

Calciumoxalat  
als potentielles Biomaterial  
Kontrolle der Morphologie  
und Hydratphase

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Chemie

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

*Myriam Hajir*

*geboren in Kehl am Rhein*

Mainz, 2014



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2011 bis Mai 2014 unter Betreuung von [REDACTED] [REDACTED] an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, angefertigt.

Amtierender Dekan:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung:

18.06.2014





Für meine Familie



# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Calciumoxalat-Partikel durch eine einfache Kristallisation von Calciumchlorid Dihydrat mit Natriumoxalat im wässrigen Milieu in Gegenwart von verschiedenen ionischen Polymer-Additiven erhalten. Durch den gezielten Einsatz von Polyvinylphosphonsäure und Polyvinylaminen und durch die Variation verschiedener Parameter wie Polymerkonzentration, Calciumoxalat-Konzentration, Zeit und Temperatur, konnten Calciumoxalat-Kristalle mit verschiedenen Morphologien und Hydratphasen beobachtet werden. Auf diese Weise wurden beispielsweise tetragonale bipyramidale Calciumoxalat Dihydrat-Partikel synthetisiert, deren Form mit zunehmender Polymerkonzentration über gestreckte bipyramidale Prismen, zu kapselförmigen Kristallen mit aufgewachsenen Subkristallen und letztendlich zurück zu gestreckten stäbchenförmigen, bipyramidalen Prismen wechselte.

Über die mechanistischen Details der Bildung von Calciumoxalat, insbesondere der Phasenumwandlungen, ist bisher nur sehr wenig bekannt. Daher beschäftigte sich diese Arbeit mit der Synthese von amorphem Calciumoxalat in Abwesenheit von Additiven. Durch die Reaktion von Calciumchlorid Dihydrat mit Dimethyloxalat in ethanolischen Lösungsmittel, konnten bei Raumtemperatur amorphe Calciumoxalat-Nanopartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 10 nm erhalten werden. Die Synthese von amorphem Calciumoxalat kann nicht nur dabei helfen die Bildung von komplexen Biomineralien in lebenden Systemen zu erklären, sondern auch Aufschluss über den Kristallisationsmechanismus im Allgemeinen geben.

Mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung konnten durch alkalische Hydrolyse von Dimethyloxalat sphärische Calciumoxalat Monohydrat-Nanopartikel mit einer Größe zwischen 40 und 50 nm in Ethylenglykol hergestellt werden. Da Calciumoxalat ein Hauptbestandteil von Harnsteinen ist, wurden die erhaltenen Nanopartikel anschließend in künstlichen Urin eingelegt, um mögliche weitere Aufklärung über Harnsteinbildung zu gewinnen.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden an Calciumoxalat Monohydrat-Partikeln spezifisch-bindenden Peptidsequenzen unter Nutzung der molekularbiologischen Selektionsmethode "Phage Display" identifiziert. Diese Sequenzen sollten in zukünftigen Experimenten gezielt zur Kristallisation von Calciumoxalat eingesetzt werden, um eine mögliche inhibierenden Wirkung auf Harnsteine erzielen zu können.

# Abstract

In this work, calcium oxalate particles were obtained through simple crystallization of calcium chloride dihydrate with sodium oxalate in an aqueous medium in the presence of various ionic polymeric additives. Through the targeted use of poly(vinylphosphonic) acid and polyvinyl amines, as well as variation of reaction parameters, such as polymer concentration, calcium oxalate concentration, reaction time, and temperature, calcium oxalate crystals with various morphologies and hydrate phases were observed. For example, tetragonal bipyramidal calcium oxalate dihydrate particles, whose form changes with increasing polymer concentration from elongated bipyramidal prisms, through capsule-shaped crystals with subcrystals extending from the surface, and then finally back to elongated, rod-shaped bipyramidal prisms, were synthesized using/via these methods.

The mechanistic details of the formation of calcium oxalate, in particular of its phase transformations, are still very poorly understood. This work, therefore, explores the synthesis of amorphous calcium dihydrate in the absence of additives. Through the reaction of calcium chloride dihydrate with dimethyl oxalate in an ethanolic solution at room temperature, amorphous calcium oxalate nanoparticles with an average size of 10 nm were obtained. The synthesis of amorphous calcium oxalate expands our understanding of not only biomineralization in living systems, but also the mechanism of its crystallization in general.

Spherical calcium oxalate monohydrate nanoparticles with an average diameter of 40-50 nm were synthesized by the alkaline hydrolysis of dimethyl oxalate in ethylene glycol with ultrasonication. The obtained nanoparticles were then incubated in artificial urine to gain a better understanding of kidney stone formation.

In the final section of this work, calcium oxalate-specific peptide sequences were identified via the phage display selection technique. In future experiments, the identified peptide sequences should be applied to the crystallization of calcium oxalate with the goal of potentially inhibiting kidney stone formation.



# Danksagung

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Grundlagen .....</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Biomineralisation.....</b>	<b>3</b>
1.1	Calciumcarbonat.....	4
1.2	Calciumoxalat.....	7
1.3	Calciumphosphat.....	7
1.4	Siliciumdioxid.....	8
1.5	Eisenoxide.....	9
1.6	Weitere Biomaterialien.....	10
1.7	Biomineralisationsprozesse.....	10
1.7.1	Biologisch induzierte Mineralisation.....	10
1.7.2	Biologisch kontrollierte Mineralisation.....	11
1.7.3	Kontrollmechanismen in der Biom mineralisation.....	12
1.8	Biomimetische Mineralisation.....	13
<b>2</b>	<b>Grundlagen der Kristallisation .....</b>	<b>17</b>
2.1	Keimbildung.....	18
2.1.1	Homogene Keimbildung.....	19
2.1.2	Heterogene Keimbildung.....	22
2.2	Kristallwachstum.....	24
2.3	Mesokristalle.....	27
<b>3</b>	<b>Additiv gesteuerte Kristallisation .....</b>	<b>29</b>
3.1	Einfluss der Additive auf die Kristallkeimbildung.....	30
3.2	Einfluss der Additive auf das Kristallwachstum.....	32

<b>4</b>	<b>Calciumoxalat .....</b>	<b>35</b>
4.1	Chemie und Kristallographie von Calciumoxalat .....	35
4.1.1	Calciumoxalat Monohydrat (COM) .....	35
4.1.2	Calciumoxalat Dihydrat (COD) .....	40
4.1.3	Calciumoxalat Trihydrat (COT) .....	42
4.2	Biogenes Calciumoxalat .....	44
<b>5</b>	<b>Phage Display .....</b>	<b>51</b>
5.1	Filamentöse Bakteriophagen – M13 Phage .....	52
5.2	Biopanning .....	55
5.3	Phage Display an anorganischen Substraten .....	57
<b>II</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Kontrolle der Morphologie mittels ionischer Polymere .....</b>	<b>61</b>
6.1	Einleitung .....	61
6.2	Experimentelles .....	63
6.2.1	Reagenzien und Chemikalien .....	63
6.2.2	Synthesevorschrift .....	63
6.2.3	Charakterisierung .....	63
6.3	Ergebnis und Diskussion .....	64
6.3.1	Kristallisation mit Polyvinylphosphonsäure .....	64
6.3.2	Kristallisation mit Polyaminen .....	78
6.4	Zusammenfassung .....	88
<b>7</b>	<b>Amorphes Calciumoxalat .....</b>	<b>89</b>
7.1	Einleitung .....	89
7.2	Experimentelles .....	91
7.2.1	Reagenzien und Chemikalien .....	91
7.2.2	Synthesevorschrift von amorphem Calciumoxalat .....	91
7.2.3	Charakterisierung .....	91
7.3	Ergebnis und Diskussion .....	92
7.3.1	Amorphes Calciumoxalat mit Dimethyloxalat .....	92
7.4	Zusammenfassung .....	108

<b>8</b>	<b>Calciumoxalat Nanopartikel.....</b>	<b>109</b>
8.1	Einleitung .....	109
8.2	Experimentelles .....	111
8.2.1	Reagenzien und Chemikalien .....	111
8.2.2	Synthese von Calciumoxalat-Nanopartikeln .....	111
8.2.3	Charakterisierung .....	111
8.3	Ergebnis und Diskussion .....	112
8.3.1	Synthese von Calciumoxalat-Nanopartikeln .....	112
8.3.2	Transformation der Calciumoxalat Monohydrat Nanopartikel in künstlichem Urin .	117
8.4	Zusammenfassung .....	122
<b>9</b>	<b>Calciumoxalat spezifisch-bindende Peptide.....</b>	<b>123</b>
9.1	Einleitung .....	123
9.2	Experimentelles .....	124
9.2.1	Reagenzien und Chemikalien .....	124
9.2.2	Biopanning .....	125
9.2.3	Phagen-Amplifikation .....	125
9.2.4	Amplifikation einzelner Kolonien.....	126
9.2.5	DNA Extraktion der M13 Phage .....	126
9.2.6	Festphasen Peptid Synthese.....	127
9.3	Ergebnis und Diskussion .....	128
9.3.1	Syntheseroute – Biopanning und Amplifikation .....	128
9.3.2	Selektierte Peptidsequenzen .....	129
9.4	Zusammenfassung .....	136
<b>III</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>137</b>
<b>IV</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>155</b>
<b>V</b>	<b>Weitere Verzeichnisse .....</b>	<b>167</b>







# **I Grundlagen**





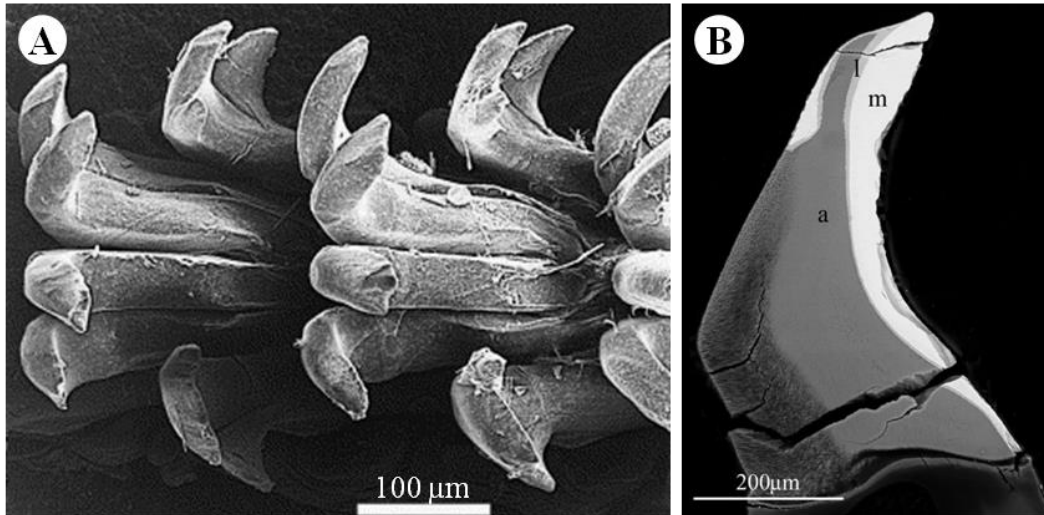
# 1

## Biomineralisation

Der Vorgang der Biomineralisation beschreibt die Bildung von organisch-anorganischen Hybridmaterialien, die von lebenden Organismen durch biologische Formprozesse produziert werden. Biomineralien sind Kompositmaterialien, die sich aus einer anorganischen Komponente und einer speziellen organischen Matrix zusammensetzen. Dabei nimmt die organische Matrix einen bedeutsamen Einfluss auf die Struktur, Morphologie und Eigenschaften des anorganischen Materials. Bis heute sind mehr als 60 dieser Mineralien bekannt,<sup>[1]</sup> die im lebenden Organismus gebildet werden. In allen 5 Reichen der Lebewesen (Pflanzen, Tiere, Pilze, Prokaryoten und Protisten) sind die Organismen im Stande Biominerale zu bilden.<sup>[2]</sup> Im Vergleich zu Mineralien, die in einem geologischen oder synthetisch-chemischen System erzeugt wurden, weisen die meisten Biominerale faszinierende biologische und mechanische Materialeigenschaften auf. Diese Materialeigenschaften gehen häufig mit viel komplexeren Morphologien, Funktionen und anderen Kristallinitäten, Isotopen- und Spurenelement-Zusammensetzungen einher, insbesondere wenn bedacht wird, dass deren Entstehen gut reproduzierbar und in hohen Ausbeuten, unter energieeffizienten milden Standardbedingungen, wie beispielsweise Umgebungstemperatur, stattfindet.<sup>[3-5]</sup> Die Entstehung von geologischen Mineralien hingegen, wie Kalkspat ( $\text{CaCO}_3$ ), Quarz ( $\text{SiO}_2$ ), Diamant (C) oder Eisenglanz ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), die zumeist starre und spröde Strukturen mit streng geometrischen Kristallformen aufweisen, findet unter extremen Drücken und hohen Temperaturen statt, z.B. aus der Schmelze im Erdinneren, die durch Vulkanausbrüche nach außen dringen können. Während diese Mineralien meist keine Anwendungen finden, dienen die Biomineralien häufig als mechanische Stütze von Endo- und Exoskelett,<sup>[6]</sup> zur Navigation im Magnet- und Gravitationsfeld,<sup>[7]</sup> als Fortbewegungsmittel

## BIOMINERALISATION

oder als optische Linse.<sup>[8]</sup> Viele Organismen nutzen sie auch als temporären Ionenspeicher wie der Calciumspeicher in Pflanzen,<sup>[9,10]</sup> als Werkzeug wie Zähne zur Nahrungsaufnahme (Abbildung 1.1), zum Schutz oder zur Verteidigung vor Fressfeinden.<sup>[1,3,7,11]</sup>



**Abbildung 1.1** (A) Zähne der Napfschnecke zur Nahrungsaufnahme, deren Mineralphase aus Goethit besteht ( $\alpha$ -FeOOH), (B) mineralisierte Zahnschnecke einer Käferschnecke bestehend aus drei Mineralzonen (m) Magnetit, (l) Lepidokrokit ( $\gamma$ -FeOOH) und (a) Apatit.<sup>[12]</sup>

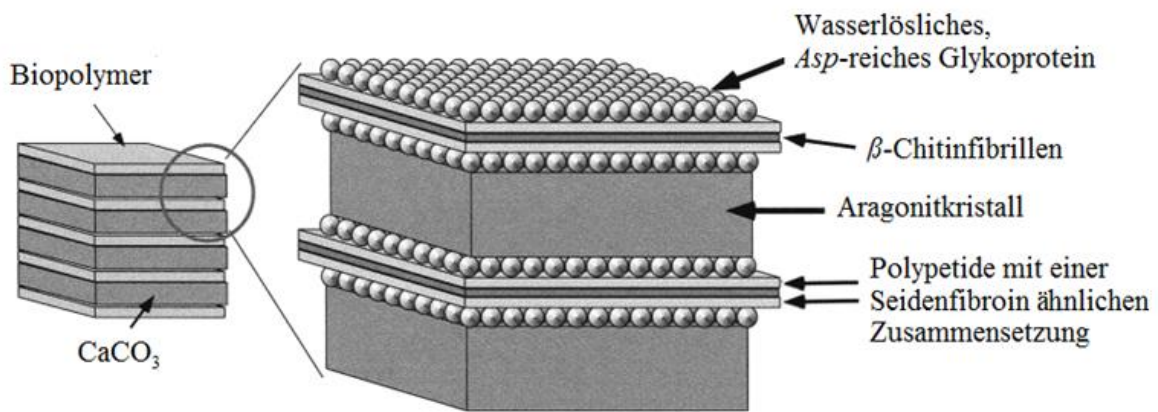
Abhängig von ihrem Aufbau, können biogene Materialien in kristalline und amorphe Mineralien unterschieden werden. Amorphe Materialien zeichnen sich durch das Fehlen einer wiederholenden Struktureinheit über weite Bereiche, sowie das Fehlen einer bevorzugten Bruchebene und einer bevorzugten Wachstumsrichtung aus. Kristalline Biomineralien hingegen, haben eine geordnete Festkörper- und Oberflächenstruktur und weisen eine größere Dichte als amorphe Materialien auf.<sup>[2]</sup>

Bei der großen Anzahl der Biomineralien treten besonders häufig die fünf Materialien Calciumcarbonat, Calciumoxalat, Calciumphosphat, Siliciumdioxid und Eisenoxid auf.

### 1.1 Calciumcarbonat

Ungefähr 50 % der bisher bekannten Biomineralien bestehen aus calciumhaltigen Verbindungen, davon ist mengenmäßig  $\text{CaCO}_3$  das wichtigste biogene Mineral, welches in unterschiedlichen Erscheinungsformen vorliegen kann.<sup>[2]</sup> Die am häufigsten auftretenden Modifikationen sind dabei das wasserfreie Calcit, Aragonit und Vaterit, wobei das Calcit

thermodynamisch die stabile Phase unter Normalbedingungen darstellt. Ikait und Monohydrocalcit sind hydratisierte Formen des  $\text{CaCO}_3$  und treten im Verhältnis sehr selten auf. Eine weitere bekannte Modifikation ist das amorphe Calciumcarbonat (ACC). ACC hat in der Natur eine bedeutsame Rolle, da es häufig entweder als ein wesentlicher Bestandteil eines biogenen Materials oder als Vorläufermaterial für Vaterit, Aragonit oder Calcit dient.<sup>[13]</sup> Ein in der Wissenschaft wohl prominentes und viel untersuchtes Biokompositmaterial ist das Exoskelett (Schale) von Weichtieren (Mollusca), das aus Calcit und/oder Aragonit besteht. Perlmutter, das zu mehr als 95 % aus  $\text{CaCO}_3$  in Form von Aragonit besteht, ist dabei häufig das Material, das die innere Schicht vieler Arten von Schnecken und Muscheln bildet (Abbildung 1.2).

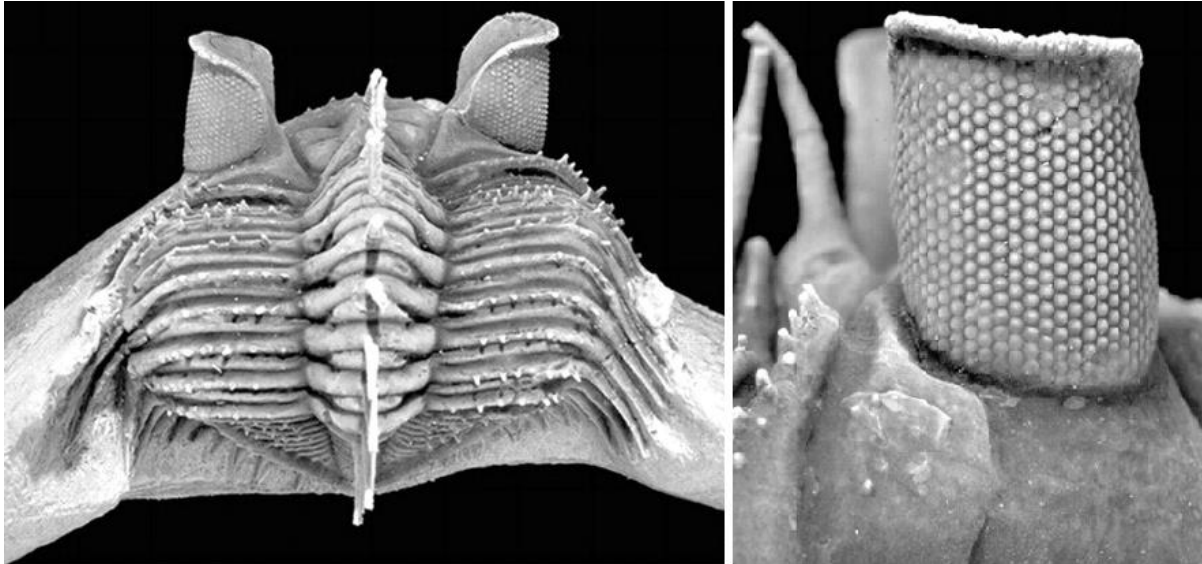


**Abbildung 1.2** Schematische Darstellung der Perlmutterstruktur der Abalone Schale.<sup>[14]</sup>

Die organische Matrix einer Perlmutterstruktur setzt sich aus einer Lage von  $\beta$ -Chitinfibrillen, umgeben von Schichten aus Seidenfibroin ähnlichen Alanin- und Glycin-Polypeptiden und hydrophilen asparaginsäurereichen Glykoproteinen zusammen. In Kombination mit der Mikrostruktur, weisen sie außergewöhnliche mechanische Eigenschaften, wie eine 3000-mal höhere Bruchfestigkeit als das reine anorganische Mineral Aragonit auf.<sup>[14-16]</sup> Die äußere Schicht des Perlmutter besteht aus Calcit, was zur Stabilität beiträgt, die innere Schicht hingegen besteht aus Aragonit. Nach dem Tod des Organismus findet im Inneren des Perlmutter allmählich eine Umkristallisation von Aragonit zu Calcit statt, was zu deren Altersbestimmung verwendet werden kann.

## BIOMINERALISATION

Ein weiteres Beispiel sind Trilobiten, vor Jahrmillionen ausgestorbene Dreilappenkrebse, wie in Abbildung 1.3 dargestellt. Sie waren eine der ersten Tierklassen mit einem fortgeschrittenen Sehapparat, deren Linsen aus klaren Calcitkristallen bestanden.<sup>[17,18]</sup>

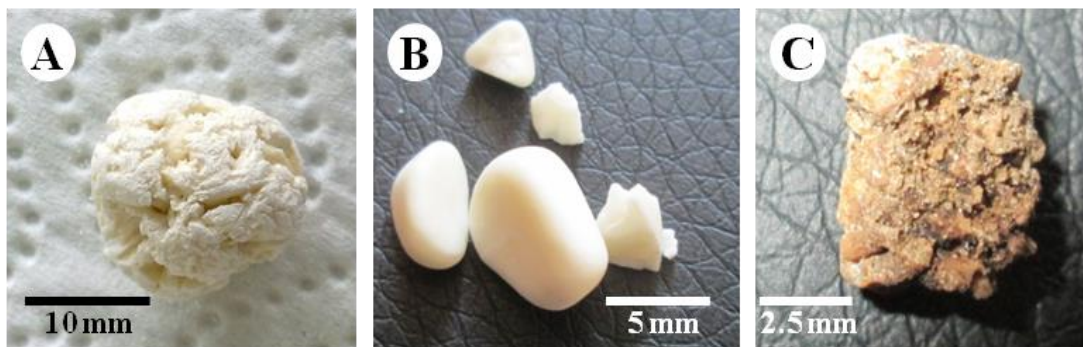


**Abbildung 1.3** *Erbenochile erbeni* (Alberti), Gattung der Trilobiten. (A) Aufnahme der Rückansicht, (B) Seitenansicht des rechten Facettenauges.<sup>[19]</sup>

Ebenfalls weit verbreitet ist Calciumcarbonat in Organismen aus Meeres- und Süßgewässern. Dort dient es z.B. als temporärer Ionenspeicher im Panzer von Krebstieren,<sup>[20]</sup> als Schutzfunktion in den Seeigelstacheln und zum Aufbau vieler Exoskelette wie von Korallen oder Schwämmen.<sup>[21]</sup> Oolithen, kleine Steinchen aus Calciumcarbonat-Einkristalliten (z.B. Aragonit-Einkristallite), eingebettet in einer Proteinmatrix, sitzen im Gleichgewichtsorgan des Innenohrs der Säugetiere wie dem Menschen oder der Zebrafische und dienen als Schwerkraftsensor.<sup>[21]</sup> In vielen Blättern von Pflanzen ist besonders das amorphe  $\text{CaCO}_3$  als Calcium-Depot enthalten, welches essentiell für den Zellmetabolismus ist. Amorphes Calciumcarbonat dient häufig als Vorläuferphase des kristallinen Calciumcarbonats, da es ein schnelles und gezieltes Kristallisieren in eine der drei gewünschten Modifikationen erlaubt.

## 1.2 Calciumoxalat

Der Hauptanteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Calciumoxalat, das in diesem Kapitel nur kurz angerissen wird, jedoch in einem eigenen Kapitel (Kap. 4) detailliert beschrieben wird. Calciumoxalat ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ ) spielt besonders in der Pflanzenwelt eine tragende Rolle, da es hier besonders als Calciumspeicher oder auch als Schutz vor Fressfeinden eingesetzt wird. Im Gegensatz dazu tritt Calciumoxalat bei Menschen und Tieren in einem negativen Zusammenhang, wie in Abbildung 1.4, in Form von Nieren- und Blasensteinen auf .

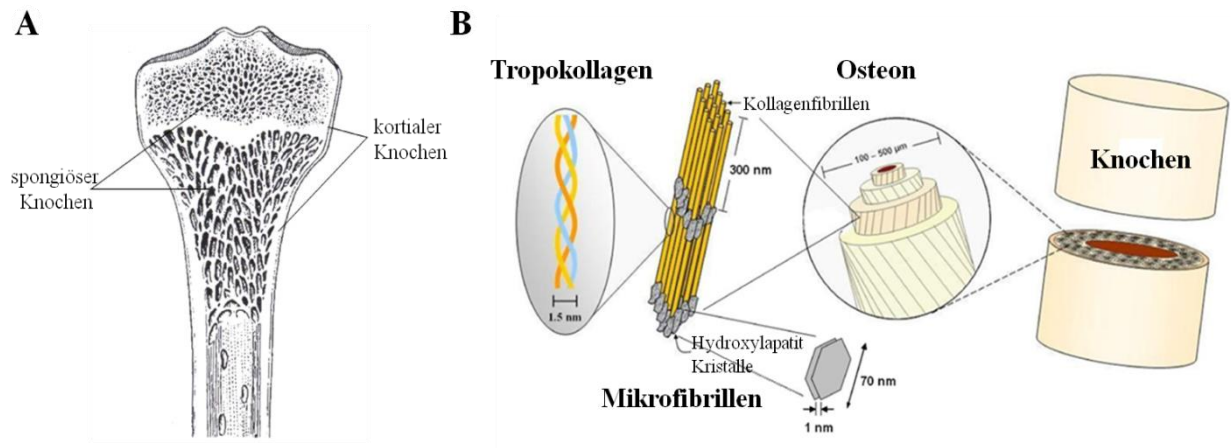


**Abbildung 1.4** (A) Nierenstein von einem Hund, (B) Blasenstein von einem Hund und (C) Nierenstein von einem Menschen.

## 1.3 Calciumphosphat

Calciumphosphat, welches in unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen auftreten kann, nimmt im menschlichen Körper und in anderen höher entwickelten Wirbeltieren (*Vertebraten*) einen bedeutenden Stellenwert ein, da es sowohl in den Zähnen als Fluorapatit, als auch in den Knochen als Hydroxylapatit, wie in Abbildung 1.5, vorkommt.

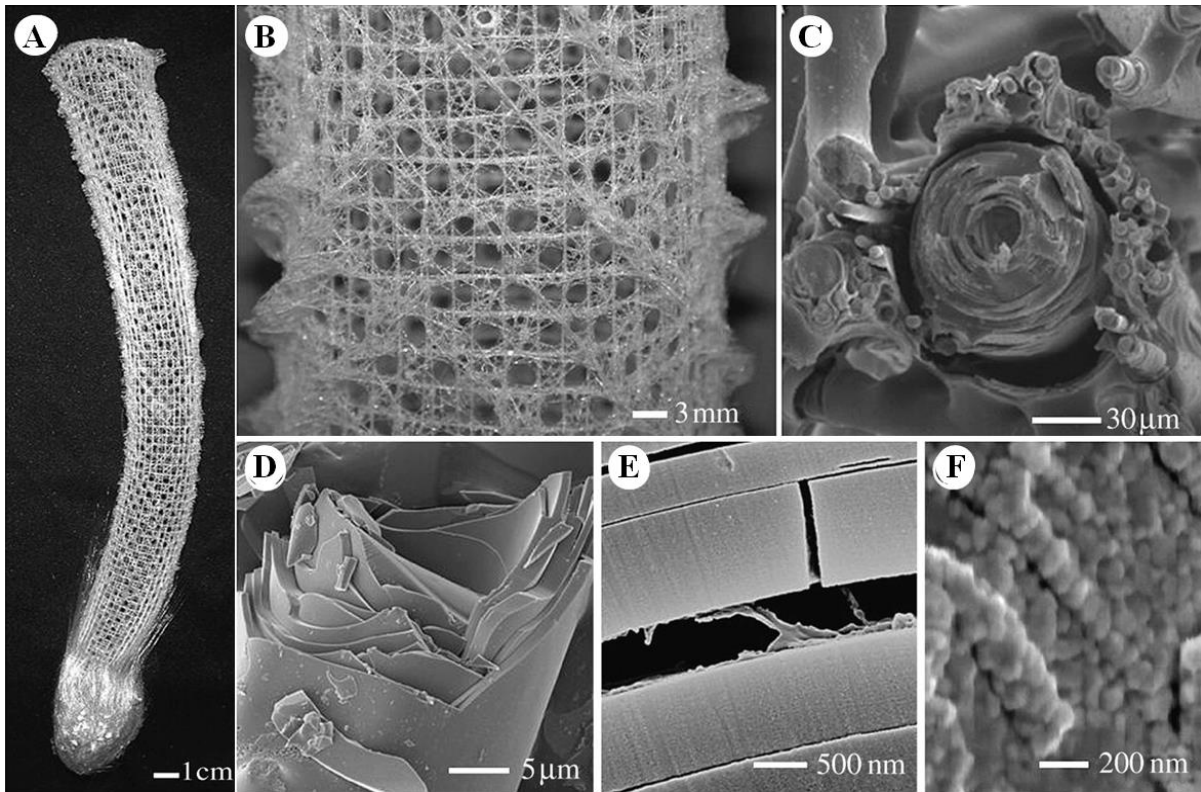
Der Knochen des Menschen in Abbildung 1.5 A ist ein nanostrukturiertes Kompositmaterial mit einem hierarchischen organisierten hoch regenerativen Gewebe, welches sich gut an mechanische Belastungen anpassen kann, da es fest aber auch elastisch ist. Aufgebaut ist das Knochenmaterial aus plättchenförmigen Nanokristallen aus Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), welche parallel zwischen den organischen mineralisierten Typ-I-Kollagenfibrillen eingelagert sind.<sup>[24]</sup> Damit Knochen einem bestimmten Belastungsdruck und einer bestimmten Biegsamkeit standhalten können, müssen sie hart sowie auch elastisch sein. Für die Härte des Knochens dienen daher die eingelagerten Hydroxylapatit-Kristalle, während die Kollagenfibrillen dem Knochen seine Elastizität geben.



**Abbildung 1.5** (A) Innere Struktur eines Knochens mit verschiedenen Mikrostrukturen,<sup>[7]</sup> (B) Hierarchischer Aufbau des Knochens mit der strukturellen Grundeinheit des Kollagens, dem Tropokollagen, welches aus 3 Polypeptid-Ketten in Form einer Tripelhelix besteht.<sup>[22]</sup> Zwischen diesen Tropokollagen-Moleküle sind plättchenförmige Nanokristalle aus Hydroxylapatit eingelagert, die zusammen die Kollagenfibrillen bilden. In den Osteon-Lamellen verlaufen die Kollagenfibrillen in Schraubentouren, deren Drehrichtung von einer zur anderen Lamelle wechselt.<sup>[23]</sup>

#### 1.4 Siliciumdioxid

In vielen Organismen kommt Siliciumdioxid vor. Einige Pflanzen wie Gräser, Bambus, Palmblätter oder auch Brennnesseln setzen es zur Verstärkung ihres Gewebes ein. Die Zellwände und Mikroskelette vieler mariner einzelliger Organismen (*Protisten*) wie Diatomee und Radiolaren bestehen aus amorphem Siliciumdioxid,<sup>[25]</sup> aber auch andere Mikroorganismen und Tiere bilden faszinierende Strukturen aus amorphem Siliciumdioxid. Ein interessantes Beispiel für biogenes Siliciumdioxid ist das Skelett des Glasschwamms in Abbildung 1.6. Ihr Skelett hat einen zylindrischen, käfigartigen, hierarchisch strukturierten Aufbau, der entgegen der geringen Festigkeit von Glas eine außerordentlich hohe mechanische Stabilität aufweist.<sup>[1,26]</sup>



**Abbildung 1.6** Hierarchiestufen in der Skelett-Struktur des Glasschwamms *Euplectella*.<sup>[27,26]</sup> (A) Ganzes Skelett, (B) Glasfasergewebe, (C) SEM Aufnahme von Faserbündeln, die durch eine Glasmatrix verbunden sind, (D) geschichtete Struktur einer Einzel-Glasfaser (E) gebrochene Faser mit einer organischen Proteinzwischenschicht, (F) kolloidale Struktur von biogenem Siliciumdioxid.

## 1.5 Eisenoxide

Magnetotaktische Bakterien synthetisieren einzelne Nanopartikel-Ketten aus Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) bzw. Greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) um sich entlang der Feldlinie im Magnetfeld der Erde bewegen zu können.<sup>[28]</sup> Während es unter synthetischen Bedingung schwierig ist eine Transformation von Magnetit zu Maghemit zu inhibieren, kann die magnetotaktische Bakterie dies gezielt verhindern.<sup>[29]</sup> Auch die Zähne der Käferschnecke in Abbildung 1.1 B bestehen aus verschiedenen Eisenmineralien. Sie setzen sich aus Goethit ( $\alpha - \text{FeOOH}$ ), Magnetit und Lepidokrokit ( $\gamma - \text{FeOOH}$ ), einer Schicht Hydroxylapatit und einem organischen Mantel zusammen.



### 1.6 Weitere Biomaterialien

Neben den vier Hauptgruppen der biogenen Mineralien, gibt es auch nicht so weit verbreitete Mineralien, die Metallsulfate wie Gips ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) und Baryt ( $\text{BaSO}_4$ ), die als Schwkraftsensoren ihren Einsatz finden oder Cölestin ( $\text{SrSO}_4$ ), dass als Stützgerüst von planktonischen Acantharia dient.

### 1.7 Biomineralisationsprozesse

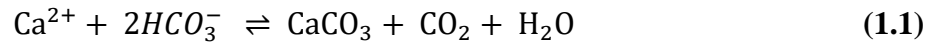
Über die Struktur der Biominerale und wie sie in verschiedenen Organismen variieren, ist bis heute viel bekannt. Weniger bekannt ist jedoch über die Prozesse der kontrollierten Bildung von Biomineralien. Insbesondere ist nur wenig bekannt über deren molekulare Wechselwirkungen und über deren zelluläre und genetische Kontrolle. Allerdings gibt es einige generell etablierte Grundlagen, die in diesem Kapitel erörtert werden. Der Prozess der Biomineralisation wird in zwei fundamentale Mineralisationsprinzipien eingeteilt, in die biologisch induzierte und in die biologisch kontrollierte Mineralisation.<sup>[4]</sup>

#### 1.7.1 Biologisch induzierte Mineralisation

Die biologisch induzierte Mineralisation bezeichnet die Bildung eines Minerals infolge einer Interaktion zwischen einer biologischen Aktivität und der Umgebung des Organismus.<sup>[4]</sup> Nicht selten reagieren ein oder mehrere der abgeschiedenen metabolischen Produkte des Organismus mit Ionen oder Verbindungen aus der Umwelt, was eine darauffolgende Abscheidung von mineralischen Partikeln mit sich zieht. Dabei hat der Organismus bzw. die Zelle nur wenig Kontrolle über Art und Habitus des gebildeten Minerals. Die abgeschiedenen Mineralien kennzeichnen sich daher häufig durch schlechte Kristallinität, Verunreinigungen durch Fremdionen im mineralischen Gitter, breite Partikel-Verteilung und wenig spezifizierten Kristallmorphologien.<sup>[4,30]</sup> Sie weisen zumeist eine große Variabilität in Form, Größe, Struktur und Zusammensetzung auf. Ihre kristallchemischen Eigenschaften unterscheiden sich zumeist nur wenig von den anorganisch mineralisierten Kristallen. Bei der biologisch induzierten Mineralisation handelt es sich meistens um eine *epizelluläre* Mineralisation, da die Bildung der Mineralien in vielen Fällen entlang der Zelloberfläche stattfindet, wo sie anschließend auch verbleiben.<sup>[7]</sup> Unter Umständen kann auf diese Weise eine Zelle komplett mit einer Kruste überzogen werden.



Meistens tritt die biologisch induzierte Mineralisation in einfachen Organismen, wie in einigen photosynthetisch aktiven grünen Algen, auf. Durch die Freisetzung von Kohlenstoffdioxid wird das Hydrogencarbonat-Carbonat Gleichgewicht



in der gesättigten Calciumbicarbonat Lösung auf die Seite des Carbonats verschoben, wodurch Calciumcarbonat abgeschieden wird.<sup>[7]</sup>

### 1.7.2 Biologisch kontrollierte Mineralisation

Der hoch regulierte Prozess der biologisch kontrollierten Mineralisation ist für die Herstellung von Kompositmaterialien wie Knochen, Muscheln und Zähne verantwortlich, von denen einige außergewöhnliche biologische Funktionen und Strukturen aufweisen.<sup>[4]</sup> Mit spezifischen Biomolekülen entstehen auf diese Weise Partikel mit einheitlicher Größe, definierter Struktur und Zusammensetzung, komplexer Morphologie und kristallographischer Vorzugsorientierung. Zusätzlich besitzen sie ein hohes Maß an räumlicher und hierarchischer Organisation.<sup>[7]</sup> Der Prozess findet bei der biologisch kontrollierten Mineralisation in einem abgeschlossenen Raum statt, der als eine Art Templat für das Biomineral fungieren kann. Abhängig in welchem Bereich die Mineralisation stattfindet, kann zwischen *extra-*, *inter-* und *intramolekulare* Biomineralisation unterschieden werden.

#### *Biologisch kontrollierte extrazelluläre Mineralisation*

Die extrazelluläre Mineralisation findet an oder innerhalb eines organischen Gerüsts wie Proteinen, Polysacchariden oder Glykoproteinen statt, aber außerhalb einer Zellmembran.<sup>[4]</sup> Die Struktur und Zusammensetzung der makromolekularen Matrix ist dabei genetisch festgelegt um wichtige, regulierende und organisierende Funktionen zur Bildung von Biokompositmaterialien zu vollziehen. Über zwei Transportwege ist es der Zelle möglich die Bauteile der Matrix zu übertragen. Eine Möglichkeit des Transportweges besteht darin, dass die Kationen aktiv durch die Zellmembran gepumpt werden und sich im umgebenden Medium durch passive Diffusion zum Bereich der Mineralisation bewegen. Der andere Weg besteht darin, dass die Kationen innerhalb der Zelle in Vesikeln konzentriert werden, in den

Vesikeln die Zellmembran verlassen und anschließend an der organischen Matrix zur Mineralisation freigesetzt werden. Das wohl bekannteste Beispiel einer extrazellulären Mineralisation ist die Entstehung des Perlmutts.

### *Biologisch kontrollierte interzelluläre Mineralisation*

Die biologisch kontrollierte interzelluläre Mineralisation ist nicht sehr weit verbreitet und tritt zumeist in Kolonien von einzelligen Organismen auf.<sup>[4]</sup> Die Keimbildung und Kristallisation mit einer Vorzugsorientierung findet in den Zellzwischenwänden statt. Dabei kann die Mineralisation so weitreichend sein, dass der komplette interzelluläre Bereich ausgefüllt wird und eine Art Exoskelett entsteht. Die Epidermis jedes einzelnen Organismus gibt die Form und Polymorphie des Biominerals vor.

### *Biologisch kontrollierte intrazelluläre Mineralisation*

Der Prozess der intrazellulären Mineralisation erfolgt im Gegensatz zur interzellulären Mineralisation innerhalb der Zelle in speziellen Vesikeln, die die Keimbildung der Biomineralien innerhalb der Zelle in einem bestimmten Bereich steuern.<sup>[4]</sup> Zumeist verlassen die intrazellulär gebildeten Mineralstrukturen anschließend die Zellen und werden dadurch extrazellulär. Nur in seltenen Fällen verbleiben sie in der Zelle. Es gibt verschiedene Wege, wie die gebildeten Keime die Zelle verlassen. Einerseits können die nukleierten Biominerale durch intrazelluläres Wachstum aneinander gebaut werden und danach die Zelle verlassen, andererseits können sie als einzelne Einheiten ausgesondert werden und anschließend auf einer organischen Matrix zu einer Struktur mit höher organisierter Ordnung wachsen. Verbleiben die einzelnen Biomineraleinheiten in der Zelle, können sie dort als einzelne Einheit verbleiben oder sich ebenfalls zu einer Struktur höherer Ordnung organisieren. Die in der Zelle verbliebenen Minerale können so als Ionenspeicher (z.B. Calciumspeicher) oder zur Orientierung (z.B. von magnetotaktischen Bakterien) dienen.

### 1.7.3 Kontrollmechanismen in der Biomineralisation

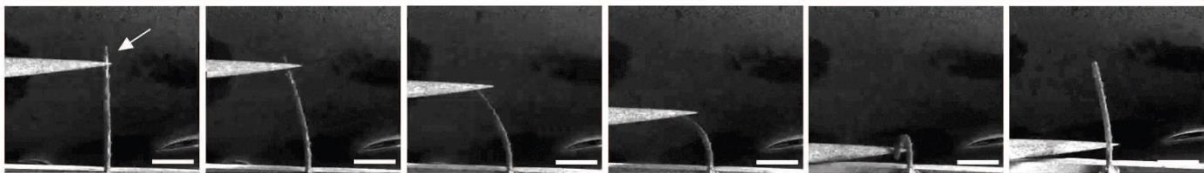
Die Kontrollmechanismen der Biomineralisation werden nach Mann in fünf Grundstrategien eingeteilt: nach der chemischen und räumlichen Kontrolle, der Struktur-, Morphologie- und Konstruktionskontrolle.<sup>[7]</sup>

An der chemischen Kontrolle sind die vier physikochemischen Faktoren beteiligt: Löslichkeit, Übersättigung, Keimbildung und Kristallwachstum. Durch den Ionentransport und spezielle Makromoleküle, die als Promotoren oder Inhibitoren der Keimbildung, des Kristallwachstums und der Phasenumwandlung agieren können, werden die vier Parameter reguliert. Entsteht das Biomineral in einem abgegrenzten Raum, wie beispielsweise in Vesikeln oder organischen Netzwerken, handelt es sich um die räumliche Kontrolle. Die dazu benötigten Ionen und Moleküle werden selektiv in den Mineralisationsbereich transportiert. Auf diese Weise wird der Mechanismus der chemischen Kontrolle, als auch die Kristallwachstumskinetik kontrolliert. Dadurch werden Größe und Form der gebildeten Mineralien bestimmt. Bei der strukturellen Kontrolle sind die Oberflächeneigenschaften (z.B. chemische Gruppe) von organischen Matrizen für die Mineralbildung entscheidend. Das organische Gerüst dient hierbei als Templat. Dies hat zur Folge, dass die Keimbildung auf einer bevorzugten Fläche oder in eine bevorzugte Richtung geführt wird. Mineralien, die der morphologischen Kontrolle unterliegen, haben eine fast unbegrenzte Vielfalt an komplexen Morphologien, die ihrem anorganischen Gegenstück nur wenig oder überhaupt nicht ähneln. Da die Präzipitation in einem organisch abgegrenzten Raum stattfindet, wird das Kristallwachstum aufgrund der vorgegebenen Grenzen von einem biologischen Programm, anstatt von intrinsischen kristallographischen Eigenschaften, in eine bestimmte Richtung gesteuert. Die Konstruktionskontrolle beschreibt den Aufbau von hierarchischen Gebilden durch mineralbasierende Bausteine, die zu höher geordneten Strukturen aufgebaut werden. Der Größenbereich dieses Prozesses erstreckt sich über mehrere Längenskalen.

## 1.8 Biomimetische Mineralisation

Die Biomineralisation bezeichnet die Bildung von mineralischen Materialien mittels lebenden Organismen, wohingegen die biomimetische Mineralisation die Simulation der Biomineralisation darstellt. Um die Biomineralien mit ihren besonderen Strukturen und Funktionseigenschaften nach dem Vorbild der Natur laborchemisch herzustellen, wird sich der Mechanismen der Biomineralisation bedient. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen die Mechanismen und Konzepte der Biomineralisation verstanden werden. In der Natur gelingt der Aufbau solcher außergewöhnlichen Mineralien durch eine kontrollierte Kristallisation in Anwesenheit von spezifischen Biomolekülen (Peptide, Proteine oder Polysaccharide), die sowohl Einfluss auf die äußere Gestalt und Kristallstruktur als auch auf die Orientierung der Kristalle im Verbund nehmen. Eine Methode ist es, diese biogenen Strukturen zu isolieren

und damit kontrollierte Kristallisationen *in vitro* durchzuführen. Addadi *et al.*<sup>[31]</sup> konnten auf diese Weise verschiedene strukturdirigierende Proteine aus Muschelschalen mit verschiedenen Polymorphen von CaCO<sub>3</sub> Schichten extrahieren. Biomoleküle, aus der Perlmutter-Schicht des Aragonit induzierten so *in vitro* die Bildung von Aragonit, aus der Calcitschicht hingegen die Bildung von Calcit. Müller *et al.*<sup>[32]</sup> machten sich die Biomimetik zu Nutze, indem sie aus Schwamm-Spiculae das bereits isolierte Protein Silicatein- $\alpha$  rekombinant aus *E. coli* Bakterien herstellten. Das hochkomplexe Silikat-Gerüst wird *in vivo* von Schwamm-Spiculae über Silicatein enzymatisch hergestellt. Das dabei gebildete Biosilikat weist ganz besondere Eigenschaften auf, denn es ist mechanisch extrem stabil und kann als Lichtleiter dienen. Tremel *et al.*<sup>[33]</sup> konnten unter Weiterverwendung des rekombinat hergestellten Silicatein- $\alpha$  selbstorganisierende Calcit-Nadeln, ähnlich wie die Nadeln von kalkhaltigen Schwämmen, synthetisieren. Auch diese Nadeln zeichnen sich, wie in Abbildung 1.7, durch außergewöhnliche mechanische Eigenschaften, wie starke elastische Biegefähigkeit, aus.



**Abbildung 1.7** In situ SEM Aufnahmen der Brucheigenschaften von einer synthetisch hergestellten Calcit-Nadel, die auch unter extremer Belastung und Verformung nicht brechen.<sup>[33]</sup>

Ein weiterer Ansatz zur Entwicklung spezieller Peptide bzw. Proteine mit besonderen sequenzspezifischen Affinitäten zu nichtnatürlichen anorganischen Materialien ist die Anwendung der *Phage Display* Technik.<sup>[34]</sup> Diese Methode ermöglicht es Peptidsequenzen zu identifizieren, die mit anorganischen Materialien hohe spezifische Bindungen eingehen können (Peptid-Substrat-Interaktion). Der Einsatz solcher Peptide in der Kristallisation, kann zu kontrollierten Peptid-vermittelnden Kristallisationen führen, aus denen spezifische Polymorphe erhalten werden. So konnten Roy *et al.*<sup>[35]</sup> via *Phage Display* Peptidsequenzen isolieren, die zum kristallinen Hydroxylapatit starke spezifische Bindungen zeigten, jedoch nicht zum CaCO<sub>3</sub> und amorphen Calciumphosphat. Ein ausführlicherer Einblick in das *Phage Display* kann in Kapitel 9 erhalten werden. Ein Ersatz für Proteine bietet die Polymerchemie. So setzten Antonietti *et al.*<sup>[36,37]</sup> amphiphile Blockcopolymere als alternative strukturdirigierende Agenzien ein. Diese synthetischen Polymere sollen dabei einen

kontrollierten Kristallisationsvorgang ermöglichen, indem sie z.B. die Primärkristallite stabilisieren und dadurch eine Agglomeration verhindern. Durch die bevorzugte Adsorption an bestimmten Kristallflächen kann somit eine Kontrolle der Kristallstruktur und der Morphologie erzeugt werden. Die amphiphilen Blockcopolymere dienen als grenzflächenaktive Verbindungen, während ein Teil des Polymers über starke Affinitäten zur Oberfläche von Kristallen verfügt und der andere Teil zumeist für gute Löslichkeits- bzw. Dispersionseigenschaften sorgt.

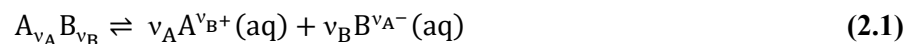


# 2

## Grundlagen der Kristallisation

Kristallisation ist ein allgegenwärtiges Phänomen, denn bei einem Großteil der festen Körper handelt es sich um Kristalle.<sup>[38]</sup> Mittels Kristallisation wird ein Stoff in einen festen und geordneten Zustand gebracht. Dieser Vorgang kann aus einer Lösung, Schmelze, der Gasphase oder aus einem anderen Kristall erfolgen.

Damit eine Kristallisation in Lösung stattfindet, muss eine übersättigte Lösung der zu kristallisierenden Substanz vorhanden sein. Im übersättigten Zustand enthält das Lösungsmittel mehr gelösten Stoff, als es bei der gegebenen Temperatur aufnehmen kann, dabei wird der Gleichgewichtszustand verlassen. Eine Übersättigung lässt sich durch Verdampfen des Lösungsmittels, Abkühlen der Lösung oder durch Zugabe von (fremden) Keimen erzeugen. Reagieren zwei oder mehr Komponenten in wässriger Lösung miteinander, welche dadurch im übersättigten Zustand vorliegen und auskristallisieren, liegt eine Fällungsreaktion vor. Mit folgender Gleichung lässt sich das Lösungsgleichgewicht der Verbindung  $A_{v_A}B_{v_B}$  beschreiben



mit den Komponenten A bzw. B und  $v_A$  bzw.  $v_B$  als stöchiometrische Faktoren von A bzw. B. Die freie Gibbsche Enthalpie der Lösung ist gegeben durch

$$\Delta G = RT \ln \frac{Q}{K_{eq}} = RT \ln \frac{\{A^{v_{B^+}}\}^{v_A} \{B^{v_{A^-}}\}^{v_B}}{\{A^{v_{B^+}}\}_{eq}^{v_A} \{B^{v_{A^-}}\}_{eq}^{v_B}} \quad (2.2)$$

R ist die Gaskonstante, T die absolute Temperatur, Q der Reaktionsquotient,  $K_{eq}$  die Gleichgewichtskonstante,  $\{i\}$  die Ionenaktivität der Spezies i und  $\{i\}_{eq}$  Aktivität der Spezies i im Gleichgewicht.

Wenn das Ionenaktivitätsprodukt (IAP) wie folgt definiert wird

$$IAP = \{A^{v_B+}\}^{v_A} \{B^{v_A-}\}^{v_B} \quad (2.3)$$

kann die freie Enthalpie aus Gl. 2.2 folgendermaßen beschrieben werden

$$\Delta G = RT \ln \frac{IAP}{K_L} = RT \ln S \quad (2.4)$$

mit  $K_L$  als Löslichkeitsprodukt im Gleichgewichtszustand und S als Sättigungsgrad der Lösung. Ist das Ionenaktivitätsprodukt größer als das Löslichkeitsprodukt ( $IAP > K_L$ ), ist demnach die freie Energie der Lösung  $\Delta G$  positiv ( $S > 1$ ,  $\Delta G > 0$ ). Somit liegt eine übersättigte Lösung vor. Im umgekehrten Fall, wenn  $K_L > IAP$ , ist die Lösung untersättigt. Ist das Ionenaktivitätsprodukt gleich dem Löslichkeitsprodukt ( $IAP = K_L$ ), handelt es sich um eine gesättigte Lösung.

Die Kristallisation aus übersättigter Lösung verläuft über die Keimbildung und das Kristallwachstum, deren theoretische Grundlagen in den nachfolgenden Kapitelteilen beschrieben werden.

## 2.1 Keimbildung

Damit es zur Kristallisation kommt, ist eine übersättigte Lösung alleine nicht ausreichend. Es ist notwendig, dass in der Lösung Keime vorhanden sind, die längere Zeit stabil sind und die Basis für die Kristallisation darstellen.<sup>[39]</sup> Ausgangspunkt der Keimbildung ist, dass sich bei der Zusammenlagerung von Atomen, Ionen oder Moleküle einer Phase Keime der auszuscheidenden Phase entwickeln. Dabei kann das Entstehen des Nukleus als eine Sequenz einer bimolekularen Additionsreaktion verstanden werden. Der Keimbildungsmechanismus ist bis heute noch nicht vollständig geklärt und verschiedene Theorien wie beispielsweise die



nichtklassischen Theorien der Pränukleationscluster oder der spinodalen Entmischung sind dazu bekannt. In diesem Kapitel wird jedoch die Theorie anhand des klassischen Keimbildungsmodells genauer erläutert.

Der Nukleationsvorgang kann zunächst zwischen primärer und sekundärer Keimbildung unterschieden werden. Bei der primären Nukleation können einerseits aus gesättigter Lösung spontane Kristallkeime entstehen, dies entspricht der homogenen Nukleation. Andererseits können Fremdkörper eine Kristallbildung induzieren, in diesem Fall wird von heterogener Nukleation gesprochen. Die gebildeten Keime der primären Nukleation können Grundlage für den sekundären Keimbildungsprozess sein. Bei der sekundären Keimbildung, die auch in metastabilen Bereichen möglich ist, können durch Kollision zwischen den Kristallen vorhandene Spaltprodukte von den existierenden Kristallen abgelöst werden, die wiederum als Kristallkeime dienen.

### 2.1.1 Homogene Keimbildung

Die Bildung von Keimen bei der homogenen Keimbildung aus einer übersättigten Lösung entsteht durch sukzessive Aneinanderlagerung von Ionen zu Clustern einer bestimmten Größe, verursacht durch lokale Fluktuation. Liegt die Größe des Clusters unterhalb eines bestimmten Bereiches, lösen sie sich nach einer bestimmten Zeit wieder auf. Wird hingegen eine bestimmte Größe erreicht, bleibt der Cluster stabil und ein schlagartiges Anwachsen ist zu beobachten.

Thermodynamisch betrachtet spielt die Änderung der Gibbs'schen freie Enthalpie  $\Delta G_K$  des Systems und dem damit verbundenen Phasenwechsel eine entscheidende Rolle für die Keimbildung. Die freie Enthalpie setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen,  $\Delta G_V$  dem exergonischen Volumenanteil und  $\Delta G_O$  dem endergonischen Oberflächenanteil.

$$\Delta G_K = -\Delta G_V + \Delta G_O \quad (2.5)$$

Da die gelöste Komponente in einer übersättigten Lösung durch die Kristallisation in einen Zustand geringer freier Enthalpie übergeht, wird Volumenenergie zugewonnen, was eine negative Änderung für  $\Delta G_K$  bedeutet und proportional zum Volumen des Keimes und somit zur dritten Potenz des Keimradius  $r_K$  ( $r^3$ ) ist. Dem gegenüber muss jedoch Oberflächenenergie

aufgewendet werden, da eine neue Phasengrenze entstanden ist und somit ein positiver Beitrag für  $\Delta G_O$  liefert. Die freie Enthalpieänderung verbunden mit der Bildung einer neuen Oberfläche, die positiv ist, ist proportional zum Quadrat des Keimradius ( $r^2$ ). Zur Vereinfachung wird ein sphärischer Keim angenommen mit dem Radius  $r_K$ , dem Volumen  $4\pi r_K^3/3$ , dem Volumenterm  $\Delta G_v$  (Differenz der freien Enthalpie von Lösung und Keim pro Volumeneinheit, in übersättigter Lösung gilt  $\Delta G_v < 0$ ), der Oberfläche  $4\pi r_K^2$  und der Grenzflächenspannung  $\sigma$ .

$$\Delta G_K = -\frac{4}{3}\pi r_K^3 \Delta G_v + 4\pi r_K^2 \sigma \quad (2.6)$$

Durch die Bestimmung des Maximums der freien Enthalpie durch Ableiten der Gleichung, lässt sich der kritische Keimradius berechnen.

$$\left(\frac{\partial \Delta G_K}{\partial r_K}\right)_{r=r_K^*} = 0, \quad (2.7)$$

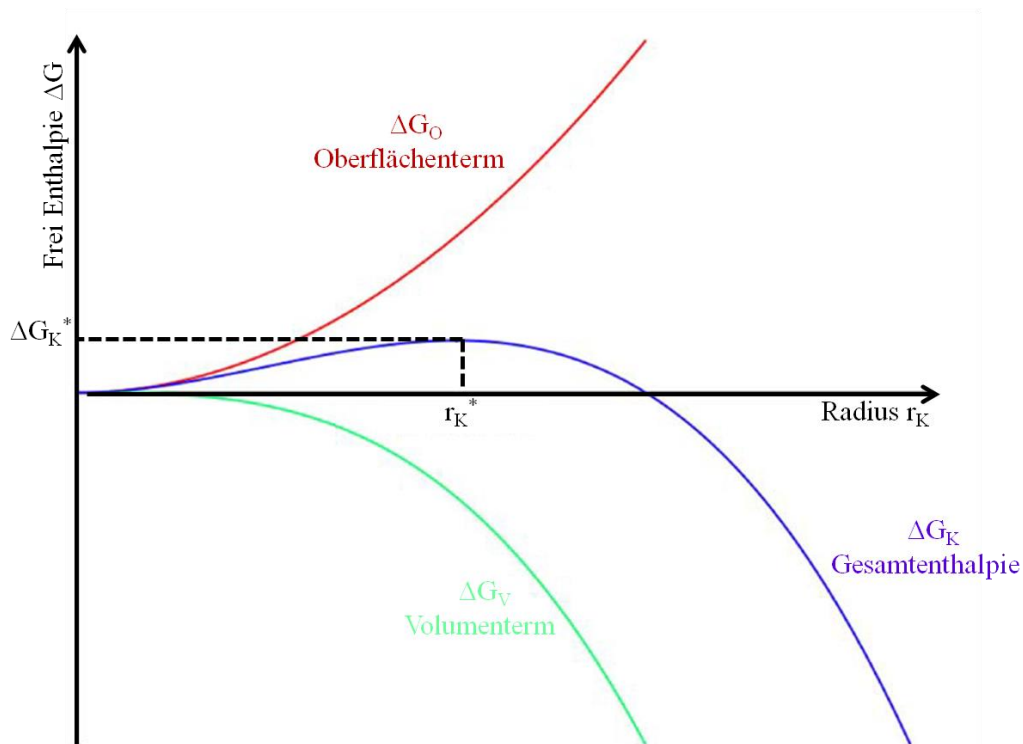
daraus ergibt sich für den kritischen Radius

$$r_K^* = \frac{2\sigma}{\Delta G_v}, \quad (2.8)$$

und für die freie kritische Keimbildungsenthalpie gilt

$$\Delta G_K^* = -\frac{16\pi\sigma^3}{3(\Delta G_v)^2} = -\frac{4\pi\sigma^3}{3}\sigma r_K^{*2}. \quad (2.9)$$

Sowohl der Volumenanteil  $\Delta G_v$  als auch der Oberflächenanteil  $\Delta G_O$  sind abhängig vom Radius des Keimes, demnach auch die freie Enthalpie  $\Delta G_K$ . In Abbildung 2.1 sind die  $\Delta G_v$ ,  $\Delta G_O$  und  $\Delta G_K$  als Funktion des Radius  $K$  aufgetragen. Da  $\Delta G_v$  und  $\Delta G_O$  entgegengesetzte Vorzeichen haben, steigt  $\Delta G_K$  zuerst an und fällt schließlich ab. Dabei durchläuft die Kurve von  $\Delta G_K$  ein Maximum mit dem kritischen Radius  $r_K^*$  (Gl. 2.8). Ist  $r > r_K^*$  dominiert die negative Volumenenergie, dadurch wird  $\Delta G_K$  erniedrigt und die Keime sind stabil und wachstumsfähig. Umgekehrt ist  $r < r_K^*$  und die positive Oberflächenenergie dominiert, löst sich der Partikel wieder auf.

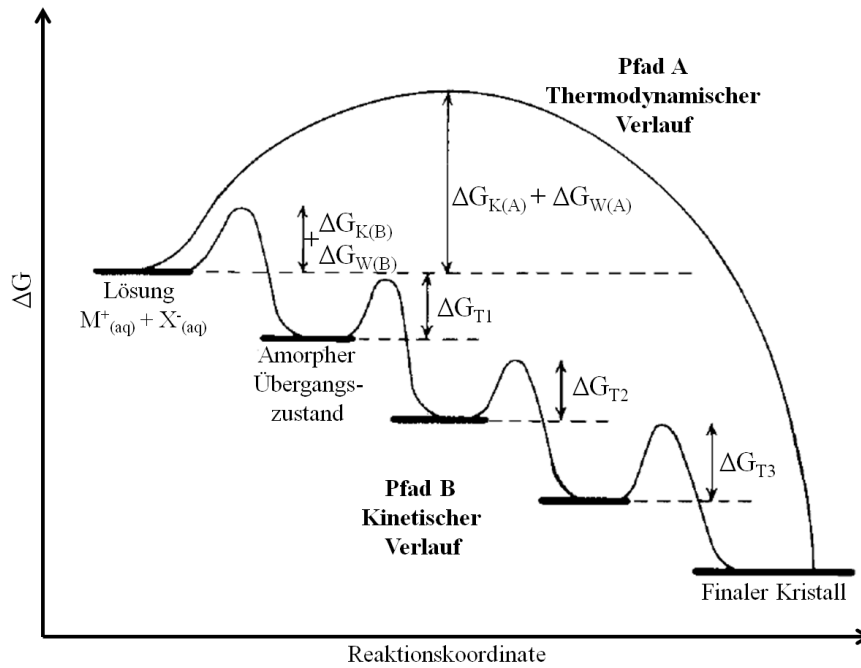


**Abbildung 2.1** Änderung der freien Bildungsenthalpie eines Keimes als Funktion seines Radius.<sup>[40]</sup>

Wie schnell ein Keim gebildet wird, kann mit der Keimbildungsgeschwindigkeit  $J$  in Gleichung 2.10 bestimmt werden. Die Keimbildungsgeschwindigkeit ist die Anzahl der pro Zeit- und Volumeneinheit gebildeten wachstumsfähigen Keime, die nach Arrhenius mit der Gleichung

$$J = A \exp \left[ \frac{-\Delta G_K^*}{k_B T} \right], \quad (2.10)$$

beschrieben wird.  $k_B$  als Boltzmann-Konstante ( $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) und  $A$  als prä-exponentieller Faktor, der auch abhängig von der Übersättigung ist. Mit dieser Gleichung wird deutlich, dass die Keimbildungsrate bis zum Erreichen eines kritischen Wertes der Übersättigung fast Null ist und erst ab diesem Wert exponentiell ansteigt. Diese kritische Übersättigung definiert die sogenannte metastabile Zone, in welcher das Kristallwachstum ohne gleichzeitige Keimbildung stattfinden kann.



**Abbildung 2.2** Kristallisationsverlauf unter thermodynamischer und kinetischer Reaktionskontrolle. Pfad A folgt einem Ein-Stufen-Mechanismus, Pfad B einer sequenziellen Route. Abhängig von der freien Aktivierungsenthalpie  $\Delta G$  verläuft ein System über Pfad A oder B. Amorphe Zwischenstufen entstehen häufig unter kinetischen Bedingungen.<sup>[41]</sup>

Existieren Substanzen in mehreren Modifikationen geht das System, wenn es nach der Ostwald'schen Stufenregel verläuft, wie in Abbildung 2.2, nicht direkt in den energetisch günstigen Zustand über, sondern zunächst in die metastabile Modifikation, da hier die größte Keimbildungsgeschwindigkeit vorliegt. Erst danach geht das System in die stabile Modifikation über.

### 2.1.2 Heterogene Keimbildung

Bei der heterogenen Keimbildung scheiden sich Keime an Fremdpartikeln wie Staub, Gefäßwänden oder Substraten ab. Aufgrund der Benetzung  $\theta$  ist die Oberflächenspannung des Keimes geringer als bei dem homogen gebildeten Keim. Für die Keimbildungsenthalpie  $\Delta G_{K(het)}$  des heterogenen Keimes gilt

$$\Delta G_{K(het)} = \Delta G_{K(hom)} \cdot f(\theta) \text{ mit } f \leq 1. \quad (2.11)$$

f gibt den Grad der Erniedrigung der Aktivierungsenthalpie an. An einer glatten Oberfläche, z.B. Gefäßwand würde für f folgendes gelten

$$f = \frac{1}{4}(2 + \cos\theta)(1 - \cos\theta)^2. \quad (2.12)$$

Ist  $f < 1$ , findet eine Benetzung statt, die Keimbildungsenthalpie und die Aktivierungsenergie werden erniedrigt und die Keimbildungsgeschwindigkeit erhöht. Daher verläuft die heterogene Keimbildung schon bei geringerer Übersättigung, im Gegensatz zur homogenen Keimbildung.

$$\Delta G_{K(\text{het})} < \Delta G_{K(\text{hom})} \quad (2.13)$$

Liegt mit  $\theta = 180^\circ$  keine Benetzung vor, nimmt der Faktor  $f(\theta)$  den Wert 1 an, es gilt

$$\Delta G_{K(\text{het})} = \Delta G_{K(\text{hom})}. \quad (2.14)$$

Das bedeutet, dass die freie Reaktionsenthalpie der homogenen Nukleation der heterogenen Keimbildung entspricht. Bei vollständiger Benetzung ( $\theta = 180^\circ$ ) strebt  $f(\theta)$  gegen den Wert null, woraus folgt

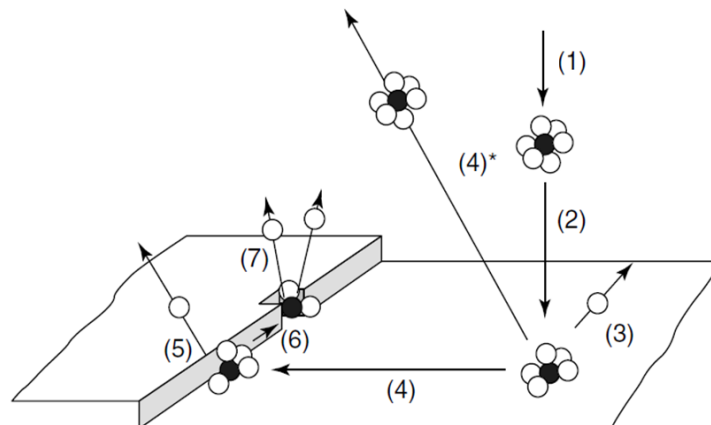
$$\Delta G_{K(\text{het})} = 0. \quad (2.15)$$

In diesem Fall findet keine Keimbildung statt, wie beispielsweise bei Kristallisationen aus übersättigten Lösungen mit Impfkristallen.

## 2.2 Kristallwachstum

Nachdem während des Keimbildungsvorganges die stabilen Keime gebildet wurden, beginnen diese zu einem Kristall mit sichtbarer Größe zu wachsen. Derweilen eine ausreichende Übersättigung vorhanden ist, können die Kristalle heranwachsen. Die verschiedenen Prozesse des Einbaus von Baueinheiten in den Kristall lassen sich in mehrere Schritten einteilen:

1. Konvektiver Transport des Bausteins aus der umgebenden Lösung an die Oberfläche des Kristalls
2. Diffusiver Transport des Bausteins aus der umgebenden Lösung an die Oberfläche des Kristalls
3. Adsorption des Bausteins auf der Kristalloberfläche (erster Desolvationsschritt)
4. Diffusion der Bausteine auf der Oberflächen zur Wachstumsstelle
5. Anlagerung an eine Ecke oder Stufe (zweiter Desolvationsschritt)
6. Diffusion entlang der Ecke oder Stufe
7. Einbau der Baueinheiten in den Ecken und Stufen des Kristall
8. Abtransport von frei werdender Adsorptionswärme und Solvatmolekülen (Desolvationsprozess)



**Abbildung 2.3** Schematische Darstellung der Prozesse während des Kristallwachstums, (1) Transport der gelösten Bausteine zur Kristalloberfläche, (2) Diffusion durch die Grenzschicht, (3) Adsorption auf der Kristalloberfläche, (4) Diffusion auf der Oberfläche, (4)\* Desorption von der Oberfläche, (5) Anlagerung an eine Ecke oder Stufe, (6) Diffusion entlang der Ecke oder Stufe, (7) Einbau in eine Ecke oder Stufe.<sup>[42]</sup>

Zur Theorie des Kristallwachstums gibt es zwei Modellvorstellungen, zum einen die Theorie der Oberflächenenergie, zum anderen die Diffusionstheorie.

Die Theorie der Oberflächenenergie beruht auf der Annahme, dass die Gestalt, die der wachsende Kristall annimmt, mit der geringsten Oberflächenenergie für ein gegebenes Volumen verbunden ist. Demnach sollte beim Kristallwachstum die Kristallfläche mit einer kleinen Oberflächenspannung vergrößert und diejenige mit einer großen Oberflächenspannung verringert werden. Dabei müssten die Kristallflächen mit der größeren Oberflächenspannung schneller anwachsen als die mit der niedrigeren.

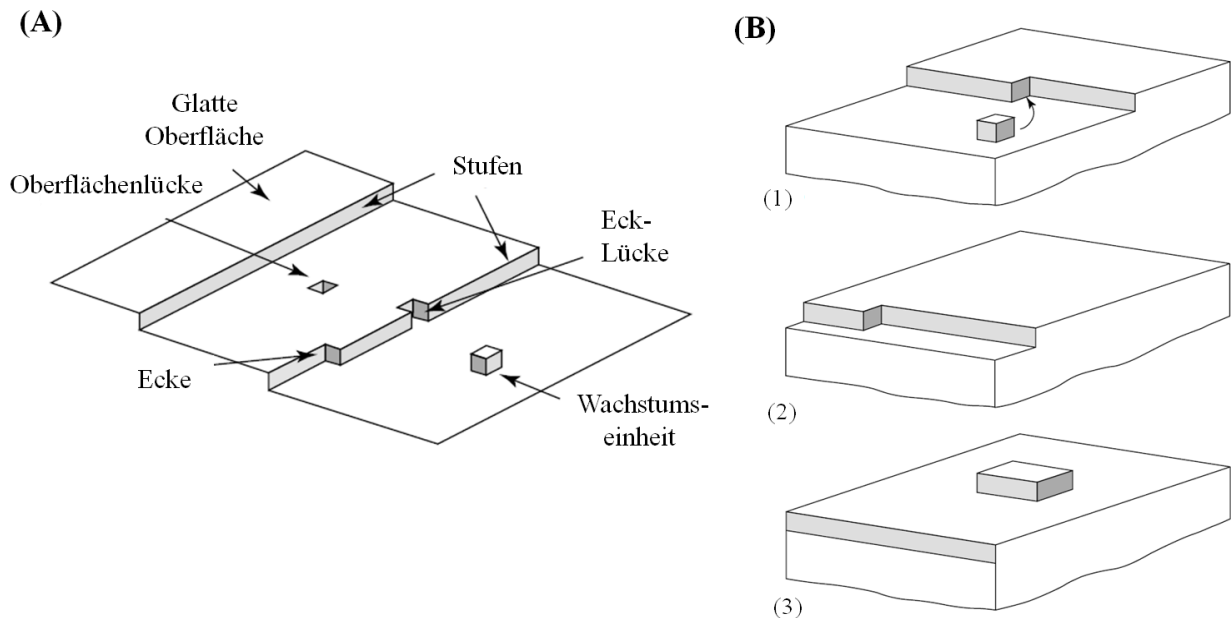
Die Diffusionstheorie basiert auf der Annahme, dass ein Konzentrationsgefälle in der Nachbarschaft der wachsenden Oberfläche ist und dass der Wachstumsprozess ein Umkehrprozess der Auflösung ist. Die Materie wird kontinuierlich auf einer Kristallfläche mit einer Rate proportional zur Differenz der Konzentration des Ablagerungsortes und der Konzentration der Teilchen in Lösung abgelagert. Die Menge der gelösten Moleküle, die aus einer übersättigten Lösung auf der Oberfläche eines wachsenden Kristalls abgeschieden werden, können mit der folgenden Gleichung von Nernst beschrieben werden:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{D}{\delta} A(c - c^*), \quad (2.16)$$

mit  $dm$  der Änderung der Masse der gelösten Substanz, abgelagert auf der Kristalloberfläche mit der Fläche  $A$  im Zeitintervall  $dt$ ,  $D$  dem Diffusionskoeffizient des gelösten Stoffes,  $c$  und  $c^*$  der gegenwärtigen Konzentration und der Gleichgewichtskonzentration des gelösten Stoffes und  $\delta$  die Dicke der stagnierenden Schicht, die an die Kristalloberfläche angrenzt.

Das Oberflächenkeimbildungsmodell in Abbildung 2.4 von Kossel, Volmer und Stranski geht davon aus, dass das Kristallwachstum ein diskontinuierlicher Prozess ist, der durch die Adsorption der kristallbildenden Materie auf der Kristalloberfläche Schicht für Schicht (*layer by layer*) stattfindet. Nach diesem Modell werden die Wachstumseinheiten beim Erreichen auf der Kristalloberfläche nicht direkt in das Kristallgitter eingebaut, sondern werden adsorbiert und wandern über die Oberfläche. Erreicht eine Baueinheit eine Ecke, so hat sie drei unmittelbare Nachbarn, dadurch wird die maximale Bindungsenergie zwischen der Baueinheit und der bestehenden Kristallfläche für den Einbau an der Ecke erreicht. Daher

findet unter Idealbedingungen das Wachstum auf der Kristalloberfläche durch Migration der Baueinheiten entlang der Kanten statt, die anschließend in den Ecken eingebaut werden. Die Ablagerungen werden dabei schrittweise fortgesetzt, bis eine gesamte Schicht gebildet wurde.



**Abbildung 2.4** (A) Kristallwachstumsmodell nach Kossel, Volmer, Stranski (B) Schematische Darstellung der Wachstumsstellen auf einer Kristalloberfläche: Adsorption auf, (1) einer Ecke, (2) einer Kante, (3) einer glatten Oberfläche.<sup>[42]</sup>

Diese Theorie kann jedoch nicht erklären, wie die Oberflächenkeimbildung, bei mäßig hohen Wachstumsraten, die in vielen Fällen bei relativ geringer Übersättigung erhalten werden, induziert wird. Das Oberflächendiffusion Modell nach Burton, Cabrera und Frank (BCF Modell) postuliert, dass das Wachstum an einem Punkt auf der Kristalloberfläche durch stufenartige Schraubversetzungen beginnt und durch Drehung der Schritte rund um den Versetzungspunkt spiralförmig weiterwächst. Durch Kristallbaufehler, wie beispielsweise dem Einbau von Fremdstoffen, können, wie Abbildung 2.5, Schraubversetzungen entstehen.



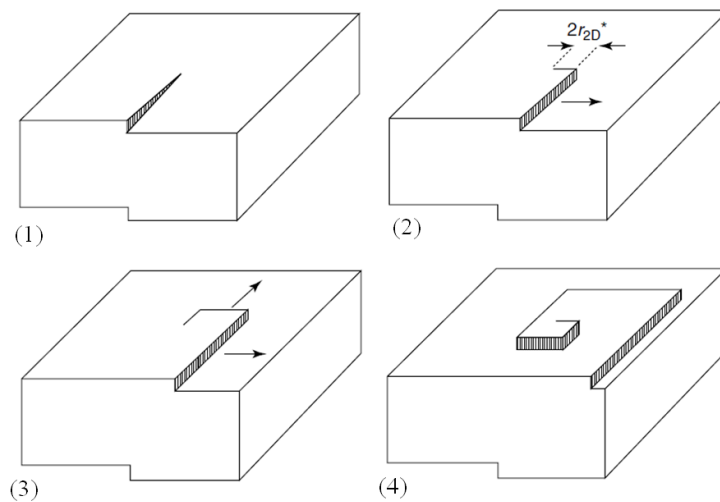
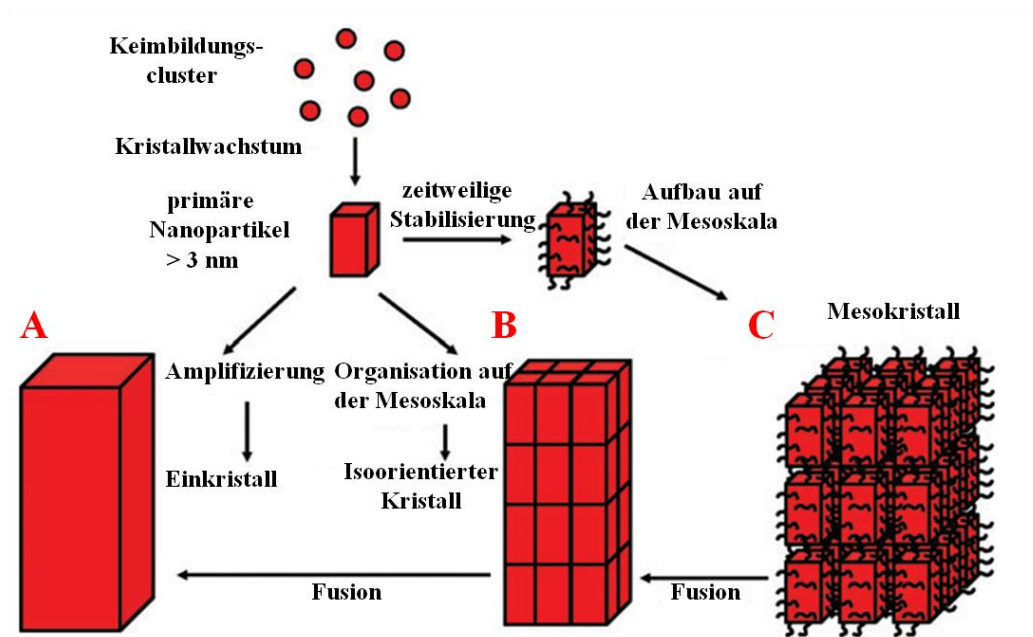


Abbildung 2.5 Wachstum einer Schraubenversetzung.<sup>[42]</sup>

### 2.3 Mesokristalle

In der Definition des klassischen Kristallisationsmodells gibt es eine entscheidende Beschränkung in Hinsicht auf die Bildung von primären Kristalleinheiten, was (abhängig vom Kristall) Atome, Ionen oder Moleküle sein können. Einige Biominerale zeigen ein Verhalten wie Einkristalle, sind jedoch so komplex in Ihrem Aufbau, dass sie sich nicht einfach mit der klassischen Kristallisationstheorie beschreiben lassen. Ein Beispiel hierzu sei der Stachel des Seeigels, der aus Calcit besteht und in polarisiertem Licht und in Streuexperimenten das Verhalten eines Einkristalls vorgibt.<sup>[43]</sup> Dennoch zeigt eine Bruchfläche des rauen Stachels nicht die typischen Spaltungsebenen an, die bei einem Einkristall erwartet werden. In verschiedenen Studien dieses Biominerals wurde ein nichtklassisches Kristallisationsmodell vorgeschlagen, welches darauf hinweist, dass sich dieser Kristallisationsvorgang auf der Bildung von Nanopartikeleinheiten stützt. Bilden diese durch Aggregation eine mesoskopische Kristallstruktur mit dreidimensional geordneten Nanopartikel-Superstrukturen, kann von einem Mesokristall gesprochen werden.<sup>[44]</sup>



**Abbildung 2.6** Schematische Darstellung der klassischen und der nichtklassischen Kristallisation. (A) Klassischer Kristallisationsweg, (B) Organisation auf der Mesoskala durch Aggregation vorgeformter kristalliner Bausteine, daraus ergeben sich Einkristalle mit einheitlicher, orientierter Mosaikstruktur, (C) Mesokristallbildung durch Selbstorganisation der primären Nanopartikel bedeckt mit Makromolekülen an der Kristalloberfläche.<sup>[43]</sup>

Durch die Aggregation von zumeist kristallinen primären Nanopartikeln, die kristallographisch orientiert verläuft, entstehen auf diese Weise, in der nichtklassischen Kristallisation, wie in Abbildung 2.6 B, iso-orientierte Kristalle. Sind die Nanopartikel, wie in Abbildung 2.6 C, mit Additiven stabilisiert, können diese über mesoskalische Selbstanordnung Mesokristalle bilden. Ist die Oberfläche der Nanopartikel nicht ausreichend mit organischen Additiven bedeckt, können deren Baueinheiten kristallographisch zu einem iso-orientierten Kristall und weiter zu einem Einkristall fusionieren. Die Folge ist, dass ein Einkristall mit vielen Defekten wie beispielsweise Poren gebildet wird. Das heißt, der Mesokristall hat als Intermediat für einen Einkristall fungiert.

# 3

## Additiv gesteuerte Kristallisation

Additive sind heutzutage in der chemischen, pharmazeutischen und Lebensmittelindustrie nicht mehr wegzudenken. Die Anforderung an kristallisierte Festkörper-Produkte wie thermodynamische und kinetische Stabilität während ihrer Lagerzeit, ihre Phase und die Polymorphie, die Wachstumsmorphologie und Größenverteilung, die durch entsprechende Kristallisationsbedingungen gesteuert werden, können so gezielt durch den Einsatz von Additiven kontrolliert werden.<sup>[45]</sup> Häufig wird dabei die Natur als Vorbild genommen, die Hybridmaterialien mit einzigartigen Formen und herausragenden mechanischen Eigenschaften aus einer organischen und einer anorganischen Komponente erzeugt. Die dabei gebildeten Biominerale sind wirkliche Meisterstücke der Additiv-gesteuerten Kristallisation.

Mit Hilfe von Additiven können die Wachstumsgeschwindigkeit und die Form von Kristallen, demnach der Kristallisationsvorgang, beeinflusst und verändert werden. Nach Song *et al.*<sup>[44]</sup> lassen sich die Additive in unlösliche und lösliche Matrixmoleküle einteilen, die auch gemeinsam in Kristallisationen auftreten können. Unlösliche Additivmoleküle können als Templat zur Kontrolle der Keimbildung oder zum Polymorph des nukleierten Kristalls eingesetzt werden. Zu den verschiedenen unlöslichen Templaten zählen beispielsweise die *Langmuir* Monoschichten, selbstorganisierte Monoschichten, unlösliche Blockcopolymere oder starre Festkörper-Templete.<sup>[44]</sup> Bei löslichen Additiven handelt es sich häufig um lösliche Makromoleküle, die auf die Kristallisation hinsichtlich der Morphologie, Größe und Polymorphie des Kristalls einwirken können. Mit Hilfe von synthetischen Polymeradditiven,<sup>[37]</sup> aus Biomineralien extrahierten Biomolekülen, polymerinduzierten

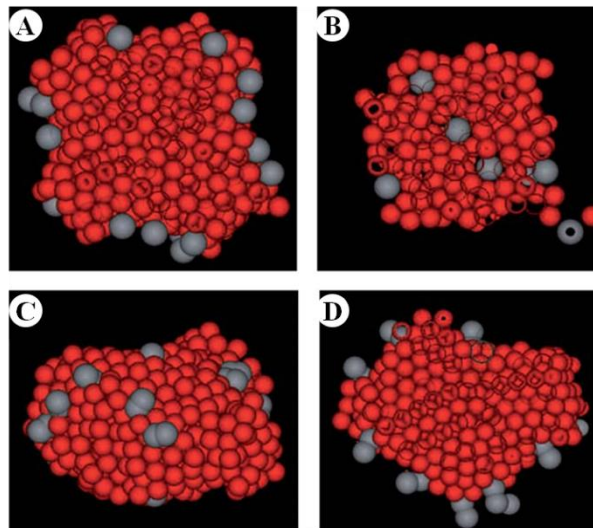
flüssigen Vorstufen,<sup>[46]</sup> einfachen ionischen Zusatzstoffen oder adsorbierten Verunreinigungen aus der Reaktion kann die Kristallisation kontrolliert werden. Additive können sowohl auf die Keimbildung als auch auf das Kristallwachstum einwirken.

### 3.1 Einfluss der Additive auf die Kristallkeimbildung

Durch die Interaktion von Additiven mit den Kristalloberflächen und den Keimen, kann die Kontrolle über die Kristallgröße, Morphologie oder Polymorphie beeinflusst werden. Die Wahl eines geeigneten Additivs kann die Keimbildung fördern, verzögern oder auch inhibieren. Die Fähigkeit eines Additivs die Kristallkeimbildung zu regulieren, wird, nach einer Modulation von Anwar *et al.*, nach folgenden Schlüsselfaktoren bestimmt:<sup>[47]</sup>

1. der Stärke seiner Wechselwirkung mit dem gelösten Stoff
2. seiner eingreifenden / zerstörerischen Fähigkeiten, basierend auf sterischen, entropischen oder enthalpischen Effekten
3. den Grenzflächeneigenschaften und
4. dem Grad an Selbstorganisation.

Sind vorhandene Additiv-Additiv Wechselwirkungen zu stark, neigen die Additive dazu miteinander zu aggregieren. Dadurch wird ihre Wechselwirkung mit den gelösten Molekülen minimiert und ihre Wirkung auf die gelöste Keimbildung sinkt. Bei einer schwachen Affinität des Additivs zu den gelösten Molekülen in Abbildung 3.1 A, werden die Additive aus dem Inneren der gelösten Cluster ausgegrenzt und können die Keimbildung höchstens verzögern. Ist hingegen eine stark ausgeprägte Affinität zwischen dem Additiv-Teilchen und den gelösten Teilchen vorhanden, wie in Abbildung 3.1 B dargestellt, neigen die Moleküle dazu, sich um die Additive anzuordnen. Sie bilden eine strukturierte Schale um die Additivmoleküle zu Lasten des entstehenden Gitters der gelösten Moleküle. Dadurch wird die Keimbildung inhibiert. Dabei spielt auch die Größe der Additive eine Rolle. Große Additive können eine komplette Hemmung der Keimbildung verursachen. Kleine Additive hingegen können die Keimbildung nur verzögern, während sie in das entstehende Gitter der gelösten Moleküle eingebaut werden.



**Abbildung 3.1** (A) Schnitt durch einen sich bildenden Keim mit Einzeladditiv-Teilchen mit geringer Affinität zum gelösten Teilchen und einer effektiven Größe größer als der eines gelösten Moleküls. (B) Schnitt durch das gelöste Aggregat mit Einzeladditiv-Teilchen mit hoher Affinität zum gelösten Teilchen und einer effektiven Größe größer als des gelösten Moleküls. (C) Snapshot des gelösten Aggregats mit einem schwachen amphiphilen Dimer-Additiv – die Additivmoleküle neigen dazu sich parallel zur Oberfläche anzuordnen. (D) Schnitt des entstehenden Keimes mit einem amphiphilen Dimer-Additiv – die Additive sind zumeist senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet.<sup>[47]</sup>

Im Gegensatz zu Additiven, die eine Neigung zum gelösten Molekül haben (*Solute-Philie*) und sich innerhalb des entstehenden Clusters befinden, haben die amphiphilen Additive sowohl eine Affinität zum gelösten Molekül, als auch zum Lösungsmittel und neigen dazu, sich an der gelösten Molekül-/Lösungsmittel-Grenzschicht aufzuhalten. Dort ist ihr Einfluss nur eingeschränkt und daher unfähig eine komplette Keimbildung zu hemmen. Amphiphile Dimer-Additive sind meist, wie in Abbildung 3.1 C, senkrecht zur Grenzfläche ausgerichtet, wohingegen sich schwache amphiphile Dimere in der Regel parallel zur Grenzflächen orientieren (Abbildung 3.1 D). Dimere Additive bestehen aus einem gelösten Partikel, der mit einem anderen Atom verknüpft ist, dessen effektive Größe und relative Affinität zum gelösten Molekül und zum Lösungsmittel variiert. Schwache amphiphile Dimere können die Nukleation sowohl hemmen als auch fördern, abhängig von der Größe des zweiten Partikels des Dimers, der eine Affinität sowohl zum gelösten Molekül als auch zum Lösungsmittel hat. Ist der Partikel größer als das gelöste Teilchen, inhibiert das Dimer, kleinere Partikel begünstigen die Keimbildung. Das amphiphile Dimer kann die Keimbildung zwar fördern, aber nicht hemmen, höchstens verzögern. Ist der zweite Partikel des Dimers, der einen

lösungsmittelähnlichen Charakter hat, groß, kann eine Verzögerung beobachtet werden, während kleine Partikel unterstützend wirken. *Solute-Phile* Dimere agieren eher als Inhibitoren, deren Effekt stark ist, wenn der zweite Dimerpartikel größer als der des gelösten Partikels ist.

Bei einer der nichtklassischen Keimbildungstheorien kann die Kristallisation über sogenannte thermodynamisch stabile Pränukleationscluster verlaufen, die weiter aggregieren und amorphe homogene Nanopartikel bilden, die in Lösung nukleieren. Durch den Einsatz von Templaten wie z.B. Polycarboxylaten können polymerinduzierte flüssige Vorstufen (*polymer-induced liquid precursors* PILPs – negativ geladene Polymere wie Polyasparginsäure oder Polyacrylsäure) generiert werden, die zu kristallinen Überstrukturen mit besonderen Eigenschaften im Mikrometerbereich führen können.<sup>[46]</sup> Aufgrund ihrer „flüssigen“ Natur können PILPs wie Vorläufer-Tröpfchen abgeschieden werden und eine Vielzahl von Nicht-Gleichgewichtsmorphologien wie Kristalltropfen, Fasern und Filme erzeugen. Daher bieten sich PILPs besonders gut zur Morphogenese von neuen, biologisch bedeutsamen Mineralstrukturen an.<sup>[48]</sup>

### 3.2 Einfluss der Additive auf das Kristallwachstum

Aufgrund der unterschiedlichen Strukturen und energetischen Situationen, sind die Wachstumsraten einzelner Kristallflächen unterschiedlich. Kristalle können ionische Flächen mit Ladungen, koordinativ bindende Flächen, elektrisch neutral aber dipolare Flächen, hochpolarisierbare Flächen oder auch hydrophobe oder hydrophile Flächen ausbilden.<sup>[44]</sup> Die Zuführung von Additiven kann das Wachstum von Kristallen erheblich beeinflussen. Es gibt einige Additive, die dazu befähigt sind, die Oberflächenbindungen einiger Kristallflächen zu „erkennen“ und an diese zu adsorbieren. Durch die Adsorption der Additive entsteht eine partielle Sättigung der Kristalloberflächenbindung, was zu einer Verringerung der Oberflächenenergie führen kann. Durch die selektive Adsorption der Additive an den Kristallflächen können auf diese Weise Kristalle mit definierten Formen erzeugt werden.<sup>[44]</sup>

Anorganische Additive, können die Kristallwachstumsrate beeinflussen und haben häufig einen ähnlichen Einfluss auf die Löslichkeit des Kristalls.<sup>[49]</sup> Schon sehr geringe Konzentrationen dieser Additive sind ausreichend, um einen starken Einfluss auf die Kristallisation auszuüben. So haben beispielsweise Magnesium-Ionen ( $Mg^{2+}$ ), Litium-Ionen ( $Li^+$ ) und Hydrogenphosphat-Ionen ( $HPO_4^{2-}$ ) Einfluss auf die Kristallform von

Calciumcarbonat.<sup>[50,51]</sup> Da  $Mg^{2+}$  einen kleineren Atomradius als  $Ca^{2+}$  besitzt und deswegen härter ist, hat es eine größere Hydrathülle, was dazu führt, dass es vereinfacht auf der wachsenden Kristalloberfläche des Calcit adsorbiert wird und dadurch die Gitterbildung des Calcits inhibieren oder zu einer Änderung der Morphologie führen kann.<sup>[52]</sup> Besonders die (001) Flächen des Calcit sind aufgrund ihrer stark geladenen Oberfläche instabile Flächen. Durch Inkorporation von Additiven, wie den oben angesprochenen anorganischen Ionen, ist es möglich die Oberflächenenergie zu verändern. Beispielsweise kann durch den Einbau von  $Li^+$  Ionen und der daraus folgenden Substitution der  $Ca^{2+}$  Ionen, die (001) Fläche stabilisiert werden, während die stabilen neutralen Kristallflächen dabei destabilisiert werden. Dies hat zur Folge, dass die Calcit Kristalle, die ohne Additiv rhomboedrische Kristalle bilden, mit den eingebauten  $Li^+$  Ionen in den Zwischengitterplätzen oder im Kristallgitter hexagonale Calcit Kristalle formen.<sup>[44,50]</sup> Werden Carbonat-Ionen ( $CO_3^{2-}$ ) des Calcits durch Hydrogenphosphat-Ionen ( $HPO_4^{2-}$ ) ausgetauscht, wird hingegen die Oberflächenenergie der (1-10) Flächen herabgesetzt und stabilisiert, wodurch prismatische Rauten generiert werden.<sup>[50]</sup> Auch bei der Kristallisation von Calciumoxalat, ist ein Einfluss von  $Mg^{2+}$  Ionen bekannt. So kann die Zugabe von  $Mg^{2+}$ , aber auch anderen Ionen wie  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ , oder  $PO_4^{3-}$  eine inhibierende Wirkung auf die Kristallisation ausüben.<sup>[53,54]</sup> Dabei konnte festgestellt werden, dass der inhibierende Effekt proportional zur der Konzentrationserhöhung des Additivs zunimmt.

Bei den meistverbreitetesten Additiven handelt es sich um organische Verbindungen, die durch ihre Oberflächenaktivität und hohe Effektivität charakterisiert werden. Besonders bemerkenswert ist, dass schon ein Molekül dieses Additivs ausreichen kann, um die Wachstumsrate auf  $10^4$  bis  $10^6$  Molekülen<sup>[49]</sup> der zu kristallisierenden Makrokomponenten zu senken. Daher verfügen diese Additive über einen erheblichen Einfluss auf die Wachstumsrate. Maßgebend für die organischen Moleküle ist besonders ihre Größe. Große organische Additive haben den Vorteil an jeder Seite der Kristalloberfläche adsorbiert werden zu können. Daher müssen sie nicht zwingend spezifisch für eine bestimmte Kristalloberfläche sein, um auf das Kristallwachstum und der daraus folgenden Morphologie einzuwirken.<sup>[49]</sup>

In Gegenwart von doppelhydrophilen Blockcopolymeren (DHBC) wie dem Polyethylenglykol-*block*-Polymethacrylsäure (PEG-*b*-PMAA) konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Polymerkonzentration die erhaltenen Calciumoxalat Dihydrat Kristalle allmählich von den tetragonalen Bipyramiden, die durch die (101) Fläche dominiert werden, zu stäbchenförmigen tetragonalen Prismen, bestimmt durch die (100) Fläche, umgewandelt

werden. Während der Kristallisation aus einer Übersättigung ohne Polymer überwiegend, aufgrund ihrer größeren Löslichkeit, die kinetisch stabilere Calciumoxalat Trihydrat und teilweise Dihydrat Phase gebildet werden, wird bei Anwesenheit des Polymers nur die Dihydrat Phase gebildet. Dies ist ein Indiz, dass das Polymer bevorzugt an der (100) Ebene adsorbiert oder spezifisch dort hemmt.<sup>[55]</sup> Untersuchungen des Einflusses des Blockcopolymers Polyethylenglykol-*block*-Polyacrylsäure zeigten, dass Polyelektrolyte, aufgrund ihrer Ladungen, einen tiefgreifenden Effekt auf das Wachstum von Calciumoxalat Monohydrat Kristallen haben. In diesem Fall ist es der negativen Ladung der Carboxylgruppe der Polyacrylsäure zuzuschreiben, an deren Polymer/Wasser Oberfläche sich Calcium-Ionen anreichern. Für die Wachstumskinetik hat dies zur Folge, dass das Polymer die aktiven Wachstumsstellen blockiert und die Wachstumsrate mit zunehmender Polymerkonzentration sinkt.<sup>[56,57]</sup> Die Anreicherung der Calcium-Ionen kann dazu führen, dass die Keimbildung von Calciumoxalat in einer chemischen Mikroumgebung, in der Nähe der Polymerkettenoberfläche, stattfindet. In dieser Umgebung werden mehr Calcium- und Oxalat-Ionen angereichert. Dadurch entsteht dort eine höhere Übersättigung als in der Lösung. Die Barriere der Aktivierungsenergie wird gesenkt und Calciumoxalat kann einfacher nukleieren. Durch die verringerte Induktionszeit der Fällung wird eine große Menge an Calciumoxalat-Partikeln mit kleiner Partikel-Größe in Anwesenheit des Polymers in Lösung gebildet.<sup>[58,59]</sup>

Neben den Polymeren sind auch kleine organische Anionen wie das Citrat, aufgrund seiner Carboxylgruppen, bekannt für ihre hemmenden Eigenschaften bei der Kristallisation von Calciumoxalat. Auch diese Moleküle können durch Hemmung der Stufenentwicklung auf verschiedenen Flächen durch spezifische Wechselwirkungen Einfluss auf die Wachstumsform und Kinetik nehmen.<sup>[60,61]</sup>



# 4

## Calciumoxalat

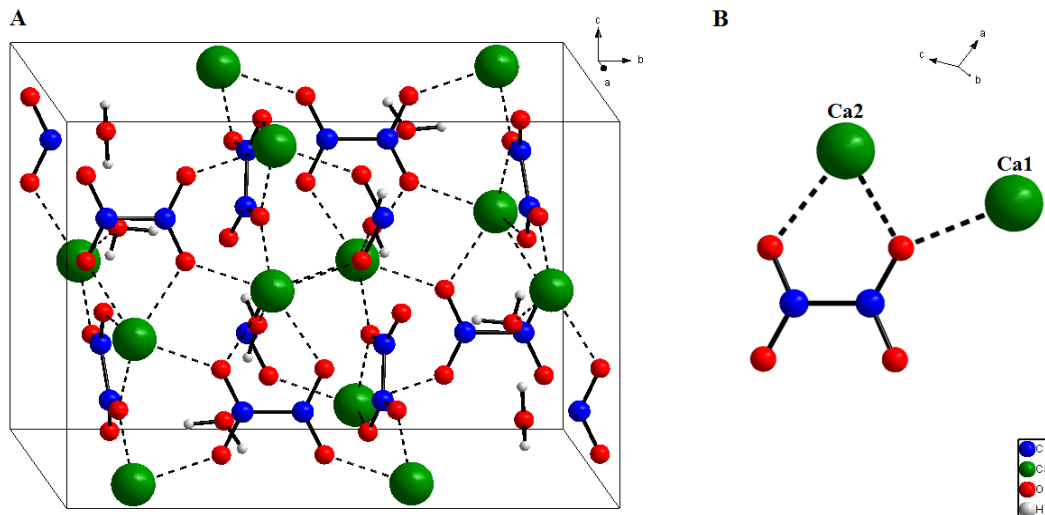
### 4.1 Chemie und Kristallographie von Calciumoxalat

Calciumoxalat mit einem Löslichkeitsprodukt von  $K_L = 2.32 \cdot 10^{-9}$  (für Calciumoxalat Monohydrat) ist ein schwerlösliches kristallines Salz der Oxalsäure und des Calciums. Die Oxalsäure selbst ist eine starke organische Säure mit Dissoziationskonstanten von  $pK_1 = 1.46$  und  $pK_2 = 4.40$  und auch die einfachste Dicarbonsäure ( $H_2C_2O_4$ ).<sup>[62]</sup> Von Calciumoxalat sind drei kristalline Phasen bekannt. Das monokline Calciumoxalat Monohydrat ( $CaC_2O_4 \cdot H_2O$ , COM, Whewellit) ist bei Standardbedingungen die thermodynamisch stabile Phase. Calciumoxalat Dihydrat ( $CaC_2O_4 \cdot (2+x)H_2O$ ,  $x < 0.5$ , COD, Weddelit)<sup>[63]</sup> ist metastabil und hat eine tetragonale Symmetrie. Calciumoxalat Trihydrat ( $CaC_2O_4 \cdot xH_2O$ ,  $3 > x > 2.5$ , COT, Caoxit) ist eine trikline Phase und zeigt die höchste Löslichkeit aller Phasen.

#### 4.1.1 Calciumoxalat Monohydrat (COM)

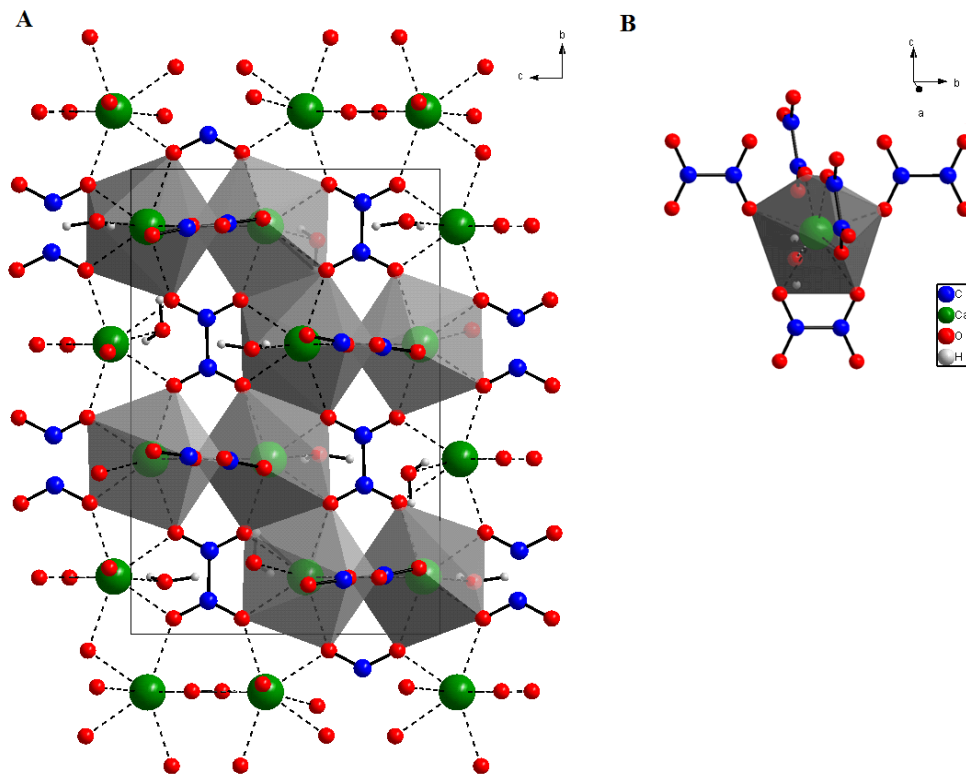
COM kristallisiert monoklin in der Raumgruppe  $P2_1/c$  mit den folgenden Kristallgitterparametern:  $a = 6.316 \text{ \AA}$ ,  $b = 14.541 \text{ \AA}$ ,  $c = 10.116 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 109.1^\circ$ ,  $Z = 4$  und  $V = 878.2 \text{ \AA}^3$ .<sup>[64]</sup> In Abbildung 4.1 ist die Einheitszelle von Whewellit und ein Oxalat-Ion, umgeben von zwei verschiedenen Calcium-Ionen dargestellt.

# CALCIUM OXALAT



**Abbildung 4.1** (A) Einheitszelle von COM (B), Oxalat-Ion, umgeben von zwei nicht äquivalenten Calcium-Ionen.

Wie in Abbildung 4.1 B ersichtlich, besetzen die Calcium-Ionen in der ersten Koordinationssphäre der Oxalat-Ionen zwei verschiedene Positionen. Die Koordinationspolyeder der pseudoäquivalenten Ca(1) und Ca(2) sind, wie in Abbildung 4.2 A+B, verzerrte tetragonale Antiprismen. Zu jedem Calcium-Ion gehören 8 Sauerstoffatome, die von 7 Oxalat-Gruppen und einem Wassermolekül kommen. Eines der Oxalat-Ionen fungiert als zweizähliger Ligand zum Calcium, die anderen 5 sind einfach koordiniert. Jeder Calciumpolyeder teilt sich dabei drei Kanten mit drei angrenzenden Calciumpolyedern. Die polyedrischen Schichten werden parallel zur (010) Ebene gebildet.



**Abbildung 4.2** (A) Einheitszelle mit Calcium-Koordinationspolydern, (B) einfacher Calcium-Koordinationspolyder.

Die Oxalat-Gruppen alternieren im COM, wie in Abbildung 4.3, mit den Calcium-Ionen und erzeugen zusammen Ketten die entlang der (010) Ebene liegen und entlang von Richtung  $a$  verlaufen. Diese Ketten werden durch Oxalat-Ionen und Wasserstoffbrückenbindungen von innenschichtigen Wassermolekülen verknüpft. Es werden dabei Oxalat-Ketten gebildet, die eine Faltblattstruktur parallel zur (010) Ebene erzeugen.<sup>[65]</sup>

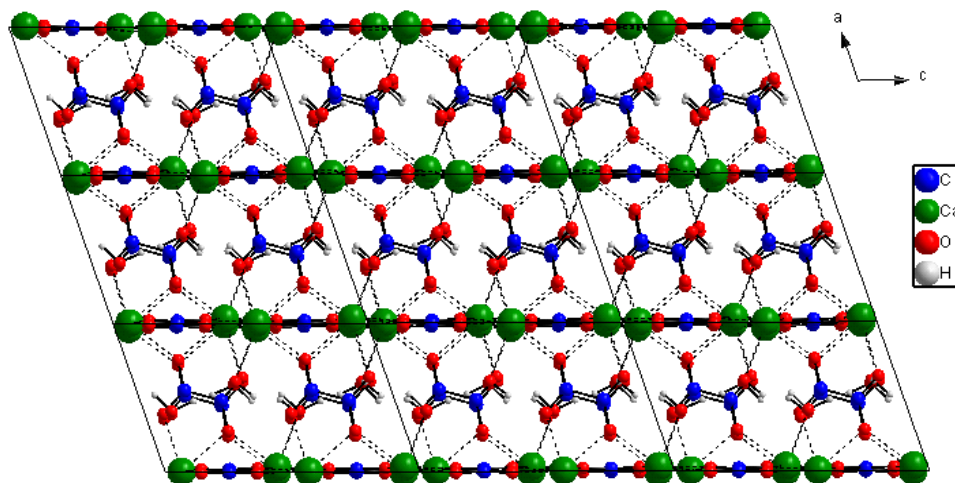


Abbildung 4.3 Kristallstruktur von COM auf der (010) Ebene.

## CALCIUM OXALAT

Es gibt zwei Typen von Oxalat-Ionen, wie in Abbildung 4.4 aufgeführt, die im gleichen Verhältnis auftreten. Davon ist eine Gruppe von Oxalat-Ionen (Ox1) parallel zur (100) Fläche angeordnet, die jeweils von sechs koplanaren Calcium-Ionen umgeben sind.<sup>[66]</sup> Zwei der Calcium-Ionen bilden Chelat-Bindungen mit dem Ox1-Ion aus, die anderen vier Einfachbindungen. Die Ox2-Ionen befinden sich zwischen den (100) Schichten, parallel zur (010) Ebene. Jedes dieser Ox2-Ionen bindet vier Calcium-Ionen, von denen zwei eine Chelat-Bindung und zwei eine Einfachbindung bilden. Weiterhin bildet jedes Ox2-Ion Wasserstoffbrückbindungen zu den Hydratwassermolekülen aus.

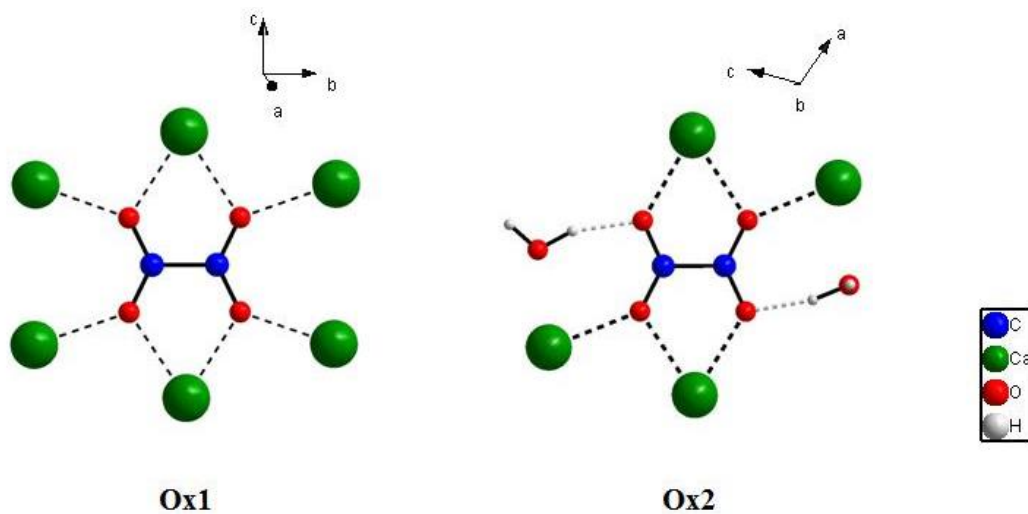
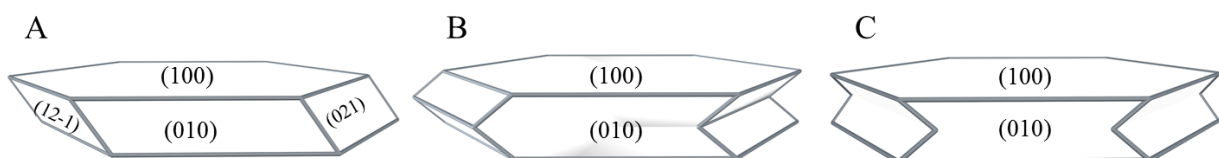


Abbildung 4.4 Zwei unterschiedliche Typen von Oxalat-Ionen in COM.

Von Calciumoxalat Monohydrat gibt es drei bekannte Polymorphe. Eine dieser Phasen hat eine orthorombische Symmetrie und wird nur durch eine Phasenumwandlung mittels Dehydration von Calciumoxalat Dihydrat bei einer hohen Temperatur von 118 °C gebildet.<sup>[67]</sup> Es kann die Raumgruppe  $A2_1am$ ,  $Ama2$  oder  $Amam$  haben, wobei nur  $Amam$  ein Symmetriezentrum, wie die Raumgruppe des ursprünglichen Calciumoxalat Dihydrat, besitzt. Die Einheitszelle setzt sich aus folgenden Gitterkonstanten zusammen:  $a = 12.088 \text{ \AA}$ ,  $b = 10.112 \text{ \AA}$ ,  $c = 14.634 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Die anderen beiden Polymorphe haben eine monokline Struktur und lassen sich im Bereich von 38 bis 45 °C reversibel ineinander umwandeln.<sup>[68]</sup> Die Hochtemperatur-Modifikation (*high temperature*, HT, Grundstruktur) kommt im Bereich von 45 bis 152 °C vor und gehört zur Raumgruppe  $I2/m$  mit den Parametern:  $a = 9.978 \text{ \AA}$ ,  $b = 7.295 \text{ \AA}$ ,  $c = 6.292 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 107.07^\circ$ ,  $Z = 4$  und  $V = 437.8 \text{ \AA}^3$ . Die Niedrigtemperatur-Struktur (*low temperature*, LT, derivative Struktur), die im Bereich von 20 bis 45 °C erhalten wird, hat die Raumgruppe  $P2_1/n$  und eine Doppeleinheitszelle mit den

Parametern:  $a = 9.9763 \text{ \AA}$ ,  $b = 14.5884 \text{ \AA}$ ,  $c = 6.2913 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 107.05^\circ$ ,  $Z = 8$  und  $V = 875.4 \text{ \AA}^3$ . Hinsichtlich der Ionenkoordination sind die beiden LT- und HT-Strukturen weitestgehend identisch, der größte Unterschied liegt im Bezug auf die Ox1-Ionen.<sup>[66]</sup> Sie erleiden in der LT-Modifikation eine leichte Verzerrung der Bindungswinkel von wenigen Zehntel Grad und leichte Verzerrung der Bindungsabstände von weniger als  $0.01 \text{ \AA}$ . Zugleich werden sie aus der (100) Ebene entfernt und sind daher nicht mehr koplanar. Folglich haben sie keine lokale  $2/m$  Symmetrie mehr und die Dimension der b-Achse wird verdoppelt.

Ein sehr häufiges Merkmal in der Kristallisation von COM ist die Zwillingsbildung. Einzelne COM-Kristalle kommen nicht so häufig vor, wie verzwillingte oder ineinander verwachsene Kristallzwillinge. Bei der Bildung von Zwillingen findet im Kristall eine Verschiebung oder ein Änderung der Orientierung des Kristallgitters entlang einer Ebene statt.<sup>[69-71]</sup> Dabei gibt es zwei verschiedene Verwachsungsarten, die gebildet werden; zum einen die Berührungs- oder Kontaktzwillinge, die in Abbildung 4.5 dargestellt sind. Hierbei handelt es sich um Zwillinge die eine definierte Zwillingssebene haben, welche die einzelnen Kristallindividuen voneinander trennt. In diesem Fall entspricht die Zwillingssebene der Verwachsungsebene. Die andere Verwachsungsart sind die Durchwachsungs- bzw. Penetrationszwillinge, bei denen die Verwachsungsflächen unregelmäßig sind und die Zwillingssebene irregulär ist. Als Folge dessen durchdringen sich die Individuen gegenseitig.



**Abbildung 4.5** Kristallmorphologien von COM. (A) Sechseitiger Polyeder, (B) Kontaktzwilling, (C) Penetrationszwilling.

Der Einzelkristall wird begrenzt durch die (100), (010), (12-1) und (021) Flächen und hat eine sechsseitige polyedrischen Gestalt.<sup>[72]</sup> Penetrationszwillinge weisen einen prismatischen Habitus mit der (100) Zwillingsfläche senkrecht zur [100] Richtung auf. (100), (010) und (12-1) sind dabei die entwickelten Flächen.

# CALCIUM OXALAT

## 4.1.2 Calciumoxalat Dihydrat (COD)

Calciumoxalat Dihydrat (COD), auch als Weddellit bekannt, ist eine unter Normalbedingung metastabile Phase des Calciumoxalats. Es kristallisiert im tetragonalen Kristallsystem der Raumgruppe  $I4/m$  mit den folgenden Parametern für die Einheitszelle:  $a = b = 12.371 \text{ \AA}$ ,  $c = 7.357 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ,  $Z = 8$  und  $V = 1125.937 \text{ \AA}^3$ .<sup>[73]</sup>

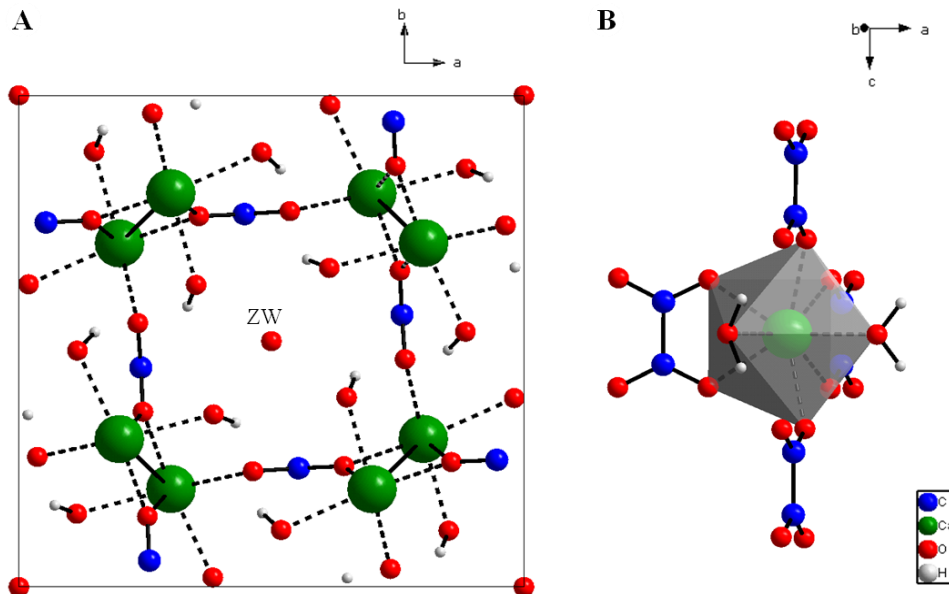


Abbildung 4.6 (A) Einheitszelle von COD, (B) Calcium-Koordinationspolyeder.

Auch im COD sind die Calcium-Koordinationspolyeder in Abbildung 4.6 verzerre quadratische Antiprismen, die ebenfalls von acht Sauerstoffatomen koordiniert werden. Im Bezug auf Whewellit, ist das Calcium-Ion im Weddellit mit einem Sauerstoffatom der Oxalat-Gruppe weniger und dafür einem Sauerstoffatom aus dem Wassermolekül mehr, koordiniert. Zwei der Sauerstoffe der Oxalat-Ionen binden zweifach, die anderen vier einfach.

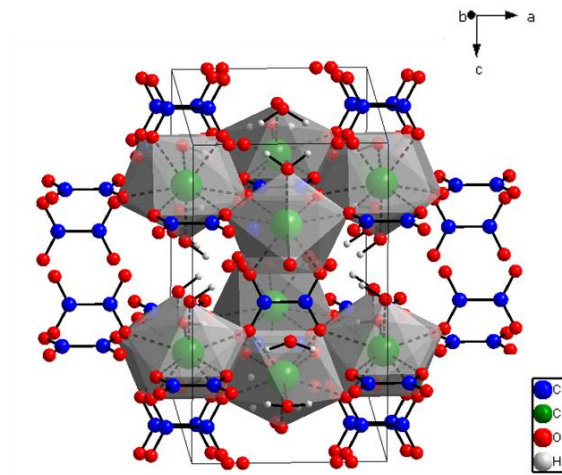
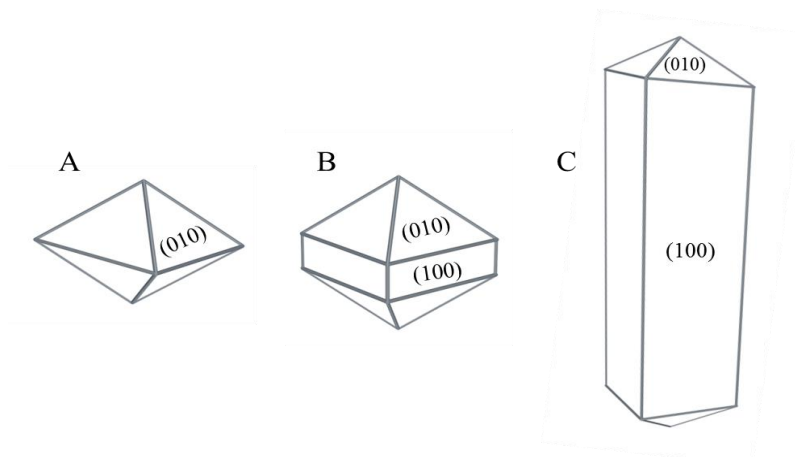


Abbildung 4.7 Einheitszelle von COD mit kantenverknüpften Calcium-Polyedern.

Jedes Calcium-Polyeder in Abbildung 4.7 ist mit zwei benachbarten Polyedern verknüpft, die dabei eine Kette erzeugen, die entlang der  $c$ -Achse verläuft. Diese Verknüpfung wird mittels Oxalat-Wasser-Oxalat-Bändern erhalten, die in den Ebenen parallel zur (100) Ebene liegen. Die Wiederholung von Calciumketten und Oxalat-Wasser-Bänder um die vierfach Achse erzeugt dabei Kanäle, in denen zeolithische Wasser (**ZW**) vorkommen.<sup>[74]</sup> Während in der COM Struktur alle Wassermoleküle stark mit der Kristallstruktur verknüpft sind, sind im COD ein Teil der Wassermoleküle, das zeolithischen Wasser, in den Kanälen vollkommen beweglich.



**Abbildung 4.8** Kristallmorphologien von COD. (A) Tetragonale Bipyramide, (B) bipyramidales Prisma, (C) gestrecktes bipyramidales Prisma.

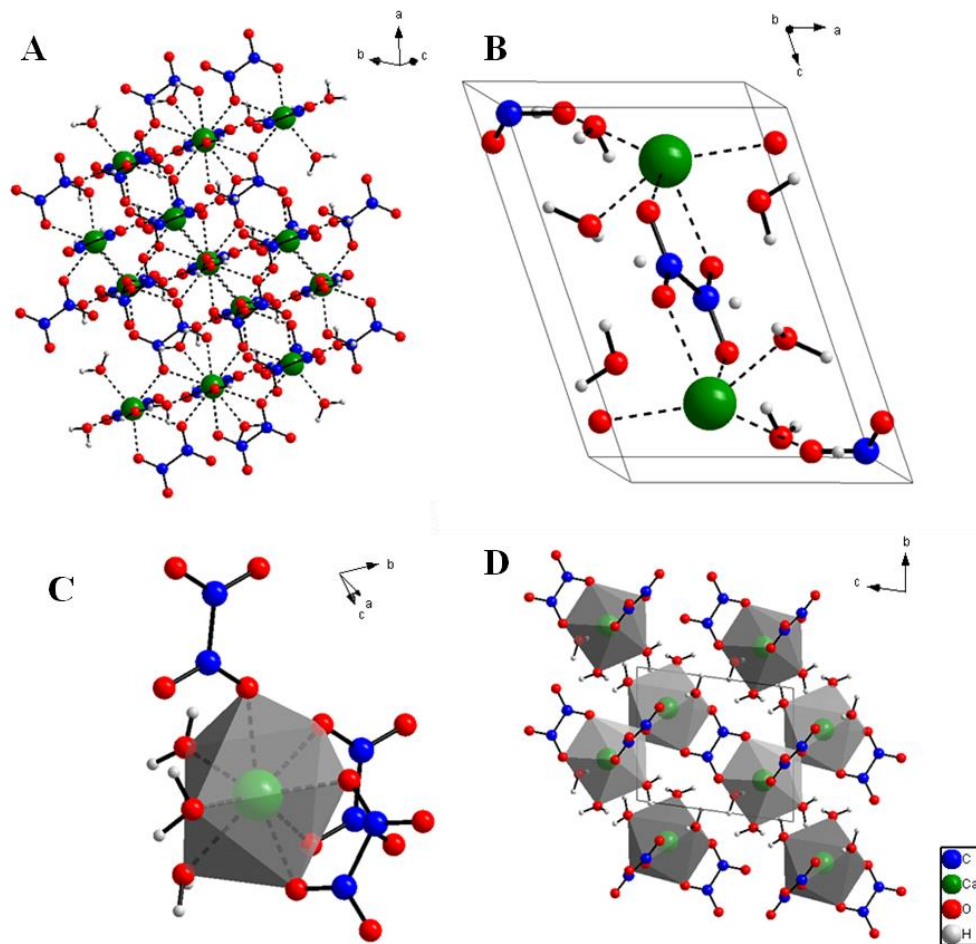
Wie in Abbildung 4.8 ersichtlich, weist Weddellit mit der dominierenden (101) Fläche eine tetragonale Bipyramide und mit der (100) Fläche ein tetragonales bipyramidales Prisma, bzw. ein gestrecktes tetragonales Prisma auf.<sup>[55,75,76]</sup>



# CALCIUM OXALAT

## 4.1.3 Calciumoxalat Trihydrat (COT)

Die dritte Hydratform des Calciumoxalats ist das Calciumoxalat Trihydrat, auch unter Caosit bekannt. Es kristallisiert triklinin in der Raumgruppe  $P\bar{1}$ ,  $a = 6.097(1)$ ,  $b = 7.145(1)$ ,  $c = 8.434(1)$ ,  $\alpha = 76.54(1)^\circ$ ,  $\beta = 70.30(1)^\circ$ ,  $\gamma = 70.75(1)^\circ$ ,  $Z = 2$  und  $V = 323.495 \text{ \AA}^3$ .<sup>[77]</sup>



**Abbildung 4.9** Kristallstruktur von COT (A), Einheitszellen (B), Calcium-Koordinationspolyeder (C) und Einheitszelle mit Calcium-Polyedern (D).

Die Calcium-Ionen im Koordinationspolyeder werden auch im Caosit, in Abbildung 4.9 C, von acht Sauerstoffatomen koordiniert, von denen drei der Sauerstoffatome von den Wassermolekülen herrühren und fünf von den Oxalat-Ionen. Dabei binden zwei Oxalat-Ionen zweizählig und eines einfach. Die Koordination der Calcium-Ionen bildet ein verzerrtes quadratisches Antiprisma, dabei sind die Calcium-Polyeder an einer Kante miteinander verknüpft.<sup>[78]</sup> Genauso wie das COM bildet das COT zickzack-förmige Kettenstrukturen aus Calcium- und Oxalat-Ionen aus, die entlang der  $c$ -Achse verlaufen. Die benachbarten Ketten



entlang der  $c$ -Achse werden durch voneinander unabhängige Oxalat-Ionen verbunden und bilden, wie bereits das COM, Oxalat-Ketten mit einer Faltblattstruktur aus. Die Wassermoleküle im COT sind scheinbar zwischen den Faltblättern eingelagert und verleihen den Faltblättern durch die Wasserstoffbrückenbindung eine wellige Form. Durch Zunahme der Temperatur und der daraus folgenden Dehydratation ist es möglich, die Faltblattstruktur durch Abnahme der Wasserstoffbrückenbindung der Wassermoleküle in den Zwischenschichten abzuflachen. Die Oxalat-Ionen, die die Ketten verknüpfen, können theoretisch dadurch Bindungen mit den Calcium-Ionen aus den entgegengesetzten Faltblättern eingehen und die COM Struktur könnte daraus resultieren.<sup>[65]</sup>

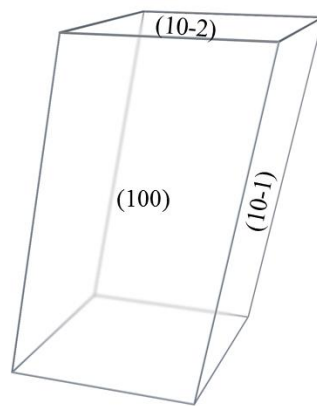
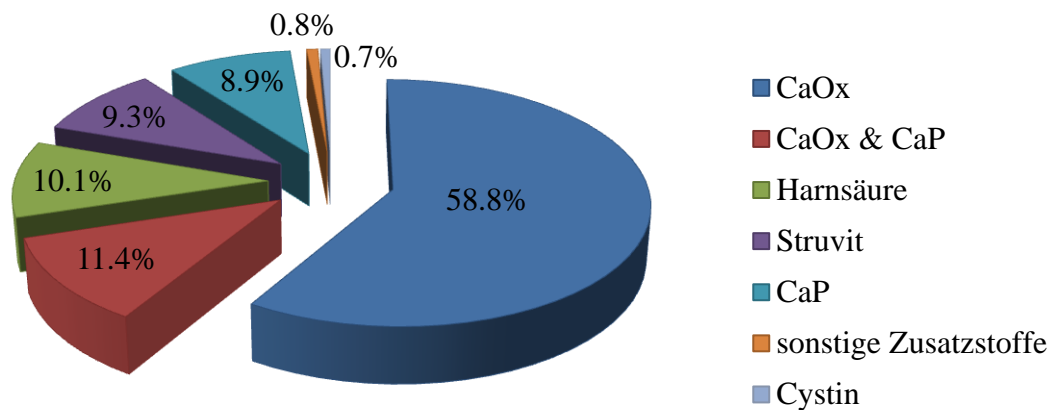


Abbildung 4.10 Kristallmorphologie von COT. Parallelogrammartiges Prisma.

COT wächst in der wässrigen Phase zu triklinen parallelogrammartigen plättchenförmigen Prismen, wie in Abbildung 4.10, heran.<sup>[58,79]</sup> Wie das COM kann das COT verzwilligte Strukturen bilden.<sup>[80]</sup>

## 4.2 Biogenes Calciumoxalat

Calciumoxalat ist ein weitverbreitetes Biomineral, das in allen fünf Königreichen der Organismen vorhanden ist. Während es in Pflanzen und Pilzen häufig eine physiologisch schützende und unterstützende Aufgabe hat, verbindet die Mensch- und Tierwelt Calciumoxalat mit Schmerzen und Krankheit, denn hier hat es eine rein pathologische Wirkung. Zwischen 3 und 14% der Bevölkerung, abhängig von der geographischen Lage, leiden unter Harnsteinerkrankungen (*Urolithiasis*).<sup>[81]</sup> Etwa in der Bundesrepublik Deutschland erkrankten alleine 2001 mit einer Häufigkeit von 4.7% der Bürger an Harnstein, Männer mehr als Frauen. Daher wird diese Krankheit auch als Volkskrankheit eingestuft.<sup>[82]</sup> Die Bildung der Harnsteine kann in der Niere (*Nephrolithiasis*) oder in den ableitenden Harnwegen (Harnleiter - *Ureterstein*, Harnblase – *Blasenstein* oder Harnröhre) lokalisiert werden. Harn- und Nierensteine sind Biomineralien, die sich aus polykristallinen Aggregaten und organischen Substanzen zusammensetzen (siehe auch Abbildung 1.4, S.7). Sie kommen in einer Vielzahl von Formen, Größen, Farben, Kompositionen und Beschaffenheiten vor.<sup>[83]</sup> Studien haben ergeben, dass Calciumoxalat mit mehr als 80% die meistverbreitete kristalline Phase in menschlichen Steinen bildet.<sup>[84,85]</sup> Das zweithäufigste anorganische Mineral stellt Calciumphosphat dar, das in der Regel als Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ), zum Teil als Carbonatapatit ( $\text{Ca}_5[(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3(\text{OH})]$ ), manchmal auch als Brushit ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) und sehr selten als Whitlockit ( $\text{Ca}_9(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})[\text{PO}_3(\text{OH})](\text{PO}_4)_6$ ) vorkommt. Daneben sind Harnsäure ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ ), Struvit ( $(\text{NH}_4)\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) und Cystein ( $(\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)_2\text{CO}_2\text{H})_2$ ), wie in Abbildung 4.11, bei der Harnsteinbildung von Bedeutung. Die organische Matrix, die etwa 2-3% des Trockengewichts bei den Steinen ausmacht, wird aus einer variablen, komplexen Zusammensetzung aus Proteinen (z.B. Tamm-Horsfall Protein, Albumin oder Osteopontin), Lipiden, Polysacchariden, Glykosaminoglykane und zellulären Ablagerungen gebildet.<sup>[86,87]</sup> Diese Makromoleküle können als Katalysatoren die Bildung von mineralischen Phasen aus metastabilen Lösungen induzieren, das heißt sie können den Prozess der Mineralisation kontrollieren, indem sie als Inhibitor oder Promotor agieren.<sup>[88,89]</sup>



**Abbildung 4.11** Kristalline Zusammensetzung von Harnsteinen, die in fast 80% der Fälle aus den Calciumsalzen Calciumoxalat (CaOx) und Calciumphosphat (CaP) bestehen.<sup>[90]</sup>

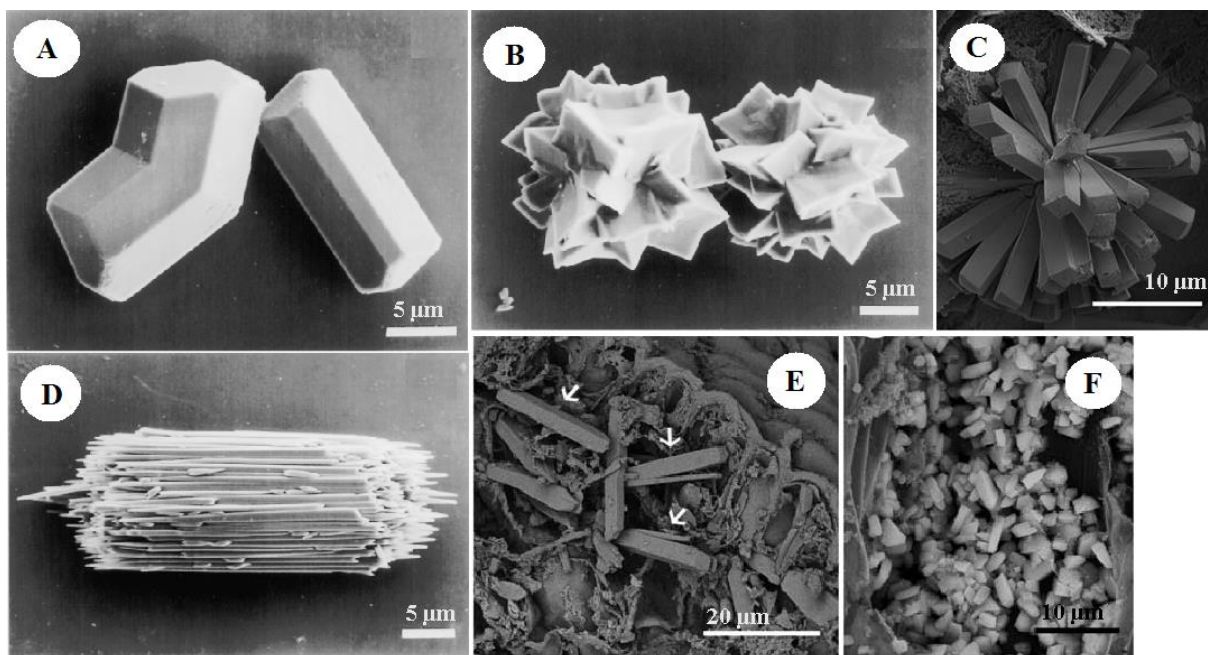
Calciumoxalat-Steine können in der Niere in drei verschiedenen Hydratformen auftreten, dem Calciumoxalat Monohydrat COM (*Whewellit*), dem Calciumoxalat Dihydrat COD (*Weddellit*) und dem extrem seltenen Calciumoxalat Trihydrat COT (*Caoxit*).<sup>[55]</sup> COM ist das pathologisch meistauf tretende CaOx Mineral, COD ist weniger prävalent und findet sich häufig im entleerten Harn in Form von einzelnen Mikrokristallen, die kleiner als 10 Mikrometer sind. Die verringerte Fähigkeit von COD zur Bildung von stabilen Aggregaten bzw. starker Adhäsion zu Nierenepithelzellen lässt darauf schließen, dass es sich beim COD tendenziell um gutartige Kristallformen handelt.<sup>[91]</sup> COD Kristalle werden zumeist im gesunden Urin gefunden, wohingegen COM-Kristalle vermehrt in lithogenen (durch Steine hervorgerufenen) Harn präsent sind.<sup>[92]</sup>

Der erste Schritt zur Harnsteinbildung folgt aus der Nukleation von Harnsteinmineralien aus einem übersättigten Urin. Oftmals findet die Bildung der Keime auf vorhandenen Flächen wie z.B. in Epithelzellen, Harnzylindern oder anderen Kristallen statt, die als Nukleationszentrum wirken. Hat der gebildete Kristallkeim die kritische Größe erreicht und ist die Lösung ausreichend übersättigt, nimmt die gesamte freie Energie ab und das Kristallwachstum bzw. die Kristallaggregation setzt ein und erreicht somit seine pathologische Größe.<sup>[93]</sup> Die Keimbildung und Kristallisation von Calciumoxalat ist der einleitende Schritt zur Steinbildung. Da die Kristallwachstumsrate relativ zur Passierzeit des Urins langsam ist, sinkt

die Wahrscheinlichkeit, dass Einkristalle eine ausreichende Größe erreichen, um in den Abflusskanälen des Harns hängen zu bleiben. Daher spielt bei der Harnsteinbildung die Anlagerung von Kristallaggregaten in der *Papilla Renalis* (dem Ausgang für den Urin aus der Niere) eine nicht unerhebliche Rolle.<sup>[86,94]</sup> Die Proteine im Urin können beim Vorgang der Steinbildung einen verstärkenden oder abschwächenden bzw. hemmenden Einfluss auf die Aggregation haben. So konnte gezeigt werden, dass säurehaltige Proteine aus dem Harn einen hemmenden Einfluss auf die Kristallisation von COM haben und die selektive Bildung von COD begünstigen.<sup>[95,96]</sup> Harn-Proteine mit vielen anionischen Funktionalitäten und Polyanionen hingegen, können als eine Art „Kleber“ dienen und die Aggregation von COM fördern.<sup>[97]</sup> Allerdings sind die mechanistischen Wechselwirkungen zwischen der organischen Matrix und den anorganischen Kristallen bei der Harnsteinbildung bis heute noch nicht vollständig verstanden. Daher beschäftigen sich nach wie vor viele Forscher mit einer Reihe von Fragen über die fördernden und hemmenden Faktoren auf die Steinbildung, indem sie beispielsweise *in vitro* Makromoleküle zur Kristallisation zugeben. Um dieser Wirkung auf den Grund zu gehen, widmet sich Kapitel 6 dieser Arbeit der Frage nach dem Einfluss von polymeren Additiven auf die Kristallisation von Calciumoxalat.

Neben dem pathologischen Auftreten in Form von Harnsteinen, mit verheerenden Auswirkungen für Mensch und Tier, verhalten sich Calciumoxalat-Kristalle in der Welt von höher entwickelten Pflanzen, niederentwickelten Gefäßpflanzen und Algen harmlos.<sup>[62]</sup> Die Kristalle kommen in fast allen Organen und Geweben wie in Samen, Blättern, Blüten, Früchten, Wurzeln, Rinden und Stängeln von sehr vielen Pflanzenarten vor.<sup>[98,99]</sup> Sie werden im Allgemeinen intra- oder extrazellulär, innerhalb der Zelle, häufig in Vakuolen von speziellen Zellen, sogenannten Idioblasten, gebildet.<sup>[98]</sup> Calciumoxalat-Kristalle, die in Pflanzen entstehen, haben eine faszinierende Vielfalt von definierten Formen und einzigartigen Morphologien, von denen die meisten in folgende fünf Grundformen, wie in Abbildung 4.12, eingeteilt werden können:<sup>[62,98]</sup> (A) block-ähnliche romboedrische oder prismatische Kristalle, die als einzelne oder mehrere Kristalle pro Zelle erscheinen; (B) Drusen, facettenreiche Kristall-Konglomerate; (C+E) Styloide, große längliche rechteckige Kristalle mit spitzen oder abgerundeten Enden, die einzeln pro Zelle gebildet werden; (D) Raphiden, Bündel von nadelförmigen Kristallen; und (F) Kristallsand, bestehend aus sehr vielen kleinen eckigen Kristallen pro Zelle. Einige dieser Grundformen treten nicht als Einkristalle auf, sondern als Zwillinge, die sich nochmals in Durchdringungszwillinge und Kontaktzwillinge aufteilen lassen, siehe auch Kapitel 4.1.<sup>[69,70,71]</sup> Abhängig vom Zelltyp in

dem der Kristall gebildet wird, der verfügbaren Menge an Calcium<sup>[100]</sup> und anderen Umweltfaktoren<sup>[101]</sup> variiert die Größe der Kristalle. Einige Gattungen bilden nur spezielle Kristallarten bzw. Morphologien, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Morphologie dieser Gattungen von deren Zellen und Genetik kontrolliert wird. Einfluss auf die Morphologie nimmt das Verhältnis von Calcium zu Oxalat, keimbildende Substanzen wie Proteinmatrizen, Verunreinigungen, die Beteiligung von speziellen Zellkulturen, der Hydratationszustand der Kristalle und verschiedene physikalische und chemische Parameter, wie Druck und Temperatur.<sup>[62,102]</sup>

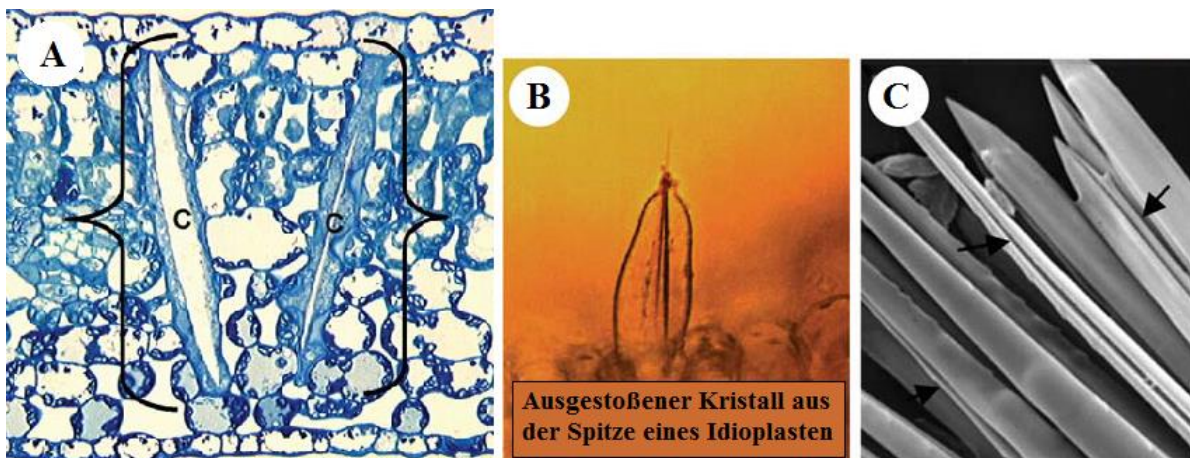


**Abbildung 4.12** verschiedene Morphologien von Calciumoxalat Pflanzen. (A) Verzwilligte prismatische Kristalle aus der Samenschale der Bohne (*Phaseolus vulgaris*).<sup>[103]</sup> (B) Drusenkristalle aus der Samtpappel (*Abutilon thiophrasti*).<sup>[103]</sup> (C) Styloide Drusen aus blätterähnlichen Gebilden des Wüstenstrauchs (*Acacia robeorum*).<sup>[104]</sup> (D) Bündel von Raphiden aus Weinblätter (*Vitis labrusca*).<sup>[105]</sup> (E) Styloide aus dem Ast eines Wüstenstrauchs (*Acacia robeorum*).<sup>[104]</sup> (F) Kristallsand aus blätterähnlichen Gebilden des Wüstenstrauchs (*Acacia robeorum*).<sup>[104]</sup>

Auch in Pflanzen ist Calciumoxalat hauptsächlich als COM, weniger häufig als COD vorhanden, wobei Kristalle mit der gleichen Morphologie, in beiden Hydrationszuständen gefunden wurden.<sup>[63,103,106]</sup> Neben der Vielfalt der Kristallgrößen und –formen und den besonderen Morphologien, gibt es viele Hypothesen über die Funktion der Kristalle in

## CALCIUM OXALAT

Pflanzen. Zu diesen Funktionen gehören beispielsweise die Calcium-Regulierung, Schutz vor Fressfeinden, Entgiftung von z.B. Schwermetallen oder Oxalsäure, oder die Unterstützung des Gewebes.<sup>[98,102,107]</sup> Die Bildung von Calciumoxalat in Idioblasten ist ein reversibler Prozess. Liegt eine beschränkte oder reduzierte Calcium-Konzentration in der Pflanze vor, können die Idioblasten reagieren, indem sie das gespeicherte Calcium durch Auflösen der Kristalle freisetzen. Die dabei als Nebenprodukt entstehende Oxalsäure kann mit Hilfe der Oxalat-Oxidase zu einer nicht toxischen Verbindung umgewandelt werden. Herrscht demnach eine hohe Calcium-Konzentration vor, nimmt die Größe und Anzahl der Calciumoxalat-Kristalle zu, bei einem geringen Calcium-Level hingegen nimmt die Größe und Anzahl ab. Während Drusen-Kristalle strikt an der Calcium-Regulation beteiligt sind, haben Raphiden eine Doppelfunktion. Sie dienen sowohl zur Ca-Regulation als auch als Schutzmechanismus.<sup>[100]</sup>



**Abbildung 4.13** Verschiedene Verteidigungsmechanismen von Pflanzen (A-C).<sup>[62]</sup> (A) Querschnitt durch ein Blatt (*Claoxylon sandwicense*), zwei große Styloide (markiert mit c) in einem Idioblasten. (B) Raphiden-Kristall der *Pistia*, der durch mechanischen Druck aus der Spitze der Idioplasten gewaltsam ausgestoßen wird. (C) SEM-Aufnahmen von Raphiden der *Pistia*, die in der Furche (mit Pfeilen markiert) mit Toxinkanälen versehen sein können.

Um Fressfeinden nicht schutzlos ausgesetzt zu sein, ist es Pflanzen möglich, sich aktiv oder defensiv vor diesen zu verteidigen. So enthält der Saft der *Agave Tequilana*, die zur Herstellung von Tequila verwendet wird, Raphiden-Kristalle, die bei Kontakt entzündliche Hautirritationen hervorrufen können.<sup>[108]</sup> In einigen Fällen besitzen Pflanzen extrem lange, teilweise auch scharfe Kristalle, wie beispielsweise Styloiden oder Raphiden wie in Abbildung 4.13 A dargestellt, die beim Berühren oder Abweiden ebenfalls zur Perforation

von Hautpartien (z.B. Mund, Mundschleimhaut oder Rachen) führen können. Einige dieser Kristalle sind in Abbildung 4.13 C entlang ihrer Kante mit Vertiefungen versehen, die als Toxinkanäle dienen und auf diese Weise Toxin in die Wunde treiben.<sup>[62]</sup> Beim aktiven Schutz hingegen steht in manchen Fällen der Kristallidioblast mit einem dünnwandigen Ende unter Druck und schleudert bei einfachem Kontakt mit der Pflanze die Raphidenkristalle, wie in Abbildung 4.13 B, gewaltsam heraus.<sup>[109]</sup>





# 5

## Phage Display

Peptide und Proteine können durch ihre einzigartigen und spezifischen Wechselwirkungen mit anorganischen Stoffen und anderen Makromolekülen und aufgrund ihrer Fähigkeit zur Substraterkennung und sequenz-spezifischen Selbstorganisation, die Struktur und Funktion von biologisch hartem und weichem Gewebe in Organismen kontrollieren. Besonders in der biomimetischen Mineralisation (Kapitel 1.8) ist die Erforschung solcher Peptide und Proteine im Bereich der Hybrid Technologien ein aufstrebendes Gebiet. Eine Methode ist die Isolation von Biomineralisations-Peptiden aus der Natur und die Untersuchung ihrer Struktur und Funktion. Ein weiterer biomimetischer Syntheseansatz ist die Verwendung von kombinatorischen *Phage Display* Bibliotheken. Damit ist es möglich, neue selektive Peptide oder Proteine mit außergewöhnlichen, sequenz-spezifischen Affinitäten zu sowohl organischen als auch anorganischen Substraten zu identifizieren. Erstmals beschrieben und publiziert wurde dieses Konzept im Jahr 1985 von *Georg Smith* unter Verwendung der filamentösen M13 Phagen.<sup>[110]</sup>

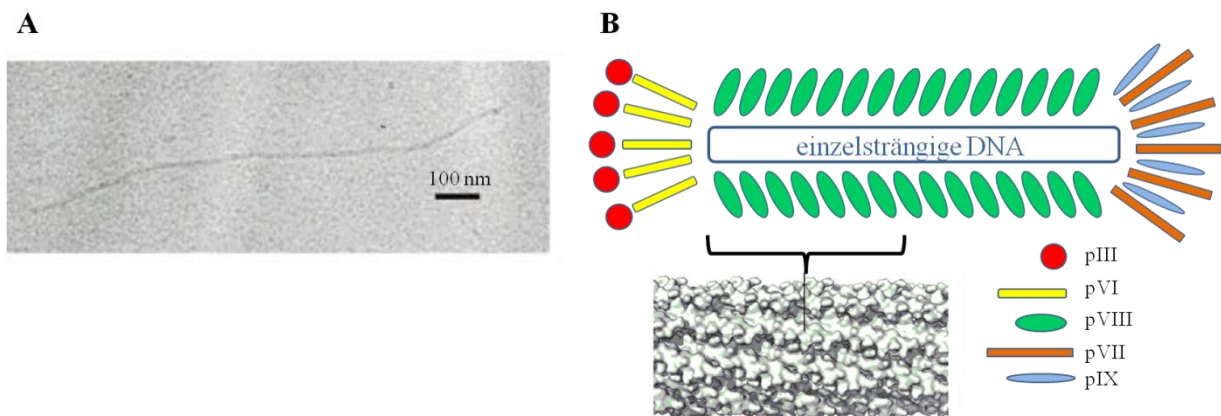
Das *Phage Display* basiert auf einem Verfahren zur Selektion von Polypeptiden *in vitro*, die auf der Oberfläche eines Bakteriophagen präsentiert werden. Dabei wird das Peptid, bzw. dessen DNA mit einem Phagenhüllprotein bzw. der dafür codierten DNA verknüpft.<sup>[111]</sup> Aus der Kopplung des präsentierten Peptids, dem Phänotyp, und der dafür codierenden DNA, dem Genotyp, entsteht auf diesem Weg eine physikalische Verbindung.<sup>[112]</sup> Mit Hilfe der biotechnologischen Methoden ist es heutzutage möglich, eine große Anzahl verschiedener Peptide auf der Oberfläche der Phagen zu exponieren. Der Vorteil des *Phage Displays* besteht darin, dass die Oberflächenstrukturen von Phagen leicht modifiziert werden können, ohne

dabei die benötigte Infektiosität zu verlieren. Der Einsatz von filamentösen Bakteriophage wie der M13, f1 oder auch der fd Phage hat sich dabei als besonders effizientes und robustes System erwiesen.<sup>[113]</sup> Neben den filamentösen Phagen gibt es noch die lytischen Phagen zu denen die T7, T4, und  $\lambda$  Phagen zählen, jedoch werden zumeist die filamentösen Phagen aufgrund ihres relativ kleinen Genoms, der Stabilität ihrer infektiösen Partikel und ihrer Akkumulation in hohen Titern eingesetzt.<sup>[114]</sup> Filamentöse Phage können repliziert werden ohne ihren Wirt dabei zu zerstören. Zur Herstellung einer auf der Phagen-Oberfläche exponierten Peptid-Bibliothek wird eine Bibliothek aus variierenden DNA-Fragmenten entwickelt, die zufällige Varianten von Peptiden einer bestimmten Länge codieren. Durch die Fusion mit einem Hüllprotein-Gen (zumeist dem pIII-Gen) werden die DNA-Fragmente in einen Phagemid Vektor kloniert.<sup>[115]</sup> Ein Phagemid ist ein Plasmid, welches die DNA-Sequenzen enthält, die in Bakteriophagen verpackt werden können. Anschließend erfolgt die Übertragung der erhaltenen Phagemiden in *E. coli* Bakterien, wo sie zunächst als doppelsträngige Plasmide repliziert werden. Erst durch Infektion mit Helferphagen entstehen einzelsträngige DNA Plasmide, die in Phagenpartikel verpackt werden.<sup>[111]</sup> Die Helferphage liefert dafür alle notwendigen Proteine für den Phagenbau, einschließlich der Wildtyp Kopien aller Hüllproteine. Das Phagemid enthält ein Gen, das eine zusätzliche Kopie von einem der Hüllproteine kodiert, das mit dem Polypeptid, welches präsentiert werden soll, fusioniert. Die so entstandene Phage enthält sowohl das Wildtyp Protein der Helferphage als auch das fusionierte Hüllprotein des Phagemids. Dadurch können die schädlichen Effekte der Fusion durch die Anwesenheit der Helferphagen abgeschwächt werden und das heterologe Peptid wird auf der Phagen-Oberfläche präsentiert.<sup>[111]</sup> Auf diese Weise entsteht die auf der Phagen-Oberfläche präsentierte Peptid-Bibliothek, in welcher jeder Bakteriophage eine zufällige Variante der Peptide mit einer bestimmten Länge präsentiert. Der Prozess der Präsentation von Peptid-Bibliotheken, die auf einem bestimmten Zielmolekül mit hoher Affinität selektioniert werden, wird als *Biopanning* bezeichnet.

## 5.1 Filamentöse Bakteriophagen – M13 Phage

Bakteriophagen, oder einfach Phagen, sind Viren von Bakterien, die mit höheren Organismen vergleichbar sind. Da Phagen über keinen eigenen Stoffwechsel verfügen, sind sie vollständig vom zellulären Stoffwechsel ihrer Wirtszelle abhängig, dem Bakterium *E. coli*. Es gibt verschiedene Arten von Phagen die sich unter anderem in ihrer Gestalt, Wirtsspezifität,

Genomgröße und -aufbau unterscheiden. Das Genom der Phagen kann aus einer Einzelstrang-DNA, Doppelstrang-DNA oder einer linearen Einzelstrang-RNA zusammengesetzt sein.<sup>[116]</sup> Während die T4 und die  $\lambda$  Bakteriophagen aus einer doppelsträngigen DNA bestehen, setzen sich die filamentösen M13 Phagenpartikel in Abbildung 5.1 A aus einer zirkulierenden, einzelsträngigen DNA und einem stäbchenförmigen Zylinder, umschlossen von einer Proteinhülle, zusammen.<sup>[117]</sup> Zur Infektion von *E. coli* Bakterien benutzen die filamentösen Phagen einen F-Pilus. Das gesamte Genom der M13 Phage ist aus elf Genen aufgebaut. Drei dieser Gene sind für die Replikation des Phagenpartikels verantwortlich, drei weitere für den Aufbau. Die restlichen fünf Gene codieren fünf verschiedene Hüllproteine (pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX). In der Regel exprimiert eine Phage etwa 2700 Kopien des pVIII Proteins, auch Haupthüllprotein genannt, welches die Länge des Phagenpartikels, wie in Abbildung 5.1 A, umfasst. Die anderen vier Hüllproteine bilden mit jeweils fünf Kopien die beiden Enden des Phagenpartikels.<sup>[118-120]</sup>

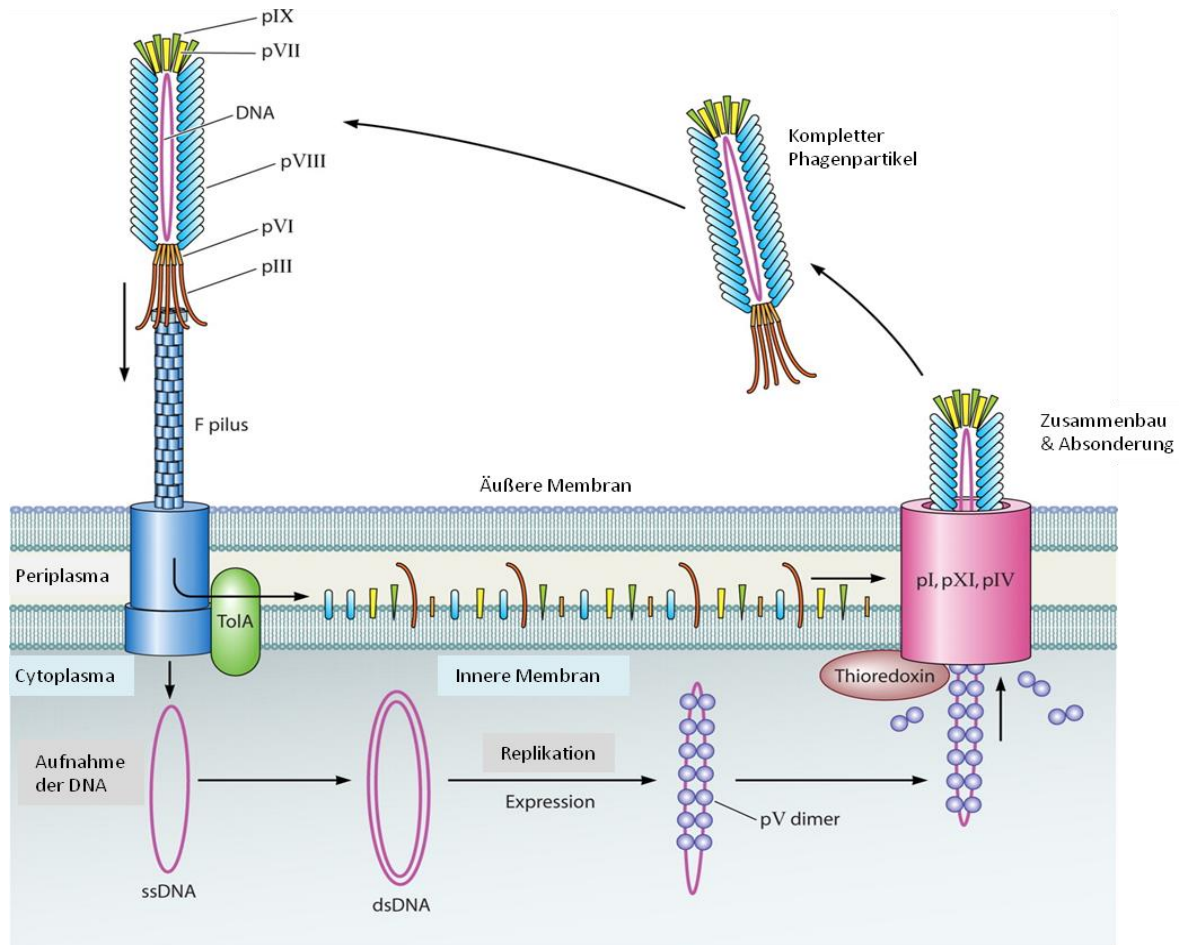


**Abbildung 5.1** Struktur der filamentösen M13 Bakteriophage. (A) TEM Aufnahme der Phage,<sup>[121]</sup> (B) oben: schematische Darstellung der M13 Phage, unten:<sup>[118]</sup> Oberflächenstruktur der M13 Phage.

Das Hüllprotein pIII, das an seiner Spitze kodierte Proteine adsorbiert, ist das komplexeste Protein; es enthält drei verschiedene Domänen.<sup>[111,122]</sup> Die N-terminale Domäne initiiert die Translokation viraler DNA in das *E. coli* Bakterium. Die zweite N-terminale Domäne vermittelt, wie in Abbildung 5.2, durch Bindung an den F-Pilus der männlichen *E. coli* Wirtszelle, die Infektion. Nach der Phagenbindung, zieht sich der F-Pilus wieder zurück und die Phage bindet an ein TolA Rezeptor Protein in der Bakterienmembran.<sup>[123]</sup> Sobald die Phage in Kontakt mit der Bakterienoberfläche tritt, wird ihre DNA in die Wirtszelle eingeschleust, die infizierte Phage wird zerlegt und die Hüllproteine werden in die

Bakterienmembran überführt. Wenn sich das Genom der Phage in dem Bakterium befindet, wird seine einzelsträngige DNA durch *E. coli* Enzyme in eine doppelsträngige DNA umgewandelt. Die Synthese der elf Phagenproteine der M13 Phage wird gestartet. Der mechanistische Verlauf, wie das Phagen-Genom in die Bakterienzelle eindringt, ist bis heute noch nicht vollständig verstanden.<sup>[123]</sup> Nachdem die viralen Phagenpartikel vollständig zusammengebaut wurden, werden sie durch einen errichteten Phagen-Protein-Kanal ausgeschieden. Da die M13 Phage eine nicht-lytische Bakteriophage ist, wird die infizierte Wirtszelle nach der Freisetzung des Phagenpartikels nicht getötet, nur ihr Wachstum wird verlangsamt. Die dritte C-terminale Domäne interagiert mit anderen Phagen-Hüllproteinen und ist für die Integration des pIII Proteins in die Phagenhülle zuständig.<sup>[111]</sup>

Prinzipiell können alle fünf Hüllproteine zur Präsentation verwendet werden, jedoch sind die pIII und die pVII Proteine die am häufigsten angewendeten Hüllproteine, wobei das pVIII nur auf die Präsentation von sehr kurzen Peptidsequenzen beschränkt ist. Das Protein pIII hingegen ist optimal für die Präsentation von langen Sequenzen, hat aber den Nachteil, dass die Infektiosität der Phagen, aufgrund sterischer Hinderung oder Ladungsabstoßung, reduziert wird.

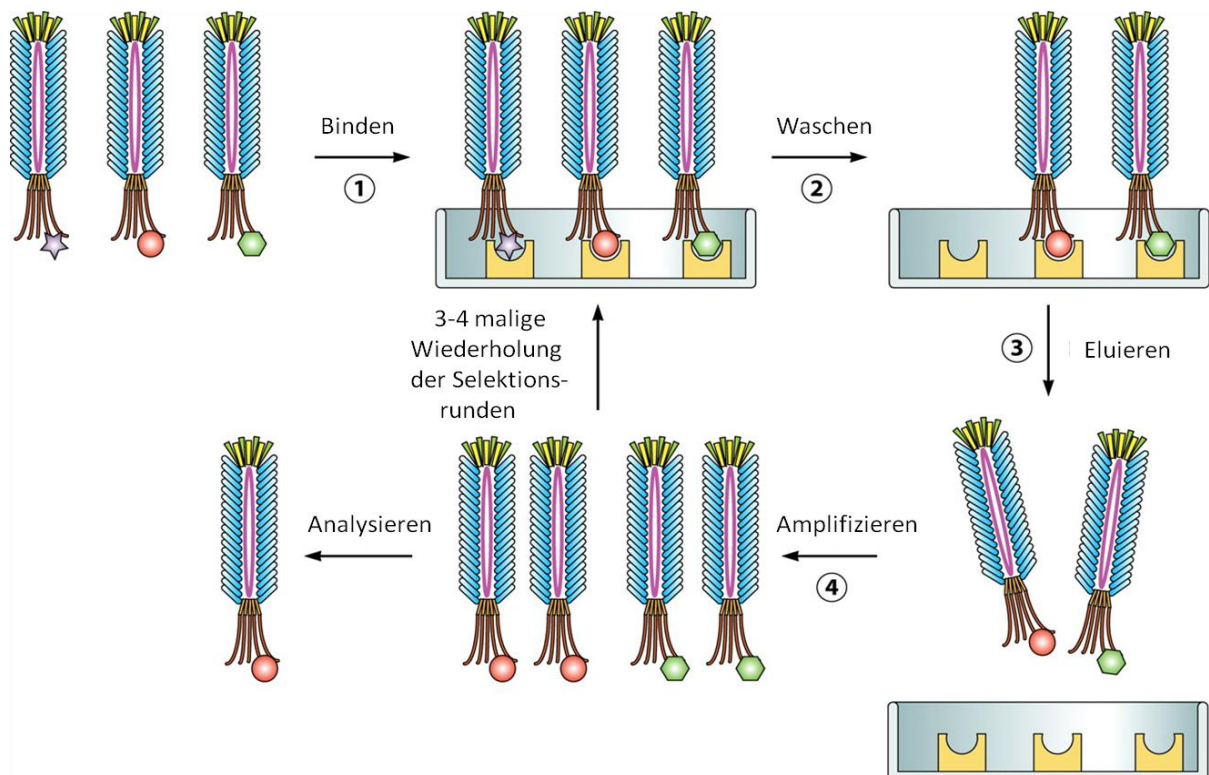


**Abbildung 5.2** Lebenszyklus von filamentösen M13 Phagen.<sup>[117]</sup> Phagenpartikel bindet durch den F-Pilus an *E. coli* Bakterien. Danach erfolgt die Depolymerisierung der Hüllproteine durch das TolaA-Protein. Die Spaltfragmente werden im Membran-Inneren der Wirtszelle bis zur Weiterverwendung gelagert. Die einzelsträngige DNA des Phagenpartikels dringt in das Cytoplasma ein und wird zur doppelsträngigen DNA durch *E. coli* Proteine umgewandelt, repliziert und exprimiert. An die reproduzierte Einzelstrang-DNA bindet das Protein pV und bildet Protein/DNA-Komplexe. Mit Hilfe des bakteriellen Thiorexodins wird das Protein pV durch das Hüllprotein pVIII ausgetauscht, die restlichen Hüllproteine werden durch Wechselwirkung mit den pI, pX und dem pIV Proteinen in einem Kanal in der Bakterienmembran zusammengefügt. Die Freisetzung der Phage erfolgt unter Erhalt der Wirtszelle.

## 5.2 Biopanning

*Biopanning* in Abbildung 5.3, ist eine Methode um eine kleine Anzahl von Phagen-Klonen aus einem ursprünglichen Bakteriophagenpool, der sogenannten Phagenbibliothek, die aus etwa  $10^9$  Peptidsequenzen besteht, mit bestimmten affinen Eigenschaften zu generieren. Der

Selektionszyklus besteht im Wesentlichen aus vier Schritten: (1) der Inkubation von Zielmolekülen mit der Phagen-Bibliothek, (2) dem Entfernen nichtbindender Phagen durch Waschen, (3) der Eluierung bindender Phagen und (4) der Amplifikation eluierter Phagen. Im Idealfall sollte eine Panningrunde zur Phagenselektion ausreichen, aber im Allgemeinen sind drei bis fünf Selektionsrunden notwendig um die möglichst höchste Selektivität von stark affinen Phagen zum Substrat zu erreichen. Aus diesem Grund werden die Phagen in bakteriellen Wirtszellen amplifiziert und zusätzlichen Selektionsrunden unterworfen. Am Ende können die am stärksten wechselwirkenden Proteine durch DNA-Sequenzierung der amplifizierten Phagen bestimmt werden.



**Abbildung 5.3** Biopanning einer Phage Display-Bibliothek, zur selektiven Phagen-Bindung an einem immobilisierten Zielmolekül.<sup>[117]</sup>

### 5.3 Phage Display an anorganischen Substraten

Anorganisch bindende Peptide, ausgewählt aus einem Pool von Bakteriophagen, sind mittlerweile für eine Vielzahl von interessanten Anwendungen bekannt. Die Selektivität eines bindenden Peptids für eine Oberfläche, kann sowohl aus chemischen Erkennungsmechanismen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, *Van der Waals* Wechselwirkungen, Ladungseffekten und Polarität, als auch aus strukturellen Mechanismen, wie der Größe und Morphologie, verursacht werden.<sup>[34]</sup> Auf der Grundlage der *Phage Display*-Technologie konnten Hochleistungs-Phagen, Batterien<sup>[120,124]</sup> oder metallische Nanodraht-Katalysatoren gewonnen werden.<sup>[125]</sup> Ein besonderes Augenmerk liegt auf der M13 Bakteriophage, die für ihre Fähigkeit bekannt ist, selektiv auf einer Vielzahl von individuellen Kristallflächen von verschiedenen Materialarten zu binden.<sup>[126]</sup> Diese Bakteriophagen können als Molekülbaustein verwendet werden, um Quantenpunkte zu nukleieren und zu arrangieren<sup>[127]</sup> oder um multidimensionale Flüssigkristalle und Filme herzustellen.<sup>[121,127]</sup> Weiterhin konnte gezeigt werden, dass selektierte Proteine die Ausfällung von kristallinem Pulver nukleieren<sup>[128]</sup>, welche als Templat für die Bildung von verschiedenen Nanostrukturen wie Nanoringen,<sup>[129]</sup> Nanofasern<sup>[119,130]</sup> und halbleitenden nanokristallinen Drähten dienen,<sup>[131]</sup> oder Nanokristalle in hoch organisierte Nanostrukturen einbauen können.<sup>[129]</sup>

In dem Bestreben den Prozess der Biomineralisation besser zu verstehen, wurden in den letzten Jahren Peptide mittels *Phage Display* selektiert, die über starke Affinitäten zu calciumhaltigen Biomineralien wie Calciumphosphat<sup>[35]</sup> und Calciumcarbonat verfügen.<sup>[132,133]</sup> Forscher konnten auf diese Weise kurze Oligopeptide identifizieren, die spezifisch mit der Oberfläche von geologischen Calcit und Aragonit wechselwirkten und untersuchten deren Einfluss auf das Wachstum von Calciumcarbonat.<sup>[133]</sup> Dabei wurde eine hemmende Wirkung auf das Wachstum festgestellt. In einer weiteren Studie wurden nanoskalige Hohlkugelpartikel aus Vaterit durch den templatierenden Effekt der Phage erhalten. Durch die Anwesenheit der Phage wurde die Umwandlung der sphärischen Hohlpartikel zu rhombischen Calcit-Kristallen verlangsamt.

Während für die beiden calciumhaltigen Minerale Calciumphosphat und Calciumcarbonat selektive Phagen/Peptide mittels *Phage Display* ermittelt wurden, wurde bei Calciumoxalat zwar bisher der Einfluss von Peptiden auf die Kristallisation untersucht, jedoch nicht von spezifischen Peptiden, die mit Hilfe der *Phage Display* Technologie identifiziert wurden.





## **II Ergebnisse und Diskussion**



# 6

## Kontrolle der Morphologie mittels ionischer Polymere

### 6.1 Einleitung

Aufgrund ihrer einzigartigen Strukturen und Eigenschaften gibt es sehr viele umfangreiche Studien, die sich mit biomineralisierten Materialien befassen. Biomineralien wie Muscheln, Korallen, Knochen oder magnetotaktische Bakterien sind bekannte Hybridmaterialien, die eine Vielzahl an Funktionen bieten, wie mechanische Eigenschaften zum Schutz, zur Verteidigung oder zur Navigation. Inspiriert durch die Prozesse der Biomineralisation, wurde eine Vielzahl von Untersuchungen an anorganischen Materialien durchgeführt, deren kontrollierte Synthese durch Einsatz von Polymeren induziert wurde. Auf diese Weise konnten Kristalle mit einer steuerbaren Größe, Polymorphie und Morphologie hergestellt werden.<sup>[75,134-137]</sup> Calciumoxalat ist ein anorganisches Biomineral, dessen Interesse, aufgrund seiner Präsenz in der Pathologie und der Pflanzenwelt, mehr und mehr in den Fokus der Forschung gerät. Es ist das am häufigsten gebildete Biomineral in höheren Pflanzen und der primäre Mineralbestandteil in den meisten menschlichen Harn- und Nierensteinen. Daher wurden schon eine ganze Reihe an Studien durchgeführt, um den Effekt verschiedener Additive auf die Nukleation, das Kristallwachstum, die Aggregation und die Phasenumwandlung des Calciumoxalats zu erforschen. Dank der spezifischen und oberflächenaktiven Eigenschaften vieler organischer Bestandteile in Organismen, wie ihrer Adsorption an Grenzflächen oder ihrer selbstorganisierten Anordnung (*self-assembly*), eignen

sich Polymere als Modellsystem, um die Wirkung von organischen Verbindungen auf den Bildungs- und Transformationsmechanismus von anorganischen Materialien zu untersuchen. Da diese Mechanismen bei Calciumoxalat *in vitro* bis heute nur limitiert erforscht und noch nicht vollständig verstanden sind, ist es Ziel der vorliegenden Studie die Morphologie und Phasenumwandlung mithilfe von anionischen und kationischen Polymeren zu untersuchen und zu kontrollieren. Dazu wird die Kristallisation von Calciumoxalat im wässrigen Medium in An- und Abwesenheit von Polyvinylphosphonsäure und Polyvinylaminen ermittelt und diskutiert.

## 6.2 Experimentelles

### 6.2.1 Reagenzien und Chemikalien

Die Chemikalien Calciumchlorid Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich,  $\geq 99\%$ ), Dimethyloxalat ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{O}_4$ , Sigma Aldrich, 99%), Natriumhydroxid (NaOH, 1.0 N, Acros Organics), Natriumoxalat ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , Sigma Aldrich,  $\geq 99,5\%$ ) und Oxalsäure Dihydrat ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Merck,  $\geq 99,5\%$ ) wurden wie erhalten eingesetzt. In allen Synthesen wurde ausschließlich mit MilliQ Wasser ( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) gearbeitet.

### 6.2.2 Synthesevorschrift

Zuerst wurden wässrige Stammlösungen von Calciumchlorid Dihydrat (0.1 M) und Natriumoxalat (0.1 M) hergestellt. Für die Kristallisation von Calciumoxalat wurde zumeist ein Ansatzvolumen von 50 mL gewählt. In einer typischen Synthese wurde zu einer wässrigen  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  Lösung (0.1 M, 1 mL) eine 1 mM wässrige Lösung des Polymers zugegeben und 20 Minuten miteinander gerührt. Um die Kristallisation zu initiieren, wurde unter kontinuierlichem Rühren eine  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  Lösung (0.1 M, 1 mL) zugegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 2 h bei Raumtemperatur, wurden die erhaltenen Kristalle durch Zentrifugation ( $9000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ , 15 min) von der Mutterlauge abgetrennt, mehrmals mit Wasser und Ethanol gewaschen und im Feinvakuum getrocknet.

### 6.2.3 Charakterisierung

Die Ausbeute der Proben wurde gravimetrisch bestimmt und mittels Rasterelektronenmikroskopie (*scanning electron microscopy*, SEM) und Röntgen-Pulverdiffraktion (*x-ray powder diffraction*, XRPD) charakterisiert.

### 6.3 Ergebnis und Diskussion

In diesem Kapitel wurden Calciumoxalat (CaOx) Partikel in einfachen Fällungsreaktionen von Calciumchlorid und Natriumoxalat in Ab- und Anwesenheit von unterschiedlichen Polymeren mit verschiedenen Morphologien und Phasenstrukturen synthetisch hergestellt. Eine dramatische Morphologie-Änderung in Gegenwart von polymeren Additiven offenbart eine spezielle Wechselwirkung der Additive mit verschiedenen strukturierten Oberflächen der kristallinen Substanz. Das heißt ein Wechsel der Morphologie, hängt mit der Adsorption der Additive an bestimmten Flächen zusammen. Wenn das Wachstum in einer Richtung senkrecht zu einer bestimmten Fläche gehemmt wird, nimmt voraussichtlich der Bereich dieser Fläche relativ zu den anderen Flächen des gleichen Kristalls zu.

#### 6.3.1 Kristallisation mit Polyvinylphosphonsäure

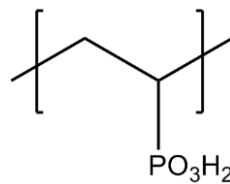
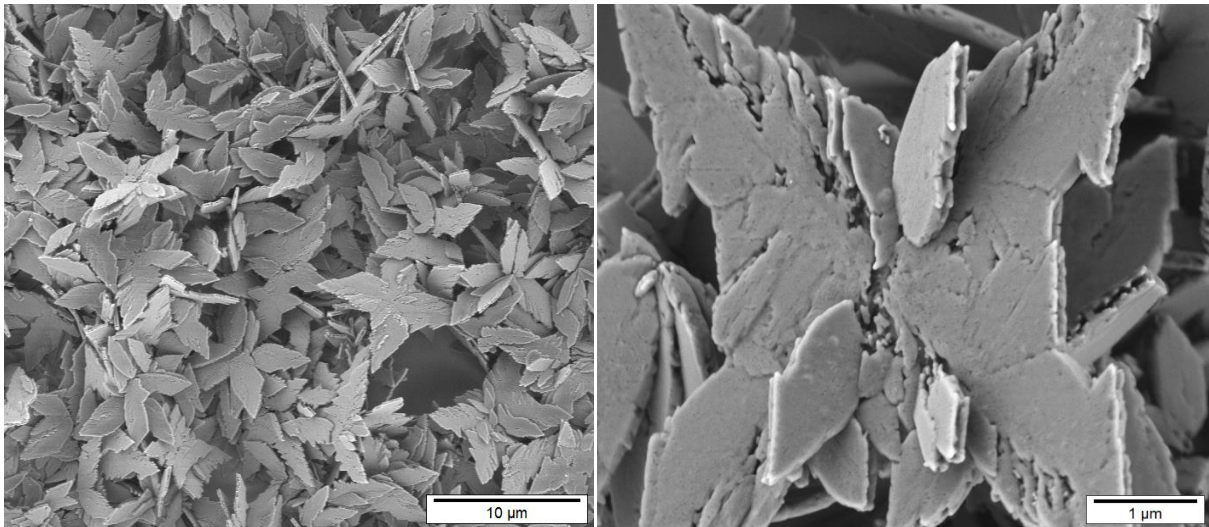


Abbildung 6.1 Struktureinheit von Polyvinylphosphonsäure.

Um einen Einfluss auf die Polymorphie und die Morphologie von Calciumoxalat festzustellen wurden mehrere Parameter wie die Konzentration des Polymers, die Calciumoxalat-Konzentration, das Verhältnis  $[\text{Ca}^{2+}]$  zu  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}]$ , die Reaktionszeit sowie die Reaktionstemperatur variiert.

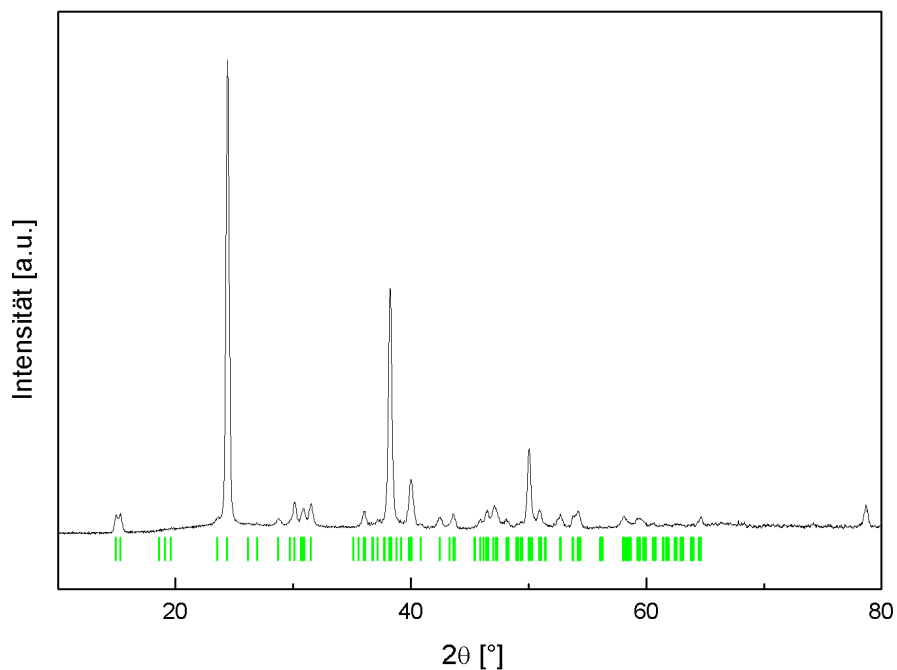
#### *Einfluss der Polymerkonzentration*

Die Polymerkonzentration der Polyvinylphosphonsäure (*Polyvinylphosphonic acid* PVPA) wurde von 0 bis 7.5 mM variiert. Es stellte sich heraus, dass der Einfluss der Additive auf die Morphologie bei einer Konzentration von 2 mM Calciumoxalat (CaOx) am besten zu beobachten und zu bestimmen ist, sodass diese CaOx-Konzentration als Standardtestsystem definiert wurde. In einem Kontrollsystem mit der CaOx-Konzentration von 2 mM, wurden, wie in Abbildung 6.2, in Abwesenheit des Polymers, Kristalle mit einer flachen, flügel-förmigen Gestalt, mit einer Länge von 7-7.5  $\mu\text{m}$  und einer Dicke von ca. 80 nm, erhalten.



**Abbildung 6.2** Morphologie von COM-Kristallen hergestellt ohne Additiv-Kontrollsystem.

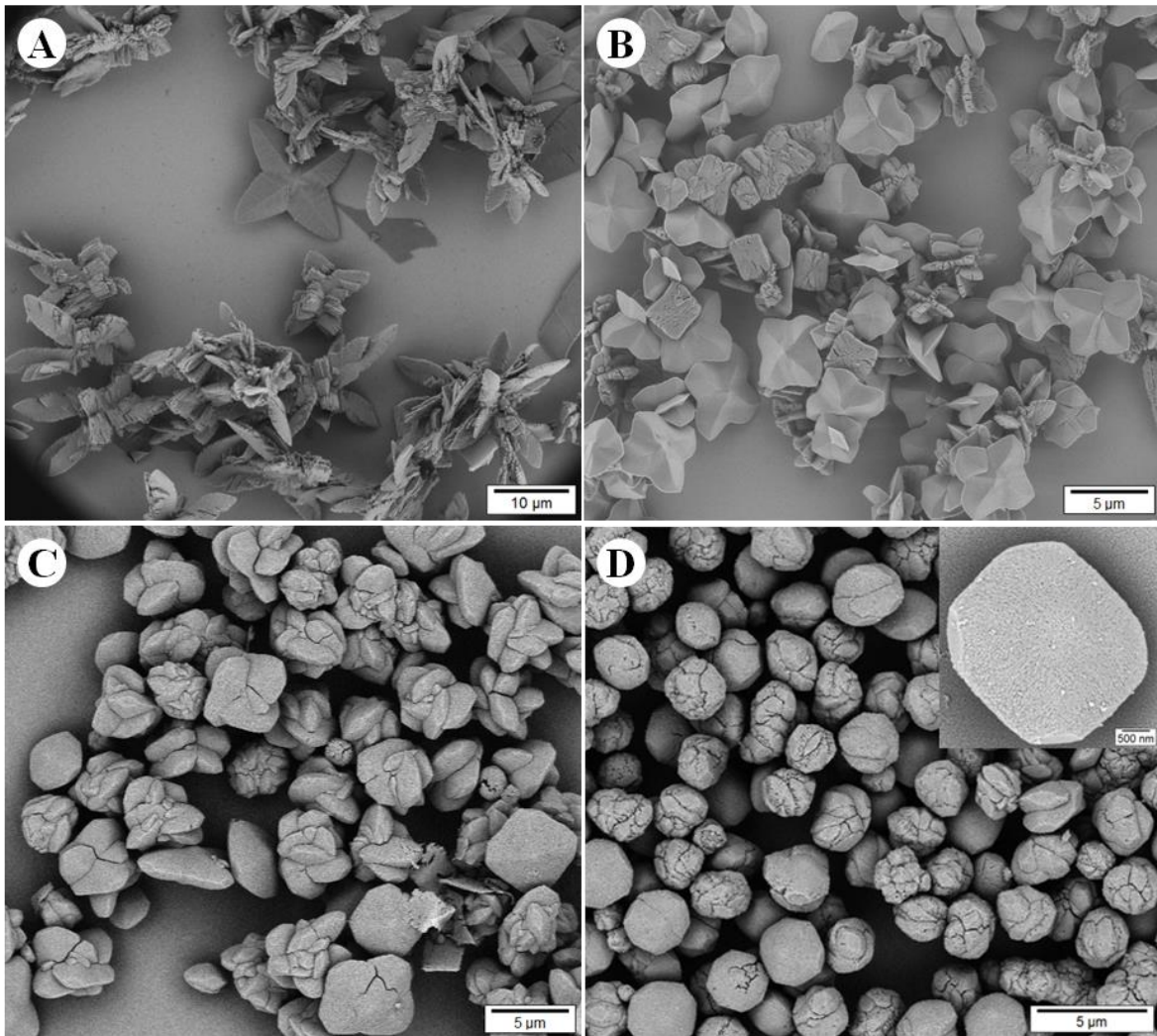
Mit Hilfe der Röntgenbeugung in Abbildung 6.3 kann festgestellt werden, dass es sich bei dieser Probe um die thermodynamisch stabile Form des Calciumoxalats, dem Calciumoxalat Monohydrat (COM) handelt. Die Hauptreflexe erscheinen bei Glanzwinkeln von  $24.37^\circ$ ,  $38.18^\circ$ ,  $39.98^\circ$  und  $50.00^\circ$  mit den jeweiligen korrespondierenden (040), (061), (-161) und (080) Flächen.



**Abbildung 6.3** Pulverdiffraktogramm der Synthese ohne Polymer, mit charakteristischen Reflexen für COM (JCPDF 1-75-1313).

Abbildung 6.4 zeigt den Einfluss einer geringen Menge PVPA auf die Größe und Morphologie von Calciumoxalat-Kristallen bei 25°C unter Standardsynthese-Bedingungen und einer Polymerkonzentration zwischen 0.02 und 0.45 mM. Es ist zu beobachten, dass bereits bei der Zugabe einer geringen Polymerkonzentration eine Änderung der Morphologie festzustellen ist. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass mit zunehmender Polymerkonzentration die Größe der CaOx-Partikel im Durchschnitt abnimmt und erst bei hohen Polymerkonzentrationen wieder leicht zunimmt. Der Grund für die Abnahme der Partikelgröße lässt sich wie folgt erklären:<sup>[138]</sup> Da es sich bei der PVPA um ein Polyanion im deprotonierten Zustand, mit negativer Ladung handelt, werden die Calcium-Ionen an der Polymer-Wasser-Grenzfläche angereichert. Daraus folgt, dass die Calcium-Ionenkonzentration an dieser Grenzfläche zunimmt und im Bulkmedium abnimmt. Dadurch entsteht eine Übersättigung an der Grenzfläche, was aufgrund der daraus folgenden Abnahme der Aktivierungsenergie, zu einer vereinfachten Keimbildung von Calciumoxalat führt (siehe auch Kapitel 2, Grundlagen der Kristallisation). Folglich nimmt die Induktionszeit der Fällung ab, wodurch viele kleine CaOx-Partikel gebildet werden. Verallgemeinert kann man deshalb sagen, je mehr Polymer eingesetzt wird, desto kleiner werden die Partikel, von ca. 8 µm bis zu 1 µm kleinen Partikeln.





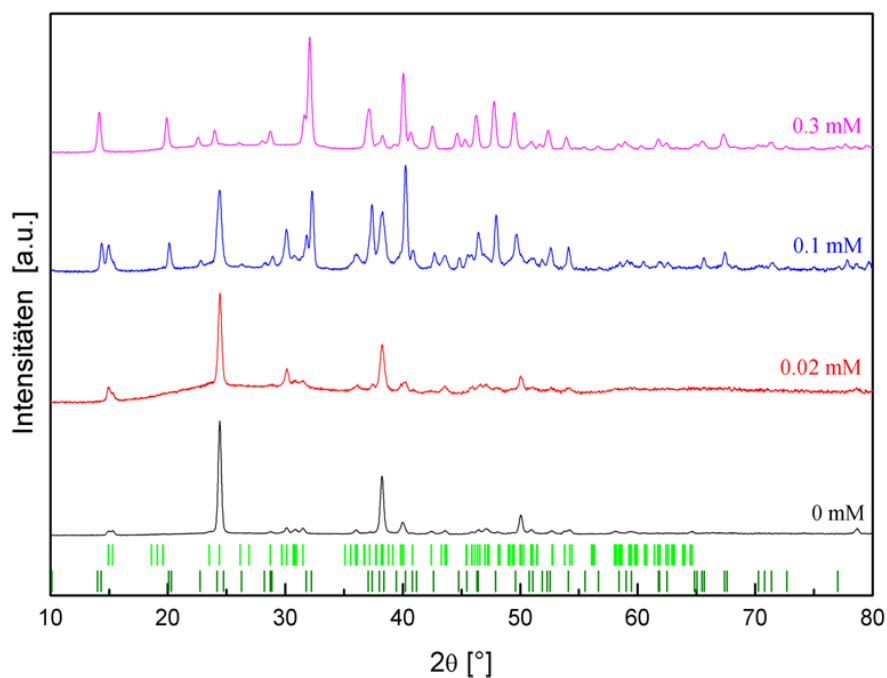
**Abbildung 6.4** SEM Aufnahmen der Morphologie von Calciumoxalat in der Gegenwart von (A) 0.02, (B) 0.1, (C) 0.3 und (D) 0.4 mM PVPA und 2 mM CaOx.

Mit einer Konzentration von 0.02 mM PVPA, sind zwei verschiedene Morphologie-Typen, wie in Abbildung 6.4 A deutlich wird, zu beobachten. Eine dieser Morphologien setzt sich aus vielen kleinen Kristallen zusammen, die optisch eine flügelförmige Gestalt annehmen und ineinander verwachsen sind. Bei diesen Partikeln handelt es sich vermutlich um COM-Kristalle. Die andere Morphologie, die eine sternförmige glatte Gestalt, mit einem gegenläufigen Kreuz in der Mitte hat, erscheint hingegen bei dieser Konzentration nur sehr selten. Sobald die Konzentration auf 0.1 mM PVPA, wie in Abbildung 6.4 B gezeigt, erhöht wurde, sind deutlich mehr sternähnliche Partikel vorzufinden, deren Form mehr und mehr die Gestalt einer tetragonalen Bipyramide annimmt. Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich bei den tetragonalen Bipyramiden zumeist um Calciumoxalat Dihydrat (COD) handelt.<sup>[55,75,139]</sup> Das Pulverdiffraktogramm in Abbildung 6.5 zeigt deutlich an, dass Calciumoxalat Dihydrat

## MORPHOLOGIE-KONTROLLE VON CALCIUM OXALAT

ab einer Konzentration von 0.1 M Additiv anwesend ist. Ab einer Konzentration von 0.3 mM bis 0.4 mM liegt fast nur noch eine Morphologie Form vor (Abbildung 6.4 C+D). Es können hauptsächlich tetragonale Bipyramiden festgestellt werden, mit abgeschnitten Kanten, die zumeist in mehrfach verzwilligter oder ineinander verwachsener Form und nicht als einzelne Bipyramide vorliegen.

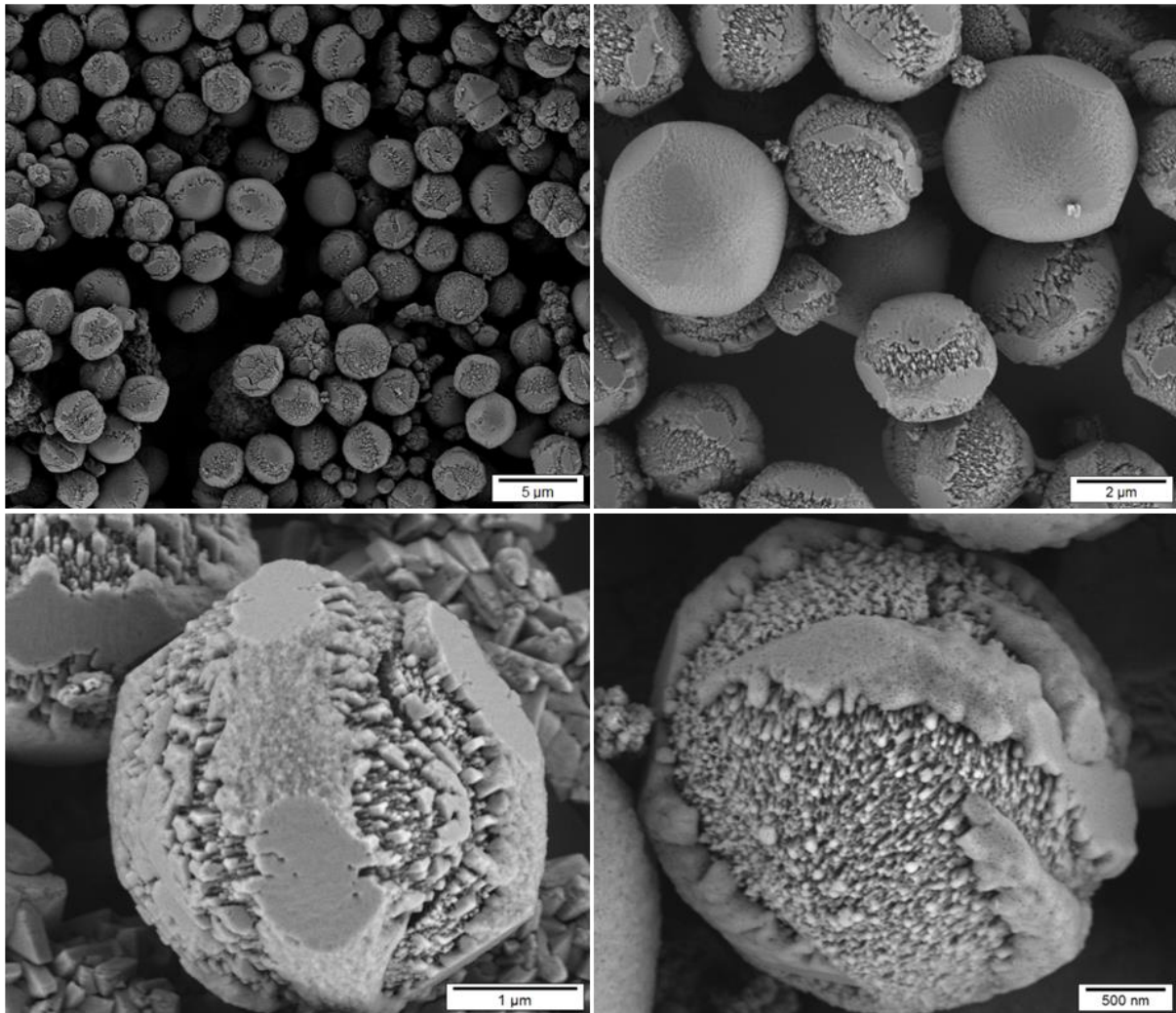
In Abbildung 6.5 sind die Pulverdiffraktogramme bei geringer Polymerkonzentration aufgeführt. Während ohne Polymer Calciumoxalat als Monohydrat vorliegt, wird bei zunehmender PVPA Konzentration deutlich, dass eine dirigierende Wirkung des Polymers die Entstehung des Dihydrats im Gegensatz zum Monohydrat begünstigt. Bei 0.02 mM Polymerkonzentration besteht CaOx noch größtenteils aus der Monohydrat-Phase, doch bei 0.1 mM liegen die beiden Phasen COM und COD in ähnlichen Verhältnissen zueinander vor. Ab einer Konzentration von 0.3 mM hingegen liegt nur noch ausschließlich COD vor.



**Abbildung 6.5** Pulverdiffraktogramm kristallisierter Calciumoxalat-Partikeln in Ab- und Anwesenheit von unterschiedlichen PVPA Konzentrationen. Obere Reflexe von COM (JCPDS 1-75-1313), untere Reflexe von COD (JCPDS 1-75-1314).

Mit einer weiteren Erhöhung der Konzentration von PVPA auf 0.5 mM sind zusätzliche Veränderungen in der Morphologie zu sehen (Abbildung 6.6). Die tetragonalen Bipyramiden werden zunehmend sphärisch und aus der (101) Fläche wachsen stäbchenförmige Subkristalle entlang der  $\langle 001 \rangle$  Richtung heraus. Das Wachstum entlang der (101) Ebene lässt sich

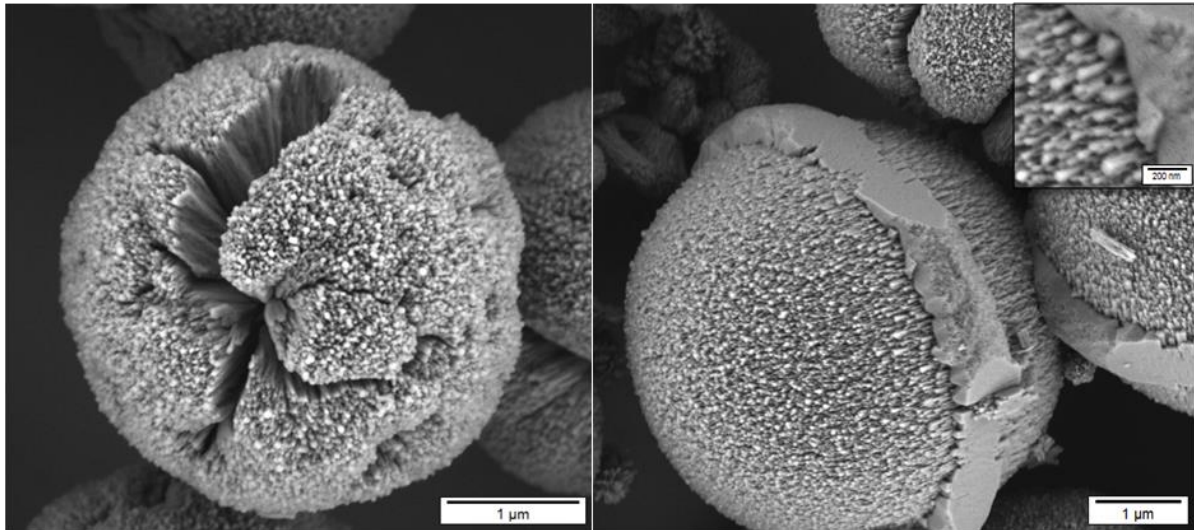
dadurch erklären, dass die (100) Ebene mit  $0.04395 \text{ Ionen}/\text{\AA}^2$  eine höhere Dichte an Calcium Ionen hat, als die (101) Fläche mit  $0.0213 \text{ Ionen}/\text{\AA}^2$ .<sup>[140]</sup> Dadurch adsorbieren die Phosphate mehr auf der (100) Fläche. Da das Wachstum der (100) Fläche durch das Additiv inhibiert ist, findet das Wachstum auf der (101) Fläche, entlang der  $\langle 001 \rangle$  Richtung statt.



**Abbildung 6.6** SEM Aufnahmen der Morphologie von Calciumoxalat in der Gegenwart von 0.5 mM PVPA und 2 mM CaOx bei verschiedenen Vergrößerungen.

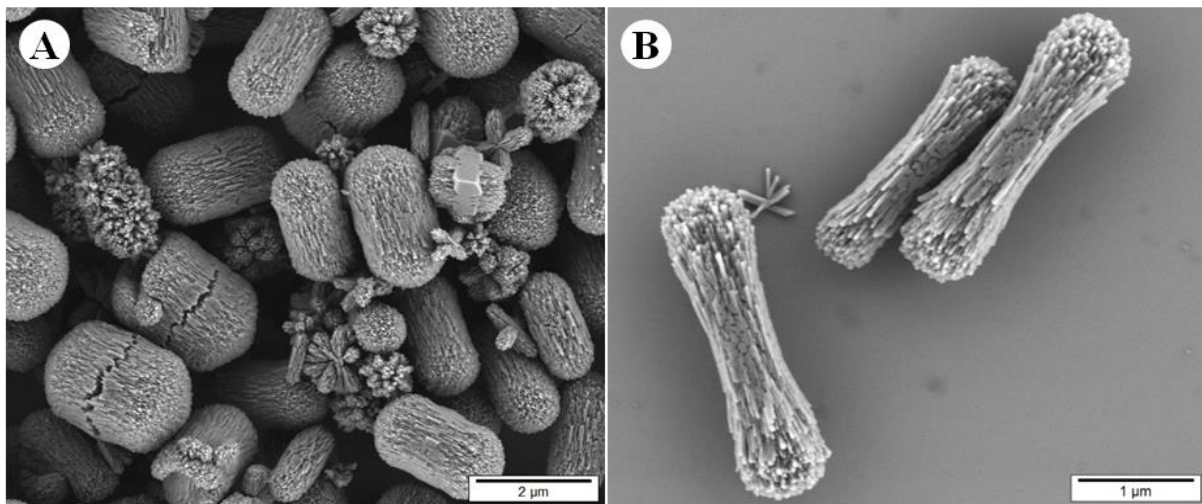
In Abbildung 6.7 links zeigt sich, dass sich bei einer Konzentration von 0.75 mM PVPA Sphärolithe aus Calciumoxalat, gebrochene Kugeln mit einer strahlenförmigen Anordnung aus Nadeln, gebildet haben. Aber auch ein fortgeschrittenes Wachstum aus den tetragonalen Bipyramiden von Subkristalle in Richtung  $\langle 001 \rangle$ , wie bereits in Abbildung 6.6 unten, kann bei dieser Konzentration in Abbildung 6.7 rechts oben festgestellt werden. In einer Vergrößerung dieser Abbildung lässt sich erahnen, dass es sich bei den herauswachsenden Kristallen, um gestreckte tetragonale Prismen handelt.





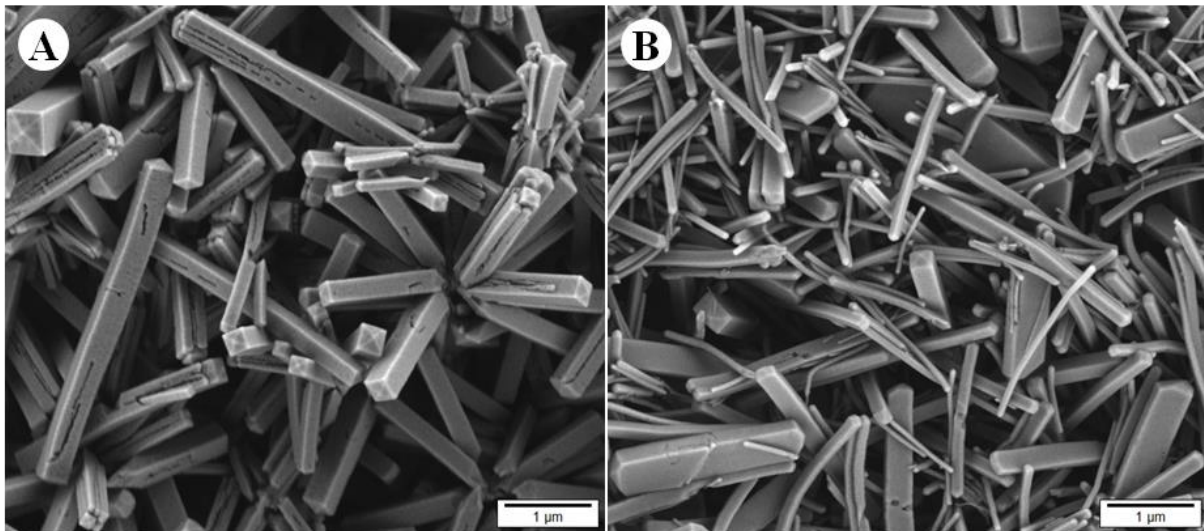
**Abbildung 6.7** SEM Aufnahmen der Morphologie von Calciumoxalat in der Gegenwart von 0.75 mM PVPA und 2 mM CaOx.

In Gegenwart von 1.0 mM des Polymer in Abbildung 6.8 A, ist auch ein Wachstum auf der (100) Fläche zu beobachten. Von der ursprünglichen tetragonalen bipyramidalen Form ist nur noch wenig vorzufinden. Während die Partikel bei 0.75 mM Polymer eine sphärische Form angenommen haben, liegen die Partikel mit erhöhter Polymerkonzentration zunehmend gestreckt vor.



**Abbildung 6.8** SEM Aufnahmen der Morphologie von Calciumoxalat in der Gegenwart von (A) 1.0 und (B) 2.0 mM PVPA und 2 mM CaOx.

Ab einer PVPA Konzentration von mehr als 5 mM, werden zumeist einzelne stäbchenförmige tetragonale Kristalle aus Calciumoxalat Dihydrat im Mikrometerbereich gebildet. Während die Stäbchen in Abbildung 6.9 A bei einer Konzentration von 5 mM im Schnitt eine relativ gleichmäßig Breite von 200 bis 300 nm aufweisen, werden die Stäbchen mit zunehmender Polymerkonzentration (7.5 mM PVPA) mit einer Breite zwischen 70 nm und 2  $\mu\text{m}$  sehr unregelmäßig (Abbildung 6.9 B).



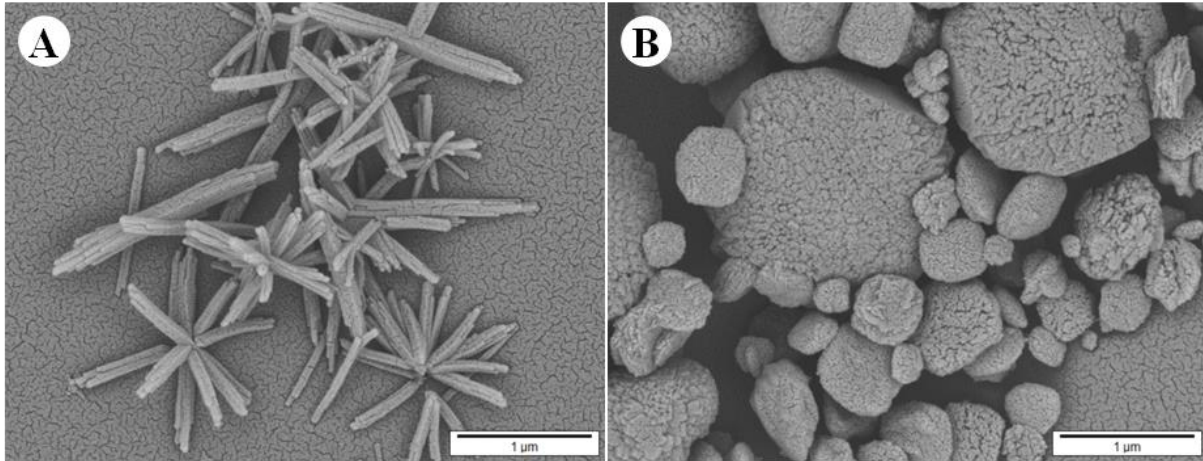
**Abbildung 6.9** SEM Aufnahmen der Morphologie von Calciumoxalat in der Gegenwart von (A) 5.0 und (B) 7.5 mM PVPA und 2 mM CaOx.

#### *Einfluss der Calciumoxalat-Konzentration*

Um den Einfluss der Calciumoxalat-Konzentration auf die Kristallisation zu untersuchen, wurden Fällungsexperimente bei einer konstanten Polymerkonzentration von 1 mM PVPA, aber niedrigerer bzw. höherer Calciumoxalat-Konzentration durchgeführt. Abbildung 6.10 zeigt den Einfluss der Calciumoxalat-Konzentration auf die Morphologie und Größe der gefällt CaOx-Partikel. Bei einer geringeren CaOx-Konzentration von 1.0 mM, konnten gestreckte tetragonale Prismen aus COD, mit einer stäbchenförmigen Gestalt, erhalten werden. Die Stäbchen sind von ähnlicher Form, wie die Stäbchen, die bei einer CaOx-Konzentration von 2 mM aber einer deutlich höheren Polymerkonzentration von 5.0 mM beobachtet wurden. Jedoch sind die vorliegenden Partikel deutlich schmäler und kleiner. Beschreiben lässt sich dieses Verhalten mit der Zunahme der relativen Polymerkonzentration zum Calciumoxalat. Während die CaOx-Konzentration abnimmt, wird die Polymerkonzentration im Verhältnis dazu deutlich größer. Demnach wird mit abnehmender

## MORPHOLOGIE-KONTROLLE VON CALCIUM OXALAT

CaOx-Konzentration die Adsorption des Polymers auf der (100) Fläche des COD bevorzugt, wodurch die tetragonalen Bipyramiden, mit der dominanten (101) Fläche, morphologisch zu getreckten tetragonalen Prismen mit der favorisierten (100) Fläche wachsen.



**Abbildung 6.10** SEM Aufnahmen der Morphologie von Calciumoxalat in der Gegenwart von (A) 1.0 und (B) 5.0 mM CaOx mit 1 mM PVPA.

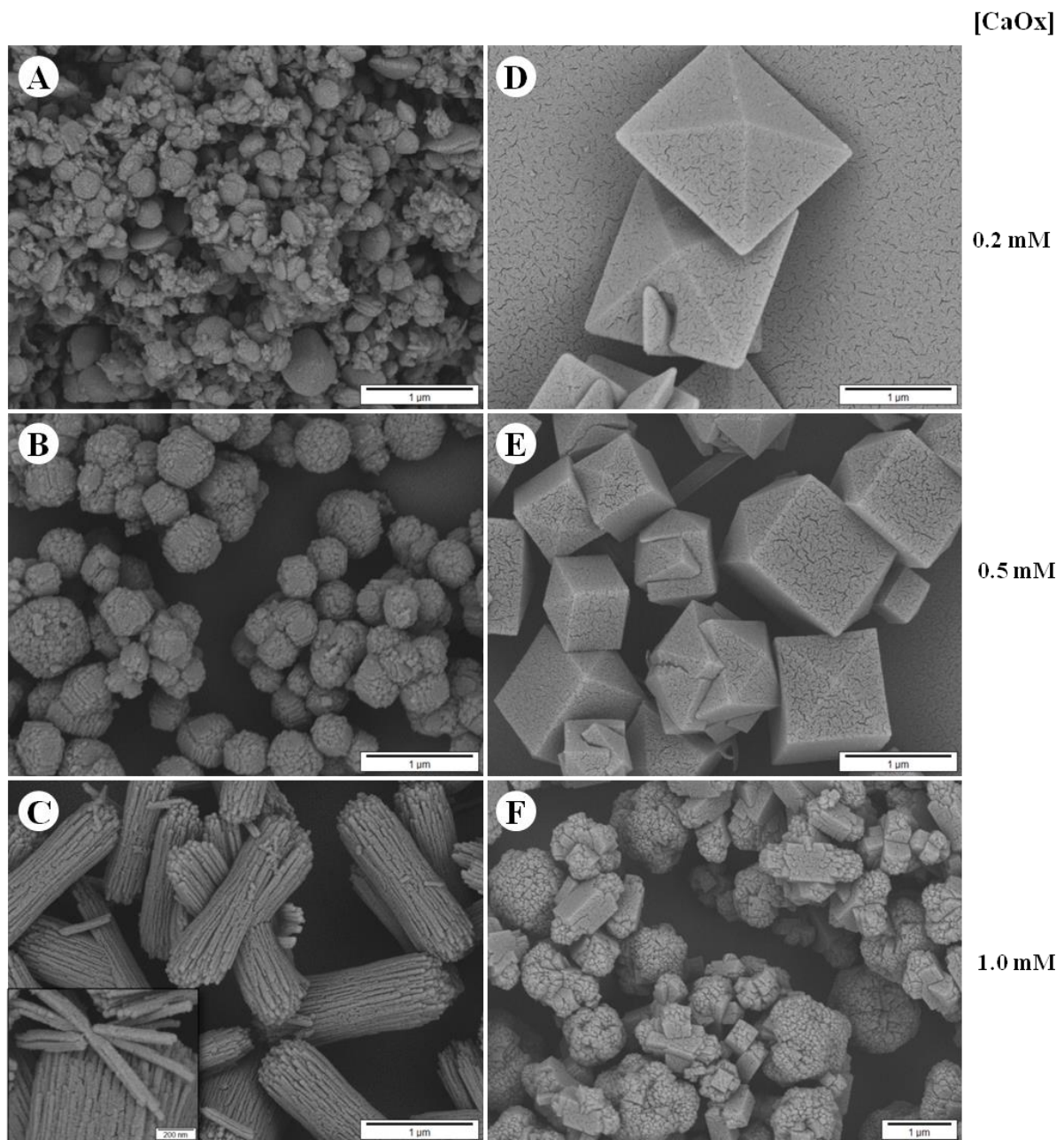
Ist die CaOx-Konzentration andererseits mit 5 mM größer, sind tetragonale Bipyramiden mit abgerundeten Kanten und teilweise schon abgerundeten gestreckten tetragonalen Prismen aus COD festzustellen. Diese Beobachtung ist vergleichbar mit den Produkten, die bei der CaOx Standardkonzentration von 2 mM und einer geringeren Polymerkonzentration von 0.4 mM erhalten wurden. Es zeigt sich, dass mit zunehmender CaOx-Konzentration bei fester Polymerkonzentration, gleichartige Effekte wie bei einer abnehmenden Polymerkonzentration mit fester CaOx-Konzentration festzustellen sind.

### *Einfluss des Verhältnisses von Calcium zu Oxalat*

Die Variation des Verhältnisses von Calcium zu Oxalat kann zu einer Änderung der Oberflächenelektrostatik der COD Kristalle führen, wodurch eine Veränderung der Polymer-COD-Kristall-Wechselwirkung stattfindet und dadurch eine veränderte Morphologie entsteht. Hierzu wurden die Verhältnisse von Calcium zu Oxalat, bei jeweils festen Calciumoxalat-Konzentrationen von 0.2, 0.5 und 1.0 mM variiert, die Konzentration des Polymers wurde auf 1 mM eingestellt. Mit einem sehr hohen Calcium-Überschuss in Abbildung 6.11 A, werden bei geringer CaOx-Konzentration von 0.2 mM sehr kleine, unregelmäßig geformte Bipyramiden aus COD gebildet. Bei erhöhter CaOx-Konzentration (0.5 mM) und einem



geringeren Überschuss an Calcium-Ionen, wie in Abbildung 6.11 B, werden größere Partikel erhalten, die sich aus Subkristallen von Calciumoxalat zusammensetzen. Liegt Calcium im doppelten Verhältnis zu Oxalat bei einer CaOx-Konzentration von 1 mM vor, sind die Partikel, wie in Abbildung 6.11 C, die sich aus gestreckten tetragonalen Prismen zusammenlagern, noch mal deutlich größer.

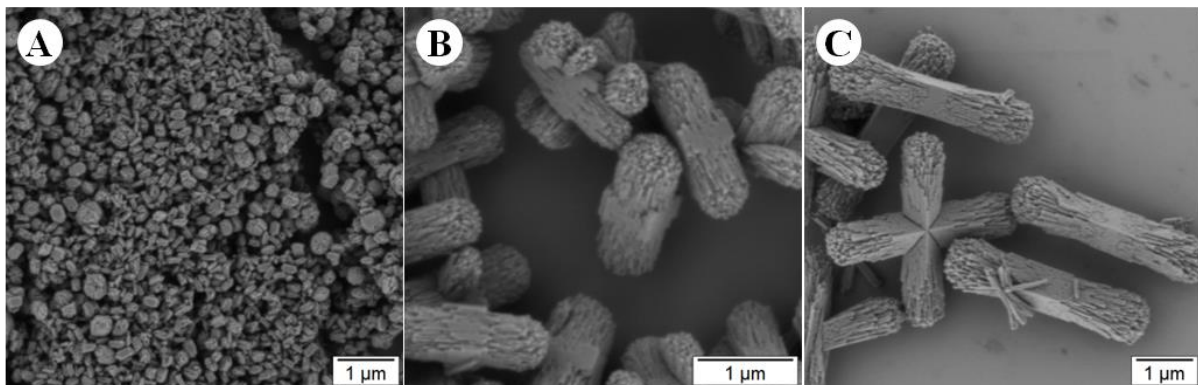


**Abbildung 6.11** SEM Aufnahmen der Morphologie bei 1 mM PVPA und verschiedenen Verhältnissen Calcium zu Oxalat. (A) 50:1, (B) 4:1 (C) 2:1, (D) 1:50, (E) 1:4 und (F) 1:2 Ca:Ox.

Ist dagegen Oxalat im Überschuss vorhanden, ist ein gegenläufiges Verhalten in der Größe der Partikel zu beobachten. Mit zunehmender CaOx-Konzentration und abnehmenden Oxalat-Überschuss, werden die Partikel kleiner. Bei einem extrem hohen Überschuss an Oxalat-Ionen (fünzigfacher Überschuss) mit einer Konzentration von 0.2 mM CaOx zeigt sich in Abbildung 6.11 D, dass tetragonale Bipyramiden mit scharfen Kanten gebildet wurden. Wird der Überschuss an Oxalat-Ionen geringer und die CaOx-Konzentration liegt bei 0.5 mM, ist zu beobachten, dass sich die tetragonalen Bipyramiden entlang der  $\langle 001 \rangle$  Richtung zu gestreckten bipyramidalen Prismen umgewandelt haben. Liegt  $[\text{Ca}^{2+}]$  zu  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}]$  im Verhältnis 1 zu 2 vor, ist festzustellen, dass aus der bipyramidalen Fläche entlang der  $\langle 001 \rangle$  Richtung, kleine dünne Stäbchen, ebenfalls gestreckte bipyramidale Prismen, wachsen.

### *Zeiteinfluss*

Um weitere Informationen über das Wachstum der CaOx Kristalle zu erhalten, wurden die Kristalle nach bestimmten Zeitintervallen, nach dem Zusammengeben der Reaktanten isoliert und unter dem SEM untersucht. Die Fällungsexperimente in Abbildung 6.12 wurden bei einer CaOx-Konzentration von 2.4 mM und einer Polymerkonzentration von 2.6 mM durchgeführt. Bereits nach 2 Minuten zeigt sich in Abbildung 6.12 A, dass sich gestreckte tetragonale Prismen mit kleinen tetragonalen Kristallen, die auf der pyramidalen (101) Fläche gebildet wurden, zu beobachten sind. Die Produkte haben nach 2 Minuten eine durchschnittliche Größe von 200-400 nm. Nach 30 Minuten sind die Partikel in Abbildung 6.12 B, mit einer Durchschnittsgröße von 1.2 bis 1.5  $\mu\text{m}$ , deutlich größer und weiter gewachsen. In Abbildung 6.12 C ist auch nach 2 Stunden ein weiteres Wachstum entlang der  $\langle 001 \rangle$  Richtung zu 3-4  $\mu\text{m}$  großen Produkten zu beobachten.

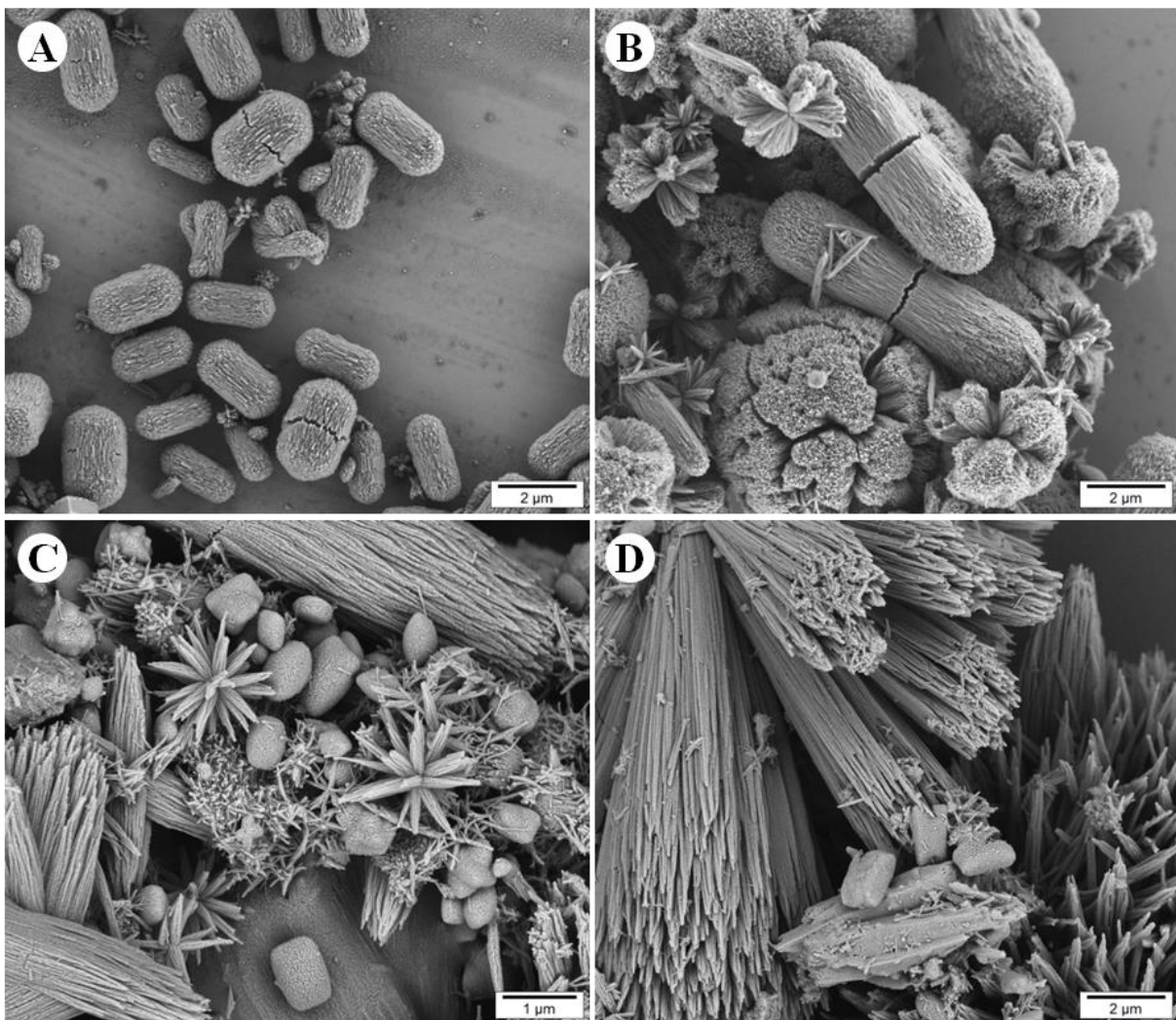


**Abbildung 6.12** SEM Aufnahmen der Morphologie bei verschiedenen Kristallisationszeiten aus 2.4 mM CaOx und 2.6 mM PVPA. (A) nach 2 Minuten, (B) nach 30 Minuten und (C) nach 2 Stunden.



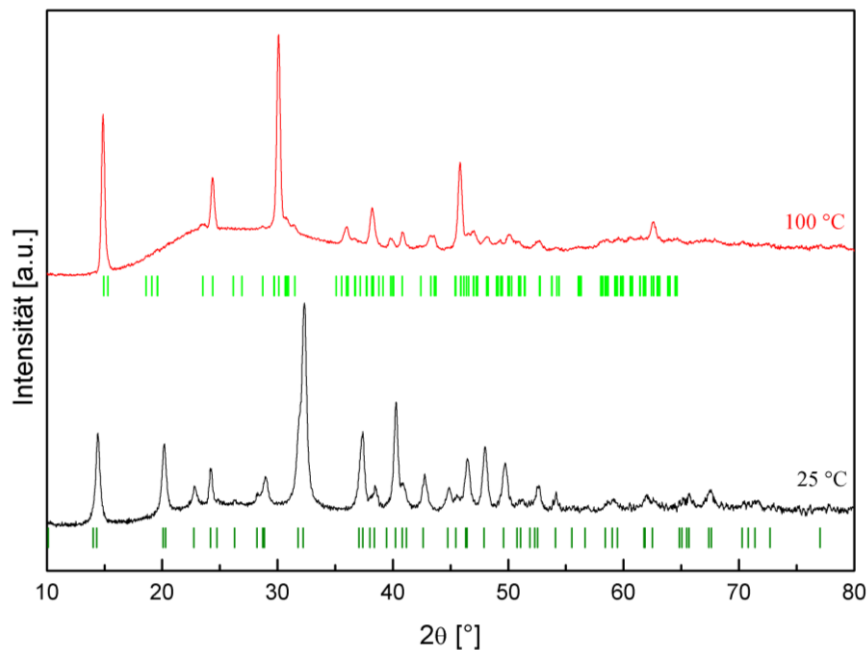
### Temperatureinfluss

Eine Erhöhung der Temperatur kann sowohl Einfluss auf die Morphologie als auch auf die Phase der CaOx Kristalle nehmen. Abbildung 6.13 zeigt SEM Aufnahmen von Calciumoxalat-Partikeln die in Gegenwart von 1 mM PVPA bei 25 °C, 45 °C, 60 °C und 100 °C erhalten wurden. Abbildung 6.13 zeigt, dass die Partikel mit zunehmender Temperatur größer werden. Sind bei 25 °C noch kapselförmige Kristalle zu beobachten, werden bei einer erhöhten Temperatur von 45 °C gestreckte kapselförmige Kristalle gebildet und zusätzlich Sphärolite aus Calciumoxalat. Sowohl bei 25 °C als auch bei 45 °C bestehen die CaOx-Partikel aus COD.



**Abbildung 6.13** SEM Aufnahmen der Morphologie bei verschiedenen Kristallisation-temperaturen, 2 mM CaOx und 1 mM PVPA. (A) 25 °C, (B) 45 °C, (C) 60 °C und (D) 100 °C.

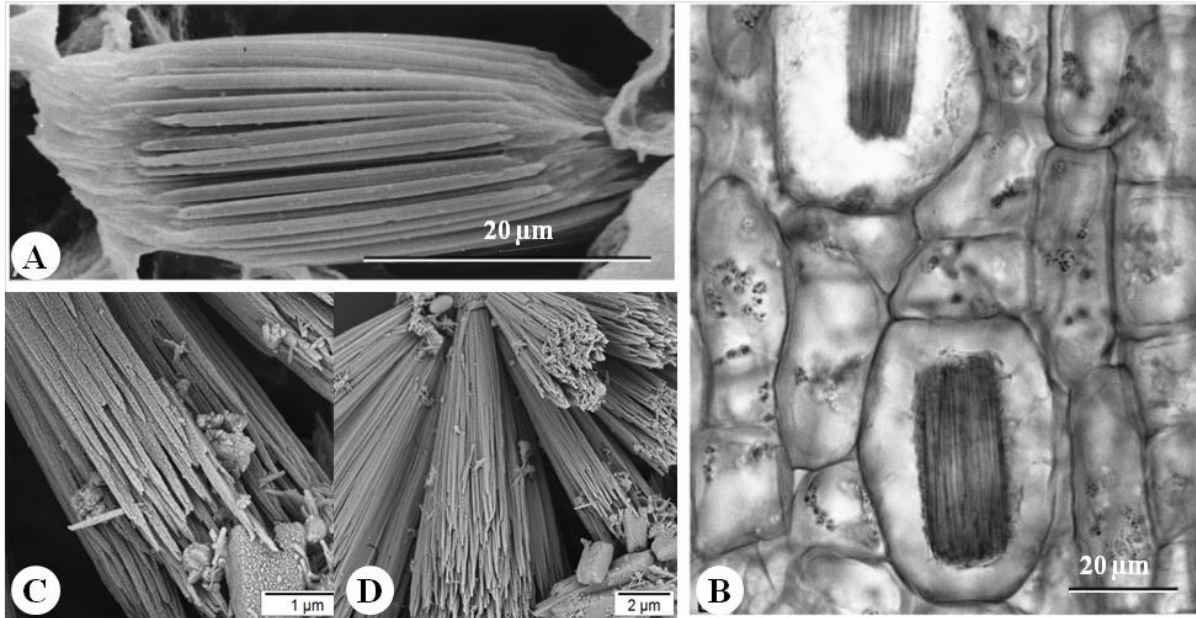
Eine weitere Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60 °C zeigt, dass nadelförmige Bündel und glatte ovale pillenähnliche Formen erzeugt wurden, die auch bei einer weiteren Reaktionstemperaturerhöhung auf 100 °C vorliegen. Im Pulverdiffraktogramm in Abbildung 6.14 wird dabei deutlich, dass die thermodynamisch stabile Phase COM vorliegt und damit eine andere Phase als bei 25 °C und 45 °C. Durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur nimmt die Löslichkeit der CaOx Kristalle zu; dabei kommt es durch das Lösen und Wiederausfällen zu einer Änderung der Morphologie und einer Umwandlung der Phasenstruktur. Höhere Temperaturen begünstigen die Bildung der thermodynamisch stabile Form COM, während COD bei höheren Temperaturen instabil wird.



**Abbildung 6.14** Pulverdiffraktogramm des Kristallisationsprodukts von 2 mM CaOx in Gegenwart von 1 mM PVPA bei verschiedenen Reaktionstemperaturen, oben COM, unten COD.

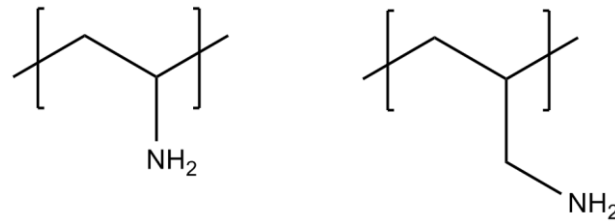
Die nadelförmigen Kristalle bei den Reaktionstemperaturen von 60 °C und 100 °C erinnern an Raphiden. Diese Raphiden werden häufig in der Natur in den Idioplasten von Pflanzen zur Verteidigung und als Calciumreservoir gebildet und bestehen ebenfalls aus COM (siehe Abbildung 6.15).<sup>[105]</sup> Im Gegensatz zu den hier erzeugten Raphiden bei hohen Temperaturen, bildet die Natur solche Formen unter Normalbedingungen, demnach auch bei Raumtemperatur. Das Pendant zur Temperaturerhöhung könnte in der Natur möglicherweise die Verringerung der Ionenkonzentration bedeuten. Ein Vergleich der synthetisch

nachgebildeten Raphiden mit den Raphiden aus der Natur zeigt, dass die synthetischen Raphiden kleiner sind (vergleiche Abbildung 6.15 und auch Abbildung 4.12 D). Nach unserem besten Wissen ist es hier das erste Mal, dass Raphiden auf synthetische Weise nachgebildet werden konnten.



**Abbildung 6.15** Vergleich von Bündeln aus Raphiden. Raphide aus der Natur, genauer aus den Eierstöcken von *Lachenalia bulbifera* (Hyacinthaceae) (A),<sup>[141]</sup> aus der *Liriope platyphylla* Pflanze (B),<sup>[141]</sup> und synthetisch hergestellte Raphide bei 100 °C mit 1 mM PVPA und 2 mM CaOx (C+D).

## 6.3.2 Kristallisation mit Polyaminen



**Abbildung 6.16** Struktureinheit von (links) Polyvinylamin und (rechts) Polyallylamin.

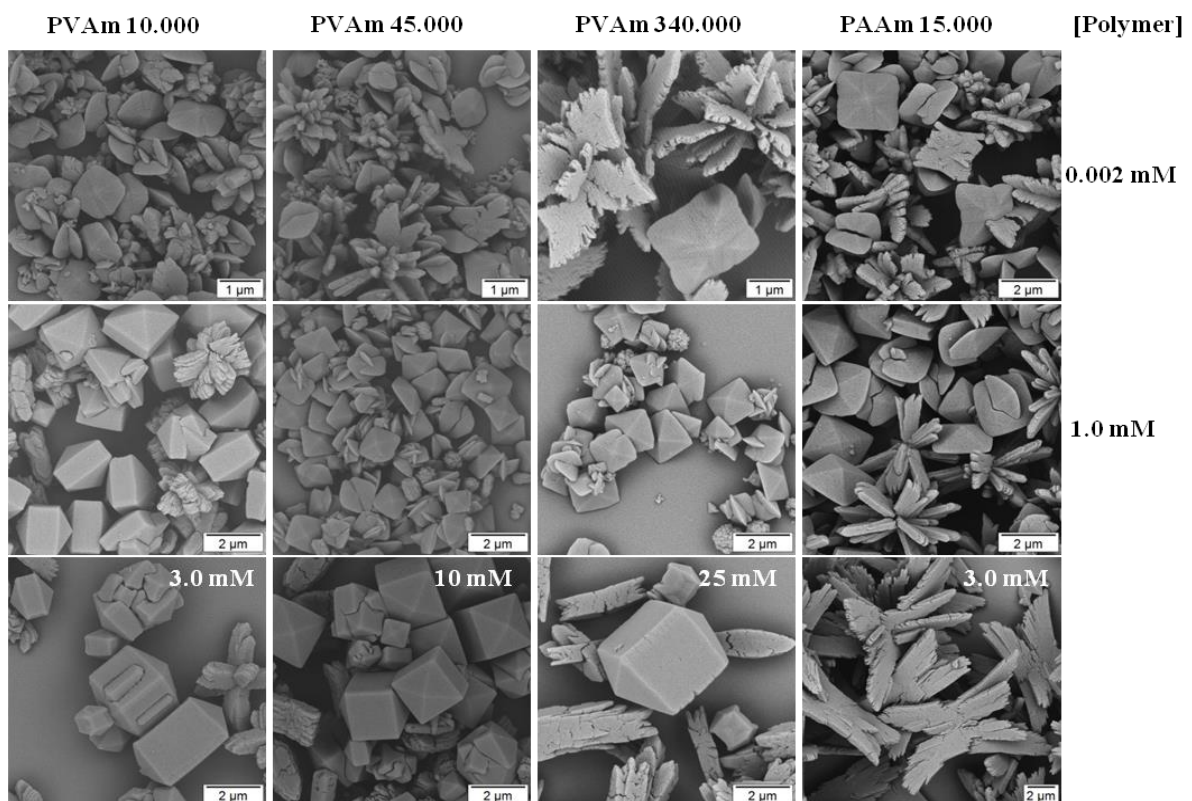
Im Gegensatz zur Polyvinylphosphonsäure, sind die hier verwendeten Polyamine stark basische Polymere, die abhängig vom pH Wert als kationische Polyelektrolyte oder neutrale Polymere reagieren können. Polyvinylamine sind schwache Polyelektrolyte, deren Ladungsdichte stark vom pH der Lösung abhängt. In einem sauren System zeigt das Polymer durch die Protonierung eine erhöhte Ladungsdichte. Es kommt zu abstoßenden Wechselwirkungen der  $-\text{NH}_3^+$ -Gruppen untereinander. Liegt das Polymer protoniert vor, können die einzelnen Gruppen mit den Oxalat-Ionen wechselwirken. Demnach kann der Protonierungsgrad des Polymers einen Einfluss auf die Kristallisation von Calciumoxalat haben. Nach der Literatur liegen die Werte für die Säurekonstante von Polyvinylamin bei einem  $\text{pK}_s$  von 8.6.<sup>[142]</sup> Damit liegt das Polymer bei einem pH Wert von 8 zu 80 % protoniert vor.

#### *Einfluss der Polymerkonzentration*

Die SEM Aufnahmen in Abbildung 6.17 zeigen den Einfluss von Polyvinylaminen (PVAm) mit unterschiedlichen Molmassen von 10.000, 45.000 und 340.000 g/mol und Polyallylamin (PAAm) mit einer Molmasse von 15.000 g/mol auf die Phase, Morphologie und Größe von CaOx Kristallen, bei einer Temperatur von 25 °C unter identischen Standardbedingungen. Wie bereits in Abbildung 6.2 festgestellt wurde, werden in Abwesenheit von Additiven flügelartige Kristalle aus CaOx in der Monohydrat-Phase gebildet. Bereits die Anwesenheit von geringen Mengen der Polyamine zeigt einen Einfluss sowohl auf die Morphologie als auch auf die Hydratphase. Es reicht eine Polymerkonzentration von 0.02 mM aus und bei allen vier Polymeren entstehen neben COM-Kristallen auch COD-Kristalle in geringen Mengen, in Form von tetragonalen Bipyramiden mit unscharfen Kanten. In einem Übersichtsausschnitt aus den SEM Aufnahmen der 0.02 mM Polymerkonzentration (Anhang



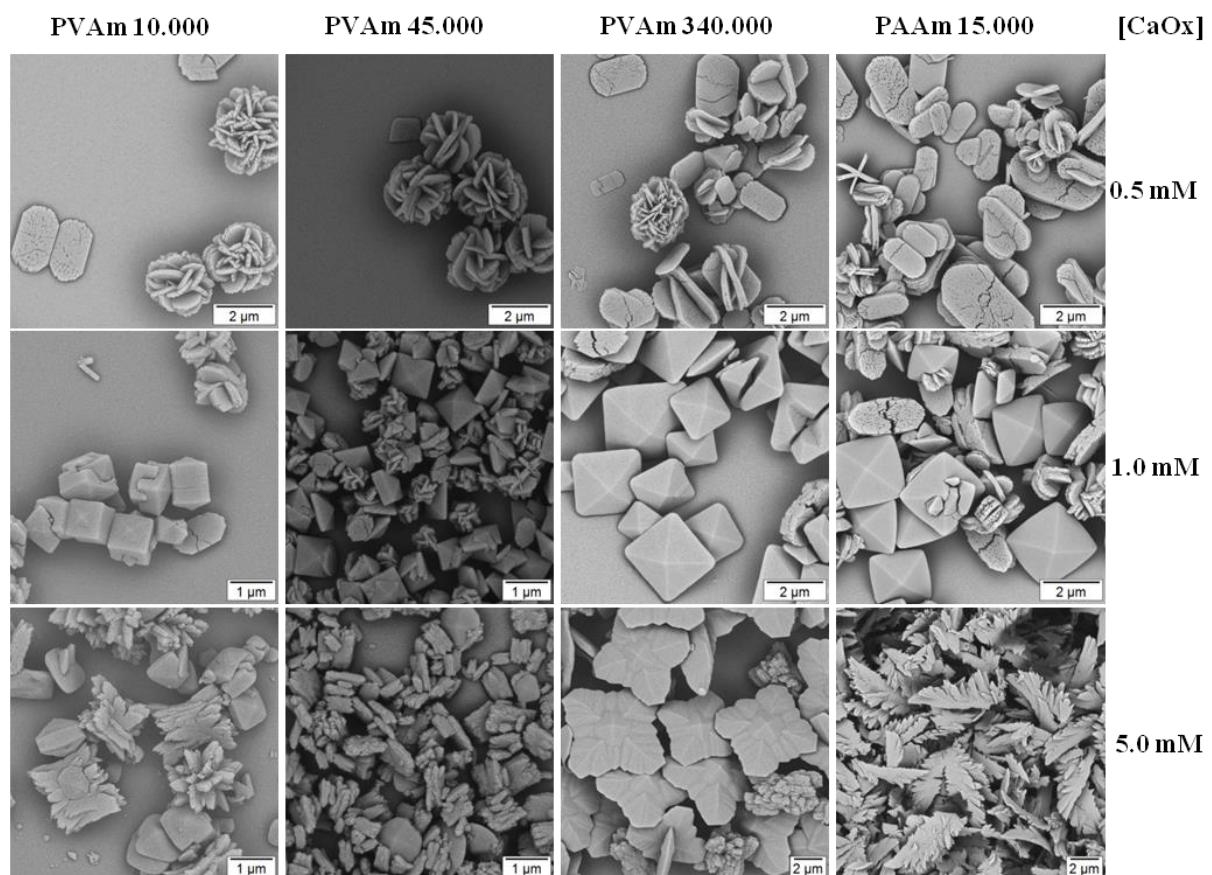
Abbildung B.3) ist zu erkennen, dass die Menge der tetragonalen Bipyramiden mit zunehmender Kettenlänge abnimmt und bei höherer Kettenlänge demnach mehr COM vorherrscht, sodass bei einer Kristallisation mit PVAm 340.000 fast nur noch COM-Kristalle vorliegen. Ein weiterer Trend zeigt, dass mit zunehmender Kettenlänge die Größe der Partikel zunimmt. Mit zunehmender Polymerkonzentration wird in den SEM Aufnahmen deutlich, dass die Menge an tetragonalen Bipyramiden und damit die COD Phase zunimmt und weniger COM vorliegt. Eine genauere Betrachtung der Kristallisation mit PVAm 10.000 lässt erkennen, dass sich die tetragonalen Bipyramiden aus COD gestreckt haben und als bipyramidale Prismen vorliegen. Damit hat ein Wachstum in die  $\langle 001 \rangle$  Richtung entlang der (101) Fläche stattgefunden. Nimmt die Konzentration der Polymere weiter zu, lässt sich dieses Verhalten auch bei den Polymeren mit größeren Molmassen beobachten. Bei einer Konzentration von 10 mM PVAm 45.000 bzw. von 25 mM PVAm 340.000 ist die dominante prismatische (100) Fläche festzustellen. Das heißt, eine Zunahme der PVAm Konzentration ergibt eine Streckung der tetragonalen Bipyramiden entlang der  $c$ -Achse und daraus resultiert die dominante (100) Fläche. Erklären lässt sich das Wachstum entlang der  $c$ -Achse mit der Adsorption des Polymers an der (100) Fläche. Die kationischen Polymere adsorbieren durch die elektrostatische Wechselwirkung mit den Oxalat-Ionen bevorzugt an der (100) Fläche.



**Abbildung 6.17** SEM Aufnahmen der Morphologie von CaOx Kristallen in Gegenwart von verschiedenen Polyaminen mit unterschiedlichen Konzentrationen und jeweils 2.0 mM CaOx.

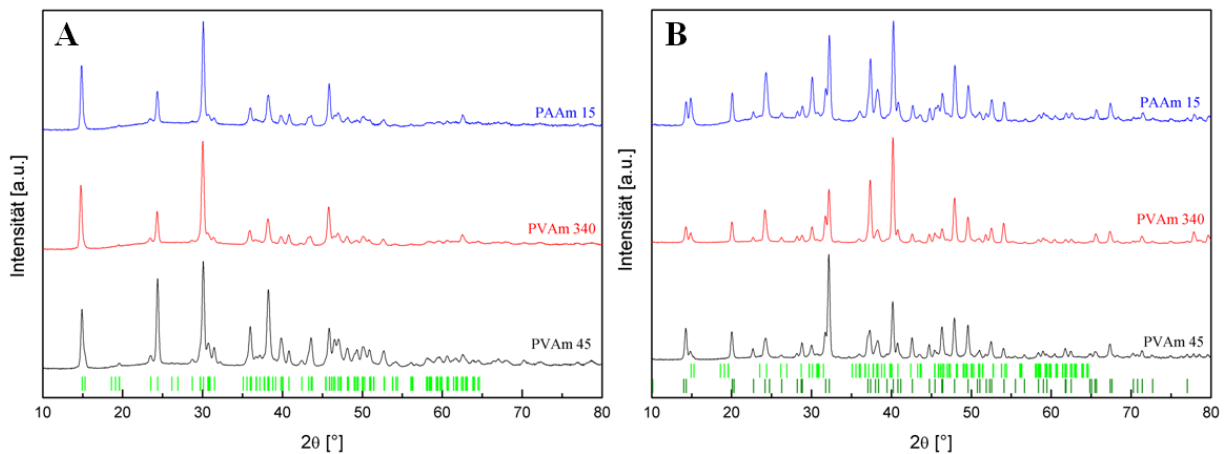
## *Einfluss der Calciumoxalat-Konzentration*

In Abbildung 6.18 wird offensichtlich, dass eine Variation der Calciumoxalat-Konzentration (0.5, 1.0, 5.0 mM) bei einer Polymerkonzentration von 1 mM einen Einfluss auf die Morphologie und die Phasenstruktur der CaOx Kristalle hat. Liegt eine CaOx-Konzentration von 0.5 mM vor, kann bei Anwesenheit aller Polymere in den SEM Aufnahmen in Abbildung 6.18 beobachtet werden, dass sich ovale, plättchenförmige Kristalle aus CaOx gebildet haben, die an vielen Stellen auch verzwilligt, in Form von Rosetten, vorliegen. Anhand des Pulverdiffraktogramms in Abbildung 6.19 kann festgestellt werden, dass es sich dabei um Kristalle aus COM handelt. Eine Zunahme der CaOx-Konzentration auf 1 mM reicht aus, damit neben der CaOx-Monohydrat Phase auch die Dihydrat Phase vorliegt, was sich in den Aufnahmen durch die tetragonalen Bipyramiden, bzw. bei geringerer Polymerkettenlänge durch bipyramidale Prismen widerspiegelt.



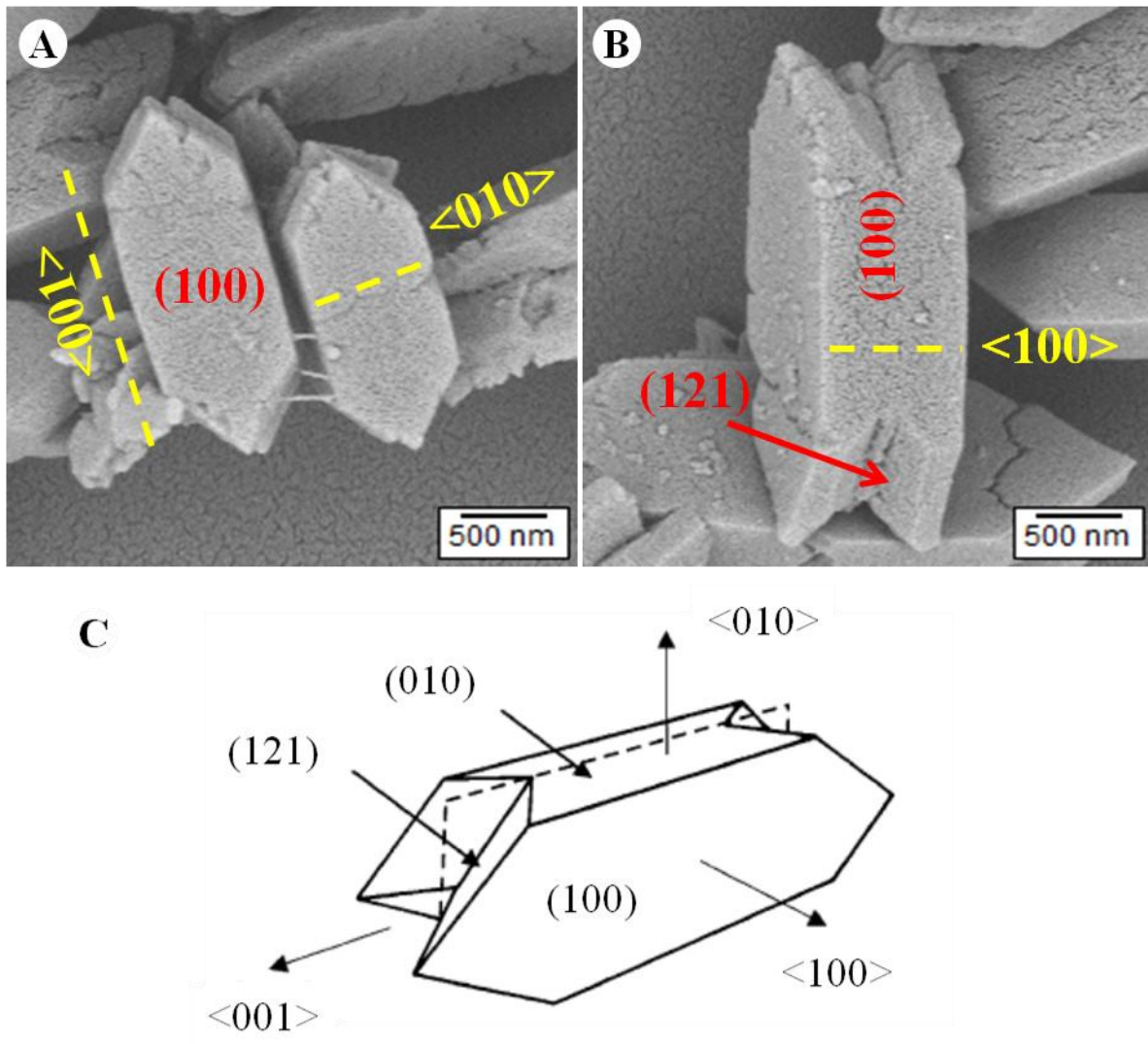
**Abbildung 6.18** SEM Aufnahmen der Morphologie von CaOx Kristallen in Gegenwart von verschiedenen Polyaminen mit unterschiedlichen CaOx-Konzentrationen und jeweils 1.0 mM Polymer.

Mit deutlich erhöhter CaOx-Konzentration von 5 mM zeigt sich, dass wieder mehr COM als COD vorliegt. Der Grund hierfür ist, dass mit zunehmender CaOx-Konzentration das Verhältnis CaOx zu Polymer abnimmt und daher verhältnismäßig deutlich mehr CaOx vorliegt. Dadurch liegt weniger Polymer vor, das an der (100) Fläche der COD Kristalle adsorbieren kann.



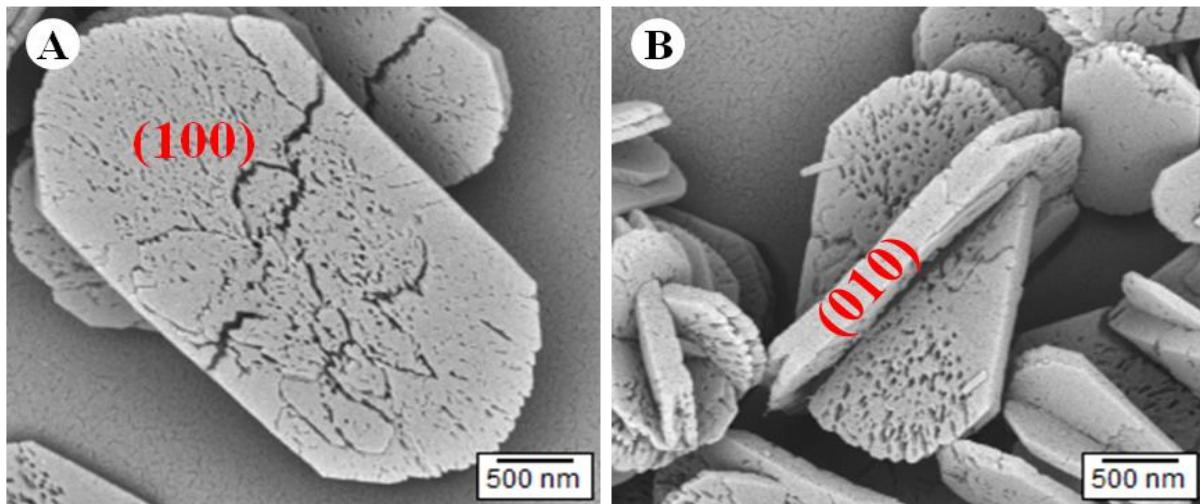
**Abbildung 6.19** Pulverdiffraktogramm von CaOx in Gegenwart von verschiedenen Polyaminen mit unterschiedlichen CaOx-Konzentrationen. (A) 0.5, (B) 1.0 mM CaOx mit 1 mM Polymer. Obere Referenzwerte sind Reflexe für COM (JCPDF 1-75-1313), untere für COD (JCPDF 1-75-1314)

Betrachtungen der CaOx-Konzentration von 0.5 mM in Abwesenheit eines Polymers sind in Abbildung 6.20 dargestellt. Bei den COM-Kristallen handelt es sich um monokline Penetrationszwillinge mit einer (100) Zwillings Ebene senkrecht zur  $\langle 100 \rangle$  Richtung. Die Kristalle haben entwickelte (100), (010) und (121) Flächen, mit den Hauptwachstumsrichtungen  $\langle 100 \rangle$ ,  $\langle 010 \rangle$  und  $\langle 001 \rangle$  (siehe auch Abbildung 6.20). Ist dagegen 1 mM des Polymers anwesend, werden, wie in Abbildung 6.21 A+B, aus den Kristallen flache Plättchen mit einer ausgeprägten (100) Fläche, einer dünner werdenden (010) Fläche und mit abgerundeten Enden. Daraus folgt, dass das Polymer bevorzugt an der (100) Kristallfläche adsorbiert und damit das Wachstum entlang der  $\langle 100 \rangle$  Richtung inhibiert. Durch die Inhibierung dieser Flächen nimmt das Wachstum entlang der  $\langle 010 \rangle$  Fläche zu.



**Abbildung 6.20** (A+B) Kristallisation von 0.5 mM CaOx ohne Polymerzusatz. Die in rot dargestellten Zahlen geben die Wachstumsflächen, gelb die Wachstumsrichtungen an. (B) Perspektivische Ansicht von Kristallflächen und Wachstumsrichtung von Calciumoxalat Monohydrat Penetrations-Kristallen. Die gestrichelte Linie deutet die Zwillingssebene an.<sup>[143]</sup>

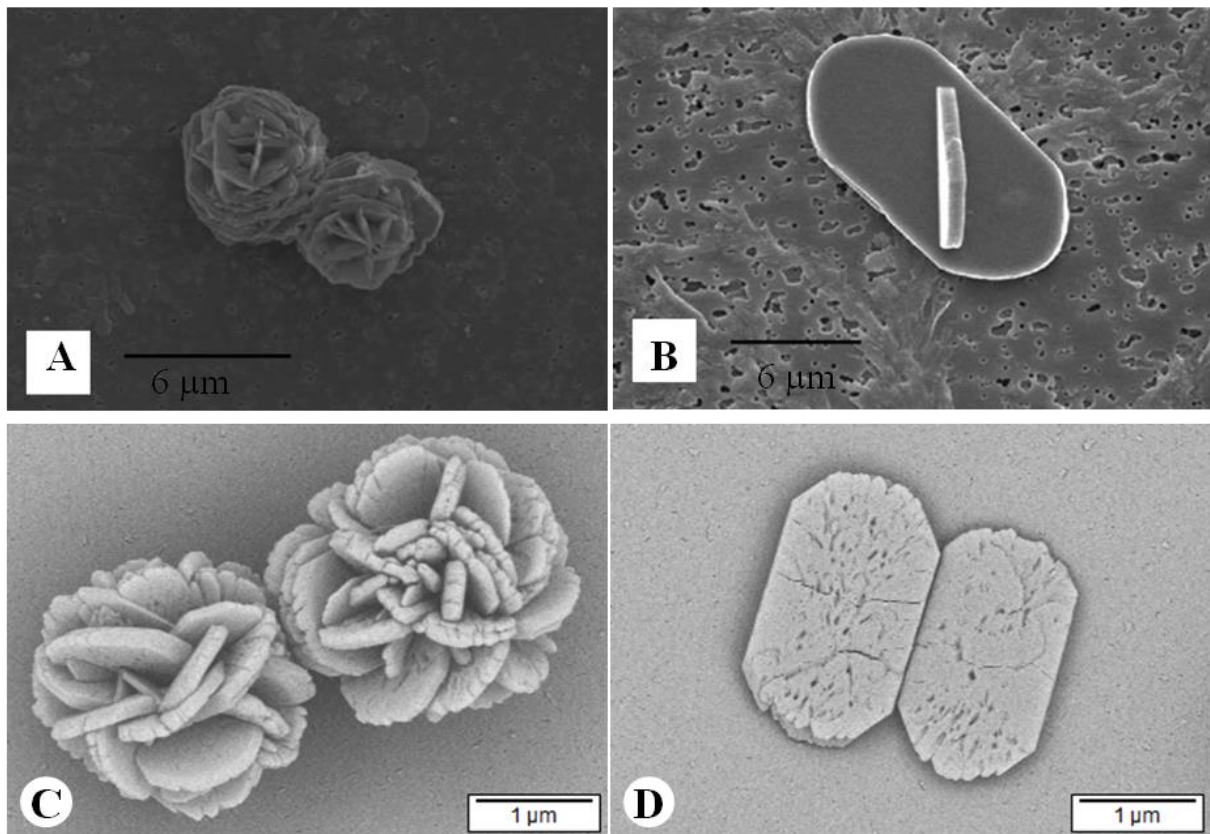




**Abbildung 6.21** Einfluss von Polyaminen auf das Wachstum von Calciumoxalat Monohydrat Kristallen (A+B) mit 1 mM PAAm und 0.5 mM CaOx.

In anderen Studien konnten ähnliche Morphologien in Anwesenheit von COM gefunden werden.<sup>[61,96,143-146]</sup> Grohe *et al.*<sup>[61]</sup> führten Untersuchungen der CaOx Kristallisation in Anwesenheit von Citraten durch. Citrate sind im Urin natürlich vorkommende Verbindung, die bekannt für ihren hemmenden Einfluss auf die Harnsteinbildung sind. Sie konnten ebenfalls eine Inhibierung der (100) Fläche, aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung mit der  $\text{Ca}^{2+}$  reichen Fläche der COM-Kristalle und der Carboxylaten des Citrats feststellen. Auch Studien mit phosphorylierten Osteopontin Peptiden zeigten eine bevorzugte Adsorption an der (100) Fläche.<sup>[144]</sup>

Ein Blick in die Natur zeigt, dass die hier gefundene Morphologie bei 0.5 mM CaOx und 0.1 mM Polyamin auch natürlich auftreten. Im oberen Teil von Abbildung 6.22 sind natürlich vorkommenden COM-Kristalle aus den Harnsteinen von Mäusen dargestellt,<sup>[147]</sup> die eine flache plättchenartige Form besitzen. Ein Vergleich dazu ist in Abbildung 6.22 unten gezeigt, wobei es sich um synthetisch hergestellte Kristalle handelt. Neben der plättchenförmigen Gestalt neigen beide Kristalle, dazu Rosetten zu bilden. Wie bei der synthetischen Herstellung der Kristalle, sind auch bei der Harnsteinbildung viele Additive, wie beispielsweise bereits oben erwähnt Citrate oder Osteopontine, anwesend, die einen starken Einfluss auf die Morphologie der gebildeten Kristalle haben.

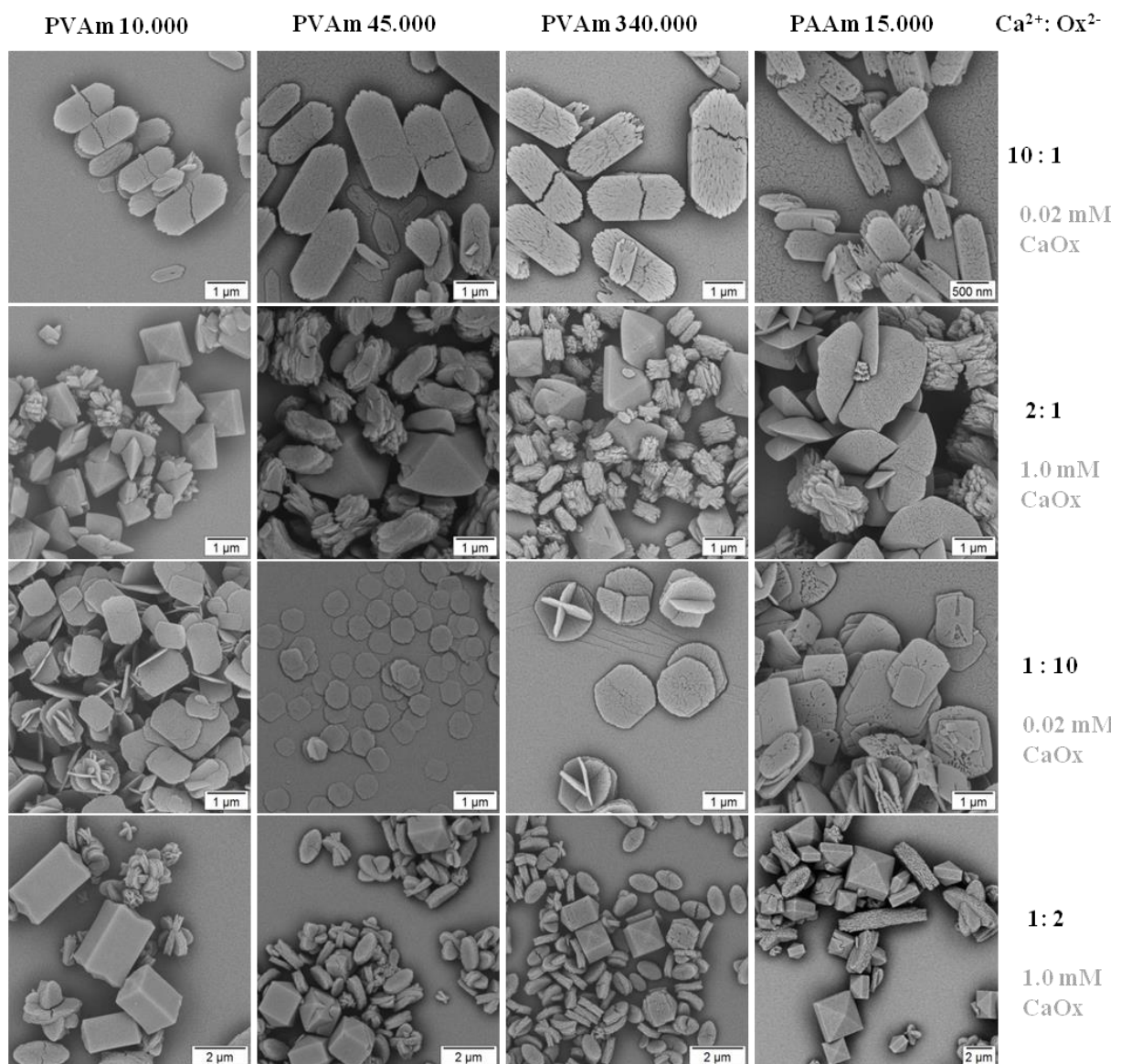


**Abbildung 6.22** SEM Aufnahmen von (A+B) Calciumoxalat Monohydrat Kristallen aus Harnsteinen von Mäusen behandelt mit Glyoxylat,<sup>[147]</sup> (C+D) synthetisch mit PVAm 10.000 hergestellte COM-Kristalle.

#### *Einfluss des Verhältnisses von Calcium zu Oxalat*

Eine Serie von Experimenten wurde durchgeführt, um den Einfluss des molaren Calcium zu Oxalat Verhältnisses zu ermitteln. In Abbildung 6.23 wurde mit einem Überschuss an Calcium bzw. Oxalat bei verschiedenen CaOx-Konzentrationen gearbeitet. Liegt neben einer geringen Konzentration von CaOx mit 0.02 mM ein zehnfacher Überschuss an Calcium-Ionen vor, werden wie bei der geringen CaO-Konzentration in Abbildung 6.21, plättchenförmige COM-Kristalle in Form von Penetrationszwillingen gebildet. Auch kann von einer bevorzugten Adsorption der (100) Fläche ausgegangen werden. Wird hingegen bei der 0.02 mM CaOx-Konzentration Oxalat im zehnfachen Überschuss eingesetzt, zeigt sich, dass ebenfalls flache plättchenförmige Kristalle aus COM gebildet wurden. Einschließlich der blockierten  $\langle 100 \rangle$  Wachstumsrichtung und der abgerundeten Enden ist ein scheinbarer Verlust der ZwillingsEbene und eine planare (010) Fläche zu beobachten. Es gibt zwei mögliche Gründe, die dieses Wachstumsverhalten erklären könnten;<sup>[61]</sup> zum einen die starke Hemmung der  $\langle 100 \rangle$  Wachstumsrichtung, was zum Ausdünnen der Kristallen und dem

scheinbaren Verlust der Zwillingsene führen kann; zum anderen könnte eine Unterbrechung in der Entwicklung der (121) Fläche zum Abnehmen der  $\langle 001 \rangle$  Richtung und damit zu runden Enden führen. Sobald die Konzentration an CaOx erhöht und der Überschuss an Oxalat geringer wurde, liegt nicht mehr nur ausschließlich COM vor. In den SEM Aufnahmen ist zu erkennen, dass neben den COM-Kristallen auch COD Kristalle als tetragonale Bipyramiden bzw. bipyramidale Prismen gebildet wurden. Der gleiche Effekt ist auch bei einem Überschuss von Calcium-Ionen bei einer CaOx-Konzentration von 1.0 mM zu beobachten.

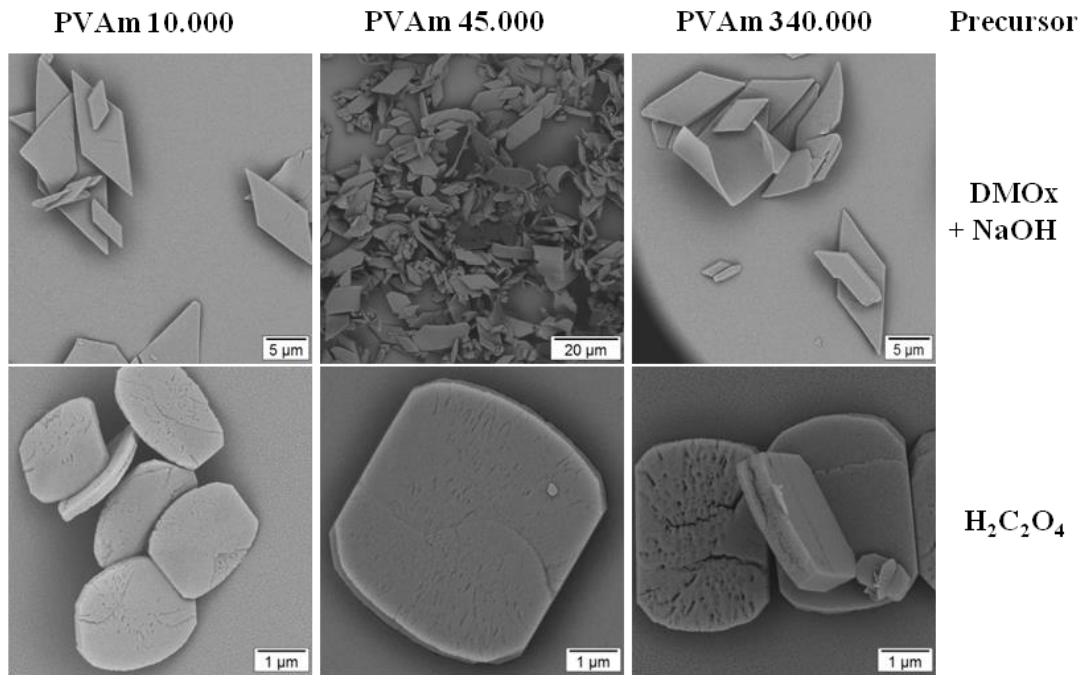


**Abbildung 6.23** SEM Aufnahmen der Morphologie von CaOx Kristallen mit 1 mM Polymer bei verschiedenen Calcium zu Oxalat Verhältnissen und verschiedenen CaOx-Konzentration.

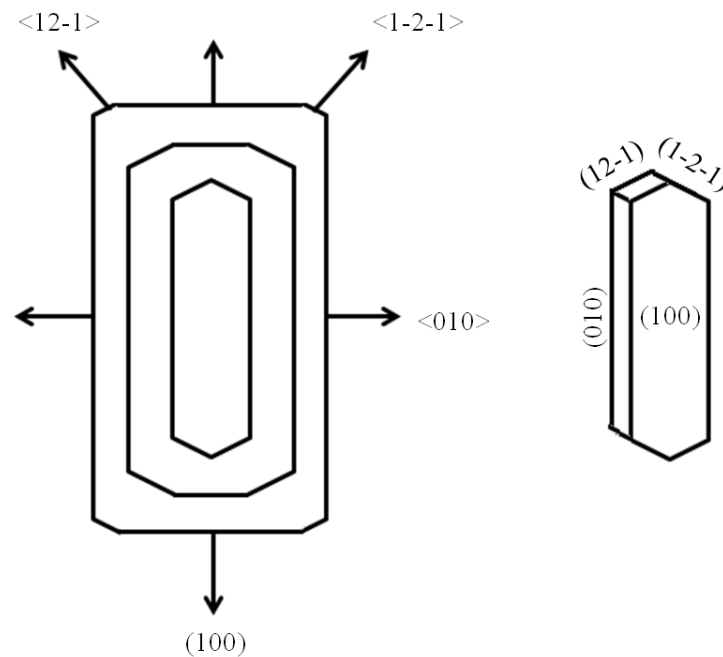
### *Einfluss der anionischen Ausgangsverbindung*

Wird die anionische Ausgangsverbindung Natriumoxalat ausgetauscht durch die Ausgangsverbindung Dimethyloxalat, sind die Oxalat-Ionen nicht mehr direkt verfügbar, sondern müssen durch eine Verseifung mit Natriumhydroxid freigesetzt werden. Es handelt sich demnach um eine *in situ* Fällungsreaktion von CaOx. Da in einem nicht gepufferten System bei einem pH von 8 gearbeitet wurde, ist durch die Zugabe der NaOH eine starke Veränderung des pH-Werts zu erwarten. In Gegenwart von PVAm zeigt sich, dass bei einem pH-Wert von etwa 11 kein Einfluss des Polymers festzustellen ist, da dieselbe Morphologie erhalten wird, die in Abwesenheit eines Additivs (siehe Abbildung B 4) gebildet wurde. Parallelogrammartige Formen aus COM sind vorzufinden. Zum einen liegen die Polymere bei einem pH von 11 in einem neutralen Ladungszustand vor, so dass keine starke Wechselwirkungen zwischen den Oxalat-Ionen und dem Polymer zu erwarten sind. Zum anderen ist die CaOx-Konzentration im alkalischen so übersättigt, dass dadurch die Kristallisation von CaOx beschleunigt wird und das Polymer keine Zeit mehr hat einen Einfluss auf die Fällung zu nehmen. Anders verhält sich die Kristallisation beim Austausch von Natriumoxalat gegen Oxalsäure. Da die Oxalsäure eine starke Säure ist, findet die Kristallisation bei einem deutlich tieferen pH Wert von 3 statt. Mithilfe der basischen Polyamine wird die Oxalsäure deprotoniert und daher ist ein weiterer basischer Zusatz zur Deprotonierung nicht notwendig. In Abbildung 6.24 ist zu erkennen, dass sich fast die gleichen flachen plättchenförmigen Kristalle aus COM gebildet haben, wie bei der geringen Calciumoxalat-Konzentration von 0.5 mM (Abbildung 6.21) oder beim Überschuss von Oxalat in Abbildung 6.24. Das kann folgenden Grund haben: Die Morphologie und der Hydrationszustand von Kristallen werden durch die Übersättigung beeinflusst, die mit geringerem pH Wert abnimmt. Daher wird bei einer geringeren Übersättigung das thermodynamisch stabile COM bevorzugt. Die geringere Übersättigung, aufgrund des niedrigeren pH Wertes, ist vergleichbar mit der 0.5 mM CaOx-Konzentrationsprobe, wo ebenfalls eine geringere Übersättigung vorliegt. Auch hier kann von einer Inhibierung der (100) Fläche gesprochen werden. Des Weiteren ist, wie in Abbildung 6.25 ein stärkeres Wachstum in die <010> Richtung zu beobachten. Durch den erniedrigten pH Wert liegen die Polymere deutlich protonierter vor; daraus folgt, dass die Polymere nochmals stärker mit der (100) Fläche adsorbieren und durch diese Inhibierung ein verstärktes Wachstum in die <010> Richtung festgestellt werden kann.





**Abbildung 6.24** SEM Aufnahmen der Morphologie mit verschiedenen anionischen Vorläufern, 2 mM CaOx und 1 mM Polymer.



**Abbildung 6.25** Schematische Darstellung der Transformation der Morphologie einer länglichen hexagonalen Plättchenmorphologie (rechts) zu fast rechteckigen CaOx Kristallen (links). Durch die Adsorption der Polymere an der (100) Fläche ist ein bevorzugtes Wachstum in Richtung  $\langle 010 \rangle$ ,  $\langle 12-1 \rangle$  und  $\langle 1-2-1 \rangle$  festzustellen (links), was zu einer Zunahme der (100) Fläche führt.

## 6.4 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit hat sich gezeigt, dass die Polymerkonzentration von Polyvinylphosphonsäure bzw. verschiedenen Polyaminen, die CaOx-Konzentration, das Verhältnis Calcium zu Oxalat oder auch die Temperatur eine bedeutsame Rolle auf das Kristallwachstum, die Kontrolle der Morphologie und der Phasenstruktur von CaOx-Partikeln spielen. In Gegenwart von Polyvinylphosphonsäure konnten verschiedene Morphologien wie tetragonale Bipyramiden aus COD, hantelförmige Subkristalle aus COD-Kristallen oder auch gestreckte bipyramidale Prismen beobachtet werden. Eine Temperaturerhöhung auf 100 °C zeigte, dass sich nadelförmige COM-Kristalle gebildet haben, die vergleichbar mit den Raphiden aus der Pflanzenwelt sind. Aber auch mit Polyaminen konnte eine Varianz in der Phasenstruktur und Morphologie festgestellt werden. So wurden bei geringer CaOx-Konzentration flache, plättchenförmige COM-Kristalle beobachtet, die sehr stark an die CaOx-Kristalle in Nierensteinen erinnern. Höhere Konzentrationen der Polyamine führten zur Bildung des metastabilen COD, in Form von tetragonalen Bipyramiden mit einer dominierenden (101) Fläche, die sich mit zunehmender Polymerkonzentration zu bipyramidalen Prismen streckten und mit der dominierenden (100) Fläche vorlagen.

In dieser Arbeit konnten Morphologien gefunden werden, die starke Ähnlichkeit mit CaOx-Kristallen aus der Natur bzw. der Pathologie aufweisen. Diese Ergebnisse können dazu dienen, weiteren Aufschluss über den Bildungsmechanismus der Biomineralisation zu erhalten und können möglicherweise dienlich in der Medizin bei der Erforschung der Inhibierung von Nierensteinen sein.

# 7

## Amorphes Calciumoxalat

### 7.1 Einleitung

Calciumoxalat ist ein wichtiges Biomineral, das in vielen lebenden Organismen weitverbreitet vorkommt. Besonders in Pflanzen werden Kristalle mit einzigartigen Morphologien unter Standardbedingungen gebildet. Neben den Pflanzen tritt Calciumoxalat auch besonders häufig in Nierensteinen auf. In wässrigen Medien sind drei Hydratformen des Calciumoxalats bekannt, das thermodynamisch stabile Monohydrat und die beiden metastabilen Dihydrat und Trihydrat.

#### *Bildung von amorphen Strukturen am Beispiel von Calciumcarbonat*

Ein weiteres sehr bekanntes calciumhaltiges Biomineral ist Calciumcarbonat, das die Grundlage für die Skelettstütze in Meeresorganismen wie den Weichtieren und den Krebstieren liefert oder auch zum Schutz in der Hülle von Vogeleiern vorkommt.<sup>[148]</sup> Calciumcarbonat ist wohl die am bestuntersuchtete calciumhaltige Verbindung. Von Calciumcarbonat sind drei wasserfreie Polymorphe bekannt, Calcit, Aragonit und Vaterit.<sup>[149,150]</sup> Empirisch betrachtet verläuft die Kristallisation von Calciumcarbonat nach der Ostwald'schen Stufenregel sequenziell über die metastabilen Phasen. Amorphes Calciumcarbonat dient häufig als Vorläufer für die wasserfreien Modifikationen.<sup>[13]</sup> Es weist weder diskrete Röntgen- noch Elektronenbeugungsmuster auf und wird auch als nichtkristallin bezeichnet. Unter physiologischen Bedingungen ist ACC in reiner Form instabil und wird in Anwesenheit von Wasser oder durch Erhitzen über 300 °C zu Calcit

## AMORPHES CALCIUM OXALAT

umgewandelt. Ungeachtet seiner Instabilität nimmt das ACC auch in der Biomineralisation, insbesondere bei den wirbellosen Tieren<sup>[151]</sup> eine bedeutsame Rolle ein. So dient es bei Regenwürmern<sup>[152,153]</sup> oder Gliederfüßern<sup>[154]</sup> als Reservoir für Calcium und Carbonat oder bei anderen Lebewesen als Vorstufe für die kristallinen Calciumcarbonat-Polymorphe.<sup>[155-157]</sup> Biogenes ACC wird zumeist in Gegenwart von anorganischen und organischen Substanzen, sowie in Anwesenheit von Strukturwasser gebildet. All diese Substanzen tragen zur Stabilisierung und Kontrolle der Kristallisationskinetik des ACC bei.<sup>[151]</sup> Diese Eigenschaften haben sich Forscher zur Laborsynthese von ACC zu Nutze gemacht und mehrere Syntheserouten zur Herstellung und Stabilisierung von ACC gewählt. So konnte die ACC Phase durch das gezielte Einsetzen von Zusätzen, wie beispielsweise Polyacrylsäure,<sup>[158]</sup> Polyasparaginsäure<sup>[146]</sup>, Phosphat-Ionen oder Magnesium-Ionen<sup>[159]</sup> stabilisiert werden.<sup>[160]</sup> Aber auch ohne Hilfe von Additiven sind verschiedene Wege bekannt, ACC zu stabilisieren. Bei der Fällung aus hoher Übersättigung entsteht ACC<sup>[161-164]</sup>, das keine klare Nahordnung aufweist. Faatz *et al.*<sup>[165,166]</sup> konnten ACC im wässrigen Medium durch kontrollierte *in situ* Erzeugung von Carbonat durch alkalische Hydrolyse von Dimethylcarbonat in Gegenwart von Calcium-Ionen darstellen. Ein weiterer Ansatz ist die Synthese von ACC außerhalb des wässrigen Mediums, in einem organischen Lösungsmittel wie Ethanol, um somit die Löslichkeit des ionischen Feststoffes CaCO<sub>3</sub> zu reduzieren.<sup>[167]</sup>

Im Gegensatz zu ACC ist über amorphes Calciumoxalat (ACO) bisher nur sehr wenig bekannt. ACO wurde bisher im Endosperm der *Virburmum* Pflanze (Pflanzengattung Schneeball), vermutlich in Harnsteinen<sup>[168]</sup> und 1956 bei der Bierbrauerei entdeckt.<sup>[169,170]</sup> In der Literaturrecherche konnten jedoch keine Informationen über die synthetische Herstellung von ACO ermittelt werden. Um weiter die Bildung von calciumbasierten Biomineralien und den eigentlichen Kristallisationsmechanismus von Calciumoxalat zu verstehen, war das Ziel der vorliegenden Arbeit amorphes Calciumoxalat herzustellen. So könnte durch die chemische Synthese von amorphem Calciumoxalat als Intermediat, Aufschluss über die Bildung komplexer Biomineralien in lebenden Systemen erhalten werden, unabhängig von der zugrundeliegenden Kristallstruktur des endgültigen Polymorphs.



## 7.2 Experimentelles

### 7.2.1 Reagenzien und Chemikalien

Die Chemikalien Calciumchlorid Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich,  $\geq 99\%$ ), Dimethyloxalat ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{O}_4$ , Sigma Aldrich, 99%), Natriumhydroxid (NaOH, 1.0 N, Acros Organics), Natriumoxalat ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , Sigma Aldrich,  $\geq 99,5\%$ ) und die Lösungsmittel Ethylenglykol ( $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ , Sigma Aldrich, 99%), Ethanol absolut ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , VWR, p.a. 99.9%) wurden wie erworben eingesetzt. Beim Einsatz von Wasser wurde nur mit MilliQ-Wasser, mit einem Widerstand von  $18.2 \Omega$ , gearbeitet

### 7.2.2 Synthesevorschrift von amorphem Calciumoxalat

In einem 100 mL Kolben wurden 0.1 mmol Calciumchlorid Dihydrat und 0.1 mmol Dimethyloxalat in 50 mL absolutem Ethanol bei Raumtemperatur gelöst. Durch Zugabe einer 0.2 mmol ethanolischen Natriumhydroxid Lösung wurde die Reaktion unter kontinuierlichem Rühren gestartet. Das Präzipitat wurde zentrifugiert ( $9000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ , 20 min) und mehrfach mit Ethanol gewaschen. Das daraus erhaltene Gel wurde für 24 Stunden am Feinvakuum getrocknet. Zum Vergleich wurde eine Referenzprobe mit den gleichen Vorbereitung jedoch mit einer wässrigen  $\text{CaCl}_2$  und DMOx Lösung hergestellt.

### 7.2.3 Charakterisierung

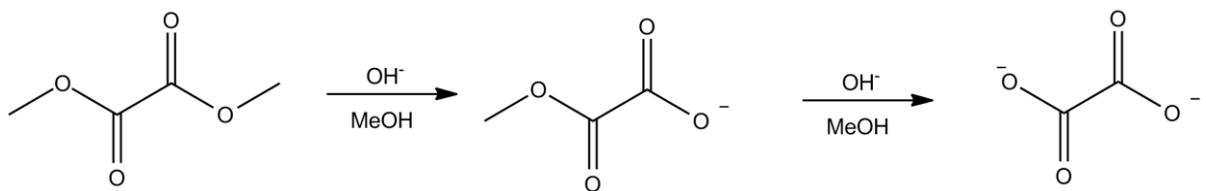
Die Ausbeute wurde gravimetrisch bestimmt. Die Partikel wurden mit verschiedenen Methoden wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben untersucht. Es wurden Rasterelektronenmikroskopie (SEM), FT-IR- und FT-Raman-Spektroskopie, Röntgenbeugung und  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR durchgeführt. Die thermische Transformation wurde mit Hilfe der thermogravimetrischen Analyse (TGA) und der dynamische Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, DSC) untersucht.

## 7.3 Ergebnis und Diskussion

## 7.3.1 Amorphes Calciumoxalat mit Dimethyloxalat

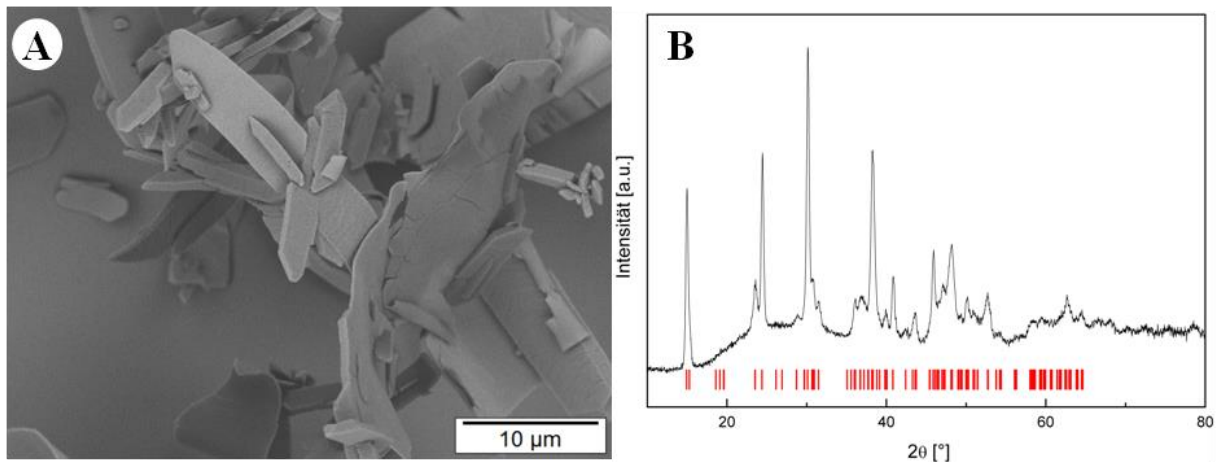
*Syntheseroute des amorphen Calciumoxalats*

Die Synthese von amorphem Calciumoxalat wurde anlehnend an die Fällungsmethode nach Faatz-Wegner<sup>[165,166]</sup> für  $\text{CaCO}_3$  durchgeführt. Hier wurde amorphes  $\text{CaCO}_3$  durch basische Hydrolyse von Dimethylcarbonat in Anwesenheit von Calciumchlorid hergestellt. Vorteil dieser Methode ist, dass ACC kontrolliert und homogen in Lösung entsteht und dass es nicht durch hohe Übersättigung spontan zur heterogenen ACC-Bildung kommt.



**Abbildung 7.1** Alkalische Hydrolyse von Dimethyloxalat durch Natriumhydroxid.

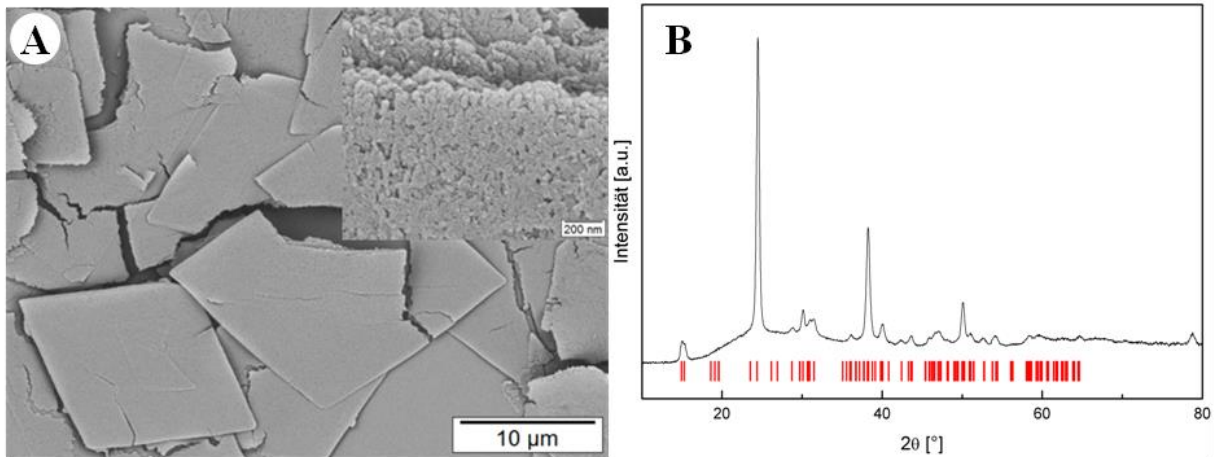
Angewendet auf den Oxalsäuredimethylester werden wie in Abbildung 7.1 Oxalat-Ionen *in situ* durch die alkalische Hydrolyse mittels Natriumhydroxid kontrolliert, unter Freisetzung von Methanol, gebildet. Die so in zwei Stufen entstandenen Oxalat-Ionen können anschließend mit den Calcium-Ionen zu Calciumoxalat ausgefällt werden. Wird die Fällung nun im wässrigen Medium durchgeführt, ist nach Zugabe von NaOH nach ca. 1-2 Minuten eine eintretende Trübung zu beobachten. Ein feiner weißer Niederschlag, wie in Abbildung 7.4, entsteht, der sich ohne Rühren direkt am Boden absetzt. Um eine mögliche Transformation von ACO zur kristallinen Form zu unterbinden, wurde das gefällte Produkt nach 3 Minuten abzentrifugiert und nach der Reinigung in Wasser, getrocknet. Mittels Röntgenpulverdiffraktometrie in Abbildung 7.2 B, konnte jedoch festgestellt werden, dass es sich nicht um ACO, sondern um das kristalline CaOx Monohydrat handelt. In den SEM-Aufnahmen in Abbildung 7.2 A ist das gefällte Produkt dargestellt. Hierbei wird ebenfalls deutlich, dass sich große längliche plättchförmige CaOx-Kristalle gebildet haben.



**Abbildung 7.2** (A) SEM Aufnahme der Fällung von CaOx mittels basischer Hydrolyse von DMOx im wässrigen Milieu. (B) Pulverdiffraktogramm mit Referenzreflexen (JCPDS 1-75-1313).

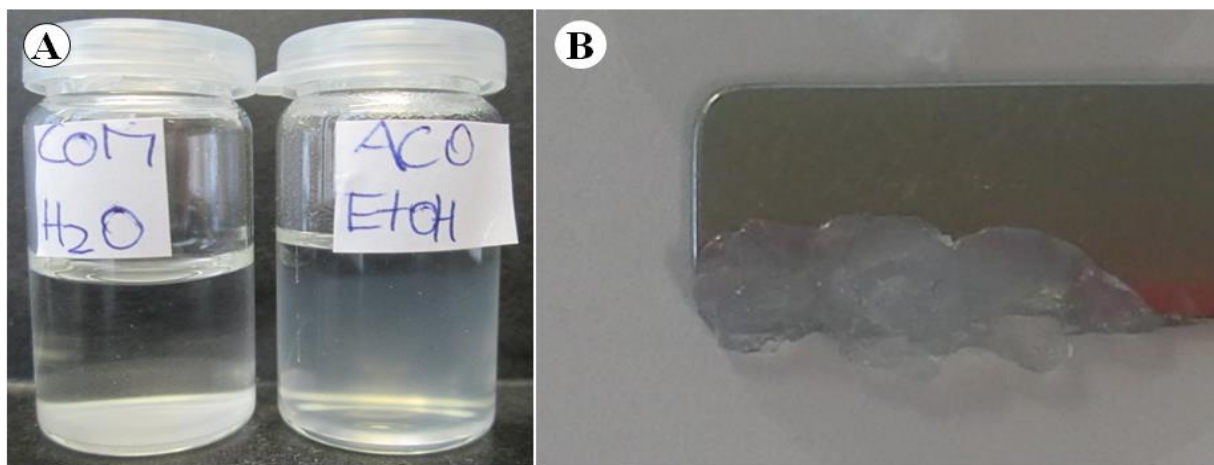
Im wässrigen Milieu wird die Umwandlung vom instabilen amorphen Zustand durch Auflösen und Wiederausfällen in die kristalline Phase begünstigt.<sup>[171-173]</sup> Um diesen Prozess zu vermeiden, wurde die Fällung in einem zweiten Ansatz statt im wässrigen Milieu in einem organischen Lösungsmittel wie Ethylenglykol durchgeführt. In den SEM Aufnahmen in Abbildung 7.3 A ist zu beobachten, dass große rautenförmige Blattstrukturen erzeugt wurden. In einer näheren Aufnahme wird deutlich, dass diese Strukturen aus mehreren Schichten und vielen kleinen Kristallen bestehen. Aber auch in diesem Fall wird mithilfe der Pulverdiffraktometrie klar, dass es sich um die einphasige, kristalline Calciumoxalat Monohydrat Variante handelt. Da es in Ethylenglykol als Lösungsmittel nicht möglich war ACO herzustellen, wurde ein weiteres, nicht wässriges System ausgetestet. Dabei fiel die Wahl auf Ethanol, da Ethanol insbesondere im Falle von Calciumcarbonat dafür bekannt ist, die amorphe Phase zu stabilisieren.<sup>[173]</sup> In weiteren Studien wurden auch Fällungsexperimente von CaCO<sub>3</sub> in Ethanol durchgeführt, die zu ACC führten.<sup>[167,174-176]</sup>

## AMORPHES CALCIUM OXALAT



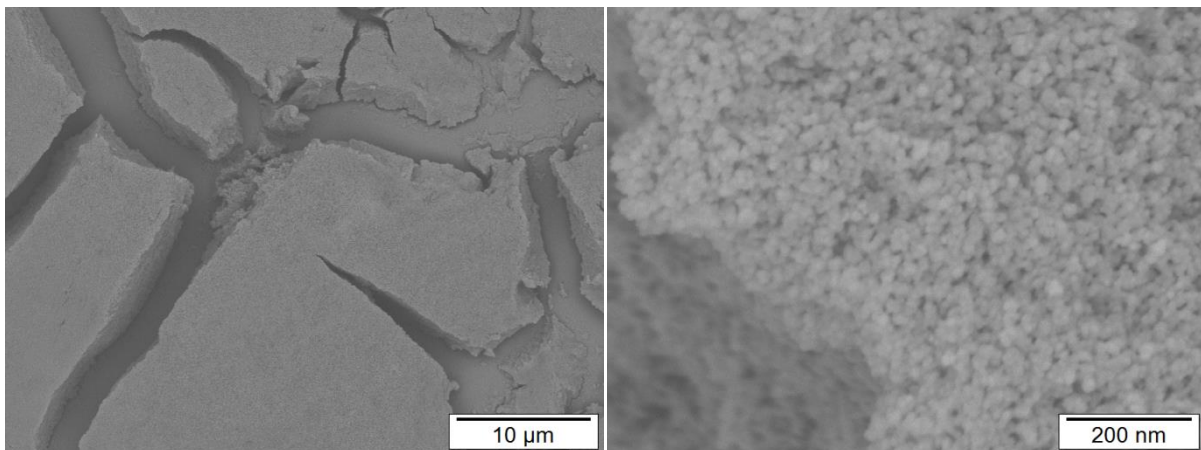
**Abbildung 7.3** (A) SEM Aufnahme der Fällung von CaOx mit CaCl<sub>2</sub> und DMOx in Ethylenglykol. (B) Pulverdiffraktogramm mit Referenzreflexen für COM (JCPDS 1-75-1313).

Zur Fällung in Ethanol wurde zu einer 2 mM CaCl<sub>2</sub> und einer 2 mM DMOx Lösung eine 4 mM ethanolische NaOH Lösung zugegeben. Die NaOH-Konzentration verhält sich stöchiometrisch zur DMOx-Konzentration, da von einem zweifachen Hydrolysevorgang wie in Abbildung 7.1 ausgegangen wird. Nach Zugabe der Base wurde nach 1-2 Minuten eine feine gelartige, milchige Suspension beobachtet, die sich im Gegensatz zur Suspension im wässrigen Medium, wie in Abbildung 7.4 A, nur langsam absetzte. Nach dem Zentrifugieren der gefällten Substanz konnte ein transparenter gelartiger Niederschlag wie in Abbildung 7.4 B festgestellt werden. Anschließend wurde die Probe im Feinvakuum getrocknet und ein grobkörniger Feststoff wurde erhalten. Im Vergleich dazu konnte bei der Kristallisation im wässrigen Medium nach dem Trocknen eine feine weiße Substanz beobachtet werden.



**Abbildung 7.4** (A) Vergleich der gefällten Probe in Wasser und Ethanol. (B) Transparenter gelartiger Niederschlag der gefällten Probe in Ethanol.

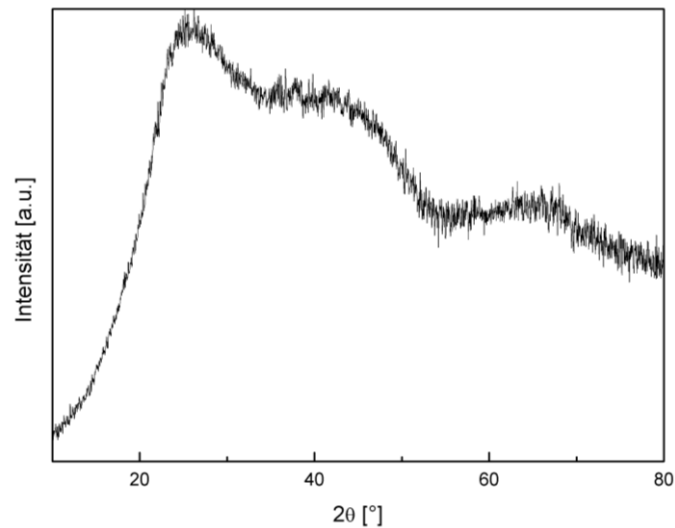
In den SEM-Aufnahmen in Abbildung 7.5 zeigt sich auf den ersten Blick, dass sich eine Art gerissener Film gebildet hat. Bei näherer Betrachtung und anhand von Messungen mittels Lichtstreuung wird dabei deutlich, dass sich kleine sphärische Partikel im Größenbereich zwischen 10 und 20 nm geformt haben. Bei der Synthese von ACC werden ebenfalls kleine sphärische Partikel erhalten,<sup>[177]</sup> die jedoch größer erscheinen.



**Abbildung 7.5** SEM Aufnahme von CaOx gefällt in ethanolischer Lösung.

#### *Röntgenspezifische Untersuchung des ACOs*

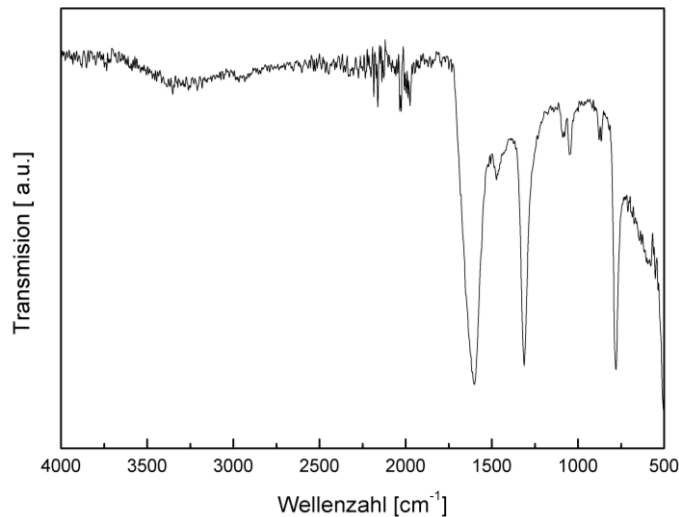
Anhand des Pulverdiffraktogramms in Abbildung 7.6 geht hervor, dass das erhaltene Calciumoxalat nur wenig geordnet vorliegt und ein breiter amorpher „Halo“ vorhanden ist. Demnach konnte in einem ethanolischen Lösungsmittel ein amorphes Produkt gefällt werden. Im Gegensatz dazu ist sowohl bei der Fällung im wässrigen Milieu als auch in Ethylenglykol ein eindeutiges Beugungsmuster zu erkennen, was in diesen Fällen auf kristalline Proben hinweist.



**Abbildung 7.6** Röntgendiffraktogramm vom im Ethanol gefällten amorphen Calciumoxalat.

#### *IR-Spektroskopie des ACOs*

Um Aufschluss über die gebildete Struktur zu erhalten, wurde die IR-Spektroskopie herangezogen. Anhand des Spektrums in Abbildung 7.7, das in Transmission aufgenommen wurde, lässt sich die breite Bande im Bereich  $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  der symmetrischen und asymmetrischen  $\text{-OH}$  Streckschwingung  $\nu_{s+a}(\text{OH})$  zuordnen. Die OH-Banden könnten ein Anzeichen für adsorbiertes Wasser und Ethanol-Solvat sein. Die Bande bei  $1602\text{ cm}^{-1}$  kann der asymmetrischen Oxalat-Streckschwingung  $\nu_a(\text{C=O})$  und bei  $1313\text{ cm}^{-1}$  der symmetrischen Carbonyl-Streckschwingung  $\nu_s(\text{C-O})$  zugeordnet werden. Die beobachtete Schwingungsmode bei  $780\text{ cm}^{-1}$  stammt aus der O-C=O Biegeschwingung  $\delta(\text{O-C=O})$  und die Bande bei  $507\text{ cm}^{-1}$  von der Ca-O Streckschwingung  $\nu(\text{Ca-O})$ .<sup>[178-181]</sup>



**Abbildung 7.7** IR-Spektrum des amorphen Calciumoxalats.

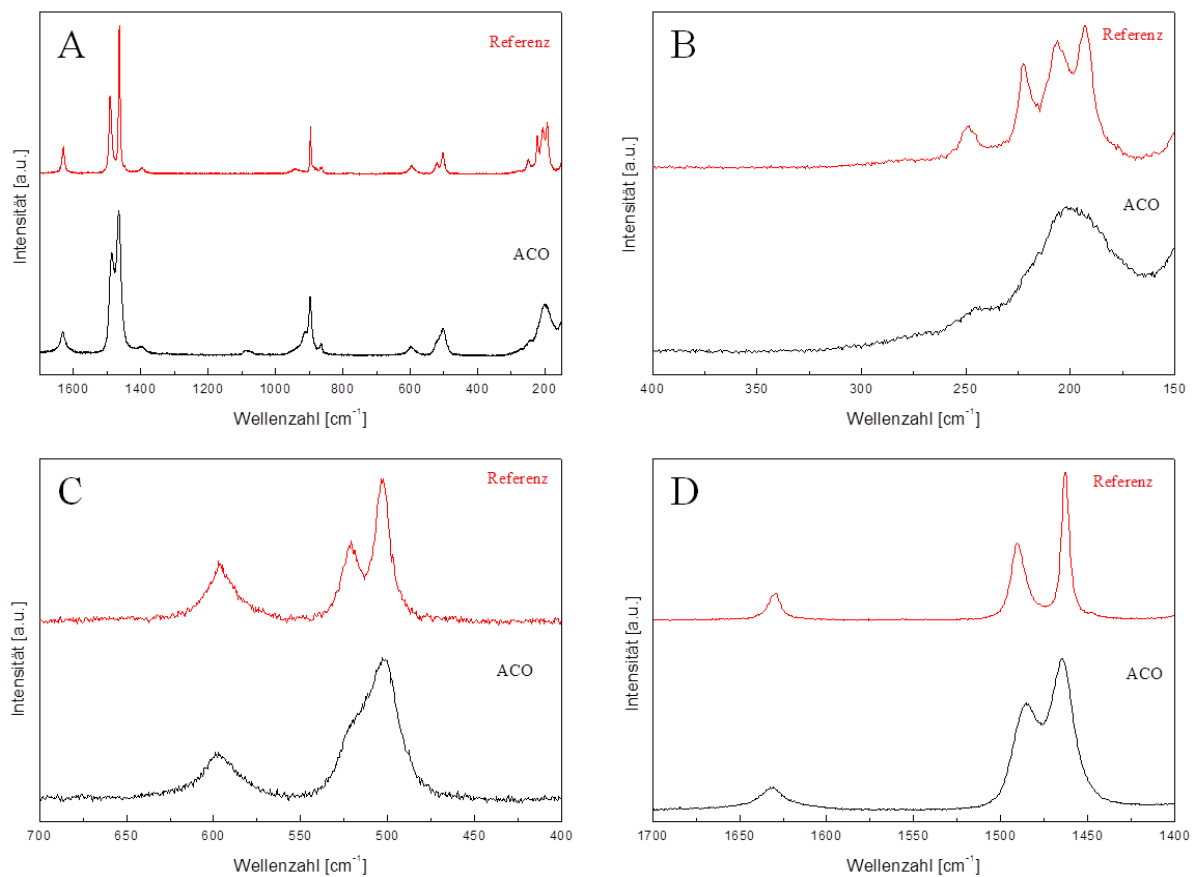
#### *Raman-Spektroskopie des ACOs*

Anhand der Raman-Spektroskopie sollte Auskunft über die Strukturbestimmung erhalten werden. Die hergestellte amorphe Zusammensetzung wurde mit einer käuflich erworbenen Calciumoxalat Monohydrat (COM) Referenz verglichen. Das Raman Spektrum in Abbildung 7.8 A suggeriert, dass die COM Referenzprobe und das amorphe Calciumoxalat weitestgehend ähnliche Banden in ihren Spektren aufweisen. Sowohl für die Referenzprobe bei  $1629\text{ cm}^{-1}$  als auch für das ACO kann bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  eine einfache Bande für die asymmetrische Streckschwingung  $\nu_a(\text{C}=\text{O})$  beobachtet werden. Die Region zwischen  $1500 - 1350\text{ cm}^{-1}$  kann der symmetrischen Streckschwingung  $\nu_s(\text{C}-\text{O})$  zugeschrieben werden, die für das hergestellte Produkt als zwei Banden bei  $1486\text{ cm}^{-1}$  und  $1465\text{ cm}^{-1}$  auftreten. Auch für die Referenzprobe COM sind im Vergleich zwei Banden zu erkennen, wohingegen nach der Literatur bei Calciumoxalat Dihydrat (COD) nur eine Einzelbanden für die asymmetrische Carbonyl-Streckschwingung zu beobachten ist. Der Grund hierfür ist, dass die Carbonyl-Streckung von COD im Gegensatz zu COM äquivalent ist.<sup>[182,183]</sup> Ein näherer Vergleich der Referenz mit dem ACO zeigt deutlich, dass im Falle der Referenz zwei scharfe voneinander abtrennbare Banden zu erkennen sind. Die Banden des ACOs hingegen verschmelzen miteinander und lassen damit eine Abnahme der Faktorgruppenaufspaltung und Symmetrierniedrigung erkennen in Abbildung 7.8 D. Berechnungen der Halbwertsbreiten (*FWHM full width half maximum*) zeigen, dass die Banden des ACOs ( $\text{FWHM} = 15.1\text{ cm}^{-1}$  (bei  $1486\text{ cm}^{-1}$ ) und  $15.7\text{ cm}^{-1}$  (bei  $1465\text{ cm}^{-1}$ ) der symmetrischen Streckschwingung zunehmend breiter sind, als

## AMORPHES CALCIUM OXALAT

die des kristallinen Materials ( $\text{FWHM} = 9.1 \text{ cm}^{-1}$  (bei  $1486 \text{ cm}^{-1}$ ) und  $5.7 \text{ cm}^{-1}$  (bei  $1465 \text{ cm}^{-1}$ ). Anhand der Halbswertsbreite können Rückschlüsse auf die Kristallinität der zu messenden Substanz gezogen werden.

Eine zusätzliche Bande wird bei  $1395 \text{ cm}^{-1}$  festgestellt, die als Kombinationsbande der symmetrischen Streckschwingung  $\nu_s(\text{C-O})$  und  $\text{O-C=O}$  Biegeschwingung  $\delta(\text{O-C=O})$  zugeteilt werden kann. Die Raman Banden, die bei etwa  $900 \text{ cm}^{-1}$  zu beobachten sind, können der C-C Streckschwingung zugewiesen werden. Die Bande der Referenz und des ACOs bei  $896 \text{ cm}^{-1}$  entspricht der C-C Streckschwingung  $\nu(\text{C-C})$  mit zusätzlichen Banden bei  $943 \text{ cm}^{-1}$  und  $862 \text{ cm}^{-1}$  für die Referenz und  $912 \text{ cm}^{-1}$  und  $862 \text{ cm}^{-1}$  für das ACO. Die Bande bei  $943 \text{ cm}^{-1}$  gehört der C-C Streckung an, während die Bande bei  $862 \text{ cm}^{-1}$  der O-C=O Biegemode zugeteilt werden kann. Auch im Falle der C-C Streckschwingung ist zu erkennen, dass die beiden Banden des amorphen Calciumoxalats im Gegensatz zur Referenz nur geringfügig aufgespalten sind.



**Abbildung 7.8** (A-D) Mikro-Ramanspektren der teilkristallinen Calciumoxalat Probe im Vergleich zu einer käuflich erworbenen COM Referenzprobe (B-D) Vergrößerungsausschnitt aus A.



Hin zu geringen Wellenzahlen ist eine breite Bande, mit geringer Intensität bei  $596\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten, die der Wasser-Libration zugeordnet wird (Abbildung 7.8 C). Im Falle der Referenzproben wird diese Bande von zwei weiteren Banden bei  $520$  und  $503\text{ cm}^{-1}$  umgeben, die der symmetrischen O-C=O Biegeschwingung, der Ca-O Ring Deformation und der  $\nu(\text{Ca-O})$  Streckmode zugeschrieben werden können. Im Gegensatz dazu ist beim amorphen Calciumoxalat durch die Abnahme der Faktorgruppenaufspaltung nur noch eine Bande bei  $503\text{ cm}^{-1}$  festzustellen. Bei genauerer Betrachtung der amorphen Substanz wird deutlich, dass eine leichte Schulter in der Bande bei  $503\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten ist.

Weiterhin sind in der Region  $300\text{-}100\text{ cm}^{-1}$  in Abbildung 7.8 B intensive Banden vorzufinden. Die Referenzprobe weist Banden bei  $249$ ,  $222$ ,  $206$  und  $193\text{ cm}^{-1}$  auf, die beim ACO nur noch als breite Bande bei  $200\text{ cm}^{-1}$  identifiziert werden kann. Demnach ist hier keine Faktorgruppenaufspaltung mehr zu beobachten. In der Literatur wird vermutet, dass diese Banden aufgrund der Ca-O Streck- und Biegeschwingung zu erwarten ist.<sup>[178,182]</sup>

Eine schwache Bande bei  $1086\text{ cm}^{-1}$  kann der C-O Streckung von Ethanol zugewiesen werden, das in Spuren noch als Solvat Molekül des ACO vorhanden ist.

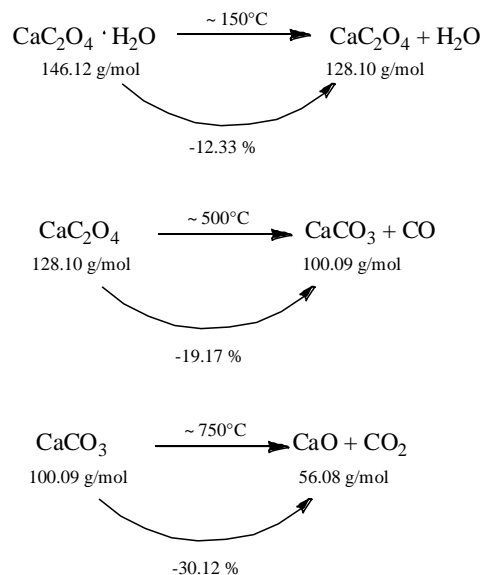
Durch die Raman-Spektroskopie wird deutlich, dass im nicht kristallinen Calciumoxalat eine deutlich geringere Faktorgruppenaufspaltung zu beobachten ist, als in der kristallinen COM Referenz. Da jedoch eine Aufspaltung bei der symmetrischen Streckschwingung im Bereich  $1500\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$  in Abbildung 7.8 D festzustellen war, die bei der amorphen Substanz nicht zu erwarten wäre, wurde die Zusammensetzung nach den Raman-Messungen erneut mit Hilfe der Pulverdiffraktometrie vermessen. Hierbei wurde deutlich, dass die Probe bereits angefangen hat zu kristallisieren und demnach teilkristallin war (siehe Anhang Abbildung C.). Der Grund hierfür liegt in der Ramanstrahlung. Diese Strahlung hat eine so hohe Energie, dass die amorphe Probe dadurch angefangen hat zu kristallisieren.

### *Thermogravimetrische Untersuchung des ACO*

Um Information über das thermische Verhalten der amorphen Substanz zu erhalten, wurden dynamische Differenzkalometrie (*differential scanning calorimetry*, DSC) und Thermogravimetrische Analyse (TG) Messungen durchgeführt. Um eine komplette Zersetzung bis zum Calciumoxid zu erzielen, wurde die amorphe Probe schrittweise bis auf

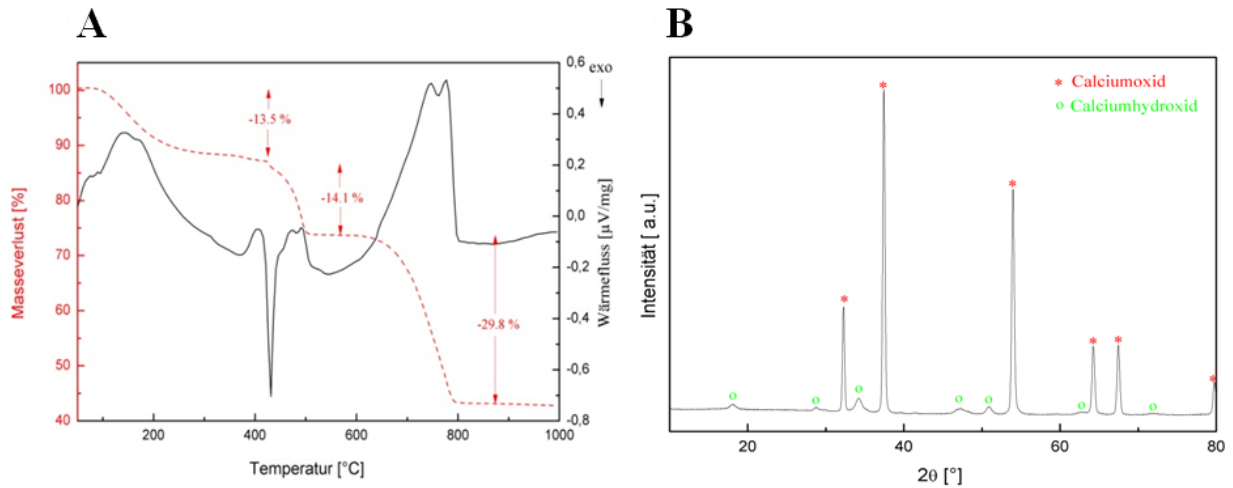
## AMORPHES CALCIUM OXALAT

1000 °C erhitzt. In Abbildung 7.9 sind die einzelnen Schritte der Zersetzung von Calciumoxalat Monohydrat zu Calciumoxid dargestellt. Die Umwandlung findet in drei Schritten statt. Im ersten Schritt wird das hydratisierte Calciumoxalat dehydratisiert, im Falle des Calciumoxalat Monohydrat (COM) findet die Dehydratation bei ungefähr 150 °C, bei Calciumoxalat Dihydrat (COD) bei 120 °C statt.<sup>[184]</sup> Anschließend folgt die Zersetzung vom wasserfreien CaOx zu Calciumcarbonat unter Freisetzung von Kohlenmonoxid bei etwa 500 °C. Da die thermogravimetrischen Messungen unter Argon durchgeführt wurden, ist mit keiner Reaktion des Kohlenmonoxids mit Sauerstoff zu Kohlendioxid zu rechnen. Im letzten Schritt bei etwa 750 °C wird CaCO<sub>3</sub> zu Calciumoxid unter Freisetzung von Kohlendioxid zersetzt.



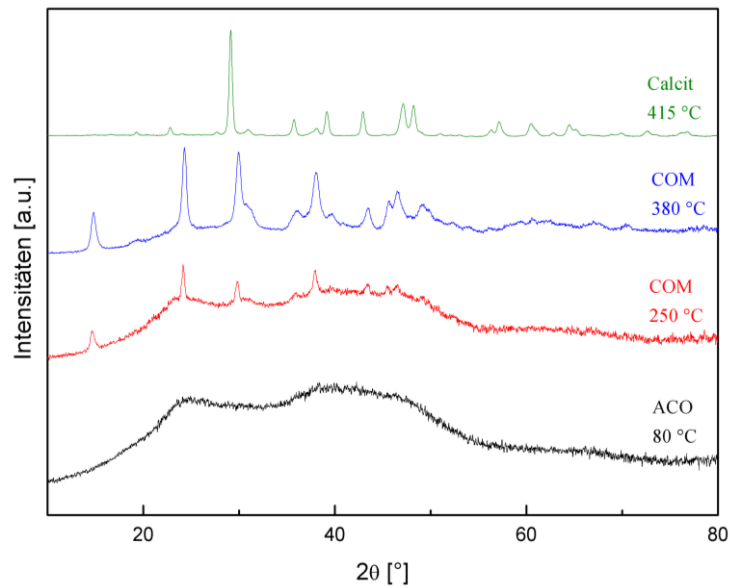
**Abbildung 7.9** Umwandlungstemperaturen von CaOx zu Calciumcarbonat und anschließend zu Calciumoxid.

In Abbildung 7.10 A sind drei Schritte des Masseverlustes bei 429 °C mit 13.5%, 493 °C mit 14.1% und 791 °C mit 28.9% Masseverlust zu beobachten. Das Abweichen der experimentellen Werte von den theoretischen COM Werten mit 12.3%, 19.2% und 30.12% ist zum einen damit zu erklären, dass die Anzahl der Kristallwasser nicht bekannt sind und zum anderen könnte mögliches adsorbiertes Ethanol für den höheren Masseverlust verantwortlich sein.



**Abbildung 7.10** Gekoppelte DSC-TG Analyse der frischen amorphen Substanz (A), Pulverdiffraktogramm der DSC-TG Probe (B).

Beobachtungen des Verlaufs der DSC Kurve zeigen neben mehreren endothermen Prozessen, ein starkes exothermes Signal an. Der erste endotherme Prozess, mit einem Maximum bei 143 °C, lässt sich vom Verdampfen des adsorbierten Ethanol bzw. Wasser aus dem amorphen Calciumoxalat ableiten. Ein exothermer Verlauf ist bei 429 °C zu beobachten. Hier findet die Kristallisation vom ACO zum kristallinen CaOx statt. Anschließend folgt wieder ein endothermer Vorgang bei 493 °C, wo die Umwandlung von kristallinem CaOx zu  $\text{CaCO}_3$  unter Freisetzung von CO stattfindet. Zwei weitere endotherme Signale sind bei 747 °C und 777 °C festzustellen. Theoretisch sollte in diesem Temperaturbereich die Zersetzung zum Calciumoxid stattfinden. Das Pulverdiffraktogramm in Abbildung 7.10 B macht jedoch deutlich, dass zwei Phasen gebildet wurden, Calciumoxid und Calciumhydroxid, auch Portlandit genannt. Den Intensitäten zu Folge wird dabei deutlich mehr Calciumoxid als Calciumhydroxid erzeugt. Vermutlich befindet sich in dem System noch Wasser, das mit dem durch die Zersetzung des Calciumcarbonats gebildeten Calciumoxid weiter zum Calciumhydroxid reagiert.

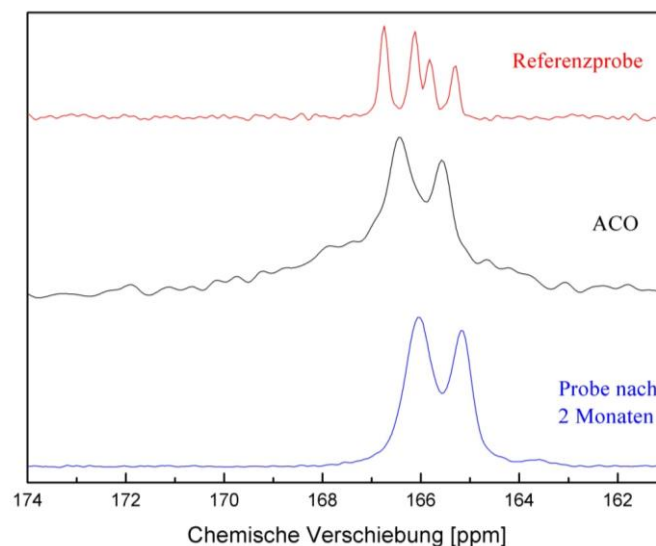


**Abbildung 7.11** Röntgendiffraktogramm des amorphen Materials erhitzt bei verschiedenen Temperaturen.

Der amorphe Feststoff wurde bei verschiedenen Temperaturen im Ofen erhitzt, um die Umwandlungsprozesse festzustellen. Zuerst wurde die Probe auf 80 °C getempert. In Abbildung 7.11 ist zu erkennen, dass die Substanz wie erwartet bei dieser Temperatur noch amorph vorliegt. Bei höheren Temperaturen findet die Kristallisation von ACO zur kristallinen Phase statt. Bereits bei einer Temperatur von 250 °C ist zu erkennen, wie der Kristallisationsprozess einsetzt und die amorphe Probe erste Reflexe des Calciumoxalat Monohydrats aufweist. Mit zunehmender Temperatur im Bereich von 380 °C kann festgestellt werden, dass die Kristallisation weiter vorangeschritten ist und mehr COM vorliegt. Der Kristallisationsvorgang setzt dabei früher ein, als die Ergebnisse der DSC erwarten lassen. Im Gegensatz zur thermogravimetrischen Analyse wurde die Probe zwar auch in 10 K·min<sup>-1</sup> Schritten aufgeheizt, wurde jedoch anschließend für 2 Stunden bei der befindlichen Temperatur gehalten. Ein weiterer Grund für die Temperaturdifferenz liegt in der Atmosphäre, während die thermogravimetrischen Analysen unter Argonatmosphäre durchgeführt wurden, fand das Tempern der Probe im Ofen unter Anwesenheit von Sauerstoff statt. Durch weiteres Tempern der Substanz, ist ab ungefähr 415 °C zu erkennen, dass hauptsächlich CaCO<sub>3</sub> als Calcit gebildet wurde und nur noch sehr wenig COM vorhanden ist.

### <sup>13</sup>C-Festkörper-NMR-Spektroskopie des amorphen und kristallinen CaOx

Mithilfe der <sup>13</sup>C-Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde eine weitere Methode zur Strukturaufklärung in Abbildung 7.12 durchgeführt. Die Messung der kommerziellen Referenz COM ergab vier Signale bei 169.0, 168.4, 168.1 und 167.6 ppm, was im Einklang mit den Literaturwerten steht.<sup>[185,186]</sup> Das amorphe Calciumoxalat weist hingegen zwei Signale bei 168.7 und 167.9 ppm und eine mit 4.2 ppm breite amorphe Komponente bei etwa 166 ppm auf. Nachdem die Substanz nach 2 Monaten wieder gemessen wurde, konnte festgestellt werden, dass der amorphe Untergrund nicht mehr vorhanden ist, was einen Hinweis darauf gibt, dass diese Substanz angefangen hat zu kristallisieren. Aber anstatt der vier Signalen liegen, nach wie vor zwei Signale vor, was darauf zurückschließen lassen könnte, dass die Probe zwar angefangen hat zu kristallisieren, aber noch nicht komplett kristallin ist und daher nur zwei Signale aufweist. Das Pulverdiffraktogramm in Abbildung 7.13 B unterstützt die Annahme, dass die Probe kristallisiert ist. In diesem Diffraktogramm ist festzustellen, dass sehr wahrscheinlich nach zwei Monaten eine Umwandlung der amorphen Substanz zum kristallinen Calciumoxalat Monohydrat stattgefunden hat. Die Ergebnisse müssen in weiteren Experimenten durch weitere Variationen der Spingeschwindigkeit, unterschiedlichen Isotopenzusammensetzung und 2D NMR Experimente (<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H Hetcore) verifiziert werden.

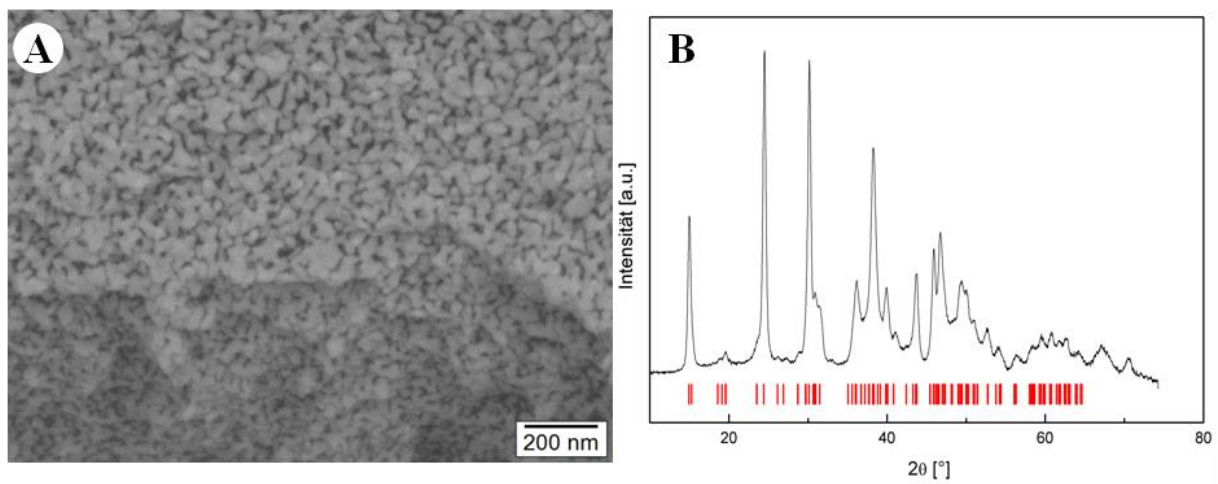


**Abbildung 7.12** <sup>13</sup>C-CP-Festkörper-NMR. Vergleich der kommerziellen COM Referenz (25 kHz, MAS) mit der frisch in ethanolischen Lösungsmittel hergestellten CaOx Probe (25 kHz, MAS) und der Probe nach zwei Monaten (10 kHz, MAS).

## AMORPHES CALCIUM OXALAT

### *Untersuchung des kristallisierten CaOxs nach 2 Monaten*

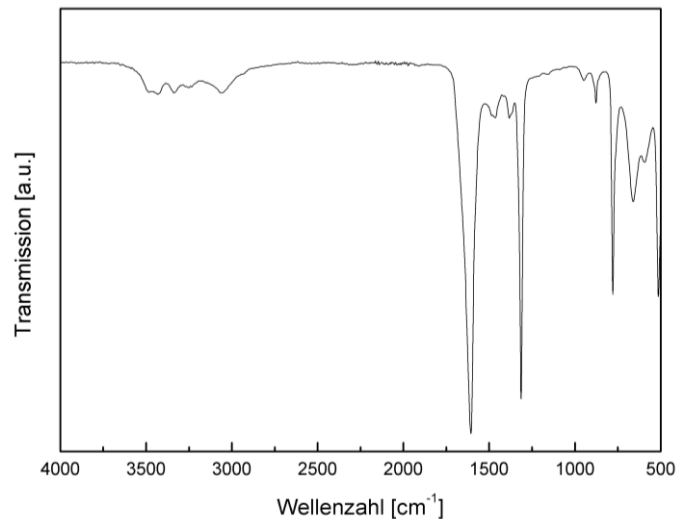
In den SEM Aufnahmen in Abbildung 7.13A ist zu erkennen, dass sich wie Abbildung 7.5 ein Film gebildet hat, der jedoch bei näherer Ansicht, im Gegensatz zur amorphen Zusammensetzung, keine sphärischen Partikel aufweist. Anstatt dessen haben sich längliche Partikel unterschiedlicher Größe gebildet. Dies spricht für einen anisotropen Aufbau und demnach für eine kristalline Verbindung, die mittels XRPD eindeutig als COM nachgewiesen werden konnte (Abbildung 7.13 B).



**Abbildung 7.13** (A) SEM-Aufnahme und (B) Pulverdiffraktogramm der nach 2 Monaten kristallisierten CaOx-Probe.

### *IR-Spektroskopie des kristallisierten CaOxs*

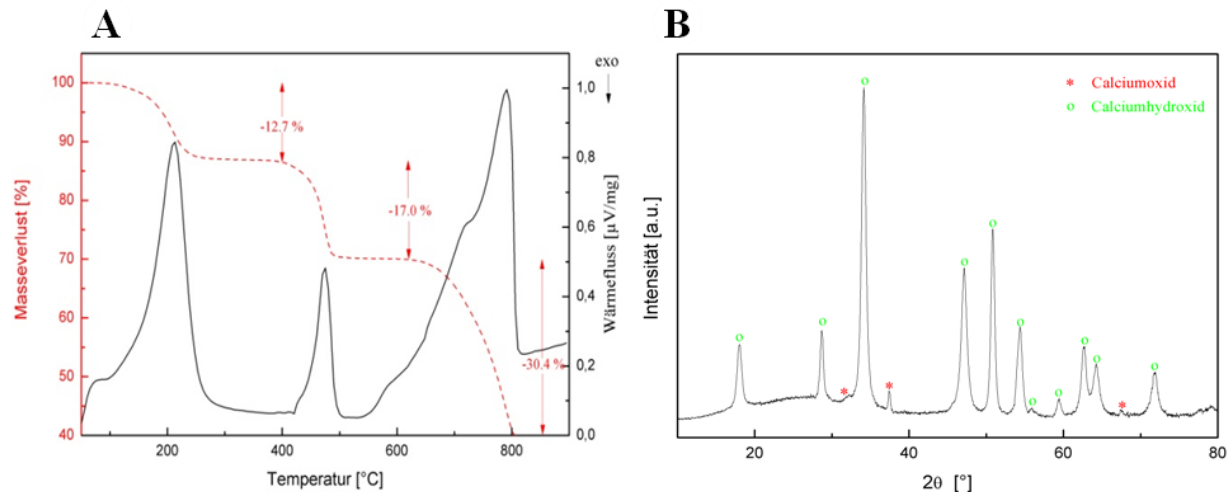
Das IR-Spektrum in Abbildung 7.14 zeigt sehr ähnliche Banden wie das Spektrum der amorphen Probe in Abbildung 7.7. Unterschiede sind in der Region  $800$  bis  $500\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. In der kristallinen Substanz sind zwei Banden mehr bei  $659$  und  $599\text{ cm}^{-1}$  für die Wasserlibration vorzufinden. Ein weiterer Unterschied liegt im Bereich zwischen  $3600$  und  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Während das ACO nur eine breite Bande erkennen lässt, weist das kristalline CaOx fünf verschiedene Banden bei  $3487$ ,  $3436$ ,  $3331$ ,  $3247$  und  $3054\text{ cm}^{-1}$  auf. Diese Banden sind ein zusätzliches Indiz dafür, dass es sich bei dieser Zusammensetzung um COM handelt. Die beiden Hydratformen Calciumoxalat Mono- und Dihydrat weisen nach den Literaturwerten zwar starke Ähnlichkeit in ihren Spektren auf, unterscheiden sich jedoch im Bereich der OH Streckschwingungsregion.<sup>[178]</sup> Während COM im Bereich der OH Streckmode fünf Banden zugeordnet werden können, ist es bei COD nur eine breite Bande.



**Abbildung 7.14** IR-Spektrum der nach 2 Monaten kristallisierten CaOx Probe.

#### *Thermogravimetrische Analyse des kristallisierten CaOxs*

Auch in der DSC Kurve in Abbildung 7.15 A ist zu erkennen, dass die Probe nach zwei Monaten kristallisiert ist. Der exotherme Kristallisationsprozess des ACO in Abbildung 7.10, ist nicht mehr vorhanden. Es sind nur noch drei scharfe endotherme Signale zu erkennen. Bei 212 °C ist ein Masseverlust von 12.7% zu erkennen. Hier findet die Dehydratation von COM statt. Der Zersetzungsprozess zu Calcit ist bei 473 °C mit einem Masseverlust von 17.0% zu beobachten. Die letzte Umwandlung mit einem Masseverlust von 30.4% kann bei 791 °C festgestellt werden. Auch hier entsteht, wie in der amorphen Verbindung, Calciumhydroxid. Jedoch ist hier fast nur noch Calciumhydroxid und geringfügig Calciumoxid vorhanden. Vermutlich wurde das komplette Calciumoxid während des thermogravimetrischen Prozesses, unter Anwesenheit von Wasser aus dem System, zu Calciumhydroxid umgewandelt.



**Abbildung 7.15** Gekoppelte DSC-TG Analyse der kristallinen Probe nach zwei Monaten (A) Pulverdiffraktogramm der kristallinen TG-DSC Probe (B).

#### *Vorgeschlagener mechanistischer Hintergrund*

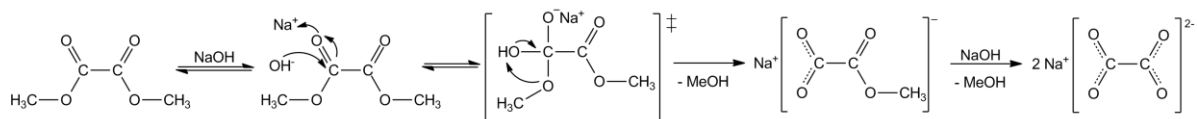
Ziel dieses Kapitels war es amorphes Calciumoxalat herzustellen. Bei der Synthese von Calciumoxalat im wässrigen Milieu mit den Ausgangsverbindungen Calciumchlorid Dihydrat und Natriumoxalat entstand das kristalline Produkt Calciumoxalat Monohydrat, wie in Kapitel 6.3.1 festgestellt wurde. Die Kristallisationsreaktion im wässrigen Milieu zum COM war wahrscheinlich so schnell, dass es mit den hier angewendeten Nachweismethoden nicht möglich war, amorphes Calciumoxalat zu beobachten. Da jedoch bei der Fällung von Calciumoxalat vermutlich eine amorphe Vorstufe besteht, wie nach der Ostwald'schen Stufenregel beim Calciumcarbonat, war die Idee die Fällungsreaktion homogen durchzuführen. Hierzu sollten die Oxalat-Ionen kontrolliert durch die Esterhydrolyse, wie in Abbildung 7.1 und Abbildung 7.16, *in situ* freigesetzt werden. Ziel war es mit Hilfe der homogenen Reaktionsführung, die Reaktionsgeschwindigkeit zu verlangsamen und somit ein amorphes Intermediat festzustellen.

Wie allerdings in Abbildung 7.2 zu erkennen ist, lieferte auch dieser Fällungsweg nach den herkömmlichen Untersuchungsmethoden kristallines Calciumoxalat. Um die Hydrolysegeschwindigkeit weiter zu verlangsamen, wurde ein anderes Reaktionsmedium gewählt. Die Wahl fiel dabei auf Ethanol. In diesem Lösungsmittel herrschen andere Deprotonierungsschritte als im Wasser. Dadurch könnte die Hydrolyse und die Folgereaktion möglicherweise weiter verlangsamt werden. Tatsächlich konnte mit dieser Methode amorphes



Calciumoxalat nachgewiesen werden. Die Bildung der amorphen Zwischenstufe könnte durch die Kationenladungsdichte hervorgerufen werden, welche dafür sorgt, dass die Hydratationsenthalpie vergleichbar mit der Bindungsenergie der Gegenanionen wird. Anionen, deren Acidität die Bildung von hydrogenbindenden Netzwerken erlauben, können dadurch einen mehrstufigen Kristallisationsprozess begünstigen, der homogene Fällung von nanokristallinen Hydratphasen beinhaltet.<sup>[187]</sup>

#### Hydrolyse



#### Kondensation

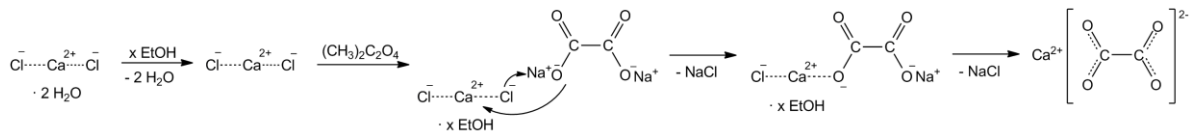


Abbildung 7.16 Reaktionsmechanismus zum Calciumoxalat.

Wahrscheinlich ist nicht das Lösungsmittel dafür verantwortlich, dass ein amorphes Zwischenprodukt gebildet wird, sondern nur dass das Zwischenprodukt im ethanolischen Milieu besser stabilisiert wird, als im wässrigen Medium. Wie bereits eingehend erwähnt, wird vermutlich auch im wässrigen Lösungsmittel eine amorphe Vorstufe gebildet. Mit den hier angewendeten Untersuchungen ist es jedoch nicht möglich, diese Vorstufe festzustellen. Um das amorphe Intermediat im wässrigen Milieu zu beobachten, müssen zukünftig Untersuchungen der Frühstadien, während des Keimbildungsprozesses, mit Hilfe der Lichtstreuung, *in situ* TEM oder auch Cryo-TEM, durchgeführt werden.<sup>[188]</sup>

### 7.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Synthese von amorphem Calciumoxalat mithilfe der alkalischen Hydrolyse von Dimethyloxalat studiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass es im wässrigen Milieu oder im organischen Lösungsmittel Ethylenglykol nicht möglich war, ACO festzustellen. Stattdessen wurden die kristallinen Hydratformen des CaOx gebildet. Erst im ethanolschen Lösungsmittel konnte ACO synthetisiert werden und mit Hilfe der Pulverdiffraktometrie nachgewiesen werden. In den SEM Aufnahmen wurde deutlich, dass kleine sphärische Partikel im Bereich zwischen 10-20 nm gebildet wurden. Die IR-Spektroskopie sollte Information über die chemische Verbindung dieser amorphen Zusammensetzung geben. Vergleiche mit Calciumoxalat Referenz-Spektren manifestierten, dass es sich bei dieser Verbindung um Calciumoxalat handelt. Ein weiterer Hinweis darauf, dass ACO synthetisiert wurde, gab die thermogravimetrische Analyse. Hier konnte ein exothermer Prozess bei 429°C festgestellt werden, der verantwortlich für die Kristallisation der amorphen Zusammensetzung zu kristallinem CaOx ist. Temperexperimente im Ofen verdeutlichten in verschiedenen Temperaturbereichen die Kristallisation zum kristallinen COM und den Zersetzungsvorgang zu Calcit. In der  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR wurde anschließend deutlich, dass im ACO eine amorphe Komponente im Gegensatz zur kristallisierten Substanz zu beobachten ist. Weiterhin wurde mittels Pulverdiffraktometrie festgestellt, dass das ACO in einem Zeitraum von ca. 2 Monaten zu Calciumoxalat Monohydrat kristallisiert war. Die IR-Spektroskopie bestätigte die Aussage der Pulverdiffraktometrie, dass ACO zu COM kristallisiert war. In thermogravimetrischen Untersuchungen konnte kein Kristallisationsprozess mehr beobachtet werden, sondern ausschließlich endotherme Dehydrations- und Zersetzungsvorgänge.

# 8

## Calciumoxalat Nanopartikel

### 8.1 Einleitung

Das Interesse an nanostrukturierten Materialien ist aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften, was mit Bulkmaterialien kaum zu erreichen ist, ihrer Größe und ihrer Oberflächeneffekte in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Besonders die Synthese von sphärischen Nanopartikeln, Nanodrähten, Nanostäben und auch Nanoröhren haben wegen ihrer ausgeprägten Geometrie außergewöhnliche physikalische und chemische Eigenschaften und werden mittlerweile in vielfältigen Anwendungsgebieten eingesetzt.<sup>[189]</sup> So finden sie beispielsweise Anwendung in der Medizin als Drug Delivery Systeme, in der Katalyse, im kosmetischen Bereich, aber auch bei Dispersionsfarben.<sup>[190,191]</sup>

Das Auftreten von Nanokristallen aus Calciumoxalat ist besonders im Sektor der Medizin und in der Pflanzenwelt bekannt. Durch einen übersättigten Urin kann es zur Bildung von Calciumoxalat-Keimen im Größenbereich von 10 nm kommen, die zu einer pathologischen Größe von mehreren Mikrometern weiter wachsen bzw. aggregieren können.<sup>[192]</sup> Eine gezielte Synthese von CaOx-Nanopartikeln und weitergehenden Untersuchungen wie deren Wachstum, Agglomeration und Phasenumwandlung, könnten Aufschluss über die Bildung von Nierensteinen geben. Weiterhin könnten die Partikel gezielt dazu dienen, spezifisch bindende Peptide darzustellen, wie in Kapitel 9, die möglicherweise eine Nierensteinbildung unterbinden könnten.

## CALCIUMOXALAT NANOPARTIKEL

Es sind bisher nur wenige Synthesemethoden von CaOx-Nanopartikeln bekannt. Die meisten laborsynthetisch hergestellten CaOx-Nanopartikel wurden bisher nur unter Anwesenheit von organischen Zusätzen durchgeführt.<sup>[193-195]</sup> In diesem Kapitel sollten CaOx-Nanokristalle durch Ultraschallbehandlung, ohne organische oder anorganische Additive, hergestellt werden. Die angewandte Syntheseroute basierte auf dem sonochemischen Herstellungsverfahren von Schüler *et al.*<sup>[196]</sup> Hier konnten gleichmäßig geformte, monodisperse Calciumcarbonat-Nanopartikel dargestellt werden.

## 8.2 Experimentelles

### 8.2.1 Reagenzien und Chemikalien

Die Chemikalien Calciumchlorid Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich,  $\geq 99\%$ ), Dimethyloxalat ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{O}_4$ , Sigma Aldrich, 99%), Natriumhydroxid (NaOH, 1.0 N, Acros Organics), Natriumoxalat ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , Sigma Aldrich,  $\geq 99,5\%$ ), Oxalsäure Dihydrat ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , Merck,  $\geq 99,5\%$ ) und die Lösungsmittel Ethylenglykol ( $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ , Sigma Aldrich, 99%), Ethanol absolut ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , VWR, p.a. 99.9%) und Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , Sigma, 99.9%) wurden ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt. In allen Experimenten wurde mit MilliQ-Wasser, mit einem Widerstand von  $18.2 \Omega$ , gearbeitet.

### 8.2.2 Synthese von Calciumoxalat-Nanopartikeln

In einer klassischen Reaktion wurden zur Synthese von Calciumoxalat-Nanopartikeln 2.5 mmol Calciumchlorid Dihydrat und 2.5 mmol Dimethyloxalat bzw. Oxalsäure Dihydrat in 50 mL Ethylenglykol im Ultraschallbad bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  gelöst. Durch gleichmäßiges Zutropfen einer 1 Molaren wässrigen Natriumhydroxid Lösung wurde die Hydrolyse und die darauffolgende Reaktion eingeleitet. Die Reaktionszeit im Ultraschallbad bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  betrug 30 Minuten. Zur Aufarbeitung wurde die Suspension zentrifugiert ( $9000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ , 30 min), mit Wasser und absolut Ethanol gewaschen und im Feinvakuum getrocknet.

### 8.2.3 Charakterisierung

Die Ausbeute der Proben wurde gravimetrisch ermittelt. Morphologische Untersuchungen erfolgten mittels SEM und TEM, Information über die Verbindung wurden mittels XRPD, FT-IR-Spektroskopie und thermische Analyse erhalten.

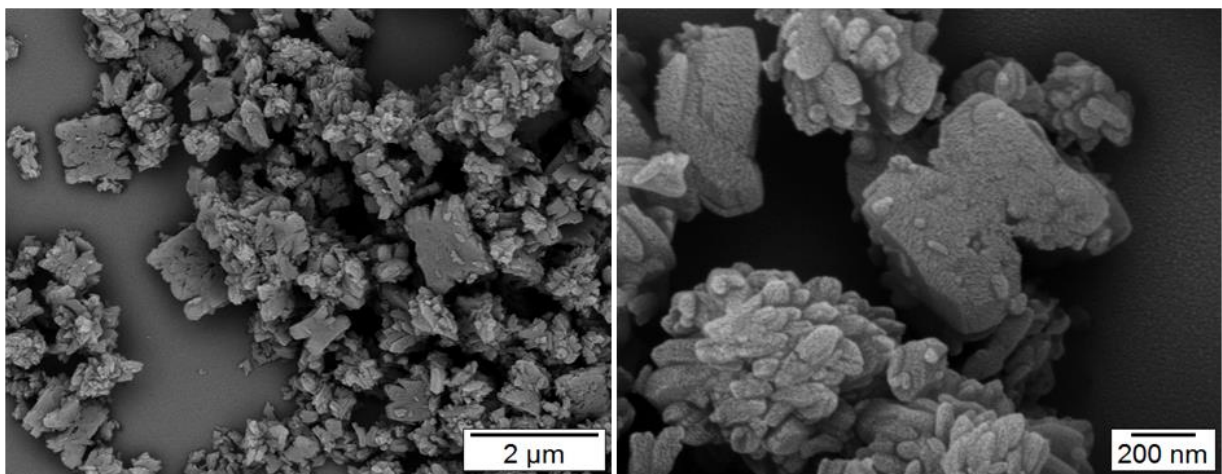
## 8.3 Ergebnis und Diskussion

### 8.3.1 Synthese von Calciumoxalat-Nanopartikeln

#### *Syntheseroute*

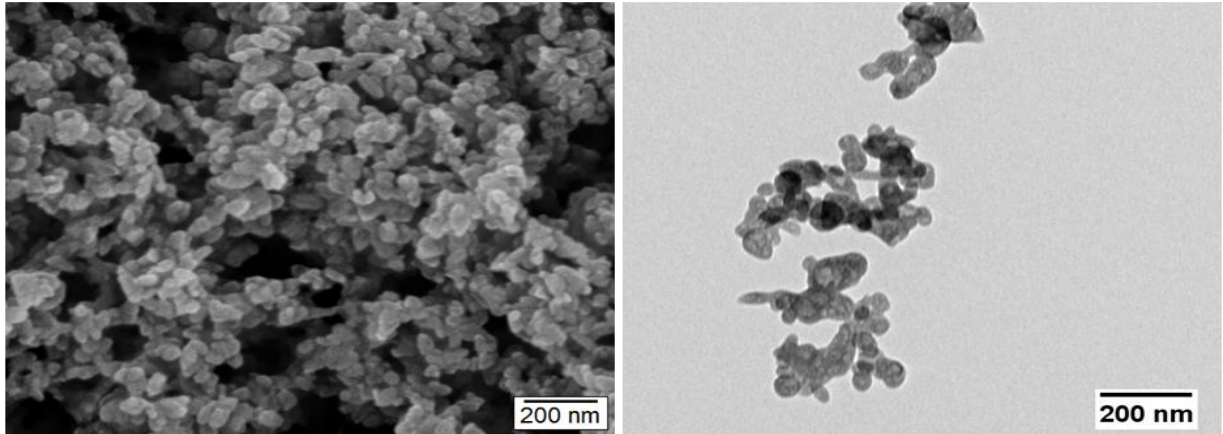
Die ausgewählte Synthesemethode entstammt aus der Arbeit von Schüler *et al.*<sup>[196]</sup> In dieser Veröffentlichung wurden, wie in der Einleitung erwähnt,  $\text{CaCO}_3$  Nanopartikel der Modifikation Vaterit synthetisiert. Das besondere an diesem Syntheseverfahren war, dass gleichförmige, monodisperse Partikel ohne weitere Zusätze unter Behandlung von Ultraschall gebildet wurden.

Die Synthese von Calciumoxalat-Nanopartikel sollte in verschiedenen Reaktionsmedien wie Wasser, Methanol oder Ethylenglykol, wie auch unter Einsatz von verschiedenen anionischen Ausgangsverbindungen durchgeführt werden. Hierzu wurden die beiden Vorläufer Calciumchlorid Dihydrat und Dimethyloxalat bzw. die Oxalsäure Dihydrat gemeinsam im entsprechenden Medium unter Ultraschallbehandlung gelöst. Die darauffolgende Reaktion wurde durch Zutropfen einer basischen Lösung gestartet.



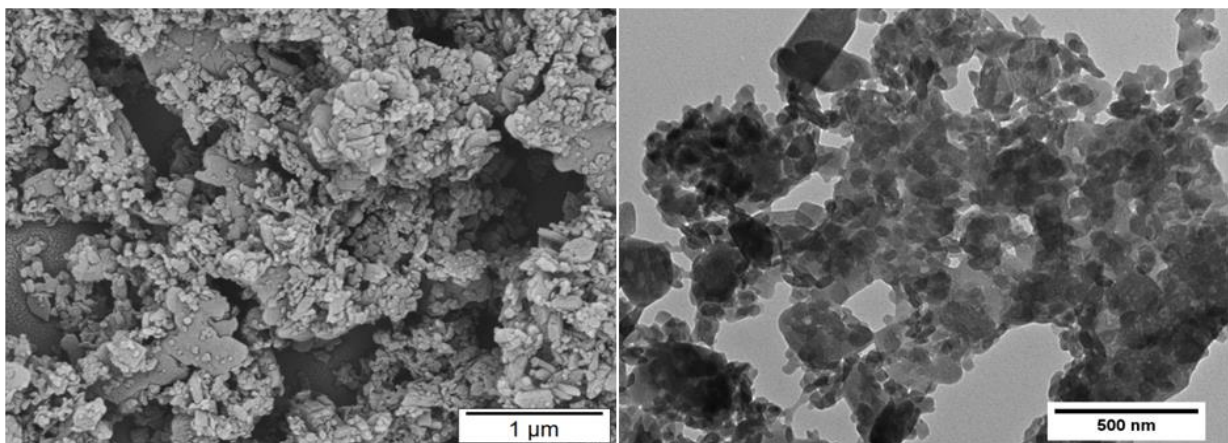
**Abbildung 8.1** SEM-Aufnahmen von Calciumoxalat-Partikel hergestellt im wässrigen Milieu mit Hilfe der basischen Hydrolyse von Dimethyloxalat unter Ultraschallbehandlung.

Das Reaktionsprodukt aus der Synthese im wässrigen Milieu in Abbildung 8.1 zeigt, dass neben vielen länglichen Nanopartikel unter 200 nm auch deutlich größere, teilweise agglomerierte Kristalle im Mikrometerbereich gebildet wurden. Es zeigte sich, dass die Größenverteilung im wässrigen Medium sehr inhomogen ist. Findet die Reaktion dagegen in Methanol statt, ist in Abbildung 8.2 festzustellen, dass Nanokristalle im Größenbereich von 40 – 50 nm gebildet wurden.



**Abbildung 8.2** SEM- und TEM-Aufnahmen von Calciumoxalat-Partikeln hergestellt in Methanol.

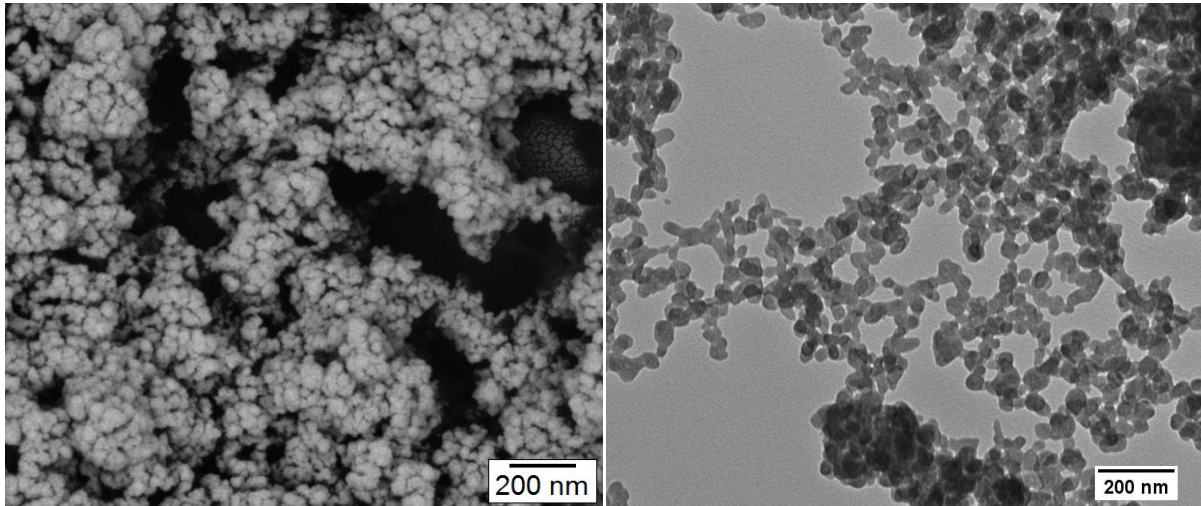
In Gegenwart von Natriumoxalat wurde Calciumchlorid Dihydrat vor der Kristallisation in Ethylenglykol unter Ultraschallbehandlung gelöst, während Natriumoxalat in einem weiteren Behälter in Ethylenglykol dispergiert wurde. Durch das Zusammenfügen der Calciumlösung mit der Oxalatdispersion im Ultraschallbad, war nach wenigen Sekunden eine milchige Lösung zu beobachten. Untersuchungen im SEM in Abbildung 8.3 verdeutlichen, dass neben vielen Partikeln im Nanometerbereich auch viele im Mikrometerbereich gebildet wurden und eine sehr breite Größenverteilung vorliegt. Daher war die Überlegung, die Fällung mit Dimethyloxalat durchzuführen. Der Vorteil von Dimethyloxalat ist, wie in Kapitel 7 erwähnt, dass freie Oxalat-Ionen zuerst *in situ* erzeugt werden und es dadurch zu einer homogenen Fällung kommt. Natriumoxalat hingegen ist eine direkte Oxalatquelle, die direkt mit den Calcium-Ionen wechselwirkt. Die Folge davon ist eine heterogene Fällung, mit ungleichmäßig verteilter Keimbildung und Kristallisationsrate.



**Abbildung 8.3** SEM und TEM Aufnahmen von der Partikelsynthese von Calciumoxalat-Kristallen in Ethylenglykol synthetisiert aus Calciumchlorid Dihydrat und Natriumoxalat.

## CALCIUMOXALAT NANOPARTIKEL

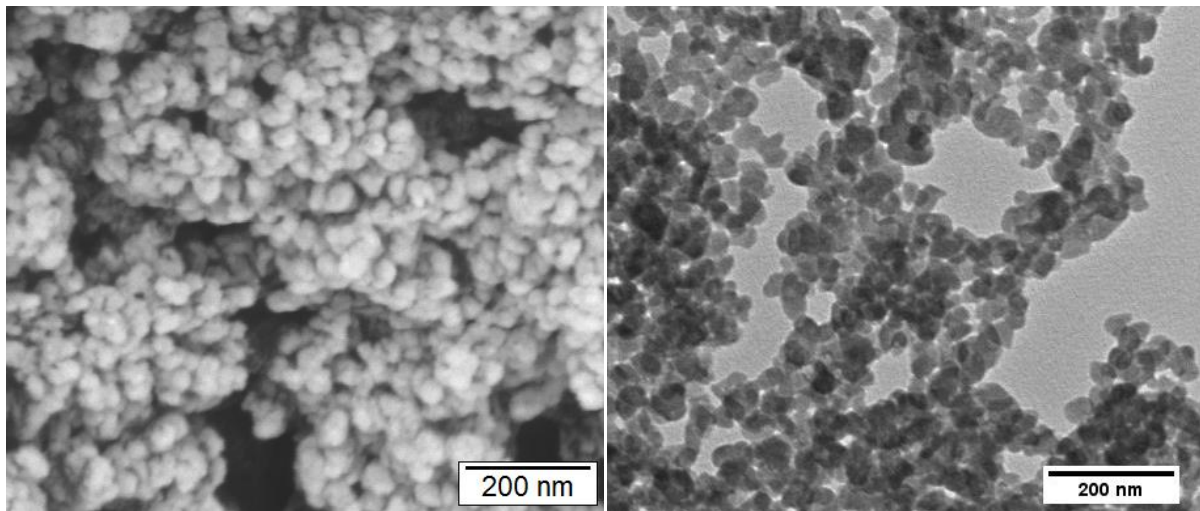
Wie bereits vermutet, konnten bei der Calciumoxalat-Synthese mit Dimethyloxalat in Ethylenglykol, Nanopartikel mit einheitlicher Größe erreicht werden. In den SEM und TEM Aufnahmen in Abbildung 8.4 ist zu erkennen, dass dabei sphärische Nanopartikel aus Calciumoxalat zwischen 40 und 50 nm gebildet wurden.



**Abbildung 8.4** SEM und TEM Aufnahme von Calciumoxalat-Nanopartikel, synthetisiert aus Calciumchlorid Dihydrat und Dimethyloxalat in Ethylenglykol.

Neben der Synthese von Calciumoxalat-Nanopartikeln aus Calciumchlorid Dihydrat und Dimethyloxalat, konnten ebenfalls einheitliche Nanopartikel zwischen 30 und 40 nm durch die Kristallisation von Calciumchlorid Dihydrat mit Oxalsäure hergestellt werden (Abbildung 8.5). Da bei dieser Syntheseroute die Fällung ebenfalls nicht im wässrigen Milieu durchgeführt wurde und die Oxalsäure daher als Oxalat-Vorläufer diente, musste die Oxalsäure zuerst mit Hilfe von Natriumhydroxid deprotoniert werden. Demnach findet auch hier, wie schon beim Dimethyloxalat, eine *in situ* Reaktion statt und die Kristallisation verläuft homogen.

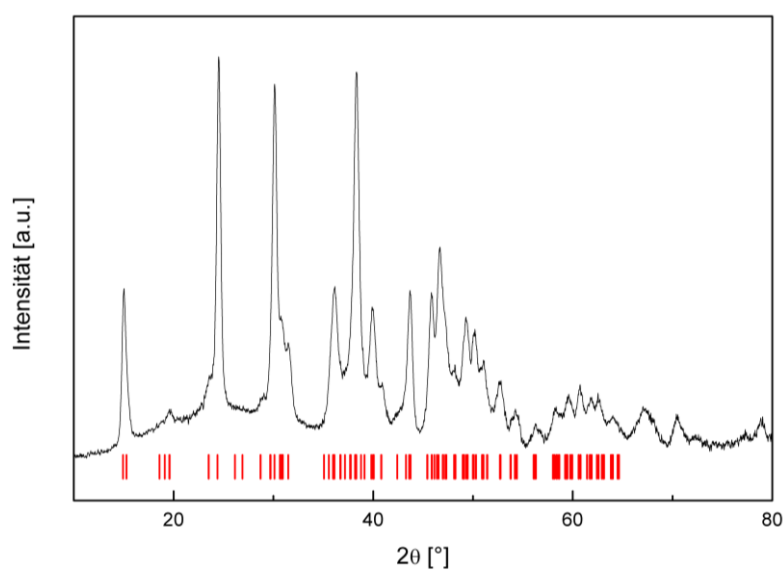




**Abbildung 8.5** SEM und TEM Aufnahme von Calciumoxalat-Nanopartikel, synthetisiert aus Calciumchlorid Dihydrat und Oxalsäure in Ethylenglykol.

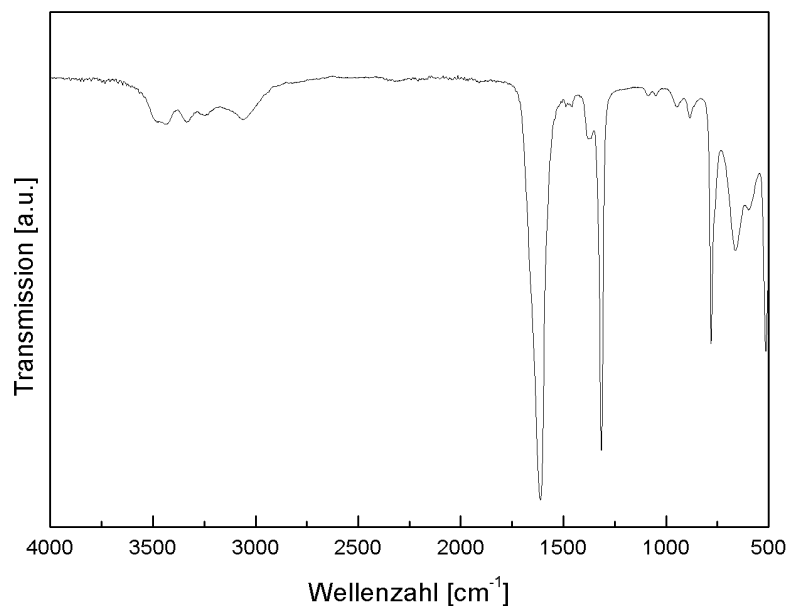
### *Charakterisierung*

Unabhängig von der Wahl des Mediums oder der anionischen Ausgangsverbindung, konnte bei allen Kristallisationsexperimenten durch die Pulverdiffraktometrie nachgewiesen werden, dass Calciumoxalat Monohydrat (COM) und damit die thermodynamisch stabile Hydratform des Calciumoxalats, entstanden ist (Abbildung 8.6). Die Hauptreflexe von COM erscheinen bei 2 Theta-Werten von  $14.93^\circ$ ,  $24.37^\circ$ ,  $30.11^\circ$  und  $38.18^\circ$  und können jeweils den (100), (040), (200) und der (061) Ebenen zugeordnet werden.



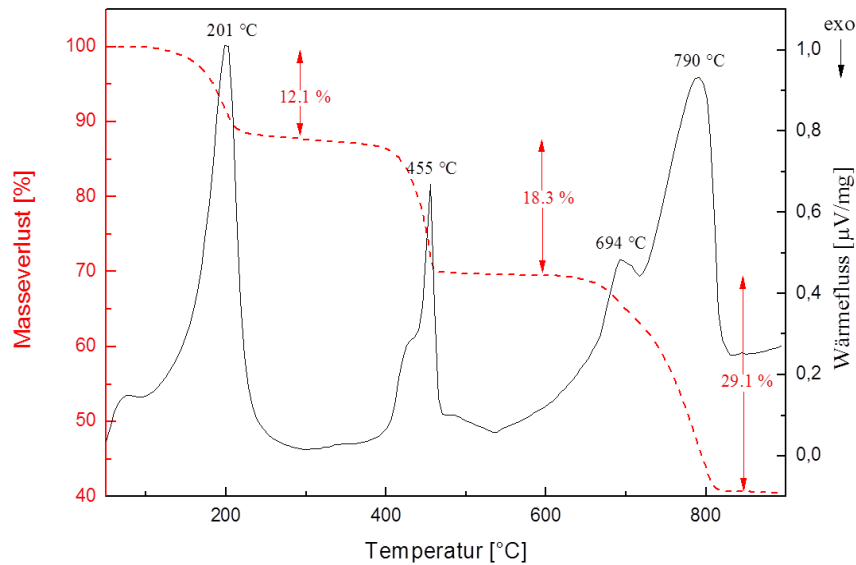
**Abbildung 8.6** Pulverdiffraktogramm von Calciumoxalat Monohydrat Nanopartikel (PDF 01-75-1313).

Die FT-IR-Spektroskopie wurde für weitere Charakterisierung von Calciumoxalat-Nanopartikel genutzt. Das IR Spektrum in Abbildung 8.7 zeigt bei  $1613\text{ cm}^{-1}$  eine Bande für die asymmetrische Carbonyl-Streckschwingung  $\nu_a(\text{C-O})$ , wohingegen die symmetrische Carbonyl- Streckschwingung  $\nu_s(\text{C-O})$  ihre Bande bei  $1316\text{ cm}^{-1}$  hat. Zwischen  $3500\text{ cm}^{-1}$  und  $3000\text{ cm}^{-1}$  tauchen fünf symmetrische und asymmetrische Streckschwingungsbanden  $\nu_{s+a}(\text{OH})$  aufgrund des koordinierten Wassers auf. Diese fünf Banden bei  $3483\text{ cm}^{-1}$ ,  $3438\text{ cm}^{-1}$ ,  $3322\text{ cm}^{-1}$ ,  $3243\text{ cm}^{-1}$  und  $3061\text{ cm}^{-1}$  sind ein weiterer Hinweis, dass es sich bei den hergestellten Nanopartikel um COM handelt.<sup>[178]</sup>



**Abbildung 8.7** IR Spektrum der Calciumoxalat Monohydrat Nanopartikel.

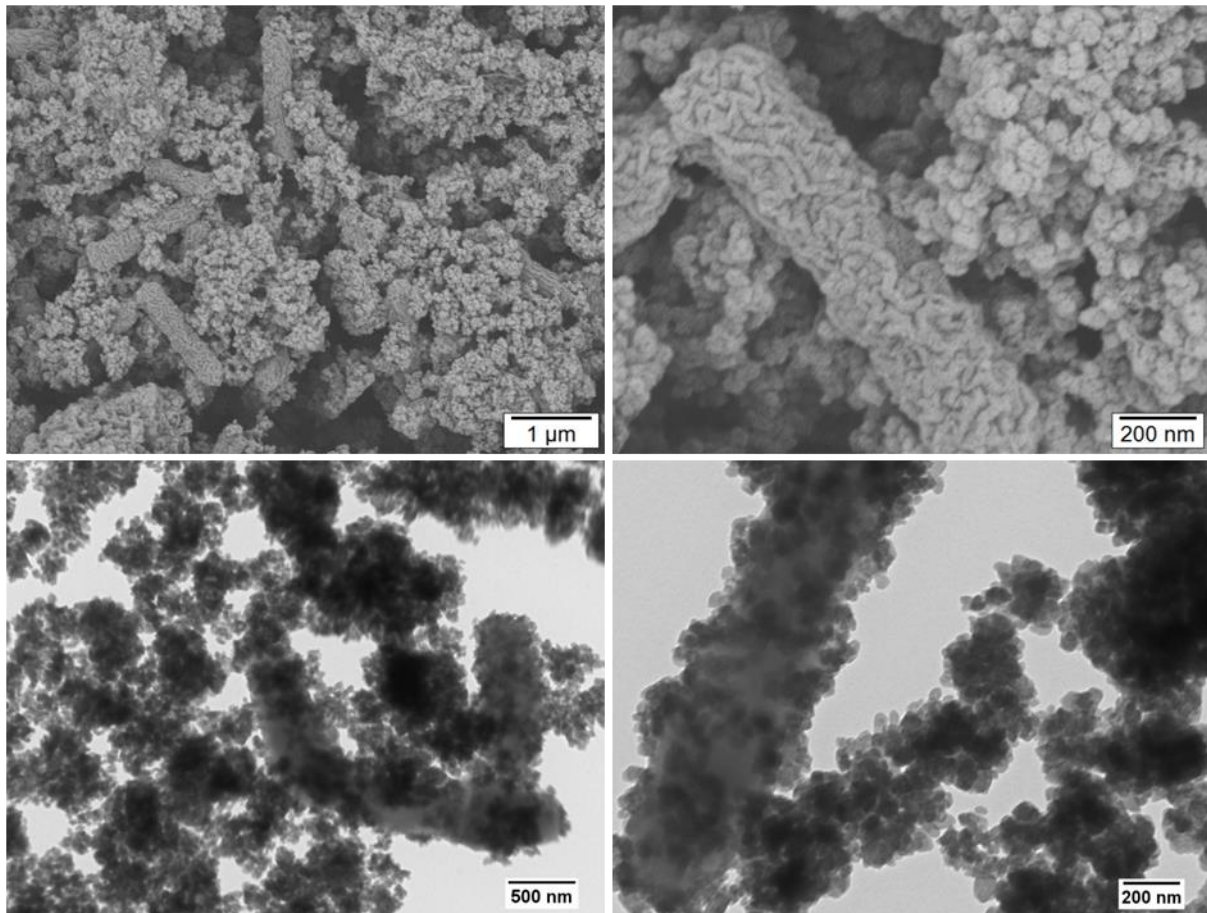
In den thermogravimetrischen Untersuchungen sind endotherme Signale für die Zersetzung des Calciumoxalat Monohydrats zum Calciumoxalat ( $201^\circ\text{C}$ ), dann zum Calciumcarbonat ( $455^\circ\text{C}$ ) und letztendlich zum Calciumoxid und Calciumhydroxid ( $694^\circ\text{C}$ ,  $790^\circ\text{C}$ ) zu beobachten. Während der Zersetzungsprozesse sind jeweils Masseverluste von 12.1% für den Verlust von Hydratwasser, von 18.3% für den Verlust von Kohlenstoffmonoxid und von 29.1% für den Verlust von Kohlenstoffdioxid festzustellen.



**Abbildung 8.8** Gekoppelte DSC-TG Analyse der Calciumoxalat Monohydrat Nanopartikeln.

### 8.3.2 Transformation der Calciumoxalat Monohydrat Nanopartikel in künstlichem Urin

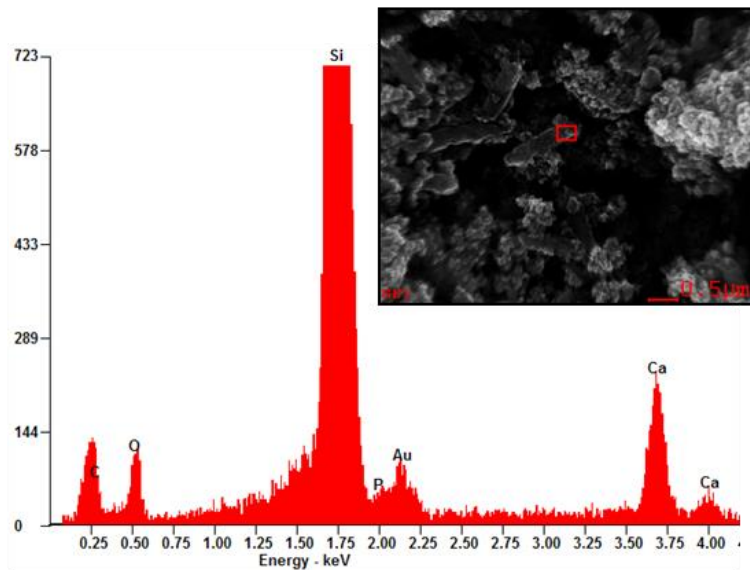
Der Bildungsmechanismus von Harn- und Nierensteinen ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Calciumoxalat ist dabei ein Hauptbestandteil von Harn- und Nierensteinen. Besonders Aggregate von Calciumoxalat Monohydrat mit anderen Kristallen, wie Calciumoxalat Dihydrat oder Calciumphosphaten, zusammen mit organischen Verbindungen wie Lipiden oder Biopolymeren sind in diesen Steinen vorzufinden. Aber vor allem die COM spielen eine tragende Rolle bei der Steinbildung.<sup>[197-199]</sup> Daher wurde die vorliegenden Studien durchgeführt, um das Verhalten von Calciumoxalat-Nanopartikel in Urin nach den Gesichtspunkten, wie der Agglomeration oder Transformation zu untersuchen und somit einen besseren Einblick in den Bildungsmechanismus zu gewinnen. Hierzu wurden die synthetisierten Nanopartikel für mehrere Stunden bzw. Tage in künstlichen Urin eingelegt (siehe Anhang Kapitel D.2). Der künstliche Urin entspricht annähernd der Zusammensetzung von normalem menschlichen Urins.<sup>[200]</sup> Nach der Aufreinigung der eingelegten Nanopartikel wurden diese mittels SEM, TEM, FT-IR-Spektroskopie und Pulverdiffraktometrie analysiert und charakterisiert.



**Abbildung 8.9** SEM (oben) und TEM (unten) Aufnahmen von Calciumoxalat-Nanopartikeln die für 3 Tage im künstlichen Urin eingelegt wurden.

Bereits nach einem Tag zeigte sich, dass eine Veränderung stattgefunden hat. Nach 3 Tage wurde diese Veränderung wie in Abbildung 8.9 noch deutlicher. Neben den Nanopartikeln sind stäbchenförmige Partikel im Mikrometerbereich zu erkennen. Ein Vergleich der Nanopartikel vor dem Einlegen in künstlichen Urin in Abbildung 8.4 und danach (Abbildung 8.9) zeigt besonders in den TEM Aufnahmen, dass die Nanopartikel nach dem Einlegen stärker agglomeriert sind.

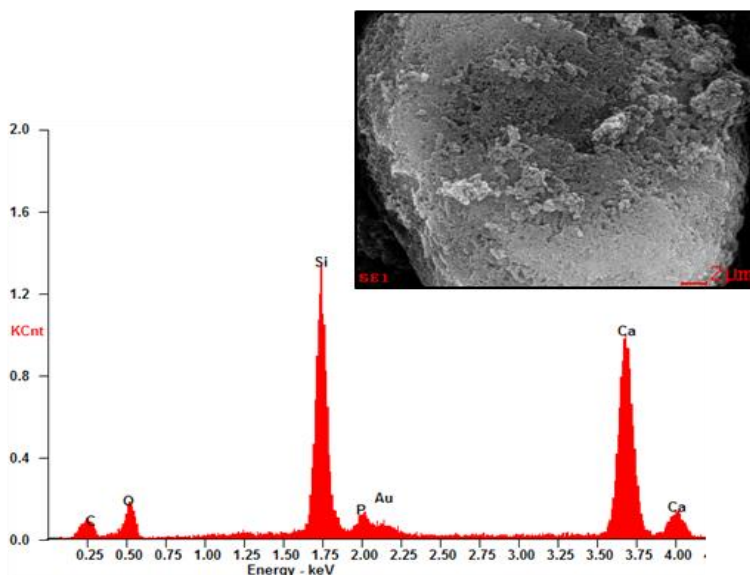
Eine EDX Messung auf einem Stäbchen in Abbildung 8.10 deutet an, dass es möglicherweise einer Umwandlung zu einer phosphathaltigen Verbindung gegeben hat, da ein kleines Signal für Phosphat vorhanden ist. Neben dem Phosphat-Reflex sind noch Signale für Silicium und Gold zu erkennen. Diese Signale kommen durch die Probenpräparation, da die Proben zur Messung auf einen Siliciumwafer aufgetragen und für eine bessere Auflösung mit Gold gesputtert wurden.



Element	Wt%	At%
CK	28.55	47.83
OK	08.40	10.57
SiK	54.74	39.22
PK	00.85	00.55
AuM	04.78	00.49
CaK	02.67	01.34

**Abbildung 8.10** EDX-Messung der in künstlichen Urin inkubierten Calciumoxalat-Nanopartikel.

An einer stark agglomerierten Stelle der Probe wird nochmal deutlich, dass eine phosphathaltige Verbindung vorhanden ist (Abbildung 8.11).



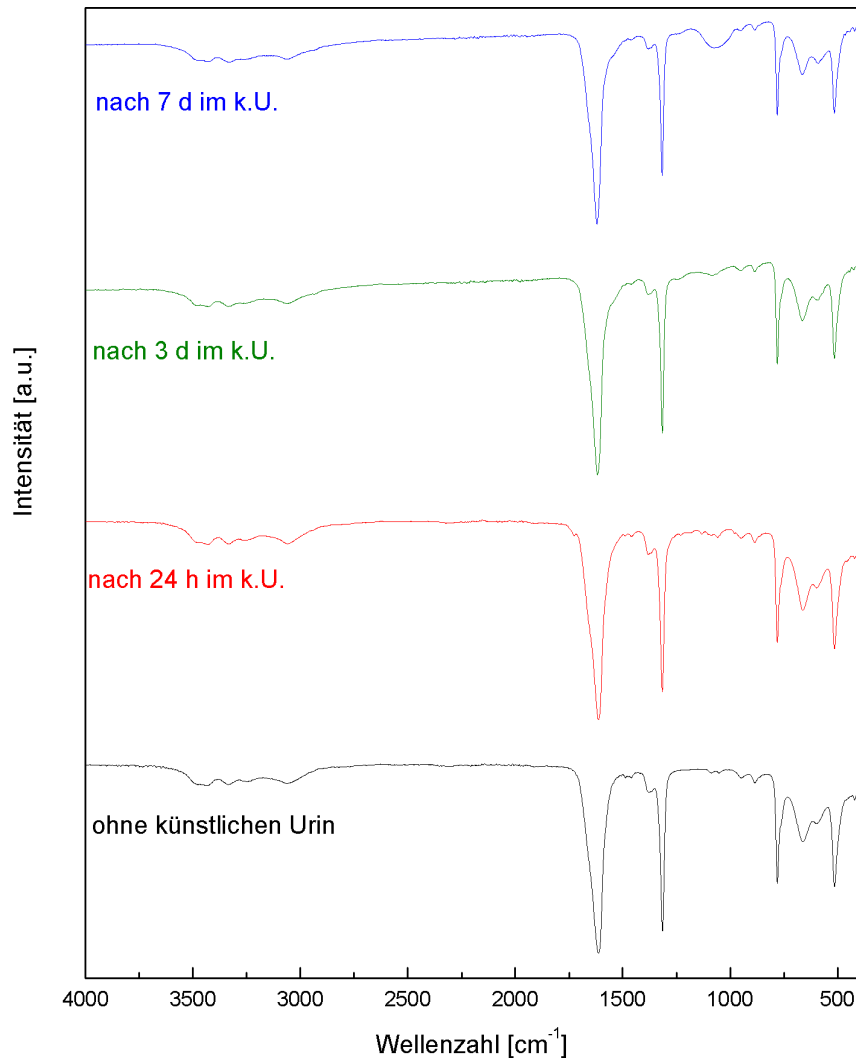
Element	Wt%	At%
CK	23.86	39.08
OK	27.50	33.82
SiK	21.75	15.23
PK	02.92	01.86
AuM	04.51	00.45
CaK	19.46	09.55

**Abbildung 8.11** EDX-Messung der in künstlichen Urin inkubierten Calciumoxalat-Nanopartikel.

In dem IR-Spektrum in Abbildung 8.12 ist zu beobachten, dass mit zunehmender Inkubationszeit im künstlichen Urin, eine zusätzliche breite Bande bei  $1069\text{ cm}^{-1}$  hinzukommt, die nach 24 Stunden sehr schwach, nach 3 Tagen zunehmend und nach 7 Tagen

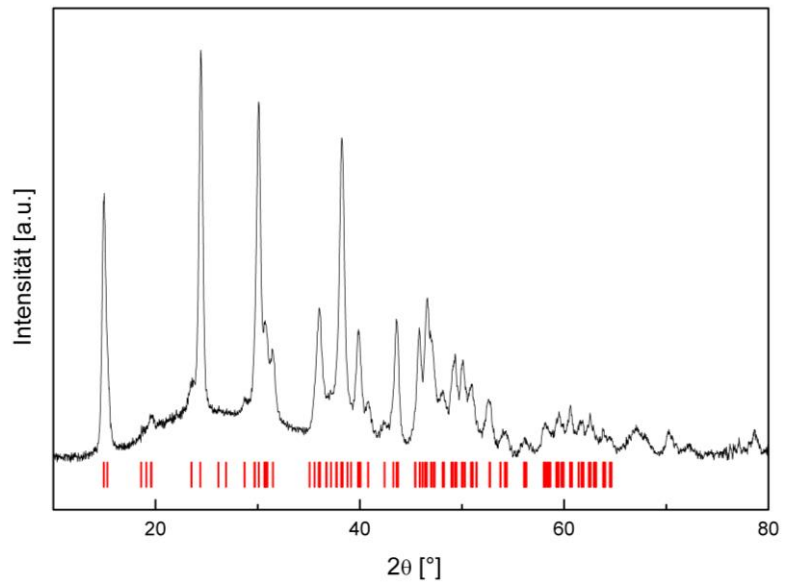
## CALCIUMOXALAT NANOPARTIKEL

deutlich zu erkennen ist. Vermutlich weist die Bande auf die Anwesenheit von Hydrogenphosphat Anionen ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) hin<sup>[201]</sup> und eine mögliche Umwandlung der Calciumoxalat-Nanopartikel zu Calciumhydrogenphosphat Stäbchen.



**Abbildung 8.12** IR-Spektroskopie der in künstlichen Urin (k.U.) eingelegten Calciumoxalat-Nanopartikel nach 1, 3 und 7 Tagen.

Dem Pulverdiffraktogramm in Abbildung 8.13 zufolge ist jedoch keine Veränderung durch das Einlegen in künstlichen Urin festzustellen. Auf den ersten Blick hin sind nur Reflexe von Calciumoxalat Monohydrat im Diffraktogramm zu erkennen. Vermutlich ist dennoch eine calciumhaltige Phosphatverbindung in dem Produkt enthalten, die amorph vorliegt und aufgrund der hohen Intensität des COM und der eigenen geringen Intensität im Untergrund nicht offensichtlich wird.



**Abbildung 8.13** Pulverdiffraktogramm der eingelegten CaOx-Nanopartikel in künstlichen Urin nach 7 Tagen.

### 8.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel durch Behandlung einer Ultraschallmethode Nanopartikel aus Calciumoxalat Monohydrat auf verschiedene Weise hergestellt werden. Während es im wässrigen Medium neben kleinen Nanopartikeln auch viele große Aggregate gab, erwies sich neben Methanol vor allem Ethylenglykol als ein geeignetes Lösungsmittel. Als besonders geeignet zeigte sich das Einsetzen von Oxalat-Vorläufern, die erst durch eine alkalische Hydrolyse das Oxalat zur Verfügung stellten und so eine homogenen Kristallisation von Nanokristallen aus Calciumoxalat Monohydrat ermöglichten.

Um das Verhalten der Nanopartikel im Urin zu testen, wurden diese in künstlichen Urin für mehrere Stunden bis Tage inkubiert und anschließend mit SEM, EDX, IR-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie untersucht. In den EDX Messungen stellte sich dabei heraus, dass vermutlich stellenweise eine Umwandlung des COM zu einer phosphathaltigen Verbindung vollzogen wurde. Mit dem Pulverdiffraktogramm konnte jedoch nur Calciumoxalat Monohydrat nachgewiesen werden. Im IR-Spektrum hingegen konnte eine breite Bande für vermutlich Hydrogenphosphat vorgefunden werden, was darauf spekulieren lässt, dass es sich möglicherweise um eine amorphe phosphathaltige Verbindung handelt.

Im folgenden Kapitel werden die hier hergestellten Nanopartikel zur Identifizierung von Peptiden eingesetzt, die spezifische Wechselwirkungen mit den Calciumoxalat-Nanopartikeln eingehen.



# 9

## Calciumoxalat spezifisch- bindende Peptide

### 9.1 Einleitung

Es wird angenommen, dass die pathologische Biomineralisation in Lebewesen durch die Wechselwirkung von Bestandteilen des Harns mit Kristallflächen reguliert wird.<sup>[202]</sup> Neben vielen anorganischen Verbindungen, sind auch organische Zusammensetzungen, Komponenten im Urin. Insbesondere Proteine und Glykosaminoglykane, die häufig eine Bindungsaffinität zu spezifischen Kristalloberflächen des Calciumoxalat Monohydrats zeigen, sind Bestandteile des Harns. Nicht selten hat diese Bindungsaffinität zwischen dem Protein und dem COM *in vivo* einen hemmenden Einfluss auf die Nukleation, das Kristallwachstum bzw. auf die Aggregation.<sup>[96,203,204]</sup> Ziel dieser Studie ist die Identifikation von Peptidsequenzen mit bevorzugter Adsorption auf Calciumoxalat-basierenden Materialien. Hierzu werden die aus Kapitel 8 hergestellten Calciumoxalat Monohydrat Nanopartikel mit einer Bibliothek aus vielen verschiedenen Phagen versetzt, um schlussendlich Peptidsequenzen mit hoher Affinität und günstiger Adsorption an den Nanopartikeln aufzuklären. Mit der *Phage Display* Methode sollen auf diesem Weg Peptide dargestellt werden, die besonders an COM haften und dessen Wachstum bzw. Aggregation vermeiden und somit die Bildung von Nierensteinen inhibieren.

## 9.2 Experimentelles

### 9.2.1 Reagenzien und Chemikalien

In allen Versuchen wurde ausschließlich mit demineralisiertem Wasser gearbeitet. Die Arbeiten wurden in einem sterilen Abzug durchgeführt. Die eingesetzten Reagenzien und Chemikalien wurden kommerziell von Sigma Aldrich und Carl Roth in analysereiner Form erworben und wurden als solche eingesetzt. Der *Escherichia Coli* Stamm ER 2738, *Ph.D.*<sup>TM</sup> 7 bzw. 12 *Phage Display Peptide Library* (Peptidbibliothek), der Ladepuffer *Gel Loading Dye Blue (6x)* und der DNA-Marker 1kb DNA Ladder wurden von der Firma New England Biolabs Inc.<sup>®</sup> geliefert. Der Sequenzierungs-Primer (96 *gIII-sequencing-primer* 5'-HOGCA ATG CGA TTG ATA CTC CCG-3') wurde von der Firma Biomers erstanden. Die zusammengesetzten Bestandteile der eingesetzten Nährmedien, Lösungen und Puffer sind in Tabelle 9.1 aufgeführt.

**Tabelle 9.1** Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien, Lösungen und Puffer.

LB Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl in H <sub>2</sub> O, pH 7.0 ± 0.2, Autoklaviert
Tetracyclin Stammlösung	20 mg/mL Tetracyclin in 1:1 Ethanol / H <sub>2</sub> O
IPTG/Xgal Stammlösung	1.25 g Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), 1 g 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (Xgal) in 25 mL Dimethylformamid
Top Agar	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 7 g/L Agar in H <sub>2</sub> O; Autoklaviert
LB-Agar-IPTG/Xgal-Platten	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 15 g/L Agar in H <sub>2</sub> O, Autoklaviert, + 1 mL IPTG/Xgal Stammlösung
TBS Puffer	50 mM Tris + 150 mM NaCl, pH 8.6
TBST Puffer	TBS + 0.1 % Tween, pH 8.5
TBS/Glycerin Puffer	50 % Glycerin in 2x TBS
TE Puffer	10 mM Tris, pH 8.0 + 1 mM EDTA
PEG/NaCl Puffer	20 % PEG8000 in 2.5 M NaCl

TAE Puffer (50x)	18.6 g/L EDTA, 60.1 g/L Eisessig und 242.3 g/L Tris in H <sub>2</sub> O
Übernachtkultur Medium	Einzelne <i>E. Coli</i> Kolonie in 10 mL L-Medium + 10 µL Tetracyclin-Stammlösung, 16 Stunden bei 37 °C inkubieren
Frischkultur Medium	10 mL LB Medium + 100 µL Übernachtkultur + 10 µL Tetracyclin-Stammlösung, 20 Minuten bei 37 °C inkubieren

Die Chemikalien zur Festphasen-Peptid-Synthese wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Acros, Iris Biotech, sowie VWR bezogen und, sofern nicht explizit angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet.

### 9.2.2 Biopanning

Die dazu notwendigen Calciumoxalat Monohydrat Nanopartikel wurden wie in Kapitel 8 beschrieben hergestellt. 10 mg der Nanopartikel wurden in 10 mL TBST Puffer suspendiert und im Ultraschallbad dispergiert. 100 µL der Suspension wurden entnommen und zentrifugiert (13300 U·min<sup>-1</sup>, 15 min). Das erhaltene Pellet wurde in 100 µL TBS Puffer resuspendiert, mit 10 µL der Phagen Bibliothek ( $2.0 \cdot 10^9$  Viren) versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat mit den bindenden Phagen zentrifugiert (13300 U·min<sup>-1</sup>, 15 min) und fünfmal mit TBST Puffer gewaschen. Zur Elution der bindenden Phagen wurde das gewaschene Pellet mit einer 100 µL 0.1 M EDTA Lösung mit pH 9 (alternativ auch 0.1 M NaAc Lösung, pH 9) versetzt, suspendiert, 30 Minuten bei 30 °C unter Schütteln inkubiert und danach zentrifugiert (13300 U·min<sup>-1</sup>, 15 min). Das Filtrat mit den gelösten Phagen wurde mit 1 mL LB-Medium versetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert.

### 9.2.3 Phagen-Amplifikation

Das aus dem Biopanning resultierende Phageneluat wurde mit 25 mL einer Frischkultur für 4.5 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler amplifiziert. Durch Zentrifugation (9000 U·min<sup>-1</sup>, 15 min) bei 4 °C wurden die *E. Coli* Bakterien ausgefällt, von den im Filtrat befindlichen amplifizierten Phagen abgetrennt und verworfen. Die Lösung mit den amplifizierten Phagen wurde mit 5 mL PEG/NaCl Puffer versetzt und über Nacht bei 4 °C ausgefällt. Das Phagen-Pellet wurde zentrifugiert (4 °C, 9000 U·min<sup>-1</sup>, 15 min), in 1 mL TBST Puffer resuspendiert

## CALCIUM OXALAT SPEZIFISCHE PEPTIDE

und abermals zentrifugiert (4 °C, 13300 U·min<sup>-1</sup>, 10 min). Der Überstand wurde entnommen und mit 200 µL PEG/NaCl Puffer für 30 Minuten bei 4 °C gefällt. Das Pellet wurde durch Zentrifugation vom Filtrat abgetrennt (13300 U·min<sup>-1</sup>, 10 min) und in 200 µL TBS/Glycerin Puffer resuspendiert.

### 9.2.4 Amplifikation einzelner Kolonien

Das aus der dritten bzw. fünften Biopanning Runde erhaltene Phageneluat wurde mit LB Medium zu verschiedenen Konzentrationen verdünnt. Jeweils 10 µL der Verdünnung wurden mit 190 µL des Frischkultur Mediums versetzt und 8 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur der Phagen-Bakterien mit 3 mL warmen Top Agar vereinigt, auf LB-Agar-IPTG/Xgal Platten ausplattiert und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Zur Amplifikation wurde eine einzelne Kolonie der Kulturplatte entnommen, mit 1 mL Frischkultur versetzt und für 4.5 Stunden auf dem Schüttler bei 37 °C amplifiziert. Das Filtrat wurde vom Rückstand abgetrennt (4 °C, 8000 U·min<sup>-1</sup>, 10 min), für 15 Minuten mit 500 µL PEG/NaCl Puffer ausgefällt, zentrifugiert (13300 U·min<sup>-1</sup>, 10 min), vom Bakterienüberstand befreit und in 100 µL TE Puffer resuspendiert.

### 9.2.5 DNA Extraktion der M13 Phage

Zur Extraktion der DNA wurden 90 µL der amplifizierten Kolonie 10 Minuten bei 0 °C inkubiert und danach mit 60 µL Phenol versetzt. Anschließend wurde dispergiert, dann zentrifugiert (13300 U·min<sup>-1</sup>, 10 min) und 80 µL der wässrigen Phase, in der sich die extrahierte DNA befand, entnommen. Diese wurde mit 5 µL NaAc Lösung (3 M) und 200 µL absolutem Ethanol behandelt und 45 Minuten bei 4 °C inkubiert. Das gefällte DNA Pellet wurde zentrifugiert, in 70%igem Ethanol resuspendiert, 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und zentrifugiert (13300 U·min<sup>-1</sup>, 10 min). Das Pellet wurde 1 Stunde bei RT getrocknet, mit 25 µL TE Puffer versetzt und bei 45 °C in Lösung gebracht. Quantifiziert wurde die DNA mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese und der UV-Vis-Spektroskopie bei 260 nm.

Zur Feststellung der DNA-Basensequenz wurde 6 µL des DNA Extraktes mit 1 µL Primer versetzt und der Firma Starseq<sup>®</sup> zur Sequenzierung weitergeleitet. Mit Hilfe der *serial cloner software* (SerialBasics<sup>®</sup>) wurden die Sequenzen in ihre korrespondierenden Peptidsequenzen übersetzt.

### 9.2.6 Festphasen Peptid Synthese

Die Synthesen aller Peptide wurden an einem mikrowellenunterstützten automatischen Peptid-Synthesizer „*Liberty*“ der Firma CEM hergestellt. Mit Hilfe der Fmoc-Schutzgruppen-Strategie wurden die Peptide an das dazugehörige Harz gekuppelt. Hierzu wurde das aminosäurebeladene Harz zuvor zum Quellen für 1 Stunde in DMF gegeben. Die Abspaltung der n-terminalen Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch Zugabe einer 5%igen Piperazinlösung in DMF. Zur Aktivierung des ungeschützten C-Terminus dienten vier Äquivalente *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat (HBTU) und Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat (Oxyma Pure) in DMF und zur Aktivierung des ungeschützten N-Terminus vier Äquivalente der Aktivatorbase *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA)-Lösung in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP). Das dabei eingesetzte Harz wurde zwischen allen Entschützungs- und Kupplungsschritten mit DMF und Dichlormethan (DCM) gewaschen.

Nach der Reaktion wurde das peptidbeladene Harz unter Vakuum filtriert und mit DCM gewaschen. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte durch Zugabe eines Cocktails aus Trifluoressigsäure, Wasser und Triispropylsilan im Verhältnis 95 : 2.5 : 2.5 für mehrere Stunden. Anschließend wurde das Harz durch Filtration vom Peptid, das sich im Filtrat befand, abgetrennt. In kaltem Diethylether wurde das Peptid ausgefällt, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Die Ausfällung des Peptids erfolgte noch zweimal in kaltem Diethylether, danach wurde das Peptid am Hochvakuum getrocknet.

## 9.3 Ergebnis und Diskussion

### 9.3.1 Syntheseroute – Biopanning und Amplifikation

Zur Identifizierung einer Peptidsequenz, die eine starke Affinität und eine spezifische Bindung zu Calciumoxalat Monohydrat (COM) hat, wurden *Phage Display* Selektionsrunden durchgeführt. Ziel dieser Experimente war es, Peptide mit einer Sequenz von sieben und zwölf Aminosäureeinheiten zu bestimmen. Dazu wurden randomisierte heptamer und dodecamer-Peptid-Bibliotheken mit einer Vielfalt von  $2 \cdot 10^9$  Klonen verwendet. Die Peptide dieser Bibliotheken werden am N-Terminus des pIII Proteins der M13 Bakteriophage präsentiert (siehe Abbildung 5.2 links, S.55). Um Wechselwirkungen der Klone mit dem Versuchsaufbau einzuschränken, wurde ausschließlich mit *LoBind-Eppendorf* Mikro-Reaktionsgefäßen gearbeitet. Als Target wurden Calciumoxalat-Nanopartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 35 nm eingesetzt. Diese Nanopartikel wurden in Kapitel 8 mit Hilfe einer Ultraschallmethode in Ethylenglykol aus Calciumchlorid Dihydrat und Dimethyloxalat hergestellt. Die Partikel wurde wie hergestellt eingesetzt.

Um Peptide mit spezifischen Bindungsaffinitäten zum COM zu identifizieren, wurden die COM Nanopartikel zuerst in einem TBS Puffer dispergiert. Der pH-Wert des TBS Puffer wurde auf pH 8.5 eingestellt, um eine Auflösung der Partikel bei einem geringeren pH zu vermeiden. Anschließend wurden die Partikel mit der jeweiligen Phagen Bibliothek für 30 Minuten inkubiert. Das anschließende Zentrifugieren und mehrmalige Waschen in TBST Puffer diente der Entfernung von ungebundenen oder nur sehr schwach bindenden Phagen. Um die bindenden Phagen von den Nanopartikel zu trennen, wurden zwei verschiedene Elutionsmittel verwendet. Zum einen wurde Natrium-Ethylendiamintetraacetat eingesetzt, um das COM aufzulösen und die Phagen dabei abtrennen zu können. Eine andere Methode zur Elution ist das Einsetzen von Natrium-Acetat. Dabei soll eine Bindung zwischen den Carboxylgruppen und dem COM entstehen und dadurch die bindenden Phagen vom COM verdrängt werden. Zur Elution wurde der Rückstand mit den bindenden Phagen und dem COM Nanopartikeln mit dem jeweiligen Elutionsmittel 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Phagen im Filtrat durch Zentrifugieren von den Nanopartikeln getrennt und nach jeder Runde mit einer Kultur aus *E.coli* ER 2738 Bakterien angeimpft. Insgesamt wurden fünf Selektionsrunden durchgeführt. Die mit den Phagen infizierten Bakterien, die eine funktionelle  $\beta$ -Galactosidase besitzen, konnten danach auf IPTG/Xgal Platten kultiviert und durch eine Blaufärbung identifiziert werden. Auf diese Weise konnten infizierte Bakterien

von nicht infizierten unterschieden werden, da die nicht infizierten auf der Kulturplatte farblos erschienen. Einzelne angefärbte Kolonien auf der Kulturplatte wurden ausgewählt und mit einer Kultur aus *E. coli* Bakterien (1:1000 verdünnt) für mehrere Stunden amplifiziert. Die im Filtrat befindlichen amplifizierten Phagen wurde durch Zentrifugieren von den Bakterien getrennt und mit PEG/NaCl ausgefällt. Für die Extraktion wurden die amplifizierten einzelsträngigen Phagen mit Phenol versetzt und aus der wässrigen Phase bei 4°C ausgefällt. Zur Quantifizierung wurde eine Agarose Gelelektrophorese und UV-Vis-Spektroskopie bei 260 nm durchgeführt. Die Ermittlung der korrespondierenden Peptidsequenzen erfolgte bei der Firma Starseq<sup>®</sup> und konnte im Anschluss mit der Software *serial cloner software* (SerialBasics<sup>®</sup>) übersetzt werden.

### 9.3.2 Selektierte Peptidsequenzen

In diesen Untersuchungen wurden Calciumoxalat-Nanopartikel als Zielmaterial eingesetzt, um Phagen Klone mit Heptamer und Dodecamer Peptiden zu exprimieren, die eine Bindungsaffinität zu COM aufzeigen, die mit Hilfe des *Phage Display* Verfahrens bestimmt werden können. In dem vorhergehenden beschriebenen Selektionsverfahren in Kapitel 9.3.1 wurden insgesamt fünf Runden zur Selektion durchgeführt. Nach der dritten und fünften Runde wurde jeweils eine Isolation und Sequenzierung einzelner Klone ausgeübt (Tabelle 9.2 und Tabelle 9.3). Die Benennung der Klone erfolgte nach der Anzahl der Peptide und nach der fortlaufenden Klonnummer.

#### *7er Phagen Bibliothek*

Bereits nach der dritten Runde, konnte eine Übereinstimmung in den Sequenzen gefunden werden. Die Sequenz SEVLFAA wurde zweimal beobachtet. Viele Peptidsequenzen, die aus der 7er Phagen Bibliothek erhalten wurden, enthalten einen Block aus hydrophoben (44% AS) und polaren Aminosäuren (32% AS). In einigen dieser Peptide sind zusätzlich noch ein bis drei basische Aminosäuren (17% AS) vorhanden. Saure Aminosäuren (7% AS) hingegen erscheinen nur sehr wenig in den Sequenzen. Das nur wenig geladene basische bzw. saure Aminosäuren auftauchen ist nicht verwunderlich, dies lässt sich mit dem Reproduktionsmechanismus der Phagen und den damit auftretenden Abstoßungserscheinungen erklären. Auffallend in allen Sequenzen ist die Aminosäure Threonin, die in fast jeder Sequenz erscheint. Threonin zeichnet sich als eine polare Aminosäure aus, die in ihrer Seitengruppen, wie Serin, eine Hydroxylgruppe trägt. Diese

## CALCIUM OXALAT SPEZIFISCHE PEPTIDE

Hydroxylgruppe könnte das Calcium Ion auf der Calciumoxalat Oberfläche koordinieren. Zwischen den einzelnen Peptidsequenzen lässt sich jedoch keine nennenswerte Korrelation und kein bestimmtes Muster bei der Selektion erkennen. Nach der dritten Runde konnten von den vier selektierten Peptiden, zwei übereinstimmende Peptide gefunden werden. Nach der fünften Selektionsrunde wurde ein sehr eindeutiges Ergebnis erhalten, ein bestimmtes Peptid mit der Sequenz WTNDPDL konnte mit einer Häufigkeit von 58% selektiert werden. Dieses Peptid konnte bereits nach der dritten Selektionsrunde schon einmal beobachtet werden. Weiterhin auffällig erscheint, dass das selektierte Peptid sowohl bei der Elution mit EDTA als auch mit Natriumacetat erhalten wurde. Dies könnte ein Hinweis für eine starke Affinität des Peptids zu den COM Nanopartikeln sein. Neben dem eben erwähnten, mehrfach auftretenden Peptid, konnten nach der fünften Runde auch andere Peptide mit einer erhöhten Frequenz von mindestens einer weiteren Wiederholung selektiert werden.

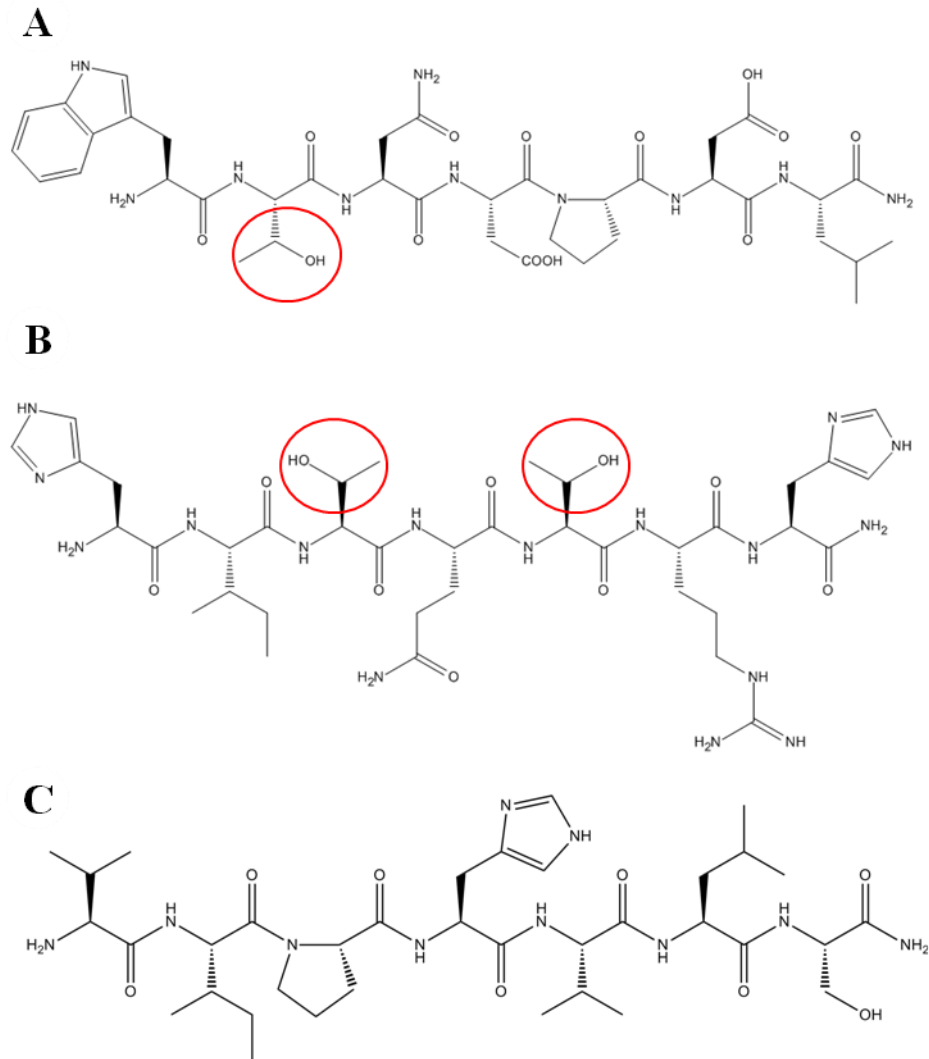
Um herauszufinden, ob die aus dem *Phage Display* erhaltenen Peptidsequenzen auch natürlich vorkommen, wurden diese Peptidsequenzen mit der *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)<sup>[205,206]</sup> Datenbank der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) abgeglichen.<sup>[207]</sup> Bei der Recherche der Hauptsequenz WTNDPDL in der BLAST Datenbank, konnte eine Übereinstimmung mit Sequenzen in der Acetyltransferase gefunden werden. Die Acetyltransferase ist in der Natur dafür zuständig die Acetylgruppen zu übertragen. Das zur Synthese der Nanopartikel verwendete Dimethyloxalat besteht aus zwei Acetoxygruppen, die Ähnlichkeiten zur Acetylgruppe aufweisen, sich jedoch durch ein zusätzliches Sauerstoffatom unterscheiden. Diese Übereinstimmung aus der Datenbank, könnte ein Hinweis auf eine spezifische Wechselwirkung des Peptids mit den Oxalat-Gruppen des Calciumoxalats sein. Die Sequenz aus der dritten Runde SEVFLAA wurde in der Datenbank als mutmaßliches metallbindendes Protein beschrieben, was ein Hinweis auf eine Calcium-Peptid-Wechselwirkung darstellen könnte.



**Tabelle 9.2** Selektierte siebener Peptidsequenzen erhalten aus der *Phage Display* Selektion an Calciumoxalat Monohydrat. Häufig auftretend in vielen Peptiden ist Threonin (rot markiert).

Klon	Selektionsrunde	Elutionsmittel	Peptidsequenz	Häufigkeit
7 Pep1	Dritte Runde	EDTA	S E V L F A A	2
7 Pep2	Dritte Runde	EDTA	H I T E T R H	1
7 Pep3	Dritte Runde	EDTA	W T N D P D L	1
7 Pep4	Fünfte Runde	EDTA / NaAc	W T N D P D L	E 9 / N 14
7 Pep5	Fünfte Runde	EDTA	A T S R G T E	2
7 Pep6	Fünfte Runde	EDTA	H I T E T R H	4
7 Pep7	Fünfte Runde	EDTA / NaAc	H A A T R S L	E 1 / N 1
7 Pep8	Fünfte Runde	EDTA / NaAc	T S T Y P P H	E 1 / N 1
7 Pep9	Fünfte Runde	EDTA	H I G Q R H I	1
7 Pep10	Fünfte Runde	EDTA	A L P P V L F	1
7 Pep11	Fünfte Runde	EDTA	T Q S Q I Y R	1
7 Pep12	Fünfte Runde	NaAc	W W K P T T V	1
7 Pep13	Fünfte Runde	NaAc	V I P H V L S	3

## CALCIUM OXALAT SPEZIFISCHE PEPTIDE



**Abbildung 9.1** Die am häufigsten selektierten Peptidsequenzen aus der 7er Peptid Bibliothek. (A) WTNDPDL, (B) HITETRH, (C) VIPHVLS, mit häufigem Auftreten von Threonin (rot markiert)

Mit zwei der Peptiden, die am häufigsten aufgetreten sind, wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt. Untersuchungen mittels SEM (siehe Anhang Abbildung E.1) zeigen jedoch nur geringe makroskopische Veränderungen. Um genauere Informationen über eine mögliche mikroskopische Veränderung zu erhalten, sind weitere Untersuchungen wie beispielsweise TEM, Lichtstreuungsexperimente oder Zeta-Potential Messungen notwendig. Weiterhin ist anzumerken, dass die synthetisierten Peptide nur als Modell gedient haben, da diese unter Umständen andere Eigenschaften aufweisen, als die aus der Selektion erhaltenen Peptide. Im Unterschied zu den synthetisierten Peptiden, liegen die Peptide aus dem *Phage Display* nicht „nackt“ vor, sondern hängen an einer Phage, die ebenfalls einen Einfluss haben könnte.

## *12er Phagen Bibliothek*

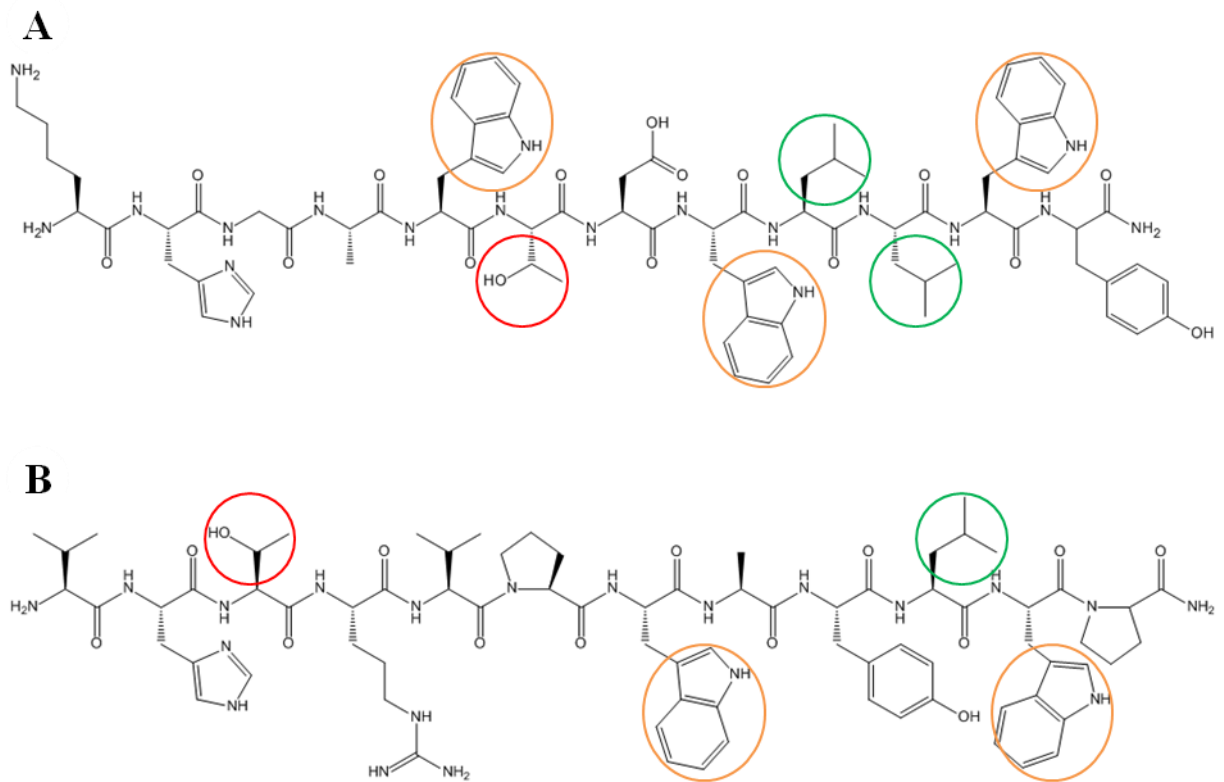
Nach der dritten Selektionsrunde der 12er Peptidsequenzen kann keine Selektion festgestellt werden, da keine identischen Peptide zu beobachten sind. Bei einem Vergleich aller Peptide untereinander fallen besonders die alkoholhaltigen Aminosäuren Serin und Threonin und die hydrophoben Aminosäuren Leucin, Prolin und Tryptophan auf, die in den meisten Sequenzen vorhanden sind. Auch wie schon bei den 7er Peptiden sind in vielen Sequenzen Blöcke aus Hydrophoben (43% AS) und polaren Aminosäuren (41% AS) festzustellen. Ebenfalls sind zumeist einzelne basische Aminosäuren (11% AS) zu entdecken und in etwa 50% der Sequenzen sind vereinzelt saure Aminosäuren (5%) vorhanden. Auch hier ist der Reproduktionsmechanismus der Phagen, wie bereits bei den 7er Sequenzen erwähnt, für das seltene Vorkommen von basischen und sauren Aminosäuren verantwortlich. Nach der fünften Runde konnten Sequenzen selektiert werden, die mehrfach erscheinen. Die Sequenz KHGAWTDWLLWY tritt von 17 Sequenzen sechsmal und die Sequenz VHTRVPWAYLWP von 17 Sequenzen fünfmal auf (Abbildung 9.2). Nach der fünften Selektionsrunde erscheint auffällig, dass die basische Aminosäure Histidin besonders häufig in vielen Sequenzen an der zweiten Position auftaucht. Ein Vergleich mit der BLAST Datenbank hat besonders bei den Hauptsequenzen keine eindeutige Übereinstimmung ergeben.

## CALCIUM OXALAT SPEZIFISCHE PEPTIDE

**Tabelle 9.3** Selektierte zwölf Peptidsequenzen erhalten aus der *Phage Display* Selektion an Calciumoxalat Monohydrat.\*

Klon	Selektionsrunde	Elutionsmittel	Peptidsequenz	Häufigkeit
12 Pep1	Dritte Runde	EDTA	N A P Q L K Q P K T T V	1
12 Pep2	Dritte Runde	EDTA	N A P Y M M N S L T P I	1
12 Pep3	Dritte Runde	EDTA	Q S S A S H N T I E T L	1
12 Pep4	Dritte Runde	EDTA	T P L K I E Q Q N P T N	1
12 Pep5	Dritte Runde	EDTA	K M Y H T S D H D W T P	1
12 Pep6	Dritte Runde	EDTA	N F S P M G P L I N H N	1
12 Pep7	Dritte Runde	EDTA	S A Y S W P L N L T R S	1
12 Pep8	Dritte Runde	EDTA	V D N K S Q K Y H N T S	1
12 Pep9	Dritte Runde	EDTA	D R M Y S I Q P A F P L	1
12 Pep10	Dritte Runde	EDTA	T T N M R F T L N E L Y	1
12 Pep11	Dritte Runde	EDTA	S G Y F L S G L H V D P	1
12 Pep12	Dritte Runde	EDTA	E P W P E S P K I A L H	1
12 Pep13	Dritte Runde	EDTA	T G T F N M F M T L W H	1
12 Pep14	Dritte Runde	EDTA	A V T W T S S S W N Q F	1
12 Pep15	Dritte Runde	NaAc	Y P F L S S P S T L Q P	1
12 Pep16	Fünfte Runde	EDTA	K H G A W T D W L L W Y	6
12 Pep17	Fünfte Runde	EDTA	V H T R V P W A Y L W P	5
12 Pep18	Fünfte Runde	EDTA	G S S Y L I R P S N M L	1
12 Pep19	Fünfte Runde	EDTA	N H S Y W L S W W S S L	1
12 Pep20	Fünfte Runde	EDTA	K H Y A L L E Y L T L W	1
12 Pep21	Fünfte Runde	EDTA	S H N R L W Q M F F P N	1
12 Pep22	Fünfte Runde	EDTA	A H R W M Y S E W L K W	1
12 Pep23	Fünfte Runde	EDTA	S Q V Y V T D L T I S Q	1

\*Farblich markierte Aminosäuren, sind besonders häufig auftretende Aminosäure mit rot für Threonin, blau für Serin, gelb für Tryptophan, grün für Serin und pink für Histidin.



**Abbildung 9.2** Die am häufigsten selektierten Peptidsequenzen erhalten aus der 12er Peptid Bibliothek. (A) KHGAWTDWLLWY, (B) VHTRVPWAYLWP. Die markierten Aminosäuren sind besonders häufig auftretende Aminosäuren, mit rot für Threonin, gelb für Tryptophan und grün für Leucin.

### 9.4 Zusammenfassung

Mithilfe der *Phage Display* Technologie konnten Peptidsequenzen mit einer 7er Einheit, bzw. einer 12er Einheit aus Aminosäuren an Calciumoxalat-Nanopartikeln gefunden werden. Besonders die drei Peptidsequenzen WTNDPDL, HITETRH und VIPHVLS und die zwei Sequenzen KHGAWTDWLLWY und VHTRVPWAYLWP konnten mit erhöhter Frequenz nach der fünften Panningrunde wiedergefunden werden. Das heißt, diese fünf Sequenzen zeigen eine starke Affinität zu den CaOx-Nanopartikeln. Auffällig erschien, dass die meisten Sequenzen die Aminosäure Threonin in ihrer Sequenz beinhalten, deren Hydroxylgruppe möglicherweise eine Wechselwirkung mit den Calcium-Ionen auf der Oberfläche der CaOx Kristalle eingeht. Um den genauen Einfluss der Peptide auf das Calciumoxalat weiter zu untersuchen wäre es sinnvoll, zukünftig eine Reihe von Kristallisationsexperimenten mit den Peptiden durchzuführen und deren Bindungsaffinität auf den CaOx-Partikel zu messen.

### **III Anhang**





# A

## Charakterisierungsmethoden

### A.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Untersuchungen am Transmissionselektronenmikroskop wurden mit einem EM 420 der Firma Phillips mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV und einem Auflösungsvermögen von bis zu 3.3 nm durchgeführt. Als Elektronenquelle diente eine Lanthanhexaborid-Kathode, die Bildaufnahme erfolgte mit einer Slow-Scan CCD-Kamera (1k · 1k). Um die Morphologie und die Partikelgrößen bestimmen zu können, wurden TEM-Aufnahmen von den Proben gemacht. Dazu wurde ein Teil der Partikel, die sich vor der Trocknung im Feinvakuum in einer ethanolischen Suspension befanden nochmals mit Ethanol verdünnt und eingesetzt. Es wurden 4 µl entnommen und auf ein mit Kohle beschichtetes Kupfernetz aufgetragen und luftgetrocknet.

### A.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Untersuchungen im Rasterelektronenmikroskop wurden mit einem *FEI Nova NanoSEM 630*, das mit einer Beschleunigungsspannung von 0.5- 30 kV arbeitet, durchgeführt. Damit ist es möglich, Morphologie und Partikelgröße einer Probe zu ermitteln. Dazu wurde die Probe aus einer Ethanol Suspension auf einen Silicium-Wafer aufgetragen und luftgetrocknet. Die Proben in pulvriger Form wurden auf einen leitenden Kohlenstoff-Pad aufgetragen. Anschließend wurden die Proben mit Gold mit einer Schichtdicke von 7.5 nm gesputtert.

## A.3 Röntgendiffraktometrie

Die Röntgenbeugungsuntersuchungen wurden mit einem *Bruker AXS D8 Discover* Zwei-Kreis-Diffraktometers durchgeführt. Die Proben, in Form von Pulver, wurden mit einer Vinylpyrrolidon / Vinylacetat Copolymer Lösung in Isopropanol auf einen Silicium- (111) oder Glaträger aufgetragen. Als Röntgenquelle wurde eine Cu-Anode mit  $K_{\alpha}$ -Strahlung und einem Graphit- Monochromator verwendet. Mit dem Detektor, einem 2D HiStar Flächendetektor, kann entweder in Transmission oder in Reflektion gemessen werden. Einzelaufnahmen wurden bei  $2\theta = 24^{\circ}, 34^{\circ}, 44^{\circ}, 54^{\circ}, 65^{\circ}, 74^{\circ}, 84^{\circ}$  (Detektorabstand von 150 mm und Öffnungswinkel Detektor  $\Delta(2\theta) = 35^{\circ}$ ) aufgenommen. Die Röntgenbeugungsmuster der einzelnen Aufnahmen wurden mit der Bruker AXS GADDS Software<sup>[208]</sup> integriert und mit Bruker EVA<sup>[209]</sup> vereinigt. Die aus Messungen erhaltenen Röntgen-Pulverdiffraktogramme wurden mit Hilfe der PDF-2-2004 Datenbank<sup>[210]</sup> unter Verwendung von Bruker AXS EVA<sup>[209]</sup> verglichen.

## A.4 Infrarotspektroskopie

Mit Hilfe eines Infrarot-Spektrometers von Bruker Alpha-P FT-IR mit Platinum-ATR (Dimant-Kristall, 1 Reflexion) wurden Spektren im Bereich von  $4000$  bis  $375\text{ cm}^{-1}$  mit je 24 Scans und einer Auflösung von  $4\text{ cm}^{-1}$  der Pulverprobe aufgezeichnet.

## A.5 Ramanspektroskopie

Die Spektren für die Ramanspektroskopie wurden bei Raumtemperatur an einem Horiba Jobin Yvon LabRAM HR (High Resolution) 800 Spektrometer mit einem Si-basierten Charge-Coupled Device (CCD)-Detektor (Peltier-gekühlt), einem integrierten Olympus BX41 Lichtmikroskop und einer automatisiert ausgestatteten x-y-Bühne aufgezeichnet. Die Spektren wurden im Bereich von  $1700$  bis  $150\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen. Die Messungen wurden mit einem 50x Fernobjektiv, einer Spaltbreite von  $100\text{ }\mu\text{m}$  und einer Laserspot-Größe von  $2 \times 2\text{ }\mu\text{m}$  durchgeführt. Zur Anregung wurde mit einem frequenzverdoppelten Nd-YAG-Laser ( $\lambda = 532\text{ nm}$ ) gearbeitet. Die Rayleigh Streuung wurde mit einem Kantenfilter blockiert und das Streulicht wurde von einem Gitter von  $1800$  Linien/mm verteilt. Alle Spektren wurden zweimal aufgezeichnet.

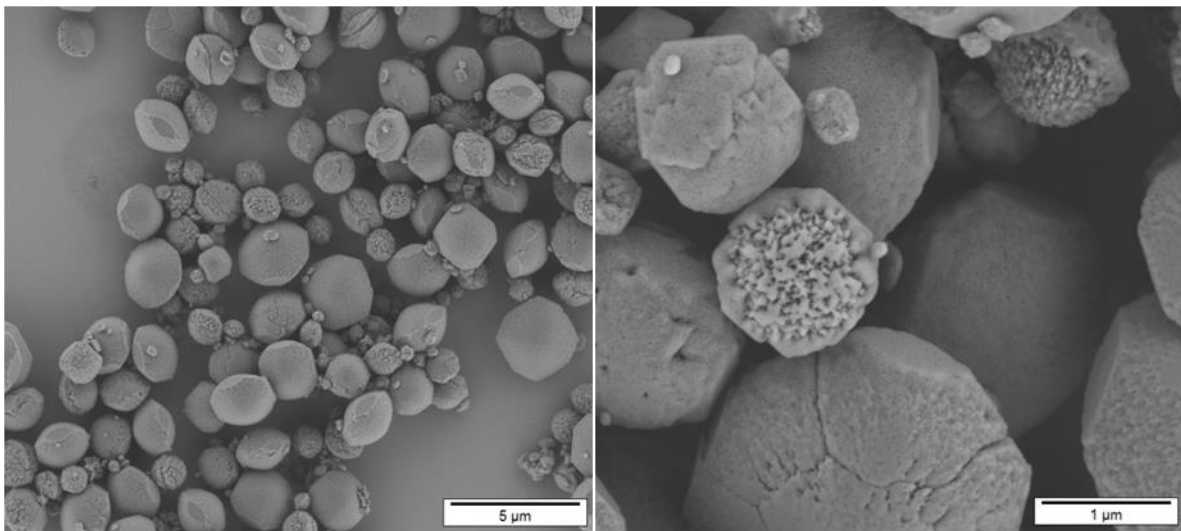
## A.6 Thermogravimetrie

Zur Messung der thermogravimetrischen Analyse (TGA) und der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) mit dem Gerät der Marke Netzsch Typ STA 449 F3 Jupiter, wurden zwischen 7-20 mg der Pulverprobe in einem Aluminiumoxid-Tiegel unter Argonatmosphäre von 25 °C auf 1000 °C erhitzt. Die Heizrate betrug dabei 10 K·min<sup>-1</sup>.

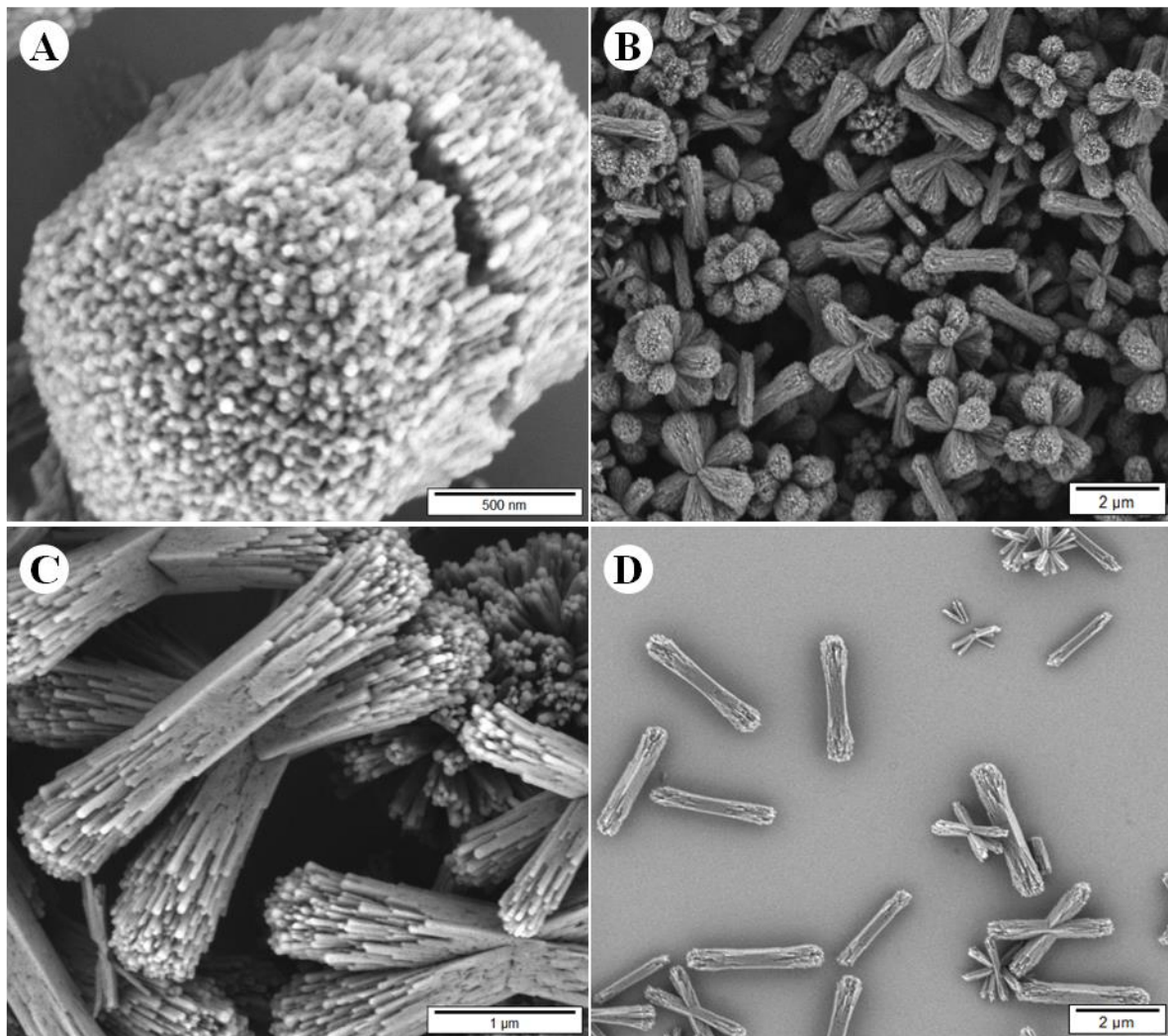


# B

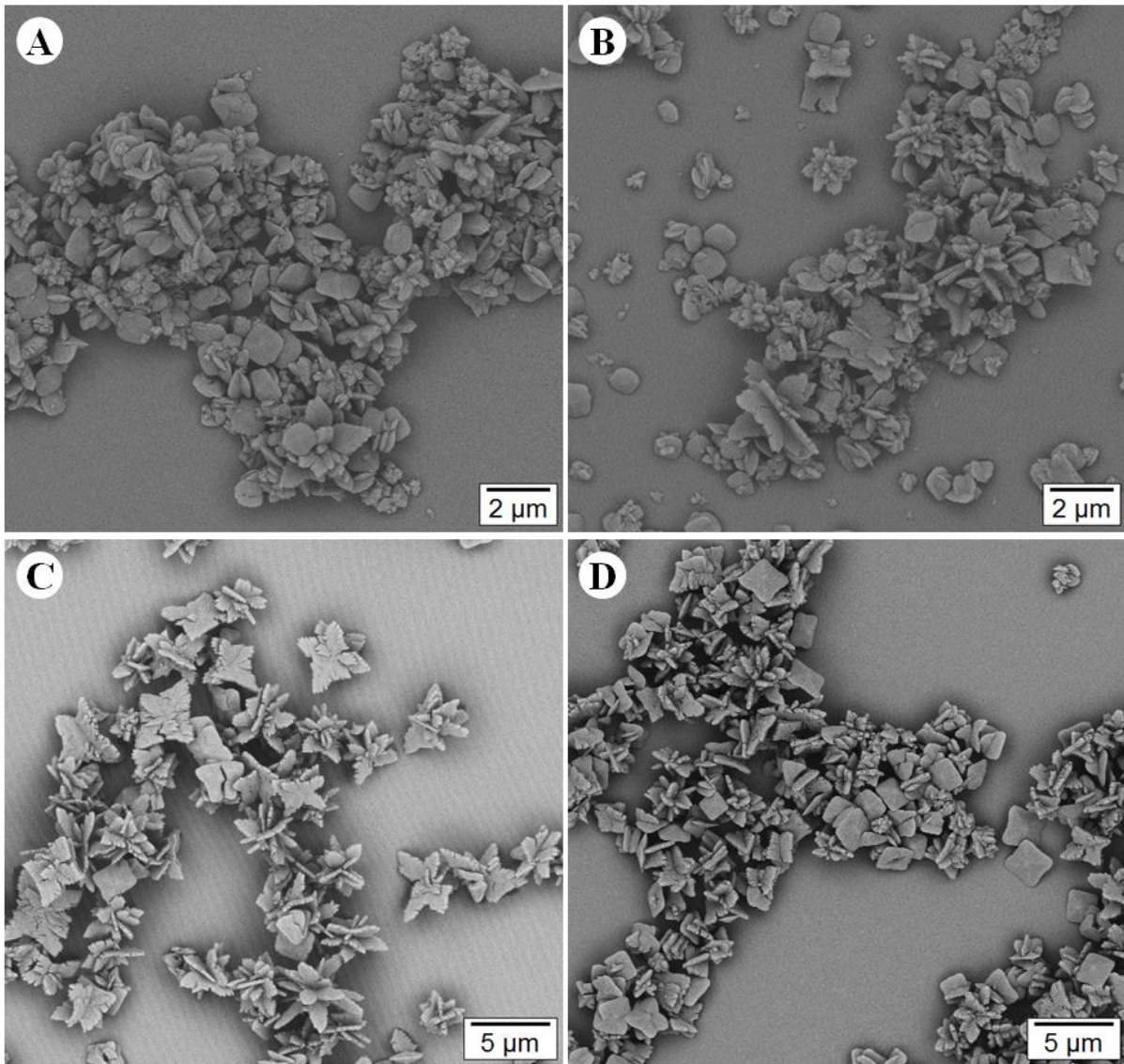
## Ergänzende Daten für Kapitel 6



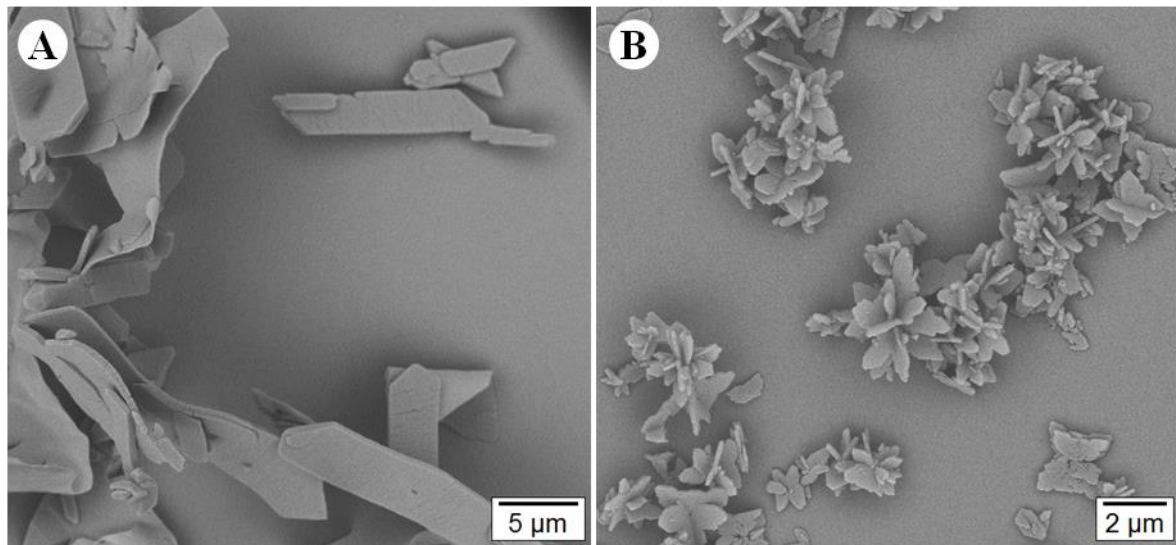
**Abbildung B.1** SEM Aufnahmen der Morphologie von Calciumoxalat in der Gegenwart von 0.45 mM PVPA und 2 mM CaOx.



**Abbildung B.2** SEM Aufnahmen der Morphologie von Calciumoxalat in der Gegenwart von (A) 1, (B) 2 und (C+D) 3 mM PVPA bei 2 mM CaOx.



**Abbildung B.3** Verkleinerter SEM Ausschnitt aus Abbildung 6.17 in Gegenwart von (A) PVAm 10.000, (B) PVAm 45.000 (C) PVAm 340.000 und (D) PAAm 15.000 mit jeweils 0.02 mM Polymer bei 2 mM CaOx.



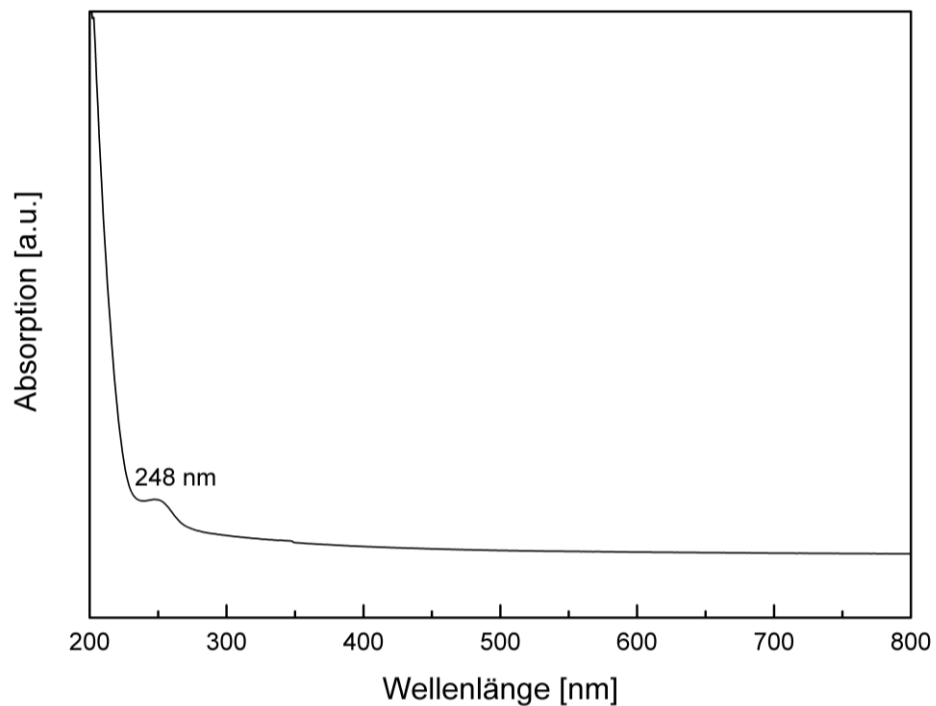
**Abbildung B.4** SEM Aufnahmen der Kristallisation von 2 mM COM-Kristallen in Abwesenheit von Additiven, gefällt mit den beiden anionischen Ausgangsverbindungen (A) DMOx (NaOH) und (B)  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .



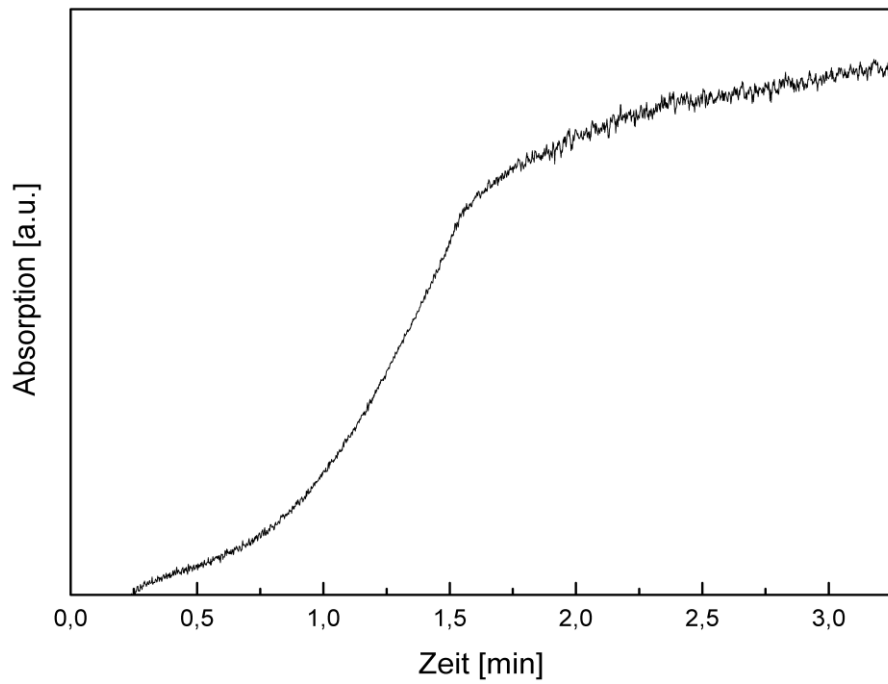
# C

## Ergänzende Daten für Kapitel 7

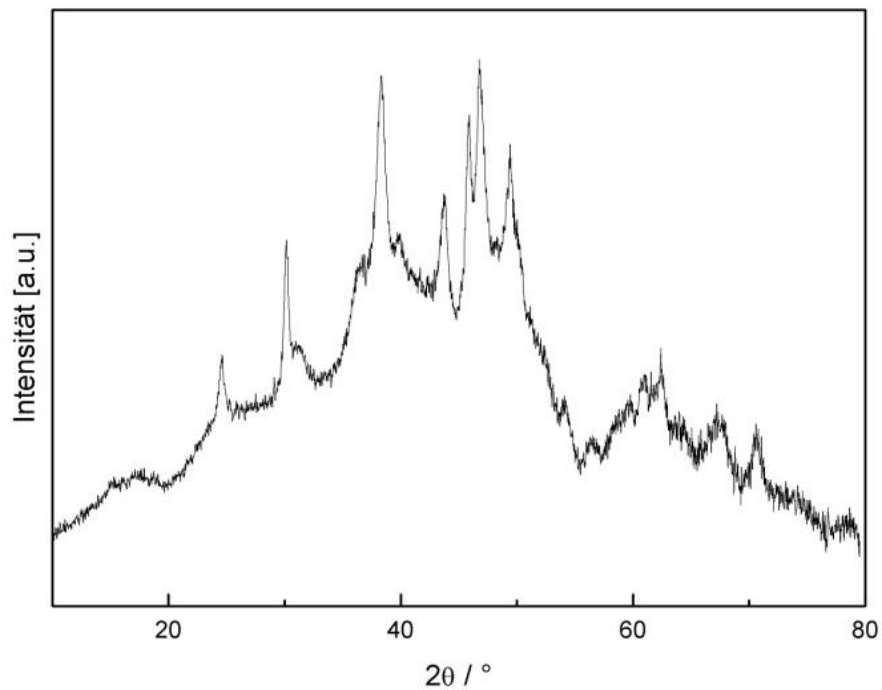
### C.1 UV-VIS Messung zur Bestimmung der Kristallisationszeit



**Abbildung C.1** UV-Vis Aufnahme des amorphen Calciumoxalats. Absorption der Carbonylgruppe bei 248 nm.



**Abbildung C.2** UV-Vis Aufnahme des amorphen Calciumoxalats bei 248 nm. Beginn der Fällung zwischen 30 Sekunden und 2 Minuten.

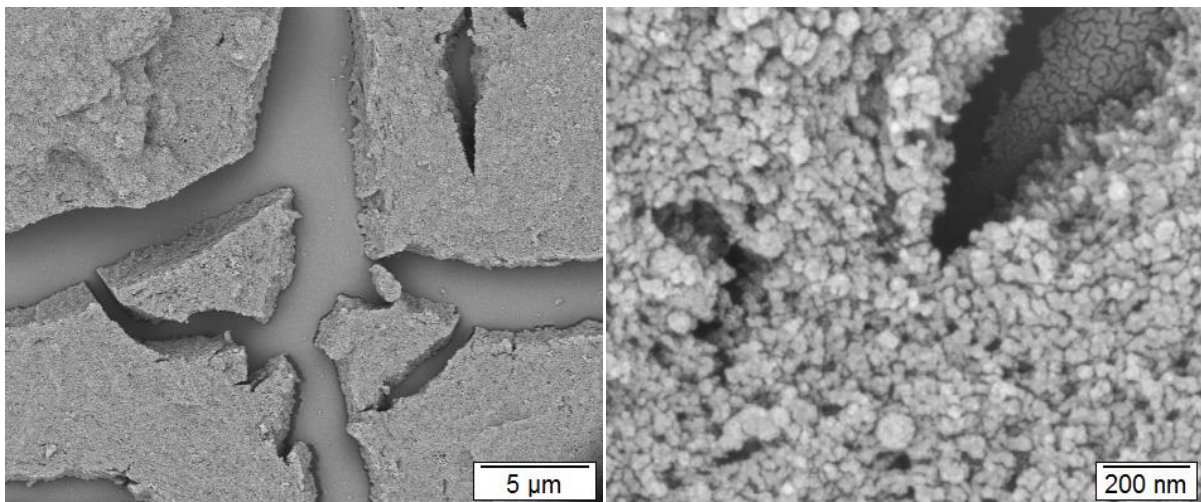


**Abbildung C.3** Pulverdiffraktogramm einer teilkristallinen Probe.

## C.2 Amorphes Calciumoxalat via Polymerzugabe

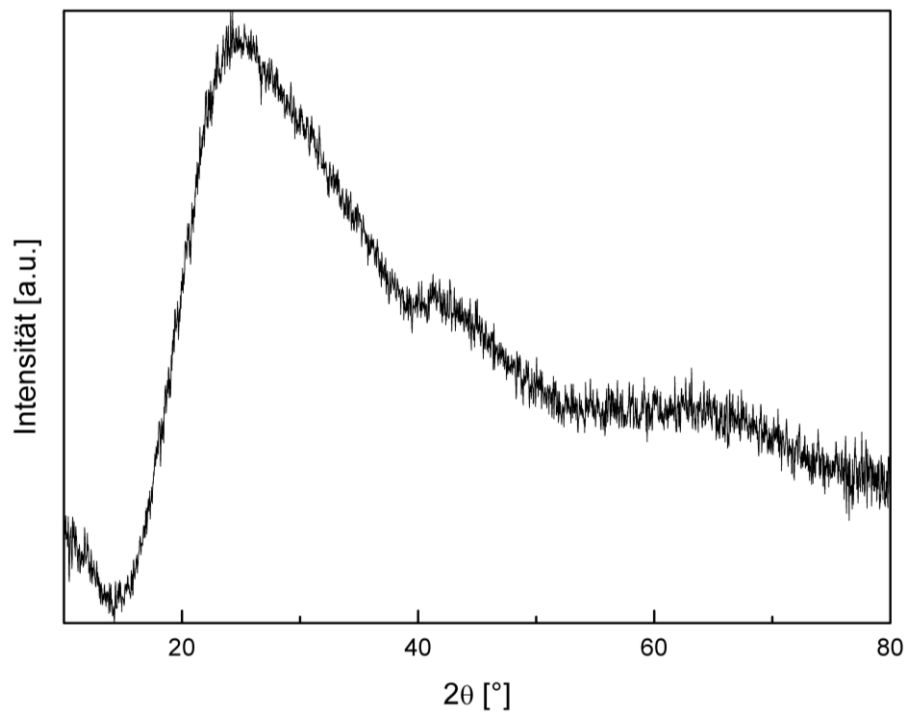
### *Synthesevorschrift von amorphem Calciumoxalat unter Zugabe von Polyvinylphosphonsäure*

Zur Synthese von amorphem Calciumoxalat in Gegenwart von Polyvinylphosphonsäure wurden 0.1 mmol Calciumchlorid Dihydrat und 0.1 mmol Dimethyloxalat in 50 mL Wasser bei Raumtemperatur gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine 1.0 mM wässrige Polyvinylphosphonsäure-Lösung hinzugefügt und für 20 Minuten miteinander verrührt. Durch Zugabe der wässrigen Basenlösung wurde die Reaktion gestartet. Die anschließende Aufreinigung erfolgt wie bereits in Kapitel II7.2.2 beschrieben.



**Abbildung C.4** SEM Aufnahmen eines amorphen Calciumoxalat Films gefällt im wässrigen Milieu in Gegenwart von 1.0 mM Polyvinylphosphonsäure.

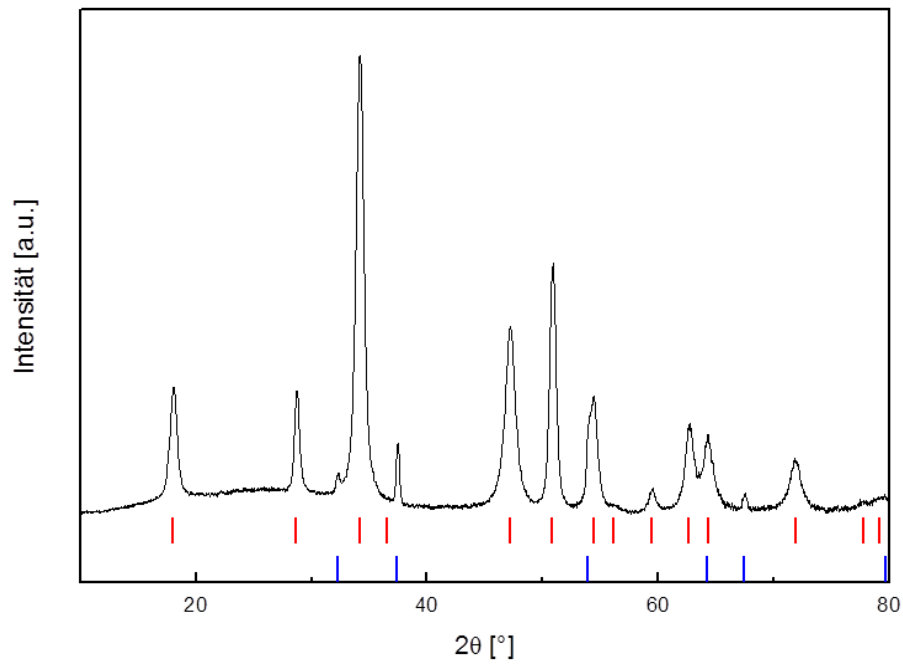
In den SEM Aufnahmen in Abbildung C.4 wird deutlich, dass wie schon beim amorphen Calciumoxalat in Kapitel 7, das in ethanolischem Lösungsmittel gefällt wurde, in Gegenwart von Polyvinylphosphonsäure ein Film aus Calciumoxalat erhalten wird. Eine nähere Betrachtung zeigt, dass es sich auch hierbei um kleine Nanopartikel handelt. Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie in Abbildung C.5 kann festgestellt werden, dass es sich bei dem gefällten Produkt um eine amorphe Variante des Calciumoxalats handelt.



**Abbildung C.5** Pulverdiffraktogramm des amorphen Calciumoxalats gefällt im wässrigen Milieu in Anwesenheit von PVPA.

# D

## Ergänzende Daten für Kapitel 8



**Abbildung D.1** Pulverdiffraktogramm der hergestellten CaO<sub>x</sub>-Nanopartikel nach der TG-DSC Analyse.

### D.1 Zusammensetzung künstlicher Urin

Der künstliche Urin wurde nach Chutipongtanate-Thongboonkerd<sup>[199]</sup> hergestellt. Hierzu wurden der Reihe nach 3,0029 g Harnstoff, 42.0 mg Harnsäure, 113.4 mg Creatinin, 367.4 mg  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 789.3 mg NaCl, 559.2 mg KCl, 200.3 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 110.4 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 59.9 mg  $\text{MgSO}_4$ , 41.8 mg  $\text{NaHCO}_3$ , 3.6 mg  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , 320.0 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 141.0 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 14.9 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 250 mL in demineralisiertem Wasser ( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) gelöst und bei  $25^\circ\text{C}$  mit HCl auf einen pH Wert von pH 6.1 eingestellt.

### D.2 Einlegen der COM Nanopartikel in künstlichen Urin

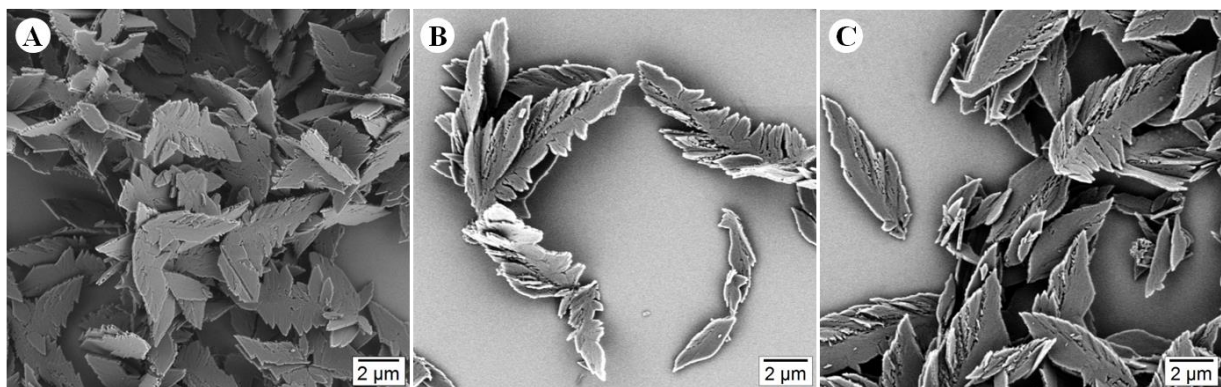
Die hergestellten Calciumoxalat-Nanopartikel aus Kapitel II8.2.2 wurden für jeweils 24 Stunden, 3 Tage und 7 Tage in künstlichen Urin in einer  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  Dispersion eingelegt und bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert, mit Wasser und Ethanol gewaschen und im Feinvakuum getrocknet.

# E

## Ergänzende Daten für Kapitel 9

### E.1 Kristallisationsexperimente mit verschiedenen 7er Peptiden

0.05 mmol  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  wurden in 25 mL Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden 2 mM des jeweiligen Peptids zugegeben und etwa 20 Minuten miteinander verrührt. Anschließend wurden 0.05 mmol  $\text{NaC}_2\text{O}_4$  zugegeben um die Reaktion zu starten. Zur Aufreinigung wurden die gefällten Kristalle zentrifugiert ( $9000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ , 15 min), mehrmals mit Wasser gewaschen und im Feinvakuum für 48 Stunden getrocknet.



**Abbildung E.1** SEM Aufnahmen der Kristallisation von Calciumoxalat mit den synthetisierten 7er Peptidsequenzen, erhalten aus dem *Phage Display* mit (A) ohne Peptid und mit den Peptiden (B) WTNDPDL und (C) VIPHVLS.

## E.2 Analytik der Peptide aus der Festphasenpeptidsynthese

## E.2.1 Peptid WTNDPDL

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein weißer Feststoff.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz), δ [ppm]: 0.81 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, 6 H), 1.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.1 Hz, 3 H), 1.44-1.58 (m, 3H), 1.77-2.08 (m, 4 H), 2.38-2.77 (m, 6 H), 3.02-3.07 (m, 2 H), 3.23-3.28 (m, 2H), 3.62-3.65 (m, 2 H), 3.99-4.02 (m, 1 H), 4.10-4.21 (m, 3 H), 4.37-4.42 (m, 2 H), 4.61 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 1 H), 4.82 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1 H), 6.95-7.37 (m, 8 H), 7.49 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, 1 H), 7.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1 H), 8.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1 H), 8.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, 1 H), 8.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.2 Hz, 1 H), 10.95 (s, 1 H).

**ESI-MS** (m/z) [M+H]<sup>+</sup> berechnet für C<sub>38</sub>H<sub>35</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub><sup>+</sup> 859.39, gefunden 859.32.

## E.2.2 Peptid VIPHVLS

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein weißer Feststoff.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz), δ [ppm]: 0.8-0.93 (m, 24 H), 1.47-1.64 (m, 5 H), 1.76-2.04 (m, 7 H), 2.94-3.12 (m, 2 H), 3.57-3.83 (m, 5 H), 4.14-4.20 (m, 2 H), 4.32-4.38 (m, 3 H), 4.62 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 1 H), 4.89 (s, 1 H), 7.10 (s, 1 H), 7.24 (s, 1 H), 7.35 (s, 1H), 7.68-7.77 (m, 2 H), 8.08 (s, 3 H), 8.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1 H), 8.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1 H), 8.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, 1 H), 8.85 (s, 1 H).

**ESI-MS** (m/z) [M+H]<sup>+</sup> berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>63</sub>N<sub>10</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> 763.48, gefunden 763.41.



## **IV Literaturverzeichnis**

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] T. Shippey, *Journal of Molecular Structure* **1980**, *63*, 157–166.
- [2] L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 153–169.
- [3] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On biomineralization*, Oxford Univ. Press, New York, **1989**.
- [4] S. Weiner, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2003**, *54*, 1–29.
- [5] C.-L. Chen, N. L. Rosi, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 1924–1942.
- [6] B. Ji, H. Gao, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* **2004**, *52*, 1963–1990.
- [7] S. Mann, *Biomineralization. Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*, Oxford Univ. Press, Oxford, **2005**.
- [8] K. Lee, W. Wagermaier, A. Masic, K. P. Kommareddy, M. Bennet, I. Manjubala, S.-W. Lee, S. B. Park, H. Cölfen, P. Fratzl, *Nat Comms* **2012**, *3*, 725.
- [9] L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman, S. Weiner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 980–987.
- [10] S. Weiner, L. Addadi, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2011**, *41*, 21–40.
- [11] A. L. Boskey, *Connect Tissue Res* **2003**, *44*, 5–9.
- [12] R. J. Wealthall, L. R. Brooker, D. J. Macey, B. J. Griffin, *J. Morphol.* **2005**, *265*, 165–175.
- [13] D. Gebauer, P. N. Gunawidjaja, J. Y. P. Ko, Z. Bacsik, B. Aziz, L. Liu, Y. Hu, L. Bergström, C.-W. Tai, T.-K. Sham et al., *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 8889–8891.
- [14] K. Naka, Y. Chujo, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3245–3259.
- [15] B. L. Smith, T. E. Schäffer, M. Viani, J. B. Thompson, N. A. Frederick, J. Kindt, A. Belcher, G. D. Stucky, D. E. Morse, P. K. Hansma, *Nature* **1999**, *399*, 761–763.
- [16] A. P. Jackson, J. F. V. Vincent, R. M. Turner, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **1988**, *234*, 415–440.
- [17] A. Thomas, *Earth-Science Reviews* **2005**, *71*, 77–93.
- [18] K. M. Towe, *Science* **1973**, *179*, 1007–1009.
- [19] R. Fortey, *Science* **2003**, *301*, 1689.
- [20] A. Becker, U. Bismayer, M. Epple, H. Fabritius, B. Hasse, J. Shi, A. Ziegler, *Dalton Trans.* **2003**, 551–555.

- [21] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On biomineralization*, Oxford Univ. Press, New York, **1989**.
- [22] M. A. Meyers, P.-Y. Chen, A. Y.-M. Lin, Y. Seki, *Progress in Materials Science* **2008**, *53*, 1–206.
- [23] R. Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tab*, Thieme, Stuttgart, **2012**.
- [24] W. Traub, T. Arad, S. Weiner, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, *86*, 9822–9826.
- [25] J. Piper, *Diatom Research* **2011**, *26*, 57–72.
- [26] J. Aizenberg, *Science* **2005**, *309*, 275–278.
- [27] P. Fratzl, *Journal of The Royal Society Interface* **2007**, *4*, 637–642.
- [28] D. Faivre, D. Schüler, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4875–4898.
- [29] A. Fischer, M. Schmitz, B. Aichmayer, P. Fratzl, D. Faivre, *Journal of The Royal Society Interface* **2011**, *8*, 1011–1018.
- [30] R. B. Frankel, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2003**, *54*, 95–114.
- [31] G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Science* **1996**, *271*, 67–69.
- [32] A. Krasko, B. Lorenz, R. Batel, H. C. Schröder, I. M. Müller, W. E. G. Müller, *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 4878–4887.
- [33] F. Natalio, T. P. Corrales, M. Panthofer, D. Schollmeyer, I. Lieberwirth, W. E. G. Müller, M. Kappl, H.-J. Butt, W. Tremel, *Science* **2013**, *339*, 1298–1302.
- [34] M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K.-Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nat Mater* **2003**, *2*, 577–585.
- [35] M. D. Roy, S. K. Stanley, E. J. Amis, M. L. Becker, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1830–1836.
- [36] C. Göltner, H. Cölfen, M. Antonietti, *Chem. Unserer Zeit* **1999**, *33*, 200–205.
- [37] K. Naka (Ed.) *Topics in Current Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, **2007**.
- [38] W. Kleber, H.-J. Bautsch, J. Bohm, *Einführung in die Kristallographie*, Verl. Technik, Berlin, **1998**.
- [39] J. W. Mullin, *Crystallization*, Elsevier professional, **2001**.
- [40] D. Gebauer, H. Cölfen, *Nano Today* **2011**, *6*, 564–584.
- [41] H. Cölfen, S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2350–2365.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [42] J. Čejka, A. Corma, S. Zones (Eds.) *Zeolites and Catalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2010**.
- [43] M. Niederberger, H. Cölfen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3271.
- [44] R.-Q. Song, H. Cölfen, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 1249.
- [45] K. Sangwal, *Additives and crystallization Processes. From fundamentals to applications*, Wiley, Chichester, **2007**.
- [46] L. B. Gower, D. J. Odom, *Journal of Crystal Growth* **2000**, *210*, 719–734.
- [47] J. Anwar, P. K. Boateng, R. Tamaki, S. Odedra, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 1596–1600.
- [48] M. J. Olszta, E. P. Douglas, L. B. Gower, *Calcified Tissue International* **2003**, *72*, 583–591.
- [49] J. Nývlt, J. Ulrich, *Admixtures in crystallization*, VCH, Weinheim, New York, **1995**.
- [50] J. Titiloye, S. Parker, S. Mann, *Journal of Crystal Growth* **1993**, *131*, 533–545.
- [51] F. C. Meldrum, S. T. Hyde, *Journal of Crystal Growth* **2001**, *231*, 544–558.
- [52] A. Mucci, J. W. Morse, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1983**, *47*, 217–233.
- [53] Golovanova O. A., Punin Yu. O., Vysotskiy A.S., Khannanov V.R., *Chemistry for Sustainable Development*, 2011, 463–470.
- [54] M. LIEBMAN, G. COSTA, *The Journal of Urology* **2000**, *163*, 1565–1569.
- [55] D. Zhang, L. Qi, J. Ma, H. Cheng, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2450–2457.
- [56] E. Akyol, M. Öner, *Journal of Crystal Growth* **2007**, *307*, 137–144.
- [57] E. Akyol, A. Bozkurt, M. Öner, *Polym. Adv. Technol.* **2006**, *17*, 58–65.
- [58] J. Yu, H. Tang, B. Cheng, X. Zhao, *Journal of Solid State Chemistry* **2004**, *177*, 3368–3374.
- [59] J. Yu, H. Tang, B. Cheng, *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *288*, 407–411.
- [60] L. Wang, W. Zhang, S. R. Qiu, W. J. Zachowicz, X. Guan, R. Tang, J. R. Hoyer, J. J. de Yoreo, G. H. Nancollas, *Journal of Crystal Growth* **2006**, *291*, 160–165.
- [61] B. Grohe, J. O’Young, A. Langdon, M. Karttunen, H. A. Goldberg, G. K. Hunter, *Cells Tissues Organs* **2011**, *194*, 176–181.

- [62] V. R. Franceschi, P. A. Nakata, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, *56*, 41–71.
- [63] A. Frey-Wyssling, *American Journal of Botany* **1981**, *68*, 130–141.
- [64] M. Daudon, D. Bazin, G. André, P. Jungers, A. Cousson, P. Chevallier, E. Véron, G. Matzen, *J Appl Crystallogr* **2009**, *42*, 109–115.
- [65] T. Echigo, M. Kimata, A. Kyono, M. Shimizu, T. Hatta, *Mineral. Mag.* **2005**, *69*, 77–88.
- [66] A. Millan, *Crystal Growth & Design* **2001**, *1*, 245–254.
- [67] G. Schubert, B. Ziemer, *Krist. Techn.* **1981**, *16*, 1025–1031.
- [68] S. Deganello, *Acta Crystallogr B Struct Crystallogr Cryst Chem* **1981**, *37*, 826–829.
- [69] H. J. Arnott, M. A. Webb, *Int. J Plant Sci.* **2000**, *161*, 133–142.
- [70] D. Aquilano, M. Franchini-Angela, *Phys Chem Minerals* **1981**, *7*, 124–129.
- [71] A. Cody, R. Cody, *Journal of Crystal Growth* **1987**, *83*, 485–498.
- [72] O. Söhnel, F. Grases, *Advances in Colloid and Interface Science* **1995**, *59*, 1–17.
- [73] M. Franchini-Angela, D. Aquilano, *Journal of Crystal Growth* **1979**, *47*, 719–726.
- [74] C. Conti, L. Brambilla, C. Colombo, D. Dellasega, G. D. Gatta, M. Realini, G. Zerbi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 14560.
- [75] A. Thomas, E. Rosseeva, O. Hochrein, W. Carrillo-Cabrera, P. Simon, P. Duchstein, D. Zahn, R. Kniep, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 4000–4009.
- [76] M. Deepa, K. Rajendra Babu, V. K. Vaidyan, *J Mater Sci Lett* **1995**, *14*, 1321–1322.
- [77] Basso R, Lucchetti G, Zefiro L, Palenzona A, *Neues Jahrbuch für Mineralogie Monatshefte* **1997**, 84–96.
- [78] W. M. Heijnen, *Journal of Crystal Growth* **1982**, *57*, 216–232.
- [79] M. Donnet, N. Jongen, J. Lemaître, P. Bowen, *Journal of Materials Science Letters* **2000**, *19*, 749–750.
- [80] D. Aquilano, M. Franchini-Angela, *Journal of Crystal Growth* **1985**, *73*, 558–562.
- [81] F. Grases, A. Llobera, *Micron* **1998**, *29*, 105–111.
- [82] A. Hesse, E. Brändle, D. Wilbert, K.-U. Köhrmann, P. Alken, *European Urology* **2003**, *44*, 709–713.
- [83] M. Afzal, M. Iqbal, H. Ahmad, *Journal of Thermal Analysis* **1992**, *38*, 1671–1682.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [84] M. Daudon, C. Hennequin, B. Lacour, G. Moel, R. Donsimoni, S. Fellahi, M. Paris, S. Troupel, *Urol. Res.* **1995**, *23*, 319–326.
- [85] S. R. Khan, *World J Urol* **1997**, *15*, 236–243.
- [86] J. A. Wesson, M. D. Ward, *Elements* **2007**, *3*, 415–421.
- [87] W. H. Boyce, *The American Journal of Medicine* **1968**, *45*, 673–683.
- [88] S. Aggarwal, C. Tandon, M. Forouzandeh, S. K. Singla, R. Kiran, R. K. Jethi, *Indian J. Biochem. Biophys.* **2005**, *42*, 113–117.
- [89] D. R. Basavaraj, C. S. Biyani, A. J. Browning, J. J. Cartledge, *EAU-EBU Update Series* **2007**, *5*, 126–136.
- [90] L. H. Smith, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **2002**, *113*, 1–20.
- [91] X. Sheng, *Journal of the American Society of Nephrology* **2005**, *16*, 1904–1908.
- [92] Jie-Yu He, Sui-Ping Deng, Jian-Ming Ouyang, *IEEE Trans. on Nanobioscience* **2010**, *9*, 156–163.
- [93] K. P. Aggarwal, S. Narula, M. Kakkar, C. Tandon, *BioMed Research International* **2013**, *2013*, 1–21.
- [94] M. Tsujihata, *International Journal of Urology* **2008**, *15*, 115–120.
- [95] F. Grases, A. Millan, A. Garcia-Raso, *Journal of Crystal Growth* **1988**, *89*, 496–500.
- [96] B. Grohe, B. P. H. Chan, E. S. Sørensen, G. Lajoie, H. A. Goldberg, G. K. Hunter, *Urol Res* **2011**, *39*, 327–338.
- [97] X. Sheng, T. Jung, J. A. Wesson, M. D. Ward, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 267–272.
- [98] V. R. Franceschi, H. T. Horner, *Bot. Rev* **1980**, *46*, 361–427.
- [99] N. Bouropoulos, S. Weiner, L. Addadi, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1881–1888.
- [100] G. M. Volk, V. J. Lynch-Holm, T. A. Kostman, L. J. Goss, V. R. Franceschi, *Plant Biology* **2002**, *4*, 34–45.
- [101] M. Tanaka, T. Nakashima, K. Mori, *Engei Gakkai zasshi* **2003**, *72*, 457–459.
- [102] P. A. Nakata, *Plant Science* **2003**, *164*, 901–909.
- [103] Webb, *Plant Cell* **1999**, *11*, 751–761.
- [104] H. He, T. M. Bleby, E. J. Veneklaas, H. Lambers, J. Kuo, *Annals of Botany* **2012**, *109*, 887–896.

- [105] M. A. Webb, J. M. Cavaletto, N. C. Carpita, L. E. Lopez, H. J. Arnott, *Plant J* **1995**, *7*, 633–648.
- [106] S. V. Pennisi, D. B. McConnell, L. B. Gower, M. E. Kane, T. Lucansky, *New Phytol* **2001**, *150*, 111–120.
- [107] K. L. Korth, *PLANT PHYSIOLOGY* **2006**, *141*, 188–195.
- [108] M. L. Salinas, T. Ogura, L. Soffchi, *Contact Dermatitis* **2001**, *44*, 94–96.
- [109] R. F. Evert, K. Esau, *Esau's Pflanzenanatomie. Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen - ihre Struktur, Funktion und Entwicklung*, de Gruyter, Berlin, **2009**.
- [110] G. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315–1317.
- [111] S. S. Sidhu, *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 57–63.
- [112] D. J. Rodi, L. Makowski, *Current Opinion in Biotechnology* **1999**, *10*, 87–93.
- [113] L. R. Krumpe, T. Mori, *Int J Pept Res Ther* **2006**, *12*, 79–91.
- [114] A. Christmann, Univ, Göttingen, Göttingen, **2004**.
- [115] V. J. B. Ruijgrok, M. Levisson, M. H. M. Eppink, H. Smidt, J. van der Oost, *Biochem. J.* **2011**, *436*, 1–13.
- [116] J. Graw (Ed.) *Springer-Lehrbuch*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2010**.
- [117] J. X. Huang, S. L. Bishop-Hurley, M. A. Cooper, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2012**, *56*, 4569–4582.
- [118] K. Li, Y. Chen, S. Li, H. G. Nguyen, Z. Niu, S. You, C. M. Mello, X. Lu, Q. Wang, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1369–1377.
- [119] C.-Y. Chiang, C. M. Mello, J. Gu, E. C. C. M. Silva, K. J. Van Vliet, A. M. Belcher, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 826–832.
- [120] K. T. Nam, *Science* **2006**, *312*, 885–888.
- [121] S.-W. Lee, B. M. Wood, A. M. Belcher, *Langmuir* **2003**, *19*, 1592–1598.
- [122] J. W. Kehoe, B. K. Kay, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4056–4072.
- [123] L. Riechmann, P. Holliger, *Cell* **1997**, *90*, 351–360.
- [124] K. T. Nam, R. Wartena, P. J. Yoo, F. W. Liao, Y. J. Lee, Y.-M. Chiang, P. T. Hammond, A. M. Belcher, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 17227–17231.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [125] K. N. Avery, J. E. Schaak, R. E. Schaak, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2176–2178.
- [126] A. M. Belcher, S. R. Whaley, D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, *Nature* **2000**, *405*, 665–668.
- [127] S.-W. Lee, *Science* **2002**, *296*, 892–895.
- [128] G. Ahmad, M. B. Dickerson, Y. Cai, S. E. Jones, E. M. Ernst, J. P. Vernon, M. S. Haluska, Y. Fang, J. Wang, G. Subramanyam et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4–5.
- [129] K. T. Nam, B. R. Peelle, S.-W. Lee, A. M. Belcher, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 23–27.
- [130] S.-W. Lee, A. M. Belcher, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 387–390.
- [131] C. Mao, C. E. Flynn, A. Hayhurst, R. Sweeney, J. Qi, G. Georgiou, B. Iverson, A. M. Belcher, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 6946–6951.
- [132] C. Li, G. D. Botsaris, D. L. Kaplan, *Crystal Growth & Design* **2002**, *2*, 387–393.
- [133] D. J. Gaskin, K. Starck, E. N. Vulfson, *Biotechnology Letters* **2000**, *22*, 1211–1216.
- [134] S. Ding, M. Lei, H. Xiao, Y. Zhang, K. Huang, C. Liang, Y. Wang, G. Liu, R. Zhang, X. Fu et al., *Powder Technology* **2013**, *249*, 140–145.
- [135] J.-M. Ouyang, X.-M. Wu, *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 1296–1297.
- [136] K. Naka (Ed.) *Topics in Current Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, **2007**.
- [137] B. Akin, M. Öner, Y. Bayram, K. D. Demadis, *Crystal Growth & Design* **2008**, *8*, 1997–2005.
- [138] H. Tang, J. Yu, X. Zhao, D. H. Ng, *Journal of Alloys and Compounds* **2008**, *463*, 343–349.
- [139] W. O. S. Doherty, O. L. Crees, E. Senogles, *Cryst. Res. Technol.* **1994**, *29*, 517–524.
- [140] T. Jung, W.-S. Kim, C. Kyun Choi, *Journal of Crystal Growth* **2005**, *279*, 154–162.
- [141] C. PRYCHID, *Annals of Botany* **1999**, *84*, 725–739.
- [142] R. Petkova, S. Tcholakova, N. Denkov, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2013**, *438*, 174–185.
- [143] A. Taller, B. Grohe, K. A. Rogers, H. A. Goldberg, G. K. Hunter, *Biophysical Journal* **2007**, *93*, 1768–1777.
- [144] B. Grohe, J. O'Young, D. A. Ionescu, G. Lajoie, K. A. Rogers, M. Karttunen, H. A. Goldberg, G. K. Hunter, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14946–14951.



- [145] B. Grohe, S. Hug, A. Langdon, J. Jalkanen, K. A. Rogers, H. A. Goldberg, M. Karttunen, G. K. Hunter, *Langmuir* **2012**, *28*, 12182–12190.
- [146] A. Wierzbicki, C. S. Sikes, J. D. Sallis, J. D. Madura, E. D. Stevens, K. L. Martin, *Calcif Tissue Int* **1995**, *56*, 297–304.
- [147] S. R. Khan, P. A. Glenton, *AJP: Renal Physiology* **2008**, *294*, F1109.
- [148] J.-W. Shen, C. Li, N. F. A. van der Vegt, C. Peter, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 6904–6913.
- [149] A.-W. Xu, W.-F. Dong, M. Antonietti, H. Cölfen, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1307–1313..
- [150] D. Kralj, L. Brečević, A. E. Nielsen, *Journal of Crystal Growth* **1990**, *104*, 793–800.
- [151] F. M. Michel, J. MacDonald, J. Feng, B. L. Phillips, L. Ehm, C. Tarabrella, J. B. Parise, R. J. Reeder, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4720–4728.
- [152] M. J. I. Briones, E. López, J. Méndez, J. B. Rodríguez, L. Gago-Duport, *Mineral. Mag.* **2008**, *72*, 227–231.
- [153] L. Gago-Duport, M. Briones, J. Rodríguez, B. Covelo, *Journal of Structural Biology* **2008**, *162*, 422–435.
- [154] S. Raz, O. Testeniere, A. Hecker, S. Weiner, G. Luquet, *Biol. Bull.* **2002**, *203*, 269–274.
- [155] I. M. Weiss, N. Tuross, L. Addadi, S. Weiner, *J. Exp. Zool.* **2002**, *293*, 478–491.
- [156] D. Jacob, A. Soldati, R. Wirth, J. Huth, U. Wehrmeister, W. Hofmeister, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2008**, *72*, 5401–5415.
- [157] J. H. E. Cartwright, A. G. Checa, J. D. Gale, D. Gebauer, C. I. Sainz-Díaz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11960–11970.
- [158] D. Volkmer, M. Harms, L. Gower, A. Ziegler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 639–644.
- [159] E. Loste, R. M. Wilson, R. Seshadri, F. C. Meldrum, *Journal of Crystal Growth* **2003**, *254*, 206–218.
- [160] R. S. K. Lam, J. M. Charnock, A. Lennie, F. C. Meldrum, *CrystEngComm* **2007**, *9*, 1226.
- [161] J. Bolze, B. Peng, N. Dingenouts, P. Panine, T. Narayanan, M. Ballauff, *Langmuir* **2002**, *18*, 8364–8369.
- [162] J. Bolze, D. Pontoni, M. Ballauff, T. Narayanan, H. Cölfen, *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *277*, 84–94.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [163] J. R. Clarkson, T. J. Price, C. J. Adams, *Faraday Trans.* **1992**, *88*, 243.
- [164] J. Rieger, J. Thieme, C. Schmidt, *Langmuir* **2000**, *16*, 8300–8305.
- [165] M. Faatz, F. Gröhn, G. Wegner, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 996–1000.
- [166] M. Faatz, F. Gröhn, G. Wegner, *Materials Science and Engineering: C* **2005**, *25*, 153–159.
- [167] H. S. Lee, T. H. Ha, K. Kim, *Materials Chemistry and Physics* **2005**, *93*, 376–382.
- [168] <https://ahdc.vet.cornell.edu/clinpath/modules/UA-ROUT/crystalsd.htm>, "ACO in Urinary Stones", **2014**.
- [169] B. Jacobs, M. J. Donoghue, F. Bouman, S. Huysmans, E. Smets, *Int. J Plant Sci.* **2008**, *169*, 409–431.
- [170] Mortimer W. Brenner, US2763554 A, **1956**.
- [171] J. D. Rodriguez-Blanco, S. Shaw, L. G. Benning, *Nanoscale* **2011**, *3*, 265.
- [172] T. Ogino, T. Suzuki, K. Sawada, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1987**, *51*, 2757-2767.
- [173] X.-R. Xu, A.-H. Cai, R. Liu, H.-H. Pan, R.-K. Tang, K. Cho, *Journal of Crystal Growth* **2008**, *310*, 3779–3787.
- [174] H. S. Lee, T. H. Ha, H. M. Kim, K. Kim, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2007**, *28*, 457–462.
- [175] S.-F. Chen, H. Cölfen, M. Antonietti, S.-H. Yu, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9564.
- [176] N. Koga, Y. Yamane, *J Therm Anal Calorim* **2008**, *94*, 379–387.
- [177] P. K. Ajikumar, L. G. Wong, G. Subramanyam, R. Lakshminarayanan, S. Valiyaveetil, *Crystal Growth & Design* **2005**, *5*, 1129–1134.
- [178] R. Frost, *Analytica Chimica Acta* **2004**, *517*, 207–214.
- [179] P. Thanasekaran, C.-M. Liu, J.-F. Cho, K.-L. Lu, *Inorganic Chemistry Communications* **2012**, *17*, 84–87.
- [180] Y. Shen, W. Yue, A. Xie, S. Li, Z. Qian, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, *45*, 120–124.
- [181] J.-M. Ouyang, N. Zhou, L. Duan, B. Tieke, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, *245*, 153–162.
- [182] R. L. Frost, M. L. Weier, *Thermochimica Acta* **2004**, *409*, 79–85.

- [183] R. L. Frost, M. L. Weier, *Thermochimica Acta* **2003**, *406*, 221–232.
- [184] O. Hochrein, A. Thomas, R. Kniep, *Z. anorg. allg. Chem.* **2008**, *634*, 1826–1829.
- [185] M. BAK, J. K. THOMSEN, H. J. JAKOBSEN, S. E. PETERSEN, T. E. PETERSEN, N. C. NIELSEN, *The Journal of Urology* **2000**, *164*, 856–863.
- [186] H. Colas, L. Bonhomme-Courty, C. C. Diogo, F. Tielens, F. Babonneau, C. Gervais, D. Bazin, D. Laurencin, M. E. Smith, J. V. Hanna et al., *CrystEngComm* **2013**, *15*, 8840.
- [187] M. Hajir, R. Graf, W. Tremel, *Chem. Commun.* **2014**.
- [188] M. Dietzsch, Dissertation, Universität Mainz, **2014**.
- [189] P. Sharma, H. S. Virk, *TOSURSJ* **2009**, *1*, 34–39.
- [190] S. SON, X. BAI, S. LEE, *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 650–656.
- [191] E. Formo, E. Lee, D. Campbell, Y. Xia, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 668–672.
- [192] J.-M. Ouyang, Z.-Y. Xia, G.-N. Zhang, H.-Q. Chen, *Reviews in Inorganic Chemistry* **2012**, *32*.
- [193] J.-M. Ouyang, L. Duan, B. Tieke, *Langmuir* **2003**, *19*, 8980–8985.
- [194] J.-J. Li, J.-F. Xue, J.-M. Ouyang, *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2013**, *2013*, 1–9.
- [195] J. Ahmed, K. Ojha, Vaidya Sonalika, J. Ganguli, A. K. Ganguli, *Current Science*, *2012*, 293–298.
- [196] T. Schüler, W. Tremel, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5208.
- [197] W. Robertson, D. Scurr, C. M. Bridge, *Journal of Crystal Growth* **1981**, *53*, 182–194.
- [198] F. Grases, L. MASÁROVÁ, O. Söhnle, A. COSTA-BAUZÁ, *British Journal of Urology* **1992**, *70*, 240–246.
- [199] K. G. Christmas, L. B. Gower, S. R. Khan, H. El-Shall, *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *256*, 168–174.
- [200] S. Chutipongtanate, V. Thongboonkerd, *Analytical Biochemistry* **2010**, *402*, 110–112.
- [201] H. Tang, Y. Guo, D. Jia, Y. Zhou, *Microporous and Mesoporous Materials* **2010**, *131*, 366–372.
- [202] J. A. Wesson, M. D. Ward, *Elements* **2007**, *3*, 415–421.
- [203] M. Goiko, J. Dierolf, J. S. Gleberzon, Y. Liao, B. Grohe, H. A. Goldberg, J. R. de Bruyn, G. K. Hunter, A.-P. Gadeau, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80344.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [204] P. K. Grover, R. L. Ryall, V. R. Marshall, *Clinica Chimica Acta* **1990**, *190*, 223–238.
- [205] S. Altschul, *Journal of Molecular Biology* **1990**, *215*, 403–410.
- [206] S. Altschul, *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*, 3389–3402.
- [207] E. W. Sayers, T. Barrett, D. A. Benson, E. Bolton, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D. M. Church, M. DiCuccio, S. Federhen et al., *Nucleic Acids Research* **2009**, *38*, D5.
- [208] Bruker-AXS, *GADDS 4.1.19*, 2004.
- [209] Bruker-AXS, *EVA 10.0*, 2004.
- [210] JCPDS - International Centre for diffraction Data, *PDF-2*, 2004

## **V Weitere Verzeichnisse**



# Abbildungsverzeichnis

1.1 Zähne der Napf- und Käferschnecke.....	4
1.2 Schematische Darstellung der Perlmutterstruktur der Abalone Schale .....	5
1.3 <i>Erbenochile erbeni</i> (Alberti), Gattung der Trilobiten .....	6
1.4 Blasen- und Nierenstein von Hund und Mensch.....	7
1.5 Innere Struktur und hierarchischer Aufbau eines Knochens .....	8
1.6 Hierarchiestufen in der Skelett-Struktur des Glasschwamms <i>Euplectella</i> .....	9
1.7 Bruchigenschaften von einer synthetisch hergestellten Calcit-Nadel .....	14
2.1 Änderung der freien Bildungsenthalpie eines Keimes als Funktion seines Radius .....	21
2.2 Kristallisationsverlauf unter thermodynamischer und kinetischer Reaktionskontrolle .....	22
2.3 Schematische Darstellung der Prozesse während des Kristallwachstums .....	24
2.4 Kristallwachstumsmodelle .....	26
2.5 Wachstum einer Schraubenversetzung.....	27
2.6 Schematische Darstellung der klassischen und der nichtklassischen Kristallisation.....	28
3.1 Keimbildungsförderung, -verzögerung und –inhibierung durch Additive.....	31
4.1 Einheitszelle von COM .....	36
4.2 Calcium-Koordinationspolyedern von COM.....	37
4.3 Kristallstruktur von COM auf der (010) Ebene.....	37
4.4 Zwei unterschiedliche Typen von Oxalat Ionen in COM .....	38
4.5 Kristallmorphologien von COM .....	39
4.6 Einheitszelle von COD und Calcium-Koordinationspolyeder .....	40
4.7 Einheitszelle von COD mit kantenverknüpften Calcium-Polyedern .....	41
4.8 Kristallmorphologien von COD .....	41
4.9 Kristallstruktur von COT .....	42
4.10 Kristallmorphologie von COT .....	43
4.11 Kristalline Zusammensetzung von Harnsteinen.....	45
4.12 Verschiedene Morphologien von Calciumoxalat Pflanzen .....	47
4.13 Verschiedene Verteidigungsmechanismen von Pflanzen (A-C).....	48
5.1 Struktur der filamentösen M13 Bakteriophage .....	53
5.2 Lebenszyklus von filamentösen M13 Phagen .....	55
5.3 <i>Biopanning</i> einer <i>Phage Display</i> -Bibliothek .....	56

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

6.1 Struktureinheit von Polyvinylphosphonsäure .....	64
6.2 Morphologie von COM-Kristallen, hergestellt ohne Additiv-Kontrollsystem .....	65
6.3 XRPD der Synthese ohne Polymer .....	65
6.4 Kristallisation von CaOx mit 0.02, 0.1, 0.3 und 0.4 mM PVPA.....	67
6.5 XRPD von unterschiedlichen PVPA Konzentrationen .....	68
6.6 Kristallisation von CaOx in Gegenwart von 0.5 mM PVPA .....	69
6.7 Kristallisation von CaOx in Gegenwart von 0.75 mM PVPA .....	70
6.8 Kristallisation von CaOx in Gegenwart von 1.0 und 2.0 mM PVPA .....	70
6.9 Kristallisation von CaOx in Gegenwart von 5.0 und 7.5 mM PVPA .....	71
6.10 Kristallisation von 1.0 und 5.0 mM CaOx mit 1 mM PVPA.....	72
6.11 Kristallisation von CaOx mit verschiedenen Verhältnissen von Calcium zu Oxalat.....	73
6.12 Kristallisation von CaOx bei verschiedenen Kristallisationszeiten .....	74
6.13 Kristallisation von CaOx bei verschiedenen Kristallisationstemperaturen.....	75
6.14 XRPD des Kristallisationsprodukts bei verschiedenen Reaktionstemperaturen.....	76
6.15 Vergleich von Bündeln aus Raphiden mit synthetisch hergestellten Raphiden.....	77
6.16 Struktureinheit von (links) Polyvinylamin und (rechts) Polyallylamin .....	78
6.17 Kristallisation von CaOx mit unterschiedlichen Polyamin-Konzentrationen .....	79
6.18 Kristallisation von 0.5, 1.0 und 5.0 mM CaOx mit 1 mM des jeweiligen Polyamins .....	80
6.19 XRPD von 0.5, 1.0 und 5.0 mM CaOx in Gegenwart von verschiedenen Polyaminen...	81
6.20 Kristallisation von 0.5 mM CaOx ohne Polymerzusatz.....	82
6.21 Einfluss von Polyaminen auf das Wachstum von COM-Kristallen.....	83
6.22 Vergleich von COM-Kristallen aus Harnsteinen mit synthetisch hergestellten .....	84
6.23 Kristallisation von CaOx mit verschiedenen Verhältnissen von Calcium zu Oxalat.....	85
6.24 Kristallisation von CaOx mit verschiedenen anionischen Ausgangsverbindungen.....	87
6.25 Schematische Darstellung der Morphologie-Transformation von CaOx Kristallen.....	87
7.1 Alkalische Hydrolyse von Dimethyloxalat durch Natriumhydroxid .....	92
7.2 Fällung von CaOx mittels basischer Hydrolyse von DMOx im wässrigen Milieu.....	93
7.3 Fällung von CaOx in Ethylenglykol.....	94
7.4 Vergleich der gefällten Probe in Wasser und Ethanol .....	94
7.5 Fällung CaOx in ethanolischer Lösung.....	95
7.6 XRPD vom im Ethanol gefällten ACO .....	96
7.7 IR-Spektrum des ACOs.....	97
7.8 Mikro-Ramanspektren von teilkristallinen CaOx .....	98
7.9 Umwandlungstemperaturen von CaOx zu Calciumoxid.....	100



7.10 Gekoppelte DSC-TG Analyse von ACO .....	101
7.11 XRPD von ACO erhitzt bei verschiedenen Temperaturen .....	102
7.12 <sup>13</sup> C-CP-Festkörper-NMR von kristallinem CaOx und ACO.....	103
7.13 SEM-Aufnahme und XRPD der nach 2 Monaten kristallisierten CaOx-Probe.....	104
7.14 IR-Spektrum der nach 2 Monaten kristallisierten CaOx Probe.....	105
7.15 Gekoppelte DSC-TG Analyse der kristallinen Probe nach zwei Monaten .....	106
7.16 Reaktionsmechanismus zum Calciumoxalat.....	107
8.1 CaOx-Partikel hergestellt im wässrigen Milieu mittels Ultraschallbehandlung .....	112
8.2 CaOx-Partikeln hergestellt in Methanol.....	113
8.3 CaOx-Kristallen hergestellt in Ethylenglykol aus CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O und NaOx .....	113
8.4 CaOx-Nanopartikeln hergestellt in Ethylenglykol aus CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O und DMOx .....	114
8.5 CaOx-Nanopartikeln hergestellt in Ethylenglykol aus CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O & H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O....	115
8.6 XRPD von COM-Nanopartikel.....	115
8.7 IR Spektrum der COM-Nanopartikel.....	116
8.8 Gekoppelte DSC-TG Analyse der COM-Nanopartikeln.....	117
8.9 In künstlichen Urin eingelegte COM-Nanopartikel .....	118
8.10 EDX-Messung der in künstlichen Urin inkubierten COM-Nanopartikel .....	119
8.11 EDX-Messung der in künstlichen Urin inkubierten COM-Nanopartikel .....	119
8.12 IR-Spektroskopie der in künstlichen Urin eingelegten COM-Nanopartikel.....	120
8.13 XRPD der eingelegten CaOx-Nanopartikel .....	121
9.1 Die am häufigsten selektierten Peptidsequenzen aus der 7er Peptid Bibliothek.....	132
9.2 Die am häufigsten selektierten Peptidsequenzen aus der 12er Peptid Bibliothek.....	135
B.1 Kristallisation von CaOx in Gegenwart von 0.45 mM PVPA.....	143
B.2 Kristallisation von CaOx in Gegenwart von 1, 2 und 3 mM PVPA.....	144
B.3 Kristallisation von CaOx in Gegenwart von 0.02 mM des jeweiligen Polyamins .....	145
B.4 Kristallisation von CaOx mit DMOx bzw. H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O ohne Polymer.....	146
C.1 UV-Vis-Aufnahmen von ACO.....	147
C.2 UV-Vis-Aufnahmen von ACO bei 248 nm.....	148
C.3 XRPD einer teilkristallinen CaOx-Probe .....	148
C.4 Film aus ACO, gefällt im wässrigen Milieu in Gegenwart von PVPA.....	149
C.5 XRPD von ACO gefällt im wässrigen Milieu in Gegenwart von PVPA .....	150
D.1 XRPD von CaOx-Nanopartikeln nach der TG-DSC-Analyse.....	151
E.1 Kristallisation von CaOx in Gegenwart von synthetisierten 7er Peptidsequenzen.....	154

# Tabellenverzeichnis

9.1 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien, Lösungen und Puffer .....	124
9.2 Selektierte siebener Peptidsequenzen erhalten aus der <i>Phage Display</i> Selektion.....	131
9.3 Selektierte zwölf Peptidsequenzen erhalten aus der <i>Phage Display</i> Selektion.....	134

# Abkürzungsverzeichnis

$\sigma$	Grenzflächenspannung
$\delta$	Schichtdicke
A	Fläche
ACC	amorphes Calciumcarbonat
ACO	amorphes Calciumoxalat
AS	Aminosäure
a.u.	unkalierte Einheit
c	Konzentration
CaP	Calciumphosphat
CaOx	Calciumoxalat
COD	Calciumoxalat Dihydrat
COM	Calciumoxalat Monohydrat
COT	Calciumoxalat Trihydrat
D	Diffusionskoeffizient
DCM	Dichlormethan
DHBC	Doppelhydrophiles Blockcopolymer
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMOx	Dimethyloxalat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	dynamische Differenzkalorimetrie
E. coli	<i>Escherichia Coli</i>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
FWHM	Halbwertsbreite
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat
HT	Hochtemperatur
G	freie Gibbsche Enthalpie
IAP	Ionenaktivitätsprodukt
IR	Infrarot
J	Keimbildungsgeschwindigkeit
$k_B$	Boltzmann-Konstante
$K_L$	Löslichkeitsprodukt
k.U.	künstlicher Urin
LT	Niedrigtemperatur
NaOx	Natriumoxalat
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz
PAAm	Polyallylamin
PEG	Polyethylenglykol
PILP	polymerinduzierte flüssige Vorstufen
pK	Dissoziationskonstante
PMAA	Polymethacrylsäure
PVAm	Polyvinylamin
PVPA	Polyvinylphosphonsäure
$r_K^*$	Kritischer Radius
S	Sättigungsgrad

SEM	Rasterelektronenmikroskopie
TBS(T)	<i>Tris-bufferd saline</i> (mit Tween-20 <sup>TM</sup> )
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TG(A)	Thermogravimetrische Analyse
U·min <sup>-1</sup>	Umdrehung pro Minute
UV / Vis	Ultraviolett / sichtbares Licht
XRPD	Röntgenpulverdiffraktometrie
ZW	zeolithisches Wasser