

Dipl.-Chem. Patrick Knappe

**Die A4F-SAXS Online-Kopplung
zur Untersuchung von
Nanopartikeln und Polymeren**

Die vorliegende Arbeit entstand an der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

Impressum

**Die A4F-SAXS Online-Kopplung
zur Untersuchung von
Nanopartikeln und Polymeren**

2012

Herausgeber:

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
Unter den Eichen 87

12205 Berlin

Telefon: +49 30 8104-0

Telefax: +49 30 8112029

E-Mail: info@bam.de

Internet: www.bam.de

Copyright © 2012 by

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Layout: BAM-Referat Z.8

ISSN 1613-4249

ISBN 978-3-9814634-6-0

**Die A4F-SAXS Online-Kopplung
zur Untersuchung von Nanopartikeln und Polymeren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Chemie

von

Dipl.-Chem. Patrick Knappe

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Direktor und Professor Dr. habil. Andreas F. Thünemann
2. Professor Dr. Hans Börner

eingereicht: 28.11.2011

Datum der mündlichen Prüfung: 02.03.2012

"Es ist nicht genug, zu wissen, man muss auch anwenden. Es ist nicht genug, zu wollen, man muss auch tun."

Johann Wolfgang von Goethe (Wilhelm Meisters Wanderjahre)

Für Antje

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Fachgruppe für Strukturanalytik, Polymeranalytik der Abteilung Analytische Chemie, Referenzmaterialien an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung im Rahmen der Promotion an der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Mein Dank gilt meinen Kollegen an der BAM, dem BfR und meinen Freunden, die zum Gelingen dieser Arbeit in welcher Form auch immer beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater und Fachgruppenleiter Dr. Andreas Thünemann für die interessante Themenstellung, die uneingeschränkte Gesprächsbereitschaft, seine Förderung und Unterstützung und so manchen ausgegebenen Kaffee. Meinem Abteilungsleiter Prof. Dr. Ulrich Panne für die konstruktiven Diskussionen und Anregungen und auch die Starthilfe betreffs CorelDraw. Der Arbeitsgruppe um Dr. Steffen Weidner mit den Kollegen Dr. Jana Falkenhagen, Karin Böttcher, Renate Borowski, Matthias Girod, Ulf Hansen, Rosi Laging, Bianka Manger, Michael Menzel, Volker Neyen und Franziska Rudolph, der ich drei Jahre lang angehören durfte, die mich in allen Belangen stets unterstützt hat, besonders Karin an der A4F und in der die beste Arbeitsatmosphäre herrscht, die ich mir vorstellen kann. Dr. Franziska Emmerling für die immer offene Tür, ihr und den Kollegen in ihrer und der Arbeitsgruppe Synchrotronanalytik um Dr. Heinrich Riesemeier für die Unterstützung bei den Messungen am BESSY, dabei insbesondere Simone Rolf, Ralf Britzke und auch Dr. Heimo Schnablegger von der Firma Anton Paar. Den Kollegen vom BfR für die gute und konstruktive Zusammenarbeit, dabei insbesondere Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen, Dr. Birgit Niemann, Silvana Karmutzki und Linda Böhmert. Besonderer Dank auch an Sabine Tietz für die Unterstützung bei allen organisatorischen Hürden, die im öffentlichen Dienst so auftreten. Den nebenamtlichen aber trotz aller Arbeit immer hilfsbereiten Administratoren Anka Kohl und Carsten Prinz u.a. auch für die Rettung meiner Festplattendaten und den flüssigen Stickstoff. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Bürogenossen Dr. Ralf Bienert für die Unterstützung der SAXS-Messungen bei Tag und zur Not auch bei Nacht, das Bereitstellen einer guten Kaffeemaschine und seinen nicht nur bei fachlichen Fragestellungen geschätzten Rat.

Ich danke den Gutachtern und den Mitgliedern des Promotionsausschusses für ihre Expertise.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die *Online*-Kopplung der Asymmetrischen Flussfeldflussfraktionierung (A4F) mit Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) als leistungsfähiges analytisches Werkzeug vorgestellt und auf aktuelle Problemstellungen in der Nanopartikelanalytik wie auch auf Modellsysteme praxisrelevanter Polymere angewandt.

Die A4F bietet die Möglichkeit, Suspensionen oder Lösungen von Teilchen ihrer Größe nach aufzutrennen. Bedingt durch das besondere Trennprinzip werden auf den Analyten nur minimale Scherkräfte wirksam, die im Gegensatz dazu bei anderen chromatographischen Methoden in erheblichem Maße auftreten können. Dies ermöglicht auch die Bearbeitung von diesbezüglich sehr empfindlichen Proben ohne dabei deren Integrität zu manipulieren.

Die Kleinwinkelröntgenstreuung ermöglicht die zerstörungsfreie Untersuchung von Strukturmerkmalen in einer Größendomäne von etwa einem bis einhundert Nanometern. Durch die Kopplung mit A4F wird die Komplexität der ausgewählten Systeme maßgeblich verringert, die sonst aufgrund der sehr breiten Größenverteilungen der enthaltenen Teilchen schwer zu charakterisieren sind. Es konnten mit dieser Methodik detaillierte Aussagen über die Probenbeschaffenheit in Hinblick auf Teilchengestalt, -größenverteilung bzw. -konformation getroffen werden.

Die Einbindung eines Dynamischen Lichtstredetektors in den Kopplungsaufbau ließ noch weitergehende Aussagen zu. So wurde gezeigt, dass eine Nanopartikelsuspension sowohl hinsichtlich der Form, Größe und Größenverteilung der Nanopartikelkerne als auch der Stärke der Stabilisatorschicht in einem *Online*-Experiment charakterisiert werden kann. Diese Parameter sind wichtige Kenngrößen, die sowohl für die Funktionalität als auch Bioverfügbarkeit und Toxizität von Nanopartikeln maßgeblich sind und auf diese Weise zeitsparend und mit hoher Präzision erhalten werden konnten. Desweiteren wurde diese Kopplungsmethode erstmals auf verschiedene Polymersysteme, wie Polyvinylpyrrolidon sowie starke und schwache Polyelektrolyte, mit Erfolg angewendet. Durch die eingesetzte Größentrennung konnten Proben in einem sehr weiten Molmassenbereich fraktioniert werden, die häufig zu unerwünschten Wechselwirkungen in trägerbasierten Trennmethode neigen. Durch die verwendete Röntgenstreuung konnten auch Strukturdetails kleiner Polymer-Größenfraktionen aufgelöst werden, die mit üblichen Standardverfahren nicht mehr zugänglich sind.

Abstract

In the present thesis the online-coupling of asymmetric flow field-flow fractionation (A4F) with small-angle X-ray scattering (SAXS) as a versatile analytical tool is introduced and applied to current challenges in nanoparticle analysis as well as to model systems of technically relevant polymers.

The A4F provides size separation of sample solutions and suspensions. Due to the separation principle only low shear forces are applied which appear in competing methods. Therefore, this method allows processing of very sensitive sample materials.

SAXS allows non-destructive probing of nanoscale structures in the range of about one to one hundred nanometers. By coupling with A4F, the complexity of sample systems with broad size distributions, which are therefore frequently hard to characterize, is reduced significantly prior to further analysis. Applying this approach, detailed information about sample properties can be gained accurately with respect to the shape, size and size distribution of particles or conformation of macromolecules in short time.

Addition of a dynamic light scattering detector to the setup allows a further conclusion. With the latter, a nanoparticles suspension was characterized rapidly and with good precision with respect to the core properties of the particles as well as the thickness of the stabilizer's shell in a single online run. These parameters are important when dealing not only with functionality but also with the bioavailability or toxicity of nanoparticles.

This methodology was also successfully applied to polymer systems for the first time, namely poly(vinyl pyrrolidone)s as well as strong and weak polyelectrolytes. Additionally, due to the applied separation method samples with broad molar mass distributions were processable which otherwise tend to interfere with stationary phase-based chromatography. Furthermore, using SAXS, structural properties can be resolved from smaller polymer size-fractions which are hardly accessible with other standardly used methods.

Inhalt

1	Allgemeine Einleitung	
1.1	Nanopartikel.....	1
1.2	Polymere	7
1.3	Zielstellung der A4F-SAXS-Kopplung.....	8
2	Theoretischer Teil	
2.1	Feldflussfraktionierung	9
2.1.1	Einleitung.....	9
2.1.2	Aufbau der A4F	12
2.1.3	Theoretische Grundlagen der A4F.....	13
2.2	Röntgenkleinwinkelstreuung.....	22
2.2.1	Einleitung.....	22
2.2.2	Aufbau der Röntgenstreuanlage.....	24
2.2.3	Theoretische Grundlagen der Röntgenkleinwinkelstreuung.....	26
2.3	Dynamische Lichtstreuung.....	34
2.3.1	Einleitung.....	34
2.3.2	Theoretische Grundlagen der Dynamischen Lichtstreuung.....	35
3	Praktischer Teil und Diskussion	
3.1	Analytik eines Ferrofluids mittels A4F-SAXS <i>Online</i> -Kopplung und DLS ...	39
3.1.1	Einleitung.....	39
3.1.2	Material	40
3.1.3	Methoden und Durchführung.....	42
3.1.4	Ergebnisse und Diskussion	45
3.1.5	Zusammenfassung	51
3.2	Eisenoxid-Nanopartikel in Zellkulturassays	53
3.2.1	Einleitung.....	53
3.2.2	Material	55
3.2.3	Methoden und Durchführung.....	56
3.2.4	Ergebnisse und Diskussion	60

3.2.5	Zusammenfassung	72
3.3	Polystyrolsulfonate in der A4F-SySAXS <i>Online</i> -Kopplung.....	73
3.3.1	Einleitung	73
3.3.2	Material	75
3.3.3	Methoden und Durchführung.....	75
3.3.4	Ergebnisse und Diskussion.....	77
3.3.5	Zusammenfassung	86
3.4	Analyse von PVP mit breiter molarer Massenverteilung	88
3.4.1	Einleitung	88
3.4.2	Material	90
3.4.3	Methoden und Durchführung.....	90
3.4.4	Ergebnisse und Diskussion.....	91
3.4.5	Zusammenfassung	99
3.5	Polyacrylsäuresalze in der A4F-SySAXS-Kopplung	101
3.5.1	Einleitung	101
3.5.2	Material	102
3.5.3	Methoden und Durchführung.....	103
3.5.4	Ergebnisse und Diskussion.....	104
3.5.5	Zusammenfassung	110
4	Anhang	
4.1	Quellenverzeichnis	111
4.2	Verwendete Abkürzungen	120
4.3	Publikationsliste.....	122

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Nanopartikel

Historische Entwicklung der Nanotechnologie

Der Aufbau der Materie aus Elementarteilchen ist schon seit Leukipp und Demokrit vor über 2000 Jahren ein Thema, das Philosophen und Wissenschaftler intensiv beschäftigt.

Eine interessante Station auf dem Weg in immer kleinere Dimensionen blieb aber bis zum Ende der 1950er Jahre relativ unbeachtet. In seinem visionären Vortrag *“There is Plenty of Room at the Bottom: Invitation to Enter a New Field of Physics”* stellte Richard P. Feynman (Portrait Abbildung 1-1) die Frage nach einem Bereich zwischen atomaren und makroskopischen Strukturen und den neuen Möglichkeiten, die eine weitere Erschließung dieser

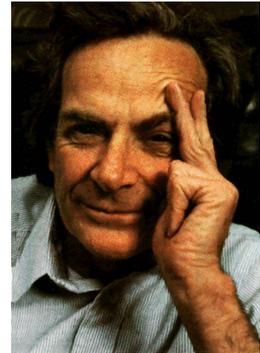


Abbildung 1-1. Richard P. Feynman: *“There is plenty of room at the bottom.”*^{1,4}

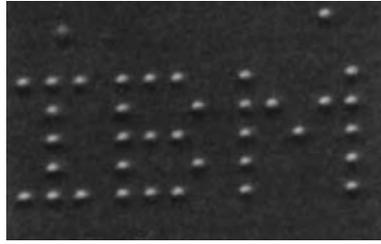
„Zwischendimension“ bieten könnte. *„(...) when we have some control of the arrangement of things on a small scale we will get an enormously greater range of possible properties that substances can have.“*¹ Diese Voraussage erfüllte sich präzise in der Form der Nanotechnologie, deren Entwicklung allerdings erst in den 1990er Jahren und besonders in der ersten Dekade des 21. Jahrhunderts stark vorangetrieben wurde.

Die Geschichte der Nanotechnik beginnt aber eigentlich schon deutlich früher, nämlich in der Glasmacherei, als man erkannte, dass Metalle wie Gold und Silber, die man Glasschmelzen zusetzte, besonders schöne und intensive Färbungen des Glases hervorriefen. Ein gut erhaltenes Exemplar dieser frühen Glasmacherkunst, der berühmte Lycurgus-Becher, datiert auf das vierte nachchristliche Jahrhundert und ist heute im Britischen Museum in London zu besichtigen.



Abbildung 1-2. Der Lycurgus-Becher, vermutlich römischer Herkunft aus dem 4. Jh. A.D.² Das sogenannte Rubinglas, aus dem der Becher gefertigt wurde, enthält Gold-Nanopartikel typischerweise in Größen von 5 bis 60 nm, die das Glas im Auflicht grün, im Durchlicht rot leuchten lassen.

Den Begriff „Nanotechnologie“ prägte der Japaner Norio Taniguchi 1974, als er Prozesse zur Abscheidung dünner Materialfilme und die Methode der Ionenstrahl-Abtragung zur Herstellung von winzigen Halbleiterstrukturen beschrieb⁶. Seine Definition lautete:



“*Nanotechnology' mainly consists of the processing of, separation, consolidation, and deformation of materials by one atom or one molecule.*”

Abbildung 1-3. 35 mittels eines Rasterkraftmikroskops positionierte Xenon-Atome auf einer Nickel-Oberfläche, die den Schriftzug „IBM“ bilden.

Zu groß war wenn auch vielleicht zweifelhafter Popularität verhalf der Nanotechnologie in den 1980er Jahren Eric Drexler, der das Konzept der „Molekularen Nanotechnologie“ (MNT) entwickelte. Drexler sah die Zukunft der Nanotechnologie darin, dass es u. a. möglich sein würde, sich selbst replizierende Roboter zu entwickeln, die auch in der Lage wären, Minimaschinen im Nanomaßstab herzustellen. Dies thematisierte er in dem Buch „*Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*“⁷, in dem er 1986 seine Idee beschrieb. Dies warf auch die mittlerweile in einigen Science Fiction Romanen^{8, 9} verarbeitete „*Grey Goo*“-Problematik¹⁰ auf, die die Vernichtung der Welt durch sich selbst unkontrolliert vermehrende Nanobots, die die gesamte Biosphäre als Ressource zur Selbstreplikation nutzen, beschreibt. Tatsächlich wurden in den 80er Jahren bahnbrechende Entdeckungen gemacht, die der Nanotechnologie wissenschaftlichen Vorschub leisteten. Etwa die Entdeckung des C₆₀-Moleküls und damit der Klasse der Fullerene durch Curl, Kroto und Smalley und die Entwicklung der Cluster-Physik, in der man die relevanten Eigenschaften von Verbänden aus 3 - 50000 Atomen oder Molekülen zu ihrer Größe in Beziehung setzt. Durch die Entwicklung des Rasterkraftmikroskops 1986 durch Binnig, Quate und Gerber¹¹ wurde es schließlich möglich, einzelne Atome zu manipulieren bzw. gezielt zu positionieren, wie es z. B. Eigler und Schweizer 1990 an Xenon-Atomen spektakulär demonstrieren konnten, die sie in Form des Firmenlogos „IBM“ anordneten (Abbildung 1-3)¹². Im Zuge dieses sogenannten *bottom-up* Ansatzes wurde demonstriert, dass sich prinzipiell auch Nanostrukturen durch gezielte Manipulation von Atomen oder Molekülen erzeugen lassen. Diese Methode ist allerdings relativ aufwändig und andere Ansätze, die beispielsweise die Selbstorganisation zu Nanostrukturen zum Ziel hatten, schienen erfolgversprechender für die breite Anwendung zu sein. So lassen sich z. B.

Kohlenstoff-Nanoröhren in hochparalleler Anordnung durch die katalytische Zersetzung von Kohlenwasserstoffen gewinnen. Die zweite Variante, die zu Nanostrukturen führt, ist der sogenannte *top-down* Ansatz. Als Beispiele seien hier die Photolithographie genannt, mit der unter anderem Wafer zur Computerchipherstellung bearbeitet werden oder das Mahlen von grob strukturierten Stoffen, die so bis in den Nanomaßstab zerteilt werden können.

Im Jahr 2004 wurde die „Nanotechnologie“ als eigenständiger Begriff schließlich in den Duden als „*Technologie, die sich mit Strukturen und Prozessen im Nanometerbereich befasst*“ aufgenommen.

Definition der Nanoobjekte

Eine heute gültige und allgemein anerkannte Definition für Nanoobjekte stammt von der International Organization for Standardization (ISO) aus dem Jahre 2008¹³, die besagt, dass von Nanoobjekten gesprochen wird, wenn mindestens eine Dimension des betrachteten Objektes kleiner oder gleich 100 nm ist. Einen Nanopartikel charakterisiert demnach, dass er in allen drei Raumdimensionen einen Durchmesser zwischen einem und einhundert Nanometern aufweist (Abbildung 1-4). Diese Definition unterscheidet nicht zwischen künstlich hergestellten und natürlich vorkommenden Nanoobjekten.

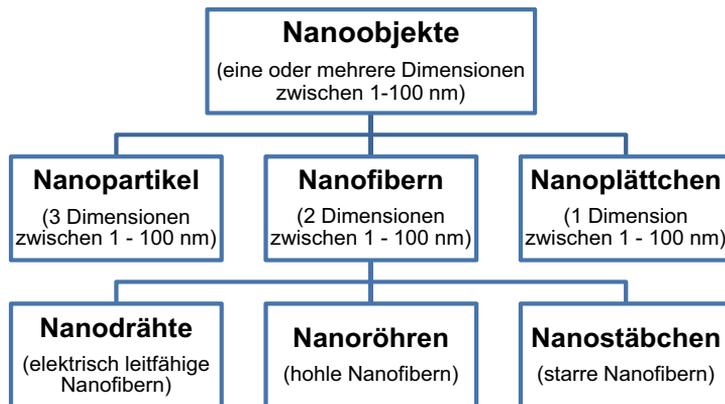


Abbildung 1-4. Definition und Unterteilung der Nanoobjekte nach ISO/TS 27687. „Ein Nanoobjekt weist in einer oder mehreren Dimensionen eine Ausdehnung zwischen einem und 100 Nanometern auf. Ein Nanopartikel hat in allen drei Raumdimensionen eine Ausdehnung zwischen einem und 100 nm.“

Nicht-anthropogene Quellen für Nanopartikel sind beispielsweise Vulkanausbrüche oder Brände. Der überwiegende Teil der Studien zu Nanoobjekten bzw. Nanopartikeln behandelt allerdings künstlich hergestellte Partikel. Wenn von „Nanopartikeln“ in dieser Arbeit gesprochen wird, sind daher künstlich hergestellte Partikel gemeint.

Einsatzbereiche und Eigenschaften von Nanopartikeln

Eine Analyse des Woodrow Wilson International Center for Scholars im Rahmen des „Project on Emerging Nanotechnologies“¹⁴ registrierte bis März 2011 weltweit mehr als 1300 verschiedene kommerzielle Produkte, die auf Nanotechnologie basieren - mit stark steigender Tendenz. Dabei fällt aktuell das Gros der Produkte (738 von 1317) in die Kategorie „Health and Fitness“, in der wiederum Körperpflege, kosmetische Produkte und Bekleidungsartikel etwa 75 % ausmachen. Immerhin 2.2 % sind als Spezialprodukte für Kinder deklariert. Knapp 30 % der Waren stammen dabei aus Europa, etwa 45 % aus den USA. Anwendungsbereiche der Nanotechnologie im Alltag in Deutschland werden auch vom Bund für Umwelt und Naturschutz (BUND) detailliert aufgelistet¹⁵.

Der aktuelle Erfolg der Nanotechnologie basiert zu großen Teilen auf den einzigartigen, neuen Eigenschaften, die Materialien erlangen, wenn sie in nanopartikulärer Form vorliegen. Viele davon gehen auf das außergewöhnlich hohe Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zurück, das stark zunimmt, wenn die Größe der Partikel einen Wert annimmt, der 100 nm oder weniger beträgt.

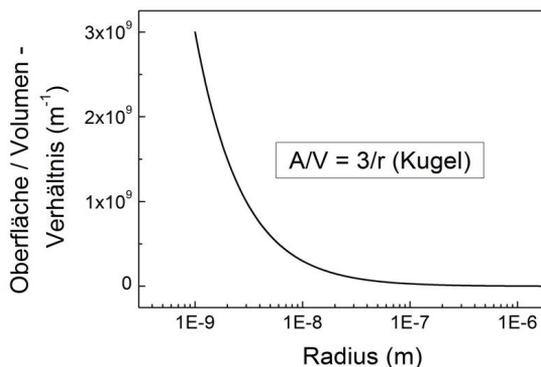


Abbildung 1-5. Illustration des Oberfläche/Volumen-Verhältnisses (A/V) am Beispiel einer Kugel in Abhängigkeit ihres Radius.

So gilt elementares Gold als chemisch nahezu inert. In nanopartikulärer Form ändern sich allerdings drastisch physikalische wie chemische Eigenschaften; es wird katalytisch aktiver und der Schmelzpunkt für Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 2 nm sinkt beispielsweise auf 327 °C¹⁶⁻¹⁸. Halbleiter-Nanomaterialien z. B. bestehend aus Cadmiumselenid, sogenannte Quantendots, zeigen größenabhängige Fluoreszenz im Nanobereich, die dadurch zustande kommt, dass Ladungsträger in den Partikeln aufgrund der geringen Größe in ihrer Bewegung eingeschränkt sind und daher nur noch diskrete Energieniveaus annehmen können. Metalle wie Kupfer, Silber und Gold zeigen als Nanopartikel in Abhängigkeit ihrer Größe und Form in Suspension eine intensive Färbung, die auf Oberflächenplasmonenresonanz-Effekte zurückzuführen ist. Titandioxid, das als Weißpigment bekannt ist, wird in nanopartikulärer Form für das sichtbare Licht nicht aber für UV-Strahlung transparent, weshalb es auch in nicht-weißelnden Sonnenschutzcremes verwendet wird. Silbernanopartikel und -fasern werden aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften bereits in Textilien, als Beschichtungen oder eingebettet in Folien zur Verpackung von Lebensmitteln verwendet. Kurzum, die Verwendung neuer Materialien und Stoffe, die auf Nanopartikeln basieren oder diese enthalten, hat insbesondere in den letzten fünf Jahren große Verbreitung in Wissenschaft, Industrie, Technik und Medizin gefunden¹⁸⁻²⁵.

Neben dem unbestreitbaren Nutzen, den die neuen Materialeigenschaften mit sich bringen, gibt es auch Bedenken in Hinblick auf mögliche Risiken, die der Einsatz von Nanopartikeln bedingt. Die Einstufung hinsichtlich Toxizität von Nanopartikeln wird aktuell anhand der Daten über die entsprechenden grob-partikulären Stoffe vorgenommen, was insofern widersinnig ist, als dass Nanopartikel ja gerade wegen ihrer neuen Materialeigenschaften hergestellt und eingesetzt werden. Diese Problematik wird ausführlicher auch in Kapitel 3.2 diskutiert.

Beide Aspekte, nutzbare und potentiell gefährliche Eigenschaften dieser neuartigen Stoffe in Form nanopartikulärer Materie, sind neben ihrer chemischen Zusammensetzung im Wesentlichen durch die Größe und die Form der Partikel bedingt. Daher ist die Kenntnis dieser Parameter für einen sowohl effektiven wie auch für einen sicheren Umgang mit nanopartikulären Stoffen unabdingbar.

Nanopartikel in Suspension in Hinblick auf Form und Größe zu charakterisieren, ist eine Herausforderung in der modernen Analytik, insbesondere dann, wenn diese nicht einheitlich (monodispers) vorliegen (siehe Abbildung 1-6).

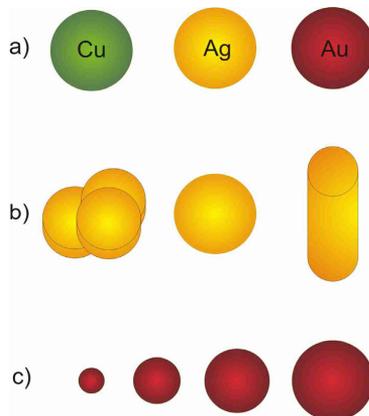


Abbildung 1-6. Illustration der Uneinheitlichkeit (Polydispersität) von Nanopartikeln in a) ihrer chemischen Zusammensetzung, b) ihrer Form und c) ihrer Größe.

In der Mehrzahl der Fälle besteht das analytische Problem darin, dass zahlreiche verschiedene Teilchengrößen vorliegen, die Probe also poly- bzw. größendispers ist²⁶. Mit Licht- bzw. Röntgenstreutechniken allein wird zwar prinzipiell ein repräsentatives Bild der Probe erhalten, da eine sehr hohe Anzahl von Teilchen gleichzeitig untersucht wird. Liegt die Probe aber nicht monodispers vor, wird es mit zunehmender Verteilungsbreite schwieriger, die gemessenen Intensitäten den einzelnen Teilchenpopulationen zuzuordnen. Da zudem der Radius der untersuchten Partikel mit der sechsten Potenz in die Streuintensität eingeht, ist ein weiteres, messtechnisches Problem, dass in einer polydispersen Probe kleine Teilchen gegenüber größeren möglicherweise unterrepräsentiert sind: Große Partikel „überstrahlen“ die kleinen Partikel durch die hohen Streuintensitäten, die sie produzieren. In der Regel gilt: Ist die Polydispersität höher als 20 % und liegen keine weiteren Informationen zur Größenverteilung vor, so sind die Interpretationen der Ergebnisse einer Untersuchung der Partikelverteilung meist nicht mehr eindeutig zu bestimmen bzw. mit inakzeptabel hohen Unsicherheiten behaftet. Um also mehr als einen Mittelwert zu erhalten, muss die Komplexität der polydispersen Probe vor der eigentlichen Messung reduziert werden.

1.2 Polymere

Eine ähnliche Problematik existiert hinsichtlich der Charakterisierung von Lösungen polydisperser Polymere. Bei nahezu jeder Polymerisationsmethode entstehen Polymerketten unterschiedlicher Länge bzw. mit unterschiedlichen Molmassen. Die wenigen Ausnahmen stellen die Proteinbiosynthese dar, bei der Proteine und Polypeptide in lebenden Zellen gebildet werden bzw. darauf basierende Verfahren zur Derivatisierung und, in der Klasse der synthetischen Polymere, die Darstellung von Dendrimeren, die aufgrund sterischer Beschränkungen meist eine einheitliche Molmasse aufweisen²⁷.

Zur Bestimmung der molaren Massen von Polymeren stehen mehrere etablierte Methoden je nach Informationsbedarf zur Verfügung. Um neben der Molmasse Parameter wie den Gyrationsradius von Polymeren in Lösung zu erhalten, werden üblicherweise Messungen mit Statischer Lichtstreuung durchgeführt. Bei polydispersen Systemen werden zudem verbreitet chromatographische Trenntechniken wie die Gelpermeationschromatographie (GPC) verwendet, die als ein Standardverfahren gilt. GPC wird dabei entweder als Relativmethode eingesetzt, über die mittels Kalibration mit bekannten Molmassenstandards die molaren Massen bestimmt werden oder in Kombination etwa mit Statischer Lichtstreuung (als Absolutmethode) durchgeführt. Trennsäulen, die in der GPC verwendet werden, enthalten eine Füllung eines porösen Trägermaterials, in dessen Poren die gelösten Teilchen in Abhängigkeit von ihrem hydrodynamischen Radius mit unterschiedlich hoher Wahrscheinlichkeit hineindiffundieren, was die verzögerte Passage dieser Teilchen bewirkt.

Die Anwendung trägerbasierter Techniken zur Auftrennung einer polydispersen Probe birgt in der Praxis zwei Gefahren. Zum einem wirken auf den Analyten starke Scherkräfte, die auf hohe lokale Strömungsgeschwindigkeiten zurückzuführen sind. Dies kann zur Auflösung von vorhandenen Aggregaten und, beispielsweise bei Polymeren mit hohen Molmassen ab Größenordnungen von 10^6 g mol^{-1} und mehr, zu Brüchen in der Molekülstruktur und dadurch zu verfälschten Ergebnissen über die vorhandenen Teilchengrößen, -massen und -verteilungen führen^{28, 29}. Zum anderen können Teile der Probe durch Vorsäulen oder Filter, die zum Schutz der Säule notwendig sind oder aufgrund von unerwünschten Adsorptionseffekten zurückgehalten werden.

Bei Absolutmessungen (die beispielsweise wünschenswert sind, wenn keine geeigneten Molmassenstandards zur Kalibration zur Verfügung stehen) durch Kombination mit Statischer Lichtstreuung bestehen aufgrund der verwendeten Wellenlänge der Lichtstredetektoren zudem Limitierungen hinsichtlich der Untersuchung kleiner Teilchen. Bei einer Teilchengröße von weniger als einem Zwanzigstel der verwendeten Wellenlänge streuen diese das Licht zunehmend isotrop, d.h. die Streuintensität des an solchen Teilchen gestreuten Lichts ist nicht mehr vom Streuwinkel abhängig.

1.3 Zielstellung der A4F-SAXS-Kopplung

Die Feldflussfraktionierung (FFF) stellt aufgrund ihres trägerfreien Trennkonzpts und der Variabilität in Bezug auf Art und Größe der Trennkraft eine anpassungsfähige und zerstörungsfreie Methode für Lösungen und Suspensionen von Partikeln und Makromolekülen dar. Bezüglich der Trennung nach Teilchengrößen, respektive Teilchenmassen, weist die FFF zudem eine wesentlich höhere Obergrenze als vergleichbare Methoden auf und ist damit in der Praxis kaum Einschränkungen bezüglich der Molmassen unterworfen.

Es existieren verschiedene Varianten der FFF, wovon die Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (hier stets als „A4F“, in der Literatur auch als „AF4“ oder „AFFFF“ bezeichnet) die momentan am universellsten einsetzbare und daher zumeist verwendete Methode darstellt.

Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung ist man in der Lage, unter anderem Größe und Form von Partikeln und Makromolekülen bis hinunter in sehr kleine Dimensionen in kurzer Zeit zu messen, die der Statischen Lichtstreuung als etablierter Standardmethode nicht mehr zugänglich sind. Proben, die Teilchen verschiedener Größe bzw. molarer Masse mit hoher Verteilungsbreite enthalten, schränken jedoch die Aussagekraft dieser Verfahren ein.

Die Kombination dieser beiden Techniken, der Feldflussfraktionierung und der Röntgenkleinwinkelstreuung, stellt somit ein interessantes Instrument dar, dessen Nutzen und Leistungsfähigkeit in dieser Arbeit anhand der Analytik von Nanopartikel-suspensionen und Polymerlösungen in Hinblick auf Partikelform, -größe und -größenverteilung bzw. Lösungsstruktur demonstriert werden soll.

2 Theoretischer Teil

2.1 Feldflussfraktionierung

2.1.1 Einleitung

Die Feldflussfraktionierung (FFF) ist eine der Chromatographie ähnliche Technik zur Trennung und Größenbestimmung von Makromolekülen, Partikel und Kolloiden in Lösung bzw. Suspension (im weiteren Text als „Teilchen“ zusammengefasst). Dazu zählen neben Polymeren und Biopolymeren vor allem Nanopartikel, Proteine und sogar ganze Zellen³⁰.

Die FFF wurde 1966 von John Calvin Giddings und seinen Mitarbeitern entwickelt^{16,31}.

Ein wesentlicher Unterschied zu verwandten Methoden wie der Größenausschlusschromatographie (SEC/GPC) oder anderen Flüssigchromatographie-Techniken, z. B. *high performance liquid chromatography* (HPLC) oder *supercritical fluid chromatography* (SFC) besteht darin, dass statt in einer Säule mit stationärer Phase die Trennung in einem offenen Strömungskanal stattfindet. Dieser Kanal hat zwei parallele Wände, typischerweise im Abstand von 50 bis 500 Mikrometern, so dass das Laufmittel bei Flussraten



Abbildung 2-1. John Calvin Giddings mit einem Kanal-Spacer in Händen. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Postnova Analytics GmbH/Landsberg am Lech.

im Bereich von Millilitern pro Minute mit einem parabolischen Strömungsprofil hindurch fließt. Die Trennung selbst wird durch ein zum Trägerstrom durch den Kanal senkrecht gerichtetes Kraftfeld oder einen Gradienten realisiert (z. B. einem elektrischen Feld, einem Schwerfeld oder einem Temperaturgradienten). Diese Eigenheit der FFF bietet zwei große Vorteile gegenüber chromatographischer Techniken mit stationärer Phase. Zum einen wirken nur sehr geringe Scherkräfte auf den Analyten. So kann sichergestellt werden, dass dieser nicht durch die Trennung manipuliert wird, was beispielsweise für Polymere mit hohen molaren Massen in der GPC/SEC auftreten kann³². Zum anderen ist die anzuwendende Trennkraft generell in weiten Bereichen

variabel, sodass eine Trennung individuell auf den Analyten abgestimmt und qualitativ wie auch vom Zeitaufwand her optimiert werden kann.

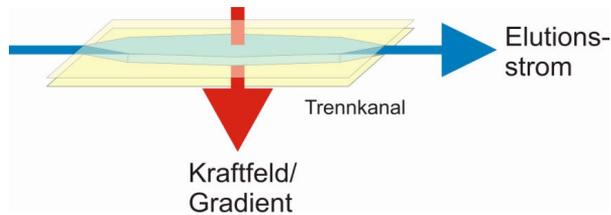


Abbildung 2-2. Darstellung des FFF-Prinzips: In einem offenen Strömungskanal wirkt die Trennkraft senkrecht zur Trägerstromrichtung auf den Analyten.

Durch das gerichtete Kraftfeld bzw. den Gradienten und die entgegen wirkende Eigendiffusion der Teilchen erreicht man eine Anordnung der zu trennenden Analytbestandteile im Kanal entsprechend seiner Wechselwirkung mit dem Trennfeld. Es bilden sich Konzentrationsregime der Teilchen aus, deren mittlerer Abstand von der Kanalwand davon abhängt, wie stark das angelegte Feld auf sie einwirkt. Von dieser Anordnung überlagert bewirkt das parabolische Strömungsprofil im Kanal während der Elution eine verschieden hohe Retentionszeit. Je nach Ausmaß der Wechselwirkung befinden sich die Analytbestandteile in bestimmten mittleren Abständen zu der Kanalober- bzw. Kanalunterseite und werden so durch die ebenfalls abstandsabhängigen Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb des Strömungsprofils langsamer (nahe der Kanalunterseite, v_{\min} in Abb. 2) oder schneller (weiter in der Kanalmitte befindlich, v_{\max}) transportiert.

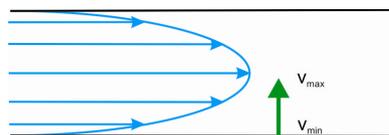


Abbildung 2-3. Schematische Darstellung der Strömungsverhältnisse in einem FFF-Kanal. Die Strömungsgeschwindigkeiten sind an der Wandober- bzw. Wandunterseite sehr klein und nehmen zur halben Kanalhöhe hin die maximalen Werte an.

Die erste FFF-Anlage, die experimentell realisiert wurde, basierte auf einem thermischen Gradienten (Thermische FFF) als Trennfeld³³⁻³⁵. Dieser Aufbau wird zum Beispiel neben der Fluss-FFF und der Sedimentations-FFF (SdFFF) bis heute verbreitet eingesetzt³⁶, wobei die Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss Fraktionierung die zur Zeit am weitesten verbreitete Methode ist. Tatsächlich wurden bereits zahlreiche weitere

Varianten der FFF mit jeweils verschiedenen zugrunde liegenden Kraftfeldern oder Gradienten realisiert, die teilweise aber auf spezielle Analyten ausgerichtet sind und daher einen eher kleinen Anwendungsbereich abdecken. Die folgende Tabelle 1 zeigt eine Auswahl von FFF-Varianten.

Tabelle 2.1-1. *Ausgewählte Varianten der FFF-Familie³⁷.*

Feld/Gradient	FFF Variante
Sedimentation	Sedimentations FFF (SdFFF)
	Schwerkraft
	Fliehkraft
Thermisch	Thermische FFF (ThFFF)
Querfluss	Fluss FFF (FIFFF, A4F)
Elektrisch	Elektrische FFF (EIFFF)
Magnetisch	Magnetische FFF (MgFFF)
Dielektrisch	Dielektrische FFF (DiFFF)

Neben den verschiedenen Trennfeldern unterscheidet man noch mehrere Betriebsarten, sogenannte Modi, nach denen die Trennung ablaufen kann. Diese sind in erster Linie abhängig von der Dimension der Teilchen. Man unterscheidet zwischen normalem, sterischem und *hyperlayer* Modus. Im normalen Modus (auch in der Literatur als Brownscher Modus bezeichnet) ist die Größe des Diffusionskoeffizienten D der Teilchen für die Trennung entscheidend. Der sterische und der *hyperlayer* Modus treten bei Teilchen auf, deren Durchmesser im Vergleich zu den Kanaldimensionen nicht mehr vernachlässigbar klein sind (siehe auch Kapitel 2.1.3). Im Prinzip kann man noch weitere Betriebsmodi aufzählen, die allerdings eher von untergeordneter Bedeutung sind. Eine detaillierte Diskussion dieser Modi erfolgt im ersten Kapitel von Giddings FFF Handbuch³⁷.

Darüber hinaus kann man noch verschiedene Subvarianten unterscheiden, die sich vor allem durch die Art der Probeninjektion, durch besondere Kanalgeometrien bzw. -ausführungen o.ä. auszeichnen, die aber für diese Arbeit keine Relevanz besitzen. Ein Überblick über die Familie der FFF findet sich unter anderem ebenfalls im erwähnten Field-Flow Fractionation Handbook³⁷ und bei Messaud *et al.*³⁸, während die am

häufigsten eingesetzten Varianten verschiedener Trennfelder (A4F, ThFFF, SdFFF) u.a. von Williams *et al.*³⁶ sehr ausführlich erläutert werden.

2.1.2 Aufbau der A4F

Das Herzstück einer A4F bildet der Trennkanal, der in die Peripherie mit Solvens- und Querflusspumpen, Injektionsventil und den entsprechenden Detektoren eingebunden ist. Der Aufbau des Trennkanals (siehe dazu Abbildung 2-4) besteht aus einem Kanalunterteil, in den eine keramische Fritte eingebettet ist. Auf dieser liegt eine Ultrafiltrationsmembran, die sogenannte Konzentrationswand oder *accumulation wall* auf, die durch die Fritte stabilisiert wird. Sowohl die Form als auch die Höhe des Kanals werden durch einen auswechselbaren Abstandhalter (*spacer*) in verschiedenen Materialstärken (meist zwischen 100 und 500 μm) bestimmt, in den auch die Form des eigentlichen Kanals eingeschnitten ist. Die verbreitetste Kanalform, die auch hier verwendet wurde, hat ein trapezoidales Design mit ungefähr 30 cm Länge und wenigen Zentimetern in der Breite und erinnert an eine gestauchte Krawatte. Auf der Injektionsseite ist der Kanal breiter und verjüngt sich etwas zum Auslass hin, was nach Wahlund *et al.* und Litzen *et al.* einen nahezu konstanten Querflussabstrom über die gesamte Länge ermöglicht^{39,40}. Es können aber prinzipiell verschiedene Formen eingesetzt werden, die in der Literatur³⁷ ebenfalls ausführlich diskutiert werden. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass eine sich exponentiell verengende Kanalform unter Umständen sogar eine effektivere Trennung als die allgemein eingesetzte trapezoidale Form ermöglichen kann⁴¹.

In das Kanaloberteil sind die Anschlüsse für den Trägerstrom, den Fokusstrom und der Auslass zu den Detektoren eingearbeitet. Träger- und Fokusfluss werden durch computergesteuerte HPLC-Pumpen in den Kanal eingebracht, der Querfluss wird mit Hilfe von Spritzenpumpen gesteuert.

In der A4F stellt der Querfluss, der senkrecht zur Trägerstromfließrichtung angelegt wird, das Trennfeld dar, das für die verzögerte Elution verschieden suszeptibler Teilchen verantwortlich ist. Der Querfluss wird realisiert, indem ein Teil des Laufmittels durch die Ultrafiltrationsmembran abgezogen wird (siehe auch Abbildung 2-5). Die Membran besteht meist aus speziell verarbeiteter regenerierter Cellulose (RC), Celluloseacetat (CA) oder Polyethersulfon (PES).

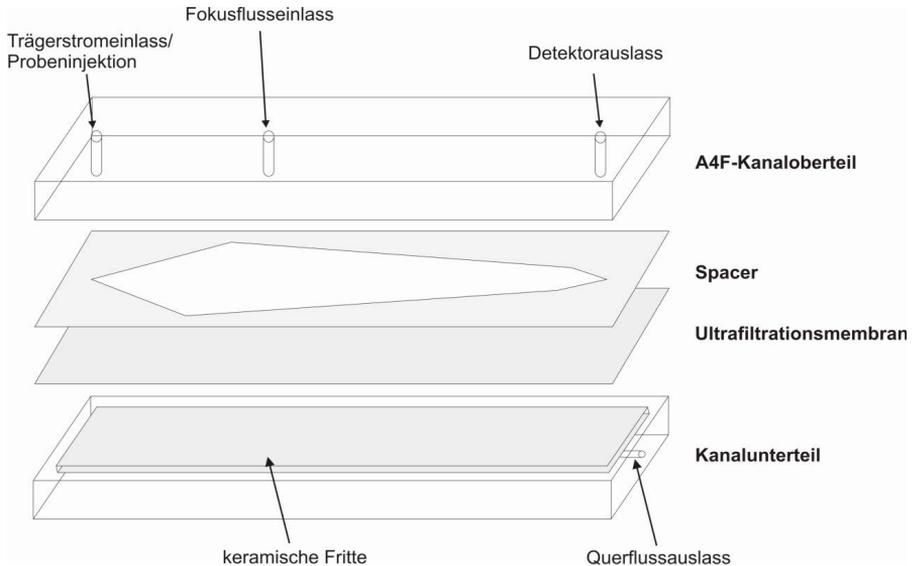


Abbildung 2-4. Schematische Darstellung des A4F-Trennkanalaufbaus: In das A4F-Kanaloberteil sind die Solvensein- bzw. Solvensauslässe für Trägerstrom und Fokusfluss eingearbeitet; die getrennten Teilchen verlassen den Kanal durch den Detektorauslass. Die Form und Höhe des eigentlichen Trennkanals werden durch den eingesetzten Abstandhalter, den spacer bestimmt. Die Ultrafiltrationsmembran verhindert das Ausschwemmen der zu trennenden Teilchen und dient als untere Begrenzung des Kanals, durch die auch der Querfluss abgezogen wird. Diese liegt zur Stabilisierung auf einer keramischen Fritte auf, die in einen Kunststoffblock eingepaßt ist.

2.1.3 Theoretische Grundlagen der A4F

Die Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (A4F) wurde im Jahre 1987 von Wahlund und Giddings⁴⁰, sowie von Granger und Dodds *et al.*⁴² als eine Variante der Fluss-FFF vorgestellt.

Der Anwendbarkeitsbereich dieser Methode umfasst einen Größenbereich von zu trennenden Teilchen von etwa einem Nanometer bis zu 100 Mikrometern oder einen Molmassenbereich bis zu $10^9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, wobei der untere Größen- bzw. Molmassenbereich von der Ausschlussgrenze der verwendeten Ultrafiltrationsmembran (typischerweise 1 bis $10\cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) begrenzt ist³⁷. Die Trennung der Partikel ist weitestgehend unabhängig von ihrer chemischen Komposition, denn sie beruht einzig auf den hydrodynamischen Eigenschaften der Probenbestandteile. Bedeutende Vorteile dieses Verfahrens sind die große Anwendungsbreite (Nano- bis Mikrometerbereich) und die äußerst niedrigen Scherkräfte, die auf den Analyten wirken, im Vergleich zu Techniken in ähnlichen Anwendungsgebieten mit stationärer Phase wie GPC/SEC³².

Dies ermöglicht die Trennung und Analytik beispielsweise von Polymeren bis hin zu sehr hohen molaren Massen oder etwa Proteinaggregaten und mit Polymeren stabilisierten Nanopartikeln ohne dabei den Analyten zu verändern. Adsorptionseffekte, die mit Probenverlust einhergehen würden, können so ebenfalls minimiert, wenn nicht ausgeschlossen werden.

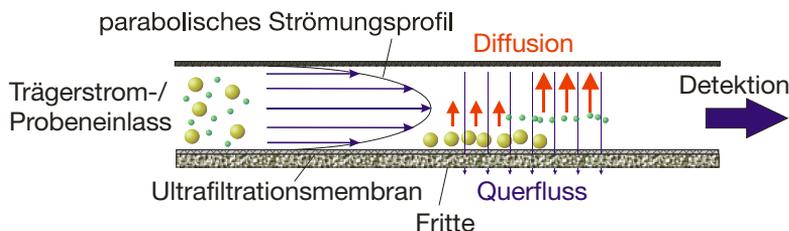


Abbildung 2-5. Schematische Darstellung des Trennkanals und des A4F-Trennprinzips: Die Teilchen werden unter dem Einfluß der Querflusskraft in Richtung der Ultrafiltrationsmembran beschleunigt. Dem entgegen wirkt die größenabhängige Eigendiffusion, sodass sich je nach Teilchengröße im Gleichgewicht der Kräfte verschiedene mittlere Abstände zur Membran hin ergeben. Dabei befinden sich kleinere Teilchen im Mittel weiter entfernt von der Membran als größere (für den Fall des normalen Elutionsmodus). Dieser Anordnung ist das parabolische Strömungsprofil im Kanal überlagert, sodass kleinere Teilchen, die sich somit in schnelleren Strömungslinien befinden, früher, größere Teilchen später eluiert werden.

Der Querfluss wird durch computergesteuerte Pumpen realisiert (man spricht von einem programmierten Fluss-Feld) und verursacht eine Beschleunigung der Teilchen in Richtung der Membran. Somit erhöht sich die Konzentration der Teilchen nahe der Membran. Eine gerichtete Gegenbewegung wird nach dem ersten Fick'schen Gesetz durch die Diffusion aufgrund des entstehenden Konzentrationsgradienten verursacht. So bilden sich im Gleichgewicht zwischen Querfluss- und Diffusionskraft verschiedene ausgedehnte Konzentrationsregime, *sample clouds*, senkrecht zur Trägerstromrichtung aus, deren mittlere Entfernung von der Membran im Kräftegleichgewicht von ihren Diffusionskoeffizienten (also auch der Teilchengröße) und der Querflussrate abhängen, mit der die Teilchen zur Membran hin beschleunigt werden.

Die Möglichkeit, den Querfluss praktisch frei zu variieren, ermöglicht individuell auf jeden Analyten zugeschnittene Trennparameter zu verwenden, um eine schnelle und optimale Trennung zu erreichen. Die Variation der Querflussstärke ist praktisch das Pendant zu verschiedenen Porengrößen in GPC Säulenfüllungen.

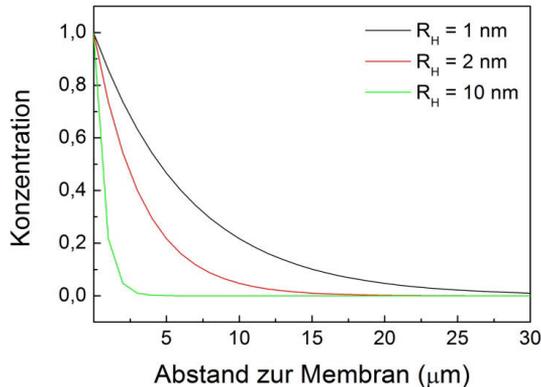


Abbildung 2-6. Verschiedene Konzentrationsgradienten im AAF-Kanal in Abhängigkeit vom Teilchenradius. Den hier dargestellten nach Formel 2.1-1 simulierten Daten liegen eine Fläche des Trennkanals von 30 cm^2 , eine Querflussgeschwindigkeit von 1 mL min^{-1} und eine Eluententemperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ zugrunde.

Wie bereits beschrieben, fließt der Trägerstrom durch den Trennkanal mit einem parabolischen Strömungsprofil, d. h. die Strömungsgeschwindigkeit nimmt in Ebenen von der Membranfläche zur Kanalmitte hin zu. Je weiter sich die Teilchen im Mittel durch Diffusion von der Membran weg bewegen können, desto schneller werden sie mit dem Trägerstrom während der Elution vorwärts durch den Kanal transportiert, was dazu führt, dass diese zuerst den Trennkanal verlassen. Dieses Szenario gilt für den normalen Modus (*normal mode*) oder synonym Brownschen Modus (*Brownian mode*), in dem die Brownsche Molekularbewegung ergo die Diffusion maßgeblich den mittleren Abstand der Teilchen von der Membran bestimmt, was im Submikrometerbereich als gegeben angenommen werden kann. Sind die Teilchen allerdings größer, dominieren zunehmend andere Effekte, die die Elutionsreihenfolge umkehren können. Dies erklärt sich zum einen daraus, dass Teilchen ab einem gewissen Durchmesser allein aufgrund ihrer Dimensionen in schnellere Strömungslinien „hineinragen“ und so schneller durch den Kanal transportiert werden, je größer sie sind. Der Diffusionskoeffizient spielt dann praktisch keine Rolle, sondern der geringstmögliche Abstand der Teilchen zur Membran bestimmt die Elutionsreihenfolge (Abbildung 2-7). Man spricht dann vom sterischen Modus (*steric mode*).

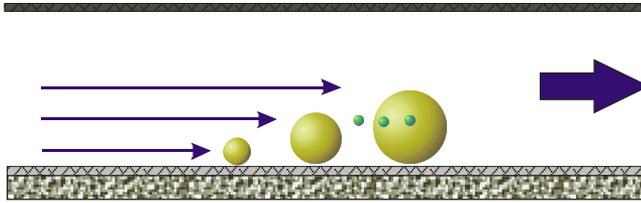


Abbildung 2-7. Auftreten des sterischen Elutionsmechanismus; die Partikel gelangen aufgrund ihres Durchmessers in schnellere Strömungslinien, die Elutionsreihenfolge kehrt sich im Vergleich zum normalen Modus um. Sind zugleich Partikel im Analyten, die im normalen Modus eluieren, so kommt es zur Koelution kleiner und großer Partikel.

Auf größere Partikel wirken durch die Strömungsverhältnisse im Kanal zunehmend Auftriebskräfte, die die Partikel weiter in Richtung der Kanalmitte beschleunigen. In diesem Fall spricht man vom sogenannten Lift- oder Hyperlayer-Modus (*lift/hyperlayer mode*, siehe Abbildung 2-8). Dies wird häufig bei hohen Trägerstromraten und vergleichsweise geringen Querflussraten beobachtet.

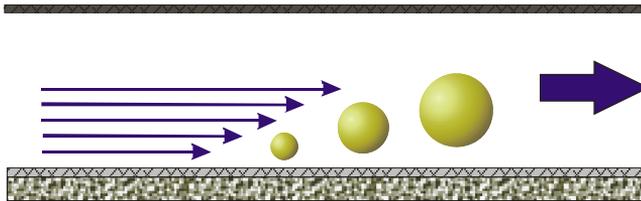


Abbildung 2-8. Illustration des Lift/Hyperlayer Modus. Durch unterschiedlich hohe Strömungsgeschwindigkeiten, die auf die einzelnen Partikel wirken, werden Auftriebskräfte ähnlich denen an einer Flugzeugtragfläche wirksam, die die Partikel in Richtung der Kanalmitte beschleunigen.

Da die beiden letztgenannten Effekte häufig unter entsprechenden Bedingungen gleichzeitig (allerdings mit unterschiedlichem Anteil) auftreten, letzten Endes jedoch den gleichen Effekt bewirken, wird in der Literatur meist von einer Kombination in Form des sterischen/hyperlayer Modus (*steric/hyperlayer mode*) gesprochen. Der Übergang vom normalen zum sterischen/hyperlayer Modus kann in einem Bereich von etwa $0.3 - 2 \mu\text{m}$ hydrodynamischem Teilchendurchmesser⁴³ beginnen aufzutreten und ist daher nicht klar abgegrenzt. Man kann ihn jedoch anhand von Experimenten bei unterschiedlichen Trennfeldstärken (Querflussraten in der A4F) und Trägerstromgeschwindigkeiten erkennen⁴⁴.

Die im Folgenden beschriebene Theorie zur Berechnung von hydrodynamischen Radien aus Retentionszeiten ist bezogen auf den Fall der Elution im normalen Modus, da dies der in dieser Arbeit maßgebliche Elutionsmodus war.

Prinzipiell können bei der A4F-Trennung die drei Phasen Injektion, Fokussierung/Relaxation und Elution unterschieden werden.

Während der Injektionsphase wird der Analyt in den Kanal über ein Injektionsventil oder einen Probenwechsler eingebracht. Um eine Diffusion entlang bzw. entgegen der Trägerstromrichtung im Trennkanal zu begrenzen, wird während dieser wie auch während der Fokussierungs- und Relaxationsphase sowohl durch den Proben- bzw. Trägerstromeinlass als auch durch einen weiteren Solvenseinlass (Fokusflusseinlass, siehe auch Abbildung 2-4) etwa in 5 cm Abstand zur Injektionsöffnung Solvens gepumpt. Währenddessen wird ein konstanter Querflussstrom, der der Summe von Injektions- und Fokusfluss angepasst ist, durch die Membran abgezogen. Dadurch wird die Probe zu einem schmalen Band, senkrecht zur Trägerstromrichtung, konzentriert.

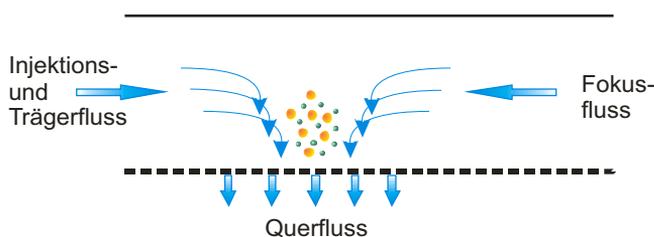


Abbildung 2-9. Die Probe wird in den A4F-Kanal injiziert, während der zusätzliche Fokusfluss, der gegen den Trägerfluss gerichtet ist, die Probenbestandteile zu einem schmalen Band konzentriert.

Prinzipiell ist der Zeitraum für die Injektion nicht begrenzt und es können auch hoch verdünnte Proben mit großen Volumina injiziert und somit *online* aufkonzentriert werden.

Nach der Injektion der Probe werden die beschriebenen Flussverhältnisse für eine gewisse Zeit weiter aufrecht erhalten. Dies ermöglicht eine Gleichgewichtseinstellung zwischen der Querflusskraft und der Eigendiffusion des Analyten und somit die Ausbildung von teilchengrößenabhängigen mittleren Abständen der Analytbestandteile zur Membran.

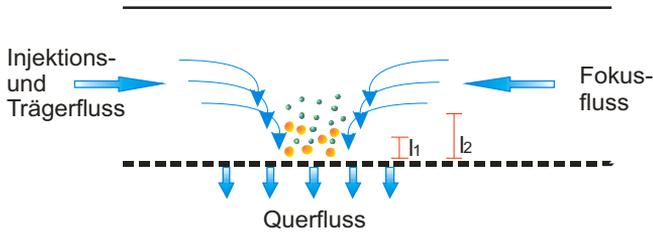


Abbildung 2-10. Relaxierte (in diesem Modellfall rein bimodale) Probe mit Partikelgrößen abhängigen mittleren Abständen (l_1, l_2) zur Membran (gestrichelte Linie).

Im Gleichgewicht bilden sich nun von der Eigendiffusion der Teilchen abhängige Konzentrationsregime aus (siehe auch Abbildung 2-6 und Abbildung 2-10), deren Konzentrationsverlauf exponentiell mit dem Abstand von der Membran abnimmt. Die höchste Konzentration an Teilchen befindet sich nahe der Membran. Die Verteilung wird beschrieben durch folgenden Zusammenhang:

$$c(x) = c_0 \cdot \exp\left(-\frac{x}{l}\right) \quad (2.1-1)$$

mit c_0 als höchster Konzentration nahe der Membran, x als der Abstand zur Membran und l als der charakteristische mittlere Abstand zur Membran von Teilchen mit gleichen hydrodynamischen Radien.

Im Wesentlichen bestimmt wird l durch den Diffusionskoeffizienten D und die Querflusskraft, die durch den Betrag der Querflussgeschwindigkeit $|U|$ beschrieben wird. Es gilt die Beziehung:

$$l = \frac{D}{|U|} \quad (2.1-2)$$

Dabei ergibt sich die Querflussgeschwindigkeit unmittelbar aus der Querflussrate in (mL min^{-1}) und der Oberfläche der Kanalmembran.

Aus Formel 2.1-2 folgt direkt der Zusammenhang zwischen Teilchengröße und mittlerem Abstand zur Membran, also der Anordnung im Trennkanal. D ist nach der Stokes-Einstein-Gleichung (Formel 2.1-3) umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Radius R_H der Teilchen, der dem Radius einer homogenen Kugel

mit gleichen hydrodynamischen Eigenschaften wie das betrachtete Teilchen (unabhängig von seiner tatsächlichen Form) entspricht.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (2.1-3)$$

Die Strömungsgeschwindigkeit des Trägerstroms hängt im A4F-Kanal vom Abstand zur Membran ab. Direkt an der Membran ist die Strömungsgeschwindigkeit nahe null und in der Kanalmitte maximal hoch. Die Strömungsgeschwindigkeit wird neben dem Abstand zur Membran auch durch die absolute Höhe des Trennkanaals bestimmt. Für die Strömungsgeschwindigkeit v im Abstand x zur Membran gilt:

$$v(x) = 6\langle v \rangle \left[\frac{x}{w} - \left(\frac{x}{w} \right)^2 \right] \quad (2.1-4)$$

Wobei w die Kanalhöhe und $\langle v \rangle$ die mittlere Strömungsgeschwindigkeit bedeuten. Formel 2.1-4 kann aus den Navier-Stokes-Gleichungen für strömende Fluide zwischen parallelen Platten hergeleitet werden³⁸.

Betrachtet man nun die mittlere Geschwindigkeit eines Analyten im Trennkanal unter dem Einfluss des Querflussfeldes im Vergleich zur mittleren Geschwindigkeit des Trägerstroms, so gelangt man zum sogenannten Retentionsverhältnis R . Es gilt also:

$$R = \frac{v_{Analyt}}{\langle v \rangle} = \frac{\langle c(x)v(x) \rangle}{\langle c(x) \rangle \langle v(x) \rangle} \quad (2.1-5)$$

Oder unter Einführung des dimensionslosen Parameters λ , als auf die Kanalhöhe normierter, charakteristischer mittlerer Abstand des Analyten l zur Kanalmembran, gilt

$$\lambda = \frac{l}{w} = \frac{D}{Uw} \quad (2.1-6)$$

Setzt man Formel 2.1-1 und 2.1-4 in 2.1-5 ein, so kann man mit λ auch schreiben:

$$R = 6\lambda \left[\coth \left(\frac{1}{2\lambda} - 2\lambda \right) \right] \quad (2.1-7)$$

In der Praxis bestimmt man die Retention R durch Vergleich der Zeit, die eine nicht-verzögert eluierende Probe (t_0) gegenüber einer, durch Wechselwirkung mit dem angelegten Fluss-Feld verzögert eluierenden Probe (t_r), zum Durchfließen des Trennkanals benötigt. R wird beschrieben als:

$$R = \frac{t_0}{t_r} \quad (2.1-8)$$

Die erhaltenen Peaks in einem FFF-Elugramm sind auch aufgrund der Diffusion der Teilchen entlang bzw. gegen die Elutionsrichtung infolge axialer Diffusion verbreitert. Typischerweise kann die Peakform in der FFF durch ein Gauß-Profil beschrieben werden. Zugrunde liegt das zweite Ficksche Gesetz, das die interstationäre Diffusion beschreibt. Für den Fall der Diffusion im eindimensionalen Fall parallel zum Trägerstrom in z-Richtung lautet es:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial z_1^2} \quad (2.1-9)$$

mit c der Konzentration, t der Zeit, D dem Diffusionskoeffizienten und $z_1 = z - v_{Zone} \cdot t$, wobei v_{Zone} die Fließgeschwindigkeit der eluierenden Teilchenwolke darstellt. Diese Differentialgleichung kann für den Fall monodisperser Teilchen der Konzentration n mit einem Gaußschen Konzentrationsprofil gelöst werden. Es ergibt sich:

$$c = \frac{n}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp \left(-\frac{z_1^2}{4Dt} \right) = \frac{n}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp \left[-\frac{(z - v_{Zone}t)^2}{4Dt} \right] \quad (2.1-10)$$

mit der Varianz $\sigma^2 = 2Dt$ ³⁷. Die Gaussche Peakform wird in der Praxis auch annähernd beobachtet, wobei nicht ideal monodisperse Proben aufgrund der Überlagerung

verschiedener Größen natürlich eine zusätzliche Verbreiterung der Elutionspeaks verursachen.

Unter den Voraussetzungen, dass es keine weiteren Wechselwirkungen zwischen den Analytbestandteilen untereinander bzw. mit der Membran gibt und das Strömungsprofil ungestört ist bzw. die Näherung unendlich breiter, paralleler Platten gilt, kann so aus den Retentionszeiten der Diffusionskoeffizient bzw. der hydrodynamische Radius der Teilchen bestimmt werden. Hierbei werden allerdings die gelegentlich nicht-idealen Verhältnisse wie zusätzliche Wechselwirkungen zwischen den Teilchen bzw. zwischen Teilchen und Membran, etwaige Turbulenzen im Trennkanal, Temperaturschwankungen etc. bei einer Trennung nicht in vollem Umfang berücksichtigt. Auch eine Überlagerung von sterischem und normalem Modus kann leicht bei alleiniger Verwendung eines Konzentrationsdetektors unerkannt bleiben. Dieser ist nach der klassischen FFF-Theorie ausreichend zur Bestimmung der Retentionszeiten und daraus der hydrodynamischen Radien. Typischerweise wird eine A4F neben Konzentrationsdetektoren (gewöhnlich wird hier der Differential-Brechungsindex oder die UV-Absorption gemessen) vor allem in Kombination mit Lichtstreuendetektoren verwendet, um die oben genannten Probleme, die zu hohen Unsicherheiten bei der Bestimmung der Partikeldimensionen führen können, zu umgehen.

In dieser Arbeit wurden Messungen ausschließlich auf der Basis weiterer angeschlossener Detektoren vor allem der Röntgenkleinwinkelstreuung aber auch der Dynamischen Lichtstreuung durchgeführt.

2.2 Röntgenkleinwinkelstreuung

2.2.1 Einleitung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (RKS oder gebräuchlicher SAXS für *Small-Angle X-ray Scattering*) ist eine Methode, die mit Hilfe von an Probenmaterial gestreutem Röntgenlicht Informationen über nanoskalige Strukturen liefert.

SAXS fällt somit in einen Anwendungsbereich, der, was die Auflösung betrifft, zwischen der Einkristall- bzw. Pulverdiffraktometrie und Lichtstreuungstechniken mit Wellenlängen etwa im Bereich des sichtbaren Lichts angesiedelt ist (Abbildung 2-11).

Die Größendomäne, die mit SAXS erschlossen werden kann, liegt etwa zwischen einem und einhundert Nanometern. SAXS ist somit geeignet, beispielsweise Polymere, Proteine und Nanopartikel untersuchen zu können. Vor allem die Teilchensymmetrie (kugelförmig, lamellar, zylindrisch) und -größe bzw. Größenverteilung kann anhand von SAXS-Daten bestimmt werden. Aber auch die innere Struktur, zum Beispiel ein Kern-Schale-Aufbau von Partikeln oder etwa Konformationen von Polymeren bzw. Biopolymeren (beispielsweise der Faltungszustand von Proteinen) werden zugänglich,

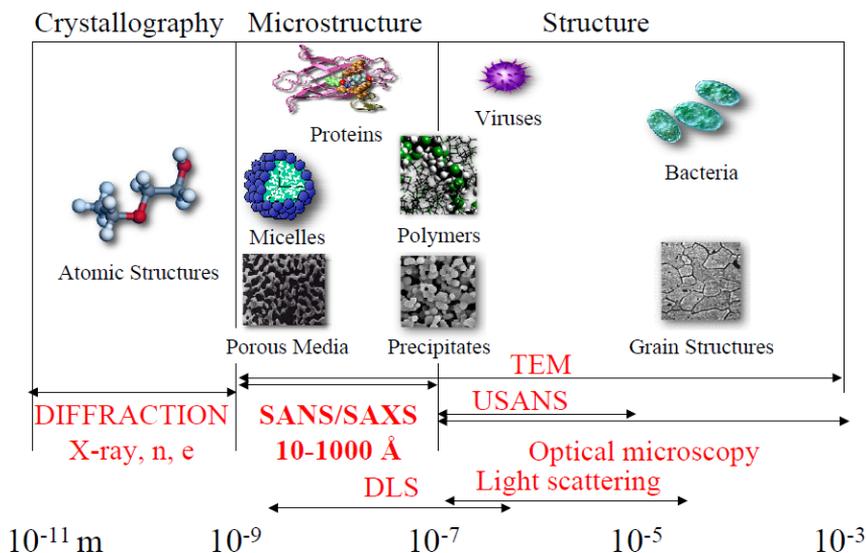


Abbildung 2-11. Anwendung verschiedener Verfahren zu Strukturuntersuchungen im Bereich von Pico- bis Millimetern. Die Abbildung ist einem Lehrvortrag von E. Gilbert entnommen⁸⁵.

wie auch die spezifische Oberfläche, mittels der Aussagen über die Porosität eines Materials getroffen werden können.

Die Röntgenkleinwinkelstreuung bietet dabei einige Vorteile, auch gegenüber elektronenmikroskopischen Techniken, die auch den SAXS-Bereich erfassen. Es ist in der Regel nur eine minimale Probenpräparation nötig: Eine Lösung oder Suspension kann bei Raumtemperatur quasi *in situ* in einer Probenkapillare gemessen werden, wobei das benötigte Volumen bei Suspensionen oder Lösungen etwa 50 µl beträgt. Es können neben letztgenannten Probenformen auch Folien, Dünnschnitte, Filme oder Pulver untersucht werden. Die Methode liefert Informationen über das gesamte Probenensemble in Sekunden bis Minuten und ist im Normalfall zerstörungsfrei, d.h. weitere Untersuchungen der unveränderten Probe sind in fast allen Fällen möglich. Die Struktur von Proteinen, die keine Einkristalle bilden und aufgrund ihrer hohen molaren Massen beispielsweise auch der NMR-Spektroskopie nicht mehr zugänglich sind, kann mittels SAXS aufgeklärt werden⁴⁶. Zudem werden die Teilchen in der Probe komplett durchstrahlt, so dass auch Informationen über den inneren Aufbau erhalten werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendbarkeit von SAXS sind Elektronendichteunterschiede, die in dem genannten Größenregime auftreten. Die Elektronendichtekontraste zwischen Analyt und dem umgebenden Medium sind maßgeblich für die entsprechenden Signalintensitäten (man spricht bei SAXS daher auch vom Streukontrast). Dies kann auch ausgenutzt werden, um mit Polymeren stabilisierte Nanopartikel zu untersuchen (wie in Kapitel 3.1 noch gezeigt werden wird), da bei genügend hohen Ordnungszahlen des Partikelkernmaterials die Polymerhülle nur vernachlässigbar wenig zur detektierten Intensität beiträgt und somit der anderweitig messtechnisch schwer zugängliche Kern ohne Berücksichtigung der Hülle erfasst werden kann. Es besteht ferner auch die Möglichkeit, durch Variation des Dispersions- oder Lösungsmittels (z. B. durch Arbeiten mit verschiedenen hoch konzentrierten Zuckerlösungen), beispielsweise bei Copolymeren, Teile der Strukturen auszublenden (*contrast variation* oder *contrast-matching* genannt; dies wird allerdings häufiger bei der sehr nah verwandten Neutronenkleinwinkelstreuung, SANS, eingesetzt), um so detailliertere Informationen zu gewinnen.

Das Phänomen der Röntgenkleinwinkelstreuung wurde in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts von André Guinier erkannt⁴⁷⁻⁴⁹. Guinier untersuchte Metalllegierungen mittels Röntgenbeugungsexperimenten und fand neben den typischen Reflexen der Metallgitter diffuse Streifen von gestreuten Röntgenstrahlen, die nach seiner

Interpretation von Gruppen von Kupferatomen stammten, die in 10 - 40 nm großen Domänen angeordnet waren⁵⁰. In den folgenden 1940er und 50er Jahren haben neben Anderen insbesondere Otto Kratky,^{48, 51-53} Günther Porod⁵⁴⁻⁵⁷ und Peter Debye⁴⁷ wichtige Beiträge zur Entwicklung der Theorie und Anwendung der Röntgenkleinwinkelstreuung geleistet und somit praktisch den Grundstein für aktuelle Anwendungen gelegt. Kratky entwickelte unter anderem den nach ihm benannten Aufbau eines Röntgenkleinwinkelstroms mit Spaltkollimation und kurzem Probe-Detektor-Abstand, die sogenannte Kratky-Kamera, nach deren Vorbild bis heute SAXS-Geräte gefertigt werden.

2.2.2 Aufbau der Röntgenstreuungsanlage

Das verwendete Gerät SAXSess der Firma Anton Paar (Österreich) ist eine solche sogenannte Kratky-Kamera. Diese ist aufgrund ihres Aufbaus mit Spaltfokuss und kurzem Probe-Detektor-Abstand besonders für schwach streuende Proben geeignet. Durch den Spaltfokus kann im Vergleich zu punktfokussierenden Systemen ein deutlich größeres Probenvolumen durchstrahlt werden. Typischer Strahlquerschnitt in einem spaltfokussierenden System beträgt $20 \times 0.3 \text{ mm}^2$ und es steht eine ungleich höhere Intensität (etwa um Faktor 50 bis 100) im Vergleich zu punktkollimierenden Systemen, die mit um die $0.3 \times 0.3 \text{ mm}^2$ Strahlquerschnitt arbeiten, zur Verfügung. Ein zusätzlicher Intensitätsgewinn (etwa Faktor 10) wird durch den kleinen Probe-Detektor-Abstand von 309 mm erreicht.

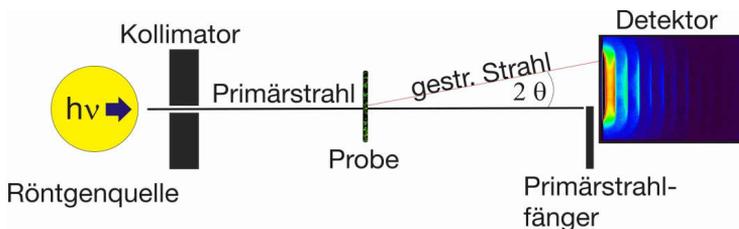


Abbildung 2-12. *Prinzipieller Aufbau eines SAXS-Experiments. Das monochromatische, ggf. fokussierte Röntgenlicht wird durch den Kollimator auf ein nahezu paralleles Strahlenbündel begrenzt. Im Strahlengang befindet sich die Probe, an der ein Teil der Strahlung gestreut wird. Nicht gestreute Strahlung wird durch den Primärstrahlfänger geblockt. Das vergleichsweise schwache Streulicht wird mittels CCD-Detektor detektiert (auch als Detektoren kommen lichtempfindliche Photoplatten oder Proportional-Zähler in Frage, wurden hier aber nicht eingesetzt).*

Dies zusammen verkürzt insbesondere die nötigen Messzeiten signifikant um demnach bis zu Faktor 1000 im Vergleich zu einem System mit Punktfokus und vergleichbarer Röntgenquelle.

Das Streubild von spaltkollimierten Systemen kann praktisch als eine Überlagerung vieler punktförmiger Strahlquellen behandelt werden. Unter Kenntnis des vorher zu messenden Strahlprofils wird diese Überlagerung oder „Verschmierung“ bei der Datenauswertung zurückgerechnet oder synonym „entschmiert“⁵⁸.

Der schematische Aufbau der Kratky-Kamera ist vereinfacht in Abbildung 2-12 dargestellt. Als Röntgenquelle dienten in dieser Arbeit entweder eine Röntgenröhre mit Kupferanode, die mit 2 kW Leistung (40 kV bei 50 mA) betrieben wurde oder die Beamline eines Synchrotron. Im Falle der Röntgenröhre wurde das emittierte Röntgenlicht mit Hilfe einer Nickelfolie gefiltert, um die emittierte kontinuierliche Bremsstrahlung und die Cu-K β -Line zu eliminieren und so nahezu monochromatisches Licht (Cu-K α) zu erhalten. Im Falle des Synchrotrons wurden spezielle Röntgenoptiken verwendet, um monochromatische Strahlung zu selektieren. Mit Hilfe eines Kollimatorblocks wird ein eng begrenzter Primärstrahl mit definierter Geometrie erzeugt, der im evakuierten Gerät durch die Probe fällt. An dieser wird das Röntgenlicht teilweise gestreut. Durch Dunkel-, Leer- bzw. Lösungsmittelmessungen wird der Streuhintergrund, der nicht von der eigentlichen Probe sondern vom Hintergrundrauschen des Detektors (Dunkelmessung), der Streuung an der Probenhalterung, -kapillare (Leermessung) und des reinen Lösungsmittels rührt, festgestellt. Diese werden bei der Datenauswertung benötigt und dort von den Messdaten abgezogen. Der Primärstrahlfänger blockt den Anteil ungestreuten Röntgenlichts. Dies ist zwingend nötig, um den Detektor nicht zu überlasten und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber des verhältnismäßig geringen Anteils der Streustrahlung zu gewährleisten. Dieses Streulicht wird bei dem verwendeten Aufbau mit einem mar[®] CCD-Detektor registriert, der die Intensität der einfallenden Strahlung anhand freigesetzter Ladungen in einem Halbleitermaterial orts aufgelöst messen kann.

2.2.3 Theoretische Grundlagen der Röntgenkleinwinkelstreuung

Bei der hier betrachteten Streuung von monochromatischem und kohärentem Röntgenlicht handelt es sich um elastische (Thomson-) Streuung an - bei dem typischerweise verwendeten Wellenlängenbereich (in den meisten Fällen CuK_α -Strahlung mit $\lambda = 0.154 \text{ nm} \approx 8 \text{ keV}$) - quasi-freien Elektronen. Man spricht in diesem Zusammenhang von „quasi-freien“ Elektronen, weil die Anregungsenergien durch das Röntgenlicht deutlich größer als die Bindungsenergien der Elektronen sind.

Die als ebene Welle einfallenden Röntgenphotonen wechselwirken mit den Elektronen der Probenmoleküle und regen diese zu Schwingungen mit gleicher Frequenz an. In der Folge emittieren diese wiederum Photonen mit der Wellenlänge der einfallenden Strahlung (daher „elastische“ Streuung) in Form von Kugelwellen (sog. Hertzsche Dipolstrahlung), die im Detektor miteinander interferieren können. Inkohärente (Compton-) Streuung tritt zwar auf, ist aber bei kleinen Winkeln aufgrund der nur geringen Intensität zu vernachlässigen.

Die Intensität der Sekundärstrahlung, die ein derart angeregtes Elektron abstrahlt, wird mit Hilfe der Thomson-Formel beschrieben:

$$I(\theta) = I_0 \cdot 7.9 \cdot 10^{-26} \cdot \frac{1}{R^2} \cdot \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \quad (2.2-1)$$

Hierbei stehen I_0 für die Intensität der einfallenden Strahlung, der numerische Term beziffert den quadrierten sogenannten klassischen Elektronenradius (in der Einheit [cm]) oder auch Streuquerschnitt des einzelnen Elektrons genannt, R (in [cm]) gibt den Abstand zwischen Probe und Detektor an und als 2θ bezeichnet man den Streuwinkel. Der winkelabhängige Term in Formel 2.2-1 wird auch als Polarisationsfaktor bezeichnet (dieser kann für kleine Winkel als eins gesetzt werden, da $\cos^2 2\theta$ ($\theta \ll 1$) ≈ 1).

Bei Streuphänomenen von elektromagnetischen Wellen gilt das Reziprozitätsprinzip (siehe auch die folgende Abbildung 2-13), d.h. je größer die beobachteten Strukturen im Verhältnis zur Wellenlänge der anregenden Strahlung sind, unter desto kleineren Beugungswinkeln werden Streueffekte beobachtet.

Dies limitiert auch den Größenbereich von Teilchen, die mit der Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht werden können, da vor allem aus praktischen

Gründen (der Primärstrahl, also das nicht gestreute Röntgenlicht, muss durch einen Primärstrahlfänger abgetrennt werden) gestreute Strahlungsanteile nicht unter beliebig kleinen Winkeln detektiert werden können (die Gerätespezifikationen lassen in diesem Falle Winkel bis etwa 0.05° zu).

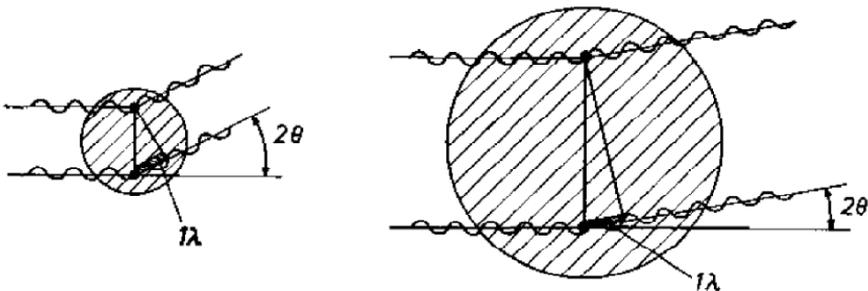


Abbildung 2-13. Illustration des Reziprozitätsprinzips für Streuung an kleinen und größeren Teilchen: Ein Signal am Detektor ist nur dort zu messen, wo es nicht zur Auslöschung des gestreuten Röntgenlichts kommt. Bei kleinen Abständen der Streuzentren (links im Bild) ist dies erst bei größeren Streuwinkeln (2θ) der Fall als bei größeren Abständen der Streuzentren (rechts). Die Intensität nimmt zu, je mehr die Wellen in Phase schwingen, somit wird die höchste Intensität theoretisch am Nullwinkel der Streuung erreicht (experimentell ist die Streuung bei einem Streuwinkel von 0° nicht zugänglich, da diese mit dem Primärstrahl zusammenfällt). Abbildung ist entnommen aus [48].

Nach Guinier können in ausreichend verdünnten Lösungen die streuenden Teilchen vereinfacht als isoliert voneinander angesehen und deren emittierte Einzelstreuintensitäten einfach aufaddiert werden (verdünnt heißt in diesem Zusammenhang, dass der mittlere Abstand zwischen den Teilchen groß gegenüber der verwendeten Wellenlänge ist). Das heißt, es werden lediglich die Interferenzmuster der von einzelnen Partikeln ausgehenden Streustrahlung beobachtet. Diese Streustrahlung wird in Abhängigkeit des Streuwinkels detektiert und es werden Daten erhalten, die den Intensitätsverlauf der Streustrahlung gegen den Streuwinkel zeigen.

Um den Vergleich von Streukurven, die mit Röntgenstrahlung unterschiedlicher Wellenlänge gemessen wurden zu erleichtern, wird der Streuwinkel in der Praxis auf die Wellenlänge normiert und man verwendet den sogenannten Streuvektor q .

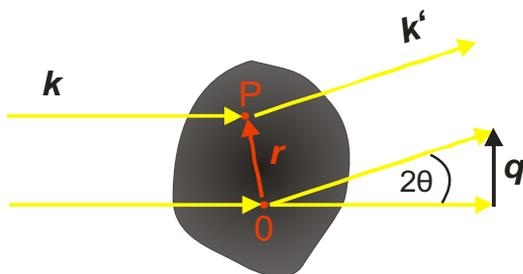


Abbildung 2-14. Definition des Streuvektors q : Der Streuvektor ergibt sich als die Differenz zwischen einfallendem und gestreutem Anteil des Röntgenlichtes. Es gilt $(\mathbf{k}' - \mathbf{k}) = \mathbf{q}$. Der Streuwinkel ist definiert als 2θ . Der Vektor \mathbf{r} in der Abbildung definiert den räumlichen Abstand zwischen zwei (punktförmigen) Streuzentren O und P .

Dieser definiert sich als die Differenz zwischen dem Wellenvektor k der einfallenden und k' dem der unter dem Winkel 2θ gestreuten Strahlung (Abbildung 2-14, Formel 2.2-2). q hat typischerweise die Einheit $[\text{nm}^{-1}]$ und spannt den sogenannten reziproken Raum auf. Realer und reziproker Raum sind über die mathematische Operation der Fouriertransformation eindeutig miteinander verknüpft, wie im folgenden noch gezeigt wird.

$$(\bar{k}' - \bar{k}) = \bar{q}; \quad |\bar{q}| = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (2.2-2)$$

Die maximalen Abstände D zwischen zwei Streuzentren, die noch aufgelöst werden können, ergeben sich durch die Berücksichtigung der Bragg-Gleichung $\lambda = 2 \cdot D \cdot \sin \theta$ mit Formel 2.2-2 zu $D_{\max} = \pi/q_{\min}$ mit q_{\min} als den kleinsten, apparativ zugänglichen q -Wert (dieser ist im Detail noch individuell vom verwendeten Gerät und dessen Justage abhängig).

Da die gestreuten Wellen kohärent sind, haben sie die gleiche Amplitude und unterscheiden sie sich lediglich in ihrer Phase φ . Beschreibt man die Streuwellen in der Form $\psi = e^{i\varphi}$, so beträgt der Gangunterschied zwischen zwei Streuwellen (siehe Abbildung 2-14, Streuzentren O - P) mit dem Streuvektor q : $\varphi = -qr$. Die resultierende Amplitude ergibt sich theoretisch aus der Summe aller gestreuten Wellen $\psi = e^{-iqr}$. Betrachtet man nun die Streuung an einer Vielzahl von Elektronen, ist es zweckmäßig, die Elektronendichteverteilung $\rho(r)$ mit dem Ortsvektor r einzuführen. Ein betrachtetes

Volumenelement enthält an der Position r $\rho(r)dV$ Elektronen. Die resultierende winkelabhängige Streuamplitude $F(q)$ der Sekundärwellen über das gesamte Streuvolumen beträgt somit:

$$F(q) = \int_V \rho(r) e^{-iqr} dV \quad (2.2-3)$$

Die Streuamplitude $F(q)$ kann daher als die Fouriertransformierte der Elektronendichteverteilung $\rho(r)$ im streuenden Objekt beschrieben werden. Die, im Gegensatz zur Streuamplitude, beobachtbare Streuintensität $I(q)$ wird erhalten durch Multiplikation mit der konjugiert komplexen der Streuamplitude, $F(q)^*$. Somit ist $I(q)=F(q)F(q)^*$. Mit Formel 2.1-13 ergibt sich:

$$I(q) = FF^* = \int_{V_1} \int_{V_2} \rho(r_1)\rho(r_2) e^{-iq(r_1-r_2)} dV_1 dV_2 \quad (2.2-4)$$

Hierin ist der Term $(r_1 - r_2)$ im Exponenten als mittlerer Abstand zwischen zwei Streuzentren zu verstehen.

Integriert man in Formel 2.2-4 in einem ersten Schritt über alle gleichen relativen Abstände ($r = r_1 - r_2 = \text{konstant}$), so erhält man die sogenannte Autokorrelationsfunktion (das Faltungsquadrat), die auch als Patterson-Funktion bekannt ist:

$$\bar{\rho}^2(r) = \int_{V_1} \rho(r_1)\rho(r_2) dV_1 \quad (2.2-5)$$

In einem zweiten Schritt integriert man nun über alle relativen Abstände der Streuzentren und gelangt so zur Streuintensität $I(q)$ als Fouriertransformation der Autokorrelationsfunktion:

$$I(q) = \int_V \bar{\rho}^2(r) e^{-iqr} dV \quad (2.2-6)$$

Unter der Annahme, dass sich das betrachtete System im Mittel isotrop verhält, also eine homogene Elektronendichteverteilung der Teilchen vorliegt, kann nach Debye⁵⁹

statt dem Phasenfaktor e^{-iqr} der entsprechende Mittelwert des Phasenfaktors („Debye-Faktor“) verwendet werden; damit kann man Formel 2.2-6 auch folgendermaßen beschreiben:

$$I(q) = \int 4\pi r^2 \bar{\rho}^2(r) \frac{\sin qr}{qr} dr \quad (2.2-7)$$

wobei gilt: $\langle e^{-iqr} \rangle = \sin qr / qr$. Unter der Voraussetzung, dass keine Fernordnung im betrachteten Streuvolumen V vorhanden ist, was für genügend verdünnte Systeme als gegeben angesehen werden kann, nimmt die Elektronendichte für große Werte von r , also große Abstände, einen konstanten Grenzwert $\bar{\rho}$ an. Die Autokorrelationsfunktion (Formel 2.2-5) strebt somit gegen $V\bar{\rho}^2$ und das Maximum der Funktion liegt bei $\bar{\rho}^2(r=0) = V\langle \rho^2 \rangle$. Daher ist es sinnvoll, stattdessen die Elektronendichteänderung $\eta = \rho - \bar{\rho}$ im System zu betrachten. Die Autokorrelation kann damit beschrieben werden als:

$$\bar{\eta}^2 = \langle (\rho - \bar{\rho})^2 \rangle = \bar{\rho}^2 - V\bar{\rho}^2 = V\gamma(r) \quad (2.2-8)$$

mit der Korrelationsfunktion $\gamma(r)$, die Werte zwischen 1 ($r=0$) und 0 ($r \rightarrow \infty$) annehmen kann und ein Maß für die (mittlere) Dimension der Elektronendichteinhomogenität ist⁶⁰. Mit der Korrelationsfunktion $\gamma(r)$ nimmt Formel 2.2-7 die Form

$$I(q) = V \int 4\pi r^2 \gamma(r) \frac{\sin qr}{qr} dr \quad (2.2-9)$$

an. Die Korrelationsfunktion $\gamma(r)$ lässt sich direkt aus den ermittelten Streuintensitäten berechnen. Führt man eine inverse Fouriertransformation (IFT) in 2.2-9 durch, lässt sich $\gamma(r)$ angeben als

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) \frac{\sin qr}{qr} dq \quad (2.2-10)$$

Aus dieser lassen sich auch intuitiv strukturelle Merkmale ableiten, wenn man berücksichtigt, dass $\gamma(r)$ außerhalb des betrachteten Partikels (r größer als der Partikeldurchmesser) auf Null absinken muss. Sie steht in engem Zusammenhang mit der Abstands- oder Paarverteilungsfunktion (pair distance distribution function, PDDF, $P(r) = r^2\gamma(r)$), die zur Auswertung von SAXS-Daten herangezogen werden kann⁴⁷. Die PDDF zeigt die Häufigkeit der Abstände zwischen streuenden Elektronen der Probeteilchen; Größe und Form der Teilchen lassen sich daher daraus ableiten.

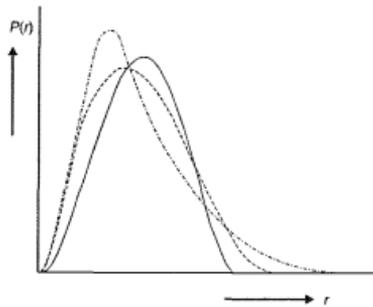


Abbildung 2-15. Abstandsverteilungen für unterschiedliche Partikelformen: Kugeln (durchgezogene Linie), prolate Ellipsoide (Striche) und oblate Ellipsoide (Punkt-Strich-Linie). Abbildung ist entnommen aus [61].

Die beschriebenen Zusammenhänge lassen sich im *magic square of scattering* (auch beschrieben in Stribeck⁶² Kap. 2.5 S. 13) zusammenfassend darstellen (siehe auch Abbildung 2-16). Die Elektronendichteverteilung $\rho_{el}(r)$ ist gleich der Fouriertransformierten der Streuamplitude $F(q)$. Letztere lässt sich nicht direkt messen, sondern nur deren Betragsquadrat die Streuintensität $I(q)$ ist durch eine Messung zugänglich. Dieser Sachverhalt ist auch als das Phasenproblem bekannt, da bei der Messung von $I(q)$ die Phaseninformation der Streuamplitude verloren geht.

$$\begin{array}{ccc}
 \rho_{el}(r) \stackrel{\mathbb{F}}{\Leftrightarrow} F(q) & & \\
 *^2 \downarrow & \downarrow & |^2 \\
 \gamma(r) \stackrel{\mathbb{F}}{\Leftrightarrow} I(q) & &
 \end{array}$$

Abbildung 2-16. Das „magic square of scattering“ illustriert die Zusammenhänge zwischen der Elektronendichteverteilung ρ_{el} , deren Faltungsquadrat ($*^2$) der Korrelationsfunktion $\gamma(r)$ und der (direkt beobachtbaren) Streuintensität $I(q)$ als Betragsquadrat ($| \cdot |^2$) der Streuamplitude $F(q)$.

Betrachtet man die Streuung (nach Formel 2.2-9) für $q = 0$, so sind alle Sekundärwellen miteinander in Phase. Der Phasenfaktor (gemäß Formel 2.2-7) nimmt dabei den Wert 1 an. Da die gestreute Strahlung dabei in die gleiche Richtung wie die Primärstrahlung ausgesendet wird, kann man diese nicht direkt messen, sondern man muss die erhaltene Streukurve $I(q)$ mit q -Werten > 0 auf q_0 extrapolieren. $I(q=0)$ ist dabei proportional zum Quadrat aller streuenden Elektronen der Probe, was bei der Messung in absoluten Intensitäten (bei Kenntnis der exakten Konzentration) die Bestimmung von Molmassen ermöglicht.

Für $r = 0$ in $\gamma(r)$ erhält man den Ausdruck:

$$V\gamma(0) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) dq = V \langle \eta^2 \rangle \quad (2.2-11)$$

$\gamma(r)$ ist direkt proportional zum Mittel der quadrierten Elektronendichteänderung η . Dabei kommt dem Integral in obigem Ausdruck besondere Bedeutung zu. Da der Ausdruck unabhängig von der Form der streuenden Teilchen, sondern proportional zum Quadrat der Anzahl der Elektronen der Probe ist, wird das Integral auch als Invariante Q bezeichnet (siehe Formel 2.2-12), über die z. B. das Partikelvolumen modellfrei aus den experimentell erhaltenen Streudaten ermittelt werden kann.

$$Q = \int_0^\infty q^2 I(q) dq \quad (2.2-12)$$

Eine weitere wichtige Größe, die direkt aus den Streudaten ermittelt werden kann, ist der sog. Streumassenradius R_G . Der Streumassenradius ist definiert als die Wurzel aus

dem mittleren Abstandsquadrat aller Elektronen zu ihrem Schwerpunkt und stellt somit das Pendant zum Trägheitsradius in der Mechanik dar. Der Streumassenradius kann durch grafische Auftragung des Logarithmus der Intensität $\log I(q)$ über q^2 , dem sog. Guinier-Plot, aus dem vorderen Teil der experimentellen Streukurve bestimmt werden für den gilt: $0 < q < 1.3 R_G$. Aufgrund dessen wird auch vom Guinier-Radius gesprochen. Ist die Form der Partikel bekannt, kann aus dem Guinier-Radius der geometrische Radius der Teilchen berechnet werden, so gilt z. B. für eine homogene Kugel mit Radius r der Zusammenhang:

$$R_G = \sqrt{\frac{3}{5}} \cdot r \quad (2.2-13)$$

Durch die Extrapolation des vorderen Teils der Streukurve im Guinier-Plot auf $I(q=0)$ kann bei Messung von absoluten Intensitäten analog zur Lichtstreuung auch die molare Masse der Teilchen bestimmt werden.

Um gegebenenfalls detailliertere Informationen aus den Streudaten abzuleiten, bedient man sich typischerweise spezieller Modelle, die dem gemessenen Interferenzmuster angepasst werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Anpassungen werden im Praktischen Teil der Arbeit vorgestellt und diskutiert.

2.3 Dynamische Lichtstreuung

2.3.1 Einleitung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS), auch Quasi-elastische Lichtstreuung (QELS) oder Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) genannt, ist ein Verfahren zur Bestimmung der hydrodynamischen Radien R_H von kolloidalen Teilchen wie zum Beispiel Polymeren und Nanopartikeln vom Nanometer- bis in den Mikrometerbereich. Grundlage ist die Brownsche Molekularbewegung der gelösten bzw. suspendierten Teilchen einer Probe. Vereinfacht ausgedrückt bewegen sich größere Teilchen aufgrund ihres kleineren Diffusionskoeffizienten langsamer als kleinere Teilchen. Die Probe wird mittels eines Lasers mit großer Kohärenzlänge (monochromatische Strahlung mit fester Phasenbeziehung) bestrahlt und die Intensität des Streulichts bei einem bestimmten Streuwinkel mit hoher Zeitauflösung gemessen. Aufgrund der ungerichteten Eigenbewegung der Teilchen schwankt die messbare Intensität von Messpunkt zu Messpunkt umso mehr, je schneller sich die Teilchen bewegen und sich die „Streusituation“ verändert. Der prinzipielle Aufbau eines DLS-Experiments ist in Abbildung 2-17 dargestellt.

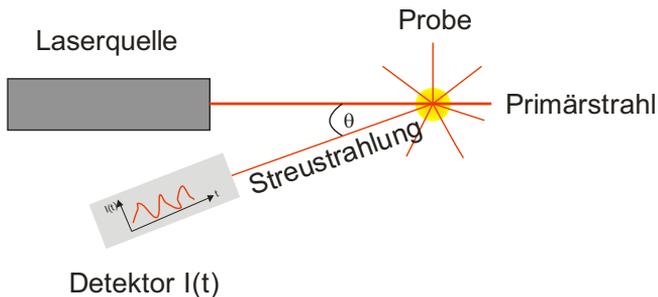


Abbildung 2-17. Schematischer Aufbau eines DLS-Experiments. Die Probe wird von einem Laser durchstrahlt und das (Rück)Streulicht wird zeitaufgelöst detektiert.

2.3.2 Theoretische Grundlagen der Dynamischen Lichtstreuung

Durch die Streuung des Laserlichtes an den sich bewegenden Teilchen, die in der Folge ihrer Eigenbewegung Konzentrationsschwankungen im betrachteten Streuvolumen verursachen, kommt es zu sich verändernden Interferenzmustern mit wechselnder Intensität, die zeitabhängig detektiert wird (siehe Abbildung 2-18).

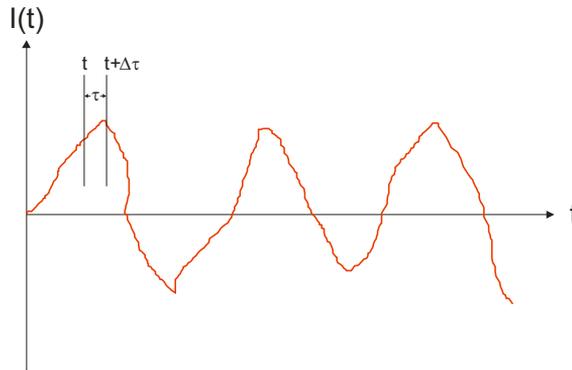


Abbildung 2-18. Schematische Darstellung der zeitabhängigen Intensität einer DLS-Messung. Je nach Interferenzmuster schwanken die im Detektor registrierten Intensitäten und zwar umso schneller, je schneller die Teilchen ihre relative Position ändern, was letztendlich von deren Diffusionskoeffizienten abhängt. In kurzen zeitlichen Abständen (im Bereich von Mikrosekunden) wird die gemessene Intensität $I(t)$ bzw. $I(t+\Delta\tau)$ aufgezeichnet, im Korrelator mit den vorherigen Werten abgeglichen und daraus die Korrelationsfunktion berechnet.

Die so erhaltenen Intensitätswerte werden in Abhängigkeit der Zeit miteinander verglichen. Man erhält die zeitabhängige Autokorrelationsfunktion der Streulichtintensität $G_2(t)$, die definiert ist als:

$$G_2(t = \tau) = \langle I(t_0)I(t_0 + n\Delta\tau) \rangle = \int_0^{\infty} I(t)I(t + \tau)dt \quad (2.3-1)$$

Die erhaltene Funktion der Streulichtintensität $G_2(t)$ wird in die Autokorrelationsfunktion des elektrischen Feldes $G_1(t)$ unter Annahme einer Gaußschen Zufallsverteilung mittels der Siegert-Relation umgerechnet (siehe Formel 2.3-2). $G_1(t)$ klingt mit einem exponentiellen Faktor ab, in dem der Diffusionskoeffizient der betrachteten Teilchen enthalten ist.

$$G_2(t) = 1 + \beta |G_1(t)|^2 \quad \text{mit} \quad |G_1(t)| = e^{-\Gamma t} \quad (2.3-2)$$

Γ im Exponenten von Formel 2.3-2 bezeichnet die Abklingkonstante der Korrelationsfunktion. In ihr ist der Diffusionskoeffizient D , der Brechungsindex des Dispersions- bzw. Lösungsmittels n_0 und der Streuvektor q enthalten. Es gilt (für monodisperse Kugeln) der Zusammenhang:

$$\Gamma = Dq^2 \quad \text{mit} \quad q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.3-3)$$

Mit dem errechneten Diffusionskoeffizienten D lässt sich nach der Stokes-Einstein-Beziehung (siehe Formel 2.3-4) unter Berücksichtigung der Temperatur T und der Viskosität des Lösungsmittels der hydrodynamische Radius R_H der Teilchen ermitteln. k_B ist dabei in folgender Gleichung die Boltzmann-Konstante.

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2.3-4)$$

Der hydrodynamische Radius ist dabei definiert als der Radius einer harten, wechselwirkungsfreien Kugel mit den gleichen hydrodynamischen Eigenschaften wie das untersuchte Teilchen.

Für den Fall der *Online*-Kopplung von DLS an eine Chromatographie bzw. an die A4F wird die Probe im Durchfluss gemessen. Dies kann auf den ersten Blick zu Messungenauigkeiten führen, da die Eigenbewegung der Teilchen von einer gerichteten Bewegung durch den Analytenfluss aus der Chromatographie überlagert wird. Eigene empirische Tests (Sammeln von Fraktionen und Abgleich der Offline-Messergebnisse mit den Werten der *Online*-Messung) zeigten ebenfalls, dass keine signifikanten Abweichungen der Messergebnisse zu beobachten waren. Der Hersteller des verwendeten Gerätes konnte durch eine Gegenüberstellung der durch den kontinuierlichen Fluss aus der Chromatographie verursachten Beamtransitzeit mit den Korrelationsfunktionsabklingraten üblicher Teilchendurchmesser zeigen, dass beide Bewegungen sich typischerweise um mindestens eine Größenordnung unterscheiden (zum Beispiel bei einer Probe 10 nm großer Partikel und einer Flussrate von 1 mL min^{-1}

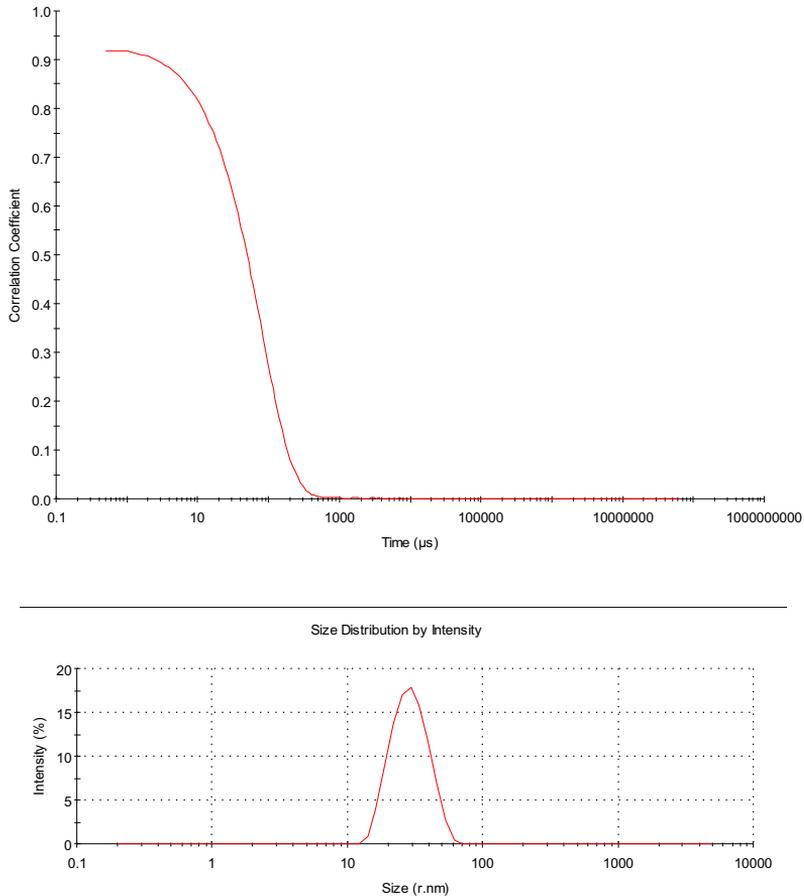


Abbildung 2-19. DLS-Korrelogramm (oben) und intensitätsgewichtete Größenverteilung von Nanopartikeln (stammend aus der Online-Kopplung mit der A4F zur Untersuchung von Resovist; unteres Bild).

unter Verwendung einer 100 μL Durchflussküvette liegt der Unterschied etwa bei Faktor 1000). Das heißt, die Bewegung der Teilchen durch den gerichteten Fluss aus der Chromatographie (bei üblichen Flussraten zwischen 0.1 und 2 mL min⁻¹) ist deutlich kleiner als die Eigenbewegung aufgrund von Diffusion, sodass erstere Bewegung vernachlässigbar ist und nicht zu einer Verfälschung der Messergebnisse führt⁶³.

3 Praktischer Teil und Diskussion

3.1 Analytik eines Ferrofluids mittels A4F-SAXS *Online-Kopplung* und DLS

3.1.1 Einleitung

Ferrofluide bestehen aus einer Suspension magnetischer bzw. magnetisierbarer Nanopartikel von typischerweise fünf bis zehn Nanometern im Radius, zumeist Eisen, Magnetit, Maghemit oder Cobalt, stabilisiert etwa mit Chelaten, Detergentien oder Polymeren^{64, 65}.



Abbildung 3-1. Ferrofluidstruktur unter dem Einfluss des magnetischen Feldes eines FeBNd-Magneten³.

Ferrofluide werden in vielfältiger Weise eingesetzt, zum Beispiel in Lautsprechern⁶⁶, als Dichtungen in reibungsarmen Lagern⁶⁷ und auch in zahlreichen biochemischen und medizinischen Anwendungen⁶⁴. Durch Funktionalisierung der Nanopartikel mit Antikörpern oder Antigenen können in Immunoassays spezifisch biologische Materialien voneinander separiert werden⁶⁸. Es gibt weiterhin vielversprechende Ansätze, die superparamagnetischen Eigenschaften von manchen Ferrofluiden in der Krebstherapie einzusetzen⁶⁹. Dazu werden speziell funktionalisierte Nanopartikel in Krebszellen angereichert und durch magnetische Wechselfelder eine lokale Erwärmung der Tumorzellen durch Anregung der Partikel forciert, die zum Absterben der entarteten Zellen führen soll. Superparamagnetismus bezeichnet die Eigenschaft von Teilchen, sich in einem externen Magnetfeld temporär magnetisieren zu lassen; diese verhalten sich dann praktisch wie ein Ferromagnet⁷⁰ solange das externe Magnetfeld anliegt. Eine andere Anwendungsmöglichkeit besteht darin, dass Medikamente an die Partikel gebunden und erst in den Zielzellen freigesetzt werden (sogenanntes *drug targeting*), wobei die Anreicherung der Eisenoxid-Nanopartikel *in vivo* direkt verfolgt werden kann.⁷¹

In der klinischen Diagnostik wird ausgenutzt, dass solche Partikel in ihrer Umgebung die ¹H-Relaxationszeiten bei Untersuchungen mittels der Magnetresonanztomographie (MRT) signifikant verkürzen und so den Kontrast lokal gegenüber Arealen verstärken, die weniger oder keine dieser Partikel enthalten. So können etwa Läsionen oder kleine Tumoren früher und sicherer erkannt werden⁷²⁻⁷⁴. Zu diesem Zweck werden Ferrofluide neben Gadoliniumchelatkomplexen tatsächlich schon seit über 10 Jahren eingesetzt,

insbesondere bei Untersuchungen der Leber, da diese im Zuge von Stoffwechselprozessen die Eisenoxidpartikel zeitweise anreichern kann.

Ein solches MRT-Kontrastmittel stellt Resovist[®] als kommerzielles Produkt dar^{75, 76}. Es besteht aus sphärischen, superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (Maghemit/Magnetit) (kurz SPIO für *superparamagnetic iron oxide*; Partikel mit Durchmessern kleiner als 20 nm werden gelegentlich in der Literatur auch als USPIOs, Ultra-SPIOs bezeichnet), die in diesem Fall mit dem Polysaccharid Carboxydextran biokompatibel stabilisiert sind. Resovist wird seit 2001 in der MRT zu Leber- und auch Milzuntersuchungen eingesetzt, wo sich diese SPIOs vorzugsweise anreichern. Nach der Injektion in die Blutbahn wird es vor allem von den sogenannten Kupffer-Zellen der Leber, die zu den phagozytären Zellen zählen und den Makrophagen der Milz aufgenommen, nicht aber von etwa malignem Gewebe, wodurch eine Kontrastverstärkung zwischen den unterschiedlichen Gewebetypen erzielt werden kann⁷⁵.

Ein wichtiger Aspekt, der die Effektivität der SPIOs wesentlich mitbestimmt, ist die Partikelgröße, von denen die Magnetisierbarkeit (die Partikelkerngröße ist hierfür entscheidend⁷⁷) aber auch die Verteilung, Aufnahme und Verweilzeit im Blutkreislauf und den Organen direkt abhängt, wobei hier die Gesamtgröße des Partikels mit Stabilisator bzw. Korona entscheidender Faktor ist^{65, 78, 79}

Somit sind die genaue Kenntnis der Partikel(kern)radien und der Größenverteilungen in Ferrofluiden für die Entwicklung, den Einsatz und die Qualitätssicherung von SPIOs als Diagnostika essentiell wichtig, auch, um Patienten nicht mit unnötig hohen Dosen zu belasten oder etwa eine unbeabsichtigte Anreicherung der Partikel im Körper vermeiden zu können.

3.1.2 Material

Die Formulierung Resovist als kommerzielles MRT-Kontrastmittel besteht aus einer polydispersen Suspension von mit Carboxydextran stabilisierten SPIOs mit einem Eisengehalt von 0,5 mmol (28 mg mL⁻¹) in einer wässrigen Lösung von 40 mg mL⁻¹ Mannitol und 2 mg mL⁻¹ Milchsäure⁷⁵. Die bisherige Charakterisierung der Partikelgröße und -größenverteilung der SPIOs in Resovist (auch als SHU 555A in der Literatur bezeichnet) beruhte bislang auf Messungen mittels Transmissions-

elektronenmikroskopie (TEM) und DLS, die als Standardverfahren gelten. Die Partikelradien wurden mittels TEM zu 2.5 nm, der hydrodynamische Radius, der mittels DLS gemessen wurde, zu 30 nm bestimmt⁷⁸.

Die alleinige Messung mit DLS ist als Charakterisierung unzureichend, da so keine Aussagen über die Dimensionen des Partikelkerns getroffen werden können. TEM ist als direkt bildgebendes Verfahren sehr anschaulich, hat aber einige Nachteile, die die Charakterisierung der Proben erschweren. Zum einen

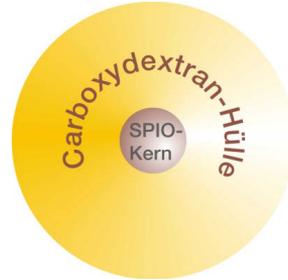


Abbildung 3-2. Illustration des Kern-Hülle-Aufbaus eines, mit Carboxydextran stabilisierten SPIO-Nanopartikels.

müssen die Proben (in diesem Falle eine Suspension) präpariert, d.h. eingetrocknet werden, was zu Aggregationen führen kann, die in der ursprünglichen Probe nicht vorhanden sind. Zum anderen kann in diesem Fall das zur Stabilisierung der Partikel vorhandene Carboxydextran die SPIO-Kerne soweit verdecken, dass nur schwierig eine repräsentative Größenordnung getroffen werden kann⁷⁷. Zudem ist das letztgenannte Verfahren sehr zeitaufwändig, wenn eine gewisse statistische Sicherheit der Ergebnisse gewährleistet werden soll.

Daher rührte die Motivation, die A4F-SAXS *Online*-Kopplung als eine schnelle und repräsentative Untersuchungsmethode für derartige Analyten zu verwenden. Zusätzlich wurden Fraktionen direkt im Anschluss gesammelt und mittels DLS vermessen, um auch einen Zugang zu den hydrodynamischen Radien zu haben, die als Maß für die Gesamtdimensionen der Partikel gelten. Dies ermöglicht, da es sich in diesem Fall um kugelförmige Partikel handelt, in Kombination mit den Ergebnissen der SAXS-Messungen, eine Abschätzung der Dicke der Stabilisatorschicht aus Carboxydextran, die auf anderem Wege nur schwer oder gar nicht zugänglich ist.

Die Kombination von SAXS mit A4F zur Nanopartikelcharakterisierung wurde bereits in einem Experiment an Proben superparamagnetischer Maghemit-Nanostäbchen mittels Synchrotron-SAXS mit Erfolg erprobt⁸⁰. Synchrotronstrahlung stellt aufgrund ihrer Eigenschaften, z.B. einer um Faktor 1000 höheren Intensität, als die einer handelsüblichen Laborröntgenröhre, der hohen Brillianz und geringen Divergenz, eine exzellente Quelle für Röntgenstrahlung zur Untersuchung zum Beispiel von nanopartikulärem Material⁸¹ dar.

Jedoch ist Synchrotronstrahlung nicht allgemein verfügbar, da der apparative und personelle Aufwand sehr groß und für Routinemessungen auch durchaus zu kostenintensiv ist.

Daher wurde die A4F-SAXS *Online*-Kopplung zur Untersuchung von Teilchenform, -größe und -größenverteilung der SPIOs in Resovist unter Verwendung einer CuK α -Röntgenröhre durchgeführt, mit dem Ziel zeigen zu können, dass diese Methode auch mit weniger apparativem Aufwand eingesetzt und somit auch einem breiteren Anwendungsspektrum zugänglich gemacht werden kann.

3.1.3 Methoden und Durchführung

A4F

Der prinzipielle Aufbau einer A4F Anlage wurde weiter oben beschrieben (2.1.2). Der hierbei verwendete Trennkanal bestand aus einer Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Cellulose (RC) mit einem Molekulargewichtsgrößenausschluss (*MWCO*, *molecular weight cut-off*) von $10 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ und einem 500 μm starken Abstandhalter. Die Peripherie bildeten zwei HPLC-Pumpen (PN 1122) für Träger- bzw. Injektionsfluss und Fokusfluss, jeweils mit 100 nm Solvensfilter, einem Autosampler (PN 5200) und einem PN 7505 Solvens-Entgaser. Als Detektor diente ein UV-Detektor (mit einer verwendeten Wellenlänge von $\lambda = 300 \text{ nm}$). Der Detektorausgang wurde mit einem Kleinwinkelröntgenstreugerät (siehe auch Abbildung 3-3) und einem Probensammler gekoppelt, der eine Messung der einzelnen Probenfraktionen mittels Dynamischer Lichtstreuung ermöglichte.

Als Elutionsmittel wurde eine wässrige Lösung von 0.2 % (v/v) NovaChem Surfactant 100 verwendet. Die injizierte Probe wurde durch Verdünnung der Resovistformulierung im Verhältnis 1:3 hergestellt, sodass 1 mL 7.1 mg Eisen enthielt. Zur Fraktionierung wurde ein Volumen von 50 μL in die A4F injiziert. Die Detektorflussgeschwindigkeit betrug 0.5 mL min^{-1} . Nach jeweils einer Minute für Injektion und Fokussierung wurde der Querfluss von ursprünglichen 2.5 mL min^{-1} linear mit einer Rate von $2.5/20 \text{ mL min}^{-2}$ reduziert (siehe Abbildung 3-5). Fraktionen der Proben wurden nach Durchgang durch die Detektion (UV, SAXS) mittels eines Probensammlers im zwei Minuten-Abstand gesammelt.

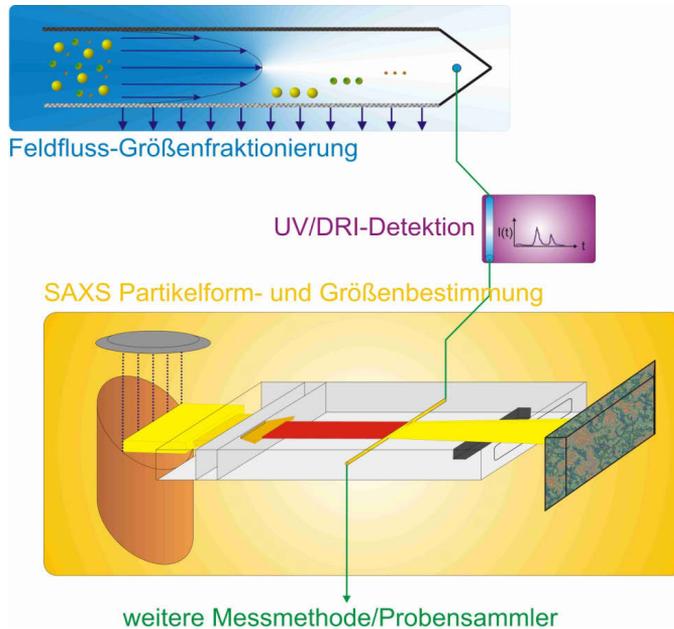


Abbildung 3-3. Aufbauschema der A4F-SAXS Online-Kopplung: Feldflussfraktionierung und UV-Detektor sind direkt an die Durchflusskapillare der SAXS zell angeschlossen. Nach Durchgang durch die Röntgenstreuung ist ein Probensammler installiert.

SAXS

Die SAXS-Daten wurden mit einer Kratky-Kamera (CuK α -Röntgenröhre, $\lambda = 0.154 \text{ nm}$) aufgenommen. Die Durchflusszelle wurde dabei auf $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Die gemessenen SAXS-Intensitäten wurden durch Subtraktion der Messdaten einer mit reinem Solvens gefüllten Kapillare und des Dunkelstroms um den Hintergrund korrigiert. Die Spalt-Längen-Entschmierung wurde mit der Software SAXSQuant 2.0 (Anton Paar) und parallel zur nochmaligen Verifizierung mit Glatters Indirect Fourier Transformation (IFT)-Methode,^{48, 82, 83} durchgeführt. Die entschmierten Streudaten wurden durch Fitfunktionen mit Modellen aus dem Software Paket von S. Kline/NIST⁸⁴, implementiert in die Software IGOR Pro (Wavemetrics, USA), ausgewertet. Im Einzelnen wurden den nach Fraktionierung gewonnenen Streudaten Kugeln als Fitmodell angepasst, die einer Gauß-förmigen Größenverteilung unterliegen, wie man sie auch typischerweise bei der Feldflussfraktionierung erwarten kann (vergl. Formel 2.1-10)³⁷.

Die i -te Fraktion der Nanopartikel mit Radius R $f_i(R)$ wird somit beschrieben durch:

$$f_i(R) = \frac{1}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(R - R_i)^2}{2\sigma_i^2} \right] \quad (3.1-1)$$

Dabei gibt R_i den mittleren Radius und σ_i die Breite der Verteilung an. Die Polydispersität ist darüber definiert als $p_i = \sigma_i/R_i$. So gilt in der Folge für die Streuintensität der Fraktion i für $I_i(q)$:

$$I_i(q) = k \frac{\phi_i}{\langle V_i \rangle} (\rho - \rho_s)^2 \int_0^\infty f_i(R) R^6 [F(qR)]^2 dR \quad (3.1-2)$$

mit k als instrumenteller Konstanten, ϕ_i , der i -ten Volumenfraktion der Partikel und der Elektronendichtedifferenz zwischen den Partikel und dem Solvens als $\rho - \rho_s$. Das gemittelte Volumen der Partikel einer Fraktion ist dabei definiert als $\langle V_i \rangle = \frac{4}{3} \pi \langle R_i \rangle^3 = \frac{4}{3} \pi R_i^3 (1 + 3p_i^2)$ und die Streuamplitude $F(qR)$ mit dem Formfaktor $P(q)$ für eine Kugel beträgt^{84, 85}

$$F(qR) = \frac{[\sin(qR) - qR \cos(qR)]}{(qR)^3} \quad (3.1-3)$$

DLS

Die durch A4F-SAXS *Online*-Kopplung erhaltenen Partikelfractionen wurden mit einem angeschlossenen Probensammlers aufgefangen und zeitnah mittels DLS vermessen, um etwaige nachträgliche Veränderungen des Analyten zu vermeiden. Dabei wurde die Messzelle auf 20 ± 1 °C temperiert. Die Messung erfolgte im Rückstreumodus unter einem Winkel von 173° , was einem Streuwinkel von $\frac{4\pi n}{\lambda} \sin \theta = 0.02636 \text{ nm}^{-1}$ entspricht. Die Proben wurden vor den DLS-Messungen durch $0.45 \mu\text{m}$ RC-Filter filtriert, um Fehlmessungen durch Staubpartikel in den Suspensionen zu vermeiden und anschließend in Polystyrol-Mikroküvetten ($400 \mu\text{l}$) überführt. Die hydrodynamischen Radien R_H wurden aus den Diffusionskoeffizienten D über die Stokes-Einstein-Relation (Formel 2.3-4) erhalten.

3.1.4 Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchung einer unfraktionierten Probe zeigt in der SAXS-Streukurve bei höheren q -Werten einen Abfall der Streuintensität, der proportional zu q^{-4} verläuft (Abbildung 3-4). In diesem sogenannten Porod-Bereich können Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit der Proben gewonnen werden, d.h. es wird praktisch ein Bereich betrachtet, der deutlich kleiner als die maximalen Dimensionen der Partikel ist, wenn also gilt: $qR \gg 1$. In diesem Bereich skaliert die Streuintensität exponentiell mit q , man spricht daher auch vom sogenannten *power-law scattering*, das durch den Ausdruck $I(q) = I_0 q^{-\alpha}$ beschrieben werden kann. Dabei bedeutet I_0 die auf $q = 0$ extrapolierte Streuintensität und der Exponent α beschreibt den Übergang vom Teilchen zu seiner Umgebung und liefert so Informationen über die Oberfläche der untersuchten Teilchen⁸⁶. So sind Werte von $1 < \alpha < 3$ charakteristisch für sogenannte Massenfraktale. Betrachtet man kugelförmige Massenfraktale, so gilt, dass ihre Masse nicht proportional mit dem Kubikradius r^3 zunimmt, sondern mit einem Exponenten, der kleiner als drei ist und anhand dessen man die (massen)fraktale Dimension bestimmt.

Werte von $3 < \alpha < 4$ zeigen sogenannte Oberflächenfraktale an, bei denen nun die fraktale Dimension ein Maß für die Rauigkeit der Oberfläche ist.

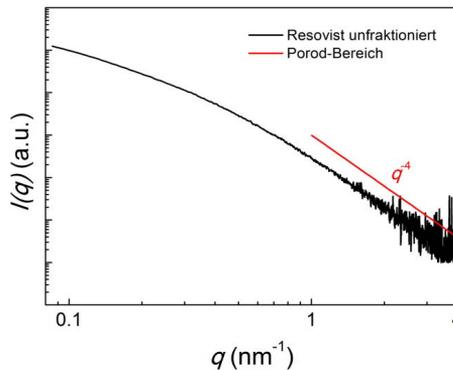


Abbildung 3-4. Experimentelle SAXS-Streukurve ($I(q)$ vs q) von unfraktioniertem Resovist (schwarze, durchgezogene Linie). Der bei hohen q -Werten mit q^{-4} abfallende Porod-Bereich weist auf eine scharfe Grenze zwischen den Partikeln und dem umgebenden Medium hin, was auch zeigt, dass das Stabilisator-material vernachlässigbar geringe Beiträge zur Streuintensität liefert.

Der Wert von $\alpha = 4$ wiederum bedeutet, dass eine glatte, nicht-fraktale Oberfläche des Partikels vorliegt, es wird also ein scharfer Übergang zwischen den Phasen im Falle der hier betrachteten SPIO-Partikel beobachtet⁸⁷. Das Carboxydextran, das sich um den SPIO-Kern befindet, liefert nur einen marginalen Anteil zur Streuintensität, da die Elektronendichtedifferenz zwischen Eisenoxid und dem Dispersionsmittel erheblich größer, als die zwischen dem Polymer und dem Dispersionsmittel ist und die Streuintensität mit dem Elektronendichtedifferenzquadrat skaliert (siehe auch Formel 2.2-9). Die Partikelhülle ist somit praktisch „unsichtbar“ in der SAXS-Analyse.

Die Form- und Größenbestimmung der Partikel wird durch Anpassen von Modellfunktionen an die experimentellen Daten vorgenommen, was eine geeignete Methode zur Datenauswertung darstellt⁸⁸. Nichtsdestotrotz ist die Größenverteilung nicht eindeutig aus der SAXS-Streukurve der unfraktionierten Partikel aufgrund der hohen Polydispersität zu ermitteln. In diesem Fall sind eine Vielzahl von Lösungen für eine Anpassung der Größenverteilung nicht jedoch eine eindeutige Charakterisierung möglich.

Der Einsatz der A4F für eine schonende Auftrennung des Partikelgemisches in Fraktionen mit jeweils geringer Polydispersität schafft somit erst die Voraussetzung für die folgende, detaillierte Auswertung der entsprechenden experimentellen Streudaten. Für die Trennung mittels A4F wurde ein lineares Querflussprofil mit einem Gradienten von $2.5/20 \text{ mL min}^{-2}$ verwendet, um die Analysezeit möglichst kurz und die Verdünnung des Analyten möglichst gering zu halten. Daher wurden die in Ein-Sekundenintervallen erhaltenen SAXS-Streukurven zu je einer Minute Laufzeit gemittelt. Das A4F-Elugramm der Fraktionierung von Resovist ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Das UV-Detektorsignal zeigt die bimodale Verteilung der Nanopartikel im Analyten mit zwei ausgeprägten Maxima nach acht bzw. 23 Minuten.

Eine direkte Quantifizierung ist allerdings mit der UV-Detektion nicht möglich, da das Lambert-Beersche Gesetz nicht auf derartige Nanopartikelsysteme anwendbar ist.

Aus Experimenten am Synchrotron, bei denen ein ähnlicher Analyt (in diesem Falle stäbchenförmige Eisenoxid-Nanopartikel in vergleichbarer Konzentration) untersucht wurde, ist bekannt, dass die typische Zeitdauer zur Aufnahme einer Streukurve mit einer guten Datenstatistik etwa eine Sekunde oder weniger beträgt⁸⁰. Da für die Untersuchung von Resovist mittels A4F-SAXS *Online*-Kopplung eine Röntgenquelle mit deutlich geringerer Intensität (etwa Faktor 1000) verwendet wurde, sind die

erhaltenen Daten ein Kompromiss zwischen optimaler Datenqualität und der gewünschten Zeitauflösung.

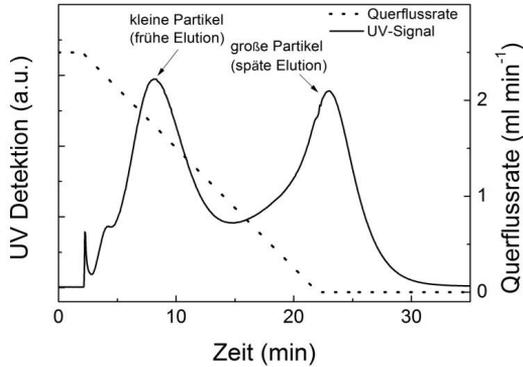


Abbildung 3-5. Das UV-Signal nach A4F-Trennung zeigt zwei Hauptfraktionen an Partikeln an, die Maxima liegen bei 8 bzw. 23 Minuten. Das korrespondierende Querflussprofil zeigt, dass die Fraktion kleiner Partikel bei einer Querflussrate von etwa 1.7 mL min^{-1} bzw. die Fraktion großer Partikel bei 0.1 mL min^{-1} eluieren.

Für die zeitliche Auflösung wurde eine Minute als Intervall gewählt, weil dies sowohl eine akzeptable Datenqualität der SAXS-Streukurven als auch eine ausreichende zeitliche Auflösung für die Bewertung der Größenverteilung in der Probe gewährleistete.

An die erhaltenen Streukdatensätze, drei davon sind in Abbildung 3-6 dargestellt, wurden Modellkurven von Gauss-verteilten Kugeln mit einer geringen Polydispersität von 5 % angepasst.

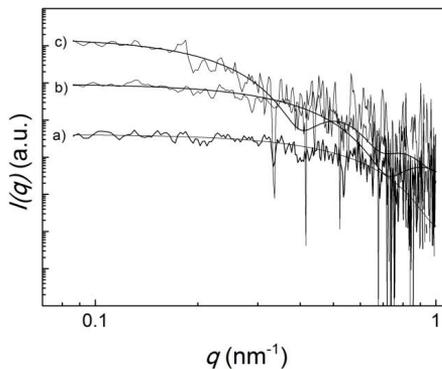


Abbildung 3-6. Drei SAXS-Streukurven und entsprechende Fit-Kurven (schwarze, durchgezogene Linien) aus der A4F-SAXS Online-Kopplung von Partikeln mit Radien von a) 4.4 nm, b) 6.1 nm und c) 11.0 nm.

Es zeigte sich, dass Partikel von 4 bis 21 nm Radius durch die SAXS-Messung nachgewiesen werden konnten. Der Partikelradius (R_{SAXS}) nimmt dabei kontinuierlich und annähernd linear mit der Fraktionierungszeit zu (vergl. Auch Abbildung 3-7) es liegt also der normale Elutionsmodus vor (ein Schema zu diesem Modus ist in Abbildung 2-5 dargestellt). Die Volumenfraktionen der Partikel wurden durch den Skalierungsfaktor der angepaßten Modellfunktionen errechnet, zu dem sie direkt proportional sind (Formel 3.1-2).

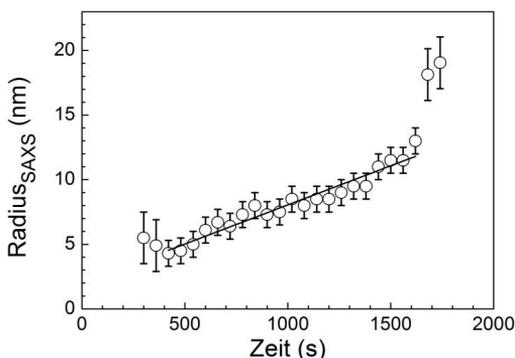


Abbildung 3-7. Mit SAXS gemessene Radien sind gegen die Elutionszeit aufgetragen. Die Fehlerbalken entstammen den Abweichungen der angepaßten Gauß-Kugel Modellfunktionen. Wie nach der FFF-Theorie zu erwarten war, nimmt der Radius der fraktionierten Partikel mit der Elutionszeit zu, wobei die kleinsten Partikel einen Radius von 5 nm, die größten von 19 nm haben. Dem Radienverlauf ist zur Veranschaulichung eine Gerade angepaßt mit $R(t)=1.99 \text{ nm} + 6E-3 \text{ nm} \cdot t$ für die Daten von $t = 400 - 1600 \text{ s}$.

Die Volumenfraktionen sind in Abbildung 3-8 dargestellt und spiegeln qualitativ das UV-Signal wieder. Es waren zwei Maxima zu beobachten, die bei 5.0 und 9.9 nm lagen. Die Breite der Größenverteilung σ betrug dabei 1.2 bzw. 1.6 nm.

Der größte Anteil der Nanopartikel ($> 99 \%$) wiesen Radien im Bereich von 4 bis 13 nm auf, größere Partikel mit Radien bis 21 nm kamen nur in geringer Anzahl vor. Diese konnten aber trotzdem detektiert werden, da die Intensität der mit SAXS gemessenen Streukurven sehr empfindlich auf größere Partikel oder Aggregate ist ($I(q) \sim R^6$).

Legt man die Dichte von Maghemit zugrunde (4.89 g cm^{-3}), so kann auch die molare Masse M der Partikel berechnet werden. Die Partikel mit den Maxima der bimodalen Verteilung hatten demnach ein Volumen von 566 nm^3 ($M = 1.7 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) und 4330 nm^3 ($M = 12.8 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$), was einem Verhältnis von etwa 1:7 entspricht.

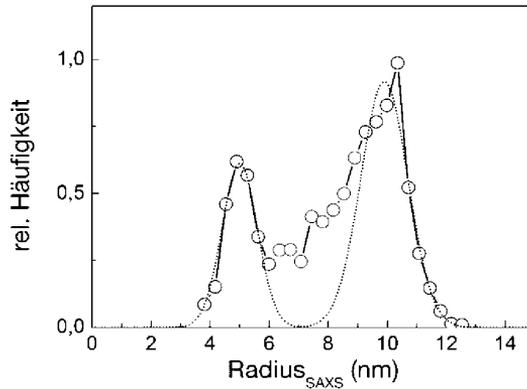


Abbildung 3-8. Die Auftragung der Volumenfraktionen als relative Häufigkeit gegenüber den einzelnen Radien zeigt eine im Wesentlichen bimodale Größenverteilung. Der höchste Wert wurde zur besseren Übersicht auf eins normiert. Zur Veranschaulichung sind die Daten mit zwei Gaußkurven hinterlegt, die die Form der Maxima widerspiegeln. Das Radien-gewichtete Verhältnis der beiden vorherrschenden Partikelgrößen beträgt 1:2.

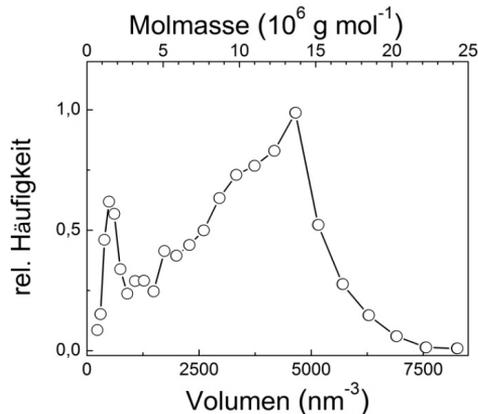


Abbildung 3-9. Auftragung des Partikelvolumens und der korrespondierenden molaren Massen gegen die relative Häufigkeit im Analyten.

Der in der Literatur von Wang *et al.*⁷⁸ angegebene Wert für den mittleren hydrodynamischen Radius der in Resovist enthaltenen Partikel beträgt $R_H \approx 30 \text{ nm}$. Dieser ist signifikant größer, als die in dieser Arbeit mittels SAXS erhaltenen Werte, was insofern zu verstehen ist, da mittels SAXS nur die Dimensionen der Partikelkerne erfasst werden.

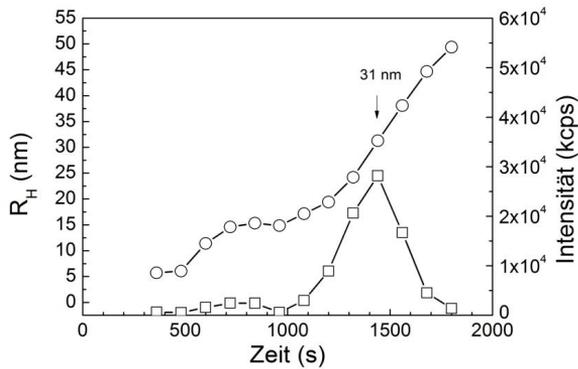


Abbildung 3-10. Hydrodynamische Radien (Kreise) und volumengewichtete Intensitäten (Quadrate) aus der DLS Messreihe der Resovistfraktionen. Es sind entsprechend der bimodalen Verteilung, die mittels SAXS gefunden wurde, ebenfalls zwei Maxima zu erkennen. Die Untersuchung von unfraktioniertem Resovist von Wang et al.³⁹ ergab einen mittleren Wert für R_H von 30 nm, der mit dem hier gefundenen Wert am zweiten Maximum (31 nm) praktisch übereinstimmt.

Um einen direkten Vergleich zwischen den Daten der beiden Methoden zu ermöglichen, wurden Fraktionen aus der A4F-SAXS *Online*-Kopplung gesammelt und direkt im Anschluss mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht und die volumengewichteten hydrodynamischen Radien und die Streuintensitäten aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung in Abhängigkeit von der Laufzeit der A4F-Elution dargestellt:

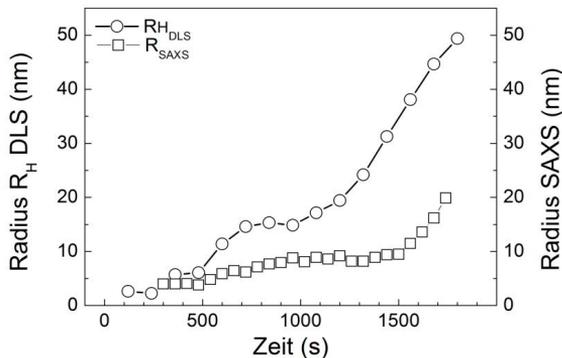


Abbildung 3-11. Hydrodynamische Radien R_H und SAXS-Radien R_{SAXS} im direkten Vergleich. Durch den Abgleich der Daten bei gleichen Fraktionierungszeiten kann die Stärke der Carboxydextranschicht abgeschätzt werden. Diese nimmt mit der Partikelkerngröße zu.

Der Unterschied der erhaltenen Radien R_{SAXS} und R_{H} kann plausibel damit erklärt werden, dass die Carboxydextranhülle maßgeblich zu R_{H} , nicht aber zu R_{SAXS} beiträgt. Somit kann man die beiden Methoden als komplementär zueinander betrachten.

Der Trend, dass die Radien mit der Fraktionierungszeit zunehmen, ist sowohl in der Auswertung der SAXS- als auch der DLS-Daten klar zu erkennen. Allerdings ist die Stärke der Stabilisatorhülle, die aus dem Vergleich $R_{\text{SAXS}} \leftrightarrow R_{\text{H}}$ abgeleitet werden kann, offensichtlich nicht konstant, sondern nimmt mit zunehmender Partikelgröße ebenfalls zu (siehe Abbildung 3-11). Ob dies ein Effekt ist, der beispielsweise durch zunehmende Aggregation von freiem Carboxydextran aus der Lösung an größere Partikel oder durch eine von der Partikelkerngröße abhängige, veränderte Orientierung bei der Bindung der Carboxydextranmakromoleküle am SPIO-Kern zustande kommt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Hier müßte beim Herstellungsprozeß selber mit weitergehenden Untersuchungen angesetzt werden und der Prozeß der Stabilisierung mit höher zeitaufgelösten SAXS-DLS-Experimenten verfolgt werden. Als gesichert kann dagegen die Folgerung gelten, dass größere SPIO-Partikel auch eine dickere Schicht aus Carboxydextran anlagern, was *a priori* nicht unbedingt zu erwarten war. Allerdings zeigt dies auch den Wert der Partikelkern-Untersuchung mittels SAXS, da mittels DLS qualitativ abweichende Ergebnisse erhalten wurden, von denen sich die tatsächlichen Werte für Partikelkerngröße und -verteilung nur grob ableiten lassen.

3.1.5 Zusammenfassung

Die Untersuchung des MRT-Kontrastmittels Resovist mittels A4F-SAXS *Online-*Kopplung und anschließender DLS-Messungen ermöglicht sowohl den Zugang zu einer detaillierten Charakterisierung der enthaltenen SPIO-Kerne hinsichtlich Form, Größe und Größenverteilung (durch SAXS) als auch entsprechende Daten über den gesamten Partikel mit einer sterisch stabilisierenden Hülle aus Carboxydextran durch DLS-Messungen.⁹⁰

Durch die A4F war bei dieser Methodenkopplung eine detaillierte Untersuchung des Analyten möglich, da die breite Größenverteilung in der unfraktionierten Probe nur die Messung von Mittelwerten, nicht aber Rückschlüsse auf die tatsächliche Größenverteilung der enthaltenen Partikel zulässt.

Die sphärischen Partikelkerne wiesen Radien zwischen etwa 4 nm und 21 nm auf, wobei zwei Größen mit knapp 5 nm und 10 nm dominierten, also im Wesentlichen eine

bimodale Größenverteilung im hier untersuchten Analyten vorlag. Es sei angemerkt, dass die Radien der Partikelkerne auch die Größe ist, die für die Funktionalität in Hinblick auf MRT-Untersuchungen mit Resovist entscheidend wichtig ist.

Anhand der zusätzlichen DLS-Daten kann die Dimension des gesamten Partikels und durch Vergleich der Daten beider Methoden, zudem die Stärke der stabilisierenden Hülle aus Carboxydextran der enthaltenen SPIO-Kerne bestimmt werden. Es stellte sich dabei heraus, dass die Schichtdicke des Stabilisators mit der Partikelgröße im betrachteten Bereich zunahm.

Die verwendete Methode ist zeitsparend im Vergleich zu beispielsweise elektronenmikroskopischen Untersuchungen; ein Lauf mit *Online*-Fraktionierung und SAXS-Detektion dauert in diesem Fall 30 Minuten. Durch den Einsatz der A4F als Trennmethode wurde gewährleistet, dass keine Artefakte - etwa durch Aggregationen bei Probenpräparationen oder durch Abscheren des Stabilisators - die Ergebnisse verfälschen; *in situ* Untersuchungen sind möglich. So werden auch im Nachhinein prinzipiell weitere Untersuchungen des bereits fraktionierten und mittels SAXS und DLS charakterisierten Analyten ermöglicht, etwa, um größenabhängige Effekte (spezifische Anreicherung in Organen, größenabhängige Toxizität) von Nanopartikeln nachzuweisen.

Diese Eigenschaften haben vielfach den Charakter einer neuen Modifikation mit ebenso drastischen Eigenschaftsänderungen wie man sie beispielsweise beim Phosphor (Vergleich: allotrope Modifikationen von rotem und weißem Phosphor) kennt, was natürlich auch Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und -distribution, wie auch den Verbleib der Partikel in der Umwelt oder in einem Organismus und nicht zuletzt, auf die Toxizität hat^{5, 16, 24, 93}. Langzeitstudien, die Aussagen etwa über Anreicherung subakut toxischer Aufnahmedosen in Organismen oder über mögliche Umweltschäden treffen könnten, fehlen fast völlig.

Daher gibt es begründete Bedenken, wenn es darum geht, Nanopartikel in Produkten einzusetzen, bei denen eine Freisetzung der Partikel in die Umwelt wahrscheinlich ist und noch mehr, wenn diese zur Lebensmittelproduktion, -verpackung oder sogar in Lebensmitteln selbst eingesetzt werden^{5, 19, 25, 94-98}.

Es existieren zwar zahlreiche Studien, die sich mit Nanotoxizitäten befassen; ein Problem ist aber, das sich selbst bei einem einzigen betrachteten Stoff die Eigenschaften innerhalb der Größendomäne, in der man überhaupt erst von Nanopartikeln spricht, bereits signifikant ändern können,^{17, 99-101} was zum Beispiel die Biodistribution und die Toxizität für den Menschen angeht. Weitere Faktoren, die eine wichtige Rolle spielen, sind der Aufnahmeweg und die Matrix, in der sich die Partikel befinden. Da Nanopartikel selten „nackt“ sondern meist mit einer Korona beispielsweise aus Bio(Polymeren), Proteinen o.ä. vorkommen, die zudem je nach chemischer Umgebung variieren kann (zum Beispiel bei oraler Aufnahme durch den Verdauungstrakt) ergibt sich eine Vielzahl von Partikelkompositionen eines einzigen Stoffs und allgemeingültige Aussagen sind schwierig zu treffen. Daher kann man die Datenlage zu Nanotoxizitäten immer noch als sehr dürftig einstufen.

Um repräsentative Ergebnisse bei Studien von Nanotoxizitäten zu erhalten, müssen Faktoren wie Form, Größe, Größenverteilung, chemische Komposition des Partikelkerns und der Oberfläche (Stabilisator, Korona der Partikel) berücksichtigt werden, nicht zuletzt auch, um Vergleichbarkeiten der Studien zu gewährleisten¹⁰².

Vielfach hat man es bei industriell hergestellten Nanopartikeln mit breiten Größenverteilungen zu tun und kann somit, beispielsweise bei Toxizitätstest in Zellkulturassays, in der Regel keine verlässliche größenabhängige Wirkung zuordnen. Man kann also keine gesicherte Aussage treffen, ob nur Partikel eines Stoffs unter oder oberhalb einer kritischen Größe ungewünschte oder gefährliche Eigenschaften aufweisen, wie zum Beispiel das Potential, zelluläre Barrieren passieren oder sich

spezifisch in bestimmten Gewebetypen anreichern und persistieren zu können. Gerade beim Einsatz derartiger Partikel ist das Wissen um größenabhängige Eigenschaften bzw. das Testen von ausgewählten Partikelgrößen von Bedeutung. Um derartige Effekte untersuchen zu können, wurde die A4F-SAXS *Online*-Kopplung eingesetzt, um eine polydisperse Mischung von industriell gefertigten Nanopartikeln in Suspension erstens auf die enthaltenen Partikelgrößen zu untersuchen und zweitens in der Folge gut charakterisierte und eng größenverteilte Fraktionen für anschließende Zelltests zu erhalten. Da die A4F typischerweise mit geringen Konzentrationen arbeitet, war dabei eine besondere Herausforderung, nach der Größentrennung Fraktionen in Konzentrationen zu erhalten, die für aussagekräftige Zelltests an einem entsprechenden Modellsystem geeignet sind. Dies wurde, wie im Folgenden gezeigt wird, mit Hilfe der sogenannten *Slot-Outlet* Technik erreicht, mit der sich die Verdünnung der Fraktionen während der Elution durch den Trennkanal signifikant verringern lässt.

3.2.2 Material

Es wurden Eisenoxid-Nanopartikel verwendet, die auch als Lebensmittelzusatzstoff eingesetzt werden dürfen (Eisenoxide, E172). Speziell (γ - Fe_2O_3 ist bis zu 70 % in Umbrafarbe aus Eisenoxid-Pigment enthalten¹⁰³.

Die verwendeten Nanopartikel (γ - Fe_2O_3 , Maghemit, 99,5 %) wurden als Pulver von der Firma IoLiTec (D-74076 Heilbronn) bezogen. Die Charakterisierung des Herstellers durch TEM-Aufnahmen ergab eine Partikelgröße von 10 - 20 nm (siehe Abbildung 3-13).

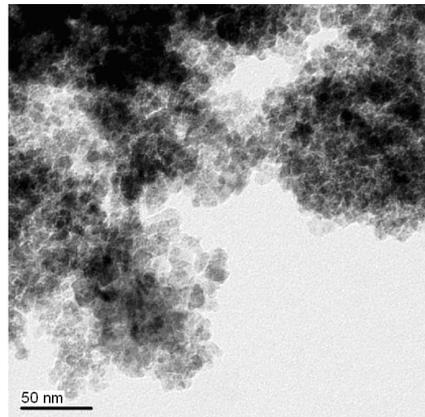


Abbildung 3-13. TEM-Aufnahme des Eisenoxid-nanopartikelpulvers vom Hersteller IoLiTec. Die Partikel sind von sphärischer aber unregelmäßiger Form mit Radien zwischen 10-20 nm.

Zur Herstellung einer Suspension dieser Partikel wurde Natriumpolyphosphat („Grahams Salz“) als biokompatibler Stabilisator eingesetzt.

Dazu wurden 800 mg Nanopartikelpulver in 10 mL einer 0.1 %igen (w/v) Natriumpolyphosphatlösung suspendiert und mittels einer Ultraschallsonde (Sonopuls

HD 2070, Bandelin GmbH Berlin) deagglomeriert (60 Sekunden bei 50 % Cycle und 56 W). Die erhaltene Suspension wurde zentrifugiert (60 Sekunden bei 80 g) und der Überstand durch Cellulosespritzenfilter mit 450 μm und anschließend 200 μm filtriert, um Staub und verbliebende große Aggregate abzutrennen.

3.2.3 Methoden und Durchführung

A4F

Es wurde mit einer Ultrafiltrationsmembran mit einem Molekulargewichts-Größenausschluss $MWCO = 10 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ und einem 500 μm Abstandhalter gearbeitet, der die Höhe des Trennkanals bestimmte. Der Aufbau und die Steuerung der A4F folgt im Wesentlichen der Beschreibung aus 3.1.3 mit dem Unterschied, dass ein modifizierter Trennkanal eingesetzt wurde, um die *Slot-Outlet* Technik zu realisieren.

Diese wurde nach den Vorgaben von Prestel, Niessner und Panne¹⁰⁴ durch ein speziell im Hause angefertigtes, modifiziertes Kanaloberteil mit einem zusätzlichen Auslass, 13 mm vor dem eigentlichen Kanalauslass, realisiert (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15). Der *Slot-Outlet* dient dazu, die Empfindlichkeit der Detektion nach einem A4F-Trennlauf dadurch zu erhöhen, dass durch den zusätzlichen Auslass kurz vor dem eigentlichen Detektorauslass ein Teil des Trägerstroms fließt, der so gut wie keinen Analyten enthält und somit der Analytstrom, der zu den Detektoren geleitet wird und die getrennten Teilchen enthält, weniger stark verdünnt wird.

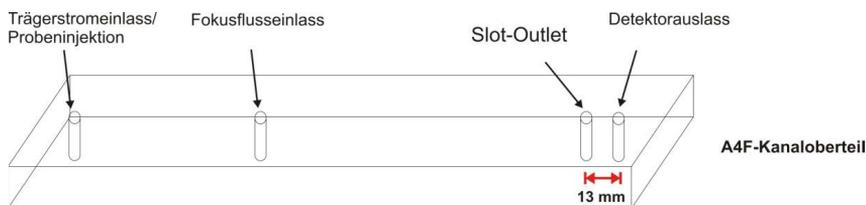


Abbildung 3-14. Darstellung des modifizierten A4F Kanaloberteils mit zusätzlicher Slot-Outlet Öffnung, 13 mm vor dem eigentlichen Probenauslass zum Detektor.

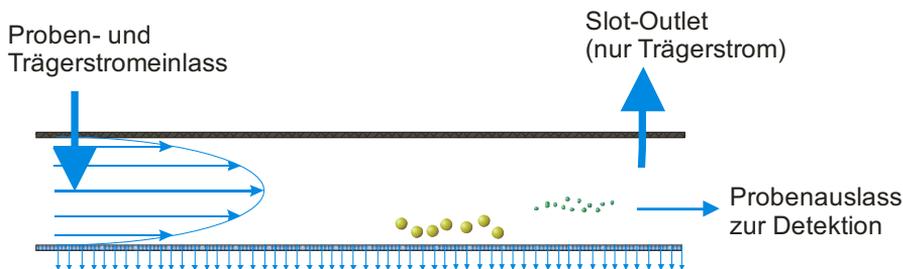


Abbildung 3-15. Schema der Solvens-Strömungen im A4F Kanal mit Slot-Outlet. Im Prinzip ermöglicht eine weitere Öffnung nahe des Kanalauslasses das weitgehend störungsfreie Entströmen nahezu reinen Trägerstroms ohne Analyt, da dieser sich nur in unmittelbarer Nähe zur Kanalunterseite an der Akkumulationswand befindet. So wird eine Verdünnung in Probenauslass verringert und die Empfindlichkeit der nachfolgenden Detektion erhöht.

Dies ist möglich, da sich die Teilchen im Strömungskanal nur in einem schmalen Bereich nah der Akkumulationswand befinden, der in der Regel maximal ein Zehntel oder weniger der gesamten Kanalhöhe ausmacht. Lässt man nun einen Teil des Trägerstroms, der keinen Analyten enthält, durch die zusätzliche Öffnung am Ende des Kanaloberteils entströmen, hat das keinen Einfluss auf die Trennung selbst. Der Trägerstrom, der den fraktionierten Analyten enthält, wird mit erhöhter Konzentration (typischerweise bis 1/10 der ursprünglich injizierten Konzentration im Vergleich zu 1/50 bis 1/100 ohne *Slot-Outlet*) eluiert.

Der nötige Rückstaudruck wurde mittels einer geeigneten schmalen Kapillare realisiert, wobei die *Slot-Outlet* Flussrate von 80 % durch Messung verschiedener Kapillaren anhand von Blank-Läufen eingestellt wurde. Als Lösungsmittel für den Trägerstrom, wie auch zur Herstellung der Nanopartikelsuspension, diente eine 0.1 %ige Natriumpolyphosphatlösung, die vor Benutzung zur Abtrennung von Staub durch Cellulosefilter mit 0.1 μm Porenweite gegeben wurde.

Der gesamte Fraktionierungsvorgang mit SAXS-Detektion benötigte 50 Minuten, wobei die Querflussrate, nach einer Injektions- und Fokussierungszeit von 10 Minuten, von anfänglich 1.5 mL min^{-1} linear binnen 15 Minuten auf null gesenkt wurde, was einem Gradienten von 0.1 mL min^{-2} entsprach.

Hinter die A4F wurden zur Detektion ein UV-Detektor (Detektion bei 400 nm, 20 ± 1 °C) und die SAXSess mit Durchflusskapillare angeschlossen. Ein automatischer Fraktionssammler (Gilson) wurde schließlich mit dem Auslass der Durchflusszelle der SAXSess verbunden. Pro A4F-Lauf wurden Volumina von je 200 μL Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension mit einem Gehalt von 5.3 ± 0.3 mg mL^{-1} injiziert, wobei die

Fraktionierung mehrmals wiederholt werden musste, um genügend Probenvolumen in den einzelnen Fraktionen für die folgenden Zellassays zu erhalten.

Die Bestimmung der Eisenoxidkonzentrationen wurde fluorometrisch mit einem Nanocolor® Iron Kit (Machery-Nagel) durch Entnahme eines Aliquots der Probe und Lösen in Salzsäure nach Herstellerangaben durchgeführt.

SAXS

Der Aufbau der SAXS-Detektion entsprach der Beschreibung in Kapitel 3.1.3. Die gemessenen Intensitäten wurden durch Abzug der Streuintensität der mit reinem Solvens gefüllten Durchflusskapillare und des Dunkelstroms korrigiert. Die Spaltlängen-Entschmierung der Streukurven wurde mit der Software SAXSQuant (Anton Paar) durchgeführt. Die Auswertung der Streudaten wurde mittels der Guinier-Näherung und der Porod-Invarianten mittels Origin durchgeführt. Für die Guinier-Näherung gilt:

$$I(q) = I(0) \cdot \exp\left[-\frac{1}{3} R_G^2 q^2\right], I(0) \sim (\rho_{\text{Partikel}} - \rho_{\text{Solvens}})^2 \cdot V^2 \cdot n \quad (3.2-1)$$

mit ρ als der Elektronendichte, V dem Partikelvolumen und n der Partikelanzahl in der Probe. Die Guinier-Näherung ist für kleine q -Werte gültig, wenn gilt: $q \cdot R_G \leq 1.3$, mit dem Streuvektor q und dem Gyrationradius (Guinierradius) R_G . Als eine zweite Methode wurde die Messung der Partikelvolumina über die Porod-Invariante Q herangezogen. Das Volumen V der Partikel kann demnach berechnet werden nach:

$$V = 2\pi^2 \frac{I(0)}{Q}, Q = \int_0^\infty q^2 I(q) dq \quad (3.2-2)$$

Angepasste Kugelmodellfunktionen lieferten hingegen keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Direkt an die SAXS-Durchflusszelle wurde ein automatischer Probensammler angeschlossen, um Fraktionen für jede Minute des A4F-SAXS-Laufs zu sammeln und anschließend weiter auf Konzentration und Zelleffekte zu untersuchen. Für die Zellexperimente wurden Fraktionen mit, nach Auswertung der Streudaten, gleichen

Partikelgrößen vereinigt, entsprechend mit Nährmedium verdünnt und mit den Zellen inkubiert.

Zellassays an Caco-2 Zellen

Um die Effekte der mittels A4F-SAXS charakterisierten Eisenoxid-Nanopartikel zu untersuchen, wurde diese nach Fraktionierung mit Caco-2 Zellen inkubiert.

Caco-2 Zellen sind eine humane Adenokarzinomzelllinie, die als Modellsystem für die menschliche Darmschleimhaut (Darm-Mucosa) eingesetzt wird, um die Aufnahme von Stoffen über den Magen-Darm-Trakt *in vitro* zu untersuchen.

Die Caco-2 Zellen wurden über die European Collection of Cell Cultures (ECACC, Porton Down, UK) bezogen und in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das verwendete Nährmedium wurde entweder mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) oder 1 % (v/v) Insulin/Transferrin/Selen (ITS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin für die Inkubation mit den Nanopartikeln versetzt. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und für die Zellexperimente in 96-well Schalen mit einer Zellzahl von 5·10³ Zellen pro Well und 100 µL Medium überführt. Die Zellen wurden mit den zwei verschieden angesetzten Medien mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Eisenoxid-Nanopartikeln eines engen Größenbereichs inkubiert. Die entsprechenden Nanopartikelsuspensionen wurde nach einer folgenden Kultivierungszeit der Zellen von 24 Stunden zugegeben. Dabei wurde das Nährmedium durch die Partikelsuspensionen mit Konzentrationen von 5, 10, 25, 50 und 100 µg mL⁻¹ ersetzt. Zusätzlich wurden Kontrollgruppen mit reiner Natriumpolyphosphatlösung angesetzt.

Im Anschluss wurden die Zell-Viabilität sowie die Proliferationsraten der Zellen nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden mittels Promega CellTiterBlue[®] Assay (Promega GmbH, Mannheim)¹⁰⁵ bzw. DAPI-Färbung¹⁰⁶ ermittelt.

Für den CellTiterBlue (CTB) Assay wurden die Zellen in den 96-well Schalen mit jeweils 20 µL des CTB Reagenzes versetzt und nach zwei Stunden weiterer Inkubation die Fluoreszenz in einem *Microplate Reader* gemessen (540 nm Anregungs- und 590 nm Emissionswellenlänge). Das Prinzip des CTB Assays basiert auf der Verstoffwechselung von Resazurin zu Resorufin in gesunden Zellen, wobei letzteres anschließend durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden kann. Nicht mehr proliferierende Zellen können diese Verstoffwechselung nicht durchführen. Die

Ergebnisse wurden auf die Medium-Kontrollgruppen bezogen, die als 100 % gesetzt wurden.

Weiterhin werden die Stoffwechselraten auf die jeweilige Zellzahl bezogen, die durch DAPI Assays bestimmt wird. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA der Zellen bindet und sie somit anfärbt. Nach dem CTB Assay wurden die Zellen fixiert, mit Methanol lysiert und mit jeweils 100 μL 20 μM DAPI-Lösung angefärbt. Das Auslesen der Fluoreszenz erfolgte nach 30 Minuten mittels eines Microplate Readers (bei 380 nm Anregungs- und 450 nm Emissionswellenlänge). Die Ergebnisse wurden auf die ausschließlich mit dem Stabilisator Natriumpolyphosphat inkubierten Zellen bezogen und die entsprechenden Medium-Kontrollgruppen wurden auf 100 % gesetzt. Die erhaltenen Mittelwerte und die Standardabweichungen basierten dabei auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.2.4 Ergebnisse und Diskussion

Um Zelltests an kommerziell erhältlichen Nanopartikelpulvern durchführen zu können, müssen die Partikel suspendiert und deagglomert werden. In den meisten Fällen liegen nun Partikelsuspensionen mit einer hohen Polydispersität vor. Untersuchungen von Effekten dieser Suspensionen auf Zellen haben dadurch nur eine begrenzte Aussagekraft, da die Partikelgröße eine Schlüsselrolle für Eigenschaften wie die Zytotoxizität spielt. Um konkrete Aussagen zu größenabhängigen Effekten treffen zu können, müssen die Suspensionen einer vorherigen Größentrennung und -charakterisierung unterzogen werden.

Die A4F-SAXS *Online*-Kopplung unter Einsatz der *Slot-Outlet* Technik ist dazu ein geeignetes und zeitsparendes Mittel und es ist möglich, aus den so fraktionierten Partikeln eine Größenfraktion auszuwählen und in Zellversuchen einzusetzen. So gelangt man direkt zu einer eindeutigen Größe-Wirkungsbeziehung.

Die verhältnismäßig schnelle Absenkung des Querflusses während des A4F-Laufs binnen 15 Minuten mit einer Rate von 0.1 mL min^{-2} , der für die Retention der Partikel verantwortlich ist, ist einem Kompromiss zwischen optimaler Größentrennung und geeigneter Endkonzentration der erhaltenen Partikelfractionen geschuldet. Da die später für Zelltests verwendeten Partikel noch weiter mit entsprechendem Medium verdünnt

werden mussten, sind gewisse Mindestkonzentrationen erforderlich, die auf diese Weise erreicht werden konnten. Die *Slot-Outlet-Rate* betrug 80 %, bei einer Trägerstromrate von 1 mL min^{-1} lag somit die Detektorflussgeschwindigkeit bei 0.2 mL min^{-1} . Die höchste Konzentration, die so in den verwendeten Fraktionen erzielt werden konnte, betrug $244 \mu\text{g mL}^{-1}$. Das Querflussprofil zusammen mit dem korrespondierenden UV-Detektorsignal ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

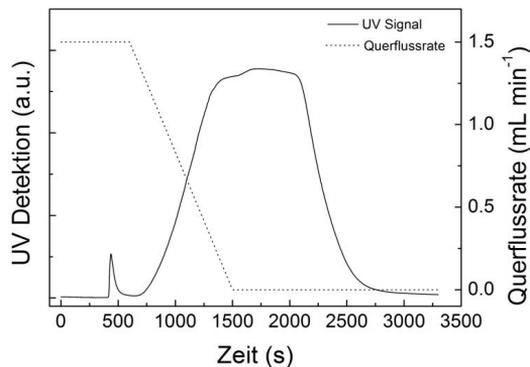


Abbildung 3-16. Querflussprofil und UV-Signal der Trennung der Eisenoxid-Nanopartikel in Suspension. Das UV-Signal wurde bei 400 nm aufgenommen. Die Querflussrate nimmt nach der Injektions-/Fokussierungszeit von 10 Minuten binnen 900 s von 1.5 auf 0 mL min^{-1} ab. Das Intensitätsmaximum liegt bei etwa 1800 s, was der am höchsten konzentrierten Fraktion mit $244 \mu\text{g mL}^{-1}$ entsprach.

Die Hauptmenge der Nanopartikel wurde zwischen 20 und 40 Minuten eluiert. Die anschließend mit jeweils einer Minute Abstand gesammelten Fraktionen wurden nach Auswertung der SAXS-Streudaten vereint, wenn die ermittelten Partikelgrößen identisch waren. Ein Teil der gesammelten Fraktionen ist in Abbildung 3-17 dargestellt.



Abbildung 3-17. Photographie der mittleren gesammelten Fraktionen von Eisenoxid-Nanopartikeln nach A4F-SAXS. Die Fraktionierungsreihenfolge verläuft von links (kurze Elutionszeit) nach rechts.

Die SAXS-Daten wurden *online* für alle Fraktionen gemessen. Anhand der Streudaten bei kleinen q -Werten können ausgeprägte attraktive oder repulsive Wechselwirkungen zwischen den Partikeln ausgeschlossen werden. Das zur Stabilisierung der Suspension eingesetzte Polyphosphat trägt nur vernachlässigbar zur detektierten Streuintensität bei, da die Elektronendichte sehr ähnlich der des Solvens ist und so, im Gegensatz zu den Eisenoxidpartikeln, praktisch kein detektierbarer Streukontrast vorhanden ist.

Die Auswertung der SAXS-Streudaten erfolgte zuerst mit Hilfe der Guinier-Näherung (siehe Formel 3.2-1) für kleine q -Werte, was den Gyrationradius („Guinierradius“) R_G liefert. Dieser ist eine wichtige Kenngröße für die räumliche Ausdehnung insbesondere unregelmäßig geformter Partikel.

Über die Relation $R = \sqrt{5/3} \cdot R_G$ kann R_G in den geometrischen Radius R einer äquivalenten Kugel umgerechnet werden, was für diesen Fall als die am besten geeignete Näherung erschien.

Es wurden für R_G Werte zwischen 7.0 ± 0.7 nm (Fraktion 13) für die kleinsten bis 20.9 ± 0.7 nm (Fraktion 40) für die größten, detektierbaren Partikel gefunden. Die höchsten Partikelkonzentrationen (bei der höchsten, nach $q = 0$ extrapolierten Streuintensität I_0) wurden um eine Fraktionierungszeit von 28 Minuten beobachtet. Die Streudaten für die Fraktionen 25 - 35, die um das Konzentrationsmaximum liegen, zeigen für diesen Bereich Werte für R_G von 15 - 16 nm (dies entspricht Kugeln mit einem Radius von $R = 19 - 20$ nm).

Exemplarisch sind experimentelle Streudaten einer Fraktion und die zugehörige Guinier-Anpassung für Werte von $R_G = 15.4$ nm in Abbildung 3-18 dargestellt. Eine simulierte Modellkurve für Kugeln mit äquivalentem Radius und einer Gaußschen Größenverteilungsbreite von 3 nm und einem Streuuntergrund (gepunktete Linie in Abbildung 3-18) wurde ebenfalls angepasst. Für kleine q -Werte stimmte diese noch mit den Streudaten überein, wich dann aber etwa im Bereich von $0.2 - 1 \text{ nm}^{-1}$ signifikant ab. Weitere Anpassungen von simulierten Streukurven kugelförmiger Partikel zeigten ähnliche Abweichungen.

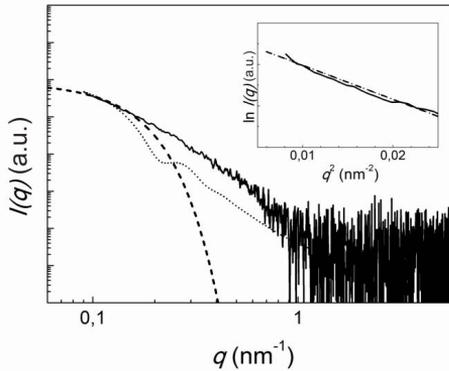


Abbildung 3-18. Doppelt-logarithmische Darstellung der Streukurve (durchgezogene Linie) in einem $I(q)$ versus q -Diagramm von Fraktion Nr. 30, die auch für die anschließenden Zellexperimente verwendet wurde. Die gestrichelte Linie zeigt den $I(q)$ - q -Verlauf nach der Guinier-Näherung in exponentieller Form für $R_G = 15.4$ nm, die im für die Näherung gültigen Bereich mit den experimentellen Streudaten übereinstimmt. Eine simulierte Streukurve (gepunktete Linie) für eine äquivalente Kugel mit einem Radius von 19.9 nm (mit einer Gausschen Größenverteilungsbreite von 3 nm und einem Background von $1.5 \cdot 10^{-5}$) stimmt für kleine q -Werte noch mit den Messdaten überein, für größere weicht sie signifikant ab. Rechts oben: Klassischer Guinier-Plot ($\ln I(q)$ versus q^2) der gleichen Streudaten im Bereich kleiner q -Werte mit linearem Fit (gestrichelte Linie) für $R_G = 15.4$ nm.

Dies wies auf eine Partikelform hin, die von einer idealen Kugel durchweg mehr oder weniger stark abweicht, was durch die TEM-Aufnahme (Abbildung 3-13) des Nanopulvers auch bestätigt worden ist. Die irreguläre Form ist typisch für durch Mahlprozesse hergestellte Nanopartikel.

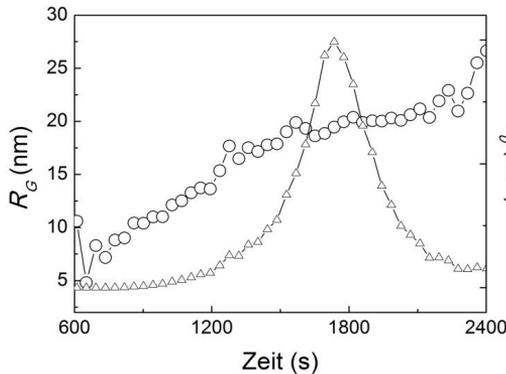


Abbildung 3-19. Ermittelte Guinier-Radien der fraktionierten Partikel in Abhängigkeit der Fraktionierungszeit und zugehörige nach $q = 0$ extrapolierte Intensitäten I_0 als Maß für die Konzentration. Die Zunahme der Radien erfolgt in Abhängigkeit der Elutionszeit. Die Fraktionen mit der höchsten Konzentration eluierten nach etwa 28 Minuten. Zu früheren bzw. späteren Elutionszeiten wurden keine Nanopartikel detektiert.

Daher ist die Auswertung der Streudaten auf modellfreie Ansätze beschränkt worden. Die mittels der Guinier-Näherung ermittelten Radien der fraktionierten Partikel sind in der vorstehenden Abbildung 3-19 in Abhängigkeit der Elutionszeit dargestellt.

Um die Ergebnisse der Guinier-Auswertung, die nur auf den Teil der jeweiligen Streukurve bei kleinen q -Werten anwendbar ist, zu verifizieren, wurde das Volumen der Teilchen mittels einer zweiten modellfreien Evaluationsmethode mit Hilfe der Porod-Invarianten (siehe Formel 2.2-12) bestimmt. Aus diesen Werten konnte dann ebenfalls der kugeläquivalente Radius der Teilchen ermittelt und mit den Ergebnissen Guinier-Näherung verglichen werden. Die Porod-Invariante kann direkt aus den Streudaten ohne Zuhilfenahme eines Modells aus dem Integral über die gesamte Streukurve in einer Auftragung von $q^2 I(q)$ gegen q bestimmt werden. Zusammen mit der auf $q = 0$ extrapolierten Streuintensität I_0 konnte so das Volumen der Partikel nach Formel 3.2-2 berechnet werden, ohne dass die Kenntnis der exakten Partikelform oder der absoluten Intensitäten nötig war.

Die gefundenen Partikelvolumina reichten von $2660 \pm 297 \text{ nm}^3$ für die kleinsten und bis zu $84712 \pm 8865 \text{ nm}^3$ für die größten Partikel. Aus diesen Volumina wurden über die einfache Relation nach $R_V = \sqrt[3]{3/4\pi \cdot V}$ der entsprechende Äquivalenzradius einer Kugel R_V mit dem gleichen Volumen wie das der Partikel berechnet. Die Ergebnisse der Radien beider Auswerteverfahren sind in Tabelle 3.2-1 zusammengefasst.

Tabelle 3.2-1. Guinier(Gyrations-)radien R_G , die von R_G abgeleiteten Kugelradien R , Partikelvolumina und dazu korrespondierende Kugelradien R_V , die mit Hilfe der Porod-Invarianten berechnet wurden und das Verhältnis R/R_V zum Vergleich der beiden Auswertungsvarianten.

Fraktion	R_G (nm)	R (nm)	Volumen (nm ³)	R_V (nm)	R/R_V
1-12 [†]	-	-	-	-	-
13	7.0 ± 0.7	9.1 ± 0.9	2660 ± 297	8.6 ± 1.0	1.0
14	8.1 ± 0.5	10.4 ± 0.6	3689 ± 253	9.6 ± 0.7	1.1
15	8.1 ± 0.4	10.4 ± 0.4	4037 ± 214	9.9 ± 0.5	1.1
16	8.5 ± 0.3	11.0 ± 0.3	5592 ± 220	11.0 ± 0.4	1.0
17	9.7 ± 0.2	12.5 ± 0.3	7189 ± 231	12.0 ± 0.4	1.0
18	10.3 ± 0.2	13.3 ± 0.2	8239 ± 237	12.5 ± 0.4	1.1
19	10.6 ± 0.2	13.7 ± 0.2	8026 ± 222	12.4 ± 0.3	1.1
20	11.9 ± 0.2	15.4 ± 0.2	12908 ± 309	14.6 ± 0.3	1.1
21	13.7 ± 0.4	17.7 ± 0.5	15324 ± 748	15.4 ± 0.8	1.1
22	13.6 ± 0.2	17.5 ± 0.3	16189 ± 473	15.7 ± 0.5	1.1
23	13.3 ± 0.3	17.2 ± 0.3	14864 ± 638	15.3 ± 0.7	1.1
24	13.9 ± 0.3	17.9 ± 0.3	16038 ± 653	15.6 ± 0.6	1.1
25	14.7 ± 0.5	19.0 ± 0.6	18075 ± 1201	16.3 ± 1.1	1.2
26	15.0 ± 0.5	19.3 ± 0.6	17287 ± 1181	16.0 ± 1.1	1.2
27	14.6 ± 0.3	18.6 ± 0.4	15898 ± 707	15.6 ± 0.7	1.2
28 [‡]	15.1 ± 0.3	19.5 ± 0.4	19143 ± 864	16.6 ± 0.7	1.2
29 [‡]	15.5 ± 0.3	20.0 ± 0.4	20061 ± 885	16.9 ± 0.7	1.2
30 [‡]	15.4 ± 0.3	20.4 ± 0.4	19836 ± 808	16.8 ± 0.7	1.2
31 [‡]	15.5 ± 0.3	20.1 ± 0.3	21183 ± 764	17.2 ± 0.6	1.2
32	15.5 ± 0.3	20.0 ± 0.4	22218 ± 918	17.4 ± 0.7	1.1
33	15.6 ± 0.3	20.1 ± 0.4	22839 ± 905	17.6 ± 0.7	1.1
34	16.0 ± 0.3	20.6 ± 0.4	25321 ± 997	18.2 ± 0.7	1.1
35	15.8 ± 0.4	20.4 ± 0.6	27823 ± 1778	18.8 ± 1.2	1.1
36	17.0 ± 0.6	21.9 ± 0.7	36661 ± 2978	20.6 ± 1.7	1.1
37	16.2 ± 0.5	21.0 ± 0.6	38546 ± 2755	21.0 ± 1.5	1.0
38	17.5 ± 0.5	22.6 ± 0.7	38607 ± 2903	21.0 ± 1.6	1.1
39	19.8 ± 0.9	25.5 ± 1.1	71357 ± 9478	25.7 ± 3.4	1.0
40	20.6 ± 0.7	26.6 ± 0.9	84712 ± 8865	27.2 ± 2.9	1.0
41-50 [†]	-	-	-	-	-

[†] Es konnten keine Partikel detektiert werden.

[‡] Diese Fraktionen wurden vereint und für die folgenden Zelleperimente verwendet.

Die nach beiden Verfahren ermittelten Partikelradien stimmen mit R/R_V -Verhältnissen von 1,0 - 1,2 gut überein. Die durch die Guiniernäherung berechneten Radien weisen dabei mit zunehmendem Radius größere Unsicherheiten auf. Dies hängt damit zusammen, dass der gültige Bereich der Streudaten, für die die Näherung anwendbar ist, mit zunehmender Partikelgröße kleiner wird. Es wurden Partikelfraktionen nach jeweils einer Minute Fraktionierungszeit gesammelt.

In der folgenden Abbildung sind die Partikelvolumina, berechnet mit Hilfe der Porod-Invarianten und die Konzentration der entsprechenden Partikel aufgetragen.

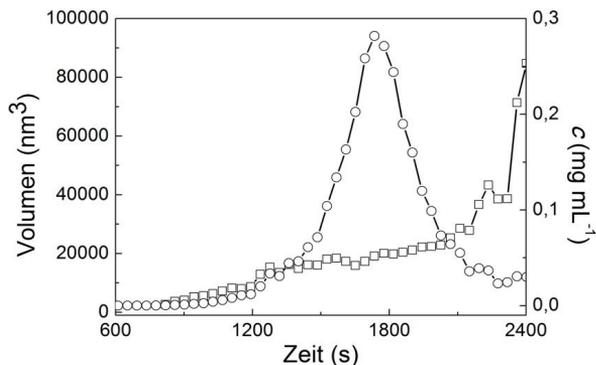


Abbildung 3-20. Es sind in Abhängigkeit von der Fraktionierungszeit die Partikelvolumina (viereckige Symbole) gezeigt, die aus der Porod-Invarianten berechnet wurden und die zugehörigen Konzentrationen der Partikelfraktionen (kreisförmige Symbole).

Die Fraktionen aus dem höchsten Konzentrationsbereich und mit ähnlichen Radien wurden zu einer Fraktion vereinigt. Der Eisengehalt in dieser Probe wurde zu $244 \mu\text{g mL}^{-1}$ ermittelt. Dieser Gehalt war ausreichend zur Verwendung für die folgenden Zellversuche, für die Partikelkonzentrationen von $5 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Zellkulturmedium benötigt wurden.

Die Zellversuche mit dem Caco-2 Zellmodell wurden in Kooperation mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Thielallee 88-92, 14195 Berlin) von Linda Böhmert unter der Leitung von Dr. Birgit Niemann in der Abteilung für Lebensmittelsicherheit von Prof. Dr. Dr. A. Lampen durchgeführt.

Zur Untersuchung der Effekte von den beschriebenen Nanopartikeln wurden CTB Assays in Kombination mit anschließender DAPI-Färbung durchgeführt, um die Proliferationsraten der Zellen und die Zellzahlen in Abhängigkeit der zugeführten Partikelkonzentrationen und der Inkubationszeit verfolgen zu können. Die Zellen wurden jeweils Konzentrationen von $5, 10, 25, 50$ und $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ von Eisenoxid-Nanopartikeln mit einem Radius von $R_G = 15 \pm 0.8 \text{ nm}$ im Nährmedium ausgesetzt.

FCS ist ein vielfach eingesetzter Bestandteil in Zellkulturmedien, da es eine große Zahl von Proteinen und Wachstumsfaktoren enthält. Insbesondere Proteine können aber auch mit Nanopartikeln wechselwirken, was zu Aggregationen, aber auch Stabilisation und in der Folge zu verändertem Aufnahmeverhalten der Partikel in Zellen¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ führen kann. Horie *et al.* haben zudem gezeigt, dass Eisenoxid-Nanopartikel von $20 - 40 \text{ nm}$, wie

auch andere Metalloxid-Nanopartikel, Proteine und Calciumionen aus dem Nährmedium (in diesem Falle DMEM) binden und so die Ergebnisse von Toxizitätsuntersuchungen verfälschen können¹¹⁰. Allerdings ist der letztgenannte Effekt bei den hier verwendeten Nanopartikelkonzentrationen von maximal $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ nach den Daten von Horie *et al.* als vernachlässigbar gering einzustufen. Um aber den schwer vorherzusagenden Einfluss von FCS in den hier beschriebenen Experimenten zu berücksichtigen, wurden zwei parallele Versuchsreihen mit einem FCS enthaltenden Medium und einem FCS-freiem Medium durchgeführt.

Tatsächlich wurde eine stärkere Inhibierung der Zellproliferation der Caco-2 Zellen in FCS freiem Medium festgestellt. Ob ein Mangel an Insulin/Transferrin im Nährmedium durch Adsorption an die Eisenoxid-Nanopartikel ursächlich war, konnte dabei allerdings nicht ausgeschlossen werden. Der Anstieg der metabolischen Aktivität der Zellen bei gleichzeitiger Abnahme des Zellwachstums im FCS-haltigen Medium wies aber auf zusätzliche spezifische Effekte der Partikel auf die Zellen hin.

Eisenoxid-Pigmente, zu denen auch $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ gezählt wird, sind praktisch unlöslich in Wasser¹⁰³ und gelten aufgrund dessen als nicht toxisch. Daher sind sie auch als Lebensmittelfarbstoffe zugelassen. In Form von Nanopartikeln erhöht sich mitunter jedoch die Löslichkeit auch schwer löslicher Verbindungen und damit auch die Bioverfügbarkeit der entsprechenden Stoffe¹¹¹. Ein direkter Vergleich von mikro- und nanopartikulären Metalloxidpartikeln, wie ihn Karlsson *et al.* an humanen Lungenepithelzellen durchgeführt haben, zeigte eine geringe Toxizität für beide Partikelarten. Jedoch wurde für die Nanopartikel eine erhöhte Anzahl abgestorbener Zellen und vermehrter oxidativer Stress im Vergleich zu den mit Mikropartikeln inkubierten Zellkulturen beobachtet¹¹². Brunner *et al.* zeigten auch, dass Eisenoxid-Nanopartikel teilweise stark unterschiedliche Toxizitäten in verschiedenen Zellsystemen aufwiesen¹¹³: Während in 3T3-Zellen (Fibroblasten) von Mäusen so gut wie keine Reaktion auf zugeführte Eisenoxid-Nanopartikel zeigten, erwies sich die humane MSTO-Zelllinie (Mesotheliomzellen) als besonders empfindlich und letale Konzentrationen wurden bereits bei Inkubation mit 7.5 ppm Eisenoxid in nanopartikulärer Form im Nährmedium beobachtet (angegebene Größe waren hier 12 nm, allerdings mit sehr breiter Größenverteilung, 20 Gewichtsprozent der Partikel wurden mit einer Größe von mehr als 200 nm angegeben). Neben einer erhöhten Bioverfügbarkeit der Stoffe, aus denen die Nanopartikel bestehen, müssen auch mögliche katalytische Effekte berücksichtigt werden, die spezifisch für nanopartikuläres

Material auftreten können. Speziell für $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ wurde in einer aktuellen Studie von Voinov *et al.* die Bildung von Hydroxy-Radikalen von Partikeln mit Durchmessern von 10 - 20 nm unter biologisch relevanten Bedingungen nachgewiesen¹¹⁴. Dabei lief die Bildung der sogenannten *ROS* (*reactive oxygen species*), wie mit Hilfe von Elektronenspinresonanz-Experimenten (ESR) gezeigt werden konnte, an der Oberfläche der Nanopartikel nach dem Mechanismus der Fenton-Reaktion¹¹⁵ ab und war damit über 50 Mal effektiver, als die Bildung der *ROS* durch freie Ionen. Insbesondere diese Hydroxy-Radikale weisen ein hohes Schadpotential für lebende Zellen auf, da sie aufgrund ihrer extremen Kurzlebigkeit (intrazelluläre Halbwertszeit beträgt etwa 1 ns¹¹⁶) nicht wie längerlebige Spezies durch Superoxidbismutase abgebaut werden können, sondern diffusionskontrolliert mit jeglichem Zellmaterial reagieren.

In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigten sich ebenfalls Effekte, die auf eine erhöhte Zelltoxizität von Eisenoxid-Nanopartikeln gegenüber grob strukturiertem Material hinwiesen.

Zellversuche in DMEM ohne FCS

Ohne Zugabe von FCS im Medium (DMEM mit Insulin/Transferrin) zeigte sich bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit anhand der DAPI-Färbung eine signifikante Abnahme der Zellzahl für Nanopartikel-Konzentrationen von 50 und 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, wie in Abbildung 3-21 gezeigt wird. Nach einer intermediären Steigerung der Proliferationsraten nach 48 Stunden sank die Stoffwechselrate wieder ab, was anhand der Ergebnisse der CTB Assays zu ersehen ist. Für geringere Konzentrationen deutet sich dieses Verhalten mit einer Zeitverzögerung ebenfalls an. Die Zellzahl hat nach 72 Stunden Inkubationszeit nur für die beiden höchsten Partikelkonzentrationen signifikant abgenommen, wobei sich auch hier für kleine Konzentrationen ein ähnlicher Trend andeutet. Bei der maximalen Konzentration von 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nahm die Zellzahl bis auf unter 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ab, die keine Nanopartikel enthielt, sondern der lediglich das Solvens zugegeben wurde. Die auf die Zellzahl normierten Proliferationsraten, bzw. die metabolische Aktivität, die mittels CTB Assays bestimmt wurden, zeigten erst nach 48 Stunden Inkubationszeit einen signifikanten Anstieg bei Konzentrationen von 50 und 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, der nach 72 Stunden wieder stark rückläufig war.

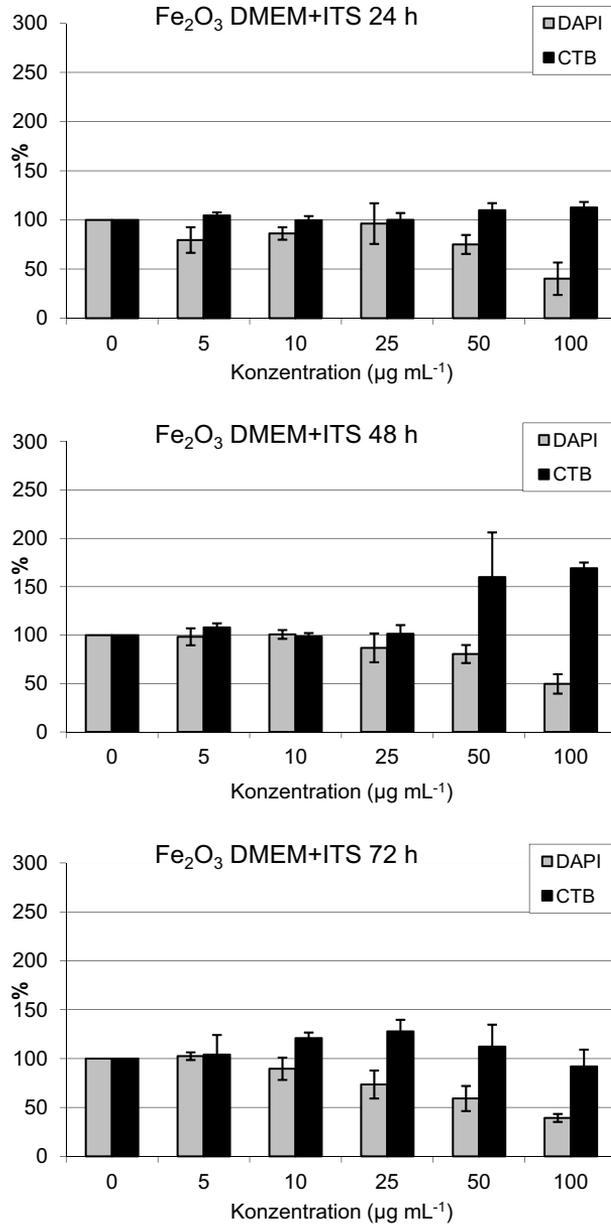


Abbildung 3-21. Ergebnisse der CTB Assays und der DAPI-Färbungen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit. Die Prozentangaben sind auf die Kontrollgruppe, in der keine Nanopartikel zugegeben worden sind, normiert. Die Caco-2 Zellen wurden mit Konzentrationen von 0 - 100 µg mL⁻¹ an Eisenoxid-Nanopartikeln in Zellmedium ohne FCS inkubiert.

Ebenso war ein verzögerter Anstieg der Stoffwechselraten nach 72 Stunden auch bei Inkubation mit geringeren Nanopartikelkonzentrationen von 10 und $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu beobachten.

Mikroskopische Aufnahmen der Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zeigten für die untersuchten Konzentrationen keine offensichtlichen Anomalien der Zellform (Abbildung 3-22).

Zellversuche in DMEM mit FCS

Bei Verwendung von DMEM mit FCS war ein ähnlicher Trend wie im Medium ohne FCS zu erkennen, allerdings schienen diese mit einer gewissen Zeitverzögerung und weniger ausgeprägt einzutreten, als es im FCS-freien Medium der Fall war (siehe Abbildung 3-23). Die Stoffwechselraten und die Zellviabilität nahmen bei der höchsten Konzentration von Nanopartikeln nach 24 Stunden Inkubation zu. Hier lag die Zellzahl jedoch signifikant höher als die des Vergleichsexperiments ohne FCS. Nach fortgesetzter Inkubation der Zellen für insgesamt 48 und schließlich 72 Stunden sank diese aber wieder ab, der gleiche Trend war bei den Proliferationsraten zu beobachten. Für die nächst niedrigeren Konzentrationen von 50 und $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ nahmen die Proliferationsraten mit einer gewissen Verzögerung von 24 bzw. 48 Stunden ebenfalls erst zu und sanken wieder ab, was möglicherweise einer verzögerten Freisetzung der Nanopartikel gegenüber den Proben ohne FCS zuzuschreiben ist. Die Zellzahlen nahmen für die beiden höchsten Konzentrationen an Nanopartikeln nach 72 Stunden ebenfalls ab, allerdings in geringerem Maße als dies bei dem serumfreien Medium zu beobachten war.

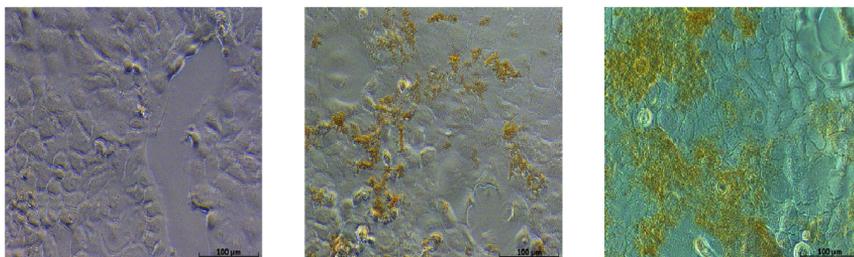


Abbildung 3-22. Mikroskopische Aufnahmen bei 200-facher Vergrößerung der Caco-2 Zellen in Serum freiem Medium nach 48 Stunden Inkubationszeit. **Links:** Ohne Zugabe von Nanopartikeln, **mitte:** mit $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ und **rechts:** $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

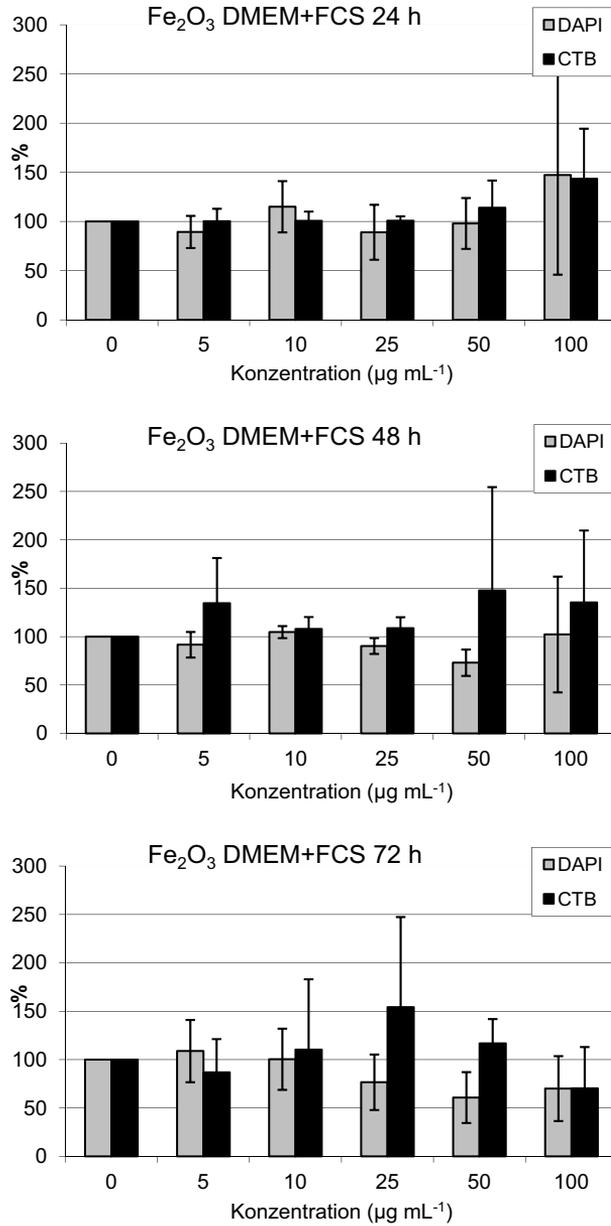


Abbildung 3-23. Ergebnisse der CTB Assays und DAPI-Färbung (vgl. Abbildung 3-21) aber mit FCS im Nährmedium.

3.2.5 Zusammenfassung

Eine Probe von Nanopartikeln mit Trägheitsradien zwischen 7 und 21 nm wurde suspendiert, deagglomeriert, mittels der Asymmetrischen Feldflussfraktionierung nach Größen aufgetrennt und mit Kleinwinkelröntgenstreuung in der A4F *Online*-Kopplung charakterisiert werden. Durch den Einsatz der *Slot-Outlet* Funktion konnten Fraktionen mit definierter Partikelgröße von 15.4 ± 0.6 nm und genügend hoher Konzentration bereit gestellt werden, um anschließende Zellversuche in zwei unterschiedlichen Nährmedien zu ermöglichen.

Bei der Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften der vorliegenden Eisenoxid-Nanopartikel anhand von CTB Assays und DAPI-Färbung ist ein signifikanter Effekt auf die getesteten Caco-2 Zellen nur bei den höchsten, eingesetzten Konzentrationen von 50 und $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu beobachten gewesen. Die Anwesenheit von FCS im Nährmedium schien die Reaktion der Zellen auf die Partikel abzuschwächen bzw. zu verlangsamen. Die beobachtete Toxizität der Partikel ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Karlsson *et al.*¹¹² am Lungenepithel-Zellmodell.

Nichtsdestotrotz zeigten diese Untersuchungen, dass die Toxizität von Stoffen in grober Form nicht direkt mit denen in nanopartikulärer Form gleichgesetzt werden können. Daher sind entsprechende Untersuchungen der Partikeleffekte auf repräsentative Zellmodelle angezeigt, besonders dort, wo diese Partikel potentiell oder unmittelbar vom Menschen aufgenommen werden können. Insbesondere sollte ein Augenmerk auf Partikelgröße und Größenverteilung gerichtet werden, um Studien vergleichbar und aussagekräftiger gestalten zu können.

Eine Möglichkeit, dies zu realisieren, besteht in der hier vorgestellten Vorgehensweise. Diese Methode ist ohne weiteres auch auf andere Nanopartikelsysteme anwendbar. Die hier untersuchten Caco-2 Zellen stellen als humane Colonzellen ein Modellsystem zur Simulation der oralen Aufnahme von chemischen Substanzen in den menschlichen Organismus dar. Anhand der beobachteten Zellreaktionen konnte die *in vitro* Toxizität der hier untersuchten Eisenoxid-Nanopartikel getestet werden, die in diesem Fall als moderat einzustufen ist.

3.3 Polystyrolsulfonate in der A4F-SySAXS *Online*-Kopplung

3.3.1 Einleitung

Die *Online*-Kopplung *Multi-Angle Laser Light-Scattering* (MALLS) als Detektion zur Charakterisierung von Makromolekülen ist mittlerweile, seit der Einführung dieser Technik durch Kulicke *et al.*,¹¹⁷⁻¹¹⁹ eine wertvolle Methode in der Polymeranalytik. Zunehmend wird hierbei neben der GPC/SEC auch auf die FFF als gekoppelte Trennmethode zurückgegriffen. Die wesentlichen Vorteile der FFF gegenüber der GPC/SEC sind die deutlich geringere Gefahr der Adsorption oder Degradation der Probe in dem trägerfreien Trennkanal der A4F.

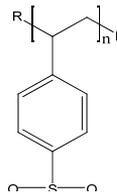


Abbildung 3-24.
Strukturformel von NaPSS.

Zudem können mit der FFF Polymere bis in den ultrahohen Molmassenbereich bearbeitet werden, die Grenze der noch trennbaren Teilchen liegt bei etwa 100 μm . Somit existiert praktisch keine obere Ausschlussgrenze der Größe für lösliche Polymere, wie im Falle der GPC/SEC oder HPLC.

Die A4F-MALLS *Online*-Kopplung erlaubt die Charakterisierung einer Polymerprobe auch mit außergewöhnlich breiter Verteilung der molaren Massen bis zu Molekulargewichten von ca. $10^{12} \text{ g mol}^{-1}$ ¹¹⁹. Die so erhaltenen Gyrationradien R_G der Polymerfraktionen sind ein wichtiger analytischer Parameter. Sind allerdings die Polymerknäuel in Lösung signifikant kleiner als ein Zwanzigstel der verwendeten Wellenlänge, so verhalten sich diese bei Messungen mittels MALLS zunehmend wie ein isotroper Streukörper, d.h. die beobachtbare Intensität des Streulichts ist in diesem Bereich nur noch geringfügig vom Streuwinkel abhängig und es können keine exakten Gyrationradien bestimmt werden. Bei Verwendung einer typischen Laserquelle mit einer Wellenlänge von $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ wäre das für Partikel ab $R_G \leq 15 \text{ nm}$ der Fall. In der folgenden Abbildung 3-25 ist dieser Sachverhalt anhand simulierter Streukurven veranschaulicht.

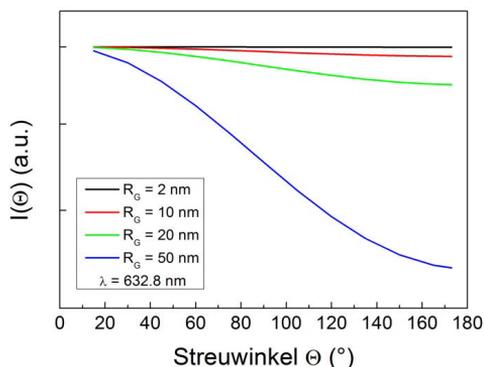


Abbildung 3-25. Simulierte Streukurven (Debye-Modell) Intensität $I(\Theta)$ gegen den Streuwinkel Θ für homogene Kugeln mit R_G -Werten von 2 bis 50 nm und einer Wellenlänge von $\lambda = 632.8$ nm. Bei Teilchen, deren Gyrationradien den Wert von $\lambda/20$ deutlich unterschreiten, nimmt die Abhängigkeit der Streuintensität vom Streuwinkel stark ab, was eine Auswertung der Streudaten zunehmend erschwert bzw. unmöglich macht.

Das bei SAXS verwendete Röntgenlicht hat typischerweise Wellenlängen im Bereich von $\lambda = 0.1 - 0.2$ nm und ist daher prädestiniert für die Strukturaufklärung von Nanoobjekten bis hin zu kleinen Gyrationradien von einem Nanometer⁴⁸. Allerdings ist die Streuung von Röntgenstrahlen an Polymeren in Lösung deutlich schwächer, als die von sichtbarem Licht. Die durch die Feldflussfraktionierung erhaltenen Probenfraktionen weisen methodenbedingt zudem typischerweise Konzentrationen deutlich unter 1 mg mL^{-1} auf. Wie bereits gezeigt wurde, kann die A4F-SAXS *Online*-Kopplung bei gut streuenden Proben wie Eisenoxid-Nanopartikeln mit einer herkömmlichen Röntgenröhre als Lichtquelle durchgeführt werden. Dies ist bei gelösten Polymeren aufgrund des geringen Streukontrastes nicht mehr möglich. Um dennoch eine Analytik mittels A4F-SAXS durchführen zu können, wurden die SAXS-Messungen am Synchrotron durchgeführt, das eine ca. 1000-fache Lichtintensität im Vergleich zu einer Röntgenröhre mit Festanode zur Verfügung stellt. Durch den Einsatz eines SAXS-Gerätes mit Spaltkollimation und der *Slot-Outlet*-Funktion der A4F wurde der Aufbau soweit optimiert, dass ein *proof-of-principle* Experiment zur Analytik eines wasserlöslichen Polymers mittels der A4F-SAXS-Methode durchgeführt werden konnte. Zusätzlich wurde in den Aufbau ein DLS-Gerät integriert, um neben den Gyrationradien auch die Diffusionskoeffizienten der fraktionierten Polymerknäuel bestimmen zu können.

Als Analyt wurde ein Gemisch aus sechs Natriumpolystyrolsulfonaten (NaPSS) mit molaren Massen von $6.5 \cdot 10^3$ bis $1 \cdot 10^6$ g mol^{-1} gewählt, das als Modell für wasserlösliche Polyelektrolyte mit hoher Polydispersität diente. NaPSS ist ein starker Polyelektrolyt, d.h die Sulfonsäuregruppen am Polystyrol-Rückgrat sind in wässriger Lösung unabhängig vom pH-Wert vollständig dissoziiert.

3.3.2 Material

Es wurden Natriumpolystyrolsulfonat-Standards mit molaren gewichtsmittleren Massen von $M_w = 6530, 32900, 63900, 145000$ und 1000000 g mol^{-1} und einer jeweiligen Polydispersität (M_w/M_n) nach Herstellerangabe von weniger als 1.2 verwendet.

Nach Einwaage der Proben wurden diese in 0.1 M NaCl-Lösung mit 200 mg L^{-1} Natriumazid gelöst und zur Entfernung von Staub durch $0.45 \mu\text{m}$ Cellulosemembranen filtriert.

3.3.3 Methoden und Durchführung

Der Aufbau der hier durchgeführten A4F-SAXS-DLS *Online*-Kopplung entspricht im Wesentlichen der Beschreibung in Kapitel 3.2.3. Es wurde jedoch ein Differentialrefraktionsindex-Detektor (DRI) als Konzentrationsdetektor direkt hinter die A4F geschaltet.

A4F

Die verwendete Ultrafiltrationsmembran bestand aus regenerierter Cellulose mit einem *MWCO* von $5 \cdot 10^3$ g mol^{-1} . Ein $500 \mu\text{m}$ starker Abstandhalter, der die Höhe des Trennkanals bestimmte, wurde eingesetzt. Als Laufmittel wurde wie auch als Lösungsmittel für die NaPSS-Proben eine 0.1 M NaCl-Lösung mit 200 mg L^{-1} Natriumazid verwendet. Es wurde die in Kapitel 3.2.3 beschriebene *Slot-Outlet* Funktion mit einer Slot-Rate von 80 % verwendet. Die Flussrate des Trägerstroms wurde auf 1 mL min^{-1} gesetzt, was unter Berücksichtigung des *Slot-Outlet*-Flusses einer Detektorflussrate von 0.2 mL min^{-1} entsprach. Die Zusammensetzung der Probe aus verschiedenen Polystyrolsulfonaten ist in Tabelle 3.3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3.3-1. Konzentrationen der Bestandteile der Natriumpolystyrolsulfonat-Mischung.

Kurzbezeichnung des Proben- bestandteils	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆
M _w (g mol ⁻¹)	6530	32900	63900	145000	282000	1000000
Konzentration (mg mL ⁻¹)	7.5	7.7	4.6	5.4	2.6	1.1

Der Querfluss wurde von einem initialen Wert von 2.5 mL min⁻¹, der während der Injektions-/Fokussierungsphase für 10 Minuten beibehalten wurde, innerhalb von 30 Minuten linear mit einem Gradienten von 0.077 mL min⁻² auf eine Rate von 0.2 mL min⁻¹ gesenkt. Anschließend wurde der Querfluss exponentiell¹²⁰ mit einer Rate von 0.2 auf 0 mL min⁻¹ abgesenkt (siehe Abbildung 3-26). Zur Trennung der Polymermischung wurde ein Probenvolumen von 100 µL der Polymermischung injiziert, was einer Gesamtmasse von 2.89 mg pro Probe entspricht.

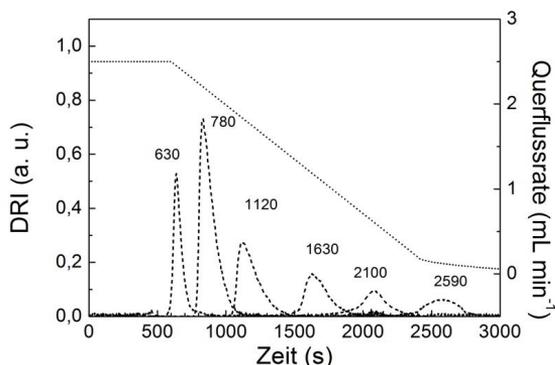


Abbildung 3-26. Querflussprofil (Punkte) und die DRI-Signale der einzeln injizierten Standards (Striche) mit den entsprechenden Elutionszeiten in Sekunden.

SAXS

Der Aufbau der SAXS-Detektion wurde in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Die Durchflusszelle wurde während der Messungen auf 25 ± 1 °C temperiert und war direkt mit dem Ausgang des DRI-Detektors verbunden. Als Quelle für das Röntgenlicht

wurde Synchrotronstrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 0.154$ nm verwendet. Gemessene Intensitäten wurden durch Abzug der Streudaten einer mit reinem Solvens gefüllten Kapillare vor der weiteren Auswertung korrigiert. Die Spalt-Längen-Entschmierung wurde mit Glatters *Indirect Fourier Transformation* Methode (IFT)⁸³ und der Software SAXSQuant durchgeführt.

DLS

Die DLS-Daten wurden *online* durch Verwendung einer Durchflussküvette, die an den Ausgang der Probenkapillare des SAXS-Gerätes angeschlossen wurde, wie auch offline durch Vermessen der einzeln gesammelten Fraktionen nach A4F aufgenommen. Die Küvetten wurden dabei auf 25 ± 1 °C temperiert.

3.3.4 Ergebnisse und Diskussion

Die Trennung einer polydispersen Polymerprobe in Lösung mittels A4F liefert eng größenverteilte Fraktionen, die mit gekoppelten Detektionsmethoden weiter charakterisiert werden können. Um eine Probe mit breiter Größenverteilung zu simulieren, wurde hier eine Mischung aus sechs NaPSS-Standards eingesetzt, um im Anschluss auch die Trennleistung der A4F zu illustrieren. Das verwendete Querflussprofil wurde für diese Probe soweit optimiert, dass die einzelnen Bestandteile in Form von voneinander Basislinien-getrennten Peaks eluiert werden konnten (siehe Abbildung 3-26). Durch die Kombination eines linear abfallenden Querflusses mit einem langsam, bei kleinen Querflussraten exponentiell abfallenden Querflussverlaufs, konnte eine Fraktionierung über den gesamten Größenbereich der Probe erzielt werden. Die Verwendung von 100 μL einer Probe mit einer Gesamtpolymerkonzentration von 2.89 mg mL^{-1} ist der höheren Datenqualität der SAXS-Messungen auf Kosten der Trennqualität geschuldet. Mit einer geringeren Beladung des Trennkanals mit Probenvolumina von 20 - 50 μL könnte eine bessere Trennleistung erzielt werden, da es bei höheren Probenvolumina tendenziell zu einer zunehmenden Überfrachtung der Konzentrationsregime (siehe Kapitel 2.1.3) kommen kann. Dies hat eine leichte Verschiebung der Peaks und eine Signalverbreiterung zur Folge, die aber in diesem Fall hinnehmbar ist (siehe Abbildung 3-27).

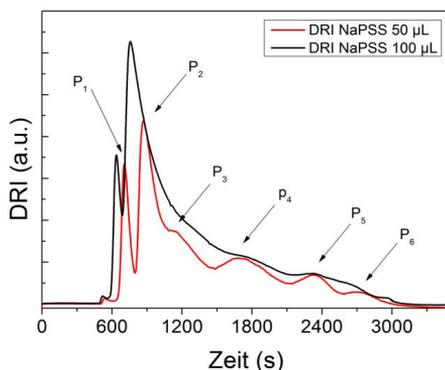


Abbildung 3-27. DRI-Signale der Elution der Mischung aus sechs PSS-Standards (P_1 - P_6) mit unterschiedlich hoher Proben-Beladung des A4F-Kanals (50 und 100 μL). Während bei einem Probenvolumen von 50 μL noch deutliche Einzelpeaks zu erkennen sind, die sehr gut mit denen der einzeln injizierten Proben übereinstimmen, sind die Signale bei höherer Beladung leicht verschoben und im Vergleich stärker verschmiert.

Offline-Messungen: SAXS

Vor der Durchführung der *Online*-Kopplung wurden die einzelnen Bestandteile der Probenmischung, d.h. einzelne Lösungen der Molmassenstandards, mittels SAXS und DLS vermessen. Mit Hilfe der SAXS-Streudaten kann so eine Struktur-Eigenschaftsbeziehung zwischen Gyrationradien R_G und den entsprechenden molaren Masse M_W nach

$$R_G = \sqrt{\langle R_G^2 \rangle} = k_\nu \cdot M_W^\nu \quad (3.3-1)$$

hergestellt werden. Der Exponent ν ist ein Maß für den Aufweitzustand des Polymerknäuels und kann Werte zwischen 1/3 (kompakte Kugel) und 1 (Stäbchen) annehmen. Unter sogenannten Θ -Bedingungen, die vom Lösungsvermögen des Solvents (und der Lösungstemperatur) abhängen und bei denen intramolekulare Polymerstrangwechselwirkungen gerade durch Polymer-Lösungsmittel-Wechselwirkungen aufgehoben werden, nimmt ν den Wert 0.5 an.

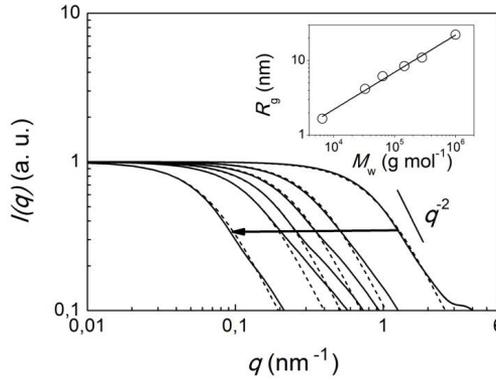


Abbildung 3-28. Mit GIFT Spalt-Längen-entschmierte Streukurven der sechs einzelnen NaPSS-Lösungen (durchgezogene Linien) und Fitkurven nach dem Debye-Modell (gestrichelte Linien). Der Pfeil zeigt in Richtung zunehmender Molmassen bzw. Gyrationradien mit $R_G = 1,7 \text{ nm}$ (P_1) bis $22,2 \text{ nm}$ (P_6). Die Streukintensitäten skalieren für höhere q -Werte annähernd mit q^{-2} , was auf eine Gauß-Knäuel Konformation unter Θ -Bedingungen schließen läßt. Kleine Grafik: Doppeltlogarithmische Auftragung der Gyrationradien als Funktion der molaren Massen. Eine Modellanpassung nach Formel 3.3-1 liefert für den präexponentiellen Faktor k_ν einen Wert von $2,2 \cdot 10^{-2}$ und für ν einen Wert von 0,5.

Für die hier untersuchten NaPSS-Lösungen wurde durch Modellanpassung gemäß Formel 3.3-1 ein Wert für ν von $0,500 \pm 0,018$ gefunden. Dies spricht für die Konformation eines Gauß-Knäuels in einem Θ -Lösungsmittel. Die Steigung von $I(q)$ bei höheren q -Werten in den gemessenen Streukurven skaliert annähernd mit q^{-2} , was ebenfalls auf diese Konformation hinweist (siehe Abbildung 3-28). Die Auswertung der Streudaten der SAXS-Experimente erfolgte durch Anpassung des Debye-Modells¹²¹ für Gauß-verteilte Kettenkonformationen, die mit der Debye-Formel den Gyrationradius der Polymerknäuel in Lösung liefern:

$$I(q) = I(0) \frac{2 \left\{ (qR_G)^2 - 1 + \exp \left[-(qR_G)^2 \right] \right\}}{(qR_G)^4} \quad (3.3-2)$$

Nach Formel 3.3-2 angepaßte Modellkurven lieferten R_G -Werte für die sechs untersuchten Polymerlösungen, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind:

Tabelle 3.3-2. Zusammenfassung der Gyrationradien R_G , die aus den offline gemessenen Streudaten der einzelnen Probenbestandteilen nach Anpassung des Debye-Modells erhalten wurden. Die angegebenen Unsicherheiten für R_G entstammen den Abweichungen der Modellanpassung.

Kurzbezeichnung	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆
M_w (g mol ⁻¹)	6530	32900	63900	145000	282000	1000000
R_G (nm)	1.67	4.23	6.15	8.44	10.93	22.23
	± 0.01	± 0.02	± 0.03	± 0.05	± 0.05	± 0.10

Die entsprechenden Kurvenanpassungen sind in Abbildung 3-28 dargestellt und zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Streudaten über einen großen q -Bereich. Einzig für die höchsten q -Werte der jeweiligen Probenmessungen wich das Modell von den Daten ab, was aber der Tatsache geschuldet ist, dass in dieser Region bereits die lokale (stäbchenartige) Struktur des Polymerrückgrates, die auch von der vorliegenden Persistenzlänge bestimmt wird, den Hauptanteil der Streuintensität lieferte.

Offline-Messungen DLS

Die Abhängigkeit der Diffusionskoeffizienten D von den molaren Massen M_w der Proben P₁-P₆ wurde vorab durch Einzelmessungen der Proben untersucht. Der Zusammenhang zwischen D und M_w ist gegeben durch:

$$D = k_d \cdot M_w^d \quad (3.3-3)$$

mit dem präexponentiellen Proportionalitätsfaktor k_d und dem Exponenten d , der ein Maß für den Lösungszustand des Polymers ist (vgl. Formel 3.3-1). Die vorangegangenen SAXS-Messungen der Gyrationradii wiesen auf eine Gauß-Knäuel Konformation unter Θ -Bedingungen hin, daher wurde zur Auswertung der DLS-Daten entsprechend $d = -0.5$ gesetzt.

Die doppellogarithmische Auftragung der gemessenen Diffusionskoeffizienten gegen die molaren Massen (Abbildung 3-29) zeigte einen nahezu linearen Zusammenhang, wobei leichte Abweichungen bei den höheren molaren Massen zu beobachten waren. Eine ähnliche Beobachtung bei DLS-Messungen der apparenten Diffusionskoeffizienten

von NaPSS-Proben ist auch von Tanahatoe *et al.* beschrieben worden mit der Vermutung, dass diese mit Kettenlängen-abhängigen Variationen der Zahl der kondensierten Gegenionen und *excluded-volume*-Effekten begründet werden können¹²². Zum Vergleich sind die von Tanahatoe *et al.* veröffentlichten Werte in der folgenden Abbildung 3-29 eingefügt.

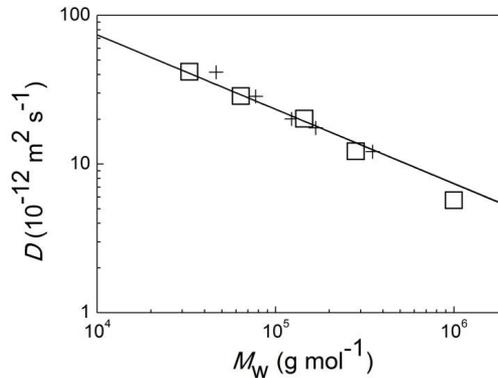


Abbildung 3-29. Doppeltlogarithmische Auftragung der Diffusionskoeffizienten aus Einzelmessungen der NaPSS-Proben mit Konzentrationen von jeweils 1 mg mL⁻¹ als Funktion der jeweiligen molaren Massen (quadratische Symbole). Eine lineare Kurvenanpassung (least squares fit) nach $D = k_d M_W^d$ lieferte bei festgelegtem $d = -0.5$ einen Wert von $k_d = 7.38 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Werte für die apparenten Diffusionskoeffizienten nach Tanahatoe *et al.*¹²² sind zum Vergleich eingezeichnet (Kreuze). Werte für P_1 (6530 g mol⁻¹) schwankten bei der DLS-Messung sehr stark und wurden daher nicht einbezogen.

Die Messwerte für P_1 zeigten bei den DLS-Messungen hohe Unsicherheiten bei Messwerten des Diffusionskoeffizienten von $(90 \pm 30) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ und wurden daher nicht in die Auswertung einbezogen

Für eine Anpassung der erhaltenen DLS-Daten für P_2 - P_6 nach Formel 3.3-3, bei welcher der exponentielle Parameter d nicht festgelegt wurde, ergaben sich mit höheren Unsicherheiten für $k_d = (12.48 \pm 3.90) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ g}^{-1}$ und $d = -0.548 \pm 0.029$. Der höhere Wert für d deutet in der Folge auf eine etwas stärker expandierte Lösungsstruktur hin. Dieses Verhalten wurde in ähnlichen Untersuchungen ebenfalls beobachtet. Für NaPSS wurden Werte für $d < -0.5$ von Tanahatoe *et al.* ($d = -0.61 \pm 0.04$)¹²² und Thielking *et al.* ($d = -0.68$)¹¹⁹ berichtet, allerdings unter leicht anderen Messbedingungen und Probenpräparationen. Da Polyelektrolyte in ihrer Lösungsstruktur sehr empfindlich auf Parameter wie Temperatur, Konzentration und Elektrolytgehalt des Lösungsmittels

reagieren,¹²³ kann man somit beim Vergleich mit weiteren Literaturwerten allerdings keine exakte Übereinstimmung erwarten.

Online-Kopplung A4F-SAXS

Die vorab durchgeführten SAXS-Einzelmessungen der NaPSS-Proben ermöglichten eine einfache Kalibration zur Bestimmung der molaren Massen über die R_G -Werte, die auch auf die Werte der A4F-SAXS *Online*-Kopplung angewendet werden kann.

Die Fraktionen der Probenmischung (P₁-P₆), die mit A4F bearbeitet wurde, zeigten Signale in den gemessenen SAXS-Intensitäten nach Retentionszeiten zwischen 10 und 50 Minuten, was wie zu erwarten den korrespondierenden DRI-Signalen entsprach (siehe Abbildung 3-27). Für die Kurvenanpassung wurde wiederum das Debye-Modell verwendet, dass in einem weiten q -Bereich von 0,1 - 2 nm⁻¹ sehr gut mit den experimentellen Daten übereinstimmte. Die mit Glatters IFT-Software Spalt-Längenschmierten Streukurven und die Anpassungen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

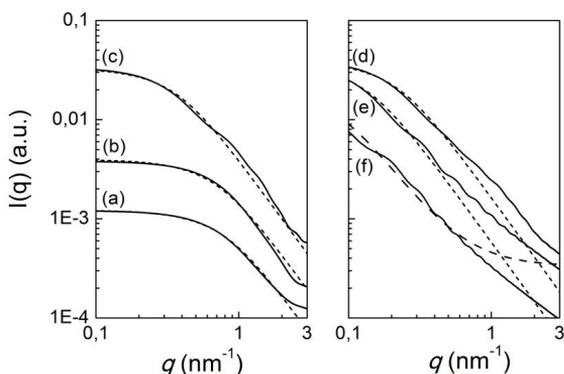


Abbildung 3-30. Dargestellt sind sechs experimentelle Streukurven (durchgezogene Linien) nach verschiedenen Elutionszeiten mit Kurvenanpassungen nach dem Debye-Modell (gestrichelte Linien). Die entsprechenden Gyrationradien sind (a) 1.86 nm (607 s), (b) 2.09 nm (652 s), (c) 4.03 nm (789 s), (d) 6.80 nm (1380 s), (e) 11.80 nm (2380 s) und (f) 19.99 nm (2607 s).

Die Anpassungen mittels des Debye-Modells stimmten über einen weiten q -Bereich gut mit den experimentellen Daten überein (siehe Abbildung 3-30, a-c). Zunehmende Abweichungen traten bei später eluierender Fraktionen in Bereich höherer q -Werte auf (Abbildung 3-30, d-f), die aber bei der Berechnung der Gyrationradien nicht von Bedeutung sind, da bei höheren q -Werten die lokale Struktur (die in diesem Falle die

Form von Stäbchen hat, wobei $I(q)$ mit q^{-1} skaliert) den wesentlichen Beitrag zur Streuintensität liefert. Die in Abbildung 3-30 dargestellten Daten zeigen sechs repräsentative Streukurven nach Retentionszeiten von 10 bis 44 Minuten und entsprechenden Gyrationradien von (1.9 ± 0.05) bis (20.0 ± 0.2) nm. Eine Übersicht über alle ermittelten Gyrationradien in Abhängigkeit der Fraktionierungszeit zeigt Abbildung 3-31.

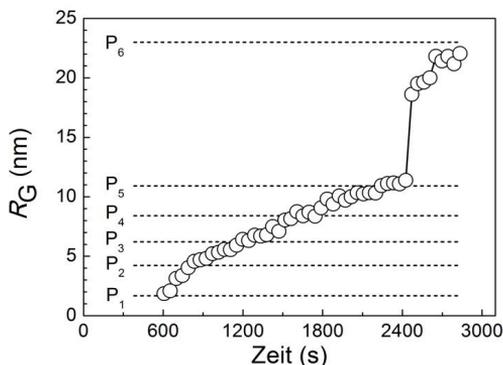


Abbildung 3-31. Gyrationradien, ermittelt aus den Streudaten der A4F-SAXS *Online*-Kopplung, in Abhängigkeit der Fraktionierungszeit (Kreise). Die gestrichelten Linien ($P_1 - P_6$) zeigen die Gyrationradien der einzeln gemessenen Probenfraktionen.

Die Gyrationradien nahmen stetig mit der Fraktionierungszeit von 1.89 nm nach 10 Minuten bis zu 22 nm nach 47 Minuten zu. Dies zeigte eine erfolgreiche Größentrennung der Fraktionierungsläufe an. Die Gyrationradien der einzeln gemessenen Proben sind in Abbildung 3-31 durch gestrichelte Linien ($P_1 - P_6$) indiziert, wobei die Schnittpunkte mit den Messwerten für R_G aus der *Online*-Kopplung sehr gut mit den DRI-Signalen der Konzentrationsmaxima der Fraktionen übereinstimmen (Abbildung 3-27).

Dies zeigt, dass mittels SAXS eine *Online*-Detektion in Kombination mit A4F mit einer zeitlichen Auflösung von 60 s ermöglicht. Weiterhin konnten Informationen über die Lösungsstruktur der hier untersuchten Natriumpolystyrolsulfonate gewonnen werden, die unter den hier vorliegenden Bedingungen als Gauß-Knäuel im Θ -Zustand identifiziert wurde.

Weiterhin konnten die molaren Massen nach Kalibration mittels Einzelmessungen der Proben aus den entsprechenden Gyrationradien nach der Beziehung aus Formel 3.3-1 abgeleitet werden. So ergaben sich nach $M_w = (R_G / k_v)^{1/\nu}$ die molaren Massen aus den

SAXS-Daten der *Online*-Kopplung. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

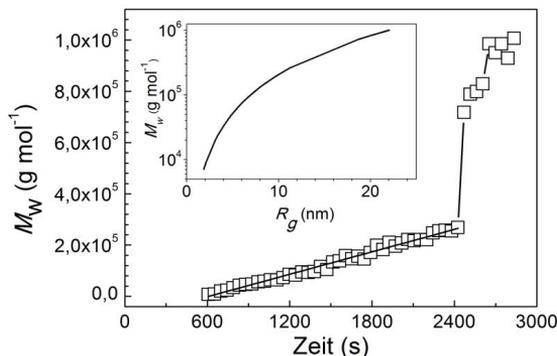


Abbildung 3-32. Aus den R_G -Werten abgeleitete molare Massen (quadratische Symbole) sind dargestellt in Abhängigkeit der Elutionszeit. In dem Bereich von 10 bis 40 Minuten nehmen diese linear zu mit einer Rate von $146 \text{ g mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Steigung der eingezeichneten Linie). Der folgende Sprung in der Molmassenzunahme ist dem speziell angepassten Querflussprofil geschuldet. Oben: Gyrationenradien in Abhängigkeit der molaren Massen.

Die molaren Massen nahmen im Bereich der Retentionszeiten zwischen 10 und 40 Minuten linear mit einer Rate von $145.9 \pm 2.7 \text{ g mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ zu. Der Sprung in der Molmassenzunahme bzw. der Gyrationenradien (Abbildung 3-31 und Abbildung 3-32) kommt aufgrund des speziell auf diese Probenmischung angepassten Querflussprofils zustande, wobei die Querflussrate nach 40 Minuten Laufzeit statt linear, mit exponentieller Rate abfällt (Abbildung 3-26) und somit ab diesem Punkt höhere Molmassen deutlich früher eluieren als es in der Folge eines weitergehenden linearen Verlaufs zu erwarten wäre.

Online DLS-Messungen

Die Diffusionskoeffizienten wurden mit dem direkt an die SAXS-Durchflusskapillare angeschlossenen DLS-Detektor *online* gemessen. Vorab wurde durch Testmessungen von Standard-Latexpartikeln (Radius von 60 nm) sichergestellt, dass bei Flussgeschwindigkeiten zwischen 0.5 und 2 mL min^{-1} im Rahmen der Fehlergrenzen keine signifikanten Abweichungen der gemessenen Werte von „ruhenden“ Proben auftraten, was nicht beobachtet wurde. So konnten verfälschte Messwerte durch die Bewegung der Partikel im Elutionsstrom in diesem Falle ausgeschlossen bzw.

vernachlässigt werden. Bei deutlich größeren Partikeln mit verhältnismäßig langsamer Eigendiffusion allerdings wären diese Effekte zu berücksichtigen und es könnte in so einem Fall ausschließlich *offline* gemessen werden.

Die *online* gemessenen Diffusionskoeffizienten nahmen wie erwartet mit der Laufzeit ab. In Abbildung 3-33 ist der Verlauf von D versus der Laufzeit und den vorab in Einzelbestimmung gemessenen Werten der Probenbestandteile der NaPSS-Mischung dargestellt.

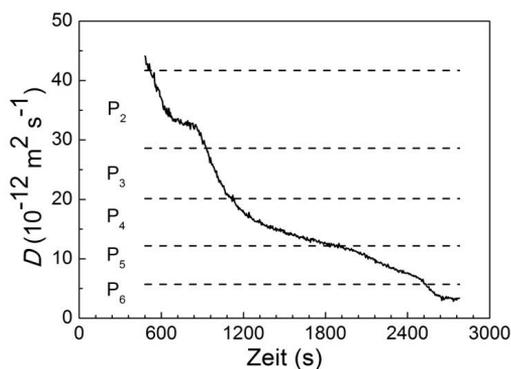


Abbildung 3-33. Verlauf der online gemessenen Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit der Elutionszeit (durchgezogene Linie). Die Werte für D aus den vorangegangenen Einzelmessungen (P_2 - P_5) sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Die stetige Abnahme der Diffusionskoeffizienten in Abbildung 3-33 bestätigt noch einmal den erfolgreichen Verlauf der Trennung mittels A4F. In der Abbildung sind die Werte der Einzelmessungen für P_2 - P_5 durch die parallel zur Abszisse verlaufenden gestrichelten Linien gekennzeichnet.

Die molaren Massen wurden nach Formel 3.3-3 aus den *online* gemessenen Diffusionskoeffizienten mit den aus der Auswertung der Einzelmessungen stammenden Parametern berechnet. Allerdings musste hierbei zur Anpassung eine Korrektur des exponentiellen Faktors vorgenommen werden ($k_d = 7.38 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ g}^{-1}$ und $d = -0.52$), der somit einen um 4 % niedrigeren Wert als für den Θ -Zustand annahm. Dies wies auf eine leicht expandierte Konformation im Vergleich zu den Idealbedingungen ($d = -0.5$) hin. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass unter den experimentellen Bedingungen der Messungen am Synchrotron die Probenlösungen tatsächlich eine leicht höhere Temperatur aufwiesen, da die Temperierung der DLS-Messküvette eine gewisse Zeit erfordert, die bei *Online*-Messungen nicht immer eingehalten werden kann. Auch

kann die Variation der Konzentration, die während der Fraktionierung auftritt, einen Einfluss auf die Viskosität der Polyelektrolytlösung haben. Ob letzteres tatsächlich in den hier untersuchten Konzentrationsbereichen maßgeblich ist, könnte durch den künftigen Einsatz eines *online* arbeitenden Viskosimeters verifiziert werden.

Die Ergebnisse der M_W -Berechnungen aus den Diffusionskoeffizienten der A4F-SAXS-DLS *Online*-Kopplung sind in Abbildung 3-34 dargestellt und zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Werten der Einzelmessungen. Allerdings konnte auch hier der Bestandteil P_1 mit der geringsten molaren Masse (6530 g mol^{-1}) aufgrund starker Schwankungen der Messwerte nicht erfasst werden bzw. lieferte die Auswertung nach Elutionszeiten, die P_1 entsprachen, einen unrealistisch hohen Wert von etwa 20000 g mol^{-1} .

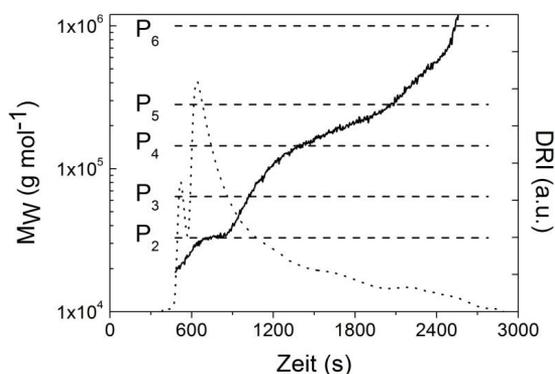


Abbildung 3-34. Molare Massen M_W (durchgezogene Linie) berechnet nach Formel 3.3-3 aus den Diffusionskoeffizienten der *Online*-Kopplung (siehe auch Abbildung 3-33). Das DRI-Signal der A4F-Trennung (gepunktete Linie) ist dem Verlauf der M_W -Werte hinterlegt. Zur Veranschaulichung sind die molaren Massen der Probenmischungsbestandteile $P_2 - P_6$ (gestrichelte Linien) parallel zur Abszisse eingezeichnet.

3.3.5 Zusammenfassung

Die A4F-SAXS *Online*-Kopplung wurde in der hier vorgestellten Arbeit erstmals zur Untersuchung von Polymerlösungen eingesetzt, um die Gyrationradien der Probenbestandteile zu ermitteln und darüber hinaus Aussagen über die molaren Massen und die Lösungskonformation treffen zu können. Zusätzlich wurde DLS in die Kopplung mit eingebunden, um zugleich die Diffusionskoeffizienten der Probenbestandteile ermitteln zu können.¹²⁴

Als Polymerprobe wurde eine Lösung sechs verschiedener Natriumpolystyrolsulfonate mit molaren Massen zwischen $6530 - 1000000 \text{ g mol}^{-1}$ verwendet, die als Modell für einen starken Polyelektrolyten mit hoher Größendispersität diente. Die benötigte Zeitdauer für einen Messvorgang betrug weniger als 60 Minuten, die erreichte zeitliche Auflösung der Messdaten waren 60 Sekunden. Insbesondere die A4F-SAXS Kopplung bietet Vorteile gegenüber der gebräuchlichen Kombination von A4F und Statischer Lichtstreuung, da durch den Einsatz von SAXS Gyrationen bis zu einem Nanometer erfasst werden können, was durch MALLS nicht mehr möglich ist. Durch die Adaptionmöglichkeiten der A4F kann die A4F-SAXS *Online*-Kopplung auf diverse Systeme von löslichen Polymeren angewendet werden, wobei als verbleibende Einschränkung in diesem Falle der apparative Aufwand durch die benötigte Synchrotronstrahlung genannt werden muss, die den Einsatzbereich vorerst vermutlich auf wissenschaftliche Forschung an Modellsystemen oder andere Spezialanwendungen wie die Charakterisierung von künftigen Standardmaterialien beschränkt.

3.4 Analyse von PVP mit breiter molarer Massenverteilung

3.4.1 Einleitung

Poly(N-vinylpyrrolidon) (PVP) wurde von Walter Reppe entwickelt und 1939 zum Patent angemeldet. Es ist ein wasserlösliches Polymer, dass im Zweiten Weltkrieg und bis in die 1950er Jahre in wässriger Lösung als Blutplasmaersatz verwendet wurde. Daher war die Verteilung der molaren Massen in PVP bereits zu dieser Zeit Gegenstand intensiver Forschung, da hochmolekulare Bestandteile

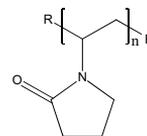


Abbildung 3-35.
Strukturformel
von PVP.

von Körper schlecht abgebaut werden und auch gefährliche Nebenwirkungen verursachen konnten¹²⁵⁻¹²⁷. Heutzutage wird PVP in diversen medizinischen und kosmetischen Produkten¹²⁸ eingesetzt (z. B. als das bekannte Antiseptikum Povidon-Jod¹²⁹ in Betaisodona[®] oder Braunol[®]). Aber auch in technischen Produkten wie Klebstoffen, Tinten, Beschichtungen etc.^{127,130} wird PVP verwendet. Besonders interessante Anwendung findet PVP zunehmend im Bereich der Nanotechnologie als sterischer Stabilisator¹³¹ und zur Wachstumskontrolle in der Nanopartikelsynthese. Beispielsweise wurden nahezu einheitliche Silber-Nanowürfel durch Reduktion von Silbernitrat mit Ethylenglycol in Gegenwart von PVP synthetisiert¹³². Es wurde auch gezeigt, dass die Form von Gold-Nanopartikeln durch Variation der Reaktionstemperatur und -dauer mit PVP als Reduktionsmittel und Stabilisator eingestellt werden kann¹³³. Als Stabilisator bei der Synthese superparamagnetischer Kobalt-Nanopartikeln beeinflusst PVP anders als andere Stoffe nicht die magnetischen Eigenschaften der Partikel¹³⁴. Im Gegensatz dazu kann man interessanterweise durch die Wahl der molaren Masse M_w des eingesetzten PVPs im Falle von Nickel-Nanopartikeln die magnetischen Eigenschaften steuern¹³⁵. So entstehen bei der Verwendung von PVP mit $M_w = 40000 \text{ g mol}^{-1}$ ferromagnetische Aggregate der Partikel; wird hingegen PVP mit $M_w = 360000 \text{ g mol}^{-1}$ verwendet, werden superparamagnetische Nickelpartikel erzeugt. Als letztes Beispiel für die vielseitige Verwendung sei die Fähigkeit von PVP genannt, Kohlenstoff-Nanoröhrchen, sogenannte *single-wall carbon nanotubes* (SWCNTs), in wässrigen Medien zu dispergieren¹³⁶.

PVP gilt als ungiftig und biokompatibel¹²⁹ und ist daher auch heutzutage noch Gegenstand vieler Neuentwicklungen im Bereich der Medizin, zum Beispiel im Bereich

der kontrollierten Medikamentenfreisetzung im menschlichen Körper (*controlled drug release*) mittels magnetischer Nanopartikel¹³⁷.

Pavlov *et al.* haben Anfang der 1990er Jahre die hydrodynamischen Eigenschaften von PVP-Lösungen anhand der Zusammenhänge zwischen intrinsischen Viskositäten und molaren Massen untersucht, mit Literaturwerten verglichen und in vielen Fällen widersprüchliche Daten gefunden¹³⁸. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass PVP häufig mit sehr breiten Größenverteilungen hergestellt wird; typische Polydispersitäten liegen in Bereichen von $M_w/M_n \geq 3$ ¹³⁰. So werden PVPs meist nicht durch eine Molmassenangabe, sondern durch sog. K-Werte klassifiziert, die sich aus den Viskositäten der PVP-Lösungen ableiten^{125, 126, 139}.

PVP ist oberflächenaktiv, da es durch die Pyrrolidon-Einheiten stark polare Amidgruppen neben einem unpolaren Rückgrat enthält. So kann beispielsweise bei niedrigem pH-Wert der Lactam-Ring zu einer Aminosäuregruppe hydrolysieren oder es kann durch Tenside wie Natriumdodecylsulfat (SDS) leicht komplexiert werden und verhält sich in der Folge durch die eingebrachten Ladungen wie ein Polyelektrolyt^{140, 141}.

Die meist sehr breite Molmassenverteilung wie auch der amphiphile Charakter von PVP-Lösungen erschweren eine detailliertere Charakterisierung von PVP allerdings erheblich.

Für PVPs mit verhältnismäßig niedriger molarer Masse (PVP K15, $\sim 8000 \text{ g mol}^{-1}$) konnten Jones *et al.* eine HPLC-basierte Methode entwickeln, die allerdings nur eine sehr geringe Auflösung hinsichtlich der vorhandenen Molmassenverteilung zuließ¹⁴².

Von Strelitzki und Reed wurde eine automatisierte Batch-Charakterisierung von PVP mittlerer molarer Massen mittels GPC/SEC, Viskosimetrie und Statischer Lichtstreuung eingesetzt, die aber einer ähnlichen Limitierung aufgrund der breiten Molmassenverteilungen in PVP unterlag¹⁴³.

Für Anwendungen, bei denen eine detaillierte Kenntnis der Molmassenverteilungen und der Lösungsstruktur von PVP von Bedeutung ist, wird im Folgenden die A4F-SAXS-DLS Kopplung als eine mögliche, zielführende Methodik anhand zweier PVPs mit mittleren und hohen molaren Massen (PVP K30 und K90) diskutiert.

3.4.2 Material

Zur Untersuchung wurden zwei Poly(N-vinylpyrrolidon)-Proben (Handelsname Kollidon[®], BASF), mit angegebenen molaren Massen von $4.0 \cdot 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ für K30 und $3.6 \cdot 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ für K90 verwendet. Die Polydispersitätswerte (M_w/M_n) betragen für K30 3.3 und K90 4.3.

Die Proben wurden in 0.1 M NaCl mit 200 mg L⁻¹ Natriumazid zu je 15 mg mL⁻¹ (K30) und 5 mg mL⁻¹ (K90) gelöst und vor Verwendung durch 0.45 µm Cellulosemembran filtriert.

3.4.3 Methoden und Durchführung

Der Aufbau der A4F-SAXS-DLS *Online*-Kopplung entspricht im Wesentlichen der in Kapitel 3.2.3. Im Folgenden werden daher nur die wichtigsten Parameter und die Abweichungen von bereits beschriebenen Aufbau aufgeführt.

A4F

Die eingesetzte Ultrafiltrationsmembran im A4F-Trennkanal bestand aus regenerierter Cellulose mit einem *MWCO* von $5 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$. Die Höhe des Trennkamals betrug 500 µm. Als Laufmittel wurde wie auch als Lösungsmittel für die Proben eine 0.1 M NaCl-Lösung mit 200 mg L⁻¹ Natriumazid verwendet.

Zur Untersuchung der einzelnen Proben wurden Volumina von 0.4 mL einer K30-Lösung mit einer Konzentration von 15 mg mL⁻¹ und 0.2 mL einer K90-Lösung mit 5 mg mL⁻¹ verwendet. Des Weiteren wurde eine Mischung der Proben K30 und K90 mit korrespondierenden Konzentrationen von 15 mg mL⁻¹ (K30) und 5 mg mL⁻¹ (K90) hergestellt, von der jeweils 0.4 mL in die A4F zur Fraktionierung injiziert wurden.

Die Trägerstromrate wurde auf 1 mL min⁻¹ gesetzt, wobei bei einer *Slot-Outlet*-Rate von 80 % gearbeitet wurde, d.h. die resultierende Detektorflussrate lag bei 0.2 mL min⁻¹. Der Querflussstrom wurde während der Injektions-/Fokussierungsphase von 10 Minuten auf drei mL min⁻¹ gesetzt und dann mit einer exponentiellen Rate gemäß der Funktion nach Williams *et al.*¹²⁰ von 0.25 mL min⁻² über 60 Minuten von drei auf null mL min⁻¹ gesenkt (siehe auch Abbildung 3-37). An die A4F waren in direkter Kopplung der DRI-Detektor, die SAXS und das DLS-Gerät angeschlossen.

SAXS

Der Aufbau der SAXS-Detektion unter Verwendung des SAXSess-Gerätes wurde in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Die Messkapillare wurde auf 25 ± 1 °C temperiert. Als Quelle für das Röntgenlicht wurde Synchrotronstrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 0.124$ nm verwendet. Für Einzelmessungen der Polymerproben wurde ein zweiter Aufbau verwendet. Mittels einer Ultraschallfalle analog zu Arbeiten von Leiterer *et al.*^{144,145} konnten einzelne Probenröpfchen ebenfalls am Synchrotron mit punktfokussiertem Röntgenlicht untersucht werden. In einer Ultraschallfalle werden zwischen der Sonotrode, die Schallwellen im Ultraschallbereich aussendet und einem Reflektor, der diese zurück wirft, stehende Wellen erzeugt, in deren Knoten kleine Probenmengen kräftefrei schweben, sprich levitiert werden¹⁴⁶. So können Proben berührungsfrei und ohne ein Probengefäß, dessen Wandung meist eine Störquelle darstellt, untersucht werden.

Die aus Messungen mit der SAXSess erhaltenen Daten wurden mittels Glatters IFT-Software^{48, 147} und der geräteeigenen Software SAXSQuant Spalt-Längen entschmiert.

DLS

Die DLS-Messungen wurden unter Verwendung einer Quarzglas-Durchflussküvette, die direkt mit dem Ausgang der Probenkapillare der SAXSess verbunden wurde, durchgeführt. Als Lichtquelle wurde ein He-Ne-Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 632.8$ nm eingesetzt, deren Streulicht unter einem Winkel von 173° (Rückstreumodus) detektiert wurde.

3.4.4 Ergebnisse und Diskussion

Im Vorfeld der *Online*-Messungen wurden die einzelnen Probenlösungen von PVP K30 und K90 in verschiedenen Konzentrationen von 0.3 - 1.5 % (w/w) mittels SAXS untersucht. So konnten konzentrationsbedingte Konformationsänderungen ausgeschlossen werden, die in der späteren A4F-Trennung dann ebenfalls zu berücksichtigen gewesen wären. Die erhaltenen Streudaten wiesen in diesem Konzentrationsbereich keine qualitativen Unterschiede auf, wie z.B. eine Änderung der Kurvenkrümmung, die auf konformelle Übergänge hätte schließen lassen können.

Die Interpretation der SAXS-Streudaten erfolgte auf der Basis des *wormlike-chain* Modells (WLC)⁴⁸. Dieses wurde in den Grundzügen von Kratky und Porod^{148, 149} entwickelt und beschreibt den Polymerstrang als aus miteinander verbundenen

zylindrischen Einheiten mit einheitlicher Streulängendichte und Radius r . Es läßt Aussagen sowohl über die Gyrationradien des gesamten Polymerstrangs als auch über die Persistenzlänge l_p als Maß für die Steifigkeit und die Gesamtlänge (Konturlänge L) des Polymerstrangs treffen. Die sogenannte Kuhn-Länge b ist für semi-flexible Polymere gleichbedeutend mit dem Abstand, innerhalb dessen man den Polymerstrang noch als „gerade“ betrachtet und daher direkt mit der Persistenzlänge verknüpft. Hierbei ist die Kuhn-Länge gleich der zweifachen Persistenzlänge ($b = 2l_p$).

Streuungsfunktionen zur Dateninterpretation von semi-flexiblen Polymeren auf der Basis des WLC wurden unter anderem von Pedersen und Schurtenberger veröffentlicht¹⁵⁰. Ballauff *et al.* haben in einer vergleichenden Studie diese Streumodelle auf ihre Eignung über einen weiten Bereich von Persistenzlängen untersucht¹⁵¹. Die hier verwendete Streufunktion zur Modellierung des Formfaktors der experimentellen Streudaten beinhaltet, aufbauend auf den genannten Untersuchungen, weiterhin die Berücksichtigung der Polydispersität der inhärenten Zylinderfunktion¹⁵². Diese Modifizierungen wurden von Kline in der vom National Institute of Standards and Technology (NIST) veröffentlichten Sammlung von Modellfunktionen, verwendbar mit IGOR Pro, berücksichtigt^{84, 153}. Danach gilt für die Streuung an Lösungen semiflexibler Polymere nach dem WLC-Modell der Zusammenhang

$$I(q) = c\Delta\rho_m^2 MS(q, L, b)P(qR) \quad (3.4-1)$$

mit der Polymerkonzentration c , der Molmasse M und der Elektronendichtedifferenz zwischen Polymer und Lösungsmittel $\Delta\rho_m$. $S(q, L, b)$ beschreibt den Formfaktor einer semi-flexiblen Polymerkette in Abhängigkeit des Streuvektors q mit der Konturlänge L und der Kuhn-Länge b . Die vollständige mathematische Beschreibung von $S(q, L, b)$ geben Chen *et al.*¹⁵². $P(qR)$ beschreibt den Streuquerschnitt eines starren Stäbchens nach $P(qR) = [2J_1(qR)/qR]$ mit der Zylinderfunktion (Besselfunktion 1. Ordnung) $J_1(x)$. Für kleine q -Werte geht $I(q)$ nach Formel 3.4-1 in die Guinier-Näherung über, d.h. der Gyrationradius ist analog nach $I(q) = I(0) \cdot \exp(-R_G^2 q^2/3)$ zu bestimmen.

Offline-Messungen SAXS

Die Gyrationradien für die unfractionierten Lösungen der beiden PVP-Proben wurden auf diese Weise zu $5.42 \pm 0.02 \text{ nm}$ (q -Bereich bis 0.2 nm^{-1}) für K30 und $12.32 \pm 0.05 \text{ nm}$ (q bis 0.1 nm^{-1}) für K90 bestimmt. Durch die Messung am Synchrotron, sowohl mit Spalt- als auch mit Punktfokus im levitierten Tropfen, konnten Streuintensitäten über einen großen q -Bereich erhalten werden. Messungen mit Spaltfokus lieferten dabei Streudaten bis zu kleinen q -Werten von 0.06 nm^{-1} , wohingegen mit Hilfe des Aufbaus mit Punktfokus und levitierten Probentropfen bei höheren q -Werten hochwertige Daten, in diesem Falle bis zu 7 nm^{-1} , erhalten werden konnten. Zur Auswertung wurden die Streudaten jeweils beider Messungen kombiniert.

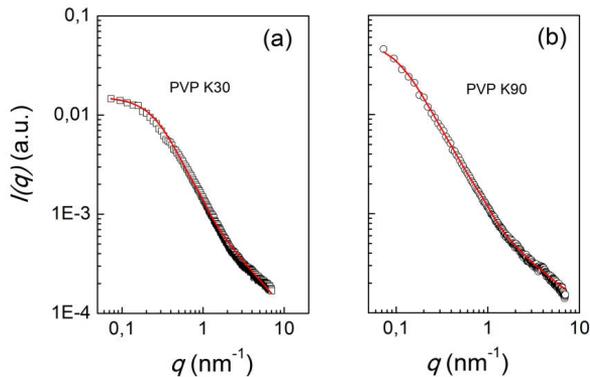


Abbildung 3-36. SAXS-Streudaten der offline-Messungen beider PVP-Proben K30 und K90 mittels Spalt- und Punktfokusaufbau in doppelt-logarithmischer Darstellung. Die Anpassungen des wormlike-chain Modells (rote Linien) lieferten Konturlängen von 50 nm (a) und 226 nm (b) und in beiden Fällen eine Kuhn-Länge von 3 nm.

Die Anpassung des WLC-Modells an den unfractionierten Proben gemäß Formel 3.4-1 ergab Konturlängen von $L = 50 \pm 1 \text{ nm}$ und eine Kuhn-Länge von $b = 3.0 \pm 0.2 \text{ nm}$ für PVP K30 bzw. $L = 226 \pm 6 \text{ nm}$ und $b = 3.0 \pm 0.2 \text{ nm}$ für PVP K90. Mittels anderer Methoden wurden vergleichbare Werte für die Kuhn-Länge von PVP mittlerer molarer Massen auch von Pavlov *et al.*¹³⁸ beschrieben. In diesem Fall wurde PVP in 0.1 M Natriumacetat-Lösung mittels Viskometrie und Analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Weiterhin ergaben theoretische Berechnungen für ein PVP 20-mer in wässriger Lösung eine Kuhn-Länge von $b = 1.72 \text{ nm}$ ¹⁵⁴.

Werte für den Streuquerschnitt R_C der Polymerkette wurden zu 0.1 nm ermittelt. Dieser Wert ist auf den ersten Blick erstaunlich niedrig. Neutronenkleinwinkelstreu-Experimente (SANS) von Pedersen *et al.*¹⁵⁵ an Polystyrol mit deuterierter Hauptkette zeigten allerdings vergleichbare Ergebnisse. Nimmt man für PVP eine zylindrische Struktur der Untereinheiten an, die sich vom Hintergrund des Lösungsmittels klar abhebt, so kann anhand der Van der Waals Volumina ein Querschnittsradius von 0.4 - 0.5 nm berechnet werden. Diese Abschätzung deckt sich mit den Ergebnissen von Pavlov *et al.*, die einen effektiven hydrodynamischen Querschnittsradius von $R_C = 0.5 \pm 0.13$ nm für PVP ermittelt haben¹³⁸. Der in dieser Arbeit gefundene Wert von 0.1 nm ist signifikant niedriger und läßt darauf schließen, dass die an das Polymerrückgrat gebundenen Pyrrolidon-Gruppen nicht oder nur unwesentlich zur Streuintensität beitragen. Eine Erklärung für diesen Befund wäre eine starke Hydratation der Pyrrolidon-Einheit und in der Folge ein sogenanntes *contrast-matching*, d.h. die Elektronendichtedifferenz zwischen wäßrigem Lösungsmittel und stark hydratisierten Pyrrolidon-Gruppen war so gering, dass keine signifikante Streuung der Röntgenstrahlen auftrat. Die beobachtbaren Streuintensitäten wurden demnach offensichtlich vom nicht hydratisierten PVP-Rückgrat, das einer Polyethylenkette entspricht, verursacht.

Tabelle 3.4-1. Zusammenfassung der Einzelmessungen von PVP K30 und K90. Es sind nominelle molare Massen M , aus den SAXS-Messungen die Gyrationradien R_G , Konturlängen L , Kuhn-Längen b , wie auch die Dissusionskoeffizienten aus den DLS-Messungen gezeigt. Der Querschnittsradius R_C wurde auf 0.1 nm gesetzt.

PVP	M (g mol ⁻¹)	R_G (nm)	L (nm)	b (nm)	D (10 ⁻¹² m ² s ⁻¹)
K30	4.0·10 ³	5.43 ± 0.01	45 ± 3	3.0 ± 0.2	34.31 ± 0.51
K90	3.6·10 ⁵	12.07 ± 0.07	179 ± 5	3.0 ± 0.2	10.50 ± 0.26

Online A4F-SAXS

Die Lösungen von PVP K30 und K90 wurden einzeln und als Mischung in die *online* mit der SAXSess gekoppelte A4F injiziert. Für eine optimierte Trennung wurde mit einem exponentiell abfallenden Querfluss gearbeitet (siehe Abbildung 3-37).

Das DRI-Signal im A4F-Eluogramm zeigte Retentionszeiten für PVP K30 von 670 - 2300 s, für PVP K90 von 760 - 3600 s und für die Mischung beider PVPs von 670 - 3600 s. Das DRI-Signal der PVP K30/K90-Mischung zeigte praktisch die Überlagerung der Signale der Einzelfraktionierungen, d.h. es waren trotz der relativ hohen Konzentration von 15 mg mL^{-1} (K30) und 5 mg mL^{-1} (K90) in der Probenlösung keine Überladungseffekte im Trennkanal zu erkennen, die zu einer signifikanten Verschiebung der Retentionszeiten geführt hätten. PVP K30 und die K30/K90-Mischung zeigten jeweils ein Maximum bei 1030 bzw. 1040 s, wohingegen im DRI-Signal von PVP K90 kein definiertes Maximum auftrat, was eine sehr breite Größenverteilung indiziert.

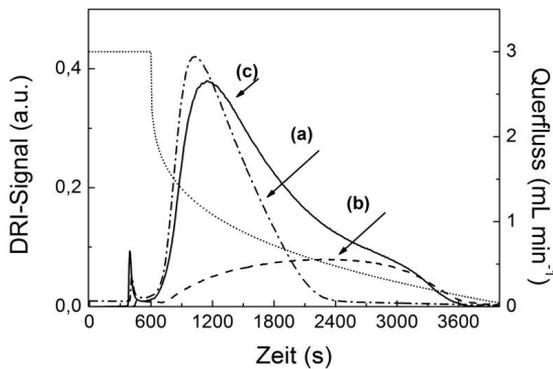


Abbildung 3-37. Das Eluogramm der A4F-Läufe zeigt das Querflussprofil mit exponentiell abfallender Flussrate (gepunktete Linie) und die DRI-Signale der PVP-Proben. (a) PVP K30, (b) PVP K90 und (c) PVP K30 und K90 in der Mischprobe.

Die Gyrationradien R_G der *online* im Anschluss an die Fraktionierung gemessenen SAXS-Daten wurden mittels der Guinier-Näherung bestimmt. Für die Fraktionierung von PVP K30 lagen die R_G -Werte zwischen 3.3 und $7.2 \pm 0.2 \text{ nm}$, für PVP K90 zwischen 7.3 und $12.4 \pm 0.2 \text{ nm}$ und für K30/K90 zwischen 2.9 und $12.9 \pm 0.2 \text{ nm}$. Wie in Abbildung 3-38 gezeigt, nahmen die R_G -Werte nahezu linear und kontinuierlich mit der Fraktionierungszeit zu, was für eine gute Größentrennung durch die Fraktionierung spricht.

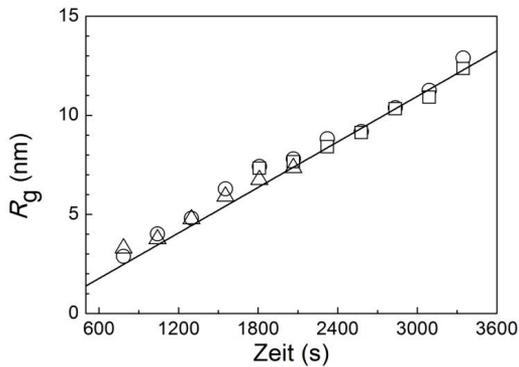


Abbildung 3-38. Gyrationradien R_G der fraktionierten PVPs K30 (Dreiecke), K90 (Quadrate) und der K30/K90-Mischung (Kreise). Die Zunahme der Radien mit der Fraktionierungszeit verlief annähernd linear mit einer Steigung von $3.83 \pm 0.17 \text{ nm s}^{-1}$ (durchgezogene Linie).

Die Konturlängen L der Proben wurden durch Anpassen des WLC-Modells ermittelt (siehe Formel 3.4-1). Die während der Fraktionierung erhaltenen Konturlängen und exemplarische Fitkurven für PVP K30 sind in Abbildung 3-39 dargestellt.

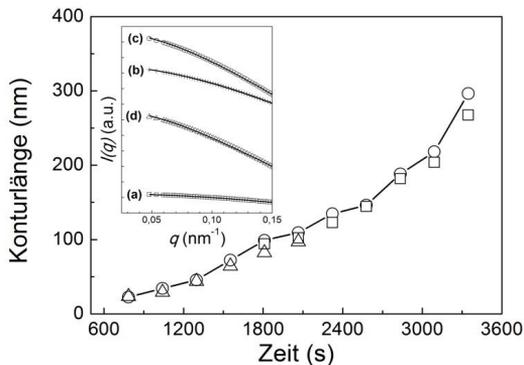


Abbildung 3-39. Dargestellt sind die Konturlängen L in Abhängigkeit der Fraktionierungszeit für PVP K30 (Dreiecke), K90 (Quadrate) und der Mischung aus K30/K90 (Kreise). Links oben: Streudaten und WLC-Anpassung für PVP K30 zu unterschiedlichen Fraktionierungszeiten nach (a) 785 s, (b) 1297 s, (c) 1553 s und (d) 1809 s.

Aufgrund der verhältnismäßig geringen Konzentration der Probenfraktionen durch A4F konnten die Anpassungen des WLC-Modells nur für kleine q -Werte von 0.04 bis 0.15 nm^{-1} durchgeführt werden. Daher wurden in den Anpassungen die Werte der *offline*-Messungen für die Kuhnlänge b (3.0 nm) und den Querschnittsradius des Polymerstrangs R_C (0.1 nm) verwendet. Die so erhaltenen Werte der Konturlängen L

lagen zwischen 23 nm und 297 nm für die K30/K90-Mischung. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 3.4-2 gegeben.

Die Benoit-Doty-Relation^{156, 157} stellt einen Zusammenhang zwischen Gyrationradius und Kuhn-Länge her, der es erlaubt, die erhaltenen Daten auf Konsistenz zu testen.

$$R_G = \left(\frac{N_k}{6} - \frac{1}{4} - \frac{1}{4N_k} - \frac{1}{8N_k^2} [1 - \exp(-2N_k)] \right)^{1/2} b \quad (3.4-2)$$

Hierbei steht N_k für die Anzahl der Kuhn-Segmente nach $N_k = L/b$. Eine Anpassung an die R_G - L -Wertepaare, die für die Fraktionierung von K30, K90 und K30/K90 erhalten wurden, liefert mit 3.5 ± 0.2 nm einen etwas höheren Wert für die Kuhn-Länge b (siehe Abbildung 3-40) als durch die *offline*-Messungen mit 3.0 ± 0.2 nm ermittelt wurde.

Tabelle 3.4-2. Ergebnisse der SAXS-Messungen nach A4F-SAXS Online-Kopplung für PVP K30, K90 und die Mischung aus K30/K90. Gyrationradien R_G wurden mittels der Guinier-Näherung bestimmt, die Konturlängen L durch Anpassung des WLC-Modells mit einer konstanten Kuhn-Länge von 3.0 nm. Die Unsicherheiten der Anpassungen betragen durchweg für $R_G < \pm 0.2$ nm, für Werte von $L < \pm 5$ nm.

Zeit (s)	PVP K30		PVP K90		K30/K90	
	R_G (nm)	L (nm)	R_G (nm)	L (nm)	R_G (nm)	L (nm)
784	3.3	23			2.9	23
1040	3.8	29			4.0	34
1297	4.8	44			4.8	46
1553	5.9	64			6.3	72
1809	6.7	82	7.3	94	7.4	99
2065	7.3	97	7.7	102	7.8	109
2321			8.4	123	8.8	135
2577			9.1	145	9.2	146
2834			10.3	182	10.4	188
3090			10.9	204	11.3	218
3346			12.4	268	12.9	297

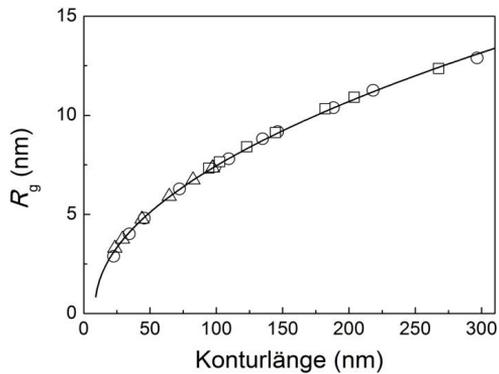


Abbildung 3-40. Anpassung der Benoit-Doty-Relation (durchgezogene Linie) an die erhaltenen Werte für R_G und L der fraktionierten Proben K30 (Dreiecke) ± 0.2 nm.

Online-DLS

Die Diffusionskoeffizienten D wurden mittels DLS-Messungen ebenfalls *online* bestimmt. In Übereinstimmung mit dem Trend der gemessenen Gyrationradien wurden kontinuierlich mit der Fraktionierungszeit abnehmende Werte für D für alle Proben beobachtet.

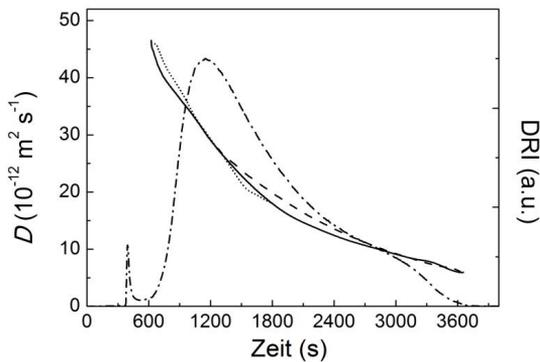


Abbildung 3-41. Online gemessene Diffusionskoeffizienten D in Abhängigkeit zur Fraktionierungszeit für PVP K30 (Punkte), K90 (Striche) und K30/K90 (durchgezogene Linie). Das DRI-Signal aus dem A4F-Trennungslauf (Punkte und Striche) ist für die K30/K90-Mischung dargestellt.

Für PVP K30 wurden Werte zwischen 46 bis $18 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ und für PVP K90 zwischen 28 bis $6 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ erhalten. Die DLS-Daten nach Fraktionierung der K30/K90-Mischung entsprachen praktisch einer Kombination der Daten der beiden einzeln vermessenen PVPs und ergaben Werte zwischen 46 und $6 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

(siehe Abbildung 3-41). Zudem deckten sich die Ergebnisse mit den im Vorhinein einzeln vermessenen Proben (Tabelle 3.4-1).

Die Häufigkeitsverteilung der Diffusionskoeffizienten der drei PVP-Proben wurde durch Gewichtung der D -Werte mit dem normierten DRI-Signal im Bereich von 623 bis 3625 s erhalten und ist in Abbildung 3-42 dargestellt. Bei niedrigen, wie auch bei den höchsten Werten von D stimmte der Verlauf der Werte der K30/K90-Mischung praktisch mit denen der Einzelläufe von K30 bzw. K90 überein. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Anteile der Polymere in K30 bzw. K90 in der Mischung zur gesamten Molmassenverteilung auch in den jeweils hohen bzw. niedrigen Molmassenbereichen beitragen, wie in Abbildung 3-42 ersichtlich wird.

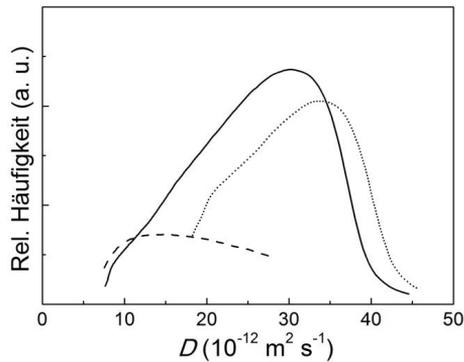


Abbildung 3-42. Mit dem DRI-Signal gewichtete Diffusionskoeffizienten von fraktioniertem PVP K30 (Punkte), K90 (Striche) und K30/K90 (durchgezogene Linie).

3.4.5 Zusammenfassung

Zur Charakterisierung zweier polydisperser Poly(N-vinylpyrrolidon)e K30 und K90 und einer Mischung dieser Proben wurde die A4F eingesetzt, um diese entsprechend ihren hydrodynamischen Radien zu fraktionieren. Durch die *Online*-Kopplung mit SAXS am Synchrotron konnten so die Gyrationradien der in den Fraktionen vorliegenden PVPs und deren Konturlängen durch Anpassung eines *Wormlike Chain* Modells bestimmt werden. Die kontinuierliche Zunahme der gemessenen Radien und Konturlängen zeigte eine gute Trennung mittels der A4F für alle Proben an. Durch die ebenfalls *online* gekoppelte DLS wurden zusätzlich die Diffusionskoeffizienten bestimmt.

Die Gesamtdauer eines Analysenlaufs betrug eine Stunde mit einer zeitlichen Auflösung von 60 Sekunden.¹⁵⁸

Die A4F-SAXS Kopplung wurde erstmals an Natriumpolystyrolsulfonaten erprobt und konnte nun erfolgreich an sehr polydisperssem PVP demonstriert werden. Die Vorteile dieser Methode liegen im Vergleich zu anderen Trennmethoden wie GPC oder HPLC in der schonenden Fraktionierung ohne stationäre Phase, die eine zerstörungsfreie Trennung ermöglicht. Ein weiterer Vorteil in Bezug auf SAXS im Vergleich zu Statischer Lichtstreuung besteht darin, dass auch der Bereich kleiner Gyrationradien unter 15 nm, die mit Statischer Lichtstreuung gewöhnlich nicht mehr zugänglich sind, erfasst werden.

3.5 Polyacrylsäuresalze in der A4F-SySAXS-Kopplung

3.5.1 Einleitung

Polyacrylsäuren (PAS) werden typischerweise durch radikalische Polymerisation von Acrylsäuren mit Peroxiden hergestellt. Sie sind ein Vertreter der schwachen Polyelektrolyte, die in wässriger Lösung nur schwach dissoziiert vorliegen bzw. deren Dissoziationsgrad stark pH-Wert abhängig ist. Diese Polysäuren und deren Natriumsalze (NaPAS) sind technologisch hoch relevant. Sie werden sowohl in pharmazeutischen und medizinischen Produkten als Gelbildner, Bindemittel oder Dispersionsmittel und Emulgatoren, z. B. in künstlicher Tränenflüssigkeit oder Salben und Gelen eingesetzt. Im industriellen Bereich werden sie zum Schutz vor Kalkablagerungen in Kühl- und Waschwasser oder als Dispersionsmittel für anorganische Pigmente in Farben und Lacken verwendet¹⁵⁹.

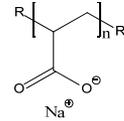


Abbildung 3-43.
Strukturformel
von NaPAS.

Ähnlich wie PVP gewinnen Polyacrylsäure und Polyacrylate zunehmend auch in der Nanotechnologie an Bedeutung. Hier werden sie unter anderem als Dispersionsmittel und zur Wachstumskontrolle von Nanopartikeln^{160, 161} oder mit Hilfe der *layer-by-layer*-Technik zur Produktion von Nanocontainern eingesetzt, in denen z. B. Fluoreszenzfarbstoffe oder pharmazeutische Wirkstoffe eingeschlossen werden können¹⁶². Insbesondere für die letztgenannten Anwendungen ist die Kenntnis über die Struktur in Lösung von Bedeutung.

Dahingehende Untersuchungen wurden unter anderem von Huber *et al.* an NaPAS mit relativ hohen molaren Massen (bis $3.3 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) in wässrigen Kochsalzlösungen anhand von Statischen und Dynamischen Lichtstremessungen durchgeführt. Adamczyk *et al.* haben das strukturelle Verhalten von PAS mit niedriger molarer Masse (um $12 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) in Abhängigkeit der Elektrolytkonzentrationen in Lösung simuliert und die Ergebnisse mit Viskositäts- und DLS-Messungen verglichen¹⁶³. Weitergehende Studien von Muroga *et al.*¹⁶⁴ zu lokalen Konformationen der Polymerketten von NaPAS zeigten, dass in gewissen Konzentrationsbereichen die Persistenzlängen nicht von den Elektrolytkonzentration abhängen und Modelle ohne Berücksichtigung von *excluded volume* Effekten, wie das WLC-Modell, durchaus Anwendung finden, was auch bereits von Odijk diskutiert wurde¹⁶⁵.

Nichtsdestotrotz besteht in Anbetracht neuerer Einsatzgebiete von Polyacrylsäuren bzw. deren Salzen weiterhin Bedarf an verbesserten Charakterisierungsmöglichkeiten, insbesondere für großdispersive Proben, deren Komposition von besonderer praktischer Relevanz sind.

3.5.2 Material

Es wurden drei NaPAS-Standardproben (P_1 - P_3) und eine Mischung dieser zur Untersuchung der Strukturen in Lösung verwendet. Die Molmassen sind nach Herstellerangabe bzw. die intrinsischen Viskositäten $[\eta]$ mit Literaturwerten¹⁶⁴ in Tabelle 3.5-1 zusammengefasst.

Tabelle 3.5-1. Mittlere molare Massen und intrinsische Viskositäten von den verwendeten NaPAS-Proben P_1 - P_3 .

NaPAS	\overline{M}_Z kg mol ⁻¹	\overline{M}_W kg mol ⁻¹	M_p kg mol ⁻¹	\overline{M}_N kg mol ⁻¹	$\overline{M}_W / \overline{M}_N$	$[\eta]$ dL g ⁻¹
P_1	24.9	17.8	16.0	12.8	1.39	0.228
P_2	135.1	83.4	62.9	47.9	1.74	0.595
P_3	282.6	165.4	130.5	97.8	1.69	1.825

Für die Fraktionierung wurden NaPAS-Lösungen in einer wässrigen Pufferlösung mit jeweils 0.05 mol L⁻¹ NaCl, NaOH und Glycin hergestellt, die einen pH-Wert von 11 einstellte. Konzentrationen von P_1 mit 20, P_2 mit 20 und P_3 mit 10 mg mL⁻¹ bzw. eine ternäre Proben-Mischung, die jeweils die Konzentrationen der Einzellösungen aufwies (mit insgesamt 50 mg mL⁻¹ an gelöstem NaPAS), wurden für die Trennung verwendet. Die Pufferlösung wurde auch als Laufmittel in der A4F eingesetzt, um konstante Lösungsbedingungen zu gewährleisten. Vor Verwendung wurden die Polymerlösungen durch 0.45 μ m Cellulosemembranen filtriert, um Verunreinigungen der Probe zu vermeiden.

3.5.3 Methoden und Durchführung

Der Aufbau der A4F-SAXS-Kopplung entsprach praktisch dem in Kapitel 3.2.3. Die wichtigsten Parameter für die Trennung bzw. die SAXS-Detektion werden im folgenden Text erläutert.

A4F

Die verwendete Ultrafiltrationsmembran bestand aus regenerierter Cellulose und hatte ein *MWCO* von $5 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$. Die Kanalhöhe, bestimmt durch den Abstandhalter, betrug $500 \mu\text{m}$. Als Laufmittel wurde die gleiche Pufferlösung wie zum Lösen der Proben verwendet, die vor Verwendung durch eine Cellulosemembran mit $0.1 \mu\text{m}$ Porenweite filtriert wurde. Die Kanalfussrate wurde auf 1 mL min^{-1} gesetzt. Es wurde wiederum die *Slot-Outlet*-Funktion mit einer Rate von 80 % eingesetzt, d.h. es resultierte eine Detektorflussrate von 0.2 mL min^{-1} . Der Querfluss wurde, nach einer Injektions-/Fokussierungszeit von 10 Minuten bei 3.5 mL min^{-1} für weitere fünf Minuten bei diesem Wert gehalten und dann über 30 Minuten mit einem linearen Gradienten von $0.113 \text{ mL min}^{-2}$ auf eine Rate von 0.1 mL min^{-1} gesenkt. Über weitere fünf Minuten wurde nun die Querflussrate mit exponentiellem Gradienten-Profil auf null gefahren, um keine Artefakte im DRI-Signal durch Druckschwankungen zu erzeugen (siehe Abbildung 3-45). Die Gesamtdauer der Fraktionierung betrug 50 Minuten. An die A4F war ein Konzentrationsdetektor (DRI) angeschlossen, dessen Ausgang direkt mit der Durchflusszelle der SAXSess verbunden war. Hinter die SAXS-Durchflusszelle war ein Probensammler geschaltet, der die Fraktionen nach Durchgang durch die Detektoren aufgefangen hat, um sie im Anschluss weiteren *Offline*-Messungen zugänglich zu machen.

SAXS

Der Aufbau der SAXS-Messungen am Synchrotron entsprach im Wesentlichen der Beschreibung in Kapitel 3.4.3. Für die *Online*-Detektion wurde die Durchflusskapillare auf $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Es wurde eine Wellenlänge von $\lambda = 0.124 \text{ nm}$ für alle SAXS-Messungen am Synchrotron verwendet. Die SAXS-Daten wurden vor der Auswertung durch Abzug der Messwerte mit dem reinen Lösungsmittel korrigiert. Es wurde sowohl mit Spaltfokus als auch im levitierten Tropfen in der Ultraschallfalle mit Punktfokus gemessen. Die Spalt-Längen-Entschmierung der mit Spaltfokus gemessenen Daten

erfolgte mittels der IFT-Software und vergleichend mit der Software des Herstellers des SAXS-Detektors, SAXSQuant. Um die Messungen mit Spalt- und Punktfokus zu kombinieren, wurden die Daten wie schon zuvor (siehe Kapitel 3.4) aus den Punktfokussmessungen mit einem konstanten Faktor skaliert und mittels der Software Mathematica¹⁶⁶ mit den korrespondierenden entschmierten Streudaten der Spaltfokussmessungen an der SAXSess zusammengefügt, um eine optimierte Datenqualität über einen weiteren q -Bereich zu erhalten.

3.5.4 Ergebnisse und Diskussion

A4F

Zur Simulation einer hohen Größendispersität wurden 400 μL des ternären Gemisches aus drei NaPAS-Standards P_1 - P_3 mit molaren Massen von (18 bis 165) $\cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ mit Konzentrationen von $c_{P_1} = 20$, $c_{P_2} = 20$, und $c_{P_3} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ injiziert. Die optimierte Trennung wurde mit einem aus linearem und exponentiellen Verlauf zusammengesetzten Querflussprofil durchgeführt (siehe Abbildung 3-45). Die Elugramme der einzelnen Mischungskomponenten sind in Abbildung 3-44 dargestellt. Sie zeigen sehr breite Signale; die Proben eluieren teilweise über einen Zeitraum von 30 Minuten, was die hohe Größendispersität widerspiegelt.

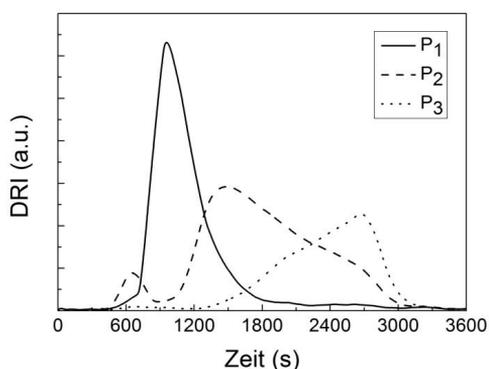


Abbildung 3-44. DRI-Signale der Elution der einzelnen Proben P_1 - P_3 . Die hohen Polydispersitäten sind ursächlich für die verhältnismäßig breiten Signale im DRI. Zur Trennung der einzelnen Proben wurde das gleiche Querflussprofil wie für das ternäre Gemisch verwendet.

Das A4F-Elugramm des Gemisches der drei NaPAS-Proben zeigt praktisch eine Überlagerung der Signale der drei einzeln vermessenen Proben. Es werden

Konzentrationsmaxima in den Fraktionen F2 (1100 s), F5 (2000 s) und F7 (2700 s) beobachtet. Es wurden im Anschluss an die A4F-SAXS *Online*-Kopplung insgesamt neun Fraktionen (F1 bis F9) gesammelt, die im Anschluss erneut mittels SAXS im levitierten Tropfen vermessen wurden, um in Kombination mit den *Online*-Daten eine bessere Datenqualität über einen möglichst großen q -Wertebereich zu erhalten.

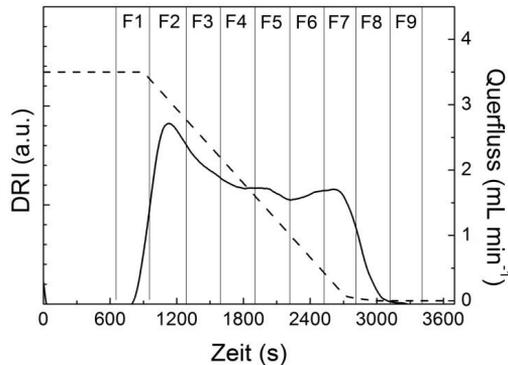


Abbildung 3-45. Querflussprofil (gestrichelte Linie) und DRI-Signal des ternären Gemischs (durchgezogene Linie) für A4F. Die Fraktionen F1 bis F9 der Mischung wurden nach der *Online*-Kopplung in 5-Minuten Intervallen gesammelt und einzeln erneut vermessen.

SAXS

Durch die Kombination der Daten beider Messaufbauten mit Spaltfokus (A4F-SAXS *Online*-Kopplung) und Punktfokus (wie in Kapitel 3.4.3 vorgestellt¹⁵⁸) konnten Daten nach A4F in einem q -Bereich von 0.06 bis 6 nm^{-1} erhalten werden, obwohl der Streukontrast von NaPAS gering ist und somit benötigte Polymer-Konzentrationen gewöhnlich um 10 mg mL^{-1} liegen¹⁶⁷. Die hier nach A4F erhaltenen Fraktionen wiesen Konzentrationen um etwa 0.1 % (w/v) auf. Die von Fraktion 2 (F2) erhaltene Streukurve ist exemplarisch in Abbildung 3-46 dargestellt.

Die Messungen von Verdünnungsreihen der Polymerproben zeigten keine Änderungen in der Form der erhaltenen Streukurven auf, sodass geschlossen werden konnte, dass in den vorliegenden Konzentrationsbereichen keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Polymerketten vorlagen.

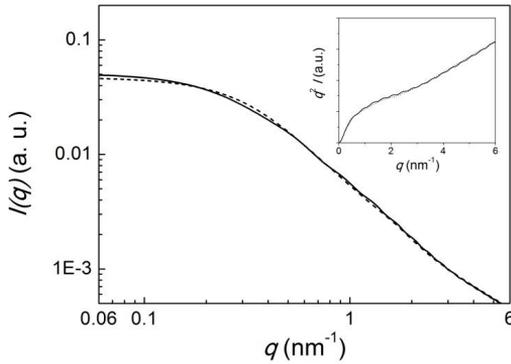


Abbildung 3-46. Darstellung der Streukurve aus Fraktion 2 (F2) als Kombination aus den Daten der Online-Kopplung mit Spaltfokus und denen der Messung der entsprechenden Fraktion im Akustischen Levitator mit Punktfokus-Setup. Es wurde ein WLC-Modell, wie beschrieben in Kapitel 3.4.4, zur Datenauswertung angepasst (gestrichelte Linie). Links oben: Der Kratky-Plot ($q^2 I$ vs. q) zeigt den Übergang bei $q^* \approx 2.66 \text{ nm}^{-1}$ zwischen dem Streubeitrag der Polymerkette und der Streuung des gesamten Polymerstäbchens an, anhand dessen auch die Persistenzlänge bestimmt werden kann (gestrichelte Linie zeigt die Anpassung des WLC-Modells).

Die Auswertung der erhaltenen Daten mittels der Guinier-Näherung zeigte eine kontinuierliche und stetige Zunahme der Gyrationradien über die gesamte Fraktionierungszeit, ähnlich wie in der in Kapitel 3.4.4 beschriebenen Trennung des PVP-Gemischs. Eine Anpassung einer Geraden an die erhaltenen R_G -Werte ergab eine kontinuierliche und nahezu lineare Zunahme der Radien mit einem Gradienten von $4.85 \pm 0.18 \cdot 10^{-3} \text{ nm s}^{-1}$.

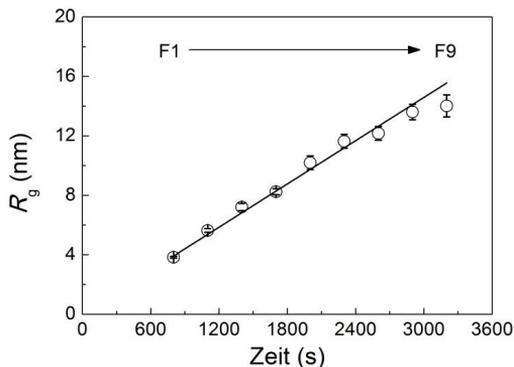


Abbildung 3-47. Darstellung der mittels Guinier-Näherung erhaltenen Gyrationradien der Fraktionen F1-F9 in Abhängigkeit der Fraktionierungszeit. Die Werte für R_G nehmen kontinuierlich nahezu linear mit einer Steigung von $4.85 \pm 0.18 \cdot 10^{-3} \text{ nm s}^{-1}$ mit der Zeit zu (die Anpassung ist durch die durchgezogene Linie gekennzeichnet).

Die ermittelten Gyrationradien sind in Abbildung 3-47 und Tabelle 3.5-2 zusammengestellt und lagen in einem Bereich von $R_G = 3.8$ und 13.6 nm.

Die korrespondierenden R_G -Werte der Maxima im DRI-Signal lagen bei 6.64 ± 0.12 nm (F2 ~ P₁), 10.20 ± 0.46 nm (F5 ~ P₂) und 12.17 ± 0.46 nm (F7 ~ P₃).

Durch die Verdünnung der Proben nach A4F etwa um den Faktor 20 auf Konzentrationen signifikant unter 1 mg mL^{-1} und die Elektrolytkonzentration von 0.1 M Na^+ -Ionen im Eluenten lagen die verdünnten NaPAS-Proben unterhalb ihrer Überlappungskonzentrationen vor. Diese wurden von Muroga *et al.* für NaPAS mit vergleichbaren molaren Massen mittels intrinsischer Viskositätsmessungen bestimmt^{164, 168} und lagen demnach bei etwa 4.4 (P₁), 1.7 (P₂) und 0.5 mg mL^{-1} (P₃). So konnte vorausgesetzt werden, dass keine intermolekularen Wechselwirkungen in der Modellanpassung berücksichtigt werden mussten und das WLC-Modell, wie beschrieben in Kapitel 3.4.4 und nach Formel 3.4-1, eine geeignete Anpassung an die experimentellen Streudaten liefert (siehe auch Abbildung 3-46).

Tabelle 3.5-2. Ergebnisse für die Gyrationradien berechnet nach der Guinier-Näherung und Konturlängen L berechnet über das WLC-Modell gemäß Formel 3.4-1. Es wurden keine Polydispersitäten berücksichtigt und für die Kuhn-Länge b wurde ein konstanter Wert von 1.65 nm in den Anpassungen verwendet. Die Werte für die molare Masse M_{SAXS} sind intensitätsgewichtet. Die Fehler gemäß den Anpassungen für L und M_{SAXS} liegen unter 10% .

Fraktion	R_G (nm)	L (nm)	M_{SAXS} (kg mol ⁻¹)
F1	3.84 ± 0.06	53.7	20.3
F2	5.64 ± 0.12	107.0	38.1
F3	7.22 ± 0.24	166.4	63.0
F4	8.25 ± 0.20	200.9	76.2
F5	10.20 ± 0.46	308.6	115.7
F6	11.64 ± 0.46	389.7	147.8
F7	12.17 ± 0.46	412.2	156.3
F8	13.61 ± 0.52	523.0	191.0
F9	14.02 ± 0.74	565.5	211.7

Die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Daten wurde bei einer Anpassung mit der Kuhn-Länge von $b = 1.65 \pm 0.2$ nm erreicht. In der Folge wurde dieser Wert zur Ermittlung der Konturlängen aller A4F-Fractionen verwendet.

Der Querschnittsradius des Polymerstrangs R_C lag nahe der Auflösungsgrenze der SAXS-Messungen, die für die kleinstmöglichen auflösbaren Inhomogenitäten durch $r_{\min} = 1/q_{\max}$ gegeben ist¹⁶⁹ und in diesem Fall um 0.2 nm^{-1} lag. Berechnungen von Adamczyk *et al.*¹⁶³ für Polyacrylsäure ergaben Werte von 0.35 nm für den Kettenquerschnitt bzw. 0.5 nm als Radius für die hydratisierte Kette. Unter der Annahme einer kompakten Zylinderform des NaPAS konnte keine zufriedenstellende Modellanpassung an die Streudaten mit diesen oder ähnlichen Werten vorgenommen werden. Eine Erklärung dafür wäre, dass der Kettenquerschnitt zu nahe bei bzw. unterhalb der Auflösungsgrenze lag, wahrscheinlich ist aber auch ein *index matching*, ähnlich, wie es bei PVP diskutiert worden ist (siehe auch Kapitel 3.4.4), da die Carboxylat-Gruppen stark hydratisiert vorliegen sollten.

In diesem Fall musste das Problem dadurch umgangen werden, dass ein festgelegter Wert für den Querschnittsradius eines starren Stäbchens verwendet wurde, der unterhalb der Auflösungsgrenze lag. Es wurde daher $R_C = 0.01 \text{ nm}$ gesetzt.

Die nun ermittelten Konturlängen L lagen zwischen 53.7 (F1) und 565.5 nm (F9). Für die Maxima im Signal des Konzentrationsdetektors wurden $L = 107.0 \text{ nm}$ (F2 ~ P₁), 308.6 nm (F5 ~ P₂) und 523.0 nm (F7 ~ P₃) erhalten (die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5-2 zusammengefasst).

Die Plausibilität der Auswertung wurde durch Anwendung der Benoit-Doty-Relation verifiziert (siehe Formel 3.4-2), die einen Zusammenhang zwischen dem Gyrationradius und der Kontur- bzw. der Kuhn-Länge herstellt. Die Anpassung der Kuhn-Längen b an die ermittelten R_G/L -Werte (aus Tabelle 3.5-2) ergab für $b = 2.08 \pm 0.06 \text{ nm}$. Damit liegt der Ergebniswert geringfügig über $b = 1.65 \text{ nm}$, der mittels Anpassung des WLC-Modells erhalten wurde. Zurückzuführen ist diese Abweichung vermutlich auf Limitierungen des WLC-Modells bzw. die Datenqualität der erhaltenen SAXS-Streukurven bei hoher Verdünnung.

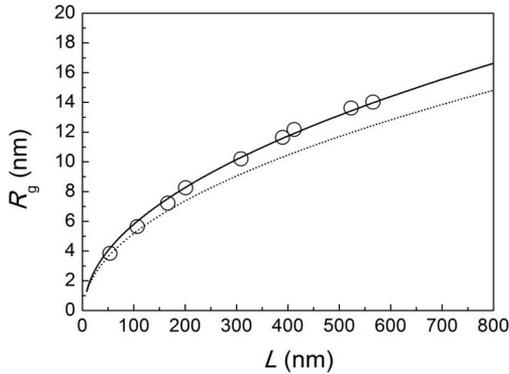


Abbildung 3-48. Auftragung der Gyrationradien gegen die korrespondierenden Konturlängen L . Die Anpassung an die Daten gemäß der Benoit-Doty-Relation ergibt einen Wert für die Kuhn-Länge von $b = 2.08$ nm (durchgezogene Linie). Im Vergleich ist der, durch die Auswertung mit dem WLC-Modell ermittelte Wert von 1.65 nm etwas kleiner (der entsprechende Verlauf ist durch die gepunktete Linie dargestellt).

Molare Massen können mit SAXS durch Absolutmessungen bestimmt werden, wenn das spezifische Volumen der Analyten genau bekannt ist, da andernfalls sehr hohe Unsicherheiten bei den Berechnungen auftreten¹⁷⁰. Für Absolutmessungen ist zudem die Ermittlung des Verhältnisses der primären zur gestreuten Intensität nötig. Eine Alternative stellt die Berechnung der molaren Masse M_{SAXS} anhand der Monomer-Masse M_m und -Länge l_m dar, wie von Glatter und Kratky beschrieben (S. 366 in Lit.⁴⁸):

$$M_{SAXS} = \frac{1}{2} \frac{I(0)}{\lim_{q \rightarrow \infty} qI(q)} \frac{M_m}{l_m} \quad (3.5-1)$$

Ein NaPAS-Monomer hat die molare Masse von 94.04 g mol^{-1} und eine Länge von 0.25 nm per Monomer. Die Werte für die nach $q = 0$ extrapolierte Intensität $I(0)$ wurden durch die Guinier-Anpassungen bestimmt werden bzw. sind an den Asymptoten $\lim_{qI(q) \rightarrow \infty} qI(q)$ der sog. Holtzer-Darstellungen der Kurvenanpassungen gemäß Formel 3.4-1 in einer Auftragung der mit dem Streuvektor q multiplizierten Streuintensität $I(q)$ gegen q abzulesen (Abbildung 3-49).

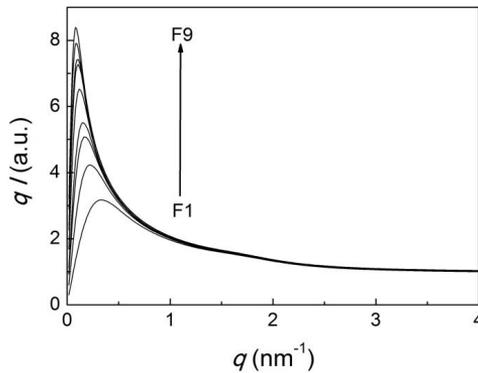


Abbildung 3-49. Holtzer-Darstellung (Auftragung von $q \cdot I(q)$ gegen q) der SAXS-Streudaten der A4F-Fractionen F1-F9. Zur besseren Übersicht sind die Streudaten für hohe q -Werte auf eins normiert.

Die so bestimmten Werte für M_{SAXS} lagen zwischen $20,3 \cdot 10^3$ und $211,7 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$. Die zu den Maxima im Konzentrationsdetektorsignal (DRI) korrespondierenden molaren Massen lagen bei $38,1 \cdot 10^3$ (F2), $115,7 \cdot 10^3$ (F5) und $191,0 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ (F7). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5-2 zusammengefasst. Da die Intensitäten der SAXS-Messungen proportional zum Radius in der sechsten Potenz sind, korrespondieren die Werte für M_{SAXS} mit den z-Mittelwerten $\overline{M_z}$ der molaren Massen.

3.5.5 Zusammenfassung

Zur Simulation einer Natriumpolyacrylatprobe mit sehr hoher Größendispersität wurde eine Mischung von drei NaPAS-Standproben im Bereich von $M_w = 17,8$ bis $165,3 \text{ kg mol}^{-1}$ mittels der A4F-SAXS *Online*-Kopplung untersucht. Anhand der Auswertung der SAXS-Daten durch Anwendung der Guinier-Näherung und Anpassung eines *Wormlike Chain* Modells konnten die Konturlängen und Gyrationradien der fraktionierten NaPAS-Proben auch in Bereichen kleiner als 10 nm bestimmt werden, die mit herkömmlicher Statischer Lichtstreuung nicht mehr zugänglich sind. Die gemessenen Gyrationradien der erhaltenen neun Fraktionen lagen zwischen 3,8 nm und 14,0 nm, die ermittelten Konturlängen zwischen 54 nm und 565 nm für die Polymerstränge. Die mittleren molaren Massen der Fraktionen wurden mittels SAXS ebenfalls bestimmt und lagen im Bereich von $20 \cdot 10^3$ und $212 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$.

4 Anhang

4.1 Quellenverzeichnis

- (1) Feynman, R. P. *Engeneering and Science* **1960**, 23
- (2) Leonhardt, U. *Nature Photonics* **2007**, 1, 207.
- (3) Jurvetson, S. <http://www.flickr.com/photos/jurvetson/136481113/> **2006**..
- (4) http://itp.uni-frankfurt.de/~gros/Vorlesungen/QM_2/Feynman.jpg.
- (5) Maynard, A. D.; Aitken, R. J.; Butz, T.; Colvin, V.; Donaldson, K.; Oberdorster, G.; Philbert, M. A.; Ryan, J.; Seaton, A.; Stone, V.; Tinkle, S. S.; Tran, L.; Walker, N. J.; Warheit, D. B. *Nature* **2006**, 444, 267.
- (6) Taniguchi, N. *Proceedings of the International Conference on Production Engineering* **1974**.
- (7) Drexler, E. http://e-drexler.com/p/06/00/EOC_Cover.html **1986**.
- (8) Roddenberry, G. <http://memory-alpha.org/wiki/Nanite> **1989**.
- (9) Schätzung, F. *Kiepenheuer & Witsch* **2004**.
- (10) Osborne, L. <http://www.nytimes.com/2003/12/14/magazine/14GRAY.html> **2003**.
- (11) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. *Physical Review Letters* **1986**, 56, 930.
- (12) Eigler, D. M.; Schweizer, E. K. *Nature* **1990**, 344, 524.
- (13) ISO/TS27687 **2008**, http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=44278.
- (14) Woodrow_Wilson_International_Center_for_Scholars_In
<http://www.nanotechproject.org/>, 2011.
- (15) BUND **2011**,
http://www.bund.net/bundnet/themen_und_projekte/nanotechnologie/einsatzbereiche/.
- (16) Kamat, P. V. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106, 7729.
- (17) Buffat, P.; Borel, J. P. *Physical Review A* **1976**, 13, 2287.
- (18) Daniel, M. C.; Astruc, D. *Chemical Reviews* **2004**, 104, 293.
- (19) BUND **2008**,
http://www.bund.net/fileadmin/bundnet/publikationen/nanotechnologie/20080311_nanotechnologie_lebensmittel_studie.pdf.
- (20) Chaudhry, Q.; Scotter, M.; Blackburn, J.; Ross, B.; Boxall, A.; Castle, L.; Aitken, R.; Watkins, R. *Food Additives and Contaminants* **2008**, 25, 241.

- (21) Falkner, R. **2008**,
<http://www2.lse.ac.uk/internationalRelations/centresandunits/regulatingnanotechnologies/nanohome.aspx>
- (22) Feng, Q. L.; Wu, J.; Chen, G. Q.; Cui, F. Z.; Kim, T. N.; Kim, J. O. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 52, 662.
- (23) Handy, R. D.; Owen, R.; Valsami-Jones, E. *Ecotoxicology* **2008**, 17, 315.
- (24) Hochella, M. F. *Earth and Planetary Science Letters* **2002**, 203, 593.
- (25) Maynard, A. D. *Annals of Occupational Hygiene* **2007**, 51, 1.
- (26) Finsky, R. *Advances in Colloid and Interface Science* **1994**, 52, 79.
- (27) Börner, H. G. *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, 32, 115.
- (28) Aust, N.; Parth, M.; Lederer, K. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **2001**, 6, 245.
- (29) Zigon, M.; The, N. K.; Cheng, S. Y.; GrubisicGallot, Z. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **1997**, 20, 2155.
- (30) Lee, H.; Williams, S. K. R.; Wahl, K. L.; Valentine, N. B. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 2746.
- (31) Giddings, J. C. *Journal of Separation Science (and Technology)* **1966**, 1, 3.
- (32) Barth, H. G.; Carlin, F. J. *Journal of Liquid Chromatography* **1984**, 7, 1717.
- (33) Thompson, G. H.; Myers, M. N.; Giddings, J. C. *Analytic Chemistry* **1969**, 41, 1219.
- (34) Myers, M. N.; Caldwell, K. D.; Giddings, J. C. *Separation Science* **1974**, 9, 47.
- (35) Giddings, J. C.; Smith, L. K.; Myers, M. N. *Analytical Chemistry* **1975**, 47, 2389.
- (36) Williams, S. K. R.; Runyon, J. R.; Ashames, A. A. *Analytical Chemistry* **2011**, 83, 634.
- (37) Giddings, J. C.; Schimpf, M.; Caldwell, K. *Field-Flow Fractionation Handbook*, 2000.
- (38) Messaud, F. A.; Sanderson, R. D.; Runyon, J. R.; Otte, T.; Pasch, H.; Williams, S. K. R. *Progress in Polymer Science* **2009**, 34, 351.
- (39) Litzen, A. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 461.
- (40) Wahlund, K. G.; Giddings, J. C. *Analytical Chemistry* **1987**, 59, 1332.
- (41) Ahn, J. Y.; Kim, K. H.; Lee, J. Y.; Williams, P. S.; Moon, M. H. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 3876.

- (42) Granger, J.; Dodds, J.; Leclerc, D.; Midoux, N. *Chemical Engineering Science* **1986**, *41*, 3119.
- (43) Jensen, K. D.; Williams, S. K. R.; Giddings, J. C. *Journal of Chromatography A* **1996**, *746*, 137.
- (44) Giddings, J. C. *Analyst* **1993**, *118*, 7.
- (45) Gilbert, E. http://capsicum.me.utexas.edu/ChE386K/docs/SAS_intro.pdf.
- (46) Svergun, D. I.; Koch, M. H. J. *Reports on Progress in Physics* **2003**, *66*, 1735.
- (47) Feigin, L. A. S., D.I. *Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering*; Plenum Press: Ney York and London, 1987.
- (48) Glatter, O.; Kratky, O. *Small Angle X-ray Scattering*, 1982.
- (49) Guinier, A. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences* **1938**, *206*, 1374.
- (50) Guinier, A. *Nature* **1938**, *142*, 569.
- (51) Kratky, O. *Pure and Applied Chemistry* **1966**, *12*, 483.
- (52) Kratky, O.; Porod, G. *Journal of Colloid Science* **1949**, *4*, 35.
- (53) http://www.uni-graz.at/uarc/www/uarc/www_geschichte/uarc/www_gr_wissenschaft/uarc/www_kratky.htm.
- (54) Porod, G. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section a-a Journal of Physical Sciences* **1949**, *4*, 401.
- (55) Porod, G. *Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere* **1951**, *124*, 83.
- (56) Porod, G. *Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere* **1952**, *125*, 108.
- (57) Porod, G. *Journal of Polymer Science* **1953**, *10*, 157.
- (58) Glatter, O. *Journal of Applied Crystallography* **1977**, *10*, 415.
- (59) Debye, P. *Annalen Der Physik* **1915**, *46*, 809.
- (60) Debye, P.; Bueche, A. M. *Journal of Applied Physics* **1949**, *20*, 518.
- (61) Dörfler, H.-D. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* **2002**.
- (62) Stribeck, N. *X-ray scattering of soft matter*, 1st ed.; Springer, 2007.
- (63) Nietzsche, R. M. I. G. **2008**.
- (64) Holm, C.; Weis, J. J. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2005**, *10*, 133.
- (65) Berry, C. C.; Curtis, A. S. G. *Journal of Physics D-Applied Physics* **2003**, *36*, R198.

- (66) Ravaud, R.; Lemarquand, G.; Lemarquand, V. *Tribology International* **2010**, *43*, 76.
- (67) Raj, K.; Moskowitz, B.; Casciari, R. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1995**, *149*, 174.
- (68) Kronick, P.; Gilpin, R. W. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1986**, *12*, 73.
- (69) Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A. *J Neurooncol.*
- (70) Kobozev, N. I.; Evdokimov, V. B.; Zubovich, I. A.; Krylova, I. V.; Lebedev, V. P.; Maltsev, A. I.; Nekrasov, L. I.; Pospelova, T. A. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii* **1959**, *33*, 2811.
- (71) Jain, T. K.; Morales, M. A.; Sahoo, S. K.; Leslie-Pelecky, D. L.; Labhasetwar, V. *Molecular Pharmaceutics* **2005**, *2*, 194.
- (72) Reimer, P.; Tombach, B. *Eur Radiol* **1998**, *8*, 1198.
- (73) Ferrari, M. *Nat Rev Cancer* **2005**, *5*, 161.
- (74) Lawaczeck, R.; Menzel, M.; Pietsch, H. *Applied Organometallic Chemistry* **2004**, *18*, 506.
- (75) Reimer, P.; Balzer, T. *Eur Radiol* **2003**, *13*, 1266.
- (76) Bayer-Schering **2001**.
- (77) Chen, D. X.; Sun, N.; Gu, H. C. *Journal of Applied Physics* **2009**, *106*.
- (78) Wang, Y.; Ng, Y. W.; Chen, Y.; Shuter, B.; Yi, J.; Ding, J.; Wang, S. C.; Feng, S. S. *Advanced Functional Materials* **2008**, *18*, 308.
- (79) Chatterjee, J.; Haik, Y.; Chen, C. J. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2003**, *257*.
- (80) Thunemann, A. F.; Kegel, J.; Polte, J.; Emmerling, F. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 5905.
- (81) Craievich, A. F. *Materials Research* **2002**, *5*, 11.
- (82) Fritz, G.; Glatter, O. *Journal of Physics-Condensed Matter* **2006**, *18*, S2403.
- (83) Glatter, O. *Journal of Applied Crystallography* **1979**, *12*, 166.
- (84) Kline, S. R. *Journal of Applied Crystallography* **2006**, *39*, 895.
- (85) Hammouda, B. http://www.ncnr.nist.gov/staff/hammouda/the_SANS_toolbox.pdf **2008**.
- (86) Schmidt, P. W. *Journal of Applied Crystallography* **1991**, *24*, 414.
- (87) Ruland, W. *Carbon* **2001**, *39*, 323.

- (88) Pedersen, J. S. *Advances in Colloid and Interface Science* **1997**, *70*, 171.
- (89) Wang, Y. X. J.; Hussain, S. M.; Krestin, G. P. *European Radiology* **2001**, *11*, 2319.
- (90) Thuenemann, A., Rolf, S., Knappe, P., Weidner, St. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 5.
- (91) Corley, E. A.; Scheufele, D. A.; Hu, Q. *Journal of Nanoparticle Research* **2009**, *11*, 1573.
- (92) Tiede, K.; Boxall, A. B. A.; Tear, S. P.; Lewis, J.; David, H.; Hasselov, M. *Food Additives and Contaminants* **2008**, *25*, 795.
- (93) Henglein, A. *Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 5457.
- (94) Balbus, J. M.; Maynard, A. D.; Colvin, V. L.; Castranova, V.; Daston, G. P.; Denison, R. A.; Dreher, K. L.; Goering, P. L.; Goldberg, A. M.; Kulinowski, K. M.; Monteiro-Riviere, N. A.; Oberdorster, G.; Omenn, G. S.; Pinkerton, K. E.; Ramos, K. S.; Rest, K. M.; Sass, J. B.; Silbergeld, E. K.; Wong, B. A. *Environmental Health Perspectives* **2007**, *115*, 1654.
- (95) BfR *Stellungnahme Nr. 024/2010 des BfR vom 28.12.2009* **2010**, 11.
- (96) Tsuji, J. S.; Maynard, A. D.; Howard, P. C.; James, J. T.; Lam, C. W.; Warheit, D. B.; Santamaria, A. B. *Toxicological Sciences* **2006**, *89*, 42.
- (97) BfR **2009**.
- (98) BUND *BUND* **2009**.
- (99) De Jong, W. H.; Hagens, W. I.; Krystek, P.; Burger, M. C.; Sips, A. J. A. M.; Geertsma, R. E. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1912.
- (100) Limbach, L. K.; Li, Y. C.; Grass, R. N.; Brunner, T. J.; Hintermann, M. A.; Muller, M.; Gunther, D.; Stark, W. J. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 9370.
- (101) Win, K. Y.; Feng, S. S. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2713.
- (102) Schneider, T. *Nordic Council of Ministers* **2007**, ISBN 978.
- (103) Falbe, J. R., M. (Herausgeber) *Römpp Kompakt Basislexikon Chemie*, 1 ed.: Stuttgart, 1998.
- (104) Prestel, H.; Niessner, R.; Panne, U. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 6664.
- (105) Klenow, S.; Gleis, M.; Haber, B.; Owen, R.; Pool-Zobel, B. L. *Food Chem Toxicol* **2008**, *46*, 1389.
- (106) Klenow, S.; Pool-Zobel, B. L.; Gleis, M. *Toxicology in Vitro* **2009**, *23*, 400.

- (107) Chen, Z. P.; Zhang, Y.; Xu, K.; Xu, R. Z.; Liu, J. W.; Gu, N. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2008**, *8*, 6260.
- (108) Petri-Fink, A.; Steitz, B.; Finka, A.; Salaklang, J.; Hofmann, H. *Eur J Pharm Biopharm* **2008**, *68*, 129.
- (109) Vippola, M.; Falck, G. C. M.; Lindberg, H. K.; Suhonen, S.; Vanhala, E.; Norppa, H.; Savolainen, K.; Tossavainen, A.; Tuomi, T. *Human & Experimental Toxicology* **2009**, *28*, 377.
- (110) Horie, M.; Nishio, K.; Fujita, K.; Endoh, S.; Miyauchi, A.; Saito, Y.; Iwashita, H.; Yamamoto, K.; Murayama, H.; Nakano, H.; Nanashima, N.; Niki, E.; Yoshida, Y. *Chemical Research in Toxicology* **2009**, *22*, 543.
- (111) Rohner, F.; Ernst, F. O.; Arnold, M.; Hibe, M.; Biebinger, R.; Ehrensperger, F.; Pratsinis, S. E.; Langhans, W.; Hurrell, R. F.; Zimmermann, M. B. *Journal of Nutrition* **2007**, *137*, 614.
- (112) Karlsson, H. L.; Gustafsson, J.; Cronholm, P.; Moller, L. *Toxicology Letters* **2009**, *188*, 112.
- (113) Brunner, T. J.; Wick, P.; Manser, P.; Spohn, P.; Grass, R. N.; Limbach, L. K.; Bruinink, A.; Stark, W. J. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40*, 4374.
- (114) Smirnov, A. I.; Voinov, M. A.; Pagan, J. O. S.; Morrison, E.; Smirnova, T. I. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 35.
- (115) Liochev, S. I. *Metal Ions in Biological Systems, Vol 36* **1999**, *36*, 1.
- (116) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Febs Letters* **1992**, *307*, 108.
- (117) Roessner, D.; Kulicke, W. M. *Journal of Chromatography A* **1994**, *687*, 249.
- (118) Thielking, H.; Roessner, D.; Kulicke, W. M. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 3229.
- (119) Thielking, H.; Kulicke, W. M. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 1169.
- (120) Williams, P. S.; Giddings, J. C. *Analytical Chemistry* **1987**, *59*, 2038.
- (121) Debye, P. *Journal of Physical Chemistry* **1947**, *51*.
- (122) Tanahatoo, J. J.; Kuil, M. E. *Journal of Physical Chemistry A* **1997**, *101*, 8389.
- (123) Wang, L. X.; Yu, H. *Macromolecules* **1988**, *21*, 3498.
- (124) Thunemann, A. F.; Knappe, P.; Bienert, R.; Weidner, S. *Analytical Methods* **2009**, *1*, 177.
- (125) Frank, H. P.; Levy, G. B. *Journal of Polymer Science* **1953**, *10*, 371.
- (126) Levy, G. B.; Frank, H. P. *Journal of Polymer Science* **1955**, *17*, 247.
- (127) Fischer, F.; Bauer, S. *Chemie in unserer Zeit* **2009**, *43*, 7.

- (128) Pattana-Arun, J.; Wolff, B. G. *Diseases of the Colon & Rectum* **2008**, *51*, 966.
- (129) Sneader, W. *Drug discovery: a history*; John Wiley & Sons: New York, 2005.
- (130) BASF, "PVP and more... Luvitec Luvicross", Infobroschüre
- (131) Tadros, T. *Advances in Colloid and Interface Science* **2009**, *147-48*, 281.
- (132) Sun, Y. G.; Xia, Y. N. *Science* **2002**, *298*, 2176.
- (133) Yu, A. B.; Kemal, L.; Jiang, X. C.; Wong, K. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 15656.
- (134) Respaud, M.; Broto, J. M.; Rakoto, H.; Fert, A. R.; Thomas, L.; Barbara, B.; Verelst, M.; Snoeck, E.; Lecante, P.; Mosset, A.; Osuna, J.; Ely, T. O.; Amiens, C.; Chaudret, B. *Physical Review B* **1998**, *57*, 2925.
- (135) Ould-Ely, T.; Amiens, C.; Chaudret, B.; Snoeck, E.; Verelst, M.; Respaud, M.; Broto, J. M. *Chemistry of Materials* **1999**, *11*, 526.
- (136) O'Connell, M. J.; Boul, P.; Ericson, L. M.; Huffman, C.; Wang, Y. H.; Haroz, E.; Kuper, C.; Tour, J.; Ausman, K. D.; Smalley, R. E. *Chemical Physics Letters* **2001**, *342*, 265.
- (137) Ding, G. W.; Adriane, K.; Chen, X. Z.; Chen, J.; Liu, Y. F. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *328*, 78.
- (138) Pavlov, G. M.; Panarin, E. F.; Korneeva, E. V.; Kurochkin, C. V.; Baikov, V. E.; Ushakova, V. N. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1990**, *191*, 2889.
- (139) Levy, G. B.; Caldas, I.; Fergus, D. *Analytical Chemistry* **1952**, *24*, 1799.
- (140) Minatti, E.; Norwood, D. P.; Reed, W. F. *Macromolecules* **1998**, *31*, 2966.
- (141) Norwood, D. P.; Minatti, E.; Reed, W. F. *Macromolecules* **1998**, *31*, 2957.
- (142) Jones, S. A.; Martin, G. P.; Brown, M. B. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, *35*, 621.
- (143) Strelitzki, R.; Reed, W. F. *Journal of Applied Polymer Science* **1999**, *73*, 2359.
- (144) Leiterer, J.; Delissen, F.; Emmerling, F.; Thunemann, A. F.; Panne, U. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 1221.
- (145) Delissen, F.; Leiterer, J.; Bienert, R.; Emmerling, F.; Thunemann, A. F. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *392*, 161.
- (146) Weber, J. K. R.; Hampton, D. S.; Merkley, D. R.; Rey, C. A.; Zatarski, M. M.; Nordine, P. C. *Review of Scientific Instruments* **1994**, *65*, 456.
- (147) Fritz, G.; Bergmann, A.; Glatter, O. *Journal of Chemical Physics* **2000**, *113*, 9733.

- (148) Kratky, O.; Porod, G. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1949**, 68, 1106.
- (149) Porod, G. *Monatshefte für Chemie* **1949**, 80.
- (150) Pedersen, J. S.; Laso, M.; Schurtenberger, P. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* **1996**, 54, R5917.
- (151) Potschke, D.; Hickl, P.; Ballauff, M.; Astrand, P. O.; Pedersen, J. S. *Macromolecular Theory and Simulations* **2000**, 9, 345.
- (152) Magid, L. J.; Chen, W. R.; Butler, P. D. *Langmuir* **2006**, 22, 6539.
- (153) NIST
ftp://rrdjazz.nist.gov/pub/sans/kline/Download/SANS_Model_Docs_v4.10.pdf
2007.
- (154) Flebbe, T.; Hentschke, R.; Hadicke, E.; Schade, C. *Macromolecular Theory and Simulations* **1998**, 7, 567.
- (155) Pedersen, J. S.; Schurtenberger, P. *Macromolecules* **1996**, 29, 7602.
- (156) Benoit, H.; Doty, P. *Journal of Physical Chemistry* **1954**, 57, 958.
- (157) Denkinger, P.; Burchard, W. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **1991**, 29, 589.
- (158) Knappe, P.; Bienert, R.; Weidner, S.; Thunemann, A. F. *Polymer* **2010**, 51, 1723.
- (159) Schweins, R.; Hollmann, J.; Huber, K. *Polymer* **2003**, 44, 7131.
- (160) Cooper, A. I.; Wang, Z. X.; Tan, B. E.; Hussain, I.; Schaeffer, N.; Wyatt, M. F.; Brust, M. *Langmuir* **2007**, 23, 885.
- (161) Guillemet, B.; Faatz, M.; Grohn, F.; Wegner, G.; Gnanou, Y. *Langmuir* **2006**, 22, 1875.
- (162) Teng, X. R.; Shchukin, D. G.; Mohwald, H. *Advanced Functional Materials* **2007**, 17, 1273.
- (163) Adamczyk, Z.; Bratek, A.; Jachimska, B.; Jasinski, T.; Warszynski, P. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 22426.
- (164) Muroga, Y.; Noda, I.; Nagasawa, M. *Macromolecules* **1985**, 18, 1576.
- (165) Odijk, T. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **1977**, 15, 477.
- (166) Wolfram_Research_Inc.: Champaign, IL, USA.
- (167) Taylor, T. J.; Stivala, S. S. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **2003**, 41, 1263.

- (168) Muroga, Y.; Noda, I.; Nagasawa, M. *Macromolecules* **1985**, *18*, 1580.
- (169) Pedersen, J. S.; Schurtenberger, P. *J. Appl. Crystallogr.* **1996**, *29*, 646.
- (170) Orthaber, D.; Bergmann, A.; Glatter, O. *Journal of Applied Crystallography* **2000**, *33*, 218.

4.2 Verwendete Abkürzungen

2 θ	Streuwinkel
A	Fläche (<i>area</i>)
A4F	Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung
a. u.	Relative Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
b	Kuhn-Länge
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und- prüfung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BUND	Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland
CA	Celluloseacetat
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (<i>charge-coupled device</i>)
CTB	CellTiterBlue
D	Diffusionskoeffizient
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DRI	Differentialer Brechungsindex
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Zell-Nährmedium)
FCS	fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FFF	Feldflussfraktionierung
FT	Fouriertransformation
g	Gramm
GIFT	Glatters Indirekte Fouriertransformation (Software)
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde(n)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IFT	inverse Fouriertransformation
ISO/TS	Internationale Organisation für Normung/Technische Spezifikation
ITS	Insulin/Transferrin, Selen
keV	Kiloelektronenvolt
kW	Kilowatt
λ	Wellenlänge
L	Konturlänge

MALLS	Multi-Angle Laser Light Scattering
MNT	Molekulare Nanotechnologie
MRT	Magnetresonanztomographie
MWCO	Molekulargewichtsgrößenausschluss (<i>molecular weight cut-off</i>)
NaPAS	Natriumpolyacrylat
NaPSS	Natriumpolystyrolsulfonat
NP	Nanopartikel
PAA	Polyacrylic Acid
PDDF	Paarabstandsfunktion (<i>Pair Distance Distribution Function</i>)
PES	Polyethersulfon
PVP	Polyvinylpyrrolidon
q	Streuvektor
Q	Invariante
QELS	Quasi-elastische Licht Streuung (<i>quasi-elastic light scattering</i>)
r	Radius
R	Probe-Detektor Abstand (im SAXS-Experiment)
RC	regenerierte Cellulose
R _G	Streumassenradius, synonym mit dem Gyration- bzw. Guinier-Radius
R _H	hydrodynamischer Radius
RKS	Röntgenkleinwinkelstreuung
SANS	Small-Angle Neutron Scattering
SAXS	Small-Angle X-ray Scattering
SEC	Size-Exclusion Chromatography
SFC	Supercritical Fluid Chromatography
SPIO	Superparamagnetic Iron Oxide
SySAXS	SAXS mit Synchrotronstrahlung als Röntgenquelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
USPIO	Ultra-SPIO
usw.	und so weiter
UV	ultraviolettes Licht
V	Volumen
v	(Fluss)Geschwindigkeit
WLC	<i>Wormlike Chain</i>
z.B.	zum Beispiel

4.3 Publikationsliste

Im Rahmen der Promotion sind folgende Publikationen entstanden, die vorab in Form von Vorträgen, Postern oder Artikeln in Fachzeitschriften veröffentlicht worden sind.

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

- 1) Thünemann, Rolf, Knappe, Weidner; “*In Situ Analysis of a Bimodal Size Distribution of Superparamagnetic Nanoparticles*”; *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 5.
- 2) Thünemann, Knappe, Bienert, Weidner; “*Online coupling of field-flow fractionation with SAXS and DLS for polymer analysis*”; *Analytical Methods* **2009**, 1, 177 (Titelblatt-Design)
- 3) Knappe, Bienert, Weidner, Thünemann; „*Characterization of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)s with broad size distributions*”; *Polymer* **2010**, 51, 1723
- 4) Knappe, Bienert, Weidner, Thünemann; “*Poly(acrylic acid): A Combined Analysis with Field-Flow Fractionation and SAXS*”; *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, 211, 2148
- 5) Knappe, Boehmert, Bienert, Karmutzki, Niemann, Lampen, Thünemann; “*Processing nanoparticles with A4F-SAXS for toxicological studies: Iron oxide in cell-based assays*”; *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 4160
- 6) Weidner, Knappe, Panne; “*MALDI-TOF imaging mass spectrometry of artifacts in “dried droplet” polymer samples*”; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 401, 127

Vorträge (extern als Vortragender)

- 1) “*A4F – SAXS Online Coupling – a powerful analytical tool*”, 14th International Symposium on Field – and Flow – based Separations (FFF 2009), 07/2009 Patras, Griechenland
- 2) “*A4F – SAXS Online Coupling – in situ nanoparticle analysis*”, BfR Seminar zur Nanotoxikologie, 08/2010 Berlin

Vorträge (als Co-Autor)

3) *"In Situ Analysis of Size Distributions of Polymer-Stabilized Nanoparticles"*, 8th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, 10/2009 Dresden.

4) *"Characterization of Polymers and Nanoparticles by Online Coupling of Field-Flow Fractionation with SAXS and other Detection Principles"*, Kolloquium des Instituts für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München, 11/2009 München.

5) *"In Situ Characterization of Superparamagnetic Nanoparticles: Online Coupling of FFF and SAXS using Synchrotron Radiation"*, Workshop on structural aspects of biocompatible ferrofluids: stabilization, properties control and application, 01/2010 Geesthacht

Posterbeiträge

1) *"In Situ Analysis of a Bimodal Size Distribution of Superparamagnetic Nanoparticles by Online Coupled A4F and SAXS"*; 4th International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules (SCM-4), 01/2009 Amsterdam, Niederlande

2) *"In Situ Analysis of a Bimodal Size Distribution of Superparamagnetic Nanoparticles by Online Coupled A4F and SAXS"*; ANAKON 03/2009, Berlin

3) *"A4F-SAXS Online Coupling as a valuable Tool in Nanoparticle- and Polymeranalysis"*, Licht, Materialien und Modelle, 100 Jahre Adlershof (LMM Adlershof), 09/2009, Berlin

4) *"In Situ Analysis of a Bimodal Size Distribution of Superparamagnetic Nanoparticles by Online Coupled A4F and SAXS"*, 8th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering APME 2009), 10/2009 Dresden (Auszeichnung mit dem Wiley-VCH Posterpreis)

5) *"Online Coupled A4F and SAXS for the Analysis of Nanoparticles and Polymers at BESSY"*, BER II and BESSY II Users Meeting, 11/2009, Berlin

6) "*In Situ Analysis of a Bimodal Size Distribution of Superparamagnetic Nanoparticles by Online Coupled A4F and SAXS*", GKSS Workshop Structural aspects of biocompatible ferrofluids: stabilization, properties control and application", 01/2010, Geesthacht

7) "*Fractionation and Analysis of Iron Oxide Nanoparticles by A4F-SAXS Coupling and Testing their Cytotoxicity on Caco-2 Cells*", International Symposium on Bioactive Surfaces 05/2010, Golm

8) XIV International Conference on Small-Angle Scattering (SAS 09), 09/2009, Oxford (präsentiert von Heimo Schnablegger, Anton Paar GmbH)

9) "*Synchrotron Radiation for in situ Characterization of Nanoparticles: Online Coupling of FFF and SAXS*", Deutsche Tagung für Forschung mit Synchrotronstrahlung, Neutronen und Ionenstrahlen an Großgeräten (SNI 2010), 02/2010 Berlin (präsentiert von M. Girod, BAM)

10) "*In Situ Characterization of Nanoparticles by Online Coupling of FFF and SAXS*", International Congress on Nanotechnology and Research Infrastructures (GENNESYS 2010), 05/2010 Barcelona (präsentiert von Dr. Heinrich Riesemeier, BAM)

Posterbeiträge als Coautor

11) Böhmert *et al.*, "*Cytotoxicity of AgPure silver nanoparticles in the human intestinal cell line Caco-2*", 47th Congress of the European Societies of Toxicology (Eurotox 2011), 08/2011 Paris, Frankreich