

# **Modifikation magnetischer Nanoträger für den Einsatz in enzymatisch katalysierten Reaktionen**

Vom Promotionsausschuss der  
Technischen Universität Hamburg-Harburg  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor-Ingenieurin  
genehmigte Dissertation

von  
Daniela Faika

aus  
Lippstadt

2014

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Calmano  
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Stefan Heinrich  
Prüfungsausschussvorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Karl Schulte

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2013

urn:nbn:de:gbv:830-tubdok-12521

# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen denen bedanken, die zum erfolgreichen Entstehen und Gelingen meiner Promotion beigetragen und mich auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt und motiviert haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Calmano, der mir die Erstellung dieser Doktorarbeit in diesem interessanten und spannenden Forschungsthema ermöglichte. Sein entgegengebrachtes Vertrauen und die eingeräumten Freiräume waren stets motivierend. Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr.-Ing. Stefan Heinrich und Prof. Dr.-Ing. Karl Schulte für die Zusage als Zweitprüfer und Prüfungsausschussvorsitzenden bedanken.

Dr. Joachim Gerth möchte ich für seine hilfreichen Gespräche und Diskussionen danken. Joachim Wiese, Irene Richardt-Brauer und Silke Hardke möchte ich für ihren Beitrag bei Laboranalysen, experimentellen Aufbauten sowie den stets netten Gesprächen danken. Immer in guter Erinnerung werde ich meine Bürokollegen Dr.-Ing. Gumelar Pritosiwi, Annette Zewuhn, Astrid Poelders und Britta Reimers behalten - durch sie hat die Arbeit immer Spaß gemacht. Verena Schmitt möchte ich für ihre Unterstützung bei Latex-Problemen sowie die nette Laborarbeit mit vielen hilfreichen fachlichen Gesprächen danken. Auch bei meinen anderen Kollegen des Instituts V-9 möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Meine Studien-, Bachelor- und Diplomarbeiter Svetlana Gemsa, Nadja Reinek, Christoph Ohlrogge, Arne Rathjens, Julia Hobohm, Gesche Dierks, Kristina Zimmermann, Max Becker, Valentina Daskalova, Daniel Echenique und Britta Schneider sowie meinen HiWis Natalie Behrens, Anna Tessner, Gesche Dierks, Valentina Daskalova und Britta Schneider haben am Gelingen dieser Arbeit sehr individuell mitgewirkt. Für ihre Mithilfe möchte ich mich bedanken. Darüber hinaus möchte ich Kirsten Meyer für das Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Ich möchte mich auch bei den Instituten für Technische Biokatalyse (Bastian Kanengiesser, Jan Brummund, Britta Lämmerhirt), für Keramische Hochleistungswerkstoffe (Kristina Brandt), für Kunststoffe und Verbundwerkstoffe (Dr. Luis Prado), für Thermische Verfahrenstechnik (Marianne Kammlot) und für Abwasserwirtschaft und Gewässerschutz (Susanne Eggers, Andreas Wiebusch, Wibke Meyer) für das Ausleihen von Gerätschaften, Durchführungen von Messungen und die anregende Diskussionen bedanken.

Mein letzter und ganz spezieller Dank gilt meinen Eltern und Valentin dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben und hinter mir stehen.



# Kurzfassung

Durch den Einsatz immobilisierter Enzyme können enzymatisch katalysierte industrielle Prozesse ökonomisch optimiert werden, da generell höhere Enzymstabilitäten und -konzentrationen realisierbar sind und ein einfacheres Recycling der Enzyme möglich ist. In diesem Zusammenhang bieten magnetische Nanopartikel eine neue Perspektive als Enzymträger, da sie eine präzisere Gestaltung der Prozessführung und eine spezifische Separation der Enzyme aus der Reaktionsmischung im magnetischen Feld erlauben. Verglichen mit herkömmlichen Trennfahren wie z.B. Filtration und Zentrifugation ist die magnetische Abtrennung schonender, da die Enzyme weniger mechanischem Stress ausgesetzt sind. Daraus ergibt sich das Ziel dieser Arbeit, welches die Oberflächenmodifikation magnetischer Nanoträger zur Anbindung von Enzymen ist.

Der erste Abschnitt handelt von Oberflächenmodifikationen durch Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel, die einerseits den Zweck hat spezielle funktionelle Gruppen auf Oberflächen aufzubringen, an denen Enzyme spezifisch und selektiv binden können; andererseits sollen veränderte Ladungsverhältnisse der Trägeroberfläche eine Stabilisierung der Partikelsuspension in den eingesetzten pH-Bereichen bewirken. Die Auswahl der Funktionalisierungssubstanzen basiert auf der Übertragung von der in Muscheln enthaltenen Haftproteinsubstanz 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und der dort spezifischen Brenzkatechinverbindung. Deshalb wurden Verbindungen von phenolischer Natur ausgewählt, welche sich durch Art und Anordnung ihrer funktionellen Gruppen am aromatischen Ring unterscheiden. So werden neben dem Redoxpaar Benzo-/Hydrochinon die aromatischen Verbindungen DOPA, Dopamin, Kaffeesäure, Ethyl 3,4-dihydroxycinamat, 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure und Gallussäure auf die Anbindung an den magnetischen Nanoträger Magnetit untersucht, welcher aufgrund seiner besonderen superparamagnetischen Eigenschaften prädestinierend für die Anwendung in magnetischen Trennverfahren ist.

Es konnten einige strukturell bedingte Einflüsse der funktionalisierenden Moleküle auf die Anbindung an die Magnetitnanopartikel festgestellt werden, welche aufgrund der Lage und Anordnung ihrer Substituenten am aromatischen Ring hervorgerufen werden. Dabei zeigen sich die stabilsten Bindungen und höchsten Beladungen der Partikel mit den funktionalisierenden Molekülen DOPA und Kaffeesäure bei einer Funktionalisierung im neutralen pH-Bereich, was sich auf die Art und Position ihrer funktionellen Gruppen am aromatischen Ring, den Redoxzustand der Moleküle sowie die Ladungseigenschaften der verschiedenen Bindungspartner zurückführen lässt. Deshalb werden im weiteren Verlauf der Arbeit die beiden aussichtsreichsten Substanzen Kaffeesäure und DOPA auf weitere prozessbedingte Parameter wie Funktionalisierungskonzentration, -zeit, -temperatur, Art und Synthese des Magnetits sowie den Einfluss der Pufferkonzentration untersucht und hinsichtlich ihrer Anbindung an die Partikeloberfläche als auch die Stabilität der Partikelsuspension gegenüber Agglomeration bewertet. An-

schließlich wird der Einfluss der Prozessbedingungen bei der Proteinimmobilisierung an den beiden funktionalisierten Magnetitpartikeltypen am Beispiel des Proteins Rinderserumalbumin (BSA) untersucht.

Im zweiten Abschnitt werden diese Partikelmodifikationen bezüglich ihrer Prozessstabilität in unterschiedlichen Medien und bei verschiedenen pH-Werten für den Einsatz in enzymatischen Reaktionen hinsichtlich ihrer chemischen Beständigkeit getestet. Die mechanische Beständigkeit wird durch die im Verfahrensablauf enthaltenen Ultraschallbehandlungen und Zerkleinerungen (mörsern) als gegeben angesehen.

Im letzten Teil wurden die geeignetsten Partikel für eine Immobilisierung mit Lipase *Candida rugosa* verwendet und hinsichtlich ihrer Eignung als Enzymträger getestet. Die maximale Restaktivität des immobilisierten Enzyms liegt bei einer Anbindung an den Kaffeesäure funktionalisierten und Carbodiimid aktivierten Partikeln bei 75 %, was als großer Erfolg zu bewerten ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren für die Oberflächenmodifikation von magnetischen Trägern entwickelt. Es ist es gelungen die Suspensionsstabilität der Träger im neutralen pH-Bereich zu erhöhen und funktionelle Gruppen für die Enzymanbindung einzuführen. Basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit kann die Eignung als Enzymträger für weitere Enzyme untersucht und die Aktivität der Enzyme z.B. durch die Verwendung von sogenannten Abstandhaltern (engl. Spacer) oder anderen Immobilisierungsbedingungen verbessert werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>Formelverzeichnis</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Stand der Technik</b>	<b>4</b>
2.1 Nanotechnologie . . . . .	4
2.2 Magnetische Nanopartikel . . . . .	4
2.2.1 Magnetseparation . . . . .	6
2.3 Magnetit als Trägermaterial . . . . .	7
2.3.1 Kristallstruktur . . . . .	8
2.3.2 Synthese . . . . .	9
2.3.3 Oberflächencharakteristika . . . . .	12
2.3.4 Magnetische Eigenschaften von Ein- und Mehrdomänenpartikel . .	17
2.4 Oberflächenbeschichtungen und Stabilisierungen . . . . .	19
2.4.1 Oberflächenanbindungen . . . . .	20
2.4.2 Beschichtungsmöglichkeiten . . . . .	22
2.4.2.1 Polymere . . . . .	23
2.4.2.2 Oberflächenaktive Stoffe . . . . .	24
2.4.2.3 Silane . . . . .	25
2.4.2.4 Edelmetalle . . . . .	26
2.4.2.5 Kohlenstoff . . . . .	26
2.4.2.6 Weitere Beschichtungen . . . . .	27
2.4.3 Funktionalisierende Substanzen . . . . .	27
2.4.3.1 Chinone . . . . .	27
2.4.3.2 Endiole . . . . .	29
2.5 Enzymimmobilisierungen . . . . .	30
2.5.1 Enzymimmobilisierungsmethoden . . . . .	31
2.5.2 Enzymimmobilisierungen an magnetischen Trägern . . . . .	33
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>37</b>
3.1 Verwendete Materialien . . . . .	37
3.1.1 Synthesematerialien . . . . .	37
3.1.2 Industriell hergestellter Referenzmagnetit . . . . .	37
3.1.3 Funktionalisierungssubstanzen . . . . .	39
3.1.4 Proteinanbindung . . . . .	42

3.1.5	Verwendete Puffer und weitere Substanzen . . . . .	43
3.2	Analysemethoden . . . . .	44
3.2.1	Quantifizierung der Partikelladung durch Messungen des Zeta-potentials . . . . .	44
3.2.2	Bestimmung der spezifischen Oberfläche mittels Adsorptionsisotherme . . . . .	45
3.2.3	Bestimmung des thermogravimetrischen Verhaltens . . . . .	46
3.2.4	Strukturuntersuchungen durch Elektronenmikroskopie . . . . .	46
3.2.5	Detektion funktioneller Gruppen durch Infrarotspektrometrie . .	48
3.2.6	Bestimmung der Partikel- bzw. der Agglomeratgröße durch dynamische Lichtstreuung . . . . .	50
3.2.7	Untersuchung der Kristallstruktur durch Röntgenbeugung . . .	50
3.2.8	Proteinbestimmung in wässrigen Lösungen mittels Bradford-Methode . . . . .	52
3.2.9	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität . . . . .	53
3.2.10	Quantitative Bestimmung von Kaffeesäure mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie . . . . .	53
3.3	Methodisches Vorgehen . . . . .	53
<b>4</b>	<b>Experimentelle Durchführung</b>	<b>59</b>
4.1	Funktionalisierung und Immobilisierung . . . . .	59
4.2	Stabilitätsuntersuchungen . . . . .	60
4.3	Analytische Untersuchungen . . . . .	60
4.3.1	Quantifizierung der Partikelladung durch Messungen des Zeta-potentials . . . . .	60
4.3.2	Bestimmung der spezifischen Oberfläche mittels Adsorptionsisotherme . . . . .	61
4.3.3	Bestimmung des thermogravimetrischen Verhaltens . . . . .	61
4.3.4	Strukturuntersuchungen durch Elektronenmikroskopie . . . . .	61
4.3.5	Detektion funktioneller Gruppen durch Infrarotspektrometrie . .	61
4.3.6	Bestimmung der Partikel- bzw. der Agglomeratgröße durch dynamische Lichtstreuung . . . . .	62
4.3.7	Untersuchung der Kristallstruktur durch Röntgenbeugung . . .	62
4.3.8	Proteinbestimmung in wässrigen Lösungen mittels Bradford-Methode . . . . .	62
4.3.9	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität . . . . .	63
4.3.10	Quantitative Bestimmung von Kaffeesäure mittels Hochleistungschromatographie . . . . .	63
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1	Funktionalisierung . . . . .	64
5.1.1	Einfluss von BSA und Puffersubstanzen auf die Funktionalisierung	65
5.1.2	Funktionalisierung mit Benzo- und Hydrochinon . . . . .	68
5.1.3	Funktionalisierungssubstanzen mit Endiolform . . . . .	81
5.1.3.1	Dopamin und DOPA . . . . .	82
5.1.3.2	Kaffeesäure . . . . .	94
5.1.3.3	Gallussäure . . . . .	101
5.1.4	Vergleich der Substanzen . . . . .	106

---

5.1.5	Weitere Untersuchungen der Funktionalisierungssubstanzen Kaffeesäure und DOPA . . . . .	110
5.1.5.1	Untersuchung des zeitlichen Adsorptionsverhaltens . . . . .	110
5.1.5.2	Untersuchung des Einflusses auf die Adsorptionskonzentration . . . . .	114
5.1.5.3	Untersuchung des Einflusses auf die Ionenkonzentration des Puffers . . . . .	117
5.1.5.4	Untersuchung des Einflusses der Temperatur . . . . .	122
5.1.6	Verhalten anderer strukturell ähnlicher Substanzen . . . . .	126
5.1.7	Einfluss des Magnetits auf die Funktionalisierung . . . . .	129
5.1.7.1	Simultane Magnetitsynthese und -funktionalisierung . . . . .	129
5.1.7.2	Einfluss unterschiedlich hergestellter Magnetite auf die Oberflächenfunktionalisierung mit Kaffeesäure . . . . .	136
5.1.8	Einfluss der Funktionalisierungssubstanz auf die BSA-Anbindung . . . . .	142
5.2	Stabilitätsversuche . . . . .	145
5.2.1	Stabilität der funktionalisierten Partikel . . . . .	146
5.2.2	Stabilität der funktionalisierten und proteinbeladenen Partikel . . . . .	148
5.3	Kovalente Enzymimmobilisierung . . . . .	150
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>156</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>160</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Einfluss der weißen Biotechnologie auf die Chemieindustrie. . . . .	1
2.1	Prinzip der Magnettrenntechnologie. . . . .	7
2.2	Kristallgitterstruktur von Magnetit. . . . .	9
2.3	Koordinierung von Hydroxylgruppen an Eisenoxidoberflächen. . . . .	13
2.4	Aufbau der elektrochemischen Doppelschicht an einer Fest-Flüssig-Grenzschicht. . . . .	15
2.5	Suspensionsstabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes eines ionischen Ferrofluids. . . . .	16
2.6	Spinanordnung des Magnetits. . . . .	17
2.7	Prinzipieller Verlauf der Koerzivität in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers. . . . .	18
2.8	Effekte von Oberflächenspins bei Nanopartikeln und deren Auswirkung auf die Magnetisierung. . . . .	18
2.9	Methoden zur Stabilisierung von Partikeln. . . . .	20
2.10	Modell der Ligandenkoordination an der Magnetitoberfläche. . . . .	21
2.11	Komplexbildungsmöglichkeiten auf der Oberfläche. . . . .	21
2.12	Unterschiedliche Morphologien magnetischer Nanopartikel. . . . .	23
2.13	Chinon-Hydrochinon-Redoxsystem anhand der Beispielsubstanz Benzochinon. . . . .	28
2.14	Benzochinonaktivierung von Polymeroberflächen mit einer funktionellen Hydroxylgruppe. . . . .	28
2.15	Schematische Darstellung: (a) der Vernetzungsreaktion von DOPA, (b) der Anbindung von DOPA an Titandioxidoberflächen. . . . .	30
2.16	Schematische Darstellung der Aktivierungsreaktion von funktionellen Carboxylgruppen mittels Carbodiimid. . . . .	33
2.17	Schematische Darstellung der Aktivierungsreaktion von funktionellen Aminogruppen mittels Glutaraldehyd. . . . .	33
2.18	Schematische Darstellung von PS-AAEM mit (a) Maghemit an der Oberfläche (b) Maghemit im Kern. . . . .	35
3.1	XRD-Spektrum des unbehandelten, industriell hergestellten Referenzmagnetits. . . . .	38
3.2	REM-Aufnahme des unbehandelten, industriell hergestellten Referenzmagnetits. . . . .	39
3.3	Verwendete Funktionalisierungssubstanzen. . . . .	40
3.4	Schematische Darstellung des Zetapotentials. . . . .	45
3.5	Schematischer Aufbau einer Thermowaage. . . . .	46
3.6	Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops. . . . .	47

3.7	Einige im Rasterelektronenmikroskop nutzbare Signale und deren Anregungsbereiche. . . . .	48
3.8	Schematischer Aufbau eines FTIR-Gerätes. . . . .	49
3.9	Schematischer Aufbau eines konventionellen dynamischen Lichtstreuungsmessgerät. . . . .	50
3.10	Schematischer Aufbau eines Röntgenspektrometers. . . . .	51
3.11	Reflexion von Röntgenstrahlen an einer Netzebenenschar. . . . .	51
3.12	Schematische Darstellung der drei Zustände des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue-G250. . . . .	52
3.13	Schematische Darstellung der Hydrolysereaktion der Lipase. . . . .	53
3.14	Abhängigkeit der kritischen Partikelgröße von der Temperatur. . . . .	56
4.1	Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. . . . .	60
5.1	REM-Aufnahmen des Einflussverhaltens der Puffersubstanzen auf den industriellen Magnetit. . . . .	67
5.2	REM-Aufnahmen des Einflussverhaltens der BSA-Immobilisierung vorbehandelter und unfunktionalisierter industriell hergestellter Magnetitpartikel. . . . .	67
5.3	FTIR-Spektren Benzochinon und Hydrochinon funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes. . . . .	69
5.4	Mögliche Bindungsform von Benzochinon an der Magnetitpartikeloberfläche. . . . .	70
5.5	Mögliche Bindungsform von Hydrochinon an der Magnetitpartikeloberfläche. . . . .	71
5.6	FTIR-Spektren Benzochinon funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung. . . . .	73
5.7	FTIR-Spektren Hydrochinon funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung. . . . .	74
5.8	Quantitative Proteinbestimmung Benzochinon und Hydrochinon funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitnanopartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und der Immobilisierung. . . . .	75
5.9	REM-Aufnahmen Benzochinon funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung. . . . .	77
5.10	REM-Aufnahmen Benzochinon und Hydrochinon funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Immobilisierung. . . . .	79
5.11	Zetapotentialverläufe Benzochinon funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. . . . .	80
5.12	XRD-Spektren Benzochinon funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. . . . .	81
5.13	FTIR-Spektren Dopamin und DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes. . . . .	83
5.14	Mögliche Bindungsform von Funktionalisierungssubstanzen mit zwei Hydroxylgruppen in para-Stellung am Beispiel von DOPA. . . . .	84

5.15	FTIR-Spektren Dopamin funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung. . . . .	88
5.16	Quantitative Proteinbestimmung Dopamin funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und der Immobilisierung. . . . .	89
5.17	REM-Aufnahmen Dopamin funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung. . . . .	89
5.18	FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung. . . . .	90
5.19	Zetapotentialverläufe DOPA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. . . . .	91
5.20	XRD-Spektren DOPA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. . . . .	92
5.21	FTIR-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes. . . . .	95
5.22	FTIR-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung. . . . .	96
5.23	Quantitative Proteinbestimmung Kaffeesäure funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und der Immobilisierung. . . . .	97
5.24	Zetapotentialverläufe Kaffeesäure funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. . . . .	98
5.25	REM-Aufnahmen Kaffeesäure funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung. . . . .	99
5.26	XRD-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. . . . .	100
5.27	FTIR-Spektren Gallussäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes. . . . .	102
5.28	FTIR-Spektren Gallussäure funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung. . . . .	103
5.29	Quantitative Proteinbestimmung Gallussäure funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung. . . . .	105
5.30	REM-Aufnahmen Gallussäure funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungssubstanz. . . . .	105
5.31	FTIR-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit. . . . .	111
5.32	Zetapotentialverläufe Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit. . . . .	111
5.33	Zeitlicher Konzentrationsverlauf der Kaffeesäure im Überstand der Funktionalisierungsversuche. . . . .	112

5.34	FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit. . . . .	112
5.35	Zetapotentialverläufe DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit. . . . .	113
5.36	FTIR-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungskonzentration. . . . .	114
5.37	Zetapotentialverläufe Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungskonzentration. . . . .	115
5.38	FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungskonzentration. . . . .	116
5.39	Zetapotentialverläufe DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungskonzentration. . . . .	117
5.40	FTIR-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Ionenkonzentration des Funktionalisierungspuffers. . . . .	118
5.41	Zetapotentialverläufe Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Ionenkonzentration des Funktionalisierungspuffers. . . . .	118
5.42	FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Ionenkonzentration des Funktionalisierungspuffers. . . . .	121
5.43	Zetapotentialverläufe DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Ionenkonzentration des Funktionalisierungspuffers. . . . .	121
5.44	FTIR-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungstemperatur. . . . .	122
5.45	Exemplarische TGA-Verläufe Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungstemperatur. . . . .	123
5.46	FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungstemperatur. . . . .	124
5.47	Exemplarische TGA-Verläufe DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungstemperatur. . . . .	125
5.48	FTIR-Spektren DP und ED funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung. . . . .	127
5.49	Zetapotentialverläufe ED und DP funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes. . . . .	128
5.50	FTIR-Spektren simultan synthetisierter und funktionalisierter Kaffeesäure-Magnetitpartikel. . . . .	130
5.51	DLS-Verläufe Kaffeesäure synthetisierter und funktionalisierter Magnetitpartikel. . . . .	132
5.52	Zetapotentialverläufe Kaffeesäure synthetisierter und funktionalisierter Magnetitpartikel. . . . .	133
5.53	FTIR-Spektren simultan synthetisierter und funktionalisierter DOPA-Magnetitpartikel. . . . .	133
5.54	Zetapotentialverläufe DOPA synthetisierter und funktionalisierter Magnetitpartikel. . . . .	134
5.55	XRD-Spektren DOPA- und Kaffeesäure synthetisierter Magnetitnanopartikel. . . . .	135
5.56	FTIR-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der verschiedenen synthetisierten Magnetite. . . . .	137

---

5.57	Zetapotentialverläufe Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel und der Einfluss der Magnetitsynthese. . . . .	138
5.58	XRD-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitnanopartikel und der Einfluss der Magnetitsynthese. . . . .	139
5.59	DLS-Verläufe Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel und der Einfluss der Magnetitsynthese. . . . .	140
5.60	Exemplarische TGA-Verläufe Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel und der Einfluss der Magnetitsynthese. . . . .	141
5.61	FTIR-Spektren Kaffeesäure und DOPA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Immobilisierungszeit. . . . .	143
5.62	Zetapotentialverläufe Kaffeesäure funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Immobilisierungszeit. . . . .	144
5.63	Quantitative Proteinbeladung des Kaffeesäure und DOPA funktionalisierten Magnetits in Abhängigkeit der Immobilisierungszeit und -konzentration. . . . .	145
5.64	Abweichungen der isoelektrischen Punkte Kaffeesäure und DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel bezüglich der Ausgangsprobe nach den Stabilitätsuntersuchungen. . . . .	147
5.65	Restbeladung Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel bezüglich der Ausgangsprobe nach Stabilitätsuntersuchungen. . . . .	148
5.66	Abweichungen der isoelektrischen Punkte funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel bezüglich der Ausgangsprobe nach den Stabilitätsuntersuchungen. . . . .	149
5.67	Quantitative Proteinrestbeladung des Kaffeesäure und DOPA funktionalisierten Magnetits nach den Stabilitätsversuchen. . . . .	150
5.68	Restaktivität des Immobilisats der DOPA funktionalisierten Magnetitnanopartikel bezüglich des nativen Enzyms und der Einfluss der Immobilisierungsdauer. . . . .	153
5.69	Restaktivität des Immobilisats der Kaffeesäure funktionalisierten Magnetitnanopartikel bezüglich des nativen Enzyms und der Einfluss der Immobilisierungsdauer. . . . .	154

# Tabellenverzeichnis

2.1	Vergleich der Synthesemethoden. . . . .	10
3.1	Materialien für die Magnetitsynthese. . . . .	37
3.2	Materialien für die Funktionalisierung. . . . .	42
3.3	Materialien für die Immobilisierung. . . . .	43
3.4	Verwendete Substanzen zur Pufferherstellung. . . . .	43
3.5	Verwendete Chemikalien für die Analysemethoden. . . . .	44
3.6	Anisotropiekonstanten für Magnetit. . . . .	55
5.1	Proteinbeladung von unbehandeltem Magnetit bei unterschiedlichen pH- Werten. . . . .	65
5.2	Proteinbeladung von unbehandeltem Magnetit bei unterschiedlichen Vor- behandlungen und pH-Werten. . . . .	66
5.3	Synthesebedingungen der ausgewählten Magnetite. . . . .	136

# Abkürzungsverzeichnis

APTS	Aminopropyltriethoxysilan
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BSA	Bovine Serum Albumin
BQ	p-Benzochinon
CA	Kaffeesäure
CDI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DA	Dopamin
DLS	dynamische Lichtstreuung
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DMF	Dimethylformamid
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DP	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure
E	Enzym
EA	Essigsäure/-Acetat
ED	Ethyl 3,4-dihydroxycinamat
ELISA	Enzym linkend Immunosorbent Assay
FTIR	Fouriertransformationinfrarotspektrometrie
Funkt.	Funktionalisierung
GA	Gallussäure
Glut	Glutaraldehyd
HGMS	Hochgradient-Magnetseparatoren
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HQ	Hydrochinon
IEP	isoelektrischer Punkt
IR	Infrarot
JCPDS	Joint Committee of Powder Diffraction Standards
k. A.	keine Angabe

---

L	Ligand
LNP	Ladungsnullpunkt
M	Metallion
m	metha
Mi	Magnetit industriell
M-PVA	magnetische Polyvinylalkoholpartikel
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
o	ortho
p	para
PDC	1,4-Phenylen-Diisothiocyanat
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
p-NP	p-Nitrophenol
p-NPP	p-Nitrophenylpalmitat
PS-AAEM	Polystyreneco-Acetoacetoxyethyl Methacrylat
PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskop
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
VTES	Vinyltriethoxysilan
XRD	Röntgendiffraktometrie (X-ray diffraction)

# Formelverzeichnis

$A$	[ $U/g$ ]	spezifische Enzymaktivität
$a$	[ $m$ ]	Gitterkonstante
$C$	[ $-$ ]	BET-Parameter
$c_m$	[ $kg/l$ ]	Massenkonzentration
$c_{Mol}$	[ $mol/l$ ]	Stoffmengenkonzentration
$c_{Mol,OH}$	[ $mol/l$ ]	molare Konzentration funktioneller Hydroxylgruppen
$c_s$	[ $kg/l$ ]	eingesetzte Konzentration
$c_{Sv,OH}$	[ $1/m^2$ ]	Konzentration der Hydroxylgruppen pro Fläche
$D$	[ $m^2/s$ ]	Diffusionskoeffizient
$d$	[ $m$ ]	Linienverbreiterung
$d_{50}$	[ $m$ ]	mittler Partikel-/Agglomeratdurchmesser
$dD$	[ $\%$ ]	Durchmesseränderung bezogen auf den Ausgangsdurchmesser
$dD/dr$	[ $\%$ ]	Schwellrate
$d_{hkl}$	[ $m$ ]	Netzebenenabstand
$d_{krit}$	[ $m$ ]	kritischer Partikeldurchmesser für superparamagnetisches Verhalten
$d_p$	[ $m$ ]	Partikeldurchmesser
$d_s$	[ $m$ ]	kritischer Partikeldurchmesser von Eindomänenpartikel
$E$	[ $V/m$ ]	elektrisches Feld
$E_A$	[ $J$ ]	Anisotropieenergie
$E_{Ak}$	[ $U$ ]	Enzymaktivität
$E_{dw}$	[ $J$ ]	Blochwandenergie
$E_{kin}$	[ $J$ ]	kinetische Energie
$E_{MS}$	[ $J$ ]	magnetostatische Energie
$E_x$	[ $-$ ]	Extinktion
$f_0$	[ $s$ ]	Vorfaktor
$FWHM$	[ $rad$ ]	Halbwertsbreite
$H$	[ $A/m$ ]	Koerzivität
$hkl$	[ $-$ ]	Miller-Indizes

$I$	[A]	elektrischer Strom
$K$	[ $ker/m^3$ ]	Anisotropiekonstante
$k$	[ $1,3807 \cdot 10^{-23}$ J/K]	Boltzmann Konstante
$K_1$	[ $ker/m^3$ ]	Anisotropiekonstante 1. Ordnung
$K_{bulk}$	[ $ker/m^3$ ]	Anisotropiekonstante des makroskopischen Magnetits
$K_{eff}$	[ $ker/m^3$ ]	effektive Anisotropiekonstante
$K_m$	[ $mol/l$ ]	Michaeliskonstante
$K_{scher}$	[–]	Scherrer-Formfaktor
$L$	[m]	Küvettenlänge
$M$	[ $kg/mol$ ]	Molmasse
$\vec{M}$	[ $A \cdot m^2$ ]	magnetisches Moment
$m_M$	[Da]	Molekülmasse
$M_R$	[A/m]	Remanenz
$\vec{M}_s$	[J/T]	Sättigungsmoment
$M_s$	[ $emu/g$ ]	magnetische Sättigung
$n_a$	[ $mol/kg$ ]	spezifische adsorbierte Stoffmenge
$N_A$	[ $6,022 \cdot 10^{23}$ 1/mol]	Avogadrozahl
$n_m$	[ $mol/kg$ ]	spezifische Monostoffmenge des Adsorbats
$p$	[Pa]	Druck des Adsorptivs im Gleichgewicht des Adsorbats
$p_0$	[Pa]	Sättigungsdampfdruck des Adsorptivs
$pK_s$	[–]	Säurekonstante Angabe als dekadischer Logarithmus
$r$	[–]	Polymer/Eisen-Verhältnis
$S$	[–]	Scherebene
$S_v$	[ $m^2/g$ ]	spezifische Oberfläche des Partikels
$T$	[K]	Temperatur
$Theta/\theta$	[°]	Reflexionswinkel
$T_{krit}$	[K]	kritische Temperatur für superparamagnetisches Verhalten
$U$	[V]	Spannung
$V$	[ $m^3$ ]	Volumen
$V_{ts}$	[l]	Probenvolumen
$V_{max}$	[ $mol/s$ ]	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
$V_p$	[ $m^3$ ]	Partikelvolumen
$V_s$	[l]	Gesamtvolumen der Reaktionsmischung

---

$Z$	$[-]$	Formeleinheit der Elementarzelle
$\alpha$	$[^\circ]$	Bindungswinkel
$\beta$	$[K/s]$	Heizrate
$\Delta A_{410}$	$[1/s]$	Maß der zeitlichen Adsorptionsänderung
$\epsilon$	$[l/(mol \cdot m)]$	Extinktionskoeffizient
$\theta_{hkl}$	$[^\circ]$	Winkel
$\vartheta_C$	$[^\circ C]$	Curie-Temperatur
$\vartheta_s$	$[^\circ C]$	Schmelzpunkt
$\vartheta_{Sied}$	$[^\circ C]$	Siedepunkt
$\vartheta_V$	$[^\circ C]$	Verwey-Temperatur
$\lambda$	$[m]$	Wellenlänge
$\mu_B$	$[9,2740 \cdot 10^{-24} \text{ J/T}]$	Bohrsches Magneton
$\nu$	$[1/m]$	Wellenzahl
$\nu_s$	$[m/s]$	Teilchengeschwindigkeit
$\nu_u$	$[m^2/s]$	Viskosität des umgebenden Mediums
$\rho$	$[kg/m^3]$	Dichte
$\rho_0$	$[kg/m^3]$	Dichte des Partikels
$\tau$	$[s]$	Relaxationszeit
$\Psi$	$[V]$	Nernst-Potential
$\omega$	$[1/s]$	Drehzahl

# 1 Einleitung

Die Katalyse ist in der chemischen Industrie von enormer wirtschaftlicher Bedeutung, da ca. 80 % aller chemischer Prozesse mit Katalysatoren arbeiten [1]. Verbindet man die herkömmlichen, chemischen Katalysewege mit der weißen/industriellen Biotechnologie durch den Einsatz von Biokatalysatoren, den sogenannten Enzymen, könnten einige der Prozesse umweltfreundlicher und „sauberer“ nach den Leitlinien der weißen Biotechnologie (z.B. Abfallvermeidung, Einsparung von Energie und Rohstoffen) gestaltet werden [1, 2, 3]. Im Jahr 2010 belief sich der Anteil der weißen Biotechnologie an der Chemieindustrie auf ca. 5 % (vgl. Abb. 1.1) und soll Prognosen zufolge bis zum Jahre 2025 auf 10-20 % steigen. Der Umsatz der industriellen Biotechnologie lag im Jahre 2010 allein in den USA bei ca. 115 Mrd. US-Dollar [2]. Für diese Entwicklung haben Enzyme eine entscheidende Bedeutung und werden heutzutage als mögliche Alternative zu traditionellen chemischen Prozessen angesehen. Etwa 130 verschiedene Enzyme sind bereits im industriellen Einsatz etabliert [2, 4].

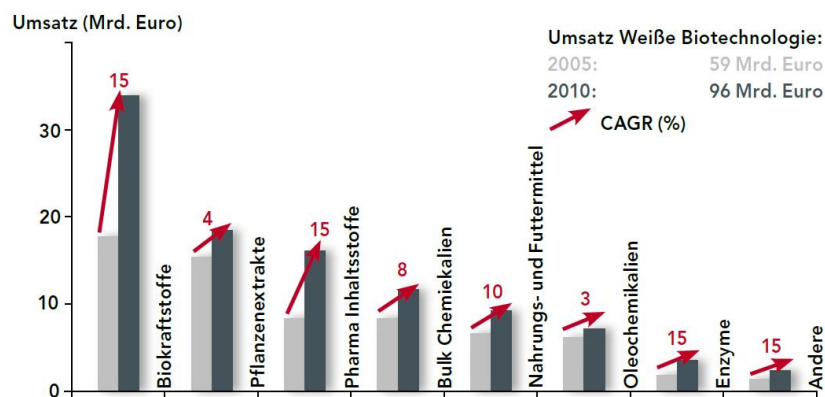


Abbildung 1.1: Einfluss der weißen Biotechnologie auf die Chemieindustrie [5].

In der kommerziellen Anwendung von Enzymen ist die Immobilisierung generell vorteilhaft, da sie eine einfachere Prozessführung sowie ein Recycling der Enzyme aus dem Reaktionsgemisch erlaubt und somit meist die Produktionskosten verringert. Weiterhin kann durch die Immobilisierung eine kontinuierliche Prozessführung ermöglicht werden und gewöhnlich nimmt der Stabilitätsbereich der Enzyme hinsichtlich des pH-Wertes und der Temperatur durch die Immobilisierung zu [4, 6]. Bislang werden meist große, poröse Partikel mit großer inneren Oberfläche und einem Partikeldurchmesser von ca. 1 mm für die Immobilisierung verwendet und in einem Batch- oder Festbettreaktor eingesetzt. Die Wiedergewinnung erfolgt überwiegend durch Zentrifugation oder Filtration [4, 7]. Nachteilig bei einer Immobilisierung an großen, porösen Partikeln sind die durch die Poren verursachte Diffusionslimitierung sowie das Fouling. Weiterhin erweist sich eine Abtrennung aus viskosen Reaktionsgemischen als schwierig. Diese Einschränkungen sorgen häufig für die Anwendung nativer Enzyme im Reaktionsprozess, was zu weniger nachhaltigen und aus ökonomischer Sicht unvorteilhaften Prozessen führt.

Ersetzt man die herkömmlichen Trägermaterialien durch nicht poröse, stabilisierte, magnetische Nanopartikel, können diese Nachteile in Kombination mit dem Einsatz einer Magnetseparation umgangen werden [7, 8]. Durch ihre geringe Größe verfügen Nanopartikel über eine große spezifische Oberfläche, sind gut dispergierbar und können aufgrund ihres Vollkörpers die aktiven Zentren der Enzyme auf der Partikeloberfläche anbinden, weshalb Porendiffusionen und Fouling vermieden werden. Die Magnetseparation ermöglicht eine leichte, effiziente (typischerweise 99 %), selektive und schonende Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch ohne wesentliche Aktivitätsverluste der Enzyme [9, 10]. Jedoch neigen die magnetischen Nanopartikel zur Agglomeration, um ihre hohen Oberflächenenergien zu minimieren, wodurch ihre größen-spezifischen Eigenschaften beeinträchtigt werden und ihr Einsatz in manchen Anwendungen eingeschränkt ist. Deshalb ist die Stabilisierung magnetischer Nanopartikel von erheblicher Bedeutung, um zum einen die Partikelagglomeration zu verringern und zum anderen die Partikel vor Umwelteinflüssen wie z.B. Oxidation zu schützen. Die Stabilisierung wird normalerweise durch eine Partikelbeschichtung erreicht, welche die native Enzymstruktur bei der Immobilisierung so wenig wie möglich beeinflussen soll, um eine möglichst hohe Aktivität des Enzyms zu erhalten [6, 9]. Ein Lösungsansatz bietet die Funktionalisierung der Beschichtung, bei der spezielle, reaktive funktionelle Gruppen auf der Oberfläche gebunden werden, um mit dem Enzym eine spezifische Bindung einzugehen und somit Aktivitätsverluste aufgrund unspezifischer Mehrfachanbindungen und/oder sterischer Hinderungen zu verhindern.

In früheren Studien lag der Fokus für Beschichtungsmaterialien auf Polymeren, jedoch büßen polymerbeschichtete magnetische Nanopartikel einen Teil ihrer Magnetisierung gegenüber unbehandelten Partikeln ein, sind nicht ausreichend gegenüber Oxidation durch Luftsauerstoff geschützt und instabil gegenüber hohen Temperaturen und niedrigen pH-Werten [11, 12]. Problematisch ist zusätzlich das Quellverhalten von Polymeren in Flüssigkeiten [13] und die häufige Notwendigkeit mehrerer Beschichtungsschritte. Weiterhin sind kommerzielle Ferrofluide auf Öl- und Wasserbasis üblicherweise nur im Sauren (unter pH 5) bzw. im Basischen (über pH 8) stabil [11], so dass ein Einsatz als Enzymträger, welche generell ein pH-Wertoptimum im neutralen pH-Bereich besitzen, unvorteilhaft ist.

Vor diesem Hintergrund wird die Bedeutung weiterer Forschungen im Bereich der Beschichtungen von magnetischen Nanopartikeln deutlich. Das Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Beschichtung, genauer die Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel mittels niedermolekularer, organischer Moleküle für eine anschließende Anwendung als Enzymträgermaterial. Gleichzeitig sollen darüber hinaus die Stabilitätseigenschaften der Partikelsuspension im neutralen pH-Bereich erhöht und eine anschließende kovalente Immobilisierung ermöglicht werden. Dafür wird das Eisenoxid Magnetit verwendet, welches sich durch seinen speziellen Superparamagnetismus als geeignet erweist, da keine Agglomeration durch den Restmagnetismus induziert wird [14] und sich die Partikel somit besonders für den Einsatz in magnetischen Separationsverfahren eignen. Die Auswahl der Funktionalisierungssubstanzen beruht auf zwei Ansätzen. Beim ersten wird eine bereits gängige Methode der Funktionalisierung von Polymerträger, welche wie Magnetit ebenfalls Hydroxylgruppen besitzen, übertragen [15]. Dazu wurden die Moleküle Benzochinon sowie sein Redoxpartner Hydrochinon als Funktionalisierungs-

substanz für Magnetit getestet. Der zweite Ansatz basiert auf Wissenstransfer aus der Bionik. Dabei ist die in Muscheln enthaltene Haftsubstanz DOPA entscheidend, welche für die feste Anlagerung von Muscheln an unterschiedlichen Oberflächen verantwortlich gemacht wird [16, 17]. DOPA und Moleküle ähnlicher Struktur wurden als Funktionalisierungssubstanz für magnetische Magnetitnanopartikel getestet, um somit strukturell bedingte Einflüsse hinsichtlich der Bindungs- und Suspensionsstabilität zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit ist in sechs Kapitel gegliedert und beginnt im 2. Kapitel mit dem Stand der Technik, in dem ein erster Einblick in das Thema Beschichtungen und Immobilisierungen an magnetischen Nanopartikeln gegeben wird. Dem theoretischen Teil folgt der Material- und Methodenabschnitt (Kapitel 3), in welchem die unterschiedlichen verwendeten Materialien und Analysemethoden vorgestellt sowie das methodische Vorgehen erläutert werden. Im 4. Kapitel wird der Versuchsaufbau sowie die Durchführung der Experimente und Analysemethoden, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, dargestellt. Den Hauptteil dieser Arbeit bildet mit dem Ergebnis- und Diskussionsteil das Kapitel 5. Das Thema des 5.1. Kapitels ist die Funktionalisierung und es handelt im ersten Abschnitt von den unterschiedlichen Substanzen und deren Eignung als Funktionalisierungssubstanz für den magnetischen Träger Magnetit. Des Weiteren werden die beiden geeignetsten Substanzen DOPA und Kaffeesäure genauer hinsichtlich ihrer Prozessbedingungen untersucht und der Einfluss der BSA-Anbindung an den funktionalisierten magnetischen Magnetitnanoträger erläutert. Das 5.2. Kapitel handelt von den Stabilitätsuntersuchungen der funktionalisierten und immobilisierten Magnetitnanopartikel. In Kapitel 5.3 wird exemplarisch auf die Eignung als Enzymträger eingegangen. Den Abschluss in Kapitel 6 bilden eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse und ein Ausblick auf mögliche anschließende Arbeiten.

## 2 Stand der Technik

Im Folgenden wird ein Einblick in Funktionalisierung und Immobilisierung an magnetischen Nanopartikeln gegeben und insbesondere der magnetische Nanopartikel Magnetit mit seinen charakteristischen Eigenschaften dargestellt. Daran anschließend werden Überblicke über Oberflächenbeschichtungs- und Stabilisierungsmethoden vorgestellt und bereits durchgeführte Beschichtungsmaßnahmen aus der Literatur von Nanoträgern erläutert. Weiterhin werden die Immobilisierungsmethoden beschrieben und Veröffentlichungen zur Immobilisierung an magnetischen Nanoträgern aufgezeigt.

### 2.1 Nanotechnologie

Als Nanotechnologie wird die Erforschung und Nutzung größenspezifischer Materialeigenschaften bezeichnet, die sich zwischen typischen Molekulareigenschaften und makroskopischen Eigenschaften im Nanometerbereich in Form von magnetischen, optischen und elektronischen Besonderheiten zeigen [18, 19]. Üblicherweise wird der Begriff der Nanotechnologie in Zusammenhang mit einem Partikelgrößenbereich von 1-100 nm [20] verwendet, was jedoch in Hinblick auf die damit verbundenen Eigenschaftsänderungen sehr pauschalisiert ist, da die spezifischen Eigenschaftsänderungen stoffabhängig sind [18]. Im Nanometerbereich überwiegen die Oberflächeneffekte, wogegen bei makroskopischen Materialien eher die Volumeneigenschaften [21] und im molekularen Bereich intermolekulare Kräfte wie van der Waals, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen bestimmend sind [22, 23]. Nanomaterialien zeichnen sich durch eine erhöhte Anzahl an Oberflächenatomen im Vergleich zur inneren Struktur sowie einer hohen Oberflächenenergie aus [9, 24, 25, 26]. Es kann sogar zu quantenphysikalischen Effekten durch die spezielle Elektronenstruktur kommen [18, 21], welche zusammen mit anderen Nanoeigenschaften für eine Vielzahl von Anwendungen in Chemie, Medizin und Ingenieurwissenschaften genutzt werden [27].

Die Zusammensetzung und Morphologie von Nanomaterialien kann unterschiedlicher Art sein. So können organische und biologische Stoffe sowie Metalle, Polymere, Kohlenmaterialien, metallische und keramische Oxide zu ihnen zählen. Ihre äußeren Erscheinungsformen sind z.B. sphärisch, röhrenartig oder zylindrisch und sie können aus sämtlichen Aggregatzuständen synthetisiert werden. Aufgrund der Vielzahl von möglichen Nanopartikeln sind die potentiellen und existierenden Anwendungsgebiete nahezu grenzenlos [21, 28].

### 2.2 Magnetische Nanopartikel

Für magnetische Nanopartikel eignen sich ferromagnetische Elemente ( $Fe, Co, Ni$ ), Legierungen ( $FePt$ ), oxidische Metallverbindungen ( $FeO, Fe_2O_3, Fe_3O_4$ ) sowie Ferrite

( $CoFe_2O_4$ ,  $MnFe_2O_4$ ) [9]. Sie finden sich in zahlreiche Gesteine und Böden [20] und helfen wandernden Tiere bei der Orientierung am Erdmagnetfeld [29, 30]. Ein Vorteil gegenüber anderen kleinen Partikeln im technischen Einsatz ist die leichtere Kontrolle sowie die effizientere Abtrennung von bis zu 99% durch ein externes Magnetfeld und die damit verbundene Möglichkeit des Recyclings gegenüber nicht magnetischen Partikeln. Im Gegensatz dazu ist die Filtration sehr feiner Kolloide z.B. überaus zeitraubend und oft nicht realisierbar. Ein genereller Vorteil kleiner Partikel ist die große spezifische Oberfläche und die damit verbundene erhöhte Oberflächenaktivität. Außerdem sind magnetische Partikel nicht porös, so dass aktive Zentren/Moleküle auf der Partikeloberfläche ohne Diffusionslimitierung durch Poren angebonden werden können und Fouling vermieden wird [9, 10, 31, 32]. Ihre spezifische Oberfläche ist vergleichbar mit vielen porösen Materialien [1, 9, 33]. Sie lassen sich nach einer Oberflächenbeschichtung gut in unterschiedlichen Lösungsmitteln dispergieren und verfügen über eine gute kolloidale und chemische Stabilität [34]. Die metallischen Oxide sind nicht toxisch und kommen aufgrund ihrer Biokompatibilität vermehrt in der Biomedizin sowie Biotechnologie zum Einsatz [35]. Ein Nachteil der Oxide ist, dass sie im Vergleich zum metallischen Nanopartikel eine geringere Magnetisierung besitzen [11], dagegen oxidieren die metallischen Partikel aufgrund ihrer Reaktivität schneller an der Luft [9]. Ein weiterer Vorteil ist ihr spezielles superparamagnetisches Verhalten, das der Partikelagglomeration bei Raumtemperatur vorbeugt [36]. Die magnetischen Nanopartikel vereinen die generellen Vorteile kleiner Partikel, wie die hohe Reaktivität und Dispergierbarkeit, mit einer einfachen magnetischen Separation [11], was sie für verschiedene Anwendungen interessant macht. Dabei benötigt jede Anwendung maßgeschneiderte Partikel aufgrund verschiedener Anforderungen an z.B. Partikelgröße und -verteilung, Dispersionsverhalten, Oberflächen- und magnetische Eigenschaften [37, 38]. Problematisch in vielen Anwendungen ist Partikelagglomeration und die Stabilität der Partikel bei den unterschiedlichen anwendungsspezifischen Bedingungen [11, 34]. Des Weiteren müssen die Partikel über eine große magnetische Sättigung verfügen, um ein starkes magnetisches Antwortverhalten auf ein magnetisches Feld zu gewährleisten [36]. Durch Oberflächenbeschichtung kann eine gewünschte Biokompatibilität sowie Dispergierbarkeit in unterschiedlichen Medien erreicht werden. Allerdings sind Teile dieser Eigenschaften immer noch problematisch, weshalb ihr kommerzieller Einsatz nur bedingt möglich ist und weiterer Forschung bedarf [38].

Die Anwendungssparte von magnetischen Nanopartikeln ist sehr umfassend und reicht über die Aufnahmetechnik [29, 39], magnetische Speichereinheiten [40], Kältetechnik [25], Spintronik [41] über die industrielle Abwasserreinigung [42, 43, 44] und Umweltsanierungen [11] bis hin zur medizinischen Bildaufnahme [45], der Dämpfungs- und Dichtungstechnik [38, 46] und der Katalyse [42].

In der Biomedizin werden hauptsächlich Eisenoxide wie Magnetit und Maghemit als verbesserte Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie, gezielte Pharmakokinetik und der Hyperthermie verwendet [37, 47, 48]. Bei der Magnetresonanztomographie geht es um die Verbesserung von biologischen Abbildungssystemen für die Diagnostik und Therapie um Prozesse auf molekularer und zellulärer Ebene zu verstehen. Klinische Anwendungen mit z.B. Dextran beschichteten Nanopartikeln wurden schon realisiert, bei denen im Anschluss an die Einnahme die Partikel über die Leber aus-

geschieden wurden [45, 49, 50]. Eine weitere biomedizinische Anwendungsmöglichkeit ist die gezielte Pharmakokinetik. Bei dieser Methode werden mit Pharmazeutika beschichtete magnetische Nanopartikel injiziert und durch ein externes Magnetfeld zum Ziel-/Wirkort gebracht, um dort das Medikament wieder abzugeben und lokal zu wirken. Dadurch wird die Dosis reduziert, was zu einer Minimierung der Nebenwirkungen führt. Fundamentale Probleme gibt es noch hinsichtlich der Größenkontrollierbarkeit der Synthese, der Stabilität sowie der Biokompatibilität der magnetischen Nanopartikel. Die Anbindung und die Abgabe des Medikamentes sowie die physiologischen Parameter sind noch nicht ausreichend geklärt [11, 50, 51, 52, 53, 54].

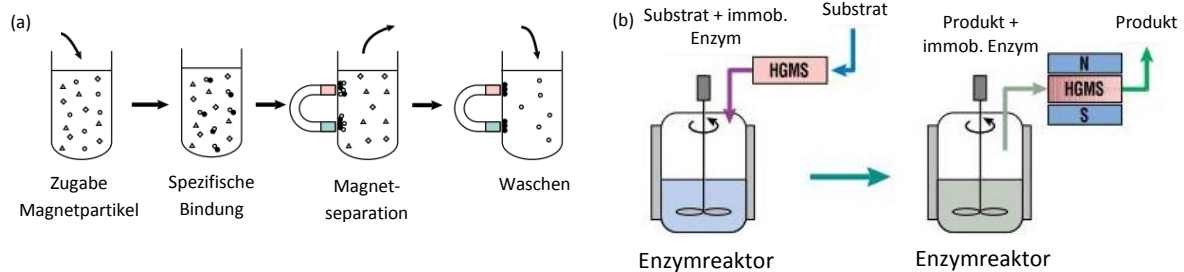
Die Verwendung magnetischer Nanopartikel für katalytische Umsetzungen ist naheliegend, da sie ideale Voraussetzungen wie eine hohe spezifische Oberfläche und die magnetische Separierbarkeit mitbringen. Zusätzlich vereinen sie die Vorteile der homogenen und heterogenen Katalyse. Sie werden daher häufig als „quasi-homogene“ oder „lösliche heterogene“ Katalysatoren bezeichnet. Ein Vorteil der Homogenkatalysatoren ist, dass sie im gegebenen Reaktionsmedium löslich und somit gut für die Substrate zugänglich sind, wodurch eine hohe katalytische Aktivität sowie Selektivität erreicht wird. Ein Nachteil ist, dass sie sich schwierig abtrennen und wiederverwenden lassen und meist aus teuren Edelmetallen und/oder Liganden bestehen, so dass sich die Vor- und Nachteile ausgleichen und die meisten industriellen Verfahren mit Heterogenkatalysatoren durchgeführt werden. Um die homogene Katalyse für die Zukunft noch attraktiver zu machen, ist das Recycling der Homogenkatalysatoren unerlässlich. In diesem Zusammenhang spielen magnetische Nanopartikel eine wichtige Rolle [9, 11]. Die Immobilisierung von Enzymen, Proteinen, Peptiden, Antikörpern sowie ganzen Zellen hat eine vielversprechende Zukunft in der weißen Biotechnologie [42, 55]. Erste Arbeiten mit magnetischen Enzymträgern und Sorbentien traten in den 1970 Jahren auf [7]. Spezielle Anwendungen in der analytischen Chemie, wie z.B. Enzym linkend Immunosorbent Assay (ELISA) und Chromatographieprozesse, sind aufgrund der schnellen Aufreinigung und Abtrennung des Analyts mittels magnetischer Separation von weiterem Interesse [40, 42, 56, 57] und mittlerweile ein kommerzielles Anwendungsgebiet neben der bereits erwähnten medizinischen Diagnostik und der Zellseparation [7].

### 2.2.1 Magnetseparation

Magnetische Abtrennungsvorgänge sind bekannt aus der Erzaufbereitung, dem Abfallrecycling sowie aus der Mineralgewinnung und bieten im Zusammenhang mit der Biotechnologie eine Vielzahl an Möglichkeiten. Sie verfügen gegenüber den üblichen Verfahren wie Zentrifugation, Aufkonzentrierung und Filtration über Vorteile, da die magnetische Separation sehr spezifisch ist und somit andere unmagnetische Feststoffe wie Fasern und unlösliche Reaktanden nicht abgetrennt werden. Von diesen Vorzügen sollen biotechnologische Prozesse in Form schnellerer und kostengünstigerer Produktionen mit geringeren Prozessschritten profitieren [7, 58, 59].

In Abbildung 2.1 (a) ist eine Magnetseparation für den Milliliter-Maßstab prinzipiell dargestellt. Hierbei ist erkenntlich, dass nur die magnetischen Träger abgetrennt werden und die nicht magnetische Materie im Überstand verbleibt. Die bisher entwickelten Magnetseparatoren für biotechnologische Anwendungen sind die Hochgradient-

Magnetseparatoren (HGMS), bei denen nach Abschluss der Reaktion die Rückgewinnung des magnetischen Trägermaterials, an dem z.B. Enzyme immobilisiert sind, erfolgt. Dadurch ist ein Recycling dieses Träger-Enzymkomplex möglich (vgl. Abb. 2.1 (b)) [7, 44].



**Abbildung 2.1:** Prinzip der Magnettrenntechnik: (a) im Labormaßstab, (b) Hochgradient-Magnetseparationstechnik mit Recyclingseinheit für Biokatalysatoren, modifiziert nach [7].

Magnetische Separation wurde erfolgreich in zahlreichen biomedizinischen und biologischen Forschungen angewendet. Es hat sich herausgestellt, dass sie für die Trennung seltener Tumorzellen, Blut und einer geringen Anzahl von Zielzellen besonders geeignet ist. Weiterhin war ihr Einsatz in einem antikörperbasierten Nachweissystem (ELISA) erfolgreich. Dadurch wurde die Reaktionszeit verkürzt und ein größeres Volumen im Vergleich zum Standardtest verwendet [50]. Eine weitere Möglichkeit ist die Anwendung im magnetischen Festbettreaktor, bei dem die Produktfilmbildung durch ein alternierendes magnetisches Feld vermieden werden kann. Zusätzlich kann durch Vibration der Substrattransfer an der Oberfläche verbessert werden. Weiterhin kann die Festbettstabilität durch ein angelegtes magnetisches Feld erhöht werden. Diese Vorteile können die Kapital- und Betriebskosten eines Festbettreaktors senken [58].

## 2.3 Magnetit als Trägermaterial

Magnetit ist das älteste bekannte magnetische Material [60]. Gefunden wurde es bisher in Bakterien, Bienen und Tauben sowie in zahlreichen Teilen der Erdkruste, weshalb es bedeutend für die Geo- und Archäologie ist [44, 61, 62]. Es ist eines der wichtigsten Eisenerze für die Eisen- und Stahlindustrie [14, 38, 63]. Bei Umgebungsbedingungen ist es inert [62] und wird aufgrund seiner geringen Toxizität, seiner chemischen Beständigkeit sowie seiner starken magnetischen Eigenschaften in zahlreichen wissenschaftlichen Disziplinen wie der Mineralogie, Biologie, Geochemie, Umweltwissenschaften, Physik und industriellen Technologie eingesetzt [8, 10, 12, 55, 63]. Unter anderem wird es als Pigment [14], als Adsorbent in Böden- und Wasserversäuerungen [43] sowie in katalytischen Prozessen bei der Vergasung von Kohle und der Hydrogenierung in der Fischer-Tropsch-Synthese verwendet [64].

Er ist schwarz und unterscheidet sich von den meisten anderen Eisenoxiden aufgrund seiner Zusammensetzung von bivalenten und trivalenten Eisenionen. Magnetit ist nicht porös und verfügt über eine spezifische Oberfläche  $S_v$  von  $4 - 100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , die abhängig von der Kristallgröße ist. Seine Dichte  $\rho$  beträgt  $5,18 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  [14, 61, 65]. Er gehört zur Gruppe der ferromagnetischen Materialien und zeichnet sich durch seine

hohe elektrische Leitfähigkeit aus, welche durch eine Elektronenverschiebung zwischen den Nachbarionen  $Fe^{2+}$  und  $Fe^{3+}$  auf den B-Plätzen (vgl. Abb. 2.2) hervorgerufen wird. Diese Leitfähigkeit existiert von der Curie-Temperatur  $\vartheta_C$  von 572-585 °C bis hin zur Verwey-Temperatur  $\vartheta_V$  von 388-397 °C, ab welcher der Magnetit zum Isolator wird, da die Elektronenverschiebung eingefroren ist [41, 60, 62, 66, 67, 68].

Problematisch ist die hohe Elektronenmobilität des Magnetits. Dadurch oxidiert er z.B. an der Luft zu Maghemit ( $\gamma - Fe_2O_3$ ) (vgl. Gleichung 2.1), was an einer Braunfärbung ersichtlich wird. Die Oberflächengröße bleibt bei der Oxidation unverändert und es kommt zu keiner Porenbildung. Bei Raumtemperatur und feinen Partikeln dauert dieser Prozess mehrere Jahre. Oberhalb einer Temperatur von 300 °C startet die Umwandlung zu Hämatit ( $\alpha - Fe_2O_3$ ), die üblicherweise bei einer Temperatur von 400-500 °C vollständig abgeschlossen ist [14, 69].

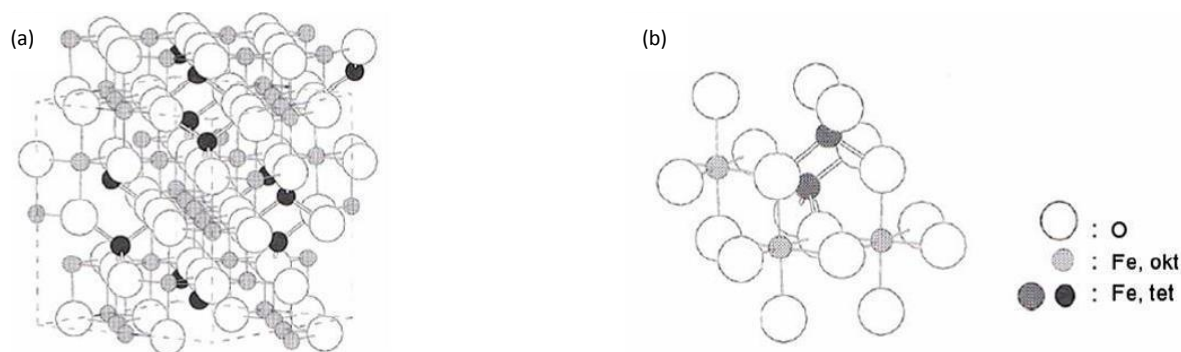


In saurem Medium (pH 2-4) gibt Magnetit  $Fe^{2+}$ -Ionen ab, wodurch sich die Zusammensetzung dem Maghemit annähert, ohne dass sich die Partikelgröße signifikant ändert. Mit steigendem pH-Wert können die Ionen wieder resorbiert werden. Ein vollständiges Auflösen vom Magnetit ist mit konzentrierter Salzsäure möglich [65, 67].

### 2.3.1 Kristallstruktur

Die Kristallstruktur von Magnetit ist in Abbildung 2.2 (a) dargestellt. Die Basis der kubisch-flächenzentrierten Einheitszelle bilden die 32 Sauerstoffionen, welche regelmäßig im kubisch zentrierten Gitter in der  $\langle 111 \rangle$ -Ebene ausgerichtet sind. Die verschiedenen Valenzen der Eisenkationen sind in zwei unterschiedlichen vollbesetzten Raumgittern zum Sauerstoff angeordnet, die trivalenten Eisenkationen belegen die tetraedrischen Plätze, wogegen die oktaedrischen Plätze aus gleichen, antiparallelen Anteilen der bi- und trivalenten Eisenkationen bestehen. Diese Anordnung wird auch als inverser Spinell bezeichnet. Die Gitterkonstante  $a$  der Einheitszelle von Magnetit beträgt 0,839 nm, die in Abbildung 2.2 (a) durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet ist und die Formeleinheiten pro Elementarzelle  $Z$  beträgt 8 [14, 60, 61, 70]. In Abbildung 2.2 (b) ist die tetra- und oktaedrische Anordnung der Eisenatome zu sehen. Dabei ist ersichtlich, dass jedes tetraedrisch koordinierte Eisenkation von vier Sauerstoffatomen umgeben ist, wobei die Bindungslänge 0,189 nm beträgt. Die Eisenkationen auf den oktaedrischen Zwischengitterplätzen verfügen über sechs lange Fe-O-Bindungen (0,206 nm). Der Abstand der Sauerstoffschichten beträgt 0,296 nm und jedes Sauerstoffion ist von einer kurzen und drei langen Fe-O-Bindungen umgeben [64]. Der Bindungswinkel  $\alpha$  (FeOFe) beträgt 127 ° [49]. Bei einer Abkühlung unterhalb der Verwey-Temperatur  $\vartheta_V$  wechselt die Struktur von kubischen zum triklinischen, was einhergeht mit der Änderung der einachsigen Anisotropie [60].

Meistens tritt der natürliche Magnetit in Kristallformen des Oktaeders oder als rhombischer Dodekaeder auf, welche von der  $\langle 111 \rangle$ -Ebene begrenzt wird und an der auch die Zwillingsbildung auftritt [14].



**Abbildung 2.2:** Kristallgitterstruktur von Magnetit: (a) Gitterstruktur, gestrichelte gibt die Gitterkonstante an, (b) Anordnung der tetraedrischen und oktaedrischen Eisenatome [14].

### 2.3.2 Synthese

An der Synthese qualitativ hochwertiger Nanopartikel wird aufgrund des wissenschaftlichen Interesses und der zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten immer noch weiter geforscht. Ein wichtiger Schlüsselparameter der Synthese ist die Partikelgröße, da elektrische, optische und magnetische Eigenschaften sowie auch die Dispergierbarkeit und der Agglomerationszustand von ihr abhängen [11, 69, 71]. Zusätzlich ist der gewählte Syntheseweg entscheidend, da Partikel mit gleicher Größe und unterschiedlichen Herstellungsverfahren unterschiedliche magnetische Eigenschaften aufweisen, was sehr wahrscheinlich an der unterschiedlichen Mikrostruktur liegt [25, 60]. Folglich ist die Ausbildung der Kristallstruktur von erheblicher Bedeutung, da sie auch im engen Zusammenhang mit den magnetischen Eigenschaften steht [25]. Somit ist das Ziel der Synthese von magnetischen Nanopartikeln eine auf atomarem Level größenkontrollierte Synthese monodisperser Partikel ohne anschließendem Größenselektionsprozess [71, 72].

Bei der Herstellung von Nanopartikel werden häufig oberflächenaktive Stoffe und/oder Lösungsmittel verwendet [11], da dadurch eine kontrolliertere Keimbildung und eine damit verbundene engere Partikelgrößenverteilung und Dispergierbarkeit in verschiedenen Medien erreicht wird [73, 74]. Problematisch dabei ist, dass diese Substanzen auf der Partikeloberfläche verbleiben, schwer ablösbar sind, und somit Schwierigkeiten bei weiteren Prozessschritten verursachen können [39, 69], da sie Oberflächeneffekte verändern und Auswirkungen auf das magnetische Verhalten haben [75].

Aufgrund der vielen Möglichkeiten der Synthesemethoden und der großen Anzahl an Syntheseparametern ist die Datenstreuung in der Literatur groß [25]. Die Synthese von Nanopartikeln ist aus jedem Aggregatzustand möglich. Es gibt Gas-, Flüssigkeits- und Feststoffprozesse. Zu den Gasphasenprozessen gehören z.B. die Spraypyrolyse und die physikalische Abscheidung aus der Gasphase. Die Methoden der Flüssigphasensynthese basieren auf chemischen Reaktionen in Lösungsmitteln oder wässrigen Phasen, die zur Kolloidbildung führen, wie z.B. thermische Zersetzung, Synthese in Mikroemulsionen, oxidative Synthese und Kopräzipitation. Bei den Feststoffprozessen handelt es sich um mechanische Prozesse, die auf Größenreduzierung wie z.B. Mahlen und Schleifen beruhen [9, 21, 51, 76].

Im Folgenden wird nur auf die Vielzahl der nasschemischen Möglichkeiten wie thermi-

sche Zersetzung, Mikroemulsion, Kopräzipitation und oxidative Synthese eingegangen, wobei im Speziellen die Kopräzipitation und die oxidative Synthese erläutert werden.

Bei der thermischen Zersetzung wird unter Zuhilfenahme von organischen Lösungsmitteln und oberflächenaktiven Substanzen eine größenkontrollierte, monodisperse Nanopartikelsuspension erreicht. Die Ausgangsstoffe sind metallorganische Komponenten wie z.B. Metallcarbonyle. Als oberflächenaktive Substanzen werden Fettsäuren, Ölsäuren, Oleylamin und Hexadecylamin verwendet, wobei das Verhältnis dieser Substanzen sowie die Reaktionstemperatur und -zeit die hauptsächlichen Parameter für die Größen- und Morphologiekontrolle sind [9, 11, 36, 38, 77]. Die thermische Zersetzung der Ausgangsstoffe liefert Monomere und ihre Aggregation oberhalb der Sättigungskonzentration löst die Keimbildung und das anschließende Keimwachstum aus [45]. Die entstandenen Partikel sind nicht in wässriger Phase löslich aufgrund ihrer Beschichtung mit hydrophoben Liganden während der Synthese und müssen mittels Oberflächenmodifikationen von der organischen in die wässrige Phase überführt werden [9, 11, 12, 77]. Eine weitere Möglichkeit, Nanopartikel zu bilden, ist die Synthese in Mikroemulsionen. Auch bei dieser Methode werden oberflächenaktive Stoffe verwendet und der notwendige Einsatz von Lösungsmitteln ist relativ hoch [9, 11, 78]. Das Verfahren führt jedoch zu polydispersen Systemen mit geringer Ausbeute. Im Gegensatz dazu kommen die Kopräzipitation sowie die oxidative Synthese ohne Lösungsmittel aus, sind weniger toxisch und aufgrund der hohen Ausbeute und vergleichsweise einfachen Durchführung kostengünstiger [9, 79, 80]. Nachteilig im Vergleich zur thermischen Zersetzung sind die meist polydispersen Partikelsuspensionen [9, 11, 12]. Bei der thermischen Zersetzung und der Kopräzipitation handelt es sich um die verbreitetsten Verfahren [80]. In Tabelle 2.1 sind die Vor- und Nachteile der wichtigsten verschiedenen Synthesemethoden zusammengefasst.

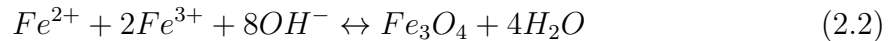
**Tabelle 2.1:** Vergleich der Synthesemethoden.

Methode	Ausführung	Temperatur	Größen		Ausbeute
			-verteilung	-kontrolle	
Kopräzipitation	sehr einfach	20 - 90 °C	relativ eng	nicht gut	hoch
Oxidative Synthese	sehr einfach	20 - 90 °C	relativ eng	nicht gut	hoch
Thermische Zersetzung	kompliziert	100 - 320 °C	sehr eng	sehr gut	hoch
Mikroemulsion	kompliziert	20 - 50 °C	relativ eng	sehr gut	niedrig

Die Herstellung von Magnetit in wässriger Phase mittels der Kopräzipitation und der oxidativen Hydrolyse basiert auf Präzipitationsprozessen in Lösungen, bei denen die unterschiedlichen Ionen unlösliche Präzipitate bilden. Eine sorgsame Prozessüberwachung ist für die Einstellung der gewünschten Partikelcharakteristika nötig [21, 69, 81]. Die Faktoren, die die Oxidfällung beeinflussen, sind zahlreich und durch die thermodynamischen und kinetischen Randbedingungen zu steuern. Jedoch sind die Einflüsse komplex und korrelieren untereinander, so dass eine Optimierung notwendig ist [82]. Einer der wichtigsten Parameter der Synthese ist der pH-Wert, da Magnetit nur in

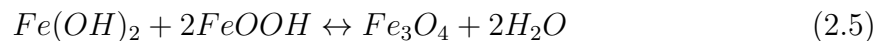
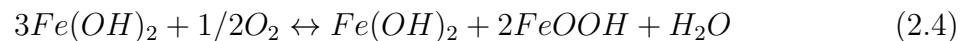
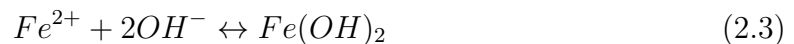
einem bestimmten pH-Bereich entsteht. So wird ein pH-Wert über 8 benötigt, jedoch trägt ein zu hoher pH-Wert zu einer Nebenproduktbildung z.B. von Goethit bei [61].

Bei der Synthese mittels der Kopräzipitationsmethode werden typischerweise Lösungen mit bi- und trivalenten Eisensalzen in einem molaren Verhältnis von  $0,5 \text{ Fe}^{2+} \cdot (\text{Fe}^{3+})^{-1}$  verwendet [83], die unter inerten Bedingungen mit einer Base in einem pH-Bereich von 9 – 10 bei konstanter Temperatur reagieren [9, 61]. Die Reaktion ist in der folgenden Gleichung 2.2 dargestellt:



Hierbei handelt es sich um eine alkalische Hydrolyse der beiden Eisensalze [37, 84]. Der Mechanismus der Kopräzipitation ist noch nicht vollständig geklärt, aber wahrscheinlich basiert die Bildung von Magnetitpartikeln auf der Aggregation von Ferrihydriten und Eisen(III)hydroxid ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ )-Partikeln. Die Bildung beinhaltet Auflösungs- und Rekristallisationsprozesse sowie die strukturelle Neuorientierung aufgrund eines Elektronentransfers bei der Adsorption von bivalentem Eisen am Eisenhydroxid [85]. Die Partikelgröße liegt zwischen 2-20 nm [37], mit einem verstärkten üblichen Vorkommen von 10 nm Partikeln [31, 39, 42, 85, 86]. Die Kontrolle der Partikelgröße erweist sich als recht schwierig, so dass sich meist eine Polydispersität ergibt [9]. Deshalb ist eine kurze Explosion der Keimbildung sowie ein langsames und kontrolliertes Keimwachstum entscheidend für die Herstellung von monodispersen Partikeln [11]. Weitere Parameter, die die Kristallgröße und -reinheit beeinflussen, sind die gewählten Eisensalze, der pH-Wert, die Reaktionszeit und -temperatur, das Molverhältnis der Eisensalze sowie die Ionenkonzentration im Medium [11, 87, 88]. Iida et al. haben Magnetitnanopartikel mit den beiden Eisensalzen synthetisiert, indem sie als Base 1,6-Hexandiamin verwendeten. Dabei führte ein höheres  $\text{Fe}^{2+} \cdot (\text{Fe}^{3+})^{-1}$ -Verhältnis zu größeren Partikeldurchmessern [37].

Die Synthese der oxidativen Hydrolyse basiert auf der Oxidation von bivalenten Eisensalzen im alkalischen Medium [61]. Zur Oxidation können Luftsauerstoff oder Oxidationsmittel wie z.B. Nitrate verwendet werden [75]. Die Synthese ist in den folgenden Gleichungen dargestellt:



Die Synthese von Magnetit mit bivalentem Eisensalz als Ausgangsstoff zeigt, dass Magnetit ein Resultat der Dehydrationsreaktion von Eisen(II)hydroxid und Eisen(III)oxidhydroxid ist (vgl. Gleichung 2.5), wobei die letztere Komponente aus der partiellen Oxidation von Eisen(II)hydroxid (vgl. Gleichung 2.4) entsteht. Das Eisen(II)hydroxid wird in der alkalischen Reaktion des bivalenten Eisenions gebildet (vgl. Gleichung 2.3). Aufgrund des unterschiedlichen Syntheseweges wird erwartet, dass die Hydroxidpartikel, die während der Hydrolysereaktion gebildet (vgl. Gleichung 2.4) werden, anwach-

sen, was zu einem größeren mittleren Partikeldurchmesser bei der Dehydrierung (vgl. Gleichung 2.5) führt, als bei der Kopräzipitationsmethode. Der mittlere Partikeldurchmesser liegt ca. bei 37 nm und basiert auf den unterschiedlichen Reaktionsmechanismen der beiden alkalischen Methoden [37, 89]. Im Vergleich zur Kopräzipitationsmethode ist die Kristallinität von oxidativ hergestelltem Magnetit besser. Dies lässt auf eine unvollständige Kristallausbildung in der Kopräzipitation schließen, was auch zu einer Verringerung der magnetischen Sättigung bei sphärischen verglichen mit kubischen Partikeln führt. Eine zu lange Ostwaldsche Reifung bei der Herstellung in wässriger Phase führt zu einer größeren Partikelverteilung [89].

### 2.3.3 Oberflächencharakteristika

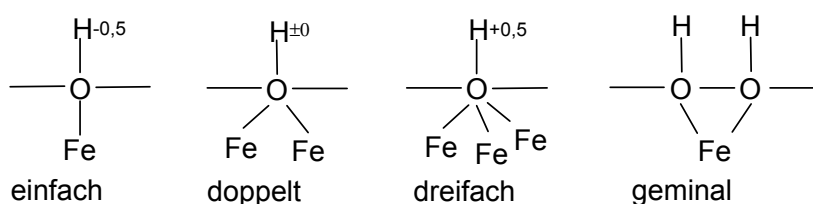
Die Beschaffenheit der Oberfläche ist nicht nur bedeutend für die magnetischen Eigenschaften, sondern legt auch die Dispergierbarkeit in unterschiedlichen Medien fest [80]. Weiterhin entscheidet sie über Korrosions- und Katalyseprozesse. Die Wechselwirkungen an der fest/flüssig Grenzfläche sind fundamental in vielen Anwendungsbereichen wie z.B. Mineralaufbereitung und Abwasserreinigung [65, 90]. Schwierig ist allerdings die eindeutige experimentelle Bestimmung der Oberflächengeometrie sowie -stöchiometrie [63].

Die Magnetitoberfläche ist nicht glatt, sondern hat eine Rauigkeit von ca. 0,4 nm [91] und verfügt über eine polare Ebene in der  $\langle 001 \rangle$ -Richtung [41]. Weiterhin gibt es drei Hauptwachstumsebenen  $\langle 111 \rangle$ ,  $\langle 110 \rangle$ , und  $\langle 001 \rangle$ , wobei die Ebenen  $\langle 111 \rangle$  und  $\langle 110 \rangle$  dominieren [63] und die höchste Belegungsdichte von Ionen haben [70]. Die  $\langle 111 \rangle$ -Ebene ist zudem eine dominante Bruchoberfläche des Materials [92]. Die kubische Anisotropie hat die Ausrichtungen  $\langle 111 \rangle$  und  $\langle 100 \rangle$ , die die leichte und harte Achse der Magnetisierungen bilden [60]. Weiterhin haben Subago und Sueoka festgestellt, dass die Eisenionen in der  $\langle 001 \rangle$ -Ebene unterschiedliche Ladungszustände besitzen [41]. Die Magnetitoberfläche hat mehrere mögliche Abschlüsse, die auf verschiedene Segmentabschnitte im Kristall (vgl. Abb. 2.2) zurückzuführen sind [64, 92]. Die Teilschicht, die aus den trivalenten Eisenkationen besteht (vgl. Kapitel 2.3.1), wird A-Schicht genannt, wogegen die anderen Teilschichten, die aus den bi- und trivalenten Eisenkationen sowie den Sauerstoffanionen bestehen als B-Schichten bezeichnet werden [90]. Diese verschiedenen Abschlüsse sind mit unterschiedlichen Reaktivitäten verknüpft und hängen sehr von der elementaren Zusammensetzung der begrenzenden Oberflächenschicht ab [92, 93]. Berechnungen haben z.B. gezeigt, dass eine B-abschließende Oberfläche eine geringere Oberflächenenergie besitzt als die A-abschließende [41]. Im Vakuum wird eine metallabschließende Oberfläche erwartet, da sie stabiler und resistenter im Vergleich zu einer sauerstoffabschließenden Oberfläche ist. Im Gegensatz dazu wird in wässriger Medium angenommen, dass die sauerstoffabschließenden Oberflächen aufgrund des Auffüllens der Sauerstoffgitterplätze durch eine Reaktion mit adsorbierten Wassermolekülen stabiler sind [64].

Oberflächen sind nicht von statischer Natur [94] und ihre Atome haben im Vergleich zu Kernatomen eine andere Bindungskoordination. Fehlende Bindungspartner (z.B. im Vakuum) können zu höheren Energiezuständen durch ungesättigte Bindungen führen, was in einer neuorientierten oder entspannten Oberfläche resultieren kann, da sie be-

strebt ist ihre Oberflächenenergie zu minimieren [95]. Ein Oberflächenabschluss wie im Kristallgitter würde aufgrund fehlender Bindungspartner in einer unterkoordinierten, polaren Oberfläche resultieren. Es wird angenommen, dass solche polaren Oberflächen im Vakuum durch Bindungen von freien Atompaaaren oder durch eine stark ins Kristallgitter gerichtete Relaxation stabilisiert werden. Dies kann aber zu einer Änderung der Elektronendichte an der Oberfläche führen, wogegen im wässrigen Medium die freien Oberflächenbindungsstellen durch die Protonierung und Hydroxylierung abgesättigt werden, was zu einer stabilen, neutralen oder geladenen Oberfläche führt [64].

Die Wechselwirkung an der Wasser-Substratgrenzschicht ist bei Übergangsmetalloxiden ein dynamischer und komplexer Prozess [64] und freiliegende Sauerstoff- und Eisenatome können  $OH^-$ - und  $H^+$ -Ionen adsorbieren [28]. Die Eisenoberflächenatome reagieren wie Lewis Säuren und adsorbieren Wassermoleküle oder Hydroxylionen, weshalb angenommen wird, dass die oktaedrischen Eisenionen die wesentlichen funktionellen Gruppen der Magnetitoberfläche und verantwortlich für die Oberflächenaktivität sind [64]. Die sogenannte Hydroxylierung ist eine schnellablaufende Reaktion. Daraus oder aus strukturellen Bedingungen entstehen Oberflächenhydroxylgruppen, welche als funktionelle Gruppen der Eisenoxide fungieren und auch als Säure und Base reagieren können. Deshalb wird bei Magnetit von einem amphoterischen Material gesprochen. Diese Hydroxylgruppen können unterschiedlich an den unterliegenden Eisenatomen koordiniert und entweder an ein, zwei oder drei Eisenatomen gebunden sein (vgl. Abb. 2.3). Sie verfügen je nach Bindungen über unterschiedliche Ladungen. Nimmt man eine Ladung von  $+0,5$  für jede Fe-O-Bindung an und geht von einer sechsfachen Koordination aus, so liegen die Ladungen der unterschiedlichen Arten bei einer Ladung von  $+0,5$ ,  $0$  und  $-0,5$ . Eine vierte Anordnung, bei der zwei Hydroxylgruppen an einem Eisenatom binden, wird als geminale Gruppe bezeichnet. Dabei soll hauptsächlich eine einfache Koordination ausgebildet werden, da die zwei- und dreifache Koordination im Vergleich inaktiver ist [14, 96].

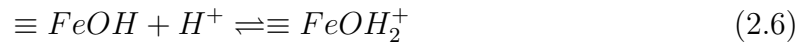


**Abbildung 2.3:** Koordinierung von Hydroxylgruppen an Eisenoxidoberflächen, aus dem Englischen [14].

Die Hydroxylgruppen bilden in der Wasser-Substratgrenzschicht die oberflächennahste Schicht (vgl. Abb. 2.4), sind direkt an den Oberflächeneisenatomen koordiniert und weisen einen Oberflächenkomplex mit kovalentem Verhalten auf [94, 95, 97]. Die Dichte der Hydroxylgruppen auf der Oberfläche hängt von der Entwicklung der Kristallstruktur ab und ist je nach Probe sehr unterschiedlich. Bei Magnetit beträgt sie ca.  $5 - 10$  Gruppen  $\cdot \text{nm}^{-2}$  [14, 34]. Laut Kundu et al. platzieren sich Wassermoleküle im Abstand von  $0,24 \text{ nm}$  zwischen Oberflächensauerstoffatomen und den niedrig koordinierten Kationen an der Magnetitoberfläche. Die Adsorptionsenergie von  $OH^-$ -Ionen ist negativer als von Wassermolekülen, so dass sie daher eher mit  $OH^-$ -Ionen reagieren. Insgesamt zeigt die Hydroxylierung eine hohe negative Reaktionsenergie, weshalb

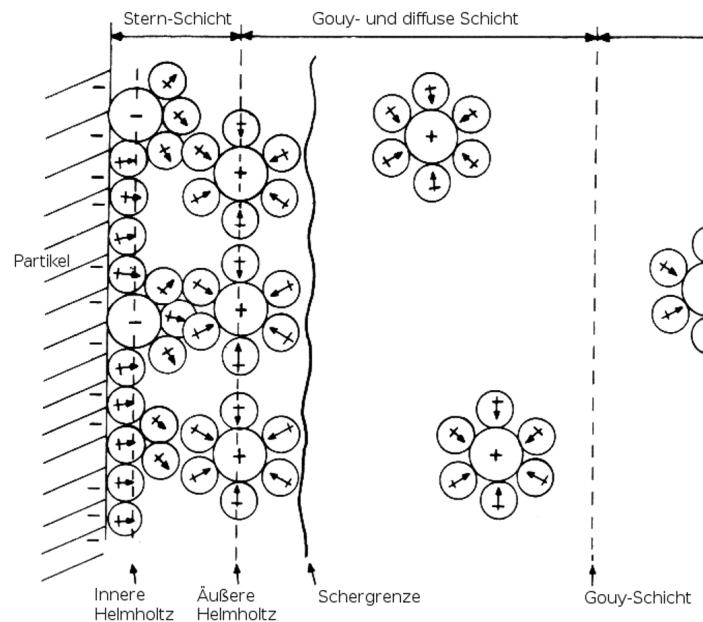
Magnetitoberflächen nur in hydroxylierter Form in der Natur vorkommen können [63].

An den  $\equiv Fe - OH$ -Stellen auf der Oberfläche laufen Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen ab, welche in den Gleichungen 2.6 und 2.7 dargestellt sind [34, 84, 98]. Dieses Säure-Base-Verhalten von Magnetit verursacht eine geladene Oberfläche, welche als Nernst-Potential  $\Psi$  bezeichnet wird [14, 72]. Weiterhin besitzt Magnetit  $pK_s$ -Werte von 4,4 ( $pK_1$ ) und 9,0 ( $pK_2$ ) [65].



Die Oberflächenladung beeinflusst die dreidimensionale Anordnung der Ionen im umgebenden Medium und es kommt zu An- bzw. Abstoßungskräften zwischen den Ionen und der Oberfläche je nach deren Ladungszuständen, was in Verbindung mit thermischen Effekten zur Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht an der Partikelgrenzschicht führt (vgl. Abb. 2.4), die aus der Oberflächenladung, den neutralisierenden Gegenionen und den weiter entfernt angelagerten Co-Ionen des Mediums besteht [99]. Der Aufbau der Ionenwolke (vgl. Abb. 2.4) wurde erstmals 1924 von Stern beschrieben. Die oberflächennahste Schicht besteht aus monoschichtfixierten, nicht hydratisierten Ionen und wird innere Helmholtzschicht genannt. Die sich anschließende Monoschicht besteht im Gegensatz zur inneren Schicht aus hydratisierten Ionen, welche aufgrund von van-der-Waals und elektrostatischen Kräften fest fixiert ist und auch als äußere Helmholtzschicht bezeichnet wird. Die beiden oberflächennahsten Schichten ergeben zusammen die Stern-Schicht. Aufgrund der Tatsache, dass die Ionen der äußeren Helmholtzschicht eine Hydrathülle tragen, ist die Oberflächenladung nicht kompensiert, da der Platzbedarf der hydratisierten Ionen größer ist als die der dehydratisierten Ionen und somit kein Ladungsausgleich stattfindet. Deshalb ist eine weitere Schicht nötig, die sogenannte diffuse Schicht oder auch Gouy-Schicht. Sie enthält bewegliche, hydratisierte positiv wie negativ geladene Gegenionen, die den Ladungsausgleich gegenüber der Partikeloberfläche bewirken [94, 96, 97].

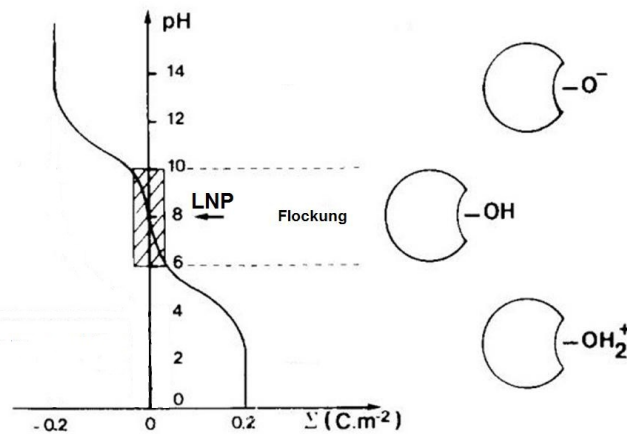
Die Basisstruktur der elektrochemischen Doppelschicht wird durch unterschiedliche Elektrolyte beeinflusst. Hiemstra et al. haben gezeigt, dass es sogenannte „strukturbildende“ ( $Li^+$  und  $Na^+$ ) und „strukturbrechende“ Ionen ( $Cs^+$ ) gibt, die die Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht beeinflussen [96]. Weiterhin hat die Elektrolytkonzentration auch einen ausgeprägten Effekt auf die Dicke der diffusen Schicht, da diese mit steigender Elektrolytkonzentration komprimiert (vgl. Kapitel 3.2.1) [14, 65, 97, 100].



**Abbildung 2.4:** Aufbau der elektrochemischen Doppelschicht an einer Fest-Flüssig-Grenzfläche, aus dem Englischen [99].

Problematisch bei Nanopartikel ist, dass sie zur Agglomeration und/oder Aggregation neigen, da sie bestrebt sind ihre Oberflächenenergie zu reduzieren [101]. Einhergehend mit der Agglomeration ist, dass die Partikel ihre charakteristischen Eigenschaften verlieren und dann als größere Feststoffpartikel ausfallen [1]. Falls die Oberflächenwechselwirkungen erfolgreich kontrolliert werden, kann dieses vermieden werden [11, 102]. Bei magnetischen Nanopartikeln handelt es sich um kolloide Dispersionen, die den üblichen interpartikulären Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Anziehung, elektrostatischen Wechselwirkungen wie beispielsweise elektrochemische Doppelschichten sowie sterische Wechselwirkungen unterliegen [72, 99, 102]. Eine zusätzliche Besonderheit sind die dipolaren magnetischen Wechselwirkungen, die bei dem Gesamtpotential der interpartikulären Wechselwirkungen berücksichtigt werden müssen, wenn es sich um große magnetische Momente (ab Partikelgrößen von ca. 12 nm) oder hohe Kolloidkonzentrationen handelt. Bei einem angelegten Magnetfeld wechselwirken die magnetischen Dipole [72, 88]. Weitere Wechselwirkungen können durch die Adsorption von Polymeren, Dispergiermitteln und anderen Molekülen generiert werden [102]. Die Gesamtenergie der Wechselwirkungen bestimmt die Suspensionsstabilität, welche durch die DLVO-Theorie (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) beschrieben wird und sich aus der Abstoßungs- und Anziehungskraft zusammensetzt. Dabei ist die Abstoßungskraft abhängig von der elektrochemischen Doppelschicht während die Anziehungskraft eher durch van-der-Waals-Kräfte dominiert wird [14]. Die beiden wichtigsten Einflussfaktoren auf die physikalische Stabilität von Suspensionen sind die Dicke der diffusen Schicht sowie die Oberflächenladungsdichte. Daraus lässt sich eine allgemeingültige Regel für die Stabilität von Dispersionen schlussfolgern: Je höher die Oberflächenladungsdichte bzw. das damit verbundene Zetapotential, desto höher ist die Stabilität der Suspension. Das Zetapotential ist direkt von dem Nernst-Potential  $\psi$  der Oberfläche abhängig und stellt somit ein indirektes Maß für die Oberflächenladungsdichte dar. Es wird verwendet um Ladungsänderungen festzustellen und die Suspensionsstabilität abzuschätzen [97].

In Abbildung 2.5 ist das Zetapotential in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgetragen. Zu erkennen ist, dass das Zetapotential im sauren Medium positiv ist, was auf die dominierende Oberflächengruppe  $\equiv Fe - OH_2^+$  zurückzuführen ist. Mit steigendem pH-Wert nimmt das Zetapotential ab, bis es den isoelektrischen Punkt (IEP) erreicht, an dem das Zetapotential gleich null ist und die Oberflächengruppen  $\equiv Fe - OH$  vorherrschen. Nach Überschreiten des IEP mit steigendem pH-Wert wird das Zetapotential negativ, was durch die Oberflächengruppen  $\equiv Fe - O^-$  hervorgerufen wird [65]. Die Werte des experimentell bestimmten IEPs von Magnetit liegen im neutralen Bereich und variieren zwischen pH 6-8 [14, 65, 84, 100, 103]. Hieraus wird ersichtlich, dass die Magnetitnanopartikelsuspension in Bereichen von sehr niedrigen und hohen pH-Werten stabiler ist, da sie über eine betragsmäßig hohe Oberflächenladung verfügen und somit die elektrostatische Abstoßung die Partikelsuspension stabilisiert, wogegen die Oberflächenladung nahe dem IEP und somit im neutralen pH-Bereich nahezu null ist und damit es zu einer vermehrten Koagulation kommt [13, 47, 84, 86, 88, 101].



**Abbildung 2.5:** Suspensionsstabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes eines ionischen Ferrofluids, LNP: Ladungsnullpunkt, aus dem Englischen und modifiziert nach [88].

Weiterer Einflussfaktor ist unter anderem die Partikelgröße, da mit abnehmendem Durchmesser die spezifische Oberfläche zunimmt und damit die Haft- gegenüber den Massenkräften in den Vordergrund treten, womit auch die Neigung zur Agglomeration und Wandhaftung wächst. Zusätzlich steigt die Festigkeit der Agglomerate, da die Oberflächenenergie bei kleineren Partikeln größer ist und so zu einer Destabilisierung des Suspensionssystems führt [11, 101, 104, 105, 106]. Des Weiteren ist die Partikelkonzentration in der Suspension entscheidend für ihre Stabilität, da interpartikuläre Wechselwirkungen aufgrund häufigerer Partikelkollisionen zunehmen [101]. Die superparamagnetische Eigenschaft trägt zur Verringerung der Agglomeration bei [59]. Man spricht von einer physikalisch stabilen Suspension, wenn ein System aus einer flüssigen und einer festen Phase besteht, die der Brownschen Molekularbewegung unterliegen und sich die Partikelgrößenverteilung der festen Phase innerhalb einer bestimmten Zeitperiode nicht oder nur geringfügig verändert. Um diesen Zustand zu bewahren müssen Partikel vor der Agglomeration geschützt werden [24, 97].

### 2.3.4 Magnetische Eigenschaften von Ein- und Mehrdomänenpartikel

Der makroskopische Magnetit gehört zu den Ferromagnetika und verfügt über ein ferromagnetisches Verhalten, welches ein als Sättigungsmoment  $\vec{M}$  bezeichnetes spontanes magnetisches Moment auch in Abwesenheit eines Magnetfeldes aufweist. Es resultiert aus der Elektronenspinanordnung (vgl. Abb. 2.6), die wiederum abhängig von der Kristallstruktur ist (vgl. Kapitel 2.3). Bei einem ferrimagnetischen Verhalten sind die Spins bei der Sättigungsmagnetisierung bei  $T = -273^\circ\text{C}$  gegensätzlich ausgerichtet (vgl. Abb. 2.6), was zu einer Verringerung des Nettomoments durch Auslöschung führt [26]. Das theoretische Moment für die Formeleinheit  $(\text{Fe}^{3+})_{T_d}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})_{O_h}O_4$  beträgt  $4\mu_B$  [45] und ist allein auf die  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zurückzuführen. Der beobachtete Wert beträgt  $4,1\mu_B$ , wobei das nicht ganzzahlige Vielfache des Bohrschen Magneton  $\mu_B$  mehrere Ursachen hat, wie z.B. die Spinbahnwechselwirkung [26]. Daraus wird ersichtlich, wie wichtig die Ionenkonfiguration und die damit verbundene Kristallstruktur eines ferromagnetischen Materials in Hinblick auf die magnetischen Eigenschaften ist [107].

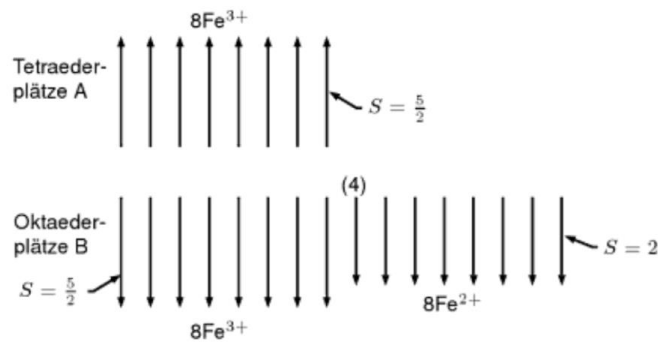
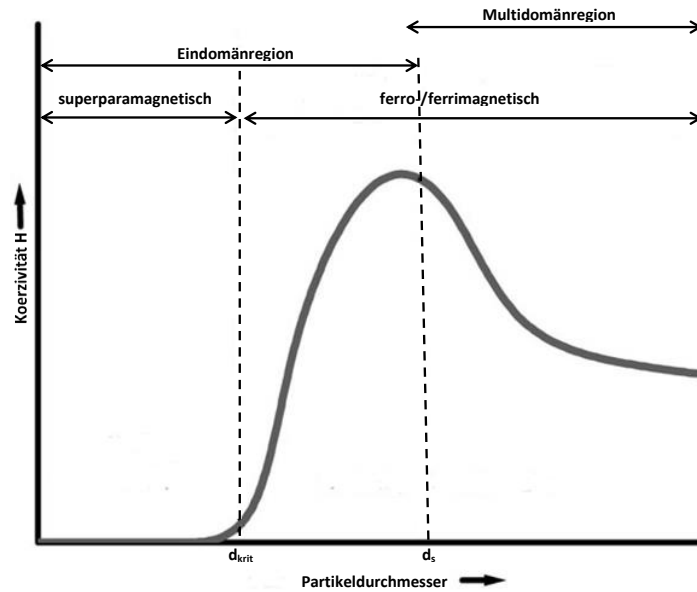


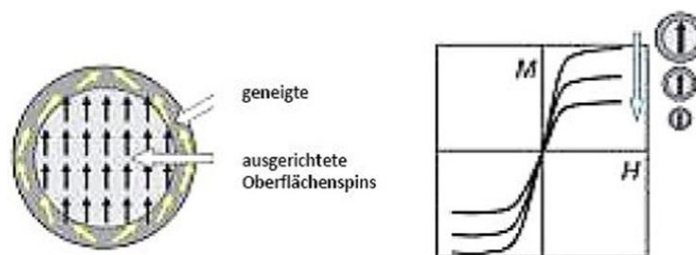
Abbildung 2.6: Spinanordnung des Magnetits [26].

Durch die Partikelverkleinerung unterhalb eines kritischen Partikeldurchmessers  $d_s$  werden bei ferromagnetischen Materialien die magnetischen Domänen, die durch Domänengrenzen, sogenannte Blochwände, voneinander abgegrenzt sind, aufgelöst, so dass nur noch eine einzige Domäne existiert. Die Triebkraft dieses Vorgangs ist das Gleichgewicht zwischen der magnetostatischen Energie  $E_{MS}$ , die proportional zum steigenden Volumen zunimmt, und der Blochwandenergie  $E_{dw}$ , welche proportional zur Fläche zwischen den Domänen ansteigt. Wenn das Probenvolumen auf das kritische Volumen abfällt, wird mehr Energie zur Bildung einer Blochwand benötigt als die magnetostatische Energie im Eindomänenzustand aufrecht zu erhalten. Das magnetische Moment  $\vec{M}$  dieser Eindomänenpartikel entspricht der Summe aller unkompensierten Spins. Wenn bei Eindomänenpartikeln das magnetische Moment durch thermische Anregung relaxiert, spricht man von einem superparamagnetischen Verhalten. Dies tritt meistens bei ferromagnetischen Materialien in der Größenordnung von  $10 - 20\text{ nm}$  [9, 11] auf, was bedeutet, dass sie im Gegensatz zu Multidomänenpartikeln nicht über ein permanentes magnetisches sondern ein fluktuierendes Moment verfügen. Die Größenordnung ist materialabhängig.



**Abbildung 2.7:** Prinzipieller Verlauf der Koerzitivität ( $H$ ) in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers ( $d$ ), modifiziert nach [9, 108].

Abbildung 2.7 zeigt, dass die Koerzitivität  $H$  mit sinkendem Durchmesser zunimmt, bis sie den kritischen Partikeldurchmesser  $d_s$  erreicht hat. Danach fällt die Koerzitivität bei Eindomänenteilchen mit sinkendem Durchmesser ab, bis sie den Wert null erreicht. An diesem Punkt weisen die Partikel ein superparamagnetisches Verhalten auf, welches durch den kritischen Partikeldurchmesser  $d_{krit}$  gekennzeichnet ist [9, 50]. Zusätzlich zur Koerzitivität ist die Remanenz  $M_R$  und die Hysterese auch gleich null [11, 31, 108]. Dadurch ist kein zusätzliches Feld nötig um die Teilchen komplett zu entmagnetisieren. Weiterhin ist der Superparamagnetismus nicht nur partikelgrößen- sondern auch temperaturabhängig. Die kritischen Werte der Temperatur  $T_{krit}$  oder des Partikeldurchmessers  $d_{krit}$  lassen sich unter der Annahme des thermischen Gleichgewicht bestimmen (vgl. Kapitel 3.3) [9, 11, 108].



**Abbildung 2.8:** Effekte von Oberflächenspins bei Nanopartikeln und deren Auswirkung auf die Magnetisierung, aus dem Englischen [45].

Laut Sato et al. fällt die magnetische Sättigung stufenweise mit abnehmender Partikelgröße, was auf verschiedene Oberflächeneffekte (vgl. Abb. 2.8) zurückzuführen ist. Zum einen kann es zur Existenz magnetisch inaktiver Schichten an der Partikeloberfläche kommen [29, 109]. Zum anderen kann die Anwesenheit geneigter Spins (vgl. Abb. 2.8) oder das Vorhandensein eines glasähnlichen Verhaltens der Spins dazu beitragen. Diese Oberflächeneffekte dominieren mit abnehmendem Partikeldurchmesser, was zur

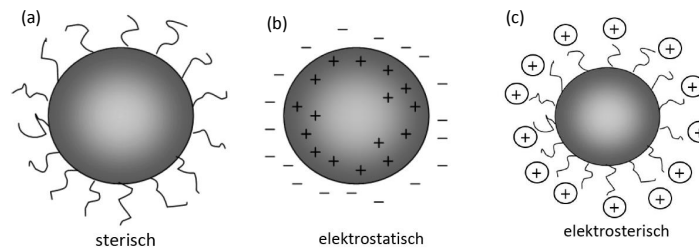
Verringerung der magnetischen Sättigung führt [11, 45]. Die Spinanordnung innerhalb des Partikels hat ebenfalls einen Einfluss auf die magnetische Sättigung [25] und liegt bei ultrafeinen Magnetitpartikeln bei  $30 - 60 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$ . Im Vergleich dazu besitzt der makroskalige Magnetit einen Wert von  $92 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$  [109].

## 2.4 Oberflächenbeschichtungen und Stabilisierungen

Die synthetisierten, magnetischen Nanopartikel müssen meistens oberflächenmodifiziert werden [21], um Agglomeration und Aggregation der unbedeckten Nanopartikel zu vermeiden und somit größenabhängige Eigenschaften und Stabilität aufrechtzuerhalten [9, 77]. Die Stabilität von magnetischen Fluiden ist nahezu in jeder Anwendung erforderlich [11]. Generell führen mehrschichtige oder dickere Beschichtungen zu einer besseren Stabilität [34, 84]. Damit sind jedoch niedrigere magnetische Momente und schlechtere Abstimmbarkeit auf die Applikation verbunden [35]. Unbedeckte magnetische Nanopartikel können zur Oxidation neigen, was oft mit Magnetverlust einhergeht, weshalb eine Schutzschicht für die chemische Stabilität wesentlich ist [11, 21]. In diesem Zusammenhang spricht man auch von „Partikel-Engineering“ [9]. Beschichtungen fungieren nicht nur als Schutzschicht der magnetischen Nanopartikel gegenüber der Umwelt gegen Degradierungen, unerwünschte Reaktionen der Partikeloberfläche mit anderen Substanzen und Agglomerationen, sondern können auch für Funktionalisierungen mit spezifischen Komponenten verwendet werden. Im Falle einer Enzymanbindung an die Partikeloberfläche wird durch die Funktionalisierung eine Direktanbindung der Enzyme an der Partikeloberfläche vermieden und somit unerwünschte Nebeneffekte wie Strukturveränderungen z.B. durch unspezifische Mehrfachanbindung oder sterische Behinderungen minimiert [11, 21, 50, 110]. Jin et al. zeigten, dass direkte Immobilisierung von Enzymen an unbehandelten Nanopartikeln zu einer sehr niedrigen Aktivität führte, was auf die Abwesenheit funktioneller Gruppen, wie z.B. der Aminogruppe, zurückzuführen ist [111].

Um Nanopartikel vor Agglomeration zu schützen, müssen die Kräfteverhältnisse der interpartikulären Wechselwirkungen verschoben werden (vgl. Kapitel 2.3.3) [84, 102]. Dafür stehen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung: zum einen die Erhöhung der Abstoßungskräfte mittels elektrostatischer Stabilisierung (vgl. Abb.2.9 (a)), zum anderen die Abschirmung der Anziehungskräfte durch sterische Stabilisierung (vgl. Abb. 2.9 (b)). Eine Kombination elektrostatischer und sterischer Stabilisierung ist ebenso möglich (vgl. Abb. 2.9 (c)) [11, 34, 84]. Das Prinzip der sterischen Stabilisierung (vgl. Abb. 2.9 (a)) basiert auf der Sorption und Bindung von Molekülen an der Partikeloberfläche. Die adsorbierten langkettigen Moleküle bilden somit eine Schutzschicht, welche aufgrund des Platzbedarfs eine Annäherung der Partikel verhindert [1, 24]. Diese Stabilisierungsmethode ist unabhängig von der Ionenkonzentration und der Oberflächenladung des Trägers. Die verwendeten Substanzen sind oft Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) und Dextrane, wobei es bei abnehmender Partikelgröße zu einer Erhöhung des Volumenverhältnisses von Polymer zu Partikel kommt. Deshalb werden auch kurzkettigere Karbonsäuren für die Stabilisierung verwendet. Die sterischen Repulsionskräfte sind abhängig von der molekularen Struktur, der Kettenlänge sowie der adsorbierten Menge auf dem Nanoträger [13, 24, 48, 102, 112]. Weiterhin sind laut Shylesh et al. mindestens sechs Kohlenstoffatome nötig um eine ausreichende sterische Stabilisierung

zu gewährleisten [9].



**Abbildung 2.9:** Methoden zur Stabilisierung von Partikeln, modifiziert nach [24].

Eine elektrostatische Stabilisierung (vgl. Abb.2.9 (b)) wird durch Sorption spezifischer Ionen auf der Partikeloberfläche, einer Änderung der Ionenkonzentration des Suspensionsmediums oder durch einer Verschiebung des pH-Wertes der Lösung realisiert. Das Grundprinzip der elektrostatischen Stabilisierung beruht auf der Entstehung von Ladungen auf der Partikeloberfläche und der damit verbundenen Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht (vgl. Kapitel 2.3.3), die für die abstoßenden Coulombschen Kräfte zwischen gleichgeladenen Partikeln sorgt [1, 24, 113]. Dabei spielt die Überlagerung der diffusen Schichten der Partikel eine bedeutende Rolle. Wenn sie sich aufgrund von Diffusion annähern und sich überlappen, bilden sie eine abstoßende elektrostatische Kraft aus, die mit zunehmendem Kontakt anwächst, bis sie im Gleichgewicht mit der kinetischen Energie der Partikel steht. Eine weitere Annäherung wird unterbunden und die Partikel sind stabilisiert [97, 114].

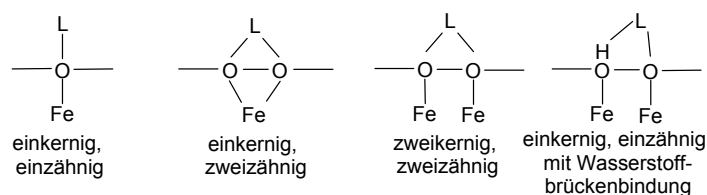
Die elektrosterische Stabilisierung (vgl. Abb. 2.9 (c)) ist eine Kombination aus der sterischen und elektrostatischen Stabilisierungsmethode. Dabei werden geladene Moleküle auf der Partikeloberfläche adsorbiert, was zu einer räumlichen (sterischen) sowie elektrostatischen Abschirmung führt. Dabei werden die Vorteile beider Methoden vereint, so dass eine Verschiebung des IEP möglich ist [1, 24].

Durch die Stabilisierungsmöglichkeiten kann eine angemessene Phasengrenzschicht für das gegebene Lösungsmittel kreiert werden. Durch Oberflächenmodifizierung kann der IEP verschoben und dadurch die Suspensionsstabilität im neutralen Bereich erreicht werden (vgl. Kapitel 2.3.3), was für viele Anwendungen unumgänglich ist [88].

### 2.4.1 Oberflächenanbindungen

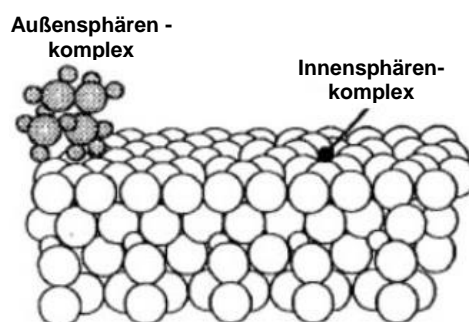
Die Oberflächenaktivität des Magnetits ist abhängig von der Koordinationschemie, der Grenzfläche und den darin enthaltenen Sauerstoff- und Eisenatomen und den ausgebildeten Hydroxylgruppen (vgl. Kapitel 2.3.3), welche für die Anbindungen verfügbar sind [24, 64]. So können Sauerstoffionen der Oberfläche Protonen aufnehmen oder abgeben, wogegen das Eisenatom als Lewis-Säure agiert und das Hydroxylion austauschen kann. So können sich Liganden an der Magnetitoberfläche einkernig-einzählig, einkernig-zweizählig (Chelatbindung) und zweikernig-zweizählig koordinieren (vgl. Abb. 2.10). Die Adsorption wird hauptsächlich vom pH-Wert bestimmt und findet meistens unterhalb des Ladungsnullpunktes statt. An dem Adsorptionsprozess können auch Wasserstoffbrückenbindungen teilnehmen. Die meisten involvierten Vorgänge sind Ligandenaustausch, elektrostatische Effekte, Wasserstoffbrückenbindungen, Kationenaustausch

und hydrophobische Bindungen [14, 24, 95, 96]. Durch die Adsorption von Liganden kann es zu einer Umstrukturierung der Oberfläche und somit Einflussnahme auf die Oberflächeneigenschaften bis hin zu den unterliegenden Schichten kommen [94].



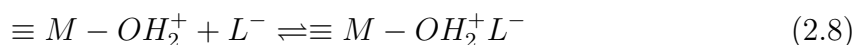
**Abbildung 2.10:** Modell der Ligandenkoordination an der Magnetitoberfläche. Fe repräsentiert die Eisenseite an der Oxidoberfläche und L ist der absorbierende Ligand, modifiziert nach [95].

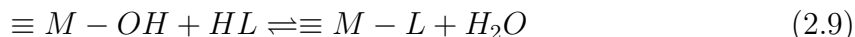
Die Adsorption wird aufgeteilt in Chemi- und Physisorption. Dabei ist die letztere für eine permanente Beschichtung eher ungeeignet, da die Moleküle zu Desorption neigen und die Bindungsenergie sehr gering ist [103]. Dagegen weist die Chemisorption eine stärkere Bindung auf und es werden Adsorbens und Adsorbat chemisch verändert. Sie basieren auf ungesättigten, koordinativen Atomen auf der Oberfläche die freie Valenzen besitzen und somit strukturfremde Atome oder Ionen relativ fest binden können [24]. Die Adsorption von organischen Liganden wurde anhand der Beispiele Oxalat, Citrat und Salicylat untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Ligand z.B. aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen einen schwächeren „Außensphärenkomplex“ bildet, der in Abbildung 2.11 zu sehen ist.



**Abbildung 2.11:** Komplexbildungsmöglichkeiten auf der Oberfläche, aus dem Englischen [115].

Der „Außensphärenkomplex“ ist schwach mit der Oberfläche verknüpft und es befinden sich Lösungsmittel- oder Wassermoleküle zwischen dem Liganden und der Oberfläche. Dagegen bilden einige Liganden „Innensphärenkomplexe“, die direkt an die Oberfläche anbinden. Für sie sind z.B. anorganische Ionen wie Sulfate, Phosphate und Arsenate und der zweizähnige Ligand Oxalat bekannt. Die „äußersphärische“ (vgl. Gleichung 2.8) und „innensphärische“ (vgl. Gleichung 2.9) Adsorption kann mit den folgenden Gleichungen beschrieben werden [95, 115, 116]. Die Art der Adsorption kann nicht einfach anhand der Reaktionsstöchiometrie vorhergesagt werden, sondern hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, wie Form der Moleküle, Position der funktionellen Gruppen, Lage zu anderen funktionellen Gruppen, Polarität etc. [95].





Gu et al. haben Adsorptionsprozesse von natürlich organischer Materie an einer Eisenoxidoberfläche (Hämatit) durchgeführt und berichten, dass zum einen die Adsorptionsplätze begrenzt verfügbar sind und zum anderen der Adsorptionsmechanismus von Oberflächenkomplexierung-Ligandenaustausch dominiert wurde. Die Ergebnisse deuten weiter darauf hin, dass funktionelle Carboxyl- und Hydroxylgruppen der natürlichen organischen Materie aktiv in den Reaktionen involviert sind und ihre sterische Anordnung eine wichtige Rolle bei der Adsorption spielt. Desorptionsstudien haben weiterhin gezeigt, dass organische natürliche Materie stark an den Eisenoxidoberflächen gebunden haben und es zu einer ausgeprägten Hysterese bei den Adsorptions- und Desorptionsprozessen kam, was auf eine mehrfache Anbindung der Makromoleküle auf der Eisenoxidoberfläche hindeutet, da nicht alle Verbindungen wieder gelöst wurden [117].

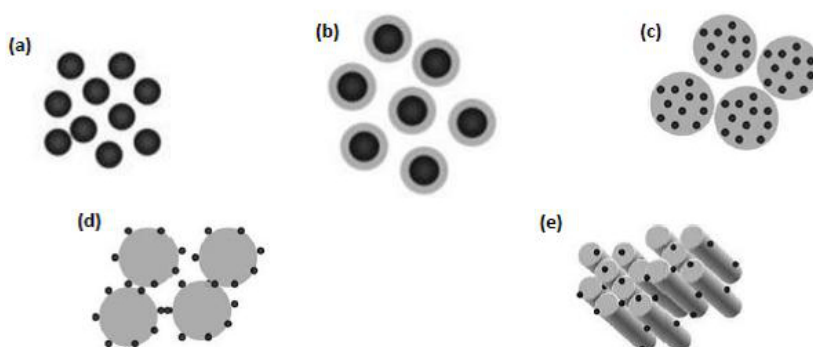
### 2.4.2 Beschichtungsmöglichkeiten

Feststoffoberflächen können mit verschiedenen Behandlungsweisen modifiziert werden. Zu ihnen gehören, abhängig vom Verwendungszweck, z.B. die Adsorption, Dünnschichtbeschichtung, chemische Reaktionen und das Entfernen von Material [84, 103]. Die meisten dieser Methoden dienen dem Partikelschutz und der Partikelstabilität. Es werden sowohl organische (Tenside, Polymere) als auch anorganische Materialien (Kieselsäure, Edelmetalle) dafür verwendet [11]. Die Beschichtungen können während der Synthese in sogenannten in-situ- oder Eintopfreaktionen durchgeführt werden, wobei die Beschichtungssubstanzen Einfluss auf die Synthese nehmen. Eine Alternative stellt die sich an die Herstellung anschließende Beschichtung (post-Synthese-Methode) dar [74, 118]. Zusätzlich zu den verschiedenen Beschichtungsmöglichkeiten gibt es auch unterschiedliche Morphologien, die in Abbildung 2.12 gezeigt sind. Üblicherweise wird die in Abbildung 2.12 (b) dargestellte Kern-Hülle-Struktur verwendet. Dabei bildet z.B. Magnetit den magnetischen Kern, der als Anker für die Beschichtungssubstanzen und für die magnetische Abtrennung und das anschließende Recycling fungiert. Durch die Hüllenstruktur wird der magnetische Kern gegenüber der Umwelt isoliert [11, 50]. Eine andere Methode ist der Einbau der Magnetitpartikel in nicht magnetische Feststoffmatrizen. Dadurch wird die magnetische Abtrennung solcher Materialien ermöglicht. Es gibt es die Möglichkeit, die magnetischen Nanopartikel in einem porösen Festkörper (vgl. Abb. 2.12 (f)) zu dispergieren oder die Einbettung in Matrizen (vgl. Abb. 2.12 (c)). Dadurch sind die Partikel allerdings in einem bestimmten Raum fixiert, was in einigen Anwendungen nicht wünschenswert ist [9, 11, 32, 42, 50, 119]. Weiterhin kann die Partikelagglomeration durch Anbindung an feste Träger (vgl. Abb. 2.12 (d)) vermieden werden. Diese können z.B. Lehmlamellen, Polymer- oder Kieselgelkügelchen sein [9, 84].

Die üblichen Beschichtungssubstanzen sind Tenside und Polymere wie Polyethylenglykol (PEG), Polyethylenoxid (PEO), natürliche Polysäuren und Dextran [11, 34, 52, 84]. Nicht polymerische Beschichtungen wurden bisher weniger untersucht. Es gibt einige Untersuchungen zur Beschichtung mit Citratmonomeren [49]. Einige teurere, kommerzielle Ferrofluide sind verfügbar, die auf Beschichtungen mit Kieselsäure und Polymeren basieren. Die Kosten für eine einfache Oberflächenmodifikation betragen einige Hun-

derte bis hin zu einigen Tausenden Euro pro Gramm funktionalisierter Partikel [59]. Die Suspensionsstabilität ist üblicherweise nur in einem pH-Bereich unterhalb von fünf oder oberhalb von acht gegeben [11].

Im Nachfolgenden soll kurz auf die wichtigsten bisherigen Beschichtungen eingegangen werden, wobei eine Kombination der verschiedenen Materialien und Mehrfachbeschichtungen möglich ist [11].



**Abbildung 2.12:** Unterschiedliche Morphologien magnetischer Nanopartikel: (a) sphärische Nanopartikel, (b) Kern-Schale-Strukturen, (c) Matrixeinschlussverfahren, (d) Anbindungen an festen Träger, (e) Einbettung in mesoporösem Material, modifiziert nach [9].

### 2.4.2.1 Polymere

Die ersten magnetischen Polymerträger wurden in den 70er Jahren entwickelt [50]. Für die Herstellung dieser Träger haben sich zwei Verfahren etabliert [119]. Zum einen die direkte Polymerisation auf der Trägeroberfläche durch Einbringen der Trägerpartikel in den Polymerisationsprozess (in-situ-Prozess) und zum anderen die Adsorption der Polymere an den Trägerpartikeloberflächen (post-Synthese-Prozess). Es wurden eine Vielzahl verschiedener Polymere für die Stabilisierung von Nanopartikeln verwendet, denen gemein war, dass die stabilisierende Eigenschaft auf sterischer Repulsion (vgl. Kapitel 2.4) beruht. Zu diesen Polymeren gehören z.B. Polyvinylalkohol (PVA), Polypyrrol, Polyglycerinmonoacrylat, Polyester und ihre Copolymere. Die Polymere enthalten oft funktionelle Gruppen wie Carbonsäuren, Phosphate und Sulfate, die an der Magnetitoberfläche binden können. Die Temperaturbeständigkeit der Polymerhülle ist nur begrenzt, falls keine starke Verankerung zur Partikeloberfläche vorhanden ist. Des Weiteren schützen sie nur bedingt vor Oxidation des Trägermaterials und werden leicht mittels saurer Lösungen ausgewaschen. Die magnetischen Eigenschaften verringern sich im Vergleich zum Ausgangsmaterial ebenfalls [9, 11]. Ein weiterer Nachteil von Polymerpartikeln ist das vom pH-Wert abhängige Schwellverhalten. In den Versuchen von Petri-Fink et al. schollen die PVA beschichteten Partikel um fast das Dreifache ihrer Ausgangsgröße an. Weiterhin ist das Anschwellen der Partikel nicht nur vom pH-Wert sondern auch von dem Polymer/Eisen-Verhältnis  $r$  abhängig, wobei die Schwellrate  $dD \cdot (dr)^{-1}$  mit ansteigendem Polymer/Eisen-Verhältnis zunimmt. Der Grund für das Anschwellen kann durch eine Veränderung der Konformation der Polymerketten oder weitere Adsorptionen begründet sein [13].

Hu et al. haben das Anbindungsverhalten der synthetischen Polymere PEG und PVA untersucht. Dabei wurden Magnetitkristalle mittels thermischer Zersetzung (vgl. Ka-

pitel 2.3.2) unter gleichzeitiger Anbindung von monocarboxyl-terminierten Polyethylenglykol (MPEG-COOH) synthetisiert [80]. Es wurde eine kovalente Bindung zwischen der Funktionalisierungssubstanz und den Partikeln angenommen. Bei der in-situ-Magnetit-PVA-Synthese mit unterschiedlichen PVA-Konzentrationen wurde die Ausbildung kettenartiger Clusterausfällungen beobachtet [13, 69]. Weitere Untersuchungen mit PVA funktionalisierten Thiol-, Amino- und Carboxylgruppen zeigten, dass aminofunktionalisierte PVA-Partikel zytotoxisch auf menschlichem Melanomzellen wirken. PVA soll nicht spezifisch an der Oxidoberfläche adsorbieren, sondern die Wechselwirkungen basieren auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren funktionellen Gruppen des Polymers und der hydroxylierten und protonierten Oxidoberfläche. Zusätzlich bildet PVA oberhalb der kritischen Polymerkonzentration eine Hydrogelstruktur aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polymerketten aus, welche die Partikel umhüllt und verantwortlich für die sterische Stabilisierung ist [13]. Mit einer PVA-Beschichtung wurden ähnliche Eigenschaften erreicht wie durch Bakterien hergestellte Magnetosome [29]. Bei der Einbettung von Magnetitpartikeln in einer PVA-Matrix wurde eine inhomogene Verteilung der Magnetitagglomerate im Gel detektiert [120]. Eine Herstellung von Magnetitpartikel in Anwesenheit von Polyvinylphosphonsäure mittels Präzipitation wurde realisiert. Jedoch verfügten die Partikel über niedrigere magnetische Sättigungen und geringere Leitfähigkeiten [121].

Zur Magnetitbeschichtung wurden neben den synthetischen auch organische Polymere, sogenannte Biopolymere wie Alginat oder Dextran, herangezogen. Sie sind generell sensibler gegenüber Temperatur- und pH-Wertschwankungen [119]. Bei einer Beschichtung mit Alginat steigt, laut Xu et al., die adsorbierte Menge mit sinkendem pH-Wert. Sie nehmen an, dass die Anbindung auf Chemisorption beruht, welche von der Alginatmenge, dem Ionisierungsgrad und der Adsorptionskonfiguration abhängt und somit die elektrostatische und sterische Stabilisierung beeinflusst [122]. Für die Erzeugung von biokompatiblen Magnetpartikeln für den medizinischen in-vivo-Einsatz wurde Carboxymethyl-dextran als Beschichtungssubstanz verwendet. Die Beschichtung erfolgte in einem post-Synthese-Verfahren und es wurde ein Gehalt von 5-7% auf den Partikeln detektiert. Nach ca. zwei Wochen neigen die Partikel zu Agglomeration, was sich auf die Alterung der Beschichtung zurückführen lässt [123]. Dung et al. haben stärkeumhüllte superparamagnetische Nanopartikel mit einer Schichtdicke von 3 nm hergestellt. Aufgrund der starken magnetischen dipolaren Wechselwirkungen bildeten sich Partikelcluster aus, was zu einer steigenden Partikelgröße führte. Die Partikel besitzen eine niedrigere magnetische Sättigung als die unbeschichteten Partikel und die Anbindung soll auf Chemisorption an den Hydroxylgruppen der Magnetitoberfläche basieren [124]. Eine Dextranbeschichtung in einem in-situ-Verfahren agiert als Detergens während der Magnetitsynthese, da sie sich während des Wachstums an der Magnetitoberfläche ansammeln. Kronick und Gilpin haben weiterhin festgestellt, dass ein höheres Dextranmolekulargewicht zu einer stärkeren Bindung an der Magnetitoberfläche führt [125].

#### 2.4.2.2 Oberflächenaktive Stoffe

Eine weitere übliche Vorgehensweise zur Vorbeugung der Agglomeration ist die Verwendung ambiphiler Komponenten, den sogenannten Tensiden. Hierzu gehören langkettige Fettsäuren und Alkylamine. In einigen Synthesewegen, wie z.B. der thermischen Zersetzung und der Mikroemulsion (vgl. Kapitel 2.3.2), gehören sie zum festen Be-

standteil der Synthese, um die Größenverteilung durch Kontrolle der Keimbildung und des Keimwachstums zu steuern [9]. Bei der Beschichtung mit Tensiden wird die Ausbildung einer Mono- oder Doppelschicht auf der Partikeloberfläche erreicht, wobei in der ersten Schicht meistens chemische Bindungen involviert sind. Die zweite Hülle basiert häufig auf hydrophoben Wechselwirkungen. Die Oberflächenladung (vgl. Kapitel 2.3.3) wird vornehmlich durch die polare Kopfgruppe bestimmt [34]. Eine der häufig verwendeten oberflächenaktiven Substanzen bei der Magnetitsynthese ist die Ölsäure. Tomitaka et al. haben eine Ölsäurebeschichtung von Magnetitpartikel untersucht. Die dipolaren Wechselwirkungen wurden durch die Beschichtung erniedrigt, was zu kleineren Agglomeraten führte. Dagegen hatte die Koerzivität der Partikel einen Verlust bis zu 75 % [126]. Zhang et al. haben Partikelgrößen im Bereich von 8-18 nm mit Ölsäurebeschichtung hergestellt, dabei waren nur die Partikel mit einem Durchmesser von 8 nm nach der Beschichtung superparamagnetisch. Die Dicke ihrer Beschichtung betrug 4 nm [127]. Park et al. berichteten von einer Herstellung von monodispersen Nanopartikeln mit Hilfe von Ölsäure, bei der die Größenverteilung so eng war, dass eine anschließende Größenseparation nicht notwendig war. Zudem war dieser Herstellungsprozess gut reproduzierbar [71]. Die Ölsäure wird laut Guardia et al. höchstwahrscheinlich kovalent an den Partikel gebunden und gegenüber der Aussage von Tomitaka et al. erzielten sie eine magnetische Sättigung in der Größenordnung des makroskopischen Materials [36]. Laut Bacri et al. soll dagegen die Anbindung der Ölsäure eine Oberflächenkomplexierung mit den Metallen sein, welcher sich im alkalischen Milieu bildet [88]. Cuyper und Joniau verwendeten anstelle von Ölsäure Laurinsäure (gesättigte Fettsäure) zur Stabilisierung. Bei der Orientierung der Laurinsäure an der Magnetitoberfläche soll sich die Carboxylgruppe des Kopfes der Oxidoberfläche zuwenden, wogegen der hydrophobe Schwanzteil in das wässrige Medium zeigt [128, 129].

Weitere verwendete oberflächenaktive Substanzen für die Magnetitsynthese sind z.B. das nichtionische Tensid Polyoxyethylen(10)oleylether, welches eine Schichtdicke von ca. 1-2 nm auf der Magnetitpartikeloberfläche aufwies [46]. Bei der Synthese von Eisenoxiden unter Verwendung von Natriumdodecylbenzolsulfonat kam es zu keinen vollständig ausgebildeten Partikeln [79]. Des Weiteren ist eine Verbindung mit der Sulfatgruppe der Substanz Natriumlaurylsulfat (SDS) aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an kationischen Partikel möglich [88]. Bei Natriumoleat wird angenommen, dass sich basierend auf dem positiven Oberflächenpotential des Magnetits ein Oberflächenkomplex zwischen den  $COO^-$ -Gruppen des Oleats und den  $\equiv FeOH$ -Gruppen der Magnetitoberfläche bildet [29, 34].

### 2.4.2.3 Silane

Die Silanisierung ist eine traditionelle Methode der Oberflächenbehandlung [102] und eine etablierte Technik, um auf anorganisches Trägermaterial organische Funktionalitäten zu übertragen. Es handelt sich bei Organosilan um bifunktionelle Moleküle, welche eine Trialkoxy- oder Trichlorsilangruppe beinhalten, an denen freien Hydroxylgruppen der Trägeroberfläche kovalent binden können. Dabei laufen zwei Reaktionen simultan ab. Zum einen die Hydrolyse der Alkoxysilangruppen und zum anderen ihre Kondensationsreaktion mit den Hydroxyloberflächengruppen, was zu einer stabilen Fe-O-Si-Bindung nach der Dehydratation führt. Durch die chemische Eigenschaft der Kopfgruppe des Silanmoleküls kann der Charakter der modifizierten Ober-

fläche beeinflusst werden, wobei Amino-, Hydroxyl- oder Thiolgruppe verfügbar sind [32, 48, 130, 131]. Das am meisten verwendete Silan ist das Aminopropyltriethoxysilan (APTS) [9, 11, 44, 83, 118, 119]. Die gängigsten Verfahren sind die Stöber-Methode und der Sol-Gel-Prozess. Die Vorteile der Silanbeschichtung sind die aquatische Stabilität bei niedrigen pH-Werten und die durch Veränderung der Konzentrationsverhältnisse kontrollierbare Schichtdicke zur Beeinflussung der interpartikulären Wechselwirkungen. Nachteilig ist die Instabilität im basischen Milieu sowie die Porenbildung beim Beschichtungsprozess, durch welche z.B. Sauerstoff diffundieren kann [9, 11, 53, 131]. Laut Xu et al. verläuft eine Silanisierung sowohl in Wasser als auch Toluol. Dabei findet eine verbesserte Anbindung in Wasser statt, was auf stärkere Bindungsenergien und erhöhte Silanbedeckung zurückzuführen ist [131]. Die Beschichtung mit Silanen wurden mit den Herstellungsmethoden der Mikroemulsion [53] und der Kopräzipitation im in-situ-Verfahren (vgl. Kapitel 2.3.2) durchgeführt. Dabei zeigt sich im Kopräzipitationsverfahren, dass Aminosilan das Partikelwachstum durch die Bildung einer dünnen Oberflächenschicht hemmt und es zu einem Verlust der magnetischen Sättigung um ca. 28 % kommt [81]. Die geringe Aminogruppendichte auf der Partikeloberfläche war von der Reaktionszeit abhängig [130]. Kobayashi et al. untersuchten verschiedene Aminosilankupplungssubstanzen und gehen von einer Bi- oder Monobeschichtung aus [31]. Durch die post-Synthese-Silanisierung mit APTES ist die Partikelgröße um 18 % gestiegen und die Partikelagglomeration wurde verringert. Die magnetische Sättigung nahm nach der Oberflächenmodifizierung von  $43 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$  auf  $40 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$  ab [111]. Yong et al. haben Magnetit mit Vinyltriethoxysilan (VTES) modifiziert, um reaktive Gruppen auf die Oberfläche aufzubringen. Die magnetische Sättigung der modifizierten Partikel hat sich dabei im Gegensatz zu reinem Magnetit um 54 % verschlechtert [32]. Auch Kombinationen von PEG mit Trimethoxysilan wurden durchgeführt [9, 48].

#### 2.4.2.4 Edelmetalle

Ein weiterer Ansatz ist die Beschichtung der magnetischen Nanopartikel mit Edelmetallen. Gold ist prädestiniert für Beschichtungen aufgrund seiner niedrigen Reaktivität und eine nachfolgende Oberflächenfunktionalisierung mit schwefelhaltigen Liganden und Thiolgruppen ist möglich. Die Direktbeschichtung von Gold hat sich aufgrund des ungleichen Charakters der beiden Oberflächen als problematisch erwiesen [9, 11]. Carpenter hat Magnetitpartikel mittels Mikroemulsion unter Verwendung des Tensid Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) hergestellt und anschließend mit Gold beschichtet. Die Schichtdicke betrug 1 nm und die Partikel waren gegenüber Sauerstoff unempfindlich [78]. Es wurde auch von Beschichtungskombinationen aus Kieselsäure und Gold berichtet. Aufgrund ihrer starken Resonanzadsorption von sichtbarem Licht und im nahen Infrarotbereich gelten sie als erfolgsversprechend für biomedizinische Anwendungen [11].

#### 2.4.2.5 Kohlenstoff

Die Beschichtung mit Kohlenstoff wird aufgrund ihrer im Vergleich zu Polymer- und Silanbeschichtungen besseren chemischen und thermischen Stabilität immer häufiger angewendet. Eine gut ausgebildete Kohlenstoffbeschichtung ist ein effektiver Schutz gegenüber Oxidation und Säurekorrosion. Problematisch ist die Neigung zur starken Agglomeration, die für viele Einsatzgebiete hindernd ist [9, 11]. Rudge et al. haben ma-

netische, kohlenstoffbeschichtete Trägerpartikel durch eine gemeinsame Deformation von Eisen und Kohlenstoff in einer Planetenkugelmühle hergestellt. Bei diesen Partikeln wurde das Ad- und Desorptionsverhalten von Doxorubicin untersucht. Die Oberflächeneigenschaften der Partikel wurden von der Kohlenstoffphase dominiert [51]. Weiterhin wurden magnetische Nanopartikel in mesoporöse Kohlenstoffe oder Kohlenstoffnanoröhrchen eingebaut, wodurch sie vor der Umwelt geschützt wurden. Unterschiedliche Arten von Kohlenstoffröhren und verschiedene vorherige Beschichtungen und Anbindungsverfahren wurden angewendet [9]. Es wurde auch von einem Einschlussverfahren in einer Polymermatrix von Magnetit und Kohlenstoff berichtet [44].

#### 2.4.2.6 Weitere Beschichtungen

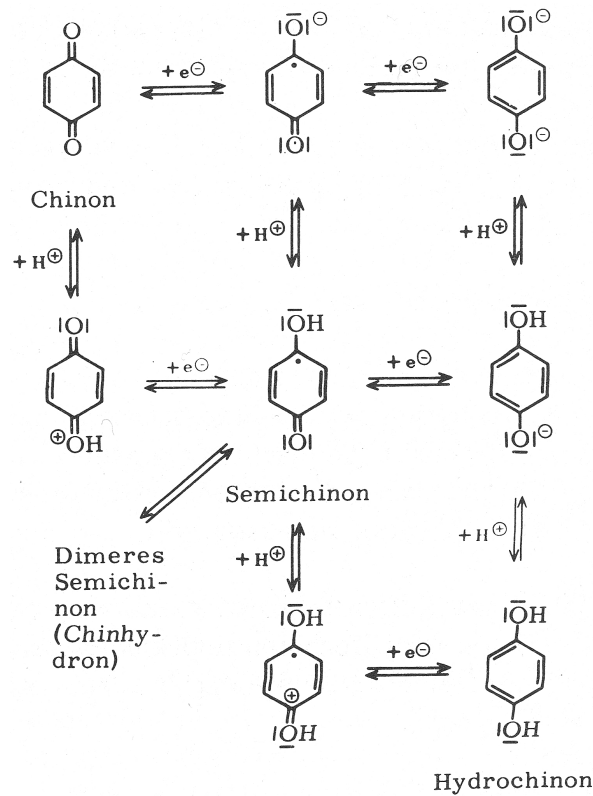
Choi et al. haben Magnetitnanopartikel direkt mit Biotinmolekülen in wässriger Lösung funktionalisiert. Die Existenz des Biotins auf der Oberfläche wurde mit Infrarot und einer Farbreaktion überprüft und bestätigt. Weiterhin wurde eine hohe Affinität zu markiertem Streptavidin nachgewiesen [40]. Goodarzi et al. nehmen an, dass sich Zitronensäure als zwei- oder dreizähliger Ligand unter Chemisorption bindet [132].

### 2.4.3 Funktionalisierende Substanzen

#### 2.4.3.1 Chinone

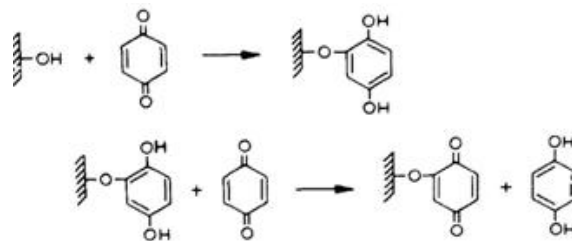
Chinone sind Dioxoverbindungen aromatischer Ringsysteme und wichtig im Bereich der Farbstoffchemie [133, 134, 135]. Man unterscheidet 1,2- (ortho-) und 1,4- (para-) Chinone. Sie sind zu zahlreichen Additionsreaktionen fähig, in der Natur weit verbreitet und in Stoffwechselfvorgängen von Pilzen, Pflanzen und tierischen Organismen anzutreffen [133, 134, 136]. Chinone finden Verwendung als Oxidationsmittel, analytische Reagenzien in der Farbstoffsynthese, als Antimalariamittel sowie in der technischen Produktion von Wasserstoffperoxid. Im Allgemeinen werden sie durch die Oxidation von Phenolen oder polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen hergestellt, aber auch eine enzymatische Oxidation von Polyphenolen ist möglich [133, 134]. Chinone zeigen die Reaktivität von  $\alpha, \beta$ -ungesättigten Ketonen und am chinoiden Ring finden Additionsreaktionen statt [137].

In Abbildung 2.13 ist das Chinon-Hydrochinon-System dargestellt, wobei die Redoxgleichgewichte in horizontaler Ausrichtung und die Säure-Base-Gleichgewichte in vertikaler Richtung gruppiert sind. Die reversible Reduktion von Hydrochinon verläuft in einem Gleichgewicht, bei dem als Reduktionsmittel zwei Elektronen stufenweise übertragen werden und die Reduktionsvorgänge mit Protonenübertragungen gekoppelt sind. Dabei entsteht als Zwischenprodukt das nicht protonierte, radikale Semichinon [135], welches durch weitere Reduktion zum Chinon wird und somit von einem benzoiden in ein desaromatisches Chinonsystem übergeht [133, 138].



**Abbildung 2.13:** Chinon-Hydrochinon-Redoxsystem anhand der Beispielsubstanz Benzochinon [135].

Das in Abbildung 2.13 dargestellte, einfache Molekül Benzochinon wurde bereits in den 70er Jahren für die Funktionalisierung organischer Polymere wie Agarose und Dextran mit funktionellen Hydroxylgruppen verwendet [15]. Die Funktionalisierung und die Immobilisierung können über einen breiten pH-Bereich stattfinden. Das erhaltene Produkt weist eine gute Stabilität und Enzymaktivität auf [15, 110]. Es ist mittlerweile ein etabliertes Standardverfahren für Aktivierung und Immobilisierung Hydroxylgruppen enthaltender, organischer oder synthetischer Polymere [110]. In Abbildung 2.14 ist der mögliche Bindungsmechanismus von ortho-Benzochinon an Polymeroberflächen mit einer funktionellen Hydroxylgruppe dargestellt. Dieser Reaktionsmechanismus verläuft bei para-Chinonen identisch [139].



**Abbildung 2.14:** Benzochinonaktivierung von Polymeroberflächen mit einer funktionellen Hydroxylgruppe [140].

Weiterhin wurde die Anbindung an Indium-Zinn-Oxid beschichteten Glaselektroden, die vor der Aktivierung mit Benzochinon mittels Aminosilan (vgl. Kapitel 2.4.2.3) funktionalisiert wurden, untersucht. Eine erwartete Bindungsreaktion sollte ähnlich

der in Abbildung 2.14 dargestellten Reaktion sein, die ein- oder zweizählige substituierte Produkte ausbilden. Narasimhan und Wingard vermuten, dass es sich um eine kovalente Bindung handelt. Allerdings wird eine starke Adsorption durch die Wasserstoffbrückenbindungen nicht ausgeschlossen [141]. Bei der Anbindung von Hydrochinon wurde eine Monoschicht nachgewiesen, die bei größeren Ansätzen ungeordnet erscheint. Eine Reduktion von Eisen wurde nicht beobachtet, weshalb angenommen wird, dass die Chinonadsorption eher zur Bildung eines Außensphärenkomplex (vgl. Kapitel 2.4.1) führt [142].

### 2.4.3.2 Endiole

Das Adhäsionsvermögen einiger mariner Organismen an z.B. Schiffsrümpfen und Felsen ist bemerkenswert [143] und ihre Veranlagung zur Bildung von Biofilmen als Schutzmechanismus und zur Fortpflanzung ist für sie überlebenswichtig [17, 144]. Dabei sind diese Biofilme hinsichtlich ihrer Funktion herausragend, da sie über einen großen Temperaturbereich, schwankende Salz- und Feuchtigkeitskonzentration sowie bei Strömungsänderungen stabil sind [144]. Insbesondere ist die dauerhafte Adhäsion von Muscheln auf den meisten organischen und anorganischen Oberflächen hervorzuheben und im Zusammenhang mit Klebstoff interessant [144, 145]. Deshalb wurden Haftproteine von Miesmuscheln extrahiert und untersucht. Sie enthalten die Substanz 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) [17, 146], eine Aminosäure, die eine funktionelle Brenzkatechin- (aromatischer Ring mit zwei Hydroxylgruppen in para-Stellung) und Aminogruppe enthält, wobei erstere eine wichtige Rolle als Ankermolekül bei der Oberflächenadhäsion spielt. Es wurde ein DOPA-Gehalt von bis zu 27 mol-% im Klebsekret nachgewiesen und mittlerweile sind mehr als 20 Haftproteine von Muscheln bekannt [16, 144, 147].

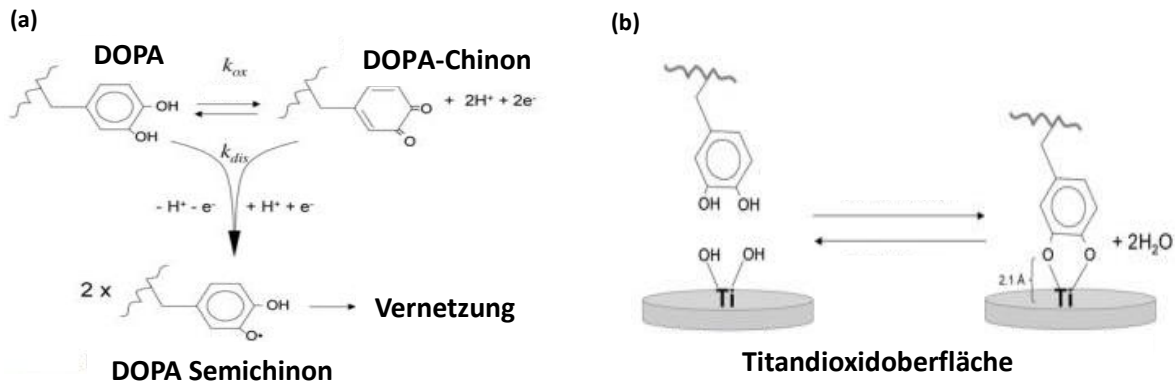
Der Bindungsmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, aber die hohe Affinität zwischen Metallionen, besonders Eisen, Aluminium und Silizium, und der enthaltenen Brenzkatechingruppe in DOPA ist schon seit längerem bekannt [16, 17, 144]. Es werden zwei unterschiedliche Koordinationsmechanismen für die Bindung an Metalloxydoberflächen vorgeschlagen: die einzählige Koordinierung (vgl. Kapitel 2.4), bei der nur eine der zwei Hydroxylgruppen des Brenzkatechins dissoziiert und an das Metallkation anbindet und die zweite Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum Nachbarbrenzkatechin ausbildet, oder eine Mischung aus ein- und zweizähligen Molekülen, bei denen beide Hydroxylgruppen dissoziieren und sich nebeneinander an das Metallkation binden (vgl. Abb. 2.15 (b)) [148]. Die Bindungskraft von DOPA an Titandioxid ist halb so groß wie bei einer kovalenten Bindung (ca. 800 pN), wobei diese gegenteilig zur Natur für tausende Wiederholungen komplett reversibel ist. Lee et al. begründen das mit den nicht vorhandenen Vernetzungsreaktionen, da einzelne DOPA-Moleküle Anwendung fanden [16, 144].

Die Vernetzungsreaktion basiert auf der Oxidation von DOPA und somit sind Oxidations- und Vernetzungsgeschwindigkeit miteinander verknüpft. Sie kann durch die Reaktionen der Oxidation, Reduktion und der Autooxidation beschrieben werden. Die Brenzkatechingruppe des DOPAs kann mit dem Hydrochinon verglichen werden (vgl. Abb. 2.13) und wird als  $H_2Q$  in der folgenden Gleichung zur Autooxidation beschrieben (vgl. Gleichung 2.10 und Abb. 2.15 (a)). Seine oxidierte Form ist das DOPA-Chinon

(Q) [146].



Bei der Oxidation von DOPA zu DOPA-Chinon werden zwei Elektronen übertragen und es können Zwischenprodukte ähnlichen denen des Chinon-Hydrochinon Redoxsystems entstehen (vgl. Abb. 2.13). Die Reaktion und die Bildung der Zwischenprodukte ist vom pH-Wert und den Lösungsmittleigenschaften abhängig [146].



**Abbildung 2.15:** Schematische Darstellung: (a) der Vernetzungsreaktion von DOPA, (b) der Anbindung von DOPA an Titandioxidoberflächen, aus dem Englischen [16].

Untersuchungen des extrahierten Haftsekrets an mit  $Fe^{3+}$  behandelten Proteinen zeigten drei wesentliche Bestandteile:  $[(Fe(DOPA)_3)]$ -Komplexe, Reaktionen von  $[Fe(DOPA)_3]$  mit Sauerstoff und die Bildung organischer Radikale, wobei die Reduktion des Eisen und die Oxidation von DOPA zum Semichinon simultan ablaufen [17]. Laut Lee et al. verringert eine Oxidation der Brenzkatechingruppen von DOPA die Anbindung an das Titandioxid und somit nimmt der pH-Wert Einfluss auf diese Reaktion [144]. Xu et al. haben Dopamin, welches ein Derivat von der Aminosäure DOPA ist [112], als Verbindungsmolekül für eine Nitrilotriessigsäure (NTA) an Eisenoxidhüllen gewählt. Es wird angenommen, dass die starke Bindung von Dopamin an Eisenoxid durch Integration und Auffüllung von Fehlstellen der Eisenoxidoberfläche stattfindet. Die Desorption von der Titandioxidoberfläche verläuft schwieriger als die Adsorption [35]. Weiterhin wurden die Reaktivität und Struktur von Eisenoxidhüllen, welche mit Dopamin und PEG funktionalisiert wurde, untersucht und modelliert. Das PEG sollte hierbei an der Aminogruppe des Dopamins binden, wobei eine Oberflächenreaktion zwischen Dopamin und  $Fe^{3+}$  stattfindet soll und eine Bindungsform von  $Fe^{3+}$ -Brenzkatechin-Wasserstoffbrückenbindung angenommen wird [8].

## 2.5 Enzymimmobilisierungen

Bei Enzymen handelt es sich um Biokatalysatoren, die in vielen Konversionsprozessen beispielsweise in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden [111]. Solche enzymatischen Reaktionen verlaufen unter milden Bedingungen und produzieren wenig Nebenprodukte. Des Weiteren zeichnen sie sich gegenüber anorganisch katalysierten Reaktionen durch ihre hohe Spezifität, geringe Toxizität, biologische Abbaubarkeit und hohe Reaktionsraten aus [32, 149, 150]. Das Recycling ist bei dem Einsatz

freier, teurerer Enzyme aufgrund der geringen Dichtedifferenz zwischen Enzym und wässriger Lösung problematisch, weshalb Enzyme immobilisiert werden. Immobilisieren bedeutet die Enzyme auf einem Trägermaterial mit chemischen oder physikalischen Methoden zu fixieren. Dadurch wird das Recycling erleichtert, da sie eine eigenständige, lokalisierbare Phase bildet, womit eine Reduzierung der Betriebskosten einhergeht [32, 58, 111, 151]. Die Immobilisierung erhöht gewöhnlich die Stabilität hinsichtlich Temperatur, pH-Wertschwankungen, organischen Lösungsmitteln und dem Denaturierungsverhalten, führt aber oftmals zu einem Aktivitätsverlust der Enzyme, da sich diese in einem neuen Zustand mit veränderter Mikroumgebung befinden [44, 58, 152, 153]. Weiterhin können Stofftransportvorgänge der enzymatischen Reaktionen nach der Immobilisierung aufgrund von Porendiffusion oder externem Stofftransport zur Katalysatoroberfläche eingeschränkt sein [154].

Wesentliche Kriterien bei der Trägerauswahl zur Immobilisierung der Enzyme sind Größe, Gestalt, Porosität, mechanische und katalytische Stabilität, Kosten, funktionelle Oberflächengruppen, Aggregationseigenschaften, Quellverhalten, Abrieb, Betriebs- und Lagerstabilität etc. [119, 154, 155]. Bei magnetischen Trägermaterialien sind noch die magnetischen Eigenschaften und im Speziellen bei den Magnetitpartikeln die Tatsache, dass sie nicht porös sind, die hohe spezifische Oberfläche, Superparamagnetismus (vgl. Kapitel 2.3.4) und die Monodispersität wichtig [59, 119]. Bisher spielen poröse Trägermaterialien aufgrund ihrer hohen inneren Oberfläche eine wichtige Rolle [4, 7] und es wurde eine Vielzahl natürlicher und synthetischer Feststoffe verwendet, wobei üblicherweise als organische Träger Polymere und anorganische Silikate eingesetzt werden [1, 155].

### 2.5.1 Enzymimmobilisierungsmethoden

Zur Immobilisierung von Enzymen kommen verschiedene Methoden zum Einsatz. Diese sind abhängig von den Randbedingungen der jeweiligen Katalyse und müssen entsprechend designt werden [156]. Des Weiteren sind Immobilisierungsmethoden nicht für nur einen bestimmten Trägertyp geeignet sondern auch Kombinationen von Trägern und Immobilisierungsmethoden möglich, was zu einer Vielzahl an Wegen führt [157]. Die Immobilisierung findet meistens an der fest/flüssig Grenzfläche statt und wird üblicherweise durch Faktoren wie pH-Wert, Temperatur, Grenzflächenspannung und Ladung der Träger sowie der Ionenstärke beeinflusst [158]. Für die Kupplungsmethoden stehen verschiedene Aminosäurereste an den Enzymen zur Verfügung, wobei die Mehrzahl der Enzymimmobilisierungen auf Bindung an den freien Aminogruppen beruht. Weitere Gruppen, die für die Proteinbindung herangezogen werden, sind Carboxyl-, Thiolgruppen oder aromatische Reste [159]. Bei der Immobilisierung werden verschiedene Bindungsarten unterschieden. Zu diesen gehören die Adsorption, die kovalente Bindung und das Einschlussverfahren [111]. Generell steigt die Stabilität des Enzym-Träger-Komplexes mit steigender Bindungsstärke, wogegen die Enzymaktivität abnimmt [44].

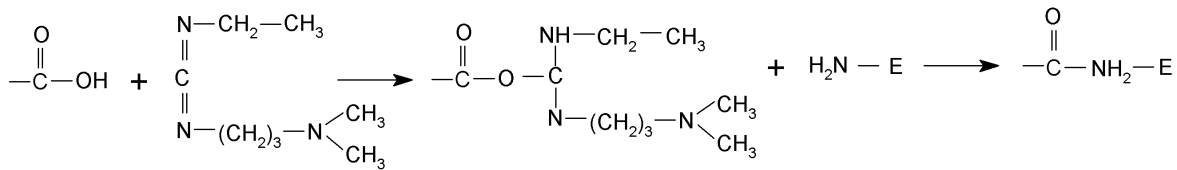
Die Adsorption ist die einfachste und älteste Methode zur Immobilisierung und basiert auf reversiblen Oberflächenwechselwirkungen zwischen dem Trägermaterial und den Enzymen. Sie können auf schwachen elektrostatischen, hydrophobischen oder ionischen Bindungen beruhen und Wasserstoffbrückenbindungen können auch ausgebildet

werden. Bei diesem Immobilisierungsverfahren werden die Enzyme gering oder gar nicht beeinträchtigt, was sich meist in ihrem geringen Aktivitätsverlust bestätigt. Weiterhin ist es preiswert, schnell und einfach durchführbar. Nachteilig ist die nicht spezifische Bindung des Enzyms, so dass es durch andere Substanzen an der Oberfläche verdrängt und vom Trägermaterial abgelöst werden kann, was zu einer Produktkontamination führt. Weitere Desorptionen sind durch Milieuveränderungen wie pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke oder durch Produktionsbedingungen wie Strömungsgeschwindigkeiten und Begasung möglich [152, 155, 157, 160].

Von einer kovalenten Immobilisierung spricht man, wenn sich zwischen dem Trägermaterial und dem Enzym eine kovalente Bindung ausbildet. Sie findet üblicherweise zwischen den funktionellen Oberflächengruppen der beiden Substanzen statt. Beim Enzym handelt es sich um Aminosäurereste, wobei hauptsächlich Aminogruppen von Lysin oder Arginin, Carboxylgruppen von Asparaginsäure oder Glutaminsäure oder die Hydroxylgruppen von Serin oder Threonin sowie die Thiolgruppe von Cystein involviert sind. Falls das Trägermaterial keine funktionellen Gruppen aufweist, können diese durch eine vorherige Funktionalisierung eingeführt werden (vgl. Kapitel 2.4). Die kovalente Immobilisierungsmethode ist die weitverbreitetste und erzeugt eine sehr hohe Bindungsstärke, so dass sich keine Enzyme aufgrund von Substratkonkurrenz oder Ionenkonzentrationsschwankungen ablösen. Jedoch verlieren die Enzyme mit dieser Bindungsmethode Aktivität, da es schwierig ist, keine essentiellen Aminosäurereste des aktiven Zentrums an der kovalenten Bindung zu beteiligen. Deshalb ist eine kontrollierte kovalente Immobilisierung wichtig, die an den nicht essentiellen Aminosäureresten im aktiven Zentrum ansetzt. Auch bei einer Anbindung an nicht essentiellen Aminogruppenresten des aktiven Zentrums wurde ein Aktivitätsverlust nachgewiesen, da es zu einer Verschiebung der Konformation kam [56, 152, 155, 157].

Für die Aktivierung der funktionellen Gruppen des Trägermaterials werden spezifische Reagenzien verwendet, um diese elektrophiler (Elektronendefizit) zu machen. Dadurch wird die Bindungsreaktion mit einem starken Nukleophil (Elektronendonator), wie z.B. Aminogruppen der Enzymoberfläche, begünstigt [155, 157]. Im Folgenden soll auf die Substanzen Carbodiimid und Glutaraldehyd (Glut) eingegangen werden.

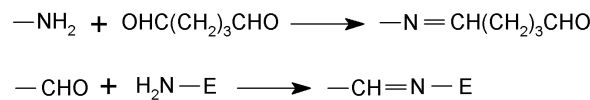
Carbodiimide werden als Vermittler zwischen Carboxylgruppen und Aminogruppen unter Ausbildung einer Amidbindung eingesetzt und gehört zu den sogenannten „Nulllängenvernetzern“. Solche Komponenten verbinden zwei Moleküle miteinander ohne zusätzliche Atome einzuführen (vgl. Abb. 2.16). Carbodiimide gehören zu den meist verwendeten „Nulllängenvernetzern“, wobei das 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (CDI) am verbreitetsten ist. Es gibt zwei verschiedene Arten der Carbodiimide: wasserlösliche und wasserunlösliche. Für die Aktivierungsreaktionen bieten sich die wasserlöslichen an, da sie einfacher „auszuwaschen“ sind und kein organisches Lösungsmittel notwendig ist. Die Reaktionen laufen schnell ab und erzielen hohe Ausbeuten. Ein pH-Bereich von 4,7-6 hat sich als geeignet erwiesen. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 2.16 dargestellt, und läuft über das Zwischenprodukt O-Acylisourea ab, welches hochreaktiv und wasserlöslich ist [159, 161, 162].



**Abbildung 2.16:** Schematische Darstellung der Carbodiimidaktivierungsreaktion einer Carboxylgruppe über die Bildung der Zwischenproduktes O-Acylisourea bis hin zur kovalenten Bindung, E: Enzym, modifiziert nach [119].

Solche Diaminmodifikationen können einen negativen Effekt auf die Aktivität des Enzyms haben, da die Nettoladung des Moleküls aufgrund der Amidbindung beeinflusst wird. Das negative Potential der Carboxylgruppe wird durch eine positive Ladung der Aminogruppe ausgetauscht. Dementsprechend wird die Mikroumgebung des Enzyms verändert, was zu einer Inaktivität führen kann [161].

Glutaraldehyd ist der meist verwendete Dialdehydvernetzer und koppelt Aminogruppen von Proteinen mit denen von anderen Molekülen unter Bildung einer sekundären Amidbindung (vgl. Abb. 2.17). Es kann in wässrigen Lösungen ungesättigte Polymere bilden, die hochreaktiv gegenüber Nucleophilen von Primäraminen sind. Problematisch ist die Reproduzierbarkeit der Vernetzungsreaktionen mit Glutaraldehyd, da die Polymergröße und -struktur sowie das Alter der Lösung Einfluss nehmen [159, 161]. Die Reaktion ist in der folgenden Abbildung (2.17) dargestellt.



**Abbildung 2.17:** Schematische Darstellung der Aktivierungsreaktion von funktionellen Aminogruppen mittels Glutaraldehyd für die kovalente Enzymanbindung, E: Enzym [119].

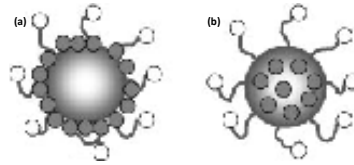
Das Einschlussverfahren basiert auf der Einkapselung oder Einhüllung des Enzyms in ein inertes Material und unterscheidet sich von den anderen Verfahren durch eine nicht vorhandene chemische Bindung. Der Vorteil ist, dass somit keine chemische Veränderung des Enzyms und kein damit vorhandener Aktivitätsverlust eintritt. Problematisch ist der dadurch bedingte Diffusionswiderstand, der Substrateintrag und Produktausgang über die Hüllengrenze behindert. Des Weiteren muss gewährleistet werden, dass das Enzym während der Katalyse im Inneren der Hülle verbleibt. Zwei Methoden des Einschlussverfahrens sind bekannt: zum einen der Geleinschluss, der aus einer die Enzyme einschließenden Gitterstruktur einer Polymermatrix besteht. Die Porengröße reguliert hierbei den Austritt von Substrat und Produkt und den Freiraum für die Enzyme, wobei die Stabilität der Gele aufgrund von Quellung gering ist. Zum anderen gibt es die Methode des Membraneinschlusses, bei dem die Enzyme mittels einer semipermeablen Membran umhüllt werden, welche nur von den Produkten und Substraten passiert werden kann [152, 155, 157].

## 2.5.2 Enzymimmobilisierungen an magnetischen Trägern

Der Einsatz magnetischer Trägermaterialien zum Zwecke der Immobilisierung wird erstmals 1973 erwähnt [31]. Heute ist es bereits gelungen, einige bioaktive Substanzen

wie Enzyme, Antikörper, Proteine oder Medikamente an Magnetit zu binden, wobei üblicherweise eine Polymerbeschichtung (vgl. Kapitel 2.4.2.1) vorgenommen wird [10]. Zusätzlich zu den Polymerbeschichtungen werden auch Silanbeschichtungen (vgl. Kapitel 2.4.2.3) und Direktimmobilisierungen durchgeführt, worauf im Folgenden kurz eingegangen wird.

Schultz et al. [4, 8] haben magnetische Polyvinylalkoholpartikel (M-PVA) mit Epoxy-, Carboxyl- und Aminogruppen funktionalisiert, wobei der Gehalt des magnetischen Materials bei ca. 50-60 % lag. Die carboxyl- und aminofunktionalisierten Partikel wurden mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und Glutaraldehyd für die Immobilisierung aktiviert. Als Enzyme wurden die Lipasen *Candida rugosa* Typ A und B verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass die epoxyaktivierten Partikel mit *Candida rugosa* Typ A die besten Ergebnisse mit einer Aktivität  $E_{Ak}$  von  $733 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{Partikel}}^{-1}$  erzielten, gefolgt von den aminofunktionalisierten Partikeln mit  $233 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{Partikel}}^{-1}$ . Die Immobilisierung der zweiten Lipase des Typs B verfügte über schlechtere Ergebnisse, die im Bereich von  $40 - 69 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{Partikel}}^{-1}$  lagen. Die M-PVA-Epoxy Partikel, welche mit der Lipase *Candida rugosa* A immobilisiert wurden, sind in Stabilitätsuntersuchung mit einer Magnetabscheidung im Labormaßstab eingesetzt worden. Nach acht Zyklen/Durchgängen gingen in der Magnetabscheidung 22 % der Partikel verloren, wogegen die Enzyme nach fünf Durchgängen bei  $30^\circ\text{C}$  keinen Aktivitätsverlust aufwiesen. Magnetische Abtrennungen mit einem HGMS-Apparat (vgl. Kapitel 2.2.1) waren erfolgreicher, führten aber auch zu Aktivitätseinbußen. Nach 20 Durchgängen waren noch 10 % der Aktivität des Ausgangsimmobilisats vorhanden [4, 8]. Akgöl et al. verwendeten magnetische, poröse PVA-Partikel im Mikrometermaßstab. Für die Aktivierung der Hydroxylgruppen des PVA wurde 1,1'-Carbonyldiimidazol verwendet und nachfolgend das Enzym Invertase kovalent über die Aminogruppen immobilisiert. Die Restaktivität sowie die Enzymbeladung betragen 74 % und  $7,2 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{Partikel}}^{-1}$ . Die optimalen Bedingungen für die Aktivität des Enzyms in Hinblick auf Temperatur und pH-Wert änderten sich im Vergleich zum freien Enzym kaum, wogegen die thermische Stabilität und Lagerungsstabilität durch die Immobilisierung erhöht wurden [58]. Das Enzym Laccase wurde auf mit Polystyrene-co-Acetoacetoxyethyl Methacrylat (PS-AAEM) modifiziertem Maghemit immobilisiert. Die Partikel besaßen einen Durchmesser  $d_p$  von ca. 500 nm und wiesen 16 % Maghemit auf. Die Maghemitpartikel wurden zum einen auf die Oberfläche angebunden und zum anderen in den Polymerkern eingebettet (vgl. Abb. 2.18). Dabei war die Restaktivität der Partikel mit dem Maghemitkern am größten und betrug 20 %, wogegen die Enzymbeladung bei diesen Partikeln mit 17 % am geringsten war. Dagegen wiesen die Partikel mit den auf der Oberfläche gebundenen Maghemitpartikeln eine Restaktivität von 4 % auf. Daraus lässt sich folgern, dass anorganische Partikel auf der Trägeroberfläche zu einer Deaktivierung der immobilisierten Enzyme führen, was u.a. durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Enzymen und dem Eisenoxid begründet werden kann. Die erhöhte Enzymbeladung kann durch die erhöhte Chemisorption der Enzyme erklärt werden. Die thermische Stabilität der gebundenen Laccase war im Vergleich zum freien Enzym höher [158].



**Abbildung 2.18:** Schematische Darstellung von PS-AAEM mit (a) Maghemit an der Oberfläche (b) Maghemit im Kern. [158].

Bei der Enzymimmobilisierung durch Silanbeschichtungen (vgl. Kapitel 2.4.2.3) werden meistens Aminosilane verwendet. Dabei haben Ma et al. gezeigt, dass sich die Proteinbeladung der aminosilanbeschichteten Magnetitpartikel um das 1,4 - 2 fache im Vergleich zum unbeschichteten Magnetit erhöht [28]. Mohapatra et al. erreichten eine Proteinkupplungseffizienz von 73,5 % bei Avidin und 82 % bei Glykoprotein, wogegen keine Bindung auf den unbeschichteten Partikeln stattfand [81]. Kobayashi und Matsunaga haben Glutaraldehyd verwendet, um die Aminogruppe des beschichteten Aminosilanmagnetitpartikels für die Enzymimmobilisierung zu aktivieren. Dadurch wurde eine Enzymbindung von 10 Gew.-% erreicht. Durch längere Silane konnte die Enzymaktivität von Protease Thermolysin von 30 % auf 50 % gesteigert werden. Die längere C-Kette der Silane fungiert als Abstandhalter [31]. Die Verwendung von Glutaraldehyd ist eine übliche Methode zur Aktivierung von Aminogruppen (vgl. Kapitel 2.5.1), weshalb sie häufig als Aktivierung bei Aminosilanen vorkommt. So wurden mit dieser Kupplungsreaktion die Enzyme Esterase *Pseudomonas putida* und Lipase *Candida rugosa* auch kovalent immobilisiert. Bei der Immobilisierung der Esterase wurde festgestellt, dass die Partikelgröße vor und nach der Immobilisierung im gleichen Größenbereich lag und je vier Enzyme pro Partikel gebunden wurden. Die Enzymaktivität betrug 63 % der Ausgangsaktivität, was eine spezifische Aktivität von  $0,25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  ergibt. 84 % der Aktivität blieben nach 10 Zyklen im Batchbetrieb erhalten. Die kinetischen Parameter  $V_{max}$  und  $K_m$  waren gegenüber dem nativen Enzym geringer. Die pH-Wert- und Temperaturoptima blieben ähnlich im Vergleich mit denen der freien Enzyme [83]. Die immobilisierte Lipase wies eine Beladung von  $7,5 \mu\text{g} \cdot \text{mg}_{\text{Partikel}}^{-1}$  auf und es wurde kein signifikanter Verlust der Stereoselektivität festgestellt. Die Ausbeute war im Vergleich zum freien Enzym 26 % geringer [36]. Die Autoren Jin et al. verwenden zusätzlich zur Aminosilanisierung die Aktivierungssubstanz 1,4-Phenylendiisothiocyanat (PDC). Dabei wurde festgestellt, dass die magnetische Sättigung nach der Immobilisierung von  $39,7 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$  (bezogen auf Beschichtung) auf  $22,3 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$  abfällt, was laut Autoren keine Auswirkungen auf die magnetische Abtrennung hat. Die Aktivität der immobilisierten Protease auf unbeschichteten Magnetitpartikeln war sehr gering und betrug  $4 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Durch eine Einführung von Aminogruppen über die Beschichtung konnte die Aktivität auf  $2875 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  gesteigert werden. Dagegen war die Aktivität durch Direktadsorption an der Beschichtung ohne PDC geringer und betrug  $165 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Jin et al. haben eine steigende Aktivität mit erhöhter Proteinbeladung bis zum Erreichen der Sättigung detektiert, welche durch die begrenzte Anzahl der Bindungen erwartet wurde. Die Lagerungsstabilität der immobilisierten Enzyme war gegenüber den freien Enzymen leicht erhöht [111]. Yong et al. haben Epoxygruppen auf der Magnetitoberfläche durch Silanisierung und einer anschließenden weiteren Beschichtung eingeführt. Die Enzymbeladung betrug  $105 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  und die relative Aktivität nach fünf Recyclingvorgängen lag bei 70 % [32].

Die Direktimmobilisierung an Magnetit wurde zuerst von Koneracka et al. mit der Kupplungssubstanz CDI (vgl. Kapitel 2.5.1) durchführt. Sie haben Protease an Magnetit erfolgreich mit CDI angebinden, wobei eine Aktivität von 80 % des freien Enzyms erhalten bleibt und 90 % der zugegebenen Enzymmenge immobilisiert wurde. Ihren Aussagen nach erfolgt die Anbindung über die Hydroxylgruppen der Magnetitoberfläche. Die Anwesenheit des CDIs modifiziert die Carboxylgruppen des Proteins zum leicht sauren pH-Wert, was die Anbindung prozentual erhöht [42, 163]. Die Immobilisierung des Enzyms Alkaline Phosphatase hat ähnliche Werte gezeigt. Hierbei sind Restaktivitäten von 75 % detektiert worden und 85 % des Enzyms in Lösung wurden angebinden. Die magnetische Sättigung nach der CDI Aktivierung und der Proteinbeladung war 22 % geringer verglichen mit den unbeschichteten Partikeln [86]. Die Forschungsgruppe band eine Vielzahl von Proteinen und Enzymen wie Rinderserumalbumin (BSA), Glukose Oxidase, Chymotrypsin, Streptokinase und Dispase auf die Magnetitpartikel und untersuchte den Einfluss von pH-Werten und unterschiedlichen Verhältnissen von Enzym, CDI und magnetischen Trägern. Das optimale Verhältnis betrug z.B. bei der Glukose Oxidase 6:1:2 (Partikel:Enzym:CDI) bei einem pH-Wert von 4,5 und einer Temperatur von 4 °C und es wurden 76 % des Enzyms angebinden. Das Enzym war nur unter diesen Bedingungen aktiv und wurde bei höheren Temperaturen (z.B. Raumtemperatur) und pH-Werten inaktiv [42, 54]. Weitere Untersuchungen mit der Direktimmobilisierung unter Zuhilfenahme von CDI zeigten bei Huang et al., dass es nach der Immobilisierung von Lipase zu keinen Änderungen in der Partikelgröße und -struktur kam [164]. Diese Beobachtungen wurden auch von Kouassi et al. bei der Immobilisierung von Cholesterol Oxidase gemacht [55]. Nach der Anbindung hatten die Partikel superparamagnetische Eigenschaften (vgl. Kapitel 2.3.4), wobei sich die magnetische Sättigung leicht reduziert hatte, was sich mit den Aussagen von Metha et al. deckt. Die immobilisierte Lipase hatte eine bessere pH-Wertstabilität [10]. Wang und Lee haben Trypsin und Avidin unter Verwendung der Aktivierungssubstanzen CDI und Cyanamid direkt an Magnetit gebunden. Dabei wurde festgestellt, dass die Proteinbeladung mit der Cyanamidaktivierung geringer war als die Beladung bei CDI aktivierten Partikeln. Die maximal erreichte Proteinträgerbeladung mit einer CDI basierten Bindung betrug  $35 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Sie vermuten, dass CDI die elektrophilen Gruppen des Magnetits, vermutlich die Hydroxylgruppen, aktiviert, damit diese Gruppen eine Bindung mit den Aminogruppen des Proteins eingehen. Koneracka et al. nehmen einen anderen Bindungsmechanismus an. Weiterhin bemerkten sie, dass ein zu hohes Verhältnis von CDI zu Magnetit die Koagulation aufgrund wahrscheinlicher Vernetzung fördert, was Auswirkungen auf die Suspensionsstabilität hat. Bei einem Verhältnis unterhalb von 0,5 CDI/Magnetit gehen sie von einer langzeitstabilen Suspension aus [164]. Saiyed et al. untersuchten den Einfluss des Direktimmobilisierungsverfahren mit CDI auf Alkaline Phosphatase, wenn die Anbindung durch Schüttel- oder Ultraschallmethode erfolgte. Die Bindungseffizienz war bei beiden Methoden ähnlich in einem Bereich von 80-100 %, wobei die verbleibende Aktivität bei den Schüttelversuchen bei 20-38 % und der Ultraschallmethode bei 30-43 % lag. Demnach ist die Aktivität der Ultraschallmethode im Vergleich zu den Schüttelversuchen höher, wobei immer noch ein Aktivitätsverlust zwischen 57-70 % zu verzeichnen ist. Die Lagerungsstabilität wurde im Vergleich zum nativen Enzym verbessert [165].

# 3 Material und Methoden

Im Folgenden werden zuerst die verwendeten Materialien vorgestellt sowie der theoretische Hintergrund der Analysemethoden erläutert. Im Anschluss wird in diesem Kapitel das methodische Vorgehen dieser Arbeit geschildert.

## 3.1 Verwendete Materialien

Bei den verwendeten Materialien handelt es sich um grundlegend verschiedene Substanzen. Es kommen chemische Reinstoffe wie. z.B. die Funktionalisierungssubstanzen, kommerzielle Produkte wie industriell hergestellter Magnetit sowie eine biologisch aktive Substanz in Form des Enzyms *Lipase Candida rugosa* zum Einsatz. Die verwendeten Substanzen sind nach Anwendungsreihenfolge aufgeführt.

### 3.1.1 Synthesematerialien

Für die Magnetitsynthese wurden bi- und trivalente Eisensalze verwendet, wobei als Anionen Chlorid und Sulfat gewählt wurden. Als Base diente Natriumhydroxid. In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Substanzen dargestellt.

**Tabelle 3.1:** Materialien für die Magnetitsynthese.

Substanz	Summenformel	Molmasse [g · mol <sup>-1</sup> ]	Bezugsquelle	Reinheit [%]
Eisen(II)Sulfat-Heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	278,02	Roth	≥ 99
Eisen(II)Chlorid-Tetrahydrat	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	198,83	Merck	≥ 99
Eisen(III)Chlorid-Hexahydrat	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,39	Merck	≥ 99
Natriumhydroxid	NaOH	40,01	Roth	≥ 99

### 3.1.2 Industriell hergestellter Referenzmagnetit

Als industriell hergestellte Referenzmagnetit (Mi) wurden Magnetitnanopartikel von der Firma Alfa-Aesar mit einem Partikeldurchmesser von 20-30 nm verwendet. Die Reinheit des schwarzen geruchslosen Pulvers beträgt 98 % und kann Spuren von  $Fe_2O_3$  enthalten. Der Schmelzpunkt  $\vartheta_s$  liegt bei 1538 °C und die spezifische Oberfläche  $S_v$  beläuft sich auf etwa 60 m<sup>2</sup> · g<sup>-1</sup>. Die Dichte  $\rho$  und das Molekulargewicht  $M$  betragen

5, 2 g · ml<sup>-1</sup> und 231, 54 g · mol<sup>-1</sup> [14, 166].

Die Herstellerangaben wurden durch die zur Verfügung stehenden Analysemethoden überprüft und um weitere Parameter wie z.B. den IEP ergänzt. Dabei wurde mittels Röntgenbeugung die Phasenreinheit (vgl. Abb. 3.1) bestimmt und die Partikelgröße und Gitterkonstante zu 22 nm und 0,8368 nm berechnet, welches zum einen den Herstellerangaben und zum anderen den Literaturangaben (0,8396 nm [167]) entspricht. Der Abbildung 3.1 ist zu entnehmen, dass es sich hauptsächlich um die Kristallstruktur von Magnetit handelt, da die Referenzpeaks von Maghemit (schwarz) z.B. bei einem Winkel von 2-Theta von 32° und 34° nicht auffällig sind. Da Magnetit und Maghemit eine sehr ähnliche Kristallstrukturen aufweisen sowie über ähnliche Referenzpeaks verfügen (vgl. Abb. 3.1), ist es schwierig, dies vollständig auszuschließen [105]. Die Verschiebung des Spektrums des industriell hergestellten Magnetits im Gegensatz zu den Referenzpeaks basiert auf der kleineren Gitterkonstante im Bezug zum Standardmagnetit. Das Hintergrundrauschen ist ein Indiz für einen amorphen Anteil in der Probe bzw. einer nicht vollständig ausgeprägten Kristallstruktur. Zusätzlich wurden FTIR-Spektren erfasst, die charakteristische Absorptionsbanden bei 600 cm<sup>-1</sup> und 850 cm<sup>-1</sup> (vgl. Abb. 5.3) zeigen. Hierbei handelt es sich um Gittervibrationen der Oxidionen gegenüber den Kationen und im Speziellen um Dehnungsschwingungen der Fe-O-Bindung in den tetra- und oktaedrischen Untergittern. Diese Absorptionsbanden treten bei fast allen Ferriten und üblichen Metalloxiden unterhalb einer Wellenzahl  $\nu$  von 1000 cm<sup>-1</sup> auf [12, 32, 107]. Die beiden Absorptionsbanden in den Regionen 1617 cm<sup>-1</sup> und 3433 cm<sup>-1</sup> existieren aufgrund von Streck- und Biegeschwingungen der Hydroxylgruppen an der Eisenoxidoberfläche, die vor allem in aquatischen Lösungen auftreten [49, 111]. Schwingungen, die im Bereich von 2350 cm<sup>-1</sup> [168] auftreten, sind auf Messfehler zurückzuführen. Dabei handelt es sich um eine CO<sub>2</sub>-Bande, die aufgrund der unterschiedlicher Luftzusammensetzung bei Hintergrundmessung und Probenmessung zustande kommt.

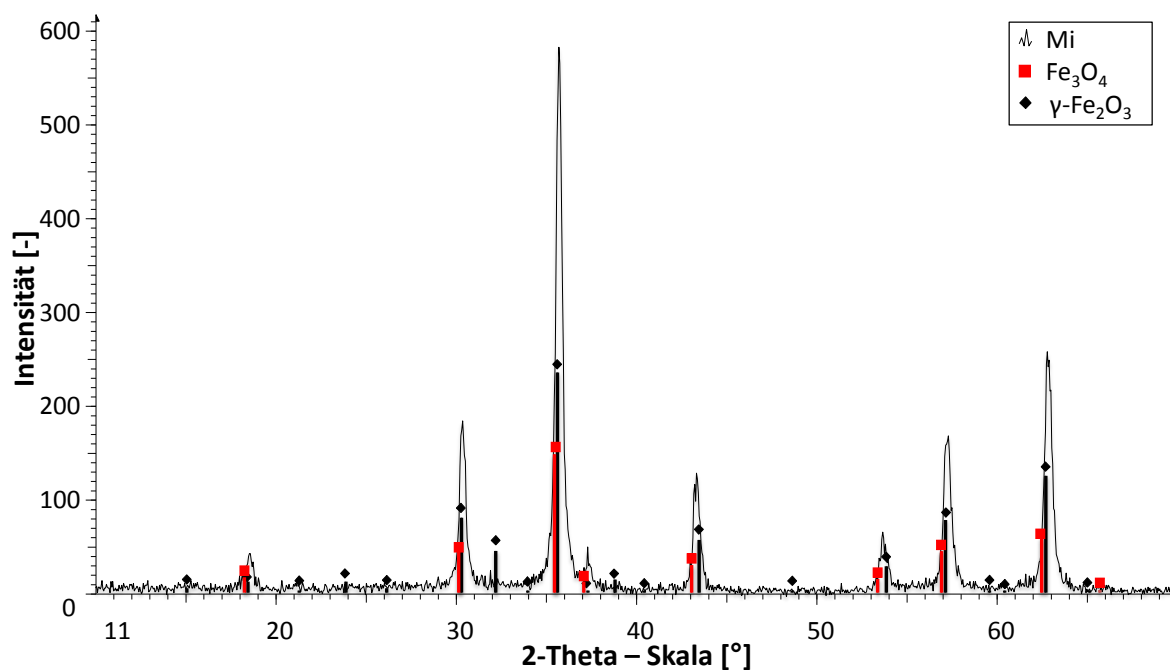
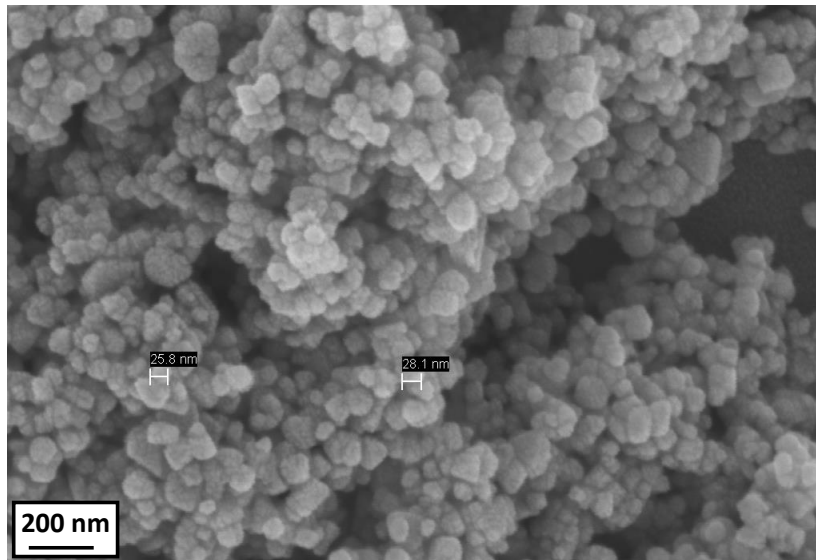


Abbildung 3.1: XRD-Spektrum des unbehandelten, industriell hergestellten Referenzmagnetits.

In der REM-Aufnahme (vgl. Abb. 3.2) sind einheitliche Partikel mit kubischer bis sphärischer Partikelform zu sehen, die in Partikelagglomeraten auftreten. Die dynamische Lichtstreuung hat einen mittleren Agglomeratdurchmesser  $d_{50}$  von  $4,8 \mu\text{m}$  ergeben. Die spezifische Partikeloberfläche wurde mit Hilfe der BET-Isotherme auf  $37,47 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  bestimmt, welches ungefähr ein Drittel geringer ist als die Herstellerangabe, was möglicherweise durch Agglomeration aufgrund von Trocknung und Lagerung verursacht wurde.



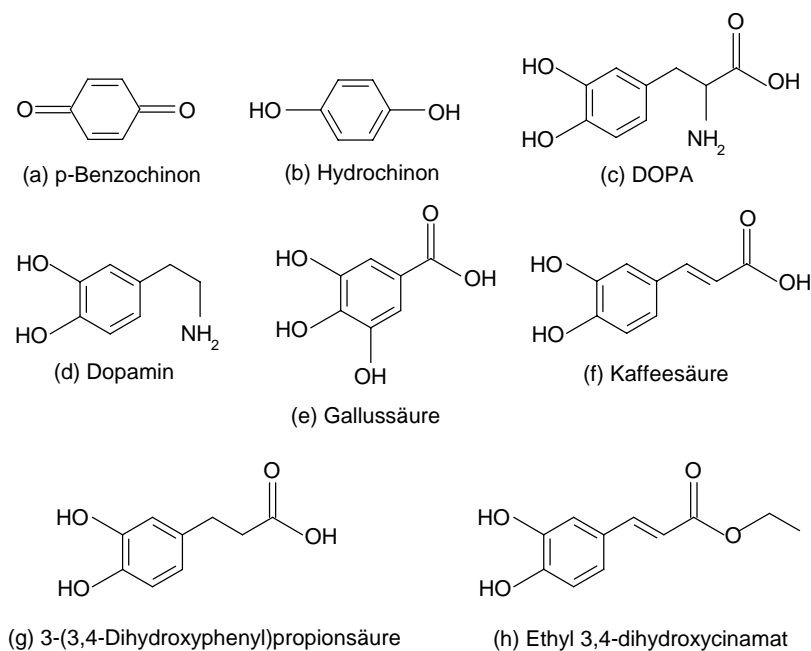
**Abbildung 3.2:** REM-Aufnahme des unbehandelten, industriell hergestellten Referenzmagnetits.

Die Oberflächenladungseigenschaften des industriell hergestellten Magnetits wurden mit Hilfe der Messung des Zetapotentials bestimmt. Der isoelektrische Punkt (IEP) des unbehandelten industriellen Magnetits liegt bei 7,3 (vgl. Abb. 5.11), woraus sich folgern lässt, dass die Partikel im neutralen Bereich zur Agglomeration neigen. Ab einem pH-Wert oberhalb von 9 stabilisieren sich die Partikel aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen, da das Zetapotential ein Wert größer als  $|20 \text{ mV}|$  aufweist.

### 3.1.3 Funktionalisierungssubstanzen

Die funktionalisierenden Moleküle sind von einfacher Struktur und besitzen nicht mehr als elf Kohlenstoffatome (vgl. Abb. 3.3). Es handelt sich dabei um substituierte phenolische Verbindungen mit Ausnahme von Benzochinon (BQ). Die Grundstruktur dieser Substanzen bildet der aromatische Benzolring, an dem verschiedene Substituenten wie Hydroxyl-, Carboxyl- und Aminogruppen gebunden sind, die als Vermittler für die Anbindung der Hydroxylgruppen der Magnetitoberfläche als auch für die funktionellen Gruppen der Enzyme fungieren sollen. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist die Anordnung ihrer charakteristischen Hydroxylgruppen, welche sich in zwei Kategorien der para- und ortho-Stellung einteilen lassen. Die Kategorie der para-Stellung wird durch p-Benzochinon und sein aromatisches Reduktionsprodukt, Hydrochinon (HQ), repräsentiert (vgl. Abb. 3.3 (a) und (b)). Die andere Kategorie bilden die restlichen Substanzen wie z.B. Dopamin (DA) und Kaffeesäure (CA) (vgl. Abb. 3.3 (c)-(h)), die

zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung besitzen, und somit eine Endiolgruppe aufweisen. Die Gallussäure (vgl. Abb. 3.3 (e)) bildet hierbei eine Ausnahme, da sie über drei substituierte charakteristische Hydroxylgruppen in ortho- und meta-Stellung verfügt. Die Lage der Hydroxylgruppen in den Molekülen ist entscheidend für den Bindungsmechanismus an der Partikeloberfläche. Zusätzlich unterscheiden sich die Moleküle hinsichtlich ihrer Substituenten am aromatischen Ring. Dabei wurden hauptsächlich funktionelle Carboxylgruppen (vgl. Abb. 3.3 (f)) sowie Aminogruppen (vgl. Abb. 3.3 (d)) ausgewählt, um eine Anbindung von Enzymen an dieser funktionellen Gruppe zu ermöglichen. Weiterhin spielt die Länge des Substituenten (vgl. Abb. 3.3 (g)) eine Rolle, da diese für eine flexiblere Lage des Enzyms sorgen kann, welches die Enzymaktivität begünstigt und somit eine sterische Behinderung vermieden werden kann [110, 159].



**Abbildung 3.3:** Verwendete Funktionalisierungssubstanzen.

### p-Benzochinon (BQ)

p-Benzochinon (1,4-Benzochinon,  $C_6H_4O_2$ ) ist ein gelber, kristalliner Feststoff der sich gut in heißem Wasser, Alkohol und Ether lösen lässt. Der Schmelzbereich  $\vartheta_s$  liegt bei 112-116 °C und es wird technisch durch die Oxidation von Anilin mit Natriumdichromat in schwefelsaurer Lösung hergestellt und entsteht durch die Oxidation von Hydrochinon. Es ist ein starkes Oxidationsmittel und wird in der Photographie, Färberei und in der organischen Synthese verwendet. Im Gegensatz zu den anderen Substanzen ist p-Benzochinon nicht aromatisch und aufgrund seiner Reaktivität als cyclisch durchkonjugiertes 1,4-Diketon anzusehen [133, 137, 169, 170].

### Hydrochinon (HQ)

Hydrochinon (1,4-Dihydroxybenzol,  $C_6H_6O_2$ ) ist ein farbloser, kristalliner Feststoff und oxidiert bereits unter Einfluss von Luftsauerstoff, welches anhand einer bräunlichen Färbung der Lösung erkennbar wird. Der Schmelzbereich  $\vartheta_s$  liegt bei 170-175 °C. Es kommt in zahlreichen Pflanzenblättern vor. Die Herstellung geschieht auch über die Anilinoxidation (vgl. p-Benzochinon) [170, 171, 172].

**DOPA**

DOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin,  $C_9H_{11}NO_4$ ) ist ein kristalliner, weißer Feststoff mit einem Schmelzbereich  $\vartheta_s$  von 276-278 °C und ist gut in heißem Wasser, Säure und Lauge löslich [173]. Es oxidiert leicht an der Luft und wird durch enzymatische oder chemische Hydroxylierung des L-Tyrosins hergestellt. Es handelt sich dabei um eine Aminosäure, welche in Keimlingen, Hülsenfrüchten und Bohnen vorkommt. Es ist bis zu 27 Mol-% in den Haftproteinen von Muscheln enthalten [133, 144]. Weiterhin findet es Anwendung als Medikament bei Parkinsonismus [170].

**Dopamin (DA)**

Dopamin(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-ethylamin,  $C_8H_{11}NO_2$ ) ist als Hydrochlorid ein weißer, pulverförmiger Feststoff und in Wasser, Methanol sowie in heißem Ethanol löslich. Es ist ein Neurotransmitter und findet Anwendung zur Steigerung des arteriellen Blutdrucks [133, 174, 175]. Es lässt sich leicht oxidieren [170] und das dabei entstehende o-Chinon kann zu 2,3-Dihydroindiol-5,6-diol cyclisieren [139].

**Gallussäure (GA)**

Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure,  $C_7H_6O_5$ ) ist ein farbloser oder leicht gelblicher, kristalliner Feststoff und gehört zu den sekundären Pflanzenstoffen. Sie wird durch alkalische oder basische Hydrolyse aus Galläpfeln gewonnen. Eine enzymatische Herstellung kann durch die Schimmelpilze *Aspergillus niger* oder *Penicillium glaucum* mittels Hydrolyse erfolgen. Sie wird als Antioxidans, beim Färben sowie als analytisches Reagenz eingesetzt [170, 176, 177].

**Kaffeesäure (CA)**

Kaffeesäure (3,4-Dihydroxizimtsäure,  $C_9H_8O_4$ ) ist ein hellgelber Feststoff mit einem Schmelzbereich  $\vartheta_s$  von 211-225 °C. Sie gehört zu den wichtigsten sekundären Pflanzenstoffen und ist in großen Mengen in Kaffee (7 mg) enthalten. Sie ist in heißem Wasser und Ethanol leicht löslich, reduziert  $Fe^{3+}$  zu  $Fe^{2+}$  und wird deshalb auch zum Nachweis für Eisen verwendet. Sie besitzt eine antioxidantische Wirkung [133, 177, 178].

**3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure (DP) und Ethyl 3,4-dihydroxycinamat (ED)**

DP ( $C_9H_{10}O_4$ ) besitzt im Vergleich zu Kaffeesäure keine Doppelbindung, weist einen Schmelzpunkt  $\vartheta_s$  von 136-140 °C auf und wird auch als Dihydrokaffeesäure bezeichnet. ED ( $C_{11}H_{12}O_4$ ) ist auch bekannt als Kaffeesäure-Ethylester und 3,4-Zimtsäure-Ethylester und hat verglichen mit der Kaffeesäure im Zusammenhang mit der Enzymimmobilisierung eine längere Abstandhalterwirkung [166, 176].

**Tabelle 3.2:** Materialien für die Funktionalisierung.

Substanz	Molmasse [ $g \cdot mol^{-1}$ ]	Bezugsquelle	Reinheit [%]
p-Benzochinon	108,09	Alfa-Aesar	98
Hydrochinon	110,11	Fluka	> 99,9
3,4-Dihydroxyphenylalanin	197,19	Sigma	> 98
Dopmain-Hydrochlorid	189,64	Sigma	> 98
Gallussäure	170,12	Merck	99
Kaffeesäure	180,16	Sigma	> 98
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure	182,18	Alfa-Aesar	> 98
Ethyl 3,4-dihydroxycinnamat	208,22	Alfa-Aesar	97

### 3.1.4 Proteinanbindung

#### Aktivierungssubstanzen für die kovalente Immobilisierung

Als Aktivierungssubstanzen für die kovalente Immobilisierung (vgl. Kapitel 2.5.1) wurden N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (CDI,  $C_8H_{18}ClN_3$ ) und Glutaraldehyd (Glut,  $C_5H_8O_2$ ) verwendet. CDI hat eine Molmasse  $M$  von  $191,70 g \cdot mol^{-1}$ , sein Schmelzpunkt  $\vartheta_s$  beträgt  $110-115^\circ C$  und es ist gut bei Raumtemperatur in Wasser löslich [179]. Glutaraldehyd ist eine farblose bis leichtgelbe Flüssigkeit. Der Siedepunkt  $\vartheta_{Sied}$  liegt bei  $100^\circ C$  [180].

#### Rinderserum Albumin (BSA)

Das verwendete Standardprotein Rinderserum Albumin Fraktion V wurde von der Firma Carl Roth bezogen und besaß eine Reinheit von  $\geq 98\%$ . Es handelte sich um einen beigefarbenen, pulverförmigen und geruchslosen Feststoff [181]. Die Molekülmasse  $m_M$  beträgt etwa  $66.500 Da$  [182] und die Dimension ist  $4,2 nm \times 14,1 nm$ . Der berechnete isoelektrische Punkt (IEP) auf Grundlage der Aminosäuresequenz liegt bei einem pH-Wert von  $5,4$ , wogegen die gemessenen Werte sich im pH-Bereich von  $4,7-4,8$  befinden [182, 183]. Es kommt vielfach als Modellprotein, Plasmaersatz und in in-vitro Anwendungen zum Einsatz. Mittels Röntgenbeugung wurde ein Teil der kristallinen Struktur aufgeklärt [175, 182].

#### Lipase *Candida rugosa* (E)

Als Standardenzym wurde Lipase *Candida rugosa* von Sigma verwendet. Sie besitzt eine geringe Wasserlöslichkeit und verfügt über eine spezifische Aktivität  $A$  von  $807 U \cdot g^{-1}$  [184]. Das Temperatur- und pH-Wertoptimum befindet sich bei  $40^\circ C$  und pH  $7$ , dagegen erstreckt sich der Stabilitätsbereich zwischen einer Temperatur von  $10-90^\circ C$  und einem pH-Wert von  $3-9$  [185]. Sie hat einen isoelektrischen Punkt von  $4,5$  [186, 187] und gehört zu der Gruppe der Lipasen (EC 3.1.1.3), die ein breites Anwendungsgebiet in vielen Bereichen findet. Der häufige Einsatz in der Industrie ist auf ihre hohe Stabilität, Substratspezifität sowie auf die Entbehrlichkeit der Kofaktoren zurückzuführen. Ein weiterer Vorteil ist ihre hohe Enantioselektivität, weshalb sie bei der Herstellung von enantiomerenreinen Substanzen Anwendung findet. Sie kommt aber auch in der

Waschmittel- und Backwarenproduktion zum Einsatz. Sie ist an wässrigen und hydrophilen Grenzflächen wirksam und katalysiert Hydrolysen, Veresterungen und Umesterungen [4, 8, 188, 189, 190].

In der folgenden Tabelle 3.3 sind die Substanzen für die Proteinimmobilisierung aufgelistet:

**Tabelle 3.3:** Materialien für die Immobilisierung.

Substanz	Molmasse	Bezugsquelle	Reinheit [%]
<i>Candida rugosa</i> Lipase	k. A.	Sigma	k.A.
Carbodiimid	191,7 $g \cdot mol^{-1}$	Sigma	zur Analyse
Gluteraldehyd	100,12 $g \cdot mol^{-1}$	Roth	50
Albumin Faktor V (BSA)	ca. 66000 Da	Roth	$\geq 98$

### 3.1.5 Verwendete Puffer und weitere Substanzen

Es wurde eine Vielzahl von Puffern verwendet, um zum einen den gesamten pH-Bereich abzudecken und zum anderen den Einfluss der verschiedenen Ionen auf die Reaktion und Stabilität zu untersuchen. Die folgende Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die verwendeten Substanzen zur Pufferherstellung:

**Tabelle 3.4:** Verwendete Substanzen zur Pufferherstellung.

Substanz	Bezugsquelle	Reinheit [%]
Essigsäure	Merck	100
Natriumacetat	Riedel de Haen	98, wasserfrei
TRIS	Roth	99,3
Salzsäure	Merck	32
Ethanol	Merck	99,9
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	$> 99,5$
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth	$\geq 99$
Bicine	Acros Organics	99
Salpetersäure	Merck	65
MOPES	Roth	$\geq 99$
HEPES	Roth	$\geq 99$
Glycin-HCl	Fluka	$> 99$

Für die Durchführung der Analysemethoden wurden die Substanzen aus Tabelle 3.5 verwendet:

**Tabelle 3.5:** *Verwendete Chemikalien für die Analysemethoden.*

Substanz	Bezugsquelle	Reinheit [%]
Roti-Quant	Roth	5 x Konzentrat
para-Nitrophenylpalmitat	Sigma	-
Kaliumbromid	Merck	$\geq 99,5$
1,10-Phenanthrolin-Monohydrat	Roth	$\geq 99,5$
N,N-Dimethylformamid	Merck	$> 99$
Hydroxylammoniumchlorid	Merck	$\geq 99$
Ammoniumacetat	Merck	98
Eisessig	Merck	100
Salzsäure	Merck	32
Schwefelsäure	Merck	95-97
Ammoniumeisen(II)Sulfat	Roth	$\geq 99$
Ethanol	Merck	$\geq 99,9$

## 3.2 Analysemethoden

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Analysemethoden zur Untersuchung der verschiedenen relevanten Eigenschaften der hergestellten Träger erläutert.

### 3.2.1 Quantifizierung der Partikelladung durch Messungen des Zetapotentials

Das Messprinzip des Zetapotentials basiert auf Elektrophorese, bei der durch Anlegen eines elektrischen Feldes  $E$  die zu analysierenden Partikel in einer Flüssigphase bewegt werden. Durch das elektrische Feld  $E$  wirkt eine Beschleunigungsspannung  $U$  auf die suspendierten Partikel in Richtung der Gegenelektrode. Durch diese Beschleunigung wird die diffuse Schicht (vgl. Abb. 3.4) aufgrund von Reibungskräften abgestreift, woraufhin die Partikel an der Scherebene  $S$  eine Potentialdifferenz aufgrund der Abtrennung der Gegenionen aufweisen. Durch das teilweise Abstreifen der diffusen Schicht wird das Potential an der Scherebene größer, welches wiederum eine Beschleunigung zur Gegenelektrode bewirkt, so dass sich die Scherschicht immer weiter zur Teilchenoberfläche bewegt, was bei einer ausreichend hohen Teilchengeschwindigkeit bzw. einem ausreichend starken elektrischen Feld ein nahezu vollständiges Abstreifen der diffusen Schicht bis hin zur Hydrathülle der Stern-Schicht ermöglicht. Dieses Potential an der Scherebene  $S$  nach Abstreifen der diffusen Schicht nennt man Zetapotential. Es kann durch die Teilchengeschwindigkeit  $\nu_s$  im elektrischen Feld  $E$  und dem wirksamen Potential an der Scherebene berechnet werden. Die Höhe des Zetapotentials wird

unter anderem durch den pH-Wert, die Ionenkonzentration der Lösung und die Art der oberflächenaktiven Substanzen beeinflusst. Der Punkt, an dem das Zetapotential null ist, wird als isoelektrischer Punkt (IEP) bezeichnet. Um Aussagen bezüglich unterschiedlicher Oberflächenladungen von Partikeln zu machen ist es wichtig, dass die Konzentration und die Art des Elektrolyts konstant und niedrig gehalten werden um eine größtmögliche Empfindlichkeit zu gewährleisten. Das Zetapotential kann annähernd dem Nernst-Potential  $\psi$  gleichgesetzt werden und ist somit ein Maß für die elektrostatische Suspensionsstabilität (vgl. Kapitel 2.4) [24, 97, 114].

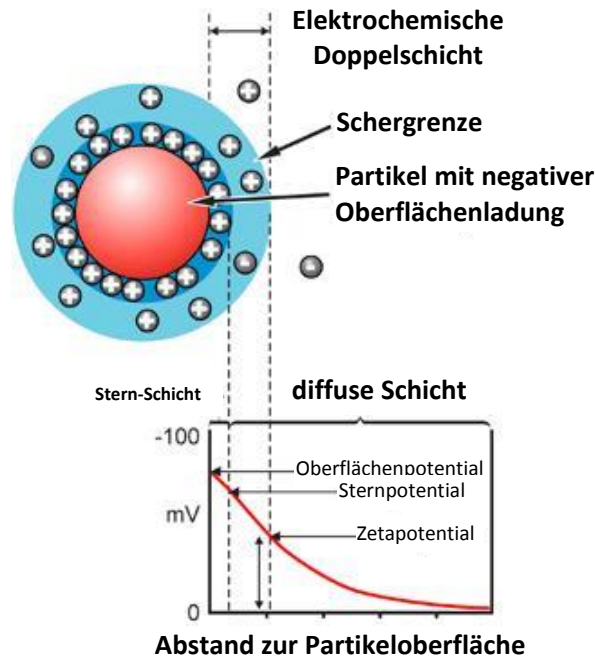


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Zetapotentials [191].

### 3.2.2 Bestimmung der spezifischen Oberfläche mittels Adsorptionsisotherme

Die spezifische Oberfläche  $S_v$  kann mit Hilfe von Adsorptionsisothermen bestimmt werden. Dabei wird die Partikeloberfläche in Abhängigkeit vom Druck mit einem Adsorptivgas - meistens flüssiger Stickstoff - belegt und das Gleichgewicht zwischen Gasphase und Substrat sowie das verbrauchte Adsorbat gemessen. Die anschließend aufgezeichnete Desorptionsisotherme wird bestimmt, indem der Druck verringert und das freiwerdende Adsorptivgas erfasst wird. Um die äußere Partikeloberfläche sowie die Porengröße zu bestimmen ist es nötig, die Probe vollständig mit einer Monoschicht zu belegen, in welcher die BET-Isotherme (vgl. Gleichung 3.1) bei einem relativen Druck von 0,05-0,30 linear verläuft. Nach der Berechnung der Oberfläche wird diese auf die Einwaage bezogen um die spezifische Oberfläche zu erhalten. Zusätzlich lassen sich anhand des Verlaufs der beiden Isothermen Aussagen über die Porengröße und -form treffen [24, 192].

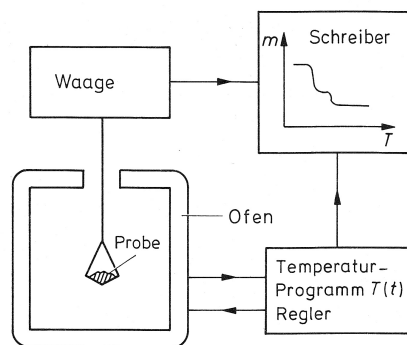
$$\frac{p/p_0}{n_a[1 - (p/p_0)]} = \frac{1}{n_m \cdot C} + \frac{C - 1}{n_m \cdot C} \cdot \frac{p}{p_0} \quad (3.1)$$

Der durchschnittliche Partikeldurchmesser kann unter Annahme sphärischer Gestalt mit Hilfe der spezifischen Oberfläche ( $S_v$ ) mit folgender Gleichung berechnet werden [24, 153]:

$$d_p = \frac{6}{\rho_p \cdot S_v} \quad (3.2)$$

### 3.2.3 Bestimmung des thermogravimetrischen Verhaltens

Bei der Thermogravimetrie (TGA) wird die Gewichtsveränderung einer Substanz als Funktion von Zeit und Temperatur aufgezeichnet um Rückschlüsse auf physikalische und chemische Vorgänge innerhalb der Probe zu ziehen. Dabei werden nur thermische Prozesse wie z.B. Zersetzungen, Sublimationen und Sorptionen detektiert, da sie mit einer Massenänderung einhergehen [193, 194], so dass sich unter anderem auch Partikelbeladungen bestimmen lassen. Zur Aufzeichnung dieser sogenannten TGA-Kurven werden Thermowaagen verwendet, die in Abbildung 3.5 mit ihren wesentlichen Bestandteilen wie temperatur- und atmosphärregulierter Ofen, Waage und Datenerfassung dargestellt ist.



**Abbildung 3.5:** Schematischer Aufbau einer Thermowaage [195].

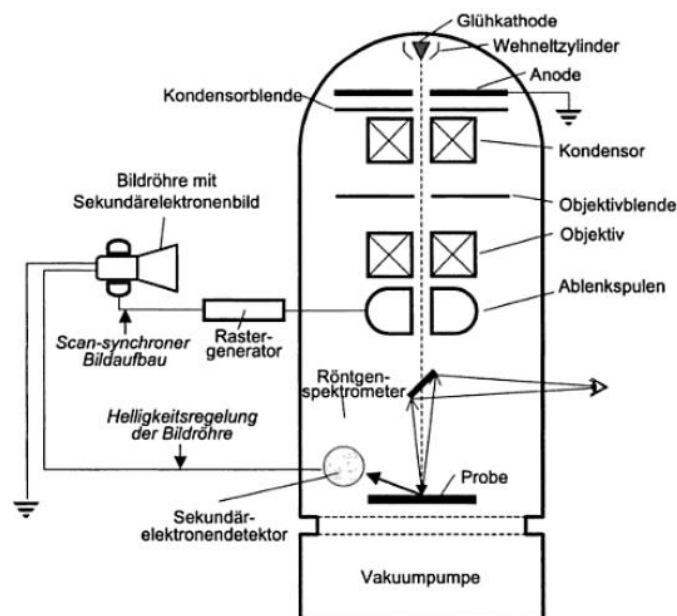
Üblicherweise wird die Probe mit einer konstanten Heizrate  $\beta = dT/dt$  erwärmt und das Anfangsgewicht sowie der temperaturabhängige Gewichtsverlauf detektiert. Dabei wird die Umgebung normalerweise von einem Inertgas laminar umströmt, um die abgegebenen Reaktionsprodukte rasch aus der Probenkammer zu entfernen, um Rückreaktionen zu vermeiden. Zusätzlich zum Atmosphärgas ist das erzeugte Temperaturfeld des Ofens von enormer Bedeutung. Es sollte im Probenbereich annähernd homogen sein, um eine einheitliche Temperaturverteilung innerhalb der Probe zu erzielen. Die Ofen- und Probentemperatur ist dabei idealerweise gleich. Um dies zu gewährleisten, sollte das Probenvolumen so klein wie möglich und eine niedrige Heizrate gewählt werden [193, 194, 195, 196].

### 3.2.4 Strukturuntersuchungen durch Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie hat sich in den Materialwissenschaften zu einer unentbehrlichen Analysetechnik entwickelt, da beträchtliche Vergrößerungsbereiche und vielseitige Strukturinformationen mit ihr dargestellt werden können. Es gibt zwei grundlegende Methoden der Elektronenmikroskopie: die Transmission und die Reflexion. Bei beiden

Techniken gibt es die Möglichkeit einer Elementaranalyse der Probenzusammensetzung mittels der charakteristischen Röntgenemissionsspektren [196, 197, 198].

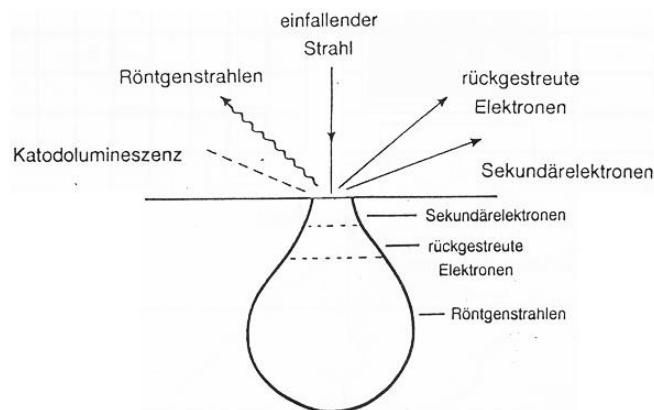
Die verwendete Rasterelektronenmikroskopie (REM) basiert auf der Reflexionsmethode und ihr Bekanntheitsgrad hat mehrere Ursachen: die große Tiefenschärfe gibt den Bildern eine klare dreidimensionale Qualität und vermittelt einen guten topografischen Eindruck der Probe. Die hohe Auflösung (theor. max. Vergrößerung: 800.000 fach [199]) und der extreme Vergrößerungsbereich (üblw.  $10x - 100.000x$  [197]) sind im Zusammenspiel mit der außergewöhnlichen Tiefenschärfe einzigartig und werden in erster Linie für die Untersuchung von Oberflächen oder oberflächennahen Strukturen von massiven Proben verwendet [196, 197, 198, 199, 200]. Der schematische Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Die Elektronenstrahlkanone erzeugt Elektronen und beschleunigt sie auf eine Energie zwischen 2 keV und 40 keV. Dieser Elektronenstrahl wird im Gerätinnern durch konvergente magnetische Kondensatorlinsen mit einem Durchmesser von 2500-5000 nm auf 10 nm [199] gebündelt und mittels Objektivlinsen auf die Probe fokussiert. Die Ablenkspulen erzeugen ein Magnetfeld mit dessen Hilfe der Elektronenstrahl rasterförmig über die Probe geführt wird. Gleichzeitig messen Detektoren die Zahl der niederenergetischen Sekundärelektroden oder andere Strahlung, die nacheinander von jedem Punkt der Oberfläche abgegeben werden. Parallel dazu wird ein Lichtpunkt über den Schirm einer Kathodenstrahlröhre gelenkt, der mit der Abtastung der Probe synchronisiert ist und zu gleichen Ablenkmustern führt. Die Vergrößerung basiert auf den unterschiedlichen Rastergrößen, so dass das gezeichnete Raster des Elektronenstrahls auf der Probe kleiner als das Raster auf dem Schirm ist. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist das Vakuumsystem, um Interferenzen von Gasmolekülen mit dem Elektronenstrahl zu vermeiden, die zu einer drastischen Limitierung der Auflösung führen würden [197, 198, 199, 200, 201].



**Abbildung 3.6:** Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops [202].

Durch den Elektronenbeschuss der Probe findet eine Vielzahl von Wechselwirkungsprozessen statt, welche unterschiedliche Informationen über die Probe enthalten. Abbil-

Abbildung 3.7 zeigt schematisch einige nutzbare Signale, die für die Bilderzeugung verwendet werden. Üblicherweise wird das Bild auf Basis der Sekundärelektronen erstellt, die durch unelastische Wechselwirkungen zwischen Hüllenelektronen der Probe und einfallenden Elektronen entstehen. Die Sekundärelektronen werden im gesamten Wechselwirkungsvolumen des Strahls mit der Probe erzeugt aber aufgrund ihrer geringen Energie von 3-5 eV werden sie stark von der Probe absorbiert, so dass nur oberflächennahe Elektronen zur Bilderzeugung beitragen. Dies macht ungefähr ein Prozent der Gesamtsekundärelektronen aus. Die Sekundärelektronen können aus unterschiedlichen Prozessen stammen. Dabei sind die Sekundärelektronen direkt aus dem Probenbereich am wichtigsten für die Bilderzeugung und werden durch Wechselwirkungen von Strahl und Probe erzeugt. Eine weitere Möglichkeit der Bilderzeugung beruht auf der Wechselwirkung zwischen rückgestreuten Elektronen und Probenatomen. Des Weiteren können auch elastische Wechselwirkungen stattfinden, welche durch Kollisionen von Atomkernen und einfallenden Elektronen entstehen. In Abbildung 3.7 ist auch das sogenannte Wechselwirkungsvolumen zu sehen, in dem die Regionen der verschiedenen Strahlungen dargestellt sind. Dieses Volumen ist abhängig von der Probe und der angelegten Spannung und hat meist eine Birnenform [197, 198, 200].



**Abbildung 3.7:** Einige im Rasterelektronenmikroskop nutzbare Signale und deren Anregungsbereiche, modifiziert nach [200].

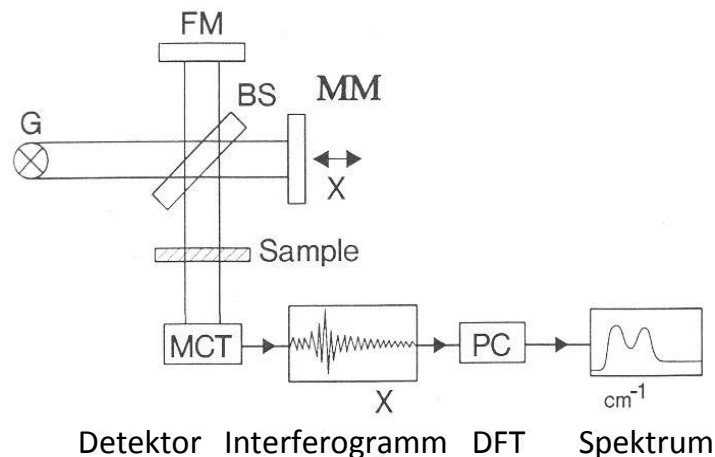
Um Proben vor der elektrischen Aufladung zu schützen oder um sie leitfähig zu machen, werden sie vorher mit einer dünnen Metallschicht, meistens Gold, beschichtet und somit die Bildqualität verbessert [196, 198].

### 3.2.5 Detektion funktioneller Gruppen durch Infrarotspektrometrie

Das Prinzip der Infrarot(IR)-Spektroskopie basiert auf Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie, wobei sich der normale Bereich des IR-Spektrums zwischen Wellenzahlen  $\nu$  von 400-4000  $cm^{-1}$  erstreckt und für eine Identifikation von funktionellen Gruppen im Speziellen bei organischen Molekülen herangezogen wird [168, 196, 203]. Dabei regt das IR-Licht die Moleküle an, deren Schwingungen und Rotationen aufgezeichnet werden und die detektierten Absorptionsbanden Rückschlüsse auf die funktionellen Gruppen zulassen. Zum jetzigen Zeitpunkt dominiert die

sogenannte Fourier-Transformation (FT)-IR-Spektrometrie, deren Ansatz im Gegensatz zu den konventionellen Messgeräten die simultane Erfassung aller Frequenzen des IR-Spektrums ist. Somit arbeitet sie wesentlich schneller und leistungsorientierter als die ursprünglichen IR-Spektrometer.

In Abbildung 3.8 ist der schematische Aufbau eines FTIR-Gerätes dargestellt, welches aus einer Michelson interferometrischen Anordnung mit einer Lichtquelle G, einem Strahlungsteiler BS, einem fixierten und einem beweglichen Spiegel sowie einen Detektor MCT besteht. Die beiden Spiegel reflektieren das ankommende Licht des Strahlungsteilers, wodurch Interferenzen der zwei Wellenzüge entstehen. Durch eine kontinuierliche Bewegung des Spiegels kann ein zeitliches Interferogramm der beiden Teilstrahlen aufgezeichnet werden. Mit Hilfe der mathematischen Fouriertransformation wird die Zeitdomäne des Interferogramms in eine Frequenzdomäne umgewandelt, um somit eine Analyse einzelner Wellenlängen bzw. -zahlen zu ermöglichen. Ein weiterer Vorteil ist das bessere Signal/Rausch-Verhältnis, da es zu einer erhöhten Lichtintensität im Vergleich zu konventionellen IR-Spektrometern kommt [168, 204, 205].



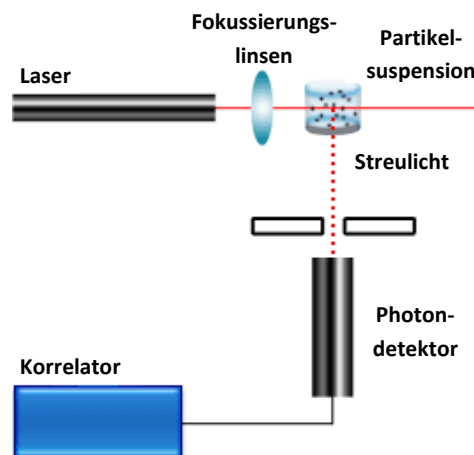
**Abbildung 3.8:** Schematischer Aufbau eines FTIR-Gerätes mit der Lichtquelle G, dem Strahlungsteiler BS, den beiden Spiegeln FM und MM sowie den Detektor MCT, aus dem Englischen [205].

Im IR-Spektrometer lassen sich Proben aller Aggregatzustände vermessen. Dabei richtet sich die Wahl der geeigneten Präparation nach der Probenbeschaffenheit sowie dem Vermessungszweck der Probe. Festkörper lassen sich im Allgemeinen nicht direkt vermessen, sondern benötigen zuvor ein Einbettungsmaterial. Dabei bieten sich zwei Präparationsarten an: die weitverbreitetste ist die Einbettung mit Kaliumbromid, da dadurch keine zusätzlichen IR-Bande erzeugt werden. Dafür wird die Probe mit Kaliumbromid vermischt und unter Vakuum zu durchsichtigen Tabletten verpresst. Ein Nachteil von Kaliumbromid ist, dass der Stoff sehr stark hygroskopisch ist und Feuchtigkeitsspuren im IR-Spektrum meist bei  $3450\text{ cm}^{-1}$  auftreten. Die andere Möglichkeit ist die Suspension in Öl, wobei in den meisten Fällen Paraffinöl verwendet wird. Dazu wird die Probe zu einer zähflüssigen Paste verrieben und findet bei feuchtigkeitsempfindlichen Proben Anwendung. Im Gegensatz zu der Kaliumbromidmethode sind die erzeugten Spektren jedoch von minderer Qualität [168, 203, 206].

### 3.2.6 Bestimmung der Partikel- bzw. der Agglomeratgröße durch dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) wird für die Partikelgrößenbestimmung im Bereich von einigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern verwendet. Sie basiert auf der Brownschen Molekularbewegung, die bei niedrigen Partikelkonzentrationen laut der Stokes-Einstein-Theorie nur von der Viskosität des umgebenden Mediums  $\nu_u$ , der Temperatur  $T$  und der Partikelgröße  $d_p$  abhängt. Somit wird die Messung nicht durch Mehrfachstreuungen und/oder interpartikuläre Wechselwirkungen gestört [207, 208].

In Abbildung 3.9 ist das optische Messprinzip dargestellt, wobei die Probensuspension mit kohärentem monochromatischem Licht bestrahlt und die Intensität des Streulichtes unter einem festen Winkel zeitabhängig gemessen wird. Da sich die Partikel in einer kontinuierlichen Brownschen Bewegung befinden, unterliegt das von ihnen gestreute Licht einer zeitlichen Fluktuation. Aus dieser zeitlichen Intensitätsänderung erhält man Informationen über die Partikelbewegung und den damit verbundenen Diffusionskoeffizienten  $D$ , woraus sich Partikelgröße sowie -verteilung durch Anwendung einer Autokorrelation berechnen lassen [24, 104, 207, 209].

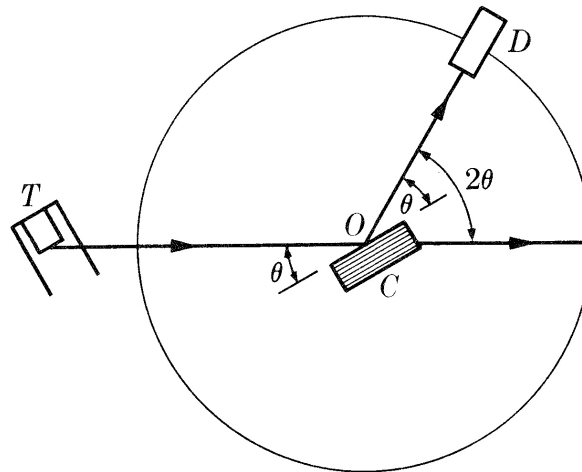


**Abbildung 3.9:** Schematischer Aufbau eines konventionellen dynamischen Lichtstreuungsmessgeräts, aus dem Englischen [191].

### 3.2.7 Untersuchung der Kristallstruktur durch Röntgenbeugung

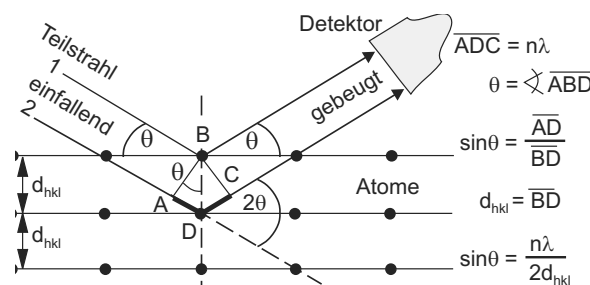
Die Röntgenbeugung (XRD) ist eine wichtige Analysemethode in der Strukturaufklärung und wird seit Anfang des letzten Jahrhunderts für die Charakterisierung von kristallinen Materialien verwendet. Durch die Beugung von Röntgenstrahlen an einem Kristallgitter kann man die Substanzen anhand der Reflexionen identifizieren, da die Beugungserscheinungen jeder Substanz einzigartig sind. Mit Hilfe der Datenbank „Powder Diffraction File“, welche von „Joint Committee of Powder Diffraction Standards“ (JCPDS) erstellt wurde, kann eine Identifizierung einfach durchgeführt werden. Zusätzlich können die Elementarzellenparameter, Partikelgröße sowie die Phasenreinheit analysiert werden. Die untere Nachweisgrenze liegt üblicherweise bei 1-5 % und es können auch einige Defekte und Störungen im kristallinen Feststoff anhand ihrer Beugungseffekte sowie die Spinellform charakterisiert werden [9, 196, 210].

Die wesentlichen Bestandteile eines Röntgenspektrometers sind in Abbildung 3.10 zu sehen. Die aus der Röntgenröhre T produzierte Strahlung trifft auf eine kristalline Probe C auf, welcher im Gerät in jedem gewünschten Winkel gegenüber des einfallenden Strahles positioniert werden kann (vgl. Abb. 3.10 Punkt O). Anschließend trifft die reflektierte Strahlung auf den Detektor D. Die räumliche Positionierung des Kristalls ist wichtig, da die Netzebene  $hkl$  eine bestimmte räumliche Orientierung hat. Dabei wird ihrer Anordnung mechanisch so variiert, dass sich die Netzebenen nacheinander in Reflexionsstellung befinden [211, 212].



**Abbildung 3.10:** Schematischer Aufbau eines Röntgenspektrometers mit Röntgenröhre T, Kristall C und Detektor D [211].

Die Beugungserscheinungen lassen sich mit der Braggschen Gleichung beschreiben, die 1912 W.L. Bragg auf die selektive Reflexion an einer Netzebenenchar zurückführte. Dieser Ansatz basiert auf Atomen, die in Kristallebenen aufgebaut sind und als semi-transparenter Spiegel fungieren. In Abbildung 3.11 ist eine Atomanordnung in einem Kristall zu sehen, bei dem die betrachtete Netzebenenchar mit dem Netzebenenabstand  $d_{hkl}$  parallel zur Oberfläche liegt.



**Abbildung 3.11:** Reflexion von Röntgenstrahlen an einer Netzebenenchar zur Ableitung der Braggschen Gleichung [210].

Wird der Kristall mit monochromatischer Röntgenstrahlung der Wellenlänge  $\lambda$  bestrahlt, so gilt nach dem Reflexionsgesetz, dass der Einfallswinkel gleich dem Ausfallswinkel ist. Treffen Röntgenstrahlen auf ein Kristallgitter, dringen diese unterschiedlich tief ein (vgl. Abb. 3.3), bevor sie an den Atomen des Kristallgitters gebeugt werden. Die reflektierten Röntgenstrahlen sind abhängig von dem Einfallswinkel der Röntgenstrahlung  $\theta$ , der Wellenlänge  $\lambda$  und dem Netzebenenabstand  $d_{hkl}$  und sind aufgrund

ihrer unterschiedlichen Weglänge phasenverschoben. In Abbildung 3.3 beträgt der Weglängenunterschied der beiden Teilstrahlen die Streckenlänge  $\overline{ADC}$ . Ist diese ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge  $\lambda$ , interferieren die Sekundärwellen in Form einer Verstärkung. Bei diesem Winkel  $\Theta$  spricht man vom sogenannten Glanzwinkel. Ist der Gangunterschied  $\overline{ADC}$  kein ganzzahliges Vielfaches, dann interferieren die Teilstrahlungen 1 und 2 zu einer Auslöschung oder schwachen Reflektion. Dieser Zusammenhang wird in der Braggschen Gleichung wiedergegeben [210, 212]:

$$2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta_{hkl} = \lambda \quad (3.3)$$

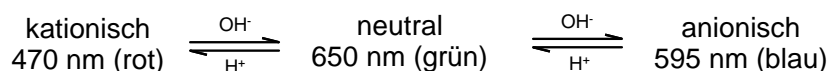
Bei der Gleichung 3.3 handelt es sich um die grundlegende Gleichung in der Röntgendiffraktometrie. Jedoch liegen ihr einige Annahmen zu Grunde, welche mit der Realität nicht übereinstimmen. So werden z.B. Röntgenstrahlen an Atomen in alle Richtungen gestreut und die Kristallebene besteht aus diskreten Atomen, welche nicht genau in einer Flucht untereinanderliegen. Ungeachtet dessen liefert die Braggsche Gleichung das gleiche Ergebnis wie eine strenge mathematische Berechnung [196, 210, 213].

Wenn die Anzahl der Gitterebenen aufgrund kleiner Kristalle gering ist, kommt es zu einer Peakverbreiterung, welche in der Scherrer-Gleichung mit der Kristallgröße verknüpft wird (vgl. Gleichung 3.4). Die Verbreiterung wird üblicherweise als  $d$  angegeben und bei halber Intensität und dem zugehörigen Winkel  $\Theta$  gemessen. Die Gleichung kann angewendet werden, wenn die Partikelgröße kleiner als 200 nm ist, jedoch wird eine mögliche Linienverbreiterung durch Belastungen bzw. Spannungen im Kristall nicht berücksichtigt [196, 214].

$$d = \frac{K_{scher} \cdot \lambda}{FWHM \cdot \cos \theta} \quad (3.4)$$

### 3.2.8 Proteinbestimmung in wässrigen Lösungen mittels Bradford-Methode

Die Proteinbestimmung nach Bradford findet ein breites Anwendungsgebiet bei der Analyse in wässrigen Lösungen, da sie schnell, sensitiv, relativ preiswert, reproduzierbar und spezifisch ist. Weiterhin wird sie durch Pufferchemikalien und reduzierende Stoffe kaum gestört und der zu analysierende Bereich liegt zwischen Mikro- bis Milligramm [215, 216]. Dabei handelt es sich um eine photometrische Analysemethode, die einen proportionalen Verlauf durch die Farbstoffreaktion mit Coomassie Brilliant Blue-G250 erreicht. Der Farbstoff existiert in drei Zuständen: kationisch, neutral und anionisch, wobei jede Form bei unterschiedlicher Wellenlänge  $\lambda$  absorbiert (vgl. Abb. 3.12) [216, 217, 218].



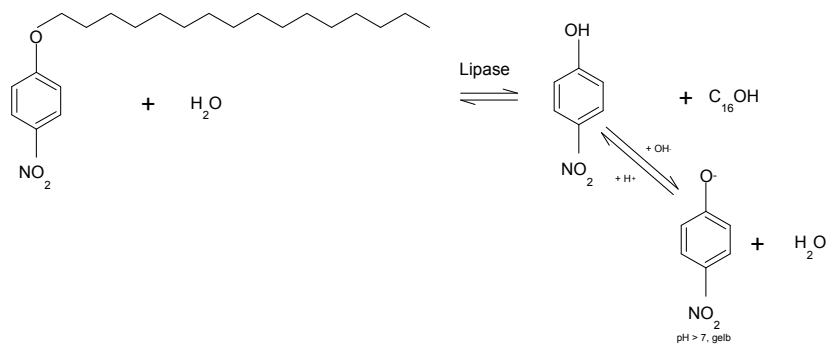
**Abbildung 3.12:** Schematische Darstellung der drei Zustände des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue-G250.

Der Farbstoff wird durch Anbindung vom kationischen in den anionischen Zustand überführt, womit eine Absorptionsverschiebung einhergeht. Der Proteingehalt wird bei

einer Wellenlänge  $\lambda$  von 595 nm bestimmt. Jedoch kann es bei verschiedenen Proteinen zu unterschiedlichen Signalen kommen, was auf die verschieden starke Sorption des Farbstoffes an den Proteinen zurückzuführen ist. Der Farbstoff reagiert hauptsächlich mit Arginin verglichen zu anderen primären Aminogruppen oder aromatischen Resten. Das Bindungsverhalten beruht auf van-der-Waals-Kräften und hydrophobischen Wechselwirkungen [216, 217].

### 3.2.9 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität

Bei der Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität wird eine etablierte Standardreaktion (vgl. Abb. 3.13) verwendet, bei der die initiale Hydrolyserate bestimmt wird. Dabei kommt das Substrat p-Nitrophenylpalmitat (p-NPP) zum Einsatz, welches die Lipase zu p-Nitrophenol (p-NP) spaltet. Das Anion des Produktes hat eine gelbe Farbe und kann photometrisch bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 410 nm bestimmt werden [8, 10, 189, 219, 220].



**Abbildung 3.13:** Schematische Darstellung der Hydrolysereaktion der Lipase, bei der das Substrat p-Nitrophenylpalmitat (p-NPP) zu p-Nitrophenol (p-NP) gespalten wird.

### 3.2.10 Quantitative Bestimmung von Kaffeesäure mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die quantitative Bestimmung von Kaffeesäure wird mittels Flüssigkeitschromatographie im Hochdruckverfahren durchgeführt. Dabei wird sich die Methode der allgemeinen Chromatographie zu Nutze gemacht, bei der Stoffgemische aufgrund von Wechselwirkungen zwischen mobiler und fester Phase getrennt und detektiert werden. Die stationäre Phase besteht bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aus einer Stahlsäule, welche mit einem bestimmten Bettmaterial je nach Trennungsanforderung bzw. -aufgabe gefüllt ist. Die mobile Phase wird für eine bessere Trennleistung mittels einer Hochdruckpumpe über die stationäre Phase geleitet und anschließend das getrennte Probengemisch mit einem Detektor aufgezeichnet und analysiert [221, 222]. Die Bestimmung phenolischer Komponenten mittels HPLC wurde bereits in der Literatur erwähnt [223, 224].

## 3.3 Methodisches Vorgehen

Das Eisenoxid Magnetit wurde aufgrund seines der Partikelagglomeration vorbeugenden superparamagnetischen Verhaltens und der im Vergleich zu Maghemit höheren

magnetischen Sättigung ausgewählt [14]. Zudem verfügt es über eine geringere Toxizität [11] und ein niedrigeres Bestreben zur Oxidation als rein metallische Nanopartikel [9, 14]. Im Folgenden wird auf die Berechnung und die für den Superparamagnetismus kritische Partikelgröße  $d_{krit}$  eingegangen.

In einer vereinfachten Betrachtung zur Bestimmung des kritischen Partikeldurchmessers  $d_{krit}$  wird von einem einachsigen Eindomänenpartikel und einer Anisotropieenergie, die sich zusammensetzt aus dem Volumen  $V$  und der Anisotropiekonstante  $K$  von  $E_A = K \cdot V$ , ausgegangen. Wenn die Eindomänenpartikel klein genug werden, wird  $K \cdot V$  so gering, dass die Energieschwankungen die Anisotropiekräfte überwinden und die Partikel spontan die Magnetisierung von der Vorzugsrichtung in die entgegengesetzte Richtung umkehren können, ohne dass ein Magnetfeld anliegt [20, 108]. Mit Hilfe der Néel-Brown-Gleichung ist dieser Zusammenhang wie folgt gegeben [225, 226]:

$$\tau^{-1} = f_0 \cdot \exp\left(\frac{-K \cdot V}{k \cdot T}\right) \quad (3.5)$$

In der Gleichung 3.5 ist die thermische Energie  $E_{kin} = k \cdot T$  mit der Anisotropieenergie  $K \cdot V$  verknüpft. Für  $E_A = k \cdot T > K \cdot V$  verhält sich das System superparamagnetisch. Der Vorfaktor  $f_0$  liegt im Bereich von  $10^9 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$  und ist nur gering temperatur- und feldabhängig und kann als konstant angenommen werden. Für die folgenden Berechnungen wurde ein Wert von  $10^9 \text{ s}^{-1}$  gewählt [9, 11, 50, 108]. Aus der Gleichung 3.5 geht hervor, dass die Relaxationszeit  $\tau$  abhängig vom Partikelvolumen  $V$  und mit der Messzeit der Remanenz verknüpft ist, die üblicherweise bei 100 s liegt [11, 108]. Mit diesen Annahmen ergibt sich folgende vereinfachte Gleichung für einachsiale Partikel:

$$V = \frac{25 \cdot k \cdot T}{K} \quad (3.6)$$

Mit der Gleichung 3.6 kann mit Hilfe der Anisotropiekonstante  $K$  der kritische Partikeldurchmesser  $d_{krit}$  in Abhängigkeit der Temperatur berechnet werden, welcher den oberen Grenzwert für den Superparamagnetismus darstellt [60, 108]. Unter Verwendung von Literaturwerten für Anisotropiekonstanten (vgl. Tab. 3.6) wurden kritische Partikeldurchmesser bei verschiedenen Temperaturen unter Berücksichtigung des recherchierten minimalen und des maximalen Wertes für sphärische und kubische Partikel berechnet und in Abbildung 3.14 aufgetragen. Als Referenz ist die Berechnung mit der Anisotropiekonstante der nicht superparamagnetischen, makroskaligen Magnetitpartikeln ( $K_{bulk}$ ) ebenfalls dargestellt. Die verschiedenen Werte für die recherchierten Anisotropiekonstanten sind in Tabelle 3.6 gezeigt. Die effektive Anisotropiekonstante  $K_{eff}$  fasst üblicherweise die Kristall- und Formanisotropie zusammen und wird meist experimentell bestimmt. Dagegen ist  $K_1$  die Anisotropiekonstante 1. Ordnung und wird meistens rechnerisch ermittelt. Der recherchierte Bereich der Anisotropiekonstanten (vgl. Tab. 3.6) umfasst  $23 - 580 \text{ kerg} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Bei dem Wert von  $460 - 550 \text{ kerg} \cdot \text{cm}^{-3}$  handelt es sich um beschichtete Partikel, wodurch die Anisotropiekonstante aufgrund von interpartikulären und dipolaren Wechselwirkungsveränderungen evtl. beeinflusst worden ist [11] und daher nicht weiter verwendet wurde. Als Minimalwert wurde die Anisotropiekonstante von  $23 \text{ kerg} \cdot \text{cm}^{-3}$  und als Maximalwert  $580 \text{ kerg} \cdot \text{cm}^{-3}$  verwendet. Die Anisotropiekonstante ist material- und partikelformabhängig [9, 227] und kann in Eindomänenpartikeln unterschiedlich vom makroskopischen Pendant aufgrund von

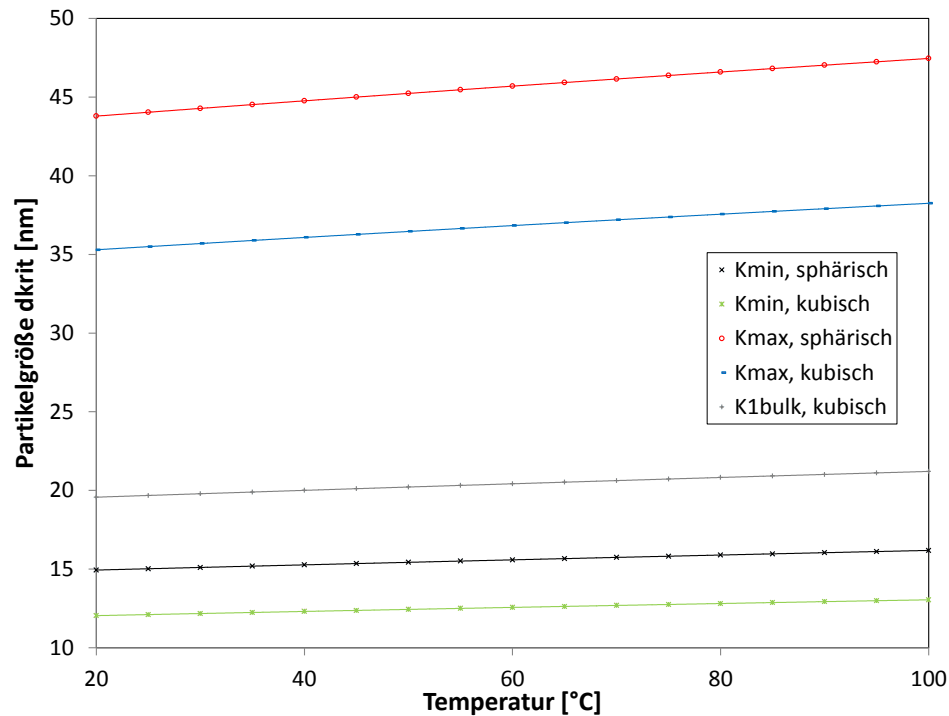
Oberflächen- und Formanisotropie sein [9, 11, 20, 60].

**Tabelle 3.6:** Anisotropiekonstanten für Magnetit.

Bezeichnung	Anisotropiekonst. [ $\text{kerG} \cdot \text{cm}^{-3}$ ]	Sonstiges	Quelle
$K_1$	580	Kopräzitations synthese	[227]
K	140	Kopräzitations synthese, Partikelgröße 11-17 nm	[109]
$K_1$	468		[60]
$K_{1,bulk}$	135		[60]
$K_{eff}$	23	d = 5 nm	[60]
K	24	Partikeldurchmesser 5 nm ummantelt mit Tensidschicht	[228]
$K_1$	110		[108]
K	460 - 550	thermische Dekomposition mit Ölsäure und Oleyamin, Partikeldurchmesser 8,5 nm	[229]

In Abbildung 3.14 ist die kritische Partikelgröße in Abhängigkeit der Temperatur, der Partikelform sowie der Anisotropiekonstanten zu sehen. Auffällig ist, dass mit steigender Temperatur die kritische Partikelgröße  $d_{krit}$ , unterhalb welcher sich der Eindomänenpartikel superparamagnetisch verhält, zunimmt. Zudem ist zu erkennen, dass die kubische Form eine kleinere kritische Partikelabmessung als sein sphärisches Gegenstück hat, wobei der Unterschied auch abhängig von der Anisotropiekonstanten ist. Bei  $K_{min}$  beträgt die mittlere Abweichung ca. 3 nm, wogegen sie bei  $K_{max}$  ungefähr 9 nm entspricht. Der Einfluss der Anisotropiekonstanten ist anhand des Unterschieds zwischen der kritischen Partikelgröße im sphärischen Fall von ca. 30 nm und im kubischen Fall von ca. 24 nm erkenntlich. Der errechnete kritische Durchmesser unter Verwendung der Anisotropiekonstanten des makroskopischen Magnetits liegt ungefähr bei 19-21 nm und befindet sich somit eher im Größenbereich der mit  $K_{min}$  durchgeführten Berechnungen. Aufgrund dieser Berechnung und der Annahme, dass die maximale Anisotropiekonstante etwas hoch erscheint, wurde für die nachfolgenden Syntheseveruche eine Partikelgröße um die 28 nm angestrebt. Diese Partikelgröße entspricht dem ungefähren Grenzwert und stimmt auch mit der Partikelgröße von Kobayashi von 30 nm gut überein [31]. Für die Anwendung in einem magnetischen Abtrennprozess ist es wichtig, die Partikelgröße unweit des kritischen Durchmessers  $d_{krit}$  zu wählen, da mit sinkendem Durchmesser die magnetische Sättigung  $M_s$  des Partikels abnimmt [109] und dadurch die magnetische Prozessführung erschwert wird [59].

Als Synthesewege für die Kolloidbildung des Magnetits wurden die nasschemischen Verfahren der Kopräzitation und der oxidativen Herstellung gewählt, da diese Verfahren ohne Lösungsmittel auskommen, einfach und preiswert durchzuführen sind und über hohe Ausbeuten verfügen (vgl. Kapitel 2.3.2).



**Abbildung 3.14:** Abhängigkeit der kritischen Partikelgröße  $d_{krit}$  von der Temperatur. Bei der Annahme einer kubischen Gestalt ist die Partikelkantenlänge in nm und bei einer sphärischen Form ist der Partikeldurchmesser in nm angegeben,  $K_{1,bulk}$  ist die Anisotropiekonstante des makroskopischen Magnetits.

Zur Wahl des Trocknungsverfahrens wurden zunächst Versuche durchgeführt. Hierbei wurden zwei verschiedene Möglichkeiten untersucht. Zum einen eine Trocknung bei niedriger Temperatur von 40 °C über mehrere Tage. Die niedrige Temperatur soll laut Schwertmann et al. gering genug sein um Phasentransformation oder -modifikationen zu verhindern [61]. Zum anderen wurde ein Gefriertrocknungsverfahren untersucht. Dabei war das Ziel, die Oxidation der Eisenionen zu verhindern um somit ein möglichst reines Produkt zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass die Methode der Gefriertrocknung nicht für Magnetitpartikeln geeignet ist. Die Partikel wiesen im Gegensatz zu der Trocknung im Trockenschrank eine bräunliche Verfärbung auf, welche auf eine Phasentransformation zu Maghemit und Goethit hinweist. Diese Beobachtung stimmt auch mit den Röntgenbeugungsspektren der beiden Proben überein. Das Spektrum des gefriergetrockneten Magnetits zeigte zwei zusätzliche Peaks, die auf Maghemit hindeuten. Die Berechnung der Gitterkonstanten  $a$  ergab einen geringeren Wert bei der gefriergetrocknete Probe, was auch in Einklang mit der Phasentransformation zu Maghemit steht. Da die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser in kälteren Zustand besser ist, wird angenommen, dass die höhere Sauerstoffkonzentration in der gefrorenen Probe zu einer vermehrten Oxidation zu Maghemit führte (vgl. Kapitel 2.3). Deshalb wurde in den nachfolgenden Versuchen die verschiedenen Partikelproben bei einer Temperatur von 40 °C getrocknet.

Ausschlaggebend für die Durchführung der Partikelfunktionalisierung und Enzymimmobilisierung sind der Erhalt der größenspezifischen Eigenschaften des Trägermaterials sowie die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität für die nachfolgende Anwendung. Weiterhin müssen bei den gegebenen Prozessbedingungen sowohl Bindungs- als auch Suspensionsstabilität gegeben sein, um die Einsatzfähigkeit der Partikel als Trägerma-

terial für die Enzymimmobilisierung sicher zu stellen. Als geeignete Methode beider Vorgänge hat sich die Verwendung eines Überkopfschüttlers als besonders geeignet erwiesen. Außerdem waren die Reproduzierbarkeit sowie die Einfachheit des Verfahrens ausschlaggebend für dessen Umsetzung. Als Suspensionsmedien der funktionalisierenden Substanzen wurden neben verschiedenen Puffern auch Wasser und DMF verwendet, um den Einfluss der Pufferionen sowie der organischen, unverdünnten Lösungsmittel auf die Anbindung und die Suspensionsstabilität zu untersuchen. Die Anfangswerte der Funktionalisierung und Immobilisierung wurden aufgrund von Löslichkeitsgrenzen und einer Literaturstudie festgelegt. Vorversuche haben gezeigt, dass eine erhöhte Partikelkonzentration im Reaktionsvolumen zu erhöhter Agglomeration führt. Deshalb wurde die Partikelkonzentration  $c_m$  auf  $1,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  festgelegt.

Die funktionellen Hydroxylgruppen des Magnetits sind entscheidend für die Oberflächenreaktivität und damit von enormer Bedeutung für die Funktionalisierung (vgl. Kapitel 2.3.3 und 2.4.1). Da angenommen wird, dass die Anbindung über die Hydroxylgruppen des Magnetit stattfindet, ist eine erste Abschätzung der Konzentration an Hydroxylgruppen in den eingesetzten Versuchen hilfreich (vgl. Gleichung 3.7). Wie bereits im Theorieteil erwähnt, ist die Dichte der Hydroxylgruppen für Magnetit von der Kristallstruktur abhängig und wird mittels potentiometrischer Titration auf  $5\text{--}10 \text{ nm}^{-2}$  abgeschätzt [14, 34]. Unter Zuhilfenahme der Avogadrozahl  $N_A$  und der eingesetzten Konzentration ( $c_m = 1,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) sowie der spezifischen Oberfläche ( $S_v = 60 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) kann die molare Konzentration funktioneller Hydroxylgruppen mit der Gleichung 3.7 berechnet werden und ergibt sich zu  $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Die Konzentration der Funktionalisierungssubstanzen wurde somit im Überschuss zugegeben.

$$c_{Mol,OH} = \frac{c_{S_v,OH} \cdot S_v \cdot c_m}{N_A} \quad (3.7)$$

Jedoch muss berücksichtigt werden, dass nicht alle funktionellen Hydroxylgruppen an der Magnetitoberfläche z.B. aufgrund von Agglomerationen für die Funktionalisierungen und Immobilisierungen zugänglich sind. Deshalb ist der minimale recherchierte Wert der funktionellen Hydroxylgruppen in die Berechnung eingegangen. Um die theoretische Beladung der Funktionalisierungssubstanz abschätzen zu können, ist die Koordination der Funktionalisierungssubstanzen an den Oberflächenhydroxylgruppen des Magnetits entscheidend, da sich die angebundene Menge bei einer einzähnigen und einer zweizähnigen Anbindung unterscheidet. Bei einer einzähnigen Anbindung können bei einer Molmasse  $M$  von  $190 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  ungefähr  $2,2 \text{ mg}$  Funktionalisierungssubstanz auf den Partikeln vorhanden sein.

Schätzt man weiter die Parameter für die Immobilisierung ab und geht von einer gleichbleibenden spezifischen Oberfläche  $S_v$  von  $60 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  und einer einschichtigen Anbindung der BSA-Moleküle mit einer Dimension von  $4,2 \text{ nm} \times 14,1 \text{ nm}$  aus, können an einem Gramm Magnetitpartikel ungefähr  $10^{18}$  Moleküle binden. Die Molekülmasse  $m_M$  beträgt  $66.500 \text{ Da}$ , so dass die theoretisch gebundene Menge ca.  $0,1 \text{ g}_{BSA} \cdot \text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$  entspricht. Diese BSA-Beladung wurde nur in Bezug auf die Größe der beiden Oberflächen berechnet. Nimmt man jedoch eine Bindung zwischen Funktionalisierungsmolekül und Protein an, kann die Anzahl der Hydroxylgruppen des Magnetits und der Anbindung der Funktionalisierungssubstanz abgeschätzt werden. Hierbei ist allerdings ungewiss, ob

es zu einer ein- oder zweizähnigen Anbindung der Funktionalisierungssubstanz über die Hydroxylgruppen der Oberfläche kommt. Bei einer einzähnigen Anbindung entspricht die Stoffmengenkonzentration der Hydroxylgruppen derer der Funktionalisierungssubstanz auf der Partikeloberfläche. Eine zweizähnige Bindungsbildung führt hingegen zu einem Konzentrationsverhältnis von Hydroxylgruppen zur Funktionalisierungssubstanz von 2:1. Geht man davon aus, dass sich eine Anbindung der Proteine über die Carboxyl- oder Aminogruppe der Funktionalisierungssubstanz ausbildet und sich pro Funktionalisierungsmolekül ein Proteinmolekül bindet, würden sich theoretisch pro Gramm Magnetit  $3 \cdot 10^{20}$  BSA-Moleküle binden. Aus einem Vergleich dieses Wertes mit dem auf die Oberflächengröße bezogenen Wert geht jedoch hervor, dass hierzu der Platz am Partikel nicht ausreichend ist. Bei einer zweizähnigen Anbindung des Funktionalisierungsmoleküls würden sich die Hälfte der BSA-Moleküle auf der funktionalisierten Magnetitoberfläche anlagern, was immer noch den theoretisch ermittelten Wert aufgrund des Platzbedarfes überschreitet, so dass die maximale Beladung aufgrund der räumlichen Anordnung beschränkt ist. Die BSA-Konzentration wurde im Überschuss dem Reaktionsansatzes zugegeben.

Die Größe des Enzyms Lipase *Candida rugosa* wurde mit Hilfe des pdb-Codes aus der Datenbank Brenda [185] und dem Swiss pdb-Viewer abgeschätzt. Dabei ergab sich eine maximale Dimension von 6,8 nm x 6,3 nm, was etwas kleiner als die Abmaße des BSA-Moleküls ist. Aufgrund der räumlichen Abschätzung ergibt sich eine Molekülbeladung von  $1,4 \cdot 10^{18}$  Moleküle pro Gramm Magnetit. Das Molekulargewicht  $m_M$  von der Lipase *Candida rugosa* beträgt 58.000 Da [230]. Das Enzym Lipase *Candida rugosa* wurde aufgrund seines großen Toleranzbereiches hinsichtlich Temperatur und pH-Werte als Standardenzym verwendet. Für die Enzymimmobilisierung wurden zuvor die funktionellen Amino- und Carboxylgruppen mit den Substanzen CDI und Glutaraldehyd aktiviert, um eine kovalente Bindung zu erreichen. Da diese Verfahren bereits in der Literatur etabliert sind, wurde die Aktivierung gemäß Koneracká et al. [42] und Dyal et al. [231] durchgeführt.

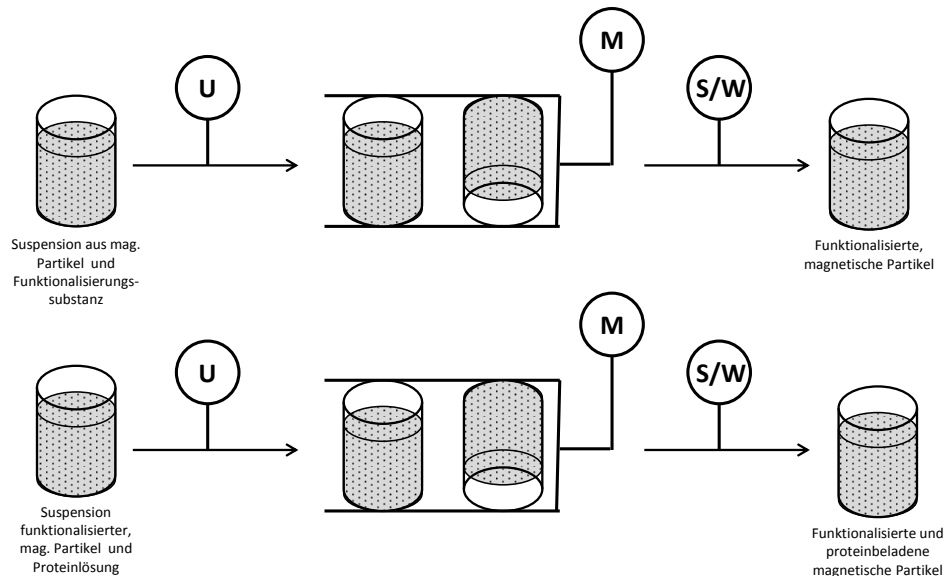
## 4 Experimentelle Durchführung

In diesem Kapitel werden die Durchführung der Versuche sowie der Analysen beschrieben. Es werden dabei der genaue Testablauf der Funktionalisierung und Immobilisierung sowie die Stabilitätsversuche erläutert.

### 4.1 Funktionalisierung und Immobilisierung

Die Oberflächenmodifikation und die anschließende Proteinanbindung wurden mit Schüttelversuchen in einem Überkopfschüttler realisiert. Dabei wurden verschiedene Prozessparameter wie pH-Wert, Konzentration, Funktionalisierungssubstanz, Temperatur und Reaktionsvolumen geändert. Die verschiedenen Prozessschritte fanden getrennt voneinander statt. In Abbildung 4.1 ist die Durchführung schematisch dargestellt. Dabei wurde eine bestimmte Menge getrockneten Magnetits mit der funktionalisierenden Substanz zur Reaktion gebracht. Um Partikelagglomerationen des trockenen Magnetits zu zerstören, wurde die Partikelsuspension vorher für fünf Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in einem Überkopfschüttler eingespannt und für einen bestimmten Zeitraum mit einer Drehzahl  $\omega$  von  $34 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  geschüttelt. Im Anschluss wurden die Partikel von der Reaktions suspension mittels magnetischer Separation abgetrennt und mit Reinstwasser dreimal gewaschen. Danach wurde die Proteinanbindung mit der Zugabe der Proteinlösung gestartet, wobei eine fünfminütige Ultraschallbehandlung voranging. Nach einer festgelegten Reaktionszeit wurden die Partikel von der Proteinlösung magnetisch abgetrennt und wieder mit Reinstwasser gewaschen. Der Überstand der Proteinlösung sowie die Waschlösungen wurden aufgefangen und einem Proteintest unterzogen. Die funktionalisierten sowie die funktionalisierten und immobilisierten Partikel wurde bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  für ca. 48 h getrocknet, gemörsert und in verschlossenen Glasgefäßen gelagert.

Bei den Versuchen zur kovalenten Enzymanbindung wurde zwischen der Funktionalisierung und der Immobilisierung ein Aktivierungsschritt hinzugefügt, der die funktionellen Gruppen der beschichteten Partikel für die Immobilisierung aktivieren sollte. Dafür wurden Glutaraldehyd (Glut) und Carbodiimid (CDI) verwendet (vgl. Kapitel 2.5.1). Bei diesem Zwischenschritt wurden die Partikel wieder mit Ultraschall behandelt und nach der Aktivierungsreaktion gewaschen. Anschließend wurde eine Enzymanbindungsreaktion wie bei der BSA-Anbindung durchgeführt. Nach der Enzymimmobilisierung wurden die immobilisierten, aktivierten und funktionalisierten Partikel gewaschen und 1 ml des  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris-HCl-Puffer zugegeben, damit die Enzymaktivität der Partikel direkt bestimmt werden konnte. Des Weiteren wurden die Überstände aufgefangen, um die Aktivität und den Proteingehalt zu analysieren.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung: U: Ultraschallbehandlung, M: Motor, S: magnetische Separation, W: Waschverfahren.

## 4.2 Stabilitätsuntersuchungen

Stabilitätsuntersuchungen wurden sowohl mit den funktionalisierten als auch den funktionalisierten und immobilisierten Partikeln durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde zuerst eine ausreichende Menge an Partikeln parallel unter denselben Bedingungen hergestellt, die Proben anschließend homogenisiert und mit Hilfe der im Folgenden beschriebenen Analysemethoden untersucht. Anschließend wurde eine Probe zusammen mit den Puffersubstanzen für eine bestimmte Dauer geschüttelt. Danach wurde die Probe gewaschen, analysiert und mit der Ausgangsprobe verglichen.

## 4.3 Analytische Untersuchungen

### 4.3.1 Quantifizierung der Partikelladung durch Messungen des Zetapotentials

Das Zetapotential wurde mit dem Zetasizer 2000 der Firma Malvern gemessen. Dafür wurden wässrige Probensuspensionen mit einer Konzentration  $c_m$  von  $0,15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  und unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von 4-10 durch Zugabe von  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Natronlauge oder  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Salzsäure hergestellt. Die Proben wurden 12 h auf einem Horizontalschüttler bei 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der pH-Wert bestimmt und die Proben in einer fünfminütigen Ultraschallbadbehandlung homogenisiert und gemessen. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 4.3.2 Bestimmung der spezifischen Oberfläche mittels Adsorptionsisotherme

Die Oberflächenmessung wurde mit dem Gerät Nova 3000E der Firma Quantachrome bestimmt. Dafür wurden ca. 2 mg der Probe in einer Zelle eingewogen, welche vor der Messung im Vakuum bei 60 °C für mindesten drei Stunden getrocknet wurde. Anschließend wurde die Messung mit Stickstoff durchgeführt und die Ergebnisse mit der Software NoraWin ausgewertet.

### 4.3.3 Bestimmung des thermogravimetrischen Verhaltens

Das thermogravimetrische Verhalten wurde mit dem Gerät TGA/DSC1 der Firma Mettler Toledo untersucht. Dabei wurden ca. 10-20 mg Probe auf einem Tiegel mit einer konstanten Heizrate  $\beta$  von 5 °C · min<sup>-1</sup> auf 500 °C erhitzt. Als Atmosphärgas bei der Probenmessung wurde Luft verwendet. Die Auswertung erfolgt mit der Software *Star*®.

### 4.3.4 Strukturuntersuchungen durch Elektronenmikroskopie

Die Partikelaufnahmen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop Leo 1530 Gemini von Zeiss unter Verwendung eines Inlens Detektors bei einer Beschleunigungsspannung  $U$  von 5 kV aufgenommen. Für die Probenvorbereitung wurden ungefähr 2,5 mg Partikel in 2 ml Ethanol gelöst und mit einer Ultraschallsonde Bandelin Sonoplus für 5 min mit einer Frequenz von 20 kHz im Pulsbetrieb 3 homogenisiert. Anschließend wurden ca. 10  $\mu$ l der Probensuspension auf einen Aluminiumprobenträger pipettiert und für mindestens zwölf Stunden bei 60 °C getrocknet. Um die Proben leitfähiger zu machen und Aufladungen zu vermeiden, wurden sie vor der Analyse mit einer Rotationseinheit für 20 s bei einem Strom  $I$  von 40 mA mit Gold besputtert.

### 4.3.5 Detektion funktioneller Gruppen durch Infrarotspektrometrie

Mithilfe der FTIR-Analyse wurde das Auftreten organischer Banden der funktionalisierten Substanzen bzw. der Proteine im Vergleich zum anorganischen Trägermaterial Magnetit untersucht, was einen qualitativen Rückschluss auf die Anbindung erlaubte. Für die Probenvorbereitung wurde die übliche Kaliumbromidpresslingmethode für Feststoffe verwendet, da Kaliumbromid keine störenden Absorptionsbanden besitzt (vgl. Kapitel 3.2) [168]. Dabei wurde das gemörserte Probenmaterial mit Kaliumbromid in einem Verhältnis von 1:100 gemischt und anschließend durch Mörsern zu einem feinem Pulver homogenisiert. Jeder Pressling bestand aus 100 mg der Proben-KBr-Mischung und wurde mittels einer hydraulischen Handpresse bei einem Druck  $p$  von 0,65 t · cm<sup>-2</sup> zum Sintern gebracht. Der entstandene Pressling wurde mit dem FTIR-Gerät Alpha der Firma Bruker im Wellenzahlenbereich von 500 – 4000 cm<sup>-1</sup> und einer Auflösung von 4 cm<sup>-1</sup> vermessen. Vor jeder Probenmessung wurde eine Hintergrundmessung durchgeführt, welche anschließend von der Probenmessung subtrahiert wurde. Trotz dieser Maßnahme kam es zum Teil zu Luftveränderungen in der Probenkammer,

welche sich in einer  $CO_2$ -Bande bei ca.  $2400\text{ cm}^{-1}$  bemerkbar macht [168]. Die Auswertung erfolgte mit der Messsoftware OPUS 6.5, mit der die Mittelwertbildung sowie die Grundlinienkorrektur durchgeführt wurden.

#### 4.3.6 Bestimmung der Partikel- bzw. der Agglomeratgröße durch dynamische Lichtstreuung

Die Partikel- bzw. Agglomeratverteilung wurde mit dem Mastersizer von Malvern vermessen. Dafür wurde eine Suspension mit einer ungefähren Partikelkonzentration von  $2\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  angesetzt, welche vor der Probenmessung für 30 s mittels einer Ultraschallsonde dispergiert wurde. Diese homogenisierte Partikelsuspension wurde in den Dispergierer pipettiert, bis eine Sättigung von 10 % erreicht wurde. Es wurde eine Doppelbestimmung der vermessenen Proben durchgeführt und die Mittelwerte des  $d_{50}$  sowie der Größenverteilung gebildet.

#### 4.3.7 Untersuchung der Kristallstruktur durch Röntgenbeugung

Für die Charakterisierung der Kristallstruktur wurde das Diffraktometer D 500 der Firma Siemens mit Kupferstrahlung einer Wellenlänge  $\lambda$  von  $0,15406\text{ nm}$  verwendet. Der vermessene Winkelbereich 2-Theta betrug  $10\text{--}70^\circ$ . Es gab zwei verschiedene Arten der Probenvorbereitung. Üblicherweise wurden für die synthetisierten Magnetite ca.  $1\text{ g}$  Probe in die dafür vorgesehenen Probenhalter verpresst. Dagegen wurden die funktionalisierten und immobilisierten Proben mit einer Masse von ca.  $10\text{--}20\text{ mg}$  auf einen mit Silikonpaste bestrichenen Glasträger gestreut. Die Peakmaxima bei geringer Probenmenge sind deutlich niedriger als bei großen Probenmengen, da es durch die geringere Probenmenge zu einer geringeren Reflexion an den Gitterebenen kommt und somit die Intensität der Reflexion geringer ist. Die Auswertung wurde mit Hilfe des Programms Eva in Verbindung mit der „Powder Diffraction File“ Datenbank (vgl. Kapitel 3.2) durchgeführt. Die Datenbank wurde verwendet um Nebenprodukte, die während der Magnetitsynthese entstanden sind, zu charakterisieren. Die Partikelgröße sowie die Gitterkonstante wurden mit dem Eva-Programm unter Verwendung der Scherrer-Gleichung (vgl. Gleichung 3.4) bestimmt.

#### 4.3.8 Proteinbestimmung in wässrigen Lösungen mittels Bradford-Methode

Um auf den Anteil des an den Träger gebundenen Proteins schließen zu können, wurde die Proteinkonzentration vor und nach der Immobilisierung in der Suspension bestimmt. Dafür werden ein Farbreagenz und eine Proteinstammlösung benötigt. Als Bradfordfarbreagenz wurde Roti-Quant verwendet, welches vor der Anwendung im Verhältnis 1:5 mit Reinstwasser verdünnt wurde. Die Lösung wurde lichtgeschützt bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Für das Erstellen der Kalibriergeraden wurde eine BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von  $5\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in Wasser angesetzt und im gefrorenen Zustand aufbewahrt. Die BSA-Stammlösung wurde für einen Konzentrationsbereich von  $0\text{--}1000\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  mit Wasser verdünnt und als Standard verwendet. Für die Messung werden  $10\text{ }\mu\text{l}$  Probe bzw. Standard und  $990\text{ }\mu\text{l}$  Bradfordfarblösung in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und anschließend mit einem Vortexer gemischt. Die Reaktionszeit

betrug 5 min und die Extinktion  $E_x$  wurde mit einem Hach Lange Photometer bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 595 nm vermessen. Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung jeder Probe durchgeführt. Falls es berechnete negative Werte gab, wurden diese zu null gesetzt.

### 4.3.9 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität

Der Aktivitätstest wurde für die Bestimmung der Restaktivität des gebundenen Enzyms am Träger, des freien Enzyms vor und nach der Behandlung (als Vergleichsprobe) sowie der Enzyme im Überstand der Reaktion verwendet. Die p-NPP-Ethanol Stammlösung hatte eine Konzentration von  $0,0037 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$  und wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Vor der Verwendung wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris-HCl Puffer (pH 8) verdünnt. Das Gesamtvolumen einer Probe betrug  $1000 \mu\text{l}$ , davon waren  $900 \mu\text{l}$  Substratlösung und die restlichen  $100 \mu\text{l}$  bildeten eine Mischungskombination aus Enzymlösung bzw. Partikelsuspension und Puffer, die der Aktivität angepasst wurde. In der Regel wurde ein Verhältnis von 1 : 4 für Partikel-Enzymsuspensionen verwendet, wogegen das Verhältnis 1 : 99 beim nativen Enzym betrug. Die Proben wurden bei  $25^\circ\text{C}$  und einer Drehgeschwindigkeit  $\omega$  von  $1400 \text{ min}^{-1}$  in einem Thermoschüttler der Firma Eppendorf in einem Zeitbereich von 1-12 min inkubiert und direkt auf Eis gestellt. Die Proben wurden bei  $4^\circ\text{C}$  drei Minuten bei einer Drehzahl  $\omega$  von  $13000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und der Überstand anschließend in einen Hach Lange Photometer bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 410 nm vermessen. Die Enzymaktivität wird über die Steigung der Extinktion als Funktion der Zeit mit Gleichung 4.1 berechnet und mit dem Extinktionskoeffizient von  $17,6 \text{ ml} \cdot (\text{umol} \cdot \text{cm})^{-1}$  [232, 233] bestimmt.

$$EAK = \frac{\Delta A_{410} \cdot V_s}{V_{ls} \cdot L \cdot \epsilon_{410}} \quad (4.1)$$

### 4.3.10 Quantitative Bestimmung von Kaffeesäure mittels Hochleistungschromatographie

Die quantitative Bestimmung der Kaffeesäure mittels Hochleistungschromatographie (HPLC) wurde für die Adsorptionskinetik und die Stabilitätsversuche der Kaffeesäurefunktionalisierung verwendet. Dafür wurde das Gerät Agilent 1100 Series mit einer LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 ( $5 \mu\text{m}$ ) LiChroCART<sup>®</sup> 250-4 Säule und einer Retentionszeit von 12 min eingesetzt. Das Eluat bestand aus 90 % Methanol, ca. 10 % Wasser und  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Ameisensäure und wurde mit einer Flussrate von  $0,75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  betrieben. Dafür wurde eine Kalibrierkurve im Bereich von  $10 - 1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  mit einem Injektionsvolumen von  $10 \mu\text{l}$  aufgenommen. Das Injektionsvolumen bei den Proben der Stabilitätsversuche wurde verdoppelt und negative Werte wurden zu null gesetzt.

# 5 Ergebnisse und Diskussion

## 5.1 Funktionalisierung

Um den Erfolg einer Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel und einer anschließenden Proteinimmobilisierung zu bewerten, sind eine Vielzahl von Einflussfaktoren zu beachten. Nicht nur das Ergebnis der Proteinbeladung ist entscheidend, sondern auch das Zusammenspiel der verschiedenen Einflussfaktoren muss bei einer Bewertung berücksichtigt werden um die optimale Lösung zu finden. So ist z.B. die Stabilität der Partikelsuspension mit der Proteinanbindung und dem Agglomerationsgrad verknüpft. Weiterhin sind die Stabilität des Trägermaterials sowie die Anbindung von Protein und Beschichtungsmolekül ausschlaggebend für das Gelingen. Zusätzlich ist die Suspensionsstabilität für eine Bewertung von wesentlicher Bedeutung und wird mit Hilfe von Zetapotentialmessungen berücksichtigt.

Die Auswahl der Puffermedien wurde durch Vorversuche getestet. Dabei erwies sich Phosphatpuffer als ungeeignet für die Funktionalisierung. Es wurde durch Messung der FTIR-Spektren festgestellt, dass sich Phosphat an der Magnetitoberfläche anlagert, was sich in zusätzlichen Phosphatbanden zeigt. Da die Bindungsplätze der funktionellen Gruppen an Magnetit bei einer spezifischen Adsorption begrenzt sind [117], kann es zu einer Konkurrenzreaktion zwischen dem Phosphat und der Funktionalisierungssubstanz kommen, was zu einer nicht vollständigen oder instabilen Beschichtung führen könnte. Auch andere Veröffentlichungen berichten von einer starken Komplexierung von Phosphat an Eisenoxidoberflächen [96, 117].

Weiterhin wurde der Partikelverlust während des Waschverfahrens durch eine gravimetrische Methode ermittelt. Daraus konnte geschlossen werden, dass pro Waschung durchschnittlich ein Partikelverlust von  $0,6 \pm 0,19\%$  der Ausgangspartikel zu verzeichnen ist, was vernachlässigbar gering ist. Somit wurden die Beladungen auf die eingesetzte Partikelmenge bezogen, welche dann leicht unterhalb des gemessenen Wertes liegt.

Vorversuche, in denen eine gemeinsame Funktionalisierung stattfand, haben gezeigt, dass alle verwendeten Substanzen den Proteintest nach Bradford stören. Aus diesem Grund fand in den folgenden Versuchen eine separate Funktionalisierung und Immobilisierung statt, um so die Störung des Testes zu vermeiden. Kam es trotz getrennter Durchführung zu verfälschten Ergebnissen, wurde auf eine instabile Anbindung der funktionalisierten Substanzen geschlossen, welche den Proteintest nach Bradford aufgrund des Ablösens vom Magnetit während der Immobilisierung störten. Negative Beladungen wurden zu null gesetzt. Magnetische Eigenschaften der Partikel wurden nicht detailliert untersucht, konnten jedoch durch die magnetische Abtrennung bei allen Proben nachgewiesen werden.

### 5.1.1 Einfluss von BSA und Puffersubstanzen auf die Funktionalisierung

Zunächst wurden die Einflüsse des BSAs und der Puffersubstanzen auf die Magnetitnanopartikel für die Funktionalisierung getestet. Dafür wurden die Nanopartikel direkt in die BSA- und Pufferlösungen gegeben, um den Einfluss der verschiedenen Substanzen auf den Magnetit zu untersuchen. Diese Ergebnisse geben einen ersten Anhaltspunkt des Verhaltens der beiden Substanzen und können mit den Funktionalisierungsergebnissen verglichen werden.

In Tabelle 5.1 sind die Proteinbeladungen der direkten Immobilisierung des Trägermaterials mit BSA in Abhängigkeit des pH-Wertes gezeigt. Dabei wird ersichtlich, dass die Proteinbeladung abhängig von dem pH-Wert der Immobilisierung ist. Die maximalen Beladungen werden im schwach sauren (pH 5,7) bis hin zum neutralen pH-Wertbereich erreicht, was durch die Lage der IEP von Magnetit und BSA zu erklären ist. Der IEP des BSAs liegt bei pH 5,4 (vgl. Kapitel 3), so dass bei einem pH-Wert von 5,7 das Protein nahezu neutral bis leicht negativ in der Lösung vorliegt. Dagegen liegt der Magnetit bei einem pH-Wert von 5,7 positiv geladen vor und somit wirken keine elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen der Partikeloberfläche und dem Protein.

**Tabelle 5.1:** Proteinbeladung von unbehandeltem Magnetit (Mi) bei unterschiedlichen pH-Werten.

pH-Wert	Puffersubstanz	Beladung [ $mg_{BSA} \cdot mg_{Mi}^{-1}$ ]
4	EA	$0,08 \pm 0,02$
5,7	EA	$0,13 \pm 0,01$
7	Tris	$0,11 \pm 0,01$
9	Tris	$0,05 \pm 0,02$
10,3	Tris	$0,08 \pm 0,03$
Wasser	-	$0,08 \pm 0,03$

In der Nähe des pH-Wertes von 7 liegt der IEP des Magnetits (IEP 7,3), so dass sich die Ladungen der beiden Bindungspartner im Vergleich zu pH 5,7 verändern. Bei pH 7 ist der Magnetit neutral bis leicht positiv geladen. Das Protein BSA ist stark negativ geladen. Aufgrund der elektrochemischen Zustände in diesem pH-Bereich wird die höchste Anbindung erzielt.

Eine mögliche Erklärung für die gute Anbindung im sauren pH-Bereich wäre die Vielzahl an Thiolgruppen, die BSA besitzt und welche protoniert vorliegen. Dies konnte jedoch nach Brandt et al. ausgeschlossen werden, da Versuche mit blockierten Thiolgruppen ähnlich gute Ergebnisse bei einer Anbindung von BSA im Sauren zeigten [15]. Es wurde festgestellt, dass BSA zu einer Strukturveränderung im sauren pH-Bereich neigt, bei der sich die Proteinoberfläche verändert [234], woraus eine erhöhte Affinität zur Partikeloberfläche resultieren könnte. Die Anbindung im Basischen ist aufgrund

der elektrostatischen Bedingungen geringer, da beide Oberflächen negativ geladen sind und somit die elektrostatische Abstoßung einer Anbindung entgegenwirkt.

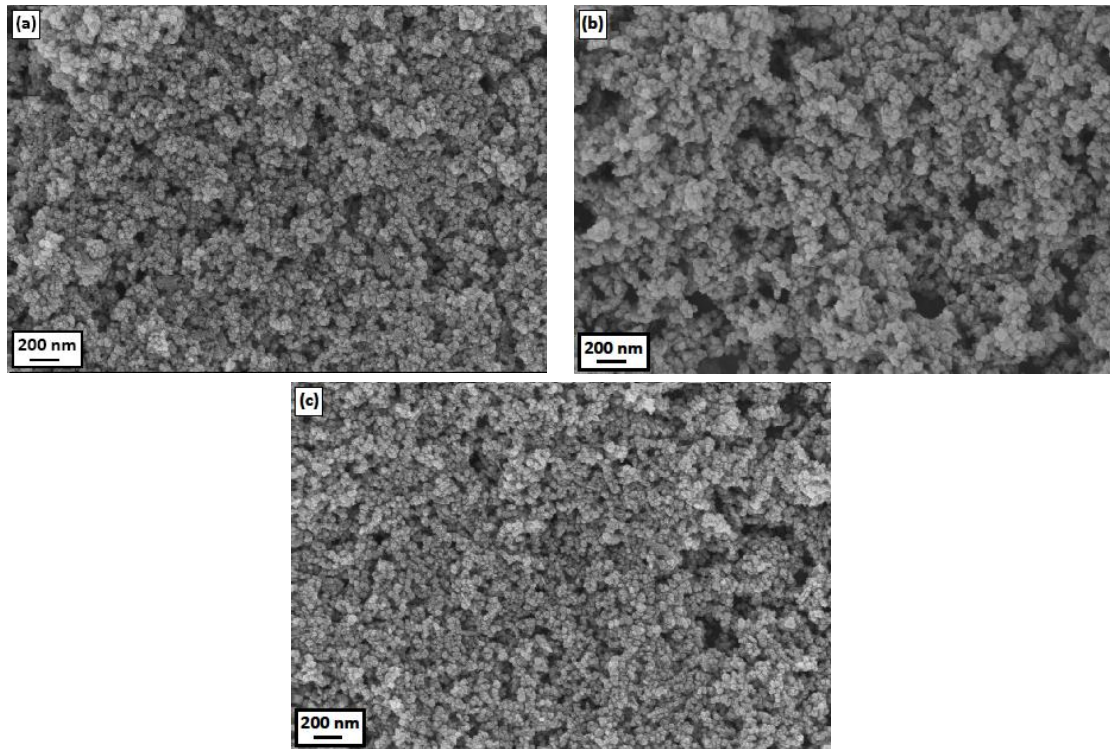
Die mit Puffer vorbehandelten Partikel, welche anschließend mit BSA in Wasser und EA-Puffer bei pH 5,7 immobilisiert wurden, zeigen wie zuvor, dass die Immobilisierung bei verschiedenen pH-Werten auch zu unterschiedlichen Beladungen führt und eine höhere Beladung wieder bei einer Immobilisierung bei pH 5,7 im Vergleich zu Wasser erreicht wird (vgl. Tab. 5.2). Die Vorbehandlung hat wenig Einfluss auf die anschließende Proteinbeladung, was sehr gut an der Immobilisierung bei einem pH-Wert von 5,7 zu erkennen ist.

**Tabelle 5.2:** Proteinbeladung von unbehandeltem Magnetit bei unterschiedlichen Vorbehandlungen und pH-Werten.

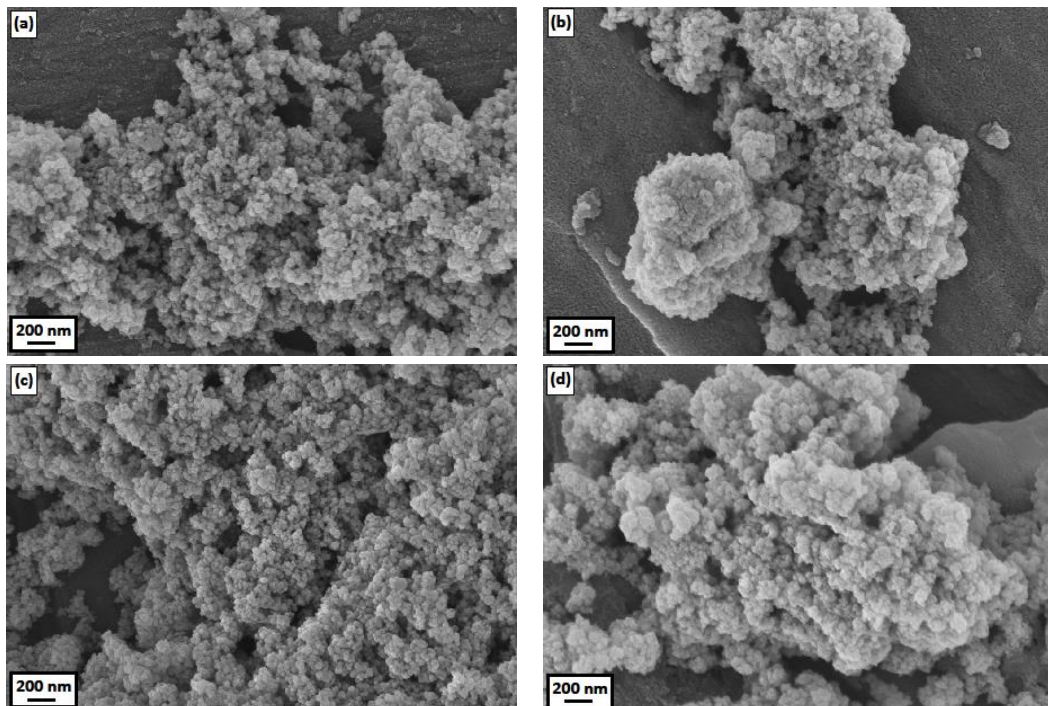
pH-Wert	Puffersubstanz	Immobilisierung in Wasser	Immobilisierung pH 5,7
		Beladung [ $mg_{BSA} \cdot mg_{Mi}^{-1}$ ]	Beladung [ $mg_{BSA} \cdot mg_{Mi}^{-1}$ ]
4	EA	$0,29 \pm 0,07$	$0,33 \pm 0,07$
5,7	EA	$0,19 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,07$
7	Tris	$0,16 \pm 0,12$	$0,33 \pm 0,07$
9	Tris	$0,23 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,07$
10,3	Tris	$0,21 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,07$
Wasser	-	$0,22 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,07$
DMF	-	$0,15 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,07$

Des Weiteren wurde kein Einfluss der Vorbehandlung auf eine Veränderung der Ladungseigenschaften detektiert. Da die FTIR-Spektren keine Unterschiede zwischen den vorbehandelten und unbehandelten Magnetitpartikel aufweisen, kann ein Einfluss der verwendeten Puffer sowie eine Anbindung der Pufferionen an die Partikeloberfläche ausgeschlossen werden. Durch REM-Aufnahmen konnte eine induzierte Agglomeration aufgrund der Vorbehandlung nicht bestätigt werden (vgl. Abb. 5.1). Insgesamt kann daher bei den verwendeten Puffern ein Einfluss auf die Partikelladung für eine Funktionalisierung ausgeschlossen werden.

Jedoch zeigen die REM-Aufnahmen in Abbildung 5.2 eine deutlich induzierte Agglomeration der Partikel in Abhängigkeit der Proteinbeladung. Die Bilder 5.2 (a) und (c) zeigen Partikel, deren Immobilisierung in Wasser stattgefunden hat. Vergleicht man dagegen die Magnetitpartikel (b) und (d), welche bei einem pH-Wert von 5,7 immobilisiert wurden, ist eine höhere Agglomeration zu erkennen. Die verstärkte Agglomeration wird durch eine höhere Proteinbeladung hervorgerufen. Eine Immobilisierung in Wasser führt zu einer durchschnittlichen Proteinbeladung von  $0,21 mg_{BSA} \cdot mg_{Mi}^{-1}$ , wogegen bei einer Immobilisierung im leicht Sauren eine durchschnittliche Beladung von  $0,33 mg_{BSA} \cdot mg_{Mi}^{-1}$  erreicht wird (vgl. Tab. 5.2).



**Abbildung 5.1:** REM-Aufnahmen des Einflussverhaltens der Puffersubstanzen auf den industriellen Magnetit (Mi): (a)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7, (b)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 7, (c)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 9. Vorbehandlung fand über 24 h statt.



**Abbildung 5.2:** REM-Aufnahmen des Einflussverhaltens der BSA-Immobilisierung vorbehandelter und unfunktionalisierter industriell hergestellter Magnetitpartikel. Vorbehandlung: (a)/(b)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7, (c)/(d)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 9. Immobilisierung (a)/(c) in Wasser, (b)/(d)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7. Vorbehandlung 24 h. Immobilisierung von BSA über 20 h mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  bei einem pH-Wert von 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

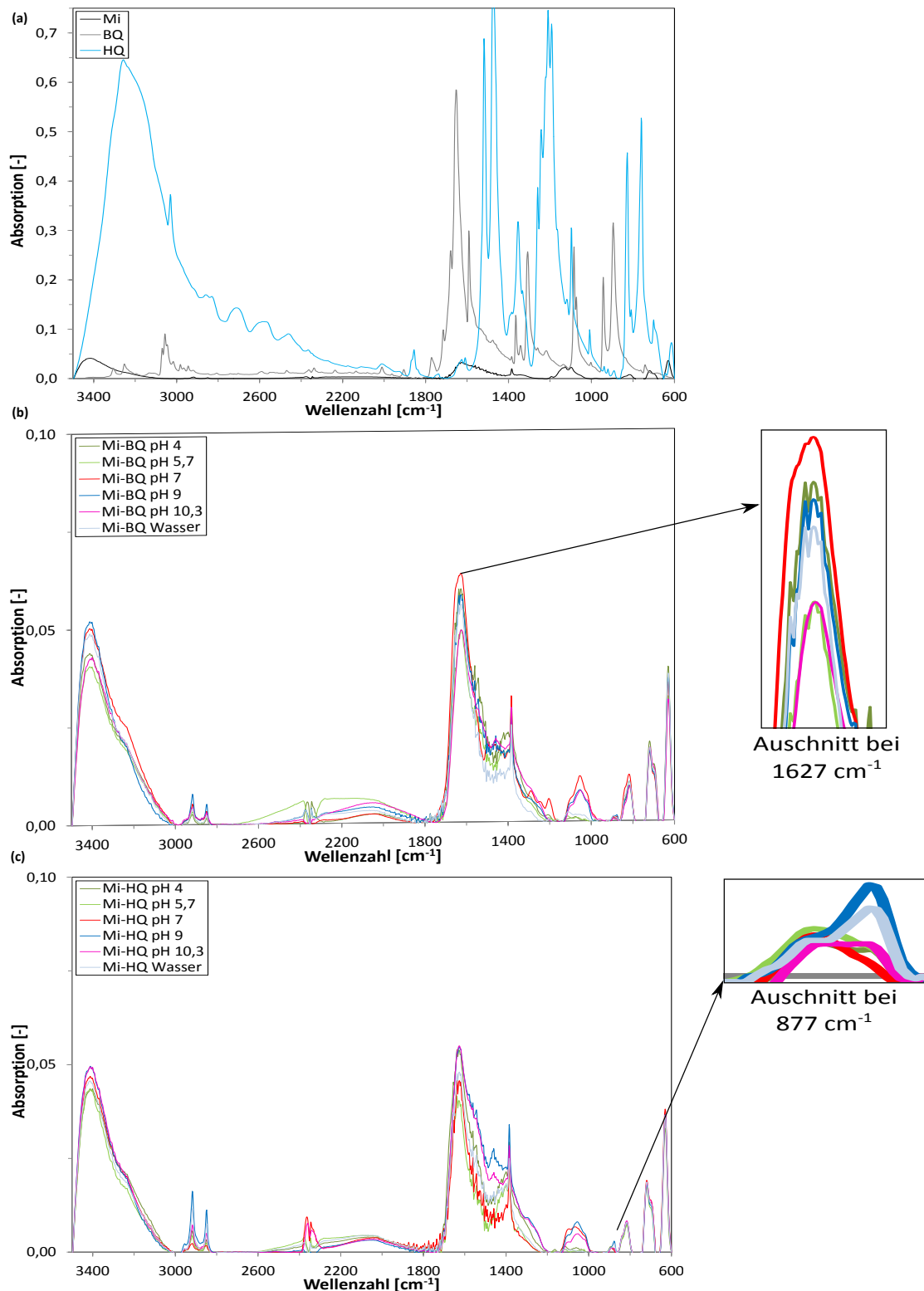
Werden die proteinimmobilisierten Partikel mit den REM-Aufnahmen der vorbehandelten Partikel verglichen (vgl. Abb. 5.1), ist ein geringer Agglomerationsgrad der unbeladenen Partikel zu erkennen. Diese Beobachtung bestärkt die Aussage, dass die Suspensionsstabilität maßgeblich von der Proteinanbindung und -beladung beeinflusst wird.

### 5.1.2 Funktionalisierung mit Benzo- und Hydrochinon

Aus der Stoffgruppe der phenolischen Substanzen wurden Benzo- und Hydrochinon ausgewählt, deren funktionellen Gruppen sich in para-Stellung befinden.

In Abbildung 5.3 (a) sind die FTIR-Spektren der Reinstoffe Benzochinon (BQ, grau), Hydrochinon (HQ, blau) und des industriellen Magnetits (Mi, schwarz) zu sehen. Die mit Benzochinon und Hydrochinon funktionalisierten Magnetitpartikel sind in Abhängigkeit des pH-Wertes in den Abbildungen 5.3 (b) und (c) aufgetragen. Das Spektrum von Benzochinon weist mehrere charakteristische Banden auf. Die Bande bei  $3056\text{ cm}^{-1}$  steht für eine aromatische =C-H-Schwingung und hat meist eine Abfolge von drei Banden [134]. Die nicht aromatische Dehnungsstreckung der Carbonylgruppe wird durch die Chinonbande (C=O) bei  $1652\text{ cm}^{-1}$  repräsentiert, wogegen die Bande  $1591\text{ cm}^{-1}$  für die aromatische Dehnungsstreckung der C=C-Bindungen des aromatischen Rings steht [134, 205, 235]. Hydrochinon verfügt über eine sehr breite Bande bei den Wellenzahlen  $3400\text{ cm}^{-1}$  bis zu  $3000\text{ cm}^{-1}$  mit Maxima von  $3257\text{ cm}^{-1}$  und  $3030\text{ cm}^{-1}$ . Hierbei handelt es sich um eine Überlagerung von verschiedenen Banden. Zum einen von der OH-Bande, die in der Region von  $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$  als Wasserstoffbrückenbindung auftritt und zum anderen die =C-H-Schwingung in Aromaten, die in einer Wellenzahlenregion von  $3100 - 3000\text{ cm}^{-1}$  angesiedelt ist [134]. Die Banden  $1518\text{ cm}^{-1}$  und  $1475\text{ cm}^{-1}$  stehen für aromatische C=C-Schwingungen [117, 205]. Substituierte aromatische Verbindungen werden durch die charakteristischen Banden bei  $828\text{ cm}^{-1}$  und  $759\text{ cm}^{-1}$  gezeigt, wobei die erste für 1,4-disubstituierte und die zweite für 1,2,3-trisubstituierte Verbindungen stehen [134].

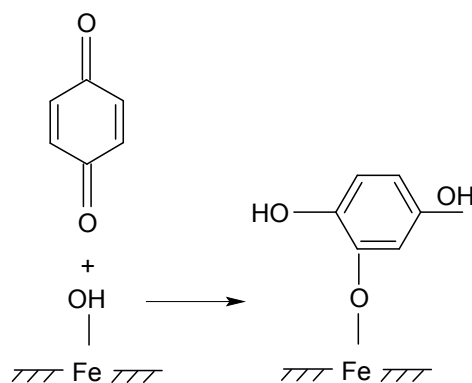
Die Spektren der funktionalisierten Partikel mit Benzochinon (vgl. Abb. 5.3 (b)) und Hydrochinon (vgl. Abb. 5.3 (c)) besitzen weiterhin die charakteristischen Banden von Magnetit, welche bei den Wellenzahlen  $719\text{ cm}^{-1}$  und  $630\text{ cm}^{-1}$  liegen. Daneben zeigen die beiden Spektren der funktionalisierten Partikel neue Banden durch die Funktionalisierung auf, woraus sich eine Anbindung schlussfolgern lässt. Die neu erschienenen Banden liegen bei Wellenzahlen von  $1627\text{ cm}^{-1}$  und  $1055\text{ cm}^{-1}$ . Zusätzlich ist den FTIR-Spektren der mit HQ funktionalisierten Partikel eine kleine Bande bei der Wellenzahl von  $877\text{ cm}^{-1}$  zu entnehmen. Die OH-Bande bei  $3412\text{ cm}^{-1}$  ist leicht erhöht im Vergleich zu reinen Magnetit, welche auch in ausgeprägter Form im Reinstoff Hydrochinon zu erkennen ist. Die Bande bei  $1627\text{ cm}^{-1}$  ist die C=O-Bande, die bei Benzochinon bei  $1652\text{ cm}^{-1}$  liegt. Die Bande bei  $877\text{ cm}^{-1}$  weist auf Substitutionen am aromatischen Ring hin [134, 205]. Die Verschiebung der Carbonylbande von Benzochinon  $1652\text{ cm}^{-1}$  auf  $1627\text{ cm}^{-1}$  sowie die erhöhte OH-Bande und die Detektion der Substitutionen am aromatischen Ring lässt die Vermutung der Reduktion bzw. Oxidation von Benzochinon bzw. Hydrochinon zu ihrem Semichinon (vgl. Abb. 2.13) zu und würde das Auftreten der charakteristischen Banden beider Substanzen erklären.



**Abbildung 5.3:** FTIR-Spektren BQ und HQ funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes: (a) Reinstoffe: Benzochinon (BQ), Hydrochinon (HQ) und industrieller Magnetit (Mi), (b) funktionalisierte BQ-Magnetitpartikel, (c) funktionalisierte HQ-Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $20,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  BQ/HQ- Lösung bei pH 4 und 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA, pH 7, 9 und 10,3 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Zusätzlich zeigen die funktionalisierten Partikel beider Substanzen ein ähnliches FTIR-Spektrum mit den gleichen charakteristischen Banden. So kann auf einen Anbindungsmechanismus nach Erreichen des Redoxgleichgewichtes von Benzo- und Hydrochinon geschlossen werden, da beide Substanzen zu ähnlichen Ergebnissen führen. Weiterhin deutet die Verschiebung der charakteristischen Gruppen auf eine Chemisorption an der Magnetitoberfläche hin. Folglich könnte sich ein Innensphärenkomplex zwischen den funktionalisierten Substanzen und der Eisenoxidfläche gebildet haben, welcher einen Elektronentransfer zwischen der Partikeloberfläche und der bindenden Substanz ermöglichen würde. Dabei könnte der Bindungsmechanismus auf Oberflächenkomplexierung bzw. Ligandenaustausch beruhen [117, 235].

Der Bindungsmechanismus von Benzo- bzw. Hydrochinon an den magnetischen Nanopartikeln hängt von dem Redoxsystem ab, das von verschiedenen Faktoren wie z.B. dem pH-Wert beeinflusst wird. Die Erscheinungsform des Chinons (vgl. Abb. 2.13) entscheidet über den Bindungsmechanismus an der Magnetitoberfläche. Hierüber lassen sich bisher nur Vermutungen äußern, da der Bindungsmechanismus von organischen Molekülen nicht vollständig geklärt ist. Generell wird akzeptiert, dass es sich um eine Ligandenaustauschreaktion zwischen den funktionellen Carboxyl- und Hydroxylgruppen der organischen Liganden und den funktionellen Gruppen der Eisenoxidoberfläche ( $\equiv Fe - OH_2^+$ ,  $\equiv Fe - OH$ ) handelt und  $H_2O$ - bzw.  $OH^-$ -Gruppen ersetzt werden. Es wird angenommen, dass die protonierten Oberflächenhydroxylionen der Eisenoxidoberfläche unterhalb eines pH-Wertes von ungefähr 8 reaktionsfähiger und austauschbarer sind. Infolge dessen wäre die Adsorption zum einen durch die Ladung und den Protonierungszustand der Eisenoxidoberflächengruppen und zum anderen durch den Oxidationszustand der organischen Substanz pH-Wert abhängig.



**Abbildung 5.4:** Mögliche Bindungsform von Benzochinon an der Magnetitpartikeloberfläche (vgl. Abb. 2.14).

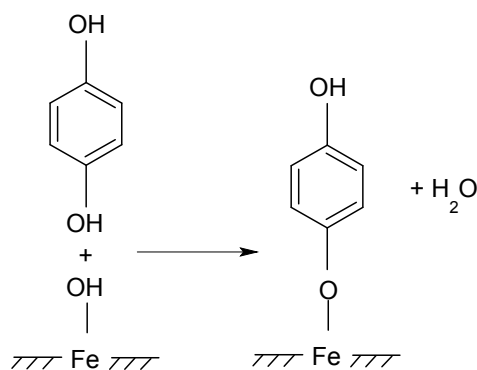
Von Gu et al. wird angenommen, dass die stereochemische Anordnung der funktionellen Gruppen der organischen Moleküle bei der Bindung ein entscheidender Faktor ist [117]. Als weitere Möglichkeit der Anbindung wurde in Kapitel 2.4.3.1 bereits die nucleophile Substitution der Oberflächen-OH-Gruppen an Benzochinon erläutert (vgl. Abb. 2.14), wie sie üblicherweise bei Polymeren verläuft. Diese Reaktion könnte auf die Bindung an den Hydroxylgruppen der Eisenoxidoberfläche übertragen werden. Die Bindungsreaktion findet in diesem Fall über einen nucleophilen Angriff der Hydroxylgruppe des

Eisenoxids auf das Benzochinonmolekül statt und geschieht über die Bildung eines 2-substituierten Hydrochinons bis hin zu einem 2,5-substituierten Benzochinonmolekül [15, 140]. Die entstehende Bindung ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Eine weitere Anlagerung verläuft aufgrund des erhöhten Redoxpotentials schneller [236].

Wenn die Substanz als Hydrochinon vorliegt, sind unterschiedliche Bindungen möglich. Basierend auf den Beobachtungen von Kung und Mc Bridge wird angenommen, dass Hydrochinon zu seinem Redoxpartner Benzochinon oder einer Zwischenstufe, dem sogenannten Semichinon (vgl. Abb. 2.13), oxidiert und dieses dann einen Innensphärenkomplex verbunden mit einem Elektronentransportmechanismus mit der Eisenoxidoberfläche bildet [235].

Weiterhin sind trivalente Eisenoxide sehr reaktiv in der oxidativen Polymerisation von phenolischen Komponenten [237], weshalb Kung und Mc Bridge von einer schnellen Redoxreaktion an den Oberflächenhydroxylgruppen der  $Fe^{3+}$ -Ionen ausgehen. Diese Oberflächengruppen können protonieren und somit eine Bindungsstelle zur Verfügung stellen. Dabei bietet sich die Protonierung zu  $Fe - OH_2^+$  an, da das gebundene Oberflächenwasser eine gute Abgangsgruppe darstellt und mit Hydrochinon durch einen Ligandenaustauschprozess ersetzt werden kann. Dabei wird das Hydrochinonmolekül vom trivalenten Eisenion zu Chinon oxidiert (Elektronentransfer), was zur Bildung von strukturellem, bivalentem Eisen innerhalb des Komplexes führt. Das Resultat könnte ein Innensphärenkomplex mit einem Semichinonradikal sein [235].

Eine weitere Bindungsform könnte auf eine Chemisorption durch eine Kondensationsreaktion ausgebildet werden (vgl. Abb. 5.5). Welche Bindungsform wirklich eintritt hängt davon ab, ob das Molekül als Aromat oder Chinon vorliegt.



**Abbildung 5.5:** Mögliche Bindungsform von Hydrochinon an der Magnetitpartikeloberfläche.

In dem FTIR-Spektrum der funktionalisierten Moleküle treten substituierte aromatische Banden auf (vgl. Abb. 5.3 (b) und (c)), welche für die Substitution des Benzochinons an die Magnetitoberfläche sprechen. Dieses kann durch die Aufnahme von Oberflächenelektronen wieder zu Hydrochinon reduziert werden, was eine Verschiebung der Bande und den ausgeprägten Peak der Wasserstoffbrückenbindungen erklären würde. Das Auftreten der Bande bei  $1055\text{ cm}^{-1}$  stellt eine C-O-H-Bande dar, die die Anbindung von Hydrochinon bestärkt. Folglich würde es zu einer einkernigen, einzähnigen

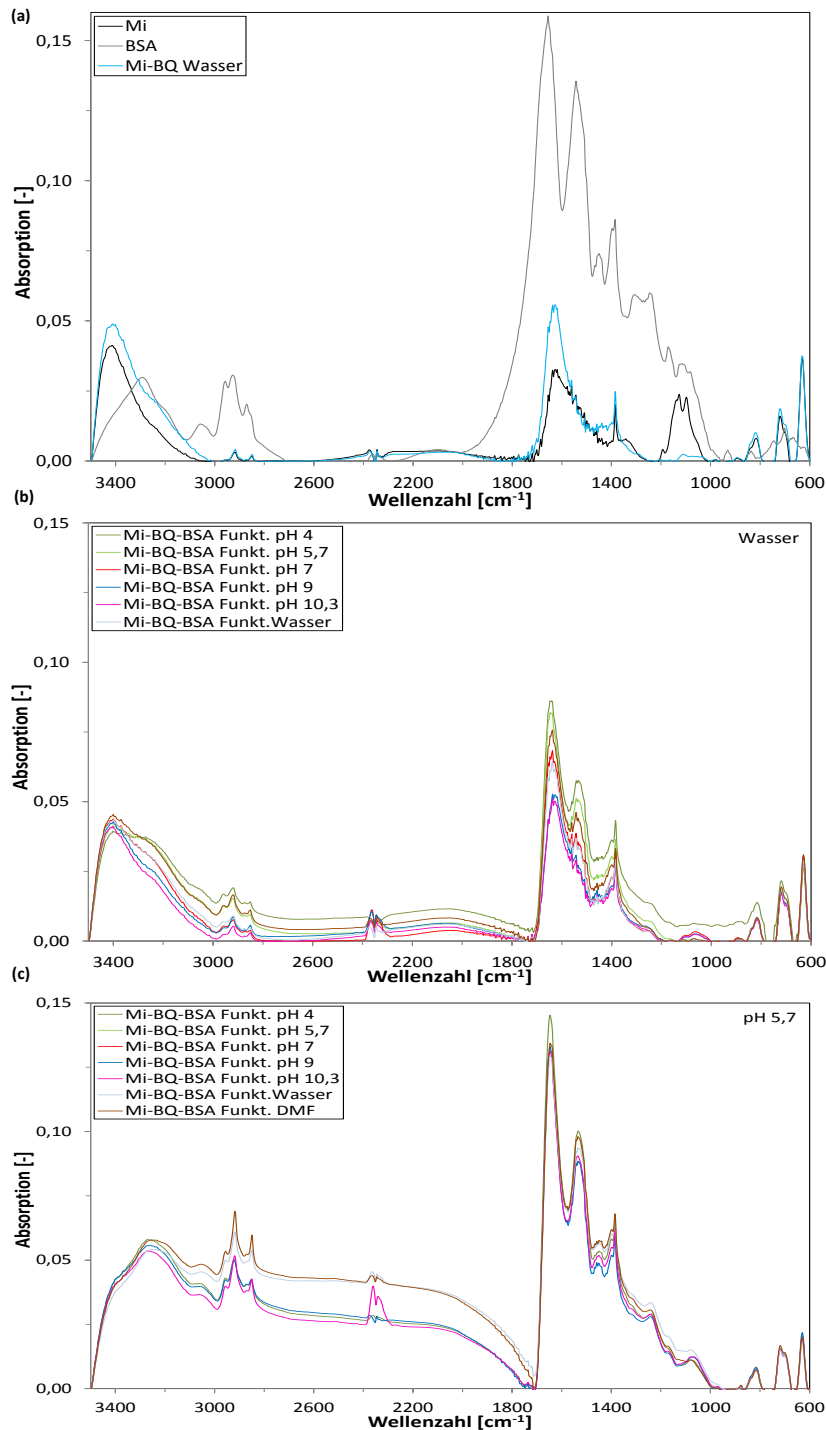
Anbindung kommen (vgl. Kapitel 2.4.1), da nur eine Hydroxylgruppe an der Eisenoxidoberfläche gebunden hat und die zweite die C-O-H-Schwingungsbande verursacht.

Die Anbindung über eine Reduktion von trivalentem zum bivalenten Eisen einhergehend mit der Oxidation des Hydrochinons zum Semichinon kann mit Hilfe des Röntgenbeugungsspektrums nicht nachgewiesen werden. Da das Prinzip der Röntgenbeugung auf der Beugung am Kristallgitter basiert (vgl. Kapitel 3.2.7), können somit keine Veränderungen der Oberfläche festgestellt werden.

Bei Betrachtung der Bandenintensitäten in den Abbildung 5.3 (b) und (c) zeigt sich keine Reihenfolge in Abhängigkeit des pH-Wertes. Deshalb wird von einer pH-Wert unabhängige Anbindung ausgegangen, welche den drei diskutierten Bindungsmechanismen widerspricht, da die auf der Protonierung der Hydroxylgruppen der Eisenoxidoberfläche basieren.

Deshalb wird von einer unspezifischen Sorption von Benzo- und Hydrochinon an der Magnetitoberfläche ausgegangen, was sich in einer schwachen Anbindung zeigen würde. Für eine schwache Anbindung spricht die Beobachtung bei der anschließenden Durchführung des Proteintests, bei dem nur eine geringe BSA-Beladung detektiert wurde. Dies steht im Widerspruch zu den FTIR-Spektren (vgl. Abb. 5.6 und 5.8). Sehr wahrscheinlich hat sich das gebundene Hydro- bzw. Benzochinon während des Versuches wieder abgelöst und den Proteintest gestört, der laut Hersteller von Chinonen beeinflusst werden kann. Allerdings ist auch eine unspezifische Bindung über Wasserstoffbrückenbindungen denkbar. Auch Kung und Mc Bridge haben eine geringe pH-Wertabhängigkeit bei der Adsorption von Hydrochinon an Goethit-Ferrihydrit-Mischungen festgestellt [235], was im Einklang mit diesen Ergebnissen steht.

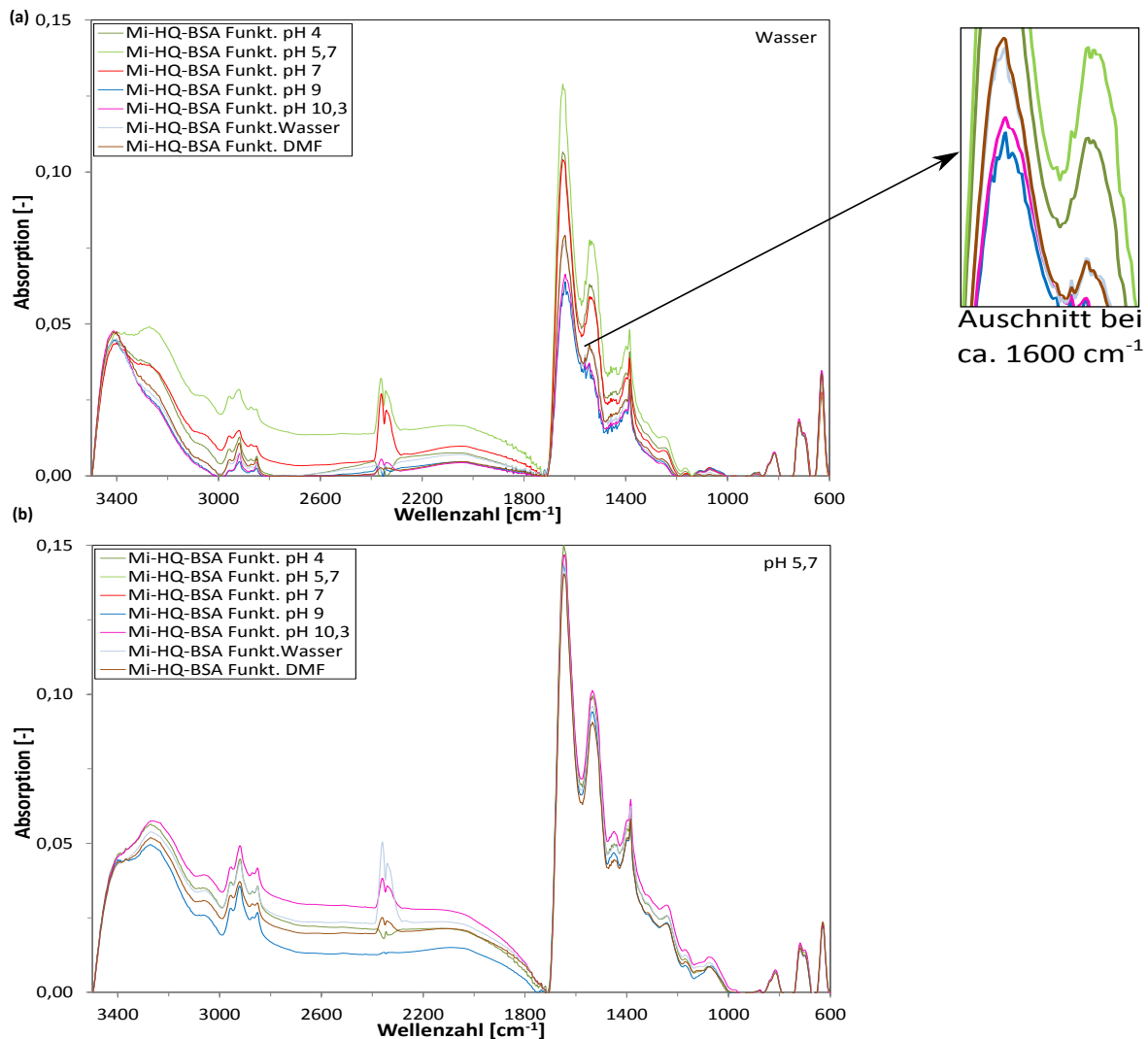
Anschließend an die Funktionalisierung der Partikel wurde eine Immobilisierung mit BSA durchgeführt. Die FTIR-Spektren der mit Benzochinon funktionalisierten und BSA immobilisierten Partikel sind in Abbildung 5.6 dargestellt. In Abbildung 5.6 (a) sind die Spektren des unbehandelten Magnetits Mi, BSA als Reinstoff sowie exemplarisch mit BQ funktionalisierte Magnetitpartikel zum Vergleich zu sehen. Betrachtet man die Bande des Proteinreinstoffes genauer, fällt sofort die für BSA übliche Doppelbande bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  und  $1542\text{ cm}^{-1}$  auf, welche für die Amidschwingungen ( $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONHR}$ ,  $-\text{CONR}_2$ ) stehen. Bei der ersten Bande, auch Amid I genannt, findet hauptsächlich die C=O-Dehnungsstreckung statt. Dagegen kommen in der zweiten Amidbande (Amid II) eher N-H-Biegeschwingungen und C-N-Dehnungsschwingungen vor [134, 205, 238]. Andere Schwingungen sind eher von nebensächlicher Bedeutung. Bei  $3350\text{ cm}^{-1}$ ,  $3070\text{ cm}^{-1}$ ,  $3070\text{ cm}^{-1}$  dominieren die primären  $H_2N$ -Schwingungen, wogegen die letzten beiden Banden auch durch C-H-Schwingungen ausgebildet werden [134, 205].



**Abbildung 5.6:** FTIR-Spektren BQ funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung: (a) Reinstoffe: BSA und industrieller Magnetit (Mi) sowie die in Wasser funktionalisierten BQ-Magnetitpartikel, (b) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in Wasser stattfand (c) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7 stattfand. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $20,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  BQ-Lösung bei pH 4 und 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA, pH 7, 9 und 10,3 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer sowie Wasser und DMF. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Immobilisierung erfolgte in Reinstwasser und  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7 mit einer BSA-Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  über 20 h. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

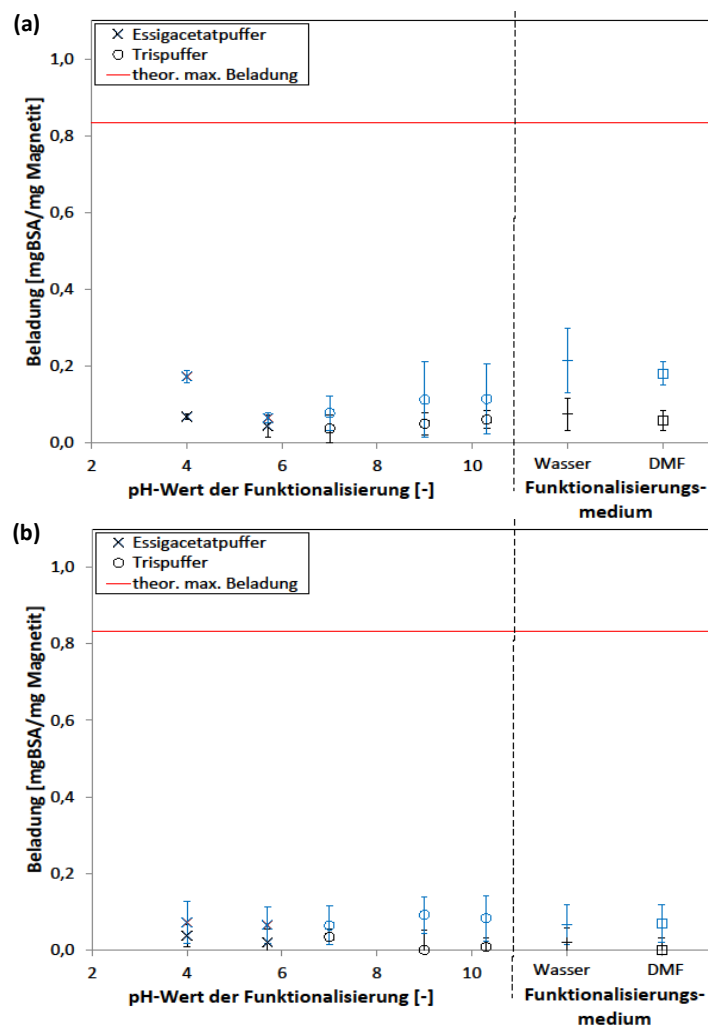
Vergleicht man die Reinstoffe Magnetit, BSA sowie die funktionalisierten Partikel mit

den BSA beladenen Partikeln (vgl. Abb. 5.6 (b) und (c)), erkennt man eine deutliche Veränderung der FTIR-Spektren. Die erfolgreiche Anbindung von BSA kann durch die neu entstehenden BSA-Doppelbanden begründet werden. Diese Banden stellen die Amidschwingungen des BSA dar, sind aber im Vergleich zum Reinstoff leicht verschoben und befinden sich an der Position  $1647\text{ cm}^{-1}$  und  $1534\text{ cm}^{-1}$ . Diese Verschiebung könnte durch die Veränderung der Natur der Amidgruppe hervorgerufen werden, was einhergeht mit der verschobenen Absorptionswellenlänge. Die Schwingungen der vorherigen Funktionalisierung werden von den BSA-Schwingungen überlagert oder die funktionalisierende Substanz hat sich aufgrund einer instabilen Bindung während der BSA-Immobilisierung der Partikel abgelöst.



**Abbildung 5.7:** FTIR-Spektren HQ funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung: (a) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikeln, deren Immobilisierung in Wasser stattfand, (b) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7 stattfand. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $20,8\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  HQ-Lösung bei pH 4 und 5,7 in  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA, pH 7, 9 und 10,3 in  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer sowie Wasser und DMF. Immobilisierung erfolgte in Reinstwasser und  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7 mit einer BSA-Konzentration von  $1\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  über 20 h. Magnetitkonzentration betrug  $1,2\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Bei den in Abbildung 5.6 (b) und (c) dargestellten Spektren wurde die anschließende Immobilisierung von BSA bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Grundsätzlich lässt sich eine höhere Beladung bei der durchgeführten Immobilisierung bei einem pH-Wert von 5,7 in EA-Puffer (vgl. Abb. 5.6 (c)) im Vergleich zur Immobilisierung im Neutralen mit Wasser als Lösungsmittel an den höheren Banden erkennen (vgl. Abb. 5.6 (b)). Dieses Ergebnis ist auch bei den mit HQ funktionalisierten Partikel mit anschließender BSA-Immobilisierung ersichtlich (vgl. Abb. 5.7 (a) und (b)). Der Unterschied der Bandenhöhe der beiden maximalen Beladungen beträgt beim Benzochinon ca. 0,05 Absorptionseinheiten.



**Abbildung 5.8:** Quantitative Proteinbestimmung BQ und HQ funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitnanopartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und der Immobilisierung: (a) BQ funktionalisierte Partikel, (b) HQ funktionalisierte Partikel, schwarz: Immobilisierung in Wasser, blau: Immobilisierung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7. Funktionalisierungszeit und -konzentration betragen 6 h und  $20,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  BQ/HQ-Lösung. Immobilisierung von BSA fand über 20 h bei einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Diese pH-Wertabhängigkeit spiegelt sich auch in der quantitativen Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Kapitel 4.3.8) wider, da hier die Ergebnisse, bei denen eine Immobilisierung bei pH 5,7 durchgeführt wurde (blaue Balken), oberhalb derer der Immobilisierung in Wasser liegen (schwarze Balken) (vgl. Abb. 5.8). Jedoch sind die quantitativ

bestimmten Werte aufgrund der bereits genannten Vermutung, dass oxidative Substanzen den Proteintest nach Bradford stören, eher fragwürdig und nicht kongruent mit den FTIR-Spektren. Dies ist am Beispiel von Hydrochinon besonders gut sichtbar. Nach den quantitativen Ergebnissen der Proteinbestimmung (vgl. Abb. 5.8 (b)) hat keine BSA-Anbindung im Funktionalisierungsmedium DMF stattgefunden, obwohl in den FTIR-Spektren (vgl. Abb. 5.7 (a), braun) die BSA-Doppelbande erkennbar ist.

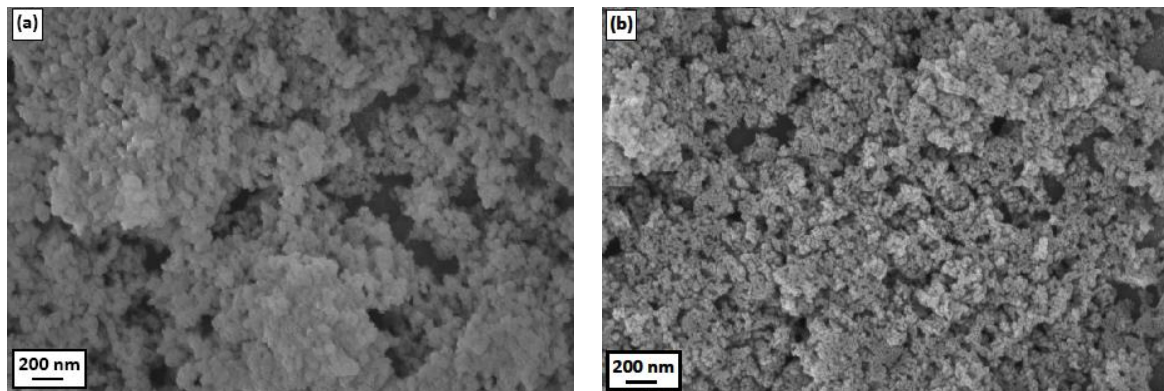
Eine quantitative FTIR-Analyse hat einen Proteinbeladungsbereich von mit Benzoquinon funktionalisierten Partikeln für eine Immobilisierung bei pH 5,7 zu  $0,2 - 0,8 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Magnetit}}^{-1}$  errechnet, wogegen die Bradford-Ergebnisse einen Bereich von  $0,05 - 0,2 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Magnetit}}^{-1}$  ergeben. Die Proteinbeladung in wässriger Lösung liegt nach der Proteinbestimmung in einem Bereich von  $0,04 - 0,08 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Magnetit}}^{-1}$  und nach dem FTIR-Modell im Bereich von  $0,05 - 0,2 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Magnetit}}^{-1}$ . Jedoch sind die ermittelten Beladungen durch die FTIR-Spektren nur als Richtwert zu verstehen, da das entwickelte Modell aufgrund der Überlagerung von Schwingungen des funktionalisierenden Moleküls und des BSAs eher eine ungenaue Vorhersage liefert. Sie sollen daher hier nur exemplarisch aufgeführt werden. Dennoch stimmen die beiden Analysemethoden soweit überein, dass eine verbesserte BSA-Anbindung bei einem pH-Wert von 5,7 detektiert wurde.

Eine Grund für eine bessere Anbindung im leicht sauren Milieu gegenüber einer Anbindung in Wasser können die Oberflächenladungsverhältnisse der funktionalisierten Partikel sein, da sie sich durch die Funktionalisierung verändern. So weisen die funktionalisierten Partikel einen IEP von 4,3 auf, wogegen der reine Magnetit (Mi) vor der Funktionalisierung einen IEP von 7,3 hat (vgl. Abb. 5.11). Die funktionalisierten Partikel sind bei einer neutralen Anbindung negativ geladen und die Proteine oberhalb ihres IEPs ebenfalls. Folglich wird die Proteinanbindung im Neutralen durch elektrostatische Abstoßungskräfte erschwert. Dagegen ist bei einer Anbindung im leicht sauren Milieu die Partikeloberfläche auch leicht negativ geladen, aber das Protein befindet sich nahe am seinem IEP und ist somit fast neutral, was eine elektrostatische Abstoßung minimiert. Falls sich die Funktionalisierungsbeschichtung vor der Proteinbeladung ablöst, könnte sich der IEP der funktionalisierten Partikel wieder hin zum reinen Magnetit verschieben, was wiederum zu anderen Ladungsverhältnissen führen würde. Somit würden sich die Ergebnisse der direkten Proteinimmobilisierung (vgl. Kapitel 5.1.1 und Tab. 5.1) widerspiegeln.

Eine pH-Wertabhängigkeit der vorangehenden Funktionalisierung lässt sich bei der Immobilisierung in EA-Puffer kaum erkennen (vgl. Abb. 5.6 (c) und 5.7 (b)). Deshalb wird von einer pH-unabhängigen BSA-Anbindung ausgegangen. Eine Interpretation wäre, dass das BSA ohne vorherige Anbindung von Hydro-, Benzo- oder Semichinon unspezifisch an die Partikeloberfläche adsorbiert, da die Beschichtungssubstanz sich vorher abgelöst hat. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Adsorption aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen, die unspezifisch und in allen Fällen gleich hoch sind. Dafür spricht die hohe Proteinbeladung, welche auf einer Vernetzungsreaktion der Proteine untereinander basiert und somit zu einer mehrschichtigen Proteinumhüllung führt. Nachteilig bei der unspezifischen Adsorption ist, dass voraussichtlich bei den Enzymen ein hoher Aktivitätsverlust einhergeht. Durch die erhöhte Proteinbeladung kommt es

zu einer erhöhten Agglomeration der Partikel, welche durch die Proteinmoleküle aufgelöst wird (vgl. Abb. 5.10).

Gegenteilig dazu ist eine pH-Wertabhängigkeit der Funktionalisierung bei der Immobilisierung in Wasser erkennbar und es kommt zu einer verbesserten Anbindung bei einer Funktionalisierung im sauren pH-Bereich (vgl. Abb. 5.6 (b) und 5.7 (a)). Da die Verfahrensschritte der Funktionalisierung und Immobilisierung getrennt voneinander durchgeführt wurden, müssen die Unterschiede bei der Immobilisierung von BSA in wässriger Phase auf die unterschiedliche Behandlung bei dem Funktionalisierungsschritt zurückzuführen sein. Da aber eine Änderung des pH-Wertes der Funktionalisierung keinen Einfluss auf die Menge am adsorbierten Molekül hat, muss es in der Anbindung selbst liegen. In der Abbildung 5.9 sind REM-Aufnahmen mit BQ funktionalisierten Partikeln bei unterschiedlichen pH-Werten gezeigt. Zu erkennen ist, dass die Partikel bei einem niedrigeren pH-Wert der Funktionalisierung anders aussehen und einen eher „verklebten“ Eindruck machen.



**Abbildung 5.9:** REM-Aufnahmen BQ funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung: (a)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7, (b)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 9. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $20,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  BQ-Lösung. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Von einer Anbindung von BQ, HQ oder ihres Semichinon an die Partikel wird aufgrund der FTIR-Spektren und der Verschiebung des IEP von 7,3 (reiner Magnetit) auf 4,3 nach der Funktionalisierung ausgegangen (vgl. Abb. 5.11). Die Ablösung der funktionalisierenden Substanz kann im Prinzip nur während der Immobilisierungsreaktion stattgefunden haben, was auch die fehlerhaften Werte im Proteintest erklären würde. Durch die unterschiedliche Art der Anbindung ist mit unterschiedlichen Bindungsstabilitäten zu rechnen. Demzufolge würden sich während der Immobilisierung unterschiedliche Mengen der Beschichtungssubstanz ablösen, was zu einer unterschiedlichen Proteinbeladung führen kann. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich eine kovalente Bindung nur bei niedrigen pH-Werten ausbildet und es bei höheren pH-Werten zu einer Konkurrenzreaktion zwischen den funktionalisierenden Molekülen und BSA kommen kann und somit die funktionalisierenden Moleküle aufgrund der geringeren Affinität von der Magnetitpartikeloberfläche verdrängt werden.

Das unterschiedliche Verhalten der Funktionalisierungssubstanz bei der Immobilisierung in Abhängigkeit des pH-Wertes kann auch anhand der Oberflächenladung erklärt werden. Das BSA ist aufgrund seines IEP bei pH 5,7 nahezu neutral. So sind kleine

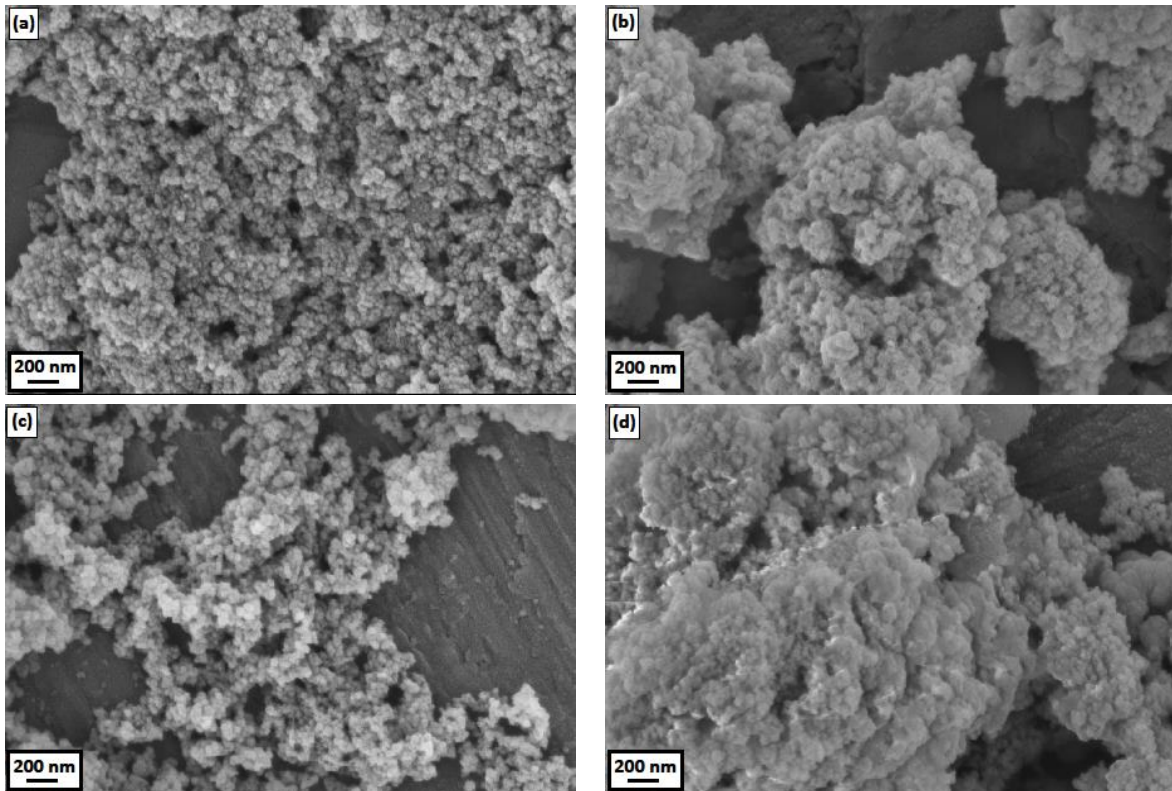
Veränderungen der Oberflächenladung durch die Funktionalisierungssubstanz nicht von entscheidender Bedeutung, da es aufgrund des ungeladenen BSA nicht zu abstoßenden Effekten kommt. Zudem agglomerieren die BSA-Moleküle aufgrund der Nähe zum IEP sehr stark, so dass es in jedem Fall zu einer sehr hohen Beladung führt.

Im Gegensatz dazu ist bei einer Anbindung in wässriger Phase das Protein negativ geladen. Kleine Änderungen in der Partikeloberflächenladung führen zu unterschiedlich großen Abstoßungs- bzw. Anziehungseffekten, so dass hier die kleinen Veränderungen aufgrund unterschiedlich starker Desorption der Funktionalisierungssubstanz einen größeren Einfluss auf die BSA-Anbindung haben können.

Die Proteinimmobilisierung an Benzochinon wurde bei Kunststoffen angewendet (vgl. Kapitel 2.4.3.1), weshalb schon eine Vielzahl an Vorschlägen für die Anbindung von Proteinen an Benzochinon in der Literatur erwähnt ist. Eine mögliche Reaktion kann über die Amino-, Thiolgruppen und/oder Aminosäurereste ablaufen. Diese Reaktion soll unter milden Bedingungen stattfinden und führt zu stabilen, meist monosubstituierten Verbindungen [15, 140, 236]. Eine Substitutionsreaktion zwischen den funktionellen Gruppen des Proteins und des Beschichtungsmoleküls wäre denkbar [139, 239].

Eine Ausbildung instabiler Bindungen kann auf Wasserstoffbrückenbindungen und/oder hydrophobische Wechselwirkungen zwischen unpolaren Regionen der phenolischen Moleküle und Proteine zurückgeführt werden. Wasserstoffbrückenbindungen können immer auch zusätzlich zu einer kovalenten Bindung gebildet werden [240]. Insgesamt wurde festgestellt, dass Chinone bildende phenolische Substanzen wesentlich reaktiver in der Bindung von Proteinen sind, die exakte Bestimmung der Bindungsstellen sich aufgrund möglicher Folgereaktionen allerdings als schwierig erweist. Die häufigsten involvierten reaktiven Reste in den Proteinen sind ihre nukleophilen Seitenketten wie Lysin, Tryptophan und Cystein [139, 239]. Dabei kommt Cystein in BSA am häufigsten vor und bringt dadurch viele Thiolgruppen mit sich, aber auch Aminogruppen sind im BSA-Molekül vorhanden [15].

In Abbildung 5.10 sind die REM-Aufnahmen von BQ- (vgl. Abb. 5.10 (a) und (b)) und HQ- (vgl. Abb. 5.10 (c) und (d)) funktionalisierten Partikeln mit einer anschließenden Proteinanbindung bei den unterschiedlichen pH-Werten zu sehen. Alle Funktionalisierungen wurden in Wasser durchgeführt. Beim Vergleich der pH-Werte der Immobilisierung ist zu erkennen, dass es zu einer verstärkten Agglomeration bei einem pH-Wert von 5,7 kommt. Diese verstärkte Agglomeration ist auf die erhöhte Proteinbeladung zurückzuführen. Durch ihre Neutralität bei der Anbindung nahe ihrem IEP neigen sie untereinander zur Agglomeration. Daraus resultiert eine mehrschichtige Proteinhülle, bei welcher die Proteine untereinander quervernetzt sind. Deshalb wird hier von einer unspezifischen Anbindung ausgegangen. Dies zeigt sich gut in der Abbildung 5.10 (d), bei der die Oberfläche einen „verklebten“ Eindruck macht. Demgegenüber ist die Agglomeration der in Wasser immobilisierten Partikel geringer. Aufgrund der unterschiedlichen Proteinbeladungen verhalten sich die immobilisierten und funktionalisierten Partikel hinsichtlich ihrer Stabilität unterschiedlich.

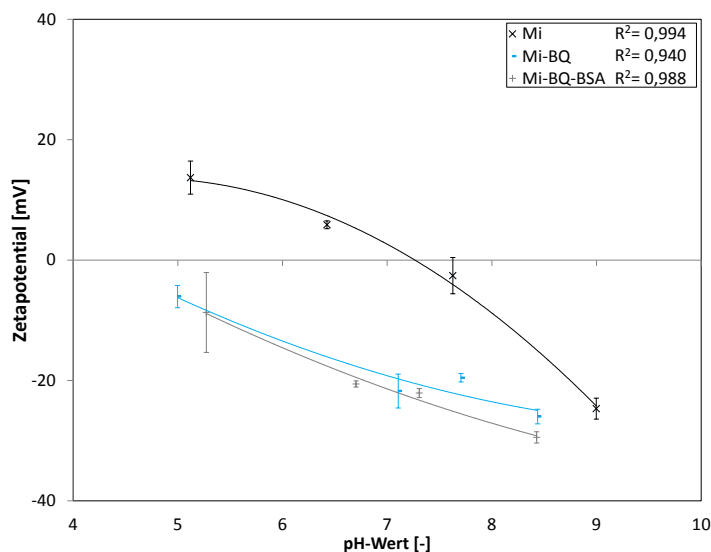


**Abbildung 5.10:** REM-Aufnahmen BQ und HQ funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Immobilisierung: (a) und (b) BQ funktionalisierte Magnetitpartikel, (c) und (d) HQ funktionalisierte Magnetitpartikel, (a) und (c) Proteinanbindung in Wasser, (b) und (d) Proteinanbindung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $20,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  BQ- bzw. HQ- Lösung in Wasser. Immobilisierung von BSA fand über 20 h mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$  statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Die Verläufe des Zetapotentials, welcher in Abbildung 5.11 dargestellt sind, geben einen Eindruck von der Stabilität der Partikelsuspension aufgrund elektrostatischer Abstößung. Der Verlauf des Zetapotential ist exemplarisch für die mit BQ funktionalisierten Partikel bei einem pH-Wert von 7 dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass sich aufgrund der Funktionalisierung der IEP des unbehandelten Magnetits von 7,3 auf 4,3 verschiebt. Diese Verschiebung verändert die elektrostatischen Wechselwirkungen in Abhängigkeit des pH-Wertes, so dass die funktionalisierten Partikel aufgrund dieser Verschiebung im neutralen Bereich im Vergleich zum unbehandelten Magnetit suspensionsstabiler sind.

Bei einem pH-Wert von 7 liegt der Betrag des Zetapotentials bei unbehandeltem Magnetit bei  $|3| \text{ mV}$ , wogegen dieser bei den BQ behandelten Partikeln ca.  $|20| \text{ mV}$  beträgt und somit BQ behandelte Partikel im Neutralen wesentlich stabiler sind, als die unbehandelten Magnetitpartikel. Zusätzlich bleibt der Betrag des Zetapotentials oberhalb eines pH-Wertes von 7 größer als  $|20| \text{ mV}$ , so dass von einer verminderten Agglomeration aufgrund der Oberflächenladung und der daraus resultierenden Abstößungskräfte zwischen den Partikeln ausgegangen werden kann. Mit abnehmendem pH-Wert im sauren Milieu sinkt das Zetapotential mit einhergehender Abschwächung der interpartikulären Abstößungskräfte mit der Folge vermehrter Agglomeration. Durch die veränderten Ladungseigenschaften der Partikeloberfläche kann auf eine Anbindung der funktionalisierenden Moleküle geschlossen werden.

Durch eine anschließende BSA-Immobilisierung wird keine weitere Veränderung der Oberflächenladung im Vergleich zur Funktionalisierung erreicht. Somit kann eine Proteinanbindung nicht durch die Messung des Zetapotentials nachgewiesen werden. Dies könnte darin begründet sein, dass der IEP des Proteins (pH 4,8-5,4) nahe dem IEP der funktionalisierten Partikel liegt und es somit aufgrund der Proteinanbindung zu keiner Ladungsverschiebung auf der Oberfläche kommt, welche hauptsächlich durch die adsorbierte Spezies dominiert wird. Die Anbindung des Proteins konnte durch den Proteintest und die FTIR- sowie XRD-Spektren nachgewiesen werden.

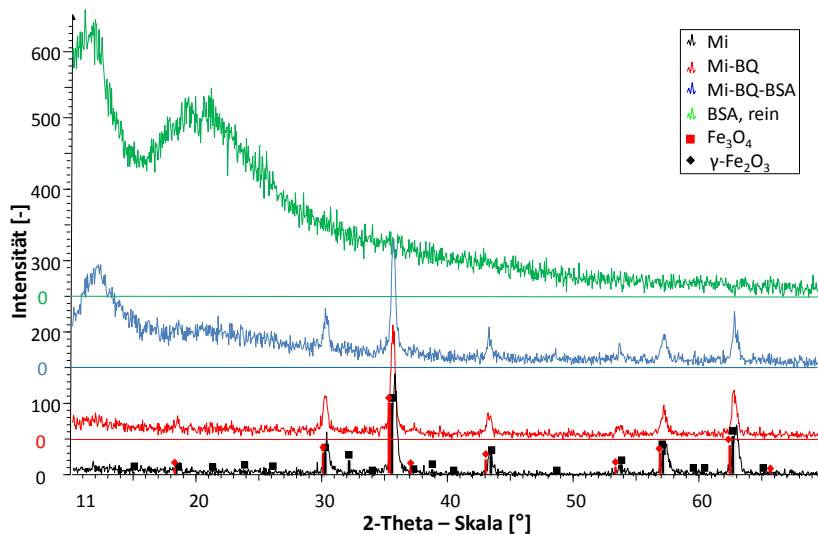


**Abbildung 5.11:** Zetapotentialverläufe BQ funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikeln. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $20,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  BQ-Lösung bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris-puffer. Immobilisierung von BSA fand über 20 h mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  bei einem pH-Wert von 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Die Röntgenbeugungsspektren der funktionalisierten und der sowohl funktionalisierten als auch immobilisierten Partikel sind in Abbildung 5.12 gezeigt. Zum Vergleich sind der reine Magnetit (Mi, schwarz) und BSA als Reinstoff in grün dargestellt. Vergleicht man die Spektren der funktionalisierten Partikel mit dem des reinen Magnetits, zeigt sich, dass die Kristallstruktur durch die Funktionalisierung nicht verändert wurde. Die charakteristischen Peaks des Magnetits sind vor und nach der Funktionalisierung erhalten geblieben, weshalb eine Umwandlung zu Maghemit ausgeschlossen wird. Weiterhin kam es zu keiner Peakverschiebung, was im Einklang mit der Berechnung der Partikelgröße und Gitterkonstanten steht, welche nahezu identisch sind. Da keine Strukturveränderungen zu erkennen sind, ist auch keine Verringerung der magnetischen Sättigung zu erwarten.

Bei dem Spektrum der anschließenden BSA-Anbindung (dargestellt in blau) bleiben die charakteristischen Peaks des Magnetits ebenfalls erhalten, wobei ein neuer Peak bei ca.  $12^\circ$  auf der 2-Theta-Skala entsteht. Dieser neu entstandene Peak weist auf die Proteinanbindung hin und wird durch die Kristallstruktur des BSA hervorgerufen [241]. Insgesamt ist kein Einfluss auf den Oxidationszustand der Gitterstruktur des Magnetits erkennbar, jedoch kann sich die Oberfläche verändert haben, was ein Indiz für eine spezifische bzw. unspezifische Adsorption wäre. Einige Strukturveränderungen von

Eisenoxiden aufgrund einer Anbindungen von Brenzkatechingruppen wurden berichtet [242] und werden im nächsten Kapitel 5.1.3 erläutert.



**Abbildung 5.12:** XRD-Spektren BQ funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $20,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  BQ-Lösung bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Immobilisierung von BSA fand über 20 h mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  bei einem pH-Wert von 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Die Spektren Mi-BQ, Mi-BQ-BSA und BSA, rein haben einen Offset.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Nutzung von Benzo- und Hydrochinon bei der Funktionalisierung und anschließenden Immobilisierung von Magnetit zu ähnlichen Ergebnissen führt und dass ein Erfolg der Proteinimmobilisierung größtenteils unabhängig von der Vorbehandlung der Partikel mit Benzo- oder Hydrochinon ist sowie von deren Redoxzustand. Eine erfolgreiche Anbindung wurde mittels der FTIR-Spektren und des Zetapotentials nachgewiesen, wobei keine pH-Wertabhängigkeit während der Funktionalisierung festgestellt wurde. Die Bindungsstärke von Hydro- bzw. Benzochinon an Magnetit wird als relativ gering erachtet. Aufgrund der neu auftretenden Bande im FTIR wird eine Anbindung als substituiertes Hydrochinon bzw. Semichinon angenommen. Die Proteinimmobilisierung ist vergleichsweise unabhängig vom pH-Wert der vorhergegangenen Funktionalisierung und erzielt eine höhere Beladung bei einem pH-Wert von 5,7 gegenüber einer Immobilisierung in Wasser, wobei die erhöhte Proteinbeladung die Partikelagglomeration fördert.

### 5.1.3 Funktionalisierungssubstanzen mit Endiolform

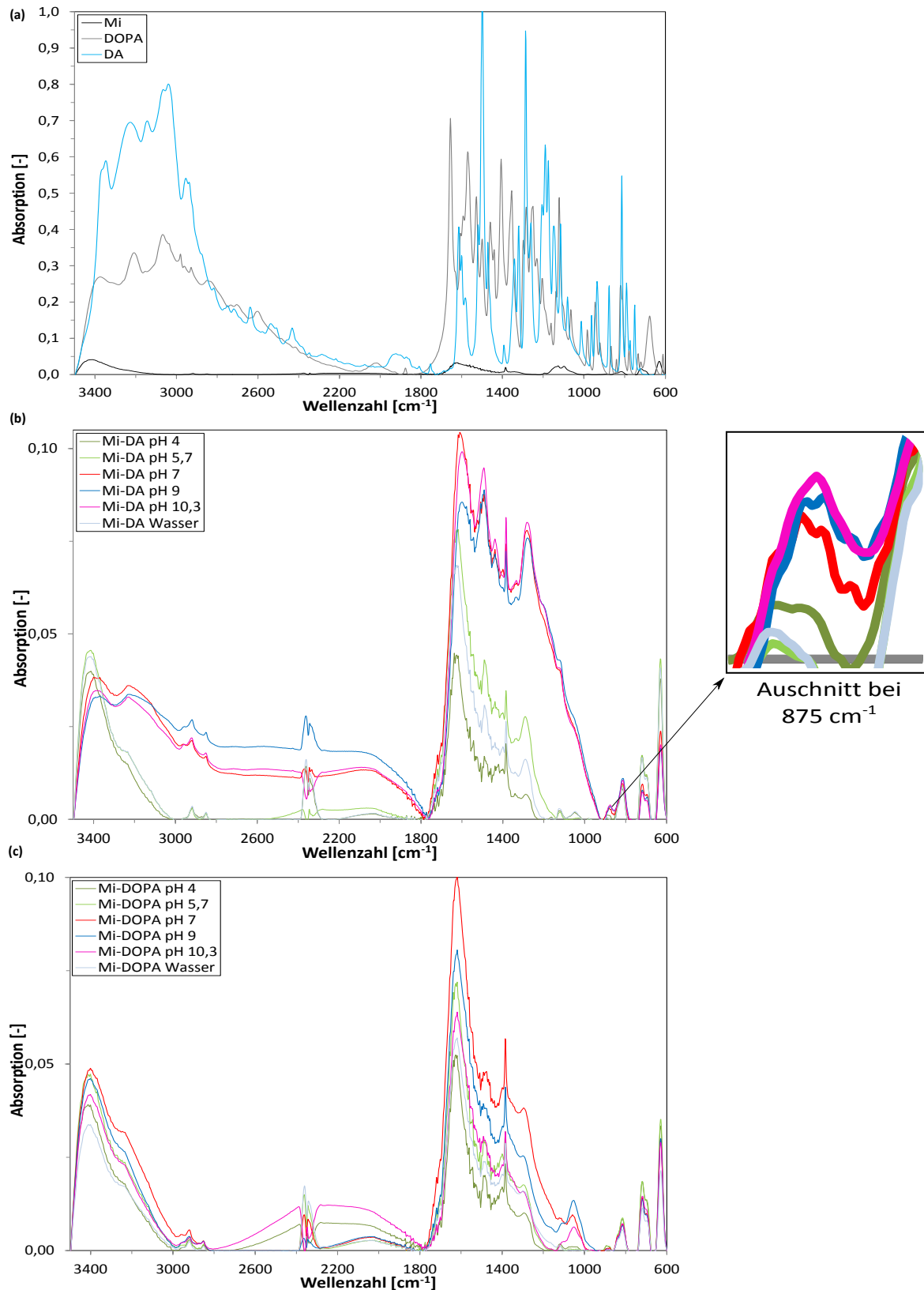
Im Folgenden werden phenolische Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung diskutiert, die zusätzlich noch über andere Substituenten am aromatischen Ring verfügen. Im Falle von DOPA und Dopamin handelt es sich um Aminogruppen, wogegen Kaffeesäure und Gallussäure eine Carboxylgruppe besitzen. Zusätzlich zu den zwei Hydroxylgruppen hat Gallussäure eine weitere Hydroxylgruppe in meta-Stellung (vgl. Abb. 3.3).

### 5.1.3.1 Dopamin und DOPA

Aufgrund des ähnlichen Aufbaus und der nahen Verwandtschaft von DOPA und Dopamin werden sie gemeinsam betrachtet. Bei DOPA handelt es sich um ein Prodrug von Dopamin, welches letztendlich als Pharmakon aktiv ist [243].

In Abbildung 5.13 (a) sind die FTIR-Spektren der Reinstoffe Dopamin (DA), DOPA und Magnetit (Mi) aufgetragen. Wenn man die Spektren von DOPA und Dopamin betrachtet, ist bei beiden ein extrem breites Band in den oberen Wellenzahlen auffällig. Die Maxima bei DOPA liegen bei  $3374\text{ cm}^{-1}$ ,  $3208\text{ cm}^{-1}$  und  $3068\text{ cm}^{-1}$ , wogegen sie bei Dopamin im Vergleich zu DOPA leicht verschoben sind und bei  $3347\text{ cm}^{-1}$ ,  $3227\text{ cm}^{-1}$  und  $3040\text{ cm}^{-1}$  auftreten. Dieses breite Band zeigt eine Überlagerung von mehreren Schwingungen. So kommen in diesem Bereich Schwingungen der Wasserstoffbrücken ( $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$ ) und eine Vielzahl von Amidschwingungen ( $3500 - 2250\text{ cm}^{-1}$ ) vor. Zudem ist die N-H-Schwingung bekannt für die Erzeugung einer breiten Bande. Des Weiteren sind in diesem Wellenzahlenbereich auch primäre Aminogruppenshwingungen von Bedeutung [134, 205]. Weitere typische Banden von Dopamin liegen bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  und  $1499\text{ cm}^{-1}$ , wobei die erste für die aromatischen C=C-Doppelbindungen steht und die letzte für Amidschwingungen. Schwingungen, die im Bereich von  $1286\text{ cm}^{-1}$ ,  $1190\text{ cm}^{-1}$  und  $814\text{ cm}^{-1}$  liegen, basieren auf Kohlenstoff und Substituenten am aromatischen Ring [134, 205]. Der Reinstoff DOPA verfügt über ein ähnliches Bandenspektrum, dessen charakteristische Schwingungen bei  $1655\text{ cm}^{-1}$ ,  $1570\text{ cm}^{-1}$ ,  $1406\text{ cm}^{-1}$  und  $1121\text{ cm}^{-1}$  liegen. Dabei stehen die ersten drei Banden für aromatische C=C-Doppelbindungen sowie Amidschwingungen des Moleküls. Die letzte Bande ist auf Kohlenstoffschwingungen zurückzuführen [205]. Wenn man die beiden Moleküle vergleicht, ist zu erkennen, dass sie aufgrund ihres chemisch ähnlichen Aufbaus (vgl. Kapitel 3) gleiche Schwingungen hervorrufen.

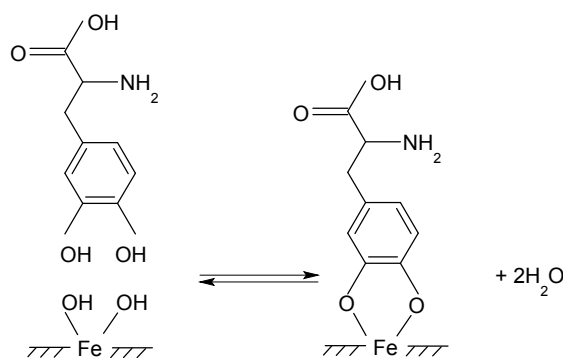
Vergleicht man die Spektren der Reinstoffe von Magnetit und Dopamin mit denen der mit DA funktionalisierten Magnetitpartikel (vgl. Abb. 5.13 (b)), sind neu auftretende Banden zu erkennen. Zum einen ist eine breite Bande mit ähnlicher Form im höheren Wellenzahlenbereich bei  $3400\text{ cm}^{-1}$  anzutreffen, die für Amidschwingungen steht. Diese Bande liegt verglichen mit dem Reinstoff leicht verschoben bei einer höheren Wellenzahl vor. Weiterhin können neue Banden im Bereich von  $1800 - 1000\text{ cm}^{-1}$  detektiert werden, wobei die Banden  $1610\text{ cm}^{-1}$ ,  $1491\text{ cm}^{-1}$  und  $1282\text{ cm}^{-1}$  sehr ausgeprägt sind. Die Bande bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  ist besonders erwähnenswert, da diese vorher in dieser Form bei dem Reinstoff nicht auftritt. Natürlich könnte es sich um die verschobene C=C-Doppelbande handeln, deren Position im Reinstoff bei  $1590\text{ cm}^{-1}$  lag. Aber dem widerspricht die Bandenhöhe, weshalb eher davon ausgegangen wird, dass es sich um eine neu entstandene Bande handelt, welche die für Chinone charakteristische C=O-Schwingung repräsentiert [134]. Durch die Existenz neuer Banden konnte eine Anbindung von Dopamin über den gesamten pH-Bereich von 4 bis 10 nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.13:** FTIR-Spektren DA und DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes: (a) Reinstoffe: Dopamin (DA), DOPA und industrieller Magnetit (Mi), (b) funktionalisierte DA-Magnetitpartikel, (c) funktionalisierte DOPA-Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 24 h in 5, 2 mmol · l<sup>-1</sup> DA/DOPA-Lösung bei pH 4 und 5,7 in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> EA, pH 7, 9 und 10,3 in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug 1,2 mg · ml<sup>-1</sup>.

Vergleicht man die FTIR-Spektren untereinander, welche bei verschiedenen pH-Werten der Funktionalisierung aufgenommen wurden, ist eine pH-Wertabhängigkeit erkennbar. Die Bande in dem Wellenzahlenbereich von  $3400\text{ cm}^{-1}$  bis  $3000\text{ cm}^{-1}$  verschwindet bei einer Anbindung im sauren Milieu sogar gänzlich. Dagegen entsteht bei einer Anbindung von pH 7 bis pH 10,3 eine neue kleine Bande bei  $875\text{ cm}^{-1}$ , was auf einen mehrfach substituerten Aromaten hinweist [134]. Bei Betrachtung der Intensität der Bande  $1610\text{ cm}^{-1}$  ist zu erkennen, dass die Anbindung folgende Reihenfolge hat: die beste Anbindung fand bei einem pH Wert von 7 statt, gefolgt von einer Anbindung im Alkalischen mit pH 10,3 gefolgt von pH 9.

Die Anbindung im sauren Milieu verschlechterte sich mit sinkendem pH-Wert von 5,7 über die Bindung in Wasser bis hin zu pH 4. Dass sich die Bandenhöhe der in Wasser funktionalisierten Partikel genau zwischen den pH-Werten 5,7 und 4 einordnet, kann mit dem pH-Wert der ungepufferten Lösung begründet werden, der nach der Reaktion bei 5,2 lag. Daher lässt sich ein Einfluss der Bindungsaffinität von Dopamin in Abhängigkeit des pH-Wertes feststellen. Das Maximum bei pH 7 kann durch die Lage des IEP von Magnetit bei 7,3 begründet werden, bei dem eine verbesserte Anbindung aufgrund geringerer elektrostatischer Abstoßungskräfte stattfindet. Betrachtet man die Ladungsverhältnisse und den Protonierungszustand der funktionalisierenden Substanz genauer, ist eine schlechtere Bindungsaffinität im Säuren zu erwarten. Bei einem niedrigen pH-Wert ist die Partikeloberfläche von Magnetit positiv geladen und die funktionalisierenden Moleküle liegen in protonierter Form vor. Aufgrund dessen müssten für eine Bindung elektrostatische Abstoßungskräfte überwunden werden. Mit zunehmendem pH-Wert steigt die Bindungsaffinität, die ihr Maximum (laut FTIR vgl. Abb. 5.13) im Bereich des IEP von Magnetit erreicht.

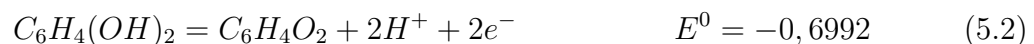


**Abbildung 5.14:** Mögliche Bindungsform von Funktionalisierungssubstanzen mit zwei Hydroxylgruppen in *para*-Stellung am Beispiel von DOPA.

Zusätzlich zu den bereits diskutierten phenolischen Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen in *para*-Stellung (vgl. Kapitel 5.1.2) weisen Dopamin und DOPA zwei Hydroxylgruppen in *ortho*-Stellung auf, was zu einer veränderten Anbindung führen kann. Die Bindungsmechanismen von *ortho*-disubstituierten phenolischen Hydroxylgruppen wurde an Metalloxydoberflächen sowie Metallionen untersucht [112, 244] und es wurde eine starke Koordination an der Oberfläche nachgewiesen [245]. Dabei binden die Metallionen an der Brenzkatechin ähnlichen Seite der phenolischen Verbindung unter Bildung einer Metall-Endiolgruppen-Bindung, die sich durch eine Komplexbildung an

den unterkoordinierten Metallatomen mit den zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung ausbildet (vgl. Abb. 5.14). Dadurch würde sich die Koordination der Metallatome an der Oberfläche verändern, wogegen die Gitterstruktur der Metallatome im Inneren konstant bliebe.

Über diesen Bindungsmechanismus wird sich somit eine zweizählige Koordination der Liganden (vgl. Abb. 2.15 (b)) bilden [17, 244, 246, 247, 248]. Damit eine zweikernige Koordination möglich ist, müssen die Eisenatome der Magnetitoberfläche und die koordinierten Sauerstoffatome des funktionalisierenden Moleküls ähnliche Abstände aufweisen [92]. Der Abstand der Sauerstoffmoleküle im Endiol beträgt 0,275 nm. Die Abstände der Eisenatome sind davon abhängig, ob die funktionalisierenden Moleküle mit den tetraedrisch oder oktaedrisch unterkoordinierten Eisenatomen komplexieren (vgl. Abb. 2.2 und Kapitel 2.3.1). Der Abstand der tetraedrisch koordinierten Eisenatome beträgt 0,592 nm, wogegen sich der Abstand oktaedrischer Eisenkationen auf 0,297 nm beläuft [92]. Da die Anbindung zwar flexibel ist, aber große Abstände nicht überwunden werden können, gibt es nur die Möglichkeit der zweizähligen Bindung mit den oktaedrischen Eisenkationen. Weiterhin ist das Standardpotential zwischen Brenzkatechin und trivalentem Eisen (vgl. Gleichungen 5.1 und 5.2) positiv und somit eine Reaktion thermodynamisch möglich [237].



Untersuchungen mit extrahierten, DOPA enthaltenden Proteinen aus dem Haftplaque von Muscheln mit trivalenten Eisenkationen zeigten  $[Fe(DOPA)_3]$ -Komplexe. Weiterhin wurden organische Radikale und die Reduktion von Eisen sowie eine simultane Oxidation von DOPA nachgewiesen [17]. Da, wie schon erwähnt, das Wassermolekül eine gute Abgangsgruppe bildet, wird davon ausgegangen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Abgabe der Wassermoleküle von der Magnetitoberfläche ist. Nach dem Überschreiten des IEP von Magnetit liegt eine negative, deprotonierte Partikeloberfläche vor. Nucleophile Liganden greifen das positiv geladene Metallion besser an [249, 250].

Im Basischen greift Dopamin als einzige Substanz die Oberfläche verbessert an. Durch einen basischen pH-Wert würde die Entstehung des Chinons der Substanz erleichtert, was dem Bindungsmechanismus entgegenwirken würde. Daher kann vermutet werden, dass Dopamin durch intramolekulare Cyclisierung [251] die Oxidation zu seinem Chinon verschiebt und somit als Aromat vorliegt. Eine andere Erklärung für die höhere Beladung von Dopamin bei alkalischen pH-Werten wäre die Polymerisation der Chinonmoleküle an der Partikeloberfläche [160].

Betrachtet man die in Abbildung 5.13 (c) dargestellten FTIR-Spektren der mit DOPA funktionalisierten Partikel, sind auch hier neue Absorptionsbanden zu erkennen. Sie liegen bei den Wellenzahlen  $1618\text{ cm}^{-1}$ ,  $1490\text{ cm}^{-1}$  und  $1063\text{ cm}^{-1}$ . Die Schwingung kann zum einen wie bei Dopamin eine neu auftretende Chinonbande sein, die durch deren C=O-Schwingung repräsentiert wird [134]. Es könnte sich aber auch um Amid-

schwingungen oder verschobene aromatische C=C-Doppelschwingungen handeln. Die weiteren Banden stehen für Amid- sowie Kohlenstoffschwingungen [205].

Diese neu auftretenden Banden sind ein Hinweis für eine Bindung von DOPA auf der Magnetitpartikeloberfläche. Weiterhin sind die Banden der mit DOPA funktionalisierten Partikel im Vergleich zum Reinstoff verschoben, was auf eine Veränderung der Molekülstruktur und der damit verbundenen Änderung der Freiheitsgrade der funktionellen Gruppen in Folge der Verbindung hinweist. Die maximale Beladung und höchste Bindungsaffinität kann, wie auch bei Dopamin, bei einem pH-Wert von 7 registriert werden. Eine so ausgeprägte pH-Wertabhängigkeit wie bei Dopamin ist nicht sichtbar. Aber es zeigt sich bei pH-Werten von 9 und 5,7 eine verbesserte Beladung mit DOPA im Vergleich zu pH 10,3 und 4, so dass sich generell eine vermehrte Anbindung in einem pH-Bereich von 5,7-9 vermuten lässt. Dabei stellt pH 7 den geeignetsten pH-Wert nahe des IEPs des Magnetits dar.

Die schlechtere Anbindung im Säuren kann zum einen auf die ungünstigen Ladungsverhältnisse zurückgeführt werden (vgl. Dopamin). Zum anderen kann der IEP der mit DOPA beladenen Partikel eine Rolle spielen (vgl. Abb. 5.19), der bei 3,6 liegt und im Zuge der ersten angelagerten DOPA-Moleküle die Ladungseigenschaften der Oberfläche so verändert, dass die Partikel anfangen zu agglomerieren und aufgrund der Verschiebung der Partikeloberflächenladung und einer damit einhergehenden Partikelagglomeration eine erhöhte Anbindung verhindert wird. Die schlechtere Anbindung im Alkalischen bei 10,3 ist damit zu erklären, dass DOPA als Chinon vorliegt und dadurch nicht an der Oberfläche anbindet, da es nicht die cyclisierende Wirkung des Dopamins aufweist. Die maximale Anbindung im Neutralen (bei pH 7) lässt sich aufgrund der Ladungsverhältnisse erklären. Bei einem pH-Wert von 7,3 befindet sich der IEP des reinen Magnetits, so dass zu Beginn der Funktionalisierung die Partikeloberfläche ungeladen ist. Die DOPA-Moleküle können bei diesem pH-Wert in geringem Ausmaß deprotoniert vorliegen. Da die Hydroxylgruppen phenolischer Substanzen schwach sauer im Gegensatz zu Hydroxylgruppen in Alkoholen oder Zuckern liegen sie bei pH 7 protoniert vor [250]. Dies erleichtert die Oxidation zum Chinon während des Anbindungsprozesses. Durch eine folgende Quervernetzung/Autooxidation der DOPA-Moleküle könnte die Beladung erhöht werden (vgl. Kapitel 2.4.3.2) [16].

Beim Vergleich der FTIR-Spektren von DOPA und Dopamin (vgl. Abb. 5.13 (b) und (c)) ist auffällig, dass die breite Bande bei  $3400 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  nur bei Dopamin auftritt (vgl. Abb. 5.13 (a)). Weiterhin ist die pH-Wertabhängigkeit bei Dopamin wesentlich ausgeprägter. Bei beiden Stoffen findet die beste Anbindung bei einem pH-Wert von 7 statt. Darüber hinaus verfügen die Spektren über die charakteristischen Banden des Magnetits bei den funktionalisierten Partikeln.

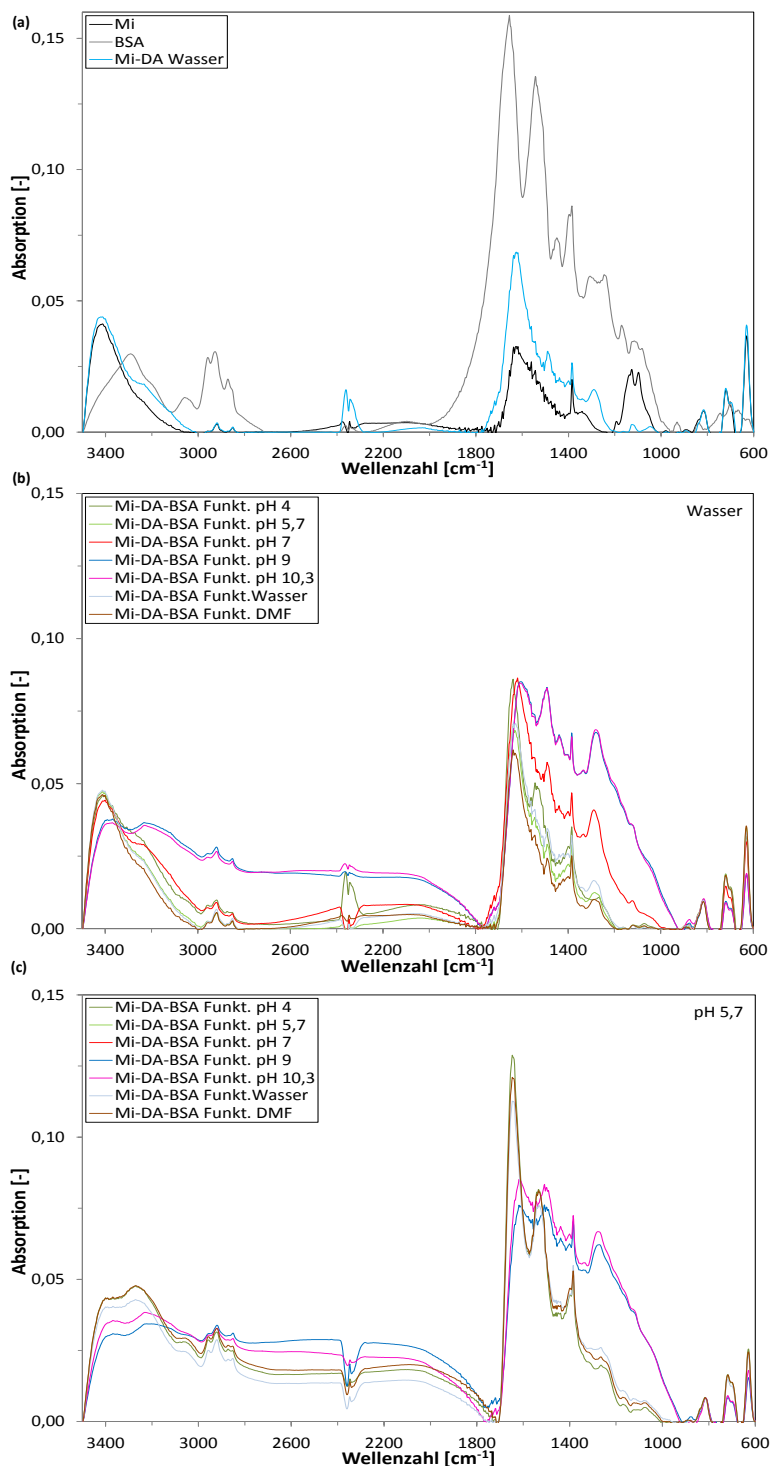
In Abbildung 5.15 sind die FTIR-Spektren der mit DA funktionalisierten Partikel mit anschließender BSA-Immobilisierung in Wasser (b) und bei einem pH-Wert von 5,7 (c) zu sehen. Zum Vergleich sind die Reinstoffe sowie die vorher in Wasser funktionalisierten Partikel dargestellt. Bei einer Immobilisierung bei pH 5,7 ist die charakteristische BSA-Doppelbande zu erkennen. Sie liegt bei  $1655 \text{ cm}^{-1}$  und  $1542 \text{ cm}^{-1}$  und hat sich im Zuge der Immobilisierung auf  $1647 \text{ cm}^{-1}$  und  $1534 \text{ cm}^{-1}$  verschoben. Die unter-

schiedliche Position könnte durch die BSA-Anbindung verursacht worden sein und auf eine Veränderung der Amidgruppe des BSAs hindeuten. Außerdem ist eine Abhängigkeit zwischen dem pH-Wert der Funktionalisierung sowie der Beladung mit BSA zu erkennen. Die BSA-Beladung ist bei einer vorherigen Funktionalisierung im Basischen (pH 9 und pH 10,3) wesentlich geringer, welches im FTIR-Spektrum anhand des nicht ausgeprägten BSA-Doppelpicks und in der quantitativen Bestimmung mit der Bradford-Methode ersichtlich wird (vgl. Abb. 5.16).

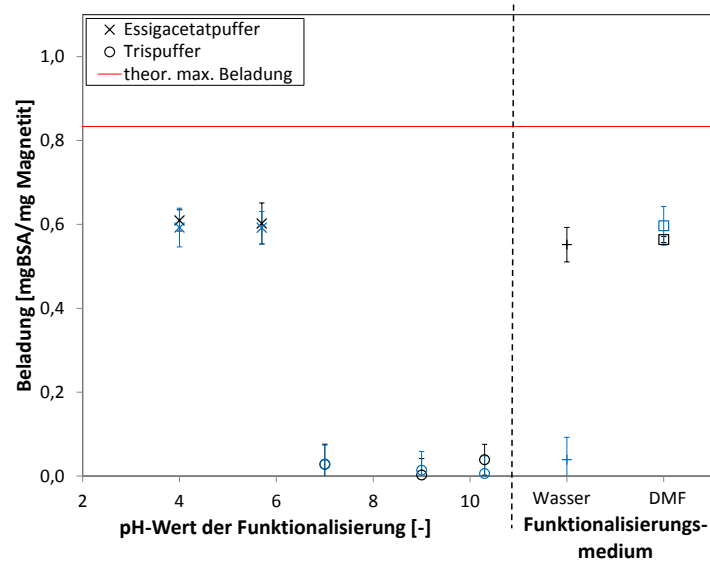
Diese Beobachtung zeigt eine Gegenläufigkeit zwischen der absorbierten Menge des Dopamins und des BSAs. Je mehr Dopamin auf den Partikeln gebunden ist, desto weniger BSA bindet an der Partikeloberfläche. Eine mögliche Ursache ist, dass das Dopamin während der Anbindung eine Cyclierungsreaktion durchläuft, dadurch die Aminogruppe nicht mehr zugänglich für das Proteinmolekül ist und somit keine Bindung zwischen der Funktionalisierungssubstanz und des Proteins ausgebildet werden kann. Voraussetzung dafür ist, dass Dopamin eine zweizählige Anbindung an den Partikeln eingegangen ist und damit die beiden Hydroxylgruppen nicht für die Bindung des Proteins zur Verfügung stehen.

Eine weitere Erklärung wäre eine induzierte Partikelagglomeration durch die funktionalisierende Substanz. Da sich der IEP der Substanz in der Regel zu niedrigeren pH-Werten verschiebt und somit eine elektrostatische Stabilisierung im Neutralen einhergeht, kann es nur zu einer Vernetzungsreaktion der Partikel mit Dopamin als Brückenmolekül gekommen sein. In Abbildung 5.17 (a) und (b) sind REM-Aufnahmen der mit DA funktionalisierten Partikeln zu sehen. Bei der Funktionalisierung in Wasser, bei der kaum eine Beladung mit Dopamin stattgefunden hat (vgl. Abb. 5.17 (a)), liegen die Partikel nicht so stark agglomeriert vor wie bei einer Funktionalisierung bei einem pH-Wert von 9 (vgl. Abb. 5.17 (b)). Durch die verstärkte Agglomeration der funktionalisierten Partikel verringert sich die spezifische Oberfläche und somit können sich weniger Proteine anlagern.

Vergleicht man den Einfluss des pH-Wertes der Immobilisierung in den FTIR-Spektren (vgl. Abb. 5.15 (a) und (b)) und die Abbildung der quantitativen Bestimmung der Proteinbeladung (vgl. Abb. 5.16), ist erkennbar, dass kaum ein Unterschied der Proteinbeladung bei diesen beiden pH-Werten festzustellen ist.

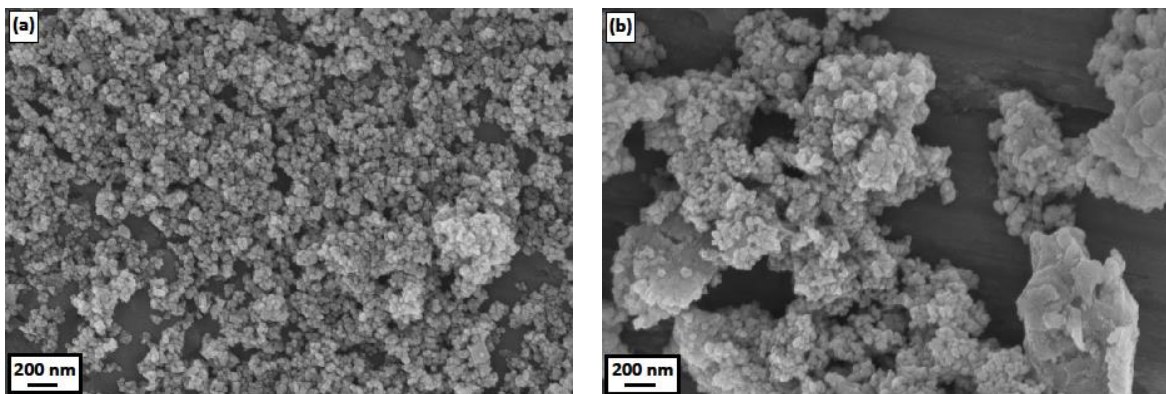


**Abbildung 5.15:** FTIR-Spektren DA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung: (a) Reinstoffe: BSA und industrieller Magnetit (Mi) sowie die in Wasser funktionalisierten DA-Magnetitpartikel, (b) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in Wasser stattfand, (c) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> EA-Puffer bei pH 5,7 stattfand. Funktionalisierung erfolgte 24 h in 5,2 mmol · l<sup>-1</sup> DA-Lösung bei pH 4 und 5,7 in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> EA, pH 7, 9 und 10,3 in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> Trispuffer sowie Wasser und DMF. Immobilisierung erfolgte in Reinstwasser und 0,1 mol · l<sup>-1</sup> EA-Puffer bei pH 5,7 mit einer BSA-Konzentration von 1 mg · ml<sup>-1</sup> über 20 h. Magnetitkonzentration betrug 1,2 mg · ml<sup>-1</sup>.

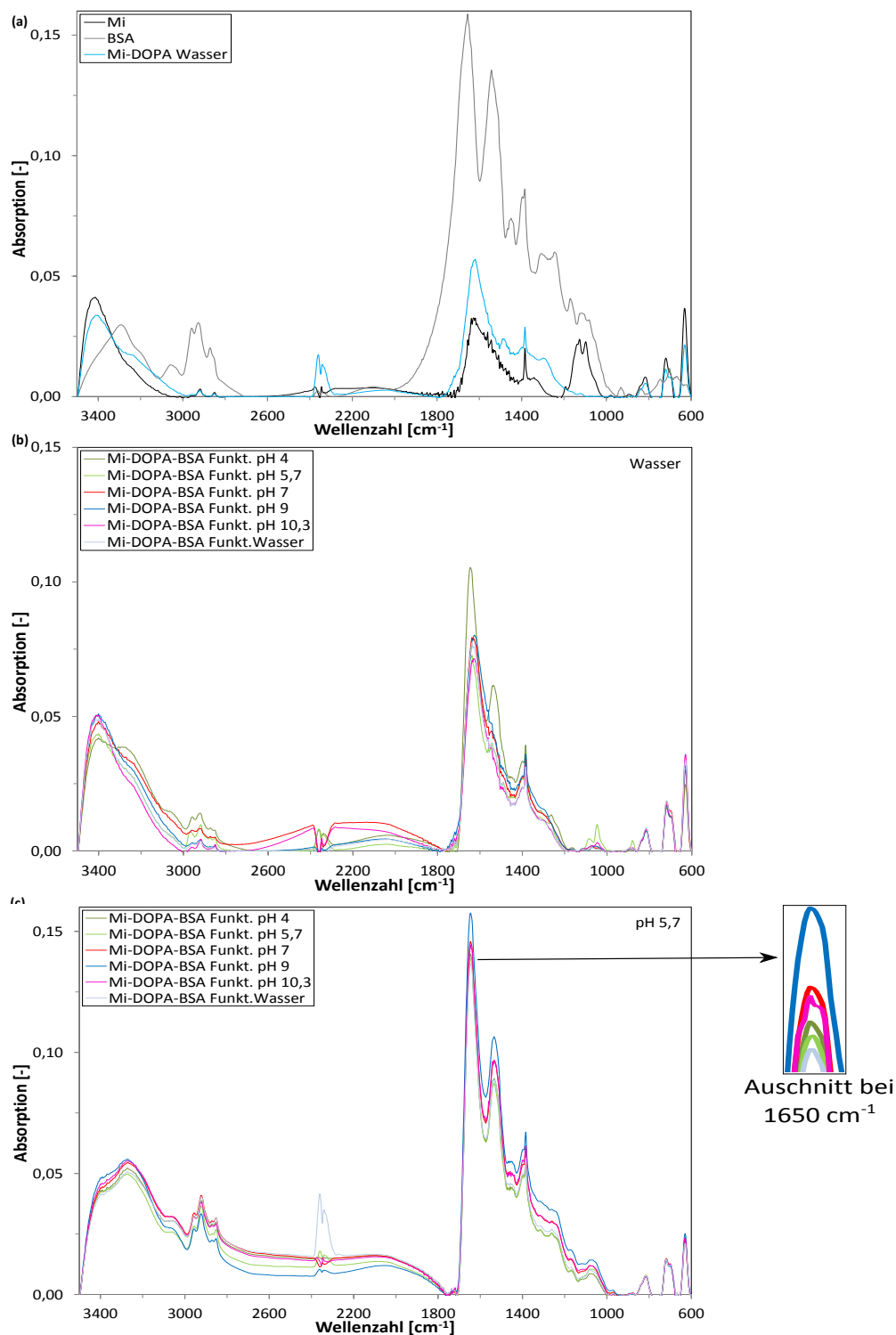


**Abbildung 5.16:** Quantitative Proteinbestimmung DA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und der Immobilisierung. Schwarz: Immobilisierung in Wasser, blau: Immobilisierung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7. Funktionalisierungszeit und -konzentration betragen 6 h und  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DA-Lösung. Immobilisierung von BSA fand über 20 h bei einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Zusätzlich bestätigt sich die pH-Wertabhängigkeit der Funktionalisierung auf die Immobilisierung bei einer Durchführung in Wasser. Dieses analoge Verhalten ist sehr gut in der Proteinbestimmung nach Bradford zu erkennen (vgl. Abb. 5.16), zeigt sich aber auch bei genauerem Vergleich der FTIR-Spektren (vgl. Abb. 5.15 (a) und (b)). Die charakteristischen Banden von Magnetit sind auch nach der Immobilisierung noch in den niedrigeren Wellenzahlenbereichen deutlich sichtbar.



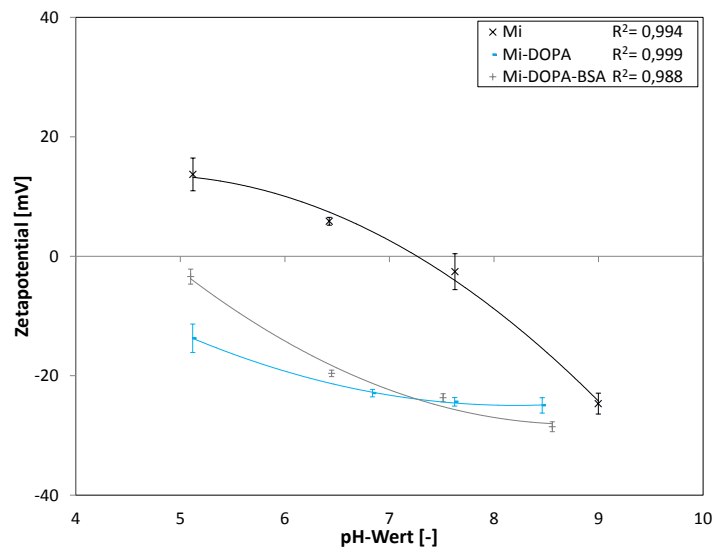
**Abbildung 5.17:** REM-Aufnahmen DA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung: (a) Funktionalisierung in Wasser, (b) Funktionalisierung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 9. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DA-Lösung. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .



**Abbildung 5.18:** FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung: (a) Reinstoffe: BSA und industrieller Magnetit (Mi) sowie die in Wasser funktionalisierten DOPA-Magnetitnanopartikel, (b) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in Wasser stattfand, (c) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in 0,1 mol·l<sup>-1</sup> EA-Puffer bei pH 5,7 stattfand. Funktionalisierung erfolgte 24 h in 5,2 mmol·l<sup>-1</sup> DOPA-Lösung bei pH 4 und 5,7 in 0,1 mol·l<sup>-1</sup> EA, pH 7, 9 und 10,3 in 0,1 mol·l<sup>-1</sup> Trispuffer sowie Wasser und DMF. Immobilisierung erfolgte in Reinstwasser und 0,1 mol·l<sup>-1</sup> EA-Puffer bei pH 5,7 mit einer BSA-Konzentration von 1 mg·ml<sup>-1</sup> über 20 h. Magnetitkonzentration betrug 1,2 mg·ml<sup>-1</sup>.

In Abbildung 5.18 sind die FTIR-Spektren der mit DOPA funktionalisierten und BSA immobilisierten Partikel dargestellt. Es kann die charakteristische BSA-Doppelbande bei  $1647\text{ cm}^{-1}$  und  $1534\text{ cm}^{-1}$  detektiert werden, was auf eine Anbindung von BSA schließen lässt. Vergleicht man die pH-Werte der Immobilisierung, wird eine höhere Proteinbeladung von BSA bei einer Anbindung bei einem pH-Wert von 5,7 ersichtlich, welche durch den Wert des IEP des Proteins erklärt werden kann. Andererseits könnte im Vergleich zu einer Anbindung in Wasser auch die Aminogruppe der funktionalisierten Substanz zugänglicher für eine Anbindung des Proteins sein, falls sie protoniert vorliegen würde. Falls es nur zu einer einzähnigen Bindung des Moleküls kommt, wäre auch die Hydroxylgruppe im sauren pH-Bereich aktiver als im neutralen Bereich.

Betrachtet man die Abbildung 5.18 (c) und vergleicht die Bandenintensitäten fällt auf, dass eine verbesserte Proteinanbindung im neutralen bis schwach basischen pH-Bereich stattgefunden hat. Dies zeigt sich auch im Verlauf der Beladung von DOPA (vgl. Abb. 5.13 (c)) und entspricht so einer erhöhten BSA-Beladung bei einer besseren Funktionalisierung. Bei einer Immobilisierung in Wasser (vgl. Abb. 5.18 (b)) ist eine geringere Proteinbeladung erkennbar. Die maximale Bandenintensität weist das Spektrum bei einem pH-Wert der Funktionalisierung von 4 auf. Bei diesem pH-Wert wird von einer geringen DOPA-Beladung ausgegangen (vgl. Abb. 5.13 (c)). Aufgrund dessen wird angenommen, dass das Protein direkt an der reaktiven Magnetitoberfläche unspezifisch adsorbiert und dies somit zu einer erhöhten Beladung führt. Alle Spektren weisen auch nach der Immobilisierung die charakteristischen Banden im niedrigen Wellenzahlbereich von Magnetit auf.

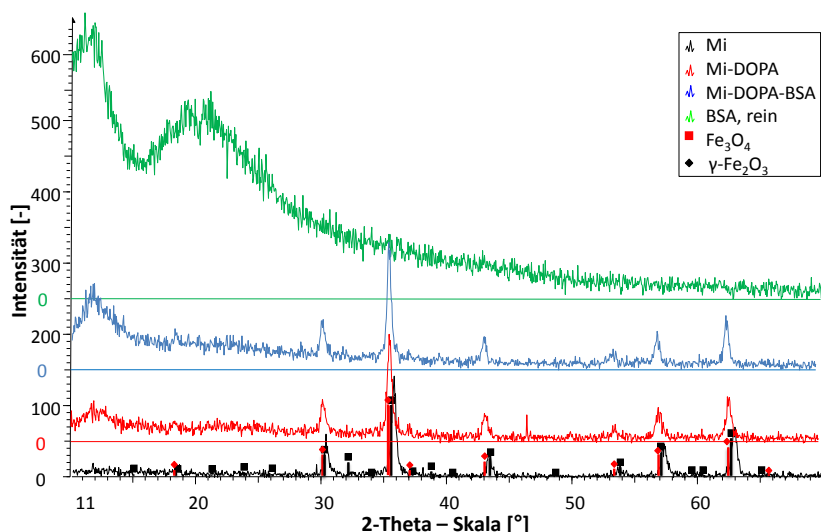


**Abbildung 5.19:** Zetapotentialverläufe DOPA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $5,2\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Immobilisierung von BSA fand über 20 h mit einer Konzentration von  $1\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  bei einem pH-Wert von 5,7 in  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Die Verläufe des Zetapotentials der mit DOPA funktionalisierten sowie der funktionalisierten und immobilisierten Magnetitpartikel sind in Abbildung 5.19 dargestellt. Die Funktionalisierung fand bei pH 7 in  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer statt. Der IEP hat sich von

7,3 auf 3,6 in Folge der Funktionalisierung verändert. Diese Veränderung der Oberflächenladungseigenschaften ist auf die Anbindung der Funktionalisierungsmoleküle und der damit verbundenen Einführung neuer funktioneller Gruppen zurückzuführen. Dadurch hat sich die Stabilität im neutralen pH-Bereich vergrößert. Bei einem Zetapotential, welches betragsmäßig höher als  $|20|$  mV ist, geht man von einer stabilisierten Suspension aus, die bei pH-Werten größer oder gleich 6 erreicht wird.

Eine anschließende Proteinanbindung führt zu einer weiteren Veränderung der Oberflächenladungen, so dass der IEP nach der Proteinanbindung 4,8 beträgt. Die Veränderung lässt sich dadurch erklären, dass der IEP des reinen BSAs zwischen 4,7-5,4 liegt und somit die Partikeloberflächenladung von den BSA-Eigenschaften bestimmt wird. Dagegen besteht das Partikelgerüst weiterhin aus Magnetit, was in den Röntgenbeugungsspektren der funktionalisierten und immobilisierten Partikel ersichtlich wird (vgl. Abb. 5.20). Die Suspensionsstabilität verändert sich nur gering durch die Anbindung von BSA, so dass die Partikel ein Zetapotential  $\geq |20|$  mV ab einem pH-Wert größer als 6,8 aufweisen. Insgesamt vergrößert sich ihre Stabilität verglichen mit dem unbehandelten Magnetitpartikel, nimmt aber leicht mit der Immobilisierung ab.



**Abbildung 5.20:** XRD-Spektren DOPA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Immobilisierung von BSA fand über 20 h mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  bei einem pH-Wert von 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Die Spektren Mi-DOPA, Mi-DOPA-BSA und BSA, rein haben einen Offset.

Die Röntgenbeugungsspektren, die in Abbildung 5.20 dargestellt sind, zeigen, dass das charakteristische Magnetitspektrum nach der Funktionalisierung und Immobilisierung erhalten geblieben ist und keine Strukturveränderung im Kristallinneren in Folge von Oxidation oder Reduktion durch die Anbindung erkennbar ist. Der berechnete Partikeldurchmesser der funktionalisierten Werte liegt in der gleichen Größe wie der des unbehandelten Magnetits. Die Größenunabhängigkeit steht im Einklang mit den Ergebnissen von Chen et al. Sie haben bei der Anbindung von Dopamin und Ascorbinsäure an Hematitpartikeln auch ähnliche Gitterparameter nachgewiesen [248].

Jedoch kann mit dieser Analyse­methode nicht geklärt werden, ob die Koordination der Oberflächenatome nach der Anbindung der phenolischen Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung beeinflusst wurde. In anderen Studien wurde bereits von einer Umkoordinierung der Oberflächenatome berichtet. Durch die Anbindung von kovalent gebundenen Liganden wurden sogar die unausgerichteten Oberflächenspins (vgl. Kapitel 2.3.4) in eine geordnere Struktur gebracht und eine höhere magnetische Sättigung  $M_s$  verglichen mit dem Ausgangsmaterial erreicht. Diese Ergebnisse wurden bei einem Ligandenaustausch von Oleat durch Dopamin erzielt. Weiterhin wurde bei einer zweizähligen Anbindung von Dopamin und Ascorbinsäure an den unterkoordinierten  $Fe^{3+}$ -Oberflächenbindungsstellen von einer Umstrukturierung der oktaedrischen trivalenten Eisenionenoberflächen­umgebung berichtet, welche sich der Struktur des makroskaligen  $\alpha - Fe_2O_3$  annäherte [242].

So kann nicht aufgrund der gleichbleibenden inneren Kristallstruktur eine spezifische Bindung ausgeschlossen werden; wichtig ist hier die Veränderung der Oberflächenatomanordnung zu berücksichtigen [252]. Die Verschiebung der Bandenlage im FTIR-Spektrum der funktionalisierten Partikel verglichen mit der reinen Funktionalisierungssubstanz weist auf eine Veränderung der Koordination der Funktionalisierungsmoleküle hin, was ein Indiz für eine spezifische Anbindung sein könnte. Betrachtet man das XRD-Spektrum der funktionalisierten und immobilisierten Magnetitpartikel, sind hinzukommende Peaks in niedrigen 2-Theta Bereichen bei ca.  $12^\circ$  zu erkennen. Diese zusätzlichen Peaks sind auf die Reflexion des kristallinen Aufbaus des BSAs zurückzuführen und auch beim BSA-Reinstoff anzutreffen. Weiterhin sind die charakteristischen Peaks des Magnetits unverändert erkennbar und bilden somit den Partikelkern.

Zusammenfassend lässt sich für die mit Dopamin funktionalisierten Partikel eine verstärkte Anbindung im Basischen feststellen. Die Fähigkeit der Cyclisierung von Dopamin könnte die Oxidation zum Chinon verzögern und zu einer besseren Affinität der Bindungspartner führen. Die Anbindung von Dopamin verringert die Proteinbeladung, was mit einer Vernetzungsreaktion und einer damit verbundenen Agglomeration der funktionalisierten Partikel einhergeht. Andererseits kann aufgrund der Cyclisierung von Dopamin die Aminogruppe des Moleküls nicht für die Proteinanbindung verfügbar sein.

Bei DOPA lässt sich ebenfalls eine erfolgreiche Anbindung nachweisen, was durch neu auftretende Absorptionsbanden sowie der Veränderung des IEP nachgewiesen werden konnte. Der optimale pH-Bereich einer Funktionalisierung liegt zwischen 7-9. Die Oxidation des DOPAs zu seinem Chinon (bei pH-Wert 10,3) führt zu einer geringeren Affinität und spiegelt sich in einer verminderten Anbindung wider. Die Proteinbeladung ist abhängig von der DOPA-Beladung und somit abhängig vom pH-Wert der Funktionalisierung. Es konnte festgestellt werden, dass es zu einer erhöhten Proteinbeladung bei einer besseren Anbindung des funktionalisierenden Moleküls kommt. Weiterhin wird eine höhere Proteinbeladung bei einem pH-Wert von 5,7 im Vergleich zur neutralen Anbindung erreicht. Zusätzlich konnte keine Veränderung der Gitterstruktur durch die Röntgenbeugungsspektren nachgewiesen werden, weshalb eine Oxidation des Kristallinneren durch die Anbindung ausgeschlossen wird.

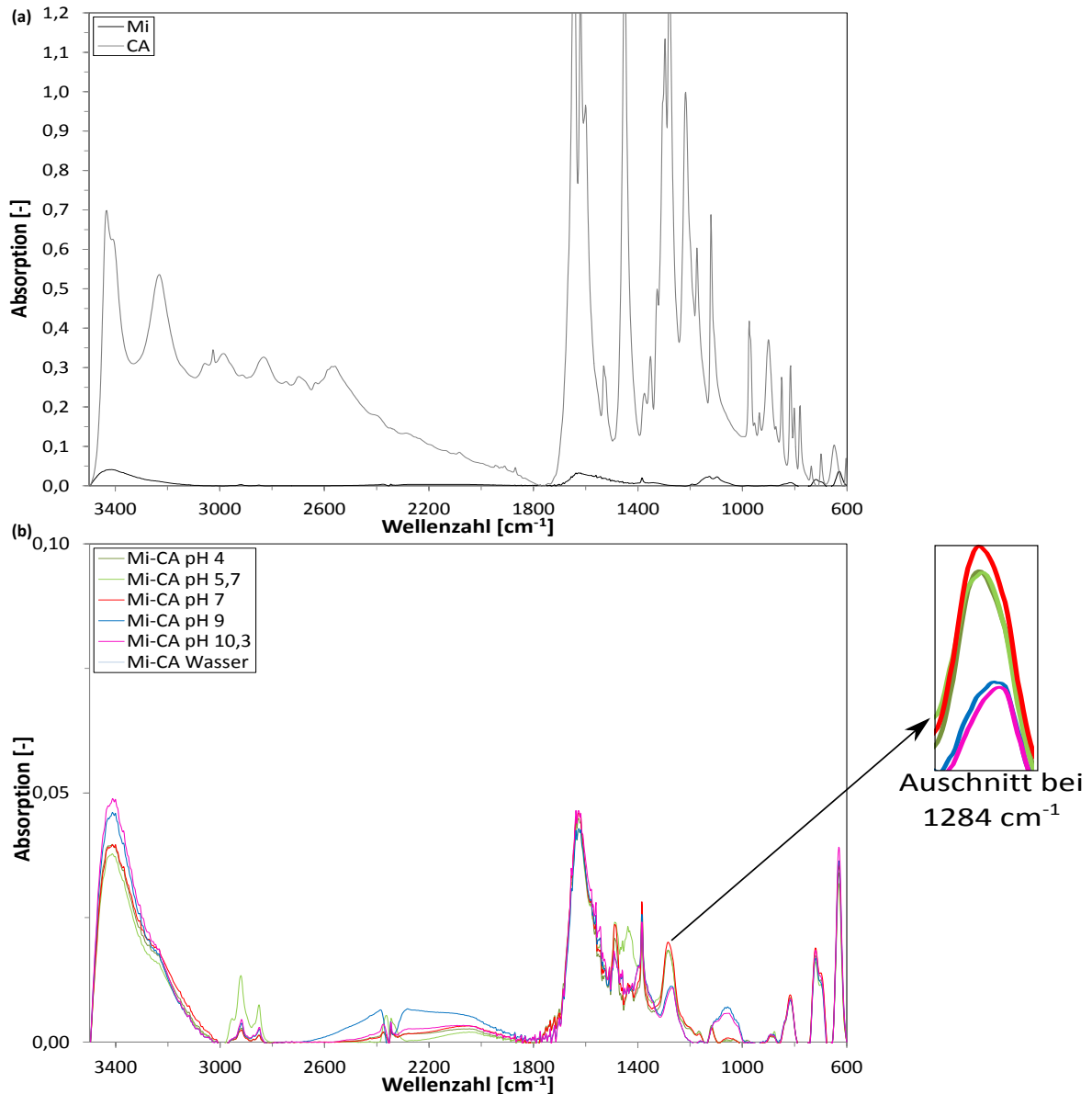
### 5.1.3.2 Kaffeesäure

In Abbildung 5.21 (a) sind die Spektren der reinen Kaffeesäure und des industriellen Magnetits dargestellt. Dabei weist das Absorptionsspektrum der Kaffeesäure einige charakteristische Banden auf. Die Bande bei  $3434\text{ cm}^{-1}$  stellt die intermolekularen Brückenbindungen zwischen den OH-Gruppen dar [237]. Der nachfolgende Wellenzahlenbereich wird als „Fingerabdruck“ für aromatische Verbindungen bezeichnet. So repräsentieren die Wellenzahlen  $1645\text{ cm}^{-1}$ ,  $1620\text{ cm}^{-1}$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$  die C=O-Doppelschwingungen [205, 253], die aromatische C=C-Doppelbindung [205] und die Schwingungen der Carboxylgruppe [134]. Die Banden bei  $1451\text{ cm}^{-1}$  und  $1280\text{ cm}^{-1}$  charakterisieren die C-H-Schwingungen [205, 237], wobei die letztere für Ph-O-Schwingungen oder O-H-Schwingungen [253] stehen könnte.

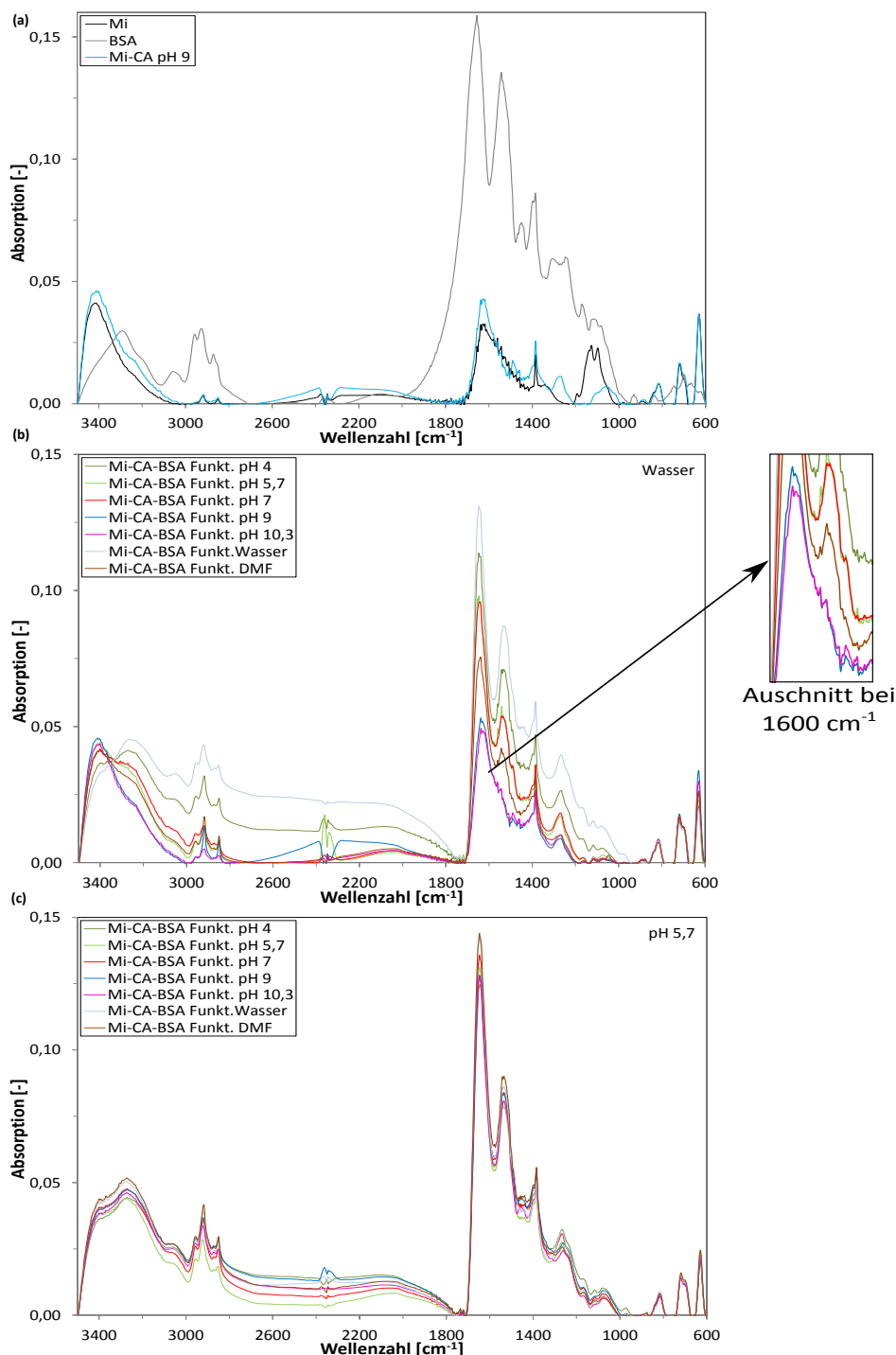
Die Spektren der mit CA funktionalisierten Partikel sind in Abbildung 5.21 (b) dargestellt und verglichen mit dem Spektrum des reinen Magnetits sind neue charakteristische Banden anzutreffen. Die auffälligste Bande liegt bei  $1284\text{ cm}^{-1}$  und weitere Banden sind bei  $1627\text{ cm}^{-1}$  und  $1489\text{ cm}^{-1}$  sichtbar. Die Banden lassen sich bei leicht verschobenen Wellenzahlen im Vergleich zum Reinstoff wiederfinden. So steht die Bande bei  $1284\text{ cm}^{-1}$  für phenolische Verbindungen. Bei der Wellenzahl von  $1627\text{ cm}^{-1}$  entsteht eine neue Bande, die zum einen für aromatische C=C-Doppelschwingungen oder der Schwingung der Carboxylgruppe stehen könnte. Das Auftreten dieser Bande könnte die freie Schwingung der Carboxylgruppen zeigen, was eine Anbindung der Kaffeesäure durch ihre Carboxylgruppe an der Magnetitoberfläche unwahrscheinlich macht. Dadurch ist die Anbindung mit den phenolischen Hydroxylgruppen denkbarer, was bereits in anderen Veröffentlichungen durch die Anbindung an unterkoordinierten trivalenten Eisenionen anbindungsstellen detektiert wurde [242]. Die Bande bei  $1489\text{ cm}^{-1}$  stellt die C-H-Schwingung dar. Die leichte Verschiebung der Banden ist auf die Anbindung von Kaffeesäure an der Magnetitoberfläche und die dadurch entstehende strukturelle Veränderung zurückzuführen.

Weiterhin sind die Absorptionsbanden der OH-Gruppen verschoben. In den Reinstoffen CA und Mi liegt diese Bande bei  $3434\text{ cm}^{-1}$  und  $3435\text{ cm}^{-1}$ , wogegen sie nach der Funktionalisierung bei  $3401\text{ cm}^{-1}$  detektiert wurde. Bei den Banden  $1489\text{ cm}^{-1}$  und  $1284\text{ cm}^{-1}$  sind geringere Unterschiede in den Intensitäten der Bandenhöhe erkenntlich, was auf eine pH-Wertabhängigkeit der Anbindung schließen lässt. Auffällig ist auch, dass die Bandenhöhe im basischen Bereich bei beiden Proben geringer ist und somit von einer niedrigeren Anbindung ausgegangen werden kann. Dagegen ist eine höhere Bandenintensität bei einer Anbindung im Neutralen oder Sauren verzeichnet worden. Die Gründe hierfür sind elektrostatischer Natur. Im Neutralen liegt die Magnetitpartikeloberfläche aufgrund des IEP bei pH 7 relativ ungeladen vor, weshalb die Kaffeesäuremoleküle nicht von der Magnetitoberfläche abgestoßen werden. Dagegen liegen die Kaffeesäuremoleküle im basischen Bereich häufiger in deprotonierter und oxidiert Form als Chinon vor. Falls die Anbindung über die Komplexbildung der zwei Hydroxylgruppen der Kaffeesäure ablaufen würde, wäre das Chinon aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkungsenergien nicht so affin gegenüber der Oberfläche und die Anbindung wäre vermutlich nicht so stark. Binbuga et al. haben herausgefunden, dass im alkalischen pH-Bereich (oberhalb von einem pH-Wert von 8,8) die Komplexbildung von Brenzkatechin mit bivalenten Eisenionen im Vergleich zum neutralen Bereich

um 50 % reduziert wurde [254]. Bei der Komplexbildung mit Titandioxid und Brenzkatechin wurden zwei verschiedene Komplexe nachgewiesen, wobei es sich um ein- und zweikernige Komplexe handelt. Jedoch wiesen sie gleiche Spektren auf. Es wird davon ausgegangen, dass der einkernige im Vergleich zum zweikernigen Komplex instabiler ist [253].



**Abbildung 5.21:** FTIR-Spektren CA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes: (a) Reinstoffe: Kaffeesäure (CA) und industrieller Magnetit (Mi), (b) funktionalisierte CA-Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 4 und 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA, pH 7, 9 und 10,3 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .



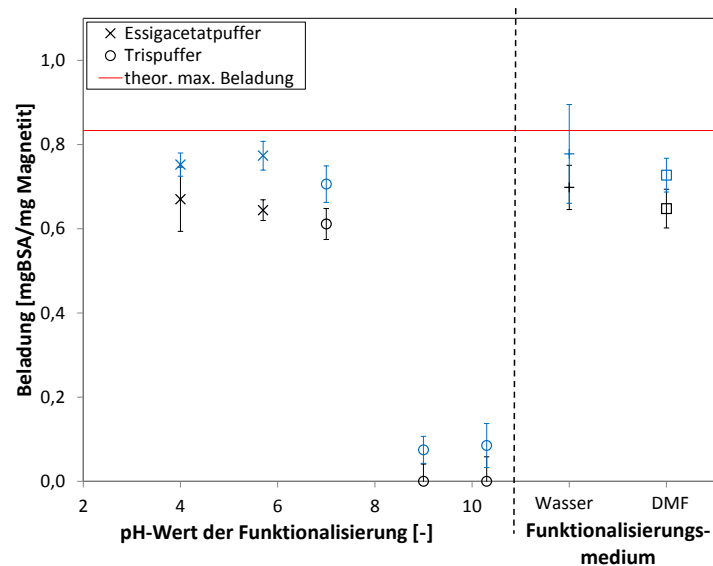
**Abbildung 5.22:** FTIR-Spektren CA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung: (a) Reinstoffe: BSA und industrieller Magnetit (Mi) sowie die in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 9 funktionalisierten CA-Magnetitnanopartikel, (b) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in Wasser stattfand, (c) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7 stattfand. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 4 und 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA, pH 7, 9 und 10,3 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer sowie Wasser und DMF. Magnetitkonzentration  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Immobilisierung erfolgte in Reinstwasser und  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7 mit einer BSA-Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  über 20 h. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

In Abbildung 5.22 sind die FTIR-Spektren der funktionalisierten und immobilisierten

Partikel gezeigt, bei denen die neu auftretende BSA-Doppelbande auffällig ist. Diese BSA-Bande ist bei der Anbindung in Wasser (vgl. Abb. 5.22 (b)) im Vergleich zum Reinstoff an leicht unterschiedlichen Positionen bei  $1647\text{ cm}^{-1}$  und  $1535\text{ cm}^{-1}$  zu detektieren. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Doppelbande bei einer vorangegangenen Funktionalisierung im basischen pH-Bereich nicht so ausgeprägt ist. Diese Beobachtung spiegelt sich in den Ergebnissen der Proteinbestimmung nach Bradford wider (vgl. Abb. 5.23).

Die beiden Ergebnisse der FTIR-Spektren und der Proteinbeladung gehen konform. Die Proteinanbindung nimmt mit steigendem pH-Wert der Funktionalisierung ab und nimmt mit sinkendem pH-Wert der Funktionalisierung und steigendem Kaffeesäuregehalt zu. Weiterhin ist bei beiden Analysen ersichtlich, dass eine höhere Proteinbeladung bei einem pH-Wert von 5,7 im Vergleich zu einer Anbindung in Wasser festzustellen ist (vgl. Abb. 5.23 und 5.22 (c) und (d)).

Ein pH-Werteinfluss durch die vorangehende Funktionalisierung auf die Immobilisierung ist erkennbar. Mit der quantitativen Proteinbestimmung wird die höchste Beladung bei einem pH-Wert der Funktionalisierung und der Immobilisierung von 5,7 verzeichnet. Sie beträgt  $0,77\text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Magnetit}}^{-1}$ . Die pH-Wertabhängigkeit der Funktionalisierung lässt sich in zwei Bereiche aufteilen. Im ersten Bereich mit pH-Werten von 4-7 werden Beladungen zwischen  $0,71 - 0,77\text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Magnetit}}^{-1}$  erzielt. Im zweiten, den basischen, pH-Bereich von 9-10,3 hat kaum bzw. keine Beladung stattgefunden.

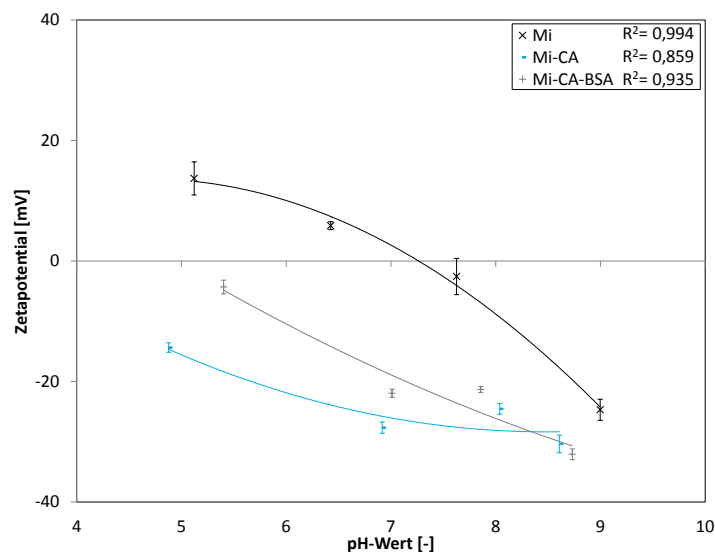


**Abbildung 5.23:** Quantitative Proteinbestimmung CA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und der Immobilisierung. Schwarz: Immobilisierung in Wasser, blau: Immobilisierung in  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7. Funktionalisierungszeit und -konzentration betragen 6 h und  $5,2\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung. Immobilisierung von BSA fand über 20 h bei einer Konzentration von  $1\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Wenn die Kaffeesäure einen zweizähligen Komplex über die phenolischen Hydroxylgruppen in para-Stellung ausbildet, kommt für die Proteinanbindung nur die Carboxylgruppe der Kaffeesäure in Frage, welche nach der Funktionalisierung im FTIR detek-

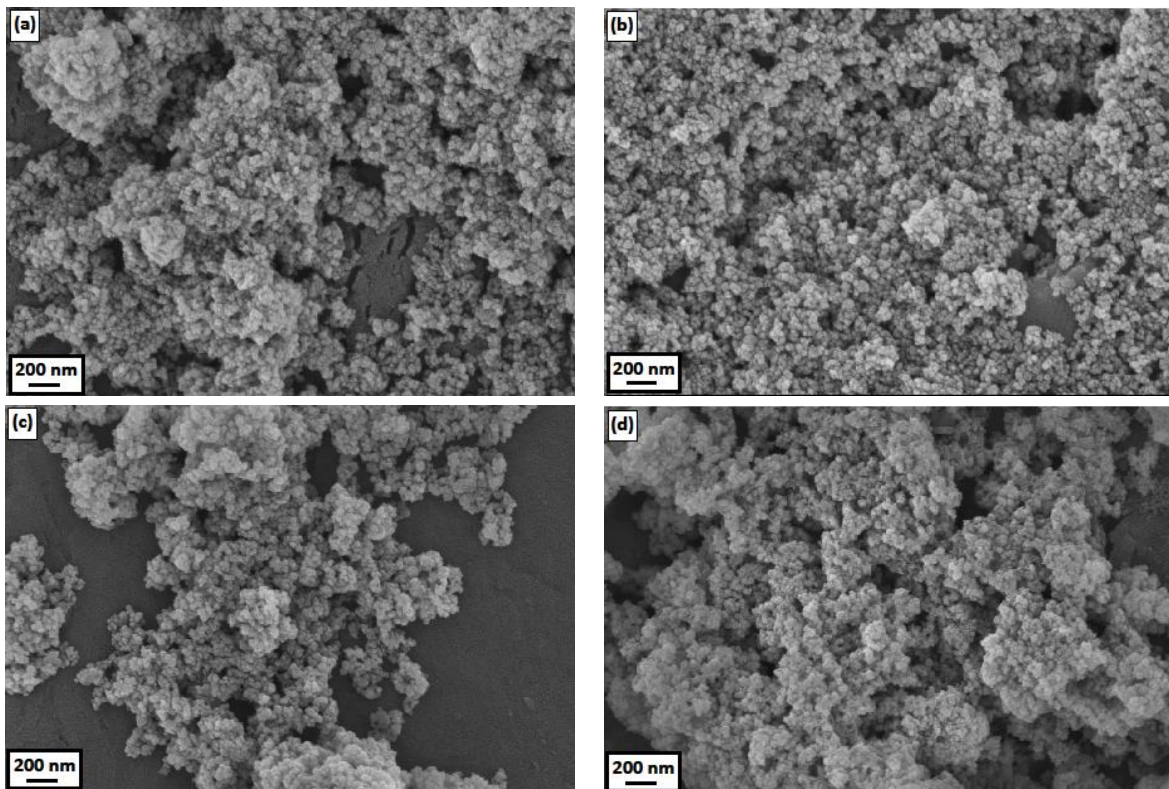
tiert wurde und somit frei für eine Anbindung wäre. Aus der Literatur ist bekannt, dass Zimtsäuren, zu denen die Kaffeesäure gehört, eine stärkere Proteinbindungsaffinität verglichen mit anderen phenolischen Substanzen besitzen [240].

Die Verläufe des Zetapotentials der funktionalisierten und immobilisierten Partikel sind in Abbildung 5.24 denen der Verläufen der unbehandelten Partikel gegenübergestellt. Sie zeigen eine deutliche Veränderung der Oberflächenladungseigenschaften hinsichtlich der Lage ihrer IEP. Durch die Funktionalisierung mit Kaffeesäure wird der IEP des unbehandelten Magnetits von einem pH-Wert 7,3 auf 3,3 verändert. Durch die Funktionalisierung mit CA wurden die Oberflächenladungsverhältnisse modifiziert, was aufgrund der Einführung neuer funktioneller Gruppen auf der Oberfläche geschieht. So werden nun die Oberflächenladungen durch die Funktionalisierung dominiert, während vorher die OH-Gruppen des Magnetits den IEP bestimmten. Durch den Austausch der funktionellen Gruppen durch die Carboxylgruppen der Kaffeesäure werden positive Ladungen neutralisiert, einhergehend mit der Erhöhung der negativen Nettoladung. Das Phänomen führt zum Abfall des IEP nach der Funktionalisierung. Durch die Oberflächenladungsveränderung und der damit erhöhten Oberflächenladungsdichte sowie der Ausdehnung der diffusen Schicht der Partikel kommt es zu einer Stabilisierung auf elektrostatischem Wege. Im neutralen pH-Bereich wurde der Betrag des Zetapotentials im Vergleich zum unbehandelten Partikel deutlich erhöht, was eine Suspensionsstabilisierung mit sich bringt. Durch die Adsorption der BSA-Moleküle wird der IEP wieder zu einem Wert von 4,9 verändert, wodurch sich auch die Proteinanbindung bestätigen lässt. Diese Veränderung wird durch die Oberflächenladungseigenschaften des BSA bestimmt und der IEP nähert sich dem IEP des Reinstoffes an, der bei einem pH-Wert zwischen 4,7-5,4 liegt. Die Proteinimmobilisierung führt somit zu einem veränderten Oberflächenpotential, was zu einer Destabilisierung im neutralen pH-Bereich führt. Dennoch ist die Stabilität gegenüber den unbehandelten Magnetitpartikeln verbessert worden. Insgesamt zeigt die Funktionalisierung mit Kaffeesäure und der nachfolgenden Immobilisierung eine starke Beeinflussung der Oberflächenladungsverhältnisse.



**Abbildung 5.24:** Zetapotentialverläufe CA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Immobilisierung von BSA fand über 20 h mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$  bei einem pH-Wert von 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

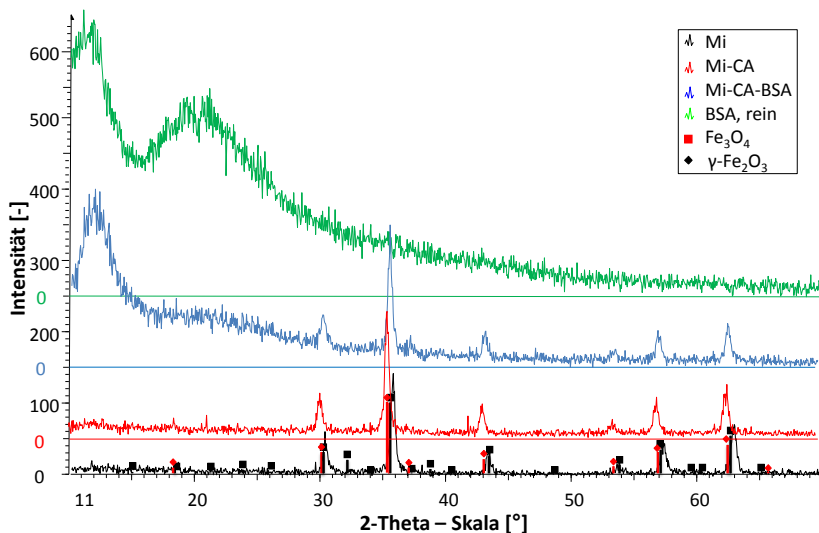
Vergleicht man in REM-Aufnahmen den Grad der Agglomeration mit den vorherigen Suspensionsstabilitätsergebnissen erkennt man, dass die Funktionalisierung zu keiner verstärkten Agglomeration führt. Dies wird in den Abbildung 5.25 (a) und (b) ersichtlich. Die beiden REM-Aufnahmen unterscheiden sich im pH-Wert der Funktionalisierung, wobei eine erhöhte Anbindung der Kaffeesäure im Säuren stattgefunden hat. Dennoch zeigen beide Bilder etwa einen gleich niedrigen Agglomerationsgrad. Dagegen wird der Agglomerationsgrad nach der Immobilisierung durch die BSA-Anbindung erhöht (vgl. Abb. 5.25 (c) und (d)). Vergleicht man aber die pH-Werte der Funktionalisierung untereinander, wird ersichtlich, dass bei einer Funktionalisierung im Basischen, die eine geringere Kaffeesäurebeladung aufweist, eine stärkere Agglomeration durch die Proteinanbindung auftritt, als bei einer Funktionalisierung im Säuren, so dass durch eine höhere Beladung der Kaffeesäure die proteininduzierte Agglomeration minimiert wird. Diese Beobachtung wurde trotz einer wesentlich höheren Proteinbeladung der funktionalisierten Partikel bei einem pH-Wert von 5,7 gemacht (vgl. Abb. 5.23).



**Abbildung 5.25:** REM-Aufnahmen CA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung: (a)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA bei pH 5,7 funktionalisierte Magnetitpartikel, (b)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 9 funktionalisierte Magnetitpartikel, (c) funktionalisierte und immobilisierte Magnetitpartikel, Funktionalisierung  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 7, Immobilisierung  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA bei pH 5,7, (d) funktionalisierte und immobilisierte Magnetitpartikel, Funktionalisierung  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 9, Immobilisierung  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA bei pH 5,7. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung. Immobilisierung von BSA fand über 20 h mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$  statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Die Spektren der Röntgenbeugung der mit Kaffeesäure funktionalisierten Partikeln bei einem pH-Wert von 7 und einer anschließenden Proteinanbindung bei einem pH-Wert von 5,7 sind in Abbildung 5.26 zu sehen. Die Magnetitkristallstruktur ist nach der Funktionalisierung erhalten geblieben, da es zu keiner Verschiebung und keinen neuen

Peaks kommt. Die Berechnungen der Gitterkonstante und der Kristallgröße sind nahezu identisch mit denen des unbehandelten Magnetits. Daraus lässt sich schließen, dass es zu keiner Oxidation durch die Funktionalisierung kam. Jedoch kommt es nach der BSA-Anbindung zu einer Beugungserscheinung bei  $12^\circ$  auf der 2-Theta-Achse, die auf die Kristallstruktur des BSA zurückzuführen ist.



**Abbildung 5.26:** XRD-Spektren CA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA- Lösung bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Immobilisierung von BSA fand über 20 h mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  bei einem pH-Wert von 5,7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Die Spektren Mi-CA, Mi-CA-BSA und BSA, rein haben einen Offset.

Insgesamt konnte eine erfolgreiche Anbindung von Kaffeesäure an Magnetitpartikeln erreicht werden, die jedoch vom pH-Wert der Funktionalisierung abhängt. Die höchsten Beladungen wurden im neutralen pH-Bereich erreicht, wogegen die niedrigsten im Basischen festgestellt wurden. Es wird davon ausgegangen, dass eine Komplexierung zwischen den phenolischen Hydroxylgruppen der Kaffeesäure und dem Magnetit ausgebildet wird und dass die Carboxylgruppe nicht an die Partikeloberfläche gebunden wird. Eine geförderte Agglomeration durch die Funktionalisierung mit Kaffeesäure wird nicht festgestellt. Eine anschließende Immobilisierung hat gezeigt, dass die vermehrte Kaffeesäureanbindung zu einer erhöhten Proteinbeladung führt. Dies könnte auf die Prävention der proteininduzierten Agglomeration der Kaffeesäure durch die vorangegangene Funktionalisierung zurückzuführen sein. Hinzu kommt die erhöhte Affinität der Carboxylgruppe der Kaffeesäure im Vergleich zu den funktionellen OH-Gruppen des Magnetits. Weiterhin wurden veränderte Oberflächenladungsverhältnisse nach der Funktionalisierung und Immobilisierung festgestellt und eine erhöhte Suspensionsstabilität im Vergleich zu den unbehandelten Partikeln erreicht. Die Bindungsstabilität von Kaffeesäure wird als stark eingestuft, da es im Vergleich zu den Vorversuchen, bei denen Kaffeesäure und BSA parallel angebunden wurden, zu keiner Störung des Proteinests kam. Aufgrund der starken Bindung kann man von einer zweizähligen Bindung ausgehen.

### 5.1.3.3 Gallussäure

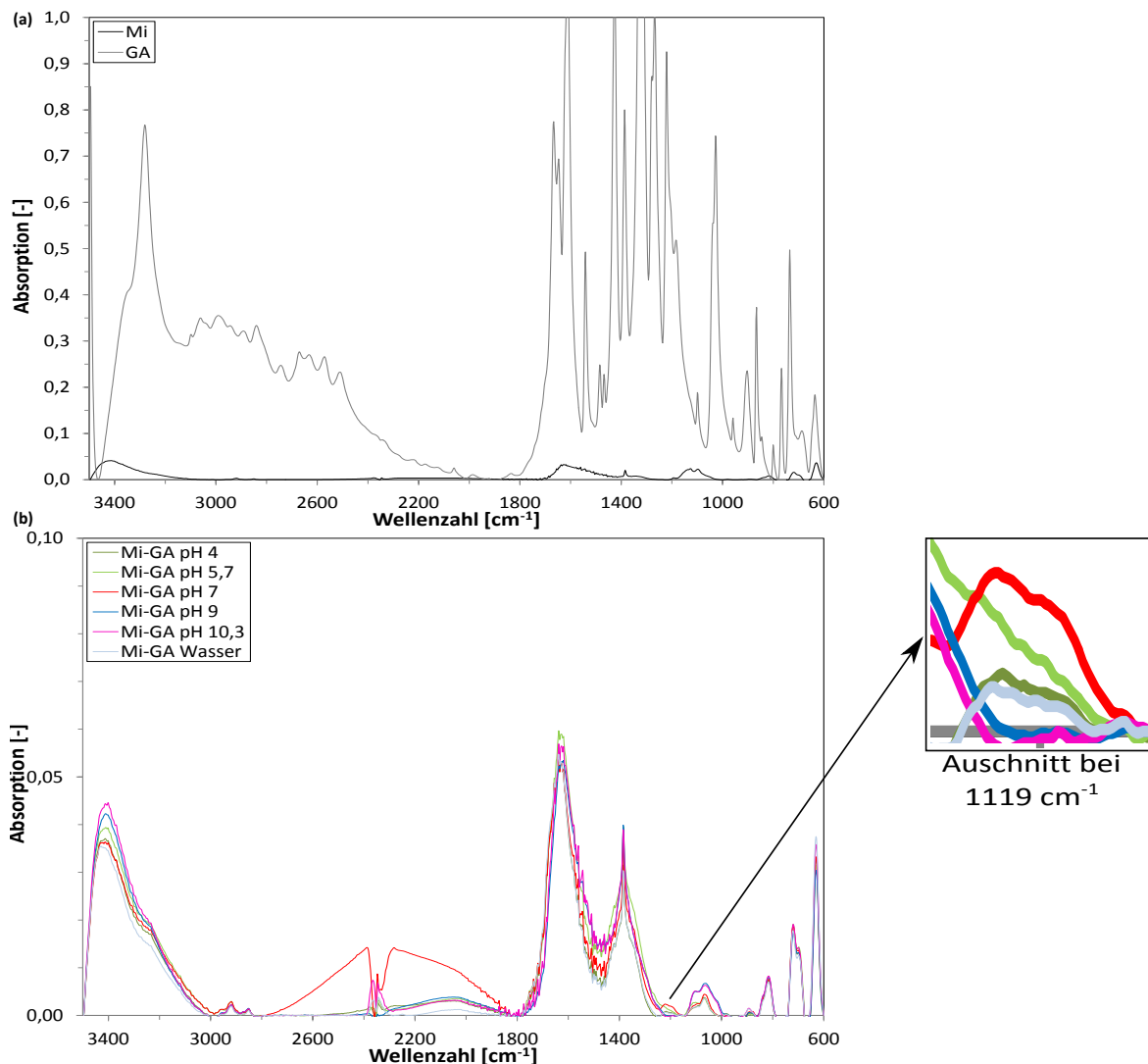
In Abbildung 5.27 sind die FTIR-Spektren der Reinstoffe (a) und der mit Gallussäure funktionalisierten Partikel (b) dargestellt. Bei einer genaueren Betrachtung des Spektrums der reinen Gallussäure lassen sich einige charakteristische Banden erkennen. Bei der Wellenzahl von  $3280\text{ cm}^{-1}$  handelt es sich um eine Überlagerung von OH-Schwingungen der intermolekularen Wasserstoffbrücken, die im Bereich von  $3200 - 3600\text{ cm}^{-1}$  auftreten und  $\equiv C-H$ -Schwingungen, die bei einer Wellenzahl von  $3300\text{ cm}^{-1}$  erscheinen. Die Bande bei  $3000\text{ cm}^{-1}$  repräsentiert eine  $=C-H$ -Schwingung, die häufig in Aromaten anzutreffen ist und üblicherweise durch drei Banden charakterisiert wird [134]. Die Banden  $1669\text{ cm}^{-1}$  und  $1612\text{ cm}^{-1}$  stehen für  $C=O$ -Dehnungsschwingungen und  $C=C$ -Doppelschwingungen. Die Bande  $1426\text{ cm}^{-1}$  stellt aromatische  $CC$ -Dehnungsschwingungen dar [205, 253]. Die Biegeschwingung in der Ebene der OH-Gruppe zeigt sich durch die Bande  $1321\text{ cm}^{-1}$ , wogegen die Ph-O-Dehnungsschwingung bei  $1221\text{ cm}^{-1}$  sichtbar wird. Bei der Bande  $1027\text{ cm}^{-1}$  handelt es sich um aromatische C-H-Deformierungsschwingungen [253].

Vergleicht man die mit Gallussäure funktionalisierten Partikel (vgl. Abb. 5.27 (b)) mit den beiden Reinstoffen werden zwei neu auftretende bzw. erhöhte Absorptionsbanden sichtbar. Diese befinden sich bei den Wellenzahlen  $1637\text{ cm}^{-1}$  und  $1384\text{ cm}^{-1}$ . Weiterhin wird eine zusätzliche kleine Bande bei  $1119\text{ cm}^{-1}$  detektiert, die besonders bei einem pH-Wert der Funktionalisierung von 7 ausgeprägt ist. Durch die Detektion der neuen Banden wird generell eine Anbindung von Gallussäure gezeigt. Jedoch wird keine Bande exakt nachgewiesen. Bei der Wellenzahl von  $1637\text{ cm}^{-1}$  dürfte es sich um die charakteristischen  $C=O$ -Dehnungsschwingungen oder aromatische Doppelschwingungen handeln, die aufgrund der Anbindung verschoben worden sind. Die Banden bei  $1119\text{ cm}^{-1}$  und  $1384\text{ cm}^{-1}$  können die verschobenen Phenol- und die O-H-Biegeschwingungen repräsentieren.

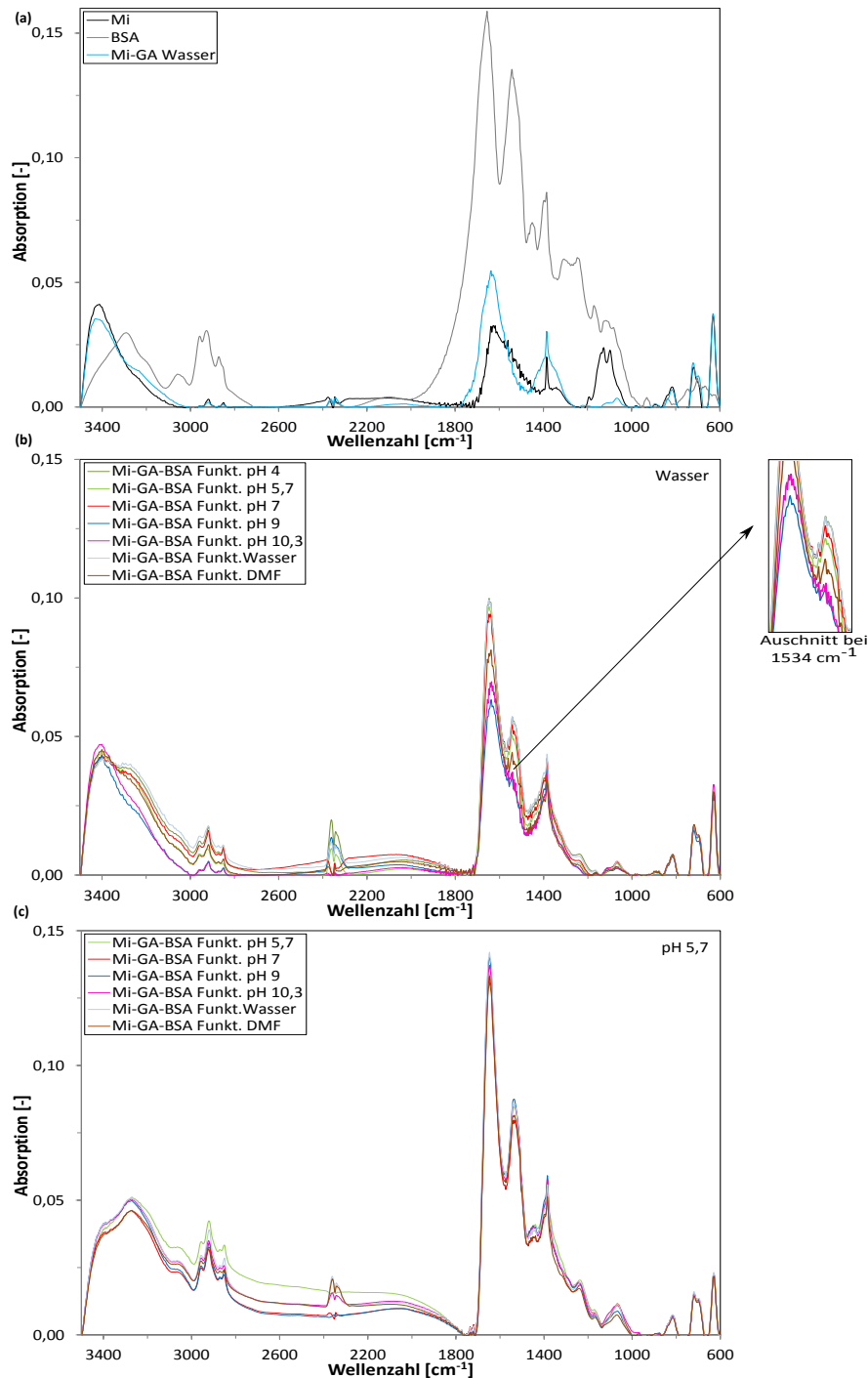
Eine pH-Wertabhängigkeit ist aufgrund einer nicht erkennbaren Reihenfolge der Bandenintensitäten nicht gegeben. Eine geringe Affinitätsänderung bezüglich einer pH-Wertänderung wurde von Araujo et al. bei der Bindung von Gallussäure an Titandioxid bemerkt [253]. Eine Anbindung der Gallussäure über die  $COOH$ -Gruppe kann aufgrund der FTIR-Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, da die  $COO^-$ -Bande nicht im Spektrum der funktionalisierten Partikel erscheint, deren charakteristische Wellenzahl bei  $1560 - 1610\text{ cm}^{-1}$  [134] liegt. So ist auch eine Anbindung über diese Gruppe denkbar. Gu et al. haben Adsorptionsversuche mit natürlicher organischer Materie an Goethit durchgeführt und festgestellt, dass die wichtigsten funktionellen Gruppen in der Adsorptionsreaktion neben den Hydroxylgruppen die Carboxylgruppen sind [117]. Laut Araujo et al. soll Gallussäure an der Titandioxidoberfläche chemisorbieren. Durch die Komplexbildung der zwei Hydroxylgruppen mit der Titandioxidoberfläche soll eine ein- oder zweikernige Bindung entstehen (vgl. Kapitel 2.4.1). Dabei soll die Stabilität der Bindungen nicht durch die dritte Hydroxylgruppe der Gallussäure beeinflusst werden [253].

Es wird angenommen, dass der Proteintest nach Bradford durch das Ablösen der funktionalisierten Substanz beeinflusst wurde, was zu unterschiedlichen Ergebnissen der Proteinanbindung im FTIR und des Proteintest führte. Dies deutet auf eine nicht

stabile Bindung hin. Daraus lässt sich schließen, dass die Gallussäure keinen stabilen Oberflächenkomplex über die beiden Hydroxylgruppen bildet. Die Ursache dafür, dass es zu keiner zweizähligen Anbindung kommt, könnte in der sterischen Hinderung durch die dritte Hydroxylgruppe begründet sein (vgl. Kapitel 2.4.3.2). Eine sterischen Hinderung wird auch von Gu et. al bei der Adsorption von natürlicher organischer Materie an Goethit beschrieben [117]. Die Ausbildung einer stabilen Bindung von Gallussäure und Titandioxid kann in der unterschiedlichen Kristallstruktur und den Bindungsaffinitäten begründet sein.



**Abbildung 5.27:** FTIR-Spektren GA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes: (a) Reinstoffe: Gallussäure (GA) und industrieller Magnetit (Mi), (b) funktionalisierte GA-Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 24 h in 20,8 mmol · l<sup>-1</sup> GA-Lösung bei pH 4 und 5,7 in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> EA, pH 7, 9 und 10,3 in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> Trispuffer. Magnetitkonzentration 1,2 mg · ml<sup>-1</sup>.



**Abbildung 5.28:** FTIR-Spektren GA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung: (a) Reinstoffe: BSA und industrieller Magnetit (Mi) sowie die in Wasser funktionalisierten GA-Magnetitnanopartikel, (b) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in Wasser stattfand, (c) funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel, deren Immobilisierung in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> EA-Puffer bei pH 5,7 stattfand. Funktionalisierung erfolgte 24 h in 20,8 mmol · l<sup>-1</sup> GA-Lösung bei pH 4 und 5,7 in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> EA, pH 7, 9 und 10,3 in 0,1 mol · l<sup>-1</sup> Trispuffer sowie Wasser und DMF. Magnetitkonzentration 1,2 mg · ml<sup>-1</sup>. Immobilisierung erfolgte in Reinstwasser und 0,1 mol · l<sup>-1</sup> EA-Puffer bei pH 5,7 bei einer BSA-Konzentration von 1 mg · ml<sup>-1</sup> über 20 h. Magnetitkonzentration betrug 1,2 mg · ml<sup>-1</sup>.

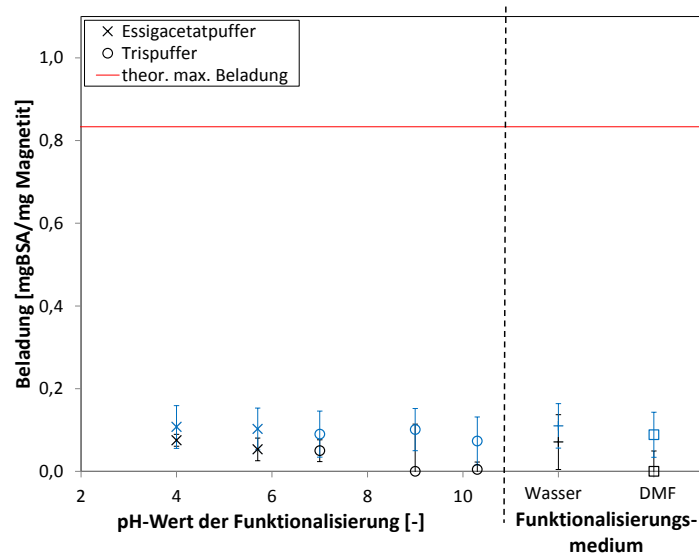
Die Spektren der mit Gallussäure funktionalisierten und BSA immobilisierten Partikel

sind in Abbildung 5.28 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei beiden pH-Werten der Immobilisierung die charakteristischen Doppelpeaks durch Amidschwingungen hervorgerufen werden, es aber zu einer leichten Verschiebung der Bande kommt. Die Bandenpositionen liegen bei reinem BSA bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  und  $1542\text{ cm}^{-1}$ . Dagegen ist die Lage der Banden bei den funktionalisierten und immobilisierten Partikeln in Abbildung 5.28 (b) bei  $1648\text{ cm}^{-1}$  und  $1534\text{ cm}^{-1}$  und in Abbildung 5.28 (c) bei  $1638\text{ cm}^{-1}$  und  $1536\text{ cm}^{-1}$ .

Dabei kommt es bei der Anbindung in Wasser zu einer verstärkten Verschiebung der Bandenposition, was durch Quervernetzungen der Partikel untereinander hervorgerufen werden könnte [240]. Diese signifikante Bandenverschiebung deutet auf eine Veränderung der Proteinstruktur hin, was weitere Auswirkungen hinsichtlich der Aktivität von Biokatalysatoren haben könnte. Die Proteinbeladung bei einem pH-Wert von 5,7 (vgl. Abb. 5.28 (c)) ist unabhängig von dem pH-Wert der Funktionalisierung und unterstützt somit die Aussage, dass unabhängig vom pH-Wert der Funktionalisierung die gleiche Menge an Gallussäure adsorbiert wird und deshalb kein Unterschied bei der Immobilisierung festgestellt werden kann.

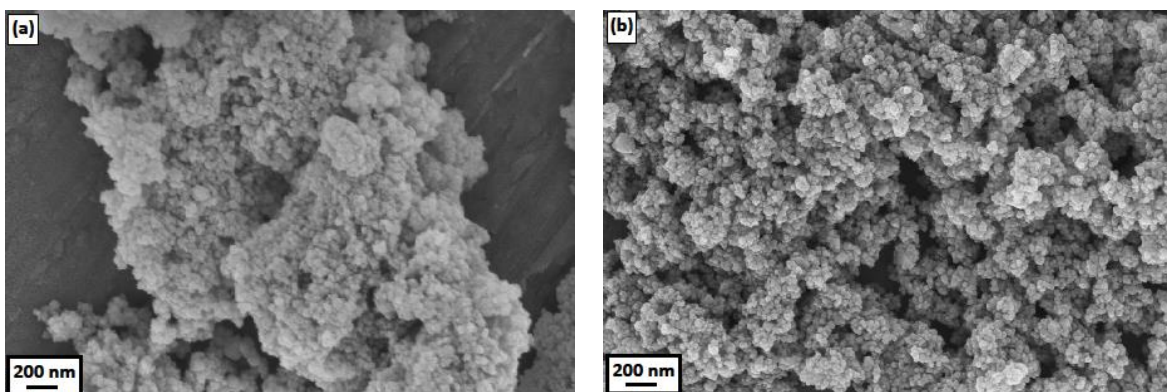
Im Vergleich dazu zeigt die Immobilisierung in wässriger Lösung eine pH-Abhängigkeit der vorangegangenen Funktionalisierung, da die charakteristische Doppelbande bei basischen pH-Werten im Wellenzahlenbereich  $1534\text{ cm}^{-1}$  nicht sehr ausgeprägt ist. Eine Erklärung dafür ist, dass sich Gallussäure abhängig vom pH-Wert der Funktionalisierung während der Immobilisierung im Neutralen unterschiedlich stark ablöst, was folglich zu einer unterschiedlichen Beladung führt. Somit ist die Beladung mit Gallussäure unabhängig vom pH-Wert der Funktionalisierung, aber möglicherweise kommt es zur einer stabileren Bindung in sauren Lösungen. Weiterhin liegt eine höhere Proteinbeladung bei einer Immobilisierung von pH 5,7 vor, was aufgrund der höheren Bandenhöhe des BSA-Doppelpeaks in Abbildung 5.28 (c) im Vergleich in Abbildung 5.28 (b) zu erkennen ist.

Bestätigt wird diese Aussage durch die Proteinbestimmungen nach Bradford (vgl. Abb. 5.29). Jedoch werden auch in diesem Proteintest Störungen bemerkt, was auf eine instabile Anbindung der Gallussäure schließen lässt. Bei der Immobilisierung in wässriger Lösung in DMF wird z.B. keine Beladung mittels des Proteintests nach Bradford nachgewiesen, wogegen im FTIR-Spektrum eine BSA-Doppelbande detektiert wird (vgl. Abb. 5.28 (b), braun).



**Abbildung 5.29:** Quantitative Proteinbestimmung GA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung und Immobilisierung. Schwarz: Immobilisierung in Wasser, blau: Immobilisierung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7. Funktionalisierungszeit und -konzentration betragen 6 h und  $20,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  GA-Lösung. Immobilisierung von BSA fand über 20 h bei einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Die in Abbildung 5.30 dargestellten REM-Aufnahmen verdeutlichen den Schutz der Agglomeration der vorher mit Gallussäure funktionalisierten Partikel. In der Abbildung (a) sind Magnetitpartikel ohne vorherige Funktionalisierung mit Gallussäure zu sehen. Aufgrund der Vergleichbarkeit mit den funktionalisierten Partikeln wurden diese auch in einem  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 9 inkubiert und anschließend mit Protein beladen. Beim Vergleich ist erkenntlich, dass die funktionalisierten Partikel eine geringere Neigung zu Agglomeration aufweisen, was auf die Funktionalisierung aber auch auf unterschiedliche Proteinbeladungen zurückgeführt werden kann. Letzteres kann jedoch durch Messungen von FTIR-Spektren und Proteinbestimmungen ausgeschlossen werden. Da die Partikel ähnliche Beladungen aufweisen, schützt die vorherige Funktionalisierung vor nachhaltiger Agglomeration bei der Proteinbeladung.



**Abbildung 5.30:** REM-Aufnahmen GA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungssubstanz: (a) BSA immobilisierte Magnetitpartikel ohne Funktionalisierungssubstanz, (b) GA funktionalisierte und BSA immobilisierte Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte 6 h in  $20,8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  GA-Lösung bei pH 9 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Immobilisierung von BSA fand über 20 h mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA bei pH 5,7 statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Generell wird eine Beladung mit Gallussäure bei unterschiedlichen pH-Werten der Funktionalisierung nachgewiesen, wobei die Menge der adsorbierten Moleküle pH-Wert unabhängig ist. Es wird von einer geringen Bindungsstabilität ausgegangen, da die Ergebnisse der Proteinbestimmung nach Bradford beeinflusst wurden. Jedoch schützt eine vorherige Funktionalisierung mit Gallussäure vor einer verstärkten Agglomeration bei der Proteinbeladung.

#### 5.1.4 Vergleich der Substanzen

Generell konnte bei allen Funktionalisierungssubstanzen die Anbindung auf der Magnetitoberfläche nachgewiesen werden, was durch neu auftretende Banden im FTIR-Spektrum der funktionalisierten Partikel belegt wurde. Weiterhin wurden in allen funktionalisierten Proben die charakteristischen Banden von Magnetit detektiert. Bei allen Substanzen, bei denen eine pH-Wertabhängigkeit besteht, lässt sich eine bevorzugte Anbindung bei einem pH-Wert von 7 feststellen, was auf die Lage des IEPs von Magnetit zurückzuführen ist. Ein Vergleich der adsorbierten Mengen der Funktionalisierungssubstanzen ist aufgrund der unterschiedlichen Bandenintensitäten der Reinstoffe schwierig. Jedoch ist auffällig, dass die Absorptionsintensitäten in den FTIR-Spektren aller Funktionalisierungssubstanzen im gleichen Bereich liegen, was auf eine Limitierung der Bindungsstellen hindeutet und eine spezifische Adsorption wahrscheinlich macht. Dennoch ist die Intensität der neu auftretenden Banden sehr gering. Mit der theoretischen Berechnung (vgl. Kapitel 3.3) würde die eingesetzte Konzentration der funktionalisierten Substanzen für eine Absättigung der Hydroxylgruppen an der Magnetitoberfläche ausreichen. Jedoch würde dies bei einer molaren Masse von  $200 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  eine Beladung von  $5 \text{ mg}_{\text{funkt. Substanz}} \cdot \text{mg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$  bedeuten, was zu höheren Intensitäten der Bande führen müsste, wenn man sie mit den Schwingungsbanden der Reinstoffe vergleicht. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass die FTIR-Spektren der angebotenen Funktionalisierungssubstanz beeinflusst werden, da das Molekül durch die Bindung veränderte Schwingungsfreiheitsgrade besitzt. Folglich müsste die Sättigungskonzentration bzw. der Einfluss der Funktionalisierungszeit in weiteren Experimenten untersucht werden.

Eine Aussage über die Bindungsstabilität der funktionalisierenden Substanzen an der Magnetitpartikeloberfläche lässt sich anhand der Proteinbestimmung nach Bradford treffen. Durch Störungen im Testsystem wird auf die Existenz der funktionalisierenden Substanzen im Überstand bei der Proteinbestimmung geschlossen, die sich während der Immobilisierung abgelöst haben. Diese Beobachtungen werden bei einer Funktionalisierung mit Benzo- und Hydrochinon und Gallussäure gemacht. Es ist möglich, dass Funktionalisierungssubstanzen aufgrund unzulänglicher Waschung im Überstand verblieben sind. Dem widersprechen allerdings die Ergebnisse der Funktionalisierungssubstanzen DOPA, Dopamin und Kaffeesäure, bei denen diese Störung des Tests nicht detektiert werden konnte. Daher wird bei der letzteren Gruppe von einer stabileren Bindung ausgegangen.

Die unterschiedlichen Bindungsstabilitäten der Funktionalisierungssubstanzen lassen die Annahme unterschiedlicher Bindungsmechanismen zu. Bei den Substanzen Hydro- und Benzochinon sind die Hydroxylgruppen in para-Stellung positioniert, weshalb eine

Komplexierung über beide Hydroxylgruppen sterisch nicht möglich ist [235]. Die FTIR-Spektren weisen auch darauf hin, dass nur eine Hydroxylgruppe am Bindungsprozess beteiligt ist. Weiterhin könnten auch für die instabilen Bindungen Wasserstoffbrücken und unspezifische Adsorption verantwortlich sein. Die Erkenntnis über die unterschiedlichen Bindungsstabilitäten zeigt, dass anscheinend die phenolischen Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung (DOPA, DA, CA) eine zweizählige Bindung eingehen, welche im Gegensatz zu einer einzähligen Bindung stabiler ist.

Bei Gallussäure wird ein anderer Grund für die Instabilität der Bindung angenommen. Sie besitzt insgesamt drei Hydroxylgruppen am aromatischen Ring, welche in ortho- und meta-Stellung angeordnet sind. Diese Anordnung führt zu sterischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen und der Magnetitoberfläche und so zu einer Hemmung/Störung bei der Anbindung.

Zusätzlich zur Lage der Hydroxylgruppen am aromatischen Ring sind die Polarität und Dissoziation der funktionellen Gruppen der Funktionalisierungssubstanzen von Bedeutung bei der Anbindung. Für den Anionenaustauschprozess der Eisenionen mit den Endiolgruppen der funktionalisierenden Substanz muss die gebundene Hydroxidgruppe oder gebundenes Wasser an Eisenionen vorher abgegeben werden, was durch einen sauren pH-Wert erleichtert wird.

Im basischen pH-Bereich wird von einer niedrigeren Adsorption organischer Verbindungen ausgegangen [14, 95], da die Moleküle negativ geladen sind, sich dadurch gegenseitig elektrostatisch abstoßen und somit die Adsorption behindern. Dies wurde in der Regel bei allen untersuchten Substanzen bestätigt, mit der Ausnahme des Dopamins, das eine ähnliche Anbindung im Neutralen und Basischen erzielte. Dieses Phänomen wird durch die Eigenschaften der Cyclisierung von Dopamin begründet.

Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten können in den unterschiedlichen Säurekonstanten der Hydroxylgruppen begründet sein. Dabei eignen sich diejenigen Moleküle am besten, bei denen die Dissoziationskonstante im Bereich des IEP der Oberfläche liegt [14, 112]. Der pH-Wert hat nicht nur Einfluss auf die Dissoziation der funktionellen Gruppen, sondern auch auf den Oxidationszustand der phenolischen Substanz. Das Redoxgleichgewicht bei hohen pH-Werten liegt auf der Seite der Chinone und wird durch die Lage, Art und Anzahl der Substituenten beeinflusst [137]. Dieses Gleichgewicht spielt eine wichtige Rolle in der Anbindung und es ist fraglich, ob die in der Theorie beschriebene Anbindung mit Chinonverbindungen stattfinden kann oder ob es eher zu einer nucleophilen Substitution kommt (vgl. Kapitel 2.4.3.1).

Zusätzlich zu den sterischen Effekten verfügen die substituierten funktionellen Gruppen am aromatischen Ring über verschiedene Einflüsse in der Reaktivität aufgrund ihrer induktiven Effekte und Mesomerieeffekte. Dabei besitzen die Hydroxylgruppen einen negativen induktiven sowie positiven mesomeren Effekt. Dagegen weisen Kaffeesäure und Gallussäure eine Säuregruppe auf, welche über einen negativen mesomeren Effekt verfügt. Im Unterschied dazu besitzen die Aminogruppen wie z.B. bei DOPA und Dopamin einen positiven mesomeren Effekt [137]. Durch die Art der Substituenten wird die Elektronendichteverteilung in organischen Molekülen beeinflusst, was Auswirkun-

gen auf deren Reaktionsverhalten hat [134]. Dennoch überwiegen die sterischen Effekte im Vergleich zu den induktiven Effekten und Mesomerieeffekten, was an den Ergebnissen der Kaffeesäure und Gallussäure erkenntlich wird. Weiterhin haben Araujo et al. gezeigt, dass die Bindungsaffinität von Brenzkatechin und seiner Derivate von der Azidität abhängt [253] und dass durch Einführung elektronegativer Gruppen, wie z.B. einer  $NO_2$ -Gruppe in das Brenzkatechinmolekül, die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und Eisenoxiden zunehmen, was auf die Erniedrigung der  $pK_s$ -Werte zurückzuführen ist [112].

Die Funktionalisierung erhöht in der Regel die Suspensionsstabilität mit Ausnahme von Dopamin. Diese Erkenntnisse basieren auf den Messungen des Zetapotentials sowie der Betrachtung von REM-Aufnahmen. Beim Vergleich der Zetapotentialmessungen von DOPA, CA, und BQ ist eine Verschiebung des IEPs erkenntlich, welcher nach der Funktionalisierung bei einem pH-Wert von ca. 4 liegt. Vergleicht man die Beträge der Zetapotentiale untereinander, ist eine Reihenfolge der Suspensionsstabilität erkennbar. Die besten Ergebnisse liefert CA gefolgt von DOPA und BQ.

Es wurde kein Auftreten zusätzlicher Peaks sowie keine Peakverschiebungen in den Röntgenbeugungsspektren detektiert. Daraus lässt sich folgern, dass die Funktionalisierung einen geringen Einfluss auf die Kristallgitterstruktur hat. Eine Veränderung der Kristalloberfläche durch Oxidation kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, die Gitterkonstante und die Partikelgröße sind aber nach der Funktionalisierung nahezu identisch. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Mohapatra et al. gemacht [81].

Vergleicht man die Ergebnisse der Immobilisierung untereinander, fällt auf, dass generell eine erhöhte Proteinbeladung bei einem pH-Wert der Immobilisierung von 5,7 erreicht wird. Zusätzlich treten bei allen immobilisierten und funktionalisierten Partikeln die charakteristischen Banden des Magnetits auf. Trotzdem zeigen sich Unterschiede bei den verschiedenen Substanzen. Die funktionalisierten Partikel mit den Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung (CA, DOPA) weisen im Vergleich zu den unfunktionalisierten Partikeln ca. die doppelte Proteinbeladung bei einem pH-Wert von 5,7 auf, wenn die vorangegangene Funktionalisierung im neutralen bis sauren pH-Bereich durchgeführt wurde. Dagegen weisen die Partikel, die mit Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen in para-Stellung (BQ, HQ) bzw. mit drei Hydroxylgruppen (GA) am aromatischen Ring funktionalisiert wurden, geringere Beladungen auf.

Die unterschiedlichen Proteinbeladungen der verschiedenen Moleküle und des unfunktionalisierten Magnetits können durch die unterschiedliche Reaktivität der Funktionalisierungssubstanzen bzw. des Magnetits mit dem Protein erklärt werden. Falls eine Proteinanbindung des funktionalisierten Magnetits über die freien funktionellen Gruppen stattfindet, sind die unterschiedlichen Reaktivitäten der funktionellen Gruppen ausschlaggebend und führen zu unterschiedlichen Beladungen. Die Sättigung der Oberfläche mit den funktionalisierten Molekülen hat eine Bedeutung für den Anbindungsmechanismus und man kann von einer Bindung zwischen funktioneller Gruppe und dem Protein bei einer vollständigen Bedeckung ausgehen. Weiterhin werden die Ladungseigenschaften der Partikeloberfläche durch die Funktionalisierung beeinflusst, was ebenfalls einen Einfluss auf die Proteinanbindung hat. Die höchste Proteinbeladung wiesen

mit CA funktionalisierte Partikel auf, bei denen die Funktionalisierung in einem pH-Bereich von 4-7 stattgefunden hat.

Zusätzlich zu den bereits oben erwähnten Einflussmöglichkeiten auf die Proteinbeladung kann durch die Funktionalisierung der Partikel die Suspensionsstabilität erhöht werden, was einen geringeren Agglomerationsgrad zur Folge hat, so dass sich die spezifische Partikeloberfläche vergrößert und es zu einer vermehrten Proteinbeladung kommt. Weiterhin sind Unterschiede in der Proteinbeladung von CA, DA und DOPA erkenntlich, was durch die unterschiedliche Affinität der funktionellen Gruppen von Funktionalisierungssubstanz und Protein begründet wird. Dabei muss beachtet werden, dass bei den erhöhten Proteinbeladungen sowohl CA als auch DOPA gut an die Magnetitoberfläche angebonden haben, wogegen sich bei Dopamin ein gegensätzlicher Verlauf zeigt (vgl. Kapitel 5.1.3.1). Vergleicht man die Proteinbeladung von CA und DOPA, ist erkenntlich, dass die direkte Proteinanbindung im Vergleich besser über die funktionelle Carboxylgruppe als über die Amino- bzw. Carbonylgruppe in DOPA verläuft, falls eine vollständige Beschichtung vorliegt. Daher wird auf eine höhere Affinität der Carboxylgruppe von Kaffeesäure im Vergleich zur Amino- und Carbonylgruppe von DOPA geschlossen. Eine geringere Proteinbeladung im Vergleich zum unfunktionalisierten Partikel wurde bei den Molekülen BQ, HQ und GA detektiert. Auffällig ist, dass bei all diesen Substanzen eine geringere Bindungsstabilität auftritt. Daher kann es durch die Anbindung der Proteine an die Funktionalisierungssubstanz und anschließendes Ablösen zu einer geringeren Beladung kommen.

Ein Einfluss der Kettenlänge der funktionellen Gruppen auf die Funktionalisierung ist schwierig festzustellen, da die Gallussäure die kürzeste Kettenlänge aufweist und nicht über den gleichen Bindungsmechanismus wie die Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen in para-Stellung verfügt (vgl. Kapitel 5.1.3.3). Die Kettenlängen von CA und DOPA sind ähnlich. DA neigt zur Cyclisierung. Deshalb können die Substanzen nicht verglichen werden. Falls die Proteinbindung an der funktionellen Gruppe stattfindet, ist eine längere Kette vorteilhaft. Dadurch wird die sterische Hinderung zwischen den Proteinen untereinander vermindert. Zusätzlich spielt die flexiblere Lage des Proteins zum Träger eine Rolle für die Aktivität [159, 255].

Generell wird durch die Immobilisierung des Proteins BSA die Suspensionsstabilität im Vergleich zu den funktionalisierten Partikeln verringert. Dabei geht mit der Zunahme der Proteinbeladung eine Verringerung der Suspensionsstabilität einher, was eine Agglomeration der Partikel fördert. Diese führt bei den Substanzen CA und DOPA zu einer Erhöhung des IEP nach der BSA-Immobilisierung, was auf die Anbindung von BSA und dessen IEP zurückzuführen ist. Auch eine Strukturveränderung des Trägermaterials nach der Immobilisierung basierend auf den Ergebnissen der Röntgenbeugungsspektren ist auszuschließen. Auffällig bei der Proteinanbindung ist bei allen Substanzen der neu auftretende Peak in niedrigen Winkelbereichen, der durch die BSA-Anbindung hervorgerufen wird.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden CA und DOPA aufgrund ihrer größeren Bindungsstabilität und der hohen Proteinbeladung, welche durch die Funktionalisierung hervorgerufen wird, weiter hinsichtlich ihrer Einflussfaktoren wie Ionenkonzentration,

Versuchszeit und Temperatur untersucht. Außerdem ist der Einfluss der Anbindung weiterer unterschiedlicher Substanzen mit unterschiedlicher Länge der funktionellen Substanz (Spacerwirkung) an Magnetit von Interesse, gerade in Hinblick auf die Immobilisierung aktiver Proteine. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Funktionalisierung unterschiedlicher Magnetite sowie die simultane Funktionalisierung und Synthese magnetischer Trägermaterialien. Diese Aspekte sollen in den nächsten Kapitel diskutiert werden.

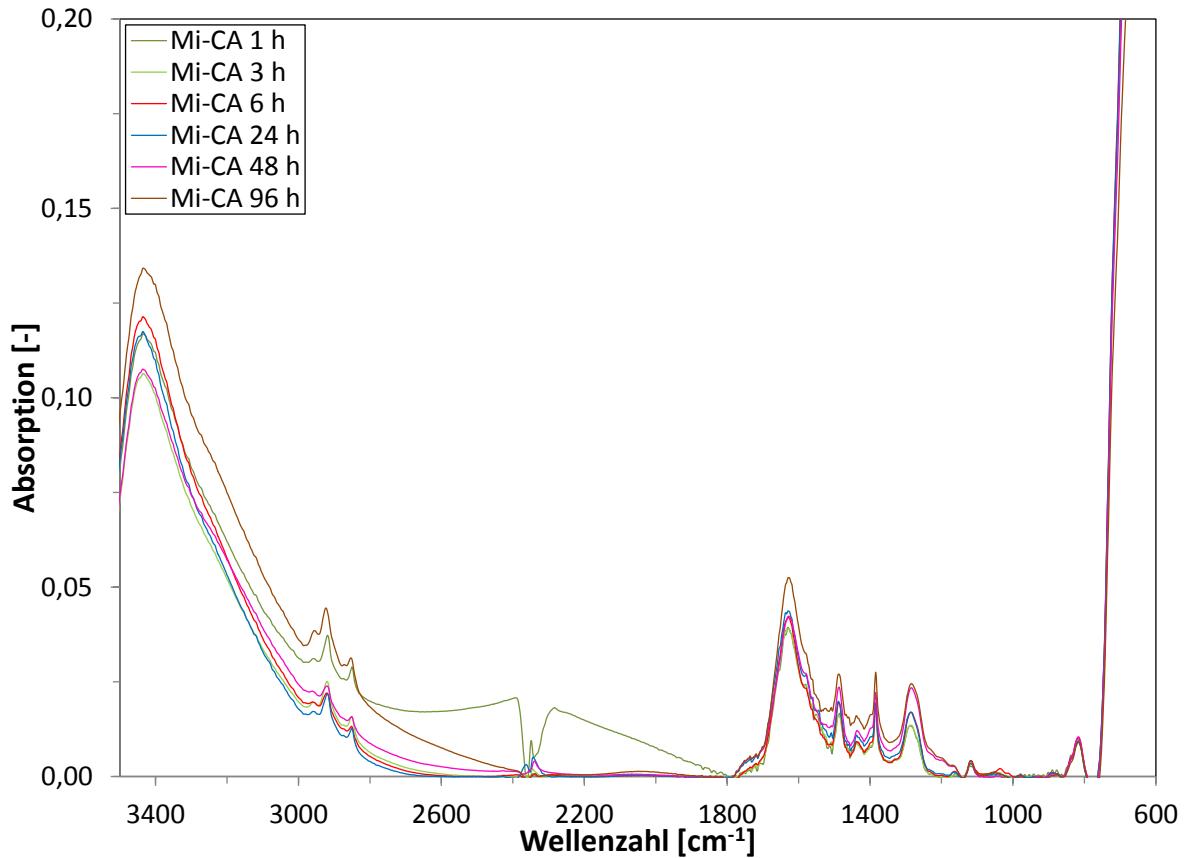
### 5.1.5 Weitere Untersuchungen der Funktionalisierungssubstanzen Kaffeesäure und DOPA

Im Folgenden werden die sich in den vorhergehenden Betrachtungen als am geeignetsten erwiesenen Substanzen Kaffeesäure und DOPA hinsichtlich ihres Adsorptionsverhaltens in Abhängigkeit von Zeit, Temperatur, Konzentration und Ionenkonzentration der Puffersubstanzen genauer untersucht.

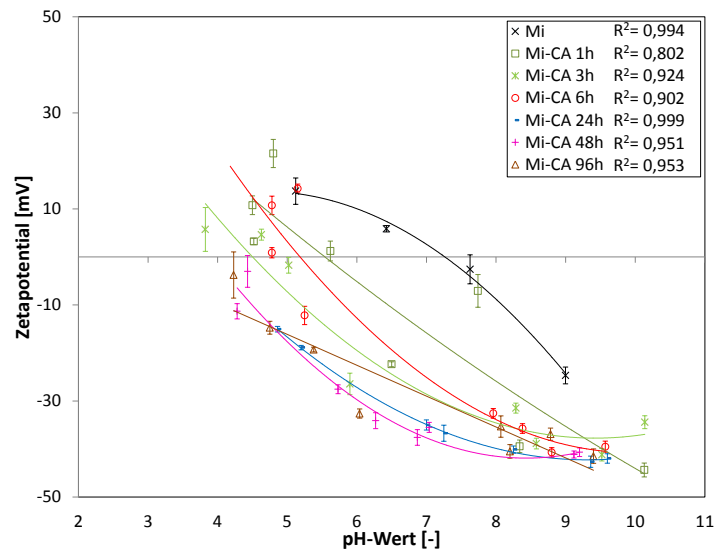
#### 5.1.5.1 Untersuchung des zeitlichen Adsorptionsverhaltens

In Abbildung 5.31 sind die FTIR-Spektren der mit CA funktionalisierten Partikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit aufgetragen. Hier sind die bereits bekannten Banden (vgl. Kapitel 5.1.3.2) zu erkennen. Vergleicht man die Banden bei den Positionen  $1296\text{ cm}^{-1}$  und  $1493\text{ cm}^{-1}$  untereinander, ist zu sehen, dass zunächst die Bandenhöhe mit steigender Funktionalisierungszeit steigt. Bei der Bande  $1296\text{ cm}^{-1}$  tritt nach 48 h eine Sättigung ein, die durch die nur geringfügig unterschiedlichen Bandenhöhen zwischen den Funktionalisierungszeiten von 48 h und 96 h deutlich wird.

Das Erreichen eines Sättigungsplateaus wird auch bei der Messung des Zetapotentials detektiert (vgl. Abb. 5.32). Es ist zu erkennen, dass der IEP mit steigender Funktionalisierungszeit von 5,5 (Funktionalisierungszeit 1 h) nach 24 h auf 3,8 sinkt. Einher geht auch die betragsmäßige Erhöhung des Zetapotentials bei einem pH-Wert von 7, was zu einer Stabilisierung der Suspension führt. Anschließend wird durch Verlängerung der Funktionalisierungszeit keine weitere Änderung des IEPs erreicht. Die Werte der IEP liegen im Zeitraum von 24-48 h bei 3,8 - 3,9 und das Zetapotentials weist bei einem pH-Wert von 7 einen Betrag zwischen  $|35| - |38|$  mV auf. Das Sättigungsverhalten kann durch eine geringere Adsorptionsaffinität mit zunehmender Oberflächenbeladung erklärt werden [117]. Der Eintritt der Sättigung wird nach ca. 24 h festgestellt. Die Plateaubildung bzw. das Sättigungsverhalten deutet darauf hin, dass nur eine bestimmte Anzahl an Bindungsplätzen zur Verfügung steht und es nicht zu einer mehrschichtigen Anbindung kommt, was auf eine Chemisorption bzw. spezifische Adsorption hindeuten könnte [113]. Gu et al. haben ähnliche Beobachtungen mit natürlicher organischer Materie an Eisenoxiden hinsichtlich der Limitierung von Adsorptionsplätzen gemacht [117]. Somit können nur die Oberflächenhydroxylgruppen des Magnetits mit den Funktionalisierungssubstanzen eine Bindungen eingehen.

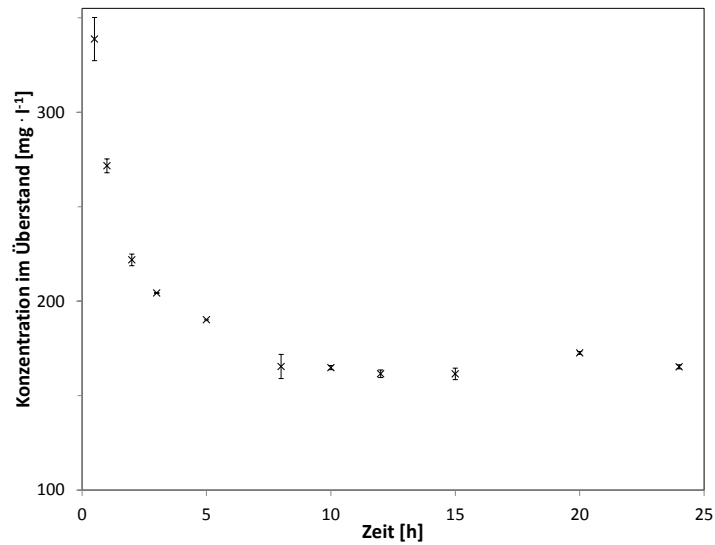


**Abbildung 5.31:** FTIR-Spektren CA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

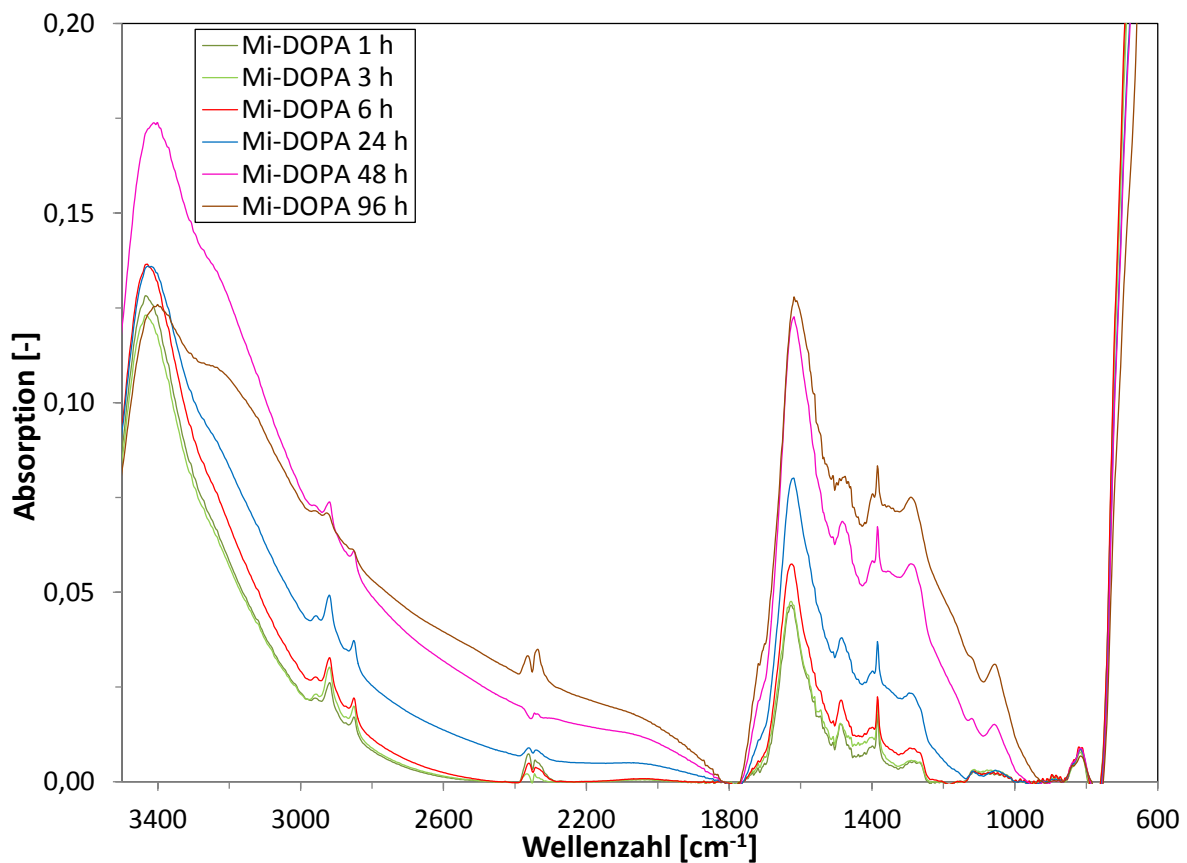


**Abbildung 5.32:** Zetapotentialverläufe CA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Eine zusätzliche Adsorptionskinetik bei einer niedrigeren Pufferkonzentration ist in Abbildung 5.33 gezeigt. Auch in diesem Verlauf ist eine Sättigung zu erkennen, die bereits nach ca. 10 h ihre maximale Beladung verzeichnet.



**Abbildung 5.33:** Zeitlicher Konzentrationsverlauf der Kaffeesäure im Überstand der Funktionalisierungsversuche. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .



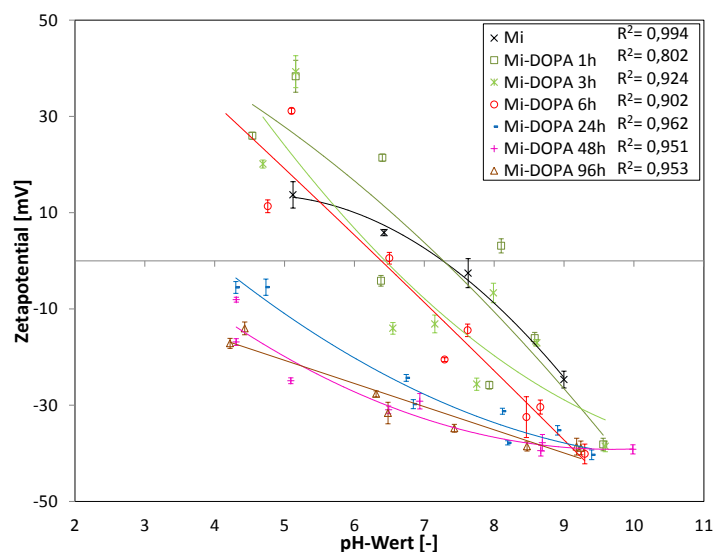
**Abbildung 5.34:** FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Bei der Funktionalisierungssubstanz DOPA wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. In Abbildung 5.34 sind die FTIR-Spektren in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit gezeigt. Hierbei sind die gleichen Bandenpositionen wie vorher zu verzeichnen (vgl.

Kapitel 5.1.3.1). Ein Vergleich der Spektren untereinander bei einer Wellenzahl von  $1627\text{ cm}^{-1}$  zeigt, dass mit höherer Funktionalisierungszeit eine höhere Absorptionsbande einhergeht. Jedoch ist der Abstand zwischen den Bandenintensitäten bei 48 h und 96 h gering, was auf eine Absättigung hindeuten könnte.

Die Ergebnisse der Zetapotentialmessungen deuten auf einen ähnlichen Sättigungsverlauf hin (vgl. Abb. 5.35). Hierbei ist auch zu erkennen, dass mit steigender Funktionalisierungszeit der IEP sinkt. Der niedrigste IEP wird bei 96 h mit 2,7 verzeichnet. Jedoch sind die Unterschiede zwischen den Messungen bei 48 h und 96 h gering und innerhalb der Messtoleranz, wobei kein weiterer Anstieg des Zetapotentials bei einem pH-Wert von 7 verzeichnet wird. Dieser liegt bei beiden Messungen bei  $|32, 8|\text{ mV}$ . Im Vergleich zu CA tritt die stabilisierende Wirkung von DOPA später ein. Weiterhin wird nach dieser Zeitspanne auch ein IEP unterhalb von 4 gemessen.

Beim Vergleich der Zetapotentialverläufe in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit von CA und DOPA wird ersichtlich, dass es auch bei kürzeren Funktionalisierungszeiten zu einem erheblichen Unterschied in der Veränderung der IEP kommt. So wird z.B. nach einer Stunde bei der CA-Funktionalisierung eine Veränderung des IEPs zu dem IEP von unbehandeltem Magnetit von 1,8 erreicht. Bei DOPA hingegen ist keine Veränderung ersichtlich (vgl. Abb. 5.32 und 5.35). Deshalb wird von einer schnelleren Anbindung bzw. höhere Affinität von CA verglichen mit DOPA ausgegangen.



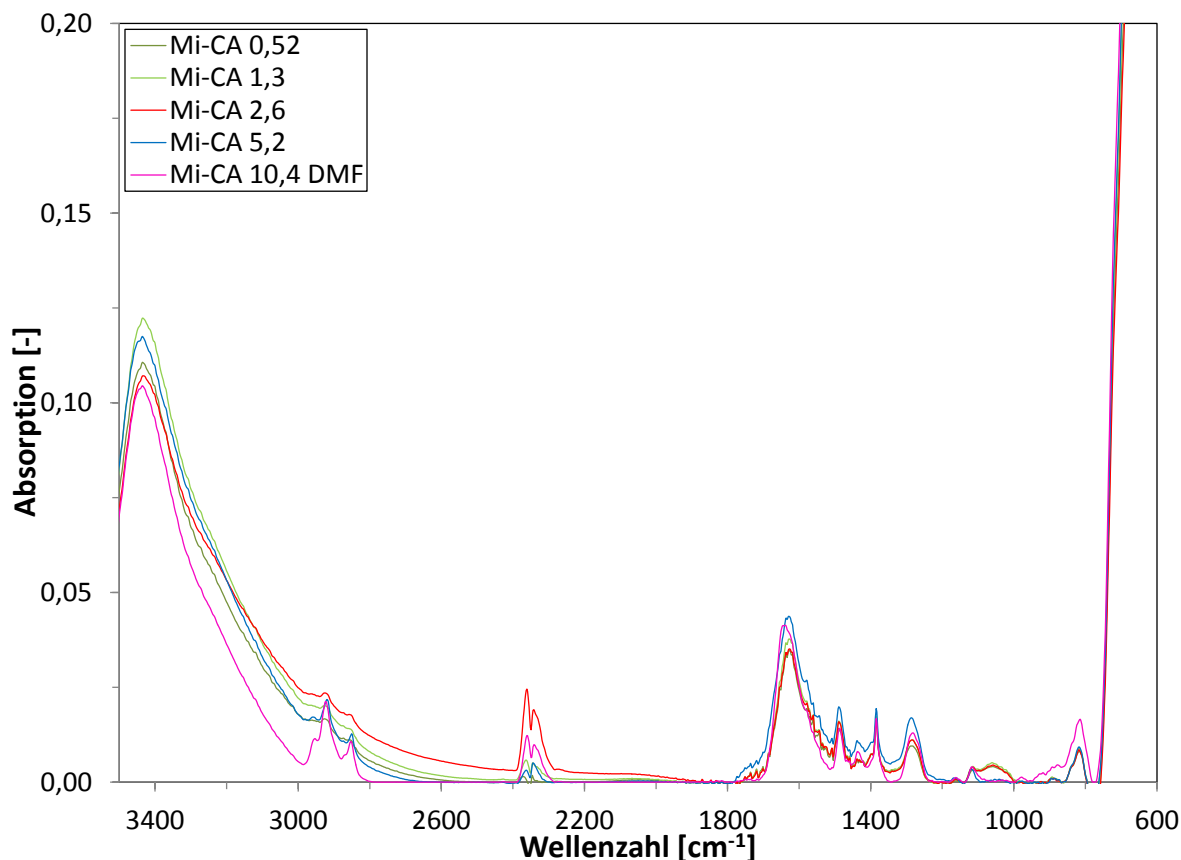
**Abbildung 5.35:** Zetapotentialverläufe DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungszeit. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Insgesamt kann festgestellt werden, dass das Sättigungsplateau von DOPA später erreicht wird als das von CA. Diese unterschiedliche Sättigungszeit kann durch die unterschiedliche Substituierung am aromatischen Ring begründet sein. Weiterhin könnte auch die Größe der Moleküle eine Rolle spielen. Da Kaffeesäure kleiner als DOPA ist, kommt es zu einer geringeren sterischen Hinderung, weshalb das kleinere Molekül schneller adsorbieren kann.

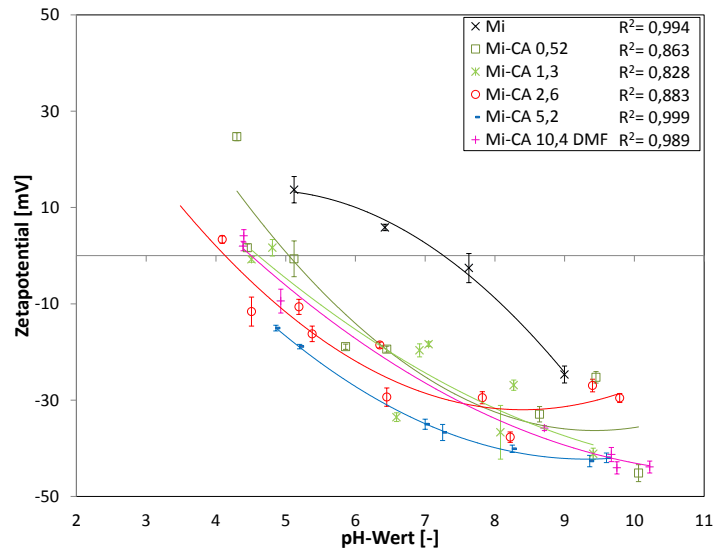
### 5.1.5.2 Untersuchung des Einflusses auf die Adsorptionskonzentration

Da sich die zuvor eingesetzten Konzentrationen der Funktionalisierungssubstanzen nahe der Löslichkeitsgrenze in wässriger Lösung befanden, war es in dieser Versuchsreihe schwierig, die Konzentrationen von CA und DOPA zu erhöhen und somit den Einfluss der Konzentrationserhöhung zu untersuchen. Die geringe Löslichkeit der Substanzen stellte sich als nachteilig heraus. Bei CA wurde die Konzentrationserhöhung mit einer Vorlösung in DMF realisiert, so dass eine Konzentration von  $10,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  erreicht wurde. Bei DOPA konnte dies wegen dessen Unlöslichkeit in DMF nicht realisiert werden. Eine Lösung in Ethanol war ebenfalls nicht möglich. Demzufolge erwies sich die Herstellung einer konzentrierten DOPA-Lösung als schwierig [256].

In Abbildung 5.36 sind die FTIR-Spektren der mit CA funktionalisierten Partikel aufgetragen. Auffällig bei den Bandenpositionen  $1296 \text{ cm}^{-1}$  und  $1493 \text{ cm}^{-1}$  ist, dass eine Konzentrationserhöhung auch zu einer erhöhten Bandenintensität führt. Allerdings ist bei den zwei niedrigsten Konzentrationen kein Unterschied der Bandenhöhe zu erkennen. Die Vorlösung in DMF führt auch zu keiner weiteren Erhöhung der Bandenintensität und somit, trotz höherer CA-Konzentration, zu einer niedrigeren Partikelbeladung. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch bei der Zetapotentialmessung wider (vgl. Abb. 5.37).



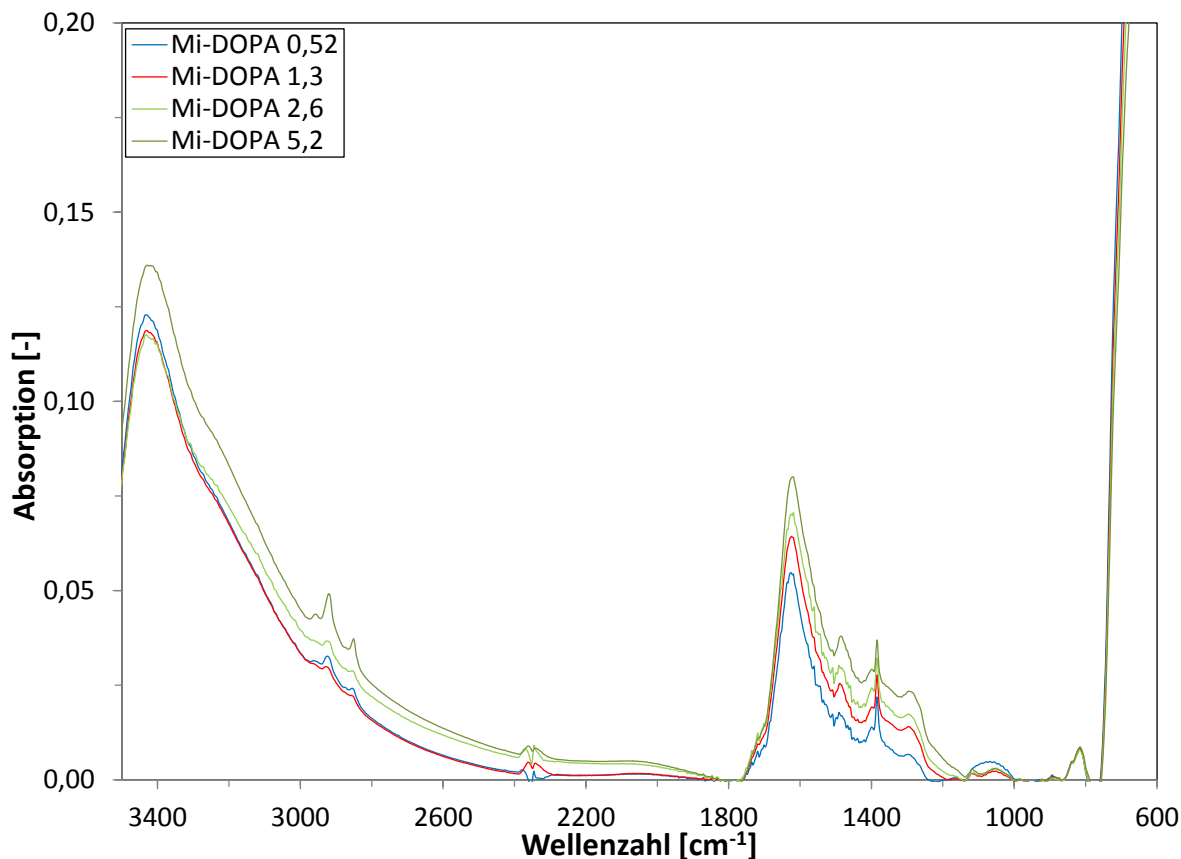
**Abbildung 5.36:** FTIR-Spektren CA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungskonzentration. Funktionalisierung erfolgte 24 h bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Die Konzentration von  $10,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  wurde in DMF vorgelöst und anschließend in einem Verhältnis 1:10 mit Trispuffer verdünnt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Alle Angaben der Funktionalisierungskonzentrationen sind in  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Abbildung 5.37:** Zetapotentialverläufe CA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungskonzentration. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 7. Die höchste Konzentration wurde im Lösungsmittel DMF vorgelöst und anschließend in einem Verhältnis 1:10 mit Trispuffer verdünnt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Alle Angaben der Funktionalisierungskonzentrationen sind in  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Bei den Verläufen des Zetapotentials ist erkennbar, dass sich der IEP mit steigender Konzentration zu einem niedrigen pH-Wert von anfänglichen 5,0 bei einer Konzentration von  $0,52 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf 3,8 bei einer Konzentration von  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  verschiebt. Auch bei diesen Messergebnissen ist ersichtlich, dass eine Konzentrationserhöhung durch eine Vorlösung in DMF zu keiner weiteren Senkung des IEPs führt. Dieser Effekt kann nur durch das Vorlösen in DMF begründet sein. Eine pH-Wertänderung durch die Zugabe von DMF im Vergleich zu anderen CA-Lösungen konnte mittels einer Überprüfung ausgeschlossen werden. Daher müssen diese gezeigten Ergebnisse anders begründet sein.

Bei DMF handelt es sich um ein polares, organisches Lösungsmittel im Gegensatz zum Trispuffer, was zu einer unterschiedlichen Ausbildung der elektrischen Doppelschicht und den damit verbundenen Ladungsverhältnissen auf der Partikeloberfläche führen kann. Weiterhin haben die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen der verschiedenen Lösungsmittelsysteme auch einen Einfluss auf die Ladungsverhältnisse. Diese veränderten Ladungsverhältnisse, injiziert durch die unterschiedlichen Lösungsmittelmischungen, können zu unterschiedlichen Adsorptionsaffinitäten führen. Grund dafür wäre die Ausbildung einer dickeren diffusen Schicht und somit die Behinderung des Adsorptionsprozesses.



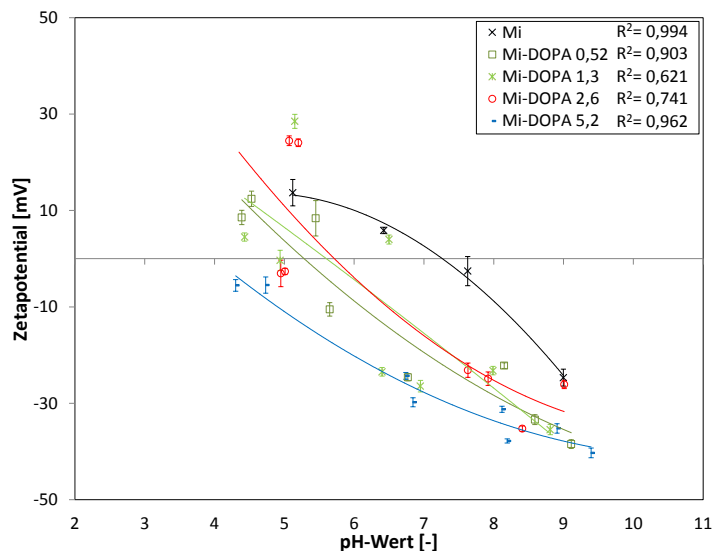
**Abbildung 5.38:** FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungskonzentration. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 7. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Alle Angaben der Funktionalisierungskonzentrationen sind in  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Eine andere Erklärung ist, dass es zu einer Konkurrenzsituation zwischen den drei Komponenten des Gemisches kommen kann. Die Bildung einer Emulsion von DMF in Trispuffer wird aufgrund der Löslichkeit von DMF in Wasser [133] ausgeschlossen, so dass es nicht zu einem Mehrphasensystem zwischen DMF und Wasser bzw. Trispuffer kommt und damit eine unterschiedliche Verteilung der Kaffeesäure in der Lösung aufgrund einer Unmischbarkeit nicht möglich ist.

Auch eine verstärkte Agglomeration der Partikel aufgrund unterschiedlicher Ladungsverhältnisse könnte zur Verringerung der spezifischen Oberfläche führen und somit die Anzahl der Bindungsstellen senken. Vergleichende Vorversuche mit DMF und Trispuffer weisen daraufhin.

Vergleicht man die konzentrationsabhängigen Zetapotentialverläufe der beiden Substanzen DOPA und CA (vgl. Abb. 5.37 und 5.39), ist auffällig, dass bei DOPA nicht wie bei CA eine Sättigungskurve eintritt, sondern sich der IEP lange auf einem Plateau befindet und kaum eine Veränderung der Oberflächenladungsverhältnisse sowie der Bandenhöhe im FTIR erkennbar sind, was für den Konzentrationsbereich von  $0,52\text{--}2,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  ersichtlich wird. Dort schwankt der IEP zwischen 5,3–5,7. Auch der Betrag des Zetapotentials variiert in einem engen Größenbereich von  $|15,5|$ – $|19,5| \text{ mV}$ . Erst wenn eine ausreichend hohe Konzentration der DOPA-Moleküle in Lösung ist, ergibt sich eine weitere Senkung des IEPs.

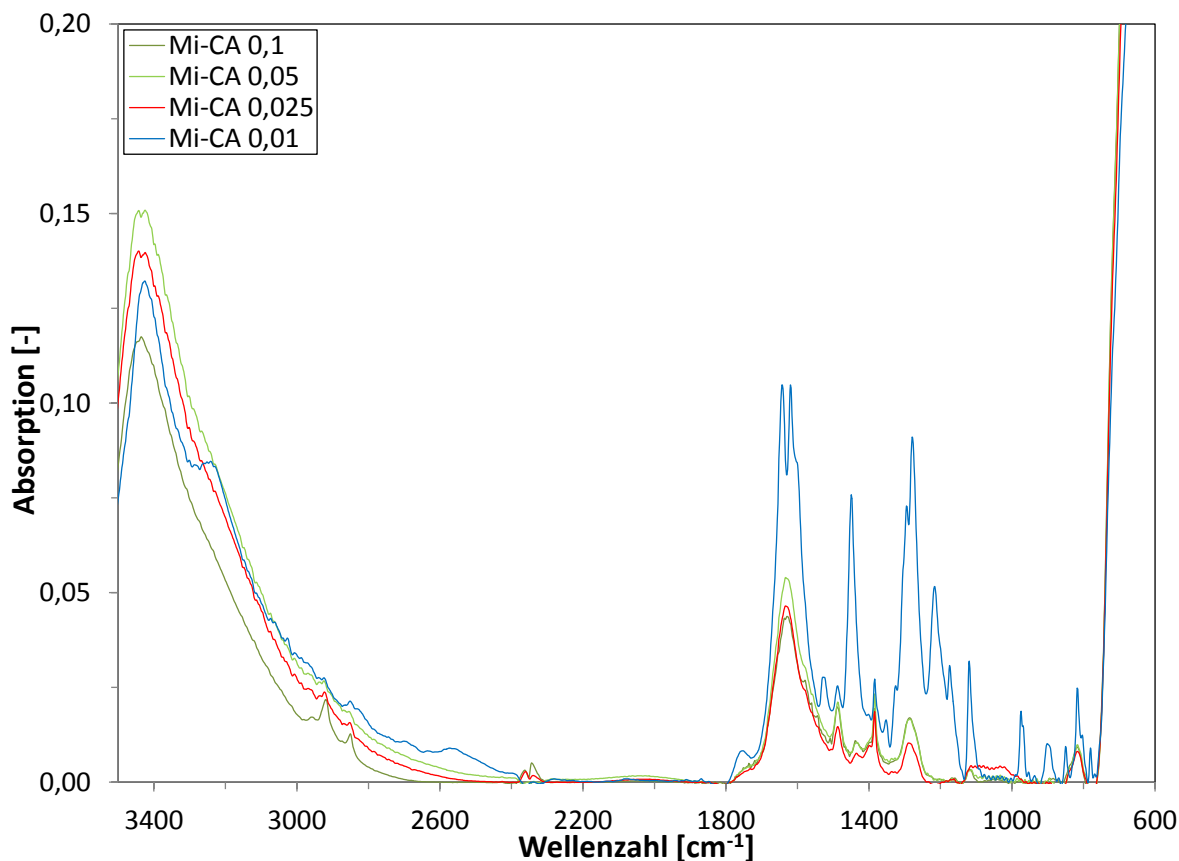
Dieses unterschiedliche Verhalten kann nur durch die verschiedenen Substituenten am aromatischen Ring begründet sein (vgl. Abb. 3.3), was dazu führt, dass CA und DOPA unterschiedlich starke Affinitäten hinsichtlich ihrer Adsorption an die magnetischen Nanopartikel haben. Bei der maximalen DOPA-Konzentration wird die höchste Bandenhöhe sowie der niedrigste IEP bei pH 4 detektiert.



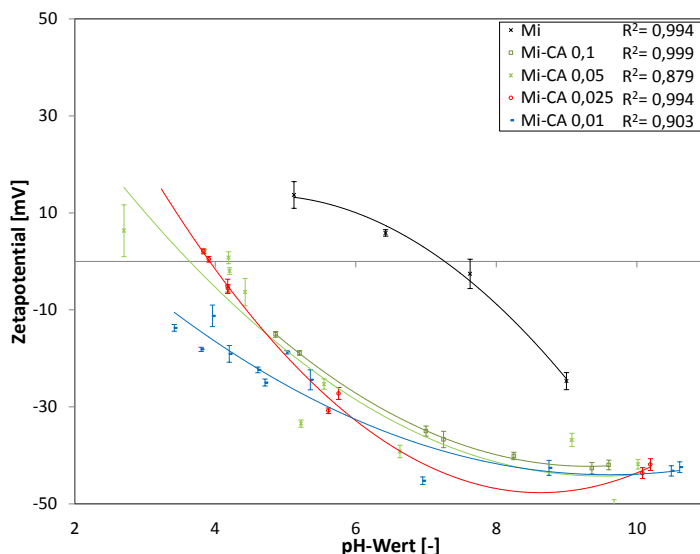
**Abbildung 5.39:** Zetapotentialverläufe DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungskonzentration. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 7. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Alle Angaben der Funktionalisierungskonzentrationen sind in  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

### 5.1.5.3 Untersuchung des Einflusses auf die Ionenkonzentration des Puffers

Im Weiteren wurde der Einfluss der Ionenkonzentration der Puffersubstanz auf die Anbindung überprüft. In Abbildung 5.40 sind die FTIR-Spektren der mit CA funktionalisierten Partikel in Abhängigkeit der Ionenstärke des Puffers aufgetragen. Bemerkenswert ist das blaue Spektrum, bei welchem die Funktionalisierung mit einer Ionenkonzentration des Puffers von  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  durchgeführt wurde. Zum einen fällt gleich die erhöhte Bandenintensität im Vergleich zu den anderen Spektren auf und zum anderen die ausgeprägtere Bandenform sowie noch weitere neu auftretende Banden. Vergleicht man dieses blaue Spektrum mit dem reinen Spektrum der Kaffeesäure (vgl. Abb. 5.21) sieht man, dass die Bandenform sehr ähnlich zu dem der reinen Kaffeesäure ist. Der Doppelpeak bei den Positionen  $1643 \text{ cm}^{-1}$  und  $1619 \text{ cm}^{-1}$  ist auch bei der reinen Kaffeesäure anzutreffen, welcher so bei den vorherigen Versuchen nicht erkennbar war. Zusätzlich sind bereits bekannte Banden wesentlich ausgeprägter und gleichzeitig neue Banden zu erkennen ( $1449 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1279 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1216 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1120 \text{ cm}^{-1}$ ,  $975 \text{ cm}^{-1}$  und  $817 \text{ cm}^{-1}$ ). Die letzte steht für die Substitution am aromatischen Ring und ist bei diesem Versuch sehr ausgeprägt. Die Intensitätsbereiche bei den anderen Ionenkonzentrationen sind ähnlich.



**Abbildung 5.40:** FTIR-Spektren CA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Ionenkonzentration des Funktionalisierungspuffers. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Alle Angaben der Ionenkonzentration des Puffers sind in  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Abbildung 5.41:** Zetapotentialverläufe CA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Ionenkonzentration des Funktionalisierungspuffers. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Alle Angaben der Ionenkonzentration des Puffers sind in  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Messungen des Zetapotentials wider (vgl. Abb. 5.41). Die IEP bei einer Pufferkonzentration zwischen  $0,025 - 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  lie-

gen im pH-Bereich von 3,6 - 3,9, wogegen eine Pufferionenstärke von  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  zu einem IEP von 2,5 führt. Jedoch wird die elektrostatische Suspensionsstabilität nicht weiter bei einem pH-Wert von 7 erhöht. Der Betrag des Zetapotentials bleibt im gleichen Größenbereich, welcher sich bei der gesamten Versuchsreihe über einen Bereich von  $|35| - |42| \text{ mV}$  erstreckt.

Eine Begründung ergibt sich aus der Überwachung des pH-Wertes über die Reaktionsdauer. Die niedrigste Ionenkonzentration des Trispuffer verfügte über keine ausreichende Pufferung mehr und es kam während der Funktionalisierung zu einem pH-Wertabfall, welcher die Anbindung der CA während der Reaktion begünstigt. Durch die Abnahme des pH-Wertes während der Reaktion verschieben sich die Oberflächenladungsverhältnisse der bereits anfänglich funktionalisierten Partikel zu ihren IEP, wodurch die elektrostatische Abstoßung der Partikel verglichen mit Partikeln in einer gepufferten Lösung minimiert wird.

Für die quantitative Bestimmung der Beladung mit Kaffeesäure wurden thermogravimetrische Messungen durchgeführt, in denen der Massenverlust über die Temperatur und Zeit bestimmt wurde. Es sind zwei Stufen des Massenverlustes erkennbar (vgl. Abb. 5.45 bei  $T = 25^\circ\text{C}$ ). Die erste Stufe zeigt einen prozentualen Massenverlust von  $2,55 \pm 0,28 \text{ Gew.} - \%$  und beinhaltet den Verlust der Wasserphase in der Substanz. Der temperaturspezifische Wendepunkt dieser Stufe liegt bei  $143 \pm 17^\circ\text{C}$  und ist somit höher als der Siedepunkt flüssigen Wassers. Diese Temperaturerhöhung kann dadurch begründet werden, dass es sich um gebundenes Wasser bzw. Kristallwasser handelt, so dass zusätzliche thermische Energie zur Spaltung der Verbindungen benötigt wird.

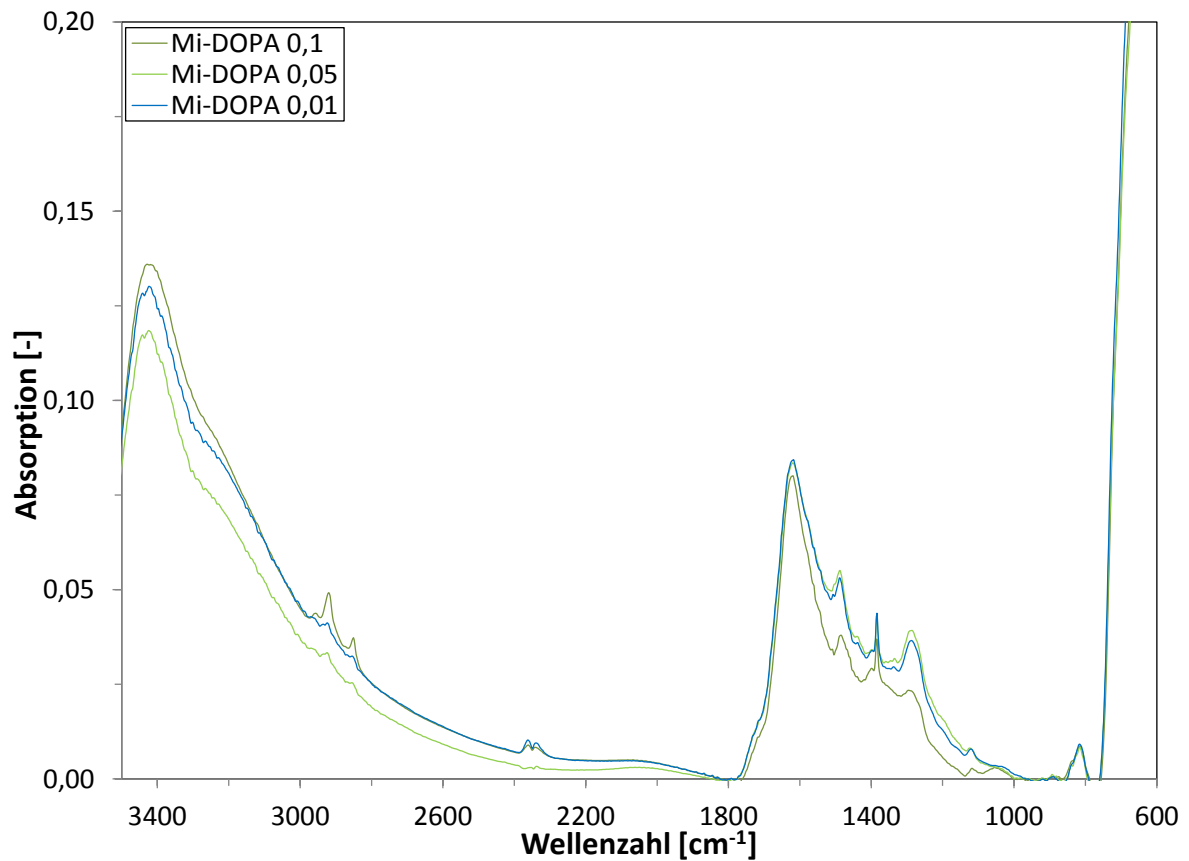
Die zweite, größere Stufe stellt die Zersetzung der Kaffeesäure dar. Der Massenverlust beträgt  $8,42 \pm 1,1 \text{ Gew.} - \%$  und der Wendepunkt dieser Stufe liegt bei einer Temperatur von  $317 \pm 5,1^\circ\text{C}$ . Die Verdampfungstemperatur von reiner Kaffeesäure hat sich auch hier nach oben verschoben, was ebenfalls durch die Anbindung hervorgerufen wird und höhere thermische Energien im Vergleich zur reinen Kaffeesäure für die Spaltung von Bindungen notwendig sind. In der Literatur wird der Schmelzbereich mit Temperaturen von  $211\text{-}213^\circ\text{C}$  [178] und die Zersetzungstemperatur mit einer Spanne von  $223\text{-}225^\circ\text{C}$  [133] angegeben. Es wird ersichtlich, dass im Vergleich zum Reinstoff ca.  $100^\circ\text{C}$  mehr für die Zersetzung der Kaffeesäure benötigt werden. Die mit CA funktionalisierten Partikel weisen einen Zersetzungsbereich von  $210^\circ\text{C}$  bis  $350^\circ\text{C}$ . auf Die Zersetzung findet also über einen weiten Temperaturbereich statt. Es ist möglich, dass nicht alle CA-Moleküle eine starke Bindung eingehen, da bereits ein Gewichtsverlust innerhalb des Schmelzbereiches der reinen CA einsetzt.

Dies könnte ein Indiz für eine mehrschichtige Anbindung sein, so dass sich die äußeren, weniger stark gebunden CA-Moleküle früher ablösen. Eine andere Möglichkeit ist, dass nicht alle Moleküle die gleiche Anbindung, sondern eine Kombination aus ein- und zweizähligen Anbindungen ausgebildet haben, die unterschiedliche Bindungsstabilitäten besitzen. Für den Einsatz in enzymatisch katalysierten Prozessen ist die Zersetzungstemperatur von  $210^\circ\text{C}$  ausreichend hoch, da diese Prozesse in der Regel unter moderaten Bedingungen ablaufen [156].

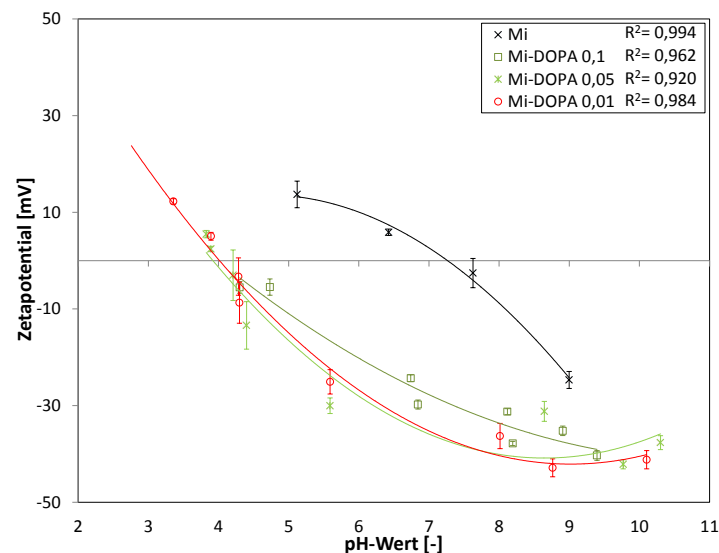
Mit Hilfe der Gewichtsverluste kann die Beladung zu  $0,095 \text{ g}_{\text{CA}} \cdot \text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$  berechnet werden. Daraus ergibt sich eine Molekülbeschichtung von  $5,3 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$ . Vergleicht man diese Molekülbeladung mit der Anzahl der Hydroxylgruppen des Magnetits, die  $5 - 10 \text{ nm}^{-2}$  [14, 34] beträgt, (vgl. Kapitel 3.3) wird ersichtlich, dass bei einer zwei-zähligen Anbindung theoretisch eine Molekülbeladung von  $5 \text{ nm}^{-2}$  nicht überstiegen werden kann, da die Anbindungsstellen dafür nicht ausreichen. Die erreichte Molekülbeladung von  $5,3 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  liegt leicht oberhalb des theoretischen Grenzwertes, weshalb einzählige Anbindungen nicht ausgeschlossen werden. Es stehen aufgrund von sterischen Hinderungen wie z.B. Partikelagglomerationen auch nicht alle Hydroxylgruppen für eine Anbindung zur Verfügung. Eine andere Ursache für diese hohe Beladung könnte eine mehrschichtige Adsorption sein, bei der möglicherweise die innere Schicht eine zwei-zählige Anbindung ausbildet und die zweite umhüllende Schicht aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen zustande kommt. Jedoch deuten mehrschichtige Adsorptionen darauf hin, dass vermutlich keine Chemisorption stattfindet, ausgenommen von Oxidschichtbildungen [113].

Literaturwerte mit Beladungen ähnlicher Substanzen wie z.B. Stilben mit einer Carboxylgruppe sowie einer Phosphonatgruppe wiesen eine Molekülbeladung von  $0,85 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  und  $1,4 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die dort verwendete funktionelle Gruppe einen Einfluss auf die Beladung hat. Die Phosphonatgruppe an Stilben führte zu einer höheren Beladung. Die Oberflächenbedeckung betrug 100% bei P-Stilben und C-Stilben [257]. Versuche von Amstad et al. zeigten bei zuvor mit PEG beschichteten und anschließend mit Brenzkatechin funktionalisierten Partikeln eine Molekülbeladung zwischen  $1 - 3 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  [112]. Im Vergleich ist die Molekülbeladung von mit CA funktionalisierten Partikeln wesentlich höher, wobei davon ausgegangen werden muss, dass diese hohe Beladung durch die Optimierung des Prozesses zustande kommt. Vergleicht man die Versuche mit den weiteren Substanzen ED und DP (vgl. Kapitel 5.1.6), die noch nicht optimiert wurden, liegt dort die Molekülbeladung im ähnlichen Größenbereich wie bei Amstad et al.

Betrachtet man die Ergebnisse des Einflusses der Pufferionenkonzentration bei DOPA, ist erkenntlich, dass sich nicht die gleiche Abhängigkeit wie bei CA zeigt. Vergleicht man die FTIR-Spektren (5.42 und 5.40) der beiden Substanzen genauer, ist sofort ersichtlich, dass die Verringerung der Pufferkonzentration bei DOPA einen nicht so einen großen Effekt auf die Beladung hat, wie bei der Kaffeesäure. Zudem liegen die Spektren im ähnlichen Intensitätsbereich bei den Pufferionenkonzentration von  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , was sich in den Peakpositionen bei  $1299 \text{ nm}^{-1}$  und  $1493 \text{ nm}^{-1}$  beispielhaft zeigt. Dieses Ergebnis wird durch die Messung der Verläufe des Zetapotentials (vgl. Abb. 5.43) bekräftigt, da der IEP sowie das Zetapotential bei einem pH-Wert von 7 Werte im gleichen Größenbereich innerhalb der Messgenauigkeit einnimmt. So schwankt z.B. der IEP der drei Ionenkonzentrationen zwischen 3,9 - 4,0.



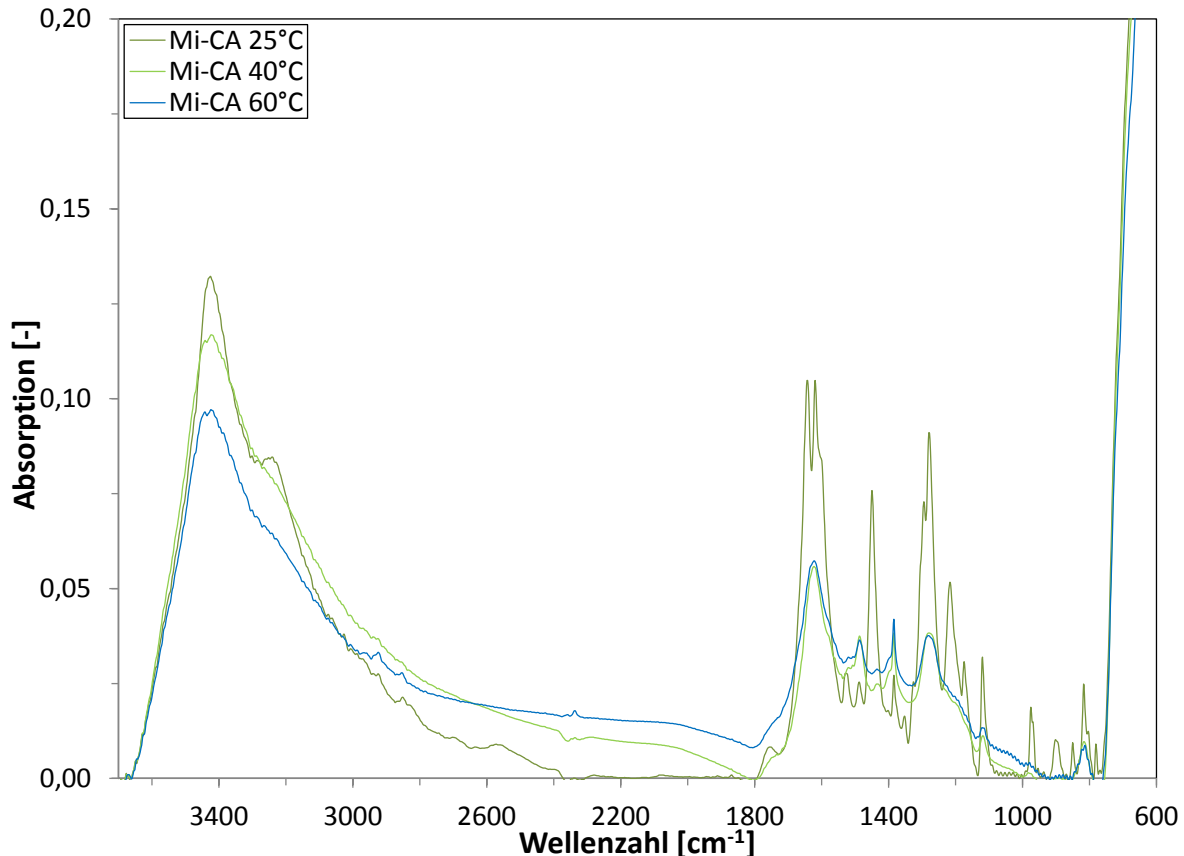
**Abbildung 5.42:** FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Ionenkonzentration des Funktionalisierungspuffers. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung in Trispuffer bei pH 7 über 24 h. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Alle Angaben der Ionenkonzentration des Puffers sind in  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Abbildung 5.43:** Zetapotentialverläufe DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Ionenkonzentration des Funktionalisierungspuffers. Funktionalisierung erfolgte 24 h in Trispuffer bei pH 7 mit einer DOPA-Konzentration von  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Alle Angaben der Ionenkonzentration des Puffers sind in  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

### 5.1.5.4 Untersuchung des Einflusses der Temperatur

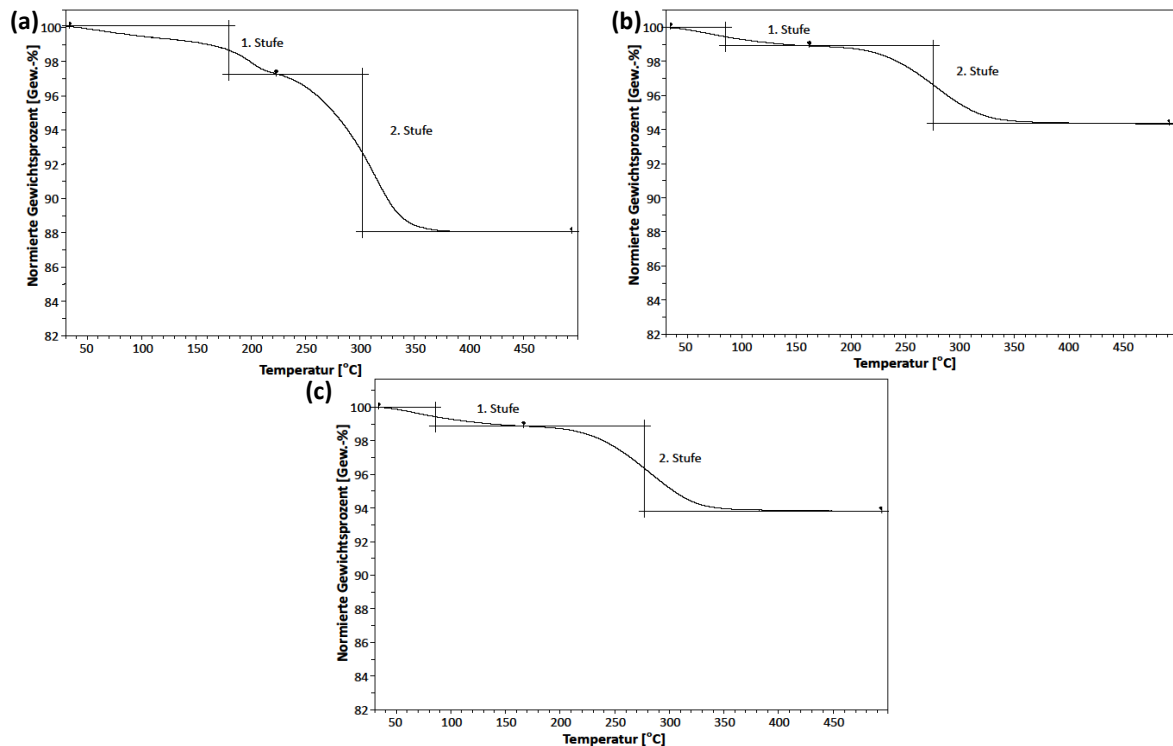
Der Einfluss der Temperatur bei der Funktionalisierung von Magnetit mit CA und DOPA wird anhand der folgenden Ergebnisse erläutert. Hierzu sind in Abbildung 5.44 die FTIR-Spektren der mit CA funktionalisierten Partikel dargestellt. In diesen Spektren ist erkennbar, dass die Bandenintensität mit einer Erhöhung der Temperatur von 25 °C auf 40 °C abnimmt. Jedoch bleibt die Bandenintensität bei einer weiteren Temperaturerhöhung auf 60 °C konstant, welches z.B. an den Wellenzahlen  $1633\text{ cm}^{-1}$  und  $1279\text{ cm}^{-1}$  erkennbar ist.



**Abbildung 5.44:** FTIR-Spektren CA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungstemperatur. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung in  $0,01\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 7 über 24 h. Magnetitkonzentration betrug  $1,2\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

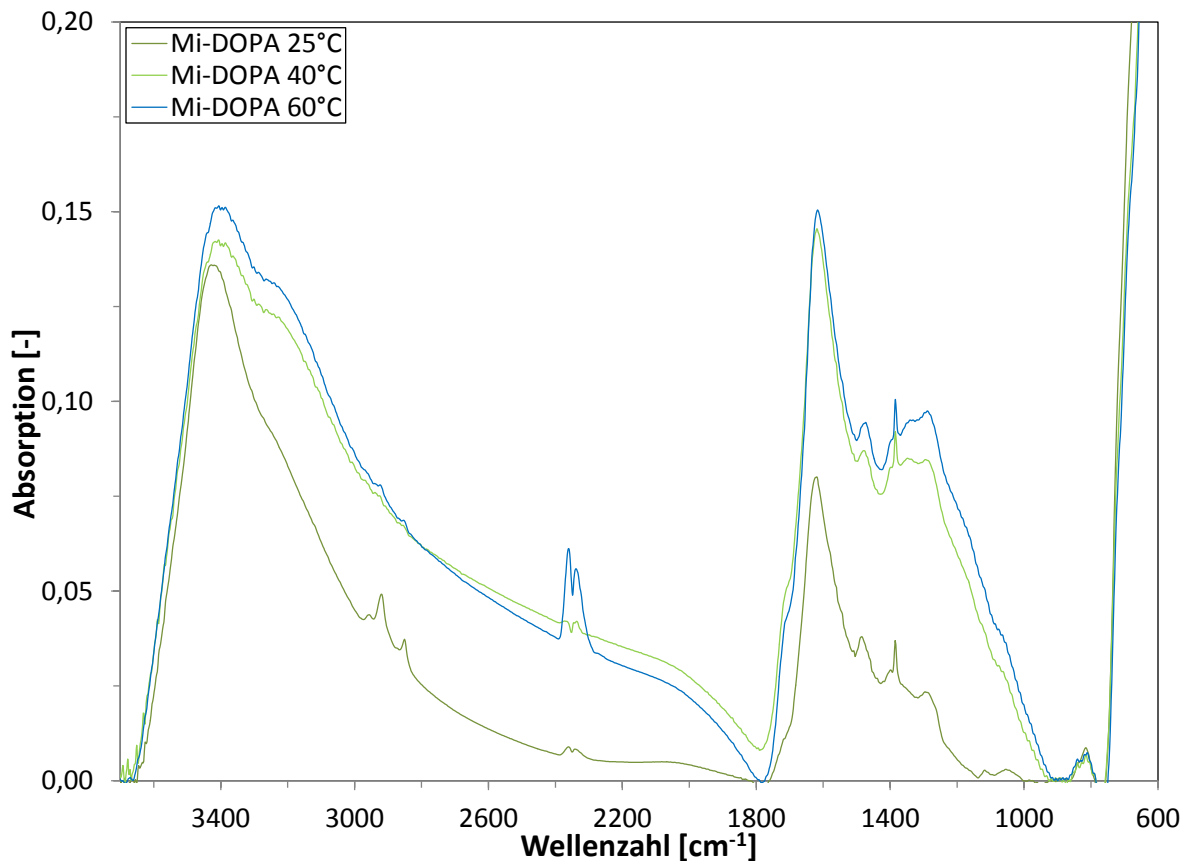
In der Abbildung 5.45 ist der Gewichtsverlust der Probe über die Temperatur aufgetragen, die die Ergebnisse der FTIR-Spektren bestätigt. Dabei sind zwei Stufen zu erkennen. Die erste Stufe gibt den Massenverlust der Wasserphase an und die zweite Stufe den Massenverlust der Funktionalisierungssubstanz, in diesem Fall CA. Schaut man sich die Gewichtsverluste der zweiten Stufe an, ist erkennbar, dass der Massenverlust bei der 25 °C-Probe am größten ist und  $8,42 \pm 1,1\text{ Gew.} - \%$  beträgt. Bei den 40 °C und 60 °C-Proben ist ein Massenverlust von  $4,56 \pm 0,02\text{ Gew.} - \%$  und  $5,05 \pm 0,02\text{ Gew.} - \%$  verzeichnet worden. Berechnet man die Beladung der Kaffeesäure bezüglich des Magnetitanteils führt dies zu Beladungen von:  $0,095\text{ g}_{\text{CA}} \cdot \text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$  bei 25 °C,  $0,048\text{ g}_{\text{CA}} \cdot \text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$  bei 40 °C und  $0,054\text{ g}_{\text{CA}} \cdot \text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$  bei 60 °C, was zu Molekülbeladungen von  $5,3\text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$ ,  $2,7\text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  und  $3\text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  führt. Die Molekülbeladungen liegen im Bereich wie bei den Experimenten von Amstad et al. [112]. Die niedrigeren Molekülbeladungen bei den höheren Temperaturen

von  $2,7 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  und  $3 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  lassen vermuten, dass es sich hier um eine einschichtige Anbindung handelt, da sich die Anzahl der Hydroxylgruppen des Magnetits auf  $5 - 10 \text{ nm}^{-2}$  [14, 34] beläuft und es bei einer zweizähigen Anbindung zur maximalen theoretischen Molekülbeladung von  $5 \text{ Molekülen} \cdot \text{nm}^{-2}$  kommen kann. Weiterhin könnte die Oberfläche aufgrund der geringen Molekülanzahl nicht vollständig bedeckt sein.



**Abbildung 5.45:** Exemplarische TGA-Verläufe CA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungstemperatur: (a)  $25^\circ\text{C}$ , (b)  $40^\circ\text{C}$ , (c)  $60^\circ\text{C}$ . Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Die Temperaturabhängigkeit von mit DOPA funktionalisierten Partikeln verhält sich gegensätzlich zur der mit CA funktionalisierten Partikeln. Betrachtet man die FTIR-Spektren in Abbildung 5.46 ist erkenntlich, dass die Bandenintensität mit steigender Funktionalisierungstemperatur zunimmt, was z.B. an den Wellenzahlen  $1619 \text{ cm}^{-1}$  und  $1384 \text{ cm}^{-1}$  erkennbar ist. Dabei ist auffällig, dass der Unterschied in der Bandenhöhe zwischen der bei  $25^\circ\text{C}$  funktionalisierten Probe und der bei  $40^\circ\text{C}$  funktionalisierten Probe deutlich größer ist, als die Differenz zwischen den Banden der mit  $40^\circ\text{C}$  funktionalisierten Probe und der bei  $60^\circ\text{C}$  funktionalisierten Probe. Dies kann auf eine abgesättigte Oberfläche hindeuten, was auch von den thermogravimetrischen Analysen (vgl. Abb. 5.47) bestätigt wird.

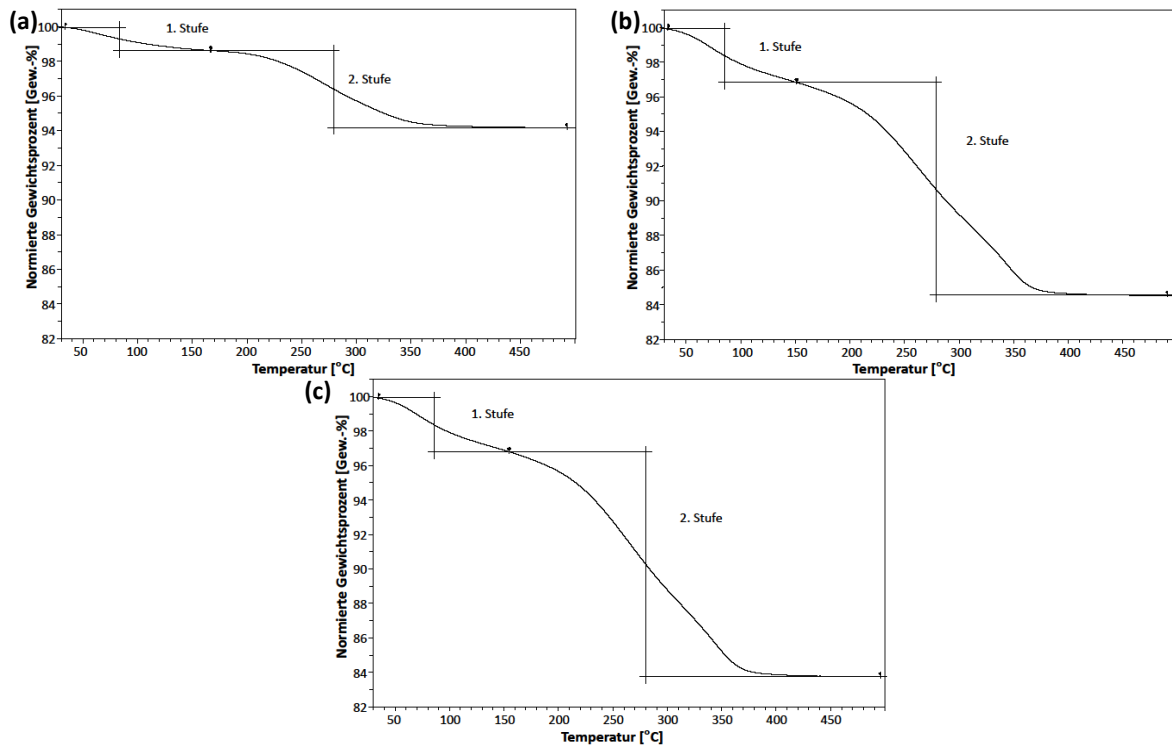


**Abbildung 5.46:** FTIR-Spektren DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungstemperatur. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 7 über 24 h. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Die Verläufe zeigen, dass der sublimierte Massenanteil mit steigender Temperatur in der zweiten Stufe zunimmt. So beträgt dieser bei  $25^\circ\text{C}$   $4,56 \pm 0,16 \text{ Gew.} - \%$  über  $12,22 \pm 0,07 \text{ Gew.} - \%$  bei  $40^\circ\text{C}$  bis hin zu  $14,37 \pm 0,45 \text{ Gew.} - \%$  bei  $60^\circ\text{C}$ . Berechnet man aus diesen Werten die Molekülbeladung, ergibt sich daraus eine Beladung von  $2,5 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  bei  $25^\circ\text{C}$ ,  $7,3 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  bei  $40^\circ\text{C}$  und  $8,8 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  bei  $60^\circ\text{C}$ . Nur die erhaltene Molekülbeladung bei einer Funktionalisierung bei  $25^\circ\text{C}$  ist im gleichen Bereich wie in den bereits erwähnten Forschungsergebnissen. Weiterhin wird an diesen berechneten Beladungen ersichtlich, dass mit der Temperaturerhöhung von  $25^\circ\text{C}$  auf  $40^\circ\text{C}$  eine Verdreifachung der Beladung einhergeht, wogegen die weitere Erhöhung der Molekülbeladung beim zweiten Temperaturintervall von  $40^\circ\text{C}$  auf  $60^\circ\text{C}$  nur ca. 1,2 beträgt. Diese Messungen bestätigen die FTIR-Ergebnisse und verdeutlichen nochmal, dass eine zunehmende Oberflächenbedeckung die Adsorptionsaffinität senkt [117].

Vergleicht man die thermogravimetrischen Messungen von mit DOPA und CA funktionalisierten Partikeln, wird ersichtlich, dass die Temperaturstabilität der mit DOPA funktionalisierten Partikel etwas geringer ist. Der Wendepunkt der mit DOPA funktionalisierten Partikel ist im Vergleich zu dem der mit CA funktionalisierten Partikel niedriger und liegt nahe am Schmelzbereich der Reinsubstanz ( $276\text{-}278^\circ\text{C}$  [173]). Bei den mit DOPA funktionalisierten Partikeln wird eine beginnende Sublimation bei  $150^\circ\text{C}$  detektiert, was jedoch ausreichend hoch für eine Anwendung in enzymatisch ka-

talysierten Prozessen ist. Diese unterschiedliche Temperaturstabilität der mit CA und DOPA funktionalisierten Partikeln lässt die Annahme zu, dass die Bindungsstabilität der mit CA funktionalisierten Magnetitpartikel höher ist. Andererseits ist die Molekülbeladung der funktionalisierten Partikel bei DOPA höher. Die höchste Beladung ist  $9 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  und wurde bei einer Funktionalisierungstemperatur von  $60^\circ\text{C}$  erreicht. Diese hohe Beladung deutet auf eine einzählige bzw. eine Mischung aus ein- und zweizähliger Anbindung hin. Auch eine Mehrschichtadsorption wäre denkbar.



**Abbildung 5.47:** Exemplarische TGA-Verläufe DOPA funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Funktionalisierungstemperatur: (a)  $25^\circ\text{C}$ , (b)  $40^\circ\text{C}$ , (c)  $60^\circ\text{C}$ . Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Funktionalisierungssubstanzen wurde nicht erwartet. Beide Substanzen verfügen über einen Phenolring mit zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung (vgl. Abb. 3.3). Der Phenolring ist sehr stabil und man könnte annehmen, dass sich die beiden substituierten Hydroxylgruppen sowie der aromatische Ring in beiden Molekülstrukturen gleich verhalten. So kann dieses Verhalten nur in der Art des dritten Substituenten begründet sein. Diese Substituenten sind ähnlich aufgebaut und unterscheiden sich durch eine zusätzliche Aminogruppe in DOPA sowie der konjugierten C-Doppelbindung bei Kaffeesäure. Es besteht die Möglichkeit, dass die Hydroxylgruppen des aromatischen Rings durch die elektronenziehenden Effekte (-I und -m-Effekte) des dritten Substituenten beeinflusst werden, was zu einem unterschiedlichen Verhalten der Funktionalisierung in Abhängigkeit der Temperatur führt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich beide Substanzen trotz ihres ähnlichen molekularen Aufbaus sehr unterschiedlich in ihrer Adsorption an Magnetit verhalten. Es wurde gezeigt, dass Konzentration, Temperatur und Zeit einen Einfluss auf die

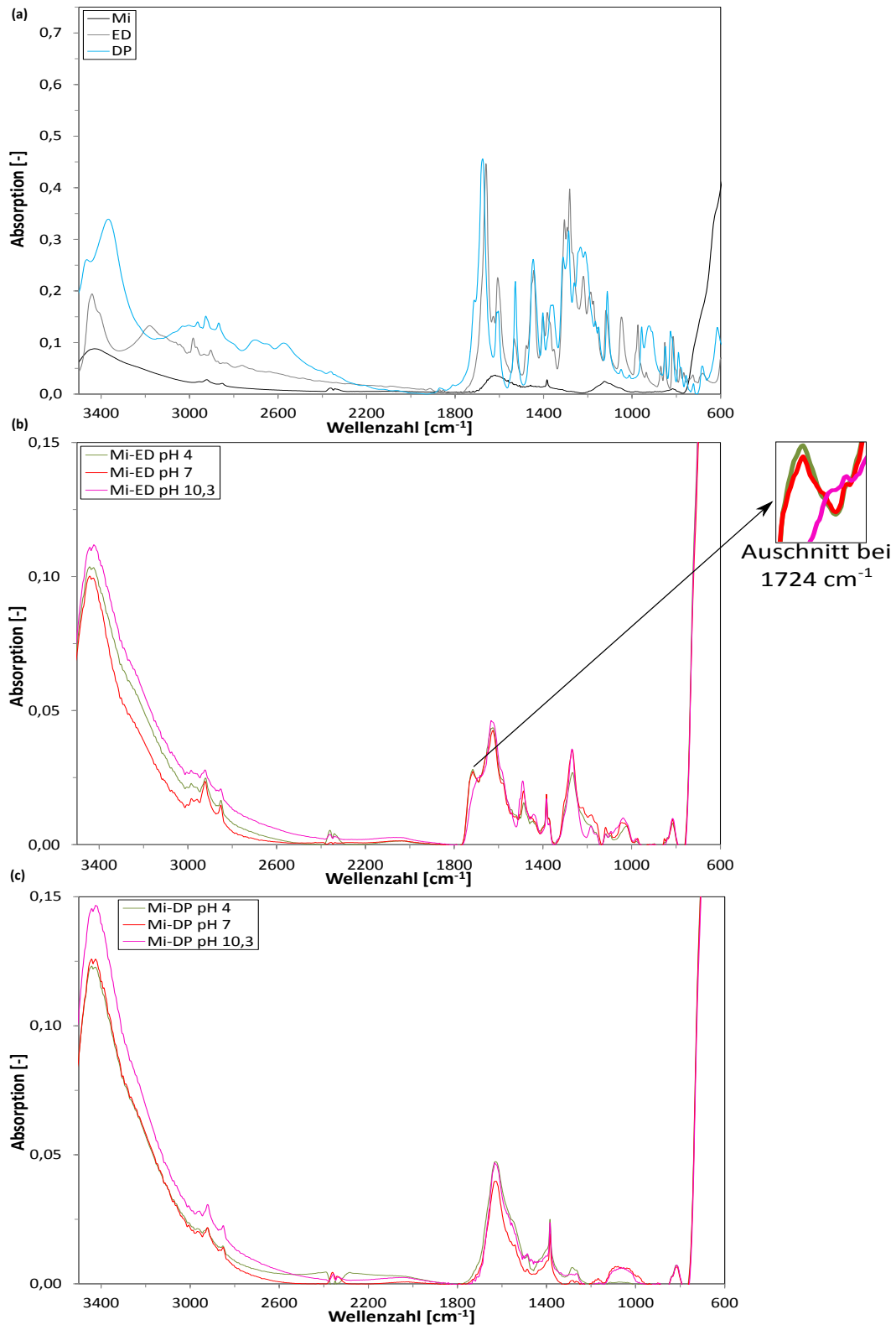
Adsorption der Funktionalisierungssubstanzen haben. Die Sublimationsverschiebung, die bei den mit CA funktionalisierten Partikeln in den TGA-Aufnahmen festgestellt wurde, deuten auf eine stärkere Bindung im Vergleich zu denen mit DOPA hin. Ob in diesem Fall von einer Chemisorption gesprochen werden kann ist noch nicht ausreichend geklärt.

### 5.1.6 Verhalten anderer strukturell ähnlicher Substanzen

Da die Struktur der Substituenten einen erheblichen Einfluss auf die Adsorption der funktionellen Substanzen am Magnetit hat, wurden zusätzlich zwei weitere phenolische Verbindungen hinsichtlich ihres vom pH-Wert abhängigen Funktionalisierungsvermögens untersucht. Zu diesem Zweck kamen die Verbindungen Ethyl 3,4-dihydroxycinamat (ED) und 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure (DP) (vgl. Abb. 3.3) zum Einsatz, die sich in zwei grundlegenden Eigenschaften von CA unterscheiden: DP verfügt über keine konjugierte C-Doppelbindung, so dass hier der Einfluss der C-Doppelbindung der CA auf die Funktionalisierung untersucht werden kann. ED hingegen enthält eine längere Kohlenstoffkette. Durch ihre Abstandhalterfunktion könnte eine sterische Hinderung bei der Enzymbindung minimiert werden [156, 255].

In Abbildung 5.48 (a) sind die charakteristischen FTIR-Banden der Reinstoffe der beiden Funktionalisierungssubstanzen DP und ED dargestellt. Aufgrund der ähnlichen Struktur und der Ähnlichkeit zu den anderen Funktionalisierungssubstanzen wie z.B. der Kaffeesäure (vgl. Abb. 3.3) weisen sie ähnliche Banden auf. Die Banden im Wellenzahlenbereich von  $3377\text{ cm}^{-1}$  für DP und  $3447\text{ cm}^{-1}$  für ED stehen für Schwingungen der Hydroxylgruppen und deren intermolekularen Brückenbindungen [134]. Die ähnliche Bandenfolge bei ED und DP im Bereich von ca.  $2900 - 3000\text{ cm}^{-1}$  charakterisiert C-H-Schwingungen in Aromaten. Die Banden im Bereich von  $1680\text{ cm}^{-1}$  charakterisieren die aromatischen C=C-Doppelbindung [134, 205]. Die Schwingungen im Wellenzahlenbereich von  $1200 - 1260\text{ cm}^{-1}$  weisen auf Phenolschwingungen hin [134]. Im Wellenzahlenbereich von  $1000\text{ cm}^{-1}$  treten zusätzlich noch aromatische CC-Schwingungen auf. Die Schwingungen im Bereich von  $870 - 730\text{ cm}^{-1}$  weisen auf Substituten am aromatischen Ring hin [134].

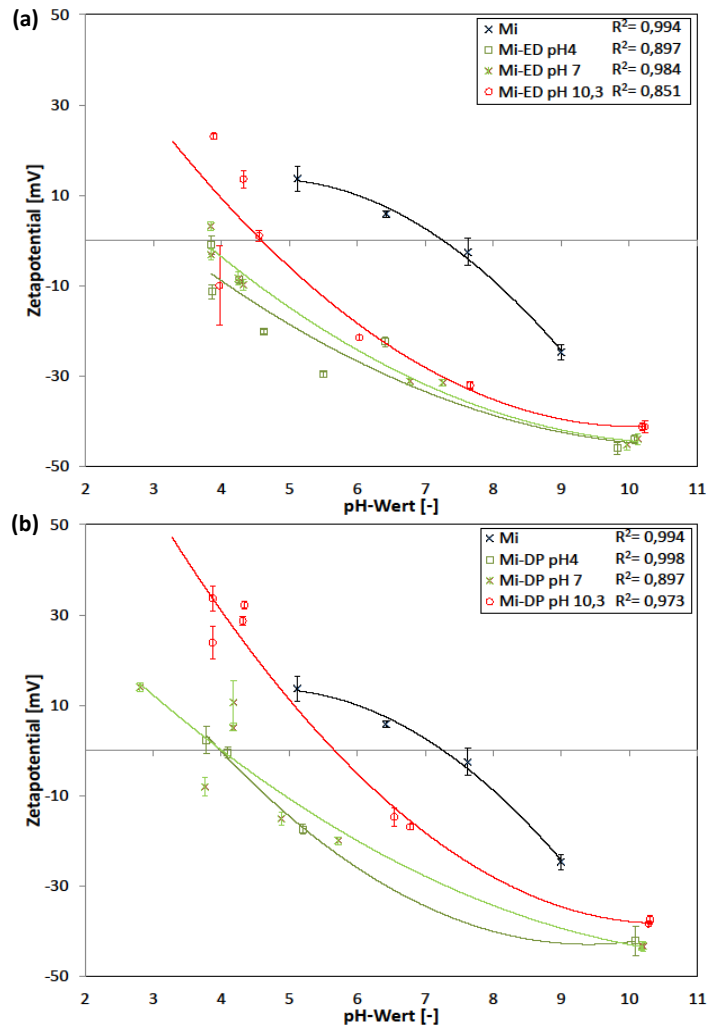
Vergleicht man die Spektren der Reinstoffe mit denen der funktionalisierten Partikeln in den Abbildungen 5.48 (b) und (c), sind neu auftretende Banden im Vergleich zum reinen Magnetit erkennbar. Bei den Spektren der mit ED funktionalisierten Partikeln sind die neuen Banden bei den Wellenzahlen von  $1495\text{ cm}^{-1}$ ,  $2474\text{ cm}^{-1}$ ,  $1055\text{ cm}^{-1}$  und  $1724\text{ cm}^{-1}$  auffällig. Die letzte Bande tritt nur bei einem pH-Wert von 4 und 7 auf und ist bei einem pH-Wert von 10,3 nur ganz leicht erkennbar. Dieser Sachverhalt deutet auf eine pH-Wertabhängigkeit hin und lässt die Vermutung einer schlechteren Anbindung im basischen pH-Bereich zu.



**Abbildung 5.48:** FTIR-Spektren DP und ED funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes der Funktionalisierung. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DP/ED-Lösung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 7 über 24 h. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Diese Beobachtung wurde auch schon bei anderen Funktionalisierungssubstanzen wie z.B. der Kaffeesäure gemacht (vgl. Kapitel 5.1.3.2). Da sich nur die pH-Abhängigkeit in einer Bande des FTIR-Spektrums zeigt, ist eine eindeutige Aussage auf Basis der

FTIR-Messungen schwierig. Diese Bande kann durch die Verschiebung der Bande im Reinstoff von  $1672\text{ cm}^{-1}$  aufgetreten sein und für die C=C-Doppelbindungen stehen. Bei DP als Funktionalisierungssubstanz (vgl. Abb. 5.48 (c)) sind die neuauftretenden Banden etwas schwieriger zu charakterisieren und liegen bei den Wellenzahlen  $1298\text{ cm}^{-1}$  und  $1040\text{ cm}^{-1}$ . Ein Zusammenhang der pH-Abhängigkeit ist bei der Substanz DP am FTIR-Spektrum kaum zu erkennen, da die auftretenden Banden sehr niedrig sind.



**Abbildung 5.49:** Zetapotentialverläufe ED und DP funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $0,1\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer bei pH 7 mit einer DOPA-Konzentration von  $5,2\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Magnetitkonzentration betrug  $1,2\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Um eine pH-Abhängigkeit der Adsorption der beiden Substanzen feststellen zu können, werden unterstützend die thermogravimetrischen Messungen hinzugezogen. Der Gewichtsverlust der Funktionalisierungssubstanz ED, der in der zweiten Stufe gegeben ist, ist bei den pH-Werten im sauren bis neutralen pH-Bereich im Vergleich zum Massenverlust der funktionalisierten Partikel im basischen pH-Bereich leicht erhöht. Der Massenverlust beträgt bei pH 4  $3,93 \pm 0,33\text{ Gew.} - \%$ , bei pH 7  $4,75 \pm 0,15\text{ Gew.} - \%$  und bei pH 10,3  $3,36 \pm 0,01\text{ Gew.} - \%$ , was zu einer Molekülbeladung zwischen  $1,7 - 2,4\text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  führt. Die geringste Molekülbeladung wird bei einem

pH-Wert von 10,3 detektiert, was auch auf eine leichte pH-Abhängigkeit hindeuten kann, wie es z.B. bei der Kaffeesäure der Fall ist (vgl. Kapitel 5.1.3.2).

Die Funktionalisierungssubstanz DP hat keine erkennbare pH-Abhängigkeit, so dass der Massenverlust über alle pH-Werte nahezu identisch ist. Die Molekülbeladung bei einer Funktionalisierung bei pH 7 und pH 10,3 beträgt  $0,88 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  und  $0,87 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$ , was sich aus einem Massenverlust von  $1,54 \pm 0,00 \text{ Gew.} - \%$  (pH 7) und  $1,56 \pm 0,02 \text{ Gew.} - \%$  (pH 10,3) berechnen lässt. Der Wassermassenverlust liegt bei allen Messungen beider Substanzen im gleichen Bereich und erstreckt sich von  $0,73 \pm 0,08 \text{ Gew.} - \%$  bis  $0,63 \pm 0,00 \text{ Gew.} - \%$ .

Bei beiden Substanzen liegt der IEP der funktionalisierten Partikel bei einer Funktionalisierung im basischen pH-Bereich höher als bei einer Funktionalisierung im Säuren (vgl. Abb. 5.49). Jedoch besitzen die mit ED funktionalisierten Partikeln niedrigere IEP verglichen mit den DP funktionalisierten Partikeln, was durch die höhere Beladung hervorgerufen wird. Der IEP der mit ED funktionalisierter Partikel liegt bei 3,2, wogegen die mit DP funktionalisierten Partikel bei gleichen Funktionalisierungsbedingungen einen IEP von 4,0 aufweisen.

Das leicht unterschiedliche Verhalten der Funktionalisierungssubstanzen DP und ED hinsichtlich ihrer Beladung und der pH-Abhängigkeit kann nur auf die verschiedenen Substituenten zurückzuführen werden. DP weist eine Carboxylgruppe auf, die aufgrund der Ladungsverhältnisse deprotoniert vorliegt und somit zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen führen kann. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Carboxylgruppe bestrebt ist, eine einzähnige Bindung mit der Magnetitoberfläche einzugehen. Dagegen verfügt ED über keine weitere Anbindungsstelle als über die zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung, weshalb das Molekül sich mit den beiden Hydroxylgruppen zum Magnetit positioniert, es somit zu keinen elektrostatischen Wechselwirkungen kommt und dadurch eine höhere Beladung erzielt wird. Die Ergebnisse zeigen auf, wie wichtig die Untersuchungen weiterer Substituten am aromatischen Ring für eine Funktionalisierung an den Magnetiten sind.

### 5.1.7 Einfluss des Magnetits auf die Funktionalisierung

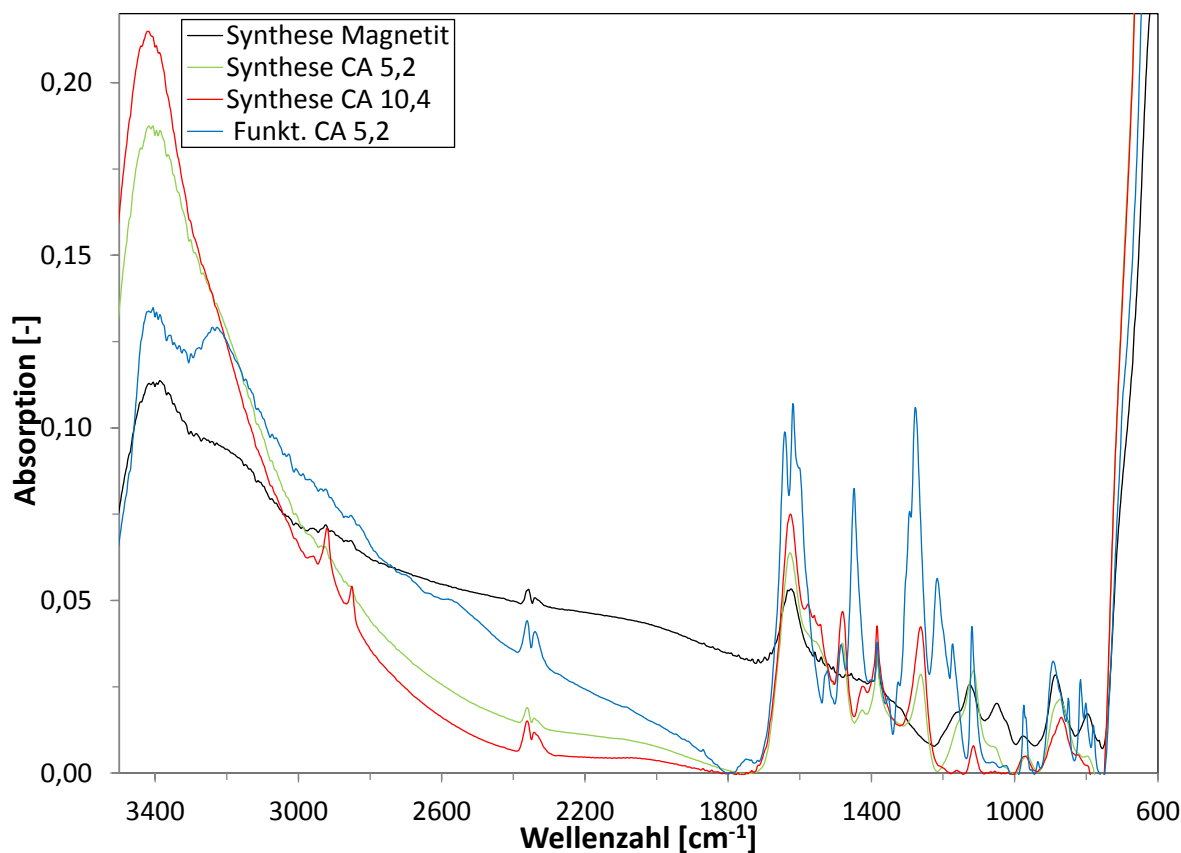
Nach den Untersuchungen der direkten Einflussfaktoren auf die Funktionalisierung wie pH-Wert, Zeit, Konzentration und Temperatur, stellte sich nun die Frage, inwieweit die Magnetitsynthese einen Einfluss auf die Funktionalisierung hat und ob eine simultane Synthese und Funktionalisierung mit Kaffeesäure durchführbar ist.

#### 5.1.7.1 Simultane Magnetitsynthese und -funktionalisierung

Die gleichzeitige Synthese und Funktionalisierung der Nanopartikel erfolgte auf Grundlage der stöchiometrischen Synthese aus Eisensalzen. Dabei wurden aus Vorversuchen zur Magnetitsynthese (nicht gezeigte Daten) die geeignetsten Prozessbedingungen gewählt und zusätzlich zu den Eisensalzen Kaffeesäure in einer Konzentration von  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $10,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  während der Synthese zugegeben. Anschließend wurden diese simultan synthetisierten und funktionalisierten Magnetitpartikel mit Partikeln, bei denen die Synthese und Funktionalisierung separat durchgeführt wurde mittels

FTIR-, DLS-, Zetapotential-, und XRD-Analyse verglichen.

In Abbildung 5.50 sind die FTIR-Spektren der mit CA funktionalisierten sowie simultan synthetisierten und funktionalisierten Partikel sowie des rein synthetisierten Magnetits zu sehen. Vergleicht man die mit CA synthetisierten und funktionalisierten Magnetitpartikel mit den rein synthetisierten Magnetitpartikeln ist zunächst erkennbar, dass eine Anbindung von CA an der Partikeloberfläche sowohl bei den Synthese- sowie Funktionalisierungsversuchen erfolgte, was sich durch die Anwesenheit neuer FTIR-Banden bestätigten lässt. Diese neuauftretenden Banden sind z.B. bei Wellenzahlen von  $1462\text{ cm}^{-1}$ ,  $1242\text{ cm}^{-1}$  und  $976\text{ cm}^{-1}$  anzutreffen und stehen für Schwingungen von =C-H, phenolischen Komponenten oder C-O-Bindungen [134, 205].



**Abbildung 5.50:** FTIR-Spektren simultan synthetisierter und funktionalisierter CA-Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung in Wasser über 24 h. Synthese verlief bei  $90^\circ\text{C}$  und einem pH-Wert von 10. Das Eisenverhältnis betrug  $0,5\text{ Fe}^{2+} \cdot (\text{Fe}^{3+})^{-1}$ . Alle Angaben der Funktionalisierungskonzentrationen sind in  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Beim Vergleich der Funktionalisierungsversuche zu den Syntheseversuchen bei gleicher Molarität der Funktionalisierungssubstanz wird eine vermehrte Anbindung bei der anschließende Funktionalisierung detektiert, da höhere Bandenintensität sowie mehr auftretende neue Banden gemessen werden. Die bessere Anbindung bei der anschließende Funktionalisierung kann durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen begründet werden. Die Synthese von Magnetit verlief bei einem pH-Wert von 10, bei welchem Kaffeesäure als oxidierte Form vorliegt. Dagegen wurde die anschließende Funktionalisierung in Wasser durchgeführt, bei der ein pH-Wert von 3 eingestellt war und CA

nicht in Form des Chinons vorliegt. Die verbesserte Anbindung im sauren pH-Bereich wurde schon vorher festgestellt und ist durch die verschiedenen Ladungsverhältnisse begründet (vgl. Kapitel 5.1.3.2).

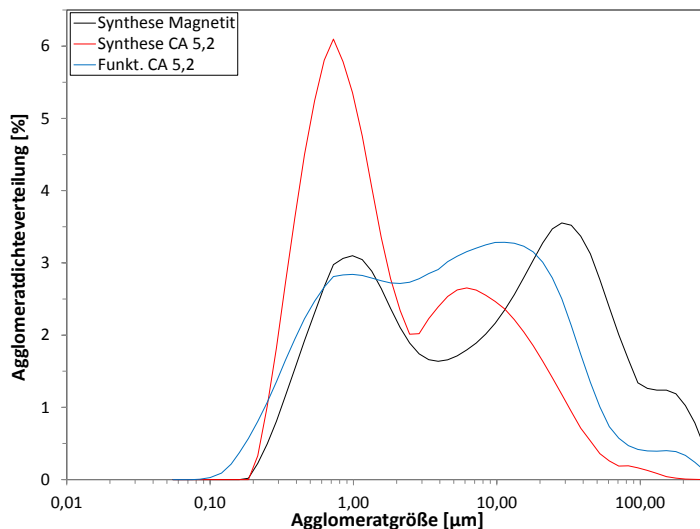
Die Molarität der Funktionalisierungssubstanzen ist bei beiden Herstellungsvarianten identisch. Bei der simultanen Synthese und Funktionalisierung ist im Vergleich zu einer separaten Synthese und Funktionalisierung die Ausbeute an Magnetit um den Faktor zehn höher, so dass sich ein niedrigeres Verhältnis von CA zu Magnetitpartikel einstellt. Deshalb wurde eine höhere Konzentration von Kaffeesäure von  $10,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  für die simultane Synthese und Funktionalisierung eingesetzt. Diese erhöhte Konzentration führt zu einer höheren Beladung von Kaffeesäure auf der Magnetitoberfläche. Jedoch ist die Bandenintensität der Partikel mit separater Funktionalisierung wesentlich höher.

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) gibt weiteren Aufschluss über die Dichteverteilung der mit CA funktionalisierten Magnetitpartikel im Vergleich zu reinen Magnetitpartikeln und der Durchführungsart der Funktionalisierung (in-situ oder post-Synthese). In Abbildung 5.51 sind die unterschiedlichen Verläufe aufgetragen und zunächst erkennt man, dass es sich um eine bimodale Partikelverteilung handelt, welche bei den beiden Syntheseversuchen sehr ausgeprägt ist. Vergleicht man diese Verläufe untereinander ist erkennbar, dass die Agglomeratgröße bei einer simultanen Synthese und Funktionalisierung am kleinsten ist.

Ein üblicher Kennwert in einer Dichteverteilung ist die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  unterhalb der 50 % der Partikelmenge liegen [104]. Die mittlere Agglomeratgröße  $d_{50}$  liegt bei den simultan hergestellten und funktionalisierten Partikeln bei  $2,29 \pm 1,59 \mu\text{m}$ . Bei den separat synthetisierten und funktionalisierten Partikeln ist der mittlere Agglomeratdurchmesser  $d_{50}$  höher und liegt bei  $4,79 \pm 1,64 \mu\text{m}$ . Die größten Agglomerate bilden sich bei der reinen Magnetitsynthese ohne Funktionalisierungsprozess.

Vergleicht man die Verläufe der Dichteverteilung untereinander ist zu erkennen, dass sich bei reinen Magnetit hauptsächlich zwei Agglomeratgrößen in ähnlicher Ausprägung um  $1 \mu\text{m}$  und  $28 \mu\text{m}$  bilden. Bei simultan synthetisierten und funktionalisierten Magnetitpartikeln tendiert die Ausbildung der Agglomerat stark zu kleinen Agglomeratdurchmessern ( $0,73 \mu\text{m}$ ) und wenigen größeren von  $6,2 \mu\text{m}$ . Die Dichteverteilung bei separater Synthese und Funktionalisierung bildet nahezu eine unimodale Verteilung mit einem breiten Agglomeratgrößenspektrum von  $0,85 \mu\text{m}$  bis  $13,2 \mu\text{m}$  aus. Die unterschiedlichen Verläufe der Dichteverteilung kann auf die unterschiedliche Durchführung zurückgeführt werden. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Funktionalisierungssubstanz ähnlich wie ein Tensid verhält und Keimbildung und -wachstum durch die Anwesenheit gestört werden (vgl. Kapitel 2.3.2), da diese Substanz die Partikel ummantelt und daraus kleinere Partikel- und Agglomeratgrößen resultieren (vgl. XRD-Ergebnisse Abb. 5.55). So schließen sich z.B. nach der Keimbildung zwei Keime zusammen und dadurch dominieren zwei Partikelgrößen, wogegen bei der anschließenden Funktionalisierung die größeren Partikelagglomerate, die durch die Synthese entstanden sind, durch Ultraschall aufgespalten werden und durch eine anschließende Funktionalisierung durch veränderte Oberflächenverhältnisse die Haftkräfte zwischen den Partikel verringert werden. Folglich bringt eine gleichzeitige Synthese und Funktio-

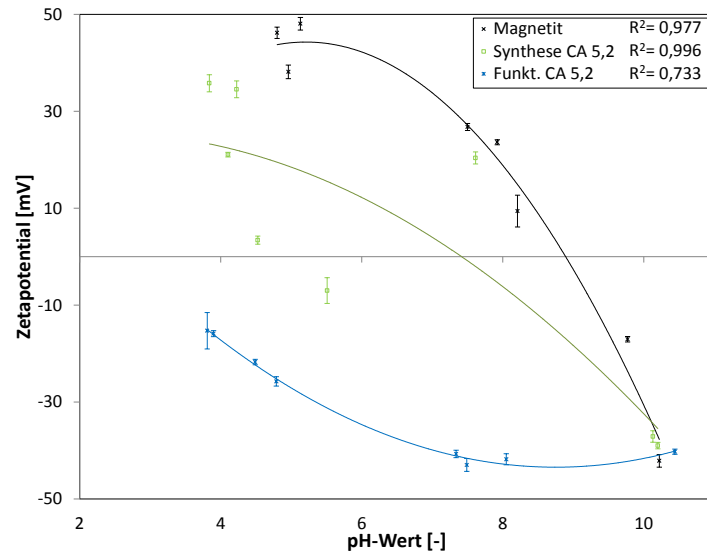
nalisation von Magnetitnanopartikel eine Verkleinerung der Partikelagglomerate und -größe. Insgesamt kann beobachtet werden, dass durch die Funktionalisierung die Partikelsuspension stabilisiert wird und es zu einer geringeren Agglomeratgröße kommt.



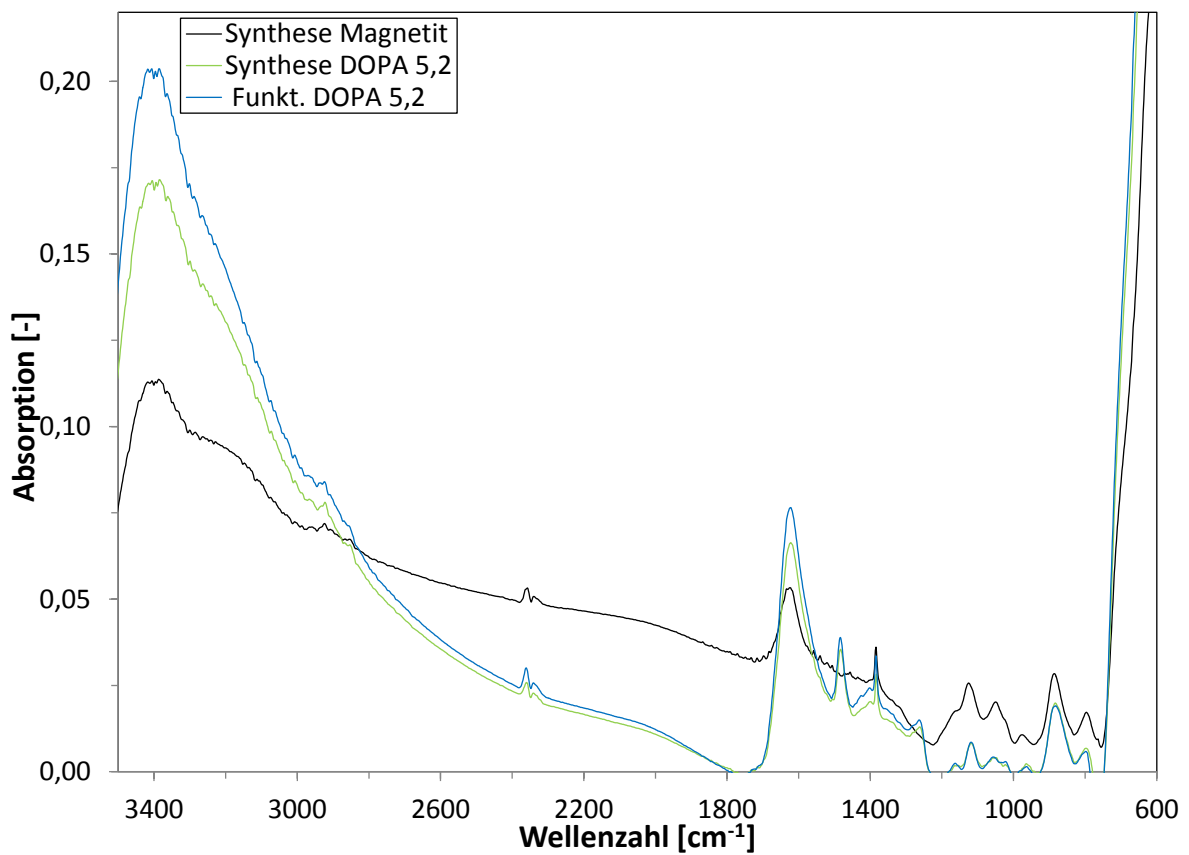
**Abbildung 5.51:** DLS-Verläufe CA synthetisierter und funktionalisierter Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung in Wasser über 24 h. Synthese verlief bei  $90^\circ \text{C}$  und einem pH-Wert von 10. Das Eisenverhältnis betrug  $0,5 \text{ Fe}^{2+} \cdot (\text{Fe}^{3+})^{-1}$ . Alle Angaben der Funktionalisierungskonzentrationen sind in  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Betrachtet man die Zetapotentialverläufe der simultanen Durchführung von Synthese und Funktionalisierung sowie der separaten Funktionalisierung und der reinen Magnetitsynthese in Abbildung 5.52, werden die FTIR-Ergebnisse bestätigt. Der IEP des reinen synthetisierten Magnetits betrug 8,9 und wies damit einen höheren IEP als der industriell hergestellte Magnetit auf. Auch bei den durchgeführten Syntheseversuchen wurde ein IEP in einem Bereich von 6-9 gemessen, wobei sich die meisten in einem Bereich zwischen pH 7-8 ansiedeln. Ein Vergleich mit anderen experimentellen Daten ergab, dass die IEP für Magnetit im Bereich von 3,8-9,9 [34] gestreut werden, jedoch wird in den meisten Veröffentlichungen ein pH-Bereich zwischen 6-8 angegeben [14, 65, 258], was mit den Versuchsergebnissen (nicht gezeigte Daten) übereinstimmt. Weiterhin wurde in der Literatur davon berichtet, dass der IEP abhängig von der Partikelgröße ist [101].

Der IEP der simultan synthetisierten und funktionalisierten Magnetitnanopartikel liegt im Vergleich zum IEP des unfunktionalisierten Magnetits etwas niedriger bei 7,4 statt 8,9. Dagegen weisen die separat funktionalisierten Partikel ein IEP von 2,6 auf. Die Suspensionsstabilität der simultan synthetisierten und funktionalisierten Magnetitpartikel ist bei einem pH-Wert von 7 nicht gegeben, da der Betrag des Zetapotentials mit  $|4| \text{ mV}$  nicht ausreichend hoch ist. Dagegen beträgt das Zetapotential der separat funktionalisierten Partikel bei einem pH-Wert von 7  $|40| \text{ mV}$ , bei dem von einer stabilen Suspension ausgegangen werden kann. Diese unterschiedliche Suspensionsstabilität ist auf die Höhe der Beladung mit CA zurückzuführen. Wahrscheinlich haben sich während der Synthese nicht genügend CA-Moleküle angelagert und somit hat eine unzureichende Oberflächenbedeckung der Magnetitoberfläche mit CA-Molekülen stattgefunden.



**Abbildung 5.52:** Zetapotentialverläufe CA synthetisierter und funktionalisierter Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung in Wasser über 24 h. Synthese verlief bei  $90^\circ \text{C}$  und einem pH-Wert von 10. Das Eisenverhältnis betrug  $0,5 \text{ Fe}^{2+} \cdot (\text{Fe}^{3+})^{-1}$ . Alle Angaben der Funktionalisierungskonzentrationen sind in  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

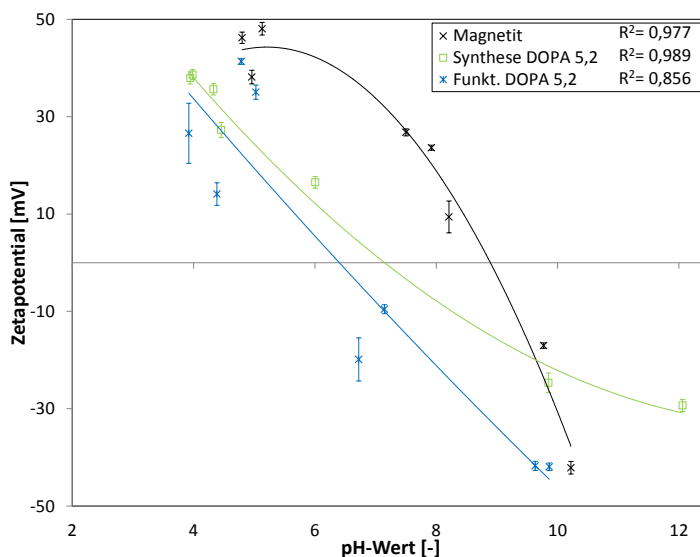


**Abbildung 5.53:** FTIR-Spektren simultan synthetisierter und funktionalisierter DOPA-Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung in Wasser über 24 h. Synthese verlief bei  $90^\circ \text{C}$  und einem pH-Wert von 10. Das Eisenverhältnis betrug  $0,5 \text{ Fe}^{2+} \cdot (\text{Fe}^{3+})^{-1}$ . Alle Angaben der Funktionalisierungskonzentrationen sind in  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Bei der simultanen Synthese und Funktionalisierung mit DOPA wurden ähnliche Beobachtungen wie bei CA gemacht. Jedoch ist in Abbildung 5.53 an den FTIR-Spektren

zu sehen, dass der Beladungsunterschied nicht so beträchtlich ist wie bei Kaffeesäure. Diese Beobachtungen werden durch die Zetapotentialmessungen bestärkt (vgl. Abb. 5.54), was sich in einen niedrigeren IEP bei der separaten Funktionalisierung zeigt. Jedoch ist der IEP der mit DOPA funktionalisierten Partikel bei 6,4 höher als in den bisher durchgeführten Versuchen, was an der Durchführung ohne Puffersystem in Wasser zwecks Vergleichbarkeit mit den simultan synthetisierten und funktionalisierten Partikeln liegt. Die IEP der simultanen Synthese und Funktionalisierung beträgt 7,1 und ordnet sich genau zwischen der reinen Magnetitpartikel und der separaten Funktionalisierung an (vgl. Abb. 5.54).

Die Beträge des Zetapotentials sind mit  $|8|$  mV und  $|1|$  mV bei pH 7 nicht ausreichend hoch, um von einer stabilen Suspension sprechen zu können. So kann keine stabile Suspension im neutralen pH-Bereich mit diesen funktionalisierten Partikeln erreicht werden. Die unterschiedlichen Beladungen werden wie zuvor bei der Kaffeesäure auf ungünstige Ladungsverhältnisse während der Synthese und Funktionalisierung sowie ungleichen Verhältnismäßigkeiten von Magnetit zu Funktionalisierungssubstanz zurückgeführt.

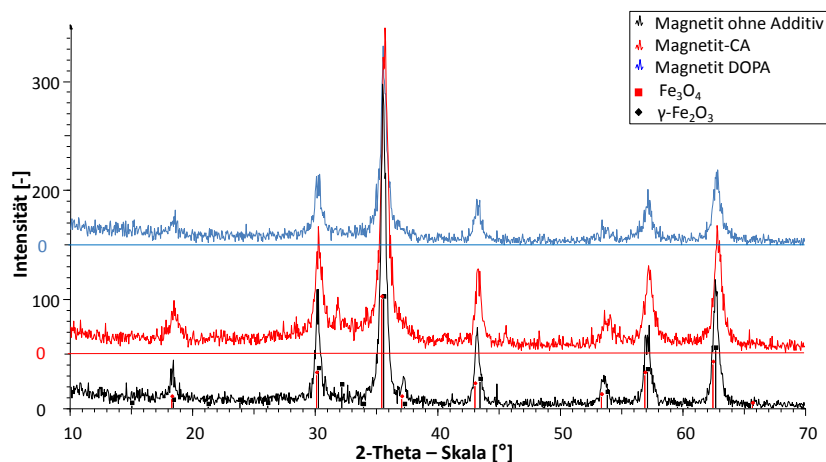


**Abbildung 5.54:** Zetapotentialverläufe DOPA synthetisierter und funktionalisierter Magnetitpartikel. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung in Wasser über 24 h. Synthese verlief bei  $90^\circ \text{C}$  und einem pH-Wert von 10. Das Eisenverhältnis betrug  $0,5 \text{ Fe}^{2+} \cdot (\text{Fe}^{3+})^{-1}$ . Alle Angaben der Funktionalisierungskonzentrationen sind in  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Bei einer Synthese sind nicht nur die Beladungseigenschaften von Bedeutung, sondern die Kristallisation und die Ausbildung der Magnetitstruktur spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Deshalb muss überprüft werden, ob überhaupt Magnetit bzw. ein Kristall bei der Anwesenheit der Funktionalisierungssubstanzen entstanden ist. Diese Überprüfung wurde mit Hilfe der Röntgenbeugung (vgl. Kapitel 3.2.7) realisiert. In Abbildung 5.55 sind die Röntgenbeugungsspektren der Synthese des reinen Magnetits (schwarz) sowie die Synthese in Anwesenheit von CA (blau) und DOPA (rot) aufgetragen. Zusätzlich finden sich in schwarz der Magnetit- und in rot der Maghemitstandard der JCPDS (vgl. Kapitel 3.2.7). Vergleicht man die Spektren ohne und mit Funktionalisierungssubstanz haben sich die Peakintensität, -form sowie der unruhige Hintergrund durch die Zugabe

der Kaffeesäure nicht bzw. kaum verändert. Jedoch ist ein kleiner neuer Peak bei einem 2-Theta Winkel von  $32^\circ$  entstanden, der auf eine Oxidation zu Maghemit hinweist, so dass ein Teil des Magnetits zu Maghemit während der Synthese oxidiert worden ist. Dies ist nicht auszuschließen, da Kaffeesäure für seine reduzierende Wirkung von  $Fe^{3+}$ - zu  $Fe^{2+}$ -Ionen bekannt ist [133]. Zusätzlich könnte durch die hohe Temperatur und den basischen pH-Wert diese reduzierende Wirkung der Kaffeesäure gefördert werden. Weiterhin wurde bei beiden Funktionalisierungssubstanzen festgestellt, dass der Peak bei 2-Theta von  $37^\circ$  nicht sehr ausgeprägt ist. Diese Beobachtungen wurden bei vielen Proben bei den Magnetitsyntheseversuchen speziell im Fall der Kopräzipitation gemacht und hat etwas mit dem Herstellungsweg sowie der Partikelgröße zu tun, wobei die Partikelgröße meistens auch einen Einfluss auf die kristalline Ausbildung der Struktur hat.

Aber insgesamt sind wenige Änderungen der kristallinen Struktur ersichtlich. Bei DOPA als Syntheseadditiv ist zu bemerken, dass insgesamt die Peakintensität abnimmt und der Hauptpeak bei  $35^\circ$  nur halb so groß ist wie bei der reinen Magnetitsynthese, was für eine schlechtere kristalline Ausbildung steht. Daher kann angenommen werden, dass DOPA die Kristallbildung stärker hemmt als CA. Die Kristallgrößen wurden mit Hilfe der Scherrer-Gleichung (vgl. Kapitel 3.2.7) und des Röntgenbeugungsspektrums abgeschätzt und ergaben sich wie folgt:  $18,1 \pm 0,7$  nm bei der reinen Magnetitsynthese,  $11,3 \pm 1,5$  nm bei Kaffeesäure und  $9,6 \pm 0,3$  nm bei DOPA als Additiv während der Synthese. Daraus wird ersichtlich, dass kleinere Kristallgrößen bei der Additivsynthese nachgewiesen wurden, welche die Ergebnisse der DLS-Charakterisierung bestätigen und was ein Tensid ähnliches Verhalten bestärkt.



**Abbildung 5.55:** XRD-Spektren DOPA und CA synthetisierter Magnetitnanopartikel. Synthese verlief bei  $90^\circ C$  und einem pH-Wert von 10. Das Eisenverhältnis betrug  $0,5 Fe^{2+} \cdot (Fe^{3+})^{-1}$  und die Funktionalisierungssubstanz hatte eine Konzentration  $5,2 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$ . Magnetit-CA und Magnetit-DOPA haben einen Offset.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Magnetisierbarkeit aller Proben gegeben war und alle Proben erfolgreich funktionalisiert werden konnten. Weiterhin wurden kleinere Agglomerat- und Partikelgrößen durch simultaner Synthese und Funktionalisierung erzielt, jedoch ist eine Suspensionsstabilität im neutralen pH-Bereich nicht gegeben, was an der unzureichenden Beladung bzw. Oberflächenbedeckung liegt. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass bei der Synthese mit den Additiven DOPA und CA kristalliner Magnetit hergestellt wurde, jedoch mit einer verminderten kristallinen Ausprägung.

### 5.1.7.2 Einfluss unterschiedlich hergestellter Magnetite auf die Oberflächenfunktionalisierung mit Kaffeesäure

Für die Untersuchung des Einflusses der Magnetite auf die Funktionalisierung wurden synthetisierte Magnetite (nicht gezeigte Daten) mittels nasschemischer Synthese (oxidativer und stöchiometrischer Herstellungsweg (vgl. Kapitel 2.3.2)) anhand ihrer Größe (vgl. Kapitel 3.3) und Herstellungsart ausgewählt. Die Übersicht der ausgewählten Magnetite und deren Herstellungseigenschaften sind der Tabelle 5.3 zu entnehmen.

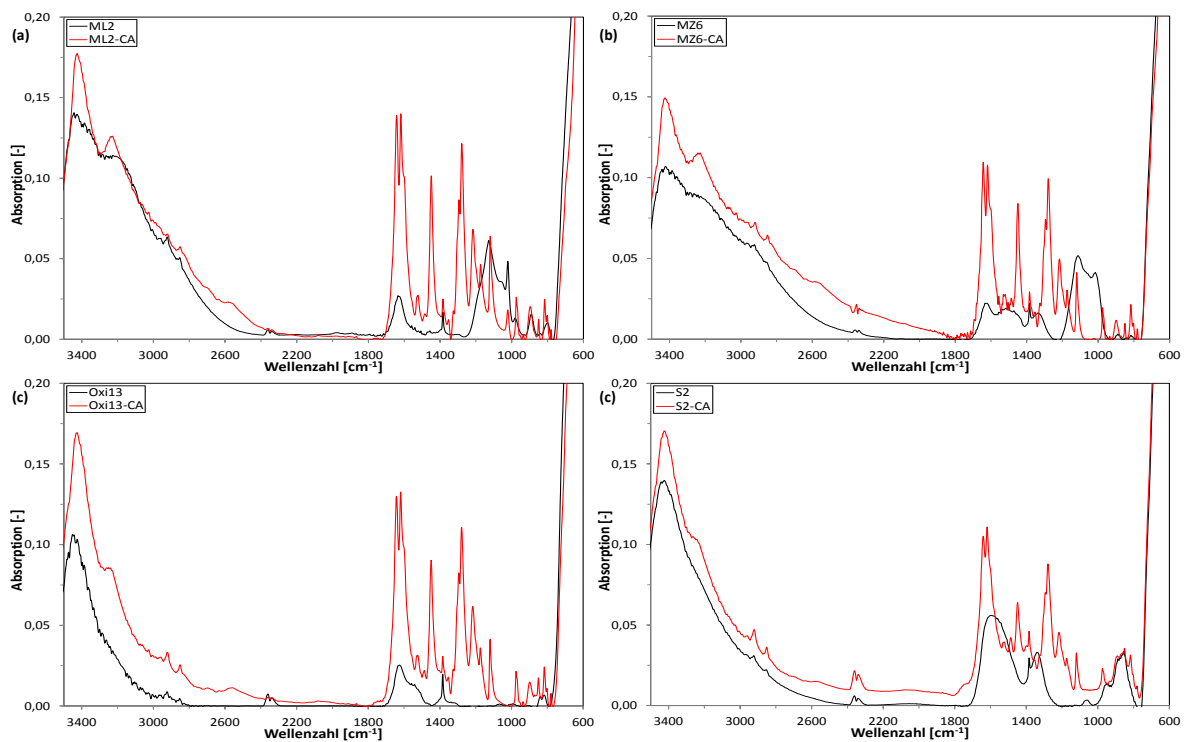
**Tabelle 5.3:** *Synthesebedingungen der ausgewählten Magnetite.*

Versuchsparameter	ML2	MZ6	Oxi 13	S2
Syntheseweg	oxidativ	oxidativ	oxidativ	stöchiometrisch
Oxidationsmittel	$O_2$	$O_2$	$KNO_3$	-
Eisensalz	$Fe_2SO_4$	$Fe_2SO_4$	$FeCl_2$	$FeCl_2, FeCl_3,$
Konzentration des Eisensalzes [mol/l]	0,4	0,4	0,3	-
Molverhältnis $\frac{Fe^{2+}}{Fe^{3+}}$ [-]	-	-	-	1,5
Temperatur [°C]	25	25	90	90
pH-Wert [-]	10	13	10	10
Versuchsdauer [h]	1	1	1	1
Konzentration NaOH [mol/l]	2,5	2,5	2,5	10
Rührgeschwindigkeit [rpm]	370	370	400	370
Zugabegeschwindigkeit der Luft bzw. der $KNO_3$ -Lösung [l/h]	0,86	0,57	0,84	-
Zugabegeschwindigkeit der $Fe^{3+}$ -Lösung [l/h]	-	-	-	0,7

In Abbildung 5.56 (a)-(d) sind die FTIR-Spektren der vier verschiedenen Magnetite und deren Funktionalisierungen mit Kaffeesäure dargestellt. Auffällig ist, dass bei allen funktionalisierten Proben (rot), die dargestellten Absorptionsspektren im Vergleich zum unbehandelt Magnetit die charakteristischen Absorptionsbanden der Kaffeesäure (vgl. Kapitel 5.1.3.2) im Wellenzahlbereich von  $1000 - 1700 \text{ cm}^{-1}$  aufweisen. Vergleicht man weiterhin die Bandenintensitäten der mit CA funktionalisierten Partikel untereinander, so ist erkenntlich, dass bei einer Wellenzahl von  $1645 \text{ cm}^{-1}$  alle im gleichen Absorptionsbereich von 0,11-0,13 liegen. Jedoch ist die Ausbildung des Doppelpeaks bei der Probe S2-CA im Vergleich zu den anderen nicht so ausgeprägt und der Peak bei  $1454 \text{ cm}^{-1}$  ist wesentlich niedriger, was auf eine etwas schlechtere Beladung schließen lässt.

Die unterschiedlich synthetisierten Magnetite weisen Banden im gleichen Wellenzahlbereich auf, jedoch sind sie zum Teil sehr unterschiedlich ausgeprägt. Die Schwingungen im Wellenzahlenbereich von  $1000 - 1700 \text{ cm}^{-1}$  sind auf Verunreinigungen zurückzuführen, die auch schon bei dem industriell hergestellten Magnetit Mi beobachtet wurden (vgl. Abb. 5.3). Die breite Bande im Wellenzahlenbereich von  $3200 - 3400 \text{ cm}^{-1}$  verläuft bei den Probe MZ6 und ML2 ähnlich, was die gleiche Herstellungsart zurückzuführen ist. Die beiden Proben wurden mittels oxidativer Synthese mit Luftsauerstoff hergestellt, allerdings unter leicht unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (vgl. Tabelle 5.3).

Insgesamt zeigen die FTIR-Spektren, dass eine Funktionalisierung bei allen ausgesuchten Magnetiten stattgefunden hat, was durch die Verläufe des Zetapotentials bestärkt wird (vgl. Abb. 5.57). Die IEP sind durch veränderte Ladungsbedingungen nach der Funktionalisierung bei niedrigeren pH-Werten anzutreffen, was ein weiteres Indiz für eine erfolgreiche Anbindung der CA ist. Diese Beobachtung wurde bei allen unterschiedlichen synthetisierten Magnetiten gemacht. Die IEP der reinen Magnetite liegen bei ML2 und MZ6 mit 7,8 und 7,7 sehr dicht beieinander, was auf die gleiche Synthese zurückzuführen ist. Auch die stöchiometrisch synthetisierte Probe S2 liegt im gleichen pH-Bereich bei 7,6. Diese IEP der synthetisierten Magnetite liegen im gleichen pH-Bereich wie der industriell hergestellten Magnetit Mi, dessen IEP bei 7,3 liegt (vgl. Abb. 5.11). Nur die Probe Oxi13, welche mit  $KNO_3$  als Oxidationsmittels synthetisiert wurde, verfügt über einen niedrigeren IEP von 5,9, was möglicherweise durch Verunreinigungen der Oberfläche mit Oxidationsmittel verursacht worden sein könnte. Jedoch spielen auch andere Phänomene wie. z.B. die Partikelgröße bei den IEP der reinen Magnetite eine Rolle, der mit sinkender Partikelgröße abnimmt [101]. Allerdings wurde dieser Zusammenhang hier nicht beobachtet, was darauf hindeutet, dass der Syntheseweg ausschlaggebender ist als die Partikelgröße.

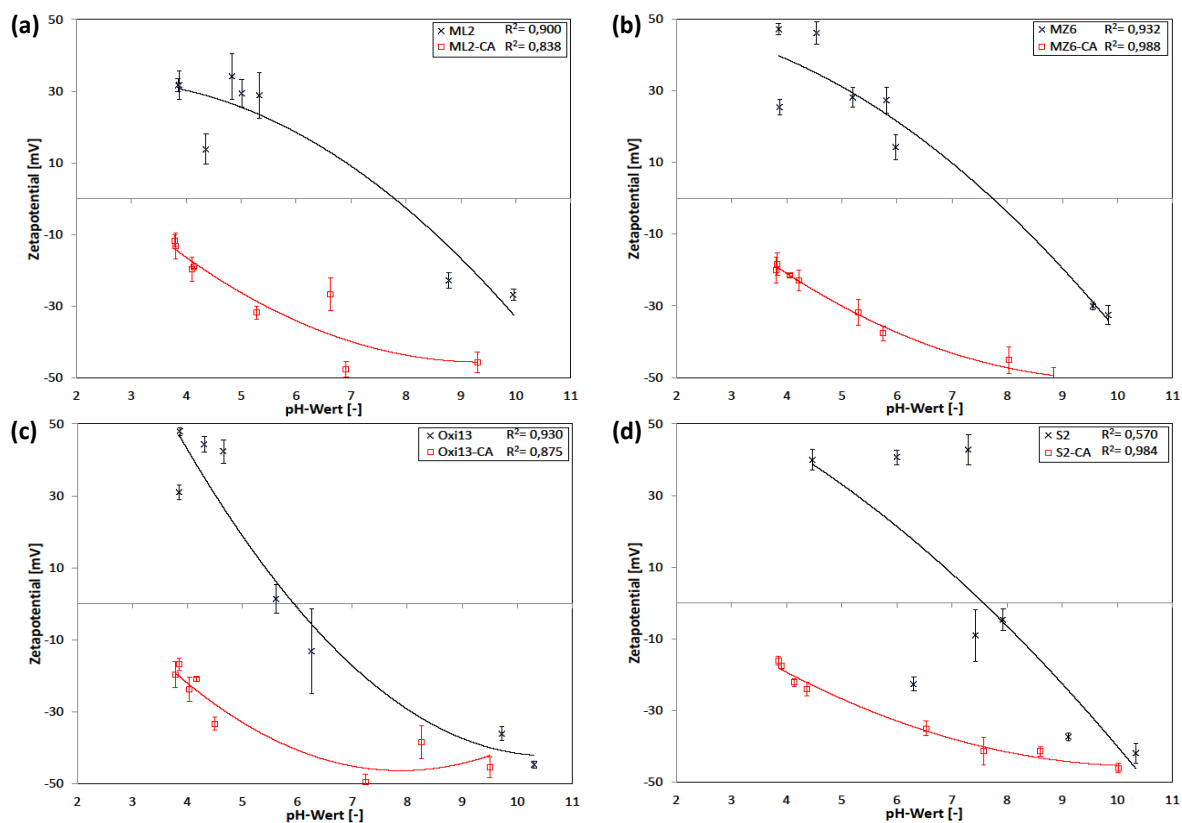


**Abbildung 5.56:** FTIR-Spektren Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der verschiedenen synthetisierten Magnetite. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Alle unfunktionalisierten synthetisierten Magnetitsuspensionen sind bei einem pH-Wert von 7 nicht suspensionsstabil und weisen ein Zetapotential zwischen  $|8| - |17| \text{ mV}$  auf. Der Betrag des Zetapotentials der Probe Oxi13 stellt den höchsten Wert mit  $|17| \text{ mV}$  dar, wogegen die anderen drei Proben in einem Bereich von  $|8| - |10| \text{ mV}$  liegen. Nach der Funktionalisierung liegen die Werte der IEP zwischen 1,9-2,7 und die Partikel weisen ein Zetapotential bei pH 7 im Bereich von  $|38| - |45| \text{ mV}$  auf, was die Stabilität der Suspension deutlich erhöht. Die vorherigen Versuche mit dem industriell hergestellten

Magnetit (vgl. Kapitel 5.1.5) lieferten einen IEP von 2,5 und zeigten ein Zetapotential bei pH 7 von  $|38|$  mV und liegen damit in der Spanne der selbst synthetisierten Magnetite.

Die Aufnahmen des Rasterelektronenmikroskops zeigten keinen signifikanten Unterschied der Magnetite nach der Funktionalisierung (nicht gezeigte Aufnahmen). Weiterhin wurden bei der XRD-Analyse keine gravierenden Veränderungen in der Kristallstruktur festgestellt (vgl. Abb. 5.58). Vorherige Verunreinigungen durch andere Eisenoxide während der Magnetitsynthese wurden nach der Funktionalisierung wieder entdeckt. Die Reduktion der Peakintensität basiert auf der Probenzubereitung (vgl. Kapitel 4.3.7) und eine Erniedrigung durch die Funktionalisierung wird eher ausgeschlossen. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die innere Kristallstruktur annähernd unverändert bleibt und somit von einem Erhalt der magnetischen Eigenschaften ausgegangen werden kann. Die berechneten Partikelgrößen (vgl. Kapitel 4.3.7) der unbehandelten und funktionalisierten Magnetitpartikel liegen in einem ähnlichen Größenbereich und unterscheiden sich nur ca. 1-3 nm im Vergleich mit der Ausgangsprobe.

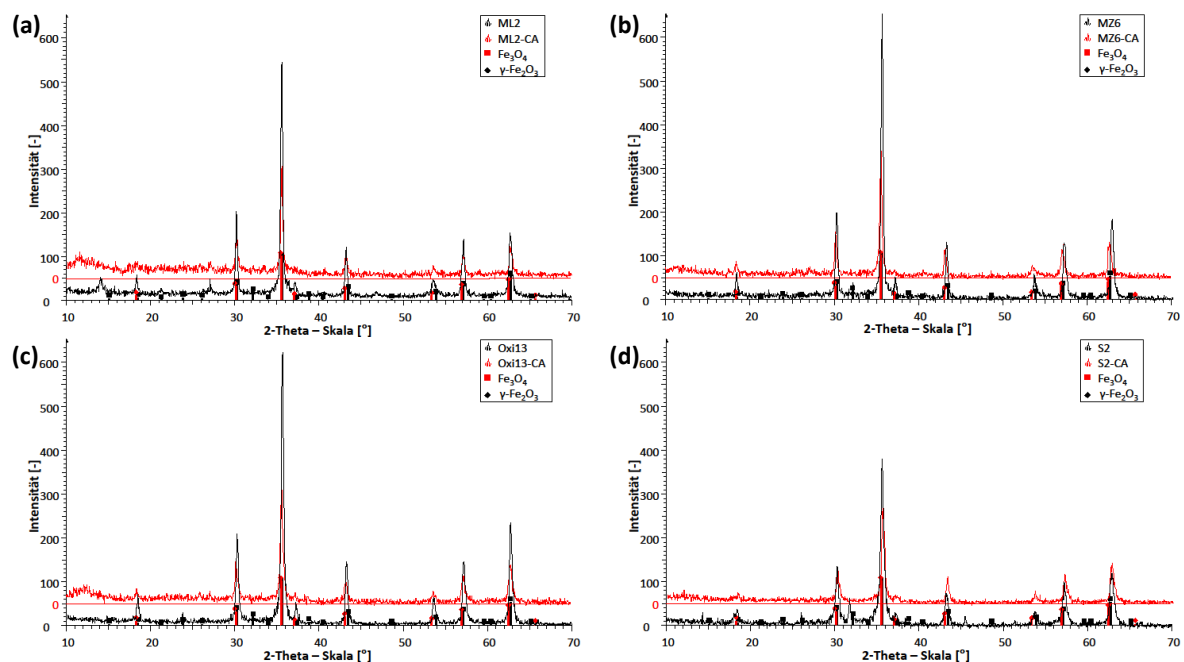


**Abbildung 5.57:** Zetapotentialverläufe Kaffeesäure funktionalisierter Magnetitpartikel und der Einfluss der Magnetitsynthese. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

In Abbildung 5.59 sind die Dichteverteilungen gegenüber den Agglomeratgrößen aufgetragen, die mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (vgl. Kapitel 3.2.6) bestimmt wurden. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass bei allen Proben außer ML2 kleinere Agglomerate durch die Funktionalisierung resultieren. Die Agglomeratverkleinerung ist bei der Probe Oxi13 bzw. Oxi13-CA am ausgeprägtesten und der  $d_{50}$  verringerte

sich um  $1,43 \mu\text{m}$ . Bei den Proben MZ6 und S2 reduzierte sich der  $d_{50}$  durch die Funktionalisierung um ca.  $0,7 \mu\text{m}$ . Die ausgeprägte Verringerung der Agglomeratgröße bei Oxi13 beruht auf der Tatsache, dass die Probe vor der Funktionalisierung die größten Agglomerate aufwies und der  $d_{50}$   $2,355 \pm 0,13 \mu\text{m}$  betrug, wogegen die anderen Proben eher im Bereich von  $1,29 \pm 0,03 \mu\text{m}$  (ML2) und  $1,93 \pm 0,03 \mu\text{m}$  (MZ6) lagen, so dass bei dieser Probe auch der größte Einfluss zu erwarten war.

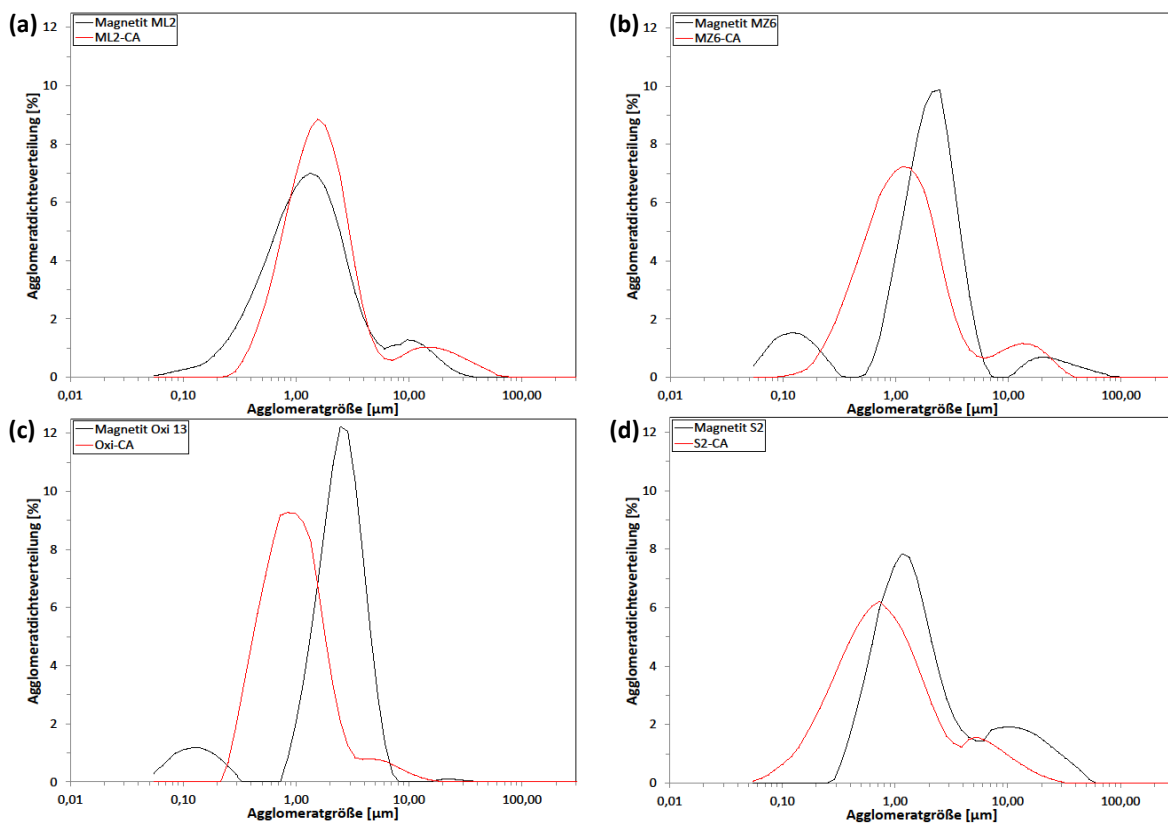
Jedoch ist nicht klar, weshalb es bei der Probe ML2 zu keiner Verkleinerung der Agglomeratgröße durch die Funktionalisierung kam, sondern eher gegenteiliges festgestellt worden ist. Der initiale  $d_{50}$  liegt bei  $1,29 \pm 0,03 \mu\text{m}$  und vergrößerte sich nach der Funktionalisierung auf  $1,63 \pm 0,06 \mu\text{m}$ . Diese Beobachtung wurde nicht erwartet, da der Magnetit MZ6, welcher mit der gleichen Herstellungsmethode synthetisiert wurde, ein anderes Bild zeigt. Eine Erklärung dieses Phänomens ist schwierig und kann nur durch die Verunreinigung der Ausgangsprobe mit Goethit begründet sein, welche MZ6 nicht aufwies. Goethit verfügt im Gegensatz zu Magnetit über eine höhere Hydroxylgruppensdichte von  $18 \text{ nm}^{-2}$  auf der Oberfläche [14], was zu einer stärkeren Vernetzung der Partikel untereinander beitragen kann. Kondensationsreaktionen verstärken diese Vernetzung. Durch die stärkeren interpartikulären Wechselwirkungen ist es möglich, dass bei der Funktionalisierung der vorangehenden Probenpräparation mit Ultraschall keine oder nur eine geringe Auflösung der Agglomerate erreicht wird und die Funktionalisierungssubstanz auf bereits bestehende größere Agglomerate trifft.



**Abbildung 5.58:** XRD-Spektren CA funktionalisierter Magnetitpartikel und der Einfluss der Magnetitsynthese. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Die Spektren der funktionalisierten Partikel haben einen Offset.

Die Ergebnisse der thermogravimetrischen Untersuchungen der unterschiedlichen, selbst synthetisierten Magnetite sind in Abbildung 5.60 dargestellt. Auffällig ist, dass die prozentualen Massenverluste der beiden Proben ML2-CA und Oxi13-CA höher sind, als bei den anderen beiden Proben MZ6-CA und S2-CA. Jedoch kann man nicht nur

die Massenverluste untereinander vergleichen, sondern muss auch die Probenzusammensetzung berücksichtigen. So ist zum Beispiel bei der Probe Oxi13 die Wasserstufe wesentlich ausgeprägter, als bei den anderen Proben, so dass sich der Massenverlust der Kaffeesäure im gleichen Bereich wie bei den anderen beiden Proben befindet und sich zu einer Molekülbeladung zwischen  $5 - 6 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  ergibt, was in guter Übereinstimmung mit der Molekülbeladung des industriell hergestellten Magnetits Mi mit  $5,3 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  steht. Die Probe Oxi13 ist besser kristallisiert, während bei dem stöchiometrischen Syntheseweg das gebundene Kristallwasser allmählich abgegeben wird. Die Probe ML2-CA bildet hinsichtlich der Kaffeesäurebeladung eine Ausnahme, was wiederum auf eine Verunreinigung mit Goethit zurückzuführen ist. Das Hydroxylgruppenverhältnis von Goethit zu Magnetit beträgt ca. 2,4. Weiterhin wird die Zersetzungstemperatur wie zuvor bei höheren Werten im Vergleich zum Reinstoff detektiert, was auf die bereits diskutierten Ansätze zurückzuführen ist (vgl. Kapitel 5.1.5).

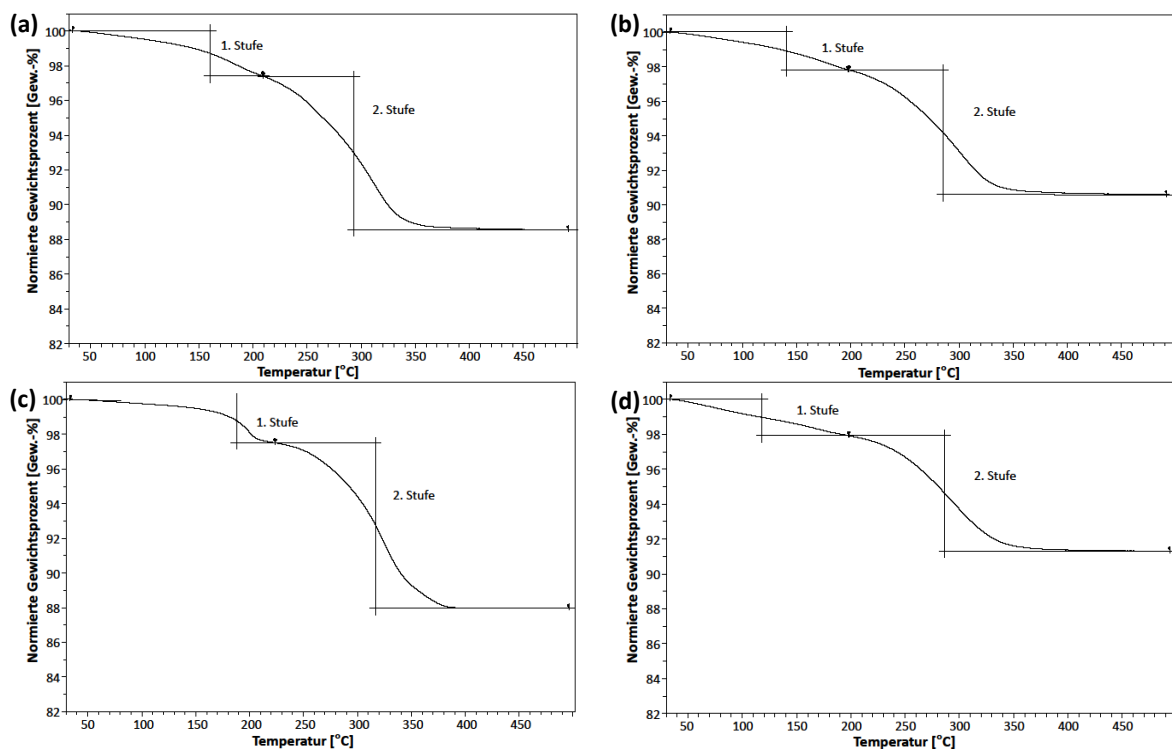


**Abbildung 5.59:** DLS-Verläufe CA funktionalisierter Magnetitpartikel und der Einfluss der Magnetitsynthese. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Insgesamt wird bei allen untersuchten Proben eine Funktionalisierung festgestellt und der Einfluss des Magnetitsynthesewegs erscheint als relativ gering, was so nicht erwartet wurde, da die Oberflächeneigenschaften wie Oberflächenladung, -morphologie und -geometrie einen signifikanten Einfluss auf die Bindungsmechanismen der An- und Kationen von FeO sowie deren Reaktionsgeschwindigkeit haben sollen [237]. Weiterhin wird der Aufbau der Adsorptionsschicht durch Parameter wie die chemische Zusammensetzung, Geometrie, Ordnungsgrad der Oberfläche etc. bestimmt. Der geringe Einfluss

des Trägermaterials deutet auf eine Chemisorption hin [113]. Dies kann auch durch die ähnlichen Syntheseverfahren und die dadurch ähnlich ausgebildeten Magnetite mit z.B. gleichen Ordnungsgraden begründet werden.

Des Weiteren könnte es durch die Trocknung und Lagerung der Magnetite zu einer Oxidation der Oberflächenschicht zu Maghemit kommen, wie es z.B. bei Molybdänferriten beobachtet wurde [259]. Diese Änderung kann nicht mit der Röntgenbeugung erfasst werden, da die Dicke der Oxidschicht nur etwa vier Elementarzellen (3 nm) umfasst [257]. Die Oxidation würde zu einer Annäherung der Oberflächeneigenschaften aller Magnetitproben führen. Jedoch widerspricht das Ergebnis der Messung des IEP bei Oxi13 dieser Annahme, welcher nach der Lagerung vor der Funktionalisierung bestimmt wurde.



**Abbildung 5.60:** Exemplarische TGA-Verläufe CA funktionalisierter Magnetitpartikel und der Einfluss der Magnetitsynthese: (a) ML2, (b) MZ6, (c) Oxi13, (d) S2. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Immobilisierung erfolgte 24 h in  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  BSA-Lösung in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7.

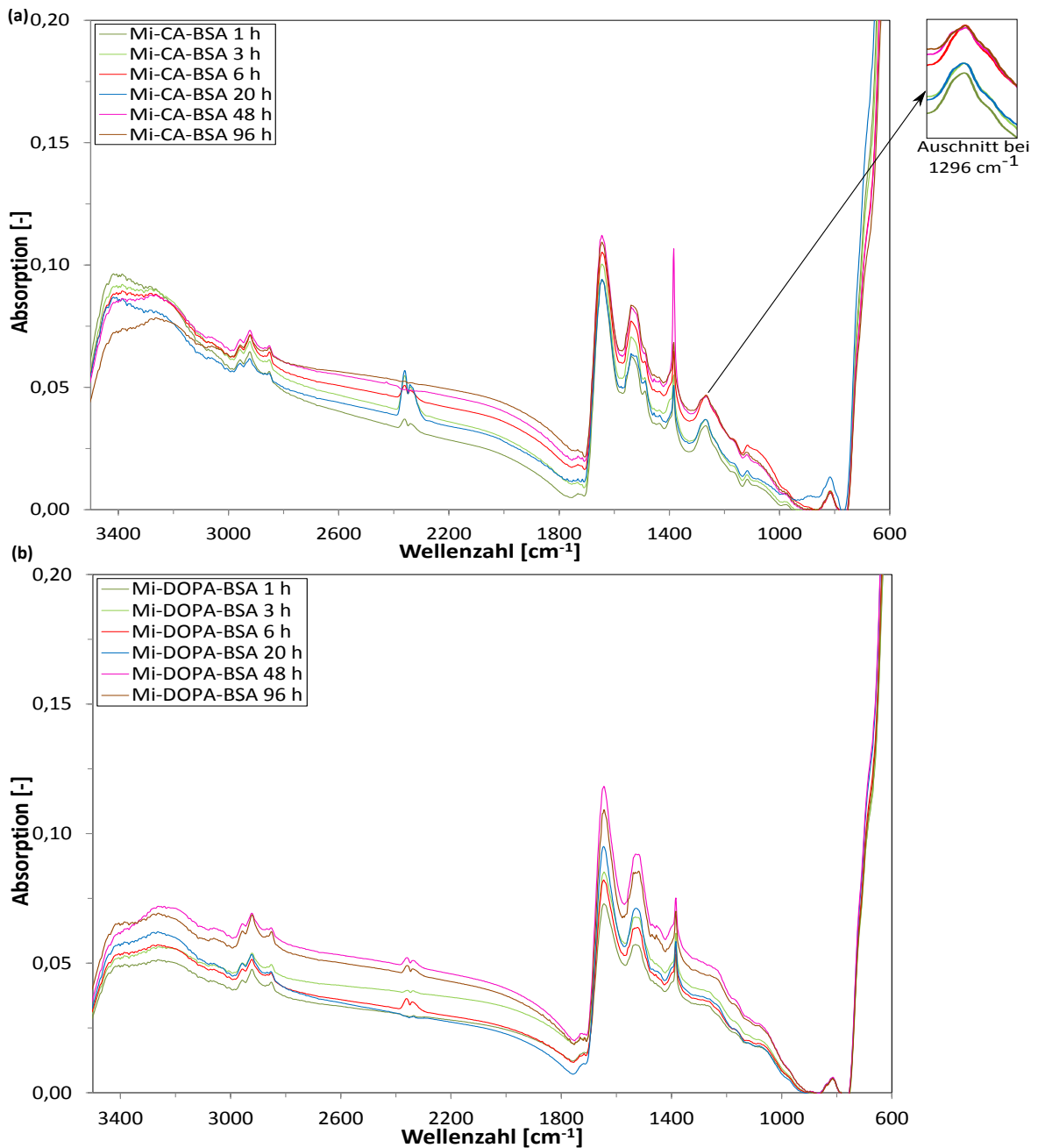
Generell ist der Einfluss verschiedener Magnetite, welche mittels nasschemischer Synthese produziert wurden, auf die Oberflächenfunktionalisierung relativ gering, wenn es sich um annähernd reine Magnetitproben handelt. Jedoch kommt es zu leichten Veränderungen, wenn die Probe mit anderen Eisenoxiden verunreinigt ist. Eine anschließende Proteinimmobilisierung (nicht gezeigte Daten) mit BSA dieser vorher funktionalisierten unterschiedlichen Magnetite hat keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer BSA-Beladung ergeben.

### 5.1.8 Einfluss der Funktionalisierungssubstanz auf die BSA-Anbindung

Um erste Abschätzungen über die Immobilisierung an den funktionalisierten Magnetitpartikeln machen zu können, wurde das Standardprotein BSA verwendet. In Abbildung 5.61 sind die FTIR-Spektren der mit CA (a) und DOPA (b) funktionalisierten und proteinbehafteten Partikeln in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Bei den FTIR-Spektren ist sofort die BSA charakteristische Doppelbande bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  und  $1541\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Diese Banden stehen für die Amidschwingungen I und II, wobei die erste hauptsächlich durch C=O-Dehnungsschwingungen und die zweite durch die Kombination von Biegeschwingungen der N-H-Moleküle und Dehnungsschwingungen der C-N-Schwingungen auftritt. Weiterhin ist eine breite Bande im Wellenzahlenbereich von  $3400 - 3000\text{ cm}^{-1}$  erkennbar. Diese breite Bande setzt sich aus den Dehnungsschwingungen der OH-Gruppen sowie den Amiddehnungsschwingungen zusammen [134, 205, 238]. Da diese Schwingungsbande durch die Anregung mit infrarotem Licht erzeugt werden, kann von einer Bindung des BSAs an beiden funktionalisierten Partikeln ausgegangen werden. Weiterhin ist eine zusätzliche Bande bei den mit CA funktionalisierten Partikeln (vgl. Abb. 5.61 (a)) bei einer Wellenlänge von  $1296\text{ cm}^{-1}$  erkennbar. Diese Schwingung resultiert von der Kaffeesäure und steht für C-H-Schwingungen oder Ph-O-Schwingungen des aromatischen Ringes. Diese Schwingung ist bei den mit DOPA funktionalisierten und BSA immobilisierten Partikeln (vgl. Abb. 5.61 (b)) nicht so ausgeprägt zu erkennen. Wenn Schwingungen von der Kaffeesäure emittiert werden, ist es nicht zu einer vollständigen Oberflächenbedeckung mit BSA gekommen, da andernfalls die Schwingungen der CA von der BSA-Hülle überlagert werden.

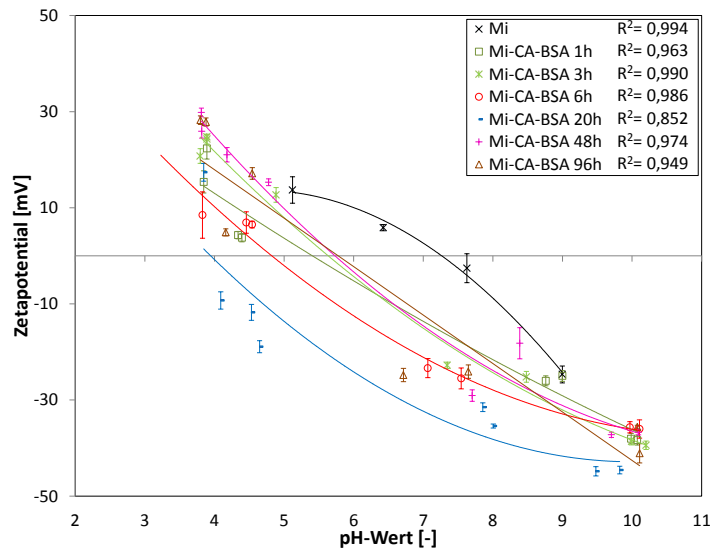
Bei den Intensitäten der Doppelbande bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  ist keine direkte Abhängigkeit von der Funktionalisierungszeit erkennbar. So zeigt sich, dass bei mit DOPA funktionalisierten Partikeln die Bandenhöhe z.B. nach 3 h leicht höher ist als die von 6 h. Bei der Kaffeesäure zeigt sich ein ähnliches Bild. Hier sind die Bandenintensitäten nach 20 h Funktionalisierungszeit geringer als nach 3 h, so dass hier kein Zusammenhang zwischen der Immobilisierungszeit und der BSA-Beladung ersichtlich wird. Diese Beobachtungen zeigen sich auch in der Messung der Zetapotentialverläufe (vgl. Abb. 5.62). Die Partikelsuspensionen haben ein Zetapotential bei pH 7 im Bereich von  $|14| - |23|\text{ mV}$ , was nicht ausreichend hoch für eine stabile Partikelsuspension ist. Die Suspensionsstabilität der BSA beladenen Partikel liegt zwischen den Stabilitätswerten reinen und funktionalisierten Magnetits.

Die Agglomeratdichteverteilung funktionalisierter und immobilisierter Partikel bestärkt die Aussage der niedrigeren Suspensionsstabilität, da größere Agglomerate nach der Immobilisierung vorhanden sind. Jedoch wurde die initialen Agglomeratgrößen der reinen Magnetitproben nicht wieder erreicht.



**Abbildung 5.61:** FTIR-Spektren CA und DOPA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Immobilisierungszeit. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA/DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Immobilisierung fand im  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7 mit einer BSA-Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Die mit DOPA funktionalisierten und BSA beladenen Partikel haben ähnliche Ergebnisse erzielt und die IEP liegen auch im Bereich des reinen BSAs (vgl. Kapitel 3.1.4). Wie auch bei den mit CA funktionalisierten und BSA immobilisierten Nanopartikeln liegen die IEP zwischen denen der unbehandelten Magnetite (Mi) und denen der funktionalisierten Partikel. Diese Unabhängigkeit der Immobilisierungsdauer wird auch in Abbildung 5.63 (a) ersichtlich, da keine höhere Proteinbeladung mit steigenden Immobilisierungszeit erreicht wird.

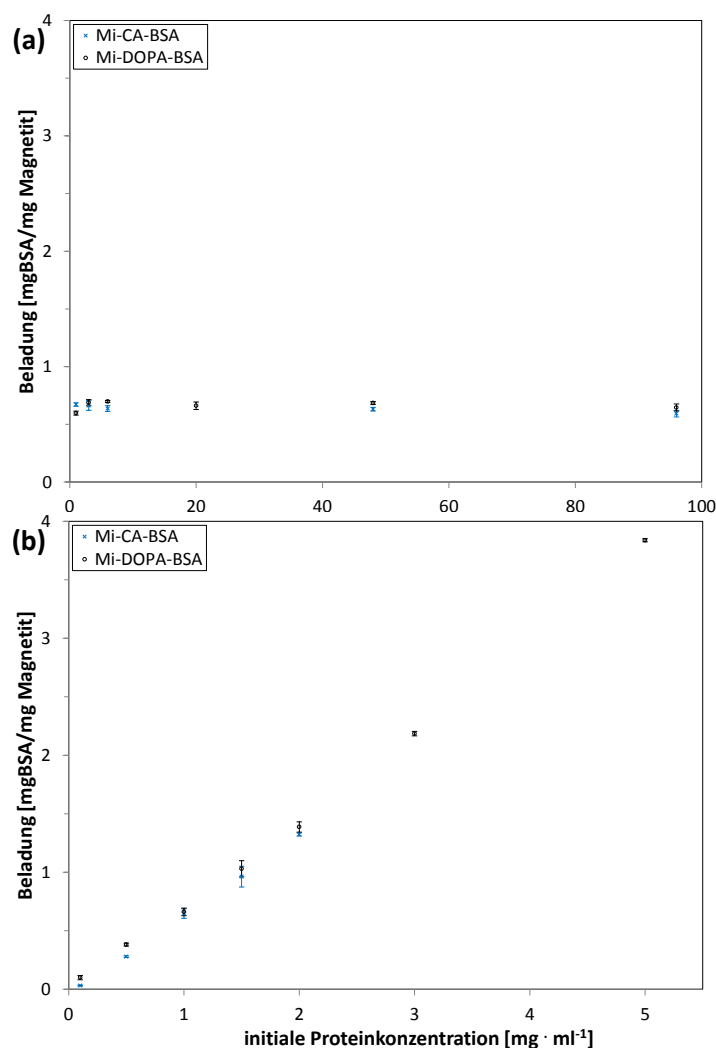


**Abbildung 5.62:** Zetapotentialverläufe CA funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel in Abhängigkeit der Immobilisierungszeit. Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Immobilisierung fand im  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7 mit einer BSA-Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Zusätzlich ist zu erkennen, dass die Proteinbeladung der zwei unterschiedlich funktionalisierten Partikel in etwa identisch ist. Sie liegt für die mit CA funktionalisierten Partikeln bei  $0,59 \pm 0,03 - 0,67 \pm 0,01 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$  und bei den mit DOPA behandelten zwischen  $0,60 \pm 0,02 - 0,70 \pm 0,01 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$ . Es handelt sich um eine unspezifische Sorption, da sie sehr schnell abläuft [260].

Diese Vermutung wird durch die BSA-Beladung in Abhängigkeit der initialen Proteinkonzentration bestärkt, welche in Abbildung 5.63 (b) zu sehen ist. In dieser Abbildung ist erkenntlich, dass die BSA-Beladung mit steigender Anfangskonzentration zunimmt, ohne eine ersichtlich Sättigung zu erreichen. Dieses Phänomen wird bei beiden Funktionalisierungssubstanzen beobachtet und deutet auf eine mehrschichtige Anbindung hin. Bei den mit DOPA funktionalisierten und BSA immobilisierten Partikel steigt die Proteinbeladung von  $0,10 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$  bei einer BSA-Anfangskonzentration von  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  auf  $3,84 \pm 0,01 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$  bei einer anfänglichen Konzentration von  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Die IEP dieser Versuchsreihe liegen alle auf gleichem Niveau (nicht gezeigte Daten), da die Oberfläche schon vollständig bedeckt ist und somit keinen weiteren Einfluss hat. Dieses unterstreicht ebenfalls eine mehrschichtige Anbindung [113, 260].

Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine Proteinadsorption mit BSA an den funktionalisierten Partikeln möglich ist und hohe Beladungen erreicht werden. Es wird von einer nicht spezifischen Adsorption ausgegangen, was in Hinblick auf eine Enzymimmobilisierung zu niedrigeren Enzymaktivitäten und einer niedrigeren Stabilität des Enzym-Trägerkomplexes führen könnte. Deshalb werden bei der Enzymimmobilisierung die funktionellen Gruppen des Trägermaterials mit bereits aus der Enzymimmobilisierung (vgl. Kapitel 2.5.1) bekannten Verfahren aktiviert, so dass sich eine kovalente Bindung zwischen Enzym und funktionalisiertem Träger ausbilden kann.



**Abbildung 5.63:** Quantitative Proteinbeladung des CA und DOPA funktionalisierten Magnetits in Abhängigkeit der Immobilisierungszeit (a) und -konzentration (b). Funktionalisierung erfolgte in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA/DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Immobilisierung fand im  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7 und einer BSA-Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  bei der Untersuchung des zeitliche Einflusses sowie einer Versuchsdauer von 20 h bei den Konzentrationsversuchen statt. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

## 5.2 Stabilitätsversuche

In diesem Kapitel soll die Stabilität der mit CA und DOPA funktionalisierten Partikel sowie der funktionalisierten und mit BSA beladenen Magnetitnanopartikel gegenüber pH-Änderungen bzw. Wechselwirkungen mit verschiedenen Puffern untersucht werden. Dabei wurden gängige Puffer aus der Biochemie/Enzymanwendung verwendet. Der pH-Wert wurde von 2,5 bis 10,3 variiert. Ziel war es zu untersuchen, ob sowohl die Funktionalisierungssubstanz als auch die Proteinanbindung stabil sind und sich idealerweise nicht ablösen, um somit beim technischen Einsatz die geforderte Prozessstabilität zu gewährleisten. Als Stabilitätsnachweis diente zunächst der IEP.

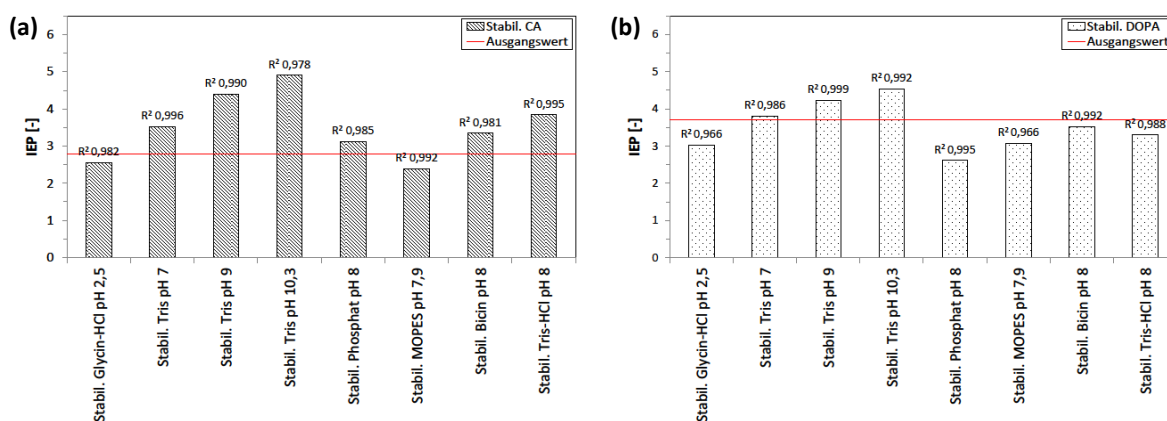
### 5.2.1 Stabilität der funktionalisierten Partikel

In Abbildung 5.64 (a) und (b) sind die IEP für mit CA und DOPA funktionalisierte Partikel nach unterschiedlichen Behandlungen aufgetragen und der Ausgangswert als Gerade markiert. Bei genauerer Betrachtung der IEP der mit CA funktionalisierten Partikel (vgl. Abb. 5.64 (a)) ist erkenntlich, dass es bei einigen zu Veränderungen kommt. Auffällig ist der leichte Anstieg der IEP bei mit Trispuffer behandelten Partikeln, welcher bei allen Proben detektiert wird und mit steigendem pH-Wert zunimmt. So beträgt die Differenz der IEP bei einer Behandlung mit Trispuffer bei pH 7 0,7, bei pH 9 1,6 und bei pH 10,3 2,1. Der Anstieg des IEPs lässt vermuten, dass sich CA von der Oberfläche abgelöst hat und dadurch die ursprünglichen Oberflächeneigenschaften des Magnetits hervortreten.

Eine weitere Möglichkeit ist die Anlagerung der Trismoleküle an die Oberfläche, wodurch auch die Oberflächenladung beeinflusst werden würde. Da Trispuffer über eine Aminogruppe mit basischen Eigenschaften verfügt, könnten die zusätzlichen positiven Ladungen auf der Oberfläche einen Anstieg des IEPs bewirken. Aus der Abbildung 5.64 (a) ist ersichtlich, dass dieser Effekt pH-Wert abhängig ist. Auch der Tris-HCl-Puffer bestärkt diese Annahme, da er einen pH-Wert von 8 besaß und ebenfalls eine Erhöhung von 1,1 aufzeigt, die genau zwischen pH 7 und 10 des Trispuffers liegt. Die Verschiebung der IEP der Trispuffer behandelten mit CA funktionalisierten Partikel hat eine Abnahme der Suspensionsstabilität im neutralen Bereich zur Folge. Im Vergleich zum unbehandelten Magnetit ist die Suspensionsstabilität bei einem pH-Wert von 7 dennoch höher.

Die anderen gemessenen IEP liegen im Rahmen der normalen Messschwankungen, so dass aufgrund gleichbleibender Oberflächenladungsverhältnisse von stabilen Partikeln in diesen Medien ausgegangen werden kann. Insgesamt scheint der Puffer ausschlaggebender zu sein als der pH-Wert, da im pH-Bereich von 7,9-8 die verwendeten Puffer Bicin, Phosphat und MOPES keine Abweichungen zeigen, wogegen die Trispufferbehandlung bei allen pH-Werten den IEP beeinflusst. Bemerkenswert ist auch, dass keine Veränderung bei einem pH-Wert von 2,5 im eingesetzten Glycin-HCl-Puffer detektiert wird.

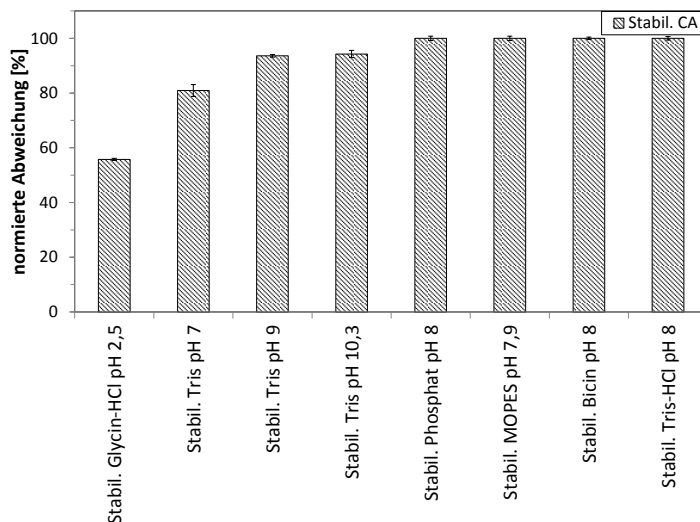
Betrachtet man die Stabilitätsversuche der mit DOPA funktionalisierten Partikel (vgl. Abb. 5.64 (b)) ist im Vergleich zu denen mit CA funktionalisierten Partikeln auffällig, dass die Schwankungen der IEP geringer sind. Es zeigt sich wieder die Abhängigkeit des Trispuffers bei den mit DOPA funktionalisierten Partikeln, jedoch in nicht so ausgeprägter Form. Allerdings liegen die Messergebnisse bei pH 7 und pH 9 im Unschärfbereich der Messgenauigkeit. Bei pH 10,3 wurde eine Abweichung von 0,9 detektiert. Im Gegensatz zu den mit CA funktionalisierten Partikeln ist keine Abhängigkeit vom Tris-HCl-Puffer aufgetreten. Es wird angenommen, dass die gleichen Faktoren wie zuvor bei der Kaffeesäure ausschlaggebend sind, aber einen geringeren Einfluss haben.



**Abbildung 5.64:** Abweichungen der IEP Kaffeesäure (a) und DOPA (b) funktionalisierter Magnetitpartikel bezüglich der Ausgangsprobe nach den Stabilitätsuntersuchungen. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA/DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Stabilitätstest erfolgten mit einer Pufferkonzentration von  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  und einer Dauer von 7 Tage.

Vergleicht man die mit CA und DOPA funktionalisierten Partikel nach einer Behandlung mit Phosphatpuffer, ist ersichtlich, dass sich nur im Falle von DOPA funktionalisierten Partikeln der IEP um 1,1 erniedrigt. Der Grund könnte in der unterschiedlichen Beladung der funktionalisierten Partikel liegen. Die mit DOPA funktionalisierten Partikel haben eine halb so große Beladung von  $2,1 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  ( $0,042 \text{ g}_{\text{DOPA}} \cdot \text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$ ). Dagegen weisen die mit CA funktionalisierten Partikel eine Beladung von  $4,6 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  ( $0,083 \text{ g}_{\text{DOPA}} \cdot \text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^{-1}$ ) auf. Dadurch könnte die Oberfläche der mit DOPA funktionalisierten Partikel nur unvollständig bedeckt sein, wodurch vermutlich eine Komplexierung des Phosphats an der Eisenoxidoberfläche hervorgerufen wird [96, 117]. Die Phosphatkomplexierung führt zur Anreicherung von negativen Gruppen auf der Oberfläche, weshalb es zu einer Verringerung des IEPs der mit DOPA funktionalisierten Partikel nach einer Behandlung mit Phosphatpuffer kommt. Die Beobachtung der Komplexierung von Phosphat an der Magnetitoberfläche wurde bereits in Vorversuchen (vgl. Kapitel 5.1) beobachtet und ein weiteres Mal bestätigt. Der Phosphatpuffer wurde aber aufgrund seiner Relevanz in der Biochemie in den Stabilitätsversuchen untersucht und zeigt bei mit CA funktionalisierten Partikeln keinen Einfluss, da die Oberflächenbedeckung wesentlich höher ist als bei mit DOPA funktionalisierten Partikeln und somit keine Eisenbindungsstellen für die Komplexierung zur Verfügung stehen. Bei den anderen angewendeten Puffern und deren pH-Werte ist kein Einfluss auf die IEP erkennbar.

In Abbildung 5.65 sind die CA-Beladungen nach Behandlungen mit verschiedenen Pufferlösungen bei unterschiedlichen pH-Werten ausgehend von den funktionalisierten Partikeln aufgetragen. Die Ergebnisse wurde aus den HPLC-Messungen im Überstand berechnet. Aus der Abbildung geht hervor, dass der höchste Verlust bei dem niedrigsten pH-Wert von 2,5 auftritt und 44 % beträgt. Jedoch wird dieser Verlust nicht durch die Verschiebung des IEPs bemerkt (vgl. Abb. 5.64 (a)), was an der hohen Beladung der Kaffeesäure liegt. Der Ausgangswert der Beladung beträgt  $4,6 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  und somit löst sich nur ein geringer Teil ab.



**Abbildung 5.65:** Restbelastung CA funktionalisierter Magnetitpartikel bezüglich der Ausgangsprobe nach Stabilitätsuntersuchungen. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA- Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Stabilitätstest erfolgten mit einer Pufferkonzentration von  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  und eine Dauer von 7 Tage.

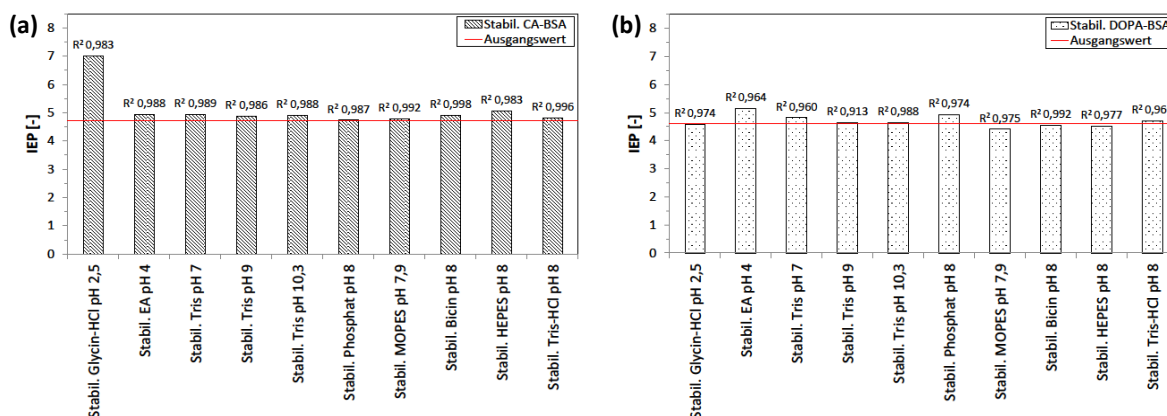
Falls es zu einer mehrschichtigen Anbindung kommt, könnten sich sogar nur die obersten Schichten abgelöst haben, so dass noch die Ladungseigenschaften der Kaffeesäure vorherrschen und nicht die Oberflächeneigenschaften des Magnetits hervortreten. Die anschließende Molekülbelastung liegt nach dem maximalen Verlust bei pH 2,5, d.h. nach der Behandlung mit Glycin-HCl-Puffer, bei  $2,6 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$ , was im oberen Bereich der Molekülbelastung in den bereits genannten anderen Studien ähnlicher Substanzen liegt [112, 257]. Es wird fast ausschließlich im niedrigen pH-Bereich ein Verlust der Kaffeesäure auf den Partikeln nach den Stabilitätsversuchen detektiert.

Insgesamt zeigt sich im neutralen pH-Bereich eine Stabilität bei den Puffern Phosphat, MOPES, Bicin und Tris-HCl. Weiterhin werden nach den Ablösen bei den niedrigen pH-Werten die Oberflächeneigenschaften durch die Kaffeesäure bestimmt, was im FTIR durch die Banden und den IEP der Partikel ersichtlich wird. Eine Anbindung der Trispuffer ist wahrscheinlich auf die eingeführten funktionellen Gruppen der funktionalisierten Substanzen zurückzuführen, welche durch eine anschließenden Immobilisierung nicht mehr verfügbar wären, so dass die Proteinbelastung die Stabilität der Funktionalisierungssubstanz erhöht und die möglichen reaktiven Gruppen vor eine ungewollte Anbindung mit Puffersubstanzen schützen würde. Diese Vermutung wird durch die nachfolgenden Ergebnisse bestärkt.

### 5.2.2 Stabilität der funktionalisierten und proteinbeladenen Partikel

Im Folgenden wird die Stabilität der funktionalisierten und anschließend mit BSA beladenen Partikel untersucht. Dafür sind in Abbildung 5.66 die IEP der behandelten Partikel im Vergleich zu den Ausgangsproben gezeigt. Die IEP der mit CA funktionalisierten und BSA immobilisierten Partikel sind in (a) und die mit DOPA funktionalisierten und BSA beladenen Partikel in (b) nach den Stabilitätsversuchen dargestellt.

Insgesamt fällt auf, dass die IEP der funktionalisierten und BSA immobilisierten Partikel nach der Behandlung sich kaum verändert haben. Hierbei bilden nur die mit CA funktionalisierten und mit BSA beladenen Partikel, die mit Glycin-HCl-Puffer behandelt wurden, eine Ausnahme. Bei ihnen steigt der IEP auf 7 an, was nahe an dem IEP von reinem Magnetit ist. Jedoch müssten sich dann die Kaffeesäure und das BSA von der Partikeloberfläche abgelöst haben. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich der Glycin-HCl-Puffer an die Oberfläche angelagert hat und dadurch den IEP nach oben verschiebt. Glycin verfügt über eine Aminogruppe, welche die positiven Ladungen auf der Oberfläche einführen kann.

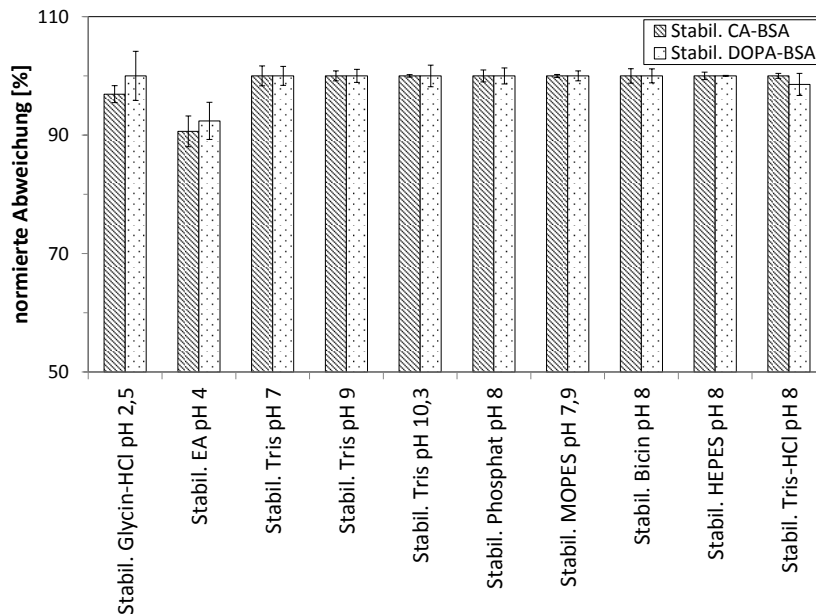


**Abbildung 5.66:** Abweichungen der IEP funktionalisierter und BSA immobilisierter Magnetitpartikel bezüglich der Ausgangsprobe nach den Stabilitätsuntersuchungen. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA/DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Immobilisierung erfolgte 24 h in  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  BSA-Lösung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7. Stabilitätstest erfolgten mit einer Pufferkonzentration von  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  und eine Dauer von 7 Tage.

Die Verschiebungen der IEP liegen bei den mit Kaffeesäure funktionalisierten Partikeln in der Messtoleranz und variieren zwischen 0-0,3. Somit liegt die prozentuale Abweichung zwischen 0-7 %, so dass die Oberflächenladungseigenschaften, abgesehen von der Glycin-HCl-Behandlung bei den anderen Puffern konstant bleiben. Die IEP der Stabilitätsversuche für mit DOPA funktionalisierten und BSA immobilisierte Partikel zeigen keine signifikanten Änderungen und liegen im Bereich von -0,2-0,5, was einer maximalen prozentualen Abweichung von ca. 12 % entspricht, so dass diesbezüglich keine Veränderungen detektiert werden und somit von keiner Oberflächenladungsänderung ausgegangen werden kann. Diese Aussage stimmt auch mit dem Vergleich der FTIR-Spektren überein, da keine neuen Banden detektiert werden und die Bandenintensität bei allen Proben annähernd gleich ist.

In Abbildung 5.67 sind die Restbeladungen nach den unterschiedlichen Behandlungen bezüglich der Ausgangsprobe dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass nahezu keine Verluste hinsichtlich der BSA-Beladung außer bei den niedrigen pH-Werten des EA und Glycin-HCl-Puffers auftreten. Die Ablösung in diesen pH-Bereichen könnte auf die Strukturveränderung des BSAs zurückgeführt werden. Diese Beobachtung wird bei beiden Funktionalisierungssubstanzen gemacht. Der Beladungsverlust bei diesen pH-Werten zur Ausgangsprobe liegt im Bereich von 3-9 %. Allerdings ist der technische Einsatz bei so niedrigen pH-Werten eher unwahrscheinlich, weshalb dies nicht als pro-

blematisch angesehen wird.



**Abbildung 5.67:** Quantitative Proteinrestbeladung des CA/DOPA funktionalisierten Magnetits nach den Stabilitätsversuchen. Die Beladungen wurden bezüglich der Ausgangsprobe normiert. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA/DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Immobilisierung erfolgte 24 h in  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  BSA-Lösung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EA-Puffer bei pH 5,7. Stabilitätstest erfolgten mit einer Pufferkonzentration von  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  und einer Dauer von 7 Tage.

Weiterhin wird ein leichter Proteinverlust von  $1,4 \pm 1,9\%$  bei den mit DOPA funktionalisierten und BSA beladenen Partikeln bei einer Tris-HCl-Behandlung detektiert, der jedoch aufgrund der gleichen Größenordnung der Messabweichung nicht als sicher eingestuft werden kann. Dieser Proteinverlust wird bei den mit CA funktionalisierten und BSA immobilisierten Partikeln nicht gemessen. Bei der BSA-Immobilisierung wird von einer unspezifischen Adsorption ausgegangen, welche mehrfach an den funktionalisierten Partikeln adsorbiert, weshalb für die Desorption bzw. das Ablösen der Partikel alle Bindungen getrennt werden müssen. Deshalb ist diese Bindung so stabil.

Insgesamt wird festgestellt, dass die Partikel durch die Proteinschicht vor weiteren äußeren Einflüssen abgeschirmt werden und somit keine anderen Substanzen mehr an die funktionellen Gruppen binden können. Die mechanische Stabilität/Beständigkeit gegen Abrieb wie z.B. bei dem Einsatz im Rührreaktor, wird als hoch eingestuft, da die Partikel während des Herstellungsverfahrens mehrfach mit Ultraschall behandelt und zahlreichen Zerkleinerungsprozessen (mörsern) unterzogen wurden.

### 5.3 Kovalente Enzymimmobilisierung

Im folgenden Kapitel wird eine Einschätzung über die Eignung der mit CA und DOPA funktionalisierten Magnetitnanopartikel als Immobilisierungsträger exemplarisch mit der Lipase *Candida rugosa* gemacht. Um eine kovalente Enzymimmobilisierung zu erreichen, wurden die funktionellen Gruppen der Funktionalisierungssubstanzen CA

(Carboxylgruppe) und DOPA (Aminogruppe) aktiviert (vgl. Abb. 2.16 und 2.17). Dafür wurden die bereits gängigen Verfahren mittels Glutaraldehyd bei DOPA und Carbodiimid bei CA verwendet (vgl. Kapitel 2.5.1). Vorversuche zeigten, dass die Messung des Zetapotentials sowie FTIR-Messungen keinen bzw. wenig Aufschluss über eine Enzymimmobilisierung zuließen.

Im Falle des Zetapotentials kann das auf die ähnliche Lage des IEPs der funktionalisierten Partikel und des Enzyms ( $IEP = 4,5$  [186, 187]) zurückgeführt werden. Weiterhin ist die Enzymbeladung bei kovalenter Immobilisierung im Vergleich zur BSA-Beladung geringer, da hier eine injizierte Verbindung durch die Kupplungssubstanzen CDI und Glut eingegangen wird und somit unspezifische Adsorptionen vermieden werden. Da im Falle des BSAs eine unspezifische Adsorption mit anschließender Polymerisation auftreten kann (vgl. Kapitel 5.1.8), wird eine geringere Beladung für die kovalent immobilisierten Enzyme erwartet.

Da keine signifikante Verschiebung des IEPs nach der Enzymimmobilisierung detektiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass die Suspensionsstabilität der funktionalisierten, aktivierten und immobilisierten Magnetitnanopartikel nahezu identisch zu denen der funktionalisierten Partikel ist. Jedoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass das Phänomen der stabilisierenden Wirkung bei jeder Proteinbeladung auftritt, da sie z.B. von Konzentration, Oberflächenbedeckung und dem Größenverhältnis von Protein zu Träger sowie den Ladungseigenschaften des Proteins abhängt und somit zu unterschiedlichen Oberflächenladungseigenschaften führt. Dementsprechend kann die Proteinimmobilisierung sowohl zu einer Stabilisierung als auch Destabilisierung der Suspension führen.

Im Falle der BSA-Anbindung (vgl. Kapitel 5.1.2) wird eine Destabilisierung detektiert, was bei Lipase *Candida rugosa* nicht der Fall ist. Die Stabilisierung von proteinbeladenen Trägern kann auf elektrosterischen Wechselwirkungen (vgl. Kapitel 2.4) beruhen [261] und das Agglomerationsverhalten kann in unterschiedliche Mechanismen eingeteilt werden, die vom pH-Wert der Suspension und der Beladung bzw. der Oberflächenbedeckung abhängig sind. Bei niedrigerer Proteinbeladung kann es zu einer direkten Bindung zwischen zwei unbeladenen Stellen der Partikeln kommen, was zu einer Agglomeration der Partikel untereinander führt. Bei einer niedrigeren bis mittleren Proteinbeladung kann es weiterhin zu sogenannten brückenbildenden Verbindungen kommen. Dabei bindet ein immobilisiertes Enzym an eine andere unbeladene Partikeloberfläche. Hierbei handelt es sich um den vorherrschenden Agglomerationsprozess. Nahe dem IEP und bei hohen Proteinbeladungen agglomerierten die proteinbeladenen Partikel in einer direkten Verbindung untereinander zwischen zwei immobilisierten Proteinmolekülen verschiedener Partikel [262].

Die FTIR-Spektren weisen im Vergleich zur adsorptiven BSA-Immobilisierung geringe Bandenhöhen und Überlagerungen der Schwingungen der verschiedenen Substanzen auf, was auf die geringere Beladung zurückzuführen ist. Im Wesentlichen wird die Eignung als Enzymträger mittels einer Aktivitätsmessung des Immobilisats realisiert, was auch für den technischen Einsatz von erheblichem Interesse ist. Der Proteintest nach Bradford wird als sehr ungenau für die Bestimmung der Enzymmenge auf dem Träger

erachtet, was an der Reaktion des Farbstoffes mit dem Enzym liegt (vgl. Kapitel 3.2.8).

Weitere Vorversuche zeigten, dass die Enzymanbindung bei 25 °C eine sehr geringe Restaktivität zwischen 1-3% zeigte, weshalb anschließende Versuche bei 4 °C durchgeführt wurden. Diese Beobachtung wurde auch von anderen wie. z.B. Koneracka et al. und Chen et al. gemacht [42, 263].

Die Restaktivitäten der beiden immobilisierten, CDI und Glut aktivierten und mit CA und DOPA funktionalisierten Magnetitpartikel im Bezug zur Aktivität des nativen Enzyms weisen ähnliche Werte auf, die bei mit CA funktionalisierten Partikeln  $20 \pm 1\%$  und bei mit DOPA funktionalisierten Partikeln bei  $24 \pm 1\%$  liegen. Ein Aktivitätsverlust der Enzyme bei einer kovalenten Immobilisierung ist häufig zu beobachten [42] und wurde bei diesen Versuchen erwartet, da es sich nicht um optimierte Enzymimmobilisierungen handelt.

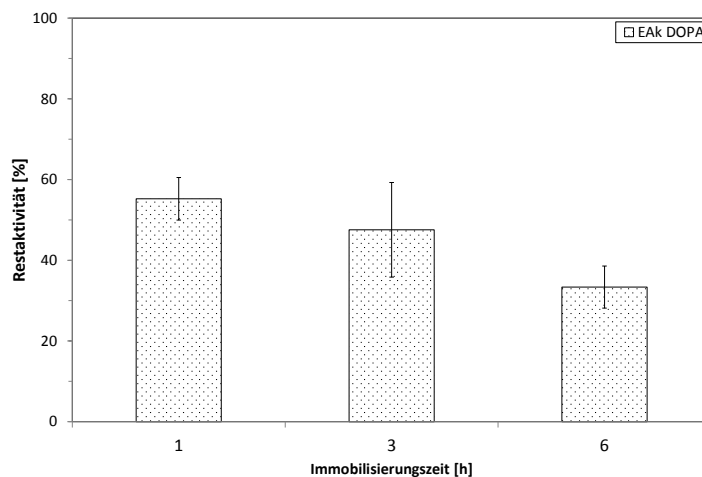
Der Aktivitätsverlust beträgt ca. 80% und kann auf eine Vielzahl von Eigenschaftsänderungen des Enzyms in Folge der Immobilisierung zugeführt werden. Meistens wird der Aktivitätsverlust aufgrund von Veränderungen der Konformation des aktiven Zentrums hervorgerufen, wodurch eine geringere Substrataffinität und -zugänglichkeit resultiert. Das aktive Zentrum kann z.B. durch den Träger verdeckt sein und dadurch dem Substrat nicht mehr für die Katalyse zur Verfügung stehen. In diesem Zusammenhang spricht man von sterischen Problemen. Eine andere Möglichkeit ist, dass das aktive Zentrum zwar frei zugänglich ist, aber durch die Bindung des Trägers seine Konformation verändert hat und dadurch die katalytische Wirkung eingeschränkt. Weiterhin wurde auch festgestellt, dass, wenn eine Anbindung nicht direkt am aktiven Zentrum stattfindet aber andere Reste des Enzyms involviert sind, es auch zu einer verminderten Aktivität kommen kann.

Anhand dieser Einschränkungen erkennt man, dass eine Vielzahl von Interaktionen von Träger und Enzym einen bedeutenden Einfluss auf die Aktivität und die damit erfolgreiche Immobilisierung haben. So sind die Entfernung des Proteins zum aktiven Zentrum, Wechselwirkungen zwischen Träger und Enzym und Eigenschaften der Verbindungsmoleküle von erheblicher Bedeutung [6, 42, 165, 231, 264]. Durch eine Immobilisierung können sich weitere physikalische sowie chemische Eigenschaften des Enzyms verändern, was in einer höheren Aktivierungsenergie der Umsetzung des Substrates resultieren kann [58]. In anderen Veröffentlichungen (z.B. [58, 265]) wurde auch von einer Veränderung des Aktivitätsoptimums der immobilisierten Enzyme hinsichtlich pH-Wert und Temperatur berichtet, so dass höhere Aktivitäten bei anderen Bedingungen möglich sind. Aktivitätsverluste können auch auf Partikelagglomerationen beruhen [55].

Vergleicht man die beiden Substanzen CDI und Glut (vgl. Kapitel 2.5.1) ist ein Unterschied hinsichtlich ihrer Aktivierung erkennbar. So führt Glut im Vergleich zu CDI fünf Kohlenstoffe ein, kann somit auch als Spacer agieren und arrangiert das Enzym in einer flexibleren Lage bezüglich des Trägers, wodurch sterische Hinderungen minimiert werden [56, 255]. Jedoch wirkt sich die größere Bewegungsfreiheit nicht merklich auf eine höhere katalytische Aktivität aus (ca. 3%). Wahrscheinlich ist der Einfluss der

flexibleren Lage des Enzyms bei diesen Versuchsparametern gering, weil die Prozessbedingungen wohl eher über die Aktivität entscheiden, da sie noch nicht ideal sind. So wurde exemplarisch der Versuchsparameter der Immobilisierungszeit für die beiden funktionalisierten und aktivierten Partikel variiert, um einen ersten Eindruck für mögliche Optimierungen zu bekommen.

In Abbildung 5.68 ist die Restaktivität nach der Immobilisierung von Lipase *Candida rugosa* an mit DOPA funktionalisierten und Glut aktivierten Magnetitpartikeln aufgetragen. Es ist eine Abhängigkeit der Immobilisierungszeit erkennbar. Mit kürzerer Immobilisierungszeit nimmt die Restaktivität verglichen mit dem nativen Enzym zu. Sie beträgt nach 6 h  $33 \pm 5\%$ , wogegen das Immobilisat nach 1 h noch  $55 \pm 5\%$  aufweist. Eine Möglichkeit wäre, dass sich mit längerer Immobilisierungszeit eine mehrschichtige, unspezifische Enzymanbindung an den bereits angebondenen Enzymen ergeben könnte und dadurch die Enzymaktivität reduziert wird, da diese unspezifische Adsorption zu einer stärkeren Veränderung des aktiven Zentrums aufgrund von Konformation oder sterischer Hinderung führt.

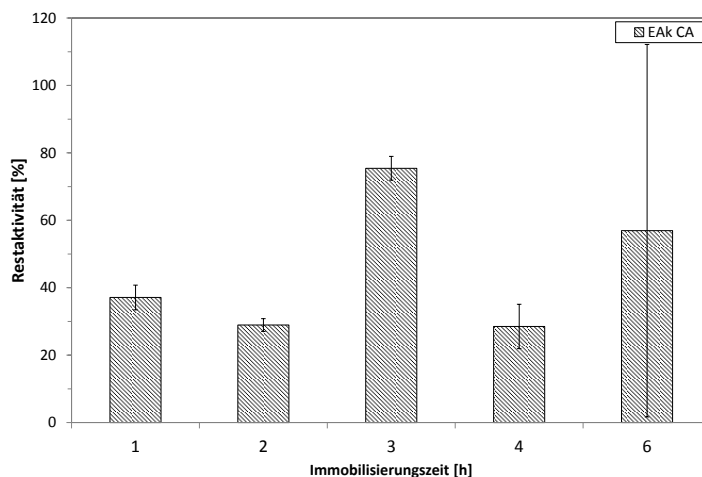


**Abbildung 5.68:** Restaktivität des Immobilisats der DOPA funktionalisierten Magnetitnanopartikel bezüglich des nativen Enzyms und der Einfluss der Immobilisierungsdauer. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DOPA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Für die Aktivierung wurde Glut mit der Konzentration von 1,25 Gew.-% in Wasser für 24 h in Reaktion gebracht. Immobilisierung erfolgte in  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  Lipase *Candida rugosa*-Lösung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Na-Phosphatpuffer-Puffer bei pH 8. Die Temperatur während der Immobilisierung betrug  $4^\circ\text{C}$ .

Ein anderes Bild der Restaktivität in Abhängigkeit der Immobilisierungszeit zeigt sich bei den mit CA funktionalisierten und CDI aktivierten Partikeln (vgl. Abb. 5.69). Hier ist kein Zusammenhang zwischen der Restaktivität und der Immobilisierungszeit ersichtlich, was durch zwei weitere Versuche mit unterschiedlichen Zeiten bestätigt wird. Die höchste Restaktivität von  $75 \pm 4\%$  wird nach einer Immobilisierungszeit von 3 h erreicht, dagegen liegen die anderen Werte in einem Bereich von 28 – 37% ausgenommen des 6 h Versuches. Dieses abweichende Verhalten kann auf die unterschiedlichen Funktionalisierungs- und Aktivierungssubstanzen zurückgeführt werden, die einen Einfluss auf die Konformation des aktiven Zentrums haben.

Das aktive Zentrum der Lipase *Candida rugosa* besteht aus einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin, Glutamat und besitzt einen „Deckel“, welcher das

aktive Zentrum schützt [266]. Möglicherweise ist die Affinität der Lipase *Candida rugosa* gegenüber den mit CA funktionalisierten und CDI aktivierten Partikeln geringer, weshalb die Enzymbindungsreaktion im Vergleich zu denen mit DOPA funktionalisierten und Glut aktivierten Partikeln langsamer verläuft, die Anbindung aber weniger die Konformation des aktiven Zentrums beeinflusst, so dass eine erhöhte Aktivität erreicht wird. Jedoch scheint auch hier eine längere Immobilisierungszeit nach Erreichen des Maximums zu einer Verringerung der Aktivität zu führen, was wiederum auf nicht optimale Anbindungsbedingungen hindeutet. Weiterhin wurde auch in der Literatur festgestellt, dass unterschiedliche Enzyme am gleichen Immobilisat zu unterschiedlichen Aktivitäten führen [42].



**Abbildung 5.69:** Restaktivität des Immobilisats der CA funktionalisierten Magnetitnanopartikel bezüglich des nativen Enzyms und der Einfluss der Immobilisierungsdauer. Funktionalisierung erfolgte 24 h in  $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  CA-Lösung bei pH 7 in  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Trispuffer. Magnetitkonzentration betrug  $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Für die Aktivierung wurde CDI mit einer Konzentration  $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in  $0,003 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Kaliumphosphat bei pH 6 für 24 h in Reaktion gebracht. Immobilisierung erfolgte in  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  Lipase *Candida rugosa*-Lösung in  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Na-Phosphatpuffer-Puffer bei pH 8. Die Temperatur während der Immobilisierung betrug  $4^\circ \text{C}$ .

Im Folgenden werden kurz die bereits erreichten Erfolge der Immobilisierung an magnetischen Trägern aufgezeigt und anschließend im Kontext zu den hier erzielten Ergebnissen gestellt. So wurde z.B. mittels Direktimmobilisierung über eine kovalente Enzymbindung von Alkoholdehydrogenase (YADH) mittels CDI eine Restaktivität des Enzyms von 62 % erreicht. Des Weiteren ergab sich eine zehnfach bessere Stabilität verglichen zum freien Enzym. Ein Aktivitätsverlust nach dreizehn Wiederverwendungen innerhalb von 2 h war nicht signifikant [263]. Auch Kouassi et al. haben eine Direktimmobilisierung mit CDI und Thiophenacetylierung durchgeführt und eine Steigerung der Enzymstabilität nach der Immobilisierung bemerkt. Die Bindungseffizienz lag zwischen 66-100 % je nach Aktivierungssubstanz [267]. Wang et al. haben Lipase mittels Glut an amino-funktionalisierten Nanopartikeln immobilisiert. Es wurden ca. 80 % der Enzyme angebunden, deren Restaktivität 70 % des freien Enzyms betrug [268]. Eine andere Forschergruppe hat Lipase *Candida rugosa* an ferromagnetischen modifizierten Dacron-Trägern immobilisiert und Restaktivitäten von 16 % bei der Umsetzung von p-NPP und 24 % bei der Hydrolyse von Triolin in Hexan detektiert [269]. Die kovalente Immobilisierung von Glucoamylase mittels Polymethylmethacrylat als Spacer unter

Verwendung der Kupplungssubstanzen CDI oder Bromcyan haben eine Aktivität von 57 % für die CDI-Kupplung und 73 % für die CNBr-Kupplung ergeben [264]. Bayramoglu und Arica haben eine Restaktivität von 81 % bei der Immobilisierung einer Lipase an modifizierten Glycidyl Methacrylaten und Methacrylsäuremethylestern unter einer Aktivierung mit Glut erreicht [270]. Im Vergleich mit den genannten Ergebnissen anderer Immobilisierungen an magnetischen Trägern zeigen die ersten Versuche eine gute Restaktivität auf, müssen aber für den Einsatz als Enzymträger noch weiter hinsichtlich ihrer Kinetik sowie der Lagerungs- und Betriebsstabilität der Enzyme getestet werden.

Insgesamt konnte eine Aktivität des Enzyms Lipase *Candida rugosa* auf beiden funktionalisierten und aktivierten Magnetitnanopartikeln festgestellt werden und eine erste maximale Restaktivität von bis zu 75 % der mit CA funktionalisierten und CDI aktivierten Partikel gemessen werden. Erste Versuchsreihen zeigen, dass die unterschiedlich funktionalisierten und aktivierten Partikel zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, die bisher noch nicht eindeutig erklärt werden können.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Oberflächenmodifikation magnetischer Nanopartikel für den Einsatz als Enzymträger wurde in dieser Arbeit untersucht. In Anlehnung an die Bionik und vorherige Funktionalisierungsmethoden mit Polymeren wurden phenolische Substanzen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen ausgewählt und ihr Einfluss auf das Bindungsverhalten an Magnetit untersucht. Bei den Substanzen handelt es sich um das Redoxsystem Benzo-/Hydrochinon, welches eine para-Stellung der Hydroxylgruppen am aromatischen Ring aufweist sowie die Substanzen Kaffeesäure, DOPA und Dopamin, bei denen die Hydroxylgruppen am aromatischen Ring in ortho-Stellung angeordnet sind. Zusätzlich wird Gallussäure mit drei Hydroxylgruppen in ortho- und meta-Stellung auf eine Anbindung getestet.

Grundsätzlich konnte bei allen Funktionalisierungssubstanzen eine Anbindung nachgewiesen werden. Bei den Substanzen wird festgestellt, dass sich bei einigen eine pH-Abhängigkeit hinsichtlich der Anbindung an die Magnetitpartikel zeigt. Bei ihnen ist eine bessere Anbindung im neutralen pH-Bereich zu detektieren, was am IEP von reinem Magnetit liegt. Trotz löslichkeitsbedingter unterschiedlicher Konzentrationen liegen die Absorptionsintensitäten der FTIR-Banden der verschiedenen Substanzen auf ähnlichem Niveau. Dies könnte auf eine Limitierung der Bindungsstellen hindeuten, was eine spezifische Adsorption wahrscheinlich macht.

Bei Benzo-/Hydrochinon sowie bei der Gallussäure wird eine geringere Bindungsstabilität festgestellt. Dagegen sind bei den Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen (CA, DOPA, Dopamin) in ortho-Stellung die Bindungen stabiler. Diese Beobachtung weist auf unterschiedliche Bindungsmechanismen hin und lässt die Annahme zu, dass die Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung eine zweizählige Bindung ausbilden. Verglichen mit einer einzähligen Bindung, die vom Redoxsystem Benzo-/Hydrochinon eingegangen wird, ist eine solche zweizählige Bindung wesentlich stabiler. Durch die Detektion der Schwingung der Hydroxylgruppen der mit Hydrochinon und Benzochinon funktionalisierten Magnetitpartikel im FTIR-Spektrometer wird diese Beobachtung bestätigt. Die instabile Anbindung der Gallussäure basiert auf sterischen Hinderungen zwischen den drei Hydroxylgruppen am aromatischen Ring und der Magnetitoberfläche.

Weiterhin wird durch die Funktionalisierung die Suspensionsstabilität im neutralen pH-Bereich erhöht. Dieses wird durch die Verschiebung des IEPs von reinem Magnetit von pH 7,3 auf ca. pH 3-4 und der damit verbundenen Erhöhung des Zetapotentials erreicht. Ein Einfluss auf die innere Kristallgitterstruktur in Folge der Funktionalisierung konnte nicht festgestellt werden, weshalb eine Oxidation des Magnetits ausgeschlossen wird. Die kristallinen und die damit verbundenen magnetischen Eigenschaften bleiben erhalten. Abweichungen, die aus Veränderungen der Kristalloberfläche z.B. durch

Oxidation resultieren, können allerdings nicht ausgeschlossen werden. Bei allen Proben wird ein magnetisches Verhalten durch einen Permanentmagneten nachgewiesen und die Funktionalisierung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Partikelgröße und die Gitterkonstante.

Bei der Proteinimmobilisierung von BSA an den Partikeln ist eine erhöhte Proteinbeladung bei einem pH-Wert von 5,7 detektiert worden, was auf den Wert des IEPs des BSA zurückzuführen ist. Die Höhe der Proteinbeladung unterscheidet sich je nach Funktionalisierungssubstanz. So ist auffällig, dass nur bei Partikeln mit Funktionalisierungssubstanzen mit zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung die Proteinbeladung höher liegt als bei reinen Magnetitpartikel. Dagegen weisen die Substanzen mit zwei Hydroxylgruppen in para-Stellung bzw. mit drei Hydroxylgruppen am aromatischen Ring geringere Beladungen auf. Die höchste Beladung wird bei mit Kaffeesäure funktionalisierten Partikeln in einem pH-Bereich von 4-7 mit  $0,71 - 0,77 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mg}_{\text{Magnetit}}^{-1}$  erreicht. Die Anbindung des BSAs beruht auf einer unspezifischen Adsorption. Deshalb mussten für eine kovalente Enzymimmobilisierung die funktionellen Gruppen der Funktionalisierungssubstanzen mit CDI und Glutaraldehyd aktiviert werden, um eine entsprechende Anbindung zu erzielen.

Die Proteinimmobilisierung mit BSA injiziert eine Partikelagglomeration, welche vom Grad der Beladung abhängig ist. Dadurch verringert sich die Suspensionsstabilität im neutralen pH-Bereich, welche jedoch im Vergleich mit reinem, unbehandeltem Magnetit immer noch höher ist. Durch die vorangegangene Funktionalisierung konnte die Suspensionsstabilität auch der proteinbeladenen Partikel erhöht werden, jedoch änderten sich die Ladungsverhältnisse der Oberfläche. Daraus wird ersichtlich, dass die Oberflächencharakteristika durch die funktionalisierende bzw. immobilisierende Substanz bestimmt werden und die magnetischen Eigenschaften ausschließlich vom Magnetitkern stammen. Eine Strukturveränderung des Trägermaterials durch die Proteinanbindung kann ausgeschlossen werden.

Da Kaffeesäure und DOPA sehr gute Ergebnisse in Hinblick auf die Eignung als Funktionalisierungssubstanz für Magnetit als Enzymträger zeigten, wurden diese genauer auf ihr Anbindungsverhalten und ihre chemische Stabilität getestet. Dabei zeigte sich, dass die funktionellen Gruppen am aromatischen Ring einen erheblichen Einfluss auf die Anbindung der beiden Verbindungen an den Magnetit haben. So zeigen die beiden Substanzen bei der Funktionalisierung ein gegensätzliches temperaturabhängiges Verhalten. Es wurde die höchste DOPA-Beladung bei einer Temperatur von  $60^\circ\text{C}$  mit einer durchschnittlichen Beladung von  $8,8 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  erreicht. Dagegen verzeichnet Kaffeesäure die höchste Beladung von  $5,3 \text{ Moleküle} \cdot \text{nm}^{-2}$  bei einer Anbindung bei  $25^\circ\text{C}$ .

Die Erhöhung der Sublimationstemperatur in den thermogravimetrischen Analysen bei den mit Kaffeesäure funktionalisierten Partikeln deutet auf eine stärkere Bindung zwischen Funktionalisierungssubstanz und Partikel im Vergleich zu denen mit DOPA funktionalisierten Partikeln hin. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass Kaffeesäure eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit bzw. Adsorptionsaffinität im Vergleich zu DOPA hat, da die Sättigungskonzentration unter Annahme gleicher Anbindungswahrschein-

lichkeiten schneller erreicht wird.

Die mit CA und DOPA funktionalisierten Magnetitnanopartikel sind im neutralen pH-Bereich beim Einsatz verschiedener Puffer stabil. Ein Teil der Moleküle löst sich bei niedrigen pH-Werten ab, jedoch bleiben die Oberflächenladungseigenschaften und die Suspensionsstabilität unverändert. Die funktionalisierten Partikel weisen nach dem maximalen Verlust im sauren Milieu bei pH 2,5 immer noch eine durchschnittliche Molekülbeladung von 2,6 Moleküle  $\cdot$  nm<sup>-2</sup> auf. Eine anschließende Proteinbeladung stabilisiert die Funktionalisierungssubstanz. Die so modifizierten Partikel bleiben auch nach Zerkleinerung und Ultraschallbehandlung stabil.

Eine Eignung der mit CA und DOPA funktionalisierten Magnetitpartikel als Enzymträger wird exemplarisch mit dem Enzym Lipase *Candida rugosa* gezeigt, welches eine sehr gute Restaktivität von bis zu 55 % bei den mit DOPA funktionalisierten und Glutaraldehyd aktivierten Partikeln und sogar 75 % bei den mit CA funktionalisierten und CDI aktivierten Partikeln bei einer Immobilisierungstemperatur von 4 °C aufweist. Weiterhin wird kein nennenswerter Einfluss auf die Oberflächenladungseigenschaften bzw. die Suspensionsstabilität im Zuge der Enzymimmobilisierung festgestellt, was auf die ähnlichen Werte der IEP der funktionalisierten Partikel und der Enzyme zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Aufgabenteile dieser Arbeit erfolgreich abgeschlossen worden sind. Der materialwissenschaftliche Teil bildet den Schwerpunkt und das Ziel einer Oberflächenfunktionalisierung magnetischer Magnetitnanopartikel mit gleichzeitiger Suspensionsstabilisierung wird erreicht, welche eine Beschichtungssowie Suspensionsstabilität bei neutralen pH-Werten zeigt. Dadurch wird ein Einsatz vor allem der mit CA und DOPA modifizierten Träger in enzymatisch katalysierten Prozessen ermöglicht. Im abschließenden biochemischen Teil wird exemplarisch mit dem Beispielenzym Lipase *Candida rugosa* die Eignung der funktionalisierten Magnetitnanopartikel als Enzymträger getestet. Die maximale Restaktivität des immobilisierten Enzyms liegt bei einer Anbindung an den mit CA funktionalisierten und CDI aktivierten Partikeln bei 75 %, was als großer Erfolg zu bewerten ist.

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit haben sich interessante Anhaltspunkte für weitere Forschungen ergeben, die sich mit dem Träger, der Funktionalisierung und Immobilisierung beschäftigen. Eine weitere Optimierung des Trägermaterials hinsichtlich Partikelgröße, -form, -verteilung und -reinheit ist von Bedeutung und damit verbunden die unterschiedlichen Synthesewege des Trägermaterials, so dass z.B. der Einfluss von oberflächenaktiven Substanzen und Lösungsmitteln auf eine anschließende Funktionalisierung untersucht werden sollte.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist eine Modifikation des Trägermaterials selbst, z.B. durch Einführung weiterer Oberflächenhydroxylgruppen, da diese für die Anbindung der Funktionalisierungssubstanzen verantwortlich gemacht werden. Dazu könnte z.B. ein sternförmiges Aufwachsen von Goethit auf der Magnetitoberfläche untersucht werden. Durch die vermehrte Einführung von Hydroxylgruppen kann es jedoch zur sterischen Behinderung der Funktionalisierungsmoleküle untereinander kommen. Eine Verbesse-

rung der magnetischen Eigenschaften kann wahrscheinlich durch den Einsatz von Ferri-ten bzw. mit dotiertem und modifiziertem Magnetit realisiert werden, welcher auf ihre Eignung als Trägermaterial geprüft werden müsste.

Bei der Funktionalisierung sind weitere Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Substituenten am aromatischen Ring für das Verständnis der Anbindung bedeutend. Hierfür wären direkt zugeschnittene und selbst dargestellte Funktionalisierungssubstanzen basierend auf den jetzigen Ergebnissen hilfreich, um genauere Analysen hinsichtlich der Bindungsmechanismen und deren Struktureinflüsse auch in Abhängigkeit der  $pK_s$ -Werte zu untersuchen. Dies könnte auch zur Aufklärung der Bindungsstärke beitragen.

Weiterhin wäre eine IR-Spektrometrie im nahen Infrarotbereich hilfreich, da Phenole üblicherweise noch über Absorptionsbanden zwischen 200-360 nm [271] verfügen und in diesem Bereich auch Unterschiede zwischen der Kristallstruktur des Magnetits und Maghemits [257] zu detektieren sind.

Des Weiteren ist zu untersuchen, ob möglicherweise durch den Einsatz einer Thiolgruppe zur Immobilisierung die Enzymaktivität erhöht werden kann. Die Untersuchung der Immobilisierung weiterer Enzyme an den funktionalisierten Partikeln ist in Hinblick auf Enzymkinetik und Aktivität von großem Interesse.

Es könnte auch die Verwendung langkettiger Moleküle, sogenannten Abstandhaltern (engl. Spacer), erwogen werden, durch die die Aktivität der Enzyme durch Unterbindung sterischer Hindernisse gesteigert werden kann. Die Bestimmung von Sättigungskonzentrationen des jeweiligen aktiven Proteins wären förderlich, um einer durch die Proteinimmobilisierung induzierten erhöhten Agglomeration vorzubeugen. Auch Informationen hinsichtlich der Anbindung des Enzyms an das Trägermaterial und der Einfluss auf die Mikroumgebung und die damit verbundene Stabilitäts- und Effektivitätseffekte sind in nachfolgenden Forschungsarbeiten von Interesse.

Eine weitere Herausforderung ist die stabile Lagerung der funktionalisierten als auch immobilisierten Partikel. Die magnetischen Eigenschaften der Partikel sind für die Anwendung von enormer Bedeutung, weshalb der Erhalt der magnetischen Eigenschaften im Zuge der Funktionalisierung und Immobilisierung mittels Aufnahme von Hysteresekurven überprüft werden muss.

In der Prozessrealisierung liegen weitere Herausforderungen für den industriellen Einsatz von magnetischen Nanoträgern in enzymatisch katalysierten Prozessen. Auch der Einsatz dieser funktionalisierten Partikel für andere Anwendungsgebiete wie z.B. Zell-, Protein- und DNA-Separation oder in der gezielten Pharmakokinetik kann getestet und angepasst werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] BEHR, A.: *Angewandte homogene Katalyse*. Weinheim : Wiley-VCH, 2008
- [2] BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG: *Weißer Biotechnologie: Chancen für eine bio-basierte Wirtschaft*. Bonn and Berlin : Druck Vogt GmbH, 2012
- [3] CARRERA, G. ; RIVA, S.: Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese. In: *Angewandte Chemie* 112 (2000), S. 2312–2341
- [4] SCHULTZ, N. ; SYLDATK, C. ; FRANZREB, M.: Integrated processing and multiple re-use of immobilised lipase by magnetic separation technology. In: *Journal of Biotechnology* 132 (2007), S. 202–208
- [5] ZINKE, H.: Nachhaltiger industrieller Trend oder nur ein Strohhalm? In: *Transkript* 13 (2007), S. 86–88
- [6] ANSARI, S. ; HUSAIN, Q.: Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. In: *Biotechnology Advances* 30 (2012), S. 512–523
- [7] FRANZREB, M.: Magnetseparation im Dienste der Biotechnologie. In: *Nachrichten Forschungszentrum Karlsruhe* 35 (2003), S. 117–122
- [8] SCHULTZ, N. ; HOBLEY, T. ; SYLDATK, C.: Spectrophotometric assay for online measurement of the activity of lipase immobilised on micro-magnetic particles. In: *Biotechnology Letters* 29 (2007), S. 365–371
- [9] SHYLESH, S. ; SCHÜNEMANN, V. ; THIEL, W.: Magnetisch abtrennbare Nanokatalysatoren: Brücken zwischen homogener und heterogener Katalyse. In: *Angewandte Chemie* 122 (2010), S. 3504–3537
- [10] HUANG, S. ; LIAO, M. ; CHEN, D.: Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. In: *Biotechnology Progress* 19 (2003), S. 1095–1100
- [11] LU, A. ; SALABAS, E. ; SCHÜTH, F.: Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. In: *Angewandte Chemie - International Edition* 46 (2007), S. 1222–1244
- [12] BASTI, H. ; BEN TAHAR, L. ; SMIRI, L. ; HERBST, F. ; VAULAY, M. ; CHAU, F. ; AMMAR, S. ; BENDERBOUS, C.: Catechol derivatives-coated  $Fe_3O_4$  and  $\gamma-Fe_2O_3$  nanoparticles as potential MRI contrast agents. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 341 (2010), S. 248–254

- [13] PETRI-FINK, A. ; CHASTELLAIN, M. ; JUILLERAT-JEANNERET, L. ; FERRARI, A. ; HOFMANN, H.: Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. In: *Biomaterials* 26 (2005), S. 2685–2694
- [14] CORNELL, R. ; SCHWERTMANN, U.: *The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrence and uses*. Weinheim : Wiley-VCH, 1996
- [15] BRANDT, J. ; ANDERSSON, L. ; PORATH, J.: Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 386 (1975), S. 196–202
- [16] HOLTEN-ANDERSEN, N. ; WAITE, J.: Mussel-designed protective coatings for compliant substrates. In: *Journal of Dental Research* 87 (2008), S. 701–709
- [17] WILKER, J.: Das eisenverstärkte HaftsysteM von Meeresmuscheln. In: *Ange wandte Chemie* 122 (2010), S. 8252–8254
- [18] SCHUBERT, U.: Die Rolle der Chemie in der Nanotechnologie. In: *Chemie in unserer Zeit* 39 (2005), S. 3
- [19] SCHMID, G.: Metallnanopartikel als Einelektronenschalter: Nanotechnologie: Schlüsseltechnologie des neuen Jahrhunderts? In: *Chemie in unserer Zeit* 39 (2005), S. 8–15
- [20] GUIMARÃES, A.: *Principles of Nanomagnetism*. Berlin : Springer, 2009
- [21] NAGARAJAN, R. (Hrsg.): *ACS symposium series*. Bd. 996: *Nanoparticles: Synthesis, stabilization, passivation, and functionalization ; [Symposium Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization held at the 233rd American Chemical Society (ACS) meeting in Chicago, Illinois on March 25-29, 2007]*. Washington and DC : American Chemical Soc., 2008
- [22] DICKERSON, R. ; SICHTING, H.: *Prinzipien der Chemie*. Berlin : Walter de Gruyter, 1988
- [23] GOSSAUER, A.: *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle: Eine Einführung in die organische Chemie*. Zürich : Verl. Helvetica Chimica Acta, 2006
- [24] SEPEUR, S.: *Nanotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*. Hannover : Vincentz Network, 2008
- [25] MORALES, M. ; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S. ; MONTERO, M. ; SERNA, C. ; ROIG, A. ; CASAS, L. ; MARTÍNEZ, B. ; SANDIUMENGE, F.: Surface and internal spin canting in  $\gamma - Fe_2O_3$  nanoparticles. In: *Chemistry of Materials* 11 (1999), S. 3058–3064
- [26] KITTEL, C. ; GRESS, J. ; LESSARD, A.: *Einführung in die Festkörperphysik*. München : Oldenbourg, 1999

- [27] LUDWIG, F. ; HEIM, E. ; SCHILLING, M.: Characterization of superparamagnetic nanoparticles by analyzing the magnetization and relaxation dynamics using fluxgate magnetometers. In: *Journal of Applied Physics* 101 (2007), S. 113909 (10 Seiten)
- [28] MA, M. ; ZHANG, Y. ; WEI, Z. ; SHEN, H. ; ZHANG, H. ; GU, N.: Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. In: *Colloids and Surfaces A* 212 (2003), S. 219–226
- [29] SCHWARZ, J. ; CONTESCU, C. ; PUTYERA, K.: *Dekker encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*. New York : Dekker, 2004
- [30] LANG, C. ; SCHÜLER, D. ; FAIVRE, D.: Synthesis of magnetite nanoparticles for bio- and nanotechnology: Genetic engineering and biomimetics of bacterial magnetosomes. In: *Macromolecular Bioscience* 7 (2007), S. 144–151
- [31] KOBAYASHI, H. ; MATSUNAGA, T.: Amino-silane modified superparamagnetic particles with surface-immobilized enzyme. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 141 (1991), S. 505–511
- [32] YONG, Y. ; BAI, Y. ; LI, Y. ; LIN, L. ; CUI, Y. ; XIA, C.: Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 320 (2008), S. 2350–2355
- [33] HU, A. ; YEE, G. ; LIN, W.: Magnetically recoverable chiral catalysts immobilized on magnetite nanoparticles for asymmetric hydrogenation of aromatic ketones. In: *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005), S. 12486–12487
- [34] HAJDÚ, A. ; TOMBÁ CZ, E. ; ILLÉS, E. ; BICA, D. ; VÉKÁS, L.: Magnetite nanoparticles stabilized under physiological conditions for biomedical application. In: *Progress in Colloid and Polymer Science* 135 (2008), S. 29–37
- [35] XU, C. ; XU, K. ; GU, H. ; ZHENG, R. ; LIU, H. ; ZHANG, X. ; GUO, Z. ; XU, B.: Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), S. 9938–9939
- [36] GUARDIA, P. ; BATLLE-BRUGAL, B. ; ROCA, A. ; IGLESIAS, O. ; MORALES, M. ; SERNA, C. ; LABARTA, A. ; BATLLE, X.: Surfactant effects in monodisperse magnetite nanoparticles of controlled size. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 316 (2007), S. 756–759
- [37] IIDA, H. ; TAKAYANAGI, K. ; NAKANISHI, T. ; OSAKA, T.: Synthesis of  $Fe_3O_4$  nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 314 (2007), S. 274–280
- [38] SUN, S. ; ZENG, H.: Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. In: *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002), S. 8204–8205
- [39] KANG, Y. ; RISBUD, S. ; RABOLT, J. ; STROEVE, P.: Synthesis and characterization of nanometer-size  $Fe_3O_4$  and  $\gamma-Fe_2O_3$  particles. In: *Chemistry of Materials* 8 (1996), S. 2209–2211

- [40] CHOI, J. ; LEE, J. ; LEE, Y. ; HONG, J. ; KIM, I. ; PARK, Y. ; HUR, N.: Immobilization of biomolecules on biotinylated magnetic ferrite nanoparticles. In: *Chemical Physics Letters* 428 (2006), S. 125–129
- [41] SUBAGYO, A. ; SUEOKA, K.: Correlation between surface structure and charge ordering in magnetite (001) studied by scanning tunneling microscopy and spectroscopy. In: *Journal of Physics: Conferenz Series* 61 (2007), S. 1102–1106
- [42] KONERACKÁ, M. ; KOPČANSKÝ, P. ; TIMKO, M. ; RAMCHAND, C. ; SEQUEIRA, A. de ; TREVAN, M.: Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. In: *Journal of Molecular Catalysis B* 18 (2002), S. 13–18
- [43] HUANG, H. ; CHEN, D.: Rapid removal of heavy metal cations and anions from aqueous solutions by an amino-functionalized magnetic nano-adsorbent. In: *Journal of Hazardous Materials* 163 (2009), S. 174–175
- [44] WILLIAMS, R. ; PIETERS, B. ; WEBB, C.: Process engineering of magnetic immobilization systems for enzyme reactors and effluent treatment. In: WILLIAMS, R. (Hrsg.): *Colloid and surface engineering*. 1992, S. 287–333
- [45] JUN, Y. ; LEE, J. ; CHEON, J.: Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. In: *Angewandte Chemie - International Edition* 47 (2008), S. 5122–5135
- [46] KIM, D. ; ZHANG, Y. ; VOIT, W. ; RAO, K. ; KEHR, J. ; BJELKE, B. ; MUHAMMAD, M.: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bio-medical applications. In: *Scripta Materialia* 44 (2001), S. 1713–1717
- [47] MORNET, S. ; GRASSET, F. ; PROTIER, J. ; DUGUET, E.: Maghemite@silica nanoparticles for biological applications. In: *European Cells and Materials* 3 (2002), S. 110–113
- [48] ILLUM, L. ; CHURCH, A. ; BUTTERWORTH, M. ; ARIEN, A. ; WHETSTONE, J. ; DAVIS, S.: Development of systems for targeting the regional lymph nodes for diagnostic imaging: In vivo behaviour of colloidal PEG-coated magnetite nanospheres in the rat following interstitial administration. In: *Pharmaceutical Research* 18 (2001), S. 640–645
- [49] CHENG, F. ; SU, C. ; YANG, Y. ; YEH, C. ; TSAI, C. ; WU, C. ; WU, T. ; SHIEH, D.: Characterization of aqueous dispersions of  $Fe_3O_4$  nanoparticles and their biomedical applications. In: *Biomaterials* 26 (2005), S. 729–738
- [50] PANKHURST, Q. ; CONNOLLY, J. ; JONES, S. ; DOBSON, J.: Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. In: *Journal of Physics D* 36 (2003), S. R167–R181
- [51] RUDGE, S. ; KURTZ, T. ; VESSELY, C. ; CATTERALL, L. ; WILLIAMSON, D.: Preparation, characterization, and performance of magnetic iron-carbon composite microparticles for chemotherapy. In: *Biomaterials* 21 (2000), S. 1411–1420
- [52] BERRY, C. ; CURTIS, A.: Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. In: *Journal of Physics D* 36 (2003), S. 198–206

- [53] CHEN, Z. ; SUN, Y. ; HUANG, P. ; YANG, X. ; ZHOU, X.: Studies on preparation of photosensitizer loaded magnetic silica nanoparticles and their anti-tumor effects for targeting photodynamic therapy. In: *Nanoscale Research Letters* 4 (2009), S. 400–408
- [54] ZÁVIŠOVÁ, V. ; KONERACKÁ, M. ; TOMAŠOVIČOVÁ, N. ; KOPČANSKÝ, P. ; TIMKO, M.: Some immobilization modes of biologically active substances to fine magnetic particles. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie International* 220 (2006), S. 241–250
- [55] KOUASSI, G. ; IRUDAYARAJ, J. ; MCCARTY, G.: Examination of cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles. In: *Journal of Nanobiotechnology* 3 (2005), S. 1–9
- [56] FUENTES, M. ; MATEO, C. ; GUIŠÁN, J. ; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.: Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. In: *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005), S. 1380–1387
- [57] TESTE, B. ; VIAL, J. ; DESCROIX, S. ; GEORGELIN, T. ; SIAUGUE, J. ; PETR, J. ; VARENNE, A. ; HENNION, M.: A chemometric approach for optimizing protein covalent immobilization on magnetic core-shell nanoparticles in view of an alternative immunoassay. In: *Talanta* 81 (2010), S. 1703–1710
- [58] AKGÖL, S. ; KAÇAR, Y. ; DENIZILI, A. ; ARICA, M.: Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. In: *Food Chemistry* 74 (2001), S. 281–288
- [59] FRANZREB, M. ; SIEMANN-HERZBERG, M. ; HOBLEY, T. ; THOMAS, O.: Protein purification using magnetic adsorbent particles. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 70 (2006), S. 505–516
- [60] GOYA, G. ; BERQUÓ, T. ; FONSECA, F. ; MORALES, M.: Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. In: *Journal of Applied Physics* 94 (2003), S. 3520–3528
- [61] SCHWERTMANN, U. ; CORNELL, R.: *Iron oxides in the laboratory: Preparation and characterization*. Weinheim : VCH, 1991
- [62] TARRACH, G. ; BÜRGLER, D. ; SCHAUB, T. ; WIESENDANGER, R. ; GÜNTHERODT, H.: Atomic surface structure of  $Fe_3O_4$  (001) in different preparation stages studied by scanning tunneling microscopy. In: *Surface Science* 285 (1993), S. 1–14
- [63] KUNDU, T. ; RAO, K. ; PARKER, S.: Atomistic simulation studies of magnetite surface structures and adsorption behavior in the presence of molecular and dissociated water and formic acid. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 295 (2006), S. 364–373
- [64] PETITTO, S. ; TANWAR, K. ; GHOSE, S. ; ENG, P. ; TRAINOR, T.: Surface structure of magnetite (111) under hydrated conditions by crystal truncation rod diffraction. In: *Surface Science* 604 (2010), S. 1082–1094

- [65] SUN, Z. ; SU, F. ; FORSLING, W. ; SAMSKOG, P.: Surface characteristics of magnetite in aqueous suspension. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 197 (1998), S. 151–159
- [66] SELWOOD, P.: *Magnetochemistry*. Interscience Publishers, 1956
- [67] JOLIVET, J. ; TRONC, E.: Interfacial electron transfer in colloidal spinel iron oxide. Conversion of  $Fe_3O_4 - \gamma - Fe_2O_3$  in aqueous medium. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 125 (1988), S. 688–700
- [68] JOLIVET, J. ; TRONC, E. ; CHANÉAC, C.: Iron oxides: From molecular clusters to solid. A nice example of chemical versatility. In: *Comptes Rendus Geoscience* 338 (2006), S. 488–497
- [69] JOLIVET, J. ; TRONC, E. ; CHANÉAC, C.: Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites. In: *Comptes Rendus Chimie* 5 (2002), S. 659–664
- [70] ALIJEV, R. ; JEVSIKOVA, N.: Eine strukturgeometrische Analyse der Kristallflächen von Spinellen (am Beispiel von Magnetit). In: *Kristall und Technik* 4 (1969), S. 265–278
- [71] PARK, J. ; LEE, E. ; HWANG, N. ; KANG, M. ; KIM, S. ; HWANG, Y. ; PARK, J. ; NOH, H. ; KIM, J. ; HYEON, T.: One-nanometer-scale size-controlled synthesis of monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles. In: *Angewandte Chemie - International Edition* 44 (2005), S. 2872–2877
- [72] CABUIL, V.: Phase behavior of magnetic nanoparticles dispersions in bulk and confined geometries. In: *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 5 (2000), S. 44–48
- [73] SANTOS, F. ; VARANDA, L. ; FERRACIN, L. ; JAFELICCI, M.: Synthesis and electrochemical behavior of single-crystal magnetite nanoparticles. In: *Journal of Physical Chemistry C* 112 (2008), S. 5301–5306
- [74] WARNER, M. ; HUTCHINSON, J.: Synthesis and assembly of functionalized gold nanoparticles. In: BARATON, M. (Hrsg.): *Synthesis, functionalization and surface treatment of nanoparticles*. Stevenson Ranch : American Scientific Publishers, 2003, S. 67–91
- [75] NISHIO, K. ; IKEDA, M. ; GOKON, N. ; TSUBOUCHI, S. ; NARIMATSU, H. ; MOCHIZUKI, Y. ; SAKAMOTO, S. ; SANDHU, A. ; ABE, M. ; HANDA, H.: Preparation of size-controlled (30-100 nm) magnetite nanoparticles for biomedical applications. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 310 (2007), S. 2408–2410
- [76] GONZÁLEZ-CARREÑO, T. ; MORALES, M. ; GARCIA, M. ; SERNA, C.: Preparation of uniform  $\gamma - Fe_2O_3$  with nanometer size by spray pyrolysis. In: *Materials Letters* 18 (1993), S. 151–155
- [77] HADDAD, P. ; MARTINS, T. ; D'SOUZA-LI, L. ; METZE, K. ; ADAM, R. ; KNOBEL, M. ; ZANCHET, D.: Structural and morphological investigation of magnetic nanoparticles based on iron oxides for medical applications. In: *Materials Science and Engineering C* 28 (2008), S. 489–494

- [78] CARPENTER, E.: Iron nanoparticles as potential magnetic carriers. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225 (2001), S. 17–20
- [79] CAMPONESCHI, E. ; WALKER, J. ; GARMESTANI, H. ; TANNENBAUM, R.: Surfactant effects on the particle size and formation of iron oxides via a sol-gel process. In: NAGARAJAN, R. (Hrsg.): *Nanoparticles* Bd. 996. Washington and DC : American Chemical Soc., 2008, S. 124–138
- [80] HU, F. ; LI, Z. ; TU, C. ; GAO, M.: Preparation of magnetite nanocrystals with surface reaction moieties by one-pot reaction. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 311 (2007), S. 469–474
- [81] MOHAPATRA, S. ; PRAMANIK, N. ; MUKHERJEE, S. ; GOSH, S. ; PRAMANIK, P.: A simple synthesis of amine-derivatised superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bioapplications. In: *Journal of Materials Science* 42 (2007), S. 7566–7574
- [82] SCHLÖGL, R. ; ABD HAMID, S.: Nanocatalysis: Mature science revisited or something really new? In: *Angewandte Chemie - International Edition* 43 (2004), S. 1628–1637
- [83] SHAW, S. ; CHEN ; Y. ; OU, J. ; HO, L.: Preparation and characterization of *Pseudomonas putida* esterase immobilized on magnetic nanoparticles. In: *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006), S. 1089–1095
- [84] TOMBÁCZ, E. ; MAJZIK, A. ; HORVÁT, Z. ; ILLÉS, E.: Magnetite in aqueous medium: Coating its surface and surface coated with it. In: *Romanian Reports in Physics* 58 (2006), S. 281–286
- [85] HUA, C. ; ZAKARIA, T. ; FARAHYAN, R. ; KHONG, L. ; NGUYEN, K. ; ABDULLAH, M. ; AHMAD, S.: Size-controlled synthesis and characterization of  $Fe_3O_4$  nanoparticles by chemical coprecipitation method. In: *Sains Malaysiana* 37 (2008), S. 389–394
- [86] METHA, R. ; UPADHYAY, R. ; CHARLES, S. ; RAMCHAND, C.: Direct binding of protein to magnetic particles. In: *Biotechnology Techniques* 11 (1997), S. 493–496
- [87] JOLIVET, J. ; CHANÉAC, C. ; TRONC, E.: Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. In: *Chemical Communications* 5 (2004), S. 481–487
- [88] BACRI, J. C. ; PERZYNSKI, R. ; SALIN, D. ; CABUIL, V. ; MASSART, R.: Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 85 (1990), S. 27–32
- [89] NEDKOV, I. ; MERODIISKA, T. ; SLAVOV, L. ; VANDERBERGHE, R.: Surface oxidation, size and shape of nano-sized magnetite obtained by co-precipitation. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 300 (2006), S. 358–367
- [90] MIJIRITSKII, A. ; BOERMA, D.: The (001) surface and morphology of thin  $Fe_3O_4$  layers grown by  $O_2$ -assisted molecular beam epitaxy. In: *Surface Science* 486 (2001), S. 73–81

- [91] GAINES, J. ; BLOEMEN, P. ; KOHLHEPP, J. ; BULLE-LIEUWMA, C. ; WOLF, R. ; REINDERS, A. ; JUNGBLUT, R. ; HEIJDEN, P. van d. ; EEMEREN, J. van ; STEGGE, J. van d. ; JONGE, W. de: An STM study of  $Fe_3O_4$  (100) grown by molecular beam epitaxy. In: *Surface Science* 373 (1997), S. 85–94
- [92] CUTTING, R. ; MURYN, C. ; THORNTON, G. ; VAUGHAN, D.: Molecular scale investigations of the reactivity of magnetite with formic acid, pyridine, and carbon tetrachloride. In: *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70 (2006), S. 3593–3612
- [93] CHAMBERS, S. ; THEVUTHASAN, S. ; JOYCE, S.: Surface structure of MBE-grown  $Fe_3O_4$  (001) by X-ray photoelectron diffraction and scanning tunneling microscopy. In: *Surface Science* 450 (2000), S. 273–279
- [94] NILSSON, A. ; PETTERSSON, L. ; NØRSKOV, J.: *Chemical bonding at surfaces and interfaces*. Amsterdam : Elsevier, 2008
- [95] MAURICE, P.: *Environmental surface and interfaces from the nanoscale to the global scale*. Hoboken : Wiley, 2009
- [96] HIEMSTRA, T. ; RIEMSDIJK, W. van: On the relationship between charge distribution, surface hydration, and the structure of the interface of metal hydroxides. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 301 (2006), S. 1–18
- [97] MÜLLER, R. ; NITZSCHE, R. ; HILDEBRAND, G.: *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1996
- [98] BLESÁ, M. ; FIGLIOLIA, N. ; MAROTO, A. ; REGAZZONI, A.: The influence of temperature on the interface magnetite-aqueous electrolyte solution. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 101 (1984), S. 410–418
- [99] WILLIAMS, R. (Hrsg.): *Colloid and surface engineering: Applications in the process industries*. 1992 (Colloid and surface engineering series)
- [100] REGAZZONI, A. ; BLESÁ, M. ; MAROTO, A.: Interfacial properties of zirconium dioxide and magnetite in water. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 91 (1983), S. 560–570
- [101] HE, T. ; WAN, J. ; TOKUNAGA, T.: Kinetic stability of hematite nanoparticles: The effect of particle sizes. In: *Journal of Nanoparticle Research* 10 (2008), S. 321–332
- [102] KAMIYA, H. ; NAITO, M.: Characterization of surface structure and interaction between particles: Chapter 12. In: BARATON, M. (Hrsg.): *Synthesis, functionalization and surface treatment of nanoparticles*. Stevenson Ranch : American Scientific Publishers, 2003, S. 257–278
- [103] BUTT, H. ; GRAF, K. ; KAPPL, M.: *Physics and chemistry of interfaces*. Weinheim : Wiley-VCH, 2003
- [104] STIESS, M.: *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1*. Berlin : Springer, 2009

- [105] TOMBÁ CZ, E. ; ILLÉS, E. ; MAJZIK, A. ; HAJDÚ, A. ; RIDEG, N. ; SZEKERES, M.: Ageing in the inorganic nanoworld: An example of magnetite nanoparticles in aqueous medium. In: *Croatica Chemica Acta* 80 (2007), S. 503–515
- [106] WEDLOCK, D.: Practice of product formulation: Chapter 3. In: WILLIAMS, R. (Hrsg.): *Colloid and surface engineering*. 1992, S. 112–138
- [107] WALDRON, R.: Infrared spectra of ferrites. In: *Physical Review* 99 (1955), S. 1727–1735
- [108] CULLITY, B ; GRAHAM, C.: *Introduction to magnetic materials*. Piscataway : IEEE Press, 2009
- [109] SATO, T. ; IJIMA, T. ; SEKI, M. ; INAGAKI, N.: Magnetic properties of ultrafine ferrite particles. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 65 (1987), S. 252–256
- [110] CAO, L.: Immobilised enzymes: Science or art? In: *Current Opinion in Chemical Biology* 9 (2005), S. 217–226
- [111] JIN, X. ; LI, J. ; HUANG, P. ; DONG, X. ; GUO, L. ; YANG, L. ; CAO, Y. ; WEI, F. ; ZHAO, Y. ; CHEN, H.: Immobilized protease on the magnetic nanoparticles used for the hydrolysis of rapeseed meals. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 322 (2010), S. 2031–2037
- [112] AMSTAD, E. ; GILLICH, T. ; BILLECKA, I. ; TEXTOR, M. ; REIMHULT, E.: Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups. In: *Nano Letters* 9 (2009), S. 4041–4048
- [113] DÖRFLER, H.: *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*. Berlin : Springer, 2002
- [114] HUNTER, R.: *Zeta potential in colloid science: Principles and applications*. London : Academic Press, 1988
- [115] STUMM, W. ; MORGAN J.: *Aquatic chemistry : Chemical equilibria and rates in natural waters*. New York : Wiley, 1996
- [116] RIEDEL, E. ; ALFASSER, R. ; JANI AK, C. ; K LAPÖTKE, T. ; MEYER, H.: *Moderne anorganische Chemie*. Berlin : De Gruyter, 2007
- [117] GU, B. ; SCHMITT, J. ; CHEN, Z. ; LIANG, L. ; MCCARTHY, J.: Adsorption and desorption of different organic matter fractions on iron oxide. In: *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59 (1995), S. 219–229
- [118] KICKELBICK, G. ; SCHUBERT, U.: Organic functionalization of metal oxide nanoparticles: Chapter 6. In: BARATON, M. (Hrsg.): *Synthesis, functionalization and surface treatment of nanoparticles*. Stevenson Ranch : American Scientific Publishers, 2003, S. 91–102
- [119] PIETERS, B. ; WILLIAMS, R. ; WEBB, C.: Magnetic carrier technology. In: WILLIAMS, R. (Hrsg.): *Colloid and surface engineering*. 1992, S. 248–286

- [120] NOVAKOVA, A. ; LANCHINSKAYA, V. ; VOLKOV, A. ; GENDLER, T. ; KISELEVA, T. ; MOSKVINA, M. ; ZEZIN, S.: Magnetic properties of polymer nanocomposites containing iron nanoparticles. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 258-259 (2003), S. 354–357
- [121] DURMUS, Z. ; ERDEMI, H. ; ASLAN, A. ; TOPRAK, M. ; SOZERI, H. ; BAYKAL, A.: Synthesis and characterization of poly(vinyl phosphonic acid) (PVPA)- $Fe_3O_4$  nanocomposite. In: *Polyhedron* 30 (2011), S. 419–426
- [122] XU, X. ; SHEN, H. ; XU, J. ; XIE, M. ; LI, X.: The colloidal stability and core-shell structure of magnetite nanoparticles coated with alginate. In: *Applied Surface Science* 253 (2006), S. 2158–2164
- [123] MÜLLER, R. ; DUTZ, S. ; HERGT, R. ; SCHMIDT, C. ; STEINMETZ, H. ; ZEISBERGER, M. ; GAWALEK, W.: Hysteresis losses in iron oxide nanoparticles prepared by glass crystallization or wet chemical precipitation. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 310 (2007), S. 2399–2401
- [124] DUNG, T. ; DANH, T. ; HOA, L. ; CHIEN, D. ; DUC, N.: Structural and magnetic properties of starch-coated magnetite nanoparticles. In: *Journal of Experimental Nanoscience* 4 (2009), S. 259–267
- [125] KRONICK, P. ; GILPIN, R.: Use of superparamagnetic particles for isolation of cells. In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 12 (1986), S. 73–80
- [126] TOMITAKA, A. ; KOSHI, T. ; HATSUGAI, S. ; YAMADA, T. ; TAKEMURA, Y.: Magnetic characterization of surface-coated magnetic nanoparticles for biomedical application. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 323 (2011), S. 1398–1403
- [127] ZHANG, L. ; DOU, Y. ; GU, H.: Magnetic behaviour and heating effect of  $Fe_3O_4$  ferrofluids composed of monodisperse nanoparticles. In: *Chinese Physics Letters* 24 (2007), S. 483–487
- [128] CUYPER, M. de ; JONIAU, M.: Immobilization of membrane enzymes into magnetizable, phospholipid bilayer-coated, inorganic colloids. In: *Progress in Colloid and Polymer Science* 82 (1990), S. 353–359
- [129] CUYPER, M. de ; JONIAU, M.: Magnetoliposomes: Formation and structural characterization. In: *European Biophysics Journal* 15 (1988), S. 311–319
- [130] CAMPO, A. del ; SEN, T. ; LELLOUCHE, J.: Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (2005), S. 33–40
- [131] XU, Z. ; LIU, Q. ; FINCH, J.: Engineering of nanosize superparamagnetic particles for use of magnetic carrier technology: Surfaces of Nanoparticles and Porous Materials. In: *Surfactant Science Series* 78 (1999), S. 33–50

- [132] GOODARZI, A. ; SAHOO, Y. ; SWIHART, M. ; PRASAD, P.: Aqueous ferrofluid of citric acid coated magnetite particles. In: *Materials Research Society Symposium Proceedings* 789 (2004), S. N6.6.1–N6.6.6
- [133] RÖMPP, H. ; FALBE, J.: *Chemie-Lexikon*. Stuttgart : Thieme, 1997
- [134] BECKER, H. ; BECKERT, R.: *Organikum: Organisch-chemisches Grundpraktikum*. Weinheim : Wiley-VCH, 2004
- [135] RYS, P. ; ZOLLINGER, H.: *Farbstoffchemie: Ein Leitfaden*. Weinheim : Verl. Chemie, 1982
- [136] VOLLHARDT, K. ; SCHORE, N. ; VOLLHARDT, K. Peter C. ; SCHORE, Neil E.: *Organische Chemie*. Weinheim : VCH, 1995
- [137] BREITMAIER, E. ; JUNG, G.: *Organische Chemie: Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur*. Stuttgart : Thieme, 2001
- [138] ROGINSKY, V. ; PISARENKO, L. ; BORS, W. ; MICHEL, C.: The kinetics and thermodynamics of quinone–semiquinone–hydroquinone systems under physiological conditions. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (1999), S. 871–876
- [139] PETER, M.: Chemische Modifikation von Biopolymeren durch Chinone und Chinonmethide. In: *Angewandte Chemie* 101 (1989), S. 572–587
- [140] TURKOVÁ, J.: *Journal of chromatography library*. Bd. 55: *Bioaffinity chromatography*. Amsterdam : Elsevier, 1993
- [141] NARASIMHAN, K. ; WINGARD, L.: p-Benzoquinone activation of metal oxide electrodes for attachment of enzymes. In: *Enzyme and Microbial Technology* 7 (1985), S. 283–286
- [142] STACK, A. ; EGGLESTON, C. ; ENGELHARD, M.: Reaction of hydroquinone with hematite: I. Study of adsorption by electrochemical-scanning tunneling microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 274 (2004), S. 433–441
- [143] YU, M ; DEMING, T.: Synthetic polypeptide mimics of marine adhesives. In: *Macromolecules* 31 (1998), S. 4739–4745
- [144] LEE, H. ; SCHERER, N. ; MESSERSMITH, P.: Single-molecule mechanics of mussel adhesion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), S. 12999–13003
- [145] SUCI, P. ; GEESEY, G.: Use of attenuated total internal reflection fourier transform infrared spectroscopy to investigate interactions between *Mytilus edulis* foot proteins at a surface. In: *Langmuir* 17 (2001), S. 2538–2540
- [146] HAEMERS, S. ; KOPER, G. ; FRENS, G.: Effect of oxidation rate on cross-linking of mussel adhesive proteins. In: *Biomacromolecules* 4 (2003), S. 632–640

- [147] LEE, H. ; LEE, K. ; PYO, K. ; PARK, S. ; LEE, H.: Catechol-grafted poly(ethylene glycol) for PEGylation on versatile substrates. In: *Langmuir* 26 (2010), S. 3790–3793
- [148] MALISOVA, B. ; TOSATTI, S. ; TEXTOR, M. ; GADEMANN, K. ; ZÜRCHER, S.: Poly(ethylene glycol) adlayers immobilized to metal oxide substrates through catechol derivatives: Influence of assembly conditions on formation and stability. In: *Langmuir* 26 (2010), S. 4018–4026
- [149] TAYLOR, R. (Hrsg.): *Bioprocess technology*. Bd. 14: *Protein immobilization: Fundamentals and applications*. New York : Dekker, 1991
- [150] GARDIMALLA, H. ; MANDAL, D. ; STEVENS, P. ; YEN, M. ; GAO, Y.: Superparamagnetic nanoparticle-supported enzymatic resolution of racemic carboxylates. In: *Chemical Communications* (2005), S. 4432–4434
- [151] ZLOKARNIK, M.: Verfahrenstechnische Aspekte der Immobilisierung - eine Einführung in die Problematik. In: *GVC VDI-Gesellschaft Verfahrensrechnung und Chemieingenieurwesen* (9. und 10. Mai 1988), S. 1–9
- [152] GEMEINER, P.: Enzyme engineering: Immobilized biosystems. In: *Ellis Horwood Series in Biochemistry and Biotechnology* (1992)
- [153] JANG, H. ; KIM, S. ; KIM, S.: Effect of particle size and phase composition of titanium dioxide nanoparticles on the photocatalytic properties. In: *Journal of Nanoparticle Research* 3 (2001), S. 141–147
- [154] BUCHHOLZ, K. ; KLEIN, J.: Characterization of immobilized biocatalysts. In: *Methods in Enzymology* 135 (1987), S. 3–30
- [155] WOLLENBERGER, U.: *Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen*. Weinheim : Wiley-VCH, 2003
- [156] CAO, L.: *Carrier-bound immobilized enzyme: Principles, applications and design*. Weinheim : Wiley-VCH, 2005
- [157] BICKERSTAFF, G. (Hrsg.): *Methods in biotechnology*. Bd. 1: *Immobilization of enzymes and cells*. Totowa and NJ : Humana Press, 1997
- [158] PICH, A. ; BHATTACHARYA, S. ; ADLER, H. ; WAGE, T. Taubenberger A. ; LI, Z. ; PEE, K. van ; BÖHMER, U. ; BLEY, T.: Composite magnetic particles as carriers for laccase from *Trametes versicolor*. In: *Macromolecular Bioscience* 6 (2006), S. 301–310
- [159] SCHELLENBERGER, A. ; FISCHER, G.: *Enzymkatalyse: Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme*. Berlin : Springer, 1989
- [160] LEE, H. ; RHO, J. ; MESSERSMITH, P.: Facile conjugation of biomolecules onto surfaces via mussel adhesive protein inspired coatings. In: *Advanced Materials* 21 (2009), S. 431–434
- [161] HERMANSON, G.: *Bioconjugate techniques*. San Diego : Academic Press, 1996

- [162] SCHULTZ, D. ; SINZ, A.: Chemisches Cross-Linking und Massenspektrometrie zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung von Proteinen. In: *Biospektrum* 1 (2004), S. 45–48
- [163] KONERACKÁ, M. ; RAMCHAND, C. ; METHA, R. ; KOPČANSKÝ, P.: Immobilization of a neutral protease in magnetic particles using direct binding procedure. In: *Journal de Physique IV* 7 (1997), S. 671–672
- [164] WANG, T. ; LEE, W.: Immobilization of proteins on magnetic nanoparticles. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8 (2003), S. 263–267
- [165] SAIYED, Z. ; SHARMA, S. ; GODAWAT, R. ; TELANG, S. ; RAMCHAND, C.: Activity and stability of alkaline phosphatase (ALP) immobilized onto magnetic nanoparticles ( $Fe_3O_4$ ). In: *Journal of Biotechnology* 131 (2007), S. 240–244
- [166] ALFA AESAR: *Produktinformationen p-Benzoquinone*. <http://www.alfa.com/de/gp100w.pgm?dsstk=A13162> (abgerufen am 27.06.2012)
- [167] CORNELL, R. ; SCHWERTMANN, U.: *The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrences and uses*. Weinheim : Wiley-VCH, 2003
- [168] HESSE, M. ; MEIER, H ; ZEEH, B: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie: 100 Tabellen*. Stuttgart : Thieme, 1995
- [169] ALFA AESAR: *Produktinformationen: 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionic acid*. <http://www.alfa.com/de/GP100W.pgm?DSSTK=A11638&rnd=156956792> (abgerufen am 22.05.2013)
- [170] BUDAVARI, S. ; O'NEIL, M. ; SMITH, A. ; HECKELMAN, P.: *The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. Rahway : Merck & Co, 1989
- [171] HUDNALL, P.: Hydroquinone. In: BOHNET, M. (Hrsg.) ; ULLMANN, F. (Hrsg.): *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. New York : Wiley-Interscience, 2002, S. 473–480
- [172] SIGMA ALDRICH: *Sicherheitsdatenblatt: Hydrochinon: Produktnummer: 53960*. <http://www.sigmaaldrich.com>. Version: 5.0, 24.04.2012 (abgerufen am 27.06.2012)
- [173] SIGMA ALDRICH ; ALDRICH.COM sigma (Hrsg.): *Sicherheitsdatenblatt: 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine: Produktnummer: D9628*. <http://www.sigmaaldrich.com>. Version: 4.1, 06.04.2011 (abgerufen am 26.06.2012)
- [174] SIGMA ALDRICH ; SIGMA ALDRICH (Hrsg.): *Sicherheitsdatenblatt: Dopaminhydrochlorid: Produktnummer: H8502*. <http://www.sigmaaldrich.com>. Version: 5.0, 23.04.2012 (abgerufen am 27.06.2012)
- [175] AKTORIES, K. ; FÖRSTERMANN, U. ; HOFMANN, F. ; STARKE, K.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker : mit 305 Tabellen*. München : Elsevier, 2009

- [176] UNITED STATES NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE: *ChemIDplus advanced*. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp> (abgerufen am 21.05.2013)
- [177] WATZL, B. ; LEITZMANN, C.: *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln: 61 Tabellen*. Stuttgart : Hippokrates, 2005
- [178] SIGMA ALDRICH ; SIGMA ALDRICH (Hrsg.): *Sicherheitsdatenblatt: Kaffeesäure: Produktnummer: C0625*. <http://www.sigmaaldrich.com>. Version: 4.3, 05.07.2011 (abgerufen am 26.06.2012)
- [179] MERCK: *Sicherheitsdatenblatt 800907 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid*. [http://www.merckmillipore.com/germany/chemicals/n-3-dimethylaminopropyl-n-ethylcarbodiimidhydrochlorid/MDA\\_CHEM-800907/p\\_uuid](http://www.merckmillipore.com/germany/chemicals/n-3-dimethylaminopropyl-n-ethylcarbodiimidhydrochlorid/MDA_CHEM-800907/p_uuid). Version: 01.10.2012 (abgerufen am 01.10.2012)
- [180] CARL ROTH GMBH + CO. KG: *Sicherheitsdatenblatt: Glutardialdehyd 50 %*. [http://www.carlroth.com/media/\\_de-de/sdpdf/4995.PDF](http://www.carlroth.com/media/_de-de/sdpdf/4995.PDF). Version: 11.01.2012 (abgerufen am 18.03.2013)
- [181] CARL ROTH GMBH + CO. KG: *Sicherheitsdatenblatt Albumin Fraktion V*. [http://www.carlroth.com/media/\\_de-de/sdpdf/8076.PDF](http://www.carlroth.com/media/_de-de/sdpdf/8076.PDF). Version: 13.10.2011 (abgerufen am 18.03.2013)
- [182] PETERS, T.: *All about albumin: Biochemistry, genetics, and medical applications*. San Diego : Academic Press, 1996
- [183] SHI, Q. ; ZHOU, Y. ; SUN, Y.: Influence of pH and ionic strength on the steric mass-action model parameters around the isoelectric point of protein. In: *Biotechnology Progress* 21 (2005), S. 516–523
- [184] SIGMA ALDRICH ; SIGMA ALDRICH (Hrsg.): *Sicherheitsdatenblatt: Lipase: Produktnummer: L1754*. <http://www.sigmaaldrich.com>. Version: 4.0, 2011 (abgerufen am 08.10.2012)
- [185] TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG: *Brenda: The comprehensive enzyme information system*. <http://www.brenda-enzymes.org/index.php4> (abgerufen am 26.06.2012)
- [186] ALBERGHINA, L. ; LOTTI, M.: Cloning, sequencing, and expression of *Candida rugosa* lipases. In: *Methods in Enzymology* 284 (1997), S. 246–260
- [187] NEVES PETERSEN, M. ; FOJAN, P. ; PETERSEN, S.: How do lipases and esterases work: The electrostatic contribution. In: *Journal of Biotechnology* 85 (2001), S. 115–147
- [188] ANTRANIKIAN, G.: *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin and Heidelberg : Springer, 2006
- [189] LASZLO, J. ; EVANS, K.: Influence of self-assembled monolayer surface chemistry on *Candida antarctica* lipase B adsorption and specific activity. In: *Journal of Molecular Catalysis B* 48 (2007), S. 84–89

- [190] KOELLER, K. ; WONG, C.: Enzymes for chemical synthesis. In: *Nature* 409 (2001), S. 232–240
- [191] MALVERN: *Zeta potential measurement using laser Doppler electrophoresis (LDE)*. [http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta\\_potential/zeta\\_potential\\_LDE.htm](http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm) (abgerufen am 30.05.2012)
- [192] DEUTSCHE NORM: *Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Feststoffen durch Gasadsorption nach dem BET-Verfahren*. DIN ISO 9277. Berlin, Mai 2003
- [193] DEUTSCHE NORM: *Thermische Analyse (TA) - Thermogravimetrie (TG) - Grundlagen*. DIN 51006. Berlin, Juli 2005
- [194] HATAKEYAMA, T. ; LIU, Z.: *Handbook of thermal analysis*. Chichester and New York : Wiley, 1998
- [195] HEMMINGER, W. ; CAMMENGA, H.: *Methoden der thermischen Analyse*. Berlin : Springer, 1989
- [196] WEST, A.: *Solid state chemistry and its applications*. Chichester : Wiley, 1984
- [197] FLEGLER, S. ; HECKMAN, J. ; KLOMPARENS, K.: *Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. Heidelberg : Spektrum, 1995
- [198] BRUNE, D. (Hrsg.) ; HELLBORG, R. (Hrsg.) ; WHITLOW, O. (Hrsg.) ; HUNDERI, O. (Hrsg.): *Surface characterization: A user's sourcebook*. Weinheim : Wiley-VCH, 1997
- [199] GABRIEL, B.: *SEM: A user's manual for materials science*. Ohio : American Society for Metals, 1985
- [200] GOODHEW, P. ; HUMPHREYS, F. ; CLEWING, U.: *Elektronenmikroskopie: Grundlagen und Anwendung*. London : McGraw-Hill, 1991
- [201] HORNBOGEN, E. ; SKROTZKI, B.: *Mikro- und Nanoskopie der Werkstoffe*. Berlin : Springer, 2009
- [202] HEINE, B.: *Werkstoffprüfung: Ermittlung von Werkstoffeigenschaften*. München : Hanser, 2003
- [203] MATISSEK, R. ; STEINER, G. ; FISCHER, M.: *Lebensmittelanalytik*. Berlin : Springer, 2010
- [204] GEY, M.: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. Berlin : Springer, 2008
- [205] SCHRADER, B. ; BOUGEARD, D.: *Infrared and Raman spectroscopy: Methods and applications*. Weinheim : VCH, 1995
- [206] SILVERSTEIN, R. ; WEBSTER, F. ; KIEMLE, D.: *Spectrometric identification of organic compounds*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2005

- [207] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION: *Particle size analysis-dynamic light scattering (DLS) - Draft international standard ISO/DIS. ISO 22412. 20.07.2006*
- [208] SYVITSKI, J.: *Principles, methods, and application of particle size analysis*. Cambridge : Cambridge University Press, 1991
- [209] WASHINGTON, C.: *Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries: Theory and practice*. New York : Ellis Horwood, 1992
- [210] SPIESS, L. ; SCHWARZER, R. ; BEHNKEN, H. Teichert G.: *Moderne Röntgenbeugung: Röntgendiffraktometrie für Materialwissenschaftler, Physiker und Chemiker*. Wiesbaden : Teubner, 2005
- [211] CULLITY, B.: *Elements of x-ray diffraction*. Reading and Mass. : Addison-Wesley, 1978
- [212] MASSA, W.: *Kristallstrukturbestimmung*. Wiesbaden : Vieweg+Teubner, 2011
- [213] DINNEBIER, R. (Hrsg.) ; BILLINGE, S. (Hrsg.): *Powder diffraction: Theory and practice*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2008
- [214] HAMMOND, C.: *The basics of crystallography and diffraction*. Oxford : Oxford University Press, 2009
- [215] HOLTZHAUER, M.: *Biochemische Labormethoden*. Berlin : Springer, 1995
- [216] COMPTON, S. ; JONES, C.: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. In: *Analytical Biochemistry* 151 (1985), S. 369–374
- [217] ROTH, C.: *Gebrauchsanweisung Roti-Quant: Proteinbestimmung nach Bradford*. [http://www.carlroth.com/media/\\_de-de/usage/K015.pdf](http://www.carlroth.com/media/_de-de/usage/K015.pdf). Version: 2011 (abgerufen am 14.06.2011)
- [218] BRADFORD, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254
- [219] WINKLER, U. ; STRUCKMANN, M.: Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. In: *Journal of Bacteriology* 138 (1979), S. 663–670
- [220] MUSIDLOWSKA-PERSSON, A. ; BORNSCHEUER, U.: Recombinant porcine intestinal carboxylesterase: Cloning from the pig liver esterase gene by site-directed mutagenesis, functional expression and characterization. In: *Protein Engineering Design and Selection* 16 (2003), S. 1139–1145
- [221] SCHWEDT, G. ; VOGT, C.: *Analytische Trennmethoden*. Weinheim : Wiley-VCH, 2010
- [222] KALTENBÖCK, K.: *Chromatographie für Einsteiger*. Weinheim : Wiley-VCH, 2008

- [223] JÖRG, E. ; SONTAG, G.: Determination of phenolic acids in honey by HPLC using coulometric dual electrode detection. In: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 88 (1992), S. 179–183
- [224] VEIT, M. ; GUMNINGER, H.: Hydroxyzimtsäuren und Derivate: Pflanzeninhaltsstoffe an der Nahtstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. In: *Deutsche Apotheker Zeitung* 133 (1993), S. 911–931
- [225] KNELLER, E. ; LUBORSKY, F.: Particle size dependence of coercivity and remanence of single-domain particles. In: *Journal of Applied Physics* 34 (1963), S. 656–658
- [226] SELWOOD, P.: *Chemisorption and magnetization*. New York : Academic Press, 1975
- [227] LAMBRICK, D. ; HOON, S. ; MASON, N. ; KILNER, M.: Measurement of the anisotropy constant in Ni-Fe and  $Fe_3O_4$  magnetic fluids. In: *IEEE Transactions on Magnetics* 24 (1988), S. 1647–1649
- [228] LUO, W. ; NAGEL, S. ; ROSENBAUM, T. ; ROSENSWEIG, R.: Dipole interactions with random anisotropy in a frozen ferrofluid. In: *Physical Review Letters* 67 (1991), S. 2721–2724
- [229] CASTILLO, V. del ; RINALDI, C.: Effect of sample concentration on the determination of the anisotropy constant of magnetic nanoparticles. In: *IEEE Transactions on Magnetics* 46 (2010), S. 852–859
- [230] VAKHLU, J. ; KOUR, A.: Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. In: *Electronic Journal of Biotechnology* 9 (2006), S. 69–85
- [231] DYAL, A. ; LOOS, K. ; NOTO, M. ; CHANG, S. ; SPAGNOLI, C. ; SHAFI, K. ; ULMAN, A. ; COWMAN, M. ; GROSS, R.: Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on  $\gamma - Fe_2O_3$  magnetic nanoparticles. In: *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003), S. 1684–1685
- [232] INSTRUMENTATION LABORATORY ; INSTRUMENTATION LABORATORY (Hrsg.): *IL Test Alkaline Phosphatase-0018252140: Deutsch-Packungsbeilage Version 02/2006*. [http://lexdms.werfengroup.com:1090/contentserver/contentserver.dll?get&pVersion=0046&contRep=ZDMS\\_LEX\\_01&docId=4B62841CCE627004E1000000C0080114&compId=00018252106R2%20INS.pdf](http://lexdms.werfengroup.com:1090/contentserver/contentserver.dll?get&pVersion=0046&contRep=ZDMS_LEX_01&docId=4B62841CCE627004E1000000C0080114&compId=00018252106R2%20INS.pdf). Version: 2006 (abgerufen am 17.04.2013)
- [233] LEVINE, M. ; LAVIS, L. ; RAINES, R.: Trimethyl lock: A stable chromogenic substrate for esterases. In: *Molecules* 13 (2008), S. 204–211
- [234] FOSTER, J. ; SOGAMI, M. ; PETERSEN, A. ; LEONARD, W.: The microheterogeneity of plasma albumins: I. Critical evidence for and description of the microheterogeneity model. In: *The Journal of Biological Chemistry* 240 (1965), S. 2495–2502
- [235] KUNG, K. ; MCBRIDE, M.: Electron transfer processes between hydroquinone and iron oxides. In: *Clays and Clay Minerals* 36 (1988), S. 303–309

- [236] MORRISON, M. ; STEELE, W. ; DANNER, D.: The reaction of benzoquinone with amines and proteins. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 134 (1969), S. 515–523
- [237] GHABBOUR, E. ; DAVIES, G.: *Special publication / Royal Society of Chemistry. Bd. 273: Humic substances: Structures, models and functions ; [based on the proceedings of the Fifth Humic Substances Seminar held on 21 - 23 March 2001 at Northeastern University, Boston, Massachusetts]*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2001
- [238] HUANG, P Kong Y. ; LI, Z. ; GAO, F. ; CUI, D.: Copper selenide nanosnakes: Bovine serum albumin-assisted room temperature controllable synthesis and characterization. In: *Nanoscale Research Letters* 5 (2010), S. 949–956
- [239] ROHN, S. ; RAWEL, H. ; WOLLENBERGER, U. ; KROLL, J.: Enzyme activity of alpha-chymotrypsin after derivatization with phenolic compounds. In: *Food* 47 (2003), S. 325–329
- [240] BARTOLOMÉ, B. ; ESTRELLA, I. ; HERNÁNDEZ, M.: Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). In: *Journal of Food Science* 65 (2000), S. 617–621
- [241] MALA, J. ; TAKEUCHI, S.: Understanding structural features of microbial lipases - An overview. In: *Analytical Chemistry Insights* 3 (2008), S. 9–19
- [242] YUEN, A. ; HUTTON G. ; MASTERS, A. ; MASCHMEYER, T.: The interplay of catechol ligands with nanoparticulate iron oxides. In: *Dalton Transactions* 41 (2012), S. 2545–2559
- [243] MUTSCHLER, E.: *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; 272 Tabellen*. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001
- [244] RAJH, T. ; POLUEKTOV, O. ; DUBINSKI, A. ; WIEDERRECHT, G. ; THURNAUER, M. ; TRIFUNAC, A.: Spin polarization mechanisms in early stages of photoinduced charge separation in surface-modified  $TiO_2$  nanoparticles. In: *Chemical Physics Letters* 344 (2001), S. 31–39
- [245] BAE, K. ; KIM, Y. ; LEE, Y. ; HWANG, J. ; PARK, H. ; PARK, T.: Bioinspired synthesis and characterization of gadolinium-labeled magnetite nanoparticles for dual contrast  $T_1$ - and  $T_2$ -weighted magnetic resonance imaging. In: *Bioconjugate chemistry* 21 (2010), S. 505–512
- [246] RAJH, T. ; CHEN, X. ; LUKAS, K. ; LIU, T. ; THURNAUER, M. ; TIEDE, D.: Surface restructuring of nanoparticles: An efficient route for ligand-metal oxide crosstalk. In: *Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002), S. 10543–10552
- [247] SHULTZ, M. ; REVELES, J. ; KHANNA, S. ; CARPENTER, E.: Reactive nature of dopamine as a surface functionalization agent in iron oxide nanoparticles. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), S. 2482–2487

- [248] CHEN, L. ; LIU, T. ; THURNAUER, M. ; CSENCISITS, R. ; RAJH, T.:  $Fe_2O_3$  nanoparticle structures investigated by x-ray absorption near-edge structure, surface modifications, and model calculations. In: *Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002), S. 8539–8546
- [249] BARR, M. ; KUSTIN, K. ; LIU, S.: Anomalous complexation kinetics of transition metal ions with l-Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanine). Kinetics and complex formation with nickel(II) and cobalt(II). In: *Inorganic Chemistry* 12 (1973), S. 1486–1490
- [250] MALISOVA, B. ; GADEMANN, K. ; ZÜRCHER, S. ; TOSATTI, S. ; TEXTOR, M.: Surface active poly(ethylene glycol) (PEG) catechol derivatives on metal oxide surfaces: Influence of pH, pKa and isoelectric point on adsorption kinetics and adlayer stability. In: *European Cells and Materials* 14 (2007), S. 123
- [251] EL-AYAAN, U. ; HERLINGER, E. ; JAMESON, R. ; LINERT, W.: Anaerobic oxidation of dopamine by iron (III). In: *Dalton Transactions* 16 (1997), S. 2813–2818
- [252] TANG, S. ; LO, I.: Magnetic nanoparticles: Essential factors for sustainable environmental applications. In: *Water Research* 47 (2013), S. 2613–2632
- [253] ARAUJO, P. ; MORANDO, P. ; BLESÁ, M.: Interaction of catechol and gallic acid with titanium dioxide in aqueous suspensions: 1. Equilibrium studies. In: *Langmuir* 21 (2005), S. 3470–3474
- [254] BINBUGA, N. ; CHAMBERS, K. ; HENRY, W. ; SCHULTZ, T.: Metal chelation studies relevant to wood preservation: 1. Complexation von propyl gallate with  $Fe^{2+}$ . In: *Holzforschung* 59 (2005), S. 205–209
- [255] GUISÁN, J. ; PENZOL, G. ; ARMISEN, P. ; BASTIDA, A. ; BLANCO, R. ; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. ; GARCÍA-JUNCEDA, G.: Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In: BICKERSTAFF, G. (Hrsg.): *Immobilization of enzymes and cells* Bd. 1. Totowa and NJ : Humana Press, 1997, S. 261–275
- [256] UNITED STATES PATENT: *Process for preparing highly concentrated aqueous solution of a dopa compound*, U.S. 424/319. 27.11.1973
- [257] DAOU, T. ; GRENECHE, J. ; POURROY, G. ; BUATHONG, S. ; DERORY, A. ; ULHAQ-BOUILLET, C. ; DONNIO, B. ; GUILLON, D. ; BEGIN-COLIN, S.: Coupling agent effect on magnetic properties of functionalized magnetite-based nanoparticles. In: *Chemistry of Materials* 20 (2008), S. 5869–5875
- [258] TOMBÁ CZ, E.: Effect of environmental relevant organic complexants on the surface charge and the interaction of clay mineral and metal oxide particles. In: *Role of Interfaces in Environmental protection* 24 (2003), S. 397–424
- [259] PERRIAT, P. ; DOMENICHINI, B. ; GILLOT, B.: A model for oxidation in finely divided ferrites taking into account the stresses generated during reaction. In: *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 57 (1996), S. 1641–1652

- [260] KARGE, H.: *Adsorption and Diffusion*. Berlin : Springer, 2008
- [261] JOHNSON, J. ; MATIJEVIC, E.: Interactions of proteins with uniform colloidal hematite and chromium hydroxide particles: I. Adsorption und II. Stability and mobility. In: *Colloid and Polymer Science* 270 (1992), S. 353–369
- [262] TIRADO-MIRANDA, M. ; SCHMITT, A. ; CALLEJAS-FERNÁNDEZ, J. ; FERNÁNDEZ-BARBERO, A.: The aggregation behaviour of protein-coated particles: A light scattering study. In: *European Biophysics Journal* 32 (2003), S. 128–136
- [263] CHEN, D. ; LIAO, M.: Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles. In: *Journal of Molecular Catalysis B* 16 (2002), S. 283–291
- [264] ARICA, M. ; YAVUZ, H. ; PATIR, S. ; DENIZLI, A.: Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. In: *Journal of Molecular Catalysis B* 11 (2000), S. 127–138
- [265] PRAKASHAM, R. ; DEVI, G. ; LAXMI, K. ; RAO, C.: Novel synthesis of ferric impregnated silica nanoparticles and their evaluation as a matrix for enzyme immobilization. In: *Journal of Physical Chemistry C* 111 (2007), S. 3842–3847
- [266] CABBILLAU, C. ; TILBEURGH, H. van: Structure of hydrolases: Lipases and cellulases. In: *Current Opinion in Structural Biology* 3 (1993), S. 885–895
- [267] KOUASSI, G. ; IRUDAYARAJ, J. ; MCCARTY, G.: Activity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles. In: *Biomagnetic Research and Technology* 3 (2005), S. 1–10
- [268] WANG, X. ; DOU, P. ; ZHAO, P. ; ZHAO, C. ; DING, Y. ; XU, P.: Immobilization of lipases onto magnetite  $Fe_3O_4$  Nanoparticles for application in biodiesel production. In: *ChemSusChem* 2 (2009), S. 947–950
- [269] PIMENTEL, M. ; LEAO, A. ; MELO, E. ; LEDINGHAM, W. ; LIMA FILHO, J.: Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetized dacron: Kinetic Study. In: *Artificial Cells, Blood Substiutes, and Biotechnology* 35 (2007), S. 221–235
- [270] BAYRAMOGLU, G. ; ARICA, M.: Preparation of poly(glycidylmethacrylate–methylmethacrylate) magnetic beads: Application in lipase immobilization. In: *Journal of Molecular Catalysis B* 55 (2008), S. 76–83
- [271] FRIEDMANN, M. ; JÜRGENS, H.: Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000), S. 2101–2110