

**Methodenentwicklung zur Charakterisierung von
metallischen Nanopartikeln und deren potentieller Einsatz
bei der Analyse von Biomolekülen mittels ICP-MS
Kopplungstechniken**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
(Dr. rer. nat.)
im Promotionsfach Analytische Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Andreas Helfrich
geboren in Worms

Mainz Juni 2008

Dekan:

[REDACTED]

1. Berichterstatter:

[REDACTED]

2. Berichterstatter:

[REDACTED]

Datum der mündlichen Prüfung: 04.08.2008

*Für meine Eltern
und für Alvaro*

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2003 bis November 2006 am Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (D77) unter der Betreuung von Herrn PD. Dr. J. Bettmer und Herrn Prof. Dr. K. G. Heumann.

Ich danke [REDACTED] und [REDACTED] für ihre uneingeschränkte Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit und der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG in Form des GRK 826 „Spurenanalytik von Elementspezies: Methodenentwicklungen und Anwendungen“ und allen daran beteiligten Professoren und Kollegiaten für die wissenschaftliche Unterstützung.

Dem Element 74, mit bürgerlichem Namen [REDACTED] danke ich für die tiefeschürfenden wissenschaftlichen und unwissenschaftlichen Unterhaltungen und wünsche ihm an dieser Stelle alles Gute für die Zukunft.

[REDACTED] möchte ich für seine Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Messungen am Element 2 danken.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für ein freundliches und nettes Arbeitsklima und für Rat und Tat bei Problemen chemischer und auch anderer Natur.

[REDACTED] und [REDACTED] danke ich für die Möglichkeit, ihr [REDACTED] untersuchen zu dürfen und [REDACTED] für die hochaufgelösten TEM-Aufnahmen.

[REDACTED] danke ich für viele nette und lustige Unterhaltungen und für etwas Ablenkung neben der ganzen Forscherei.

Zuletzt möchte ich mich bei all den anderen entschuldigen, die ich an dieser Stelle vergessen habe und sie im Rahmen einer allgemeinen weltumspannenden Dankung mit aufnehmen.

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeiner Teil	5
1.1	Einleitung	5
1.2	Zielsetzung	8
2	Theoretische Grundlagen	10
2.1	Nanopartikel.....	10
2.1.1	Synthesemethoden.....	11
2.1.1.1	Direkte Synthese	13
2.1.1.2	Ligandenaustausch	14
2.1.1.3	Post-synthetische Modifikation	18
2.1.2	Chemische und physikalische Eigenschaften.....	19
2.1.3	Charakterisierungsmethoden	21
2.1.3.1	Elektronenmikroskopie	21
2.1.3.2	Dynamische Lichtstreuung	22
2.1.4	Strategie zur Kopplung von Nanopartikeln an Proteine	23
2.1.4.1	Kopplung eines Proteins an eine Carbonsäuregruppe	26
2.2	Analytische Kopplungsmethoden.....	29
2.2.1	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS)	29
2.2.2	Elektronenspray Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	34
2.2.3	UV/VIS-Detektor	37

2.2.4	Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC).....	40
2.2.5	Gelelektrophorese (GE).....	43
3	Experimenteller Teil	50
3.1	Chemikalien- und Geräteliste.....	50
3.1.1	Chemikalien.....	50
3.1.2	Geräte	51
3.2	Synthese von Gold- und Silbernanopartikeln.....	52
3.2.1	Die Citrat-Methode	52
3.2.2	Reduktion mit NaBH ₄ in Anwesenheit von Thiolen	54
3.2.2.1	Mercaptobornsteinsäure (MSA)	56
3.3	Synthese verschiedener Thiole.....	58
3.3.1	Dihydroliponsäure.....	58
3.3.2	ω-Mercaptohexansäure	62
3.4	Charakterisierung der Nanopartikel	66
3.4.1	HPLC-Trennung von Nanopartikeln.....	66
3.4.2	GE-Kopplung zur Trennung von Nanopartikeln und Komplexen	67
3.4.2.1	Wasserlösliche Nanopartikel	73
3.4.2.2	Metall-MSA-Komplexe.....	74
3.4.2.3	Metall/S-Verhältnismessungen der Nanopartikel	75
3.4.2.4	Rubigold	78
3.4.3	ESI-MS-Charakterisierung von Nanopartikeln.....	82

3.4.4	Unabhängige Größenbestimmung der Nanopartikeln	83
3.4.4.1	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	83
3.4.4.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	84
3.5	Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen.....	85
3.5.1	Plattengele	86
3.5.1.1	Native Gelelektrophorese.....	88
3.5.2	GE-Kopplung zur Trennung von Proteinen.....	88
3.6	Biokonjugate	91
3.6.1	Kopplung von Proteinen mit DHLA	92
4	Diskussion	94
4.1	Synthesen.....	94
4.1.1	Farbigkeit der Nanopartikel	94
4.1.2	Stabilität.....	97
4.2	Charakterisierung der Nanopartikel	99
4.2.1	HPLC-Trennung von Nanopartikeln.....	99
4.2.1.1	Nicht-kovalent stabilisierte Nanopartikel.....	101
4.2.1.1.1	Reduktion durch den Eluenten.....	105
4.2.1.2	Kovalent stabilisierte Nanopartikel	109
4.2.1.3	Vergleich verschiedener Säulen.....	111
4.2.2	GE-Trennung von Nanopartikeln.....	113
4.2.2.1	Vergleich von nicht-kovalent und kovalent stabilisierten Nanopartikeln	114
4.2.2.2	Vergleich von unterschiedlichen Trennbedingungen.....	116

4.2.2.3 Vergleich mit der HPLC.....	119
4.2.2.4 Metal-MSA-Komplexe	122
4.2.2.4.1 Silber-MSA-Komplexe.....	122
4.2.2.4.2 Gold-MSA-Komplexe	127
4.2.2.5 Metall/Schwefel-Verhältnismessungen.....	133
4.2.2.6 Rubigold	138
4.2.3 ESI-MS-Charakterisierung.....	143
4.2.4 TEM-Aufnahmen	151
4.3 Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen.....	155
4.3.1 Plattengel	156
4.3.2 GE-Kopplung.....	157
4.3.3 Vergleich der zwei Gelsysteme	167
4.4 Biokonjugate	168
4.4.1 Modifizierte Proteine.....	168
5 Zusammenfassung und Ausblick	172
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	172
5.2 Ausblick	174
6 Literaturverzeichnis	175

1 Allgemeiner Teil

1.1 Einleitung

Die qualitative und quantitative Analyse von Biomolekülen hat in den letzten Jahren und Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen. Nicht zuletzt durch das Genomprojekt, welches das Ziel hatte, das menschliche Erbgut zu entschlüsseln, erlangten Wissenschaftler einen tiefen Einblick in die Natur des Lebens bis hinunter auf das molekulare Niveau^[1]. Man kennt nun die Codierungen für alle Proteine, die der menschliche Körper zu exprimieren im Stande ist. Das Auftauchen von bestimmten Proteinen oder deren Konzentrationsänderung in bestimmten Regionen des Körpers oder der Zelle, sollte Medizinern, Pharmazeuten oder Biologen dienen, Veränderungen pathogener Natur, pharmakologische Aktivität oder Signalcharakter der einzelnen Biomoleküle aufzudecken und ihre Bedeutung für das System als Ganzes zu entschlüsseln. Um allerdings komplexe Zusammenhänge biochemischer Natur genau verstehen zu können, ist es notwendig, alle Beteiligten des Systems zu identifizieren. Einige der Komponenten kommen in nur sehr niedriger Konzentration vor, können aber einen großen Einfluss auf das Gesamtsystem haben. Deshalb ist es unabdingbar, mit den gegebenen analytischen Methoden in immer niedrigere Konzentrationsbereiche vorzustoßen, die Biomoleküle in niedrigsten Mengen zu identifizieren und, was bis heute immer noch mit großen Schwierigkeiten behaftet ist, sie hinsichtlich ihrer absoluten Menge zu quantifizieren. Es reicht mitunter nicht immer aus, nur relative Änderungen bestimmter Substanzen zueinander, z. B. beim Vergleich gesunder und kranker Zellen, zu bestimmen^[2]. Da es jedoch leichter ist, solche relativen Quantifizierungen durchzuführen, begnügte man sich lange Zeit damit. Durch das Aufkommen und die kontinuierliche Weiterentwicklung neuer Analysen- und Detektionsmethoden und deren Verbindung miteinander zu leistungsfähigen Einheiten, erlangte man Schritt für Schritt neue Erkenntnisse bei der Untersuchung von Biomolekülen. So vermochte das ICP-MS (inductively coupled plasma-mass spectrometer), welches seit Mitte der 80er Jahre kommerziell vermarktet wird, Analyten in niedrigsten Konzentrationsbereichen mit hoher Präzision zu quantifizieren^[3]. Allerdings waren zu Beginn fast nur Metalle dieser

Analysenmethode zugänglich. Die mannigfaltigen Möglichkeiten einer Kopplung mit Trennmethode, wie z. B. der Gaschromatographie oder der Flüssigchromatographie, erweiterten den Einsatz des ICP-MS dramatisch, und Speziesanalytik auf einem Ultrapurenniveau wurde möglich^[4,5]. Mit der Verbesserung der Geräte wurden auch Halbmetalle und Nichtmetalle dem ICP-MS zugänglich und die Speziesanalytik öffnete sich den so genannten „-omics“, am bekanntesten vertreten durch die Genomics und die Proteomics, also der Gesamtanalyse der Gene und der Proteine^[6,7,8]. Viele wissenschaftliche Arbeitsgruppen beschäftigten sich fortan mit der Trennung und Quantifizierung von Proteinen und Metalloproteinen und mit der Analyse von DNA-Fragmenten mittels Detektion der in den Biomolekülen vorkommenden Metalle und Heteroatome wie z. B. Phosphor und Schwefel^[9]. Das Vermögen eines ICP-MS, Elemente wie diese in niedrigen Konzentrationen zuverlässig zu bestimmen, ist jedoch limitiert durch die im Vergleich zu den Metallen schlechtere Nachweisgrenze, geringere Ionisierungseffizienz im Plasma und die Überlagerung des eigentlichen Signals durch auftretende spektrale Interferenzen, welche nur durch die Benutzung spezieller ICP-Massenspektrometer abgetrennt werden können^[10,11].

Ein Ansatz, schlecht detektierbare Substanzen (also solche, die keine Metalle enthalten) für die „Augen“ des ICP-MS-Anwenders sichtbar zu machen, ist die Markierung der selbigen mit Metallionen oder -cluster. Das Prinzip der Markierung im Allgemeinen (Fluoreszenzmarkierung, Radionuklidmarkierung) ist auf dem Gebiet der Proteom- und Genomforschung schon lange bekannt^[2,12,13,14], wird aber in Bezug auf die Analytik mittels ICP-MS bis dato nur zögerlich angewandt. Stattdessen wurde und wird das Augenmerk auf die im Biomolekül natürlich vorkommenden Heteroatome wie Metalle (in Metalloproteinen), Schwefel (Proteine mit Cystein- oder Methioninresten), Phosphor (phosphorylierte Proteine, DNA) und Selen (Selenomethioninhaltige Proteine) gerichtet^[15,16,17]. Der Nachteil gegenüber einer gezielten Markierung liegt in der relativ schlechten Detektierbarkeit und der Tatsache, dass solche Heteroatome nicht immer in dem Biomolekül von Interesse vorhanden sind.

Da Marker dazu dienen sollen, die markierten Moleküle einer quantitativen Analyse zugänglich zu machen, müssen sie einige Kriterien erfüllen, die keineswegs trivial sind. So müssen die Reaktionen zwischen Marker und Zielmolekül spezifisch, stöchiometrisch und quantitativ sein, und die erhaltene Verbindung muss während

jedem der folgenden Arbeitsschritte stabil bleiben. Soll die Markierung einzig und allein der Sichtbarmachung von Molekülen dienen, wie z. B. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen oder deren Markierung mit Nanopartikeln für optische Untersuchungen^[18], so sind die oben aufgeführten Punkte weit weniger kritisch zu beachten. Eine quantitative Analyse hängt jedoch substantiell davon ab.

Zurzeit forschen viele Gruppen im Bereich der analytischen Chemie auf dem Gebiet der Markierung von Biomolekülen mit stabilen Isotopen, dem so genannten „labeling“, und auch dort gilt es einige Schwierigkeit zu überwinden. Die organische Chemie bietet uns eine große Palette an chemischen Werkzeugen, um Kupplungsreaktionen zwischen funktionellen Gruppen von Biomolekülen und denen von Trägersubstanzen, die das Label tragen, durchzuführen. Es bedarf jedoch meist vieler aufwendiger Arbeitsschritte und einer gewissen Menge an Ausgangssubstanz, was zusammen nach einer äußerst sauberen und akkuraten Syntheseführung verlangt und dementsprechend sehr anspruchsvoll ist.

Wenn man nun den Aufwand betreibt, ein Biomolekül zu markieren mit dem Ziel, es anschließend elementmassenspektrometrisch zu untersuchen, ist es natürlich wünschenswert, den auf diese Weise erhaltenen Vorteil zu maximieren. Es liegt nun auf der Hand, das Zielmolekül nicht nur mit einem einzigen Atom, welches z. B. als komplexiertes Kation über einen Liganden an das Biomolekül gekoppelt werden kann^[19], zu markieren, sondern gleich eine Vielzahl von Atomen zu verwenden, um das resultierende Signal zu erhöhen. Das ist gegeben, wenn man einen metallischen Nanopartikel als Marker benutzt. Er enthält viele Atome und verstärkt entsprechend das Signal pro Biomolekül gegenüber der Markierung mit einem einzigen Atom. Neben den oben aufgeführten Anforderungen an einen Marker, muss ein Nanopartikel noch weiteren Anforderungen genügen, um ihn beim Labeling von Biomolekülen einsetzen zu können. Möchte man nach der Markierung noch eine Trennung der Spezies durchführen, so muss das Partikel im Verhältnis zum markierten Molekül klein sein, so dass die verschiedenen Moleküle immer noch aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften separiert werden können und nicht der Nanopartikel den dominierenden Einfluss aufgrund seiner Größe auf die Trennung hat. Des Weiteren müssen die Partikel eine gewisse Homogenität aufweisen, da sonst eine Quantifizierung aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an angebondenen Atomen nicht mehr gegeben wäre. All dies stellt hohe Ansprüche an

das einzusetzende Partikel, welches deshalb seinerseits analytisch charakterisiert werden muss.

1.2 Zielsetzung

Diese Arbeit setzte sich zum Ziel, eine Methode zu entwickeln, welche es ermöglicht, Biomoleküle, hier in erster Linie Proteine, über die kovalente Ankopplung eines Gold- oder Silbernanopartikels, durch die Verwendung von ICP-MS-Kopplungstechniken zu analysieren.

Dazu werden zuerst verschiedene Nanopartikel synthetisiert und mittels HPLC und GE charakterisiert. Ebenso ist es notwendig, die später zu markierenden Moleküle mit denselben Trenntechniken zu analysieren, um durch das so erlangte Wissen über das Verhalten der beiden Verbindungsklassen Biomolekül und Nanopartikel das neue System mit den gewünschten Addukten verstehen zu können. Die Gelelektrophorese, eine in der Biologie und Biochemie durch ihre bekanntermaßen guten Trenneigenschaften bei der Analyse von Proteinen, ihrer einfachen Handhabung und ihrer vielen Variationsmöglichkeiten weit verbreitete Analysemethode, verspricht als online-Kopplung an das ICP-MS, durch die Kombination ihre bekannten Vorteile mit den herausragenden Eigenschaften des Detektors ICP-MS, eine ideale Kopplung zur Analyse markierter Biomoleküle darzustellen.

Nach der Charakterisierung der „Edukte“ Biomolekül und Nanopartikel soll ein Weg gefunden werden, durch eine beherrschbare und einfach zu reproduzierende Chemie, diese kovalent zusammenzuführen. Am Ende des Projektes steht die Trennung und Quantifizierung von auf diese Weise markierten Biomolekülen.

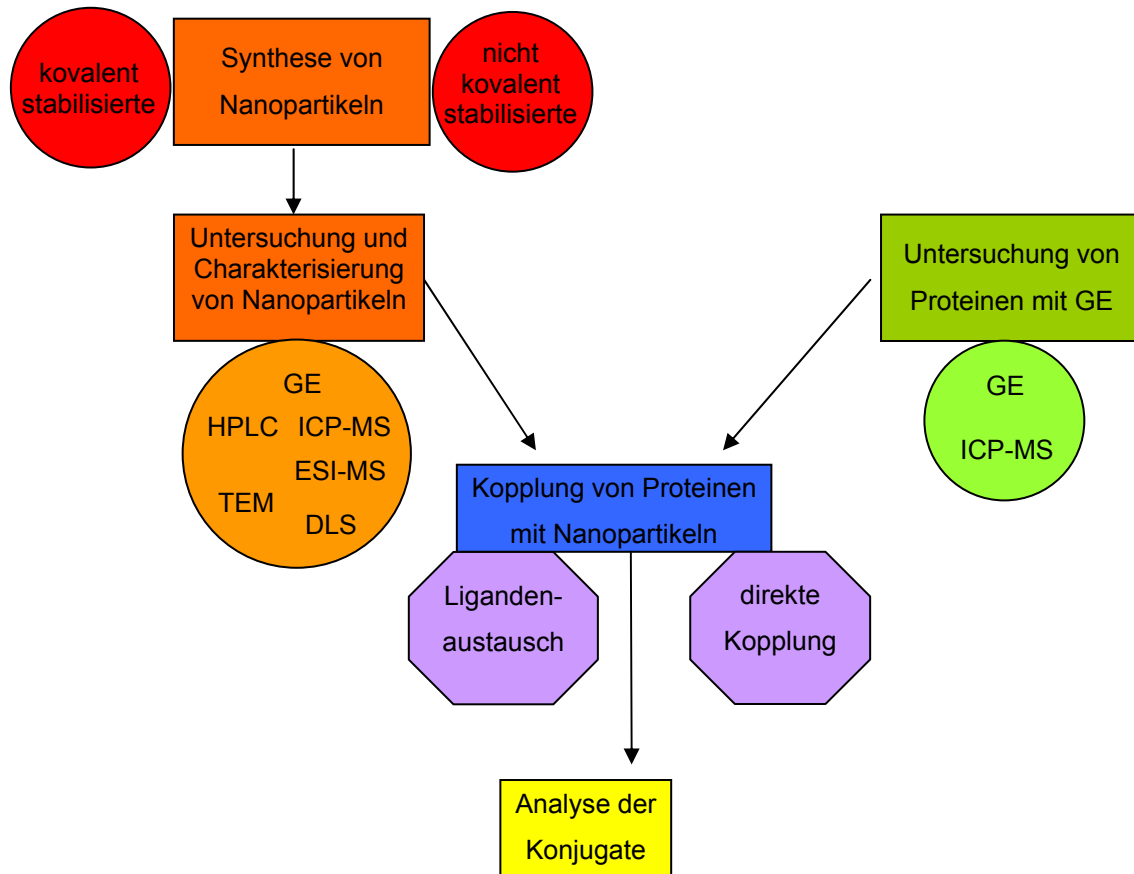


Abb. 1 Darstellung der geplanten Vorgehensweise

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Nanopartikel

Nano – eigentlich nur die wissenschaftliche Bezeichnung für den Faktor 10^{-9} , und doch verbindet man damit in wissenschaftlichen und ökonomischen Kreisen Schlagworte, wie Innovation, technische Revolution und Zukunftphantasien. In der freien Wirtschaft ist nano „trendy“ und verspricht Gewinn und Wachstum. An den Universitäten und Forschungsinstituten haben Forschungsprojekte, die den Zusatz „nano“ in ihrem Titel tragen, regen Zulauf. Und es ist in der Tat so, dass viele seriöse Wissenschaftler und Unternehmer, der so genannten Nanotechnologie in den nächsten Jahrzehnten ein immenses Potential zuschreiben, was die Entwicklung und den Einsatz von nanoskopischen Materialien im wissenschaftlichen und auch im täglichen Leben anbelangt^[20].

Durch die Entwicklung neuer Techniken und die Verbesserung der bereits bestehenden, ist es dem Menschen möglich geworden, einen immer tieferen Blick in die Welt des Kleinsten und Aller kleinsten zu werfen. Durch die Entdeckung und systematische Erforschung neuer Eigenschaften einzelner Atome, Atomcluster und Moleküle, und wegen des sich weiterentwickelnden Vermögens, das Winzige immer gezielter und präziser zu manipulieren, haben sich in den letzten Jahren immer mehr Forscher mit den möglichen Anwendungsgebieten solcher „Nano“-Materialien beschäftigt.

Schon der Physiker Richard Feynman konstatierte im Jahre 1959, dass die gezielte Manipulation einzelner Atome oder Moleküle, die bestehende synthetische Chemie revolutionieren könnte. Mit dem Titel „there’s plenty of room at the bottom“ deutete er schon die seiner Ansicht nach enormen Möglichkeiten an, die ein gezieltes Design von einzelnen Molekülen und Atom- oder Molekülverbänden auf atomarer Ebene bieten kann^[21]. Er dachte an winzige Computerschaltkreise und Mikroskope, die noch kleinere Gebilde abbilden können, als die damals existierenden Techniken es vermochten. Das alles hat sich bis heute bewahrheitet und die Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet gehen ungebrochen weiter.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf metallische Nanopartikel, also atomare Cluster mit Durchmessern zwischen 1 und 100 nm, gelegt. Die ersten bahnbrechenden Arbeiten über Nanopartikel gehen auf Studien von Faraday Mitte des 19. Jahrhunderts zurück^[22]. Er reduzierte eine Lösung aus Goldchlorid und erhielt auf diese Weise kolloidales Gold, welches er auf seine charakteristische und sich von der Lösung des Eduktes unterscheidende Farberscheinung hin untersuchte. Seitdem wurden die größenabhängigen Eigenschaften von makroskopischem Metall in seiner „bulk“-Form und seiner kolloidalen oder nanoskopischen Form eingehend untersucht. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zielen aber nicht auf die Aufklärung solcher Charakteristika, sondern untersuchen die Partikel selbst und deren potentiellen Einsatz und möglichen Nutzen in der Analytischen Chemie.

2.1.1 Synthesemethoden

Es gibt mittlerweile eine Vielzahl an chemischen Reaktionsführungen, um Nanopartikel aus unterschiedlichen Materialien mit gezielten Eigenschaften gezielt herzustellen. Auch für die Einführung funktioneller Gruppen an der Oberfläche der Partikel sind viele chemische Reaktionen denkbar. Abb. 2 zeigt ein allgemeines Schema, welches den Weg – ungeachtet aller chemischen Aspekte der Reaktionsführung – zu einem gewünschten funktionalisierten Nanopartikel beschreibt. Man geht dabei von einem Metallsalz aus, welches man reduziert und mit einem weiteren Reagenz versetzt, das gleichzeitig das Reduktionsmittel sein kann, um die entstandenen Atomverbände gegen Agglomeration zu schützen. Von dieser schützenden Schicht bzw. der nach außen zeigenden funktionellen Gruppen des stabilisierenden Moleküls hängt nun das chemische Verhalten eines Nanopartikels ab.

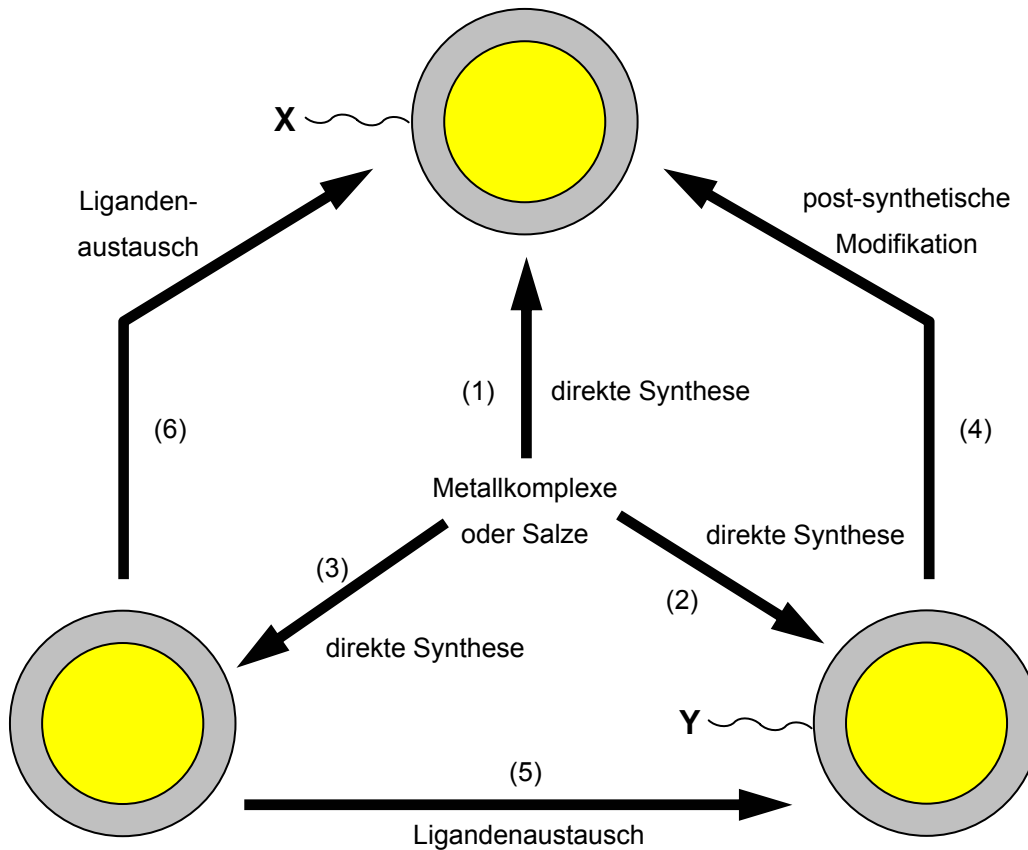


Abb. 2 Allgemeiner Syntheseweg zur Herstellung funktionalisierter Nanopartikel mit der gewünschten Funktionalität X (oben)^[23]

Man kann sich drei grundlegende Transformationen bei der Synthese funktionalisierter Nanopartikel vorstellen:

- direkte Synthese
- Ligandenaustausch
- post-synthetische Modifikationen

Bei der direkten Synthese (in Abb. 2 Weg (1)) werden die Nanopartikel unter Bedingungen synthetisiert, bei denen die gewünschte Funktionalität schon im stabilisierenden Liganden enthalten ist. Dies ist der geradlinigste Weg, verlangt allerdings nach einer genügenden Stabilität der funktionellen Gruppe während der Synthese und der Aufreinigung des Produktes.

Eine zweite Vorgehensweise ist die gezielte Modifikation des bei der Synthese verwendeten stabilisierenden Liganden. Man nennt diese Art der Einführung einer Funktionalität „post-synthetische Modifikation“ oder auch „grafting“ (in Abb. 2 Weg (2) und (4)). Hier wiederum ist es erforderlich, dass der Nanopartikel sich während des Modifikationsschrittes nicht in seiner Größe, Form und Ligandensphäre verändert. Kann bei der Synthese des Nanopartikels kein modifizierbarer Ligand eingesetzt werden, kann auch der Weg über einen Ligandenaustausch gegangen werden (in Abb. 2 Weg (3), (5) und (4)). Hierbei wird dem Nanopartikel ein Ligand zugegeben, der mit der stabilisierenden Ligandenschicht auf der Oberfläche des Partikels austauscht. Hierbei kann es sich um den gleichen Ligandentyp handeln (z. B. Thiol gegen Thiol) oder um unterschiedliche Ligandentypen (z. B. Thiol gegen Citrat). Auch hierbei ist darauf zu achten, dass durch den Austausch keine Veränderungen am Kern des Nanopartikels stattfinden sollten.

Eine dritte Möglichkeit schließlich ist der direkte Ligandenaustausch der stabilisierenden Schicht mit einem Liganden, der die gewünschte funktionelle Gruppe besitzt (in Abb. 2 Weg (3) und (6)). Falls ein geeignetes Vorläuferpartikel (Precursor) vorhanden ist, bieten die Wege 2 und 3 den Vorteil, dass aus einem Precursor eine Vielzahl verschieden funktionalisierter Partikel mit dem gleichen Metallkern erhalten werden können.

2.1.1.1 Direkte Synthese

Es ist eine Fülle an direkten Synthesen zur Herstellung funktionalisierter metallischer Nanopartikel bekannt, wobei hier nur solche besprochen werden sollen, die zu stabilen funktionalisierten Gold- und Silbernanopartikeln führen, ohne dass ein weiterer synthetischer Reaktionsschritt notwendig ist. Im Folgenden wird der Einfachheit halber nur noch von Goldnanopartikeln die Rede sein, wobei die meisten Synthesemethoden funktionieren auch für Silbernanopartikel anwendbar sind.

Die am weitesten verbreitete Methode, Goldnanopartikel herzustellen, ist die Reduktion einer Goldverbindung in Anwesenheit eines stabilisierenden Liganden oder Templates. Als Liganden können Phosphine, Thiole und Amine dienen, als Template werden reverse Mizellen, Polymere und Dendrimere verwendet. Die initiale Goldverbindung ist meistens HAuCl_4 (Tetrachlorogold(III)säure) und die Reduktion

kann photochemisch^[24], elektrochemisch^[25] oder sonochemisch^[26] erfolgen, wobei die chemische Reduktion mit Borhydriden die häufigste ist. In einigen Fällen ist das Reduktionsagens gleichzeitig auch der Stabilisator, wie bei der Verwendung von Natriumcitrat^[27], oder der Stabilisator befindet sich im Ausgangssalz wie bei der Reduktion von $\text{Au}(\text{PPh}_3)\text{Cl}$ mit Diboran^[28].

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Thiole als Stabilisatoren eingesetzt und die zugrunde liegende Chemie geht auf die Arbeiten von Brust et al. aus dem Jahre 1994 zurück^[29]. Hier wurde HAuCl_4 in wässriger Lösung unter Anwesenheit von Dodecanthiol mit Natriumborhydrid reduziert und mittels eines Phasentransferreagens sogleich in Toluol überführt. Das entstandene Partikel mit der allgemeinen Formel $\text{Au}_n(\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{S})_m$ war stabiler, als die bisher üblichen Phosphin-stabilisierten Partikel und die Synthese war einfacher. Anstelle von Dodecanthiol können auch Arylthiole^[30], polare oder ionische Thiole verwendet werden, um verschiedenste funktionalisierte Oberflächen zu erhalten. Die beiden Letzteren führen zu wasserlöslichen Nanopartikeln.

Einen weiteren Schritt in Richtung Größenkontrolle unternahmen Schaaff et al., indem sie der Mischung aus Thiol und Goldsalz vor dem Reduktionsschritt erlaubten, eine polymere Struktur $(\text{AuSR})_n$ auszubilden. Das Verhältnis beider Komponenten entschied über das Ausmaß der Polymerisation und eine anschließende schnelle Reduktion mit einem Überschuss an Reduktionsmittel führte zu Nanopartikeln mit einer engen Größenverteilung^[31].

2.1.1.2 Ligandenaustausch

Durch den kompletten oder partiellen Austausch der stabilisierenden Ligandenschicht eines Goldnanopartikels kann, sofern bei der Austauschreaktion die Eigenschaften des Goldnukleus nicht beeinflusst werden, eine Vielzahl von verschiedenen Partikeln aus einem Precursorpartikel hergestellt werden. Der Austausch kann zwischen gleichen Verbindungsklassen (z. B. Phosphin gegen Phosphin) oder verschiedenen (z. B. Citrat gegen Thiol) erfolgen, er kann in einem monophasischen oder in einem biphasischen Gemisch stattfinden.

Der am weitesten verbreitete Austauschtyp ist der zweier unterschiedlicher Thiole, auch als „place-exchange reaction“ bekannt. Die ersten beschriebenen Experimente wurden von Hostetler et al. 1996 durchgeführt, wobei sie mit unverzweigten Alkanthiolaten stabilisierte Goldpartikel synthetisierten und die Alkanthiolate gegen funktionalisierte Thiolate wie $\text{Br}(\text{CH}_2)_{12}\text{SH}$ oder ω -Ferrocen substituiertes Oktanthiol austauschen ließen^[32]. Die resultierende Oberflächenbelegung konnte durch das molare Verhältnis des austauschenden Thiols zum auf der Oberfläche des Partikels vorhandenen Thiols kontrolliert und über $^1\text{H-NMR}$ -Messungen bestimmt werden. Um Partikel mit mehr als zwei stabilisierenden Spezies herzustellen, so genannte polyhetero- ω -funktionalisierte Nanopartikel, kann man entweder die Thiole schrittweise oder simultan zum Austausch bringen^[33]. Auch hier kann man bei einem simultanen Ansatz über die molaren Verhältnisse der verschiedenen Thiole die spätere Zusammensetzung der stabilisierenden Schicht kontrollieren. Der schrittweise Austausch diente Ingram et al. zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der chemischen Beschaffenheit des Thiols und seinem Bestreben, mit den an der Oberfläche fixierten Thiolen auszutauschen^[33]. Alle Experimente bezogen sich auf in organischen Lösungsmitteln lösliche Nanopartikel und erst im Jahre 1999 beschrieben Templeton et al. die Synthese von Tiopronin (N-2-mercapto-propionylglycin)-stabilisierten wasserlöslichen Nanopartikeln und den Ligandenaustausch mit verschiedenen ebenfalls wasserlöslichen kurzkettigen ω -substituierten Alkanthiolen (z. B. Sulfonat- und Carbonsäuresubstituierte Alkanthiole)^[34].

Hostetler et al. fanden bei mechanistischen Untersuchungen der Austauschreaktionen heraus, dass sie vornehmlich nach dem so genannten assoziativen Mechanismus ablaufen^[35]. Dies bedeutet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit erster Ordnung bezüglich der Partikelkonzentration und der Thiolkonzentration ist. Der Ligand wird als Thiol ausgetauscht und Disulfide oder oxidierte Schwefelspezies sind nicht an der Reaktion beteiligt. Des Weiteren hängt die Reaktivität von der Stelle, an der das Thiolat auf der Goldoberfläche gebunden ist, ab. In Abb. 3 sind die an der Oberfläche eines Clusters möglichen Austauschprozesse schematisch dargestellt.

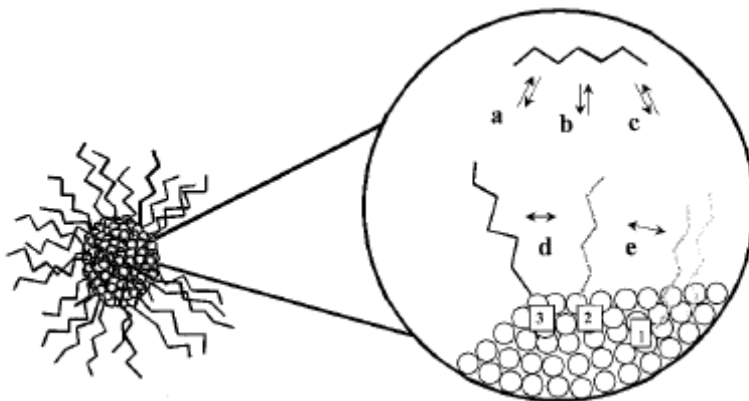


Abb. 3 Darstellung der bei einem Ligandenaustausch möglichen Prozesse^[23]

Es gibt drei Arten von Bindungsstellen auf einem Cluster:

- Flächenbindungsstellen
- Kantenbindungsstellen
- Eckbindungsstellen

Die verschiedenen Stellen haben unterschiedliche Austauschreaktivitäten bezüglich der in Lösung befindlichen Thiole. So tauschen an Ecken gebundene Liganden (in der Abbildung mit 3 bezeichnet) sehr schnell aus, solche, die sich an einer Kante oder auf einer Fläche befinden (2 und 1) jedoch kaum.

Nicht zuletzt spielt auch noch die Größe des eintretenden und austretenden Liganden eine Rolle. Je raumfüllender die Liganden sind, desto schlechter können sie in die Ligandenhülle ein- bzw. aus ihr heraustreten.

Ein Beispiel für den Austausch von Phosphinliganden gegen Thiole wurde von Loweth et al. beschrieben^[36]. Es handelte sich aber nicht um einfache SH-Verbindungen sondern um thiolierte Oligonukleotide, die durch Ligandenaustausch auf die Oberfläche von Goldnanopartikeln gebracht werden sollten. 0,9 Äquivalente von einsträngigen modifizierten 18-, 28- und 38meren wurden mit Nanopartikeln verschiedenen Durchmessers (5 nm und 10 nm) zusammengebracht. Eine Änderung der gelelektrophoretischen Mobilität konnte allerdings erst bei Reaktion mit mehr als einem Äquivalent oder bei Verwendung von Oligonukleotiden mit Basenlängen >60 für einsträngige und >40 für doppelsträngige beobachtet werden. Bei der Zugabe von

geeigneten Templaten (siehe Abb. 4) (komplementäre Oligonukleotide), verbanden sich diese mit den Gold-Oligo-Konjugaten und konnten mit Hilfe des TEM sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 5).

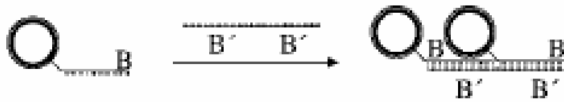


Abb. 4 Synthesestrategie für die Aggregation von Nanopartikeln. B' stellt die komplementäre Basensequenz zu B dar^[36]

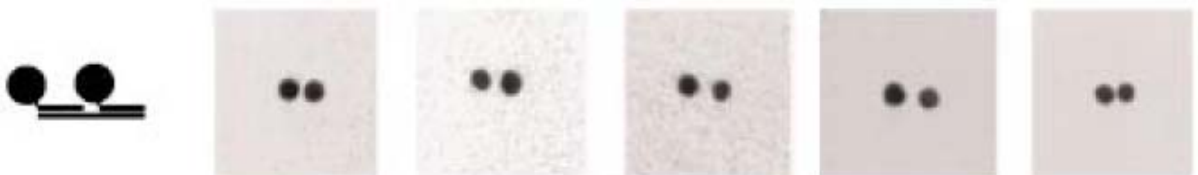


Abb. 5 TEM-Aufnahmen von 10nm-Homodimeren^[36]

Einen systematischen Austausch eines Liganden, mit dem Ziel, eine einzige funktionelle Gruppe an das Partikel zu fügen, gelingt neben dem unspezifischen Ligandenaustausch, der über das stöchiometrische Verhältnis beider Komponenten, also Nanopartikel und auszutauschender Ligand, kontrolliert wird, auch durch eine Festphasenreaktion. Dabei wird die feste Phase, in der Regel Harzkügelchen, mit dem gewünschten Liganden beladen. Die in einer wässrigen Phase gelösten Nanopartikel strömen an der festen Phase vorbei und der zuvor auf ihr fixierte Ligand reagiert entweder mit der Ligandenhülle des Nanopartikels oder bindet im Falle eines Thiols direkt an den Kern des Clusters. In einem zweiten Schritt wird die Bindung des Liganden zum Harz gespalten und das nun freie modifizierte Cluster kann vom Harz eluiert werden^[37, 38, 39].

2.1.1.3 Post-synthetische Modifikation

Die ersten Arbeiten zur gezielten Modifizierung der stabilisierenden Ligandenschicht auf chemischem Wege gehen auch auf die Arbeitsgruppe um Murray zurück. Sie waren es, die zuerst etwaige Unterschiede in der Reaktivität der auf der Oberfläche des Nanopartikels fixierten Moleküle und den gleichen Molekülen in Lösung untersuchten. Als Ausgangssubstanzen wurden mit ω -Brom- und ω -Carbonsäurealkanthiolen modifizierte Goldnanopartikel verwendet^[40,41]. Erstere dienten zur Untersuchungen von S_N2 -Reaktionen in Umsetzung mit verschiedenen Propyl- und Butylaminen und letztere zur Veresterung mit verschiedenen Aminen. Bei beiden Reaktionstypen konnten keine signifikanten Unterschiede zu vergleichbaren Reaktionen der einzelnen Komponenten in Lösung beobachtet werden. Bei den Veresterungen wurden die gleichen Reaktionsbedingungen gewählt wie für nicht an Oberflächen gebundene Moleküle, und in keinem Fall konnten nach der Kopplungsreaktion Veränderungen am Goldkern bezüglich Größe und Form festgestellt werden.

Zur Verbindung von zwei und drei Nanopartikeln zu einem größeren Gerüst, benutzten Alivisatos et al. schon 1996 (vgl.^[36]) kommerziell erhältliche wasserlösliche phosphinstabilisierte Goldnanopartikel mit einer einzelnen N-Propylmaleimid-Funktionalität auf der Oberfläche (Nanoprobes, Yaphank/USA). Diese wurde mit einem am 5'-Ende thiolierten Oligonukleotiden (18mer) zur Reaktion gebracht und nach einer gelelektrophoretischen Aufreinigung mit verschiedenen komplementären Oligonukleotidsträngen gekoppelt^[42]. In Abb. 6 ist die Trennung von Konjugaten aus zwei, einem und keinem oligoderivatisiertem Goldnanopartikel mit einem entsprechenden komplementären Oligonukleotid (37mer) zu sehen. Durch verschiedene stöchiometrische Ansätze von Templat und mit dem Goldnanopartikel gelabelten 18meren, konnten diese gezielt synthetisiert werden.

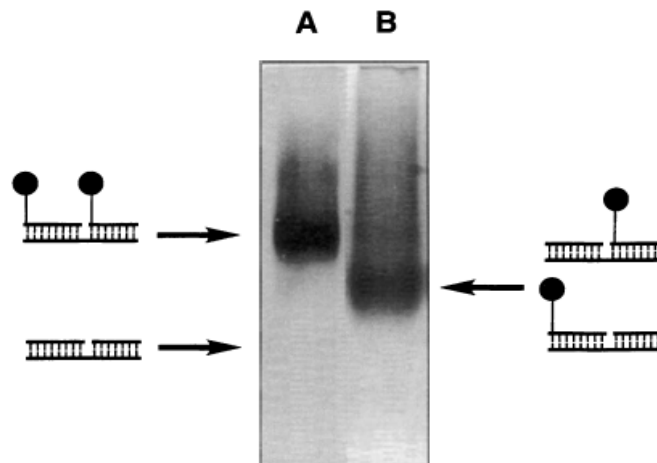


Abb. 6 Gelelektrophorese (10 % Acrylamid) von DNA-Au-Nanopartikel-Komplexen. Bahn **A**: eine 2:1 Mischung aus gelabeltem Oligo und dem entsprechenden Templat, Bahn **B**: eine 1:1 Mischung aus gelabeltem Oligo und dem entsprechenden Templat^[43].

2.1.2 Chemische und physikalische Eigenschaften

Als Beispiele für die deutlichen und fundamentalen Unterschiede bezüglich des chemischen und physikalischen Verhaltens und des optischen Erscheinungsbildes zwischen Metallen in ihrer bulk-Form, als gelöstes Kation und als nanopartikuläres Cluster, seien hier Gold und Silber herausgegriffen.

Der ohne Benutzung analytischer Methoden und chemischer Vergleiche, und somit auch für einen Laien augenscheinlichste Unterschied dieser drei chemischer Formen der Metalle, ist optischer Natur. Gold und Silber besitzen den für Metalle typischen Glanz mit dem Unterschied, dass Gold eine Farbigkeit besitzt. Erklären lässt sich die Farbe, der Glanz und die Undurchsichtigkeit von Metallen mit dem sogenannten Bändermodell, wonach sich im Metallgitter bindende und nichtbindende Orbitale überlappen und ein Kontinuum an energetisch sehr nahe liegenden Zuständen bildet, die man sich als Bänder vorstellen kann. Die Elektronen in diesem Band sind frei beweglich und können Lichtenergie über einen sehr breiten Wellenlängenbereich absorbieren. Die Elektronen bleiben aber nicht lange im angeregten Zustand und emittieren ihre aufgenommene Energie sogleich wieder als Lichtquant. Durch das

Vermögen, Strahlung praktisch jeder Wellenlänge absorbieren und emittieren zu können, erhalten die Metalle ihren spiegelartigen Glanz. Die Farbigkeit von Gold rührt nun daher, dass die Zustandsdichte (Zustände vergleichbaren Energiegehalts) nicht gleich ist und deshalb verschiedene Wellenlängen in unterschiedlichem Maße absorbiert werden können^[44].

Das dreiwertige und auch stabilste Kation des Goldes besitzt in Lösung eine stark gelbe Färbung, beim Silber ist jedoch die einwertige Form die stabilste und diese ist, ebenso wie beim Gold, farblos. Die Tatsache, dass viele komplexierte Metallkationen aus den Nebengruppen gefärbt sind, liegt an der in der Ligandenfeld-Theorie erklärten Aufspaltung der zum Metall gehörigen d-Orbitale im Feld der Liganden. Übergänge von Elektronen zwischen den durch den Einfluss der Liganden bezüglich der Energie unterschiedlichen d-Orbitale oder Übergänge zwischen Zentralmetall und Ligand durch Absorption von Strahlung im sichtbaren Bereich, geben den Komplexen ihre charakteristische Farbe^[45].

Metallische Nanocluster haben nun weder die optischen Eigenschaften von dem makromolekularen quasi endlosen Metallgitter noch von den diskreten komplexierten Metallkationen. Durch Anregung der Oberflächenelektronen des Partikels im elektromagnetischen Feld, werden diese in eine kollektive Schwingung versetzt (engl. Plasmon resonance). Die Absorptionsfrequenz ist abhängig vom Material des Partikels, von seiner Form und dem umgebenden Medium. Sphärische Goldpartikel in wässriger Lösung mit Durchmessern um 10 nm absorbieren im Bereich von 500-530 nm und haben dementsprechend eine rote Färbung. Nimmt der Partikeldurchmesser zu, so verschiebt sich das Absorptionsmaximum in den längerwelligen Bereich und der Farbeindruck geht über ins Violette.

2.1.3 Charakterisierungsmethoden

2.1.3.1 Elektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist die wohl am häufigsten angewandte Methode, um die Größe und Form von Partikeln zu bestimmen. Das Prinzip ähnelt dem des Lichtmikroskops mit dem Unterschied, dass anstelle von Licht Elektronen verwendet werden. Auf Grund des Wellen-Teilchen-Dualismus sind sie zur Interferenz fähig und durch geeignete magnetische oder elektrische Linsensysteme lassen sie sich, wie auch Licht durch eine optische Linse, in ihrer Richtung beeinflussen. Die Auflösung eines Mikroskops wird in erster Linie durch die verwendete Wellenlänge der Strahlung bestimmt. Je größer die Beschleunigung der mit Hilfe einer Kathode oder durch Feldemission erzeugten Elektronen ist, desto niedriger ist ihre Wellenlänge. Bei 100 kV beträgt diese einige Pikometer, durch Abbildungsfehler von magnetischen Linsen ist die Auflösung jedoch auf etwa 100 pm limitiert.

In Abb. 7 ist der Aufbau des hochauflösenden JEM 3010 der Firma JOEL zu sehen. Man erkennt die Elektronenemissionsquelle am oberen Ende des Gerätes, den Probenhalter in der Mitte und verschiedene Linsen und Blenden vor und nach der Probe. Am unteren Ende befindet sich der Leuchtschirm, auf dem man sich durch das Sichtfenster die Probe ansehen kann. Dreht man diesen zur Seite tritt eine CCD-Kamera (CCD = charged coupled device) an seine Stelle und misst die Intensitätsverteilung in der Bildebene.

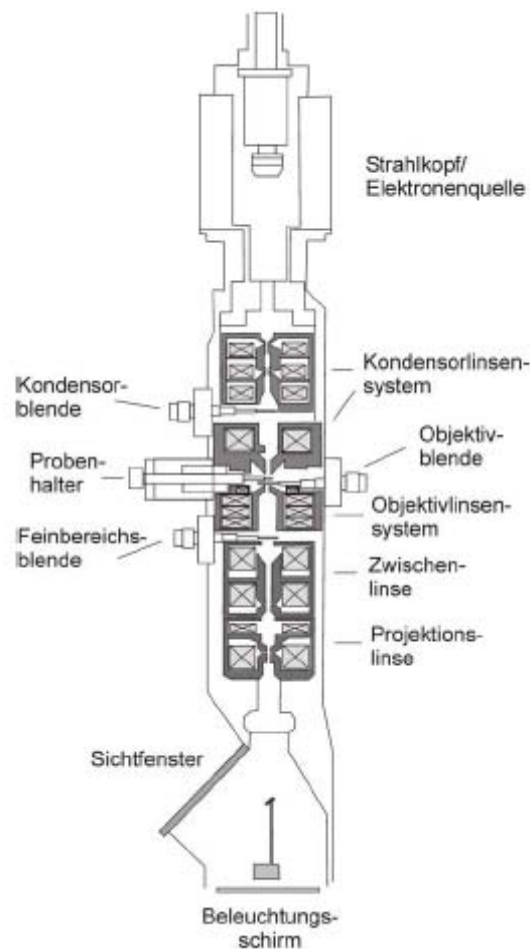


Abb. 7 Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops.

2.1.3.2 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung dient zur Ermittlung des hydrodynamischen Radius eines Moleküls, also des Radius der Verbindung inklusive der sie umgebenden Hydrathülle in wässriger Lösung. Hierzu wird das Streulicht eines Laserstrahls, der durch die Probe geleitet wird, beobachtet.

Ein Teil des Laserlichtes wird an den in der Probelösung gelösten Molekülen gestreut und die Intensität dieser Streustrahlung wird winkelabhängig gemessen. Sie erlaubt eine Aussage über die Größe der Moleküle. Betrachtet man den Mittelwert der Streuintensität spricht man von statischer Lichtstreuung. Sie dient zur Charakterisierung von Strukturen mit einem Durchmesser von einigen 100 nm.

Um kleinere Gebilde untersuchen zu können, bedient man sich der dynamischen Lichtstreuung, die im Gegensatz zur statischen Lichtstreuung die zeitliche Fluktuation der Streuintensität detektiert. Diese hängt mit der zeitlichen Fluktuation der Anzahldichte der Streuteilchen im Streuvolumen zusammen und diese Fluktuation ist wiederum abhängig vom Diffusionskoeffizienten der Teilchen. Prinzipiell bestimmt man mit der dynamischen Lichtstreuung Diffusionskoeffizienten bzw. Verteilungen von Diffusionskoeffizienten. Mit der *Stokes-Einstein*-Beziehung lassen sich dann unter der Annahme, dass sphärische Teilchen vorliegen, aus den Diffusionskoeffizienten die hydrodynamischen Radien der diffundierenden Teilchen berechnen.

2.1.4 Strategie zur Kopplung von Nanopartikeln an Proteine

Im Folgenden wird das mögliche Einsatzgebiet von Dihydroliponsäure (DHLA) als einföhrbare Thiolkomponente bei der Anbindung von Proteinen an Nanopartikel erörtert. Die Strategie zur Anbindung von Proteinen an Nanopartikel beruht auf einer Modifizierung des Zielmoleküls, hier dem Protein, und einer Fixierung des auf diese Weise modifizierten Moleküls über die eingeföhrte Schwefelkomponente an das Nanopartikel. Hintergrund dieses Ansatzes ist die stabilere Anbindung von DHLA als Dithiolverbindung an die Goldoberfläche des Clusters gegenüber Monothiolverbindungen. Durch einen statistischen Ligandenaustausch zwischen der an das Zielmolekül gebundenen Dithiolkomponente mit den auf dem Nanopartikel gebundenen Monothiolverbindungen und der stärkeren Bindung nach dem Austausch könnte unter geeigneten Bedingungen ein einzelnes Biomolekül an ein Cluster angebonden werden (siehe Abb. 8).

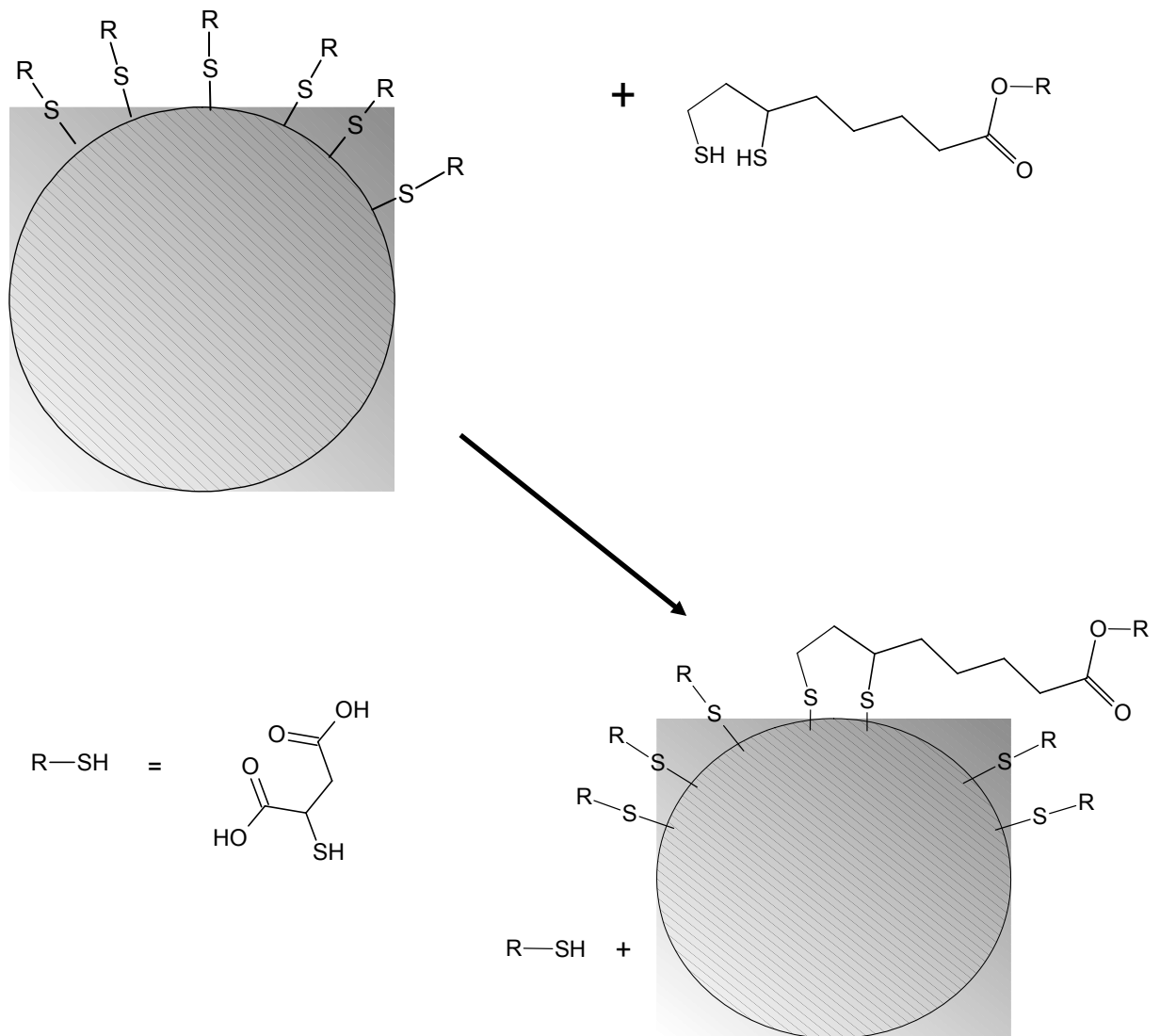


Abb. 8 Schema des Ligandenaustausches von MSA durch derivatisiertes DHLA

Es ist bekannt, dass Liganden mit mehreren Thiofunktionen im Molekül den Partikeln eine höhere Stabilität gegenüber Ligandenaustauschreaktionen bieten. Als Beispiele seien multithiolierte Cyclodextrine^[46] und mit Dithianepiandosteron und Tri(hexylthiol) derivatisierte Oligonukleotide^[47] genannt, die dem Nanopartikel eine signifikant erhöhte Stabilität gegenüber dem Angriff von threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol (Dithiothreitol, DTT) bieten. Hierzu wurde den mit Mono-, Di- und Trithiolliganden stabilisierten Partikeln Dithiothreitol zugegeben und die Abnahme der Absorption bei 600 nm beobachtet. Durch den Austausch mit DTT werden die Nanopartikel instabil und agglomerieren, was zu einer Veränderung der Farbe von rot nach blau, also eine Verschiebung der Absorption in den niederwelligen Bereich, mit sich bringt.

Mit DHLA modifizierte Cluster weisen durch die Bindung über zwei Schwefelatome an die Clusteroberfläche ebenfalls eine erhöhte Stabilität gegenüber Austauschreaktionen mit anderen Thiolen auf. Diese stärkere Bindung zeigt sich auch im umgekehrten Fall durch eine Verdrängung von schwächer gebundenen Stabilisatoren, wie Citrat, und kann, wie oben beschrieben, zur Fixierung von Biomolekülen genutzt werden.

Erste Untersuchungen der Bindungsart der Thiolkomponente von DHLA-modifizierten Goldnanopartikeln (im Folgenden DHLA@Au genannt) gehen auf Arbeiten von Roux et al.^[48] zurück und zeigen eine lange Zeit vermutete und durch K-edge XANES Studien bewiesene Anbindung des Liganden über beide Schwefelatome an die Goldoberfläche. Diese doppelte Bindung erklärt die größere Stabilität bezüglich Ligandenaustauschreaktionen durch Dithiothreitol (DTT) gegenüber Monothiolverbindungen, wie z. B. Mercaptoundecansäure (MUA). Hier übersteigt der Vorteil der stärkeren Bindung zur Goldoberfläche den Nachteil, dass die Monoschicht gegenüber einer MUA-Monoschicht ungeordneter und damit angreifbarer ist. Diese starke Bindung ist auch für den effektiven Austausch von Citratmolekülen bei citratstabilisierten Nanopartikeln verantwortlich und soll bei den folgenden Überlegungen zur Herstellung von Clusterkonjugaten mit Biomolekülen genutzt werden.

Roux beschreibt die Synthese von DHLA@Au und führte die darauf folgende Modifizierung der Ligandenschicht zum einen mit Luminol und zum anderen mit Peroxidase durch. Über den Zwischenschritt der Aktivierung der Carboxylgruppen von DHLA mit EDC/NHS bzw. PFP* gelang jeweils eine Kopplung der beiden Moleküle über die in ihnen enthaltenen freien Aminogruppen unter Bildung einer Peptidbindung. Die kovalente Modifizierung wurde über Chemolumineszenzmessungen bewiesen. Im Falle von Luminol konnte gezeigt werden, dass etwa 10 % der DHLA-Moleküle mit Luminol zur Reaktion gebracht werden konnten.

* Die Aktivierung mit EDC/NHS (siehe Abb. 9 und Abb. 10) stellt eine schnelle Reaktion dar, wobei eine Aktivierung mit EDC/PFP (Pentafluorphenol) langsam verläuft und der Pentafluorphenylester als Zwischenprodukt stabiler ist.

Für die Nutzung von Nanopartikeln zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Biomolekülen ist allerdings die Kenntnis der absoluten Anzahl der angekoppelten Moleküle notwendig und im idealen Fall sollte es genau ein Molekül sein, um während des Aufreinigungs- bzw. Separationsschrittes eine einheitliche Fraktion zu erhalten. Bei einer Aktivierung der gesamten Ligandenschicht eines Clusters ist dies jedoch keinesfalls gegeben, und die Konjugate können allenfalls zu qualitative Untersuchungen dienen. Deshalb wird bei dieser Arbeit der umgekehrte Weg gegangen: die zu analysierenden Biomoleküle, in diesem Fall beispielhaft zwei Proteine verschiedener Molekularmasse (Ovalbumin und β -Casein), sollen an einer verfügbaren Aminogruppe durch Aktivierung durch EDC/NHS mit DHLA zur Reaktion gebracht werden und danach über einen Ligandenaustausch an die Oberfläche eines mit Mercaptobernsteinsäure stabilisierten Goldclusters gebunden werden. Durch die Verwendung eines Überschusses an Clustermolekülen soll die Bindung von mehr als einem modifizierten Protein an ein Cluster verhindert werden. Durch eine Aufreinigung der Probe sollen in einem ersten Schritt unmodifizierte Cluster von modifizierten Clustern getrennt werden und falls dies gelingt, sollen in weiteren Versuchen Cluster, die mit verschiedenen Proteinen modifiziert wurden, voneinander getrennt werden. Bei der Verwendung von im Vergleich zu Proteinen genügend kleinen Nanopartikeln sollten die chromatographischen bzw. elektrophoretischen Unterschiede in der Trennung zwischen einzelnen Protein-Cluster-Konjugaten immer noch vom Protein herrühren und nicht vom Goldcluster abhängen.

2.1.4.1 Kopplung eines Proteins an eine Carbonsäuregruppe

Zur kovalenten Ankopplung eines Proteins an eine Carbonsäuregruppe, hier stellt DHLA die Carbonsäurekomponente dar, wird die Carboxylgruppe mit EDC aktiviert. Es findet die in Abb. 9 beschriebene Reaktion statt. EDC wird in 5-fachem Überschuss zur Carbonsäurekomponente gegeben, da das sehr reaktive Diimid auch mit Wasser reagiert und deshalb ein Teil nicht mehr für die gewünschte Reaktion zur Verfügung steht. Um den sehr instabilen O-Acylisoharnstoff gegen Hydrolyse zu stabilisieren, wird der Mischung NHS zugegeben, welches den deutlich stabileren NHS-Ester bildet (siehe Abb. 10), der dann mit weiteren Aminen zur Reaktion gebracht werden kann.

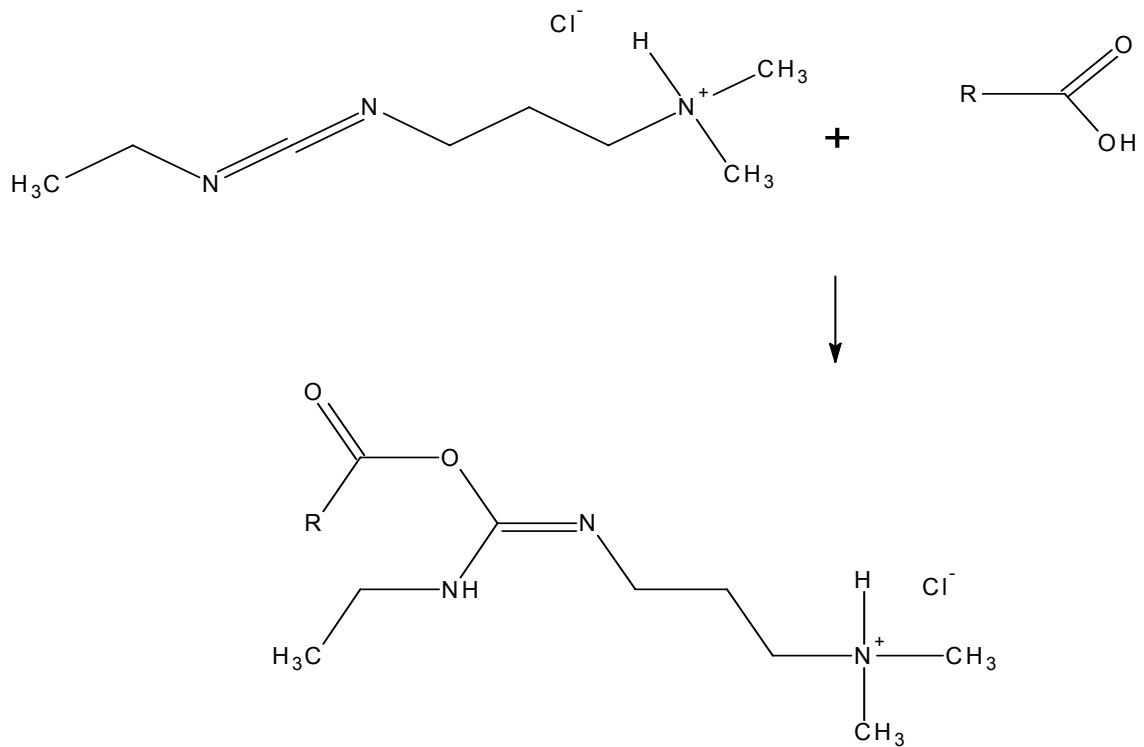


Abb. 9 Reaktionsschema der Aktivierung einer Carbonsäure mit EDC unter Bildung eines instabilen O-Acylisoharnstoffes.

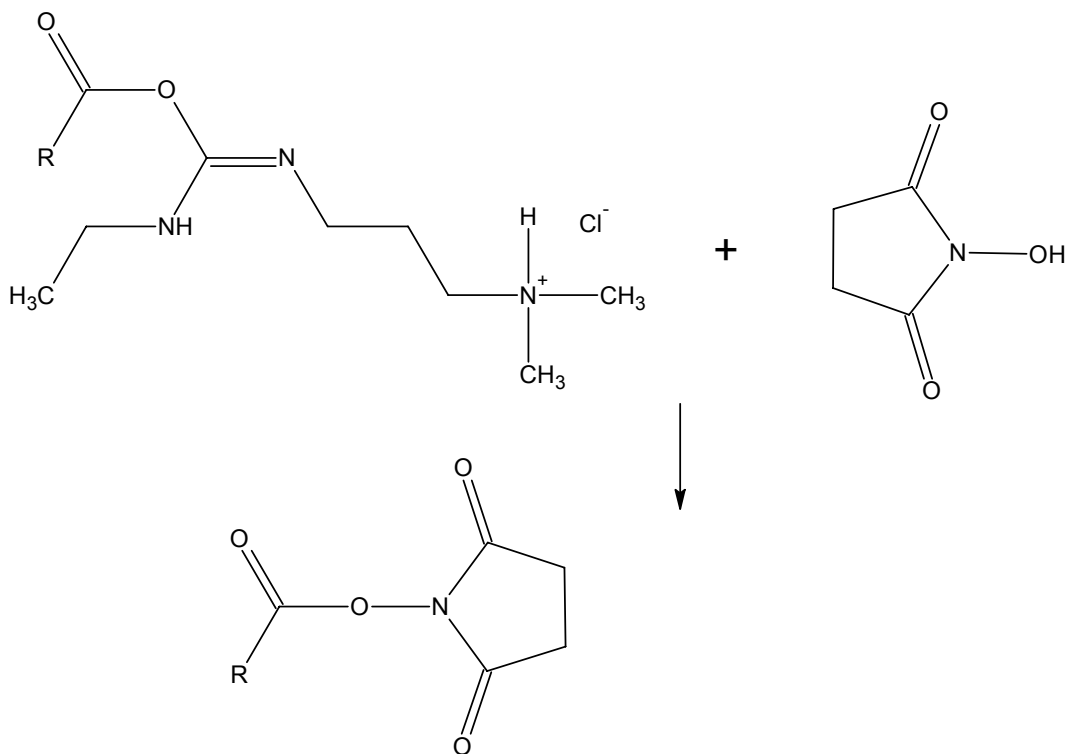


Abb. 10 Stabilisierung des reaktiven Zwischenproduktes durch NHS unter Bildung eines gegen Hydrolyse stabileren NHS-Esters.

Nachdem das EDC vollständig abreagiert hat wird der Reaktionsmischung die Aminkomponente, das Protein, zugegeben. Bei der Reaktion verdrängt diese das NHS aus dem Ester und bildet eine stabile Peptidbindung aus (siehe Abb. 11).

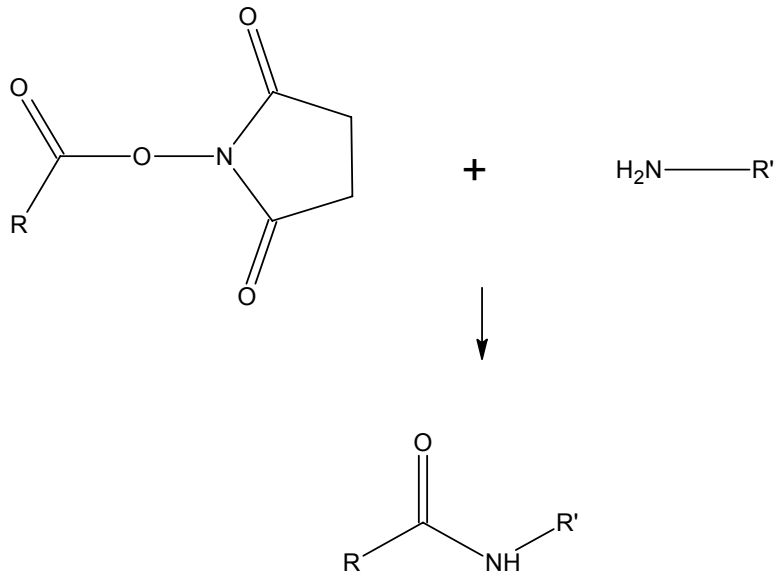


Abb. 11 Reaktion des NHS-Esters mit der Aminkomponente (R' = Proteinrest)

2.2 Analytische Kopplungsmethoden

2.2.1 Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS)

Das induktiv gekoppelte Plasma stellt bei der ICP-MS die Ionenquelle für die anschließend mit dem MS zu analysierenden Analyte dar. Die Probe wird als Gas (z. B. bei der GC-ICP-MS), als Flüssigkeitsaerosol (z. B. durch Zerstäubung bei der Fließinjektion oder LC-ICP-MS) oder als Feststoffaerosol (z. B. bei der LA-ICP-MS) in das Plasma eingetragen. Dort werden die Analyten aufgrund der hohen Temperaturen atomisiert und ionisiert, um dann über ein Interface in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers zu gelangen, wo sie aufgrund ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses getrennt und anschließend detektiert werden.

Ist die zu analysierende Probe eine Flüssigkeit, wie in dieser Arbeit, so muss diese zuerst fein zerstäubt werden, da nur Aerosolpartikel kleiner 10 µm effizient im Plasma ionisiert werden. Zur Zerstäubung wurde ein konzentrischer Mikro-flow-Zerstäuber benutzt. Hierbei wird die Flüssigkeit durch eine Kapillare geleitet, die konzentrisch in einem Glaskörper liegt, durch den das Zerstäubergas geführt wird. Am Ende der Kapillare trifft die austretende Flüssigkeit auf einen Gasstrom, der das Ende der Kapillare quasi umgibt und durch die große Geschwindigkeit den Flüssigkeitsstrom aufreißt und fein zerstäubt (siehe Abb. 12).

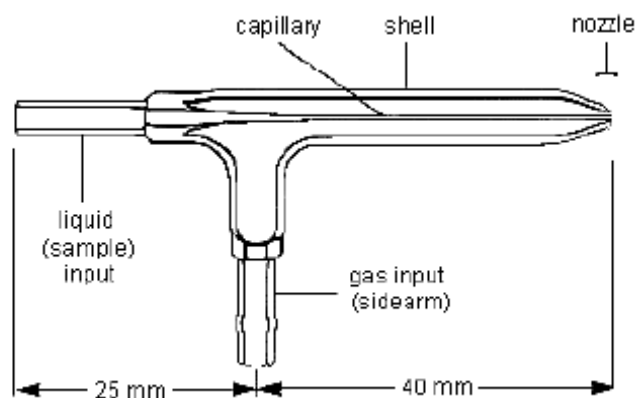


Abb. 12 Darstellung eines konzentrischen Zerstäubers

In einer zweiwandigen Scott-Sprühkammer werden die größeren Aerosolpartikel durch die Gravitation bei ihrem Weg durch die Glasrohre von den kleineren abgetrennt, indem sie sich an den Wänden niederschlagen. Durch einen unteren Ausgang fließen diese in einen Abfallbehälter ab. Durch den seitlichen Ausgang der Sprühkammer gelangen die Partikel kleiner 10 μm getragen von dem Gasstrom des Zerstäubers durch das Injektionsrohr zum Plasma.

Das Plasma, in diesem Fall ein Argonplasma, wird durch die ständige Einkopplung einer Radiofrequenz (meist 27 oder 40 MHz) mit einer Leistung von 750-1400 W erzeugt und aufrechterhalten. Die Spule, ein Kupferhohldraht mit drei Windungen, sitzt am Ende der Plasmafackel und erzeugt dort durch die Radiofrequenz (RF) ein elektromagnetisches Wechselfeld, welches mittels eines Initialfunken erzeugte Elektronen beschleunigt. Diese kollidieren mit Argonatomen, regen sie durch Energieübertrag an und ionisieren sie. Die sich in einem angeregten Zustand befindlichen Argonatome und die frei gewordenen Elektronen ionisieren weitere Atome, wodurch das Plasma gebildet und aufrechterhalten wird.

Durch einen großen tangentialen Argonfluss von 14-17 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ wird die Plasmatorch vor der enormen Hitze des Plasmas (bis zu 10000 K) geschützt und vor dem Schmelzen bewahrt. In das Plasma wird nun das Aerosol eingetragen und in den verschiedenen Zonen des Plasmas nacheinander getrocknet, verdampft, atomisiert und schließlich ionisiert.

Der Ionisierungsgrad hängt in erster Linie von der ersten Ionisierungsenergie des Elementes ab, die bei den meisten zwischen 5 eV und 10 eV liegt. Je höher die Ionisierungsenergie eines Elementes, desto schlechter ionisiert es, was die resultierende Signalintensität, also die Empfindlichkeit für dieses Element merklich herabsetzt.

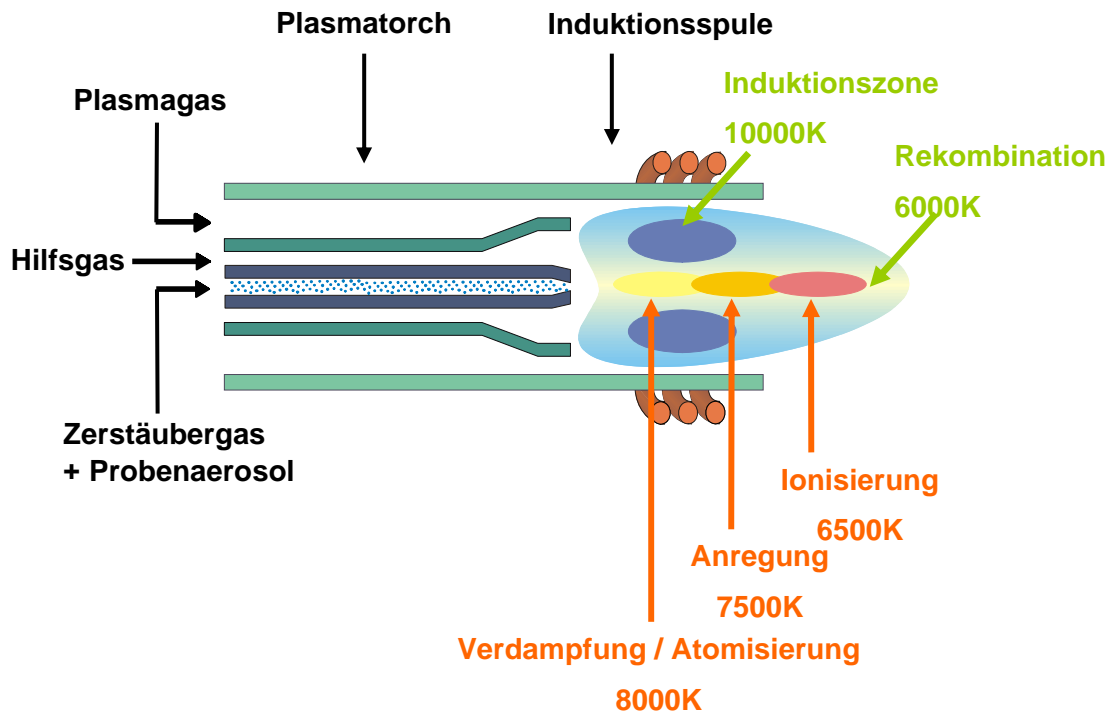


Abb. 13 Schema einer Plasmafackel mit Temperaturverteilung

In Abb. 13 ist der schematische Aufbau einer Plasmafackel mit den im Plasma herrschenden Temperaturen gezeigt. Die Fackel (engl. torch) besteht aus drei konzentrischen Glasrohren, wobei durch das innerste, das sogenannte Injektorrohr, das Aerosol eingetragen wird. Die RF-Spule (RF = Radiofrequenz) sitzt am Ende der Fackel und die Konen des Interfaces befinden sich nur einige Millimeter vom Fackelausgang entfernt. Auf dem Weg des Aerosols durch das Plasma, finden die schon beschriebenen Schritte (Trocknung, Verdampfung,...) bis zur Bildung der Ionen nacheinander statt.

Die sich im Argonstrom befindlichen Ionen passieren das Interface und gelangen in das Massenspektrometer. Das Interface besteht aus zwei Konen mit einer Öffnung von 0,8 bis 1,2 mm. Hinter dem ersten Konus (Sampler) befindet sich das Vorvakuum von etwa 1-2 mbar und hinter dem zweiten (Skimmer) ein Hochvakuum von etwa 10^{-6} mbar. Der Argonstrom tritt durch die erste Öffnung und expandiert ins dahinter liegende Vorvakuum. Durch den zweiten Konus mit einem Öffnungsdurchmesser von 0,6 bis 0,8 mm gelangt der Ionenstrom in das Hochvakuum, wo er mit Hilfe der Ionenoptik in den Massenanalysator geleitet wird.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Typen von Massenanalysatoren benutzt: zum einen ein niedrigauflösendes Quadrupol-Massenspektrometer der Firma Perkin-

Elmer, das Elan 5000, und zum anderen ein hochauflösendes Sektorfeldmassenspektrometer der Firma Thermo Finnigan, das Element 2. Die Art und Weise der Massentrennung der beiden Geräte unterscheidet sich grundlegend.

In Abb. 9 ist ein Quadrupol-MS schematisch dargestellt. Die Separationseinheit besteht aus vier jeweils parallel angeordneten elektrisch leitenden Stäben. An beiden liegen eine Gleichspannung (gegenüberliegende Stäbe gleichpolig) und eine hochfrequente Wechselspannung an, die sich in ihren Vorzeichen unterscheiden. Die durch die Ionenoptik ankommenden Ionen beschreiben zwischen den vier Stäben eine spiralförmige Kreisbahn. Je nach angelegter Spannung und Frequenz bilden nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis eine stabile Bahn aus und kollidieren nicht mit den Stäben. Die Auflösung der kommerziellen ICP-MS Geräte beträgt maximal ca. 300, so dass nur Massenunterschiede von einer atomaren Einheit aufgelöst werden können.

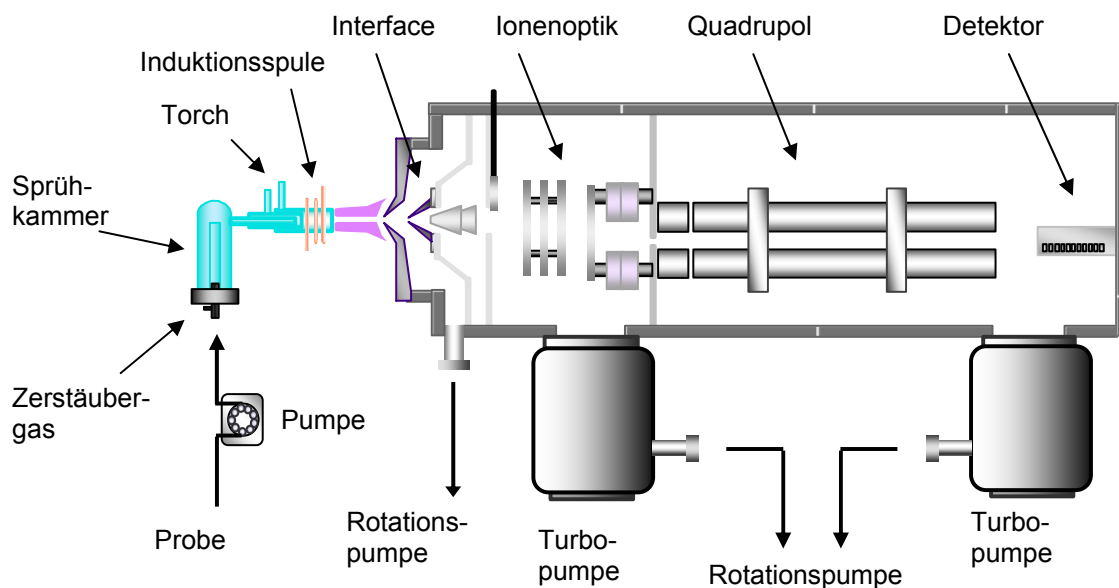


Abb. 14 Schematischer Aufbau eines ICP-Quadrupol-MS

Ein hochauflösendes Sektorfeldgerät, wie es in Abb. 15 zu sehen ist, besteht aus einem magnetischen und einem elektrischen Analysator. Erster trennt die Analytionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis und Letzter trennt nach der Energie der Teilchen.

Vor Eintritt in das magnetische Sektorfeld werden die Ionen beschleunigt, um Energieunterschiede relativ zueinander zu minimieren. Danach erfolgt die Separation nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis im magnetischen Feld und der Ionenstrom wird auf den Eingangsspalt des elektrischen Sektorfeldes fokussiert. Dort werden die Ionen mit gleichem Masse/Ladungs-Verhältnis aber unterschiedlicher Energie auf den Austrittsspalt fokussiert, wo der Detektor sitzt. Auf diese Weise ist es möglich, auf Kosten der Transmission die Auflösung zu steigern. In der Praxis sind mit diesen Geräten Auflösungen ($m/\Delta m$) bis zu 10000 möglich, was für die Trennung sehr vieler Molekülinterferenzen genügt. Isobare können allerdings nicht getrennt werden, da ihre Massendifferenz in der Regel so klein ist, dass Auflösungen um 10^5 nötig sind.

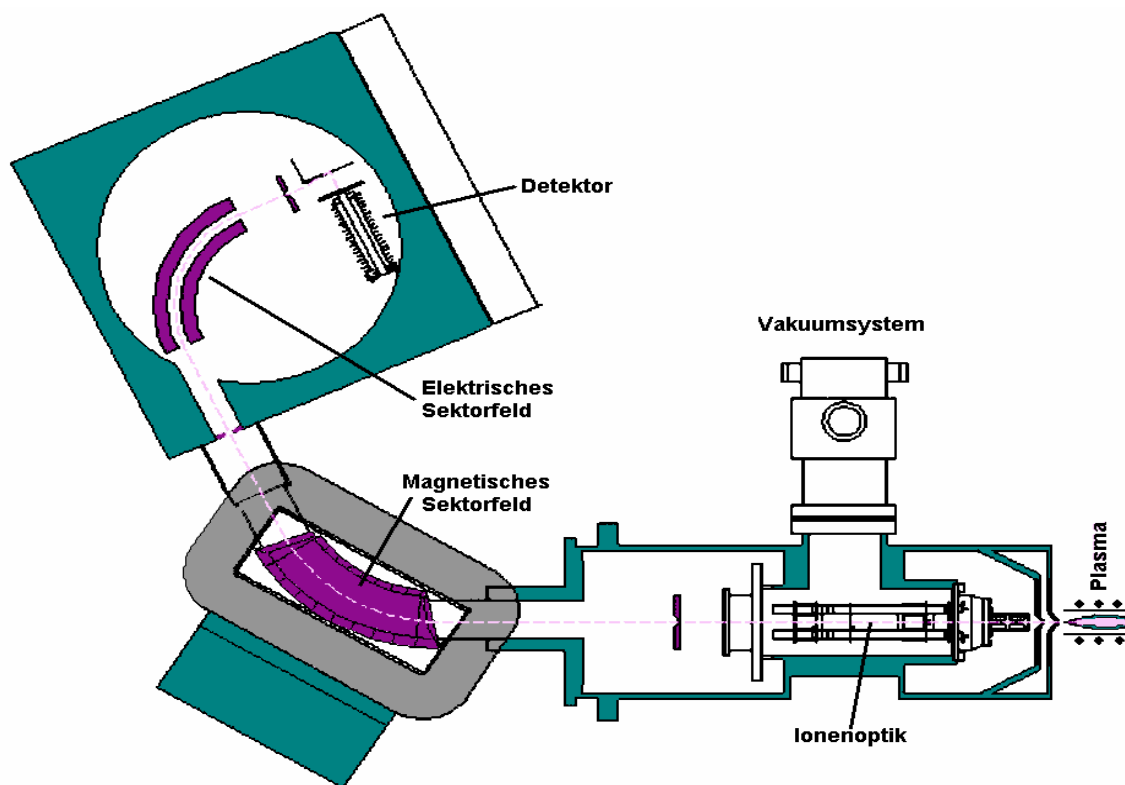


Abb. 15: Schematischer Aufbau des ICP-HRMS Element 2^[49]

2.2.2 Elektronenspray Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Elektrospray Ionisation ist mittlerweile neben der MALDI die meist verwendete Ionisationsmethode bei der massenspektrometrischen Untersuchung von organischen Molekülen und Makromolekülen. Nicht zuletzt erhielt John B. Fenn im Jahre 2002 den Nobelpreis für „*die Entwicklung von Methoden zur Identifikation und Strukturanalyse von biologischen Makromolekülen*“, also für die Entwicklung der ESI-Technik, die auf Veröffentlichungen aus den Jahre 1988/89 zurückgeht^[50,51]. Ihr herausragendes Charakteristikum ist in erster Linie die Fähigkeit, große Moleküle zerstörungsfrei zu ionisieren, und diese mehrfach aufzuladen, so dass m/z-Verhältnisse im Arbeitsbereich konventioneller Massenseparatoren auftreten.

Der Transfer von Ionen aus der Analytlösung in die Gasphase erfolgt durch die Bildung geladener Tröpfchen, die durch kontinuierlichen Solvensverlust immer kleiner werden und die Ladungsdichte auf deren Oberfläche dadurch immer größer wird. Durch den wiederholten spontanen Zerfall (Coulomb Explosion) der Tröpfchen in Mikrotröpfchen werden die Ladungen aufgrund des völligen Solvensverlustes auf den ursprünglich gelösten Substanzen akkumuliert. Dieser Ionisierungsprozess ist sehr schonend, da im Vergleich zu anderen Ionisationsmethoden wie dem FAB (fast atom bombardment), auf die Moleküle kaum zusätzliche Energie übertragen wird, welche zu ihrer Fragmentation führen könnte.

Die Probe wird direkt durch Fliessinjektion oder nach chromatographischer Trennung mit dem Eluenten durch eine Stahlkapillare, die sich relativ zu einer zylindrischen Elektrode auf einigen kV Spannungsdifferenz befindet, gepumpt und expandiert in Richtung Kathode. Während dessen treffen die entstandenen Tröpfchen auf einen Gegenstrom aus trockenem Stickstoff, der zur Verdunstung der Lösungsmittelmoleküle beiträgt. Ein Teil des zersprühten Materials gelangt durch eine dünne Kapillare in einen Bereich des Massenspektrometers, der sich unter vermindertem Druck befindet. Dort wird ein Großteil des Gases, das aus dem desolvatisierenden Aerosol stammt, abgepumpt und der Rest gelangt durch den Skimmer in den Hochvakuumbereich des Systems. Hier sind die Moleküle bereits desolvatisiert und aufgeladen und werden durch elektronische Linsen in einem Strahl gebündelt.

Alle modernen ESI-Quellen weisen Unterschiede in ihrer Bauart auf, sind jedoch von einem Grunddesign abgeleitet, welches Kantrowitz und Grey 1951 beschrieben haben^[52]. Das von ihnen vorgestellte *nozzle-skimmer system* leitet einen intensiven Molekularjet in ein Hochvakuum, wodurch wegen der adiabatischen Ausdehnung des Gases dieser stark abgekühlt wird und dadurch die zufälligen Bewegungen der Moleküle verringert werden. Des Weiteren wird durch den Aufbau ein Teil der thermischen Bewegung der Moleküle in einen gerichteten Partikelfluss umgewandelt. Zusammenfassend führt das zu einer Fokussierung von schwereren Lösungsmittelcluster, die Analytmoleküle enthalten, und die leichteren Solvensmoleküle fliegen am Rande des Jets und entweichen ihm schließlich.

Modifikationen am Zerstäuber sind nötig, wenn man höhere Flussraten in die ESI-Quelle eintragen möchte oder die Volatilität des Solvens zu niedrig für das reine Elektrospray ist. So verfügt das *pneumatically assisted ESI* über einen zusätzlichen Gasstrom konzentrisch zur eigentlichen Kapillare, der die austretende Flüssigkeit zerstäubt und somit höhere Flussraten von einigen hundert μLmin^{-1} zulässt^[53].

Die Entstehung der Ionen beim ESI-Prozess kann man in drei Schritte unterteilen:

- Entstehung eines elektrisch geladenes Spray
- Verkleinerung der Tröpfchengröße
- Entstehung völlig desolvatisierter Ionen

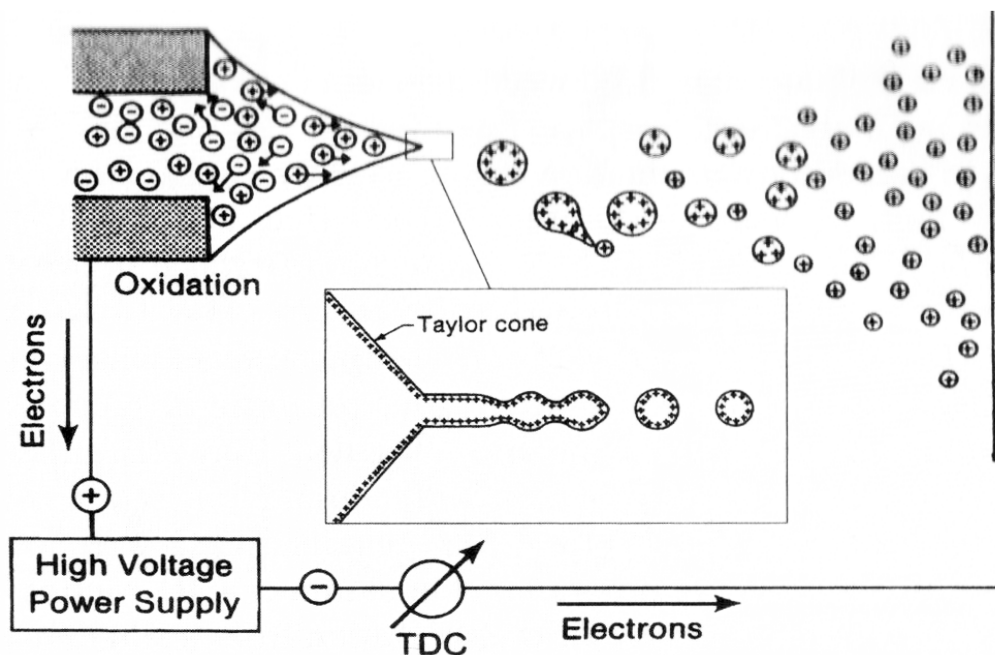


Abb. 16 Schema der Bildung eines Taylor Konus^[54]

Die Bildung eines kontinuierlichen Sprays kann man verstehen, wenn man sich vorstellt, dass zwischen dem Ende der Kapillaren mit etwa 75 μm Innendurchmesser und der sich in 1-2 cm Abstand befindlichen Elektrode eine Potentialdifferenz von 3-4 kV anliegt. Durch das große elektrische Feld von bis zu 10^6 Vm^{-1} trennen sich die Ladungen in der sich am Ausgang der Kapillaren befindlichen Flüssigkeit und der Meniskus verwandelt sich in einen Konus^[54,55]. Durch die gekrümmte Oberfläche der Flüssigkeit erhöht sich seinerseits wieder die Feldstärke, bis diese einen kritischen Wert überschreitet und der so genannte Taylor-Konus immer feiner wird und einen Jet in Richtung der Gegenelektrode ausbildet. Dieser Jet bleibt jedoch nicht stabil und bricht aufgrund der Coulombabstoßung der vielen gleichgeladenen Ionen in winzige Tröpfchen auseinander. Auf diese Weise entsteht ein feines Spray, das wegen der großen Oberfläche der einzelnen Tröpfchen durch Verdunstung ständig Solvensmoleküle verliert. Durch die damit einhergehende Verkleinerung des Radius erhöht sich die Ladungsdichte auf der Oberfläche (10^4 Ladungen pro Tröpfchen ist eine realistische Annahme). Sobald die elektrostatischen Abstoßungskräfte die Oberflächenspannung übersteigt, brechen die Tröpfchen zu kleinere Untereinheiten auseinander. Dies geschieht, indem die Tröpfchen eine Reihe von Mikrotröpfchen an ihrem gestreckten Ende absondern. Die Tröpfchen haben keine perfekte runde Form, so dass die Oberflächenladung nicht homogen verteilt ist. Sie ist stark erhöht in den Bereichen stärkerer Krümmung. Die Mikrotröpfchen nehmen nur 1-2 % der Masse aber 10-18 % der Ladung des Muttertröpfchens mit^[56].

Die Entstehung der einzelnen ionisierten Spezies ist noch nicht bis ins Letzte geklärt. Verschiedene Modelle wurden vorgeschlagen, aber die Debatte über ihre Gültigkeit wird immer noch geführt. Für große Moleküle wird das *charged-residue model* (CRM) favorisiert, welches für genügend kleine Mikrotröpfchen den sukzessiven Verlust von Solvensmolekülen bis hin zur kompletten Desolvatisierung des Analytens annimmt^[57].

ESI-MS wurde in der Vergangenheit zur Analyse von metallischen Komplexen und auch metallischen Nanopartikeln (CdS-Nanopartikel) mit Erfolg angewandt^[58]. Kleine Cluster mit bis zu 10 Cadmium- und 20 Schwefelatomen konnten als vierfach negativ geladene Spezies detektiert werden, und vorhandene Verunreinigungen mit weniger Atomen konnten identifiziert werden.

2.2.3 UV/VIS-Detektor

Die UV/Vis-Spektroskopie macht sich die Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch Moleküle zu Nutzen. Beim Durchgang einer elektromagnetischen Welle durch Materie, tritt diese mit ihr in Wechselwirkung. Dabei können in den Molekülen oder Atomen Übergänge von Elektronen aus bindenden σ - und π -Orbitalen oder nichtbindenden n -Orbitalen in antibindende σ^* - und π^* -Orbitale erfolgen (siehe Abb. 17). Besitzt das eingestrahelte Licht die entsprechende Energie, einen solchen Übergang hervorzurufen, wird es beim Durchgang durch die Materie geschwächt.

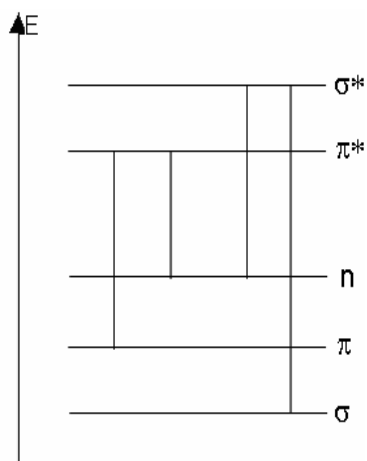


Abb. 17 Energiediagramm beim Übergang von Elektronen induziert durch elektromagnetische Strahlung.

σ^* -Orbitale sind energetisch sehr hoch liegend, weshalb für Biomoleküle diese Elektronenübergänge spektroskopisch uninteressant sind. Interessant, da im Wellenlängenbereich $\lambda > 200$ nm liegend, sind Übergänge in π^* -Orbitale. Um diese beobachten zu können, müssen die Moleküle ungesättigte Gruppen enthalten, was bei den meisten Biomolekülen der Fall ist. Die Peptidbindung in Proteinen (siehe Abb. 18) absorbiert bei 190 nm (π - π^*) und 210 nm (n - π^*), verschiedene Aminosäurereste bei 257 nm (Phe, π - π^*), 270 nm und 280 nm (Tyr und Trp, π - π^*) (siehe Abb. 19). Die Nukleinsäurebasen besitzen Übergänge im Bereich von 260 nm (n - π^* und π - π^*) (siehe Abb. 20).

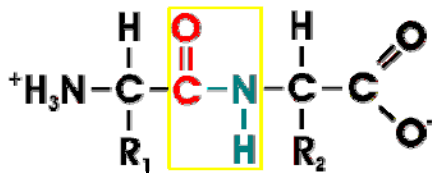


Abb. 18 Peptidbindung, absorbiert bei 190nm (π - π^*) und 210 nm (n - π^*)

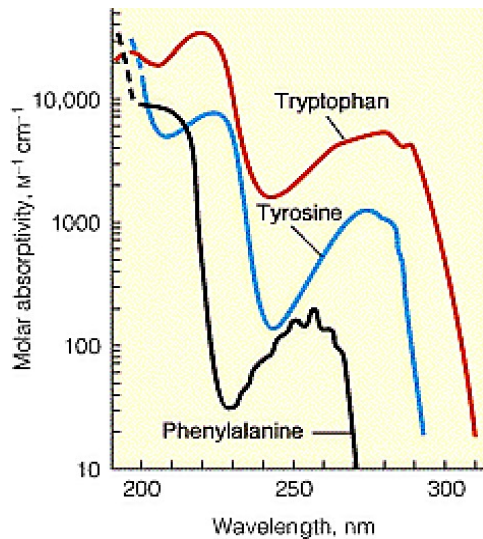


Abb. 19 Absorptionsspektrum der Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan(Trp)

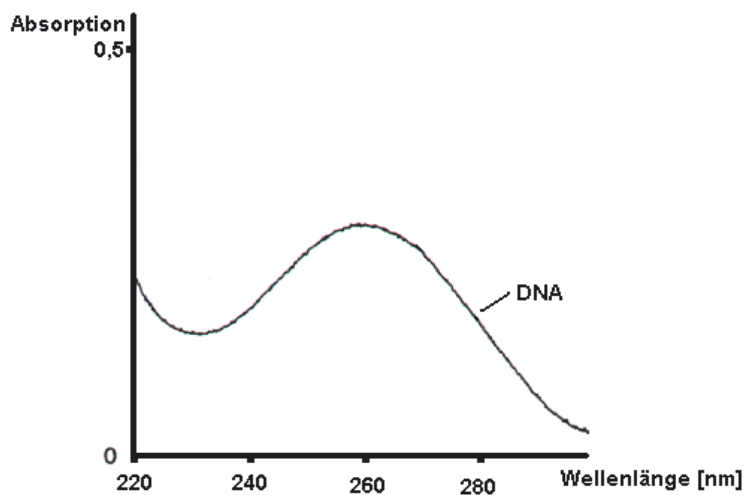


Abb. 20 Absorptionsspektrum von DNA, das Absorptionsmaximum befindet sich bei etwa 260nm

Ein Standardaufbau eines UV/Vis-Detektors ist in Abb. 21 zu sehen. Als Lichtquelle dient im Allgemeinen eine Deuteriumlampe für den Wellenlängenbereich von 200 nm bis 365 nm und eine Wolframlampe für den Bereich von 365 nm bis 800 nm. Der Monochromator, ein Prisma oder ein Gitter, filtert eine am Gerät einstellbare Wellenlänge heraus und über verschiedene Spiegel wird der nun monochromatische Strahl durch die Analysenlösung geleitet. Diese Lösung befindet sich in einer Küvette oder einer Durchflusszelle. Bei dieser Arbeit handelte es sich um ein Gerät mit Durchflusszelle, da die HPLC bzw. die Gelelektrophorese online an den UV/Vis-Detektor gekoppelt wurde. Hinter der Zelle befindet sich der Detektor, welcher die Intensität des durchtretenden Lichtstrahls misst. Über einen Verstärker und eine Auswerteinheit, hier ein Computer, können die so erhaltenen Daten erfasst und ausgewertet werden.

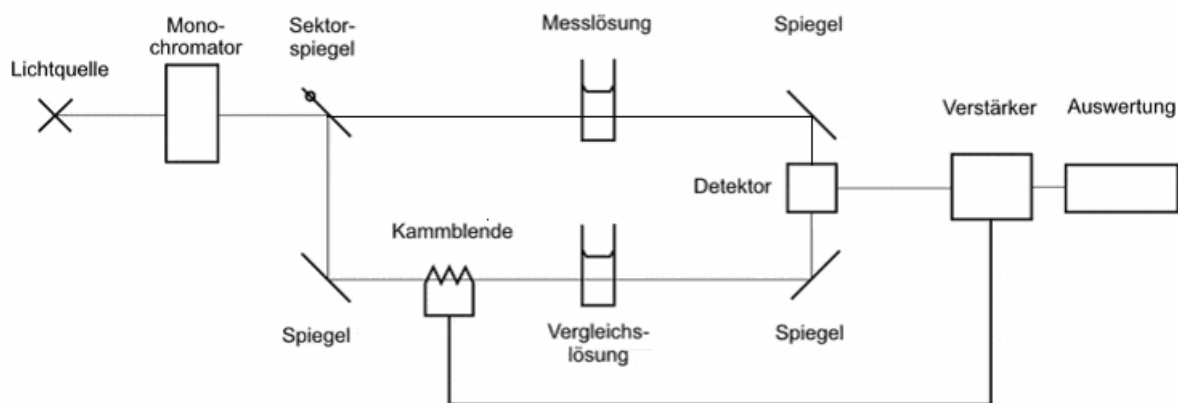


Abb. 21 schematischer Grundaufbau eines UV/Vis-Detektors

Ein UV/Vis-Detektor ist ein element- und substanzspezifischer Detektor, der keinerlei Aussagen über die Identität eines Analyten machen kann, jedoch wird er in vielen Laboratorien standardmäßig eingesetzt, was mit seiner einfachen Handhabung, seiner universellen Einsetzbarkeit und nicht zuletzt mit seinen niedrigen Anschaffungs- und Unterhaltungskosten zusammen hängt.

2.2.4 Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC)

Die Größenausschlusschromatographie ist eine chromatographische Methode, bei der Partikel oder Moleküle aufgrund ihrer Größe getrennt werden. Genau genommen beruht die Separation verschiedener Analytfraktionen auf den Unterschieden im hydrodynamischen Radius, welcher u.a. von der Form des Moleküls und der Größe der Solvathülle abhängig ist. Als Säulenmaterial werden meist poröse Silikate mit modifizierter Oberfläche oder quervernetztes Polymere (meist Polystyrol) verwendet, wobei durch die Kontrolle der Oberflächenporösität bzw. den Grad der Quervernetzung, die Porengröße und somit die Ausschlussgrenze bestimmt wird. Abb. 22 illustriert das Prinzip, nach welchem verschieden große Moleküle von dem Säulenmaterial ausgeschlossen werden, d.h. nicht oder nur in einem bestimmten Maße in die Poren eindringen, und somit unterschiedliche Verweildauern in der Säule haben und zu unterschiedlichen Zeiten eluieren.

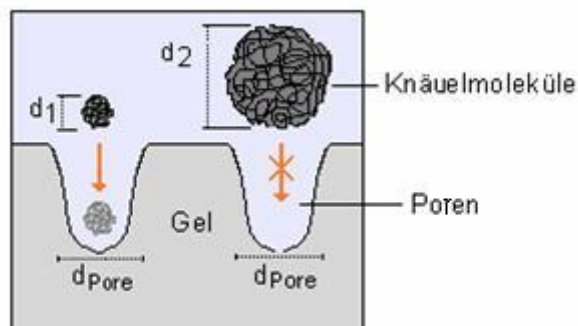


Abb. 22 Darstellung des Ausschlussprinzips bei der SEC-Chromatographie

Je kleiner der hydrodynamische Radius eines Moleküls ist, desto tiefer kann es in eine Pore eindringen und desto länger ist der durch Diffusion zurückgelegte Weg. Sie eluieren demnach später als größere Moleküle, die nicht so tief in die Poren der stationären Phase diffundieren können. Solche Moleküle, die größer als die Porenöffnungen sind und deshalb nicht hinein diffundieren können, werden auf einer SEC-Säule nicht aufgetrennt und eluieren als Erste im Totvolumen V_0 .

Das Permeationsvolumen der Säule V_t setzt sich aus dem Totvolumen V_0 und dem Porenvolumen V_p zusammen.

$$V_t = V_0 + V_p$$

Das Elutionsvolumen V_E von Molekülen, die von der Säule ausgeschlossen werden, ist V_0 . Für Moleküle, die in alle Poren eindringen können, ist $V_E = V_0 + V_p$. Moleküle, deren Größe zwischen diesen beiden Extremen liegt, eluieren im Volumen

$$V_E = V_0 + K \cdot V_p$$

Für völlig ausgeschlossene Moleküle ist $K = 0$, für partiell ausgeschlossene Moleküle ist $0 < K < 1$ und für Moleküle, die vollständig in die Poren eindringen können ist $K = 1$.

Da es sich bei der SEC um eine relative Größenbestimmungsmethode handelt, muss die verwendete Säule zunächst mit geeigneten Standards kalibriert werden. Hierzu sollten ähnliche Verbindungen gebraucht werden, die später auch analysiert werden und deren Größe durch eine unabhängige Methode bestimmt wurde. Für Nanopartikel bieten sich die Transmissionselektronenmikroskopie und die dynamische Lichtstreuung an.

Eine Kalibrierkurve erhält man, indem man die Retentionszeit oder das Elutionsvolumen auf der Abszisse gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes oder des hydrodynamischen Radius auf der Ordinate aufträgt. Im Allgemeinen reicht ein linearer Ansatz zur Beschreibung der Kalibrierkurve aus. In Abb. 23 ist eine solche gezeichnet. Man erkennt das Totvolumen, zu dem alle Moleküle eluieren, die eine bestimmte Größe überschreiten. Extrapoliert man die Molmasse bei diesem Volumen, erhält man die Ausschlussgrenze der Säule. Danach setzt eine Zone der linearen Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom Logarithmus der Molekülgröße ein, bei der der Verteilungskoeffizient K Werte zwischen 0 und 1 annimmt. Nähert sich K dem Wert 1, so wird die Kurve wieder nicht-linear, da nun alle Moleküle eluieren, die eine bestimmte Größe unterschreiten. Extrapoliert man auch hier die Molmasse beim Permeationsvolumen, erhält man die Permeationsgrenze. Zwischen diesen Grenzen lassen sich Moleküle trennen und ihre Größe ist mit einer gewissen Unsicherheit bestimmbar.

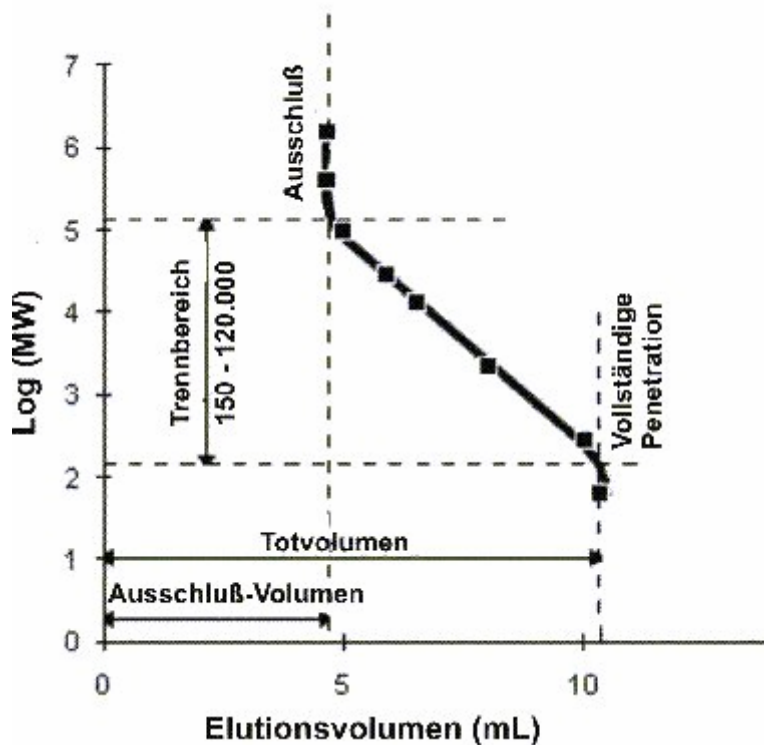


Abb. 23 Kalibrationskurve einer SEC-Säule

Zum Betreiben einer Größenausschlusschromatographie benötigt man den apparativen Aufbau einer HPLC-Anlage, in Abb. 24 schematisch dargestellt. Dabei wird aus einem oder mehreren Lösungsmittel- bzw. Pufferreservoirs mit Hilfe einer Kurzhubpumpe der gegebenenfalls gemischte Eluent durch ein Ventil, welches zur Probenaufgabe dient, und dann durch die Säule gepumpt. Die Pumpe gewährleistet einen konstanten Eluentenfluss bei hohem Gegendruck der Säule von bis zu 250 bar. Da das Säulenmaterial im Gegensatz zur klassischen reversed phase oder normal phase Chromatographie relativ porös ist, liegen die auftretenden Drücke je nach Fließgeschwindigkeit zwischen 10 und 100 bar. Nach dem Austritt aus der Säule trägt der Eluent die getrennten Fraktionen mit sich, welche nun auf vielfältige Weise detektiert werden können. In dieser Arbeit wurden einander ergänzend und vergleichend ein UV-Detektor und das ICP-MS genutzt.

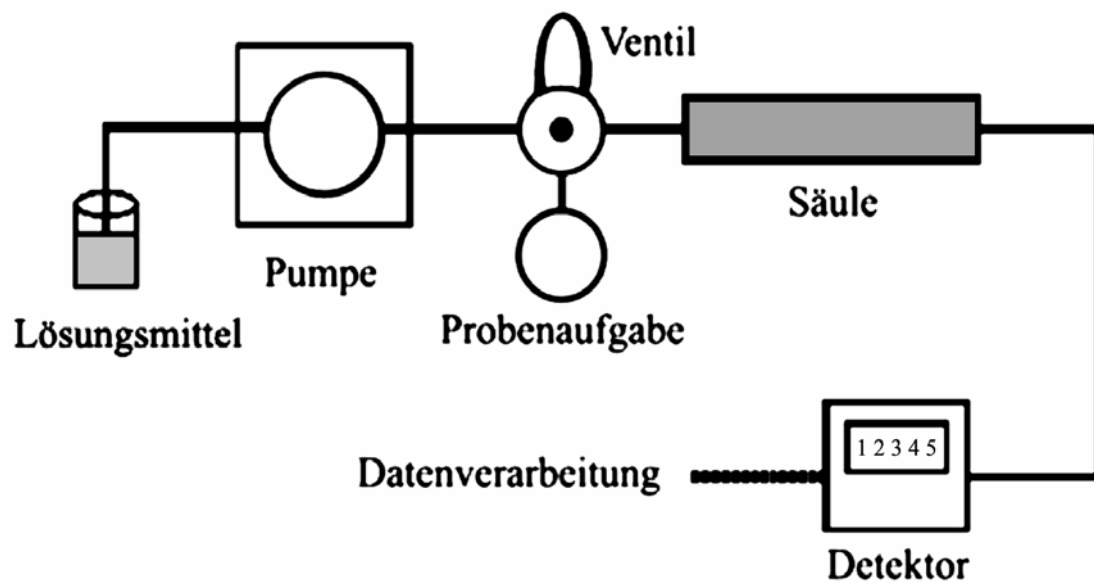


Abb. 24 Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage

2.2.5 Gelelektrophorese (GE)

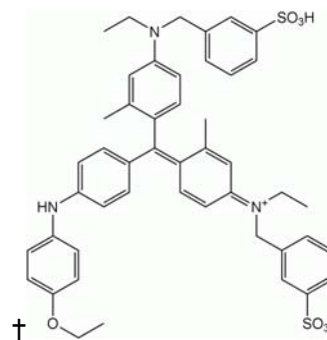
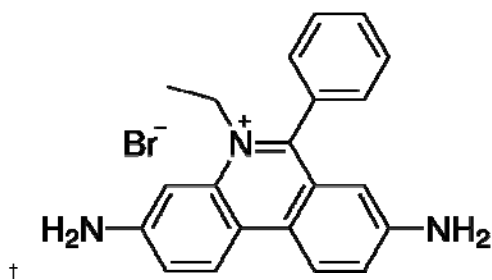
Als Elektrophorese bezeichnet man die Trennung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten resultierend aus verschiedener Ladung und Größe der Analytmoleküle. Durch eine angelegte Spannung erfahren Ionen eine Kraft, welche Kationen zur Kathode und Anionen zur Anode wandern lässt. Durch ihre unterschiedliche Beweglichkeit bilden verschiedene Moleküle bei ihrer Wanderung zur Elektrode Fraktionen und werden so voneinander getrennt.

Im Jahre 1930 entwickelte der schwedische Biochemiker und spätere Nobelpreisträger Arne Tiselius die Elektrophorese in freier Lösung^[59] wobei er auf Arbeiten von Picton und Linde aus dem Jahre 1892 und 1897 aufbaute^[60,61]. Hierzu nahm er ein U-Rohr, in das er eine Mischung aus Farbstoffen gab und diese mit Pufferlösung überschichtete. Zwei Elektroden wurden an den Enden des Rohres platziert und nach Anlegung einer Spannung konnte man die sich trennenden Farbstoffe als wandernde Banden erkennen. Aufgrund unterschiedlicher Ladungen bei dem im Puffer herrschenden pH und unterschiedlicher Größe wandern die Moleküle mit verschiedenen Geschwindigkeiten zu den Elektroden.

Ein großes Problem war die entstehende Joule'sche Wärme, welche durch molekulare Reibung der Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld entsteht. Sie kann nur über die äußeren Grenzflächen des Röhrchens abgegeben werden und so bildet sich von der Rohrmitte nach außen ein Temperaturgradient aus, welcher zu thermischen Konvektionsbewegungen in der Flüssigkeit und somit zu einer Vermischung von bereits separierten Fraktionen führt.

Erst die Verwendung von Trägersubstanzen wie Gelen oder Papier verringerten die thermische Konvektion und machten die Elektrophorese zu einem analytisch brauchbaren Werkzeug, welches bis heute aus der Biologie und der Biochemie nicht mehr wegzudenken wäre. Einsatzgebiet ist z. B. die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge und durch den Vergleich mit einem Längenstandard kann man den einzelnen DNA-Fraktionen durch Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeiten mit einer gewissen Präzision eine bestimmte Basenpaaranzahl zuordnen. Um die Fragmente im Gel sichtbar zu machen, werden sie mit Ethidiumbromid[†] angefärbt, welches statistisch zwischen die Basenpaare interkaliert. Die Intensität der Färbung ist substanzabhängig, so ist die Anbindung an einsträngige DNA oder RNA wesentlich schwächer. Der Farbstoff fluoresziert bei 254 nm und durch Messung der Intensität kann man eine Aussage über die vorhandene Substanzmenge an DNA machen. Bei der Analytik von Proteinen kommt der Farbstoff Commassie-Blau zum Einsatz[‡], der sich durch Physisorption an Arginin und aromatische Aminosäuren, wie Histidin, Tyrosin und Phenylalanin bindet.

Ein Nachteil der Elektrophorese in Gelen ist immer noch die entstehende Wärme, welche zu einem Schmelzen des Gels oder zu dessen Austrocknung führen kann. Durch eine Verringerung des Stromflusses wird zwar die Wärmeproduktion verkleinert, jedoch verlängern sich dadurch die Analysezeiten, und die Trennleistung



kann abnehmen. Auch statistische Unterschiede der Porengröße und Porengrößenverteilung in vom Ansatz her gleichen Gelen führen zu nichtreproduzierbaren Ergebnissen, welche den Vergleich von verschiedenen Trennungen erschweren. Den größten Nachteil stellte bis jetzt jedoch die mehr oder weniger aufwendige Detektion der Analyte dar, mit der bis Weilen nur begrenzte quantitative Aussagen zu machen sind. Eine direkte Bestimmung war bis dato nicht möglich, die Moleküle mussten erst durch Anfärben sichtbar gemacht werden.

Durch die Verwendung puffergefüllter Quarzkapillaren konnten die meisten Probleme gelöst werden. Ein guter Wärmeabtransport aufgrund der großen Oberfläche und des geringen Volumens verhindert die Bildung von Konvektionsströmen und eine UV-Detektion der getrennten Analyte war wegen der Transparenz der Kapillare möglich. Auch die Verwendung gelgefüllter Kapillaren (Kapillargelelektrophorese, CGE) ist absolut vergleichbar mit der Plattengelelektrophorese. Von Vorteil ist die problemlose Anlegung 10- bis 100-mal stärkerer Felder, von Nachteil jedoch die geringe Probenmenge, die im Allgemeinen bei allen kapillarelektrophoretischen Methoden aufgegeben werden kann.

Nichtsdestotrotz ist die traditionelle Gelelektrophorese auch aus modernen biologischen und biochemischen Laboratorien nicht wegzudenken, weshalb Anstrengungen unternommen wurden, eine an leistungsstarke Detektoren einfach anzukoppelnde und durch die online-Detektion schnellere Variante der selben zu entwickeln. So beschrieben Brüchert und Bettmer 2005 die online Kopplung einer GE an ein ICP-MS, welche zur Trennung von DNA-Fragmenten mit anschließender Detektion des Phosphors benutzt wurde^[62].

Die klassische Elektrophorese in Gelen ist eine in der Biologie und Biochemie sehr weit verbreitete analytische Methode, da man auf einen über Jahrzehnte gesammelten Erfahrungsschatz zurückblicken kann und die einfache und kostengünstige Handhabung den Umgang mit ihr sehr leicht machen. Das Trennprinzip ist auf den ersten Blick sehr einfach. Durch den porösen Charakter der Gele kommt es bei der Migration von geladenen Makromolekülen im elektrischen Feld durch den Siebeffekt des Gels zu einer Trennung nach deren Größe. Jedoch wird die Trennung durch eine Vielzahl an Parametern beeinflusst, was eine exakte

theoretische Betrachtung sehr schwierig macht und weshalb in der praktischen Anwendung meist auf empirisch gewonnene Erfahrungen zurückgegriffen wird. Als Gelmatrix wird Agarose oder polymerisiertes und quervernetztes Acrylamid verwendet, wobei durch die Konzentration der Agarose bzw. den Vernetzungsgrad des Polyacrylamids die durchschnittliche Porengröße kontrolliert wird.

Bei der Wanderung durch das Gel wirken zwei Kräfte auf die geladenen Moleküle. Zum einen die elektrische Kraft F_E , die proportional zu der Stärke des Feldes E und der Ladung des Ions ist:

$$F_E = zeE$$

z	Ladung des Ions
e	Elementarladung des Elektrons [$1,602 \cdot 10^{-19}$ C]
E	Stärke des elektrischen Feldes [Vcm^{-1}]

Die Feldstärke ist der Quotient aus der angelegten Spannung und dem Abstand der Elektroden. Er ist bei den verwendeten Apparaturen bei konstanter Spannung immer gleich, da die Elektroden nicht beweglich sind.

Der elektrischen Kraft F_E wirkt die Reibungskraft F_R der Moleküle bei ihrer Wanderung durch das Gel entgegen. Angenähert kann sie nach Stokes für ein kugelförmiges Teilchen in Lösung beschrieben werden durch:

$$F_R = -6\pi\eta r v$$

η	Viskosität der Lösung [Pa s]
r	hydrodynamischer Ionenradius [m]
v	Lineargeschwindigkeit des Ions [ms^{-1}]

Eine konstante Geschwindigkeit der wandernden Moleküle ergibt sich, wenn beide vektoriellen Kräfte im Gleichgewicht sind:

$$v = zeE/6\pi\eta r$$

Die Ionenbeweglichkeit oder elektroforetische Mobilität μ_{EP} , welche eine geräteunabhängige Größe darstellt, ergibt sich zu:

$$\mu_{EP} = ze/6\pi\eta r$$

Sie ist abhängig vom Lösungsmittel und spezifisch für jeden Stoff. Man erkennt, dass sie in einem Lösungsmittel eine Funktion der Ionenladung und der Ionengröße ist. Je höher die effektive Ladung eines Moleküls und je kleiner sein hydrodynamischer Radius ist, desto beweglicher ist es und wandert somit schneller. Die effektive Ionenladung setzt sich zusammen aus der Ladung des Ions abzüglich des Anteils der entgegengesetzt geladenen Ionensphäre, die es umgibt.

Bei der Analyse von Proteinen unterscheidet man prinzipiell zwischen zwei Arten der Gelelektrophorese:

- nativen Gelelektrophorese, bei der die Proteine in ihrer natürlichen Form belassen werden
- denaturierende Gelelektrophorese, bei der die Analyten durch einen Zusatz im Puffer (meist ein Detergenz) in eine Form gebracht werden, die nicht der natürlichen entspricht

Die native GE ist eine Variante der Gelelektrophorese, bei der die zu analysierenden Proteine in ihrer natürlichen, also gefalteten Form im elektrischen Feld durch das Molekularsieb des Gels getrennt werden. Im Gegensatz zur denaturierenden Gelelektrophorese mit Natriumdodekylsulfat (sodium dodecylsulfate, SDS) erfolgt die Trennung nicht ausschließlich aufgrund der Größe der entfalteten und einheitlich mit SDS-Anionen beladenen Proteine sondern setzt sich aus deren Ladungszustand und deren hydrodynamischer Größe zusammen. Die native GE findet Einsatz, wenn Informationen über den natürlichen Zustand der Proteine gewonnen werden sollen. Als Beispiel sei die Trennung von Monomeren, Dimeren, Trimeren, etc. zu nennen, die bei der Verwendung von SDS alle in das Monomer umgewandelt werden würden. Des Weiteren können Proteine mit unterschiedlichem Phosphorylierungsgrad

getrennt werden, da sich zwar kaum die Masse, dafür jedoch die Ladung durch zusätzliche Phosphatgruppen voneinander unterscheidet.

Die Benutzung der nativen GE hat bei der Detektion mittels ICP-MS den Vorteil, dass die Konzentration gelöster Stoffe der ins Plasma eingeführten Matrix, also dem Puffer, niedrig gehalten werden und somit die Verunreinigung des Injektorrohres und der Konen minimiert werden kann. Ein weiterer Vorteil ist die niedrige Stromstärke der Pufferlösung bei vergleichsweise hohen angelegten Spannungen. Mit einem Zusatz an Detergenz steigt die Stromstärke stark an und eine merkliche Erwärmung des Gels bis hin zum Schmelzen wird beobachtet. Als Folge dessen muss bei der Verwendung von Zusatzstoffen im Puffer die Spannung erniedrigt werden, was wiederum andere Nachteile wie stark verlängerte Trennzeiten und manchmal schlechtere Trennleistungen mit sich bringt.

SDS-PAGE ist ohne Zweifel die am weitesten verbreitete Art der Gelelektrophorese, da sie auf Grund der Entfaltung und gleichmäßigen Aufladung der Proteine diese annähernd ausschließlich nach ihrer Größe auftrennt. In Kombination mit einer vorangehenden isoelektrischen Fokussierung (2D-SDS-PAGE) liefert sie hervorragende Proteintrennungen. Jedoch aufgrund der oben genannten Limitationen bei der Benutzung von Röhrchengelen anstelle von Plattengelen wurde in erster Linie mit nativen Agarosegelen gearbeitet, um das zu untersuchende System einfach zu halten und mögliche Störungen zu minimieren. Die prinzipiellen Einsatzmöglichkeiten der Röhrchengelelektrophorese konnten auf diese Weise gezeigt werden.

Agarose ist ein Polysaccharid aus Galactose und 3,6-Anhydrogalactose, die alternierend β -1,4- und α -1,3-glykosidisch verbunden sind (siehe Abb. 25).

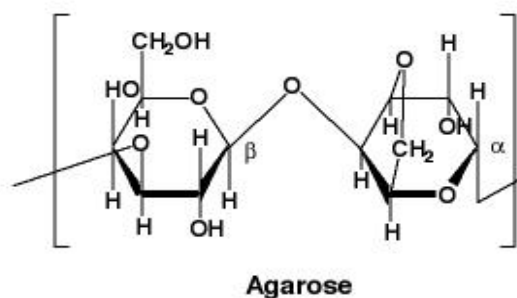


Abb. 25 Ausschnitt aus der Polymerkette der Agarose

Sie ist ein starker Gelbildner und findet deshalb Einsatz als Matrixsubstanz bei elektrophoretischen Trennungen. Durch Aufkochen der Agarose in Pufferlösung schmilzt diese und geliert bei Abkühlung wieder. Die Konzentration des Polysaccharids in der Lösung entscheidet über die durchschnittliche Porengröße des Gels und somit über die Migrationsgeschwindigkeit der zu untersuchenden Makromoleküle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Agarosegele hergestellt und keine Polyacrylamidgele verwendet. Der Umgang mit der hoch toxischen Ausgangssubstanzen Acrylamid sollte vermieden werden und es standen Alternativen in Form von Hochleistungsagarosen zur Verfügung, die in ihren Trenneigenschaften mit denen von PA-Gelen vergleichbar sind und für die Analyse der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Modellproteine eine zufriedenstellende Trennung erbrachten. Um verschiedene Messungen bezüglich der Migrationszeiten der einzelnen Spezies vergleichen zu können, wurde jeder Probe mindestens ein interner Marker zugesetzt. Mit ihm kann ein Rf-Wert ausgerechnet werden, der unter gleichen Trennbedingungen für dieselbe Substanz gleich sein sollte, auch wenn die absolute Migrationsstrecke, bzw. -geschwindigkeit differiert. Bei Plattengelen wurde Bromphenolblau verwendet und beim Röhrchengel u. a. auch Iodid und Iodat.

3 Experimenteller Teil

3.1 Chemikalien- und Geräteliste

3.1.1 Chemikalien

Argon Reinheitsstufe 4.6 (99,996 %) (Linde)
Helium Reinheitsstufe 4.6 (99,996 %) (Linde)
Stickstoff Reinheitsstufe 4.6 (99,996 %) (Linde)
Phosphor Plasmastandardlösung 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Alfa Caesar)
Schwefel Plasmastandardlösung 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Alfa Caesar)
Gold Plasmastandardlösung 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Alfa Caesar)
Silber Plasmastandardlösung 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Alfa Caesar)
Dinatriumhydrogencitrat-1,5-hydrat, reinst (Riedle-de Haen)
Trinatriumhydrogencitrat (Sigma)
Natriumchlorid p.a. (Acros)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane p.a. (Acros)
Borsäure suprapur (Merck)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES (Acros)
Natriumdodecylsulfat (SDS for molecular biology) min. 98,5 % (GC) (Sigma)
Bromphenolblau (Sigma)
Methanol, ECD geprüft für die Rückstandsanalyse (Acros)
Tetrachlorgoldsäure 99 % (Sigma)
Natriumborhydrid 98 % (Acros)
DL-Mercaptobernsteinsäure 99 % (Acros)
DL-Liponsäure 98 % (Acros)
Natriumdihydrogenphosphat p.a. (Merck)
Dinatriumhydrogenphosphat p.a. (Merck)
DL-1,4-Dithiothreitol, DDT 98 % pure (Acros)
1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride, EDC (Piercenet)
N-hydroxysuccinimid, NHS (Piercenet)
Silbernitrat zur Analyse (Acros)
Goldnanopartikelstandardlösungen (Sigma, Zertifikate siehe Ende Kapitel 6)
Bovine α -, β -casein (Sigma–Aldrich)
Ovalbumin (Sigma–Aldrich)

3.1.2 Geräte

ICP-Q-MS Elan 5000 (Perkin Elmer)

ICP-Q-MS -HP7500 (Agilent Technologies)

ICP-HRMS Element 2 (Thermo Finnigan MAT)

ESI-MS LCQ DECA (Thermo Finnigan)

Zerstäuber Typ Cross-flow (AHF Feuerbacher)

Sprühkammer Scott-Typ aus Quarzglas (AHF Feuerbacher)

Konen aus Nickel (AHF Feuerbacher)

HPLC-Pumpe S1121 Solvent Delivery System (Sykam)

Gradienten-Mischer S8110 (Sykam)

Probeninjektionsventil 9725i (Rheodyne)

Probenschleifen 100, 50 und 20 μL (Rheodyne)

RP-Säule Nucleosil C 18 (5 μ Korngröße, 1000 Å Porengröße, 150 \times 2,0mm ID)
(Phenomenex)

RP-Säule Nucleosil C 18 (5 μ Korngröße, 300 Å Porengröße, 150 \times 2,0mm ID)
(Phenomenex)

Vorsäulencartridge Widedpore C18 (4,0 \times 2,0mm ID) (Phenomenex)

Model 491 Mini Prep Cell (BioRad Laboratories)

PowerPac Basic Power Supply (BioRad Laboratories)

PowerPac 3000 Power Supply (BioRad Laboratories)

SeaKem[®] LE Agarose (Cambrex)

NuSieve[®] 3:1 Agarose (Cambrex)

Milli-Q Water Purification System (Millipore)

Uniphase He/Ne laser ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$, 22 mW)

ALV-SP 86 Goniometer (ALV)

ALV/High QE APD-Avalanche photodiode with fiber optic detection (ALV)

ALV3000 correlator (ALV)

Lauda RC-6 thermostatzation unit (Lauda GmbH)

EM420 electron microscope (Philips Electron Optics)

JEM 3010 (JOEL)

3.2 Synthese von Gold- und Silbernanopartikeln

3.2.1 Die Citrat-Methode

Zur Herstellung von Goldnanopartikeln mittels der Citratmethode nach Turkevich^[27] geht man von einem gut löslichen Salz des Metalls, wie z. B. Tetrachlorogoldsäure, aus. Alle verwendeten Gefäße und Rührfische werden vor der Benutzung mit frisch zubereitetem Königswasser (Salpetersäure und Salzsäure im Verhältnis 1:3) gesäubert und mit MQ-Wasser gründlich ausgespült.

Zur Herstellung der Goldnanopartikel wird einer wässrigen Goldsalzlösung mit der Konzentration $c = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1} \text{ Au}^{3+}$ als Tetrachlorogoldsäure zum Sieden erhitzt und unter kräftigem Rühren werden verschiedene Volumina einer Trinatriumcitrat-Lösung der Konzentration $c = 20 \text{ mmolL}^{-1}$ zugegeben. Nach wenigen Minuten wechselt die Lösung die Farbe von schwach gelb nach tief rot. Die Lösung wird für weitere 15 min unter Rühren am Sieden gehalten.

Während der Induktionszeit wird durch die Oxidation des Citrates Acetondicarbonsäure gebildet, wobei Au^{3+} reduziert wird. Bei der direkten Verwendung von Acetondicarbonsäure fiel diese Induktionszeit weg und die Lösung änderte ihre Farbe schon nach wenigen Sekunden.

Acetondicarbonsäure spielt eine große Rolle als Precursor, Reduktions- und Nukleationsagens (siehe Abb. 26). Zuerst wird die Citronensäure durch das Au^{3+} zur Acetondicarbonsäure oxidiert, wobei das Gold zu $\text{Au}(0)$ reduziert wird. Die Reduktion erfolgt jedoch nicht direkt, sondern über die Stufe des Au^+ , in Lösung als AuCl_2^- vorliegend, welches durch die Carboxylatgruppen der Acetondicarbonsäure koordiniert ist. Während dieses Nukleationsprozesses bilden sich Goldkerne mit 13 oder mehr Atomen, die durch die Komplexbildung des AuCl_2^- entstanden sind. Die Koordination des Goldes ist zwingend notwendig, da eine Nukleation nur stattfindet, sobald eine lokale Übersättigung der Lösung an Gold gegeben oder sobald ein Nukleationskeim vorhanden ist. In diesem Fall wird die Übersättigung durch die räumlich nahe Koordination des Goldes hervorgerufen und kleine Goldkerne entstehen^[27]. Nachdem eine signifikante Anzahl dieser Kerne entstanden ist, wachsen diese durch reduktive Abscheidung von $\text{Au}(0)$ auf deren Oberfläche. Die Größe der Cluster hängt vom Verhältnis Gold zu Citrat ab, da letzteres letztendlich

für die Keimbildung verantwortlich ist und je mehr Nukleationskeime gebildet werden, desto kleiner werden die resultierenden Cluster.

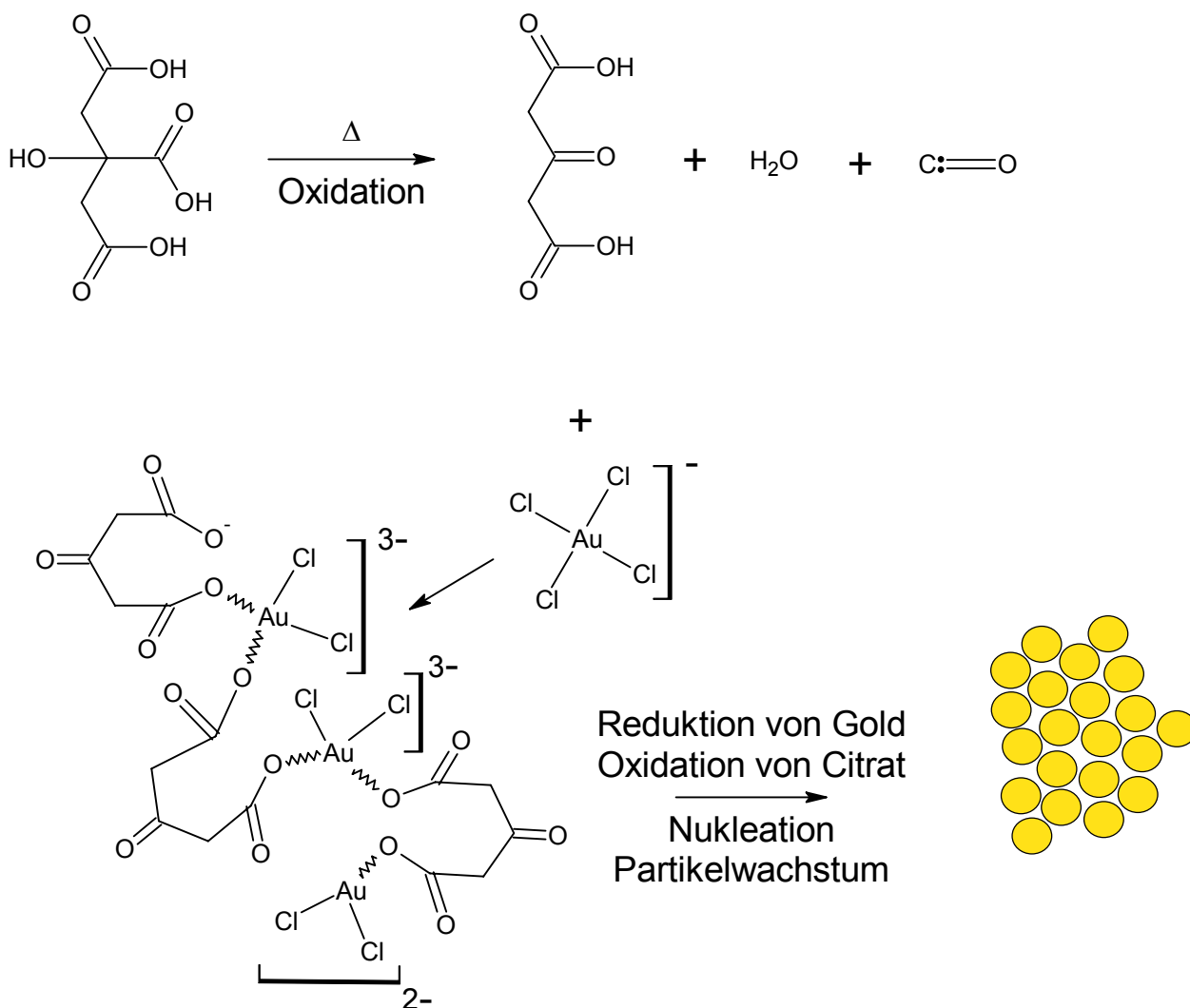


Abb. 26 Reaktionsmechanismus der Bildung von Goldclustern durch Reduktion von Au^{3+} mit Citronensäure

Um die Reproduzierbarkeit eines solchen Syntheseansatzes zu überprüfen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze jeweils drei Mal wiederholt. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob zwei unterschiedliche Au/Citrat-Verhältnisse zu Goldpartikeln verschiedener Größe führen und diese auch mit der HPLC unterschieden werden können. Als Stammlösungen dienten die zu Beginn des Kapitels genannte $0,25 \text{ mmolL}^{-1} \text{ Au}^{3+}$ -Lösung, hergestellt aus $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und die 20 mmolL^{-1}

Citratlösung, angesetzt mit Trinatriumcitrat. In Tab. 1 sind die Ansätze tabellarisch zusammengefasst.

Tab. 1 Syntheseansätze der Citratnanopartikel

Ansatz	Au-Lösung [g]	Citrat-Lösung [μ L]	Au/Citrat-Verhältnis
A	10,22	426	0,3
B	10,13	422	0,3
C	10,20	425	0,3
D	10,16	317	0,4
E	9,88	309	0,4
F	10,14	317	0,4

Neben den selbst hergestellten Goldclustern wurden drei käufliche Standards verwendet, die vom Hersteller Sigma auf ähnliche Weise synthetisiert wurden und eine zertifizierte Größenverteilung und Durchschnittsgröße besitzen. Nominal betrug der Durchmesser der einzelnen Standards 5 nm (3-6 nm), 10 nm (8-12 nm) und 20 nm (17-23 nm), was durch TEM-Aufnahmen bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 4.2.4). Die drei Standards dienten zur Kalibrierung der SEC-Säule für die Bestimmung der Größe der Cluster A - F und für Ligandenaustauschexperimente.

3.2.2 Reduktion mit NaBH_4 in Anwesenheit von Thiolen

Bei dieser auf Brust et al. basierenden Methode^[63] wird das Natriumcitrat aus der zuvor beschriebenen Synthese durch Natriumborhydrid als reduzierendes Reagenz ersetzt. Da letzteres viel stärker reduzierend wirkt, wird die Reaktion nicht bei 100°C sondern bei Raumtemperatur durchgeführt. Um stabile, gegen Agglomeration geschützte Partikel zu erhalten, ist ein Stabilisierungsligand notwendig, welcher bei der Citrat-Methode das Citrat selbst ist. Hier können verschiedene Thiole zum Einsatz gebracht werden, welche über den Schwefel eine wesentlich stärkere Bindung zu denen sich an der Oberfläche des Partikels befindlichen Gold- bzw. Silberatomen ausbilden und dadurch stabiler gegenüber der Änderung äußerer Einflüsse reagieren.

Die entstehenden Partikel sind im Allgemeinen kleiner als die Citratnanopartikel, was in der höheren Geschwindigkeit der Reduktion und Nukleation begründet ist. Auch hier kann durch Variation des Verhältnisses Metall zu Thiol Einfluss auf die Größe der resultierenden Cluster genommen werden.

Zur Synthese stehen prinzipiell zwei Arten von Thiolen zur Verfügung:

- Thiole, die wasserlösliche Cluster hervorbringen
- Thiole, die wasserunlösliche Cluster hervorbringen

Zur ersten Gruppe gehören Thiole mit ionisierbaren funktionellen Gruppen (z. B. Carboxylgruppen) oder polaren Gruppen (z. B. Hydroxylgruppen). Wasserunlösliche Cluster erhält man unter Verwendung von unpolaren Thiolen (z. B. Alkanthiole) oder Thiolen mit polaren Gruppen aber langen Kohlenstoffketten (z. B. Mercaptohexan-6-ol). Diese Arbeit beschreibt nur die Synthese und Analyse von wasserlöslichen Nanopartikeln, da die Analytik in wässriger Phase stattfindet und das potentielle Einsatzgebiet bei der Markierung von Biomolekülen ebenfalls in einem wässrigen Milieu liegt. Hier verhalten sich thiolstabilisierte Cluster wesentlich stabiler gegen Änderungen der Ionenstärke oder des pH-Wertes. Citratpartikel agglomerieren beispielsweise bei Zugabe einer Salzlösung sofort, da eine hohe Elektrolytkonzentration die an der Clusteroberfläche adsorbierten Citratmoleküle verdrängt und daraufhin die schützende Hülle der Partikel zusammenbricht. Da das Thiol eine quasi-kovalente Bindung zum Metall des Clusters ausbildet, kann es durch andere gelöste Ionen nicht verdrängt werden und die Partikel bleiben in Lösung. Bei starker Veränderung des pH-Wertes fallen sowohl citrat- als auch thiolstabilisierte Nanopartikel aus, wobei sich letztere reversibel durch erneute Änderung des pH wieder in Lösung bringen lassen.

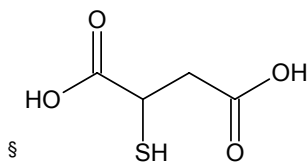
Im Folgenden wird die Synthese der bei dieser Arbeit hauptsächlich zum Einsatz gekommenen Nanopartikel beschrieben. Neben der Mercaptobernsteinsäure (MSA, mercapto succinic acid) wurden auch 2,3-Dimercaptobernsteinsäure, Liponsäure, Dihydroliponsäure, ω -Mercaptohexansäure, ω -Mercaptohexanol und diverse kurzkettige Alkanthiole zur Synthese verwendet, allerdings ergaben nur Syntheseansätze mit den vier erstgenannten Verbindungen wasserlösliche Cluster. Für alle folgenden analytischen Untersuchungen an thiolstabilisierten Nanopartikeln

wurden beispielhaft die in der Literatur beschriebenen MSA-Cluster verwendet, um die zu erarbeitenden Ergebnisse mit in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen vergleichen zu können.

3.2.2.1 Mercaptobernsteinsäure (MSA)

Tetrachlorogoldsäure wird in Methanol gelöst und mit einer ebenfalls methanolischen Lösung von Mercaptobernsteinsäure[§] versetzt. Die intensiv gelbe Färbung der Lösung verblasst langsam und weicht einem fahlen Gelb. Anschließend wird eine frisch angesetzte wässrige Natriumborhydridlösung langsam während 5 min zugetropft. Die Lösung sprudelt bei jedem zugegebenen Tropfen stark auf und färbt sich alsbald dunkelbraun. Das exzessive Sprudeln rührt von der Reaktion des Hydrids mit Methanol her. Borhydrid reagiert zu Borat und Borsäuremethylester und elementarer Wasserstoff entweicht als sprudelndes Gas. Ein Teil des Borhydrids reduziert das gelöste Au^{3+} bzw. die sich gebildeten Au(I)-MSA-Komplexe und am Ende der Reaktion steht ein mit MSA kovalent stabilisiertes Goldcluster. Durch die Zersetzung des Borhydrids steigt der pH-Wert und das auf der Goldoberfläche gebundene MSA wird deprotoniert, was dazu führt, dass das Cluster aus dem Methanol ausfällt.

Nach einer Stunde Rühren ist die Reaktion abgeschlossen und alles Borhydrid hat sich zersetzt. Die Suspension wird nun in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4000 Umin^{-1} für 30 min zentrifugiert. Das Präzipitat wird zweimal mit 20 % v/v Wasser/Methanol und zweimal mit purem Methanol gewaschen, um die Nanopartikel von Salzen und oberflächlich adsorbiertem MSA zu befreien. Nach jedem Waschschrift wird die Lösung zentrifugiert, dekantiert und in der nachfolgenden Waschlösung im Ultraschallbad dispergiert. Am Ende des Waschprozederes wird die Probe nach dem Dekantieren im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet. Für Untersuchungen wird ein Teil des Pulvers in Wasser oder Pufferlösung unter Ausbildung einer tiefbraunen Farbe gelöst.



2-mercaptosuccinic acid, Thioäpfelsäure, 2-Mercaptobernsteinsäure

Mit den folgenden Ansätzen wurden verschiedene Proben synthetisiert:

Tab. 2 Syntheseansätze von Au-MSA-Partikeln

Probenname	HAuCl ₄ [mg]	MSA[mg]	NaBH ₄ [mg]	Verhältnis Au/S
TC-01	40,7	5,2	37,5	3:1
TC-02	39,5	15,1	35,9	1:1
TC-03	40,4	76,9	38,1	1:5
Au _{klein}	38,9	37,0	22,4	4:5
Au _{groß}	31,7	15,0	12,2	8:5

Die Synthese der Silber-MSA-Partikel erfolgte auf die gleiche Weise. Im Unterschied zu Gold besitzt Silber ein deutlich niedrigeres Oxidationspotential, weshalb keine Reduktion des MSA erfolgt und der Ag-MSA-Komplex sich sofort ausbilden kann. Hier wurden folgende Proben synthetisiert:

Tab. 3 Syntheseansätze von Ag-MSA-Partikeln

Probenname	AgNO ₃ [mg]	MSA[mg]	NaBH ₄ [mg]	Verhältnis Ag/S
TC-04	40,1	11,8	75,4	3:1
TC-05	38,1	33,6	74,3	1:1
TC-06	35,3	156	77,8	1:5
P17	350	3090	380	1:10
P18	345	914	380	1:3
P19	360	317	380	1:1
P20	372	164	380	2:1

Als getrocknetes Pulver blieben die Cluster bis zum Ende der Arbeiten stabil, ohne dass eine messbare Veränderung bezüglich der Größe feststellbar war. Im Gegensatz zu den Pulvern konnte bei älteren Lösungen allerdings eine Agglomeration festgestellt werden, weshalb angesetzte Verdünnungen nie länger als zwei Wochen verwendet wurden.

3.3 Synthese verschiedener Thiole

Um der in Abb. 1 aufgezeigten Strategie folgen zu können, wurden einige nicht käuflich zu erwerbende Thiole benötigt, welche selbst synthetisiert werden mussten. Hierunter einerseits die ω -Mercaptohexansäure, die zur Synthese von Nanopartikeln genutzt werden sollte und andererseits die Dihydroliponsäure, die neben der Synthese auch bei den Ligandenaustauschexperimenten eingesetzt werden sollte.

3.3.1 Dihydroliponsäure

Bei der Darstellung der oxidationsempfindlichen Dihydroliponsäure geht man von Liponsäure (engl. *thioctic acid*) aus und reduziert in wässriger Lösung mit NaBH_4 . Liponsäure ist eine lineare Carbonsäure mit acht Kohlenstoffatomen, die am ω -Ende eine Thiolgruppe besitzt, welche über eine Disulfidbrücke mit einer weiteren, zu ihr in β -Stellung stehenden Thiolgruppe verbunden ist.

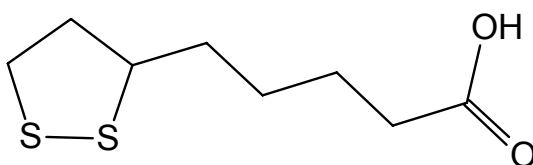


Abb. 27 Chemische Struktur von Liponsäure (5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentansäure)

1,5 g Liponsäure (7,25 mmol, MW: 206,32 g mol^{-1}) werden in 50 mL 0,25 molarer Natronlauge gelöst. Die gelbliche Lösung wird unter stetigem Rühren auf 5 °C abgekühlt. 0,3 g NaBH_4 (8 mmol, MW: 37,83 g mol^{-1}) werden in etwa 1 mL Wasser gelöst und in kleinen Portionen zugegeben. Sofort setzt ein leichtes bis heftiges Sprudeln ein, was auf die Reaktion des Borhydrids mit Wasser zurückzuführen ist. Nach drei Stunden Rühren ist die Färbung der ursprünglich gelben Lösung vollständig verschwunden und es wird mit 0,2 molarer HCl bis auf pH 1 angesäuert. Die auf diese Weise protonierte Dihydroliponsäure wird drei Mal mit 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit Wasser gewaschen und anschließend über MgSO_4 getrocknet. Nach destillativer Entfernung des Ethers bei 30 °C bleibt als Produkt 1,29 g einer schwach gelblichen Flüssigkeit, die bis zur weiteren Verwendung unter Stickstoff bei -18 °C gelagert wurde. Die Ausbeute der Reaktion betrug 85 %.

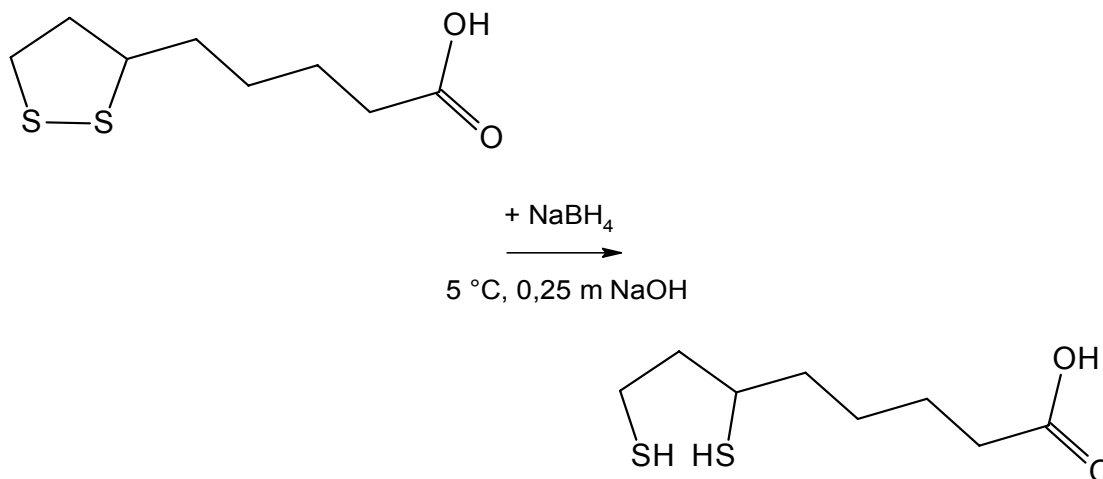
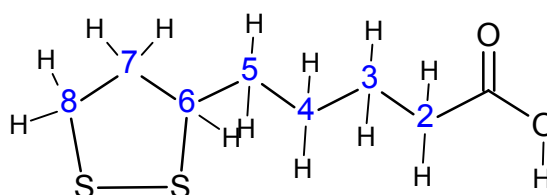


Abb. 28 Reaktionsschema der Reduktion von Liponsäure durch Natriumborhydrid in gekühlter wässriger alkalischer Lösung.

Zur Überprüfung der Identität und der Reinheit wurden vom Edukt Liponsäure ein $^1\text{H-NMR}$ und vom Produkt Dihydroliponsäure ein $^1\text{H-NMR}$ und ein $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in Tab. 4 bis Tab. 6 zusammengefasst. Die Spektren sind in Abb. 29 und Abb. 30 zu sehen.

Tab. 4 Zusammenfassung der Signale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von DL-Liponsäure in CDCl_3

Signalnummer	Chemische Verschiebung [ppm]	Aufspaltung	Anzahl der Protonen (durch Integration)
6	3,57	Quintett	1
8	3,11-3,19	Multiplett	2
7a	2,46	Multiplett	1
2	2,40	Triplett	2
7b	1,92	Multiplett	1
3-4	1,65-1,72	Multiplett	4
5	1,41-1,58	Multiplett	2



Die Protonen 6 und 8 an den Kohlenstoffatomen, die Bindungen zum Schwefel aufweisen, besitzen die größte Tieffeldverschiebung, was auf die Nähe zum Schwefel zurückzuführen ist. Die Protonen an C7 sind nicht äquivalent, was an der Asymmetrie des benachbarten Kohlenstoffs und der Fixierung durch den Fünfring liegt. Deshalb weisen sie unterschiedliche Verschiebungen auf. Bei diesen fünf Protonen (6-8) werden nach der Reduktion der Disulfidbrücke deutliche Veränderungen in der chemischen Verschiebung zu beobachten sein. Die übrigen (2-5) werden davon relativ unbeeinflusst bleiben.

Tab. 5 Signale aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von DL-Dihydroliponsäure

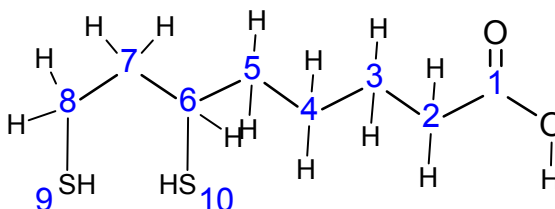
Signalnummer	Chemische Verschiebung [ppm]	Vergleich mit Literaturwerten [ppm]
1	*	180,0
6	42,6	42,7
7	39,1	39,2
5	38,5	38,6
2	33,7	33,8
4	26,3	26,4
8	24,1	24,2
3	22,1	22,2

*liegt außerhalb des ausgedruckten Bereiches des Spektrums

Tab. 6 Zusammenfassung der Signale des ^1H -NMR-Spektrums von Dihydroliponsäure in CDCl_3

Signalnummer	Verschiebung [ppm]	Aufspaltung	Anzahl der Protonen	Vergleich mit Literaturwerten
6	2,88 - 2,97	Multiplett	1	2,89
8	2,6 - 2,8	Multiplett	2	2,67
2	2,36	Triplett	2	2,34
7	1,86 - 1,97	Multiplett	1	1,4 - 1,92
	1,73 - 1,82	Multiplett	1	
4 - 3	1,62 - 1,67	Multiplett	4	
5	1,45 - 1,6	Multiplett	2	
9 - 10	1,30 und 1,32	Multiplett	2	1,30 und 1,33

In der Tat bleiben die Verschiebungen der Protonen 2 bis 5 im ^1H -NMR-Spektrum fast unverändert. Die Protonen 6 und 8 haben ihre Position im Spektrum zu höherem Feld verschoben. Die Protonen 7a und 7b weisen nach Aufbruch des starren Fünfrings durch die Spaltung der Disulfidbrücke nun fast identische chemische Verschiebungen auf.



Im Spektrum des Produktes (Abb. 29 rechts) sind noch Reste vom Lösemittel Diethylether zu erkennen (Signale bei 3,48 ppm und 1,18 ppm). Nach Abschätzung mittels der integrierten Protonensignale beträgt der Lösemittelrest etwa 1,5 %. Signale des Eduktes sind praktisch nicht mehr detektierbar.

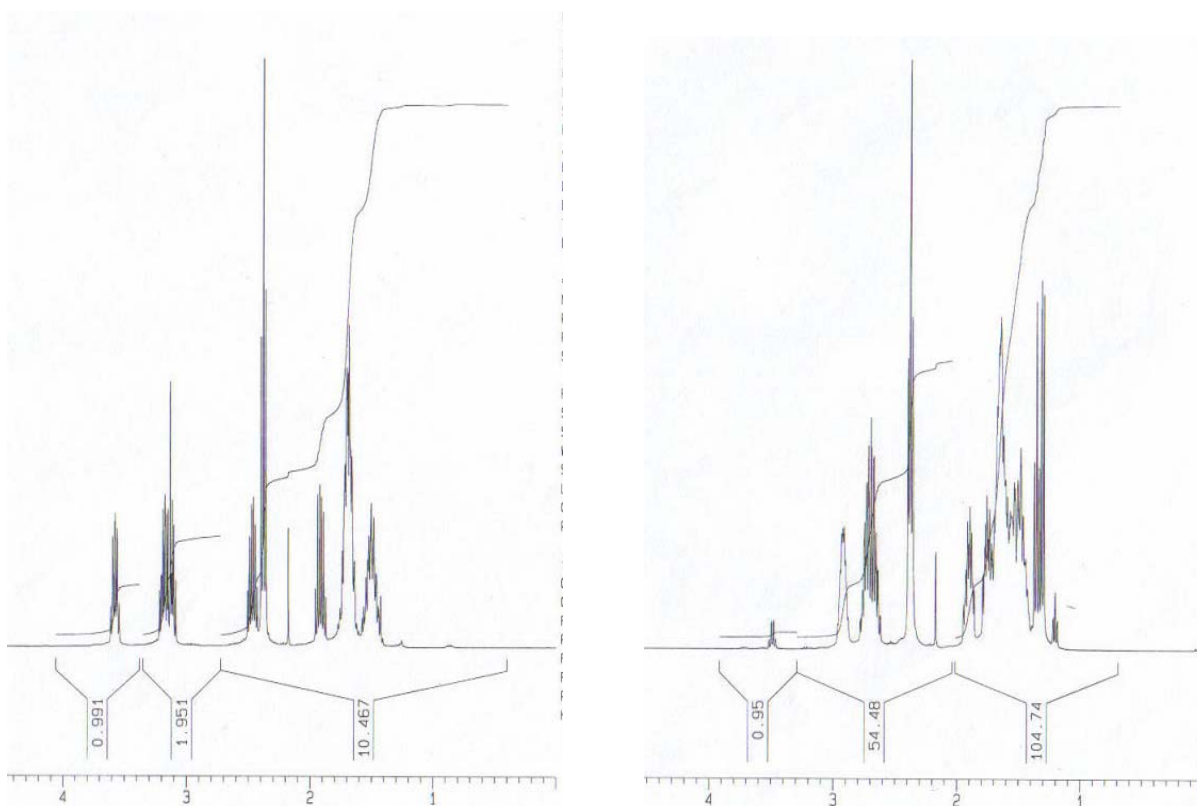


Abb. 29 Gegenüberstellung der ^1H -NMR-Spektren von DL-Liponsäure und DL-Dihydroliponsäure.

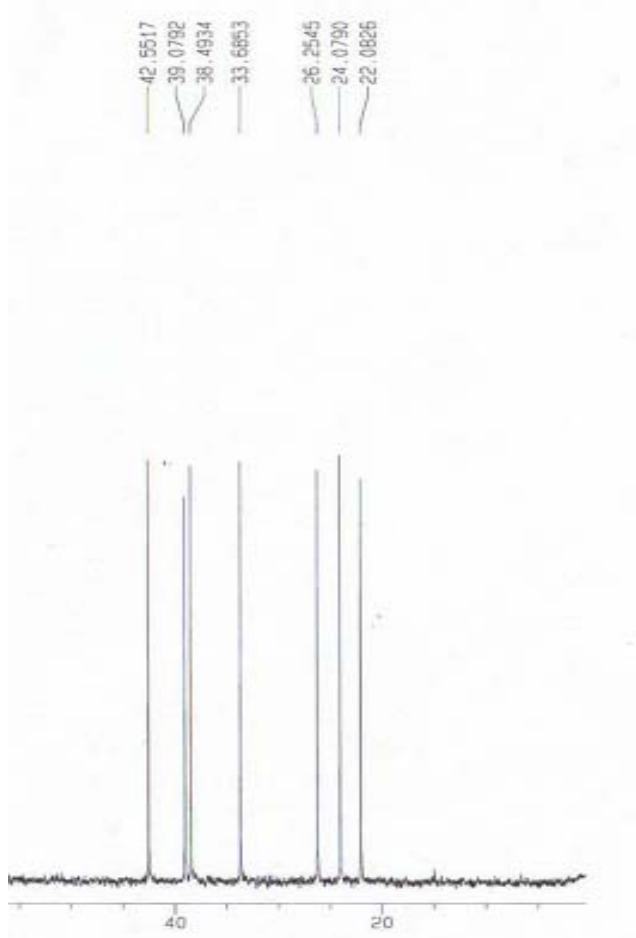


Abb. 30 ^{13}C -NMR-Spektren von DL-Dihydroliponsäure.

Durch den Vergleich der Spektren mit Ergebnissen aus der Literatur^[64] konnte die Identität des Produktes zweifelsfrei festgestellt werden und ohne weitere Aufarbeitung wurde die DL-Dihydroliponsäure für alle folgenden Experimente verwendet. Nach Entnahme der benötigten Menge wurde die Substanz wieder unter Stickstoff bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, um die Oxidation der Thiolgruppen zu unterbinden.

3.3.2 ω -Mercaptohexansäure

Zur Herstellung von ω -Mercaptohexansäure werden 13,6 g ϵ -Caprolacton (120 mmol, MW: $114,14\text{ g mol}^{-1}$) mit 8,4 g Thioharnstoff (110 mmol, MW: $76,12\text{ g mol}^{-1}$) und 20,1 g Bromwasserstoff (48 % m/v) (120 mmol, MW: $80,92\text{ g mol}^{-1}$) während 9 Stunden im Ölbad bei $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Rückfluss gekocht.

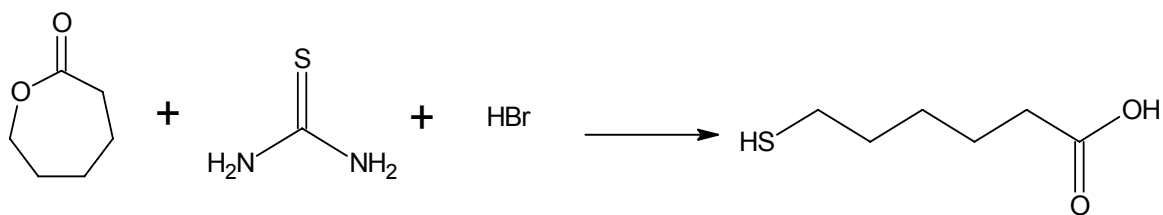


Abb. 31 Edukte und Produkt bei der Synthese von ω-Mercaptohexansäure

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden etwa 20 g NaOH als 50 % m/v Lösung zugefügt. Dabei fällt erst ein Feststoff aus, der sich dann wieder auflöst, bis die Lösung schließlich klar wird. Für weitere 3 Stunden wird die Lösung bei 100 °C unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach erneutem Abkühlen wird der pH-Wert mit Schwefelsäure (50 % v/v) auf pH 1 eingestellt. Dabei bilden sich zwei Phasen aus. Die Suspension wird drei Mal mit je 100 mL Diethylether extrahiert, die vereinigten Extrakte mit Wasser gewaschen und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Unter vermindertem Druck wird der Ether bei 30 °C entfernt. Die erhaltene gelbe ölige Flüssigkeit wird durch Destillation gereinigt (2 mbar, 135 – 140 °C) und als Endprodukt konnten 5,32 g eines farblosen Öls gewonnen werden (Ausbeute = 30 %).

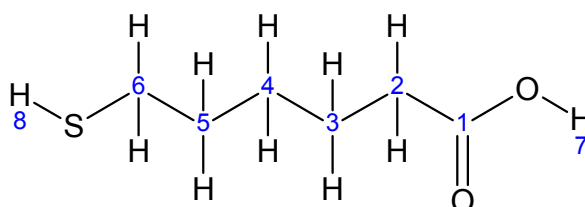
Die Identität und Reinheit des Produktes wurde mittels ¹H- und ¹³C-NMR (siehe Tab. 7 und Tab. 8) überprüft.

Tab. 7 Signale aus dem ¹³C-NMR Spektrum von ω-Mercaptohexansäure

Signalnummer	Chemische Verschiebung [ppm]	Vergleich mit Literaturwerten [ppm]
1	179,7	179,9
2	33,7	33,8
6	33,4	33,4
3 - 5	27,5	27,6
	24,2	24,2
	23,9	23,9

Tab. 8 Zusammenfassung der Signale des ^1H -NMR-Spektrums von ω -Mercaptohexansäure in CDCl_3

Signalnummer	Verschiebung [ppm]	Aufspaltung	Anzahl der Protonen	Vergleich mit Literaturwerten
7	10	Breites Singulett	1	10,4
6	2,49 - 2,54	Quartett	2	2,53
2	2,33 - 2,36	Triplet	2	2,37
3 - 5	1,59 - 1,65	Multipllett	4	1,57 - 1,71
	1,43 - 1,45	Quintett	2	1,37 - 1,51
8	1,31 - 1,35	Triplet	1	1,34



Die gefundenen chemischen Verschiebungen stimmen mit denen aus der Literatur überein^[65] und es sind nur leichte Verunreinigungen im Protonenspektrum zu erkennen, die wahrscheinlich größtenteils vom Edukt ϵ -Caprolacton herrühren. Die Substanz wurde deshalb ohne weitere Reinigungsschritte unter Stickstoff im Tiefkühlschrank bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

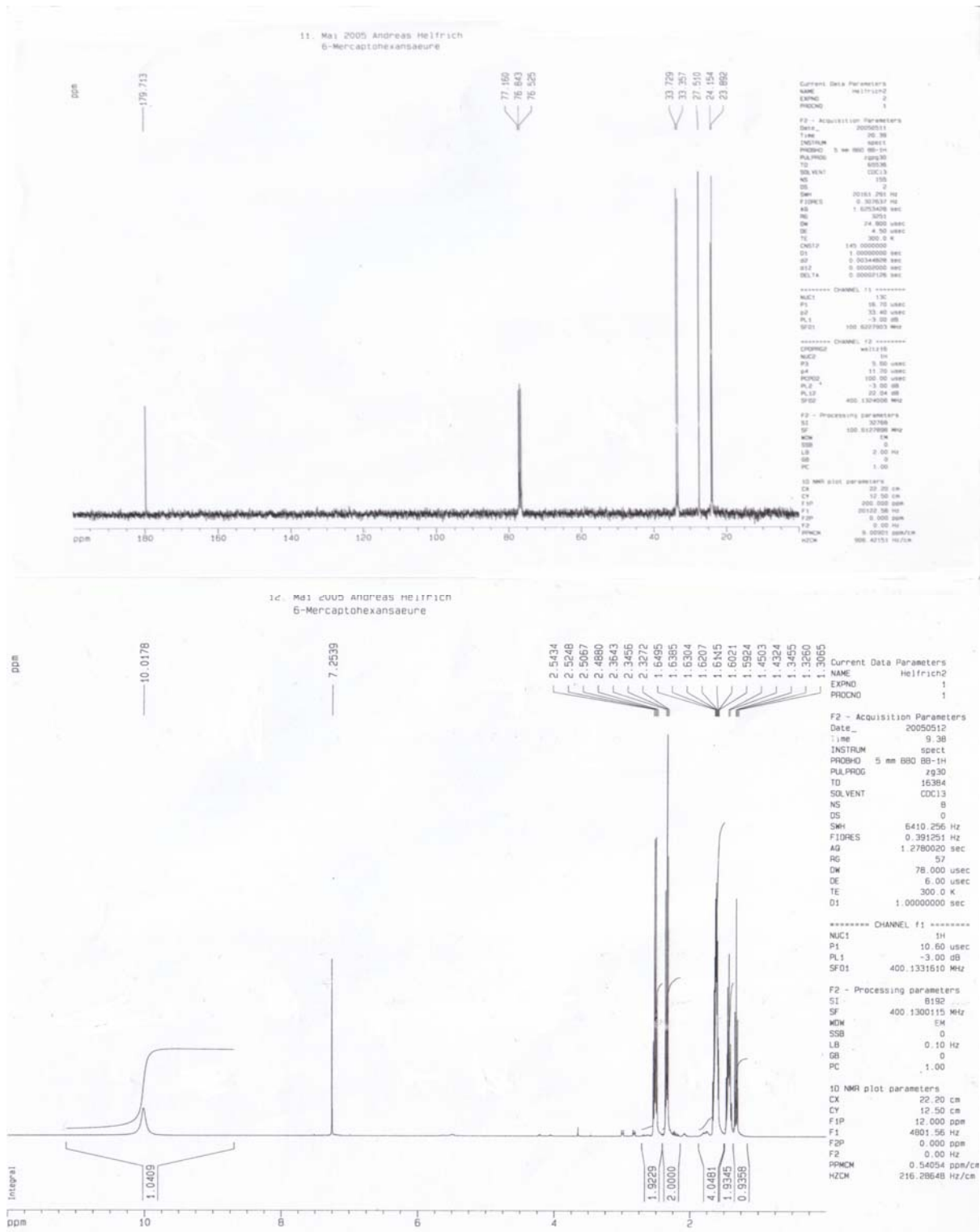


Abb. 32 ¹³C- und ¹H-NMR-Spektrum von ω-Mercaptohexansäure in CDCl₃

3.4 Charakterisierung der Nanopartikel

Um Nanopartikel für Markierungszwecke einsetzen zu können, müssen diese zuerst selbst charakterisiert werden. Eine Charakterisierung der Nanopartikel ist einerseits von allgemeinem Interesse, da Nanocluster in immer mehr Gebieten der Wissenschaft und Technik eingesetzt werden und sich die Methoden für deren Analyse mit der hier beschriebenen innovativen und neuen GE-ICP-MS-Kopplung um ein wertvolles und vielversprechendes Werkzeug erweitern.

Andererseits wird durch die Analyse die Eignung für den beabsichtigten Einsatz evaluiert. Diese kann nur dann gegeben sein, wenn die Partikel eine relativ enge und monomodale Größenverteilung besitzen und wenn sie unter den für die Konjugate anzuwendenden Trennbedingungen diskrete Signale ergeben, die von denen der Konjugate selbst unterscheidbar sind. Die Partikel müssen deshalb mit den gleichen Trenn- und Detektionstechniken analysiert werden wie die zu markierenden Biomoleküle.

3.4.1 HPLC-Trennung von Nanopartikeln

Zur Größentrennung der Nanopartikel wurden unterschiedliche Säulen verwendet. Zum einen eine „echte“ SEC-Säule, wie sie hauptsächlich zur Proteinanalytik verwendet wird, und zum anderen zwei C18-Säulen mit Porengröße von 300 Å bzw. 1000 Å. In Tab. 9 sind die Standardtrennbedingungen tabellarisch zusammengefasst, die, falls nicht anders angegeben, bei allen Trennungen verwendet wurden.

Tab. 9 Verwendete HPLC-Säulen und Mobile Phase zur Untersuchung von Nanopartikeln

Säule	Dimension		Fluss	Eluent
BioSep-SEC-S 3000	5 μ Partikel 145 Å	300×7,8	1 mLmin ⁻¹	10 mmolL ⁻¹ SDS 2 mmolL ⁻¹ Phosphat pH = 6
Nucleosil (Phenomenex) 1000-C18	7 μ Partikel 1000 Å	150×4,6	0,5 mLmin ⁻¹	10 mmolL ⁻¹ SDS 2 mmolL ⁻¹ Phosphat pH = 7,3
Nucleosil (Phenomenex) 300-C18	7 μ Partikel 300 Å	150×4,6	0,2 mLmin ⁻¹	10 mmolL ⁻¹ SDS 2 mmolL ⁻¹ Phosphat pH = 7,3

Eine HPLC-Pumpe (S1121 Solvent Delivery System, Sykam) förderte den Eluenten durch die Säulen und die Kopplungen mit den Detektoren wurde über PEEK-Kapillare und –verbindungsstücke hergestellt. Als Detektoren dienten die ICP-Massenspektrometer und ein UV-Detektor (Linear 203). Die Säulen wurden vor Gebrauch mit dem Eluenten für mindestens eine Stunde konditioniert und während längerer Nichtbenutzung den Angaben des Herstellers entsprechend gelagert.

3.4.2 GE-Kopplung zur Trennung von Nanopartikeln und Komplexen

Die gelelektrophoretischen Trennungen erfolgten mit Hilfe eines instrumentellen Aufbaus mit einem vertikalen Röhrchengel, welches am unteren Ende ein Elutionsinterface besitzt, was einen Transfer der aus dem Gel migrierenden Analytionen zum Zerstäuber des ICP-MS bzw. zum UV-Detektor ermöglicht. Beschrieben wurde dieses Setup erstmals im Jahre 2005 und geht auf eine Entwicklung in der Arbeitsgruppe Bettmer zurück^[62,66].

Der Aufbau besteht aus einer modifizierten MiniPrep-Cell von Bio-Rad, welche im Folgenden genauer beschrieben wird.

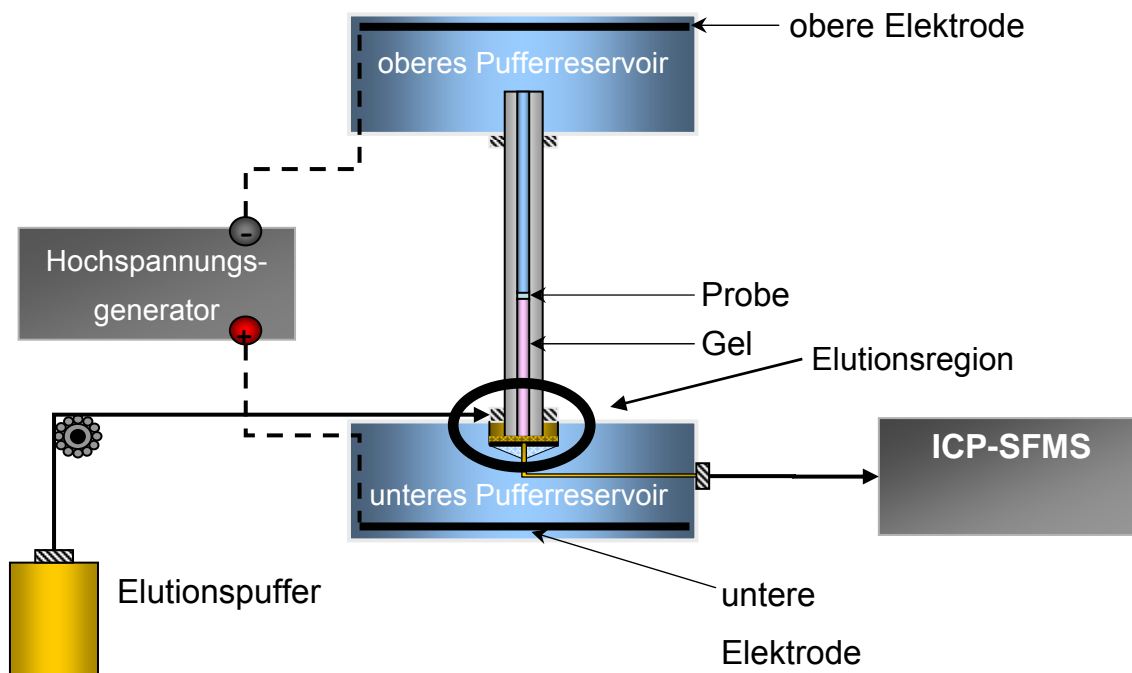


Abb. 33 Schematischer Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten Gelelektrophoreseapparatur

Zwischen den zwei räumlich voneinander getrennten Pufferreservoirs mit den entsprechenden Elektroden befindet sich ein Glasröhrchen, welches das analytische Gel in sich trägt. Am oberen Ende hat es Kontakt zur Pufferlösung aus dem Reservoir. Das untere Ende liegt auf einer porösen Quarzfritte, durch die der Elutionspuffer kontinuierlich mittels einer peristaltischen Pumpe gefördert wird und wieder durch den darunter liegenden Elutionskanal über eine PEEK-Kapillare weiter zum Detektor geleitet wird. Der Elutionspuffer wurde mit einem internen Standard ($10 \mu\text{gL}^{-1}$ Rh) versetzt, um die korrekte Funktion und die kontinuierliche Förderung durch die Pumpe zu überwachen und um Schwankungen der Ionisierung im Plasma standardisieren zu können. Durch eine weitere unterstützende Fritte unterhalb der Elutionsfritte wird der elektrische Kontakt zum unteren Pufferreservoir gegeben. Ein genaueres Abbild der Elutionsregion ist in Abb. 34 zu sehen.

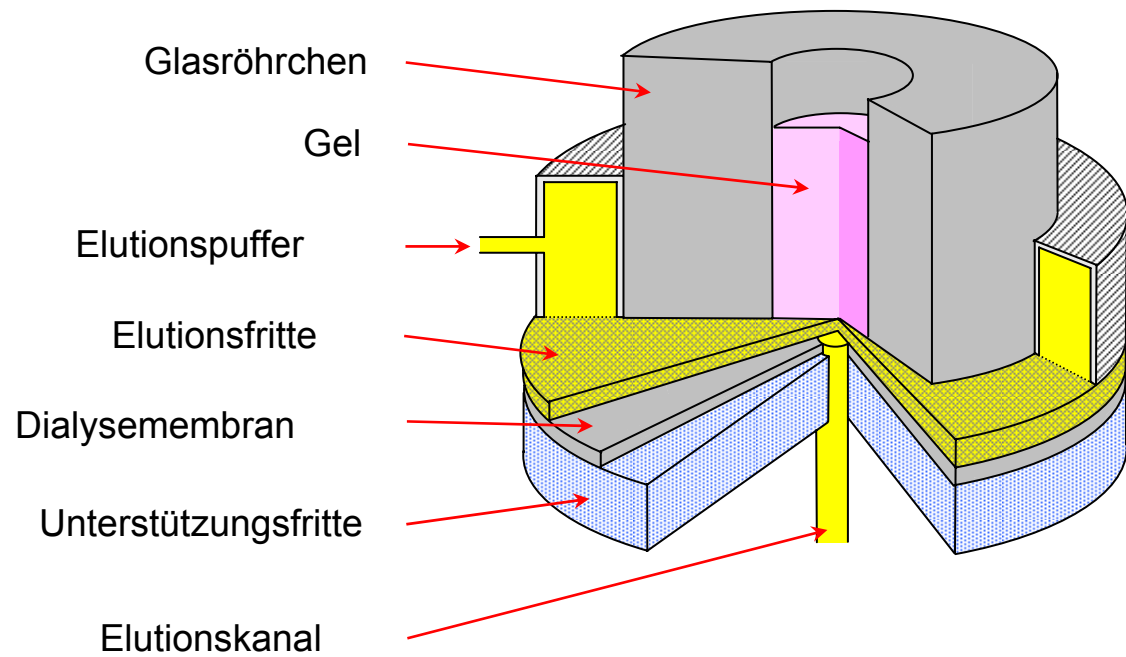


Abb. 34 Detaillierte Darstellung der Elutionsregion der vertikalen Röhrengeloelektrophorese

Die online-Kopplung zum ICP-MS erfolgte über zwei Varianten:

- Eine peristaltische Pumpe befördert den Eluenten von der Elutionskapillare zum Zerstäuber des ICP-MS (siehe Abb. 35)
- Der Eluent gelangt direkt durch die Saugkraft des selbstansaugenden Zerstäubers in die Sprühkammer (siehe Abb. 36)

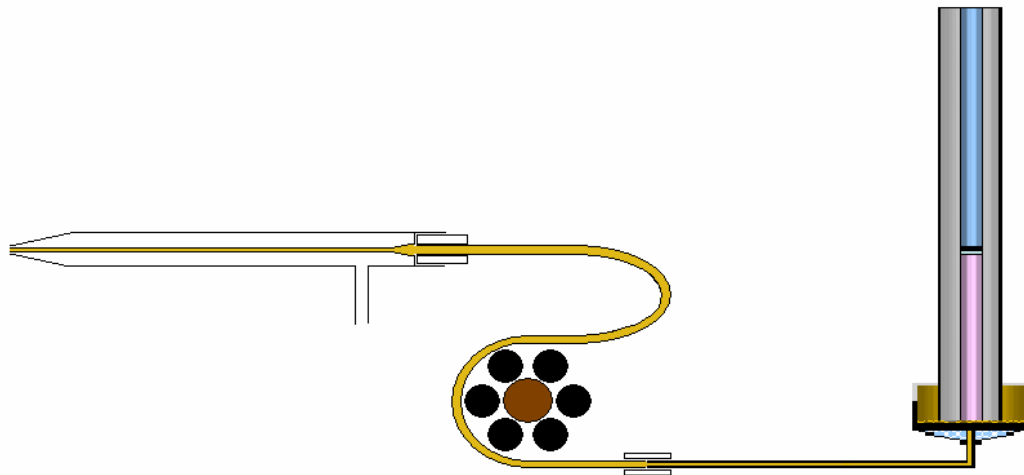


Abb. 35 Online-Kopplung der GE an das ICP-MS über eine peristaltische Pumpe

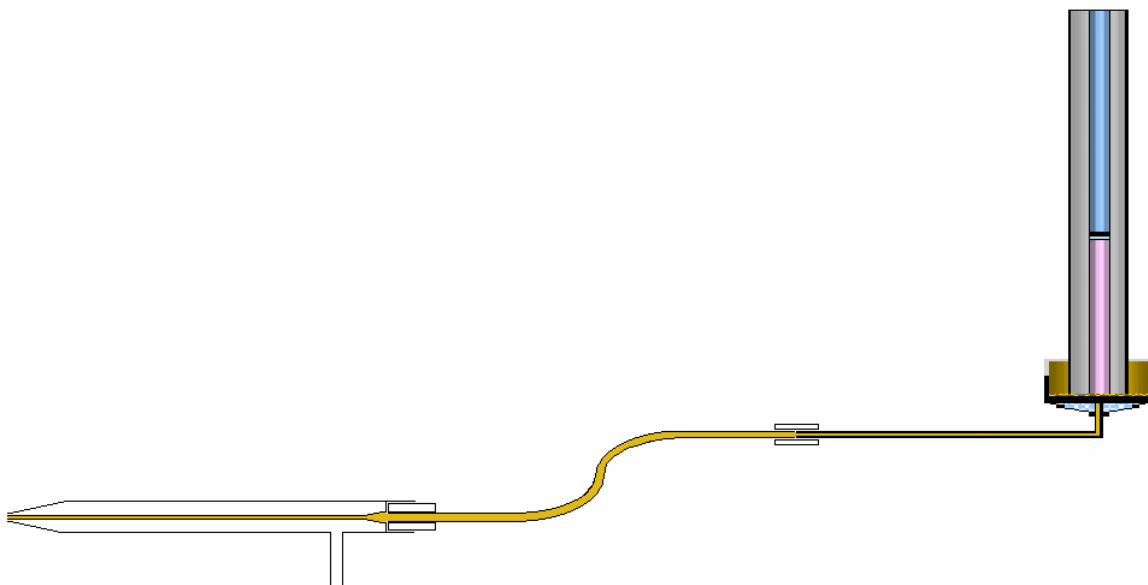


Abb. 36 Direkte online-Kopplung der GE an das ICP-MS ohne Unterstützung einer Pumpe

Beide Verfahren wurden ausprobiert und funktionierten, allerdings erwies sich das pumpenunterstützte System als robuster, weshalb es für die in dieser Arbeit beschriebenen Messungen verwendet wurde.

Tab. 10 Vor- und Nachteile der Kopplung mit und ohne peristaltischer Pumpe

	Vorteile	Nachteile
mit Pumpe	<ul style="list-style-type: none"> • Elutionsfluss ist konstant • Elutionsfluss ist regelbar 	<ul style="list-style-type: none"> • leicht pulsierende Eluentenzufuhr
ohne Pumpe	<ul style="list-style-type: none"> • geringeres Totvolumen • ruhigeres Signal 	<ul style="list-style-type: none"> • Elutionsfluss nicht konstant • Elutionsfluss nicht regelbar • Zerstäuber verstopft leichter

Die Herstellung der Gele erfolgt durch Suspension der Agarose in der Pufferlösung und Erhitzen bis zum Sieden, wobei die Agarose schmilzt und ein zähflüssiges Gel entsteht. Sobald in der Lösung keine feste Agarose mehr erkennbar ist, wird sie abgedeckt in einen auf 70 °C beheizten Trockenschrank gestellt, bis alle Luftbläschen aufgestiegen sind und das Gel völlig klar ist. Um auf einer Seite des Geles eine definierte Geometrie zu erhalten, werden selbst hergestellte Aluminiumstempel (siehe Abb. 37) im Gel versenkt, die den gleichen Innendurchmesser wie die Glasröhrchen besitzen. Die temperierten Glasröhrchen werden nun in das Gel gleiten gelassen, so dass der Stempel mit dem unteren Ende des Glases abschließt und es wird dafür Sorge getragen, dass keine neuen Blasen ins Gel gelangen. Sollte dies jedoch passiert sein, wird das Gel samt Röhrchen weitere Zeit im Trockenschrank belassen, bis die Blase aufgestiegen ist. Danach lässt man es etwa 30–60 min erkalten. Sobald es vollständig geliert ist wird das Röhrchen aus dem umgebenden Gel gelöst und der Stempel vorsichtig entfernt, so dass die eingeprägte Geometrie nicht beschädigt wird. Das Gel wird nun durch leichten Überdruck mit dem Ende, welches einen Meniskus ausgebildet hat, aus dem Röhrchen gleiten gelassen, wo man es dann mit einem Skalpell auf die gewünschte Länge kürzen kann. Die vorher gewölbte Oberfläche ist nun eben und kommt auf der Elutionsfritte zum liegen. Die durch den Stempel vorgegebene Geometrie hat den Vorteil, dass die Probe auf einer geraden Fläche aufliegt und keinen Kontakt zu den Seitenwänden des Röhrchens hat, wo es eventuell mit dem Glas wechselwirken oder durch kleinste Hohlräume zwischen Gel und Glas Richtung Elektrode fließen kann. Beides würde zu Signalverbreiterungen und Geistersignalen führen. Das

Glasröhrchen mit dem sich darin befindlichen Gel wird in die Elektrophoreseapparatur eingebaut und kann alsbald verwendet werden.

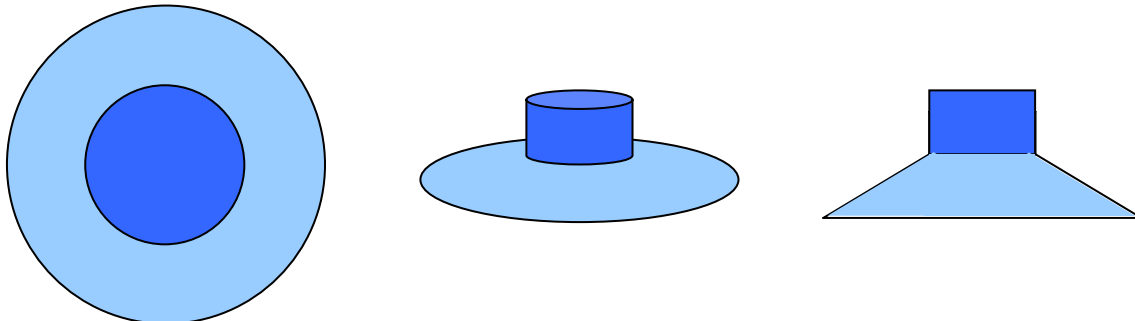


Abb. 37 verschiedene Ansichten des verwendeten Aluminiumstempels (Aufsicht, schräge Ansicht, seitliche Ansicht)

Es wurde bei allen elektrophoretischen Messungen bei konstanter Spannung gearbeitet und die Proben wurden manuell mit einer 2-20 μL Pipette aufgegeben, die eine modifizierte Spitze besaß. Die Spitze bestand aus einer 160 mm langen Injektionsnadel, die an ihrem unteren Ende abgeschnitten wurde, um ein gerades Spitzenende zu erhalten. Dies ist nötig, um die Gefahr der Beschädigung des Gels durch die Nadel zu verringern. Bei einem flachen Ende wird das Gel bei einem Aufsetzen der Nadel nicht sofort perforiert. Da sich das Nadelende ca. 15 cm unter der Eluentsoberfläche befindet, kann aufgrund des hydrostatischen Drucks nicht immer gewährleistet werden, dass das komplette Probenvolumen die Pipette verließ. Im Laufe einer Messreihe sammelt sich in der Elutionsfritte Luft an, die zu einer Verringerung der Stromstärke führt. Diese wiederum führt zu verlängerten Migrationszeiten, weshalb zur Vergleichbarkeit einzelner Messungen immer ein interner Zeitmarker der Probe zugesetzt wurde. Das war entweder Bromphenolblau oder eine Mischung aus Iodid und Iodat. Bei einer starken Erniedrigung der Stromstärke wurde die Luft aus der Fritte durch Anlegung eines Unterdrucks mittels einer Spritze entfernt.

Bei einem kompletten Wechsel des Systems (Wechsel der Pufferflüssigkeiten und Wechsel des Gels) wird das Gel im Röhrchen direkt in die Elektrophoresezelle eingebaut. Ist nur der Wechsel des Gels unter Beibehaltung der Pufferlösungen notwendig, so kann das alte Gel durch Anlegen eines Überdrucks an der Ausgangskapillare nach oben gedrückt werden, wo es dem Röhrchen entnommen

werden kann. Das neue Gel wird auf umgekehrtem Wege in das Röhrchen eingeführt und mittels erzeugten Unterdrucks in Richtung Elutionsfritte gezogen. Letzterer Wechsel nimmt weit weniger Zeit in Anspruch als das komplette Auseinanderbauen der Apparatur und ermöglicht ein rasches Weiterarbeiten.

Bei Verwendung eines neu gegossenen Gels wird immer zuerst ein 10 minütiger Pre-run durchgeführt (siehe auch Kapitel 3.5.2), da durch Verunreinigungen im Gel bei der ersten Messung die Basislinie einiger Elemente deutlich erhöht ist, um nach vollständiger Migration aus dem Gel wieder auf das Niveau des Eluenten abzufallen und weil die Stromstärke bei einem frischen Gel ebenfalls durch das Herauswandern der geladenen Verunreinigungen mit der Zeit abfällt und sich nach etwa 10 min sich einem stabilen Wert nähert.

3.4.2.1 Wasserlösliche Nanopartikel

Für die Analyse von nicht-kovalent stabilisierten Nanopartikeln, also den citratstabilisierten Nanopartikeln und den Größenstandards, wurde ein niedrig konzentriertes und kurzes Agarosegel verwendet, da die Partikel relativ große Durchmesser besaßen und die Migration auch im Hinblick auf eine geringe Signalverbreiterung in einer vernünftigen Zeitspanne verlaufen sollte. Als Puffer wurde ein sehr niedrig konzentrierter Phosphatpuffer gewählt, um nicht Gefahr zu laufen, dass die stabilisierende Hülle der Partikel zusammenbricht.

Tab. 11 Konditionen der Trennung von nicht-stabilisierten Nanopartikeln

Puffer	2 mmolL ⁻¹ Phosphat, pH = 7,5
Gelkonzentration	2 %
Gellänge	15 mm
Gel	LG Agarose (Cambrex)
Spannung	400 V

Für die Charakterisierung kovalent stabilisierten Nanopartikel wurden die Parameter der Trennbedingungen vielfältig variiert und sind deshalb immer bei der entsprechenden Abbildung angegeben.

3.4.2.2 Metall-MSA-Komplexe

Wie in früheren Kapiteln schon häufiger erwähnt und für Silber- und Gold-MSA-Nanopartikel in ^[67] und ^[74] beschrieben, hängt die Größe von thiolstabilisierten Nanopartikeln neben anderen Parametern in starkem Maße vom Verhältnis Metall zu Ligand ab. Deshalb wurden Untersuchungen zur Bildung von Metall-MSA-Komplexen bei verschiedenen molaren Verhältnissen von Metall zu MSA durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es, herauszufinden, welche Komplexe und in welchem Ausmaß diese sich bilden.

Dazu wurden jeweils Lösungen von

MSA (20 mmolL⁻¹ in 5 mmolL⁻¹ Tris/Borat-Puffer pH = 8,6),
 AgNO₃ (10 mmolL⁻¹ in MQ-Wasser) und
 HAuCl₄ (10 mmolL⁻¹ in MQ-Wasser) hergestellt.

Die einzelnen Lösungen wurden im gewünschten Verhältnis miteinander gemischt und anschließend mit Pufferlösung verdünnt. Die auf diese Weise hergestellten Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Spezies jeweils mit einem UV-Detektor und dem ICP-MS nachgewiesen. Zur Bestimmung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren von Silber, Schwefel und Gold zur späteren Errechnung der molaren Verhältnisse Ag/S und Au/S, wurden verdünnte Standardlösungen ins ICP-MS eingetragen, deren Signalverhältnis bestimmt und auf molare Konzentrationen umgerechnet (zur genaueren Beschreibung siehe Kapitel 3.4.2.3). In Tab. 12 sind die Konditionen für die Analysen der Metall-MSA-Komplexe zusammengefasst.

Tab. 12 Konditionen der Trennung der Metall-MSA-Komplexe

Puffer	5 mmolL ⁻¹ Tris/Borat, pH = 8,6
Gelkonzentration	5 %
Gellänge	35 mm
Spannung	500 V
Wellenlänge (UV-Detektion)	214 nm
Isotope (ICP-MS-Detektion)	³² S, ¹⁰⁷ Ag, ¹⁹⁷ Au

3.4.2.3 Metall/S-Verhältnismessungen der Nanopartikel

Um mehr Information über die Stöchiometrie der synthetisierten MSA-Gold- und MSA-Silbernanopartikel zu erlangen, wurde das atomare Verhältnis der Elemente Schwefel und Gold, bzw. Silber mit Hilfe des ICP-MS bestimmen.

Hierzu fanden Untersuchungen der Proben TC01-06 (Synthese siehe Kapitel 3.2.2.1) mittels GE statt und die gemessenen Signalintensitäten der einzelnen Fraktionen wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Durch die Bestimmung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren der Elemente kann man aus den gemessenen Isotopenverhältnissen $^{197}\text{Au}/^{32}\text{S}$ und $^{107}\text{Ag}/^{32}\text{S}$ auf das stöchiometrische Verhältnis der Elemente im Cluster schließen.

Zur Bestimmung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren wurde eine Lösung mit 5 mg kg^{-1} Schwefel und $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ Gold, bzw. Silber über eine peristaltische Pumpe zum Zerstäuber gefördert und die Isotopenverhältnisse wurden über einen bestimmten Zeitraum gemessen. Das gemessene Verhältnis Au zu S muss nun mit dem reziproken Wert des Quotienten der Konzentration in Atomen pro Volumeneinheit von Au zu S multipliziert werden und man erhält das molare Intensitätsverhältnis.

$$F = \frac{I_{\text{Au}}}{I_{\text{S}}} \cdot \frac{\frac{C_{\text{S}}}{m_{\text{S}}}}{\frac{C_{\text{Au}}}{m_{\text{Au}}}}$$

I = Intensität [cps]

c = Konzentration [g L^{-1}]

m = molare Masse [g mol^{-1}]

F = Empfindlichkeitsfaktor (dimensionslos)

Anschaulich beschrieben sagt uns der Empfindlichkeitsfaktor, ein wie viel Mal größeres Signal eine bestimmte Anzahl Atome Au im Vergleich zur selben Anzahl Schwefelatome gibt.

Die Versuche haben gezeigt, dass eine Minute Messdauer als ausreichend betrachtet werden kann, da sich der RSD des Quotienten auch bei längerer Messzeit nicht signifikant verringerte. Der relative Empfindlichkeitsfaktor muss täglich vor oder nach jeder Messserie erneut bestimmt werden, da es sehr vom aktuellen Tuning des ICP-MS abhängt und deshalb von Tag zu Tag relativ großen Schwankungen unterliegt.

Um Rückschlüsse aus den ermittelten Verhältnissen von Metall zu Schwefel im Nanopartikel ziehen zu können, muss man sich grundsätzlich überlegen, wie ein Nanopartikel auf atomarer Ebene aufgebaut ist. Nimmt man an, dass ein Nanopartikel ein weitgehend rundes Gebilde darstellt, dann kann man die in ihm enthaltenen Metallatome in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen gibt es solche Metallatome, die sich im Inneren des Clusters befinden und keinen Kontakt zu einem MSA-Molekül haben und zum anderen gibt es die sich an der Oberfläche des Clusters befindlichen Metallatome, die theoretisch die Möglichkeit besitzen, ein MSA-Molekül zu binden.

Das atomare Verhältnis von Au zu S ist bei sehr kleinen Partikeln nahe 1, denn die Anzahl der Oberflächenatome ist im Vergleich zu im Inneren liegenden Atomen sehr groß. Je größer das Partikel ist, desto größer wird auch das Verhältnis. Eine einfache Rechnung am Beispiel einer Kugel zeigt, dass das Verhältnis von Kugelvolumen, hier analog den Goldatomen, zu Kugeloberfläche, analog den MSA-Molekülen, stetig zunimmt:

$$V = 4/3\pi r^3$$

r = Radius

$$A = 4\pi r^2$$

V = Volumen

$$V/A = r/3$$

A = Oberfläche

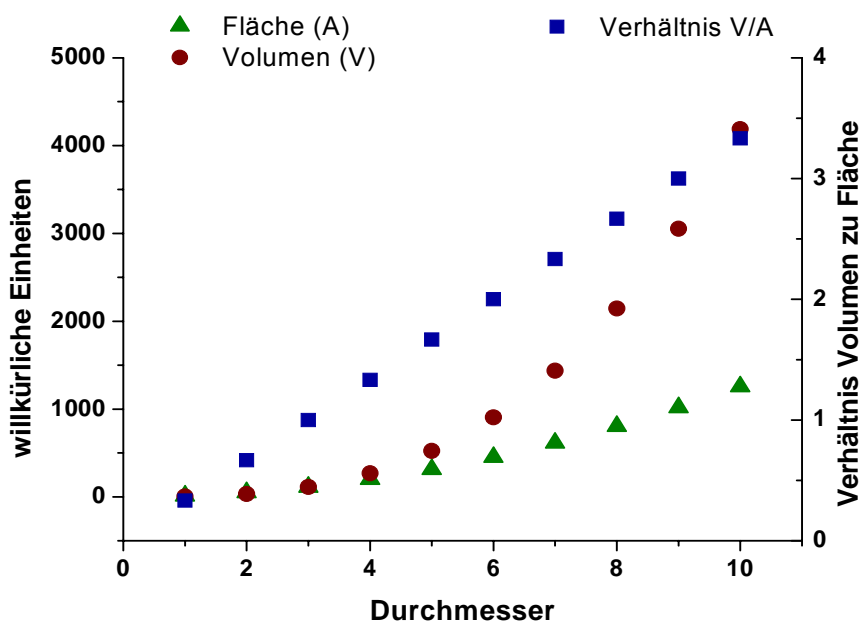


Abb. 38 Darstellung des Verhältnisses des Volumens einer Kugel zu ihrer Oberfläche

Der Vergleich zu den Metall- und Schwefelatomen hinkt etwas, da hier ein Volumen mit einer Fläche verglichen wird und bei den Nanopartikeln die Anzahl der einzelnen Atomsorten. Qualitativ ist der Verlauf des Quotienten jedoch gleich und Abb. 38 stellt den Sachverhalt anschaulich dar.

Wenn man von diskreten Atomen ausgeht und sich das Partikel aus einzelnen, ikosaedrisch aufgebauten Atomschalen^[68] aufgebaut vorstellt, erhält man ein ähnliches Ergebnis. Jede neue Schale bringt dabei $10l^2+2$ neue Atome mit, wobei l ($l \geq 1$) die Nummer der Schale ist. Der Quotient aus der Gesamtzahl der Atome im Cluster und der Anzahl der äußeren Atome, die der maximalen Anzahl an Bindungen zu einem Thiol entspricht, wird bei größeren Clustern immer größer (siehe Tab. 13). Der Grenzwert für sehr große l lässt sich berechnen zu $1/3$. Trotzdem kann man Cluster, die im Prinzip gleich aufgebaut sind, aufgrund des Verhältnisses Metall zu Schwefel miteinander vergleichen, auch wenn der Bedeckungsgrad durch das Thiol nicht bekannt ist. Bei chemisch gleich aufgebauten Clustern wird dieser ähnlich sein und ein Cluster mit größerem Metall/Schwefel-Verhältnis wird größer als ein entsprechender Cluster mit niedrigem Verhältnis.

Tab. 13 Zusammenfassung der Atomzahlen bei einem idealen ikosaedrischen Aufbau eines Clusters (l = Schalennummer).

l	Innere Atome	Äußere Atome	Atome gesamt	Atome gesamt / äußere Atome
1	1	12	13	1,08
2	13	42	55	1,31
3	55	92	147	1,60
4	147	162	309	1,91
5	309	252	561	2,23
6	561	362	923	2,55

3.4.2.4 Rubigold

Rubigold ist der Handelsname eines patentierten Goldclusters, des im Jahre 2002 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Günther Kidrowski durch Wolf M. Pankau im Rahmen seiner Dissertationsarbeit entwickelt wurde^[69,70,71]. Ursprüngliches Ziel der Arbeiten war die Entwicklung eines geeigneten organischen Liganden, der das im Jahre 1981 von Schmid et al. entwickelte und nach ihm benannte Schmid-Cluster^[72] aus der organischen Phase in die wässrige überführen und es dort stabilisieren kann. Das Schmid-Cluster ist ein Goldcluster mit sehr enger Größenverteilung, welches mit Phosphinliganden bedeckt ist und sich in organischen Lösungsmitteln löst. In Abb. 39 ist der Goldkern des Schmid-Clusters zu sehen. Es handelt sich um einen Kuboktaeder mit 42 äußeren Atomen und 13 inneren Atomen. Ein Kuboktaeder besitzt 6 quadratische Flächen und 8 Dreiecksflächen und somit 12 Ecken und 24 Kanten. Der durchschnittliche Durchmesser beträgt 1,4 nm.

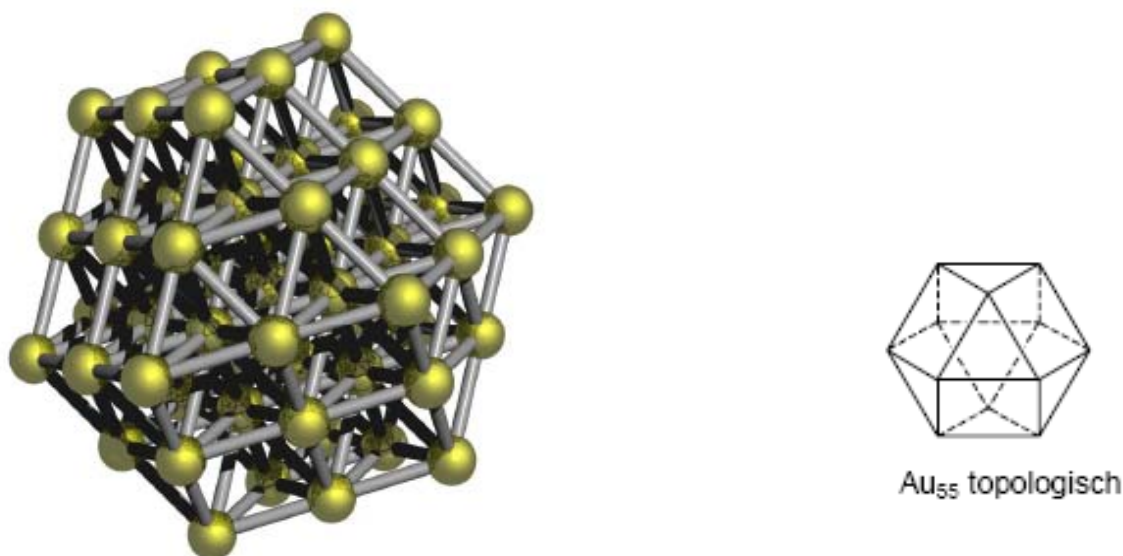


Abb. 39 Darstellung des idealisierten 55 atomigen Goldkerns des Schmid-Clusters

Die Vorteile dieses Clusters, den man aufgrund seiner engen Verteilung an Goldatomen schon fast als definiertes Molekül bezeichnen kann, sollten auch in wässriger Phase nutzbar gemacht werden, weshalb Pankau et al. einen Liganden entwickelten, der auf die Größe und Form des Schmid-Clusters abgestimmt und wasserlöslich war^[69]. Mithilfe eines dem in Abb. 40 dargestellten ähnlichen Liganden

(anstelle der über eine Peptidbindung über einen Spacer angelagerten funktionellen Gruppe bleibt die Aminogruppe frei) wurde dies erreicht.

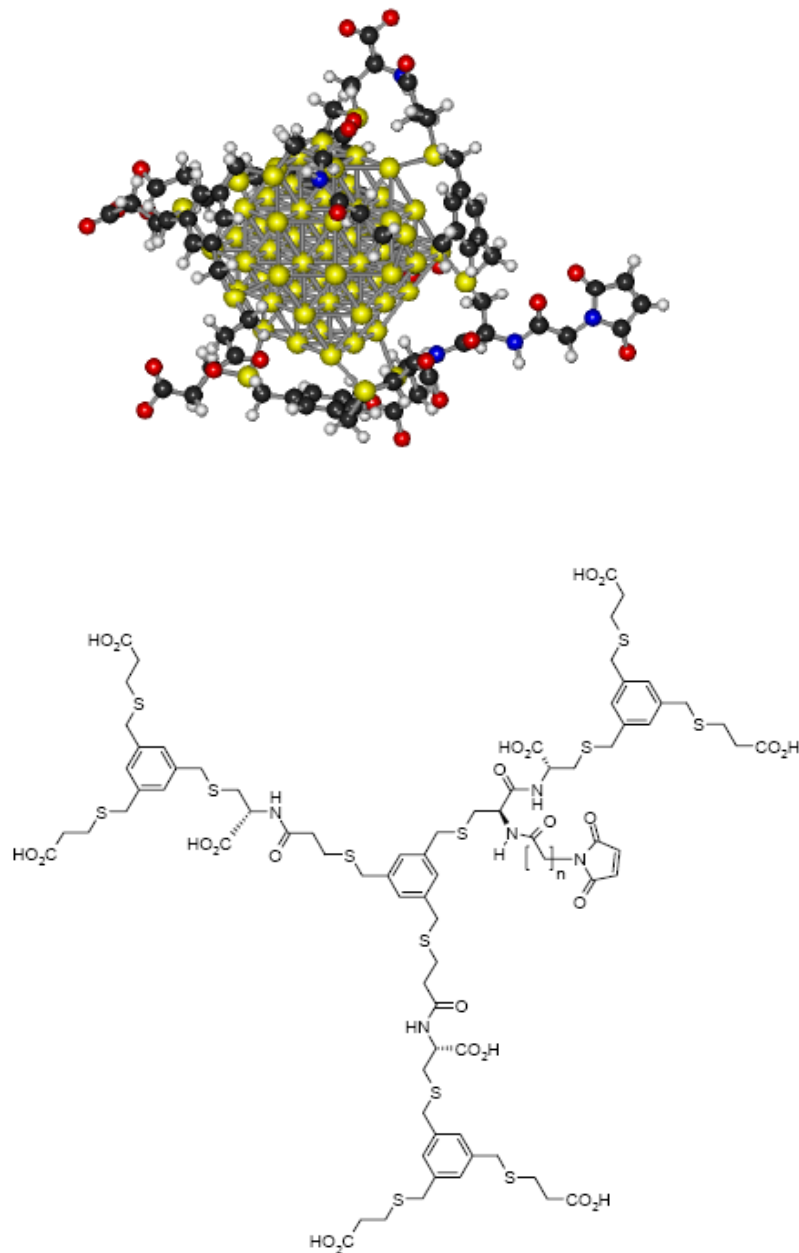


Abb. 40 Ligand zur Überführung des Schmid-Clusters aus der organischen in die wässrige Phase

Die mit Thioethern 1,3,5-trifunktionalisierten Benzole weisen eine adäquate Geometrie zur Bedeckung der Dreiecksflächen des Clusters auf. Eine stabile Bindung zwischen dem Liganden und dem Cluster wird durch Gold-Schwefel-

Wechselwirkungen erreicht. Es ist zwar bekannt, dass Thiole wesentlich stärkere Bindungen zu Gold als Thioether ausbilden, was bedeutet, dass Thioether im Gegensatz zu Thiolen keine Phosphinliganden von einer Goldoberfläche verdrängen können. Jedoch konnte gezeigt werden, dass mehrpodante Thioether im Vergleich zu monopodanten sehr wohl in der Lage waren, Phosphinliganden von der Goldoberfläche zu verdrängen, um so einen stabileren Komplex mit dem Cluster zu bilden.

Ein weiterer Vorteil des verwendeten Liganden ist die Möglichkeit seiner Funktionalisierung, um selektiv mit anderen funktionellen Gruppen von Zielmolekülen zu reagieren. In Abb. 40 ist der Ligand mit einem Maleimidogruppe dargestellt, welche mit SH-Gruppen reagieren kann (siehe Abb. 41). Durch die Einführung einer anderen reaktiven Gruppe (z. B. N-Hydroxysuccinimidester) bei der Synthese des Liganden, können auch andere funktionelle Gruppen (z. B. Aminogruppen) einer Kopplung mit dem Liganden zugänglich gemacht werden.



Abb. 41 Reaktionsschema für die Reaktion eines Thiols mit einem Maleimid

Nachdem die Verdrängung der Phosphinliganden und die Überführung des Clusters in die wässrige Phase gelungen war, sollte der apparativ aufwendige und keineswegs triviale Syntheseprozess des Schmid-Clusters umgangen und das Cluster direkt hergestellt werden. Dazu wurde der in Kapitel 3.2.2 beschriebene Syntheseweg eingeschlagen, wobei man als stabilisierendes Thiol nun den Liganden (einen mehrpodanten Thioether) und als Reduktionsmittel anstelle des Natriumborhydrids NaBH₃CN benutzte^[73]. Die Aufarbeitung des Rohproduktes erfolgt über eine Größenausschlusschromatographie (Sephadex G-50, Phosphat-Puffer).

Zusammenfassend lassen sich folgende Vorzüge von Rubigold gegenüber herkömmlichen Clustern herausstellen:

- Die Größenverteilung, und somit die Verteilung der Anzahl von Goldatomen, ist sehr eng.
- Das Cluster ist aufgrund der vollständigen Umhüllung durch den Liganden sehr stabil.
- Durch Modifizierung des Liganden kann der Cluster an verschiedenste Moleküle kovalent gebunden werden.

Um die postulierte und mit MALDI-Experimenten schon im Vorfeld von W. Pankau untersuchte Homogenität des Clusters zu bestätigen, wurden Versuche mit einem ICP-MS angestrebt und durchgeführt, da es aufgrund der Eigenschaft quantitative Aussagen über die elementare Zusammensetzung einer Probe machen zu können, einen Hinweis auf die Stöchiometrie des Clusters geben kann. Hierbei wurden nach vorheriger Bestimmung der Empfindlichkeitsfaktoren von Schwefel und Gold das Verhältnis dieser zwei Elemente in der Probe bestimmt. Da die absolute Anzahl an Schwefelatomen im Liganden bekannt ist, nämlich 12, kann durch Vergleich der Signale von Gold und Schwefel die Anzahl der Goldatome errechnet werden. Eine separative Analyse der Probe, in diesem Fall eine elektrophoretische Trennung, um eventuell vorhandene Spezies mit unterschiedlicher Anzahl von Goldatomen und Agglomerate abzutrennen, erschien notwendig, da die direkte Bestimmung von Gold/Schwefelverhältnissen nur Information über die durchschnittliche Zusammensetzung der Probe geben kann. Deshalb wurde jede bei der chromatographischen Aufreinigung des Syntheseproduktes gesammelte Fraktion wiederum mit der Gelelektrophorese-ICP-MS-Kopplung analysiert.

In Kapitel 4.2.2.6 sind die Ergebnisse der Messungen mehrerer der gesammelten Fraktionen des Rohproduktes dargestellt.

3.4.3 ESI-MS-Charakterisierung von Nanopartikeln

Zur Charakterisierung von großen Molekülen mit Hilfe massenspektrometrischer Techniken wurden mit der Entwicklung der Electrosprayionisation (ESI) und der Matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) in der Vergangenheit vor allem bei Makromolekülen wie Proteinen große Erfolge erzielt. Ein nanopartikuläres Cluster kann ebenso als Makromolekül bezeichnet werden, mit dem Unterschied, dass je nach Art des Nanopartikels nicht immer kovalente Bindungen zwischen den einzelnen Atomen bestehen, was die Stabilität solcher Atomverbände beim Ionisationsschritt und dem Verhalten während der Flugzeit im Vakuum beeinflussen kann. Es wurde jedoch gezielt auf eine Charakterisierung der Partikel mit einem ESI-Massenspektrometer hingearbeitet, da sich im Gegensatz zur MALDI-Technik eine online-Kopplung mit der Gelelektrophorese aufbauen lässt.

Zuerst muss geklärt werden, ob sich wässrige Lösungen von Nanopartikeln, so wie sie im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und verwendet wurden, in der ESI-Quelle prinzipiell ionisieren lassen, ob nach erfolgreicher Ionisation das Cluster eine genügend hohe Ladung aufweist, um ein m/z -Verhältnis innerhalb des Arbeitsbereiches des ESI-MS (max. m/z 4000) zu haben und ob das ionisierte Cluster in der Zeit zwischen Ionisation und Detektion stabil bleibt und nicht etwa auseinander bricht. Hierzu wurden die Syntheseansätze Au_{klein} , P17 und der gekaufte 5 nm Größenstandard in unterschiedlichen Pufferlösungen mit und ohne Methanol verdünnt und über eine Spritzenpumpe direkt in die Ionisationsquelle eingeführt. Durch Optimierung der Geräteparameter konnten für die thiolstabilisierten Nanopartikel P17 und Au_{klein} Massenspektren erhalten werden. Für die Messungen wurde ein LCQ DECA (Thermo Finnigan) Ionenfallenmassenspektrometer verwendet. Die Sprühspannung betrug -3,5 V und es wurden 30 willkürliche Einheiten Hilfsgas eingestellt (die Einheiten werden von der Gerätesoftware definiert). Die Kapillare wurde nicht geheizt, um eine Degradation der Partikel durch thermisch induzierten Zerfall zu verhindern. Charakteristische Ionen wurden in der Ionenfalle akkumuliert und mit einer Kollisionsenergie von 30 % fragmentiert. Die Ionenoptik wurde in Hinblick auf eine maximale Intensität der Fragmentensignale und ein grosses Signal-Rausch-Verhältnis optimiert.

Für die citratstabilisierten 5 nm Standardprobe konnten keine Signale erhalten werden, was unter Umständen mit der nicht kovalent gebundenen Hülle in

Verbindung gebracht werden kann. Es ist möglich, dass diese sich beim Ionisationsprozess vom Goldkern löst und der nackte Nucleus, sofern dieser in der Ionisationsquelle nicht selbst schon zerfällt, nicht oder nur schwer zu ionisieren ist. Ohne den Ergebnissen, welche in Kapitel 4.2.3 vorgestellt werden, vorwegzugreifen, gilt anzumerken, dass Massensignale nur für relativ konzentrierte Lösungen erhalten werden konnten, weshalb der geplante zweite Schritt, nämlich die Untersuchung mittels der online-Kopplung der GE an das ESI-MS, nicht durchgeführt wurde^{**}.

3.4.4 Unabhängige Größenbestimmung der Nanopartikeln

3.4.4.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Eine alternative Größenbestimmung von synthetisierten und gekauften Nanopartikeln wurde mittels der dynamischen Lichtstreuung durchgeführt. Diese Methode ist relativ einfach zu handhaben, bedarf allerdings einer sehr sauberen Probenvorbereitung, da jegliche Fremdpartikel in den Probelösungen, z. B. Staub aus der Umgebungsluft, die Ergebnisse verfälschen. Deshalb wurden alle verwendeten Glasgefäße in siedendem THF von Staubresten befreit und das Einfüllen der Proben erfolgte unter größter Sorgfalt in reinen Werkbänken.

Die Messungen und Auswertungen wurden im Arbeitskreis von Prof. M. Schmidt (Universität Mainz, Institut für physikalische Chemie) in Zusammenarbeit mit Herrn Störkle durchgeführt. Der DLS-Aufbau bestand aus einem Uniphase He/Ne laser ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$, 22 mW), einem ALV-SP 86 Goniometer (ALV, Langen, Germany), einer ALV/High QE APD-Avalanche Photodiode mit Glasfaserdetektion, einem ALV3000 Korrelator und einem Lauda RC-6 Thermostator (Lauda GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland). Die Auswertung der Daten folgte Standardprozeduren, bei denen kumulierte Analysen und Simplex-Algorithmen benutzt wurden. Die

^{**} Im Vorfeld wurde diese Kopplung natürlich getestet, indem eine Farbstoffmischung aus Mono-, Di-, Tri- und Tetraiodofluorescein auf ein Agarosegel aufgegeben wurde und die Molekularmassen mit dem ESI-MS detektiert wurden (Daten und Elektropherogramme werden im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt). Die Kopplung erfolgte analog der ICP-MS-Kopplung und funktionierte problemlos. Bei der Wahl des Puffers ist man auf flüchtige Substanzen angewiesen, weshalb 10 mmolL^{-1} Ammoniumcarbonat (mit NH_3 auf pH = 8,7 eingestellt) verwendet wurde.

Proben wurden vor den Messungen durch einen 0,1 μ -Filter gefiltert, um sie von Verunreinigungen zu befreien.

3.4.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM-Bilder der Proben C und D (siehe Abb. 86 und Abb. 88) und die des 20 nm Standards (siehe Abb. 85) wurden mit einem Philips EM420 Elektronenmikroskop (Philips Electron Optics, Niederlande) an der Universität Mainz (Institut für physikalische Chemie, Dr. Ute Kolb) aufgenommen. Die Partikeldurchmesser wurden mit Standardprozeduren bestimmt.

Die hochaufgelösten Bilder der Proben Au_{klein} und des 5 nm Standards wurden an der Universität Marburg mit Hilfe von Barbara Herrmann an dem dort zu Verfügung stehenden JEM 3010 der Firma JOEL durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein TEM, welches mit einer LaB₆ Kathode ausgestattet ist und mit einer Beschleunigungsspannung von 300 kV betrieben wird. Die Proben wurden in Form eines Tropfens einer wässrigen Lösung auf ein kohlebeschichtetes Kupfernetz aufgebracht. Das im Vakuum getrocknete Netz wurde anschließend auf den Probenhalter gegeben, dieser wurde in die Probenkammer gebracht und daraufhin wurde das System evakuiert.

3.5 Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen

Neben den zur Markierung verwendbaren Nanopartikeln müssen auch die zu markierenden Biomoleküle, hier Proteine, mit den Techniken charakterisiert werden, die auch für die Konjugate eingesetzt werden sollen. Die Gelelektrophorese als leistungsstarke und weit verbreitete Analysetechnik in Kombination mit der ICP-MS stellt hier ein vielversprechendes und innovatives Werkzeug bei der Analyse dar.

Elektrophorese, ob in Lösung, Kapillaren oder Gelen, wird schon lange mit Erfolg und Routine in den biologischen und biochemischen Laboratorien, in erster Linie zur Trennung und Reinigung von Proteingemischen und DNA-Fragmenten, verwendet. Um eine gute Auflösung der einzelnen Fraktionen zu erreichen, können viele der Trennparameter variiert und auf ein individuelles Problem optimiert werden. Die einzelnen Einflüsse der veränderbaren Größen sind empirisch bekannt aber wissenschaftlich nicht fundiert erforscht und erklärt, da die Entwicklung dieser Trenntechnik auf Jahre zurück geht, in denen viele der heute verfügbaren Analysetechniken noch nicht oder nur in eingeschränktem Maße zur Verfügung standen.

Ziel dieser Arbeit ist nicht die physikochemische Beschreibung der Trenntechnik „Gelelektrophorese“. Doch durch die Etablierung der Verknüpfung dieser Standardmethode mit der Massenspektrometrie, einer in den letzten Jahren und Jahrzehnten die moderne Analytik bestimmende Analysemethode, sollen in Zukunft Möglichkeiten und Anreize zu weiteren Untersuchungen bezüglich des theoretischen Verständnisses der auf vielen Gebieten der Biowissenschaften allgegenwärtigen Gelelektrophorese und weiterer praktischer Anwendungen gegeben werden.

Um die Röhrengelelektrophorese neben der traditionellen Form der Gelelektrophorese etablieren zu können, muss geklärt werden, ob Trennungen von Proteinen in Röhrengelen vergleichbare Ergebnisse wie die Trennung auf Plattengelen hervorbringen. Die Abhängigkeit von vielen Parametern macht diese Frage allerdings nicht allgemein beantwortbar, jedoch soll anhand einfacher Proteinsysteme, auch unter der Berücksichtigung der Verfügbarkeit und der Detektionsmöglichkeit der verwendeten Proteine, die prinzipielle Möglichkeit einer

Übertragung der Trennung von der Platte in das Röhrchen mit all seinen Möglichkeiten einer postseparativen Detektion aufgezeigt werden.

3.5.1 Plattengele

Bevor Proteine, Nanopartikel und Nanopartikelkonjugate im Röhrchengel aufgetrennt werden sollten, war es notwendig, ersten Erfahrungen mit der klassischen Form der Gelelektrophorese, nämlich der Plattengelelektrophorese, zu sammeln. Hierfür stand ein sehr einfach handhabbares Gerät zur Verfügung in Form der horizontalen submarinen Mini-Sub Cell GT (Bio-rad Laboratories).

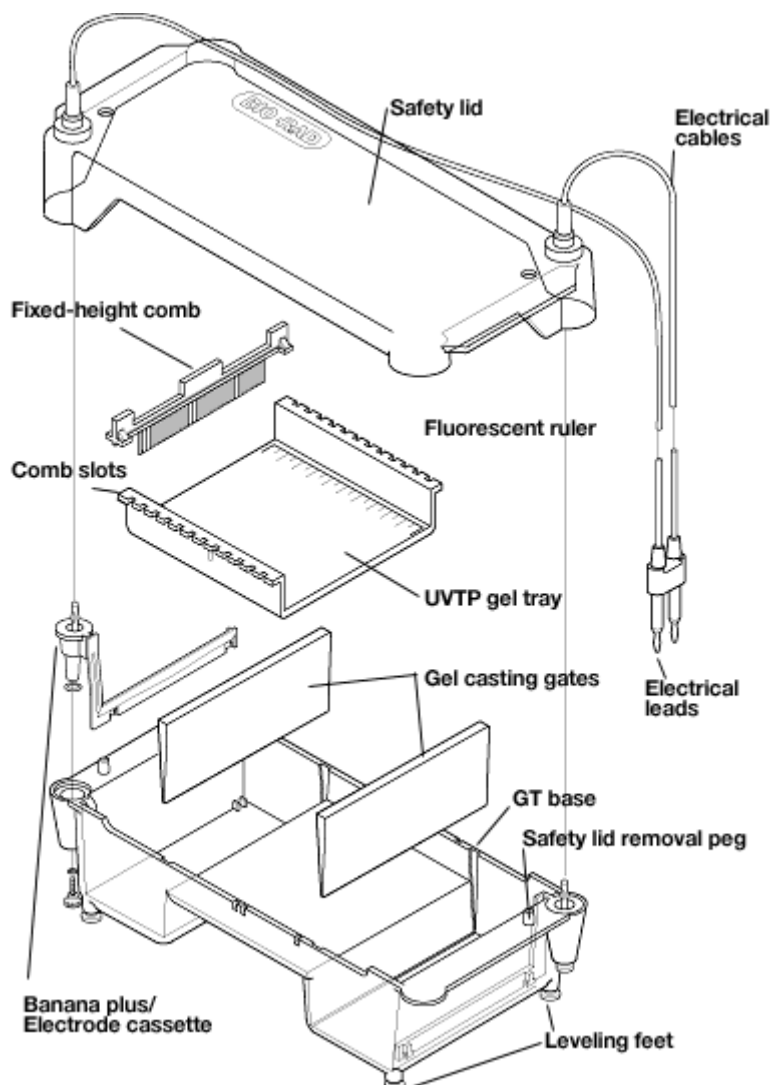


Abb. 42 Schema der Mini-Sub Cell GT

Betrieben wurde die Zelle mit einer Hochspannungsversorgung, dem PowerPac Basic Power Supply (Bio-rad Laboratories), der zwischen 10 V und 300 V Spannung, bzw. 4–400 mA Stromstärke aufrechterhalten kann.

Die Gele wurden im Geleinsatz (gel tray) hergestellt, indem beide Seiten mit Klebeband abgeklebt wurden und das warme (etwa 75 °C) blasenfreie Gel hinein gegossen wurde. Zur Formung der Probetaschen wurde ein Kamm (fixed-height comb) am Ende des Einsatzes positioniert, der nach Gelierung der Agarose herausgenommen wurde und die Aussparungen hinterließ. Benutzt wurden zwei Kämmen mit acht Zähnen, die 5,5 mm breite und 0,75 mm bzw. 1,5 mm lange Taschen formten. Nach etwa 30 min war das Gel fest und einsatzbereit. Es war notwendig, das Gel relativ zeitnah in die mit Pufferlösung gefüllte Mini-Sub Cell zu geben, da es sonst auszutrocknen begann. Die Beladung der Taschen mit succroehaltiger Probelösung erfolgte ähnlich wie auch bei den Röhrengelen mit einer Pipette. Da der elektrische Kontakt zwischen den beiden Elektroden nicht nur durch das Gel sondern auch durch die darüberliegende Pufferlösung bestand, konnte die angelegte Spannung je nach Pufferkonzentration und –zusammensetzung nicht höher als 150 V gewählt werden, um eine Stromstärke über 40 mA zu vermeiden, die durch die Produktion von Joule'scher Wärme das ganze System zu sehr erhitzen würde. Zu hohe Temperaturen führen zu stark erhöhter Diffusion der Analytbanden und somit zu einer schlechteren Auflösung.

Bei der Analyse von Proteinen wurde das Gel nach der Trennung in ein Färbebad gelegt (0.03 % Coomassie Blau, 10 % Eisessig und 40 % Methanol in Wasser), um die Proteine im Gel zu fixieren und für das Auge sichtbar zu machen. Der niedrige pH und das Methanol lassen die Proteine präzipitieren, so dass die Fraktionen nicht weiter im Gel diffundieren können, und der Farbstoff lagert sich an die Proteine an. Nach 30 min wird das Gel herausgenommen und in einer Entfärbelösung (5 % Eisessig und 20 % Methanol in Wasser) wiederholt entfärbt, bis nur noch die Proteinfractionen deutlich sichtbar sind. Durch das Entfärben wird der in das Gel diffundierte Farbstoff an den Stellen wieder herausgelöst, wo er nicht an das Protein gebunden ist (siehe Kapitel 2.2.5). Zu jeder Probe wurde Bromphenolblau als Marker für die Lauffront zugegeben. Spätestens 2 cm vor Erreichen des Gelendes wurde die Spannung abgeschaltet und der Anfärbevorgang begonnen.

3.5.1.1 Native Gelelektrophorese

Für die native GE wurden Tris/Borat Pufferlösungen mit verschiedenen Konzentrationen und pH-Werten benutzt. Etwa 30 mL des Puffers wurde abgewogen und je nach gewünschter Gelkonzentration wurde die entsprechende Menge Agarose zugewogen. Bei der verwendeten Agarose handelte es sich um NuSieve 3:1 (Cambrex, Rockland, MA, USA). Im siedenden Wasserbad wurde die Suspension unter starkem Rühren erhitzt, bis die Agarose geschmolzen war. Das Gel wurde bei etwa 75 °C im Trockenschrank ruhen gelassen, bis alle Bläschen aufgestiegen waren. Nach der Entfernung etwaigen Schaumes auf der Geloberfläche wurde der Geleinsatz vorsichtig unter Vermeidung erneuter Blasenbildung mit dem Gel gefüllt. Das gelierte Gel war danach bereit zur Verwendung.

Denaturierende Gele wurden unter identischen Bedingungen hergestellt und nach der Gelierung für eine halbe Stunde in SDS-haltige Pufferlösung gelegt. Solche Gele wurden für Vorversuche verwendet, finden sich aber nicht im weiteren Inhalt dieser Arbeit wieder.

3.5.2 GE-Kopplung zur Trennung von Proteinen

In diesem Kapitel wird soll aufgezeigt werden, dass

- die gelelektrophoretische Trennung im Röhrchen prinzipiell genauso funktioniert, wie in traditionellen Plattengelen,
- die online Detektion mittels UV/Vis-Detektor und ICP-MS funktioniert und Vorteile gegenüber der herkömmlichen Färbung der Gelplatten zur Sichtbarmachung und Quantifizierung hat und
- Analysenzeiten verkürzt werden und zusätzliche Information aus einer Probe gewonnen werden kann, wie z. B. die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von Proteinen.

Hierzu wurden täglich frisch zubereitete Proteinstandardlösungen von α -Casein, β -Casein, Ovalbumin und bovines Serumalbumin im Konzentrationsbereich von 0,5 - 5 mgmL⁻¹ im jeweiligen Puffer angesetzt und für die verschiedenen Messung je nach Bedarf verdünnt. Um verschiedene Messungen bezüglich der Migrationszeiten besser miteinander vergleichen zu können, wurde den Lösungen immer Bromphenolblau zugegeben. Durch Lösen von 50–150 mg Succrose in der Proteinprobe wurde deren Dichte erhöht, so dass während der Probenaufgabe in die Geltasche eine Vermischung mit der Umgebungslösung minimiert wurde.

Bei Verwendung eines frischen Gels wird immer ein so genannter Pre-run durchgeführt, um das Gel von aus der Agarose stammenden Verunreinigungen wie Phosphat und Sulfat zu befreien. Wie in Abb. 43 zu sehen ist, steigt das Signal des beobachteten Elements nach der Totzeit^{††} von etwa einer Minute (sie hängt vom Volumen der Elutionszone, der verwendeten Kapillare und dem Schlauch der peristaltischen Pumpe ab) auf ein konstantes Niveau an. Wegen der räumlichen Verteilung der Verunreinigungen im Gel bleibt das Signal konstant bis es zur Migrationszeit der Spezies bei Probeninjektion, in Abb. 43 Phosphat, wieder auf den Blindwert der verwendeten Elutionspufferlösung abfällt. Das Elektropherogramm sieht ähnlich aus für andere Elemente, wie z. B. Schwefel oder Halogene, und unterscheidet sich nur im Zeitpunkt des Signalabfalls.

^{††} Hier wird der Begriff Totzeit nicht im traditionellen Sinne der Chromatographie gebraucht, da die Fortbewegungsprinzipien der Analytmoleküle bei den Trennverfahren unterschiedliche sind. In der Flüssigchromatographie ist die Totzeit, bzw. das Totvolumen der Säule das freie Volumen, welches dem Eluenten zur Verfügung steht. Moleküle, die nicht mit dem Säulenmaterial wechselwirken benötigen in Abhängigkeit von der Flussrate eben die Totzeit, um zu eluieren. In diesem Fall wird fortan mit Totzeit die Zeit bezeichnet, die ein Analyt vom Austritt aus dem Gel bis zum Erreichen des Detektors benötigt.

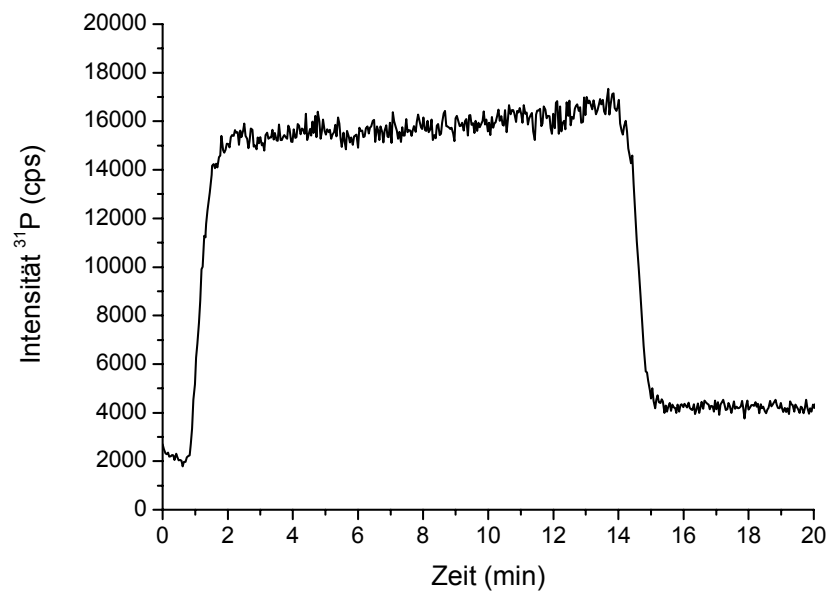


Abb. 43 Typisches Elektropherogramm eines Pre-runs zur Reinigung eines frischen Gels.

Die Konditionen der Trennung und die Beschaffenheit des Gels für die Proteinmessungen sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Tab. 14 Bedingungen für die Trennung der Proteine mit anschließender UV-Detektion

Puffer	10 mmolL ⁻¹ Na-Borat, pH = 9,1
Gelkonzentration	4 %
Gellänge	15 mm
Spannung	500 V

Tab. 15 Bedingungen für die Trennung der Proteine mit anschließender ICP-MS-Detektion

Puffer	10 mmolL ⁻¹ Tris/Borat, 5 mmolL ⁻¹ NaCl, pH = 9,1
Gelkonzentration	5 %
Gellänge	15 mm
Spannung	500 V

3.6 Biokonjugate

Das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit war, eine analytische Methode zu entwickeln, um Biomoleküle durch Ankopplung von Nanopartikeln auf einem niedrigen Konzentrationsniveau quantifizieren zu können. Das dafür angedachte Trennverfahren, die Gelelektrophorese gekoppelt an das ICP-MS, erwies sich als geeignet, sowohl Nanopartikel als auch Biomoleküle wie Proteine und DNA-Fragmente, analytisch charakterisieren zu können. Der letzte Schritt zu den Konjugaten, die den Vorteil der guten Detektierbarkeit über die Metallatome des Nanopartikels beinhaltet, geht über die chemische kovalente Anbindung eines Clusters an ein Protein. Aufgrund der anspruchsvollen Anforderungen an die durchzuführende Kopplungsreaktion, wie die 1:1 Stöchiometrie und eine möglichst nahe 100 % liegende Ausbeute, stellt sich dieser Schritt als sehr schwierig heraus und ist keinesfalls auf triviale Weise innerhalb kurzer Zeit zu lösen. Die direkte Kopplung von Protein und Nanopartikel in einem einzigen simplen Reaktionsschritt und ohne aufwendige Aufarbeitung der Reaktionsmischung stellte keine Aussicht auf Erfolg dar, da die meisten möglichen Reaktionen zu unspezifisch sind und viele Nebenprodukte mit sich bringen. Je spezifischer der Kopplungsschritt gewählt wird, desto aufwendiger muss der präparative Aufwand sein, um die Spezifität zu gewährleisten. Eine Fokussierung auf diese synthetischen Aspekte hätte den Rahmen dieser analytisch orientierten Promotionsarbeit überschritten und wäre auch aufgrund der fehlenden technischen Ausstattung schwierig zu realisieren gewesen. Die analytischen Aspekte im Sinne einer prinzipiellen Machbarkeit des Vorhabens anhand eines einfachen aber nicht zwangsläufig optimalen Modells sollen im Zentrum dieser Dissertation stehen.

Als eine leicht durchzuführende, synthetisch gut handhabbare und apparativ unaufwendige Strategie erschien eine Kombination aus chemischer Modifikation des Zielmoleküls (hier des Proteins) und einem Ligandenaustausch mit dem Nanopartikel. Beide Schritte sind in der Literatur beschrieben^[23] und zumindest der erste ist in der Biochemie weit verbreitet und kommerzielle Kits zur spezifischen Modifikation von Proteinen sind auf dem Markt erhältlich. Der Ligandenaustausch mit kleinen Molekülen ist gut untersucht worden, es ist allerdings nicht bekannt, ob auch

Makromoleküle einen solchen eingehen, bzw. in welchem Maße ein solcher stattfindet.

Als präparativ durchführbarer und Erfolg versprechender Ansatz wurde deshalb eine Variante gewählt, bei der das Protein mit einer Thiolkomponente modifiziert wird und durch den darauf folgenden Austausch von Liganden des Nanopartikels mit diesem thiolierten Protein, eine stabile Verbindung der zwei Komponenten herbeigeführt werden soll.

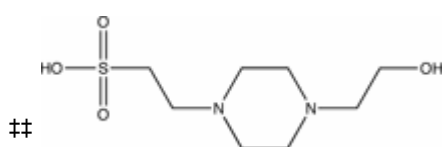
3.6.1 Kopplung von Proteinen mit DHLA

Alle Reaktionen wurden in HEPES-Puffer^{‡‡} durchgeführt, welcher den pH-Wert im physiologischen Bereich von 7,3 – 7,4 halten kann und beim Arbeiten mit Proteinen im Labor als Standardpuffer weite Anwendung findet. Es wurde eine Lösung der Konzentration 50 mmolL^{-1} hergestellt und mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Folgende Lösungen werden benötigt:

- 6,4 mg DHLA (31 μmol) in 1 mL HEPES-Puffer
- 29,8 mg EDC (155,4 μmol) in 200 μL HEPES-Puffer und
- 4,4 mg NHS (38,2 μmol) in 200 μL HEPES-Puffer

Nach 2 min Schütteln ist alles gelöst, und die beiden Lösungen werden unter weiterem Schütteln zusammengegeben. Nach 10 min hat das EDC vollständig abreagiert und der Mischung aus DHLA, EDC und NHS wird die Aminkomponente, das Protein, zugegeben. Bei den Ansätzen mit den beiden Proteinen Ovalbumin und β -Casein werden jeweils 31 μmol , was 1364 mg Ovalbumin und 731 mg β -Casein entspricht, eingesetzt, und in je 3 mL HEPES-Puffer gelöst. Die Proteinlösung wird mit der Lösung des aktivierten DHLA zusammen gegeben, eine Minute stark geschüttelt und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen.



4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

Danach wird aus den 4,2 mL Reaktionsmischung 100 μL entnommen und zu einer Lösung aus 23 mg der synthetisierten Nanopartikelprobe Au_{klein} in 1 mL Wasser gegeben. Bei der Annahme von etwa 15000 g mol^{-1} als mittleres Molekulargewicht des Nanopartikels, was einem Cluster mit etwa 50 Goldatomen und 40 MSA-Molekülen entspricht und bei einer mit der HPLC abgeschätzten Größe von 1,5 nm Durchmesser eine realistische Größenordnung darstellt, entspricht das Mischungsverhältnis Cluster zu eingesetztem Protein 2 zu 1. Bei einem Überschuss an Cluster ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass bei Erreichung des Austauschgleichgewichtes kaum Cluster mit zwei Proteinmolekülen zu finden sind sondern nur solche mit keinem oder einem Protein.

4 Diskussion

4.1 Synthesen

4.1.1 Farbigkeit der Nanopartikel

Wie in Kapitel 2.1.2 schon beschrieben wurde, ist die Farbigkeit der Nanopartikel ein Phänomen, welches auf kollektive Schwingungen der Elektronen in den Atomen des Partikels zurückzuführen ist. Das für die Farberscheinung des Partikels ausschlaggebende Maximum der Absorption ist unter anderem abhängig von seiner Größe. Ein Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von etwa 10 nm besitzt eine starke Absorption im Bereich um 520 nm. Werden die Partikel kleiner, so nimmt das Absorptionsmaximum ab, und der rote Farbeindruck geht ins Braune über, da nun eine Absorption über den sichtbaren Wellenlängenbereich (380–780 nm) stattfindet, wobei niedrigere Wellenlängen stärker absorbiert werden.

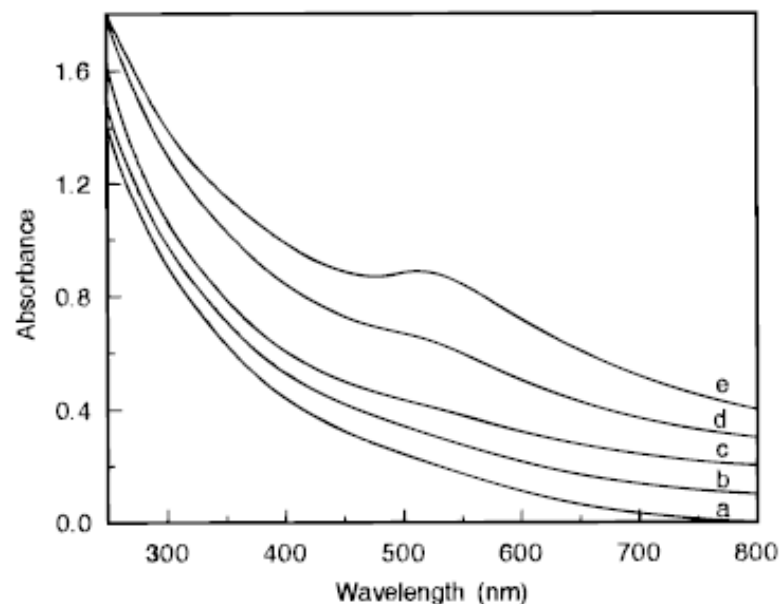


Abb. 44 Absorptionsspektrum von Goldnanopartikeln verschiedener Größe (a = 1,02 nm, b = 1,08 nm, c = 1,28 nm, d = 1,94 nm, e = 3,36 nm)

In Abb. 44 sind Absorptionsspektren verschieden großer Nanopartikel zu sehen^[74]. Man erkennt, dass das Maximum bei etwa 520 nm bei den größeren Partikeln

(e , $r = 3,4$ nm) noch vorhanden ist, aber mit abnehmender Größe der Partikel von e nach a schließlich vollständig zurückgeht. Der rote Farbton der Partikellösung verschwindet und sie erscheint nunmehr braun.

Betrachtet man nun größere Partikel, so nimmt die Absorption am Maximum zu und dieses verschiebt sich in den längerwelligen Bereich. Bei sehr großen Partikeln werden schließlich noch weitere Absorptionsmoden sichtbar^[75]. Für den Farbeindruck bedeutet dies, dass er sich von rot über violett nach blau ändert.

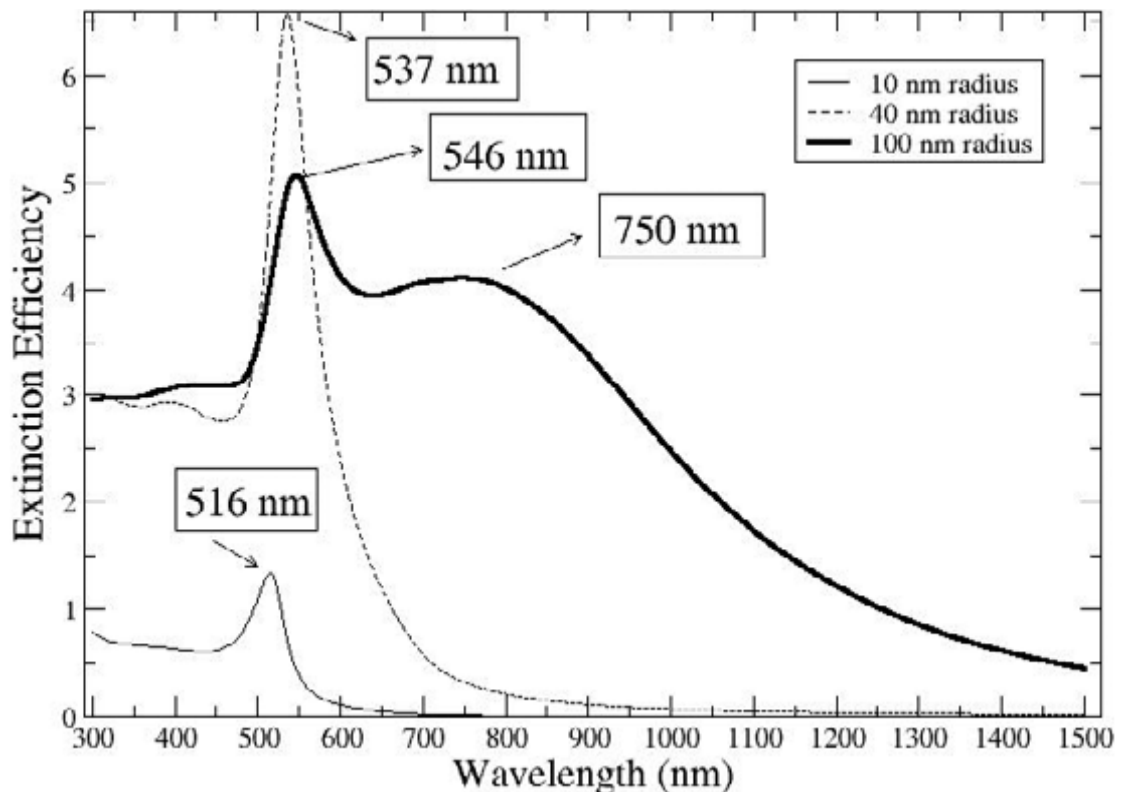


Abb. 45 Absorptionsspektrum von Goldnanopartikeln im Größenbereich von 10 nm bis 100 nm

In den folgenden Abbildungen sind Lösungen synthetisierter Goldnanopartikellösungen unterschiedlicher Größe zu sehen. Die Lösungen der oberen Reihe enthalten Partikel, welche nach der Borhydridmethode hergestellt wurden und mit MSA-Moleküle stabilisiert sind und im unteren Bild sind Partikel zu sehen, die nach der Citratmethode synthetisiert wurden.

Einzig durch den Farbton kann man den Größenbereich der unterschiedlichen Partikel auf kleiner 5 nm Durchmesser für die MSA-Partikel und größer 10 nm für die Citratpartikel abschätzen. Durch HPLC-Messungen konnten die Durchmesser der

Partikel der oberen Reihe auf 1,2 nm (oben links), 2,3 nm (oben Mitte) und 3,8 nm (oben rechts) abgeschätzt werden. Bei den Citratpartikeln im unteren Bild handelt es sich um den 10 nm Standard (links), den 20 nm Standard (Mitte) und einer Probe mit etwa 100 nm Durchmesser (rechts).



Die oben gezeigten Proben zeigen, dass alleine durch die visuelle Betrachtung von Nanopartikellösungen eine Einschätzung der durchschnittlichen Größe möglich ist. Nichtsdestotrotz ist natürlich keine absolute Aussage über den tatsächlichen Durchmesser möglich. Man erkennt nicht, ob die Größenverteilung mono- oder bimodal, schmal oder breit ist und die Lösung muss eine gewisse Konzentration aufweisen, dass der Farbeindruck gut für das menschliche Auge wahrnehmbar ist.

4.1.2 Stabilität

Die Stabilität von Nanopartikeln gegenüber Veränderungen in der umgebenden Lösung (pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur) hängt in erster Linie von der Art der Stabilisation durch die sich auf der Oberfläche befindlichen Liganden ab. Nicht kovalent stabilisierte Partikel (durch Citratmoleküle) sind stabil gegen Änderungen in der Temperatur (die Synthese erfolgt schon bei 100 °C), agglomerieren jedoch sofort und irreversibel bei Zugabe von Salzen oder Säuren. Dies leuchtet ein, wenn man sich vor Augen führt, dass die Stabilisierung darauf beruht, dass das Partikel durch die Adsorption der negativ geladenen Citratmoleküle eine geladene Oberfläche erhält, sich deshalb zwei Partikel gegenseitig abstoßen und eine Agglomeration verhindert wird. Durch Erniedrigung des pH-Wertes geht die negative Ladung verloren, die gegenseitige Abstoßung nimmt ab und durch die sterische Nähe fallen die Partikel aus. Ebenso verlieren sie ihre schützende Hülle bei Erhöhung der Ionenstärke, da die Citratmoleküle durch andere Ionen von der Oberfläche verdrängt werden, die nicht die schützende Funktion des Citrates auszuüben vermögen, und das nunmehr „nackte“ Partikel mit anderen agglomeriert.

Gibt man zu einer Lösung aus Citratpartikeln einen Tropfen 1 molarer NaCl oder HCl, so verfärbt sich die Lösung erst lila, dann blau und nach einigen Minuten oder nach Schütteln verliert sie jegliche Färbung und ein Bodensatz bildet sich, bei dem es sich um die vollständig agglomerierten Partikel handelt.

Bei Nanopartikeln, die durch wasserlösliche Thiole stabilisiert sind, ist das Verhalten umgekehrt. Sie sind empfindlich gegenüber hohen Temperaturen, da hierbei die Bindungen des Thiols über den Schwefel zum Partikel brechen können und sich das Molekül vom Metallkern trennt. Eine große Stabilität zeigt sich jedoch gegenüber Änderungen der Ionenstärke. So vermögen andere Ionen nicht, die MSA-Moleküle von der Oberfläche des Nanopartikels zu verdrängen, und selbst in 1 molarer NaCl bleiben die Partikel über einen langen Zeitraum stabil. Handelt es sich bei den Thiolen um Carbonsäuren, so führt eine Erniedrigung des pH-Wertes zu einer Protonierung der Carboxylatgruppen und zu einem Ausfallen der Partikel. Sie agglomerieren jedoch nicht wie Citratpartikel sondern werden lediglich unlöslich. Dementsprechend ist dieser Prozess umkehrbar, und bei Zugabe einer Base löst sich der Niederschlag wieder auf. Auch bestimmte Metallkationen wie Kupfer

vermögen die Partikel zum Ausfallen zu bringen. Sie bilden stabile Komplexe mit den Carboxylatgruppen und vernetzen auf diese Weise viele Nanopartikel miteinander, was ebenfalls zur Unlöslichkeit führt. Durch Zugabe starker Komplexbildner, wie EDTA, kann dieser Prozess teilweise wieder rückgängig gemacht werden. War die Vernetzung zu stark, sind die EDTA-Moleküle aufgrund der sterischen Hinderung nicht mehr in der Lage, die komplexierten Kupferionen zu erreichen, und eine Wiederauflösung des Niederschlages kann nicht mehr erfolgen.

Durch den Austausch der Citratmoleküle durch Thiole kann eine Stabilisierung erreicht werden. Hierzu wurde jeweils 1 mL der drei Goldnanopartikelstandards mit 50 μL Dihydroliponsäure versetzt und nach 30 min wurden 250 μL 1 molare NaOH zugegeben.

Tab. 16 Zusammenfassung der Austauschexperimente zwischen den Goldnanopartikelstandards und Dihydroliponsäure (DHHLA)

Zugabe	5 nm Standard	10 nm Standard	20 nm Standard
-	rot	rot	rot
50 μL DHHLA	gelbe Lösung mit schwach dunklem Niederschlag	farblose Lösung mit blauschwarzem Niederschlag	unverändert
250 μL 1 m NaOH	braunrot	rot-pink	schwach rotblau

In Tab. 16 sind die Ergebnisse zusammengefasst, und man erkennt, dass beim größten Standard in den 30 min kein ausreichender Austausch stattgefunden hat, da nach Zugabe der NaOH die Lösung agglomerierte. Beide anderen Standards tauschten aus, da sich nach Zugabe von DHHLA ein Niederschlag bildete, der sich in basischer Lösung wieder auflöste. Der 10 nm Standard erhielt einen leichten Pinkton, was auf einen gewissen Anteil an Agglomeration hindeutet. Hier bildeten sich während des Austausches größere Partikel (durch Agglomeration einzelner weniger Partikel), die für den pinken Farbton verantwortlich sind. Beim kleinsten Partikel deutete nichts auf Agglomeration während des Austauschvorgangs hin.

Zusammenfassend kann man sagen, dass kleinere Partikel allgemein besser einen Ligandenaustausch eingehen als größere. Die Geschwindigkeit bei weniger auszutauschenden Molekülen ist größer und die Wahrscheinlichkeit einer zwischenzeitlichen Agglomeration der Partikel somit niedriger. Die erlangte Stabilität gegenüber Zugabe von Base (Erhöhung der Ionenstärke) beweist den erfolgten Austausch innerhalb von 30 min. Dieses Ergebnis ist eine Grundvoraussetzung für die Verwendung von Thiolverbindungen zur stabilen Anbindung an Nanopartikel durch Ligandenaustausch.

4.2 Charakterisierung der Nanopartikel

4.2.1 HPLC-Trennung von Nanopartikeln

Der wohl wichtigste Parameter bei der Charakterisierung von Nanopartikeln ist deren Größe, vorzugsweise angegeben als Partikeldurchmesser. Letztendlich ist es nämlich die Größe, bzw. die Kleinheit, die für den Namen dieser Verbindungsklasse verantwortlich ist: Nano.

Ein zweiter sehr entscheidender Parameter für die Beurteilung der späteren Verwendung ist die das Partikel umgebende und stabilisierende Ligandensphäre, da sie das chemische Verhalten der Partikel bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf eine Charakterisierung der Oberfläche verzichtet, da nur Proben bekannter und homogener Oberfläche verwendet wurden. Die Homogenität war durch die bei der Synthese verwendeten Substanzen vorbestimmt (Citrat bzw. Thiol als stabilisierende Liganden) und die Charakterisierung beschränkte sich auf eine Größenbestimmung. Zur Größenbestimmung werden traditionelle Verfahren wie TEM und DLS routinemäßig und erfolgreich eingesetzt. Mitunter ist der apparative Aufwand zur Untersuchung der Proben allerdings recht hoch, bzw. benötigte Geräte stehen nicht oder nur eingeschränkt zur Verfügung. Eine Alternative dazu stellt die Flüssigkeitschromatographie dar, die in fast allen Analytiklaboratorien mittlerweile zur Standardausrüstung gehört, einfach zu bedienen und vielfältig einsetzbar ist.

Die Vorteile einer HPLC-Methode:

- kurze Messdauer gegenüber den traditionellen Messverfahren
- geringer Aufwand bei der Probenvorbereitung
- Möglichkeit der Kopplung mit verschiedenen Detektoren und dadurch ein größerer Informationsgewinn
- echte Auftrennung verschiedener Nanopartikel und die Möglichkeit der Fraktionierung mit Hilfe einer semipräparativen Säule

Durch die Kopplung der Trennsäule an verschiedene Detektoren, können zusätzliche Informationen über optische (UV-Detektor), molekulare (ESI-MS) oder elementare (ICP-MS) Eigenschaften der Cluster erhalten werden.

Da bei den Analysen primär die Größe der Partikel bestimmt werden soll, wurden größendispergierende Säulen, also „size exclusion“ Säulen, verwendet. Ihr Trennprinzip beruht auf dem Ausschluss größerer Partikel von den Poren des Säulenmaterials und eine damit verbundene schnellere Elution gegenüber kleineren Partikeln, die durch das Eindringen in die Poren eine längere Verweilzeit in der Säule besitzen. Details über dieses Trennverfahren sind in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Eine Besonderheit bei der hier verwendeten Analysenmethode ist die Verwendung von SDS im Eluenten. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches in diesem speziellen Fall die Aufgabe hat, die ebenfalls negativ geladenen Nanopartikel von einer irreversiblen Adsorption am Säulenmaterial zu hindern. Wei et al. beschrieben zuerst die Notwendigkeit dieses Zusatzes und zeigten, dass eine Mindestkonzentration SDS (abhängig vom Säulenmaterial) notwendig ist, um die Nanopartikel vollständig zu eluieren^[76].

Die Verwendung von SDS hat für die Detektion der Cluster allerdings entscheidende Nachteile:

- bei der Detektion im UV-Detektor bilden sich in der Messzelle leicht Bläschen, die die Messung der Transmission empfindlich stören
- Signale im ESI-MS werden durch den hohen ionischen Matrixgehalt vollständig unterdrückt
- durch Ablagerungen auf den Konen ist ein häufiges Reinigen des Interfacebereiches des ICP-MS notwendig
- die Detektion von Schwefel in den Partikeln ist unmöglich

4.2.1.1 Nicht-kovalent stabilisierte Nanopartikel

Historisch betrachtet sind citratstabilisierte Goldnanopartikel die ersten ihrer Art und waren lange Zeit auch die einzigen. Ihre Synthese ist gut untersucht und Größenstandards sind kommerziell erhältlich. Da die vor Agglomeration schützende Citrathülle nur über ionische Wechselwirkungen mit der Goldoberfläche des Partikels verbunden ist, spricht man hier von nicht-kovalent stabilisierten Goldnanopartikeln.

Ziel war es, drei Standardlösungen mit unterschiedlichen vom Hersteller angegebenen Partikelgrößen voneinander zu trennen und durch die Erstellung einer Kalibrationsgeraden selbst hergestellte Nanopartikel hinsichtlich ihrer Größe zu bestimmen. Hierzu wurden die Lösungen in einer Pufferlösung verdünnt und über eine Probenschleife durch ein Injektionsventil auf die Säule gebracht. Das im Eluenten befindliche SDS wechselwirkt mit dem Säulenmaterial, dessen Oberfläche auf diese Weise negativ geladen wird und die gleichsinnig geladenen citratstabilisierten Goldpartikel können nicht mehr an der Oberfläche adsorbieren. Der Trennmechanismus ist demnach auch bei den verwendeten C18-Säulen größendispergierend, da Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial ausgeschlossen werden können.

In Abb. 46 ist die Trennung der drei Standardlösungen mit Partikeldurchmessern von 5 nm, 10 nm und 20 nm zu sehen. Die drei Signale sind nicht grundliniengetrennt, da einerseits die Partikel eine gewisse Größenverteilung aufweisen und die Trennleistung der Säule begrenzt ist. Allerdings sind die drei Maxima deutlich zu erkennen, und eine entsprechende Kalibrationsgerade konnte erstellt werden (siehe Abb. 47). Hierzu wurde auf der Ordinate der Partikeldurchmesser logarithmisch gegen die Retentionszeit aufgetragen und durch lineare Regression konnte eine Kalibriergerade erstellt werden.

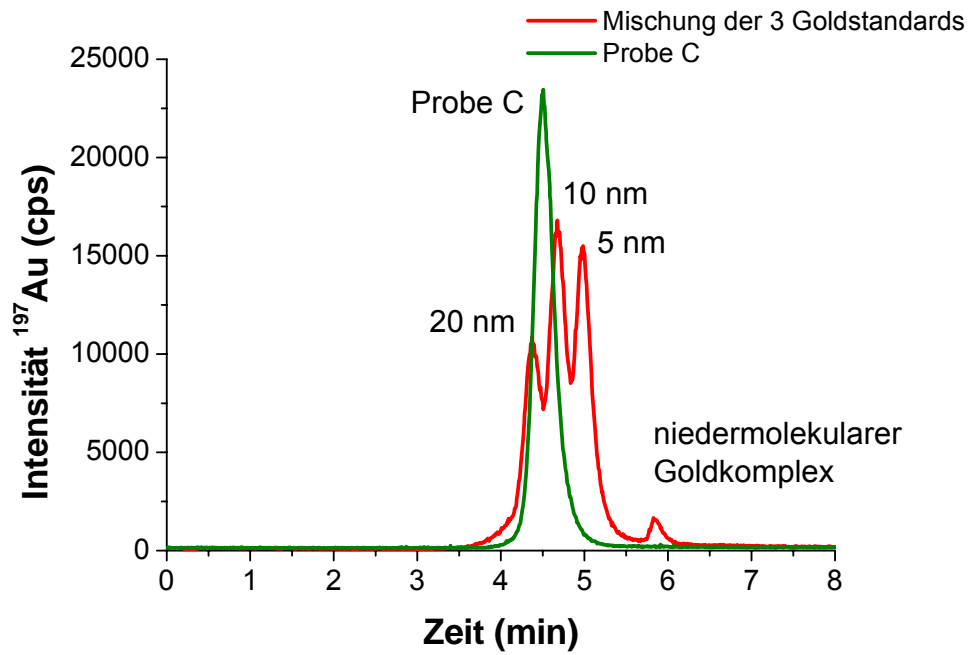


Abb. 46 Chromatogramm der drei Goldstandards und der Probe C, Säule: Nucleosil C18-1000

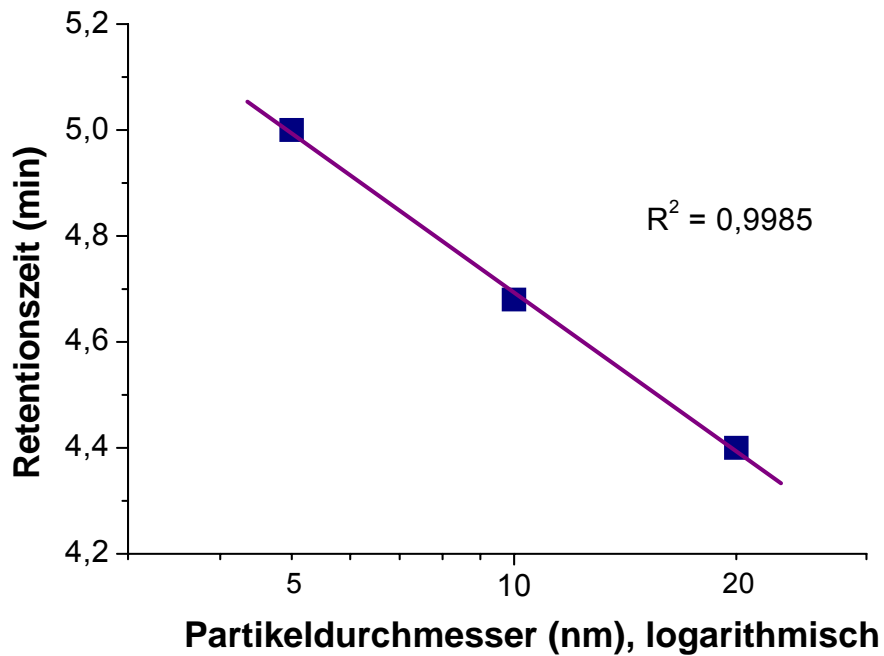


Abb. 47 Lineare Regression der Retentionszeit gegen den logarithmischen Partikeldurchmesser

Die Elutionszeiten der Größenstandards waren auf Tagesbasis mit einer relativen Standardabweichung der Retentionszeiten von RSD <2 % stabil (Daten hier nicht gezeigt). Über Wochen und Monate betrachtet verkürzten sich die Elutionszeiten der Analyten jedoch, was auf ein sukzessives irreversibles Abscheiden von Partikeln auf dem Säulenmaterial und eine damit einhergehende Verstopfung der Poren hindeutet. Aufgrund der gegebenen Kurzzeitstabilität der Retentionszeiten kann man mit dieser Chromatographie die Reproduzierbarkeit bezüglich der resultierenden Partikelgröße bei gleichen Syntheseansätzen überprüfen. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze jeweils drei Mal unter gleichen Bedingungen synthetisiert und danach chromatographisch untersucht. Abb. 48 zeigt die Probenserie A-C und D-F im Vergleich zu den Standards mit 5 nm und 20 nm Durchmesser (Synthese der Proben A-F siehe Kapitel 3.2.1, Tab. 1).

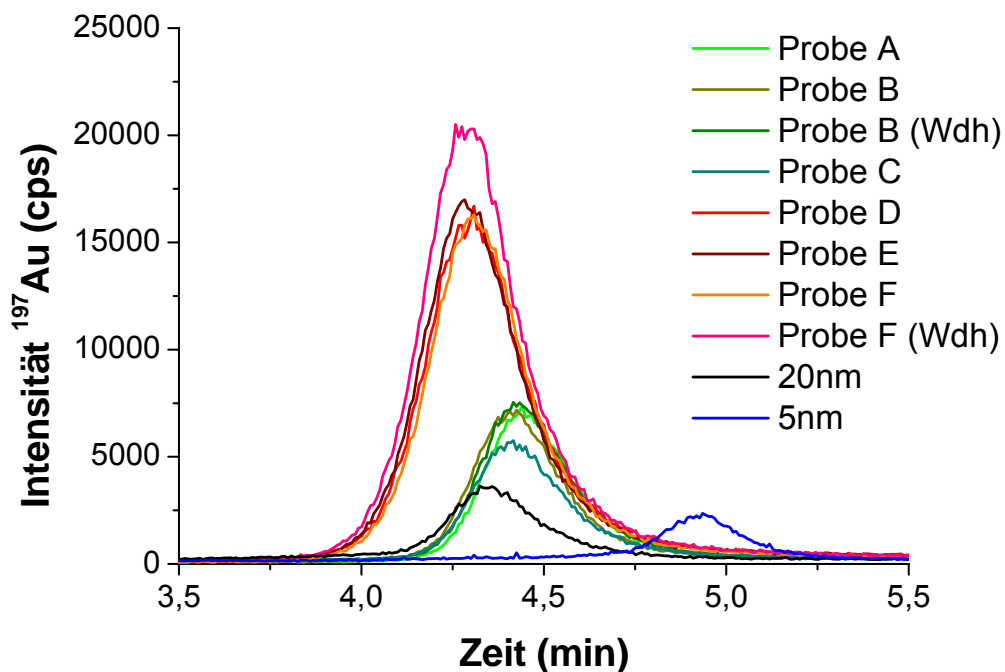


Abb. 48 Chromatogramm von jeweils drei Proben des gleichen Ansatzes zum Vergleich der Reproduzierbarkeit der Partikelgrößen bei der Synthese von Citrat-Goldnanopartikeln

Tab. 17 Retentionszeiten der Analyse der einzelnen Syntheseansätze A-F mittels SEC-Chromatographie. Ermittlung der Durchmesser mit Hilfe einer Kalibration mit drei Größenstandards.

Probe	Retentionszeit [min]	Durchmesser [nm]	RSD
A	4,44	15,9	16,6 ± 0,6 nm (± 3,3 %)
B	4,41	17,0	
B (Wdh.)	4,43	16,3	
C	4,41	17,0	
D	4,31	21,3	21,7 ± 0,5 nm (± 2,2 %)
E	4,30	21,8	
F	4,31	21,3	
F (Wdh.)	4,29	22,3	

Es ist bekannt, dass die Größenausschlusschromatographie keine gute Auflösung bezüglich ähnlich großer Moleküle hat. Dies ist ein Nachteil, der bei der Analyse von Nanopartikeln allerdings nur eine untergeordnete Rolle spielt. Der Effekt ist in Abb. 49 deutlich erkennbar, und es ist keine Unterscheidung zwischen den zwei Proben möglich, da die Signale so dicht zusammen liegen, dass sie sich in der Form überlappen und als ein einzelnes Signal im Chromatogramm erscheinen. Betrachtet man nun aber einen typischen Syntheseansatz, dann wird es nicht vorkommen, dass das Produkt eine bimodale Größenverteilung aufweist, bei der die zwei Modi sehr nahe beieinander liegende Maxima aufweisen. Bi- oder polymodale Verteilungen können bei der Synthese natürlich vorkommen, aber dann liegen die einzelnen durchschnittlichen Durchmesser weiter auseinander als in folgendem Beispiel.

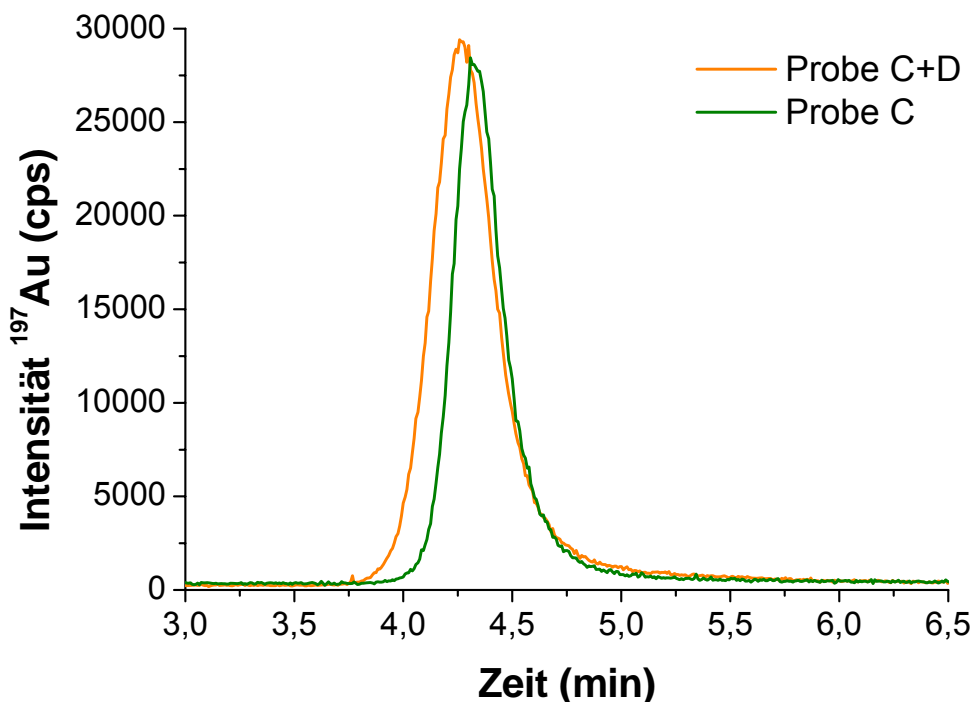


Abb. 49 Vergleich der Proben C (17nm) und D (21nm)

4.2.1.1.1 Reduktion durch den Eluenten

Bei der chromatographischen Trennung von citratstabilisierten Nanopartikeln müssen einige Aspekte bezüglich des verwendeten Eluenten beachtet werden. Die Probe kann durch Substanzen im Eluenten chemisch verändert werden, und das Elutionsverhalten kann hinsichtlich der Retentionszeiten und Vollständigkeit der Elution der Probe beeinflusst werden.

Bei der Analyse von Goldnanopartikeln muss natürlich in Betracht gezogen werden, dass neben dem Cluster, als Nebenprodukt der Synthese oder Degradationsprodukt des Clusters, komplexiertes Gold in der Probe vorliegt. Zur Bestimmung der Retentionszeit wurde nun eine Au^{3+} -Standardlösung im zur chromatographischen Trennung verwendeten Eluenten verdünnt. Dieser bestand aus 5 mmolL^{-1} Citrat und 15 mmolL^{-1} SDS bei einem pH von 6. Um zu sehen, ob andere Metalle die gleichen Retentionszeiten aufweisen, wurden der Lösung noch Kupfer und Blei zugegeben, so dass alle Metalle in einer Konzentration von 1 mg/kg vorlagen. In Abb. 50 kann man

nun den zeitlichen Verlauf der Veränderung der Probe durch wiederholte aufeinander folgende Analyse derselben verfolgen. Schon bei der ersten Messung der Probe, etwa 10 min nach deren Präparation, sind mehrere Signale zu erkennen. Signal (A) mit der längsten Retentionszeit von 10,3 min ist der kleinsten Spezies in der Probe zuzuordnen und diese stellt das komplexierte Metall dar. Auch die anderen Metalle eluierten zur gleichen Zeit (Pb nicht gezeigt, Cu siehe Abb. 51). Das zweite Signal (B) mit einer Retentionszeit von 8,9 min ist schon bei der ersten Messung vorhanden und nimmt ebenso wie Signal (A) von Messung zu Messung kontinuierlich ab. Signal (C) ist ab der dritten Messung deutlich zu sehen und wächst in dem Maße wie die anderen Signale kleiner werden.

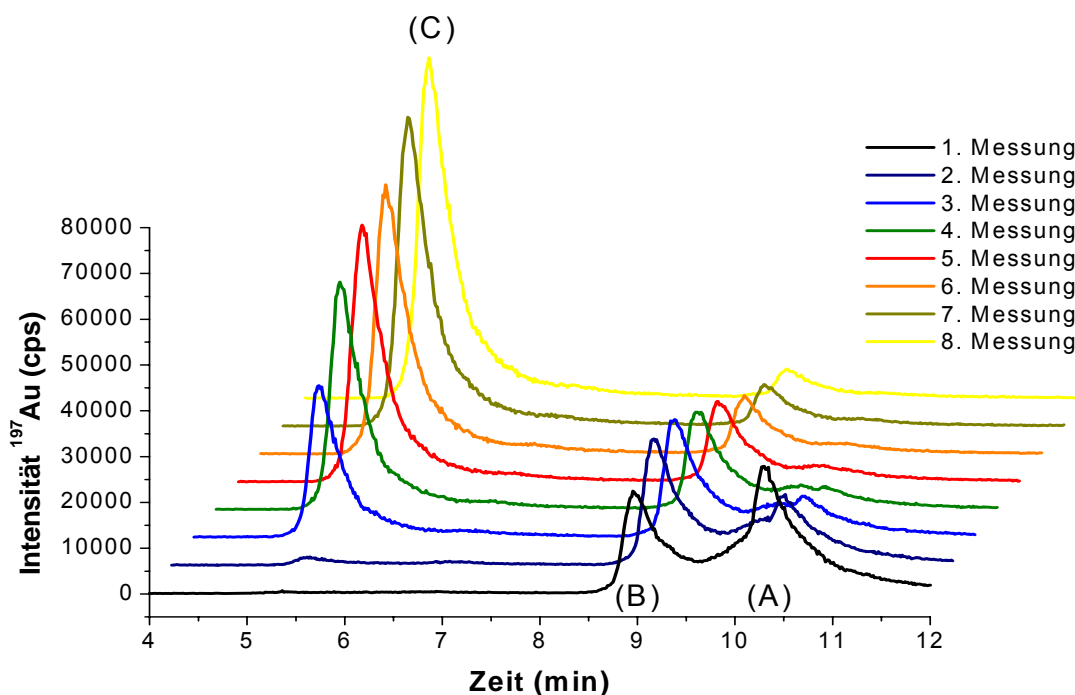


Abb. 50 pseudo-3D-Darstellung der Messungen des Au-Standards

Am Beispiel von Kupfer kann man in Abb. 51 sehen, dass dieses keiner Reaktion unterworfen ist und die Signale bei allen acht Messungen reproduzierbar sind. Abb. 52 stellt die Signalflächen integriert über alle auftretenden Peaks dar. Der auffallend niedrigere Wert der ersten Analyse ist darauf zurückzuführen, dass die Poren der Säule und das Säulenmaterial in gewisser Weise mit dem Anteil an kleinen Komplexen gesättigt werden, die nicht wieder bzw. nur nach langen Spülvorgängen

von ihr eluiert werden können. Diese Adsorptionseffekte sind jedes Mal zu beobachten, wenn eine gespülte Säule frisch benutzt wurde.

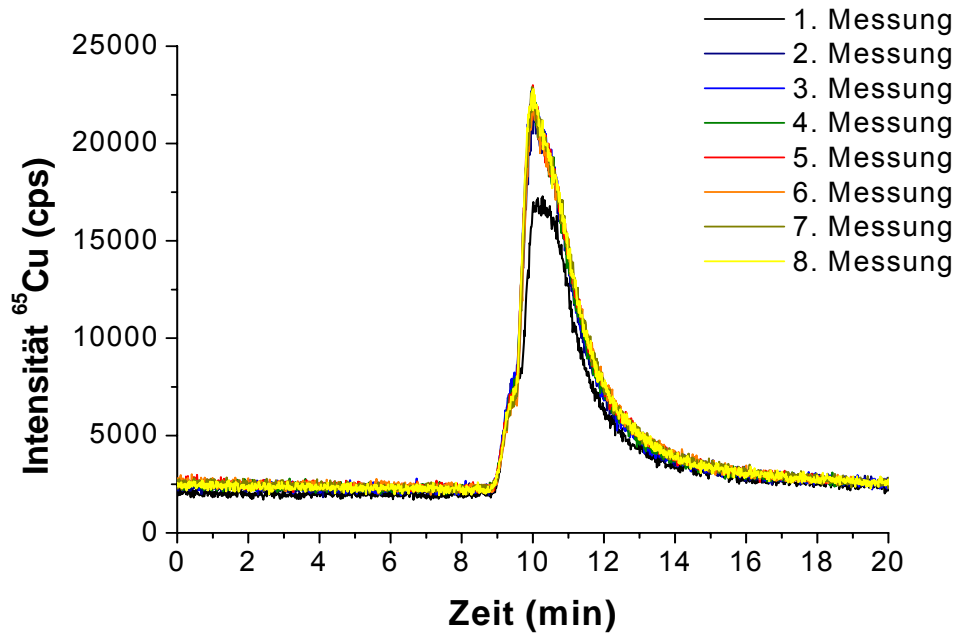


Abb. 51 Nacheinander wiederholte Analysen einer 1 mgL^{-1} Cu-Standard-Lösung, angesetzt in Citratpuffer

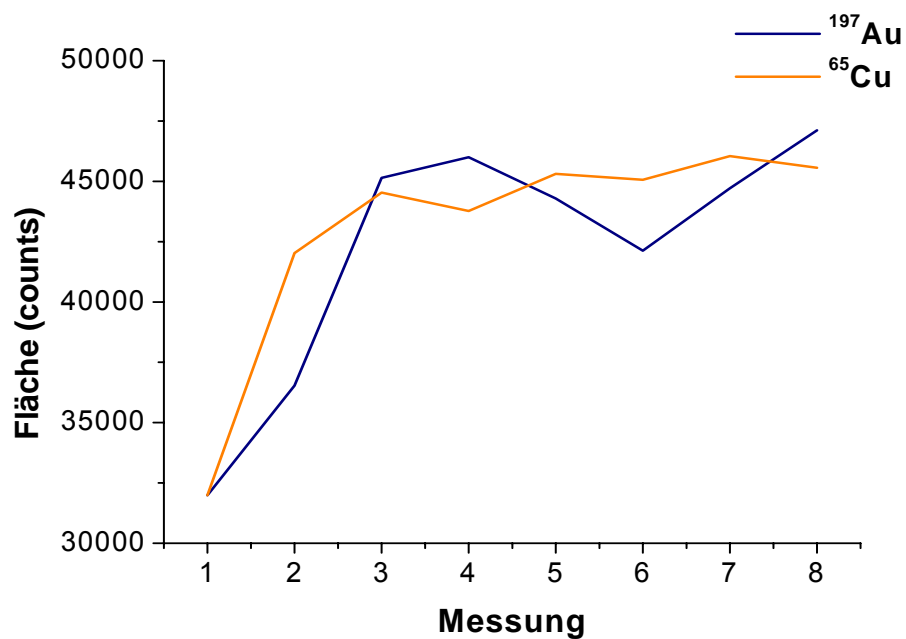


Abb. 52 Vergleich der Peakflächen über alle Signale einer Analyse

Zur Erklärung der Beobachtungen ist zu bedenken, dass Au^{3+} im Gegensatz zu Cu^{2+} und Pb^{2+} ein starkes Oxidationsmittel darstellt und dementsprechend Kupfer und Blei mit dem Puffer des Eluenten einfache Komplexe bilden, Gold jedoch in der Lage ist, wie schon in 3.2.1 beschrieben, Citrat zu oxidieren, polymere Strukturen auszubilden und durch weitere Reduktion größere Cluster zu bilden.

Fraktion (C) wird kaum retardiert und eluiert kurz nach der Totzeit der Säule. Das bedeutet, dass das Signal einem relativ großen Partikel (wie später noch gezeigt wird, ist die Ausschlussgrenze >25 nm) entspricht. Es ist auch nachzuvollziehen, dass unter den gegebenen Reaktionsbedingungen große Partikel entstehen, denn durch die niedrige Temperatur (20 °C) ist die Reduktionsgeschwindigkeit der Citronensäure zur Acetondicarbonsäure recht langsam und somit bildet sich auch das für die Nukleation verantwortliche Oligomer mit Au^+ nur langsam. Durch die daraus resultierende niedrige Anzahl an Nukleationskeimen werden die daraus wachsenden Partikel sehr groß, was die frühe Elution der Fraktion erklärt.

Während der ersten beiden Messungen sind noch keine großen Partikel zu beobachten, was mit der am Beginn des Partikelwachstums stehenden notwendigen Ausbildung des Oligomers in Einklang steht. Es kann spekuliert werden, dass das Signal (B) einem solchen Oligomer zugeordnet werden kann, was konkordant zur beobachteten Retentionszeit von $8,9$ min und der zu erwartenden Größe des Oligomers ist.

Das im vorangegangenen dargestellte Phänomen zeigt einerseits, dass die Wahl der zur Herstellung des Puffers verwendeten Substanzen auf die zu analysierende Probe anzupassen ist, da es sonst zu Veränderungen derselben kommen kann. Das starke Oxidationsmittel Au^{3+} oxidierte analog der Synthese nach Turkevich das in der Lösung als Puffer verwendete Citrat unter Bildung von Clustern. Da die Reaktion nicht wie bei der Synthese bei 100 °C sondern bei Raumtemperatur stattfand, bildeten sich auf Grund der niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit große Partikel. Hier konnte also die Synthese von citratstabilisierten Goldnanopartikeln quasi im Zeitraffer mittels der Größenausschlusschromatographie beobachtet werden.

4.2.1.2 Kovalent stabilisierte Nanopartikel

Im Unterschied zu den nicht-kovalent stabilisierten Nanopartikeln, bei denen die Bindung zwischen Metallkern und Ligandensphäre aus ionischen oder van-der-Waals-Wechselwirkungen besteht, besitzen solche Partikel, bei denen diese Bindung kovalenter Natur ist, in erster Linie eine größere chemische Stabilität. Durch einen anderen Reaktionsmechanismus ist der resultierende Durchmesser solcher Partikel im Allgemeinen auch kleiner als z. B. bei citratstabilisierten Nanopartikeln. Es gibt leider (noch) keine kommerziell erhältlichen Standards mit einer zertifizierten Größenangabe, weshalb als Vergleichsstandards die schon im vorigen Kapitel beschriebenen citratstabilisierten Goldnanopartikel benutzt werden. Eine Größenbestimmung durch Vergleich der Retentionszeiten ist prinzipiell möglich, da der Trennmechanismus primär von dem Durchmesser des Partikels abhängig ist und chemische Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial durch Verwendung von SDS im Eluenten weitgehend unterdrückt werden.

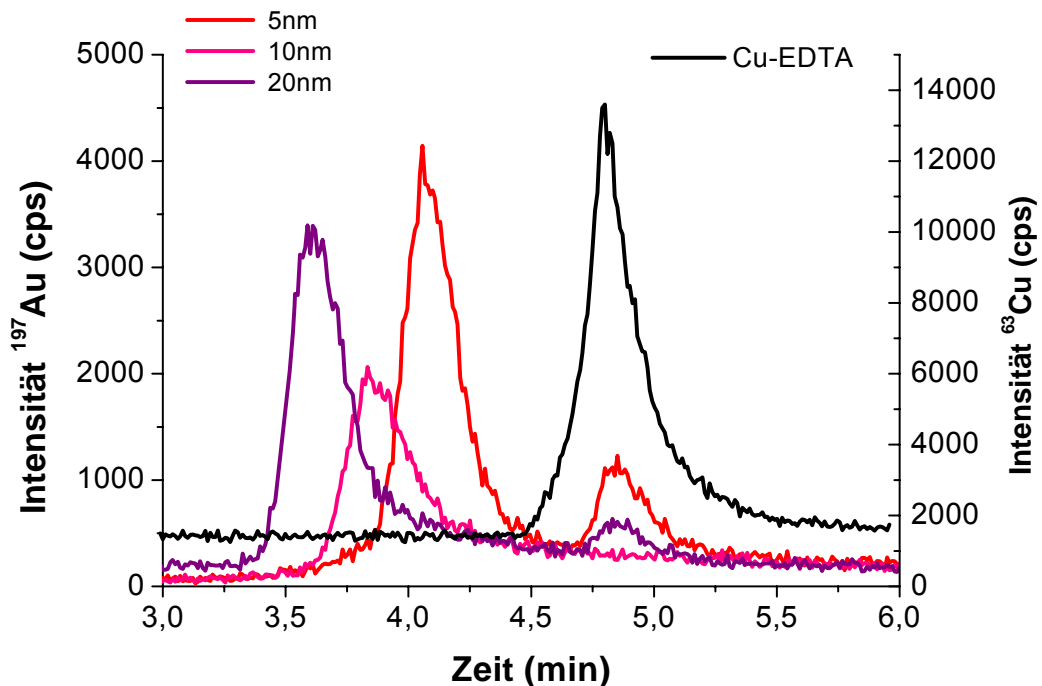


Abb. 53 Chromatogramme verschiedener Größenstandards.

In Abb. 53 ist ein Chromatogramm dargestellt, welches die Retentionszeiten der drei Größenstandards (20 nm, 10 nm und 5 nm) und die eines niedermolekularen Komplexes (Cu-EDTA) zeigt. In Abb. 54 sind nun Chromatogramme unterschiedlicher Syntheseansätze von MSA-stabilisierten Silbernanopartikeln zu sehen (Synthese vgl. Tab. 3).

Aus den Messungen geht hervor, dass die Unterschiede bezüglich der durchschnittlichen Größe der Partikel (repräsentiert durch das Maximum der Signale) nur minimal variieren. Allgemein ist festzustellen, dass die Durchmesser zwischen dem des 5 nm Standards und des Cu-EDTA-Komplexes liegen. In Bezug auf die Breite des Signals, welche im Zusammenhang mit der Größenverteilung der Probe steht, ist jedoch eine Differenzierung der einzelnen Analysenansätze möglich.

In der Reihenfolge der Verkleinerung des Verhältnisses MSA zu Silber (P17 mit 10:1, P18 3:1, P19 1:1 und P20 1:2) werden die Größenverteilungen der Proben ausgeprägter, und das Maximum des Signals verschiebt sich tendenziell zu niedrigeren Retentionszeiten, was einem größeren Durchmesser entspricht.

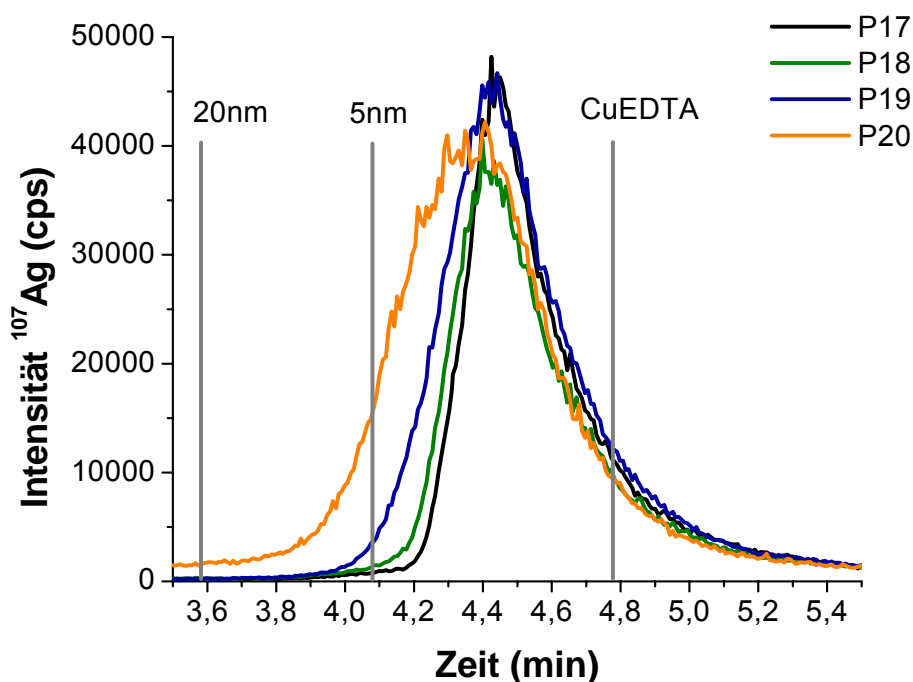


Abb. 54 Chromatogramme von Ag-MSA-Partikeln aus verschiedenen Syntheseansätzen.

Die Größenausschlusschromatographie ist für die Analyse von Nanopartikeln im Größenbereich unter 5 nm nur bedingt geeignet, da geringe Unterschiede in der Größe nicht mehr aufgelöst werden können und nur eine qualitative Aussage über die Breite der Größenverteilung gemacht werden kann. Eine Verbesserung der Auflösung könnte z. B. durch Verwendung einer Säule mit kleinerer Porengröße erzielt werden, was im folgenden Kapitel diskutiert wird.

4.2.1.3 Vergleich verschiedener Säulen

Um eine Verbesserung der Auflösung der zu trennenden Nanopartikel zu erreichen, gibt es prinzipiell die Möglichkeit, eine Säule mit kleinerem Porendurchmesser zu benutzen. Ein kleinerer Porendurchmesser führt zu einem vollständigen Größenausschluss schon bei kleinerem Partikeldurchmesser und (theoretisch) zu einer Verbesserung der Auflösung im unteren Größenbereich.

Der 20 nm Größenstandard eluiert zur Totzeit der Säule, da der hydrodynamische Radius (Goldkern plus Citrathülle plus Hydrathülle) in etwa dem Porengröße von 300 Å entspricht, und der Partikel somit nicht in die Poren eindringen kann.

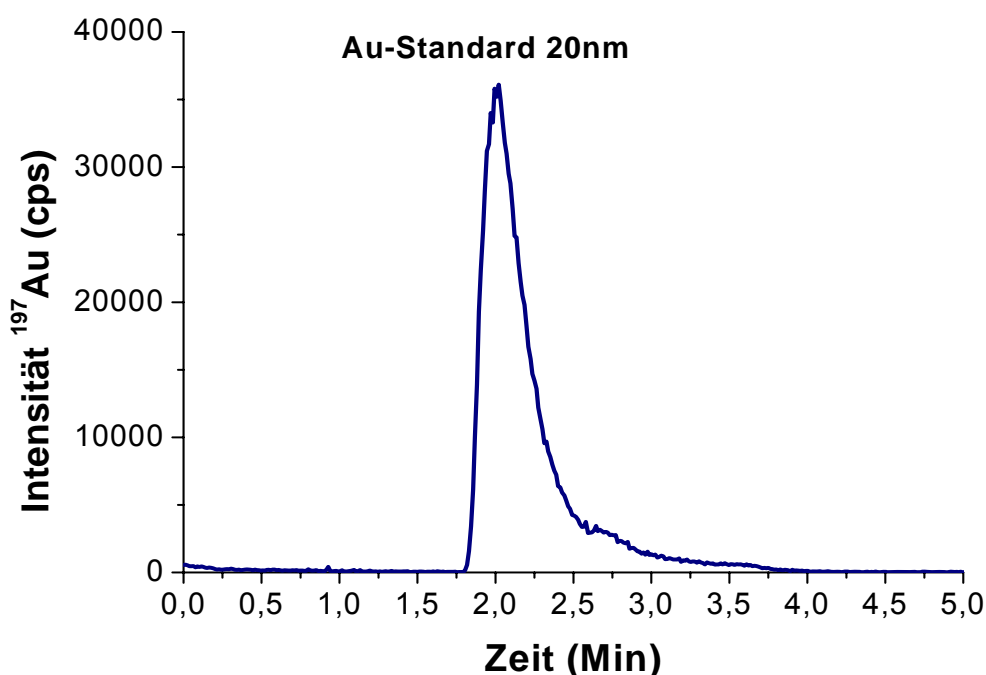


Abb. 55 Chromatogramm des 20 nm Goldpartikelstandards auf einer C18-Säule mit 300 Å Porendurchmesser.

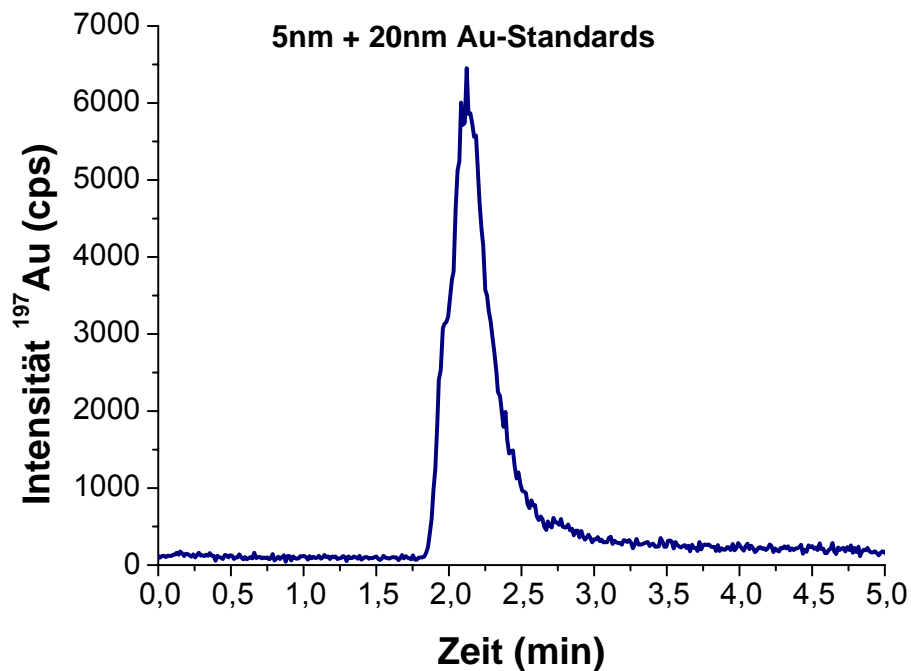


Abb. 56 Chromatogramm einer Mischung des 20 nm und des 5 nm Goldstandards auf einer C18 Säule mit 300 Å Porendurchmesser.

Eine Mischung aus dem 20 nm und dem 5 nm Standard kann im Gegensatz zur 1000 Å-Säule auf der 300 Å-Säule nicht getrennt werden. Die Retentionszeiten unterscheiden sich mit 2,11 min für den 5 nm Standard zum 20 nm Standard mit 2,01 min nur unwesentlich, was zu einer Überlappung beider Signale führt (siehe Abb. 56).

Auch im Größenbereich unter 5 nm kann keine Verbesserung der Auflösung durch Benutzung der 300 Å-Säule erreicht werden, was in Abb. 57 deutlich wird. Die Retentionszeit unterscheidet sich mit 2,36 min zwar von der der beiden Standards, allerdings liegen die drei Signale viel enger zusammen als bei der 1000 Å-Säule. Von weiteren Untersuchungen bezüglich der Trennleistung wurde aufgrund dieser Ergebnisse abgesehen.

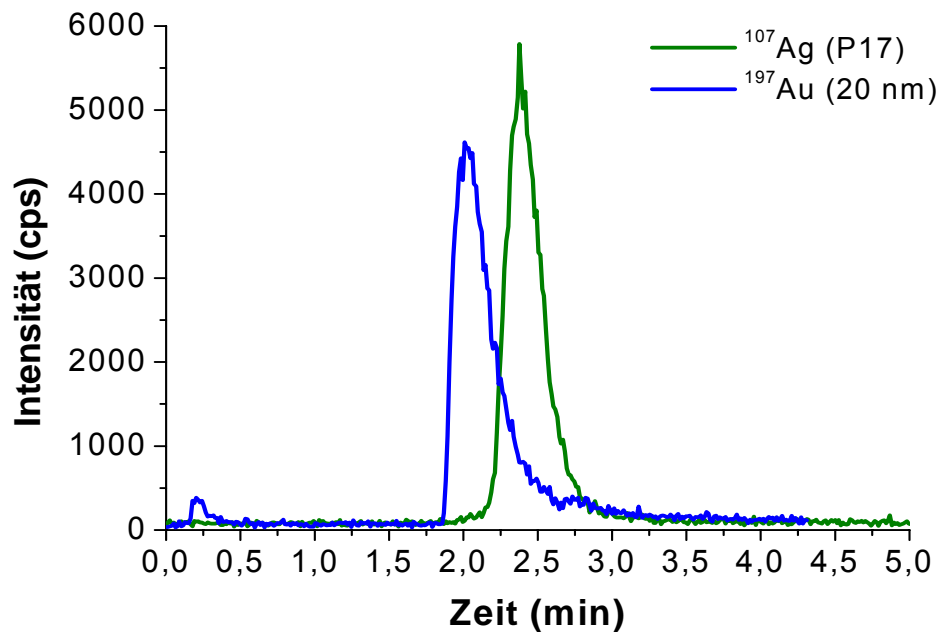


Abb. 57 Chromatogramme des 20 nm Goldstandards und des Ag-MSA Partikels P17 auf einer C18 Säule mit 300 Å Porendurchmesser.

4.2.2 GE-Trennung von Nanopartikeln

Wie im vorigen Kapitel gezeigt wurde, ist zur Charakterisierung von Nanopartikel die Größenausschlusschromatographie zwar geeignet, allerdings ist ihr Auflösungsvermögen beschränkt und die Möglichkeiten zur Variation der Analyse sind ebenfalls limitiert. Im Gegensatz dazu besitzt die Gelelektrophorese eine Fülle an Parametern, die zur Optimierung einer Analyse verändert werden können. Unter anderem ist das:

- das Gelmaterial selbst (unterschiedliche Agarosen, Polyacrylamid)
- die Dimensionen des Gels (Länge, Durchmesser)
- der Elektrolyt (Pufferzusammensetzung)
- die angelegte Spannung

Die Gelelektrophorese sollte daher im Stande sein, durch geeignete Variation der Trennbedingungen, detailliertere und genauere Resultate zur Charakterisierung von Nanopartikeln zu liefern.

4.2.2.1 Vergleich von nicht-kovalent und kovalent stabilisierten Nanopartikeln

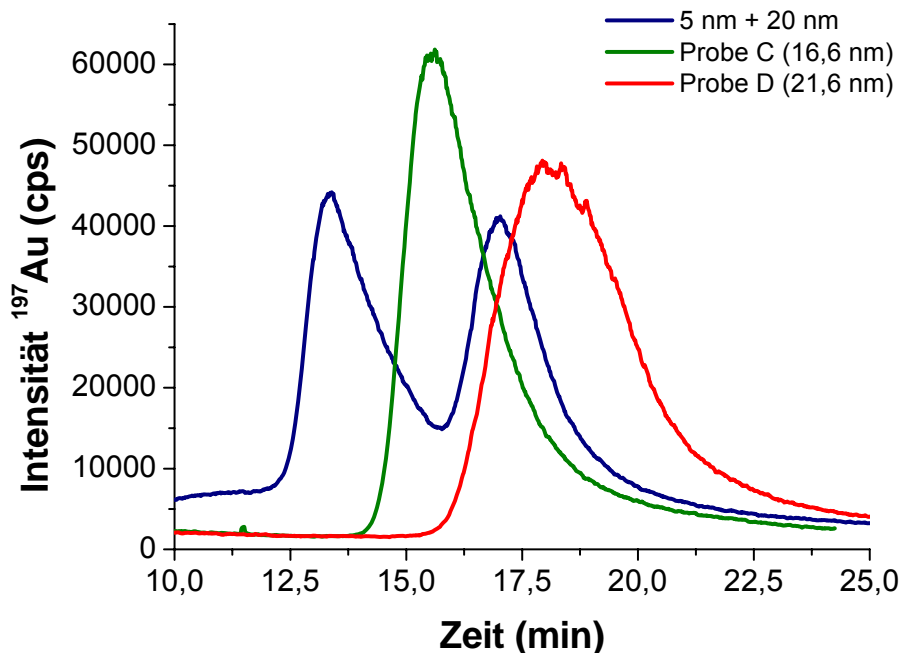


Abb. 58 Elektropherogramm nicht-kovalent stabilisierter Nanopartikel;
Gel: 2 % Agarose, Länge: 30 mm, Spannung: 400 V,
Puffer: 10 mmolL^{-1} SDS, 2 mmolL^{-1} Hydrogenphosphat

In Abb. 58 sind Elektropherogramme zweier Standardlösungen (5 nm und 20 nm Durchmesser) und zweier synthetisierter Citratnanopartikel vergleichend dargestellt. Die Elutionsreihenfolge ist hier umgekehrter im Vergleich zur Größenausschlusschromatographie, da der Trennmechanismus ein anderer ist. Aufgrund des angelegten elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Partikel durch das poröse Agarosegel in Richtung Anode. Je kleiner die Partikel sind, desto weniger werden sie durch die Struktur des Gels in ihrer Bewegung gebremst und gelangen demnach schneller an das Ende des Gels, wo sie eluiert werden. Die 5 nm Partikel migrieren demnach schneller als die 20 nm Partikel.

Ein gewisses Tailing der Signale ist deutlich sichtbar, was unter anderem mit der Natur der Nanopartikel zusammenhängt. Ein Vergleich zwischen einem nichtkovalent stabilisierten Citratnanopartikel und einem Au-MSA-Partikel in Abb. 59 macht dies deutlich. Ein Tailing des Signals ist nur bei dem 5 nm Standard zu beobachten, wo

hingegen der Au-MSA-Partikel ein symmetrisches Signal aufweist. Eine Erklärung hierfür könnte im Verlust eines Teils der Citrathülle während der elektrophoretischen Trennung liegen. Da die Citratmoleküle nur durch elektrostatische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen an den Kern des Nanopartikels gebunden sind und diese Bindungen schwächer sind als kovalente Bindungen, könnten sie sich durch die Reibungskräfte, die bei der Wanderung im Gel entstehen, und der elektrostatischen Kräfte im Spannungsfeld lösen. Die Ladung des Partikels verringert sich und somit nimmt auch seine Wanderungsgeschwindigkeit ab. Bei den Au-MSA-Partikeln wird kein Tailing beobachtet, und da der grundlegende Unterschied zu den Citratpartikeln in der Stabilität der Schutzhülle liegt, ist dies ein Indiz dafür, dass diese teilweise bei der Wanderung im Gel verloren geht. Einen Einfluss auf die Elution durch die verwendeten Schläuche und Verbindungen konnte ausgeschlossen werden.

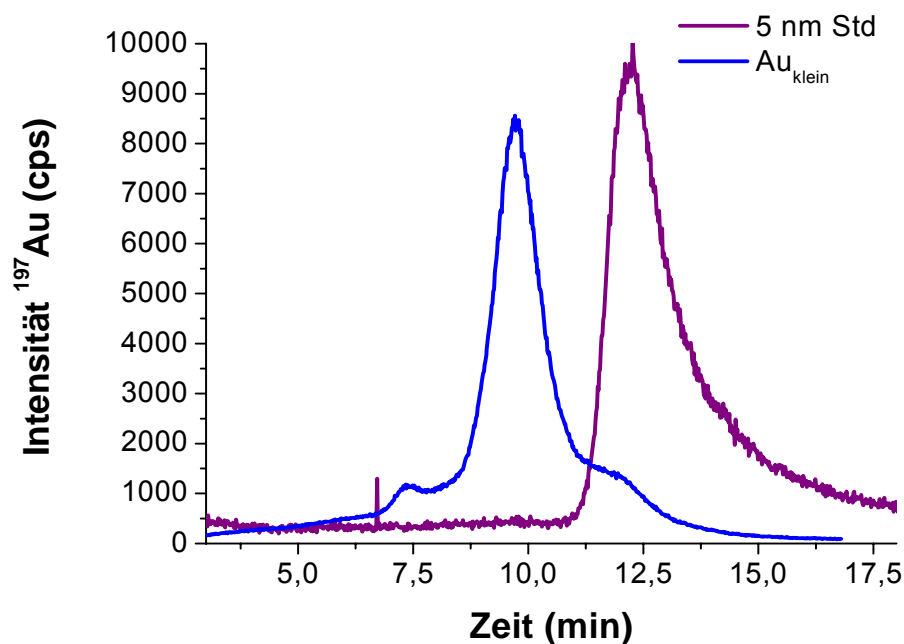


Abb. 59 Elektropherogramme des nicht kovalent stabilisierten 5 nm Standards und des Au-MSA-Nanopartikels Au_{klein} bei einer angelegten Spannung von 300 V.

4.2.2.2 Vergleich von unterschiedlichen Trennbedingungen

Von den zu Beginn des Kapitels schon erwähnten Variationsparametern bei der Gelelektrophorese sollen hier beispielhaft die angelegte Spannung, die Länge des Gels und die Gelkonzentration behandelt werden. Die Parameter Agarose und Elektrolyt werden nicht diskutiert, da sich herausstellte, dass nur eine der drei verwendeten Agarosen aufgrund ihrer homogenen Struktur nach der Gelierung für die Untersuchung von Nanopartikeln geeignet war (NuSieve) und dass es bei den Elektrolyten auch nur zwei unterschiedliche Typen gab, nämlich solche, bei denen eine Trennung nicht funktionierte und solche, bei denen sie funktionierte. Bei letzteren konnten kaum qualitative Unterschiede zwischen gleichen Experimenten mit unterschiedlichen Elektrolyten beobachtet werden.

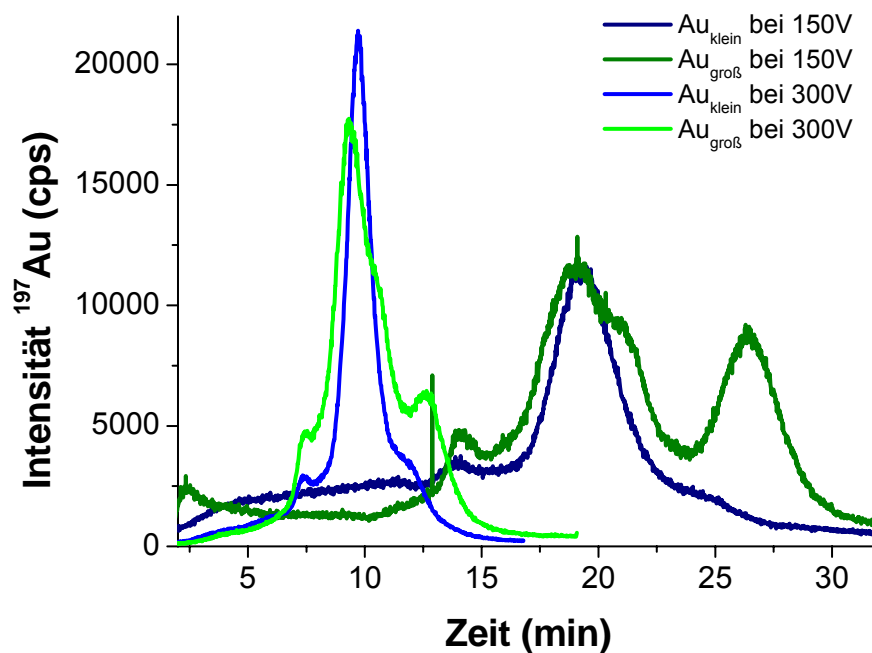


Abb. 60 Vergleich gelelektrophoretischer Trennungen von Au-MSA-Nanopartikeln bei unterschiedlichen Spannungen

Bei der Analyse der Au-MSA-Nanopartikel Au_{klein} und $Au_{\text{groß}}$ (Synthese siehe Tab. 2, Seite 57) bei unterschiedlichen Spannungen sind die qualitativen Unterschiede zwischen 150 V und 300 V angelegter Spannung nur gering (siehe Abb. 60). Die Auflösung bei den größeren Partikeln nimmt bei niedriger Spannung etwas zu, was an der besseren Abtrennung der Fraktion mit Maximum bei 27 min ($Au_{\text{groß}}$ bei 150 V) im Vergleich zu 12,5 min ($Au_{\text{groß}}$ bei 300 V) deutlich wird. Die einzelnen Fraktionen migrieren bei doppelter Spannung doppelt so schnell (ersichtlich anhand der Migrationszeiten nach Korrektur der Totzeit) und die Peakbreite verdoppelt sich ebenfalls. Eine Erhöhung der Spannung beschleunigt die Analyse, ohne Auflösung in nennenswertem Umfang einzubüßen. Deshalb wurden im Weiteren mehrheitlich Spannungen für die Analysen gewählt, die in der Nähe der für das Analysengerät zulässigen Maximalspannung lagen. Im Einzelfall wurde, wenn es notwendig erschien, die Analyse bei einer niedrigeren Spannung wiederholt, um zu sehen, ob eine Verbesserung der Auflösung zu erreichen ist.

Die Länge des Agarosegels hat einen ähnlichen Einfluss auf die Trennung, wie die angelegte Spannung: bei einer Verdopplung der Gellänge verdoppelt sich auch die Migrationszeit. Die Auflösung verbessert sich beim Wechsel von 10 mm zu 20 mm Gellänge (siehe Abb. 61), jedoch ist kein qualitativer Unterschied beim Übergang zu 40 mm zu erkennen. Die Signale werden durch die verlängerte Analysendauer zunehmend breiter und die eingesetzte Probenmenge muss entsprechend angepasst werden, um noch vernünftige auswertbare Signale zu erhalten. Dies hat seine Ursache in der längeren Verweildauer der Probe im Gel und der Aufheizung des Gels während der Analyse, was zu einer Erhöhung der Diffusion der Fraktionen und somit zu einer Verbreiterung des Signals führt. Die Migrationsreihenfolge und die relativen Intensitäten der Signale bleiben wie zu erwarten bei einer Verlängerung der Gels gleich.

Im Gegensatz dazu ändern sich die relativen Signalintensitäten bezüglich der Höhe bei Änderung der Gelkonzentration. In Abb. 62 sind die Elektropherogramme von Au_{klein} in jeweils einem 20 mm Gel mit 1,5 % und 3 % Agarose zu sehen. Die Migration der Spezies verlangsamt sich aufgrund der bei höherer Gelkonzentration nun geringeren Porengröße. Das Signal der Hauptspezies wird breit und flach, was auf eine gewisse Undurchlässigkeit des Gels für diese Spezies hindeutet. Es ist wahrscheinlich, dass die Partikel einen mit dem durchschnittlichen

Porendurchmesser vergleichbaren Durchmesser haben und aufgrund der statistischen Porengrößenverteilung stark retardiert werden und dadurch deutlich verbreitert eluieren.

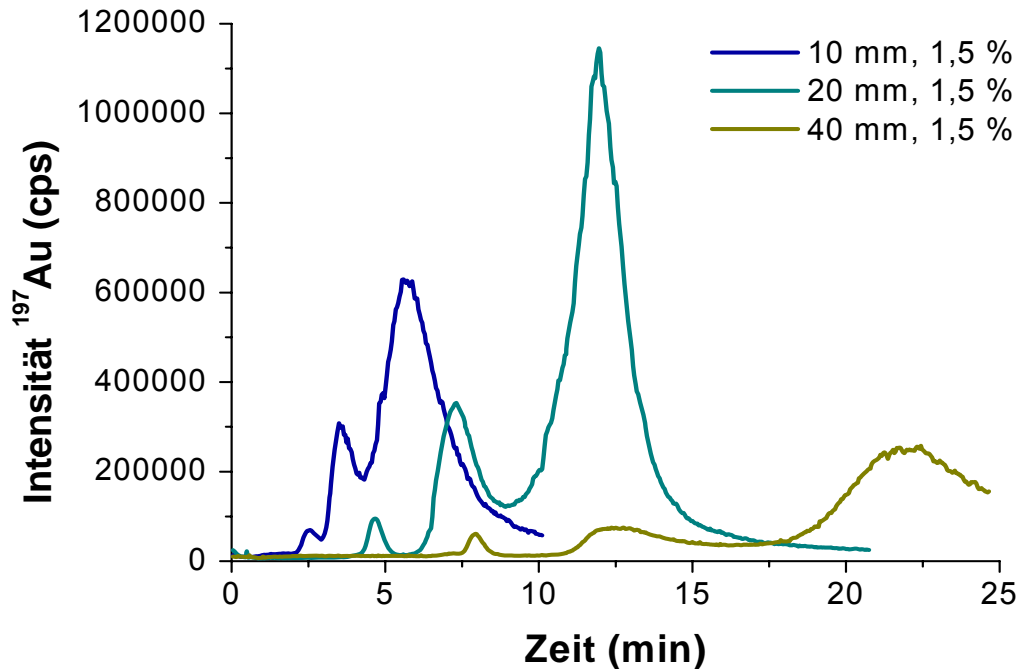


Abb. 61 Elektropherogramm von Au_{klein} bei unterschiedlicher Gellänge

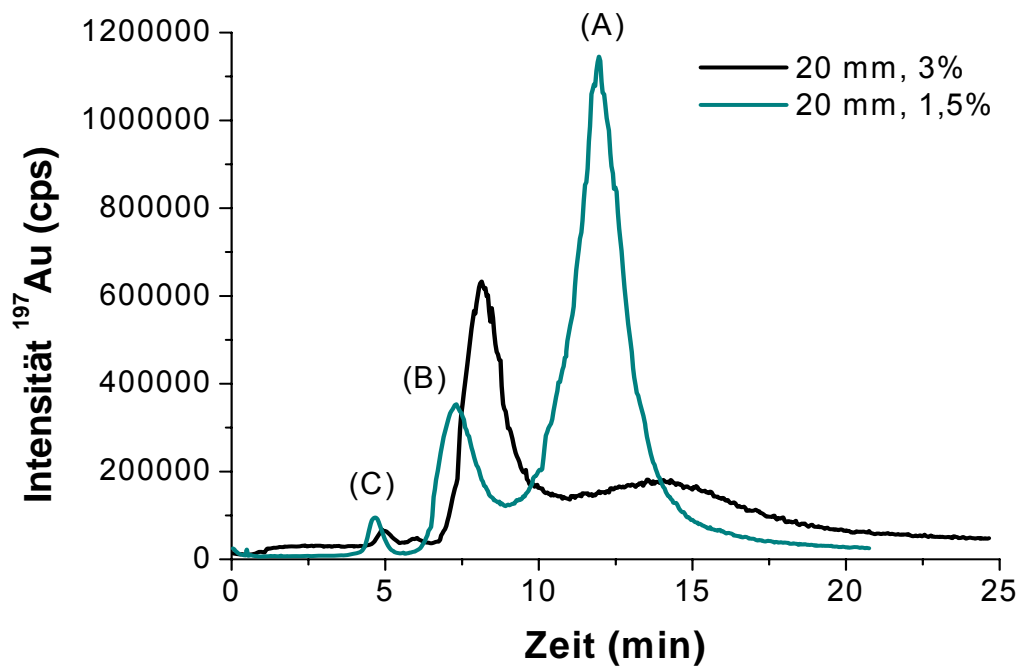


Abb. 62 Elektropherogramm von Au_{klein} bei unterschiedlicher Gelkonzentration

Die Gelkonzentration spielt also eine ganz entscheidende Rolle bezüglich des Größenbereiches der zu analysierenden Spezies. Liegen die Größen der Spezies weit auseinander, bietet sich ein Gel niedriger Konzentration an, da nur bei einem solchen die großen Cluster annähernd vollständig durch das Gel migrieren können. Um herauszufinden, ob ein Signal aus einer oder mehreren Fraktionen besteht, muss die Probe auch auf einem höherprozentigen Gel analysiert werden. Hier erreicht man teilweise hochauflösende Trennungen bei Molekülen, die sich in ihrem Molekulargewicht nur um wenige Prozent unterscheiden (Daten von Messungen von Iodspezies, hier nicht gezeigt).

Eine eindeutige Zuordnung der Signale bezüglich der Größe der Partikel ist nicht ohne weiteres möglich, da ein adäquater Vergleichsstandard fehlt. Aufgrund des Migrationsverhaltens kann Signal (C) einem niedermolekularen Au-MSA-Komplex zugeordnet werden und Signal (A) einer Nanopartikelfraktion mit einem Durchmesser kleiner 5 nm (vgl. Abb. 59). Bei Fraktion (B) handelt es sich entweder um einen mehrkernigen Au-MSA-Komplex oder eine Partikelfraktion, die einen nochmals kleineren Durchmesser als Fraktion (A) aufweist. Letzteres ist jedoch reine Spekulation, da der Beweis dafür nicht erbracht werden konnte.

4.2.2.3 Vergleich mit der HPLC

Im Vergleich zu HPLC-Trennungen sind die Signale bei der Gelelektrophorese deutlich breiter und neigen je nach Partikelart zu Unsymmetrie. Die Signalverbreiterung liegt zum größten Teil an den Dimensionen der Analysenapparatur, aber auch an der Inhomogenität des verwendeten Gels. Im Vergleich zu einer Chromatographiesäule ist der Durchmesser des Gels um ein Vielfaches größer und die Elutionszone am Ende des Gels besitzt ein großes Totvolumen. Eine Verkleinerung beider Parameter, vor allem des Totvolumens, könnte zu einer signifikanten Verbesserung der Peakbreite führen. Diese Anpassungen waren allerdings im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht vorgesehen und auch nicht durchführbar.

Am Beispiel der Ag-MSA-Partikel P17, P18 und P19 (siehe Abb. 63 und Abb. 64) kann man sehr deutlich den Unterschied im Auflösungsvermögen der beiden Trenntechniken erkennen. Die drei Partikel ergeben bei der

Größenausschlusschromatographie drei sehr ähnliche Signale, die sich in der Retentionszeit praktisch nicht unterscheiden und lediglich auf der linken Seite (zu niedrigeren Retentionszeiten hin) eine Verbreiterung des Signals aufweisen. Der kleinere Partikel P17 zeigt ein schmaleres Signal als die größeren Partikel P18 und P19.

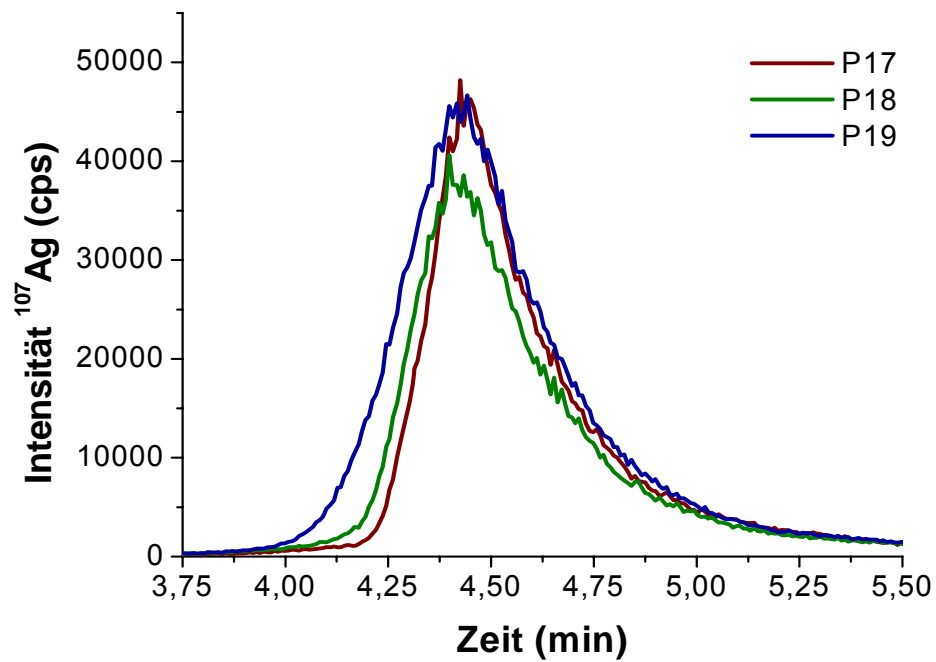


Abb. 63 Chromatogramm der Ag-MSA-Partikel P17 bis P19

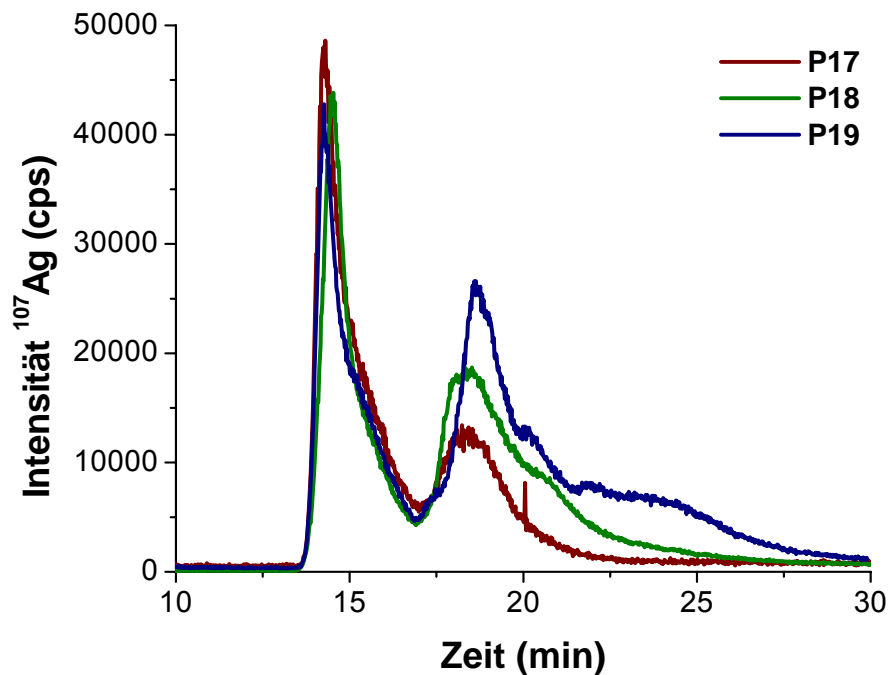


Abb. 64 Elektropherogramm der Ag-MSA-Partikel P17 bis P19. Gel: 3 % NuSieve; Länge: 110 mm; Spannung: 600 V; Puffer: 10 mmolL⁻¹ Tris/Borat bei pH = 8,9

Das Elektropherogramm zeigt ein anderes differenzierteres Bild, bei dem zum einen mehr als eine Fraktion aufgelöst ist und die Unterschiede zwischen den einzelnen Partikeln deutlicher zum Vorschein kommen. Alle drei Partikel zeigen ein Signal bei 15 min, was aufgrund der kleineren Migrationszeit einem niedermolekularen Ag-MSA-Komplex zugeordnet werden kann. Das zweite Signal bei etwa 18 min ist auch bei allen drei Proben vorhanden und stellt den eigentlichen Nanopartikel dar. Bei den Partikeln P18 und P19 sind im Elektropherogramm weitere Strukturen mit längeren Migrationszeiten erkennbar, welche nicht vollständig aufgelöst sind und eine größere Partikelfraktion repräsentieren. Bei den HPLC-Experimenten stellt sich dies als Verbreiterung der Signale zu kürzeren Retentionszeiten dar.

Der Informationsgewinn aus den Elektropherogrammen trägt leider keinen absoluten Charakter bezüglich der Aussage über die Größe eines Partikels. Es ist lediglich ersichtlich, dass eine nicht unbeträchtliche Menge der Probe aus einfachen Komplexen besteht und die Nanopartikel eine gewisse Inhomogenität in ihrer Größenverteilung besitzen, die von P17 zu P19 größer wird, was auch anhand der Synthesebedingungen zu erwarten war.

Die Größenausschlusschromatographie ist aufgrund der limitierten Auflösung für die Analyse kleiner nanopartikulärer Verbindungen nicht geeignet. Nanopartikel-fractionen, die sich in ihrer Größe nur wenig unterscheiden koeluieren. Die Verwendung der Gelelektrophorese hat hier deutliche Vorteile:

- Flexibilität bei der Herstellung des Gels und dadurch die Möglichkeit einer optimalen Anpassung auf den Analyten
- Optimierungsmöglichkeit mehrerer Parameter
- geringe Anschaffungs- und Unterhaltungskosten

4.2.2.4 Metal-MSA-Komplexe

Die Bildung von Gold- und Silberthiolaten wird bei der Synthese von Nanopartikeln nach Brust^[63] postuliert, aber bisher gab es in der Literatur keine genaueren Untersuchungen und auch keine Identifizierung der gebildeten Spezies. Die Bildung der Thiolate ist allerdings wichtig bei den Erklärungsversuchen zur Größenabhängigkeit der entstehenden Partikel in Abhängigkeit vom Verhältnis Metall zu Thiol.

Zur Untersuchung der sich bildenden Silber- und Goldthiolate wurden Proben mit Metall/Schwefel-Verhältnissen von 2:1, 1:1, 1:2 und 1:8 für Silber und 1:1, 1:2 und 1:8 für Gold wie in Kapitel 3.4.2.2 beschrieben vorbereitet und gelelektrophoretisch untersucht. Dabei wurde für die Voruntersuchungen zur Auswahl der Trennbedingungen ein UV-Detektor ($\lambda = 214 \text{ nm}$) verwendet.

4.2.2.4.1 Silber-MSA-Komplexe

In Abb. 65 ist zu erkennen, dass sich die Basislinie nach den Systempeak zwischen 2 und 3 min stabilisiert und drei getrennte Signale vollständig voneinander getrennt werden können.

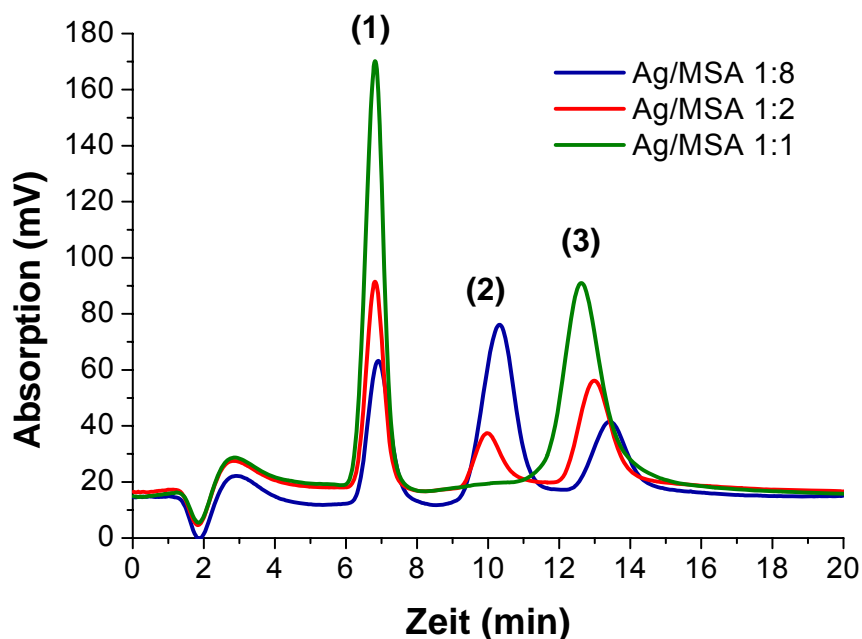


Abb. 65 Elektropherogramm von drei Ag-MSA-Proben mit unterschiedlichen Verhältnissen der Komponenten Ag^+ und MSA, UV-Detektion ($\lambda = 214 \text{ nm}$)

Eine eindeutige Identifizierung der Signale kann mit einem UV-Detektor nicht vorgenommen werden, da er außer einer unspezifischen Absorption bei 214 nm keinerlei Aussagen über die Natur der Spezies machen kann. Nichtsdestotrotz kann durch Kenntnis der möglichen vorkommenden Spezies und deren migrativem Verhalten während der gelelektrophoretischen Trennung über die Identität der einzelnen Signale spekuliert werden.

In der Probe befinden sich neben dem Tris/Borat-Puffer gelöstes AgNO_3 , MSA und mögliche Ag-MSA-Komplexe. Mit Hilfe der Messung von Proben, die einmal nur AgNO_3 und nur MSA enthielten (Daten hier nicht gezeigt), konnte gezeigt werden, dass Signal (1) dem Nitrat anion und Signal (2) dem Mercaptobernsteinsäure anion (MSA^-) zuzuordnen ist. Signal (3) kann dementsprechend einem Ag-MSA-Komplex zugeordnet werden, was bei Messungen mit dem ICP-MS durch Koelution von Silber und Schwefel (siehe Abb. 66a und b) und Messungen an einem ESI-MS bestätigt werden konnte.

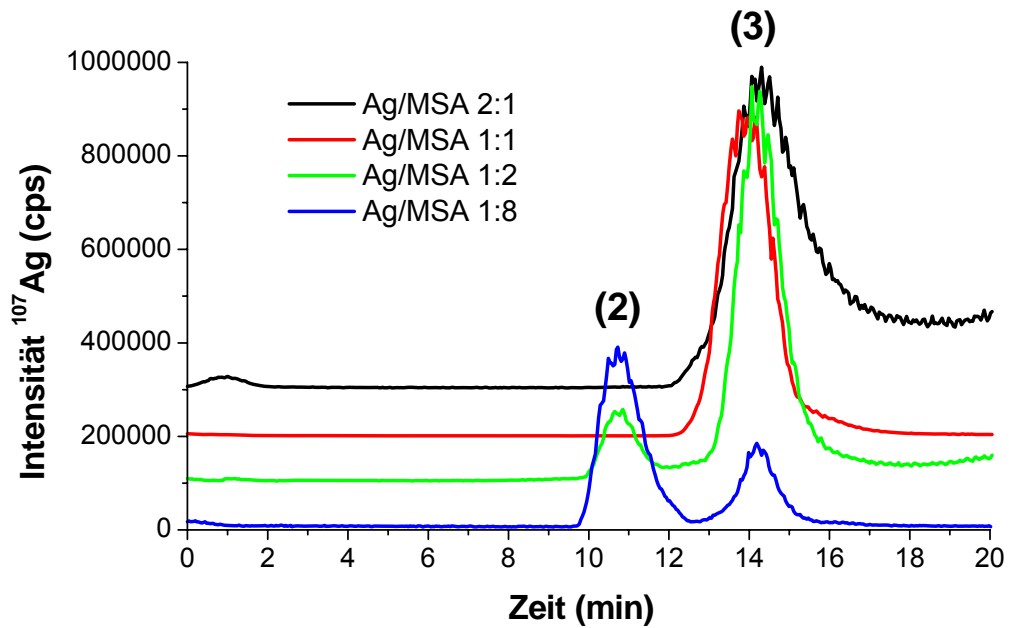


Abb. 66a Elektropherogramme von 4 Ag-MSA-Proben mit unterschiedlicher Zusammensetzung, ICP-MS-Detektion des Isotops ^{107}Ag

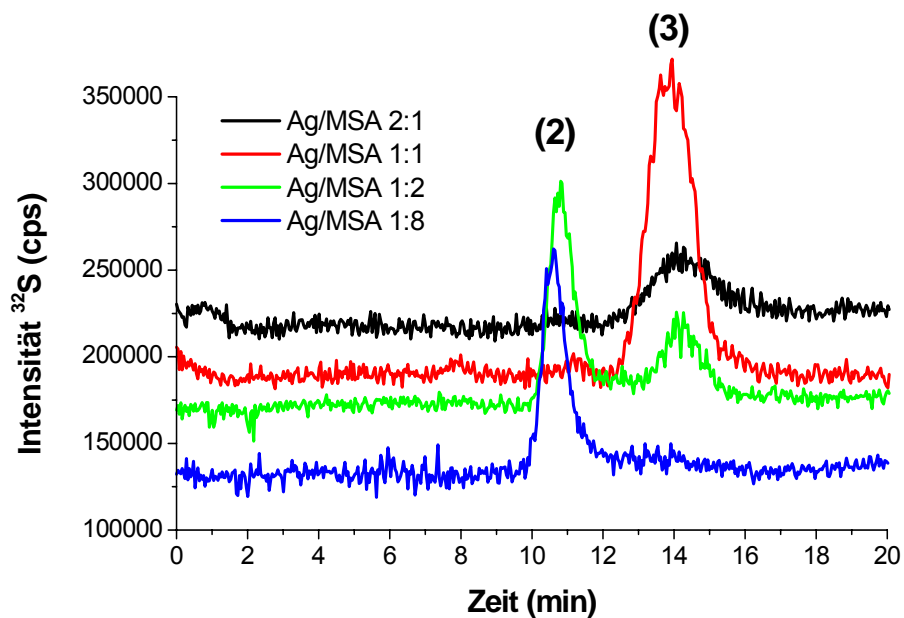
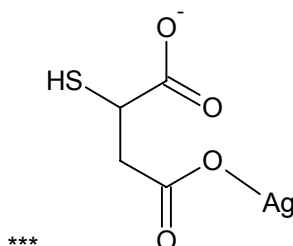
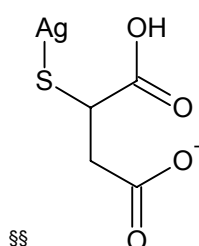


Abb. 66b Elektropherogramm von 4 Ag-MSA-Proben mit unterschiedlicher Zusammensetzung, ICP-MS-Detektion des Isotops ^{32}S

Das Signal (1) ist bei der Detektion mit dem ICP-MS nicht mehr zu sehen, was bedeutet, dass es weder Silber noch Schwefel enthält. Demnach kann es nur das Nitrat anion sein, welches bei 214 nm absorbiert^[77] und wegen seiner geringen Größe auch eine kurze Migrationszeit im Gel haben sollte.

Abb. 66b zeigt die Schwefelspur der Elektropherogramme und man kann erkennen, dass bei einem Unterschuss von MSA und bei äquimolaren Verhältnissen von Silber zu MSA (Ag/MSA 2:1 und Ag/MSA 1:1) kein Signal zwischen 10 und 11 min, was freiem MSA⁻ entspricht, zu sehen ist. Erst bei einem Überschuss von MSA ist das Signal (2) zu sehen. Auch in Abb. 66a ist nur in zwei Elektropherogrammen das Signal (2) vorhanden. Es ist allerdings nicht zu erwarten, dass zur Migrationszeit von freiem MSA⁻ auch ein Silbersignal zu beobachten ist. Es muss sich demnach bei einem Überschuss an MSA ein Ag-MSA-Komplex bilden, der in etwa den gleichen hydrodynamischen Radius und dieselbe Ladung wie reines MSA hat. Nur so ist eine Komigration zu erklären. Bei dem Komplex kann es sich entweder um ein Silberthiolat^[§§] oder ein Silbercarboxylat^[***] handeln. Aufgrund der höheren Affinität des Silbers zum Schwefel als zum Sauerstoff^[78] ist die Bildung eines Thiolates wahrscheinlicher. Durch die Substitution des Protons der Thiolgruppe durch ein Silberkation bleibt die durch den Grad der Deprotonierung der Carboxylatgruppen bestimmte Ladung erhalten und die Größe nimmt nur in einem Maße zu, die unter den verwendeten Trennbedingungen nicht zu einer merklichen Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit führt.

Die Fraktion repräsentiert durch Signal (3) migriert langsamer, was auf ein weniger negativ geladenes und/oder größeres Molekül hindeutet. Einen Anhaltspunkt für die Identität dieser Spezies gibt das durch Vergleich der Signalfächen errechenbare molare Verhältnis Ag/S. Hiernach handelt es sich um ein Molekül mit doppelt so vielen Schwefelatomen wie Silberatomen. Durch ESI-MS-Messungen konnte die Identität des Komplexes Ag(MSA)₂²⁻ bestätigt werden. Dieser Komplex ist unter den



herrschenden Trennbedingungen zwar höher geladen als MSA^- oder AgMSA^- , durch seine doppelte Größe wird er jedoch bei einem 5 %igen Gel so stark an seiner Wanderung gehindert, dass er langsamer durch das Gel migriert.

In Tab. 18 sind die integrierten Peakflächen der Signale (2) und (3) für die 4 Proben aufgelistet. Das molare Verhältnis Ag/S für Signal (3) schwankt zwischen 1,7 und 2,1. Es ist jedoch kein Trend von einer Probe zur anderen erkennbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Schwankungen mit der Messunsicherheit erklärt werden können. Bei einem Unterschuss von MSA oder äquimolaren Mengen von Ag zu MSA liegt das gebundene Silber ausschließlich als $\text{Ag}(\text{MSA})_2^-$ vor. $\text{Ag}(\text{MSA})$ hat sich nicht gebildet und positive Silberkomplexe könnten nicht nachgewiesen werden, da sie in die entgegengesetzte Richtung, also nach oben, migrieren und den Detektor deshalb nicht erreichen. Gibt man einen Überschuss an MSA zur Silberlösung, so bildet sich vermehrt auch der einfache Komplex AgMSA^- . Durch die Koelution von MSA^- und AgMSA^- sind die molaren Verhältnisse von Ag zu S nicht aussagekräftig, da sich unter dem Signal zwei Spezies verbergen.

Tab. 18 Übersicht über die Peakflächen, die molaren Ag/S-Verhältnisse und den prozentualen Anteil der beiden Spezies am Gesamtsilber

Probe	Peak	Fläche ^{107}Ag (counts)	Fläche ^{32}S (counts)	$R(^{107}\text{Ag}/^{32}\text{S})$	molares Verhältnis Ag/S	Verteilung des Ag auf Peak (a) und (b)
Ag/MSA 2:1	(2)	n.b.	n.b.			0 %
	(3)	1512970	95267	15,9	1 : 2,1	100 %
Ag/MSA 1:1	(2)	n.b.	n.b.			0 %
	(3)	5251200	265550	19,8	1 : 1,7	100 %
Ag/MSA 1:2	(2)	179110	117157	1,53	1 : 21,5	14 %
	(3)	1108000	61547	18,0	1 : 1,8	86 %
Ag/MSA 1:8	(2)	247680	102100	1,92	1 : 17,2	66 %
	(3)	128960	n.b.			34 %

4.2.2.4.2 Gold-MSA-Komplexe

Gold verhält sich bei der Komplexbildung mit MSA prinzipiell unterschiedlich zu Silber, da Gold ein hohes Redoxpotential besitzt und unter Reduktion zu Au(I) Thiole zu oxidieren vermag. Eine Frage war demnach auch, ob das Gold im Komplex $\text{Au}(\text{MSA})_2^-$ nun dreiwertig oder einwertig vorliegt.

In Abb. 67 erkennt man wieder den Systempeak zwischen 2 und 3 min. Das Signal (2) kann aufgrund der Migrationszeit dem MSA zugeordnet werden und Signal (4) entspricht dem Goldkomplex $\text{Au}(\text{MSA})_2^-$. Die Messungen der Goldproben sind aufgrund der teilweise niedrigen Intensitäten nicht so eindeutig wie die Messungen der Silberkomplexe, aber es ist trotzdem zu erkennen, dass sich auch hier bei einem Unterschuss an MSA der Komplex $\text{Au}(\text{MSA})_2^-$ bildet. Das Signal (2) der Probe 1:8 weist allerdings im Gegensatz zur äquivalenten Silberprobe eine deutliche Schulter auf. In Abb. 68a ist das Signal (2) jedoch wesentlich kleiner, weshalb keine Schulter sondern ein eigenes Signal zwischen (2) und (4) zu sehen ist. Über dessen Identität kann an dieser Stelle keine Aussage gemacht werden.

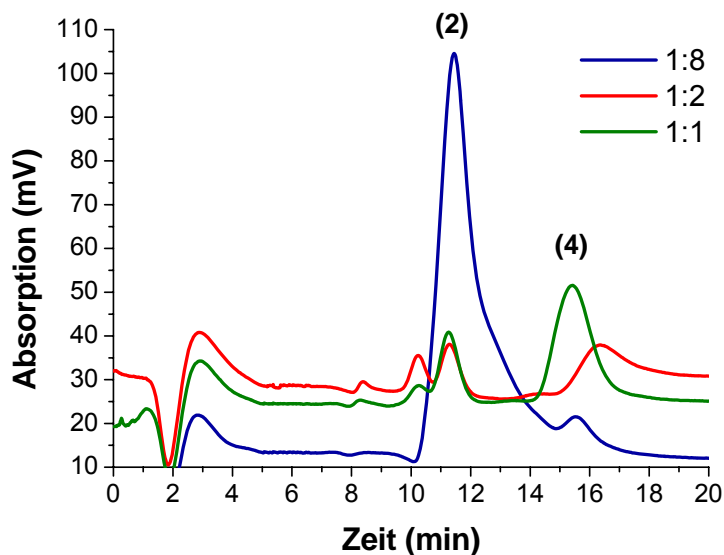


Abb. 67 Elektropherogramme von drei Au-MSA-Proben mit unterschiedlichen Verhältnissen der Komponenten Au^{3+} zu MSA; Detektion bei $\lambda = 214 \text{ nm}$

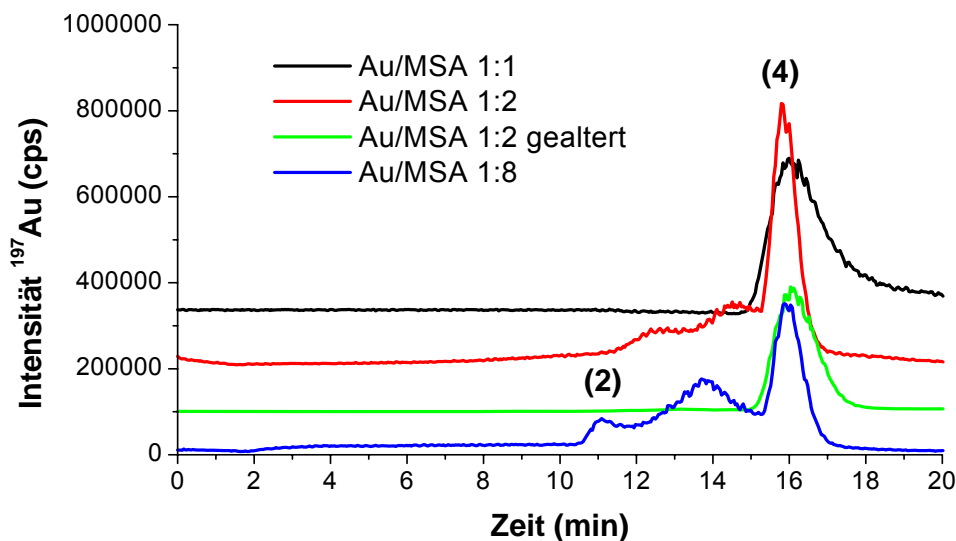


Abb. 68a Elektropherogramme von vier Au-MSA-Proben mit unterschiedlicher Zusammensetzung, ICP-MS-Detektion des Isotops ^{197}Au

Ebenfalls ist in Abb. 68a zu erkennen, dass sich die Spezies $\text{Au}(\text{MSA})_2^-$ nicht sofort nach Zusammengabe der beiden Komponenten HAuCl_4 und MSA bildet, sondern dass die Reaktion erst eine Reihe von Zwischenprodukten durchläuft. Diese sind bei einer Wiederholung der Messung derselben Probe am nächsten Tag jedoch nicht mehr zu finden und der stabile Komplex (4) hat sich ausgebildet.

Die untenstehende Abb. 68b zeigt die entsprechende Schwefelspur. Die Intensitäten sind leider zu niedrig, um genauere Aussagen über die einzelnen Spezies machen zu können. So geht bei den Proben 1:1, 1:2 und 1:8 das Signal (4) im Rauschen des Untergrundes unter. Mit Hilfe des Gold-Schwefelverhältnisses aus Probe (1:2 gealtert) kann man jedoch die molare Zusammensetzung des Komplexes errechnen und kommt wie bei den Silberproben zu einem atomaren Verhältnis von einem Goldatom zu zwei Schwefelatomen.

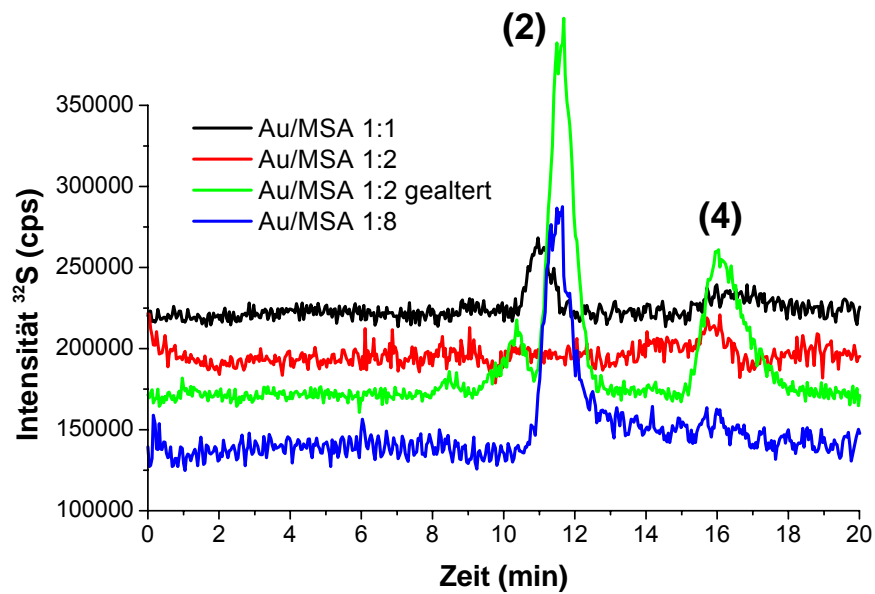


Abb. 68b Elektropherogramme von vier Au-MSA-Proben mit unterschiedlicher Zusammensetzung, ICP-MS-Detektion des Isotops ^{32}S

Um nun die Identität des Goldkomplexes zu klären, wurde die Probe 1:2 mit dem ESI-MS untersucht. Abb. 69 und Abb. 70 zeigen die Spektren.

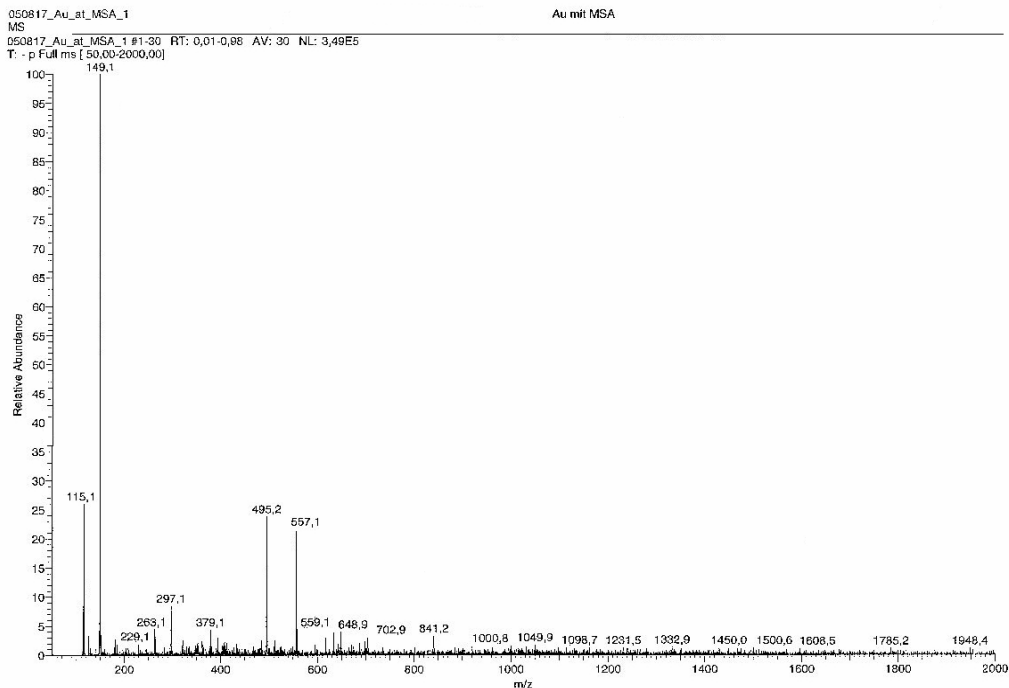


Abb. 69 Ion-trap-ESI-Massenspektrum der Probe Au/MSA 1:2 im negativen Modus

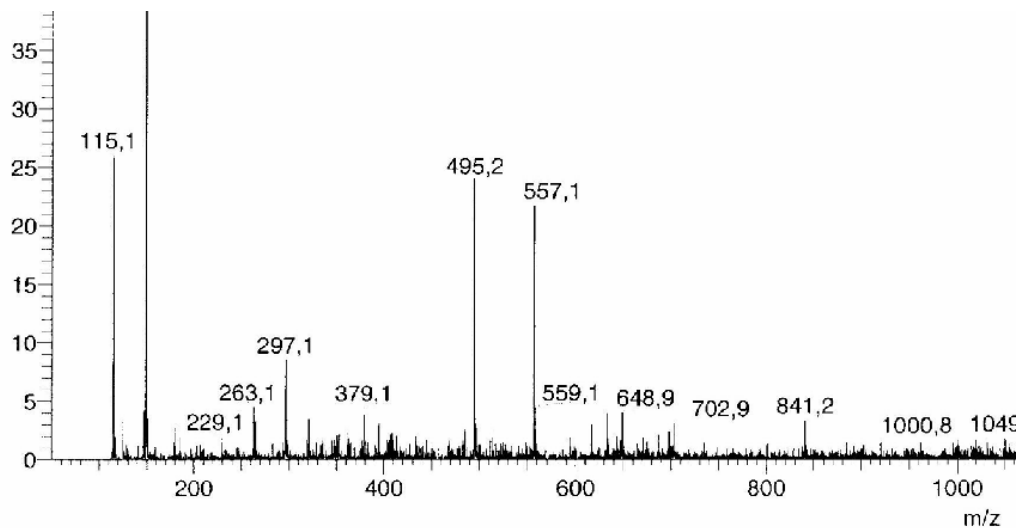
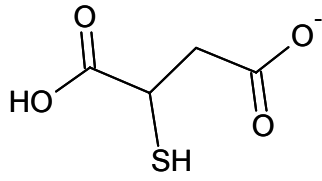


Abb. 70 Ausschnitt aus dem IT-ESI-Spektrum der Probe Au/MSA 1:2 gealtert

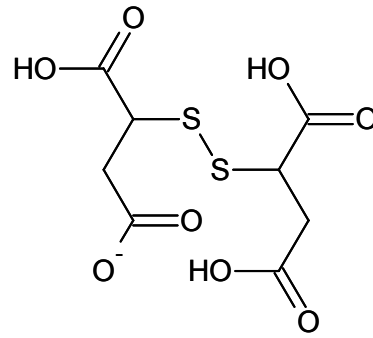
Die einzelnen Signale können wie folgt zugeordnet werden:

m/z	Molekül	Bemerkung
115	$[\text{MSA-H-SH}_2]^-$	Verlust von H_2S
149	$[\text{MSA-H}]^-$	einfach deprotoniertes Muttermolekül
297	$[(\text{MSA})_2-3\text{H}]^-$	einfach deprotoniertes dimeres oxidiertes MSA mit Disulfidbrücke
495	$[\text{Au}(\text{MSA})_2-\text{H}]^-$	einfach deprotonierter Komplex aus Gold und zwei MSA-Molekülen

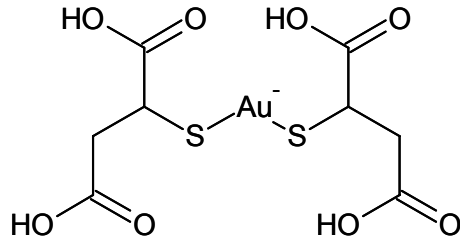
Das Massensignal bei $m/z = 557$ konnte keiner Goldverbindung zugeordnet werden. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein Artefakt aus vorangegangenen Messreihen (Information des Geräteverantwortlichen).



$m/z = 149$



$m/z = 297$



$m/z = 495$

Zur Klärung der Identität des Ions mit dem Masse-Ladungsverhältnis von 495 wurde dieses in der Ionenfalle von den anderen Ionen abgetrennt und fragmentiert. Folgendes Massenspektrum konnte erhalten werden:

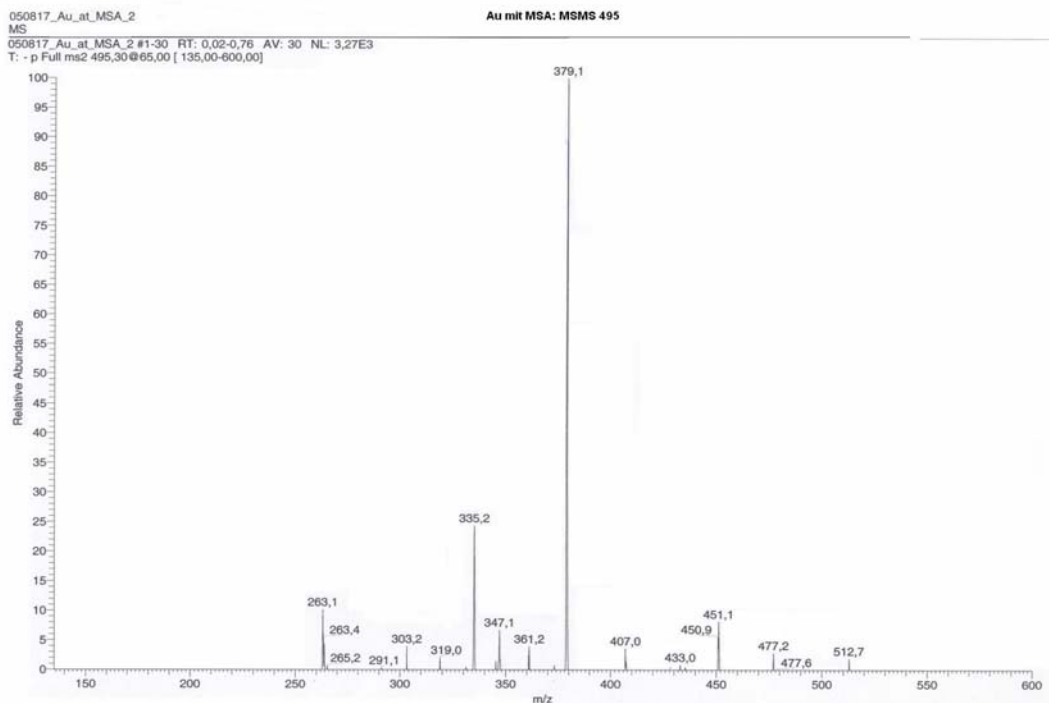
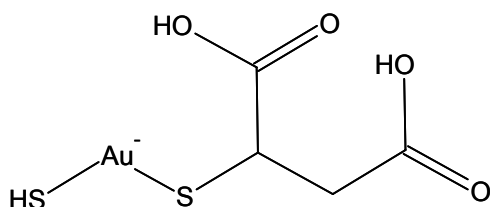
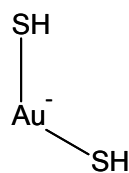


Abb. 71 MSMS-Spektrum des Ions mit $m/z = 495$ (AuMSA_2^-)

m/z	Molekül	Bemerkung
477	$[\text{Au}(\text{MSA})_2\text{-H-H}_2\text{O}]^-$	Verlust von H_2O
451	$[\text{Au}(\text{MSA})_2\text{-H-CO}_2]^-$	Verlust von CO_2
407	$[\text{Au}(\text{MSA})_2\text{-H-2CO}_2]^-$	Zusätzlicher Verlust von CO_2
379	$[\text{Au}(\text{SH})(\text{MSA})\text{-H}]^-$	Verlust der Äpfelsäuregruppe
361	$[\text{Au}(\text{SH})(\text{MSA})\text{-H-H}_2\text{O}]^-$	Verlust von H_2O
335	$[\text{Au}(\text{SH})(\text{MSA})\text{-H-CO}_2]^-$	Verlust von CO_2
263	$[\text{Au}(\text{SH})_2]^-$	Verlust der zweiten Äpfelsäuregruppe



m/z = 379



m/z = 263

Bei der Fragmentierung des Ions mit $m/z = 495$ ist der Verlust von H_2O und CO_2 zu beobachten, was auf die Äpfelsäurereste zurückzuführen ist und ein deutliches Indiz für den postulierten Komplex $\text{Au}(\text{MSA})_2^-$ ist. Des Weiteren konnte keine Abspaltung des Schwefels vom Gold beobachtet werden, was aufgrund der hohen Affinität der beiden Elemente zueinander auch nicht zu erwarten war.

Zur Entscheidung, ob das Gold in der Oxidationsstufe +1 oder +3 vorliegen, muss man sich das Ion 495 näher betrachten. Hätte das Gold die höhere Oxidationsstufe, so müssten zwei zusätzliche Protonen abgespalten werden, um die Gesamtladung -1 zu erhalten. Das Ion hätte allerdings ein m/z von 493 und dieses wurde im Spektrum nicht beobachtet. Das Vorliegen von Gold in der Oxidationsstufe +1 im Komplex $\text{Au}(\text{MSA})_2$ ist somit erwiesen.

4.2.2.5 Metall/Schwefel-Verhältnismessungen

Die Bestimmung des Verhältnisses zwischen dem durch den bei der Elution der Nanopartikelfractionen generierten transienten Metall- und Schwefelsignalen ist mit einigen prinzipiellen Schwierigkeiten behaftet. Zum ersten ist der Unterschied der relativen Empfindlichkeitsfaktoren der beiden Elemente sehr groß. Eine Lösung mit Gold ergibt etwa das 50fache des Signals als eine Lösung mit der gleichen Anzahl an Schwefelatomen und eine Lösung mit Silber immerhin noch das 30fache. Dieser Umstand hängt unter anderem mit den unterschiedlichen Ionisationswahrscheinlichkeiten der Elemente zusammen, die mit Hilfe der Saha-Gleichung und dem Ionisationspotential abgeschätzt werden können. Letzteres ist für das Nichtmetall Schwefel (10,36 eV) deutlich größer als für die Metalle Silber (7,58 eV) und Gold (9,23 eV).

Die zweite ungünstige Tatsache ist, dass Schwefel als omnipräsentes Element ein sehr hohes Untergrundsignal besitzt und zudem durch Molekülinterferenzen auf allen Isotopen überlagert wird. Benutzt man kein hochauflösendes Massenspektrometer, so macht es das Interferenzion $^{16}\text{O}_2^+$ fast völlig unmöglich, den Schwefel im niedrigen Konzentrationsbereich auf seiner Hauptmasse 32 zu analysieren. Mit einem hochauflösenden ICP-MS kann diese Interferenz abgetrennt werden, jedoch ist der Signaluntergrund immer noch relativ hoch, was u.a. auf im Eluenten vorhandenes Sulfat zurückzuführen ist. Schwefel ist ein weit verbreitetes Element und auch nach der Aufreinigung durch eine MilliQ-Anlage immer noch im Wasser und somit im Eluenten in einer Konzentration von etwa 1 mgL^{-1} vorhanden. Ein dritter nachteiliger Punkt ist die Tatsache, dass je größer die Partikel werden, desto weniger Schwefel (relativ zum Metall) in ihnen vorhanden ist und desto breiter die Signale bei der GE-Trennung werden, so dass das Schwefelsignal oft nicht mehr quantifizierbar ist.

Diese Arbeit beschränkt sich deshalb auf die Analyse der kleineren synthetisierten Partikel TC-03 und TC-06, an Hand derer die Möglichkeit der Bestimmung der molaren Metall-Schwefelverhältnisse aufgezeigt werden soll.

In Abb. 72 ist das Elektropherogramm des Goldnanopartikels TC-03 zu sehen. Man erkennt, dass das Goldsignal das Schwefelsignal um fast das 50fache übersteigt und dass das Schwefelsignal auf einem hohen Untergrund von etwa 130000 cps

gemessen wird. Kennt man die relativen Empfindlichkeitsfaktoren der beiden Elemente, kann man entweder durch Integration der Signale der beiden Massenspuren und Quotientenbildung oder durch direkte Quotientenbildung der Zählraten die Zusammensetzung des Partikels errechnen. Bei einem homogenen Partikel sollte der Quotient der Zählraten in jedem Messpunkt über die Dauer der Elution der Fraktion konstant bleiben, jedoch nehmen die Schwankungen im Quotienten deutlich zu, je näher man sich an den Rand des Signals bewegt. Eine Auswertung sollte sich dementsprechend auf das Zentrum des Signals beschränken, denn dort ist der Quotient aufgrund genügend großer Signalintensitäten stabil. Falls es sich um eine einheitliche Verbindung handelt, kann man die Signale der einzelnen Massenspuren auch integrieren.

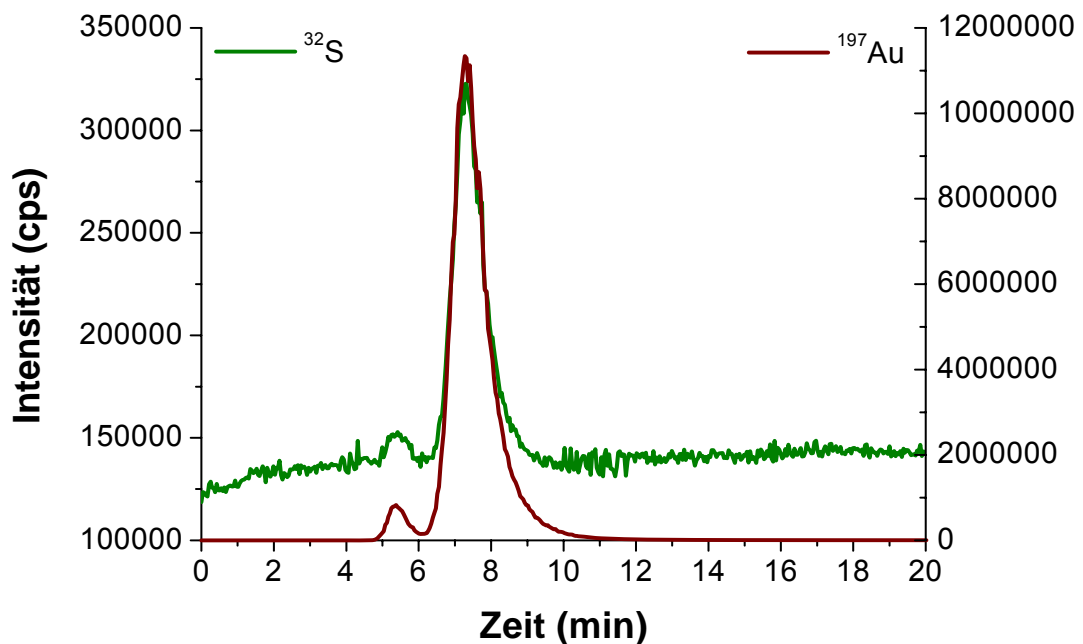


Abb. 72 Elektropherogramm der Probe TC-03. Die Koelution von Gold und Schwefel ist zu erkennen und das atomare Verhältnis Au zu S wurde bestimmt.

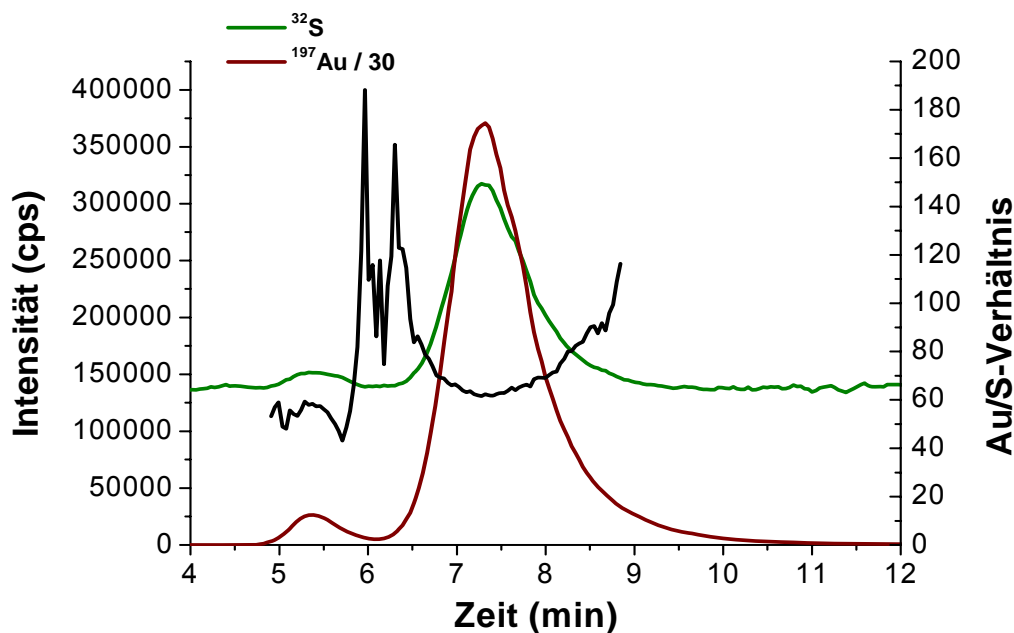


Abb. 73 Darstellung der Quotientenbildung aus den beiden Massenspuren des Elektropherogramms der Probe TC-03.

Bei der Probe in Abb. 72 handelt es sich um eine augenscheinlich homogene Verbindung, was am weitgehend stabilen Quotienten der Zählraten im Zentrum des Signals zu erkennen ist (siehe Abb. 73). Durch Integration der Signale der beiden Fraktionen konnte bei der ersten mit einem Maximum bei 5,37 min ein Au/S-Verhältnis von 1,19 und bei der zweiten mit einem Maximum bei 7,29 min ein Verhältnis von 1,33 errechnet werden.

Zur Interpretation der erhaltenen Zahlenwerte, muss man das Cluster auf atomarer Ebene betrachten. So kann man sich, wie in Abschnitt 3.4.2.3 beschrieben, idealisiert vorstellen, dass das Cluster wie eine Zwiebel aus verschiedenen Schalen aufgebaut ist. Ideale Cluster bauen auf ikosaedrischen Strukturen auf und man kann die Anzahl der in einer Schale befindlichen Atome errechnen. Im Zentrum sitzt ein einzelnes Atom und in der l -ten Schale $10l^2 + 2$ Atome. In Tab. 13 (Seite 77) sind die Quotienten aus Oberflächenatomen zur Gesamtzahl aller im Cluster enthaltenen Atome am Beispiel von Clustern mit „magischen“ Atomzahlen, also abgeschlossenen idealisierten Schalen, aufgeführt.

Aus den experimentell bestimmten Quotienten von 1,19 und 1,33 bei der Probe TC-03 kann man abschätzen, dass die Partikelgröße zwischen Au_{13} (0,8 nm) und Au_{55} (1,4 nm) liegt. Beide Partikel sind sehr klein sind und der später eluierende ist der Größere.

Es bleibt anzumerken, dass die Zahl der Oberflächenatome nicht mit der Anzahl gebundener MSA-Moleküle übereinstimmen muss und dieses Modell nur eine angenäherte Vorstellung der tatsächlichen Verhältnisse im realen Cluster vermitteln kann. Das MSA-Molekül besitzt eine Ausdehnung, die größer ist als der Querschnitt eines Gold-, bzw. Silberatoms und eine Bindung zu jedem Oberflächenatom ist somit nur bei stark gekrümmten Flächen möglich. Für größere Cluster wird somit der tatsächliche Quotient größer sein als in Tab. 13 auf Seite 77 dargestellt.

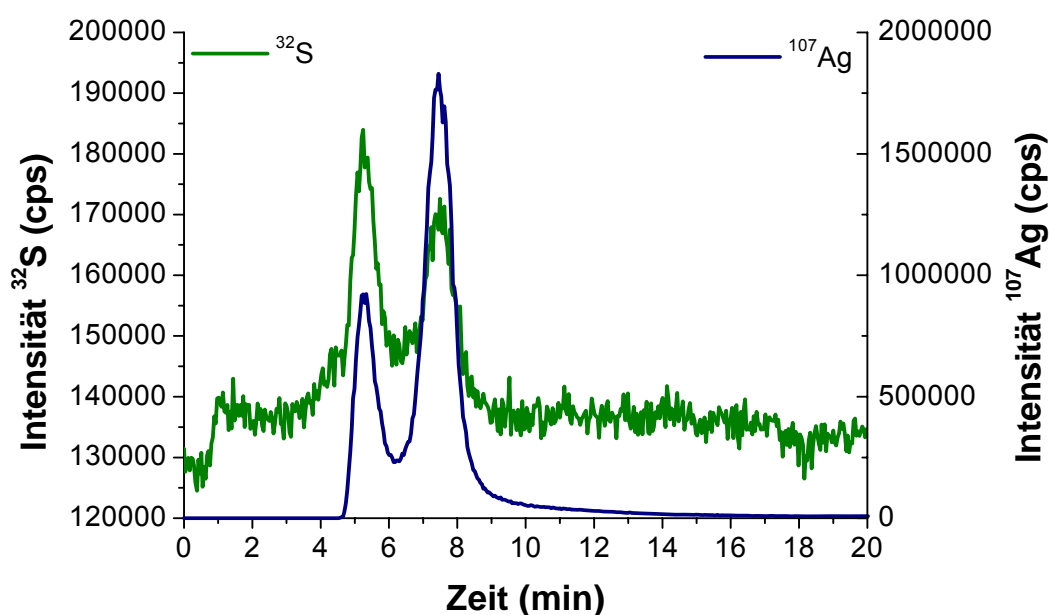


Abb. 74 Elektropherogramm der Probe TC-06. Die Koelution von Silber und Schwefel ist zu erkennen und das atomare Verhältnis Ag zu S wurde bestimmt.

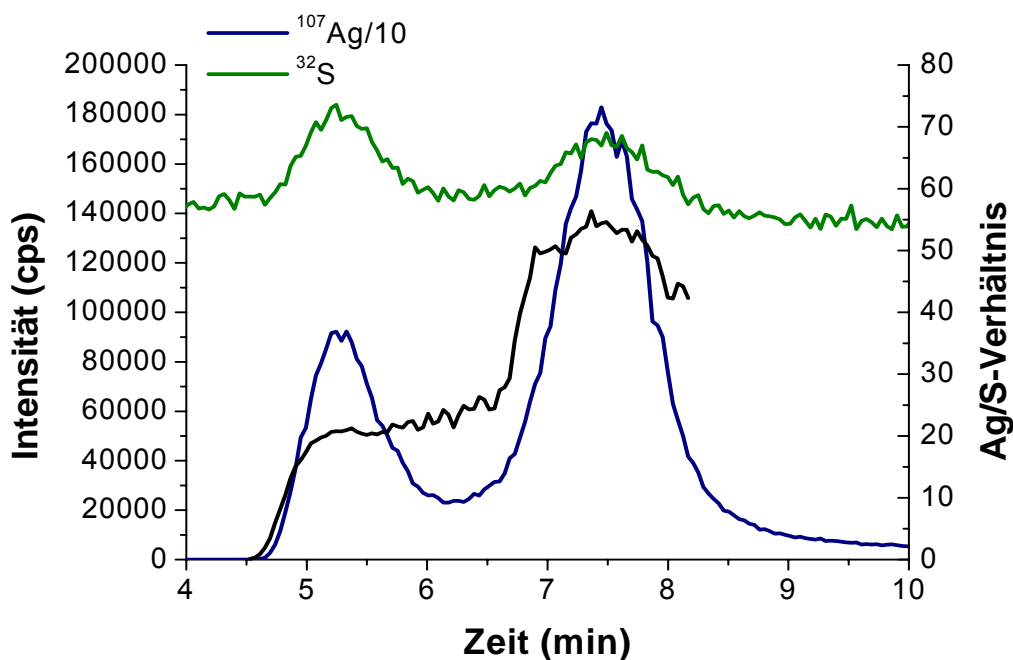


Abb. 75 Darstellung der Quotientenbildung aus den beiden Massenspuren des Elektropherogramms der Probe TC-06.

Auch bei der Probe des Silbernanopartikels TC-06 (siehe Abb. 74) ist analog zum Goldnanopartikel die Koelution von Silber und Schwefel zu erkennen, und es konnten auch zwei unterschiedliche Fraktionen getrennt werden, wobei das relative Verhältnis der beiden zueinander deutlich anders ist.

In Abb. 75 ist sehr gut das stabile Ag/S-Verhältnis während der Elution der Fraktionen zu erkennen, was wie schon weiter oben erwähnt auf eine weitgehend homogene Fraktion deutet. Das erste Signal bei 5,3 min hat einen sehr großen Schwefelanteil (Intensitätsverhältnis Ag/S = 21) und mit einem atomaren Verhältnis von Silber zu Schwefel von 2 zu 3 handelt es sich wahrscheinlich um keinen wirklichen Partikel sondern vielmehr um einen Silber-MSA-Komplex. Das zweite Signal mit einer Elutionszeit von 7,5 min zeigt ein atomares Verhältnis von 1,72 (Intensitätsverhältnis Ag/S = 54).

Silberatome haben einen geringeren Atomradius als Goldatome (135 pm vs. 160 pm), besitzen allerdings fast identische Metall-Metall-Bindungslängen von 288,9 pm bzw. 288,4 pm, weshalb gleich große Cluster auch eine ähnliche Anzahl an

Metallatomen enthalten. Mit einem Quotienten von 1,33 liegt das Goldcluster aus Abb. 73 nahe dem theoretischen Quotienten für einen Au₅₅-Cluster (1,31) und das Silbercluster (TC-06) mit 1,72 nahe dem theoretischen Verhältnis für einen Ag₁₄₇-Cluster (1,60).

Es lassen sich durch diese Experimente keine absoluten Größen für die Cluster ermitteln, da einige Faktoren, die die Interpretation des Metall-Schwefel-Verhältnisses beeinflussen, unbekannt sind. So spielt der Belegungsgrad der Clusteroberfläche eine entscheidende Rolle bei der Beurteilung der erhaltenen Resultate. Nichtsdestotrotz konnte eine Abschätzung der Größe erfolgen, die in Übereinstimmung mit der durch die herrschenden Synthesebedingungen zu erwartenden Größe war.

4.2.2.6 Rubigold

Zur Untersuchung von Rubigold hinsichtlich seiner molekularen Homogenität, wurde von Wolf M. Pankau und Sven Mönninghoff von der Ruhr-Universität Bochum ein Syntheseansatz gestartet, um bei dessen Aufreinigung mittels SEC-HPLC Fraktionen zu sammeln. Das Eluat wurde während einer Minute in einem Eppendorfgefäß aufgefangen und anschließend gefriergetrocknet. Die Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert, verschickt und vor der gelelektrophoretischen Analyse in 500 µL Wasser aufgenommen.

Die SEC-HPLC-Trennung wurde mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 350 nm beobachtet und das Chromatogramm ist in Abb. 76 zu sehen.

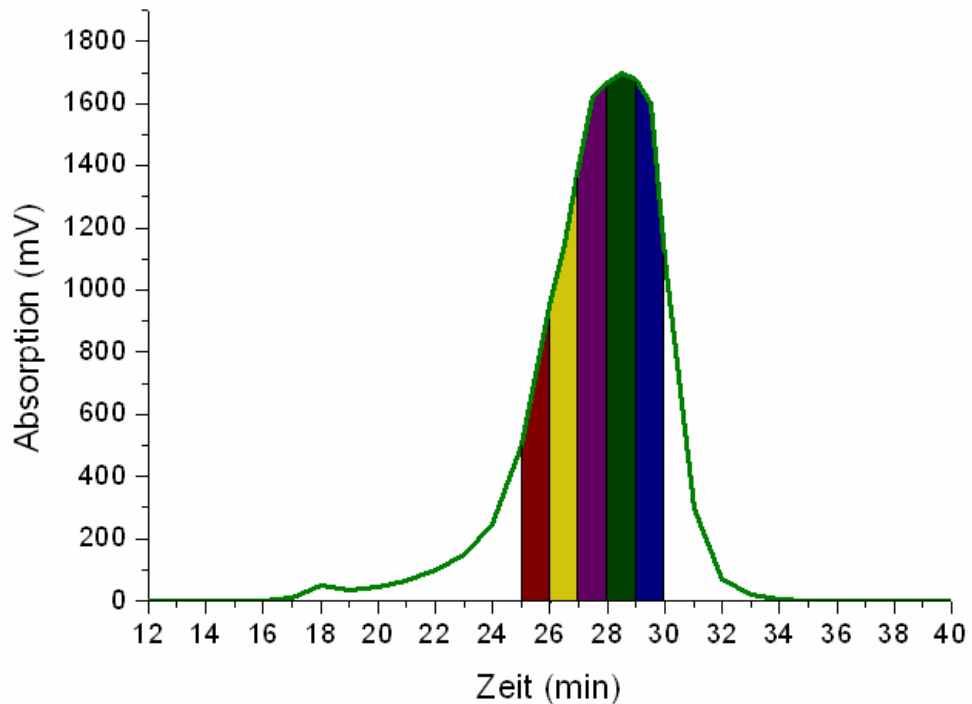


Abb. 76 SEC-Trennung einer Probe Rubigold. Detektion bei 330 nm

Von den gesammelten Fraktionen wurden nur solche untersucht, die sich im Zentrum des Eluats befanden (in Abb. 76 farbig markiert). Die Konzentration an Clustern in den übrigen Fraktionen war zu niedrig, so dass keine verlässliche Aussage mehr über das Gold/Schwefel-Verhältnis getroffen werden konnte. Die Elektropherogramme der untersuchten Fraktionen sind in Abb. 77 dargestellt.

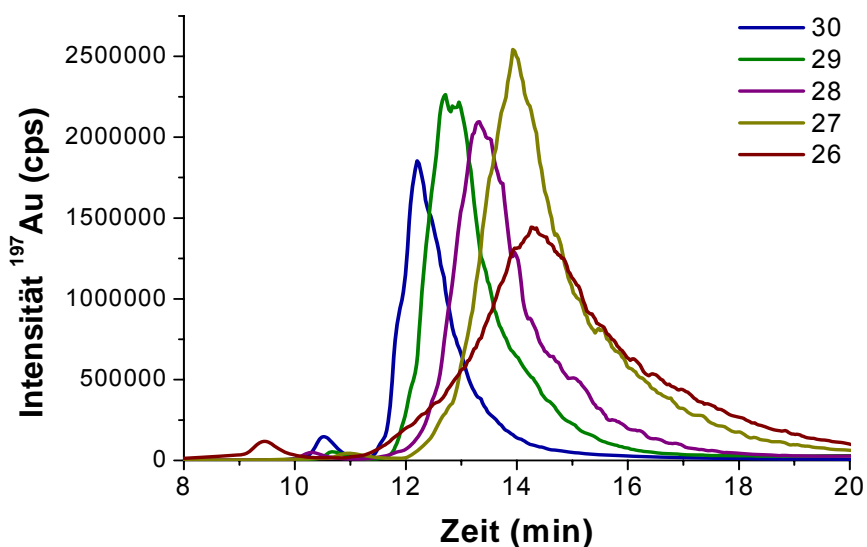


Abb. 77 Elektropherogramm der Fraktionen 26 bis 30

Die einzelnen Fraktionen zeigen bei abnehmender Retentionszeit in der SEC-Chromatographie eine kontinuierliche Verschiebung zu größeren Migrationszeiten bei der gelelektrophoretischen Trennung. Dies stimmt mit den Trennmechanismen der einzelnen analytischen Separationsmethoden überein und ist so zu erwarten. Eine niedrigere Elutionszeit bei der SEC weist auf ein größeres Molekül hin und eine niedrigere Migrationszeit bei der GE auf kleinere bzw. niedriger geladene Moleküle. Bei der Betrachtung des Gold/Schwefel-Verhältnisses sieht man eine stetige Zunahme desselben sowohl während der Elution der einzelnen Fraktion wie auch beim Vergleich der einzelnen Fraktionen (siehe Abb. 78).

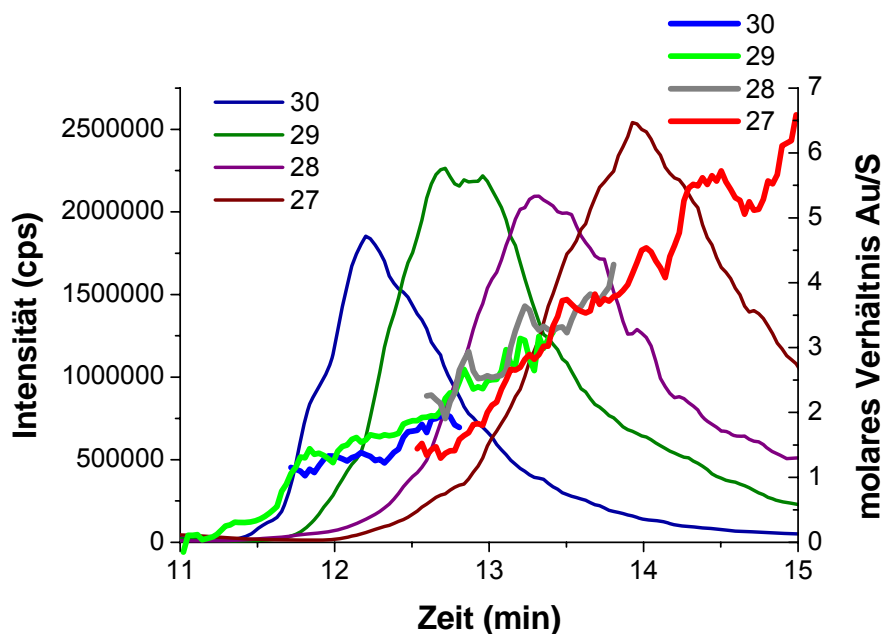


Abb. 78 Molare Verhältnisse zwischen Gold und Schwefel während der Elution der Fraktionen

Eine Zunahme des Verhältnisses während der Elution einer Fraktion hat dieselben Gründe wie eine Zunahme von einer Fraktion zur anderen. Betrachtet man eine Fraktion, so besteht diese aus einer Verteilung an Molekülen verschiedener Größe. Da die Anzahl an Schwefelatomen im Cluster aufgrund des einen gebundenen Liganden immer gleich ist, variiert nur die Anzahl der Goldatome und somit auch das Verhältnis Au zu S. Je mehr Goldatome das Cluster besitzt desto größer ist sein Durchmesser. Dementsprechend migriert es langsamer, und man beobachtet ein größeres Gold/Schwefel-Verhältnis bei der Detektion mit dem ICP-MS.

Vergleicht man zwei Fraktionen miteinander, so sollte eine bei der SEC-Chromatographie zeitlich früher gesammelte Fraktion größere Cluster beinhalten als eine später gesammelte. Also sollte auch das Gold/Schwefel-Verhältnis bei den Fraktionen mit der Retentionszeit abnehmen, was in Abb. 78 bestätigt wird. Außerdem wird beim Übereinanderlegen der einzelnen Elektropherogramme ersichtlich, dass bei verschiedenen Fraktionen zur gleichen Migrationszeit bei der Gelelektrophorese das atomare Verhältnis Au zu S gleich ist, was für eine gute Konstanz der Messbedingungen spricht.

Nimmt man nun das gesamte Signal einer Fraktion, integriert beide Massenspuren und bildet das Verhältnis, so kann man die mittlere Größe des Clusters der Fraktion berechnen.

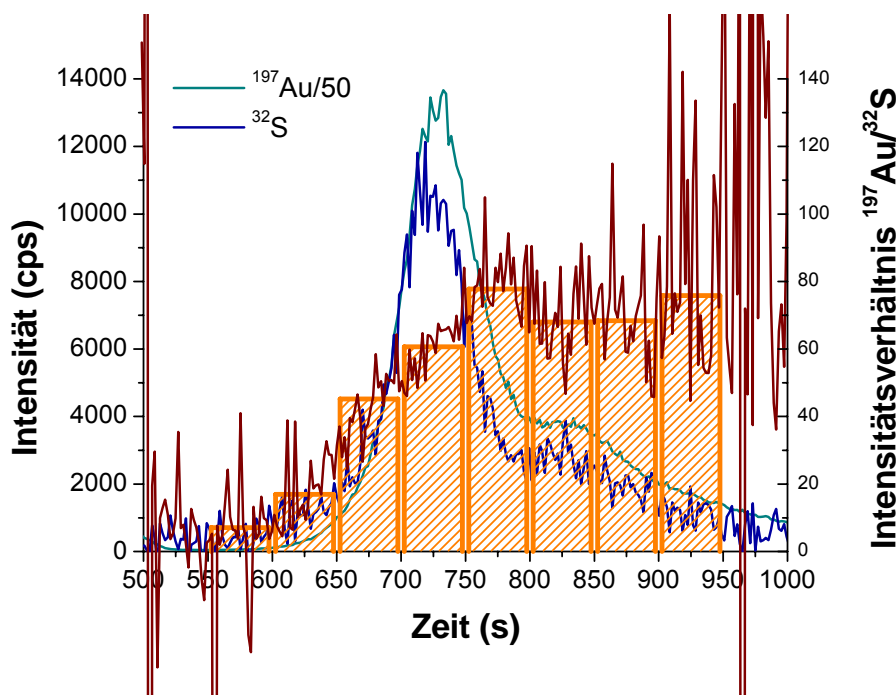


Abb. 79 Schrittweise integriertes Intensitätsverhältnis der Fraktion 29 (diese Messung ist nicht identisch mit der aus Abb. 78, durch Überladung des Gels kam es zur Ausbildung einer Schulter)

In Abb. 79 ist beispielhaft das in Schritten von 50 Sekunden integrierte Elektropherogramm der Fraktion 29 zu sehen. Auf der linken Ordinate ist die Intensität der Signale des Schwefels (Isotop ^{32}S) und des Goldes dargestellt, wobei das Goldsignal auf ein Fünfzigstel reduziert wurde. Auf der rechten Ordinate ist das gemessene Intensitätenverhältnis beider Signale dargestellt (das molare Verhältnis

ergibt sich durch Multiplikation mit dem Responsefaktor, siehe Kapitel 3.4.2.4). Der Responsefaktor am Tag der Messung betrug 0,042. Betrachtet man das Integral im Zentrum des Signals, also von 700 bis 750 Sekunden, so erhält man eine Intensitätsverhältnis von 60,7, was einem molaren Verhältnis Au zu S von 2,55 entspricht und dies, multipliziert mit der Anzahl an Schwefelatomen im Liganden eine Anzahl von durchschnittlich $30,6 \pm 1,6$ Goldatomen ergibt^{†††}.

Somit ist das Rubigoldcluster dieses Syntheseansatzes deutlich kleiner als erwartet. Fraktion 29 befindet sich im Maximum des Signals der SEC-Trennung und repräsentiert somit den Hauptteil der Probe.

Durch die vergleichende Messung von Intensitäten verschiedener Elemente und die vorhergehende Kalibrierung auf molare Intensitätsverhältnisse können Aussagen über das relative Verhältnis dieser Elemente zueinander in einer Probe gemacht werden. Mit der Kenntnis der absoluten Anzahl einer Atomsorte kann die Anzahl einer anderen berechnet werden. In obigem Beispiel ist die Anzahl der Schwefelatome im Liganden bekannt und deshalb kann auf die Anzahl der Goldatome geschlossen werden. Mit Hilfe einer geeigneten chromatographischen oder elektrophoretischen Trennung ist es möglich, eine Probe in einzelne Bestandteile aufzutrennen und durch die online-Kopplung dieser Trennmethode könne sogar Veränderungen in der atomaren Zusammensetzung innerhalb eines einzelnen Signals beobachtet werden.

Auf diese Weise war es möglich, die Masse des Rubigoldclusters abzuschätzen. Anstrengungen im Arbeitskreis von Prof. von Kiedrowski, die Masse des Cluster mit alternativen MS-Methoden wie ESI-MS oder MALDI zu bestimmen, schlugen bis dato fehl. Einzig die physische Größe der Cluster konnte mit TEM zu 1,2 nm Durchmesser bestimmt werden^[73].

^{†††} Der Wert der Messunsicherheit wurde abgeschätzt unter Einbeziehung des Fehlers bei der Bestimmung des Responsefaktors und der Signalkorrektur des Basislinienabzuges. Der Wert von 30,6 selbst stellt einen Mittelwert über den integrierten Zeitraum dar und eine Standardabweichung des Intensitätsverhältnisses von 14 % ($\pm 4,3$ Atome) zeigt, dass Fraktion 29, wie auch alle anderen Fraktionen, eine Verteilung von Clustergrößen enthält.

Die oben beschriebene Methode unterliegt jedoch auch Limitationen, die oft eine exakte Bestimmung der atomaren Verhältnisse erschweren oder gar unmöglich machen. Handelt es sich bei den Untersuchungen allein um Metalle, so stellen Anforderungen an genügend hohe Intensitäten und interferenzfreie Messungen kein Problem dar. Schwefel jedoch ist aus bekannten Gründen problematisch zu analysieren. Durch Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers kann man die Interferenzen (O_2^+) abtrennen, die niedrige Ionisationsrate und die überhöhte Grundlinie bleiben jedoch weiterhin ein Problem. Hier kann nur durch entsprechende Probenmenge bei der Analyse ein quantifizierbares Signal erzeugt werden, was dann wiederum Probleme wegen Überladung der Säule bzw. des Gels oder zu hohe Intensitäten bei den anderen zu beobachtenden Elementen mit sich bringen kann.

Wegen der niedrigen Intensitäten und des Rauschens des Signals (im Falle von Schwefel) ist eine direkte Quotientenbildung mit dem Goldsignal in den einzelnen Messpunkten nur schwer möglich, da der resultierende Quotient ein noch größeres Rauschen aufweist. Durch vorherige Glättung (die Mittlung des Signals mit den zwei links und rechts stehenden Nachbarwerten) der Massenspuren kann dies verringert werden. Einen statistisch zuverlässigeren Wert erhält man jedoch durch die Integration eines größeren Bereiches (wie in Abb. 79 zu sehen).

4.2.3 ESI-MS-Charakterisierung

Bei den Versuchen zur Charakterisierung der Nanopartikel mittels ESI-MS stellte sich heraus, dass es nicht möglich war, ein vollständiges intaktes Cluster zu detektieren. Dies könnte einerseits daran liegen, dass aufgrund einer zu niedrigen Ionisation das Masse-Ladungs-Verhältnis außerhalb des messbaren Bereiches liegt, daran, dass das ionisierte Cluster bis zur Detektion instabil wird, oder daran, dass der Ionisationsgrad zu niedrig für eine erfolgreiche Detektion ist. Citratstabilisierte Goldnanopartikel konnten gar nicht ionisiert werden. Im Folgenden wird deshalb nur von MAS-stabilisierten Nanopartikeln die Rede sein.

Prinzipiell besteht bei der ESI das Problem, dass die Matrix der verwendeten Probenlösung einen entscheidenden Einfluss auf den Grad der Ionisation und die Ausbildung des Sprays besitzt. Durch einen zu hohen Salzgehalt tritt einerseits im

Interfacebereich durch sich ablagernde Salze eine Verschmutzung auf, die bis hin zur völligen Verstopfung der Kapillare und des Interfaces selbst führen kann. Andererseits, und dieser Punkt ist noch viel gravierender, darf die eingeführte Lösung keine zu große Leitfähigkeit aufweisen, da sich sonst kein Spray ausbildet und Überschläge zwischen der Kapillare und der gegenüberliegenden Elektrode auftreten.

Bei den MSA-Nanopartikeln handelt es sich allerdings selbst um ein Salz, da die Säuregruppen der an der Oberfläche fixierten MSA-Moleküle teilweise als Natriumcarboxylat vorliegen. Löst man die Nanopartikel, die nach der Synthese und Aufreinigung pulverförmig vorliegen, in Wasser und versucht diese Lösung zu analysieren, ist es sehr schwierig, ein stabiles Spray zu erzeugen. Um die Salzfracht aus der Lösung zu verringern, wurde die Lösung angesäuert, was zum Ausfall der Nanopartikel führte. Durch die Protonierung der Carboxylatgruppen der MSA-Moleküle verlieren die Nanopartikel sukzessive ihre negative Ladung und somit auch den Schutz vor Agglomeration durch die gegenseitige Abstoßung. Nach Zentrifugation wird der salzhaltige Überstand verworfen. Das Präzipitat kann leider nicht mit wässrigem Methanol, sondern nur in schwach basischer NaOH oder ammoniakalischer Lösung wieder in Lösung gebracht werden.

Auch Versuche, die Nanopartikel auf einer Ionentauschersäule zu fixieren und nach Waschung mit Säure zu eluieren schlugen fehl, da die Wechselwirkung aufgrund der vielen Carboxylatgruppen auf der Oberfläche der Partikel zu stark für eine Elution mit verdünnter Säure waren.

Schließlich konnte mit einer schwach angesäuerten und 50 %igen methanolischen Lösung ein Spray erzeugt werden, welches jedoch im Vergleich relativ instabil war und während der Messung eine sehr unregelmäßige Ionisation ergab, was sich in großen Signalschwankungen bemerkbar machte.

In Abb. 80 ist ein mit dieser Probenvorbereitung erhaltenes Massenspektrum zu sehen. Der Messbereich liegt zwischen $m/z = 50$ und $m/z = 2000$, wobei nur der höhere Massenbereich gezeigt ist, da nur dort Signale von Nanopartikeln zu erwarten sind. Aufgrund des in Abb. 81 zu erkennenden Isotopenmusters, welches die typische Verteilung für ein Silbercluster aufweist, und des Abstandes zwischen den prominenten Signalen von $\Delta m/z = 1$ kann auf ein zweifach geladenes Molekül geschlossen werden. Durch die Berechnung möglicher Ag-MSA-Verbindungen mit unterschiedlicher Anzahl von Silberatomen und MSA-Molekülen können den

einzelnen Signalgruppen, die in der unterstehenden Abbildung aufgeführten Summenformeln zugeordnet werden. Die Signalintensität ist sehr schwach und es kann vermutet werden, dass noch andere Clustersignale vorhanden sind, diese aber aufgrund ihrer zu geringen Intensität im Rauschen des Untergrundes untergehen. Das größte Signal kommt von dem Cluster $\text{Ag}_9\text{MSA}_8\text{Na}_x\text{-H}_{(x-1)}$. Dieses Cluster stellt aber auf keinen Fall den Nanopartikel dar, denn dieser müsste aufgrund aller bisher gefundenen Hinweise durch HPLC- und GE-Messungen wesentlich größer sein. Dieses Ergebnis lässt nun zwei Vermutungen zu. Zum Ersten besteht die Möglichkeit, dass intakte Partikel so wie die detektierten Cluster ebenfalls nur zweifach geladen sind und sich deshalb aufgrund ihres hohen Masse-Ladungsverhältnisses außerhalb des beobachteten Massenbereiches befinden. Zum Zweiten ist es möglich, dass das Partikel während der Ionisation in kleinere stabilere Cluster zerbricht. Die tatsächliche Ursache konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht herausgefunden werden.

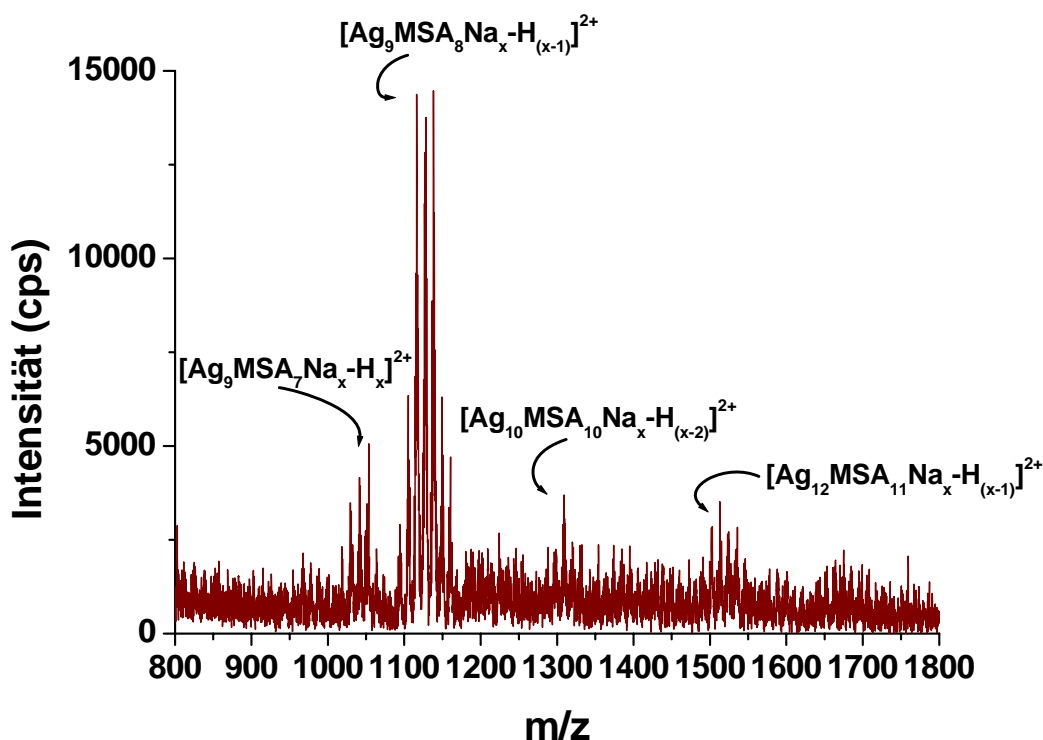


Abb. 80 Positives ESI-MS Spektrum der Probe P17. Zu erkennen sind Fragmente aus 9, 10 und 12 Silberatomen mit einer unterschiedlichen Anzahl an MSA-Molekülen, bei denen die Protonen der Carboxylgruppen teilweise durch Natrium ersetzt sind.

Die einzelnen Signalserien konnten den in Abb. 80 aufgeführten Summenformeln durch Kombination von möglichen Ag-MSA-Clustern unter Berücksichtigung der Isotopie von Silber und der möglichen Substitution von Säureprotonen durch Natrium zugeordnet werden. Eine Detailaufnahme der Signalgruppe von $[\text{Ag}_9\text{MSA}_8\text{Na}_x\text{-H}_{(x-1)}]^{2+}$ zeigt sehr deutlich die Substitution von Protonen der Carboxylatgruppe durch Natrium (siehe Abb. 81). Die Abstände der einzelnen Maxima liegen um 11 Masseneinheiten auseinander, was bei doppelter Ladung einem Δm von 22 und somit eines Austausches von H (m/z 1) durch Na (m/z 23) entspricht. Es ist zu erkennen, dass die Verteilung der Substitution einer Normalverteilung folgt.

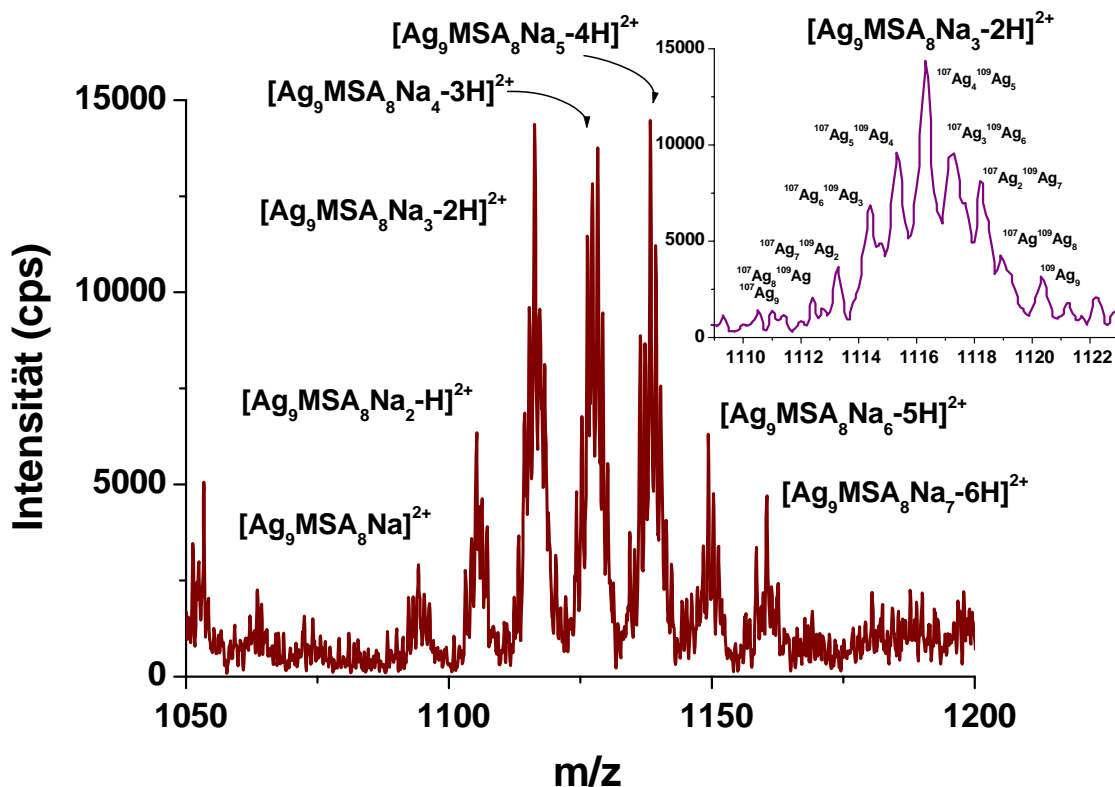


Abb. 81 Detailausschnitt aus Abb. 80. Einzelnen Natriumaddukte des Clusters Ag_9MSA_8 sind erkennbar. Im Inlet ist das Isotopenmuster von Silber zu erkennen.

Schaut man sich eine Vergrößerung des Signals einer einzelnen Spezies an (siehe Inlet Abb. 81), so wird das Isotopenmuster sichtbar, welches mit dem theoretisch berechneten^[79] (siehe Abb. 82) übereinstimmt. Das Hauptpattern beruht auf der Verteilung des Silbers, welches zwei stabile Isotope besitzt (^{107}Ag zu 51,839 % und ^{109}Ag zu 48,161 %). Durch die zweifache Ladung beträgt der Abstand zwischen den Hauptsignalen eine Masseneinheit. Dazwischen, also auf halben Massen, befinden sich die durch das Kohlenstoffisotop ^{13}C hervorgerufenen Signale. Das natürliche Vorkommen beträgt nur 1,07 %, allerdings befinden sich im Molekül 32 Kohlenstoffatome, was die Größe der Signale erklärt. Die Auflösung des Massenspektrometers genügte nicht, um diese Signale vollständig aufzulösen.

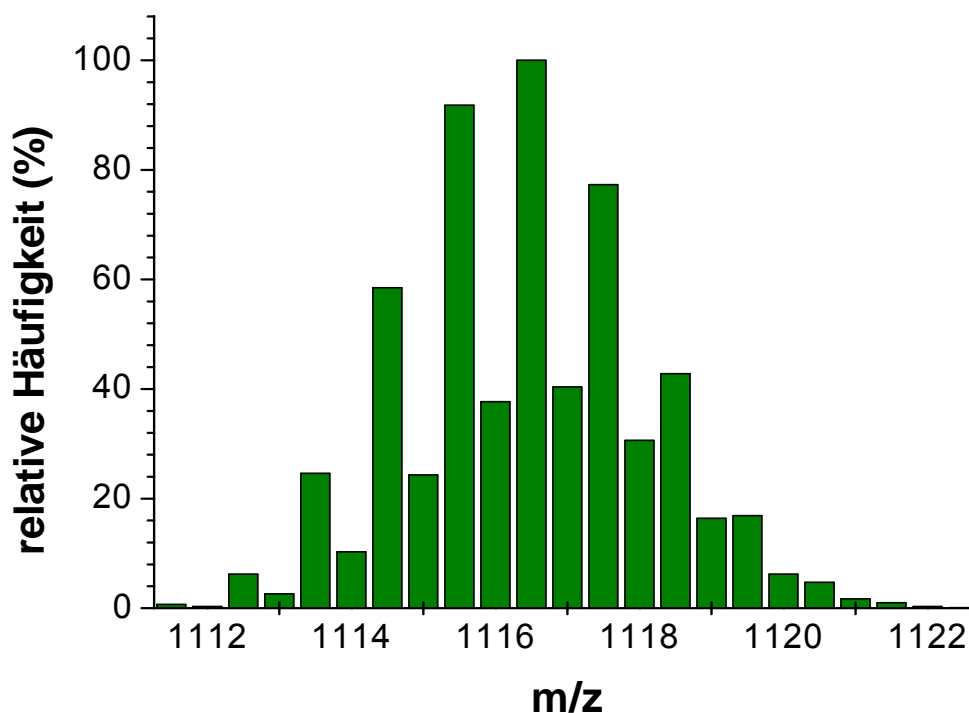


Abb. 82 Errechnetes Isotopenmuster für das Ion $\text{Ag}_9\text{C}_{32}\text{O}_{32}\text{S}_8\text{H}_{39}\text{Na}_3^{2+}$.

Bei der Analyse der Probe Au_{klein} verhielt es sich ähnlich wie auch schon bei den Silbernanopartikeln. Es war nicht möglich, ein intaktes Nanopartikel zu detektieren. Auch hier waren nur Fragmente zu beobachten, mit dem Unterschied, dass diese kleiner als beim Silber waren und eine Ionisation nur im negativen Modus des Massenspektrometers möglich war. In Abb. 83 ist das Spektrum der Probe zu sehen.

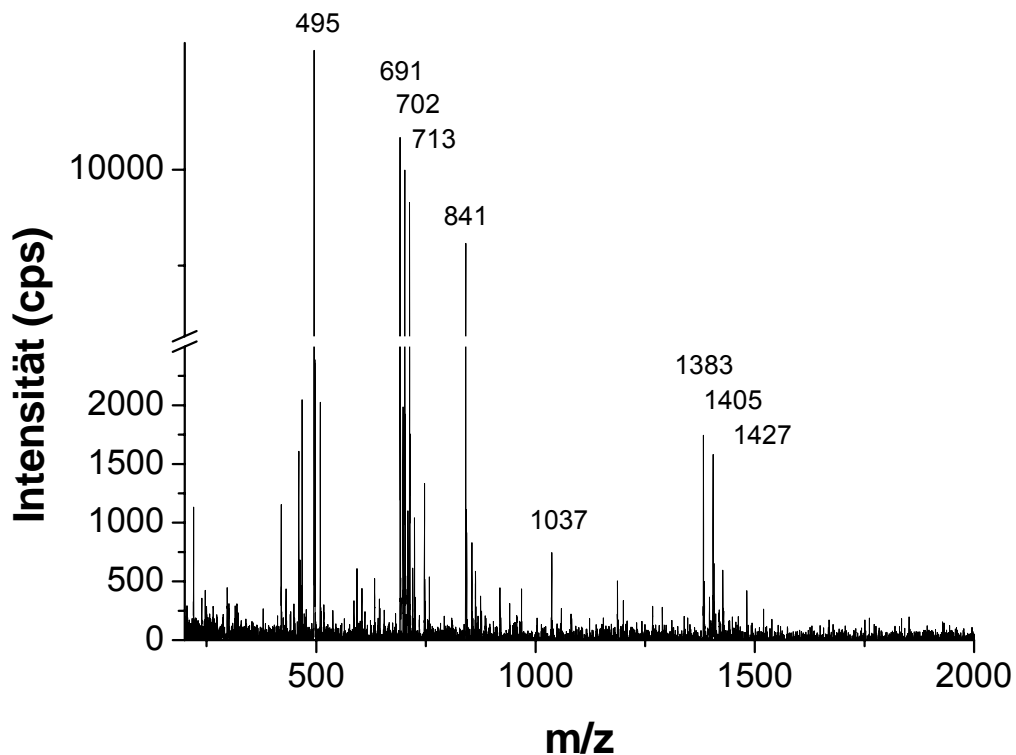


Abb. 83 Negatives ESI-MS Spektrum der Probe Au_{klein}

Aufgrund des monoisotopischen Vorkommens von Gold ist das Spektrum einfacher strukturiert. Jedoch wird eine zweifelsfreie Identifikation der einzelnen Signale durch das Fehlen eines Isotopenmusters erschwert und kann nur durch MS-MS-Experimente bestätigt werden.

Das Signal auf der Masse m/z 1383 entspricht $[\text{Au}_4\text{MSA}_4\text{-H}]^-$ und durch Akkumulation dieses Ions in der Ionenfalle des ESI-MS mit anschließender Energieeinkopplung von 15 V, konnte das Molekül fragmentiert werden (siehe Abb. 84).

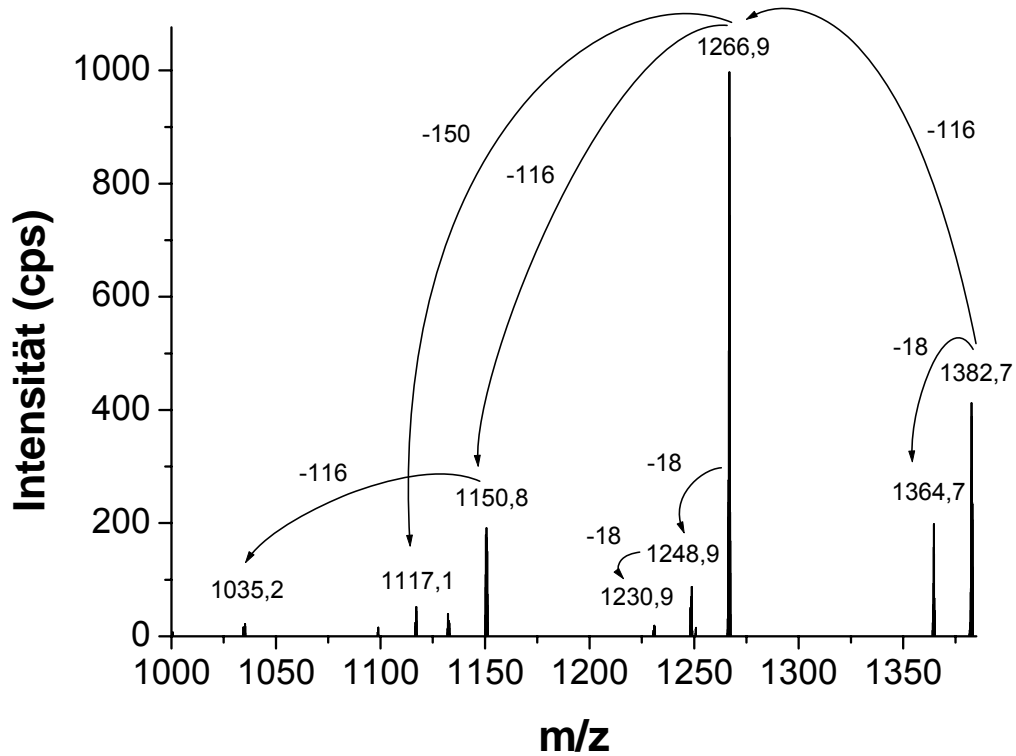


Abb. 84 Negatives MS/MS-Spektrum des Ions 1383. Der sukzessive Verlust von Wasser ($\Delta m = 18$) und MSA ($\Delta m = 150$) und der Bruch zwischen Schwefel und Kohlenstoff ($\Delta m = 116$) ist erkennbar.



Der Verlust von $\Delta m = 150$ kommt zustande, weil zu dem abgespaltenen MSA-Molekül noch ein Proton verloren geht, so dass die Ladung des resultierenden Ions wieder einfach negativ wird. Im Fall von $\Delta m = 116$ wird ein Proton angelagert, damit die einfach negative Ladung des Ions erhalten bleibt.

In untenstehender Tabelle sind die Fragmentationen des Ions 1383 aufgelistet.

m/z	Molekül	Bemerkung
1383	$[\text{Au}_4\text{MSA}_4\text{-H}]^-$	
1365	$[\text{Au}_4\text{MSA}_4\text{-H-H}_2\text{O}]^-$	Verlust von Wasser
1267	$[\text{Au}_4\text{MSA}_3\text{S}]^-$	Bruch der Bindung zwischen S und C in einem MSA-Molekül
1151	$[\text{Au}_4\text{MSA}_2\text{SSH}]^-$	Zweiter Bruch in einem MSA-Molekül
1117	$[\text{Au}_4\text{MSA}_2\text{S-H}]^-$	Verlust eines ganzen MSA-Moleküls von 1267
1035	$[\text{Au}_4\text{MSA}(\text{SH})_2\text{S}]^-$	Dritter Bruch in einem MSA-Molekül

In Abb. 83 sind des weiteren Natriumaddukte von $[\text{Au}_4\text{MSA}_4\text{-H}]^-$ zu erkennen (1405 und 1427) mit einem $\Delta m = 22$. $[\text{Au}_3\text{MSA}_3\text{-H}]^-$ bei 1037, $[\text{Au}_2\text{MSA}_3]^-$ bei 841 und $[\text{AuMSA}_2]^-$ bei 495 sind weitere einfach negativ geladene Cluster. Als doppelt geladene Spezies tritt $[\text{Au}_4\text{MSA}_4\text{-2H}]^{2-}$ mit seinen Natriumaddukte bei 691, 702 und 713 auf und $[\text{Au}_2\text{MSA}_3\text{-H}]^{2-}$ bei 420.

Allen detektierten Cluster ist gemein, dass das Gold einwertig vorliegt. Dies kann für alle oben aufgeführten Cluster überprüft und verifiziert werden. Für die Komplexe aus Kapitel 4.2.2.4.2 konnte das gleiche Ergebnis gefunden werden.

Nach den erhaltenen Ergebnissen kann man sagen, dass ESI-MS nicht die optimale Methode ist, um Silber- oder Gold-MSA-Nanopartikel zu charakterisieren. Es konnten keine intakten Partikel detektiert werden. Die beobachteten Signale stellen kleinere Cluster dar, die sich wahrscheinlich während des Ionisationsprozesses als solche von der Partikeloberfläche gelöst haben. Sie lassen keine Aussage über die ursprüngliche Größe des Partikels zu.

4.2.4 TEM-Aufnahmen

Um die Verlässlichkeit der durch die HPLC-Methode erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Größe der Citrat stabilisierten Nanopartikel zu prüfen, wurden TEM-Aufnahmen des Standardclusters mit 20 nm Durchmesser und der zwei synthetisierten Proben C und D mit jeweils 16 nm und 22 nm Durchmesser gemacht. In Abb. 85 ist das 20 nm Standardcluster zu sehen und der ermittelte Durchmesser von $19,2 \pm 2,1$ nm stimmt mit den Angaben des Herstellers ($20 \text{ nm} \pm 15 \%$) im Rahmen der Fehlergrenzen überein.

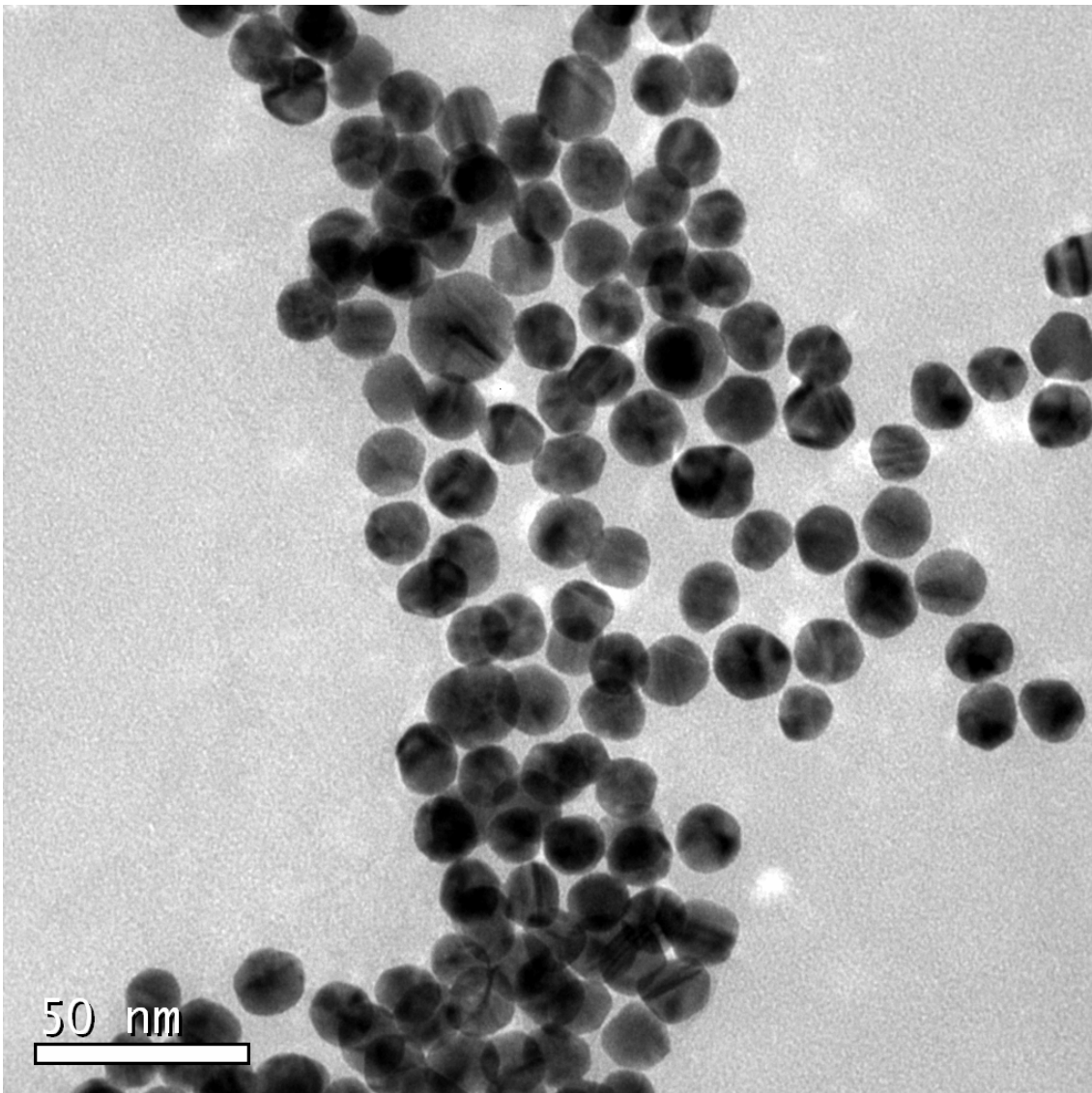


Abb. 85 TEM-Aufnahme des gekauften Standardclusters mit nominell 20 nm Partikeldurchmesser

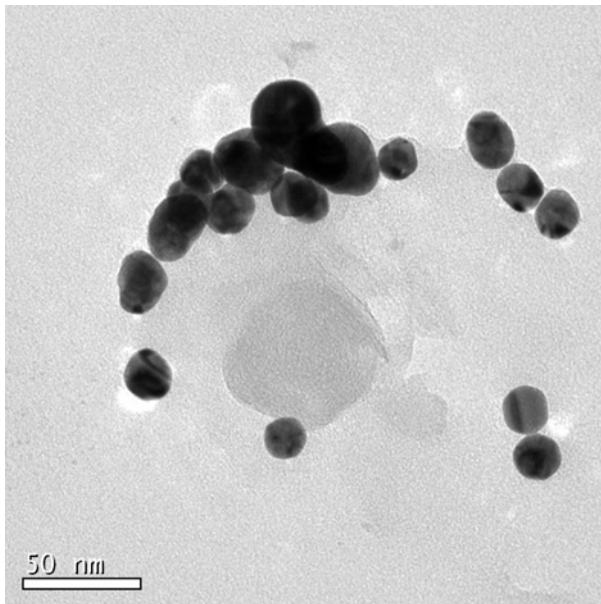


Abb. 86 TEM-Aufnahme der Probe D mit einem Durchmesser von 21nm (durch HPLC)

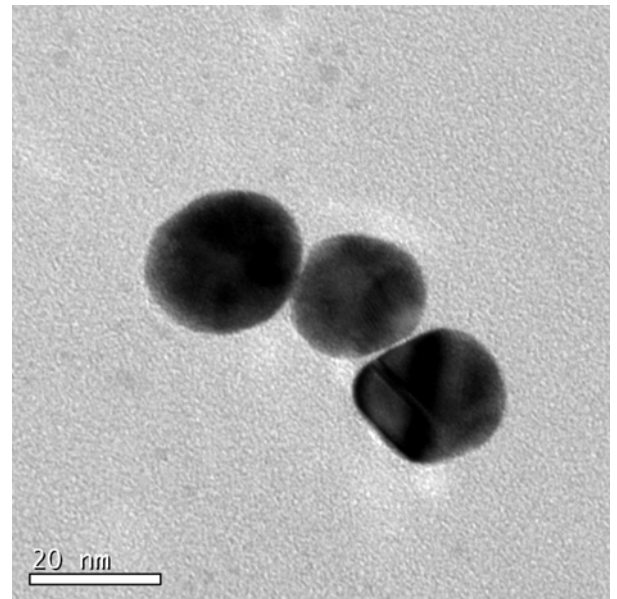


Abb. 87 Zoom einer TEM-Aufnahme der Probe D

In Abb. 86 und Abb. 87 ist das Bild der Probe D zu sehen, welcher nach Auswertung der Aufnahme ein Partikeldurchmesser von $21,9 \pm 2,5$ nm zugeordnet werden kann, was auch gut mit dem durch die SEC-Analyse erhaltenen Ergebnis von 21,3 nm übereinstimmt.

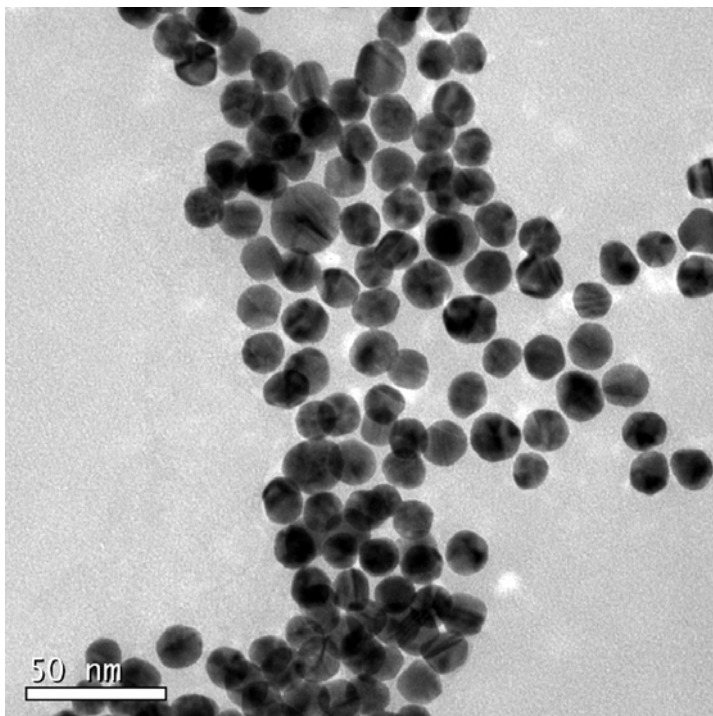


Abb. 88 TEM-Aufnahme der Probe C

In Abb. 88 ist Probe C zu sehen, bei der der Durchmesser zu $15,9 \pm 1,9$ nm bestimmt werden konnte. Auch hier ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den HPLC-Werten.

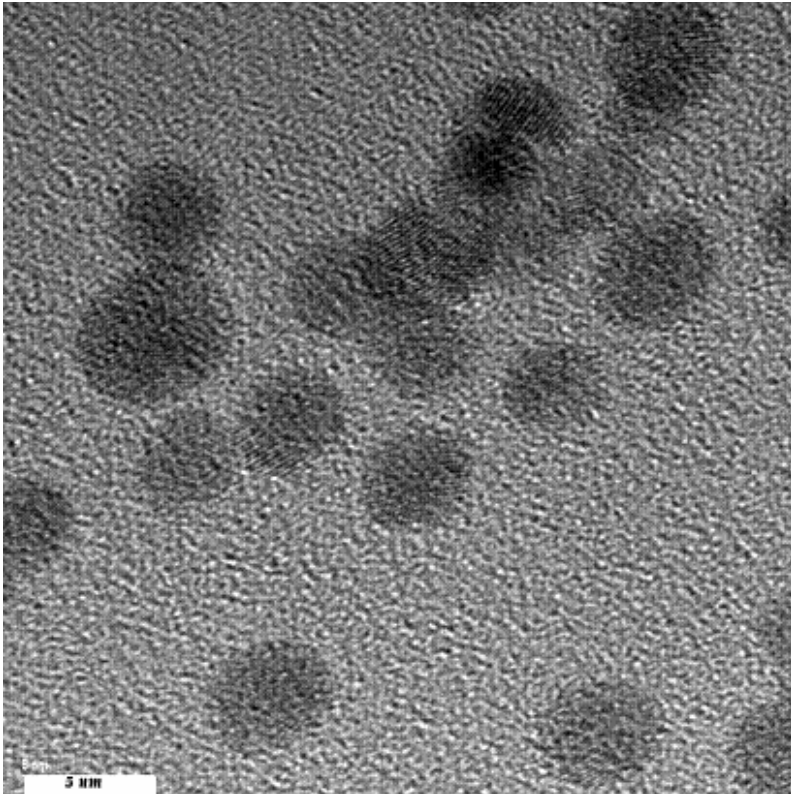


Abb. 89 hochauflöste TEM-Aufnahme des 5 nm-Standards

Auch die Aufnahme des 5nm-Standards in Abb. 89 zeigt mit $4,6 \pm 1,1$ nm eine gute Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert von 5 nm.

Im Gegensatz zu den Au-Citrat-Partikeln konnten bei den Au-MSA-Partikeln keine einzelnen Partikel aufgenommen werden. Wie in Abb. 90 zu sehen ist, liegen die Partikel dicht zusammen. Die Auswertung der Größe wurde dadurch erschwert, da die physische Grenze der einzelnen Partikel nicht zweifelsfrei erkannt werden kann und die Messung des Durchmessers nicht bei allen Partikeln zu einem eindeutigen Ergebnis führt. Die Partikel zeigen eine weitgehend homogene Größenverteilung, weshalb der durchschnittliche Durchmesser durch Auswertung einzelner weniger Partikel auf $3,1 \pm 0,4$ nm bestimmt werden konnte.

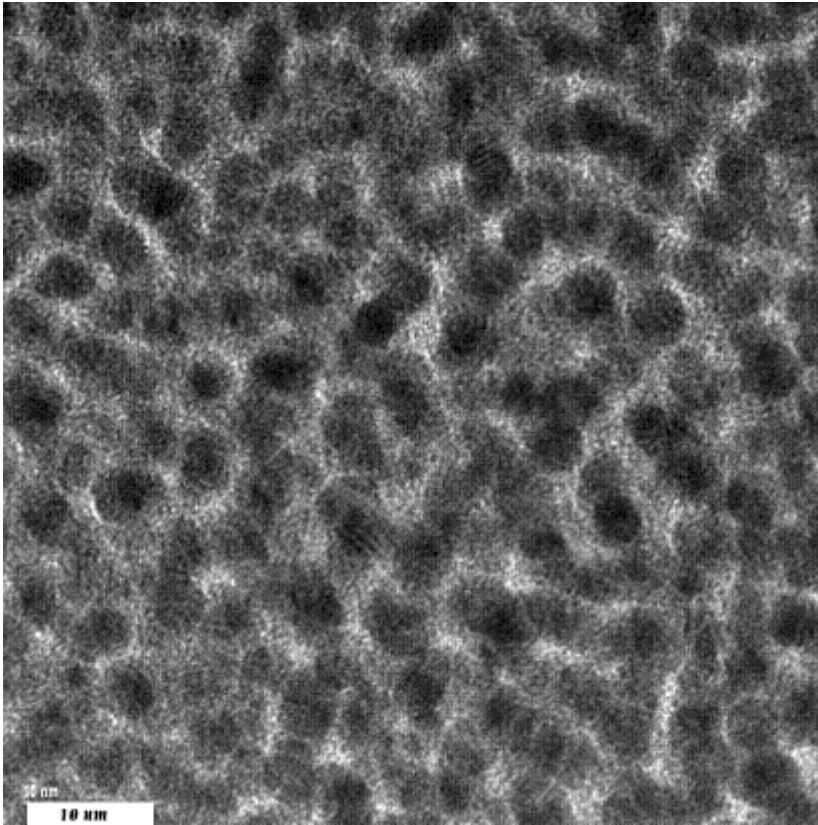


Abb. 90 hochaufgelöste TEM-Aufnahme der Probe Au_{klein}

4.3 Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen

Nachdem verschiedene Nanocluster mit Hilfe der GE-ICP-MS-Kopplung untersucht und deren migratives Verhalten im Gel studiert wurde, muss verifiziert werden, dass auch diese Analysentechnik für die Untersuchung der zu markierenden Zielmoleküle geeignet ist. Hierzu wird im Vergleich zwischen der traditionellen Plattengel-elektrophorese und der Röhrengel-elektrophorese eine prinzipielle Übertragbarkeit von Trennergebnissen aufgezeigt und die Detektion von einzelnen Proteinen aus einem Proteingemisch unter Nutzung der in ihnen natürlich vorkommenden Atome Phosphor und Schwefel beschrieben.

Die elektrophoretische Trennung von Proteingemischen auf Gelplatten ist eine weit verbreitete Routinetechnik und findet sich in nahezu jedem bioanalytischen Laboratorium wieder. Die wohl typischste und zugleich effektivste Variante ist die sogenannte 2D-Gelelektrophorese. Hierbei werden die Proteine nach einer isoelektrischen Fokussierung (Auftrennung aufgrund der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der einzelnen Proteine) auf einem IPG-Streifen (immobilized pH gradient) auf ein SDS-PA-Gel (sodium dodecylsulfate polyacrylamid) geblottet und dort bei einer zweiten elektrophoretischen Trennung nach ihrer Größe getrennt. Die Trennleistung ist sehr hoch, jedoch bereitet die Quantifizierung der einzelnen Proteine stellenweise Probleme. In der Regel werden die Gelplatten mit einer Anfärbelösung versetzt, um die Proteine im Gel zu fixieren und sichtbar zu machen. Die Intensität der Färbung von Proteinen ist jedoch proteinspezifisch und solche, die nur in geringsten Konzentrationen vorhanden sind (so genannte low abundant proteins) können auf diese Weise oft gar nicht erfasst werden. Für weiterführende Untersuchungen bezüglich der Struktur oder auch zur Quantifizierung der Proteine müssen die einzelnen Spots aufwendig aus dem Gel herauspräpariert werden, und die Gefahr einer Kontamination oder Degradation ist nicht auszuschließen.

Eine direkte Analyse, sei sie quantitativen oder qualitativen Charakters, im Anschluss an die Trennung im Gel ohne weitere Arbeitsschritte, die die Proteine in ihrer Art verändern oder ihrer Menge vermindern könnte, wäre eine willkommene und in bestimmten Fällen sogar unabdingbare Alternative zu der etablierten GE auf Platten. Die in Kapitel 3.4.2 vorgestellte Röhrengel-elektrophorese ist in der Lage, die

Analytmoleküle nach ihrer Trennung ohne weitere Arbeitsschritte, da online koppelbar, einem geeigneten Detektor zuzuführen. Die oben aufgeführte 2D-Gelelektrophorese stellt eine zwar effektive aber auch komplizierte Variante dar, die als solche nicht unmittelbar auf ein eindimensionales Röhrchen übertragbar ist. Zum Studium der Machbarkeit gelelektrophoretischer Trennungen im Röhrchen und dem Vergleich mit der traditionellen Plattengelelektrophorese, wurde die einfachste Version, eine 1D-Trennung in einem nativen Agarosegel gewählt. Der Vergleich der Trennexperimente von denselben Proteinlösungen unter vergleichbaren Bedingungen im Röhrchen und auf der Platte soll die prinzipielle Äquivalenz der beiden Methoden und die Übertragbarkeit untereinander aufzeigen.

4.3.1 Plattengel

Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit der herkömmlichen auf Gelplatten durchgeführten Gelelektrophorese mit der im Rahmen dieser Arbeit benutzten GE-ICP-MS-Kopplung wurden die Ergebnisse der Trennung der Proteine α - und β -Casein verglichen.

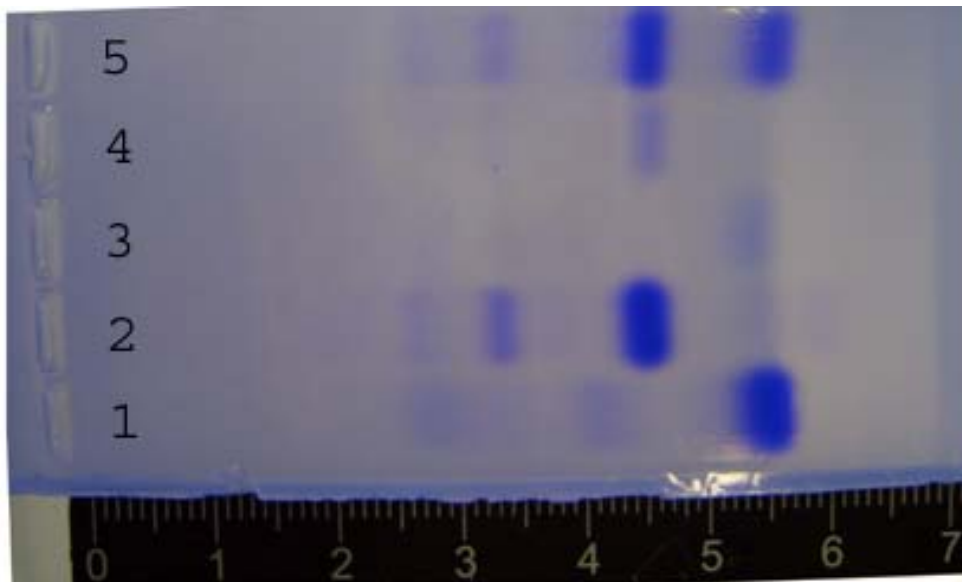


Abb. 91 Gelelektrophoretische Trennung von α -Casein (Linien 1 und 3) und β -Casein (Linien 2 und 4, Linie 5 ist eine Mischung aus beiden) unter nativen Bedingungen. Anfärbung mit Coomassie-Blau

Die Proteine wurden auf einer herkömmlichen Gelplatte elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Ergebnisse sollten sich von denen der Röhrentrennung nicht unterscheiden, da ansonsten eine Veränderung bzw. Störung des Trennmechanismus vorliegen würde.

Das in Abb. 91 abgebildete Gel zeigt die Trennung von α - und β -Casein unter nativen Bedingungen. Es handelte sich bei dem Gel um 5 %ige Agarose (NuSieve) in 50 mmolL⁻¹ Tris/Boratpuffer bei pH = 8,8. Das Gel wurde wie in Kapitel 3.5.1.1 beschrieben hergestellt und angefärbt. Die Lauffront von Bromphenolblau befand sich nach Beendigung der Trennung bei 100 mm. In den Reihen 1 und 3 ist α -Casein, in den Reihen 2 und 4 β -Casein und in Reihe 5 eine Mischung aus beiden zu sehen. Die Konzentrationen betragen 10 mgmL⁻¹ für Reihe 1 und 2, 1 mgmL⁻¹ für Reihe 3 und 4 und 5 mgmL⁻¹ für Reihe 5.

Neben den Hauptbanden bei 55 mm für α -Casein und 45 mm für β -Casein sind noch weitere zu erkennen, die, worauf die schwächere Färbung hinweist, in einer deutlich geringeren Konzentration in der Proteinlösung vorkommen. Es handelt sich hierbei um Verunreinigungen oder Abbauprodukten der Proteine. Die Bande bei 55 mm in Reihe 2 liegt auf derselben Höhe wie die Hauptbande von α -Casein, was vermuten lässt, dass es sich hierbei um α -Casein handelt.

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass dieses einfache Proteinsystem gut trennbar ist und scharf abgegrenzte Proteinbanden ergibt. Beide Proteine sind in der Literatur eingehend beschrieben und enthalten für die ICP-MS detektierbare Atome (Phosphor und Schwefel). Sie sind deshalb geeignet zum Vergleich beider gelelektrophoretischer Trennsysteme.

4.3.2 GE-Kopplung

Um zu zeigen, dass die gelelektrophoretische Trennung im Röhren mit anschließender direkter Detektion im Prinzip funktioniert und somit auf Proteine allgemein und Proteinkonjugate im Speziellen angewandt werden kann, wurden die beiden Caseine erst einzeln und dann als Mischung der Gelelektrophorese

unterworfen. Als Detektor diente ein UV/Vis-Detektor, der die Absorption des Eluenten bei einer Wellenlänge von 214 nm maß.

In Abb. 92 ist ein Elektropherogramm einer Probe aus Bromphenolblau (1) und α -Casein (2) zu sehen. Bromphenolblau erscheint als ein weitgehend symmetrisches Signal und α -Casein zeigt am Signalende eine leicht tailende Schulter.

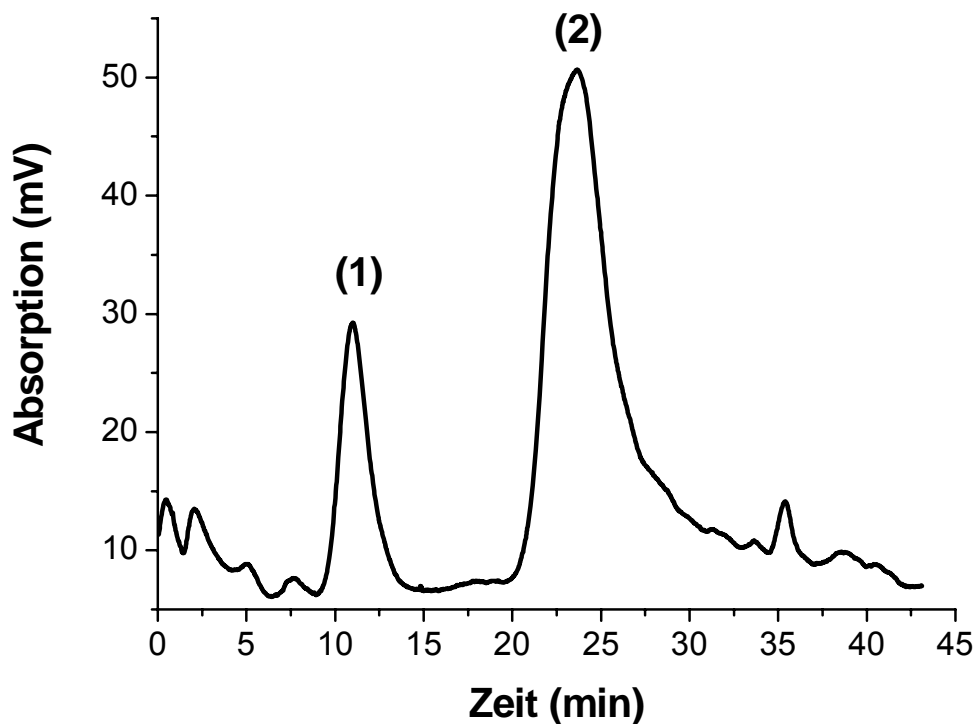


Abb. 92 Elektropherogramm einer Mischung aus Bromphenolblau (1) und α -Casein (2); Detektion bei $\lambda = 214$ nm

Unter den gleichen Bedingungen wurde eine Mischung aus Bromphenolblau (1) und β -Casein (3) analysiert (siehe Abb. 93). Die Signalformen sind ähnlich denen in Abb. 92: (1) symmetrisch und (3) mit leichtem Tailing. Zudem ist noch ein weiteres Signal (2a) zu erkennen, was auf eine Verunreinigung der Proteinprobe hindeutet und aufgrund der gleichen Migrationszeit α -Casein sein könnte.

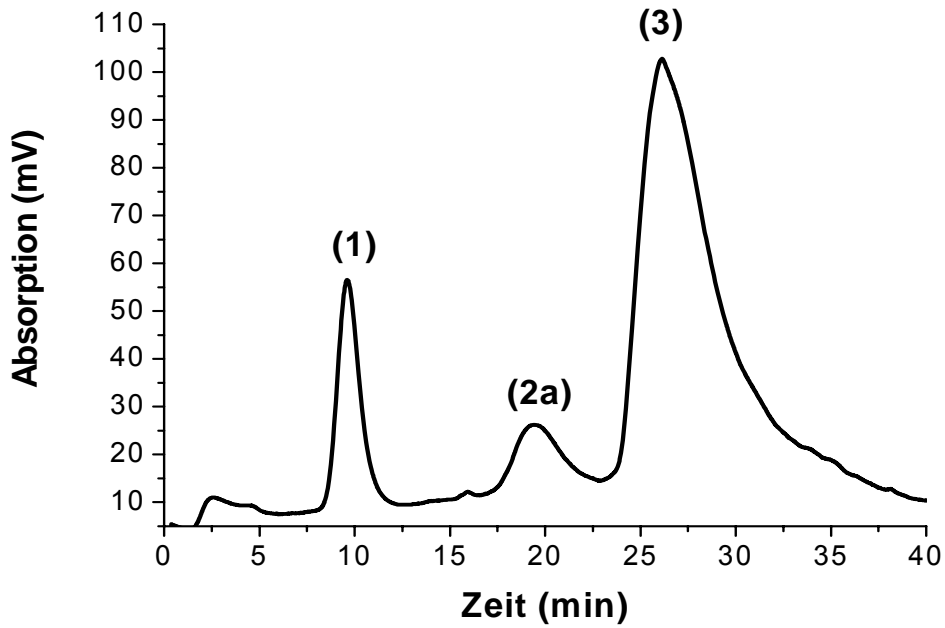


Abb. 93 Elektropherogramm einer Mischung aus Bromphenolblau (1) und β -Casein (3), das eine Verunreinigung (2a) enthält; Detektion bei $\lambda = 214$ nm

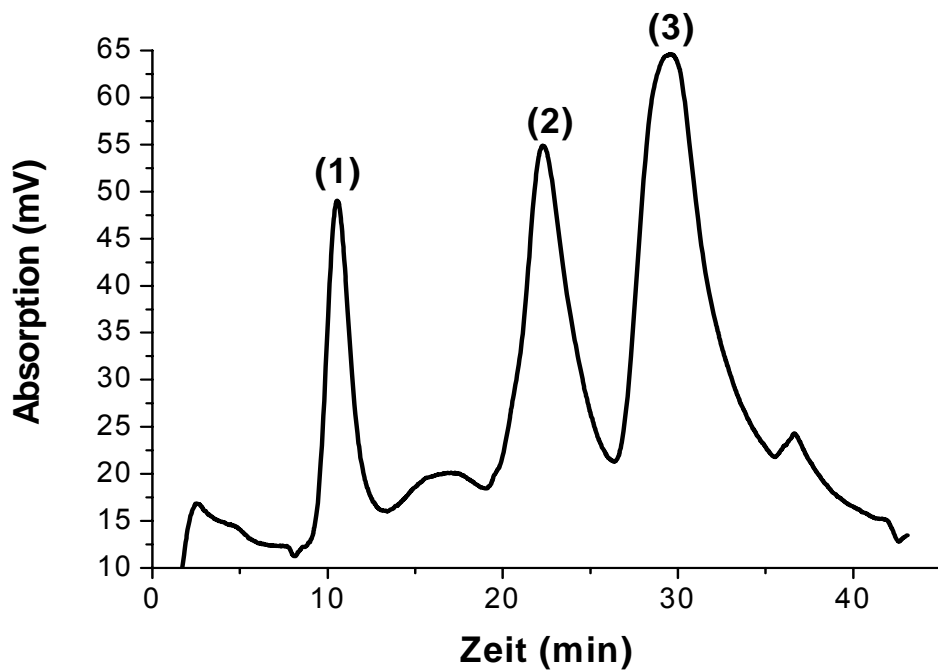


Abb. 94 Elektropherogramm einer Mischung aus Bromphenolblau (1), α -Casein (2) und β -Casein (3); Detektion bei $\lambda = 214$ nm

In Abb. 94 schließlich ist die Separation der beiden Caseine zu sehen. Beide Verbindungen konnten innerhalb von 40 min vollständig voneinander getrennt werden.

Die in den Abbildungen Abb. 92 bis Abb. 94 gezeigten Messungen wurden unter den in Tab. 14 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Konzentration der Proteinlösung betrug $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ und das Aufgabevolumen $3 \mu\text{L}$, was bedeutet, dass eine absolute Menge von $2,1 \mu\text{g}$ Protein aufgegeben wurde.

Die gleichen Proteine wurden auch mit der ICP-MS als Detektor unter leicht geänderten geänderten Separationsbedingungen (siehe Tab. 15) untersucht, wodurch auf Grund der Elementspezifität des Detektors das atomare Verhältnis von Phosphor und Schwefel, und somit durch Kenntnis der Anzahl der schwefelhaltigen Aminosäuren auch der Phosphorylierungsgrad, bestimmt werden konnte.

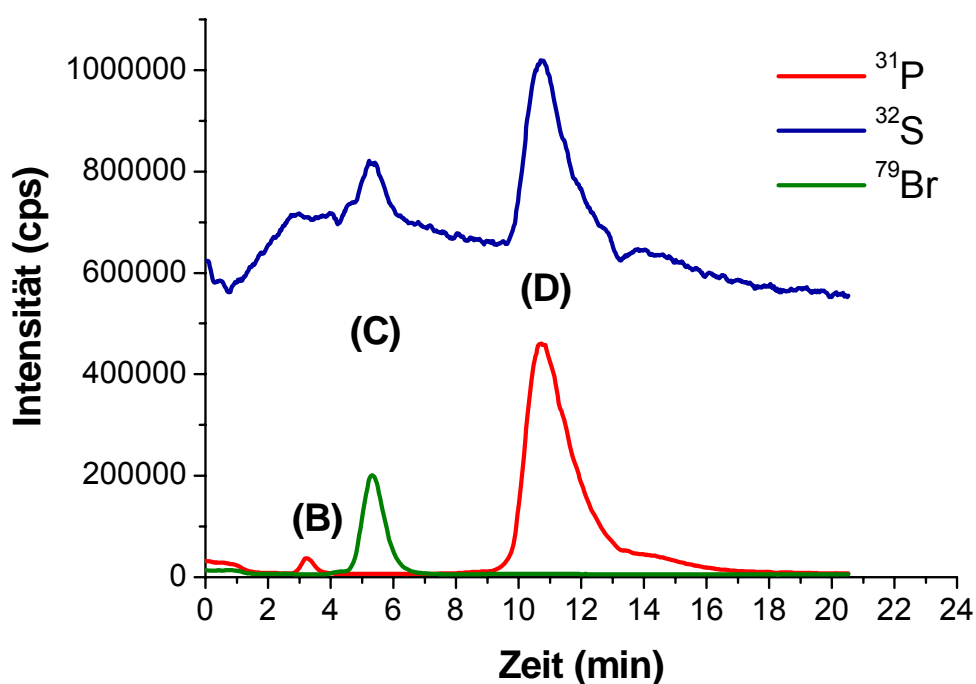


Abb. 95 Elektropherogramm einer Mischung aus Bromphenolblau (C) und α -Casein (D). (B) konnte als Phosphat identifiziert werden.

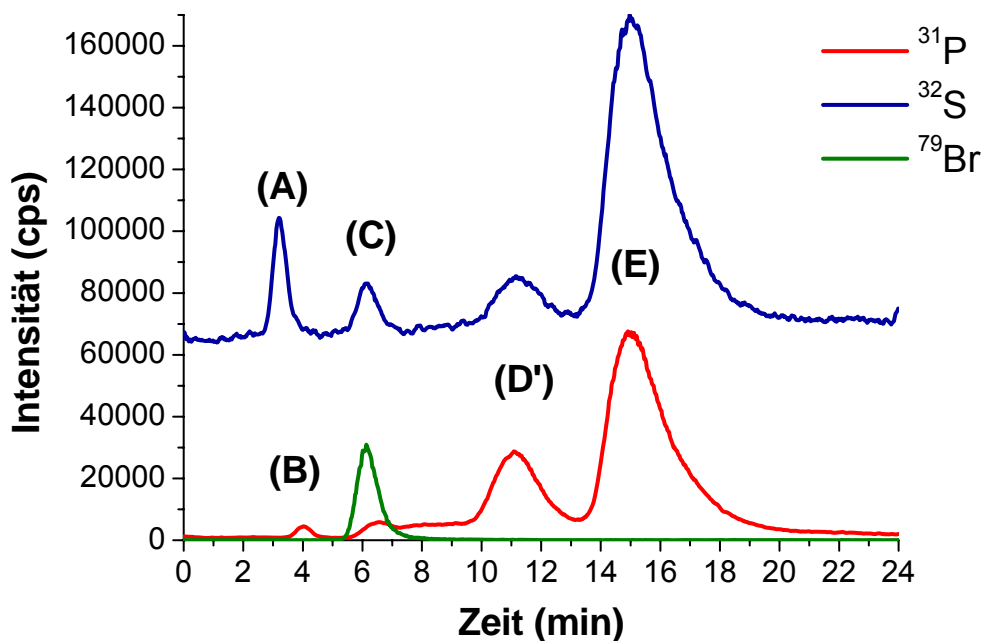
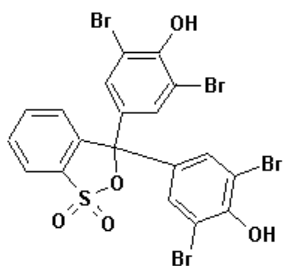


Abb. 96 Elektrochromatogramm einer Mischung aus Bromphenolblau (C) und β -Casein (E). Neben Phosphat (B) konnte auch Sulfat (A) identifiziert werden. Wie in Abb. 93 ist auch hier die Verunreinigung (D') detektierbar.

Wie in den Elektrochromatogrammen mit UV-Detektion, sind auch mit dem ICP-MS die Proteine und der Farbstoff detektierbar. Als elementselektiver Detektor ist das ICP-MS in der Lage, zwischen den einzelnen Elementen der separierten Verbindungen zu unterscheiden. So sieht man nach etwa 6 min einen Anstieg im Signal des Broms und des Schwefels. Die Fraktion besteht aus Bromphenolblau, welches ein Schwefel- und vier Bromatome enthält¹¹. Ebenso kann man bei der Elution der Caseine das Schwefel- und das Phosphorsignal beobachten, da die Proteine im Aminosäurengerüst die schwefelhaltige Aminosäure Methionin enthalten und zudem



noch an verschiedenen Serinresten phosphoryliert sind. Des Weiteren sind im Elektropherogramm auch noch Spezies wie Phosphat und Sulfat detektierbar, die mit dem UV-Detektor nicht zu erkennen waren.

Aus Tab. 19 ist unter anderem die Anzahl schwefelhaltiger und phosphorylierbarer Aminosäuren der untersuchten Proteine zu entnehmen.

Tab. 19 Ausgewählte Charakteristika von α - und β -Casein und Ovalbumin (Quelle: www.expasy.org)

Protein	α -Casein (bovine)	β -Casein (bovine)	Ovalbumin (chicken)
SWISS-PROT Eintragsnummer	P02662	P02666	P01012
Anzahl der Aminosäuren	199	209	385
Molekulargewicht	22974,8	23583,2	42750
pI	4,91	5,13	5,19
Anzahl Cys	0	0	6
Anzahl Met	5	6	16
Anzahl Ser	9	5	1,9 ^[80]
Anzahl Tyr / Thr	10 / 5	4 / 9	10 / 15

Um eine Aussage über den Phosphorylierungsgrad eines Proteins machen zu können, muss die in ihm enthaltene Anzahl von Schwefelatomen bekannt sein und das beobachtete ^{32}S -Signal darf einzig und alleine vom Proteinschwefel herrühren, d.h. andere schwefelhaltige Spezies müssen effektiv vom Protein abgetrennt worden sein. In den Elektropherogrammen sind Sulfat- und Phosphatsignale zu erkennen, so dass eine direkte Analyse der Probenlösung ohne vorherige Trennung durch das Gel zu falschen Ergebnissen geführt hätte.

Des Weiteren muss das Verhältnis der molaren Signalintensitäten von Schwefel und Phosphor, also die Intensität bei gleicher Anzahl von Atomen in der Kalibrationslösung, bestimmt werden. Hierzu wird über den kontinuierlichen Eintrag einer Mischung aus einer Schwefel- und einer Phosphorstandardlösung das Isotopenverhältnis $^{31}\text{P}/^{32}\text{S}$ gemessen und, da Standardlösungen im Allgemeinen auf eine Massenkonzentration und keine molare Konzentration zertifizieren sind, auf die Anzahl der ins Plasma eingetragenen Atome umgerechnet. Das Verhältnis ist in

erster Linie abhängig von der Isotopenhäufigkeit, vom Verhalten der Spezies in der Zerstäuberkammer, von der Ionisierung im Plasma, vom Verlust an Atomen durch Clusterbildung und vom Verhalten der Ionen im Interfacebereich und in der Ionenoptik (charge-space-Effekte). Der größte Effekt geht von den unterschiedlichen Ionisierungsenergien von 10,36 eV für den Schwefel und 10,486 eV für den Phosphor aus und erklärt eine höhere Intensität des Schwefelsignals bei gleicher Konzentration. Die bestimmten Isotopenverhältnisse $^{31}\text{P}/^{32}\text{S}$ lagen zwischen 0,6 und 0,8. Diese Werte schwankten von Tag zu Tag, was an unterschiedlichen Plasmabedingungen nach dem täglichen Tuning lag und mussten daher vor jeder neuen Messreihe bestimmt werden.

In Abb. 97 wurde erst eine Mischung aus verdünnten Standardlösungen mit 250 ngL^{-1} Schwefel und Phosphor und anschließend das zur Verdünnung benutzte Wasser zur Bestimmung des Blindwertes kontinuierlich ins ICP-MS eingetragen. Das Intensitätenverhältnis $R(^{31}\text{P}/^{32}\text{S})$ der Probe betrug 0,774. Da im Vergleich zum Schwefelstandard im Phosphorstandard gleicher Massenkonzentration auf Grund der geringeren Masse von P 3,23 % mehr Atome enthalten sind, wird das gemessene Verhältnis R auf 0,750 korrigiert und stellt nun das Intensitätenverhältnis von Phosphor und Schwefel bei Eintrag äquimolarer Lösungen der beiden Elemente dar. Mit Kenntnis der molaren Intensitätenverhältnisse kann man nun bei bekannter Anzahl von Schwefelatomen im betreffenden Molekül die Anzahl der Phosphoratome errechnen. Das Isotopenverhältnis des Schwefels muss man bei diesem Vorgehen nicht berücksichtigen, da sich der Abzug der Schwefelisotope 33 und 34 bei der Berechnung des Intensitätenverhältnisses und der „Aufschlag“ bei der späteren Rückrechnung des gemessenen Schwefels 32 auf den Gesamtschwefel im Protein wieder aufhebt.

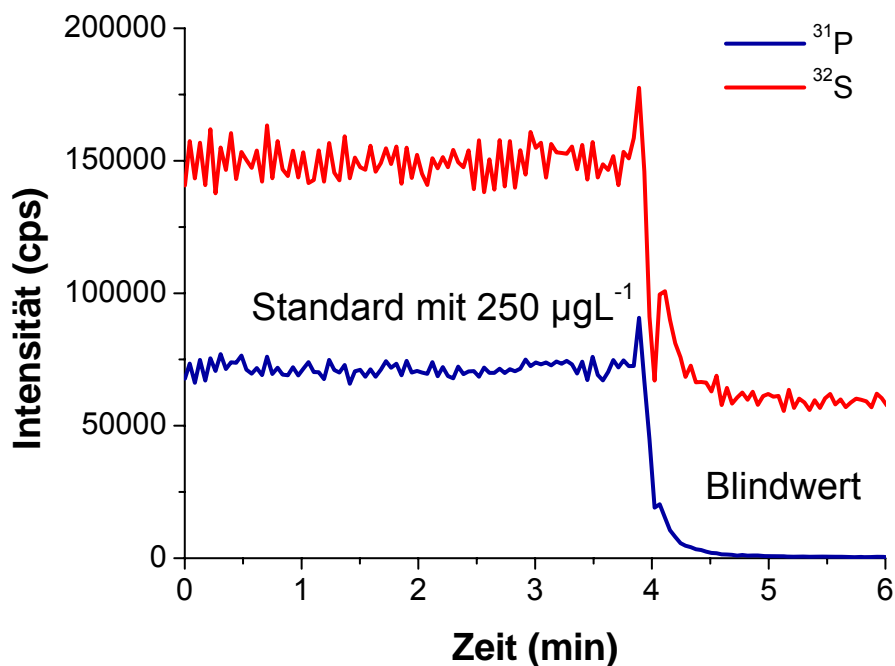


Abb. 97 Bestimmung der Signalintensitäten einer äquimolaren Lösung von Schwefel und Phosphor

In Abb. 98 ist das Elektropherogramm von Ovalbumin zu sehen. Das gekaufte Protein war allerdings nur mit einer Reinheit von 70 % ausgewiesen, was das zweite, als Schulter des eigentlichen Ovalbumins erscheinende Signal erklärt. Es konnte durch Variation der Trennbedingungen nicht vollständig abgetrennt werden. Nichtsdestotrotz kann der Phosphorylierungsgrad des Ovalbumins durch einen Fit zweier gaußförmiger Kurven übereinstimmend mit Literaturwerten^[80] bestimmt werden.

Das ^{31}P -Signal koeluiert mit dem ^{32}S -Signal, jedoch weist das Schwefelsignal eine ausgeprägte Schulter auf, was auf eine nicht Phosphor enthaltende Verunreinigung des Proteins zurückzuführen ist oder von einem Degradationsprodukt herrührt. Das Verhältnis $R(^{31}\text{P}/^{32}\text{S})$ zeigt deshalb auch keine zeitliche Konstanz und fällt mit dem Beginn der Elution der Verunreinigung steil ab. Aufgrund des niedrigen Signals des Phosphors weist das Verhältnis im linearen Teil eine sehr große Schwankung auf, weshalb kein verlässlicher Wert für $R(^{31}\text{P}/^{32}\text{S})$ daraus abgeleitet werden kann. Eine Integration ist auch nicht möglich, da das Schwefelsignal des Ovalbumins mit der Verunreinigung überlagert.

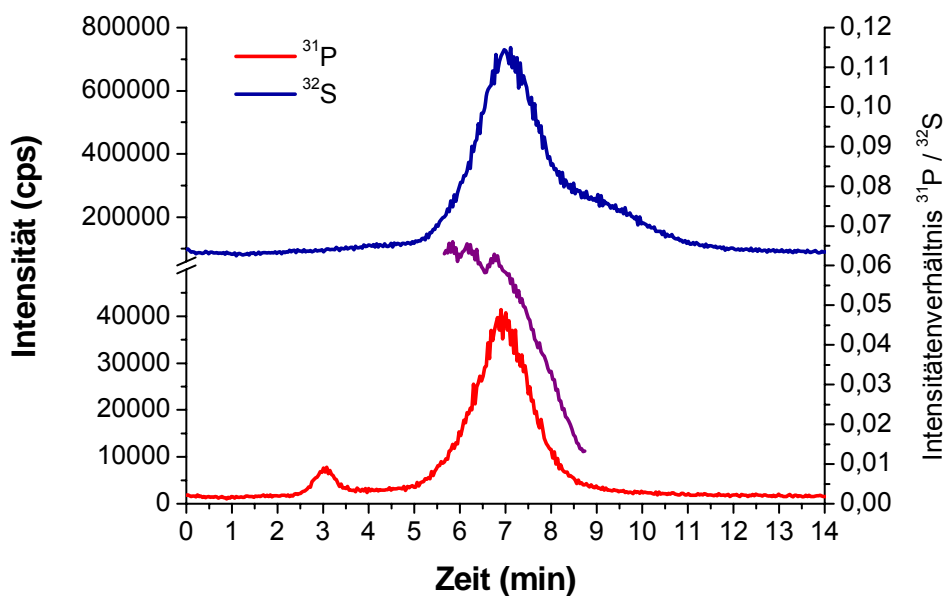


Abb. 98 Elektropherogramm von Ovalbumin und das Intensitätsverhältnis $^{31}\text{P}/^{32}\text{S}$

Fittet man jedoch das Schwefelsignal mit zwei Gaußkurven an (siehe Abb. 99), erhält man eine, das Originalsignal einhüllende Summenkurve und die erste Fitkurve kommt genau mit dem Phosphorsignal zur Übereinstimmung. Durch Integration dieser beiden Kurven lässt sich ein Phosphorylierungsgrad des Ovalbumins zu 1,8 berechnen.

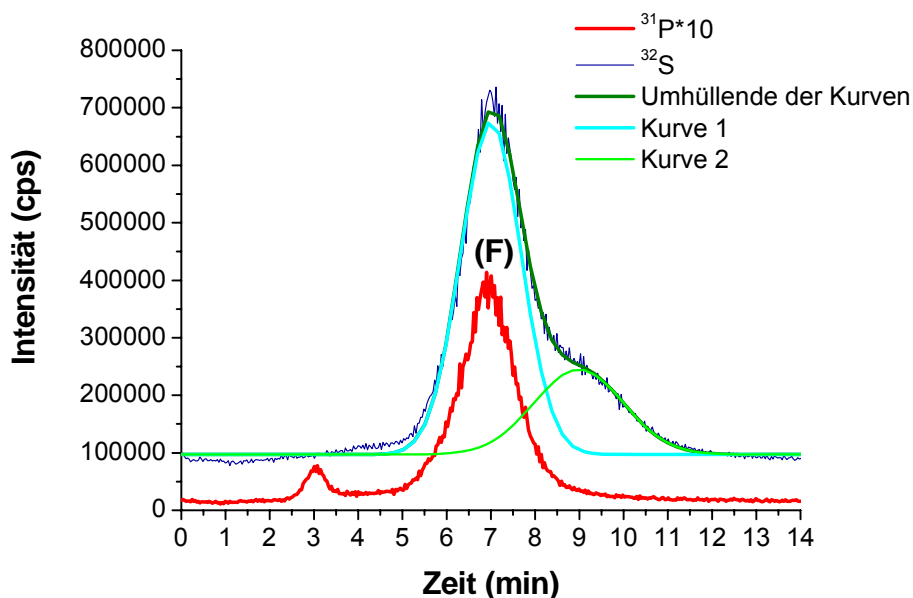


Abb. 99 Elektropherogramm von Ovalbumin (chicken), das ^{31}P -Signal ist 10fach überhört dargestellt, das ^{32}S -Signal wurde mit zwei Gaußkurven angefitet

In Tab. 20 sind die Ergebnisse für die untersuchten Proteine aufgelistet und beim Vergleich mit Literaturwerten ergibt sich eine gute Übereinstimmung.

Der von Krüger et al.^[80] mittels μ LC-ICP-MS bestimmte Phosphorylierungsgrad für Ovalbumin von 1,9 konnte mit einem gefundenen Wert von 1,8 bestätigt werden. Auch die Ergebnisse für α - und β -Casein von 9,4 und 5,1 sind in guter Übereinstimmung mit dem von Wind et al.^[81] erarbeiteten Ergebnis von 8,7 und 5,6 (Angabe im Artikel: P/S ratio = 1,74 bzw. 0,93).

Tab. 20 Phosphorylierungsgrad verschiedener Proteine mittels GE-ICP-MS, jede Messung wurde nur einmal durchgeführt

Protein	Signal	Intensitätenverhältnis $R(^{31}\text{P}/^{32}\text{S})$ der integrierten Peakflächen	Atomares Verhältnis P/S	Anzahl der Phosphatgruppen
α -Casein	(D)	$796355/567811 = \mathbf{1,403}$	1,87	9,4
β -Casein	(D')	$36360/20640 = \mathbf{1,761}$	2,35	nicht bestimmbar
	(E)	$136765/214626 = \mathbf{0,637}$	0,85	5,1
Ovalbumin	(F)	$59095/963036 = \mathbf{0,061}$	0,081	1,8

Die Genauigkeit der Ergebnisse hängen ab von

- der kompletten Abtrennung des Analyten von anderen phosphor- oder schwefelhaltigen Verbindungen,
- der Güte der Intensitätenverhältnisbestimmung von Phosphor und Schwefel und
- der rechnerischen Auswertung der Elektropherogramme.

Um diese Genauigkeit zu erreichen,

- müssen die Trennbedingungen variiert und individuell auf die Proteine angepasst werden,
- kann eine Verbindung bekannter Phosphor-Schwefel-Komposition der Probe bei der Trennung im Gel zugegeben werden (evtl. ein Thiophosphat)
- müssen Wiederholungsmessungen gemacht werden, um die Ungenauigkeit beim Integrieren statistisch zu minimieren.

4.3.3 Vergleich der zwei Gelsysteme

Zusammenfassend kann man sagen, dass

- sich mittels nativer Gelelektrophorese Proteine, welche sich kaum in ihrem Molekulargewicht, jedoch in ihrem isoelektrischen Punkt und der Anzahl an posttranslationalen Modifizierungen unterscheiden (z. B. α - und β -Casein gezeigt), trennen lassen.
- die Trennung im Röhrchen aufgrund der höheren anlegbaren Spannungen schneller ist und durch eine direkte Detektion die Zeit für die Gelfärbung und –entfärbung wegfällt.

Nachteile zur Plattengelelektrophorese ergeben sich durch die Tatsache, dass

- die Peakverbreiterung durch die großen Totvolumina signifikant ist.
- bei einer Analyse von Proteinen über einen weiten Molekulargewichtsbereich die großen Proteine extrem lange Migrationszeiten besitzen und deren Signal durch Dispersionseffekte extrem breit und flach wird, so dass deren Detektion erschwert wird.

Der größte Vorteil des online-Systems liegt jedoch in der Kopplungsfähigkeit mit verschiedenen Detektoren und der daraus resultierenden Vielfalt an Möglichkeiten zur weiteren Analyse der getrennten Spezies. Wo vorher eine arbeitsintensive Probenpräparation aus dem Gel und die damit verbundene Gefahr der Veränderung oder Zerstörung der separierten Spezies stand, können jetzt ohne Arbeitsaufwand und zeitliche Verzögerung die Spezies detektiert, charakterisiert und unter bestimmten Umständen auch quantifiziert werden.

4.4 Biokonjugate

Als letzten Schritt nach der Charakterisierung von Gold- und Silberkomplexen und –nanopartikeln und Biomolekülen in Form von Proteinen steht die Konjugatbildung zwischen den beiden Substanzgruppen, um die Vorteile einer solchen kovalenten Markierung nutzen zu können. Die GE-ICP-MS-Kopplung hat sich als hervorragendes Werkzeug zur Trennung und qualitativen wie auch quantitativen Untersuchung der Einzelkomponenten bewiesen und soll nun bei den Konjugaten zur Trennung zwischen Edukten und Produkten dienen und diese über die elementspezifischen Signale von Gold und Phosphor detektieren und gegebenenfalls quantifizieren.

Die Schwierigkeit bei der Verbindung zwischen Nanopartikel und Protein liegt jedoch in der Kontrolle der sehr anspruchsvollen Chemie bezüglich der Reaktivität und der Stöchiometrie. So führten viele Reaktionsansätze nicht zur gewünschten Aktivierung der Dihydroliponsäure, bzw. die Ligandenaustauschreaktion erfolgte nicht oder nur in sehr geringem Maße (siehe Kap. 3.6).

Durch die hohe Reaktivität der Substanzen EDC und NHS kann es während der Reaktionsführung zu unerwünschten und unerwarteten Nebenreaktionen kommen, die die Kopplungssubstanzen aufbrauchen und die gewünschte Reaktion unterdrücken.

Es ist trotzdem gelungen, Proteinkonjugate herzustellen und diese mit der GE-ICP-MS-Kopplung zu detektieren.

4.4.1 Modifizierte Proteine

Der in Kapitel 3.6ff beschriebene Syntheseansatz zur Bildung stabiler Konjugate zwischen Proteinen und Nanopartikeln wurde mehrere Male durchgeführt und lieferte nach einigen Versuchen ein detektierbares Konjugat. In Abb. 100 ist das Elektropherogramm von mit dem Nanocluster Au_{klein} derivatisiertem β -Casein zu sehen. Neben dem großen Signal des unreaktierten Nanopartikels ist bei einer Migrationszeit von 41 min ein weiteres Signal auf der Gold- wie auch auf der

Phosphorspur zu sehen. Hierbei handelt es sich um ein Konjugat zwischen dem phosphorhaltigen β -Casein und dem Nanopartikel Au_{klein} . Die Migrationszeit zu underivatisiertem β -Casein (31 min, bei identischen Trennbedingungen) ist um 10 min verschoben. Dies ist aufgrund des größeren Durchmessers des Konjugates durchaus plausibel und entspricht den Erwartungen.

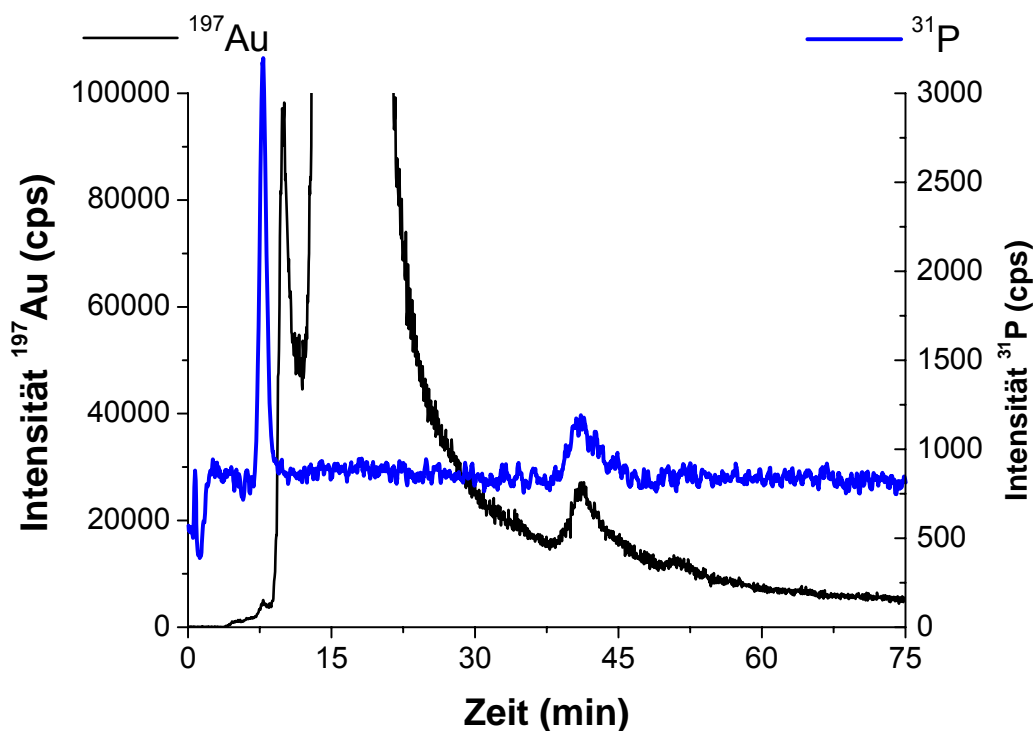


Abb. 100 Elektropherogramm des Ansatzes zum Ligandenaustausch von modifiziertem β -Casein auf Au_{klein} . Gelkonzentration: 6 % NuSieve, 19 mm Gellänge, 50 mmolL^{-1} Tris/Borat-Puffer, 0,1 % SDS, pH = 8,6.

Es kann kein weiteres Signal auf der Phosphorspur beobachtet werden, was auf Protein hindeutet, welches nicht mit einer MSA-Gruppe der Partikeloberfläche ausgetauscht hat. Das Signal des unveränderten Au_{klein} ist um ein vielfaches höher als erwartet, was seine Ursache in einem stark verminderten Austauschprozess haben kann oder in einer unzureichenden Derivatisierung des Proteins. Bei letztem Punkt müsste allerdings das ursprüngliche Protein noch in der Probe detektierbar sein, was hier nicht der Fall war.

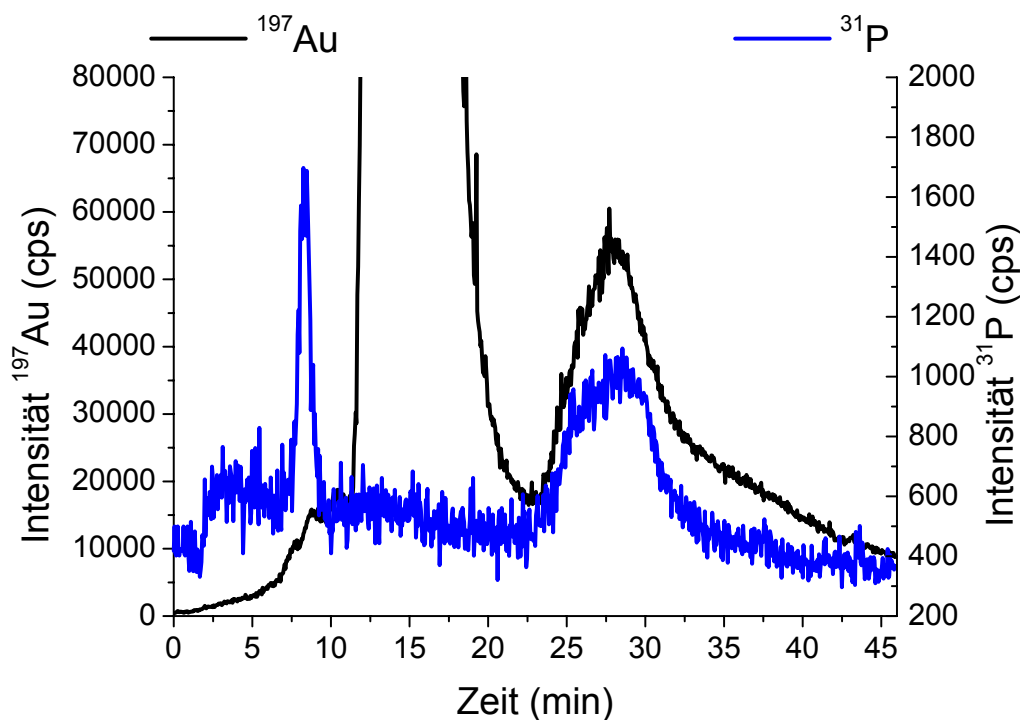


Abb. 101 Elektropherogramm des Ansatzes zum Ligandenaustausch von modifiziertem Ovalbumin auf Au_{klein}. Gelkonzentration: 6 % NuSieve, 19 mm Gellänge, 50 mmolL⁻¹ Tris/Borat-Puffer, 0,1 % SDS, pH = 8,6.

Die Derivatisierung des Ovalbumins und der Ligandenaustausch an der Clusteroberfläche funktionierte besser als bei β -Casein, was an dem größeren Signal des Konjugates bei 27,5 min in Abb. 101 zu erkennen ist. Auch hier ist die Koelution von Phosphor und Gold zu beobachten, was ein eindeutiges Indiz für eine Cluster-Protein-Verbindung ist. Allerdings ist auch hier die Menge an unreaktiertem Cluster viel höher als erwartet.

Der Derivatisierungs- und Austauschschritt stellte sich in den Versuchen als nicht-trivialer Prozess heraus, der einer Optimierung durch Kontrolle der Zwischen- und Nebenprodukte bedarf. Die Chemie zur Aktivierung des Proteins und der Kopplung mit der Dihydroliponsäure unterliegt vielen potentiellen Störfaktoren, die die Reaktion hemmen oder gar unterbinden können. Eine detaillierte Untersuchung hinsichtlich der Optimierung dieses Prozesses konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht durchgeführt werden.

Eine Empfindlichkeitssteigerung bezüglich der Detektion der Proteine konnte bislang auf diese Weise noch nicht erreicht werden, da der Kopplungsschritt noch unzureichend ist. Die Signale für Gold sind in beiden Abbildungen Abb. 100 und Abb. 101 zwar deutlich größer als die Phosphorsignale, jedoch hinterlässt das um ein Vielfaches größere Signal des Nanoclusters eine deutlich erhöhte Grundlinie mit entsprechendem Rauschen.

Die eingesetzte Menge an Nanocluster muss minimiert und der Kopplungsschritt effizient gestaltet werden, so dass das große Potential dieses Ansatzes verwirklicht werden kann und in einem ersten Schritt einzelne Proteine empfindlicher detektiert und quantifiziert werden können und anschließend die gewonnen Erkenntnisse auf Proteingemische übertragen werden können. Die prinzipielle Durchführbarkeit des Ansatzes und die Eignung der analytischen Methode GE-ICP-MS konnten im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit ist es gelungen, der Analyse ganz unterschiedlicher Substanzklassen, zum einen metallische Nanopartikel und zum anderen Proteine, neue Impulse zu geben und zukünftiges Potential bei der Anwendung gekoppelter Techniken aufzuzeigen.

Durch die Verwendung einer alten, aber neu konzipierten Analysetechnik, der Gelelektrophorese, und deren Kopplung an einen modernen Detektor, dem ICP-MS, kann die weit verbreitete, durch jahrzehnte lange Erfahrung gut beherrschte und in der Bioanalytik sehr häufig verwendete Gelelektrophorese ihr enormes Potential bei der Trennung verschiedenster Verbindungsklassen mit der exzellenten Nachweisstärke und Elementspezifität eines ICP-MS verbinden und dadurch mit viel weniger Arbeitsaufwand als bisher qualitative und auch quantitative Ergebnisse produzieren, was bisher nur mit großem präparativem Aufwand möglich war. Die Verwendung von Gelröhrchen im Vergleich zu Gelplatten hat keinen Einfluss auf die Trennung und deshalb sind Erfahrungen von der klassischen Gelelektrophorese direkt übertragbar. Die Kopplung an verschiedenste Detektoren, wie einen UV-VIS-Detektor, einen organischen sowie einen anorganischen Massenspektrometer (ESI-MS und ICP-MS) funktioniert apparativ ohne Probleme und erfordert keinen größeren Aufwand als die Ankopplung z. B. einer HPLC. Durch Anpassung des bei der GE verwendeten Eluenten an die Bedürfnisse des jeweiligen Detektors ist dieser in seiner analytischen Leistungsfähigkeit durch die Kopplung nicht beeinträchtigt.

Bei der Analyse von Nanopartikeln konnte aufgezeigt werden, dass durch die GE-ICP-MS-Kopplung aufgrund der guten Trenneigenschaften der GE vorhandene Spezies bzw. Fraktionen voneinander separiert werden und mit Hilfe des ICP-MS Informationen auf atomarem Niveau gewonnen werden können. So war es möglich, das atomare Verhältnis der Metallatome im Kern und der Schwefelatome in der Ligandenhülle eines Partikels zu bestimmen und damit die Größe des Partikels abzuschätzen. Auch konnte die Anzahl der Goldatome in einem dem Schmid-Cluster

ähnlichen Nanopartikel (Rubigold) bestimmt werden, was vorher nur mit Hilfe von MALDI-TOF möglich war.

Bei der Analyse von Biomolekülen konnte auf einfache Weise der Phosphorylierungsgrad verschiedener Proteine bestimmt werden. Die Trennung erfolgte im Röhrchen analog der auf einem Plattengel, jedoch konnte das Verhältnis von Schwefel (aus dem Aminosäurengerüst) und Phosphor direkt nach der Trennung der Proteine erfolgen, ohne dass weitere Arbeitsschritte im Sinne einer Präparation des Gels folgen mussten. Auch bei kleinen Molekülen erzielt die Gelelektrophorese ausgezeichnete Trennergebnisse, wie z. B. bei der Analyse verschiedener Brom- und Iodspezies^[82].

Die stöchiometrische Kopplung eines Proteins an einen Nanopartikel, ohne eine der beiden Verbindungen in einem größeren Maße zu verändern, stellte jedoch eine Herausforderung dar, die im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig gelöst werden konnte. Verschiedene Ansätze zur Kopplung der beiden Substanzen wurden ausprobiert, jedoch führte keine zu dem gewünschten Ergebnis einer stöchiometrisch vollständigen und spezifischen Modifikation eines Proteins mit einem Nanopartikel.

Durch das Potential der GE-ICP-MS-Kopplung bei der Analyse beider Substanzklassen und dem Beweis der Praktikabilität und Zuverlässigkeit der Methode ist jedoch der Grundstein für weitere Forschungen auf diesem Gebiet gelegt worden. Ist eine geeignete chemische Kopplung der beiden Substanzklassen gefunden und beherrscht, dies könnte durch die Verwendung von modifiziertem Rubigold funktionieren, steht auf analytischer Seite eine leistungsstarke Kombination aus Trennung und Detektion zur Verfügung, um die Quantifizierung von Proteinen entscheidend zu verbessern.

5.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erfahrungen und Erkenntnisse geben Anstoß, weitere Forschungsaktivitäten in zwei Richtungen aufzunehmen.

Zum Ersten konnte gezeigt werden, dass die Kopplung der analytischen Technik Gelelektrophorese an verschiedene zum Teil hochselektive und -sensitive Detektoren ohne größere Probleme funktioniert und einerseits neue Wege bei der Quantifizierung gelelektrophoretischer Trennungen aufzeigt und andererseits eine Alternative zu anderen Separationstechniken darstellen kann. Die gekoppelte Gelelektrophorese hat unbestritten ein großes Potential im Einsatz auf Gebieten wie Speziation, Proteomics und Genomics. Hierzu muss allerdings der instrumentelle Aufbau verfeinert und den in der Analytik kritischen Parametern angepasst werden. Eine Optimierung der Elutionszone (Verminderung des Totvolumens) und der Probenaufgabe könnten zu einer deutlichen Verbesserung der erhaltenen Signale und einer Verringerung der Peakverbreiterung führen. Dann stellt die online-GE eine wirkliche Alternative zur HPLC dar.

Zum Zweiten wurden erste Ergebnisse bei der Analyse von nanopartikulären Gold- und Silberclustern vorgestellt. Hier müssen die erhaltenen Ergebnisse mit alternativen Methoden wie z. B. MALDI in einen molekularen Kontext gerückt werden. Es fehlt ein echter Nachweis über die molekulare Zusammensetzung der hier synthetisierten und analysierten Cluster, der den erhaltenen Ergebnissen aus den Chromatogrammen und Elektropherogrammen zu einer quantitativen Aussage bezüglich der Größe der Cluster verhelfen kann.

Nicht zuletzt haben die ersten Ergebnisse über die Konjugatbildung von Biomolekülen und Nanopartikeln eine grundsätzliche Möglichkeit dieses Vorgehens aufgezeigt. Hier muss jedoch noch viel Forschungsarbeit auf der präparativen Seite geleistet werden, um Konjugate sauber, gezielt und stöchiometrisch darzustellen. Dieser Schritt erfordert einen großen experimentellen Aufwand und der Ansatz einer one-pot-chemistry wird wahrscheinlich nicht zu dem gewünschten Ziel führen. Die GE-ICP-MS-Kopplung stellt aber nach erfolgreicher Synthese von Konjugaten ein geeignetes Werkzeug bei deren Analyse dar.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Internet www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml
- [2] S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold, *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*, *Nature Biotech.* **17** (1999) 994–999
- [3] R.S. Houk, V.A. Fassel, G.D. Flesch, H.J. Svec, A.L. Gray, C.E. Taylor, *Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements*, *Anal. Chem.* **52** (1980) 2283–2289
- [4] R. Lobinski, D. Schaumlöffel, J. Szpunar, *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry*, *Mass. Spectrom. Rev.* **25** (2006) 255–289
- [5] D. Beauchemin, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.* DOI: 10.1021/ac8006945
- [6] J.S. Becker, S.F. Boulyga, C. Pickhardt, J. Becker, S. Buddrus, M. Przybylski, *Determination of phosphorus in small amounts of protein samples by ICP-MS*, *Anal. Bioanal. Chem.* **375** (2003) 561–566
- [7] M. Wind, A. Wegener, A. Eisenmenger, R. Kellner, W.D. Lehmann, *Sulfur as the Key Element for Quantitative Protein Analysis by Capillary Liquid Chromatography Coupled to Element Mass Spectrometry*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **42** (2003) 3425–3427
- [8] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M. Fernández de la Campa, J. Ruiz Encinar, J. Bettmer, *Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics*, *Anal. Bioanal. Chem.* **390** (2008) 3–16
- [9] J. Bettmer, N. Jakubowski, A. Prange, *Elemental tagging in inorganic mass spectrometric bioanalysis*, *Anal. Bioanal. Chem.* **386** (2006) 7–11
- [10] P.R.D. Mason, K. Kaspers, M.J. van Bergen, *Determination of sulfur isotope ratios and concentrations in water samples using ICP-MS incorporating hexapole ion optics*, *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 1067–1074
- [11] M. Wind, I. Feldmann, N. Jakubowski, W.D. Lehmann, *Spotting and quantification of phosphoproteins purified by gel electrophoresis and laser ablation-element mass spectrometry with phosphorus-31 detection*, *Electrophoresis* **24** (2003) 1276–1280

-
- [12] M. Kainosho, *Isotope labelling of macromolecules for structural determination (NMR supplement)*, Nat. Struct. Biol. **4** (1997) 858–861
- [13] K.H. Gardner, L.E. Kay, *The use of ^2H , ^{13}C , ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **27** (1998) 357–406
- [14] W. Y. Liu, X. R. Gu, J. E. Cao, Scientia Sinica **23** (1980) 1296–1308
- [15] D. Schaumlöffel, A. Prange, G. Marx, K.G. Heumann, P. Bratter, *Characterization and quantification of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-isotope-dilution mass-spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. **372** (2002) 155–163
- [16] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M.L.F. Sanchez, *Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics*, Anal. Bioanal. Chem. **377** (2003) 236–247
- [17] C. Rappel, D. Schaumlöffel, *The role of sulfur and sulfur isotope dilution analysis in quantitative protein analysis*, Anal. Bioanal. Chem. **390** (2008) 605–615
- [18] D.A. Schultz, *Plasmon resonant particles for biological detection*, Curr. Opin. Biotechnol. **14** (2003) 13–22
- [19] R. Ahrends, S. Pieper, A. Kühn, H. Weisshoff, M. Hamester, T. Lindemann, C. Scheler, K. Lehmann, K. Taubner, M.W. Linscheid, *A metal-coded affinity tag approach to quantitative proteomics*, Mol Cell Proteomics. **11** (2007) 1907–1916
- [20] M. Valcárcel, B.M. Simonet, S. Cárdenas, *Analytical nanoscience and nanotechnology today and tomorrow*, Anal. Bioanal. Chem. DOI 10.1007/s00216-008-2130-9
- [21] Rede vom 29.12.1959 auf dem jährlichen Treffen der American Physical Society, <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>
- [22] M. Faraday, *The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London **147** (1857) 145–181
- [23] M.I. Baraton, *Synthesis, Functionalization and Surface Treatment of Nanoparticles*, American Scientific Publisher, Chapter 5 (M.G. Warner, J.E. Hutchinson)

-
- [24] J. Nedderson, G. Chumanov, T.M. Cotton, *Laser Ablation of Metals: A New Method for Preparing SERS Active Colloids*, Appl. Spectrosc. **47** (1993) 1959–1964
- [25] S.E. Gilbert, O. Cavalleri, K. Kern, *Electrodeposition of Cu Nanoparticles on Decanethiol-Covered Au(111) Surfaces: An in Situ STM Investigation*, J. Phys. Chem. **100** (1996) 12123–12130
- [26] W. Chen, W. Cai, L. Zhang, W. Wang, L. Zhang, *Sonochemical Processes and Formation of Gold Nanoparticles within Pores of Mesoporous Silica*, J. Coll. Interf. Sci. **238** (2001) 291–295
- [27] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillar, *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*, Discuss. Faraday Soc. **11** (1951) 55–75
- [28] G. Schmid, R. Pfeil, R. Boese, F. Sandermann, S. Meyer, G.H.M. Calis, J.W.A. van der Welden, *Au₅₅[P(C₆H₅)₃]₁₂Cl₆ - ein Goldcluster ungewöhnlicher Größe*, Chem. Ber. **114** (1981) 3634–3642
- [29] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, *Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1994) 801–803
- [30] S. Chen, R.W. Murray, *Arenethiolate Monolayer-Protected Gold Clusters*, Langmuir **15** (1999) 682–689
- [31] T.G. Schaaff, M.N. Shafiqullin, J.T. Khoury, I. Vezmar, R.L. Whetten, W.G. Cullen, P.N. First, C. Wing, J. Ascensio, M.J. Yacaman, *Isolation of Smaller Nanocrystal Au Molecules: Robust Quantum Effects in Optical Spectra*, J. Phys. Chem. B **101** (1997) 7885–7891
- [32] M.J. Hostetler, S.J. Green, J.J. Stokes, R.W. Murray, *Monolayers in Three Dimensions: Synthesis and Electrochemistry of ω-Functionalized Alkanethiolate-Stabilized Gold Cluster Compounds*, J. Am. Chem. Soc. **118** (1996) 4212–4213
- [33] R.S. Ingram, M.J. Hostetler, R.W. Murray, *Poly-hetero-ω-functionalized Alkanethiolate-Stabilized Gold Cluster Compounds*, J. Am. Chem. Soc. **119** (1997) 9175–9178
- [34] A.C. Templeton, D.E. Cliffel, R.W. Murray, *Redox and Fluorophore Functionalization of Water-Soluble, Tiopronin-Protected Gold Clusters*, J. Am. Chem. Soc. **121** (1999) 7081–7089

-
- [35] M.J. Hostetler, A.C. Templeton, R.W. Murray, *Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules*, *Langmuir* **15** (1999) 3782–3789
- [36] C.J. Loweth, W.B. Caldwell, X. Peng, A.P. Alivisatos, P.G. Schultz, *DNA als Gerüst zur Bildung von Aggregaten aus Gold-Nanokristallen*, *Angew. Chem.* **111** (1999) 1925–1929
- [37] J.G. Worden, A.W. Shaffer, Q. Huo, *Controlled functionalization of gold nanoparticles through a solid phase synthesis approach*, *Chem. Commun.* (2004) 518–519
- [38] K.M. Sung, D.W. Mosley, B.R. Peelle, S. Zhang, J.M. Jacobson, *Synthesis of Monofunctionalized Gold Nanoparticles by Fmoc Solid-Phase Reactions*, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 5064–5065
- [39] A.W. Shaffer, J.G. Worden, Q. Huo, *Comparison Study of the Solution Phase versus Solid Phase Place Exchange Reactions in the Controlled Functionalization of Gold Nanoparticles*, *Langmuir* **20** (2004) 8343–8351
- [40] A.C. Templeton, M.J. Hostetler, E.K. Wamoth, S. Chen, C.M. Hartshorn, V.M. Krishnamurthy, M.D.E. Forbes, R.W. Murray, *Gateway Reactions to Diverse, Polyfunctional Monolayer-Protected Gold Clusters*, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 4845–4849
- [41] A.C. Templeton, M.J. Hostetler, C.T. Kraft, R.W. Murray, *Reactivity of Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules: Steric Effects*, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 1906–1911
- [42] A.P. Alivisatos, K.P. Johnsson, X. Peng, T.E. Wilson, C.J. Loweth, M.P. Bruchez, P.G. Schultz, *Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA*, *Nature* **382** (1996) 609–611
- [43] A.P. Alivisatos, K.P. Johnsson, X. Peng, T.E. Wilson, C.J. Loweth, M.P. Bruchez, P.G. Schultz, *Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA*, *Nature* **382** (1996) 609–611
- [44] Holleman, Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, **101** (1995) 172, 1356
- [45] Holleman, Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, **101** (1995) 1264 ff.
- [46] J. Liu, W. Ong, E. Román, M.J. Lynn, A.E. Kaifer, *Cyclodextrin-Modified Gold Nanospheres*, *Langmuir* **16** (2000) 3000–3002

-
- [47] Z. Li, R. Jin, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, *Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates*, Nucl. Acids Res. **30** (2002) 1558–1562
- [48] S. Roux, B. Garcis, J.-L. Bridot, M. Salomé, C. Marquette, L. Lemelle, P. Gillet, L. Blum, P. Perriat, O. Tillement, *Synthesis, Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol*, Langmuir **21** (2005) 2526–2536
- [49] *Produktinformation ICP-MS Element 2*, Finnigan MAT, Bremen.
- [50] S.F. Wong, C.K. Meng, J.B. Fenn, *Multiple Charging in Electrospray Ionization of Poly(ethylene glycols)*, J. Phys. Chem. **92** (1988) 546–550
- [51] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules*, Science **246** (1989) 64–71
- [52] A. Kantrowitz, J. Grey, *High Intensity Source for the Molecular Beam. I. Theoretical*, Rev. Sci. Instr. **22** (1951) 328–332
- [53] A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion, *Ion Spray Interface for Combined Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization-MS*, Anal. Chem. **59** (1987) 2642–2646
- [54] J.H. Gross, *Mass Spectrometry A Textbook*, Springer (2004) chapter 11.3
- [55] J. Zeleny, *Instability of Electrified Liquid Surfaces*, Phys. Rev. **10** (1917) 1–7
- [56] R.B. Cole, *Some Tenets Pertaining to ESI-MS*, J. Mass Spectrom. **35** (2000) 763–772
- [57] N. Felitsyn, M. Peschke, P. Kebarle, *Origin and Number of Charges Observed on Multiply-Protonated Native Proteins Produced by ESI*, Int. J. Mass Spectrom. **219** (2002) 39–62
- [58] T. Lover, G.A. Bowmaker, W. Henderson, R.P. Cooney, *ESI-MS of Some Cadmium Thiophenolate Complexes and of a Thiophenolate Capped CdS Cluster*, Chem. Commun. (1996) 683–685
- [59] A. Tiselius, *The moving-boundary method of studying the electrophoresis of proteins*, Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis Ser. IV, **7** (1930)
- [60] H. Picton, S.E. Linder, *Solutions and pseudo-solutions Part I*, J. Chem. Soc., Trans. **61** (1892) 162–172

-
- [61] H. Picton, S.E. Linder, *Solution and pseudo-solution. Part III. The electrical convection of certain dissolved substances*, J. Chem. Soc., Trans. **71** (1897) 568 – 573
- [62] W. Brüchert, J. Bettmer, *On-Line Coupling of Gel Electrophoresis and Inductively Coupled Plasma-Sector Field-Mass Spectrometry for the Determination of dsDNA Fragments*, Anal. Chem. **77** (2005) 5072–5075
- [63] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffrin and C.J. Kiely, *Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **16** (1995) 1655–1656
- [64] United States Patent 6331559, *Lipoic acid derivatives and their use in treatment of disease*, US Patent Issued on December 18, 2001
- [65] Y. Chevolut, J. Martins, N. Milosevic, D. Leonard, S. Zeng, *Immobilisation on polystyrene of diazirine derivatives of mono-and disaccharides: Biological activities of modified surfaces*, Bioorga. Med. Chem. **9** (2001) 2943–2953
- [66] W. Brüchert, *Methodenentwicklung zur Untersuchung von DNA-Fragmenten und Oligonucleotiden mit Hilfe chromatographischer und massenspektrometrischer Verfahren*, Dissertationsarbeit (2007) Mainz
- [67] S. Chen, K. Kimura, *Water Soluble Silver Nanoparticles Functionalized with Thiolate*, Chem. Lett. **28** (1999) 1169–1170
- [68] A. L. Mackay, *A dense non-crystallographic packing of equal spheres*, Acta Crystallogr. **15** (1962) 916–918
- [69] W. M. Pankau, *Thermostabile und monokonjugierbare Goldcluster-Komplexe*, Dissertationsarbeit (2002) Bochum
- [70] W. Pankau, K. Verbist, G. von Kiedrowski, *Phase-transfer synthesis of novel water-soluble gold clusters with tripodal thioether based ligands*, Chem. Commun. (2001) 519–520
- [71] W. M. Pankau, S. Mönninghoff, G. von Kiedrowski, *Thermostable and Monokonjugable Gold Clusters with a Dodecadentate Thioether Ligand Gripper*, Angew. Chem. Int. Ed. **45** (2006) 1889–1891
- [72] G. Schmid, R. Boese, R. Pfeil, F. Bandermann, S. Meyer, G.H.M. Callis, J. W. A. van der Velden, *Au₅₅[P(C₆H₅)₃]₁₂Cl₃ - ein Goldcluster ungewöhnlicher Größe*, Chem. Ber. **114** (1981) 3634–3642
- [73] persönliche Kommunikation von Herrn Dr. W. Pankau (2006) Bochum

-
- [74] S. Chen, K. Kimura, *Synthesis and Characterization of Carboxylate-Modified Gold Nanoparticle Powders Dispersible in Water*, *Langmuir* **15** (1999) 1075–1082
- [75] C.E. Rayford II, G. Schatz, K. Shuford, *Optical Properties of Gold Nanospheres*, *Nanoscape* **2** (2005) 27–33
- [76] G.T. Wei, F.K. Liu, *Separation of nanometer gold particles by size exclusion chromatography*, *J. Chrom. A* **836** (1999) 253–260
- [77] G. Scheibe, *Die Veränderlichkeit der Absorptionsspektren in Lösungen in Beziehung zur Ladungsverteilung der Moleküle und Zusammenhänge zwischen Absorption und Refraktion*, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **59** (1926) 1321–1334
- [78] Holleman, Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, **101** (1995) 1343 ff.
- [79] Internet www.webelements.com, Chemputer
- [80] R. Krüger, D. Kübler, R. Pallissé, A. Burkovski, W.D. Lehmann, *Protein and Proteome Phosphorylation Stoichiometry Analysis by Element Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.* **78** (2006) 1987–1994
- [81] M. Wind, H. Wesch, W.D. Lehmann, *Protein Phosphorylation Degree : Determination by Capillary Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.* **73** (2001) 3006–3010
- [82] W. Brüchert, A. Helfrich, N. Zinn, T. Klimach, M. Breckheimer, H. Chen, S. Lai, T. Hoffmann, J. Bettmer, *Gel electrophoresis coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry using species-specific isotope dilution for iodide and iodate determination in aerosols*, *Anal. Chem.* **15** (2007) 1714–1719

Datenblatt der käuflichen Goldnanopartikelstandards:



3050 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
 Fax (314) 286-7828
 email: techserv@sial.com
 sigma-aldrich.com

Product Information

GOLD COLLOIDS AND GOLD CONJUGATES

GOLD COLLOID (see page 2)

APPEARANCE: Clear dark red liquid

EXTINCTION COEFFICIENT: Certificate of Analysis reports absorbance and gold content of product.

CONCENTRATION: Approximately 0.01% as HAuCl₄

STABILITY/STORAGE:

Store at 2-8 °C for up to 18 months. Freezing may cause aggregation. Sodium azide (0.02%) has been added as preservative. Once stabilized with protein, the solution may be supplemented with an antibacterial agent and stored at 2-8 °C.

CERTIFICATE OF ANALYSIS: Lot specific Certificate of Analysis is available.

CHOOSING A PARTICLE SIZE:

Generally, particles <15 nm are most useful in transmission electron microscopy (TEM) and for applications where access to the probe may be hindered by larger particles.⁴¹ Particles >15 nm are more suitable for scanning electron microscopy (SEM), light microscopy and blotting. Sigma's gold colloids are all monodisperse (the coefficient of variance of the particle size is <15% of the mean particle size). In electron microscopy, monodisperse particles facilitate quantitation and allow for dual labeling with different particle sizes.⁴²

GENERAL GUIDELINES FOR USAGE:

The proper pH and concentration must be determined for each protein selected to complex with the gold.^{43,44} The tannic acid in the gold sol must be broken down to reduce its masking effects.²⁷ After ligand adsorption, final blocking of the sol may be done with polyethylene glycol (PEG), BSA or gelatin.⁴⁵ After stabilization of the gold (by reacting with protein), excess ligand should be removed by centrifugation or chromatography, and aggregates should be removed by centrifugation.^{44,46}

GOLD COLLOIDS AND GOLD CONJUGATES

DESCRIPTION:

Colloidal gold is an electron-dense, non-fading marker useful as a probe in electron microscopy (TEM and SEM), light microscopy and blotting.²⁸ It requires no additional processing for detection, but in some applications the signal can be enhanced by reaction with silver.^{4,40} It can be complexed with biomolecules by strong, non-covalent interactions.¹ All unconjugated gold colloids offered by Sigma contain about 0.01% HAuCl₄ suspended in 0.01% tannic acid with 0.04% trisodium citrate, 0.26 mM potassium carbonate and 0.02% sodium azide as preservative; all are produced by a modified tannic acid method of Slot and Geuze.²⁷

GOLD COLLOIDS		
PRODUCT NO.	NAME - DESCRIPTION	PARTICLE SIZE
G-1402	Gold Colloid	Spec: 5 nm Mean: 3-6 nm (monodisperse)
G-1527	Gold Colloid	Spec: 10 nm Mean: 8-12 nm (monodisperse)
G-1652	Gold Colloid	Spec: 20 nm Mean: 17-23 nm (monodisperse)

