



Peptidgesteuerte Mineralisation von Calciumoxalat und Struvit

Diplomarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades

eines Diplom-Chemikers (Dipl.-Chem.)

eingereicht an der

Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

von

Viktor Fischer

geboren am 12.10.1983 in Alma-Ata, Kasachstan

Mainz, im November 2009





Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.04. – 30.09.2009 unter der Betreuung von Prof. Dr. Katharina Landfester am Max-Planck-Institut für Polymerforschung durchgeführt.

Amtierender Dekan

1. Gutachterin

2. Gutachter

Prof. Dr. Peter Bäuerle Prof. Dr. Katharina Landfester Prof. Dr. Axel Groß

Inhaltsverzeichnis

1		Ein	ing	5	
2		Theoretische Grundlagen			
	2.	.1	The	eorie der Biomineralisation	7
2.		2.1	.1	Grundlagen der Kristallisation aus übersättigter Lösung	7
2.1.2			.2	Nukleation	9
		2.1	.3	Kristallwachstum	. 11
		2.1	.4	Alternativer Mechanismus der Kristallisation	. 13
		2.1	.5	Einfluss von Additiven auf die Kristallisation	. 14
	2.	2	Cal	ciumoxalat und Struvit	17
		2.2	.1	Calciumoxalat	. 17
		2.2	.2	Struvit	. 19
	2.	.3	Mik	rowellengesteuerte Festphasen-Peptidsynthese	19
	2.	2.4 Syr		nthese von funktionalisierten Nanopartikeln	24
		2.4.1		Theorie der Miniemulsion	. 24
		2.4	.2	Theorie der Miniemulsionspolymerisation	. 25
3		Ana	alyse	emethoden	27
	3.	.1	Fur	hktionsweise der Calciumionen-selektiv-Elektrode	27
	3.	.2	Ras	sterelektronenmikroskopie (REM)	30
	3.	3.3 Rö		ontgenbeugung	
	3.	.4	Kap	billarelektrophorese	32
4		Exp	berir	nenteller Teil	34
4		.1	Pep	otidsynthese	34
	4.	2	Kris	stallisationsexperimente	36
		4.2	.1	Probenvorbereitung für Untersuchungen mit REM und XRD	. 36
		4.2	.2	Kristallisation und Reaktionskinetik von Calciumoxalat	. 36
		4.2	.3	Kristallisation von Struvit	. 38

	4. M	3 linio	Syn	ithese	von	funktionalisierten	Latexpartikeln	mittels	
	IVI	internuisionspolymensation							
	4.	4 Kristallisation von Calciumoxalat auf der Oberfläche von funktionalisierten							
	La	atex	part	ikeln				40	
5	5 Ergebnisse und Diskussion							41	
5.1 Synthese der Oligopeptide							41		
	5.	2	2 Kristallisationsexperimente und Reaktionskinetik						
		5.2	.1	Kinetikexpe	rimente mi	t Calciumoxalat		45	
		5.2	.2	Einfluss vor	n Peptiden a	uf die Morphologie vo	n Calciumoxalat	55	
		5.2	.3	Einfluss vor	n Peptiden a	uf die Kristallstruktur	von Calciumoxalat	60	
5.2.4 Einfluss von Peptiden auf die Morphologie von S							n Struvit	63	
		5.2	.5	Einfluss vor	n Peptiden a	uf die Kristallstruktur	von Struvit	65	
	5.	3	Kris	stallisation a	uf der Obe	erfläche von funktiona	alisierten Latexpartike	əln 66	
6		Zus	samı	menfassung	und Aust	blick		68	
7		Abkürzungsverzeichnis							
8		Literaturverzeichnis							
8.1 Danksagungen							75		
9	Erklärung								

1 Einleitung

Die Untersuchung der Kristallisation von Calciumoxalat (CaC₂O₄•*n*H₂O; *n*=1–3) und Struvit (MgNH₄PO₃•6H₂O) liegt seit vielen Jahren im Interesse der Industrie und Medizin. Bei diesen Stoffen handelt es sich um natürlich vorkommende Mineralien, die sich als problematische Ablagerungen bei verschiedenen Prozessen und Komponenten der Industrie wie z.B. der Papier- und Lebensmittelherstellung, Rohren, Pumpen, Boilern, Wärmetauschern und Abwasser wieder finden.^[1-5] Dadurch wird die Effizienz der Geräte verringert und die Betriebskosten erhöht.

Abgesehen von industriellen Ablagerungen kommt Calciumoxalat in Fossilien sowie als Einlagerungen in den meisten pflanzlichen Organen wie Blättern, Wurzeln, Blüten, Rinde und Samen vor, in denen es in unlöslicher Form als Calciumspeicher für das Cytosol der pflanzlichen Zelle dient.^[6,7] Des Weiteren fungiert Calciumoxalat als Schutz gegen Schädlinge und verbessert die mechanischen Eigenschaften von Halmen und Blättern.^[6,8]

Auch in der Veterinär- und Humanmedizin sind Struvit und Calciumoxalat von großer Bedeutung und stellen den Hauptbestandteil von Gallen-, Blasen- und Nierensteinen, einigen der ältesten dokumentierten Krankheiten, dar.^[4,5,9-12]

Calciumoxalat kristallisiert in drei unterschiedlichen Modifikationen: dem thermodynamisch stabilen monoklinen Calciumoxalat Monohydrat (CaC₂O₄•H₂O; COM oder Whewellit), dem metastabilen tetragonal bipyramidalen Calciumoxalat-Dihydrat (CaC₂O₄•2H₂O; COD oder Wheddellit), und dem metastabilen triklinen Calciumoxalat-Trihydrat (CaC₂O₄•3H₂O; COT oder Caoxit).^[5,11,13-15] Während COM den Hauptbestandteil von Nierensteinen darstellt, die bei einem Mangel an Osteopontin (Uropontin) und Uromodulin entstehen, sind COT und Struvit häufig vorkommende Bestandteile von Nierensteinen, die bei bakteriellen Erkrankungen des Nierentrakts auftreten.^[4,12,16-19]

In der Natur wird die Bildung von anorganischen Kristallen durch die Anwesenheit von biogenen Makromolekülen kontrolliert. Calciumcarbonat, das in Korallen und Schalen von Meereslebewesen vorkommt, Calciumphosphate, aus denen Knochen und Zähne bestehen sowie Calciumoxalat, welches als Calciumspeicher und zur Stabilisierung des pflanzlichen Skeletts in vielen Pflanzen dient, sind typische Beispiele für dieses Phänomen.^[20-22] Diese biologischen Systeme setzen Biomoleküle ein, die als Kristallisationskeimbildner, Inhibitoren, Matrices und zur Wachstumskontrolle dienen und einen Einfluss auf die Mineralisation ausüben. Im menschlichen Körper kommen Citrate, säurereiche Urinproteine, das TammHorsfall-Protein (Uromodulin), Inulin und Osteopontin vor, die die Kristallisation von Calciumoxalat und Struvit inhibieren.^[4,5,9,23-28]

Einige Forschungsgruppen fokussieren ihr Interesse bei der Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften von Osteopontin, bei dem es sich um ein asparagin- und glutaminsäurereiches Protein handelt, auf die Kristallisation von Calciumoxalat. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass Osteopontin eine stark hemmende Wirkung auf die Kristallisation und einen deutlichen Einfluss auf die Morphologie von Calciumoxalat hat.^[9,29] und glutaminsäurereichen Des Weiteren wurden Synthesen einer asparagin-Aminosäurensequenz durchgeführt. Diese Sequenzen zeigen einen ähnlichen Einfluss auf die Wachstumsrate und Morphologie der Calciumoxalatkristalle wie Osteopontin, woraus geschlussfolgert wurde, dass die freien Carboxylgruppen der Asparagin- und Glutaminsäure für die inhibierenden Eigenschaften von Osteopontin verantwortlich sind.^[27,28]

Viele Arbeitsgruppen konzentrieren ihre Forschung direkt auf die Untersuchung der Wirkung von Polyasparagin- und Polyglutaminsäure auf die Kristallisation von Calciumoxalat, mit dem Ergebnis, dass beide Polypeptide das Wachstum inhibieren und die Morphologie von Calciumoxalat verändern.^[23,25,26,30-34]

Jedoch wurden bisher noch keine Untersuchungen durchgeführt, die einen Zusammenhang zwischen der Kettenlänge der Polyasparagin- und Polyglutaminsäure bzw. der Anzahl der freien Carboxylgruppen und der Stärke der Inhibierung des Kristallwachstums sowie dem Einfluss auf die Modifikation und Morphologie von Calciumoxalat und Struvit herstellen.

Ziel der Diplomarbeit war es, Oligomere von definierter Kettenlänge zu synthetisieren und deren Einfluss auf die Kristallisationsgeschwindigkeit von Calciumoxalat und Struvit in Abhängigkeit von Kettenlänge und Konzentration zu überprüfen. Es sollte außerdem der Einfluss der synthetisierten Oligomere auf die Morphologie und Kristallstruktur von Calciumoxalat und Struvit überprüft werden. Im Rahmen der Diplomarbeit wurden drei verschiedene Oligomere der L-Glutaminsäure mit definierter Kettenlänge mit einem Peptidsynthesizer hergestellt und deren Einfluss auf die Kristallisationskinetik von Calciumoxalat mit Hilfe einer Calciumionen-selektiven-Elektrode sowie deren Wirkung auf die Modifikation und Morphologie von Calciumoxalt und Struvit untersucht. Des Weiteren wurden funktionalisierte Latexpartikel synthetisiert, die als ein biomimetisches Templat für die Kristallisation von Calciumoxalat dienten.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Theorie der Biomineralisation

Während der Diplomarbeit wurden Kristallisationsversuche von Calciumoxalat und Struvit aus übersättigter Lösung mit und ohne Zugabe von Oligomeren der L-Glutaminsäure, die als biomimetische Additive fungierten, durchgeführt. Dabei wurde eine Veränderung der Modifikation und Morphologie bei Zugabe von Additiven beobachtet. In diesem Abschnitt soll erklärt werden, wie die Kristallisation von Calciumoxalat und Struvit stattfindet und auf welche Art die Additive den Kristallisationsprozess beeinflussen.

2.1.1 Grundlagen der Kristallisation aus übersättigter Lösung

Die Kristallisation eines Stoffes aus wässriger Lösung impliziert eine Fällungsreaktion, der ein Lösungsgleichgewicht zu Grunde liegt. Als allgemeines Lösungsgleichgewicht für eine Verbindung A_{VA}B_{VB} kann Gl. 2.7 formuliert werden:

$$A_{\nu_{A}}B_{\nu_{B}} \longrightarrow \nu_{A}A^{\nu_{B}+}(aq) + \nu_{B}B^{\nu_{A}-}(aq)$$
(2.7)

mit A/B

Komponente A bzw. B

 $v_{\rm A}/v_{\rm B}$ stöchiometrischer Faktor von A bzw. B

Für Gl. 2.7 kann eine Gleichgewichtskonstante K_{eq} formuliert werden:

$$K_{\rm eq} = \frac{(a_{\rm A^{\nu_{B^+}}})^{\nu_{\rm A}} \cdot (a_{\rm B^{\nu_{\rm A^-}}})^{\nu_{\rm B}}}{a_{\rm A_{\nu_{\rm A}} \rm B_{\nu_{\rm B}}}}$$
(2.8)

mit K_{eq} Gleichgewichtskonstante $a_{A^{\nu B+}}$ Aktivität der Ionen des Typs $A^{\nu_{B^+}}$ $a_{B^{\nu A-}}$ Aktivität der Ionen des Typs $B^{\nu_{A^-}}$ $a_{A\nu AB \nu B}$ Aktivität des Festkörpers $A_{\nu A}B_{\nu B}$ (per Definition = 1)

Wie in Abschnitt 2.1 bereits erwähnt wurde, ist die Aktivität a_i eines Ions *i* proportional zu seiner Konzentration c_i . Als Freie Reaktionsenthalpie (Lösungsenthalpie) ΔG (nach Gibbs) ergibt sich Gl. 2.9:

$$\Delta G = RT \ln \frac{Q}{K_{\rm eq}} = RT \ln \frac{(a_{\rm A^{\nu_{B^+}}})^{\nu_{\rm A}} \cdot (a_{\rm B^{\nu_{A^-}}})^{\nu_{\rm B}}}{(a_{\rm A^{\nu_{B^+}}})^{\nu_{\rm A}}_{\rm eq} \cdot (a_{\rm B^{\nu_{A^-}}})^{\nu_{\rm B}}_{\rm eq}}$$
(2.9)

mit Q Reaktionsquotient

T absolute Temperatur in Kelvin

 $a_i t/(a_i)_{eq}$ tatsächliche Aktivität/Gleichgewichtsaktivität der Ionen der Spezies *i* Das Ionenaktivitätsprodukt *I* kann als Gl. 2.10 formuliert werden:

$$I = (a_{A^{V_{B^{+}}}})^{V_{A}} \cdot (a_{B^{V_{A^{-}}}})^{V_{B}}$$
(2.10)

Dadurch kann Gl. 2.9 als Gl. 2.11 ausgedrückt werden:

$$\Delta G = RT \ln \frac{I}{L_{A_{\nu_A}B_{\nu_B}}} = RT \ln S \tag{2.11}$$

mit $L_{A \nu A B \nu B}$ Löslichkeitsprodukt des Stoffes $A_{\nu A} B_{\nu B}$ *S* Sättigungsgrad der Lösung (*S* = I/ $L_{A \nu A B \nu B}$)

Ist das Ionenaktivitätsprodukt kleiner als das Löslichkeitsprodukt (S > 1), ist $\Delta G > 0$ und es liegt eine übersättigte Lösung vor. Im Fall S = 1, wird $\Delta G = 0$, und die Lösung ist gesättigt. Wenn S < 0 ist, handelt es sich um eine untersättigte Lösung mit $\Delta G < 0$.

Im allgemeinen beinhaltet die Bildung von Kristallen aus übersättigter Lösung drei Schritte: Nukleation, Kristallwachstum und Ostwald-Reifung, die in Abb. 2.8 veranschaulicht werden.



Abbildung 2.1: Schritte des Kristallisationsprozess.

- I. Nukleation: Unter Nukleation lässt sich die Bildung von Nukleationskeimen (Nuklei), an denen spontanes Kristallwachstum stattfinden kann, verstehen. Es wurde nachgewiesen, dass metastabile Phasen wie z.B. amorphe (flüssig-kondensierte) Phasen als erste Nukleationsprodukte von kristallinen Verbindungen auftreten.^[35-40] Die Nukleation kann ersten Grades oder zweiten Grades sein. Die Nukleation ersten Grades findet in Systemen statt, die keine kristallinen Stoffe enthalten. Bei der Nukleation zweiten Grades findet die Bildung der Nuklei in der Nähe von Kristallen in einem übersättigten System statt. Die Nukleation ersten Grades kann sich homogen (spontan) oder heterogen (durch einen Fremdkörper induziert) ereignen. Häufig ist die Nukleation, die zu einer Kristallbildung führt, heterogener Natur.^[22]
- II. Kristallwachstum: Das Kristallwachstum ist als Prozess der Anlagerung von Material auf die gebildeten Nuklei zu verstehen.

III. Ostwald-Reifung: Die Ostwald-Reifung beschreibt einen Prozess, bei dem sich große, weniger lösliche Kristalle auf Kosten von kleinen, besser löslichen Kristallen bilden. Dieses Phänomen kann durch die Verminderung des Kontaktwinkels zwischen Kristall und Lösemittel bei einem großen Kristall im Vergleich zu einem kleinen erklärt werden, da die Grenzflächenspannung zwischen Kristall und Lösemittel kleiner wird.

2.1.2 Nukleation

Ein Nukleus entsteht durch Wechselwirkungen von Ionen (oder Molekülen), die einen Cluster von kritischer Größe bilden. Die Teilchenzahl, die für die Bildung eines Nukleus, erforderlich ist, erstreckt sich von zehn bis zu mehreren tausend.^[41] Die Bildung eines Nukleus kann als eine Reihe von bimolekularen Additionsreaktionen verstanden werden:

$$A + A \rightleftharpoons A_{2}$$

$$A_{2} + A \rightleftharpoons A_{3}$$

$$\vdots$$

$$A_{j-1} + A \rightleftharpoons A_{j}$$

$$A_{j} + A \rightleftharpoons A_{j+1}$$

$$(2.12)$$

Die Entstehung von stabilen Nuklei erfordert das Überwinden einer Energiebarriere, die wie folgt berechnet werden kann. Die Änderung der Freien Reaktionsenthalpie ΔG_j setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen: 1. Der Freien Enthalpie des Festkörper $\Delta G_{\text{Festk.}}$ (für große Partikel mit dem Radius $r \rightarrow \infty$), die der Energiedifferenz zwischen Festkörper und der gelösten Partikel entspricht. 2. Der Freien Oberflächen-Enthalpie $\Delta G_{\text{Oberfl.}}$, die der Arbeit, die verrichtet werden muss, um eine Oberfläche zu bilden, entspricht. Für sphärische Nuklei mit dem Radius r kann ΔG_j als Gl. 2.13 ausgedrückt werden:^[22]

$$\Delta G_{\rm j} = \Delta G_{\rm Festk.} + \Delta G_{\rm Oberfl.} = \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_{\rm v} + 4\pi r^2 \gamma \qquad (2.13)$$

mit

γ

Grenzflächenspannung

 ΔG_{υ} Energiedifferenz zwischen der festen Phase und der Lösung pro Volumeneinheit

 ΔG_{v} , das für übersättigte Lösungen negativ ist, kann als Gl. 2.14 geschrieben werden:

$$\left|\Delta G_{\nu}\right| = \frac{k_{\rm B}T\ln S}{\upsilon} \tag{2.14}$$

mit	$k_{ m B}$	Bolzmannkonstante ($1.38 \cdot 10^{-23}$ J/mol)
	υ	Volumen eines Nukleus ($v = V/N_A$; V = mol. Vol.; N_A = Avogadro
		Konstante)
	S	Sättigungsgrad (Siehe Gl. 2.11)

Wie in Abb. 2.9 gezeigt wird, erreicht die Freie Reaktionsenthalpie ΔG_j während des Wachstums eines Nukleus ein Maximum ΔG_j^* bei dem Radius r^* . Das Maximum wird kritische Nukleationsenthalpie und der Radius r^* als kritischer Nukleationsradius bezeichnet. Nachdem das Maximum überwunden ist, nimmt ΔG_j wieder ab und das Kristallwachstum setzt ein. Das Maximum der Freien Reaktionsenthalpie kann durch die erste Ableitung der Gl. 2.13 berechnet werden:



$$r^* = -\frac{2\gamma}{\Delta G_v} \tag{2.15}$$

Abbildung 2.2: Änderung der Freien Reaktionsenthalpie bei der Bildung eines Nukleus als Funktion des Radius r.^[22]

Durch Einsetzen von Gl. 2.15 in Gl. 2.13 und anschließender Substitution mit Gl. 2.14 wird für eine übersättigte Lösung (mit $\Delta G_{\nu} < 0$) eine Gleichung für ΔG_{j}^{*} erhalten:

$$\Delta G_{j}^{*} = \frac{16\pi\gamma^{3}\upsilon^{2}}{3(k_{\rm B}T\ln S)^{2}}$$
(2.16)

Durch Einsetzen des Ausdrucks für ΔG_j^* in die Arrhenius-Gleichung ($J = A \exp[-\Delta G_j^*/k_BT]$) wird ein Ausdruck für die Nukleationsrate J erhalten:

$$J = A \exp\left[-\frac{16\pi \gamma^{3} \upsilon^{2}}{3k_{\rm B}^{3} T^{3} (\ln S)^{2}}\right]$$
(2.17)

10

mit A Präexponentieller Faktor (Effizienz der Partikel-Kollisionen)

Die Nukleationsrate ist ein Maß für die Anzahl der Nuklei, die pro Zeit- und Volumeneinheit gebildet werden.

Als letzte Überlegung zur Nukleation sollte die Ostwald'sche Phasenregel betrachtet werden. Sie besagt, dass bei sehr schneller Abkühlung einer Lösung anorganischer Salze eine thermodynamisch weniger stabile (bzw. besser lösliche) Form des Salzes begünstigt ausfällt. Es wird dabei von einer kinetischen Kontrolle der Fällungsreaktion gesprochen.^[22]

2.1.3 Kristallwachstum

Das Wachstum von Kristallen ist ein komplizierter Vorgang, für den zahlreiche unterschiedliche Theorien entwickelt wurden, die erklären, wie ein Kristall gebildet wird. Die Theorien können in zwei Gruppen gegliedert werden, in die Theorien der Grenzflächenenergie und in die Diffusionstheorien.

Die Theorien der Grenzflächenenergie basieren auf dem Prinzip, dass die endgültige Form, die ein Kristall annimmt, eine Minimierung seiner Grenzflächenenergie zur Folge hat. D.h. der Kristall nimmt die Form mit der minimalen Grenzflächenenergie an.

Die Grundlage der Diffusionstheorien ist die kontinuierliche Ablagerung von Material auf einer Kristallfläche in einer Rate, die proportional zu der Differenz der Konzentration am Ablagerungspunkt und der Konzentration der restlichen Teilchen in Lösung ist (z.B. Ionen, Atome oder Moleküle).^[41] Volmer postulierte, dass das Kristallwachstum durch eine *"layer-bylayer*"-Ablagerung (Schicht für Schicht) stattfindet. Dabei kommen die Einheiten, aus denen der Kristall aufgebaut ist (Ionen, Atome oder Moleküle), an der Oberfläche des Kristallgitters an und können frei auf ihr wandern. Außerdem besteht ein Gleichgewicht zwischen den Teilchen, die Schichten erzeugen und den Teilchen in Lösung. Die Teilchen werden an den aktiven Stellen, d.h. Stellen, an denen die Anziehungskräfte maximal sind, fixiert. Die Theorie besagt, dass sich ein Oberflächen-Nukleus bilden muss, bevor der Kristall weiter wachsen kann. Diese Sachverhallte können thermodynamisch, analog zu den in Abschnitt 2.3.2 diskutierten, erklärt werden. So muss zuerst eine kritische Partikelgröße und eine kritische Freie Reaktionsenthalpie ΔG_j^* erreicht werden, bevor das Wachstum an der Kristalloberfläche stattfinden kann. Der Oberflächen-Nukleus wird dabei als eine Scheibe mit dem Radius *r* und der Höhe *h* beschrieben:

$$\Delta G_{i} = \upsilon \Delta G_{\nu} + a\gamma = \pi r^{2} h \Delta G_{\nu} + 2\pi r h\gamma \qquad (2.19)$$

mit *a* Fläche des Nukleus

υ Volumen des Nukleus

 ΔG_{v} Siehe Gl. 2.14

Unter Berücksichtigung der Überlegungen in Abschn. 2.3.2 lässt sich der kritische Radius r^* als:

$$r^* = -\frac{\gamma}{\Delta G_{\nu}} \tag{2.20}$$

und die Energiebarriere ΔG_{j}^{*} als:

$$\Delta G_{j}^{*} = \frac{\pi h \gamma^{2}}{\Delta G_{v}} \tag{2.21}$$

schreiben. Durch Substitution von Gl. 2.14 mit Gl. 2.21 wird Gl. 2.22 erhalten:

$$\Delta G_{\rm j}^{*} = \frac{\pi h \gamma^2 \upsilon}{k_{\rm B} T \ln S} \tag{2.22}$$

Im Vergleich zu der in Abschn. 2.3.2 dreidimensionalen Nukleation benötigt das zweidimensionale Kristallwachstum einen geringeren Sättigungsgrad bei gleichen Reaktionsbedingungen, was durch Vergleich von Gl. 2.16 mit Gl. 2.22 festgestellt werden kann.

Abb. 2.10 zeigt Pfade der Kristallisation unter thermodynamischer und kinetischer Reaktionskontrolle. Ob ein System einem Ein-Schritt-Mechanismus (Pfad A), oder einem sequentiellen Verlauf (Pfad B) folgt, hängt von der Freien Aktivierungsenthalpie ΔG (n = Nukleation, g = Kristallwachstum und t = Phasentransformation) ab. Daraus lässt sich schließen, dass durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen wie z.B. durch Variation der Temperatur oder des Sättigungsgrades einer Lösung thermodynamisch weniger stabile Phasen - wie z.B. einen metastabilen amorphen Zustand - gebildet werden können.



Abbildung 2.3: Kinetischer und thermodynamischer Verlauf einer Fällungsreaktion.^[42]

2.1.4 Alternativer Mechanismus der Kristallisation

Neuste Studien haben gezeigt, dass eventuell eine Alternative zum klassische Kristallisationsprozess existiert. Es wurde postuliert, dass Prä-Nukleations-Cluster eine mögliche Rolle bei der Bildung eines Nukleus spielen können. Gebauer *et al.*^[43] haben bei der Untersuchung der Kristallisation von Calciumcarbonat nachweisen können, dass stabile Prä-Nukleations-Cluster noch vor Erreichen der Sättigungsgrenze vorhanden sind. Die Existenz solcher Cluster konnte von Pouget *et al.*^[44] bestätigt werden, die diese mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) visualisiert haben.

Die klassische Theorie bietet ein einfaches Verständnis des Wachstums von Kristallen. Die Nukleation findet durch das Überwinden einer Freien Enthalpie-Barriere statt, die ihren Ursprung in dem Kontakt zwischen dem Nukleus und seiner Umgebung hat. Die Theorie geht von der Annahme aus, dass Nuklei Molekül um Molekül wachsen (siehe Abb. 2.11). Während des Wachstums nimmt die Gibbs'sche Freie Reaktionsenthalpie zu, bis sie ein Maximum bei der kritischen Clustergröße erreicht. Oberhalb der kritischen Clustergröße sind die Nuklei stabil und setzen Energie beim Wachstum frei (siehe Abb. 2.9).



Abbildung 2.4: Klassischer (oben) und alternativer (unten) Mechanismus der Kristallbildung. Modifiziert nach [45].

Während ihrer Forschung der Kristallisation von Calciumcarbonat gelang es Gebauer *et al.* langlebige Prä-Nukleations-Cluster mit dem Durchmesser von 2 nm und einer Clustergröße von 70 Ionen (Ca²⁺ und CO₃²⁻) zu beobachten, deren Wachstum sie durch Kollision und anschließender Koaleszenz erklären. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu der klassischen Nukleationstheorie, die annimmt, dass ein Nukleus die gleiche Struktur wie ein Stück des Festkörpers hat, den es aufbaut und dessen Oberfläche dieselbe Grenzflächenspannung zum Lösemittel hat wie der Festkörper. Wenn stabile Prä-Nukleations-Cluster existieren, müssen sie in einem energetischen Minimum liegen, was in klarem Widerspruch zur klassischen Theorie steht.^[43] Dieses Minimum kann möglicherweise durch eine unterschiedliche Struktur von Cluster und Festkörper erklärt werden.

Über die mögliche Struktur der Prä-Nukleations-Cluster wird noch spekuliert, und es stehen mehrere Vorschläge im Raum. Eine Möglichkeit ist, dass bei den Clustern die Ionen in einem Kristallgitter vorliegen. Wenn dies der Fall ist, stellt sich die Frage, wieso die Cluster aus ca. 70 Ionen weder schrumpfen noch wachsen. Alternativ kann die Struktur anders geordnet als die des Festkörpers sein, wodurch das Wachstum der Cluster gehemmt werden würde. Bei Calciumcarbonat handelt es sich um einen polymorphen Stoff, der in sechs unterschiedlichen Kristallstrukturen vorkommen kann. Amorphes Calciumcarbonat (AAC) ist das erste Polymorph, das nach einer Nukleation gebildet wird.^[35] AAC hat keine Fern-Ordnung, jedoch häufig eine Nah-Ordnung, die oft die Kristallstruktur nach der Kristallisation festlegt.^[46] Dadurch entsteht die Vermutung, dass die Prä-Nukleations-Clustern ebenfalls amorph sind.^[43] Jedoch bleibt bei dieser Vermutung wieder die Frage offen, wieso die Cluster weder schrumpfen noch wachsen. Ein weiterer Vorschlag besagt, dass die Prä-Nukleations-Cluster von Calciumcarbonat von einer anderen Spezies (z.B. einer Verunreinigung) stabilisiert werden. Diese Überlegung würde eine Erklärung für die Stabilisierung der Cluster in einem energetischen Minimum liefern, die nicht der klassischen Theorie widerspricht. Verunreinigungen können präparativ so gut wie nicht ausgeschlossen werden. Gebauer et al. haben somit einen Mechanismus für die Nukleation von Calciumcarbonat für ein reales System gefunden, bei dem sich die Prä-Nukleations-Cluster durch Koaleszenz zu AAC aggregieren, das allmählich zu einem thermodynamisch stabileren Polymorph (Phase) kristallisiert.

2.1.5 Einfluss von Additiven auf die Kristallisation

Die Natur bildet Hybridmaterialien aus einer Kombination von einer weichen organischen und einer harten anorganischen Komponente für verschiedene Zwecke, wie z.B. zur mechanischen Unterstützung, als Werkzeuge oder zum Schutz vor Angreifern. Diese Biomineralien, wie Knochen, Zähne, Schalen (z.B. Eierschalen, Muschelschalen) und Korallen, kombinieren oft eine faszinierende Form mit hervorragenden mechanischen Eigenschaften, was das Resultat einer hochgradigen Kontrolle über die Struktur, Größe, Morphologie und Anordnung von Kristalliten ist.^[20,21,42,44,47,48] Biogene Makromoleküle können nicht nur, wie zuvor beschrieben, als Matrix oder Templat zur Mineralisation dienen, sondern sich auf die Nukleation und das Kristallwachstum von anorganischen Stoffen auswirken. Dabei kann die Nukleation und das Kristallwachstum gefördert oder gehemmt (inhibiert) werden. Der menschliche Körper setzt z.B. Osteopontin, Citrat oder das Tamm-Horsfall-Protein ein, um die Bildung von Nierensteinen zu vermeiden.^[4,28]

Zahlreiche Arbeitsgruppen widmen ihre Forschung der Untersuchung des Einflusses von biomimetischen Additiven auf die Kristallisation von anorganischen Verbindungen. So wurde der Templateffekt und der Einfluss als Additiv von unterschiedlich funktionalisierten Latexpartikeln auf die Kristallisation von Zinkoxid^[47], Hydroxylapatit^[49] und Titanoxid^[50] untersucht. Muñoz-Espí et al. setzten die Latexpartikel als Additive ein. Sie konnten zeigen, dass eine Variation der Funktionalisierung der Latexpartikel zwar das Kristallwachstum und die Morphologie von Zinkoxid sehr stark beeinflussen,^[47] jedoch die Perfektion der Kristalle wenig gestört wird.^[51] Ethirajan et al. gelang es erfolgreich, Hydroxylapatit auf der Oberfläche der funktionalisierten Latexpartikel abzuscheiden und den Templateffekt der Latexpartikel zu belegen. Lu et al. verfolgten das Ziel, mesoporöses Titanoxid zu erhalten. Zu diesem Zweck erfolgte eine Ablagerung von Titanoxid auf der Oberfläche von funktionalisierten Latexpartikeln, die anschließend getrocknet und calciniert wurde. Des Weiteren wurde der Einfluss von synthetisierten Aminosäuresequenzen auf die Nukleation und das Kristallwachstum von Calciumcarbonat untersucht.^[52] Gebauer et al. konnten nachweisen, dass mit der Aminosäuresequenz das Kristallwachstum von Calciumcarbonat gesteuert und dadurch unterschiedliche Polymorphe erzeugt werden können. Außerdem gelang es ihnen, durch den Peptidzusatz die Nukleation von Calciumcarbonat zu beeinflussen, wodurch verschiedene Strukturen der Prä-Nukleations-Cluster entstanden.

Für den Einfluss von Additiven auf die Mineralisation von anorganischen Kristallen hat Cölfen einen Mechanismus vorgeschlagen.^[20] In Abbildung 2.5 ist das Schema der Kristallisation mit und ohne Additiv zu sehen. Pfad a) zeigt dabei den Mechanismus der klassischen Kristallisationstheorie, wie er in Abschn. 2.3.1 – 2.3.3 beschrieben ist. Bei Pfad b) handelt es sich um eine Variation der klassischen Theorie, bei der sich die nach dem Wachstum gebildeten Kristallite mesoskopisch anordnen. Dabei entsteht ein iso-orientierter Kristall, der dieselbe Form hat wie die Kristallite, aus denen er aufgebaut ist. Die nanokristallinen Einheiten, aus denen der iso-orientierte Kristall aufgebaut ist, können an den Kontaktflächen verschmelzen (sog. *lock in and fuse*), wodurch ein Einkristall entsteht. Sind Additive in der Kristallisationslösung vorhanden (Pfad c)), so adsorbieren sie an der Oberfläche der gebildeten Kristallite. Nach einer Selbstanordnung (*self-assembly*) der von Additiv bedeckten Kristallite entsteht ein Mesokristall, der aufgrund der bereits ausgerichteten Einheiten zu einem iso-orientierten Kristallite mit Mesokristall, und schließlich (Pfad b)) zu einem Einkristall verschmilzt.





Der Einsatz von Additiven kann sich nicht nur auf den Kristallisationsmechanismus, sondern auch auf die Morphologie von Kristallen auswirken. Jongen *et al.* haben bei ihrer Studie über Kupferoxalat zeigen können, wie sich die Konzentration von Hydroxymethylpropylcellulose (HPMC) auf die Morphologie von Kupferoxalat auswirkt.^[53] Sie konnten zeigen, dass HMPC flächenspezifisch an den Kristalliten von Kupferoxalat adsorbiert (Abbildung 2.6).



Abbildung 2.6: Einfluss der Konzentration von HMPC auf die Morphologie von Kupferoxalat.^[42]

Bei geringer Konzentration an HPMC wird ein kubischer Mesokristall statt einem quaderförmigen Kristall gebildet. Dabei lagern sich durch Selbstorganisation (*self-assembly*) die Kristallflächen aneinander, die nicht mit HPMC bedeckt sind. Wird die Konzentration von HMPC weiter erhöht, bilden sich stäbchenförmige Mesokristalle. Dieser "Stück für Stück" (*brick by brick*)-Mechanismus wurde in einer zeitabhängigen Studie experimentell belegt.^[42]

2.2 Calciumoxalat und Struvit

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden Kristallisationsexperimente mit Calciumoxalat und Struvit unter Additivzugabe durchgeführt. In diesem Abschnitt sollen die Strukturen und die Kristallphasen der beiden Mineralien erklärt werden.

2.2.1 Calciumoxalat

Calciumoxalat kommt in der Natur häufig in Pflanzen (z.B. Blätter, Wurzel, Rinde) und als Ablagerungen in tierischen und menschlichen Organen vor.^[5,6,12,54] Es sind drei unterschiedliche kristalline Phasen von Calciumoxalat bekannt. Das thermodynamisch stabile Calciumoxalat Monohydrat (Whewellit oder COM, $CaC_2O_4 \cdot H_2O$) und die metastabilen kristallinen Phasen Calciumoxalat-Dihydrat (Wheddellit oder COD, $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$) sowie Calciumoxalat-Trihydrat (Caoxit oder COT, $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$) (Abbildung 2.7).



Abbildung 2.7: Thermodynamische Stabilität und Löslichkeit von COM, COD und COT.

Es hängt stark von dem Sättigungsgrad der Lösung S_i und dem Verhältnis R_i zwischen $c(\text{Ca}^{2+})$ und $c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-})$ ab, welche der Modifikationen gebildet wird (Abbildung 2.8. a)).



Abbildung 2.8: a) Abhängigkeit der Kristallphase von S_i und R_i (eCOD = längliche COD-Kristalle).^[22] b) Löslichkeit von COM, COD und COT in Abhängigkeit von der Elektrolytkonzentration.^[18]

Cody und Cody konnten zeigen, dass die Löslichkeit der drei Kristallmodifikationen durch Zugabe eines Elektrolyten (Leitsalzes) wie z.B. Natrium- oder Kaliumchlorid erhöht werden kann (Abbildung 2.8 b).^[18] Die metastabilen Phasen COD und COT wandeln sich mit der Zeit in das thermodynamisch stabile COM um, wie in Abbildung 2.9 zu erkennen ist.



Abbildung 2.9: Umwandlung von COD und COT in COM in Abhängigkeit von der Zeit.^[22]

Während der Diplomarbeit wurden COD- und COT-Kristalle erhalten. COT kristallisiert in einem triklinen und COD in einem tetragonal bipyramidalen Kristallsystem (Abbildung 2.10).^[14,15]



Abbildung 2.10: a) Kristallstruktur von COT.^[55] b) und c) Kristallsystem von COD.^[14]

Bei idealen COD-Kristallen ist die [100]-Fläche nicht ausgebildet. Zhang *et al.*^[14] konnten zeigen, dass unter Zusatz von PEG-*b*-PMMA (Polyethylenglycol-*block*-Polymethacrylsäure) die [100]-Fläche stärker wächst und elongierte COD-Kristalle (eCOD) (längliche tetragonale Prismen mit pyramidalen Enden) gebildet werden können. Die Bildung dieser eCOD-Kristalle wird außerdem, wie in Abbildung 2.8 a) gezeigt wird, durch den Sättigungsgrad der Lösung und dem Verhältnis zwischen $c(Ca^{2+})$ und $c(C_2O_4^{2-})$ beeinflusst, was von Zhang *et al.* bestätigt werden konnte.

2.2.2 Struvit

Struvit oder Ammoniummagnesiumphosphat Hexahydrat (MgNH₄PO₃ · 6H₂O), das aus dem klassischen Trennungsgang als Nachweis für Magnesiumionen bekannt ist, kommt häufig in industriellen Abwässern als Ablagerungen vor.^[56] Es ist jedoch auch als ein Bestandteil von Nierensteinen von Tieren (Hunden und Katzen) und Menschen zu finden.^[4,19] Struvit kommt nur in einer Modifikation vor und kristallisiert als rhombische Kristalle mit prismatischer Form (Abbildung 2.11) vor. Bei einer hohen Konzentration von Mg²⁺- oder NH₄⁺-Ionen können diese Prismen verwachsen und gekreuzte, scherenartige oder verästelte X-Formen bilden.^[57]



Abbildung 2.11: Kristallstruktur von Struvit.^[19]

2.3 Mikrowellengesteuerte Festphasen-Peptidsynthese

Die mikrowellengesteuerte Festphasen-Peptidsynthese (FPPS) stellt eine einfache Alternative zur klassischen organischen Synthese von Peptiden dar und ist mit der Verwendung eines Peptidsynthesizers verknüpft. Der Peptidsynthesizer wird von vielen Forschungsgruppen zur Synthese von Aminosäuresequenzen natürlich vorkommender Polypeptide eingesetzt.^[28,29,52,58-60] Im Rahmen der Diplomarbeit wurden mit einem Peptidsynthesizer (CEM Liberty Peptidsynthesizer) drei unterschiedliche Oligomere der L-Glutaminsäure mit den Kettenlängen von 5, 10 und 20 Monomereinheiten hergestellt. Außerdem wurde ein mit einer Acrylsäure funktionalisiertes 20-mer der L-Glutaminsäure synthetisiert. Abgesehen von der Synthese von Aminosäuresequenzen zeigt die Funktionalisierung von Oligo- und Polypeptiden mit unterschiedlichen Endgruppen die vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten des Peptidsynthesizers.

In diesem Abschnitt werden die Funktionsweise des Peptidsynthesizers und die Vorgänge bei der Festphasen-Peptidsynthese erläutert. Als Grundstoffe für die FPPS wird ein mit einem Monomer substituiertes Harz und eine Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-geschützte Aminosäure (Fmoc-geschützte Aminosäure) benötigt. Das Harz hat die Eigenschaft, in N,N-Dimethylformamid (DMF) in Lösung zu gehen und in Dichloromethan (DCM) wieder auszufallen.

In Abb. 2.2 wird die Strukturformel der eingesetzten Fmoc- und *tert*-Butyl-geschützen L-Glutaminsäure (Monomer) und der entschützten L-Glutaminsäure sowie die Art und Weise der Verknüpfung von Harz und L-Glutaminsäure dargestellt. Das Harz ist über einen Linker mit dem C-terminalen Ende der Fmoc-geschützten L-Glutaminsäure verknüpft, die wie das Monomer eine Permanentschutzgruppe (*tert*-Butyl-Schutzgruppe) an der γ -Carboxylgruppe besitzt. Durch die Permanentschutzgruppe wird ein Wachstum der Oligmomerkette in γ -Position verhindert. Die Funktion der Fmoc-Schutzgruppe, die sowohl das N-terminale Ende



Mit L-Glutaminsäure substituiertes HarzFmoc- und *tert*-Butyl-geschützte L-GlutaminsäureAbbildung 2.12:Eingesetztes Harz und Monomer zur Synthese der Oligo-Glutaminsäure.

des Monomers als auch das N-terminale Ende der mit dem Harz verbundenen L-Glutaminsäure schützt, wird im Zusammenhang mit dem FPPS-Mechanismus erklärt. In Abb. 2.3 werden die Reagenzien, die außer dem Harz und dem Monomer für die FPPS benötigt werden, gezeigt: als Entschützungslösung: eine 20% ige Piperidinlöung in DMF; als eine Aktivatorbase 2 M *N*,*N*-Di-isopropyl-ethylamin (DIPEA) in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) und als Aktivatorlösung [2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetra-methyluroniumhexafluorophosphat] / *N*-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (HBTU / HOBt \cdot H₂O) jeweils 0.5 M in DMF.





Um den Mechanismus der FPPS zu verstehen, wird in Abb. 2.4 die Reaktionskammer des Peptidsynthesizers dargestellt, deren Funktionsweise im Zusammenhang mit dem Reaktionsmechanismus erklärt wird.



Abbildung 2.14: Reaktionskammer des Peptidsynthesizers.^[61]

Abb. 2.5 zeigt das Reaktionsschema der FPPS, das im Folgenden beschrieben werden soll. Im ersten Schritt wird das in DMF gelöste Harz durch die Harz-Transfer-Kanüle in die Reaktionskammer des Peptidsynthesizer eingeleitet. Anschließend wird die Entschützungslösung über den Sprühkopf zugeführt und das Reaktionsgemisch durch die Mikrowelle des Peptidsynthesizers auf die nötige Reaktionstemperatur erhitzt. Dabei erfolgt mit Hilfe von Piperidin, das bei der Entschützungsreaktion zurück gebildet wird, die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, die in CO₂ und 9-Methylenfluoren zerfällt. Darauffolgend wird das Harz mit DCM, das über den Sprühkopf zugeführt wird, ausgefällt und die überschüssige Entschützungslösung sowie die entstandenen Nebenprodukte über den Absaugschlauch aus der Reaktionskammer entfernt. Das Harz bleibt auf Grund des Filters in der Reaktionskammer (siehe Abb.2.4). Danach wird das Harz wieder in DMF gelöst und über die Harz-Transfer-Kanüle abgesaugt. Im zweiten Schritt wird das in DMF gelöste Monomer, die Aktivatorbase und die Aktivatorlösung über den Sprühkopf in die Reaktionskammer eingeleitet. Dabei wird, wie in Abb 2.6 gezeigt, die Fmoc-geschützte L-Glutaminsäure von der nicht nukleophilen Base DIPEA deprotoniert. Anschließend erfolgt eine Aktivierung der L-Glutaminsäure durch einen nukleophilen Angriff des negativ geladenen Sauerstoffatoms der Carboxylgruppe auf das positiv polarisierte N-Atom von HBTU, wobei der reaktive Aktivester der L-Glutaminsäure er-



Abbildung 2.15: Reaktionszyklus der Festphasen-Peptidsynthese.

halten wird. Triebkraft der Reaktion ist die Bildung des stabilen Nebenprodukts Tetramethylharnstoff. Im dritten Schritt wird das Harz durch die Harz-Transfer-Kanüle in die Reaktionskammer geleitet und das Reaktionsgemisch mit Hilfe der Mikrowelle auf die nötige Reaktionstemperatur erhitzt. Die Amidbindung wird durch einen nukleophilen Angriff des freien Amins der mit dem Harz verknüpften L-Glutaminsäure auf das stark polarisierte C-Atom der Carboxylgruppe des Aktivesters (siehe Abb. 2.5) gebildet. Bei diesem Vorgang entsteht als Nebenprodukt HOBt, welches wiederum eventuell noch nicht aktivierte L- Glutaminsäure aktivieren kann. Die Fmoc-Schutzgruppe des Aktivesters sorgt dafür, dass die Amidbindung ausschließlich an der am Harz substituierten L-Glutaminsäure gebildet wird. Im letzten Schritt wird das Harz mit DCM ausgefällt und das Lösemittel mit allen Nebenprodukten und überschüssigen Reagenzien abgesaugt. Im Anschluss wird das Harz mehrfach in DCM gewaschen und erneut in DMF gelöst. In den zuvor beschriebenen drei Schritten ist die Glutaminsäuresequenz um eine Monomereinheit gewachsen und der in Abb. 2.5 dargestellte Reaktionszyklus beginnt von neuem. Die Abspaltung der L-Glutaminsäuresequenz vom Harz und die Entfernung der Permanentschutzgruppen erfolgt manuell durch Zugabe von Trifluoressigsäure, die 2.5%ig an Wasser und 2.5%ig an Triisopropylsilan (TIS) ist. Aufgrund der Trifluoressigsäure



Abbildung 2.16: Mechanismus der Bildung eines reaktiven Aktivesters.

und des Wassers erfolgt eine säurenkatalysierte Esterhydrolyse, bei der die L-Glutaminsäuresequenz am Linker und die Permanentschutzgruppe als *tert*-Butanol abgespalten wird. Das TIS dient dabei als Fänger für evtl. auftretende Spaltungsprodukte des Linkers.

In Abb.2.7. werden die für die Mineralisationsversuche synthetisierten Sequenzen der L-Glutaminsäure dargestellt. Bei Glu20-AS handelt es sich dabei um ein 20-mer der L-Glutaminsäure, das am N-terminalen Ende der Sequenz mit einer Acrylsäure funktionalisiert wurde.



Abbildung 2.17: In der Diplomarbeit synthetisierte Sequenzen der L-Glutaminsäure.

2.4 Synthese von funktionalisierten Nanopartikeln

2.4.1 Theorie der Miniemulsion

Bei einer Miniemulsion handelt es sich um ein Zwei-Phasen-System mit einer einheitlichen Tröpfchengröße zwischen 50 und 400 nm. Dabei lässt sich zwischen zwei Miniemulsionssystemen, der direkten (Öltröpfchen in Wasser) und der indirekten (Wassertröpfchen in Öl) Miniemulsion, unterscheiden. Während der Diplomarbeit wurden funktionalisierte Latexpartikel mit der Miniemulsionspolymerisation hergestellt, der eine direkte Miniemulsion zu Grunde liegt. Die Herstellung der Miniemulsion erfolgte aus zwei Phasen, der dispersen Ölphase und der wässrigen, kontinuierlichen Phase. Die kontinuierliche Phase bestand aus einer wässrigen Lösung des zur Stabilisierung der Tröpfchen benötigten Tensids Lutensol AT50 und dem zur Funktionalisierung benötigten Makromonomer (siehe Abschn. 2.3). Bei Lutensol AT50 handelt es sich um ein nichtionisches, d.h. sterisch stabilisierendes Tensid, das aus einer 50 Einheiten langen, hydrophilen Polyethylenglycol-Kette besteht, die am Ende mit einem lipophilen C-18-Alkohol verethert ist. Die disperse Phase bestand aus Polystyrol, dem Initiator V59 [2,2'-Azobis-(2-methylbutyronitril)] und dem ultrahydrophoben Hexadecan. Die zwei Phasen wurden durch Rühren voremulgiert, wodurch eine thermodynamisch instabile Makroemulsion erzeugt wurde. Die Tröpfchen einer so hergestellten Makroemulsion weisen eine breite Größenverteilung auf. Nach einer längeren Zeit findet eine Phasenseparation durch Koagulation der Tröpfchen statt. Um die instabile Makroemulsion in den metastabilen Zustand der Miniemulsion zu überführen, müssen hohe Scherkräfte angewandt werden.^[62] Diese Kräfte können durch Ultraschall oder einen Hochdruckhomogenisator erreicht werden. Durch die Einwirkung der Scherkräfte finden multiple Verschmelzungs- und Aufspaltungsprozesse statt, bis der Gleichgewichtszustand der metastabilen Miniemulsion erreicht ist.^[63] Dabei dienen das eingesetzte Tensid und das Ultrahydrophob dazu, den destabilisierenden Effekten der Ostwald-Reifung und der Koaleszenz entgegen zu wirken. Die Koaleszenz entsteht durch Kollisionen und anschließender Verschmelzung der Tröpfchen und wird durch den Einsatz des Tensids verhindert.^[64] Das Tensid lagert sich dabei an die Grenzfläche von Wasser und Öltröpfchen an und setzt dadurch die Grenzflächenspannung herab. Des Weiteren werden die Tröpfchen durch die sterischen Wechselwirkungen von Lutensol stabilisiert. Bei einer Miniemulsion wird so viel Tensid wie nötig eingesetzt, um die Koaleszenz der Tröpfchen zu verbefindet sich unterhalb der hindern. Dadurch das System kritischen Mizellenbildungskonzentration (cmc), weswegen keine freien Mizellen vorliegen.^[64] Die Ostwald-Reifung ist das Wachstum von größeren Tröpfchen auf Kosten von kleineren. Triebkraft von diesem Vorgang ist die Verminderung des Laplace-Drucks:

$$p_L = \frac{2\gamma}{r} \tag{2.23}$$

Mit $p_{\rm L}$ Laplace-Druck

 γ Grenzflächenspannung

r Tröpfchenradius

der in kleinen Tröpfchen aufgrund der starken Oberflächenkrümmung herrscht. Dadurch findet eine Diffusion von Monomer aus den kleinen Tröpfchen zu den großen statt, wodurch sie letztendlich verschwinden. Der Zusatz des Ultrahydrophobs verhindert die Ostwald-Reifung, indem es einen osmotischen Druck aufbaut, der dem Laplace-Druck entgegen wirkt. Je unlöslicher das Ultrahydrophob in Wasser ist, desto besser ist seine osmotische Wirkung.^[65]

2.4.2 Theorie der Miniemulsionspolymerisation

Mit Hilfe der Miniemulsionspolymerisation lassen sich Polymerpartikel im Größenbereich von 50-500 nm herstellen. Die Partikel können dabei als Abdruck der Miniemulsionströpfchen bezeichnet werden. Für die Miniemulsionspolymerisation muss zunächst eine Miniemulsion, wie in Abschn. 2.4.1 beschrieben, hergestellt werden.

Im Gegensatz zur Emulsionspolymerisation, die in Mizellen startet und durch Diffusion wächst, findet die Miniemulsionspolymerisation in den gebildeten Nanotröpfchen statt. Diese werden als Nanoreaktoren bezeichnet.^[66]

Die Initiierung der Polymerisation kann entweder mit einen öllöslichen Initiator oder einem wasserlöslichem Initiator durchgeführt werden. Für die Synthese der funktionalisierten Latexpartikel wurde der öllösliche Initiator V59 verwendet. Dieser startet die Polymerisation im Inneren der Nanotröpfchen. Bei der Miniemulsionspolymerisation sind Kettenwachstumspolymerisationen wie radikalische Polymerisation und radikalische Copolymerisation oder auch Stufenwachstumspolymerisationen wie Polyaddition oder Polykondensation möglich. Bei der in Abbildung 2.18 dargestellten Synthese von funktionalisierten Latexpartikeln wird die radikalische Copolymerisation angewendet.



Abbildung 2.18: Schema der durchgeführten Miniemulsionspolymerisation zur Funktionalisierung von Latexpartikeln.

3 Analysemethoden

3.1 Funktionsweise der Calciumionen-selektiv-Elektrode

Die ionenselektive Messtechnik stellt ein Analyseverfahren dar, das oftmals gegenüber anderen Verfahren Vorteile wie z.B. ein schnelleres Erreichen von Messergebnissen, die Möglichkeit in trüben und farbigen Lösungen zu messen, die mit Verfahren wie der Photometrie nicht messbar sind, und verhältnismäßig geringe Anschaffungskosten bietet. Der Anwendungsbereich erstreckt sich von Landwirtschaft, Lebensmitteltechnologie und Umweltanalytik bis hin zu klinischen Anwendungen.^[67] Selbstverständlich hat dieses Verfahren auch Nachteile wie eine Messungenauigkeit mit einem Fehler von 2 - 5%, was für die meisten Anwendungen jedoch ausreichend ist und durch Mittelwertbildung aus mehreren Messungen minimiert werden kann. Des Weiteren können organische Stoffe mit dieser Messtechnik nicht erfasst werden. Die besondere Stärke des Verfahrens liegt damit in der Bestimmung von Salzen.

Ionen-selektive-Elektroden (ISE) werden aufgrund ihres Aufbaus und ihrer Funktionsweise in vier Typen unterteilt: 1. Elektroden mit Glasmembran, 2. Elektroden mit Festkörpermembran, 3. Elektroden mit Polymermatrixmembran und 4. gassensitive Elektroden. In dieser Arbeit wurde eine Ca²⁺-selektive Polymermatrixmembranelektrode DC240 von Mettler Toledo mit integrierter Referenzelektrode verwendet, deren Funktionsweise in diesen Abschnitt erklärt werden soll.

Abb. 2.1 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten Ca²⁺-ISE. In der Hauptkammer befindet sich die Arbeitselektrode und die Kammer der Referenzelektrode, die von einem Brückenelektrolyt, einer 3 M KCl-Lösung, umhüllt sind, der außerdem an das Schliffdiaphragma der Referenzelektrodenkammer und die Polymermatrixmembran grenzt. In der Referenzelektrodenkammer befindet sich der Referenzelektrolyt - ebenfalls eine 3 M KCl-Lösung - der die Referenzelektrode umhüllt. Die Polymermatrixmembran besteht aus Polyvinylchlorid (PVC), in das Ionophore, d.h. organische Verbindungen, die selektiv mit Ca²⁺-Ionen Komplexe bilden, eingeschlossen sind:^[68]

$$Ca^{2+}(aq) \Longrightarrow [Ca^{2+}]_{Membrankomplex}$$

$$K_{MWG} = \frac{[\mathrm{Ca}^{2^+}]_{\mathrm{Membrankomplex}}}{[\mathrm{Ca}^{2^+}]} \Longrightarrow [\mathrm{Ca}^{2^+}] K_{MWG} = [\mathrm{Ca}^{2^+}]_{\mathrm{Membrankomplex}}$$
(2.1)

mit

[Ca²⁺]_{Membrankomplex}

 $[Ca^{2+}]$

Konzentration der Calciumionen in Lösung Konzentration der komplexierten Calciumionen



Abbildung 3.1: Ca²⁺-ISE (DC240) mit integrierter Referenzelektrode.

Wird die Ca²⁺-ISE in eine Messlösung getaucht, so werden gemäß Gl. 2.1, in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Ionenkonzentration, Ca²⁺-Ionen von der Polymermatrixmembran komplexiert, wodurch diese positiv geladen wird. Die Cl⁻-Ionen des Brückenelektrolyts lagern sich von der anderen Seite an die Polymermatrixmembran an, um die positive Ladung auszugleichen. Dadurch entsteht ein Überschuss an K⁺-Ionen, der von der Arbeitselektrode erfasst werden kann. Die gemessene Spannung entspricht der Potentialdifferenz zwischen der Arbeits- und der Referenzelektrode, die als Bezugspunkt für die Arbeitselektrode dient:^[68]

$$E = E_0 + \frac{RT}{z_i F} \ln a_i$$

bzw.:
$$E = E_0 + 2.303 \frac{RT}{z_i F} \log a_i$$
 (2.2)

mit E Potentialdifferenz zwischen Arbeits- und Referenzelektrode

 E_0 Standardpotential (für $a_{Ca}^{2+} = 1$)

- *R* ideale Gaskonstante ($\mathbf{R} = 8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
- *T* absolute Temperatur in Kelvin
- *F* Faradaykonstante ($F = 9.649 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$)

$$z_i$$
 Ladung des Messions i ($z_{Ca}^{2+} = 2$)

2.303 Umrechnungsfaktor vom natürlichen zu dekadischem Logarithmus

a_i Aktivität der Messionen

In Gl. 2.2 (Nernst'sche Gleichung) lässt sich erkennen, dass die Potentialdifferenz nicht nur von der Konzentration und Ladung des Messions abhängt, sondern auch von der Temperatur des Systems. Deswegen ist es sinnvoll, die Kalibrierung und die Messungen bei der gleichen Temperatur durchzuführen. Wird die gemessene Spannung *E* gegen $log(a_i)$ aufgetragen, ergibt sich eine Gerade mit der Steigung (2.303 · (*RT*/zF)), die für die Berechnung der Ionenkonzentration bei einer Einpunktkalibrierung herangezogen wird. In der Diplomarbeit wurde eine Dreipunktkalibrierung für die Konzentrationen $c_{Ca}^{2+} = 10$, 1 und 0.1 mmol/L durchgeführt. Das Ionometer (MettlerToledo SevenMulti S47), mit dem die Messwerterfassung erfolgte, berechnet intern die Steigung zwischen zwei benachbarten Messpunkten und multipliziert sie mit einem Korrekturfaktor, so dass die theoretische Steigung (2.303 · (*RT*/zF)) erreicht wird. Dies ist wichtig für Messwerte die außerhalb des Kalibrierbereichs liegen.

Gl. 2.2 zeigt außerdem, dass die Potentialdifferenz nicht unmittelbar von der Konzentration, sondern von der Aktivität der Messionen abhängt. Die Ionenaktivität ist bei geringen Konzentrationen annähernd 1. Für hohe Konzentrationen ändert sich dies jedoch, da sich die Ionen bei hohen Konzentrationen gegenseitig behindern und ihre Mobilität einschränken. Die Lösung verhält sich dann so, als wäre ein Teil der gelösten Ionen nicht mehr vorhanden. Die Aktivität ist damit ein Maß für die Konzentration an wirksamen Ionen in Lösung:

$$a_{i} = f_{i} \cdot c_{i} \tag{2.3}$$

mit c_i Konzentration des Messions i f_i Aktivitätskoeffizient des Messions i

Der Aktivitätskoeffizient ist konzentrationsabhängig und nähert sich mit zunehmender Verdünnung dem Wert $f_i = 1$ an, wodurch die Aktivität mit der Konzentration gleich wird. Mit zunehmender Konzentration weicht f_i immer mehr von 1 ab. Des Weiteren ist der Aktivitätskoeffizient von der Ladung der gelösten Ionen abhängig. Ein Maß dafür ist die Ionenstärke *J*:

$$J = \frac{1}{2} \sum c_{i} \cdot z_{i}^{2} \tag{2.4}$$

Für den Aktivitätskoeffizienten ergibt sich daraus:

$$\log f_i = A\sqrt{J} \tag{2.5}$$

mit A konstanter Faktor

In Gl. 2.5 lässt sich der Zusammenhang zwischen der Aktivität und Ionenstärke aller gelöster Ionen erkennen. Durch Zugabe einer Ionenstärke-Adjustier-Lösung (ISA-Lösung) zu Kalibrier- und Messlösungen wird in allen Fällen derselbe Aktivitätskoeffizient erzeugt. Als ISA- Lösung wurde in der Diplomarbeit eine 3 M KCl-Lösung verwendet. Dadurch lässt sich in Gl. 2.2 die Konzentration c_i statt der Aktivität a_i zur Berechnung der Potentialdifferenz einsetzen.

Bei Gl. 2.2 wird davon ausgegangen, dass sonstige gelöste Ionen die Messung nicht beeinträchtigen. Die Polymermatrixmembran ist Ca²⁺-Ionen-selektiv, jedoch nicht Ca²⁺-Ionenspezifisch. Außer Ca²⁺-Ionen können Störionen von der Polymermatrixmembran komplexiert werden. Die Nikolsky-Eisenman-Gleichung berücksichtigt diese Störionen:^[68]

$$E = E_0 + 2.303 \frac{RT}{z_i F} \log(a_i + \sum_{a_j \neq a_i} K_{i/s} a_j^{z_i/z_j})$$
(2.6)

Z_i	Ladung des Messions i $(z_{Ca}^{2+}=2)$
Z.j	Ladung der Störionenarten
a_i	Aktivität der Messionen
a_j	Aktivität der Störionenarten
K _{i/s}	potentiometrischer Selektivitätskoeffizient

mit

Gl. 2.6. zeigt, dass die gemessene Potentialdifferenz zusätzlich von den Aktivitäten der Störionenarten sowie von deren potentiometrischen Selektivitätskonstanten abhängig ist. Dabei ist $K_{i/s}$ für jede Störionenart spezifisch und hängt von dem Verhältnis der Konzentration von Mession zu Störion ab. Somit ist $K_{i/s}$ ein Maß dafür, wie selektiv die Polymermatrixmembran Ca²⁺-Ionen komplexiert. Als Störionen bei Ca²⁺-Ionen-selektiven Messungen kommen Pb²⁺-, Hg²⁺-, Cu²⁺-, Ni²⁺- und Mg²⁺-Ionen in Frage.^[69]

3.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie beruht auf den Wechselwirkungen zwischen dem Elektronenstrahl und der Probe. Dabei rastert der Elektronenstrahl die Probe ab, wodurch es zur Rückstreuung oder zur Bildung von Röntgenstrahlen, Sekundär- und Auger-Elektronen kommt, die detektiert werden können. Die detektierten Signale geben einen Aufschluss über die Oberfläche, Struktur und chemische Zusammensetzung der Probe. Als Elektronenquellen werden dabei Schottky-, Glüh-, oder Feldemissionskathoden eingesetzt. Die Beschleunigungsspannung der Elektroden liegt dabei bei 0.1 – 50 kV. Der Elektronenstrahl wird gebündelt und anschließend über Spulen abgelenkt, so dass die Probe in einem Raster abgefahren wird. Die dabei entstehende Rückstreuung wird von einem Detektor erfasst. Zur Signalerfassung werden meistens Detektoren für Rückstreuelektronen oder Sekundärelektronen verwendet. Die Analyse mit Hilfe der REM muss im Hochvakuum durchgeführt werden. Dabei hängt es von der Orientierung der Probe ab, ob Sekundärelektronen entstehen und Rückstreuung auftritt. Aufgrund dieser Abhängigkeit können dreidimensionale Bilder der Oberfläche der untersuchten Probe erzeugt werden.

3.3 Röntgenbeugung

Die Abstände der Atome in einem Kristallgitter liegen in der Größenordnung der Wellenlängen von Röntgenstrahlen. Aus diesem Grund sind Röntgenstrahlen zur Untersuchung von Atomabständen geeignet. Dabei wirken die Kristalle als ein dreidimensionales Beugungsgitter. Trifft die Röntgenstrahlung in einem Einfallswinkel θ auf ein Kristallgitter und wird mit einem Ausfallswinkel, der ebenfalls θ entspricht, reflektiert, sind die Bragg'schen Bedingungen erfüllt:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \tag{3.1}$$

mit λ Wellenlänge der RöntgenstrahlungdAbstand der Netzebenen

Die Weglänge der an den benachbarten Netzebenen reflektierten Röntgenstrahlung muss ein ganzzahliges Vielfaches von λ betragen, damit es zu konstruktiver Interferenz kommt. Ist dies nicht der Fall, kommt es zur Auslöschung (destruktive Interferenz). Das heißt, dass die Reflektion winkelspezifisch ist. Zwischen den Miller'schen Indizes und dem Abstand der Netzebenen *d* existieren unterschiedliche Beziehungen, die von der Symmetrie des Kristalls abhängen. Mit Hilfe dieser Beziehungen können letztlich Aussagen über die Kristallstruktur getroffen werden. Es kann zwischen drei Verfahren der Röntgenstrukturanalyse unterschieden werden: dem Drehkristallverfahren, dem Laue-Scherrer-Verfahren und dem in der Diplomarbeit verwendeten Debye-Scherrer-Verfahren. Bei diesem Verfahren wird ein Kristallpulver mit monochromatischer Strahlung bestrahlt. Aufgrund der fein verteilten Kristalle liegen alle Kristalleben in dem für die Reflektion benötigten Winkel vor. Dabei entstehen Beugungskegel, die auf einem Film Beugungsringe erzeugen.

3.4 Kapillarelektrophorese

Die Trennung von Verbindungen mit der Kapillarelektrophorese (KE) hängt von der Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten in einem angelegten elektrischen Feld ab.^[70] Die Wanderungsgeschwindigkeit u_p eines Analyten in einem elektrischen Feld entgegengesetzter Ladung kann als:

$$u_p = \mu_p E \tag{5.1}$$

mit μ_p Elektrophoretische Mobilität

E Stärke des angelegten elektrischen Feldes

geschrieben werden. Die elektrophoretische Mobilität ist dabei proportional zu der Gesamtladung z des Analyten und reziprok proportional zu den Reibungskräften zwischen dem Analyten und der sich in der Kapillare befindenden Pufferlösung. Wenn sich also zwei verschiedene Analyten mit unterschiedlicher Ladung oder unterschiedlichen Reibungskräften in einer Probe befinden, werden sie sich bei der Wanderung durch die Pufferlösung voneinander trennen. Die Reibungskräfte hängen dabei von der Viskosität η und der Größe und Form des Ladungsträgers ab. In Abhängigkeit davon kann die elektrophoretische Mobilität als:

$$\mu_p = \frac{z}{6\pi\eta r} \tag{5.2}$$

mit r Stokes'scher Radius

ausgedrückt werden. Die elektrophoretische Mobilität kann experimentell aus der Wanderungszeit des Analyten und der Feldstärke berechnet werden:

$$\mu_p = \frac{L}{t_r} \cdot \frac{L_t}{V} \tag{5.3}$$

mit *L* Distanz vom Einspritzpunkt der Probe bis zum Detektor

*t*_r Wanderungszeit des Analyten

V angelegte Spannung (Feldstärke)

*L*t Gesamtlänge der Kapillare

Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt außerdem von der elektroosmotischen Flussrate (EOF) ab. In einem typischen System ist der elektroosmotische Fluss direkt gegen die negativ geladene Elektrode gerichtet. Der Analyt wandert dabei zu der ihm entgegengesetzt geladenen Elektrode. Als Folge wird ein negativ geladener Analyt (wie z.B. die synthetisierten Oligomere) von der positiv geladenen Elektrode angezogen und wandert entgegengesetzt zum elektroosmotischen Fluss. Der elektroosmotische Fluss kann als:

$$u_0 = \mu_0 E \tag{5.4}$$

32

geschrieben werden, wobei die elektroosmotische Mobilität vom Zetapotential ζ , der relativen Primitivität ε und der Viskosität η abhängt:

$$\mu_0 = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \tag{5.5}$$

Experimentell kann die elektroosmotische Mobilität durch Messung der Retentionszeit eines neutralen Stoffes ermittel werden. Die Geschwindigkeit *u* des Analyten wird dabei als:

$$u_p + u_0 = (\mu_p + \mu_0)E \tag{5.6}$$

definiert.

4 Experimenteller Teil

In diesem Abschnitt wird erklärt, wie die Peptidsynthese und Kristallisationsexperimente mit Calciumoxalat und Struvit durchgeführt wurden.

4.1 Peptidsynthese

Chemikalien:

Das Harz (Wang-Resin 0.7 mol Äquivalente, Novabiochem, Sandiago, CA, USA), die Fmoc-und *tert*-butyl-geschütze L-Glutaminsäure (Fmoc-Glu(O*t*Bu)-OH, Novabiochem, Sandiago, CA, USA), das HBTU (Novabiochem, Sandiago, CA), HOBt (Acros Organics), Pipereidin (Alfa Aeser p.a. 99%), DMF (Sigma Aldrich p.a. 99.8%), NMP (Sigma Aldrich p.a. 99%) und die Acrylsäure (Acros, 99%) wurden käuflich erworben.

Durchführung:

Das Pentamer (Glu5), Decamer (Glu10), Icosamer (Glu20)- und das mit Acrylsäure funktionalisierte Icosamer (Glu20-AS) der L-Glutaminsäure wurde über eine Festphasensynthese mit einem CEM Liberty Peptidsynthesizer hergestellt (siehe Abschn. 2.2). Die für die Synthese benötigten Reaktionslösungen:

- Entschützungslösung: 20% ige Piperidin-Lösung in DMF
- Aktivatorbase: 2 M DIPEA in NMP
- Aktivatorlösung: 0.5 M HBTU / HOBt \cdot H₂O in DMF
- Harz: 1.30 g (1 mmol) in 15 mL DMF (für alle Ansätze wurde gleich viel Harz genutzt)
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH (F-Glu): 0.2 M in DMF
- Acrylsäure (für Glu20-AS): 0.2 M in DMF

wurden vor jeder Reaktion frisch hergestellt. Die benötige Menge an Reagenzien und Lösemitteln sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Abspaltung des Harzes und der *tert*-Butyl-Schutzgruppen erfolgte durch Schütteln des Reaktionsproduktes in einer TFA/Wasser/TIS(38:1:1)-Lösung (TFA-L). Die Dauer der Entschützung war dabei abhängig von der Kettenlänge des Oligomers (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Entschützungszeit und Menge der Entschützungslösung (TFA-L) für die einzelnen Oligomere.

	M / g/mol	TFA-L / mL	Zeit / h
Glu5	663.59	10	24
Glu10	1309.16	15	24
Glu20	2600.29	40	48
Glu20-AS	2654.34	40	48

Das Oligopeptid wurde durch Filtration und anschließender Fällung mit Diethylether erhalten. Zur Reinigung wurde das Oligopeptid dreimal mit je 40 mL Diethylether gewaschen. Zur Analyse der Oligopeptide wurde sie mittels ¹H-NMR, MALDI-TOF und Kapillarelektrophorese (KE) untersucht.

	Reagenzien	Glu5	Glu10	Glu20	Glu20-AS
E. 4 1. "4	Piperidin / mL	51	89	178	178
Entschutzungslösung	DMF / mL	204	356	712	712
	HBTU / g (mmol)	6.17 (16.3)	12.3 (32.5)	24.7 (65.0)	24.7 (65.0)
Aktivatorlösung	HOBt H2O / g (mmol)	2.49 (16.3)	4.98 (32.5)	9.96 (65.0)	9.96 (65.0)
	DMF / mL	30	65	130	130
Altivotorhogo	DIPEA / mL	5.2	12.2	24.4	24.4
AKUvatorbase	NMP / mL	14.8	22.8	45.6	45.6
Emon Clu(otPu) OU Log	F-Glu / g (mmol)	6.38 (15.0)	12.8 (30.0)	26.4 (62.0)	26.4 (62.0)
rilloc-Glu(0tbu)-On Lsg	· DMF / mL	75	150	310	310
A onvioñuno I co	AS / g (mmol)	-	-	-	0.29 (4.00)
Acryisaure Lsg.	DMF / mL	-	-	-	20

Tabelle 4.2: Einwaage, Stoffmenge und Volumen der Lösemittel der für die Synthese benötigten Reagenzien.

¹H-NMR (DMF d⁷): wurde durchgeführt, um zu überprüfen ob die *tert*-Butyl-Schutzgruppe abgespalten wurde (siehe dazu Abschn. 5.1).

Glu5:

MALDI-TOF *m*/*z* [M⁺]: 740 [-H, +2K], 724 [-H, +Na, +K], 702 [+K], 686 [+Na], 664 [+H].

KE (Elektrophoretische Mobilität): $50.2 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ min}^{-1}$

Ausbeute: 557 mg (0.84 mmol; 84%)

Reinheit: 91% (Bestimmung der Reinheit siehe Abschn. 5.1)

Glu10:

MALDI-TOF *m*/*z* [M⁺]: 1385 [-H, +2K], 1370 [-H, +K, +Na], 1354 [-H, +2K], 1332 [+Na].

KE (Elektrophoretische Mobilität): $48.1 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ min}^{-1}$

Ausbeute: 1.05 g (0.80 mmol; 80%)

Reinheit: 73%

Glu20:

MALDI-TOF *m*/*z* [M⁺]: 2763 [-5H, + 2K, +4Na], 2749 [- 5H, +K, +5Na], 2677 [-H, +2K], 2638 [+K], 2622 [+Na], 2600 [+H].

KE (Elektrophoretische Mobilität): 46.7 cm² V⁻¹ min⁻¹

Ausbeute: 1.90 g (0.73 mmol; 73%)

Reinheit: 70%

Glu20-AS:

MALDI-TOF *m*/*z* [M⁺]: 2935 [-11H, +K, +11Na], 2863 [-7H, +2K, +6Na], 2825 [-6H, +K, +Na], 2809 [-6H, +7Na], 2736 [-2H, +K, +2Na], 2793 [+K], 2677 [+K]. KE: Nicht durchgeführt. Ausbeute: 2.12 g (0.79 mmol; 80%) Reinheit: Nicht bestimmt.

4.2 Kristallisationsexperimente

4.2.1 Probenvorbereitung für Untersuchungen mit REM und XRD

Die Untersuchungen im Rasterelektronenmikroskop wurden mit einem LEO Gemini 1530 der Firma Zeiss durchgeführt. Dazu wurden die Proben als Pulver auf ein leitendes Kohlenstoffpad aufgetragen und auf den Objektträger geklebt.

Die XRD-Messungen wurden mit einem Röntgendifraktometer der Marke Phillips Typ PW 1820 durchgeführt. Die Proben wurden als Pulver auf einen Aluminiumobjekträger aufgetragen. Als Röntgenstrahlen wurden Cu-K_{α}-Strahlen (λ : 1.5418 Å) eingesetzt und eine Spannung von 40 kV angelegt. Die Stromstärke betrug 30 mA. Die Winkel wurden in 0.02 θ -Schritten verändert, wobei jeder Winkel für 5 s gemessen wurde.

4.2.2 Kristallisation und Reaktionskinetik von Calciumoxalat

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von Additiven (Mono-L-Glutaminsäure, Glu5, Glu10 und Glu20) auf die Kristallisation von Calciumoxalat untersucht, indem die zeitliche Abnahme der Calciumionenkonzentration mit einer Ca²⁺-selektiven Elektrode verfolgt wurde. Die Kinetik der Fällungsreaktion von Calciumoxalat wurde ohne Additiv (Referenzmessung) und mit Additiv der Konzentrationen 0.2, 0.1, 0.1 und 0.001 mmol/L untersucht. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Außerdem wurde der Einfluss von Additiven auf die Morphologie und Kristallphase durch Untersuchungen im Rasterelektronenmikroskop und Pulverdiffraktometer ermittelt.

Chemikalien:

Die 0.1 M Calciumchlorid Dihydrat-Stammlösung (Fluka), Natriumoxalat (Sigma Aldrich, p.a. ACS = 99.5%), Kaliumchlorid (Merck, puris. p.a. ACS \geq 99.5%) und L-Glutaminsäure wurden käuflich erworben. Die Oligo-Glutaminsäuren (Glu5, Glu10 und Glu20) wurden wie zuvor in Abschnitt 4.1 beschrieben synthetisiert.
Herstellung der Lösungen für die Kristallisationsversuche:

Für alle hergestellten Stamm- und übersättigten Kristallisationslösungen wurde ausschließlich MilliQ-Wasser verwendet, um Kristallisationskeime in Form von Staubpartikeln oder anderen möglichen Verunreinigungen auszuschließen.

- Natriumoxalat-Stammlösung: Zur Herstellung einer 0.1 M Natriumoxalat-Stammlösung wurden 3.35 g (25.0 mmol) Natriumoxalat (Na₂C₂O₄) in 250 mL Wasser gelöst.
- ISA-Lösung: Um eine 3 M Kaliumchlorid-ISA-Lösung (Ion Strenght Adjustment-Lösung) herzustellen, wurden 55.9 g (0.75 mol) Kaliumchlorid in 250 mL Wasser gelöst.
- Kalibrierlösungen: Drei Kalibrierlösungen wurden angefertigt, die 10, 1 und 0.1 mM an CaCl₂ · 2H₂O und jeweils 0.3 M an KCl waren und einen pH von 8.5 hatten. Dazu wurden 25, 2.5 bzw. 0.25 mL der Calciumchlorid Dihydrat-Stammlösung mit je 2.5 mL der ISA-Lösung und 70 µL einer 0.1 M KOH-Lösung versetzt und mit Wasser auf das Gesamtvolumen von 250 mL aufgefüllt.
- Für 250 mL der 1·10⁻³ M L-Glutaminsäure-(Glu1-) bzw. der Oligo-Glutaminsäure-Stammlösungen wurde die entsprechende Menge an Mono- bzw. Oligo-Glutaminsäure mit einer ihrer Stoffmenge an Carboxylgruppen äquivalenten Menge 0.1 M Kalilauge versetzt und mit Wasser aufgefüllt (Siehe Tabelle 4.3).

	Glu1	Glu5	Glu10	Glu20
Menge / mg (mmol)	36.8 (0.25)	166 (0.25)	327 (0.25)	650 (0.25)
n(COOH) / mmol	0.50	1.50	2.75	5.25
Kalilauge 0.1 M / mL	5.00	15.0	27.5	52.5

Tabelle 4.3: Einwaage an Additiv und Menge an Kalilauge 0.1 M.

Durchführung:

Vor jeder Messung wurde die Calciumionen-selektive Elektrode (DC240 Mettler Toledo), um eventuell gebildete Ablagerungen auf der Polymermatrixmembran zu entfernen, mit einer 0.001 M HCl gereinigt und neu kalibriert. Die Kalibrierung wurde bei denselben Bedingungen (pH 8.5, $T = 25\pm0.1$ °C) wie die Kristallisationsversuche durchgeführt. Alle Kinetikexperimente wurden als 50 mL-Ansatz in einem temperierten 100 mL-Reaktionsgefäß (Lauda ecoline RE240) durchgeführt. Für die Herstellung von Kristallisationslösung wurde 48.5 mL Wasser mit je 0.5 mL der 0.1 M CaCl₂ · 2H₂O Stamm- und der 3 M KCl ISA-Lösung versetzt. Im Falle des Additivzusatzes wurde eine adäquate Menge Wasser eingesetzt (siehe Tabelle 4.4). Die Reaktionslösung wurde 10 min temperiert und mit Argon entgast, um Fällen von Ca²⁺ als CaCO₃ durch eventuell gelöstes CO₂ zu verhindern. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 15 μ L einer 0.1 M Kalilauge auf 8.45 – 8.5 eingestellt. Darauffolgend wurde unter Rühren (200 U/min) 0.5 mL der 0.1 M Natriumoxalat-Stammlösung zugegeben, um die Fällungsreaktion einzuleiten. Somit war die Reaktionslösung zum Zeitpunkt *t* = 0, 1 mM an CaCl₂ und 1 mM an Na₂C₂O₄.

Die Konzentration der Ca²⁺-Ionen wurde in Intervallen von fünf Sekunden mit Hilfe einer Calciumionen-selektiven Elektrode (MetlerToledo, DC240) und einem Ionometer (MetlerToledo SevenMulti S47) erfasst. Die erhaltenen Daten wurden simultan mit dem Programm LabX V.1.1 auf einen Computer übertragen. Nach einer Stunde wurde die Messung beendet und die Reaktionslösung filtriert (Pall Life Science Supor®-100, Membranfilter mit 0.1 µm Porengröße). Anschließend wurde das gebildete Präzipitat dreimal mit je 5 mL Wasser gereinigt. Um die Morphologie der gereinigten Kristalle zu zeigen, wurden diese mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Für Untersuchungen mit dem Pulverdiffraktometer wurde der 50 mL Ansatz auf 500 mL hochskaliert.

Tabelle 4.4: Eingesetzte Menge an Wasser und Additivlösung (1 mM).

	Endkonzentration an Glun (n =1, 5, 10, 20)				
	0.2 mmol/L	0.1 mmol/L	0.01 mmol/L	1·10 ⁻³ mmol/L	
Additiv-Lsg. / mL	10	5	0.5	0.05	
Wasser / mL	38.5	45.5	48.0	48.45	

4.2.3 Kristallisation von Struvit

Die Kinetik der Kristallisation von Struvit konnte nicht untersucht werden, da keine Magnesiumionen-selektive Elektrode vorhanden war. Es wurde versucht, den Verlauf der Kristallisation durch eine Trübungsmessung (Turbidimeter) zu verfolgen. Der Sensor des Turbidimeters erwies sich als ungeeignet, da er nur für einen hohen Trübungsgrad ausgelegt ist. Deswegen wurde der Einfluss der Additive auf die Morphologie von Struvit untersucht.

Chemikalien:

Das Magnesiumsulfat(MgSO₄, WTL Laborbedarf GmbH, 99%), Ammoniumdihydrogenphosphat (NH₄H₂PO₄, Sigma-Aldrich, p.a. 99.5%) und die konz. Ammoniaklösung (VWR, p.a. 28%ig) wurden käuflich erworben.

Herstellung der Stammlösungen für die Kristallisationsversuche:

Für alle hergestellten Stamm- und übersättigten Kristallisationslösungen wurde ausschließlich MilliQ-Wasser verwendet, um Kristallisationskeime in Form von Staubpartikeln oder anderen möglichen Verunreinigungen auszuschließen.

 Magnesiumsulfat-Stammlösung: Zur Herstellung einer 0.1 M MgSO₄-Stammlösung wurden 3.01 g (25.0 mmol) in 250 mL Wasser gelöst.

- Ammoniumdihydrogenphosphat-Stammlösung: Um eine 0.1 M NH₄H₂PO₄.
 Stammlösung herzustellen, wurde 2.88 g (25.0 mmol) in 250 mL Wasser gelöst.
- Additivlösung: siehe Abschn. 4.2.2.

Durchführung:

Es wurde eine Referenzlösung ohne Additiv und vier Lösungen mit den Additiven Glu1, Glu5, Glu10 und Glu20 der Konzentration 0.1 mmol/L untersucht. Dazu wurden 5 mL der 0.1 M Magnesiumsulfat-Stammlösung und 5 mL konzentrierter Ammoniaklösung in 485 mL (Referenzmessung) respektive in 435 mL (Lösungen mit Additiv) gelöst und 10 min bei 25 °C temperiert. Anschließend wurde unter Rühren (200 U/min) die Fällungsreaktion durch Zugabe von 5 mL der NH₄H₂PO₄-Stammlösung initiiert. Die Reaktionslösung hatte zum Zeitpunkt t = 0 einen pH Wert von 10 und war 0.1 M an MgSO₄ und 0.1 M an NH₄H₂PO₄. Nach einer Stunde wurde die Reaktion beendet und die Kristallisationslösung filtriert (Pall Life Science Supor®-100, Membranfilter mit 0.1 µm Porengröße). Die erhaltenen Kristalle wurden dreimal mit je 5 mL Wasser gereinigt. Die Untersuchung der Kristalle fand mit dem Rasterelektronenmikroskop und dem Pulverdiffraktometer statt.

4.3 Synthese von funktionalisierten Latexpartikeln mittels Miniemulsionspolymerisation

Um ein Modell für biogene Makromoleküle zu erhalten, wurden mit Glu20-AS funktionalisierte Latexpartikel mit der Miniemulsionspolymerisation hergestellt.

Chemikalien:

Styrol (Merck, 99%), Hexadecan (Acros, 99%), V59 [2,2'-Azobis-(2-methylbutyronitril), Wakko] und Lutensol AT50 (BASF) wurden käuflich erworben. Das Makromonomer (mit Acrylsäure funktionalisiertes Icosamer der L-Glutaminsäure) wurde wie in Abschn. 4.1 beschrieben synthetisiert.

Vorbereitung:

Für die Synthese der Latexpartikel wurden 14 g Styrol destilliert, um den Stabilisator (Radikalfänger), mit dem das käuflich erworbene Styrol versetzt ist, zu entfernen.

Durchführung:

Zur Herstellung der dispersen Phase wurden in 5.88 g Styrol 250 mg Hexadecan und 120 mg V59 gelöst. Anschließend wurden in 24 g Wasser 240 mg Lutensol AT59 (4 Gew.% bezüglich der dispersen Phase) und 120 mg (2 Gew.% bezüglich Styrol) des Makromonomers (Glu20-AS) gelöst, um die kontinuierliche Phase zu erhalten. Im Anschluss wurde der pH-Wert der wässrigen Phase mit einer 0.1 M Kalilauge auf pH = 9 eingestellt. Beide Phasen wurden vermischt und 30 min. gerührt (voremulgiert) und darauffolgend bei 0 °C (Eisbad) mit Ultraschall behandelt (1/2" Spitze, 70% Amplitude, 6 min, 1 s Puls, 0.1 s Pause).^[47] Danach wurde die Miniemulsion 12 h bei 72 °C unter Rückfluss mit Argonatmosphäre gerührt.

Die auf diese Weise erhaltenen Latexpartikel wurden mittels Zentrifugations-Dialyse (Milipore 30 kDa, Zentrifugengläser) gereinigt (zehn mal eine Stunde 3500 U/min), um eventuell nicht reagiertes Macromonomer bzw. in der wässrigen Phase polymerisierte Makromonomere abzutrennen. Nach jedem Dialysevorgang (nach 1 h) wurde das Dialysewasser gewechselt.

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius (bzw. Durchmesser) wurden die Latexpartikel mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht. Außerdem wurde das Zetapotential der Dispersion gemessen und die Latexpartikel mit dem Rasterelektronenmikroskop, um die Größenverteilung der Partikel zu visualisieren. Der Feststoffgehalt der Latexdispersion wurde durch Gefriertrocknung bestimmt, wobei dreimal je 0.5 mL Aliquote der Dispersion vor und nach der Gefriertrocknung gewogen wurden. Der Feststoffgehalt betrug 10.2%.

Als Vergleichsprobe wurden nicht funktionalisierte Latexpartikel mit 6 g reinem Polystyrol auf die gleiche Weise und unter denselben Reaktionsbedingungen synthetisiert. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte analog zu den funktionalisierten Latexpartikeln. (Feststoffgehalt 24.3 Gew.%)

4.4 Kristallisation von Calciumoxalat auf der Oberfläche von funktionalisierten Latexpartikeln

294 mg (2.00 mmol) Calciumchlorid Dihydrat wurden in 4 g Latexdispersion (10.2 Gew.%) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 269 mg (2.00 mmol) Natriumoxalat in 6 mL Wasser gelöst. Die Lösung wurde unter Zuhilfenahme einer Dosierpumpe innerhalb einer Stunde (0.1 mL/min) zu der Latexdispersion zugetropft und im Anschluss für 24 h gerührt.^[49]

Um den Erfolg der Kristallisation auf der Oberfläche der Teilchen zu überprüfen, wurden diese mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Synthese der Oligopeptide

Die Synthese der Oligo-L-Glutaminsäuren (Abbildung 5.1) konnte in guten Ausbeuten und hoher Reinheit der Produkte durchgeführt werden. Der Erfolg der Synthese und die Reinheit der Produkte wurde mit drei Methoden überprüft: ¹H-NMR, MALDI-TOF und Kapillarelektrophorese.

Die ¹H-NMR-Spektroskopie diente dabei lediglich als Nachweis für die Abspaltung der Permanentschutzgruppe, indem die signifikanten Signale der Protonen der Amidgruppe integriert und ins Verhältnis mit den Protonensignalen der *tert*-Butyl-Schutzgruppe gesetzt wurden. Eine nicht abgespaltene Schutzgruppe hat ein wesentlich intensiveres Signal als das Spaltungsprodukt *tert*-Butanol. Die Oligo-Glutaminsäuren weisen ein ¹H-NMR-Spektrum höherer Ordnung auf, da die Moleküle keine Spiegelebene haben. Aus diesem Grund können ohne weiteres keine weiteren Aussagen aus dem ¹H-NMR-Spektrum getroffen werden. Außerdem kommt es mit zunehmender Kettenlänge zu Signalüberlappungen und dadurch zu einer Signalverbreiterung, wodurch die Integration der Signale unzuverlässiger wird.

Abbildung 5.1: Struktur von Glu5-Protonen mit nummerierten Protonen, die ein signifikantes, integrierbares Signal geben.

In Abbildung 5.2 wird anhand des ¹H-NMR-Spektrums von Glu5 gezeigt, wie die Integration vorgenommen und die Abspaltung der Permanentschutzgruppe nachgewiesen wurde. Die blau markierten Dupletts resultieren aus den Protonen der Amidgruppe (in Abbildung 5.1 mit 2 nummeriert). Das Integral des Dupletts bei der chemischen Verschiebung von 8.80 ppm wurde auf 1 normiert. Wie zu erkennen ist, ist das Integral der restlichen drei Dupletts wie erwartet auch 1. Damit wurden die 4 Protonen der Amid-Gruppen nachgewiesen. Die fünf Protonen der C-H-Gruppen (in Abbildung 5.1 mit 1 nummeriert) sind als Multiplett bei 4.49 ppm grün markiert und haben ein Integral von 5. Der violett markierte ppm-Bereich stellt den Bereich dar, in dem ein Signal einer nicht abgespaltenen *tert*-Butylgruppe erwartet werden würde. Das Integral einer solchen Gruppe müsste aufgrund der neun Protonen der *t*Bu-Gruppe den Wert 9 betragen. Da dies nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Abspaltung der Permanentschutzgruppen erfolgreich war.



Abbildung 5.2: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von Glu5 mit integrierten Signal der signifikanten Protonen. (Blau: Protonen der Amid-Gruppen; Grün: Protonen der C-H-Gruppe; Violett: Verunreinigungen). Die blauen Zahlen (senkrecht) entsprechen jeweils dem Wert des Integrals unter dem markierten Signal.

Bei der Synthese von Glu20-AS dient das ¹H-NMR-Spektrum zusätzlich als Nachweis für den Erfolg der Funktionalisierung mit Acrylsäure. In Abbildung 5.3 ist ein Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von Glu20-AS dargestellt. Das Integral des Multipletts (grün markiert) bei der chemischen Verschiebung von 6.44 ppm wurde auf 2 normiert. Dieses Multiplett ist das Resultat aus der *cis*(1 mit 3)- und *trans*(2 mit 3)-Kopplung der beiden endständigen Protonen des Vinylrestes der Acrylsäure (Nummerierung der Protonen: siehe Strukturformel Abbildung 5.3). Das ebenfalls grün markierte Integral des Dupletts bei 5.76 ppm hat den Wert 1 und resultiert aus der Kopplung zwischen Proton 3 mit Proton 1 und 2. Die Summe der Integrale der zwanzig Protonen der Amidgruppen (blau markiert) ergibt den Wert 20. Daraus ist zu schließen, dass die Ausbildung der Amidgruppe zwischen Acrylsäure und Glu20 stattgefunden hat. In Abbildung 5.3 können außerdem die zuvor beschriebene Signalüberlappung erkannt werden.



Abbildung 5.3: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von Glu20-AS mit integrierten Signalen der signifikanten Protonen (blau: Integrale der zwanzig Protonen der Amid-Gruppe (4), grün: Protonen des Vinyl-Restes der Acrylsäure (1,2 und 3)). Die blauen Zahlen (senkrecht) entsprechen jeweils dem Wert des Integrals unter dem markierten Signal.

Außer der ¹H-NMR-Spektroskopie wurde die Massenspektrometrie "*matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry*" (kurz: MALDI-TOF) zur Analyse der Oligopeptide eingesetzt. Mit ihrer Hilfe konnte festgestellt werden, dass jedes der synthetisierten Oligomeren das erwartete Molekulargewicht aufwies.

Die Überprüfung der Reinheit von Peptiden findet normalerweise mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (kurz: HPLC *"high performance liquid chromatography*") statt. Diese Methode konnte bei den synthetisierten Oligomeren nicht angewendet werden, da sie sich in keinem der üblichen HPLC-Lösemittel (Dioxan, THF, Acetonitril) lösten. Deswegen wurden die Oligomere mit der Kapillarelektrophorese untersucht.

In Abbildung 5.4 wird das Elektropherogramm von Glu5, Glu10 und Glu20 dargestellt. Dabei weist jeder Kurvenverlauf einen Hauptpeak auf. Vor allem bei der roten Kurve (Glu20) und der blauen Kurve lassen sich links vom Hauptpeak kleinere Peaks erkennen, die auf Verunreinigungen hindeuten. Wie erwartet, (siehe Gl. 5.2) hat Glu20 die geringste elektrophoretische Mobilität (EM) (46.7 cm² V⁻¹ min⁻¹) und Glu10 hat eine geringere (48.1 cm² V⁻¹ min⁻¹) 43 EM als Glu5 (50.2 cm² V⁻¹ min⁻¹). Angesichts der Ladung von Glu20, die ungefähr zweimal größer ist als die von Glu10 und der Ladung von Glu10, die ungefähr zweimal größer ist als die von Glu5, wurde erwartet, dass die Peaks äquidistante Abstände haben. Dieses Phänomen wurde bereits für unterschiedliche Polymere beobachtet.^[70,71]



Abbildung 5.4: Elektropherogramm der Oligomere Glu5 (schwarz), Glu10 (blau) und Glu20 (rot).

Rechts des Hauptsignals von Glu20 und Glu10 ist zu sehen, wie die Kurven "wellenartig" nach unten verlaufen. Dabei überlappen die "Wellen" von Glu20 und Glu10 ziemlich genau. Dies deutet auf kürzere Oligomerketten hin, die bei der Synthese als Nebenprodukte angefallen sind. Die Reinheit der Peptide wurde berechnet, indem das Integral des Hauptpeaks $A_{\rm H}$ ins Verhältnis zum Integral der gesamten Kurve $A_{\rm ges}$ gesetzt wurde (siehe Tabelle 5.1). Die Oligomere konnten in einer guten Reinheit erhalten werden. Wie erwartet, nimmt die Reinheit mit zunehmender Kettenlänge des Oligomers ab, was an der Zunahme der Syntheseschritte liegt.

Tabelle 5.1: Verhältnisse der Flächen unter den Hauptpeaks und der Fläche unter der gesamten Kurve, die zur Bestimmung der Reinheit ermittelt wurden.

	Glu5	Glu10	Glu20	Glu20-AA
$A_{\rm H}$ / $A_{\rm ges}$	37.8 / 41.6	37.6 / 51.7	53.1 / 76.3	nicht bestimmt
Reinheit / %	91	73	70	nicht bestimmt

5.2 Kristallisationsexperimente und Reaktionskinetik

5.2.1 Kinetikexperimente mit Calciumoxalat

Für jede Konzentration an Additiv wurden jeweils drei Messungen der Kristallisationskinetik mit der Ca²⁺-Ionen-selektiven Elektrode (ISE) durchgeführt. Die Kurvenverläufe der drei Messungen weisen eine Varianz gegen Ende der Fällungsreaktion auf. Diese Varianz kann durch die Veränderung des Zustandes der Polymermatrixmembran erklärt werden, die aus einer Ablagerung von Calciumoxalat oder Adsorption von Additiv an der Membran resultieret. Für die Auswertung wurde deswegen das arithmetische Mittel der Messpunkte aus den Messungen gebildet. Um die Messungen der unterschiedlichen Konzentrationen und Additivzugaben miteinander vergleichen zu können, wurde jeder Kurvenverlauf auf den Anfangswert der Calciumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_0$ zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ s normiert. Daraus resultieren die Kurvenverläufe der normierten Ca²⁺-Ionenkonzentration gegen die Zeit, mit denen die Berechnungen der Kristallisationsgeschwindigkeit durchgeführt wurden. In Abbildung 5.5 wird der Kurvenverlauf der normierten Ca²⁺-Ionenkonzentration in einer Glu10-Lösung der Konzentration 0.1 mmol/L dargestellt. Diese Kurve wurde ausgewählt, weil sie die spätere Betrachtung der drei, für diese Untersuchung relevanten, Bereiche erleichtert.





Anhand der Kurve in Abbildung 5.5 lässt sich erkennen, dass die Kurve vom Zeitpunkt $t_0 = 0$ s zu $t_1 = 5$ s einen Sprung macht. Zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ wurde die Natriumoxalat-Stammlösung zugegeben. Diese hatte das Gesamtvolumen und dadurch auch die Gesamtkonzentration an Calciumionen verändert. Außerdem wurde eine kurze Zeit benötigt, bis die Calciumionen gleichmäßig verteilt waren und keine Lokalkonzentration an Calciumionen mehr vorlag. Mit diesen Überlegungen lässt sich der Sprung des Kurvenverlaufs von t_0 auf t_1 erklären. Ab dem Zeitpunkt t_1 weist die Kurve keine Unstetigkeiten mehr auf, was für die spätere Berechnung der Reaktionskinetik wichtig ist.

Wie in Abbildung 5.5 zu sehen ist, lässt sich der Verlauf der Kristallisation in drei Bereiche aufteilen (vergl. dazu Abschn. 2.1):

- I. In Bereich I ist kaum eine Veränderung der Calciumionenkonzentration zu beobachten. Dies kann durch die Bildung der Nuklei, d.h. den Nukleationsvorgang erklärt werden. Die Zeit, die benötigt wird, bis eine endliche Anzahl an Nuklei (Cluster kritischer Größe) entstanden ist, wird als Induktionszeit *I* bezeichnet.
- II. In diesem Bereich nimmt die Calciumionenkonzentration rapide ab. Diese Beobachtung kann mit dem Kristallwachstum erklärt werden. Nachdem die Energiebarriere ΔG_j^* bei dem kritischen Radius r^* überwunden ist, wird bei dem Kristallwachstum Energie freigesetzt. Die Kristalle wachsen dabei solange, bis der Energiegewinn durch die Verringerung der Grenzflächenspannung mit der Energie, die benötigt wird, um Kristallgitter auszubilden, kompensiert wurde. Danach geht die Kurve in Bereich III über.
- III. In diesem Bereich ist eine Verringerung der Abnahme der Calciumionenkonzentration zu erkennen. Dies lässt sich durch einen Übergang der Reaktionsordnung erklären. In diesem Bereich erfolgt der Prozess der Ostwald-Reifung. Gegen Ende der Messzeit lässt sich erkennen, dass die Calciumionenkonzentration so gut wie nicht mehr abnimmt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den gelösten Ionen und den ausgefallenen Kristallen bildet. Die Höhe des Plateaus H_P ist ein Maß für das Löslichkeitsprodukt von Calciumoxalat (je höher das Plateau, desto höher die Löslichkeit).

Alle erhaltenen Messkurven lassen sich in die soeben beschriebenen Bereiche einteilen (siehe Abbildung 5.5). In Diagramm A ist zu erkennen, dass sich die Verläufe der Kurven für unterschiedliche Konzentrationen an Mono-L-Glutaminsäure stark ähneln. Das Löslichkeitsprodukt wird im Vergleich zur Referenz schwach erhöht und die Induktionszeit ist bei allen Konzentrationen ungefähr gleich. Eine ähnliche Beobachtung lässt sich bei Diagramm B machen. Auch hier ähneln sich die Kurvenverläufe für die unterschiedlichen Konzentrationen an Glu5. Die Induktionszeit verändert sich im Vergleich zur Referenzmessung kaum.



Abbildung 5.6: Normierte Konzentration der Calciumionen aufgetragen gegen die Zeit. A: Mit dem Additiv Glu1; B: mit dem Additiv Glu5; C: mit Glu10 und D: mit Glu20; für die vier Konzentration 0.2(rot), 0.1 (blau), 0.01 (oliv) und 0.001(violett) mmol/L. Die schwarze Kurve stellt die Referenzmessung ohne Additiv dar.

Die Höhe des Plateaus H_P erhöht sich im Vergleich mit Diagramm A nicht merklich. In Diagramm C ändert sich der Sachverhalt. Die Konzentration 0.2 mmol/L und 0.1 mmol/L des Additivs Glu10 erhöhen deutlich die H_P . Die geringeren Konzentrationen 0.01 und 0.001 mmol/L erhöhen die Löslichkeit von Calciumoxalat auf das Niveau der hohen Konzentrationen von Glu5 und Glu1. Die Induktionszeit nimmt für die Konzentrationen 0.2 und 0.1 mmol/L im Vergleich zur Referenzmessung zu. Diagramm D zeigt einen drastischen Einfluss des Additivs Glu20 auf die Abnahme der Calciumionenkonzentration. Die Konzentrationen 0.2 - 0.01 mmol/L erhöhen die Löslichkeit von Calciumoxalat stark. Die Induktionszeit wird vor allem bei den Konzentration 0.2 und 0.1 mmol/L verlängert. Zur Quantifizierung der soeben getroffenen qualitativen Beobachtungen wurde die Induktionszeit *I* und die Plateauhöhe H_P direkt aus den Diagrammen abgelesen und zu der Induktionszeit *I*₀ bzw. der Plateauhöhe H_{P0} der Referenzmessung ohne Additiv ins Verhältnis gesetzt (siehe Tabelle 5.2). Die Induktionszeit *I*₀ beträgt 30 s und H_{P0} hat den Wert 0.12.

	Glu1 / mmol/L		Glu5 / mmol/L		Glu10 / mmol/L		Glu20 / mmol/L	
c / mmol/L	I/s	<i>I/I</i> ₀	I/s	<i>I/I</i> ₀	I/s	<i>I/I</i> ₀	I/s	<i>I/I</i> 0
0.2	35	1.17	35	1.17	80	2.67	160	5.33
0.1	30	1.00	30	1.00	60	2.00	80	2.67
0.01	35	1.17	35	1.17	40	1.33	35	1.17
0.001	35	1.17	30	1.00	35	1.17	35	1.17
	Glu1/	mmol/L	Glu5 /	mmol/L	Glu10/	′ mmol/L	Glu20 /	′ mmol/L
c / mmol/L	Glu1 / H _P	mmol/L H _P /H _{P0}	Glu5 / H _P	mmol/L H _P /H _{P0}	Glu10 / H _P	' mmol/L H _P /H _{P0}	Glu20 / H _P	' mmol/L H _P /H _{P0}
c / mmol/L 0.2	Glu1 / <i>H</i> _P 0.17	mmol/L H _P /H _{P0} 1.42	Glu5 / H _P 0.15	$\frac{\text{mmol/L}}{H_{\text{P}}/H_{\text{P0}}}$ 1.25	Glu10 / <i>H</i> _P 0.24	$\frac{\text{mmol/L}}{H_{\rm P}/H_{\rm P0}}$ 2.00	Glu20 / <i>H</i> _P 0.36	$\frac{\text{mmol/L}}{H_{\rm P}/H_{\rm P0}}$ 3.00
c / mmol/L 0.2 0.1	Glu1 / H _P 0.17 0.18	mmol/L <u>H_P/H_{P0}</u> 1.42 1.50	Glu5 / H _P 0.15 0.18	mmol/L <u>H_P/H_{P0}</u> 1.25 1.50	Glu10/ <i>H</i> _P 0.24 0.24	' mmol/L H_P/H_{P0} 2.00 2.00	Glu20 / H _P 0.36 0.32	/ mmol/L H _P /H _{P0} 3.00 2.67
c / mmol/L 0.2 0.1 0.01	Glu1 / H _P 0.17 0.18 0.16	$ mmol/L H_P/H_{P0} 1.42 1.50 1.33 $	Glu5 / H _P 0.15 0.18 0.16	$ mmol/L H_P/H_{P0} 1.25 1.50 1.33 $	Glu10 / H _P 0.24 0.24 0.19		Glu20 / H _P 0.36 0.32 0.32	⁷ mmol/L <u>H_P/H_{P0}</u> 3.00 2.67 2.67

Tabelle 5.2: Abgelesene Induktionszeiten und H_P Werte aus den Diagrammen im Verhältnis zu I_0 und H_{P0} .

Die abgelesenen Induktionszeiten von 35 s können nicht mit I_0 verglichen werden, da das Intervall, in dem die Elektrode die Werte erfasste, 5 s betrug. Somit liegt ein Wert von I = 35s im Fehlerbereich der Messung. Es macht nur Sinn, die I-Werte von den Messungen mit dem Additiv Glu10 (0.2 und 0.1 mmol/L) und Glu20 (0.2 und 0.1 mmol/L) mit dem Referenzwert zu vergleichen. Durch Zugabe der Glu10 wurde die Induktionszeit um 167% (mit der Konzentration 0.2 mmol/L) respektive um 100% (mit der Konzentration 0.1 mmol/L) erhöht. Mit dem Additiv Glu20 konnte die Induktionszeit sogar um 433% (mit 0.2 mmol/L) bzw. um 167% (mit 0.1 mmol/L) erhöht werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich feststellen, dass die Konzentration 0.2 mmol/L der Glu10 denselben Einfluss auf die Induktionszeit wie die Konzentration 0.1 mmol/L von Glu20 hat. Daraus lässt sich schließen, dass die Erhöhung der Induktionszeit von der Stoffmenge der Carboxylgruppen abhängt, da eine 0.1 mM Glu20-Lösung genauso viele Carboxylgruppen enthält wie eine 0.2 mM Glu10-Lösung. Diese Schlussfolgerung lässt sich jedoch nur eingeschränkt treffen, da bei einer 0.2 M Glu5-Lösung dieselbe Induktionszeit wie bei einer 0.1 M Glu10-Lösung erwartet werden würde. Da dies nicht der Fall ist, lässt sich vermuten, dass eine bestimmte Kettenlänge des Oligomers nötig ist, damit eine Erhöhung der Induktionszeit eintritt. Durch Vergleich der Wirkung von Glu1 und Glu5 auf die Löslichkeit von Calciumoxalat lässt sich feststellen, dass sie wie schon zuvor behauptet einen ähnlichen H_P-Wert haben. Unerwartet ist, dass sowohl bei Glu1 als auch bei Glu5 niedrigere Konzentrationen an Additiv einen stärken Einfluss auf die Löslichkeit haben als höhere (vgl. 0.2 mmol/L Glu5 mit 0.1 und 0.01 mmol/L). Wie auch schon bei der Induktionszeit beobachtet wurde, haben die Konzentrationen 0.2 und 0.1 mmol/L von Glu10 (Erhöhung der Löslichkeit um jeweils 100%) und die Konzentrationen 0.2, 0.1 und 0.01 mmol/L von Glu20 (Erhöhung der Löslichkeit um 200% bzw. jeweils 167%) einen hohen Einfluss auf die Löslichkeit von Calciumoxalat. Interessant dabei ist, dass es keinen Unterschied macht, ob 0.2 oder 0.1 mmol/L von Glu10 als Additiv zugegeben wurde. Bei dem

Oligomer Glu20 kommt es bei den Konzentrationen 0.1 und 0.01 mmol/L ebenfalls zu einer Erhöhung der Löslichkeit um den gleichen Wert.

Abschließend sollte Abbildung 5.7 betrachtet werden, die den Einfluss der vier eingesetzten Additive der selben Konzentration (0.1 mmol/L) darstellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Einfluss auf die Abnahme der Calciumionenkonzentration stark mit der Kettenlänge korreliert. Aus den Messkurven für den Glu1- und Glu5-Zusatz, die sehr ähnlich verlaufen, lässt sich schließen, dass erst ab einer bestimmten Kettenlänge ein merkbarer Einfluss auf die Abnahme der Calciumionen stattfindet. Daraus lässt sich an dieser Stelle vermuten, dass die Hemmung des Kristallwachstums durch Adsorption der Oligomere stattfindet. Eigentlich müsste auch ein Vergleich von Messkurven erfolgen, die dieselbe Konzentration an Carboxylgruppen haben. Dies lässt sich mit den eingesetzten Konzentrationen an Glu1 – Glu20 nicht durchführen. Jedoch wird der Einfluss der Carboxylgruppen im Zusammenhang mit den berechneten Geschwindigkeitskonstanten, von Glu10 und Glu20 besprochen.



Abbildung 5.7: Verlauf der normierten Calciumionenkonzentration gegen die Zeit für die Konzentration 0.1 mmol/L der Additive Glu1 (violett), Glu5 (oliv), Glu10 (blau) und Glu20 (rot).

Für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Fällungsreaktion von Calciumoxalat müssen mehrere Annahmen getroffen werden:

 Die Fällungsreaktion beginnt nach einer kurzen, eventuell nicht messbaren Nukleationsperiode. Nach dieser Periode (Induktionszeit) werden keine neuen Nuklei mehr gebildet. Anschließend erfolgt nur das Wachstum bereits gebildeter Kristallisationskeime. (vgl. Diskussion zu Abbildung 5.5)

- Die Geschwindigkeit des Kristallwachstums ist proportional zu der Geschwindigkeit der Abnahme der Calciumionenkonzentration in Lösung. Für die Geschwindigkeitskonstanten der beiden Vorgänge gilt folglich: $k_{\text{Wachstum}} = k_{\text{AbnahmeCa}}^{2+}$.
- Die Fällungsreaktion folgt einer Reaktionskinetik 2ter Ordnung. Für die Fällungsreaktion gilt die Reaktionsgleichung:

$$\operatorname{Ca}^{2+}(aq) + \operatorname{C}_{2}\operatorname{O}_{4}^{2-}(aq) \xrightarrow{k_{W}} \operatorname{Ca}\operatorname{C}_{2}\operatorname{O}_{4} \downarrow$$
(5.6)

Unter der Annahme, dass $[Ca^{2+}] = [C_2O_4^{2-}]$ ist, kann das Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung für die Abnahme der Calciumionenkonzentration formuliert werden:

$$\frac{d[\mathrm{Ca}^{2^+}]}{dt} = -k_{\mathrm{W}}[\mathrm{Ca}^{2^+}]^2$$
(5.7)

Durch Lösen des Differentials wird eine Gleichung für die Calciumionenkonzentration $[Ca^{2+}]$ als eine Funktion der Zeit *t* erhalten:

$$\int_{[Ca^{2+}]_{t}}^{[Ca^{2+}]_{t}} \frac{d[Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}]^{2}} = -k_{W} \int_{t=0}^{t} dt'$$

$$-\left(\frac{1}{[Ca^{2+}]_{t}} - \frac{1}{[Ca^{2+}]_{0}}\right) = -k_{W}t$$

$$\frac{1}{[Ca^{2+}]_{t}} = k_{W}t + \frac{1}{[Ca^{2+}]_{0}}$$
(5.8)

Durch Auftragung von Gl. 5.8 als $1/[Ca^{2+}]_t$ gegen *t* wird die Geschwindigkeitskonstante k_W aus der Steigung der resultierenden Geraden erhalten.

Es ist anzunehmen, dass die Annahme $[Ca^{2+}] = [C_2O_4^{2-}]$ deswegen getroffen werden kann, weil bei pH 8.45 – 8.50 gearbeitet wurde. Dadurch lassen sich die Protolysegleichgewichte der Oxalsäure:

$$\begin{array}{c} H_2 C_2 O_4 &\longrightarrow H C_2 O_4^- + H^+ \\ H C_2 O_4^- &\longrightarrow C_2 O_4^{-2-} + H^+ \end{array}$$

$$(5.9)$$

vernachlässigen, da bei diesen pH-Werten das Gleichgewicht (5.9) vollständig zugunsten von Oxalat verschoben wird.

$$\operatorname{CaC}_{2}\operatorname{O}_{4} \xleftarrow{dyn.} \operatorname{Ca}^{2+}(aq) + \operatorname{C}_{2}\operatorname{O}_{4}^{2-}(aq)$$
(5.10)

Zur Geschwindigkeitskonstanten Berechnung der wurden die normierten Calciumionenkonzentrationen $[Ca^{2+}]/[Ca^{2+}]_0$ verwendet. Indem $[Ca^{2+}]/[Ca^{2+}]_0$ als y-Wert für eine Auftragung 1/y vs. x eingesetzt wird, resultiert daraus die durchgeführte Auftragung von $1/([Ca^{2+}]_t/[Ca^{2+}]_0)$ bzw. $[Ca^{2+}]_0/[Ca^{2+}]_t$ gegen t. Um die Geschwindigkeitskonstante k_W zu erhalten, wurde eine lineare Regression des linearen Bereichs, der Auftragung $[Ca^{2+}]_0/[Ca^{2+}]_t$ gegen t, aufgrund der zuvor angestellten Annahmen durchgeführt. Dabei entspricht die Steigung der resultierenden Regressionsgeraden dem Wert von $k_{\rm W}$. Der lineare Bereich wurde so gewählt, dass die Bestimmtheit R^2 der Regressionsgeraden mindestens den Wert 0.99 hat. R^2 ist ein Maß dafür, wie gut die Messpunkte mit dem Verlauf der Regressionsgeraden übereinstimmen. Der y-Achsenabschnitt c stellt lediglich einen theoretischen Wert von $1/[Ca^{2+}]_0$ dar und spielt für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten keine Rolle. Für die Referenzmessung ergibt sich die Gerade y = 0.0153x + 0.76 mit R² = 0.991. Somit ist der Wert der Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{Ref}} = 15.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Die linearen Bereiche der Auftragung $[Ca^{2+}]_0/[Ca^{2+}]_t$ gegen die Zeit für die einzelnen Konzentrationen an Additiven und die dazugehörigen Regressionsgeraden werden in Abbildung 5.8 dargestellt.



Abbildung 5.8: Auftragung [Ca²⁺]₀/[Ca²⁺]_t gegen t mit den entsprechenden Regressionsgeraden. A: Mit dem Additiv Glu1; B: mit dem Additiv Glu5; C: mit Glu10 und D: mit Glu20; für die vier Konzentration 0.2 (rot), 0.1 (blau), 0.01 (oliv) und 0.001 (violett) mmol/L. Die schwarze Kurve stellt die Referenzmessung ohne Additiv dar.

Die aus der Steigung der Regressionsgeraden erhaltenen k_w -Werte mit den dazugehörigen R^2 -Werten sind in Tabelle 5.3 zu finden. Durch die Bildung des Quotienten aus k_w und k_{Ref} wird die Wachstumsrate R_w (mit $R_w = k_w/k_{Ref}$) erhalten. Die prozentuelle Inhibierung der Reaktionsgeschwindigkeit R_i wird mit der Gl. 5.11 berechnet.

$$=\frac{k_{\text{Ref}} - k_{\text{W}}}{k_{\text{Ref}}} = 1 - \frac{k_{\text{W}}}{k_{\text{Ref}}}$$
(Gleichung: 5.11)

Die berechneten R_w und R_i Werte sind in Tabelle 5.3 dargestellt.

Tabelle 5.3: a) k_w Werte, die aus den Steigungen der Regressionsgeraden erhalten wurden und Bestimmtheit der einzelnen
Regressionsgeraden. b) Berechnete R_w - und R_i -Werte für die einzelnen Konzentrationen an Additiven.

a)	Glu	ı1	Glu	15	Glu	10	Glu	20
<i>c /</i> mol/L	$k_{\rm W}$ / 1/s	R^2	$k_{\rm W}$ / 1/s	R^2	<i>k</i> _W / 1/s	R^2	<i>k</i> _W / 1/s	R^2
0.2	$1.22.10^{-02}$	0.996	$1.35 \cdot 10^{-02}$	0.994	$5.71 \cdot 10^{-03}$	0.992	$1.84.10^{-03}$	0.992
0.1	$1.37 \cdot 10^{-02}$	0.995	$1.23 \cdot 10^{-02}$	0.997	$6.44 \cdot 10^{-03}$	0.997	$3.92 \cdot 10^{-03}$	0.995
0.01	$1.03 \cdot 10^{-02}$	0.998	$1.36 \cdot 10^{-02}$	0.997	$8.19.10^{-03}$	0.995	$6.96 \cdot 10^{-03}$	0.993
0.001	$1.44 \cdot 10^{-02}$	0.991	$1.40.10^{-02}$	0.999	$9.41 \cdot 10^{-03}$	0.994	$9.27 \cdot 10^{-03}$	0.998
b)	Glu	ı1	Glu	15	Glu	10	Glu	20
c / mol/L	$R_{\rm w}$	R_{i}	$R_{ m w}$	R _i	$R_{ m w}$	R _i	$R_{ m w}$	$R_{\rm i}$
0.2	0.80	0.20	0.88	0.12	0.37	<mark>0.63</mark>	0.12	0.88
0.1	0.90	0.10	0.80	0.20	0.42	<mark>0.58</mark>	0.26	<mark>0.73</mark>
0.01	0.67	<mark>0.34</mark>	0.89	0.11	0.54	0.48	0.46	<mark>0.54</mark>
0.001	0.95	0.05	0.92	0.07	0.62	0.38	0.61	0.39

Aus einem Vergleich von R_i der einzelnen Konzentrationen von Glu1 kann festgestellt werden, dass die Konzentration 0.01 mmol/L (In Tabelle 5.3 gelb markiert) von der erwarteten Entwicklung der Inhibierung abweicht. Mit einer Inhibierung der Kristallisationsgeschwindigkeit von 34% ist die Konzentration wesentlich effektiver als höhere Konzentrationen von Glu1. Da für jede Konzentration drei Messungen durchgeführt wurden und alle drei Kurvenverläufe vergleichbar aussahen, können Fehler in der Versuchsdurchführung ausgeschlossen werden. Das Phänomen einer ungewöhnlich starken Inhibierung der Kristallisationsgeschwindigkeit von Calciumoxalat durch relativ geringe Konzentrationen an L-Glutaminsäure wurde bereits von Komunjer et al. beobachtet, die keine Erklärung dafür fanden.^[30] Die Konzentration 0.2 mmol/L an Glu5 (In Tabelle 5.3 grün markiert) weicht ebenfalls von der erwarteten Entwicklung der Inhibierung ab. Mit einer Kristallisationsgeschwindigkeit von 12% ist sie mit der Konzentration 0.01 mmol/L (Glu5) vergleichbar. Es ist unklar, wodurch es zu dieser Anomalie kommt. Abgesehen von den markierten R_i -Werten weisen Glu1 und Glu5 vergleichbare R_i -Werte auf. Daraus lässt sich schließen, dass Glu1 und Glu5 einen ähnlichen Inhibierungsmechanismus haben. Mit einer Inhibierung von max. 20% (ausgenommen der Konzentration 0.01 mmol/L an Glu1) kann die hemmende Wirkung von Glu1

und Glu5 als schwach eingestuft werden, da Glu10 und Glu20 selbst bei der geringsten Konzentration einen fast doppelt so hohen R_i -Wert aufweisen.

Die Inhibierung der Kristallisationsgeschwindigkeit lässt sich durch zwei mögliche Vorgänge erklären. Zum einen kann eine Komplexierung der Ca²⁺-Ionen durch die Carboxylgruppen der Oligo-L-Glutaminsäuren bzw. der Mono-L-Glutaminsäure stattfinden, wodurch die Calciumionen nicht mehr für die Kristallisation zur Verfügung stehen. Zum anderen können die Oligomere das Wachstum von Kristallflächen einschränken, indem sie an diesen adsorbieren und sie dadurch für weiteres Wachstum blockieren. Die Adsorption der Oligoglutaminsäuren an Kristallflächen wird im Zusammenhang mit der Untersuchung der Morphologie der Calciumoxalatkristalle in Abschnitt 5.2.2 behandelt.

Für die Komplexierung der Calciumionen durch die Carboxylgruppen der Oligomere kann die Reaktionsgleichung:

$$\operatorname{Ca}^{2+}(aq) + 2\operatorname{RCOO}^{-} \xleftarrow{K} [\operatorname{Ca}^{2+}(\operatorname{RCOO}^{-})_{2}]$$
(5.12)

formuliert werden. Dabei können sich die Carboxylgruppen am selben Molekül oder an zwei unterschiedlichen Molekülen befinden. Aus Gl. 5.12 ist ersichtlich, dass die Komplexierung von der Gesamtstoffmenge der Carboxylgruppen in Lösung abhängt. Es muss dabei beachtet werden, dass die Annahme $[Ca^{2+}] = [C_2O_4^{2-}]$ nicht mehr zutrifft. Gl. 5.7 muss folglich als:

$$\frac{d[\mathrm{Ca}^{2^{+}}]}{dt} = -k_{\mathrm{W}}[\mathrm{Ca}^{2^{+}}][\mathrm{C}_{2}\mathrm{O}_{4}^{2^{-}}]$$
(5.13)

geschrieben werden. Die Annahme kann jedoch bedingt getroffen werden. Durch das Entfernen der Calciumionen aus der Lösung durch Kristallisation verschiebt sich das Gleichgewicht in Gl. 5.12 nach Le Chatelier zu Gunsten der Calciumionen. Aus Gl. 5.12 lässt sich schließen, dass die Komplexbildung die Löslichkeit von Calciumoxalat erhöht.

Um zu überprüfen, in welchem Ausmaß sich die Konzentration an Carboxylgruppen in Lösung auswirkt, werden der R_i -Wert von Glu10 der Konzentration 0.2 mmol/L mit dem R_i -Wert von Glu20 der Konzentration 0.1 mmol/L verglichen (in Tabelle 5.3 violett markiert). Die Konzentration an Carboxylguppen der 0.2 mM-Lösung von Glu10 beträgt 2.2 mmol/L und die der 0.1 mM Glu20-Lösung 2.1 mmol/L. Es sollte hierbei beachtet werden, dass zur Berechnung der Konzentration der Carboxylgruppen sowohl die γ Caboxylgruppen als auch die α -Carboxylgruppe berücksichtigt wurden. Es lässt sich feststellen, dass trotz vergleichbarer Konzentration an Carboxylgruppen der R_i -Wert von Glu20 um 16% höher ist als der von Glu10. Des Weiteren sollen der R_i -Wert von Glu10 der Konzentration 0.1 mmol/L mit dem R_i -Wert von Glu20 der Konzentration 0.01 mmol/L verglichen werden (in Tabelle 5.3 blau markiert). Die Carboxylgruppenkonzentration beträgt im Fall von Glu10 1.10 mmol/L und im Fall von Glu20 0.21 mmol/L. Obwohl die Konzentration der Carboxylgruppen von Glu20 5.24 mal kleiner ist als die von Glu10, nimmt der R_i -Wert nur um 7% ab. Aus diesen Vergleichen lässt sich schließen, dass die Kettenlänge der Oligomere eine wesentlich größere Rolle bei der Inhibierung der Kristallisationsgeschwindigkeit und somit des Kristallwachstums spielt als die Konzentration der Carboxylgruppen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Inhibierung durch Adsorption der Oligomere stattfindet, da größere Moleküle mehr Gitterplätze blockieren können als kürzere. Um den Einfluss der Kettenlänge auf die Kristallisationsgeschwindigkeit zu quantifizieren, müssten Messungen mit Glu1 – Glu20 durchgeführt werden, die dieselbe Konzentration an Carboxylgruppen haben.

5.2.2 Einfluss von Peptiden auf die Morphologie von Calciumoxalat

Die Calciumoxalatkristalle, die bei den Kinetikmessungen erhalten wurden, wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht, um hochaufgelöste Bilder der Kristalle zu erhalten. Bei den Referenzmessungen kristallisierten Calciumoxalat-Trihydrat-Kristalle von prismatischer Form mit hexagonaler Grundfläche wie in Abbildung 5.9 zu sehen ist.



Abbildung 5.9: REM-Aufnahme von Calciumoxalat ohne Additivzugabe. a: Interpenetrierte, elongierte COD-Kristalle (0.1 mmol/L Glu20), b: Teilweise interpenetrierter Zwillingskristall (0.2 mmol/L Glu20).

In Abbildung 5.10 werden die REM-Aufnahmen von Calciumoxalat gezeigt, die mit dem Zusatz der unterschiedlichen Oligomere erhalten wurden.

Glu1:

Die Kristalle, die bei der Konzentration 0.001 mmol/L entstanden sind, weisen die selbe Morphologie wie die Kristalle der Referenzprobe auf. Somit hat diese Konzentration an Glu1 keinen Einfluss auf die Morphologie von Calciumoxalat.

Die Konzentration 0.01 mmol/L, die den stärksten Einfluss auf die Inhibierung der Kristallisationsgeschwindigkeit hat (bezgl. des Einsatzes des Additivs Glu1), hat auch den stärksten Einfluss auf die Morphologie von Calciumoxalat. Es lassen sich Kristalle erkennen, deren Form mit Holzspänen verglichen werden kann. Eine solche Morphologie von Calciumoxalat wurde bereits von Donnet *et al.* beobachtet.^[72]

Bei dem Einsatz von 0.1 mmol/L an Glu1 wurden Kristalle gebildet, die wie die Referenzkristalle aussehen. Außerdem sind viele unförmige Kristalle in der dargestellten REM-Aufnahme zu erkennen, was an der Probenvorbereitung für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop liegen kann. Calciumoxalat-Trihydrat ist sehr weich und bildet leicht Bruchstücke.

Die Kristalle, die in einer 0.2 mM Lösung an Glu1 entstanden sind, haben die selbe Form wie die Kristalle, die ohne Zusatz von Additiv entstanden sind. Außer den vereinzelt vorkommenden Prismen mit hexagonaler Grundfläche sind wieder viele Bruchstücke zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Zusatz der Mono-L-Glutaminsäure die Modifikation von Calciumoxalat nicht stark beeinflusste.



Abbildung 5.10: REM-Aufnahme von Calciumoxalatkristallen, die in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an Glu1, Glu5, Glu10 und Glu20 ausgefallen sind.

Glu5:

Bei der Konzentrationsreihe des Pentamers der L-Glutaminsäure lässt sich deutlich erkennen, wie sich eine rhombische (flach, mit trapezförmiger Grundfläche) Morphologie der Calciumoxalatkristalle entwickelt. Während die Kristalle, die bei der Konzentration 0.001 mmol/L entstanden, noch der Referenz ähneln, sind bereits bei der Konzentration von 0.01 mmol/L längliche, rhombische Kristalle zu erkennen. Die Kristalle, die bei den Konzentration nen 0.1 und 0.2 mmoL entstanden, sind breiter als die Kristalle aus der 0.01 mM-Lösung und die trapezförmige Grundfläche ist deutlich zu erkennen.

Glu10:

Bei der geringsten Konzentration entstand ein Gemisch von Kristallen mit der zuvor beschrieben Holzspanform und der Form der Referenzkristalle. Bei der Konzentration von 0.01 mmol/L an Glu10 wurden zum ersten Mal vereinzelt tetragonal bipyramidale Kristalle erzeugt. Bei diesen Kristallen handelt es sich um Calciumoxalat-Dihydrat-Kristalle mit kaum ausgeprägter [100]-Fläche. Außer den vereinzelten COD-Kristallen wurden Kristalle mit der Form der Referenz gebildet (Auch hier sind wieder viele Bruchstücke zu erkennen). Bei den Konzentrationen 0.1 und 0.2 mmol/L lassen sich COD-Kristalle mit einer etwas ausgeprägten [100]-Fläche erkennen (prismatische Kristalle mit pyramidalen Enden). Bei der Konzentration 0.1 mmol/L sind jedoch auch große Calciumoxalat-Trihydrat-Kristalle zu erkennen, die die Form der Referenz aufweisen. Erkennbar ist, dass die gebildeten COD-Kristalle kleiner sind als die, die bei den Konzentrationen 0.001 – 0.2 mmol/L an Glu5 oder Glu1 gebildet wurden.

Glu20:

Glu20 hatte den stärksten Einfluss auf die Morphologie von Calciumoxalat. Bei der Konzentration 0.001 mmol/L entstanden Kristalle mit der gleichen Morphologie wie die Referenz. Bereits bei der Konzentration von 0.01 mmol/L bildeten sich elongierte COD-Kristalle mit ausgeprägter [100]-Fläche. Je höher die Konzentration wurde, desto ausgeprägter wurde die [100]-Fläche (vgl. Abbildung 5.10: Glu20: Konzentrationen 0.01, 0.1 und 0.2 mol/L). Vor allem die Kristalle, die bei 0.1 und 0.2 mmol/L an Glu20 entstanden, weisen eine breite Kristallgrößenverteilung auf. Es lassen sich vereinzelt elongierte große Kristalle und viele elongierte kleine Kristalle, die zum Teil aggregiert sind, erkennen. Vor allem bei der Konzentration von 0.2 bildeten sich viele sehr kleine Aggregate von COD-Kristallen. Die gebildeten Aggregate sind in Abbildung 5.9 a), b) dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kettenlänge der Oligomere einen starken Einfluss auf die Morphologie hat. Bei dem Einsatz von Glu20, das die größte Kettenlänge hat, wurden die kleinsten Kristalle gebildet. Die [100]-Fläche der COD-Kristalle war am stärksten ausgeprägt. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass die Konzentration der Additive ebenfalls einen starken Einfluss auf die Morphologie hat. Bei der größten Konzentration an Glu20 sind die kleinsten Kristalle mit den am stärksten ausgeprägten [100]-Flächen entstanden.

Die Bildung der COD-Kristalle lässt sich mit den Beobachtungen aus Abschnitt 5.2.1 erklären, bei denen festgestellt wurde, dass Glu10 (0.1 und 0.2 mmol/L) und Glu20 (0.01 – 0.2 mmol/L) die Löslichkeit von Calciumoxalat stark erhöhen. Ein erhöhte Löslichkeit hat einen geringeren Sättigungsgrad der Lösung zur Folge. Wie sich in Abbildung 2.8 erkennen lässt, wird bei geringeren Sättigungsgraden bevorzugt COD gebildet. Die Ausprägung der [100]-Fläche lässt sich durch Adsorption der Oligomere Glu10 und Glu20 an der [101]-Fläche erklären. Durch die Adsorption an der [101]-Fläche wird deren Wachstum eingeschränkt und dadurch das Wachstum der [100]-Fläche begünstigt. Um diese Behauptung zu belegen, werden folgende Annahmen getroffen:

- Die Zahl *N* der adsorbierten Oligomere ist proportional zur Inhibierungsrate $[(k_0-k_W)/k_0]$ des Kristallwachstums und hängt von der Konzentration der Oligomere ab.
- Die Adsorption von Molekülen ist abhängig vom Belegungsgrad und damit der Zahl bereits adsorbierter Moleküle, d.h. je mehr Moleküle adsorbiert sind, desto schwieriger wird es für neue Moleküle, sich an der Oberfläche zu adsorbieren, da die Adsorptionsplätze mit zunehmendem Belegungsgrad energetisch ungünstiger werden.

Durch Auftragung von $[(k_{\text{Ref}}-k_{\text{W}})/k_{\text{Ref}}]$ gegen die Konzentration der Oligomere werden die in Abbildung 5.11 dargestellten Verläufe erhalten.



Abbildung 5.11: $[(k_{\text{Ref}}-k_{\text{W}})/k_{\text{Ref}}]$ gegen c(Oligo-Glutaminsäure) mit angepasster Freundlich'scher Adsorptionsisotherme. Bei den in Abbildung 5.11 dargestellten Kurven (rot/blau) handelt es sich um Freundlich'sche Adsorptionsisotherme, die mit der Formel

$$N = ac(Glu)^n \tag{5.13}$$

mit

N Zahl der adsorbierten Moleküle

aln systemspezifische Konstanten der Freundlichschen Adsorptionsisotherme

mit OriginLab 8.0 angepasst wurden, wodurch die systemspezifischen Konstanten a und n ermittelt wurden:

Glu20: *a* = 1.09, *n* = 0.15; Glu10: *a* = 0.72, *n* = 0.09.

An Hand der in Abbildung 5.11 gezeigten Kurvenverläufe lässt sich erkennen, dass der Bedeckungsgrad der Kristalle bei Glu20 höher war als bei Glu10. Daraus lässt sich schließen, dass die Adsorption mit zunehmender Kettenlänge besser erfolgt (entropisch begünstigt). Anhand der Möglichkeit einer Auftragung nach der Formel der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme und der beobachteten Morphologie der Kristalle, die mit den Additiven Glu10 und Glu20 erhalten wurden, kann wie erwartet der Inhibierungsmechanismus durch Adsorption nachgewiesen werden.

5.2.3 Einfluss von Peptiden auf die Kristallstruktur von Calciumoxalat

Um den Einfluss von Additiven auf die Kristallphase von Calciumoxalat zu überprüfen, wurden die Kristalle mit einem Pulverdiffraktometer untersucht. Die erhaltenen Diffraktogramme wurden mit der PDF-2-2004-Datenbank (Datenbank für spezifische Streusignale von unterschiedlichen Mineralien) abgeglichen.

Abbildung 5.12 zeigt das Diffraktogramm der Calciumoxalatkristalle, die ohne den Zusatz an Additiven entstanden sind. Aus dem Vergleich mit den Referenzsignalen der PDF-2-Datenbank für die unterschiedlichen Kristallphasen von Calciumoxalat lässt sich feststellen, dass es sich bei den hergestellten Kristallen um Calciumoxalat-Trihydrat handelt.



Abbildung 5.12: Diffraktogramm der Calciumoxalatkristalle, die ohne Additivzugabe hergestellt wurden. [Senkrechte Linien grün: Referenz Signale von COT (PDF-2 20-232)]

In Abbildung 5.13 werden die Diffraktogramme der Kristalle gezeigt, die mit den Konzentrationen 0.1, 0.01 und 0.001 mmol/L an Additiven (Glu1, Glu5, Glu10 und Glu20) erhalten wurden. Aus den Diffraktogrammen a) (mit dem Additiv Glu1) und b) (mit dem Additiv Glu5) lässt sich schließen, dass die eingesetzten Konzentrationen an Glu1 bzw. Glu5 keinen Einfluss auf die Kristallphase von Calciumoxalat haben. Mit jeder Konzentration wurde Calciumoxalat-Trihydrat gebildet. In den Diffraktogrammen c) (mit dem Additiv Glu10) ist zu erkennen, dass sich in einer 0.1 mM-Lösung an Glu10 ein Gemisch aus Calciumoxalat-Trihydrat- und Calciumoxalat-Dihydrat-Kristallen bildete. Bei der Konzentration von 0.01 mmol/L entstand ebenfalls ein Gemisch aus COD und COT. Dies lässt sich anhand des Signals von schwacher Intensität der (200)-Ebene (Im Diffraktogramm mit (200) markiert) erkennen. Aufgrund der geringen Intensität der Signale von Calciumoxalat-Dihydrat lässt sich schlussfolgern, dass überwiegend Calciumoxalat-Trihydrat entstanden ist. Die Konzentration 0.001 mmol/L führte ausschließlich zur Bildung von COT. Somit lässt sich sagen, dass diese Konzentration von Glu10 keinen Einfluss auf die Kristallphase von Calciumoxalat hat. Anhand der Diffraktogramme d) (mit dem Additiv Glu20) lässt sich erschließen, dass es sich bei den Kristallen, die bei einer Konzentration von 0.1 und 0.01 mmol/L an Glu20 ausfielen, um Calciumoxalat-Dihydrat handelt. Bei der Konzentration von 0.001 mmol/L entstanden ausschließlich COT-Kristalle.



Abbildung 5.13: Diffraktogramme der gebildeten Calciumoxalat-Kristalle mit den Additiven a) Glu1, b) Glu5, c) Glu10 und d) Glu20 [blaue Messkurve: c = 0.001 mmol/L, rote Messkurve: c = 0.01 mmol/L, schwarze Messkurve: c = 0.1 mmol/L; senkrechte Linien grün: Referenz Singnale von COT (PDF-2 20-232), senkrechte Linien magenta: Referenz Signale von COD(PDF-2 17-541)].

Die Ergebnisse der XRD-Untersuchungen belegen die Ergebnisse, die bei den Kinetikmessungen (Abschn. 5.2.1) und bei den Untersuchungen der Kristallmorphologie im

Rasterelektronenmikroskop (Abschn. 5.2.2) erhalten wurden. Durch Vergleich des Diffraktogramms für 0.01 mmol/L an Glu20, bei der nur COD entstand, mit dem Diffraktogramm für 0.1 mmol/L an Glu10, bei der ein Gemisch aus COD und COT entstand, ist festzustellen, dass die Kettenlänge entscheidend für einen Phasenübergang ist und nicht die Konzentration der Carboxylgruppen. Außerdem lässt sich schlussfolgern, dass erst ab einer bestimmte Kettenlänge der Oligomere ein Einfluss auf die Kristallphase ausgeübt wird. Anhand des Diffraktogramms der Kristalle, die in einer 0.001 mM-Lösung an Glu20 entstanden sind, ist erkennbar, dass erst ab einer bestimmten Konzentration an Additiv die Kristallphase von Calciumoxalat verändert wird. Durch den Vergleich der XRD-Ergebnisse mit den Kinetik-Ergebnissen kann festgestellt werden, dass die Inhibierung der Kristallisationsgeschwindigkeit mit der Veränderung der kristallinen Phase von Calciumoxalat korreliert.

5.2.4 Einfluss von Peptiden auf die Morphologie von Struvit

Die Struvit-Kristalle, die bei den Kristallisationsexperimenten erhalten wurden, wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht, um hochaufgelöste Bilder der Kristalle zu erhalten.

In Abbildung 5.14 sind die Mikrographien der Struvit-Kristalle zu sehen, die ohne Additiv und mit den Additiven Glu1 – Glu20 der Konzentration 0.1 mmol/L hergestellt wurden. Die Kristalle der Referenzprobe (a) haben die typische, längliche, prismatische Form, wie sie in Abschn. 2.2.2 beschrieben wird. Die mit den Additiven Glu1 (b) und Glu5 (c) erzeugten Kristalle weisen dieselbe Morphologie auf wie die Kristalle der Referenzprobe. Dies zeigt, dass die Additive Glu1 und Glu5 keinen Einfluss auf die Morphologie von Struvit haben. In den REM-Aufnahmen können scherenartige, aggregierte Zwillingskristalle beobachtet werden, die für Struvit typisch sind. Ein Beispiel eines solchen Kristalls wird in Abbildung 5.14 (f) gezeigt. Der Einsatz von Glu10 als Additiv führt zu einer Veränderung der Morphologie von Struvit. Die erhaltenen Kristalle (d) weisen eine prismatische Form mit trigonaler Grund-



Abbildung 5.14: REM-Aufnahme von Struvit-Kristallen die ohne Additiv in Anwesenheit von Glu1, Glu5, Glu10 und Glu20 der Konzentration 0.1 mmol/L ausgefallen sind. a) ohne Additiv, b) Glu1, c) Glu5, d)Glu10, e) Glu20 und f) typischer scherenartiger Zwillingskristall von Struvit (Glu5, vergrößert)

fläche auf. Bei dem Zusatz von Glu20 zur Kristallisationslösung kann ebenfalls eine Morphologieveränderung beobachtet werden. Die Kristalle (e) weisen eine prismatischer Form mit einer länglichen oktagonalen Grundfläche auf.

Wie bei den Kristallisationsexperimenten von Calciumoxalat kann bei den Kristallisationsexperimenten von Struvit feststellen werden, dass die langkettigen Oligomere Glu10 und Glu20 einen Einfluss auf die Morphologie haben. Im Gegensatz zu Calciumoxalat weist der Einsatz von Glu5 keine Veränderung der Morphologie auf. Daraus lässt sich schließen, dass die Wechselwirkungen zwischen Glu5 und den Calciumoxalat-Kristallen höher sind als die mit den Struvit-Kristallen. Außerdem ist zu beobachten, dass in Anwesenheit der Oligomere Glu10 und Glu20 kleinere Kristalle entstanden als bei den andern Kristallisationsexperimenten.

5.2.5 Einfluss von Peptiden auf die Kristallstruktur von Struvit

Um den Einfluss der Additive Glu1, Glu5, Glu10 und Glu20 auf die Kristallphase von Struvit zu überprüfen, wurden die Kristalle mit einem Pulverdiffraktometer untersucht (Abbildung 5.15). Die erhaltenen Diffraktogramme wurden mit der PDF-2-2004-Datenbank abgeglichen.



Abbildung 5.15: Diffraktogramme von Struvit-Kristallen, die ohne und mit dem Zusatz der Additive Glu1, Glu5, Glu10 und Glu20 der Konzentration 0.1 mmol/L hergestellt wurden (Senkrechte Linien grün: Referenzsignale von Struvit [PDF-2 77-2303]).

Da Struvit nur in einer Modifikation existiert, weisen alle Diffraktogamme dasselbe Signalmuster auf, obwohl unterschiedliche relative Intensitätsverhältnisse der Reflexe beobachtet werden können. Es lässt sich erkennen, dass Glu20 die niedrigsten Signalintensitäten aufweist. Eine unterschiedliche Intensität könnte auf unterschiedliche Verhältnisse der Dimensionen der Kristallite hinweisen, jedoch kann, durch die Vorbereitung der Probe, eine Vorzugsorientierung ("*preferred orientation"*) der Kristalle nicht ausgeschlossen werden.

5.3 Kristallisation auf der Oberfläche von funktionalisierten Latexpartikeln

Um den Effekt von biogenen Makromolekülen auf die Kristallisation zu untersuchen, wurden mit Glu20-AS funktionalisierte Latexpartikel mittels Miniemulsionspolymerisation synthetisiert. Die hergestellten Latexpartikel wurden mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung untersucht und weisen eine bimodale Teilchengrößenverteilung mit den mittleren Durchmessern von ca. 80 nm und 340 nm auf, wie in Abbildung 5.16 zu erkennen ist.



Abbildung 5.16: Teilchengrößenverteilung der synthetisierten Latexpartikel (NICOMP Verteilung).

Das Zetapotential der verdünnten Dispersion in einer 0.1 M KCl-Lösung bei pH 9 betrug –13.58 mV. Die nicht funktionalisierten Vergleichspartikel hatten unter denselben Bedingungen das Zetapotential von –3.46 mV. Aufgrund dessen lässt sich vermuten, dass die Funktionalisierung mit dem Makromonomer Glu20-AS an der Oberfläche der Teilchen evtl. stattfand. Dies ist jedoch kein eindeutiger Beweis. Die Untersuchung der funktionalisierten Latexpartikel im Rasterelektronenmikroskop (Abbildung 5.17) zeigt, dass sie polydispers sind.



Abbildung 5.17: Mikrographien der funktionalisierten Latexpartikel (a) und der Vergleichspartikel (b).

Die Vergleichspartikel, mit einem mittleren Durchmesser (bestimmt mit DLS) von ca. 225 nm, sind wesentlich monodisperser. Daraus lässt sich schließen, dass die Synthesebedingen der funktionalisierten Latexpartikel nicht optimal waren und kein monodisperseres System erzeugt werden können.

Zur Abscheidung von Calciumoxalat an der Oberfläche der funktionalisierten Latexpartikel wurde Calciumchlorid Dihydrat in der Latex-Dispersion gelöst und 2 h gerührt. Das lange Rühren war notwendig, damit die Calciumionen von den Oligo-L-Glutaminsäure-Ketten komplexiert werden konnten. Durch die Komplexierung befanden sich die Calciumionen nah an der Oberfläche der Latexpartikel, auf der die Abscheidung stattfinden sollte. Die Abscheidung von Calciumoxalat auf der Oberfläche wurde durch das Zutropfen der Natriumoxalatlösung mit einer Zutropfgeschwindigkeit von 0.1 mL/min induziert. Das langsame Zutropfen war nötig, um einen raschen Anstieg des Sättungsgrades und die daraus resultierende Präzipitation von Calciumoxalat zu vermeiden.

Anhand der in Abbildung 5.18 gezeigten REM-Aufnahme lässt sich erschließen, dass eine erfolgreiche Abscheidung von Calciumoxalat auf der Oberfläche der funktionalisierten Latexpartikel stattfand. Des Weiteren kann die REM-Aufnahme eingeschränkt als Beweis für die Funktionalisierung der Latexpartikel mit dem Makromonomer Glu20-AS gesehen werden. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass statt einer Funktionalisierung eine Adsorption der Latexpartikel stattfand. Außerdem wurde eine Abscheidung an den Vergleichspartikeln nicht durchgeführt, was die Beweiskraft der vorhergehenden Aussage mindert. Die beibehaltene Kugelform der Latexpartikel deutet darauf hin, dass die funktionalisierten Latexpartikel als Template eingesetzt werden können.



Abbildung 5.18: REM-Aufnahme der funktionalisierten Latexpartikel nach der Abscheidung von Calciumoxalat.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden Oligomere der L-Glutaminsäure der Kettenlänge 5, 10 und 20 synthetisiert und ihr Einfluss auf die Kristallisation von Calciumoxalat und Struvit in Abhängigkeit ihrer Konzentration untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz der Oligomere die Kristallisationsgeschwindigkeit gehemmt und die Kristallstruktur von Calciumoxalat beeinflusst werden kann. Dabei hat es sich erwiesen, dass die Kettenlänge des eingesetzten Oligomeres maßgebend auf die Kristallisationskinetik und Kristallstruktur auswirkt und die Konzentration der Carboxylgruppen eine untergeordnete Rolle spielt. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch den Einsatz langkettiger Oligomere (Glu10 und Glu20) selbst in geringen Konzentrationen die Kristallphase von Calciumoxalat verändert wurde. Außerdem wurde bewiesen, dass die Inhibierung der Kristallisationsgeschwindigkeit durch eine Adsorption nach Freundlich stattfand, wodurch auch der Einfluss auf die Kristallstruktur erklärt wurde. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass kurzkettige Oligomere (Glu1 und Glu5) nur einen geringen Einfluss auf die Kristallisationsgeschwindigkeit haben, sich aber dennoch in hohen Konzentrationen verändernd auf die Morphologie von Calciumoxalat auswirken können. Calciumoxalat konnte erfolgreich auf der Oberfläche von funktionalisierten Latexpartikeln abgeschieden werden, was ihre Funktion als Templat bestätigte. Bei den Kristallisationsversuchen von Struvit konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Kettenlänge der Oligomere entscheidend für die Bildung anderer Morphologien ist.

Nachdem erfolgreich gezeigt wurde, dass sich das 20-mer und das 10-mer inhibierend auf die Kristallisationsgeschwindigkeit von Calciumoxalat auswirken, bleibt es zu überprüfen, ob es sich bei Struvit genauso verhält. Dafür muss ein geeigneter Sensor für das Trübungsmessgerät gefunden werden, der auch bei niedrigen Trübungsgraden zuverlässige Messergebnisse liefert. Des Weiteren können noch längere L-Glutaminsäuresequenzen synthetisiert werden, um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und die Abhängigkeit der Kettenlänge auf den Kristallisationsverlauf zu überprüfen. Außerdem kann noch der Einfluss anderer Oligo- bzw. Polyaminosäuren auf die Reaktionskinetik und Kristallstruktur von Calciumoaxalat und Struvit untersucht werden, um die bereits erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen. Abgesehen von Aminosäuren können noch andere Additive bei der Kristallisation eingesetzt werden, um die Kristallstruktur zu verändern und das Kristallwachstum zu hemmen. Bei den synthetisierten, funktionalisierten Latexpartikeln können das Miniemulsionssystem und die Reaktionsbedingungen optimiert werden, um monodispersere Partikel zu erhalten. Weiterhin kann versucht werden, Struvit auf der Oberfläche der Latexpartikel abzuscheiden, um die Selektivität der Abscheidung zu überprüfen. Im allgemeinen kann das Thema der peptidgesteuerten Mineralisation auf andere wichtige Biomineralien wie z.B. Calciumcarbonat und Hydroxylapatit ausgedehnt werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CE	Kapillarelektrophorese
CMC	kritische Mizellenkonzentration
DCM	Dichloromethan
DIPEA	N,N-Di-isopropyl-ethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	N,N-Dimethylformamid
Gl.	Gleichung
Glu1	L-Glutaminsäure
Glu5	Pentamer der L-Glutaminsäure
Glu10	Decamer der L-Glutaminsäure
Glu20	Icosamer der L-Glutaminsäure
Glu20-AS	mit Acrylsäure funktionalisiertes Icosamer der L-Glutaminsäure
h	Stunde
$H_{ m P}$	Plateauhöhe
HBTU	[2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetra-
	methyluroniumhexafluorophosphat]
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol-Hydrat
HPMC	Hydroxymethylpropylcellulose
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ISA	ion strength adjustment
ISE	Ionen-selektive-Elektrode
Lutensol AT50	Polyalkylenglykolether
Μ	molar (= mol/L)
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spec-
	trometry
min	Minute
L	Liter
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Tab.	Tabelle

TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
S	Sekunde
U/min	Umdrehungen pro Minute
V59	2,2'-Azobis-(2-methylbutyronitril)]
XRD	Röntgenbeugung

8 Literaturverzeichnis

- [1] B. K. Horenstein, G. L. Hernandez, G. Rasberry, J. Grosse, *Sci. Technol.* **1990**, *22*, 12-183.
- [2] C. O. Pera, I. C. Hallet, T. T. Nguyen, J. Charles, J. Food Sci. 1990, 55, 1066-1069.
- [3] P. Ulmgren, R. Radström, Nordic Pulp Paper Res. J. 2001, 16, 389-395.
- [4] A. N. Kofina, K. D. Demadis, P. G. Koutsoukos, *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 2705-2712.
- [5] B. Akin, M. Oner, Y. Bayram, K. D. Demadis, *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1997-2005.
- [6] N. Bouropoulos, S. Weiner, L. Addadi, *Chem.-Eur. J.* **2001**, *7*, 1881-1888.
- [7] M. A. Webb, *Plant Cell* **1999**, *11*, 751-761.
- [8] D. S. Finley, *Rev. Biol. Trop.* **1999**, *47*, 27-31.
- [9] A. Taller, B. Grohe, K. A. Rogers, H. A. Goldberg, G. K. Hunter, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1768-1777.
- [10] F. Jones, M. Mocerino, M. I. Ogden, A. Oliveira, G. M. Parkinson, *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 2336-2343.
- [11] S. Kirboga, M. Oner, Cryst. Growth Des. 2009, 9, 2159-2167.
- [12] Y. Shirane, Y. Kurokawa, S. Miyashita, H. Komatsu, S. Kagawa, *Urol. Res.* **1999**, *27*, 426-431.
- [13] A. Milan, Cryst. Growth Des. 2001, 1, 245.
- [14] D. B. Zhang, L. M. Qi, J. M. Ma, H. M. Cheng, *Chem. Mater.* 2002, 14, 2450-2457.
- [15] T. Echigo, M. Kimata, A. Kyono, M. Shimizu, T. Hatta, *Mineral. Mag.* **2005**, *69*, 77-88.
- [16] W. Heijnen, W. Jellinghaus, W. E. Klee, Urol. Res. 1985, 13, 281-283.
- [17] F. J. Opalko, J. H. Adair, S. R. Khan, J. Cryst. Growth 1997, 181, 410-417.
- [18] A. M. Cody, R. D. Cody, J. Cryst. Growth **1994**, 135, 235-245.
- [19] J. Prywer, A. Torzewska, *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 3538-3543.
- [20] E. Baeuerlein, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007.
- [21] S. Mann, *Biomineralization* Oxford University Press, Oxford, 2001.
- [22] K. Sangwal, *Additives and Crystallization Processes*, John Wiley, West Sussex, **2007**.
- [23] N. Garti, F. Tibika, S. Sarig, S. Perlberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *97*, 1154-1162.
- [24] B. Fellstrom, B. G. Danielson, S. Ljunghall, B. Wikstrom, *Clin. Chim. Acta* **1986**, *158*, 229-235.
- [25] L. Brecevic, D. Kralj, J. Cryst. Growth 1986, 79, 178-184.
- [26] T. Jung, W. S. Kim, C. K. Choi, *J. Cryst. Growth* **2005**, *279*, 154-162.
- [27] L. J. Wang, X. Y. Guan, R. K. Tang, J. R. Hoyer, A. Wierzbicki, J. J. De Yoreo, G. H. Nancollas, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 9151-9157.
- [28] B. Grohe, J. O'Young, D. A. Ionescu, G. Lajoie, K. A. Rogers, M. Karttunen, H. A. Goldberg, G. K. Hunter, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*, 14946-14951.
- [29] L. J. Wang, S. R. Qiu, W. Zachowicz, X. Y. Guan, J. J. DeYoreo, G. H. Nancollas, J. R. Hoyer, *Langmuir* 2006, *22*, 7279-7285.
- [30] L. Komunjer, M. Markovic, H. Furedimilhofer, *J. Cryst. Growth* **1993**, *132*, 122-128.
- [31] D. Skrtic, H. Furedimilhofer, J. Cryst. Growth 1993, 129, 449-455.
- [32] J. A. Wesson, E. M. Worcester, J. G. Kleinman, J. Urol. 2000, 163, 1343-1348.
- [33] S. W. Guo, M. D. Ward, J. A. Wesson, *Langmuir* **2002**, *18*, 4284-4291.
- [34] T. Jung, X. X. Sheng, C. K. Choi, W. S. Kim, J. A. Wesson, M. D. Ward, *Langmuir* **2004**, *20*, 8587-8596.
- [35] M. Faatz, F. Grohn, G. Wegner, Adv. Mater. 2004, 16, 996-+.
- [36] L. Addadi, D. Joester, N. F., S. Weiner, *Chem.-Eur. J.* **2006**, *12*, 980-987.
- [37] S. Weiner, I. Sagi, L. Addadi, *Science* **2005**, *309*, 1027.
- [38] Y. Politi, E. Klein, T. Arad, S. Weiner, L. Addadi, *Science* **2004**, *306*, 1161-1164.
- [39] L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 959-970.
- [40] H. Colfen, M. Antonietti, Angew. Chem., Int. Ed. 2005, 44, 5576-5591.
- [41] J. W. Mullin, Crystallization 4th ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, 2001.
- [42] A. W. Xu, Y. R. Ma, H. Colfen, J. Mater. Chem. 2007, 17, 415-449.
- [43] D. Gebauer, A. Volkel, H. Colfen, *Science* **2008**, *322*, 1819-1822.
- [44] E. M. Pouget, P. H. H. Bomans, J. Goos, P. M. Frederik, G. de With, N. Sommerdijk, *Science* 2009, *323*, 1555-1458.
- [45] F. C. Meldrum, R. P. Sear, *Science* **2008**, *322*, 1802-1803.
- [46] R. S. K. Lam, J. M. Charnock, A. Lennie, F. C. Meldrum, 2007, 9, 1226.
- [47] R. Munoz-Espi, Y. Qi, I. Lieberwirth, C. M. Gomez, G. Wegner, *Chem.-Eur. J.* **2006**, *12*, 118-129.
- [48] J. Falbe, M. Regitz, *Römpp Lexikon Chemie; Band 2, Cm G, Vol. 2; Cm G*, 10. Auflage ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [49] A. Ethirajan, U. Ziener, K. Landfester, Chem. Mater. 2009, 21, 2218-2225.
- [50] Y. Lu, M. Hoffmann, R. S. Yelamanchili, A. Terrenoire, M. Schrinner, M. Drechsler, M. W. Moller, J. Breu, M. Ballauff, *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 377-386.
- [51] R. Munoz-Espi, A. Chandra, G. Wegner, *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 1584-1589.
- [52] D. Gebauer, A. Verch, H. G. Borner, H. Colfen, *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 2398-2403.
- [53] N. Jongen, P. Bowen, J. Lemaitre, J. C. Valmalette, H. Hofmann, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *226*, 189-198.
- [54] A. Frey, Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule (Zürich), **1925**.
- [55] <u>www.webmineral.com</u>
- [56] D. J.D., P. S.A., *Water Research* **2002**, *36*, 3925–3940.
- [57] J. Strähle, E. Schweda, *Jander Blasius, Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, 15te ed., Hirzel Verlag, Stuttgart, **2002**.
- [58] D. A. Pampena, K. A. Robertson, O. Litvinova, G. Lajoie, H. A. Goldberg, G. K. Hunter, *Biochem. J.* **2004**, *378*, 1083-1087.
- [59] A. Tickler, A. Clippingdale, J. D. Wade, *Protein Peptide Lett.* **2004**, *11*, 377-384.
- [60] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4307-4312.
- [61] M. Jonathan, M. J. Collins, P. D. Collins, *Microwave Enhanced Solid Phase Peptide Synthesis*
- [62] M. S. El-Aasser, E. D. Sodol, *Federation Soc Coatings Technology, Boston, MA* **2002**.
- [63] K. Landfester, *Macromol. Rapid Commun.* 2001, 22, 896.
- [64] K. Landfester, *Macromol. Symp.* **2000**, *150*, 117.
- [65] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, M. Antonietti, *Macromolecules* **1999**, *32*, 5222.
- [66] K. Landfester, J. Dispersion Sci. Technol. 2002, 23, 5222.

- [67] E. Bakker, Y. Qin, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3965-3983.
- [68] R. P. Buck, E. Lindner, *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 2527-2536.
- [69] MetlerToledo, Combination Ion selective Electrodes with Polymer Membrane, p.7
- [70] H. Cottet, A. Simo, W. Vayaboury, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1068*, 59-73.
- [71] H. Cottet, P. Gareil, O. Theodorly, C. Williams, E., *Elektrophoresis* **2000**, *21*.
- [72] M. Donnet, N. Jongen, J. Lemaitre, P. Bowen, *J. Mater. Sci. Lett.* **2000**, *19*, 749-750.

8.1 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die auf ihre Art und Weise einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

In erster Linie gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Katharina Landfester für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung und für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Axel Groß für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Besonders möchte ich Dr. Rafael Munoz-Espi danken, für die hervorragende Betreuung als Projektleiter, der keine Mühen gescheut hat und stets helfend zur Seite stand.

Ein Dank gilt auch an Michael Steiert für die zuverlässige Messungen der XRD-Proben.

Vielen Dank an alle Mitglieder des Arbeitskreises "Physikalische Chemie der Polymere" des MPI für Polymerforschung Mainz, die mir mit ihrer hilfsbereiten Art das Arbeiten erleichterten. Besonderer Dank gilt hierbei Matthias Maier und Julien Andrieu, die mir die Bedienung des Peptidsynthesizers erklärt haben.

Außerdem möchte ich Patrice Castignolles danken, der mir wie selbstverständlich bei der Untersuchung meiner synthetisierten Oligopeptide geholfen hat.

Zu ganz besonderem Dank bin ich meinen Eltern verpflichtet, die mir jahrelang mit moralischer und finanzieller Unterstützung zur Seite standen, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

Danke auch an meine ganze restliche Familie, die mir während meiner gesamten Studienzeit das Leben erleichterten.

Zuletzt möchte ich einen Dank an Christopher Wolff und Leonhard Linta aussprechen, die mir geholfen haben, meine Rechtschreibfehler auszumerzen.

9 Erklärung

Diese Diplomarbeit wurde im Zeitraum vom 01.04.2009 bis zum 30.09.2009 im Arbeitskreis "Physikalische Chemie der Polymere" unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Katharina Landfester am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn gemäß anderen Arbeiten entnommen wurden, sind durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Mainz, den 30.09.2009

Fischer Viktor