

**Miniemulsionen als räumliche Begrenzungen:
Synthese von Polymer/Hydroxylapatit-Nanopartikeln, bio-
inspirierten Nanokapseln und Polymer-Einzelkettenpartikeln**

Dissertation zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Katrin Julia Schöller

geboren in Leonberg

Mainz 2012

Amtierender Dekan:

1. Gutachterin

2. Gutachter

Tag der Promotion: 14.02.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theorie und Grundlagen.....	4
2.1	Heterophasensysteme	4
2.1.1	Miniemulsionen – Herstellung und Eigenschaften.....	4
2.1.2	Miniemulsionen als räumliche Begrenzungen	5
2.1.3	Sekundärdispersionen	8
2.2	Polymer-Einzelketten	12
2.2.1	Einzelmolekülchemie von Polymeren	12
2.2.2	Herstellung von Polymer-Einzelkettenpartikeln	14
2.3	Biomineralisation und biomimetische Synthese.....	18
2.3.1	Grundlagen der Kristallisation in Bezug auf Biom mineralisation	18
2.3.2	Experimentelle Analyse des Biom mineralisationsprozesses.....	22
2.3.3	Von Biom mineralisation zu bioinspirierter Synthese	23
2.3.4	Beispiel eines Calciumphosphat basierten Biom minerals: Knochen.....	24
2.3.5	Templatgesteuerte Kristallisation von Calciumphosphat	25
2.3.6	Polymernanopartikel als Template	27
2.3.7	Synthese organisch/anorganischer Hybridkapseln	29
3	Methoden	33
3.1	Elektronenmikroskopie	33
3.1.1	Transmissionselektronenmikroskopie.....	34
3.1.2	Rasterelektronenmikroskopie	35
3.2	Dynamische Lichtstreuung	35
3.3	Ionenselektive Elektroden.....	37
3.4	Röntgenbeugung	39

4	Ergebnisse und Diskussion.....	40
4.1	Polymer/Calciumphosphat-Nanopartikel mit kontrollierter Morphologie	41
4.1.1	Oberflächen-funktionalisierte Polymerpartikel als Templat	42
4.1.2	Einfluss unterschiedlicher funktioneller Gruppen.....	44
4.1.3	Einfluss des pH-Wertes.....	46
4.1.4	Kinetik der Mineralisation	54
4.1.5	Zusammenfassung und Ausblick	61
4.2	Polymer/Calciumphosphat-Partikel für biomedizinische Anwendungen	62
4.2.1	Wechselwirkung von Polymer/HAP-Partikeln mit Zellen	62
4.2.2	Polymer/HAP-Partikel unterschiedlicher Größe.....	64
4.2.3	Anisotrope Polymer/HAP-Partikel	68
4.2.4	Mineralisation von Substrat gebundenen Partikeln.....	70
4.2.5	Mineralisation von DNA-Nanokapseln	75
4.3	Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln über Grenzflächenmineralisation ..	80
4.3.1	Synthese von Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln	81
4.3.2	Verkapselung von Hydroxylapatit-Kristallen	85
4.3.3	Verkapselung und Freisetzung von Rhodamin	89
4.3.4	Verkapselung von Vancomycin.....	92
4.3.5	Zusammenfassung und Ausblick	93
4.4	Polymer-Einzelkettenpartikel	95
4.4.1	Herstellung von Einzelkettenpartikeln	95
4.4.2	Einfluss des Molekulargewichtes	101
4.4.3	Einfluss der Polymerkonzentration	105
4.4.4	Fluoreszenzanisotropie-Untersuchung	106
4.4.5	Upscale der Synthese	113
4.4.6	Zusammenfassung und Ausblick	114
5	Experimenteller Teil	116
5.1	Synthese von Oberflächen-funktionalisierten Polymer-Nanopartikeln.....	116
5.1.1	Materialien	116
5.1.2	Synthese über direkte Miniemulsionspolymerisation.....	116
5.2	Synthese von Polymer/Calciumphosphat-Partikeln	118
5.2.1	Materialien	118
5.2.2	Mineralisation von Oberflächen-funktionalisierten Partikeln.....	118
5.2.3	Mineralisation von Substrat gebundenen Partikeln.....	119

5.2.4	Mineralisation von DNA-Kapseln.....	119
5.3	Synthese von Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln.....	120
5.3.1	Materialien	120
5.3.2	Allgemeiner Syntheseweg	120
5.3.3	Verkapselung von Rhodamin und Vancomycin	121
5.3.4	Verkapselung von Hydroxylapatit-Kristallen	121
5.4	Synthese von Einzelkettenpartikeln	122
5.4.1	Materialien	122
5.4.2	Miniemulsions-/Verdampfungsmethode	122
5.4.3	Miniemulsions-/Diffusionsmethode.....	123
5.4.4	Synthese über den Ouzo-Effekt.....	123
5.4.5	Upscale mittels Hochdruckhomogenisator	123
5.5	Charakterisierung der Proben	124
5.5.1	Titrationsexperimente mit ionensensitiven Elektroden.....	124
5.5.2	Röntgenbeugung	128
5.5.3	Partikelladungsdetektion	129
5.5.4	Thermogravimetrische Analyse.....	129
5.5.5	Rasterelektronenmikroskopie	129
5.5.6	Transmissionselektronenmikroskopie	130
5.5.7	Freisetzungsexperimente	130
5.5.8	Dynamische Lichtstreuung	130
5.5.9	Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie	131
6	Zusammenfassung	134
7	Anhang	139
7.1	Abkürzungen	139
7.2	Symbole	140
7.3	Zusätzliche experimentelle Ergebnisse	142
8	Literaturverzeichnis.....	148
9	Danksagung	156
10	Lebenslauf	157
11	Veröffentlichungen	158
12	Erklärung	159

1 Einleitung

Vor kurzem formulierte der Materialchemiker David Taylor in einer Ausgabe der Zeitschrift *Materials Today* die Frage „Warum sind deine Knochen nicht aus Stahl aufgebaut?“¹ Hinter dieser auf den ersten Blick etwas einfach klingenden Frage steckt jedoch eine Thematik, die sowohl Chemiker als auch Ingenieure seit längerem beschäftigt; nämlich die Frage, wie in der Natur, im Vergleich zur Technik, funktionelle Materialien gebildet werden und wie diese sich voneinander unterscheiden. Knochen ist eines der bekanntesten Beispiele für ein multifunktionelles Kompositmaterial aus der Natur. Im menschlichen Körper dient Knochen zur mechanischen Stabilisierung und als Ionenspeicher, um nur zwei seiner Hauptfunktionen zu nennen. Dabei ist er leichter als Stahl, gleichzeitig hart und flexibel, kann sich (bei kleineren Verletzungen) selbst heilen und ist einem ständigen Transformationsprozess unterworfen, um sich den äußeren Anforderungen während eines Menschenlebens anzupassen. Somit ist das Beispiel Knochen hochaktuell, da in unserer Gesellschaft die Anforderungen an Materialien immer komplexer werden und eine Vielzahl unterschiedlicher Eigenschaften in einem multifunktionellen Material vereint werden sollen.

Wie also schafft es die Natur, Materialien mit einer so einzigartigen Kombination von Eigenschaften herzustellen und welche Konzepte können wir aus der Natur lernen? Insbesondere die Zusammensetzung und Struktur von Biomineralien wie Knochen ist für deren herausragende Materialeigenschaften verantwortlich. Biomaterialien setzen sich über mehrere Längenskalen aus einer komplexen hierarchischen Ordnung der organischen und anorganischen Komponenten zusammen. Im Prinzip handelt es sich bei der niedrigsten Organisationsstufe der meisten Biomineralien um ein Nanokomposit, welches im Fall von Knochen aus Nanometer großen Hydroxylapatit-Kristallen in einer organischen Matrix besteht.²

Sowohl die Struktur von Biomineralien als auch deren Bildungsprozess dient Materialchemikern in der sogenannten biomimetischen oder bioinspirierten Synthese als Vorbild für die Herstellung hierarchisch strukturierter Kompositmaterialien mit interessanten Eigenschaften. Dabei werden Prinzipien wie die templatgesteuerte

Mineralisation zur kontrollierten Herstellung von organisch/anorganischen Strukturen im Nanometerbereich verwendet, wodurch sich die makroskopischen Eigenschaften der Materialien gezielt steuern lassen.³⁻⁵ Grenzflächen, wie zum Beispiel die Grenzfläche zwischen dem organischen Templat und den anorganischen Kristallen, spielen eine wichtige Rolle für die Strukturierung und damit für die späteren Eigenschaften des Materials.⁶ Miniemulsionen sind als Heterophasensystem mit Nanometer-großen Tröpfchen oder Partikeln ideal für die templatgesteuerte Mineralisation geeignet, da sie sowohl eine räumliche Begrenzung als auch die Möglichkeit der Funktionalisierung der Grenzfläche bieten.⁷ Außerdem können mit der extrem vielfältigen Miniemulsionstechnik Faktoren wie die Partikelgröße, Morphologie, Oberflächenbeschaffenheit, Funktionalität und Form der als Template eingesetzten Nanopartikel gezielt verändert werden. Auch für die in-situ-Verkapselung von unterschiedlichen Substanzen im Inneren der Partikel oder Kapseln eignen sich Miniemulsionen sehr gut.^{8,9}

In dieser Arbeit dienten Miniemulsionen als räumliche Begrenzungen für die Synthese von Materialien mit neuartigen Eigenschaften. Das erste Themengebiet umfasst die templatgesteuerte Mineralisation von Calciumphosphat zur Herstellung von Polymer/Calciumphosphat-Hybridpartikeln und -kapseln. Zum einen wurde die funktionalisierte Oberfläche von Polymernanopartikeln, die über die Miniemulsionspolymerisation hergestellt wurden, als Templat für die Kristallisation von Calciumphosphat verwendet. Auf diese Weise sollten Polymer/Calciumphosphat-Hybridpartikel mit kontrollierter Morphologie hergestellt werden. Zum anderen wurde die flexible Grenzfläche von flüssigen Miniemulsionströpfchen zur Mineralisation von Calciumphosphat eingesetzt. Die hierbei entstandenen Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln mit flüssigem Kern könnten als multifunktionelle Freisetzungssysteme eingesetzt werden. Eine mögliche Anwendung der Polymer/Calciumphosphat-Partikel und -Kapseln ist die Implantatbeschichtung, wobei diese als Bindeglied zwischen künstlichem Implantat und natürlichem Knochengewebe dienen. Aufgrund ihrer knochenähnlichen Struktur und Multifunktionalität könnten diese Beschichtungen das aktive Aufwachsen von Knochengewebe auf der Implantatoberfläche fördern.^{10, 11}

Das zweite Themengebiet umfasst die Synthese und Charakterisierung von extrem kleinen Nanopartikeln, die aus nur einer einzigen Polymerkette bestehen. Die

Grenzfläche zwischen wässriger und disperser Phase in Nanometer großen Miniemulsionströpfchen sollte hier zur Separation einzelner, in der dispersen Phase gelösten Polymerketten eingesetzt werden. Nach der Verdampfung der dispersen Phase sollten auf diese Weise Polymer-Einzelkettenpartikel erhalten und anschließend mit Hilfe verschiedener Analysetechniken untersucht werden. Es wird vermutet, dass sich die Materialeigenschaften (wie zum Beispiel das Schmelzverhalten) der Polymer-Einzelkettenpartikel auf Grund der fehlenden intermolekularen Wechselwirkungen bzw. Verschlaufungen der Polymerketten von denen konventioneller Polymere unterscheiden. In der industriellen Anwendung könnten die Polymer-Einzelkettenpartikel möglicherweise zu einer verbesserten Prozessierbarkeit von Polymeren führen, deren konventionell hergestellte Schmelzen hochviskos sind.

Die vorliegende Arbeit ist wie folgt strukturiert: In Kapitel 2 werden die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Grundlagen und Konzepte beschrieben. In Kapitel 3 werden die zur Materialcharakterisierung verwendeten Methoden erklärt. Der Hauptteil in Kapitel 4 beschäftigt sich mit den experimentellen Ergebnissen und deren Diskussion, wobei dieser in zwei Themengebiete unterteilt ist. In den ersten drei Unterkapiteln wird die Synthese und Charakterisierung von Polymer/Calciumphosphat-Partikeln und -Nanokapseln über die templatgesteuerte Mineralisation von Calciumphosphat gezeigt. Das vierte Unterkapitel behandelt die Synthese von Polymer-Einzelkettenpartikeln sowie deren ausführliche Untersuchung. Im fünften Kapitel finden sich die experimentellen Details, und im letzten, sechsten Kapitel wird eine Zusammenfassung der Arbeit gegeben.

2 Theorie und Grundlagen

2.1 Heterophasensysteme

2.1.1 Miniemulsionen – Herstellung und Eigenschaften

1973 wurde von Ugelstad et al. zum ersten Mal von Miniemulsionen berichtet.¹² Heute wird zwischen direkten und inversen Miniemulsionen unterschieden, wobei direkte Miniemulsionen aus Öl-in-Wasser- und inverse Miniemulsionen aus Wasser-in-Öl-Emulsionen bestehen. Direkte Miniemulsionen bestehen aus einem Öl (zum Beispiel einem Monomer), einem hydrophoben Reagenz, Tensid und Wasser, wobei Öl und hydrophobes Reagenz mit einem durchschnittlichen Tröpfchendurchmesser zwischen 50 und 500 nm dispergiert in Wasser vorliegen.¹³ Bei der Herstellung einer Miniemulsion wird das Zweiphasensystem zunächst durch Rühren homogenisiert, die so entstandenen Tröpfchen zeigen eine breite Größenverteilung. Anschließend wird das System, zum Beispiel durch die Verwendung eines Ultraschallstabes, hohen Scherkräften ausgesetzt. Bei diesem Prozess verringert sich der Tröpfchendurchmesser durch wiederholtes Verschmelzen und Aufspalten der Tröpfchen, bis ein Gleichgewichtszustand mit minimalem Tröpfchendurchmesser und enger Teilchengrößenverteilung erreicht wird. Zwei Mechanismen wirken der Stabilität von Miniemulsionen entgegen, Ostwald-Reifung und Koaleszenz.¹⁴

Als Ostwald-Reifung wird das Anwachsen von Teilchen durch Diffusion auf Kosten von kleineren Teilchen bezeichnet. Die treibende Kraft dieses Vorgangs ist der unterschiedliche Laplace-Druck innerhalb verschieden großer Tröpfchen, wobei der Laplace-Druck umso größer ist, je stärker die Tröpfchenoberfläche gekrümmt ist: Um den Laplace-Druck zu minimieren, diffundiert Öl von kleineren zu größeren Tröpfchen, wodurch größere Tröpfchen anwachsen und kleinere schließlich verschwinden. Dies führt zu einer Destabilisierung des Systems. Eine Unterdrückung der Ostwald-Reifung kann durch Zusatz eines hydrophoben Reagenz zur Ölphase erreicht werden. Da das hydrophobe Reagenz unlöslich in der kontinuierlichen Phase sein sollte, wird

typischerweise Hexadekan als Hydrophob eingesetzt. Auf diese Weise bildet sich in den Tröpfchen ein osmotischer Druck aus, der dem Laplace-Druck entgegenwirkt und eine Diffusion des Öls und damit die Ostwald-Reifung unterbindet. Der zweite Mechanismus, der zur Destabilisierung führt, wird Koaleszenz genannt. Darunter versteht man das Zusammenschmelzen von Tröpfchen bei ihrer gegenseitigen Berührung. Durch den Einsatz von Tensiden kann Koaleszenz verhindert und die Miniemulsion stabilisiert werden. Analog zur Emulsion können hier ionische und/oder nichtionische Tenside zur Stabilisierung verwendet werden. Die Bedeckung der Tröpfchen mit Tensid ist in Miniemulsionen nur unvollständig. Insgesamt wird der Miniemulsionszustand auch als kritisch stabilisiert bezeichnet.¹⁴

Die Miniemulsionstechnik eignet sich zur Herstellung einer Vielzahl von Polymernanopartikeln über unterschiedliche Polymerisationstechniken.^{8, 9} Indem funktionelle Monomere mit beispielsweise Styrol in der radikalischen Miniemulsionspolymerisation kombiniert werden, können verschiedene oberflächenfunktionalisierte Nanopartikel hergestellt werden.^{15, 16} In inversen Miniemulsionen durchgeführte Polyadditionen, Polykondensationen, anionische Polymerisationen oder Vernetzungsreaktionen werden eingesetzt, um Nanokapseln mit einem hydrophilen flüssigen Kern herzustellen.¹⁷

2.1.2 Miniemulsionen als räumliche Begrenzungen

Miniemulsionen ermöglichen nicht nur die Herstellung von Polymernanopartikeln durch die Polymerisation von Monomeren, sondern dienen in der Materialsynthese als Nanometer große räumliche Begrenzungen (sogenanntes „Confinement“). Befinden sich organische Materialien in einer physikalisch eingegrenzten Umgebung, können Grenzflächeneffekte und durch die Begrenzung hervorgerufene Entropieverluste Materialeigenschaften wie Glasumwandlung, Kristallisation und Morphologie im Vergleich zum „freien“ System deutlich verändern.¹⁸ Miniemulsionen eignen sich auf Grund ihrer leicht reproduzierbaren Herstellung und gezielt einstellbaren Eigenschaften ideal, um Effekte des Confinements zu untersuchen. Zum Beispiel wurde die Kristallisation verschiedener Alkane in wasserbasierten Miniemulsionen analysiert.^{19, 20} Im Vergleich zu den reinen Alkanen erforderten die Alkane in Miniemulsions-Tröpfchen eine stärkere Unterkühlung bis zum Erfolgen der Kristallisation. Als Ursache

hierfür wurde gefunden, dass sich der Keimbildungsmechanismus von heterogen zu homogen änderte. Die Kristallisation lief in den Miniemulsions-Tröpfchen in Abhängigkeit von der Tröpfchengröße schneller ab als in der reinen Alkanphase.¹⁹ Zudem wurde in Miniemulsionen ein Wechsel der Kristallstruktur einiger Alkane beobachtet und auf den Einfluss des Confinements zurückgeführt.²⁰

Auch bei der Kristallisation von Polymeren in Miniemulsions-Tröpfchen wurde ein Einfluss des Confinements auf die zur Kristallisation erforderliche Unterkühlung festgestellt. Zudem wurde die Polymerstruktur durch die räumliche Begrenzung beeinflusst – die Kristallisation erfolgte durch homogene Keimbildung (im Gegensatz zur heterogenen Keimbildung in den meisten Lösungen), und nur ein Keim lag pro Tröpfchen vor. Dies führte zu kristallisierten Tröpfchen, deren lamellare Struktur durch das Confinement beeinflusst wurde.²¹ Die Kristallisation zweier organischer Farbstoffe, die zunächst gelöst in Miniemulsions-Tröpfchen vorlagen, führte zu einkristallinen Nanofasern. Interessanterweise überstieg die Größe dieser Fasern die Größe der ursprünglichen Miniemulsionströpfchen weit, obwohl die Farbstoffe in der kontinuierlichen Phase komplett unlöslich waren. Aus diesem Ergebnis wurde gefolgert, dass das Kristallwachstum über die kontrollierte Aggregation und mesoskalische Transformation von kolloidalen Zwischenstufen erfolgt sein müsste.²²

Der Einfluss des kugelförmigen Confinements auf Systeme, die aus zwei oder mehreren unterschiedlichen Polymeren bestehen, wurde sowohl experimentell als auch theoretisch untersucht.²³⁻²⁵ Insbesondere die jeweiligen Grenzflächenenergien sowie kinetische und thermodynamische Effekte wirkten sich auf die erhaltenen Morphologien aus. In Miniemulsionen führte zum Beispiel die Verwendung zweier Polymere oder eines Polymers und eines organischen Reagenzes (Hexadekan) zu Kern-Hülle-Morphologien, Janus-Partikeln und anderen Strukturen.^{26, 27} Im Vergleich zu unterschiedlichen Polymeren, die nicht kovalent verbunden sind, wurde als komplexeres System Blockcopolymere untersucht. Blockcopolymere haben die besondere Eigenschaft, dass in einem einzigen Molekül unterschiedliche Polymere blockweise miteinander verbunden sind.

Die Anordnung von Blockcopolymeren in Nanometer großen Confinements führte zu verschiedenen ungewöhnlich organisierten Morphologien und ist deshalb von großem wissenschaftlichem Interesse. Als Confinement dienten beispielsweise Grenzflächen,

poröse Mineralien oder Polymersysteme wie Membranen oder organisierte Monolagen.¹⁸ Je nach Form und Größe des Confinements veränderte sich die lamellare Struktur der Copolymere. Insbesondere die Krümmung des Confinements beeinflusste die erhaltenen Morphologien stark. Blockcopolymere zwischen planaren Oberflächen zeigten eine gestauchte lamellare Morphologie,²⁸ wohingegen im zylinderförmigen Confinement die lamellare Struktur verschwand und durch andere ring- und scheibenartige Morphologien ersetzt wurde.²⁹ Theoretische Simulationen ergaben für Blockcopolymere in kugelförmigem Confinement eine große Variation an unterschiedlichen möglichen Morphologien.³⁰ Synthetisch führte die Herstellung von Blockcopolymeren über ATRP (engl. atom transfer radical polymerization) in Miniemulsion zu Nanopartikeln mit außergewöhnlichen zwiebelartigen Strukturen.³¹ Des Weiteren wurden zuvor synthetisierte Blockcopolymere unter Verwendung von Miniemulsions-Tröpfchen als Confinement detailliert untersucht. Zweifache räumliche Begrenzungen beeinflussten hier die Morphologie der erhaltenen Nanopartikel und Nanokapseln. Es wurden sowohl der Partikel-Durchmesser als auch die Dicke der Kapselhülle verändert und die Anordnung der Copolymere analysiert. Dabei wurden vielfältige Morphologien wie Janus-Partikel- oder Kern-Hülle-Strukturen und himbeer- oder zwiebelartige Morphologien erhalten.³² Der Einfluss des Confinements auf einzeln vorliegende Polymerketten und chemische Reaktionen wird in Kapitel 2.2.1 über Einzelmolekülchemie näher beschrieben.

In den zuvor beschriebenen Beispielen wurden flüssige Miniemulsions-Tröpfchen als räumliche Begrenzungen für die Kristallisation und Anordnung unterschiedlicher Substanzen verwendet. Im Gegensatz dazu können jedoch auch feste oder gelartige Nanopartikel in Miniemulsionen als Confinement dienen. Ein Beispiel hierfür ist die Kristallisation von Calciumphosphat in vernetzten Gelatine-Nanopartikeln. Die räumliche Begrenzung durch die Gelatinematrix diente hier als Templat für die Mineralisation und ermöglichte die Stabilisierung amorphen Calciumphosphates sowie deren Umwandlung in Hydroxylapatit-Einkristalle.³³ Diese Umwandlung unterschied sich signifikant von der in Lösung beobachteten. Wurden nicht die Nanopartikel selbst, sondern deren funktionalisierte Oberfläche als Templat für die Kristallisation von Calciumphosphat verwendet, so bildete sich nur die thermodynamisch stabilste Calciumphosphat-Phase, analog zur Kristallisation in Lösung.³⁴

Die in diesem Kapitel beschriebenen Beispiele zeigen, wie Miniemulsionen als begrenzte Reaktionsräume das Design von Nanopartikeln komplexer Struktur ermöglichen.

2.1.3 Sekundärdispersionen

Polymer-Dispersionen können über Heterophasenpolymerisationen von Monomeren in Emulsion, Miniemulsion, Mikroemulsion oder über die Dispersionspolymerisation hergestellt werden („Primärdispersionen“). Im Gegensatz dazu werden Sekundärdispersionen aus zuvor gebildeten synthetischen oder natürlichen Polymeren hergestellt. Diese als künstliche („artificial“) Latizes bezeichneten Dispersionen werden über Methoden wie den Emulsions-Verdampfungsprozess, Emulsions-Diffusionsprozess, Ouzo-Effekt oder Ausfällen des Polymeren hergestellt. Gründe für die Verwendung von Sekundärdispersionen sind zum einen die Möglichkeit, durch den Verkauf des Polymeren als Feststoff einen Transport der Dispersionen (mit nur 50% Feststoffgehalt) zu vermeiden. Zum anderen sind Sekundärdispersionen interessant für Anwendungen, bei denen besondere Reinheit erforderlich ist, wie zum Beispiel als Halbleiter oder in medizinischen Produkten. Eine dritte Möglichkeit, Sekundärdispersionen zu verwenden ergibt sich, wenn Polymere mit speziellen Materialeigenschaften als Dispersion erwünscht sind und nicht über Heterophasenpolymerisationen hergestellt werden können.³⁵

Der **Emulsions-Verdampfungsprozess** beruht auf der Emulgierung einer Polymer-Lösung in einer kontinuierlichen Phase, die nicht mit der dispersen Phase mischbar ist und zur Stabilisierung der Dispersion ein Tensid enthält. Im zweiten Schritt wird das Lösungsmittel durch Verdampfung entfernt, wodurch das Polymer in den Tröpfchen ausfällt und sich feste Partikel ausbilden.³⁶ Ein typisches Beispiel für die Verwendung des Emulsions-Verdampfungsprozess ist die Herstellung von Dispersionen aus natürlichen oder synthetischen bioabbaubaren oder biokompatiblen Polymeren für biomedizinische Anwendungen.³⁷ Zudem werden häufig Polyolefin-Partikel über diesen Prozess hergestellt, da ihre Polymerisation wasserempfindliche Katalysatoren erfordert. Auch Polybutadien und Polyisopren werden industriell mit sehr hohem Feststoffanteil über die Emulsions-Verdampfungs-methode produziert.³⁸ Dispersionen von Polymeren mit komplizierten Architekturen oder Funktionalitäten werden ebenfalls bevorzugt über

diese Methode hergestellt.³⁹ In diesem Fall würden funktionelle Gruppen entweder bei der Polymerisation oder anschließend durch Nebenreaktionen in der Dispersion stören. Ein Isocyanat-Latex, dessen funktionelle Gruppen anschließend zum Aushärten der erhaltenen Partikelfilme dienen, wurde beispielsweise über die Emulsions-Verdampfungsmethode hergestellt.⁴⁰ Auch für die Herstellung von Partikeln mit definierter Morphologie^{23, 41} oder der Verkapselung von Substanzen⁴² eignet sich der Emulsions-Verdampfungsprozess. Die in diesen Beispielen aufgezeigten Anwendungsmöglichkeiten des Emulsions-Verdampfungsprozesses gehen vor allem auf dessen einfache Durchführbarkeit und Anwendbarkeit auf unterschiedliche Materialien und Lösungsmittel zurück. Die hauptsächliche Anforderung an die verwendeten Substanzen ist deren Löslichkeit in einem mit Wasser nicht mischbaren und niedrig-siedenden Lösungsmittel. Zudem darf die Viskosität der gelösten Polymere für eine erfolgreiche Emulgierung nicht zu stark ansteigen. Vor allem ionische Tenside eignen sich hierbei zur kolloidalen Stabilisierung, eine tensidfreie Durchführung ist nicht möglich.

Seit einiger Zeit wird der Emulsions-Verdampfungsprozess mit der Herstellung von Miniemulsionen kombiniert, wobei der hauptsächliche präparative Unterschied in der Verwendung von Ultraschall im Emulgierschritt liegt. Auf diese Weise werden einheitliche Nanotröpfchen ausgebildet, deren kolloidale Stabilität sowohl durch das in der kontinuierlichen Phase vorliegende Tensid als auch durch das in der dispersen Phase gelöste Polymer, welches die Rolle des Hydrophobes übernimmt, gewährleistet ist. Die Kombination aus Miniemulsion und Emulsions-Verdampfungsprozess ermöglichte zum Beispiel die Synthese von Polymer-Dispersionen leitfähiger Polymere für die Herstellung von Solarzellen.⁴³ Für biomedizinische Anwendungen wurden auf diese Weise bioabbaubare Nanopartikel hergestellt und Magnetit in bioabbaubaren Polymeren verkapselt.^{44, 45} Dasselbe Prinzip wurde auch für die Synthese von magnetischen und farbstoffmarkierten Nanopartikeln für die Verwendung als Sauerstoffsensoren angewendet.⁴⁶

Der **Emulsions-Diffusionsprozess** unterscheidet sich in der Art der Lösungsmittelentfernung vom oben beschriebenen Emulsions-Verdampfungsprozess. Während bei letzterem das Lösungsmittel relativ langsam entfernt wird, indem das zu einem geringen Anteil in der kontinuierlichen Phase vorliegende Lösungsmittel

verdampft wird, erfolgt das Ausfällen des Polymers in der Diffusionsmethode schneller durch einen sogenannten „Diffusionsschock“.⁴⁷ Neben der Löslichkeit des Polymeren im Lösungsmittel ist hierfür eine teilweise Löslichkeit des Lösungsmittels in der kontinuierlichen Phase (Wasser) nötig. Im ersten Schritt wird die disperse Phase in der wässrigen Phase emulgiert. Im zweiten Schritt wird die schnelle Diffusion des in der dispersen Phase vorliegenden Lösungsmittels in die kontinuierliche Phase erzwungen, indem die Emulsion mit einer großen Menge Wasser verdünnt wird. Anschließend wird das Lösungsmittel beispielsweise unter reduziertem Druck entfernt. Der Emulsions-Diffusionsprozess wurde bisher hauptsächlich zur Herstellung von bioabbaubaren Nanopartikeln und der Verkapselung aktiver Substanzen in Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) (PLGA)-Nanopartikeln verwendet.^{47, 48} Moinard-Chécot et al. stellten auf diese Weise Nanokapseln aus Poly(ϵ -caprolacton) her und untersuchten, wie sich verschiedene Parameter auf die Eigenschaften der erhaltenen Kapseln auswirken.⁴⁹ Ein Vorteil der Emulsions-Diffusionsmethode ist, dass durch das schnelle Entfernen des Lösungsmittels die kolloidale Stabilität der im ersten Schritt gebildeten Emulsion oder Miniemulsion nur für kurze Zeit gewährleistet sein muss. Nachteile dieser Methode sind die geringe Auswahl an geeigneten Lösungsmitteln sowie die hohe Verdünnung, in der die Dispersion am Ende vorliegt.

Weitere Möglichkeiten, Sekundärdispersionen herzustellen, sind die sogenannten Niedrig-Energie-Methoden, welche auf einen hohen Energieeintrag während der Emulgierung verzichten. Hierzu zählen der „**Ouzo-Effekt**“ und das Ausfällen von Polymeren durch Zugabe eines Nicht-Lösungsmittels. Metastabile Emulsionen werden über den Ouzo-Effekt hergestellt, indem große Mengen Wasser mit einer Lösung gemischt werden, in der ein Öl in geringer Konzentration in einem hydrophilen Lösungsmittel vorliegt. Der Mischvorgang mit Wasser führt zu einer Übersättigung des Öls, woraufhin eine Nukleation von Öltröpfchen und spontane Emulgierung erfolgt.^{50, 51} Der umgekehrte Prozess, die Zugabe von kleinen Mengen Wassers zu einer ölreichen Lösung, führt ebenfalls zu Emulsionen. Die spontane Emulgierung erfolgt bei diesem Prozess nur in einem engen Konzentrationsfenster, welches zwischen der Spinodalen und der Binodalen des Phasendiagramms der jeweiligen Mischungen liegt. Die Verwendung des Ouzo-Effektes ist aus diesem Grund auf spezielle Systeme limitiert. Die Herstellung von wässrigen Dispersionen über den Ouzo-Effekt ist zudem auf sehr hydrophile Lösungsmittel, welche vollständig in Wasser löslich sind, beschränkt. Aus

diesem Grund werden mit dieser Methode vor allem Partikel aus relativ hydrophilen Substanzen wie zum Beispiel Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Polylactid (PLA) für medizinische Anwendungen hergestellt.⁵¹ Außerdem wurden vor kurzem über den Ouzo-Effekt Kompositnanopartikel bestehend aus PMMA und Kohlenstoffnanoröhren hergestellt.⁵²

2.2 Polymer-Einzelketten

2.2.1 Einzelmolekülchemie von Polymeren

Neue Analysetechniken wie die Rastertunnelmikroskopie (STM), Rasterkraftmikroskopie (AFM) oder Einzelmolekülspektroskopie ermöglichten in den letzten Jahren die Untersuchung einzelner Moleküle, etwa auf Oberflächen oder in Lösung. Indem die Reaktion einzelner Moleküle auf äußere Kräfte oder Reize beobachtet wurde, konnten Rückschlüsse auf die angesprochenen molekularen Mechanismen gezogen werden. Auf diese Weise ist es möglich, Zusammenhänge zwischen molekularen Ereignissen und makroskopischen Eigenschaften des Ensembles zu finden.⁵³ Die Beobachtung chemischer Reaktionen auf der Ebene einzelner Moleküle ermöglichte kurzlebige Zwischenprodukte zu identifizieren und komplexe Reaktionswege sichtbar zu machen. Dies ist insbesondere bei Reaktionen biologischer Makromoleküle interessant, da hier Unterschiede zwischen verschiedenen aktiven Spezies (zum Beispiel unterschiedliche Konformere eines Enzyms) verlorengehen, wenn nur der Mittelwert des Ensembles gemessen wird.⁵⁴ Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie konnten sogar die einzelnen wachsenden Spezies während einer radikalischen Polymerisation beobachtet werden. Mit dieser Methode können Heterogenitäten detektiert werden, die auf molekularer Ebene während der Polymerisation auftreten und die resultierenden Polymereigenschaften beeinflussen können.⁵⁵

In der Chemie konnten einzelne Moleküle in Nanostrukturen räumlich separiert werden, um anschließend sogenannte „Einzelmolekül-Reaktionen“ durchzuführen. Dieses Konzept wurde von Ozin als Nanochemie bezeichnet.⁵⁶ Reaktionen einzelner Moleküle die zum Beispiel in den Hohlräumen von Zeolithen durchgeführt wurden, folgten teilweise einem anderen Reaktionsmechanismus und zeigten eine höhere Reaktionsordnung, was auch als Einzelmolekülchemie definiert wurde.^{53, 57, 58}

Die räumliche Separation einzelner Polymerketten in Nanoreaktoren führt zu mehreren interessanten Effekten, die im Folgenden näher beschrieben werden. Zum einen kann das Verhältnis von inter- und intramolekularen Reaktion verschoben werden, indem in jedem Nanoreaktor ausschließlich eine einzige Polymerkette vorliegt. In diesem Fall

sind intramolekulare Reaktionen bevorzugt und durch die Kompartimentalisierung werden extrem hohen Verdünnungen, wie sie für diese Reaktionen üblicherweise eingesetzt werden, überflüssig. Zum anderen wird für einzelne Polymere ein anderes physikalisch-chemisches Verhalten erwartet, da typische Polymereigenschaften, die auf ein Zusammenspiel vieler Polymerketten zurückgehen, nicht mehr ausgebildet werden können.⁵³

Ein Beispiel für die räumliche Separation von einzelnen Makromolekülen in der Natur stellt die Proteinfaltung in Kompartimenten dar.⁵⁹ Synthetisch wurden beispielsweise Vesikelmembranen zur Separation einzelner Polymerketten während der Polymerisation verwendet.⁶⁰ Shin et al. setzten Proteinporen als Nanoreaktoren für das Stufenwachstum einzelner Polymerketten ein.⁶¹ Außerdem dienten Miniemulsionströpfchen als Nanoreaktoren für die Polymerasekettenreaktion separiert vorliegender DNA-Moleküle.⁶² Auch in lebenden Organismen sind DNA-Moleküle durch ihre räumliche Umgebung stark eingeschränkt. Biophysiker untersuchten deshalb in den letzten Jahren vermehrt sowohl experimentell als auch theoretisch die geometrischen und topologischen Begrenzungen von DNA in Bakteriophagen.⁶³ Das Diffusionsverhalten synthetischer Polymere in begrenzten Systemen wurde experimentell untersucht, indem Polymerketten zwischen zwei flachen Platten extrem geringen Abstandes (2 nm) gebracht wurden. Theoretische Simulationen beschäftigten sich zudem mit dem Einfluss einer kugelförmigen Begrenzung (zum Beispiel eines Miniemulsionströpfchens) auf die Verknotungswahrscheinlichkeit einzelner Polymerketten (siehe **Abbildung 1**).⁶⁴

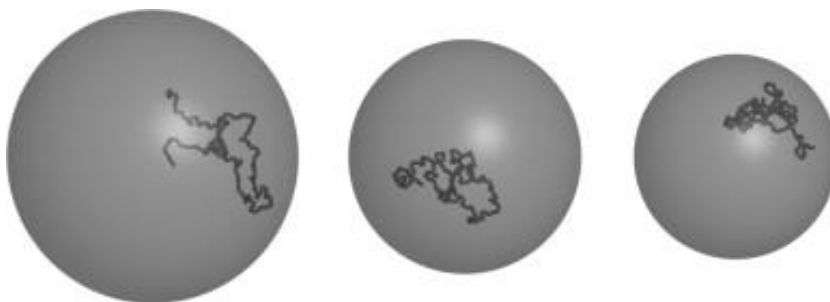


Abbildung 1: Simulierte Struktur einer Polymerkette ($M_w=420000$ g/mol) in einer kugelförmigen Begrenzung (Miniemulsionströpfchen mit 22 nm Durchmesser). Die Wahrscheinlichkeit, dass die Polymerkette unverknotet vorliegt, nimmt mit dem Radius der räumlichen Begrenzung ab.⁶⁴

2.2.2 Herstellung von Polymer-Einzelkettenpartikeln

Erste Versuche, einzelne Polymerketten räumlich separiert zu synthetisieren, verwendeten **Mikroemulsionen**.^{65, 66} Mikroemulsionen sind thermodynamisch stabile Emulsionen mit einer Tröpfchengröße in Bereich von 10-200 nm und bestehen aus einem Gemisch aus Wasser/Öl/Tensid/Cotensid.⁶⁷ In der Mikroemulsionspolymerisation erfolgt die Polymerisation in den winzigen Monomertröpfchen. Experimentell konnten in Anwesenheit großer Mengen an Tensid/Cotensid auf diese Weise Dispersionen mit sehr kleinen Polymerpartikeln (20-30 nm Durchmesser) hergestellt werden. Wird eine geringe Konzentration an öllöslichem Initiator eingesetzt, ist es möglich, sehr hohe Molekulargewichte zu erreichen. Die erhaltenen Partikel enthalten in diesem Fall im Durchschnitt nur wenige Polymerketten pro Partikel. Aufgrund der sehr breiten Molekulargewichtsverteilung konnte jedoch nicht bewiesen werden, dass es sich hier tatsächlich in der Mehrzahl um Einzelkettenpartikel handelt.⁶⁸⁻⁷⁰ Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Mecking et. al. über die katalytische Polymerisation von Polyethylen in Mikroemulsion. Auch hier konnten sehr kleine Nanopartikel (10-30 nm Durchmesser) synthetisiert werden, welche aus nur wenigen Polymerketten bestehen.^{71, 72} Indem diese Methode optimiert wurde, konnten vor kurzem Nanopartikel aus Polyacetylen hergestellt werden, welche im Durchschnitt annähernd eine Polymerkette pro Partikel enthalten.⁷³ Beschränkungen dieser Methode liegen in der sehr breiten Molekulargewichtsverteilung, der Anwesenheit anorganischer Katalysatoren sowie Cotensiden, die nach der Synthese nur schwer entfernt werden können, sowie in der Anwendbarkeit auf nur wenige Monomere.

Eine weitere Möglichkeit, Polymerpartikel aus einer einzelnen Kette zu synthetisieren, besteht in der **kovalenten intramolekularen Vernetzung** einzelner in hoher Verdünnung in Lösung vorliegender Polymerketten. Die Charakterisierung der inneren Polymerstruktur erwies sich nach der Vernetzung als äußerst schwierig, meist wurde über die Größe der erhaltenen Nanopartikel angenommen, dass es sich hier um Einzelkettenpartikel handelt.^{74, 75} Auf ähnliche Weise wurden mit Benzocyclobuten funktionalisierte Polymere intramolekular zu sehr kleinen Partikeln vernetzt.^{76, 77} Außerdem wurden mit Isocyanat-Gruppen funktionalisierte Polymere in Anwesenheit von Diaminen intramolekular vernetzt.⁷⁸ In den beschriebenen Experimenten diente die Vernetzung der Polymerketten hauptsächlich zur Stabilisierung der Einzelkettenstruktur

und ermöglichte deren Untersuchung in Schmelzen.⁷⁶ Aufgrund der irreversiblen intramolekularen Vernetzung konnten jedoch keine Rückschlüsse auf die Materialeigenschaften der einzelnen unvernetzten Polymere gezogen werden. In letzter Zeit wurden einige neue Methoden gefunden, Polymere intramolekular zu vernetzen, um sehr kleine Polymerpartikel zu synthetisieren. Beispiele für Reaktionen, die hierfür verwendet wurden, sind die Photodimerisierung von Cumarin⁷⁹ oder Cycloadditionen⁸⁰ (Click-Chemie). In einem weiter reichenden Beispiel wurden einzelne Blöcke eines Triblock-Copolymeren intramolekular vernetzt, was zu unimolekularen Januspartikeln führte.⁸¹

Eine **reversible supramolekulare Vernetzung** einzelner Polymerketten wurde in hoch verdünnten Polymerlösungen durch die Ausbildung supramolekularer Wechselwirkungen erreicht. Zum Beispiel führte der reversible, durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausgelöste Kollaps einzelner Polymerketten zu sehr kleinen Einzelkettenpartikeln.⁸² Inspiriert von der intramolekularen Faltung der Proteine in der Natur, synthetisierten Foster et al. Polymere mit speziellen Funktionalitäten, welche sich durch intramolekulare Faltung in hochverdünnter Lösung in kompakte Einzelkettenpartikel verwandeln.⁸³ Vor kurzem konnten durch intramolekulare Faltung von Polymeren mit speziellen chiralen Seitengruppen sogar Einzelkettenpartikel mit helikaler Tertiärstruktur hergestellt werden.⁸⁴ Obwohl die hier ausgenutzten supramolekularen Wechselwirkungen (Wasserstoff-Brückenbindungen) prinzipiell reversibel sind, ist die supramolekulare Faltung in den beschriebenen Beispielen nicht reversibel. Grund hierfür ist die UV-initiierte Abspaltung kleiner Moleküle, welche die Faltung der Polymere auslöst.⁸⁵ Diese faltbaren Polymersysteme sind jedoch sehr komplex und werden synthetisch extrem aufwändig hergestellt. Außerdem eignen sie sich auf Grund ihrer Komplexität nicht für die Untersuchung grundlegender Polymereigenschaften. DNA stellt ein Beispiel für ein faltbares Biopolymer dar. Synthetisch konnten aus einzelnen DNA-Molekülen in Gegenwart gegensätzlich geladener Tensidmoleküle durch elektrostatische Wechselwirkungen und anschließende oxidative Vernetzung kompakte DNA-Einzelkettenpartikel hergestellt werden.⁸⁶

Polymerchemiker interessierten sich bereits in den 60er Jahren für die grundlegenden Eigenschaften einzelner Polymerketten in Lösung wie zum Beispiel für die Wechselwirkungen des Polymeren mit Lösungsmittelmolekülen und die Dimension

einzelner Polymerketten.⁸⁷ Insbesondere der Übergang einer einzelnen Polymerkette in Lösung vom Knäuel zu einem kompakteren Zustand (sogenannte „Coil-Globule“-Umwandlung) wurde später intensiv untersucht. Chu et al. analysierten mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) den Übergang von Polymerketten vom gequollenen zum kollabierten kompakten Zustand. Dabei wurde herausgefunden, dass die Dichte der kollabierten Polymerketten annähernd die des Feststoffes erreicht. Es wurde auch versucht, über die Coil-Globule-Umwandlungen, welche durch äußere Faktoren wie das Lösungsmittel oder die Temperatur (Θ -Bedingungen) ausgelöst werden können, Einzelkettenpartikel herzustellen.⁸⁸ Die aus der Lösung kollabierten einzelnen Polymerketten agglomerierten jedoch Sekunden nach ihrer Bildung, weshalb auf diese Weise keine Einzelkettenpartikel zur Untersuchung der Materialeigenschaften hergestellt werden konnten. Um die kolloidale Stabilität der einzelnen kollabierten Polymerketten zu erhöhen, wurden Partikel aus wenigen sulfonat-funktionalisierten Polymeren hergestellt.⁸⁹ Xu et al. umgingen das Problem der Agglomeration einzelner Polymerketten im kollabierten Zustand, indem sie die winzigen Partikel direkt nach ihrer Bildung durch Ausschütteln vom organischen Lösungsmittel in eine wässrige Tensidlösung überführten.⁹⁰ Allerdings reichte die Ausbeute an Partikeln, die aus nur wenigen Polymerketten bestanden, nur für deren Analyse mittels DLS aus.

Verschiedene **physikalische Methoden** wurden eingesetzt, um Einzelkettenpartikel oder Partikel mit nur wenigen Polymerketten aus zuvor synthetisierten Polymeren herzustellen. Hierzu wurden einzelne Polymerketten mit Techniken wie zum Beispiel der Sprühtrocknung⁹¹ oder der Gefriertrocknung⁹² separiert. Außerdem wurden einzelne Polymerketten aus verdünnter Lösung an Flüssigkeitsoberflächen angeordnet und anschließend (durch dropcasting) auf eine Oberfläche aufgebracht.⁹³ Mit Hilfe dieser Methoden konnten sehr kleine Polymerpartikel, die aus nur wenigen Polymerketten bestehen, auf Oberflächen hergestellt, und mittels TEM oder AFM untersucht werden. Diese Methoden eignen sich jedoch nicht, Einzelkettenpartikel als Pulver in größerer Menge herzustellen, wie es für die Materialcharakterisierung nötig wäre. Mit Techniken wie der Gefriertrocknung verdünnter Polymerlösungen könnten zwar größere Probenmengen hergestellt werden, auf Grund des undefinierten Herstellungsprozesses können jedoch nur Vermutungen über die Struktur des Materials gemacht werden und ob es sich hierbei tatsächlich um Einzelkettenpartikel handelt.

Eine Methode um definierte Einzelkettenpartikel in Dispersion herzustellen, sodass deren Analyse mit Methoden wie der DLS oder Mikroskopie möglich ist, ist der sogenannte Ouzo-Effekt (siehe Kapitel 2.1.3). Durch Ausfällen von zuvor synthetisierten konjugierten Polymeren aus hochverdünnter Lösung mittels des Ouzo-Effektes konnten sehr kleine aus wenigen Polymerketten bestehende Partikel (ca. 10 nm Durchmesser) hergestellt werden.^{94, 95} Der Feststoffgehalt der erhaltenen Dispersionen war jedoch extrem gering, sodass eine Herstellung größerer Mengen an Partikeln auf diese Weise schwierig erscheint.

2.3 Biomineralisation und biomimetische Synthese

2.3.1 Grundlagen der Kristallisation in Bezug auf Biomineralisation

Homogene **Keimbildung** erfolgt, indem sich spontan ein Keim aus einer übersättigten Lösung herausbildet. Dagegen geht die heterogene Keimbildung auf die Bildung eines Keims an einer im System befindlichen Oberfläche zurück. Kristallisationen in der Biomineralisation erfolgen üblicherweise durch heterogene Keimbildung in einem biologischen System (zum Beispiel an einer organischen Matrix oder in einem Vesikel). Die Prinzipien, die der homogenen Keimbildung zugrunde liegen, sollen hier zum besseren Verständnis kurz erläutert werden.

Die Bildung eines Kristallkeimes aus einer Lösung ist zunächst kinetisch gehemmt. Durch Konzentrationsfluktuationen in der Lösung ist es jedoch möglich, dass diese Energiebarriere überwunden wird und sich ein Keim ausbildet, der anschließend zu einem Kristall weiterwachsen kann. Die Energie, die zur Bildung eines Keimes nötig ist, setzt sich aus der Differenz von freier Oberflächenenergie (Energie, die zur Bildung einer neuen Oberfläche pro Flächeneinheit nötig ist) und freier Volumenenergie (Energie, die durch die Bildung der neuen Phase pro Volumeneinheit entsteht) zusammen. Im klassischen Fall, der Bildung eines sphärischen Nukleus, ergibt sich die freie Keimbildungsenergie (ΔG_N) damit aus folgender Formel:⁹⁶

$$\Delta G_N = 4\pi r^2 \gamma + 4\pi r^3 \frac{\Delta G_V}{3V_m} \quad 2-1$$

mit γ als der freien Grenzflächenenergie oder Grenzflächenspannung und ΔG_V als der freien molaren Energie der Fest-Flüssig Phasenumwandlung und V_m als molarem Volumen. Die Einflüsse, die die freie Keimbildungsenergie bei der Bildung eines sphärischen Keimes bestimmen, sind in **Abbildung 2** gezeigt.

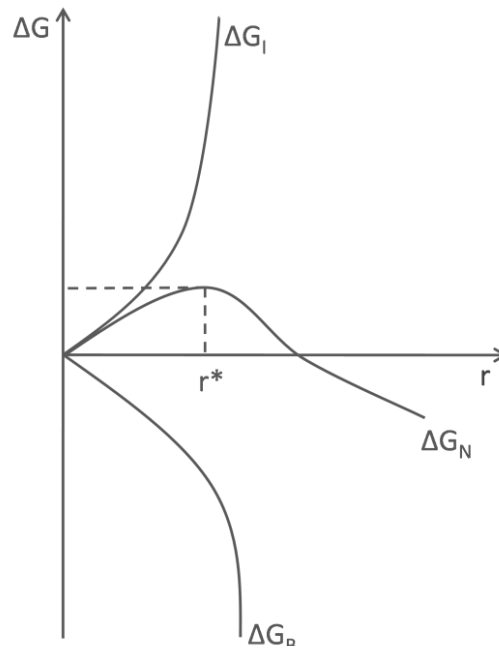


Abbildung 2: Auftragung der freien Keimbildungsenergie (ΔG_N) als Funktion der Clustergröße r . Die freie Keimbildungsenergie (ΔG_N) ergibt sich aus der Differenz der freien Obeflächenenergie (ΔG_I) und der freien Volumenenergie (ΔG_B).

Der kritische Keimbildungsradius (r^*) ergibt sich durch Auflösen nach r ($d\Delta G_N/dr = 0$) aus:

$$r^* = \frac{2\gamma V_m}{\Delta G_V} \quad 2-2$$

Die Aktivierungsenergie der homogenen Keimbildung (ΔG_N^*) ergibt sich durch die Substitution von r^* in 2-1 und der Abhängigkeit der freien Phasenumwandlungsenergie (ΔG_V) von der Übersättigung S_R der Lösung ($\Delta G_V = kT \ln S_R$):

$$\Delta G_N^* = \frac{16\pi\gamma^3 V_m^2}{3(kT \ln S_R)^2} \quad 2-3$$

Die Keimbildungsgeschwindigkeit J_N wird in folgender Formel beschrieben (mit A als Vorfaktor):

$$J_N = A \exp\left(-\frac{\Delta G_N^*}{kT}\right) \quad 2-4$$

Aus diesen Gleichungen ergibt sich, wie die Aktivierungsenergie und die Keimbildungsgeschwindigkeit durch die Grenzflächenenergie und die Übersättigung beeinflusst werden. In der Biomineralisation werden diese Faktoren maßgeblich durch organische Gerüste (engl. Matrices) oder die Veränderung von Ionen-Konzentrationsgradienten mit Hilfe von Membranen gesteuert, wie im nächsten Kapitel näher beschrieben wird. Insbesondere die Grenzflächenenergie hat einen enormen Einfluss auf die Keimbildung und die kritische Keimbildungsgröße, was der Grund dafür ist, dass die meisten Kristallisationen durch heterogene Keimbildung ausgelöst werden. Die erniedrigte Grenzflächenenergie, zum Beispiel an der Oberfläche eines Substrates, führt bei gleichbleibender Übersättigung zu einer Erhöhung der Keimbildungsgeschwindigkeit. In der Biomineralisation wird dieser Effekt noch verstärkt, indem spezifische Wechselwirkungen an Grenzflächen, die beispielsweise durch chemische oder strukturelle Komplementarität entstehen, die Aktivierungsenergie der Keimbildung herabsetzen.⁹⁷ In **Abbildung 3** sind die physikalisch-chemischen Einflüsse, die die biologische Mineralisation kontrollieren, zusammengefasst gezeigt.

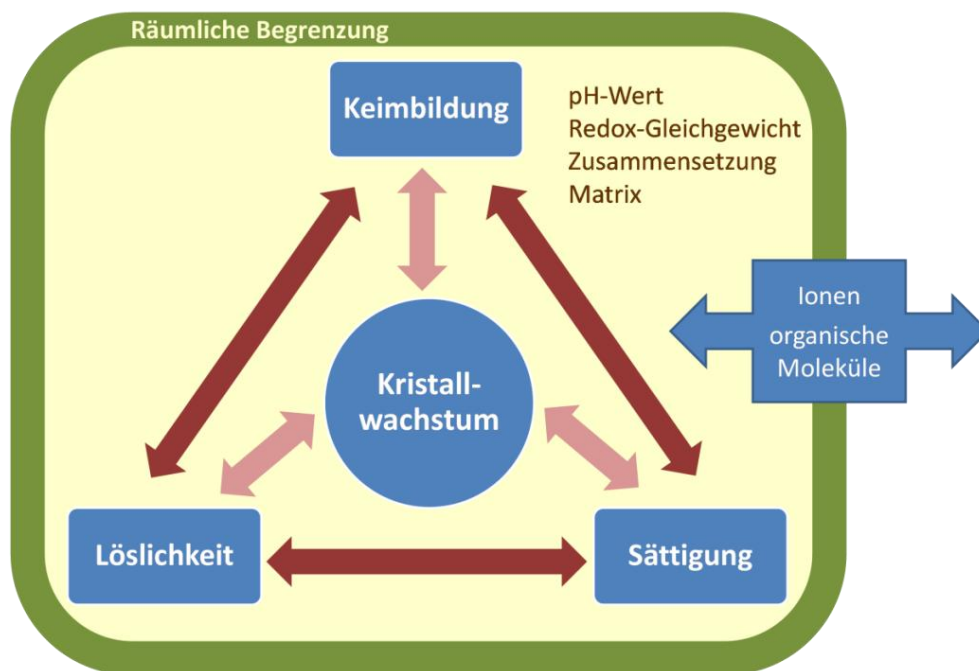


Abbildung 3: Schematisch dargestellte Einflüsse, welche die biologische Mineralisation kontrollieren.

Das **Kristallwachstum** beeinflusst die Morphologie der entstehenden Kristalle. Im Folgenden sollen deshalb entscheidende thermodynamische und kinetische Faktoren des Kristallwachstums erläutert werden. Anorganische Kristalle wachsen aus Lösungen, indem kontinuierlich Ionen zur Kristalloberfläche diffundieren und in das Kristallgitter

eingebaut werden. Die Morphologie der erhaltenen Kristalle wird durch die relativen Wachstumsraten der verschiedenen Kristallflächen bestimmt. Die Gleichgewichtsmorphologie (thermodynamische Morphologie) eines Kristalles ergibt sich bei gegebenem Volumen aus der minimalen gesamten Oberflächenenergie (Wulffs Regel). Die Oberflächenenergie einer Kristallfläche kann wiederum durch die Adsorption von Additiven wie Ionen oder organischen Molekülen herabgesetzt werden. Das anisotrope Wachstum von Kristallen kann daher thermodynamisch damit erklärt werden, dass die spezifische Adsorption von Additiven an spezielle Kristallflächen zu einer Herabsetzung der Oberflächenenergie und Hemmung des Wachstums dieser Kristallflächen führt.^{98, 99}

Kristallisationen, wie sie in der Biomineralisation oder in der biomimetischen Synthese beobachtet werden, finden jedoch häufig weit entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht statt. In diesen Prozessen wird das Kristallwachstum durch kinetische Faktoren bestimmt, welche vor allem die Aktivierungsenergie von Keimbildung, Kristallwachstum und Phasenumwandlung beeinflussen. Synthetisch können die kinetischen Faktoren der Kristallisation beeinflusst werden, indem die Wechselwirkung der sich bildenden Keime und Kristalle mit Oberflächen oder löslichen Molekülen verändert wird. In der Biomineralisation wird angenommen, dass beim Kristallwachstum an organischen Matrices die Aktivierungsenergie der Keimbildung und des Wachstums spezifischer Kristallflächen und Polymorphe herabgesetzt ist. Dies führt häufig zu einer mehrstufigen Kristallisation, zum Beispiel über amorphe Präkursorphasen und kristalline Zwischenstufen unterschiedlicher Struktur und Modifikation, anstelle eines einstufigen Prozesses. Ursache hierfür ist vor allem die Beschaffenheit der organischen Grenzfläche, an der die Kristallisation stattfindet. Es wird angenommen, dass die Anordnung der gebildeten Kristallkeime durch elektrostatische, strukturelle und stereochemische Übereinstimmungen an der organisch-anorganischen Grenzfläche gesteuert wird. Dieser Prozess wird in der Biomineralisation und biomimetischen Chemie auch als molekulare Erkennung bezeichnet.^{98, 100}

Als Modellsystem zur Untersuchung der Wechselwirkungen an der organisch/anorganischen Grenzfläche während der Keimbildung und des Kristallwachstums wurden selbstanordnende Monolagen verwendet. Indem Moleküle

mit verschiedenen funktionellen Gruppen gezielt in speziellen Mustern auf Metalloberflächen aufgebracht wurden, konnte sowohl die Dichte als auch das Muster der Keimbildung kontrolliert werden. Außerdem konnte durch die Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Flächeneinheiten die kristallografische Orientierung der Kristalle kontrolliert werden.¹⁰¹

2.3.2 Experimentelle Analyse des Biomineralisationsprozesses

In der Biomineralisation und biomimetischen Synthese werden häufig Hybridmaterialien gebildet, die aus anorganischen Kristallen in einer weichen molekularen Matrix bestehen. Um die Bildung dieser komplexen Strukturen und die zu Grunde liegenden Kontrollmechanismen besser zu verstehen, sind Untersuchungen der Kristallisation sowie der Wechselwirkung zwischen der anorganischen und der organischen Phase nötig. Da das Wechselspiel zwischen den organischen Bestandteilen (Matrix-Moleküle oder lösliche Additive) und den sich bildenden Mineralien höchst dynamisch ist und sich während der Mineralisation ändert, werden häufig sogenannte in-situ oder zeitaufgelöste Methoden zur Analyse der Mineralisation verwendet. Typischerweise werden zur Untersuchung der biomimetischen Mineralisation unterschiedliche Methoden der Beugung, Spektroskopie und Mikroskopie eingesetzt. Eine Kombination unterschiedlicher Methoden ist meist nötig, um Informationen über die Struktur und Morphologie des Materials zu erhalten. Außerdem führt die Analyse von sowohl lokalen als auch kollektiven Eigenschaften auf unterschiedlichen Längenskalen zu einem Verständnis des gesamten Bildungsprozesses der Hybridmaterialien.¹⁰²

Die biomimetische Mineralisation von Calciumphosphat in Gegenwart löslicher und unlöslicher organischer Template wurde detailliert untersucht, indem komplexe Titrationsexperimente (gleichzeitige Titration von Calcium- und Phosphat-Ionen sowie des pH-Wertes) mit hochauflösender Rasterkraftmikroskopie (AFM) kombiniert wurden. Auf diese Weise wurden sowohl Informationen über die unterschiedlichen sich bildenden Calciumphosphat-Phasen und deren Morphologien als auch über die Wechselwirkung der Templat-Moleküle mit den wachsenden Kristallebenen erhalten.¹⁰³ Aufgrund der Komplexität des Biomineralisationsvorgangs werden zudem computergestützte Simulationen zu Hilfe genommen, um experimentelle Ergebnisse der

biomimetischen Mineralisation zu interpretieren und theoretische Vorhersagen über die zu erwartenden Strukturen zu treffen.¹⁰⁴

2.3.3 Von Biomineralisation zu bioinspirierter Synthese

Biomineralien besitzen eine hohe Ordnung bezogen auf ihre Struktur, Zusammensetzung, Form und Organisation. Im Folgenden sollen die Grundprinzipien der Biomineralisation näher erläutert werden und ein Zusammenhang zwischen den oben genannten Eigenschaften von Biomineralien und der biomimetischen Materialchemie hergestellt werden.

Der Prozess der Biomineralisation kann in drei Phasen unterteilt werden, die in der Reihenfolge steigender Komplexität als supramolekulare Vororganisation, molekulare Erkennung an Grenzflächen und zelluläre Verarbeitung bezeichnet werden. Im ersten Schritt der Biomineralisation wird durch supramolekulare Vororganisation organischer Substanzen eine definierte Reaktionsumgebung gebildet. Hierbei wird zwischen zwei unterschiedlichen Konzepten unterschieden. Zum einen führt die Selbstanordnung organischer Moleküle zu Proteinkäfigen und Lipidvesikeln, in deren begrenztem Inneren anschließend die Mineralisation stattfindet. Zum anderen werden durch Selbstanordnungsprozesse ausgedehnte Netzwerke aus Proteinen und Polysacchariden als Matrix für die Mineralisation gebildet. Im zweiten Schritt der Biomineralisation findet die kontrollierte Keimbildung anorganischer Cluster aus wässriger Lösung statt. Dabei dienen die organischen supramolekularen Systeme, welche im ersten Schritt gebildet wurden, als Gerüst für die geordnete Ausbildung der anorganischen Phase. Die meist funktionalisierten organischen Oberflächen dienen als Templat für die anorganische Keimbildung, wobei Effekte der molekularen Erkennung an der organisch/anorganischen Grenzfläche eine große Rolle spielen (siehe 2.3.1). Im letzten Schritt der Biomineralisation bilden sich aus den in den ersten beiden Schritten geformten kleineren Einheiten Biomineralien mit größerer Dimension heraus. Hierfür sind zelluläre Prozesse, welche in größerem Maßstab stattfinden, verantwortlich. Diese sogenannte zelluläre Verarbeitung führt zu den ungewöhnlichen Formen und Zusammensetzungen, wie sie in natürlich vorkommenden Biomineralien gefunden werden.⁹⁷

Das Verständnis der Biomineralisation inspirierte Materialchemiker zur Entwicklung neuer Synthesewege, welche die grundlegenden Prinzipien der Biomineralisation ausnutzen. Konzepte der Biomineralisation wie supramolekulare Vororganisation und molekulare Erkennung an Grenzflächen führten etwa zu Materialsynthesen, die auf der räumlichen Eingrenzung von Reaktionsräumen und der Verwendung organischer Template basieren.^{4, 5, 98, 99} Auf diese Weise konnten organisierte anorganische und Kompositmaterialien durch kontrollierte bio-inspirierte Synthese hergestellt werden. Im nächsten Kapitel soll am Beispiel des bekanntesten Calciumphosphat-basierten Biomaterials, Knochen, der Zusammenhang zwischen Biomineralisation und biomimetischer Synthese erklärt werden.

2.3.4 Beispiel eines Calciumphosphat basierten Biomaterials: Knochen

Knochen ist ein klassisches Beispiel eines natürlich vorkommenden Calciumphosphat-basierten Biomaterials mit interessanten Eigenschaften. Im menschlichen Körper dient Knochen zum einen der mechanischen Stabilisierung und zum anderen als Ionenspeicher sowohl für Anionen als auch für Kationen. Diese Materialeigenschaften hängen entscheidend von der Größe, Struktur und Zusammensetzung des Knochens ab. Insbesondere die Struktur dieses Kompositmaterials weckte das Interesse vieler Materialchemiker, da sie wie viele Biomaterialien eine komplexe hierarchische Ordnung auf unterschiedlichen Längenskalen zeigt.²

Die niedrigste Organisationsstufe des Knochens besteht aus einzelnen nanometerkleinen Kristallen aus nicht-stöchiometrischem Hydroxylapatit (HAP) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (mit Ioneneinschlüssen) in einer organischen Matrix. Diese Struktur entsteht durch die kontrollierte Mineralisation von HAP in einer Matrix aus vernetzten Kollagenfibrillen, Glycoproteinen und vielen anderen Proteinen. Die Kollagenfibrillen bestehen aus Kollagen-1-Molekülen, welche zu einer Tripelhelix angeordnet sind, die wiederum kristalline faserförmige Strukturen ausbildet. Im Inneren dieser Kollagenfibrillen befinden sich in regelmäßigen Abständen Zwischenräume, in denen die Keimbildung und das Wachstum plättchenförmiger HAP-Kristalle stattfindet.⁹⁷ Die nächsthöhere Organisationsstufe beschreibt die Anordnung von Kollagen und Kristallen im Mikrometerbereich. Makroskopisch betrachtet besteht Knochenmaterial aus einer relativ

dichten äußeren Schicht (kompakter Knochen) und einem porösen Innenraum, dem schwammartigen Knochen, welcher mit gelartigem Knochenmark gefüllt ist.

Im Labor wurde die Struktur des Knochens synthetisch nachgebildet, indem amphiphile Polypeptidstränge mit Calciumphosphat mineralisiert wurden. Auf diese Weise entstand ein geordnetes Kompositmaterial, welches Knochen auf der niedrigsten Ordnungsebene sehr stark ähnelt.¹⁰⁵ Auch wurde die Rolle von Kollagen und einiger bei der Knochenbildung beteiligter Proteine für die Mineralisation von Calciumphosphat in verschiedenen Kristallisationsexperimenten detailliert untersucht.¹⁰⁶ Insbesondere die Bedeutung von funktionellen Gruppen der organischen Matrix im Keimbildungsprozess wurde dabei näher betrachtet.

Außerdem wurde versucht, die Oberfläche von Substraten so zu modifizieren, dass sie der Struktur und Oberfläche des Knochens möglichst nahe kommen. Ziel dieser sogenannten bio-inspirierten Synthesen ist es zum Beispiel, Beschichtungen herzustellen, die ein Einwachsen von natürlichem Knochen bei gleichzeitigem langsamem Abbau der Beschichtung ermöglichen.^{10, 11}

2.3.5 Templatgesteuerte Kristallisation von Calciumphosphat

Allgemein wurde der Einsatz von Templaten in der biomimetischen Synthese anorganischer Materialien sowohl im Hinblick auf das grundlegende Verständnis als auch mit Blick auf Anwendungen intensiv untersucht.¹⁰⁷ So gibt es in der aktuellen Literatur zahlreiche Beispiele, in denen das Konzept der Selbstanordnung (engl. „self-assembly“) zur Synthese von Hybrid-Nanoteilchen und Nanomaterialien angewendet wird.¹⁰⁸ Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Knochenmineralien weckte die templatgesteuerte Synthese von Hydroxylapatit besonderes Interesse. Als Template für die Mineralisation von HAP wurden Hydrogele,^{33, 109, 110} Copolymer-Mizellen,¹¹¹ Polyelektrolyte,¹¹² Mikroemulsionen¹¹³ und Fasern¹¹⁴ verwendet. In diesen Systemen dienten sowohl natürlich vorkommende Biopolymere als auch synthetisch hergestellte Polymere mit negativ oder positiv geladenen funktionellen Gruppen als aktive Matrix für die Mineralisation. In Kapitel 2.3.6 wird die Verwendung von oberflächenfunktionalisierten Polymernanopartikeln als Templat für die Calciumphosphat-Kristallisation näher beschrieben.

Organische Gerüste (engl. „matrices“) erfüllen in der templatgesteuerten Mineralisation mehrere Funktionen. Sie bestehen aus einem unlöslichen organischen Gerüst, das Räume für die Mineralisation bietet, als strukturelles Gerüst für die mechanische Stabilität dient und durch ihre Grenzflächenaktivität die Keimbildung kontrolliert. Charakteristisch für die templatgesteuerte Synthese sind die spezifische Keimbildung und das Wachstum der anorganischen Phase an der Oberfläche von funktionalisierten organischen Strukturen.⁹⁷ Die Ladungsverteilung an der Oberfläche des Substrates spielt dabei für die Keimbildung des Kristalles eine wichtige Rolle. Calcium-enhaltende Biomineralien sind zum Beispiel häufig mit Säuregruppen enthaltenden Makromolekülen verbunden. Diese anionischen funktionellen Gruppen (aus Carboxyl- oder Phosphonsäure-Gruppen enthaltenden Aminosäuren) bilden starke elektrostatische Bindungen mit Calciumionen, was zu einer Anhäufung der Metallkationen an bestimmten Stellen des organischen Substrates führt. Es wird vermutet, dass dieser Vorgang für die Erniedrigung der Aktivierungsenergie der anorganischen Keimbildung an funktionalisierten organischen Substraten verantwortlich ist. Die räumliche Ladungsverteilung ist je nach Oberflächentopografie des Substrates verschieden, wie in **Abbildung 4** schematisch dargestellt ist.¹⁰⁰



Abbildung 4: Effekt der Oberflächentopografie auf die Ladungsverteilung an organischen Oberflächen; (a) ebene, b) konkave, c) konvexe Oberfläche mit geladenen funktionellen Gruppen (nach ⁹⁷).

Außerdem beeinflusst die geometrische Anordnung der Ladungen auf der Oberfläche die anorganische Keimbildung. Entspricht die regelmäßige Anordnung der Ladungen an der Substratoberfläche dem Gitterabstand einer bestimmten Kristallfläche, so ordnet sich der entstehende Keim bevorzugt entlang dieser Kristallfläche an das Substrat an (siehe **Abbildung 5**).⁴

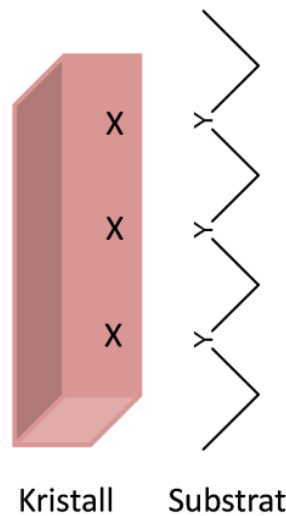


Abbildung 5: Geordnetes Kristallwachstum durch geometrische Anpassung zwischen Substrat (Y) und wachsendem Kristall (X) (nach ⁴).

Besitzen die in der Mineralisation eingesetzten Template eine spezifische Form, so können sie zusätzlich zur physikalischen Formgebung anorganischer Materialien verwendet werden. Oft wird in diesen Fällen nach dem Entfernen der organischen Matrix (zum Beispiel durch Verbrennen) eine anorganische Replik der organischen Architektur erhalten.⁹⁷

Neben der templatgesteuerten Kristallisation können organische Strukturen auch zur räumlichen Begrenzung des Fällungsprozesses verwendet werden. Ähnlich wie in den in der Natur vorkommenden Phospholipid-Vesikeln, werden in der bioinspirierten Synthese anorganische Materialien in räumlich begrenzten Systemen hergestellt. Beispiele für die biomimetische Synthese in begrenzten Reaktionsräumen werden in Kapitel 2.3.7 näher erklärt.

2.3.6 Polymernanopartikel als Template

Die Verwendung Oberflächen-funktionalisierter Polymerpartikel als Template für die Synthese organisch-anorganischer Hybridpartikel mit einstellbarer Kristallmorphologie stellt eine elegante biomimetische Strategie zur Herstellung von Komposit-Nanomaterialien dar. Biomimetische Synthesestrategien ermöglichen die Kontrolle über Struktur,¹¹⁵ Form¹¹⁶⁻¹¹⁸ und Größe der Mineralien und führen, im Gegensatz zur getrennten Herstellung der anorganischen Kristalle,¹¹⁹ zu einer sehr guten Verbindung zwischen organischen und anorganischen Materialbestandteilen.¹⁰⁷ Die erhaltenen

Hybridstrukturen mit unterschiedlichen Morphologien sind interessant für verschiedene Anwendungen, da Faktoren wie Form und Struktur die Materialeigenschaften entscheidend beeinflussen.⁹⁹ Die Kristallform bestimmt zum Beispiel die mechanischen Eigenschaften des Hybridmaterials. Zudem verändert sich durch die Kristallform die Adsorption und Freisetzung von Medikamenten wie Zytostatika, Bisphosphonaten oder DNA aus HAP-Kristallen.¹²⁰⁻¹²² Die Oberflächentopographie ist ein weiterer wichtiger Faktor, welcher die Eigenschaften von Materialien beeinflusst. Die topografische Veränderung von Titandioxid-Substraten im Nanometer-Bereich führte zum Beispiel zu einer verbesserten Osseointegration (Implantateinheilung).¹²³

Trotz der Komplexität des natürlichen Biomineralisationsvorgangs kann die Oberflächenfunktionalisierung, welche eine Mineralabscheidung induziert, im Labor nachgeahmt werden. Die Rolle von Glycoproteinen (Osteonektin oder Phosphoproteine) und γ -Carboxylglutaminsäure-Proteinen wie Osteokalzin wurde ausführlich untersucht und im Zusammenhang mit der Wachstumsgrenze von Biomineralien diskutiert.^{124, 125} Aufgrund der Komplexität des Biomineralisations-Mechanismus von Knochen und Zähnen ist dieser in seiner Gesamtheit bis heute nicht vollständig geklärt. Dennoch wird angenommen, dass negativ geladene Gruppen, wie zum Beispiel Phosphatgruppen in vielen Phosphoproteinen (Phosphoserin) und Carboxylgruppen in Gla-Proteinen, Calcium-Ionen aus der Umgebung binden und die HAP-Mineralisation induzieren können. Mit selbstanordnenden Monolagen durchgeführte Studien haben bewiesen, dass Phosphat- und Carboxyl-Gruppen zu einer effektiven Keimbildung von HAP aus Lösungen, die den im menschlichen Körper vorliegenden Bedingungen ähneln, führen.^{126, 127}

Insbesondere Phosphonat-Gruppen sind als funktionelle Gruppen für die Komplexierung von Calcium-Ionen vielversprechend, da sie im Gegensatz zu Carboxyl-Gruppen diprotisch sind. Außerdem zeigen Phosphonat-Gruppen durch die Ausbildung von Säure-Base-Wechselwirkungen eine sehr gute Haftung an Metalloxid-Substraten,¹²⁸⁻¹³¹ wodurch sie als Ankergruppe auf Metalloxid basierten Implantat-Oberflächen dienen können.¹³² Die Bedeutung von Pyrophosphat und organischen Bisphosphonaten in der in vitro-Mineralisation wurde bereits 1969 untersucht.¹³³ Die starke Bindung an HAP-Kristalle führte zudem zum weit verbreiteten Einsatz einer Vielzahl von Bisphosphonaten in der Medizin als physiologische Regulatoren der

Knochenresorption.¹³⁴ Phosphonat-funktionalisierte Partikel, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, eignen sich daher ausgezeichnet als Templat für die Bildung von HAP auf der Partikeloberfläche und die Anbindung an Implantat-Oberflächen.

Oberflächen-funktionalisierte Polymerpartikel wurden bereits zur Abscheidung verschiedener anorganischer Materialien aus Präkursor-Phasen wie Metalloxiden eingesetzt. Zum Beispiel wurden mit Indiumhydroxid ($\text{In}(\text{OH})_3$) oder Zinkoxid (ZnO) beschichtete Polymermikropartikel hergestellt, deren Morphologien sich abhängig von der Hydrolysegeschwindigkeit des Präkursors unterschieden.^{135, 136} HAP-beschichtete Polymerpartikel wurden synthetisiert, indem Pd-immobilisierte Carboxylgruppen und β -Diketon-Gruppen als aktive funktionelle Gruppen verwendet wurden.^{137, 138} In beiden Fällen wurde die tensidfreie Emulsionspolymerisation verwendet, um Oberflächen-funktionalisierte Polymerpartikel herzustellen. Die Menge an anorganischem Material, welches auf der Partikeloberfläche abgeschieden wurde, wurde entweder durch eine Variation der Reaktionsbedingungen¹³⁷ oder der Menge an zugegebenen Salzen kontrolliert.¹³⁸ Zudem wurden Carboxyl-funktionalisierte Polymernanopartikel, welche über die Miniemulsionstechnik hergestellt wurden, als Template für die HAP-Bildung eingesetzt.³⁴ Obwohl die Menge an HAP-Kristallen auf der Oberfläche der Nanopartikel variiert werden konnte, indem die Menge an funktionellen Gruppen variiert wurde, wurde keine vollständige Bedeckung der Partikeloberfläche mit HAP-Kristallen erreicht. Zudem ist bisher wenig über die Kinetik der Mineralabscheidung aus einfachen Ionen als Präkursoren unter Verwendung von Polymerpartikeln als Template bekannt.

2.3.7 Synthese organisch/anorganischer Hybridkapseln

In den letzten Jahren wurden in der biomedizinischen Forschung enorme Anstrengungen unternommen, um multifunktionelle Nanokapseln zu entwickeln. Verschiedene Zielsetzungen wie Medikamentenfreisetzung, eine genaue Zielgruppenansprache (engl. „targeting“) und eine kontinuierliche Überwachung (engl. „monitoring“) in Kombination mit einer Ansprache auf mehrere Auslöser sollten dabei gleichzeitig verwirklicht werden.^{17, 139-141} Einige Bestrebungen zielten auf die Verkapselung von Medikamenten in bioabbaubaren Nanokapseln oder Nanogelen ab, um eine kontrollierte Medikamentenfreisetzung zu erreichen, ohne dabei toxische Materialien einzusetzen.¹⁴² Besonders organisch-anorganische Hybridmaterialien zeigen

ein großes Potential als multifunktionelle Freisetzungssysteme, da sie die unterschiedlichen Materialeigenschaften und Funktionalitäten der organischen und anorganischen Komponenten verbinden.^{9, 143} Außerdem ermöglichen neue Synthesestrategien wie die templatgesteuerte Mineralisation die Herstellung biomimetischer Materialien unter milden Reaktionsbedingungen.

Ein neuartiges multifunktionelles System für die medizinische Freisetzung könnte nicht nur auf Grund äußerer Stimuli Medikamente freisetzen, sondern das sich zersetzende Material selbst könnte verschiedene nützliche Funktionalitäten besitzen. Biomimetische Strategien, welche auf der kontrollierten Mineralisation des Knochenminerals Calciumphosphat unter Verwendung organischer (Makro)moleküle als Template beruhen, scheinen sich hierfür ideal zu eignen.⁴ Verschiedene Template wie Polysaccharide,¹⁴⁴ Tenside,¹⁴⁵ Mikroemulsionen,¹⁴⁶ vernetzte Mizellen^{147, 148} oder Liposome¹⁴⁹ wurden mineralisiert und führten zur erfolgreichen Herstellung von Calciumphosphat-Kapseln.

Die Herstellung von Calciumphosphat-Kapseln unter Verwendung von Liposomen als Templat erfolgte mittels Phosphat-funktionalisierter Lipide als negativ geladene, Calcium-Ionen komplexierende Moleküle. Nach der Herstellung der Liposomen wurden diese durch mehrfaches Zugabe von Calcium- und Phosphat-Ionen zu Calciumphosphat-Kapseln mineralisiert. Da Liposome jedoch eine sehr hohe Empfindlichkeit gegenüber Elektrolyten besitzen, waren viele einzelne Zugabeschritte nötig.¹⁴⁹

Polysaccharid/Calciumphosphat-Kapseln wurden hingegen in einem Schritt synthetisiert, indem eine poröse Schicht aus Alginat (negativ geladener Polyelektrolyt) und Chitosan (positiv geladener Polyelektrolyt) um mikrometergroße Natriumalginat-Tröpfchen gebildet wurde. Gleichzeitig führte die Diffusion von Calcium- und Phosphat-Ionen zu einer Fällung von Calciumphosphat an der Tröpfchengrenzfläche. Dieses Konzept basiert auf der Komplexierung von Ionen an der Grenzfläche, an der sich die gegensätzlich geladenen Polyelektrolyte befinden.¹⁴⁴

Vor kurzem wurden zudem mit Hilfe peptidbasierter Template wie synthetischen virusähnlichen Partikeln¹⁵⁰ oder proteinstabilisierten Pickering-Emulsionen¹⁵¹ Calciumphosphat/Peptid-Kapseln hergestellt. Außerdem konnten unterschiedliche

modifizierte Peptide wie zum Beispiel Netzwerke aus Peptid-Amphiphilen mit funktionellen Säuregruppen¹⁵² oder komplexe Strukturen aus Polymer-Peptid-Conjugaten¹⁵³ als Templat für die Calciumphosphat-Mineralisation in Lösung eingesetzt werden. Obwohl einige der Calciumphosphat-basierten Kapselsysteme bereits erste Erfolge in Freisetzungsexperimenten zeigten,^{144, 154} sind diese Systeme entweder sehr komplex und mehrere Syntheseschritte sind bei ihrer Herstellung nötig oder sie sind zu groß, um als Nanocarrier (Nanometer-großes Trägersystem) eingesetzt zu werden. Außerdem basieren die meisten existierenden Systeme auf Wasser-in-Wasser (w/w) Emulsionen, was eine effektive Verkapselung aktiver Substanzen erschwert.

Gelatine Nano- oder Mikropartikel wurden erfolgreich als Template in der Calciumphosphat-Mineralisation eingesetzt, da sie verschiedene funktionelle Gruppen für die Komplexierung von Calciumionen bereitstellen. Gleichzeitig kann die Calciumphosphat-Phase gezielt eingestellt werden und zum Beispiel HAP-Kristalle in den Partikeln verkapselt werden.^{33, 109, 155} Die wasserlöslichen Gelatinemoleküle werden normalerweise durch organische Moleküle vernetzt, um Gelatinenetzwerke zu erhalten, welche unlöslich in Wasser sind. Anschließend können die vernetzten Partikel mit Calciumphosphat zu Hybridmaterialien mineralisiert werden. In dieser Arbeit wird ein neues Konzept zur in situ-Herstellung von Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln vorgestellt, welches auf der direkten Mineralisation der Gelatine-Moleküle an der Tröpfchengrenzfläche von Wasser-in-Öl (w/o) Miniemulsionen basiert. In diesem Fall ist keine zusätzliche Vernetzung nötig, das Calciumphosphat selbst fungiert als Vernetzer der Gelatineketten und stabilisiert die kompakte organisch-anorganische Hybrid-Hülle der Nanokapseln.

Gelatine wird aus Kollagen, einem wichtigen Protein im Körper, hergestellt und ist ein vielseitiges Biomaterial, was vor allem auf seine Bioabbaubarkeit, Biokompatibilität und nicht immunogene Eigenschaften zurückgeht. Gelatine enthält viele verschiedene funktionelle Gruppen, weshalb unterschiedliche Medikamente, DNA oder andere Biomoleküle kovalent angebunden werden können. Besonders im Hinblick auf ihre gute Abbaubarkeit hat sich Gelatine für die Verwendung in der Medikamentenfreisetzung bereits bestens bewährt. Auslöser für eine kontrollierte Zersetzung der Gelatine können Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur oder die Anwesenheit von Enzymen sein.

Beim Abbauvorgang von Gelatine entstehen nicht nur ungiftige, sondern auch wertvolle Zersetzungsprodukte wie Aminosäuren und Peptide.^{156, 157}

Calciumphosphat als anorganischer Anteil der Kapselhülle oder als HAP-Kristalle im Kapselinneren ist ein vielseitiges Biomaterial, welches als Trägermaterial für DNA und andere Medikamente in biologischen Systemen eingesetzt wird.^{107, 158, 159}

Calciumphosphat ist die anorganische Komponente von Knochen und Zähnen (siehe auch Kapitel 2.3.4) und zeigt daher hohe Biokompatibilität und gute Bioabbaubarkeit. Die Zersetzung von Calciumphosphat kann je nach der Löslichkeit der unterschiedlichen Calciumphosphat-Phasen durch Änderungen des pH-Wertes gezielt ausgelöst werden.¹⁰³ Die bei diesem Vorgang frei werdenden Calcium- und Phosphat-Ionen sind ungiftig, gleichzeitig haben sich Calcium-Ionen als förderlich für das Wachstum neuen Knochenmaterials erwiesen.

3 Methoden

In diesem Kapitel wird auf die für diese Arbeit wichtigen Charakterisierungsmethoden näher eingegangen.

3.1 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskope erlauben die Untersuchung und Charakterisierung von Materialien vom Nanometer- zum Mikrometermaßstab. Ursprünglich wurden Elektronenmikroskope entwickelt, um die Einschränkungen von Lichtmikroskopen, die auf Grund der Wellenlänge des Lichtes nur Objekte bis ca. $0,2\text{ }\mu\text{m}$ sichtbar machen können, zu überwinden. In der Elektronenmikroskopie werden hingegen Elektronenstrahlen verwendet, deren Wellenlänge von der angelegten Beschleunigungsspannung abhängt. Zur Fokussierung des Strahls werden in Elektronenmikroskopen magnetische Linsen anstatt Glaslinsen (wie im Lichtmikroskop) verwendet. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe, so können unterschiedliche Wechselwirkungen auftreten (siehe **Abbildung 6**).

Grundsätzlich wird zwischen Raster- (REM) und Transmissionselektronenmikroskopen (TEM) unterschieden, wobei im TEM der durch die Probe transmittierte Elektronenstrahl und im REM die von der Probenoberfläche gestreuten Elektronen zur Bildgebung verwendet werden. Sowohl REM als auch TEM können zusätzlich zur Bildgebung für die energiedispersive Röntgenbeugung (EDX) verwendet werden, um die Elementzusammensetzung der Probe zu analysieren.

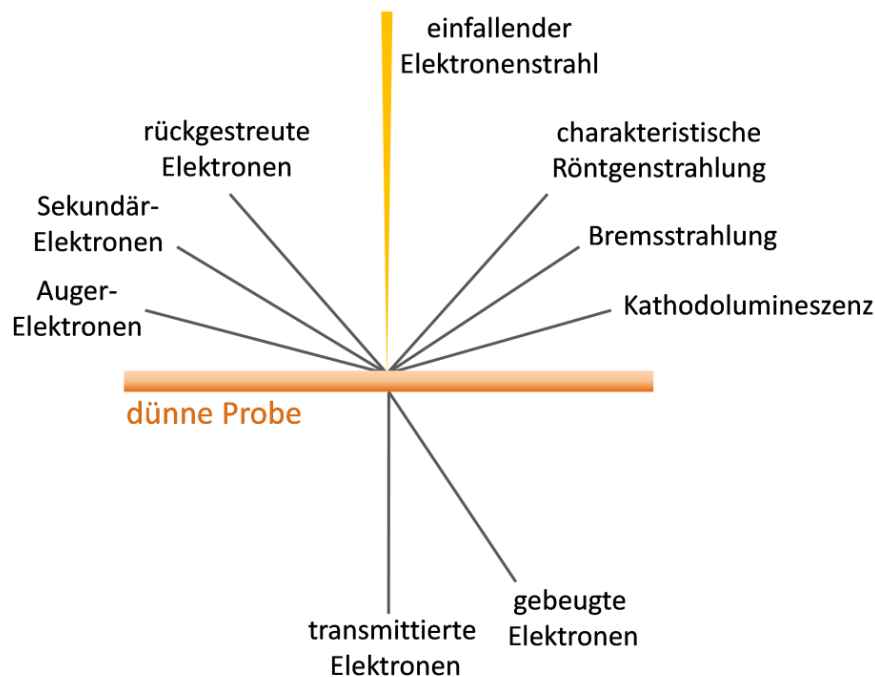


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe.

3.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Beim TEM tritt der Elektronenstrahl durch die Probe hindurch, dabei kommt es zur Wechselwirkung der Elektronen mit der Probe. Nachdem die Elektronen das Linsensystem aus Objektiv-, Zwischen- und Projektivlinsen durchquert haben, wird das Bild der Probe auf einem Fluoreszenzschirm dargestellt. Der Kontrast des Bildes hängt vom Streuvermögen der Atome (umso höher, je größer die mittlere Ordnungszahl des Atoms) und der Massendicke (Produkt aus Dichte und Dicke der Probe) der Probe ab. Besitzt eine Probe einen geringen Eigenkontrast, kann der Kontrast durch Komplexierung von Molekülen höherer Ordnungszahl wie Phosphorwolframsäure, RuO_4 oder OsO_4 erhöht werden.

Im Hellfeldmodus des TEM entstehen die Bilder durch den transmittierten Strahl, wohingegen im Dunkelfeldmodus Teile des gestreuten Strahls zur Bildgebung verwendet werden. Zwischen den beiden Abbildungsmodi kann durch Verschieben der Objektblende gewechselt werden. Mit Hilfe der Elektronenbeugung können zudem Kristallstrukturen im TEM bestimmt werden. Mit Hilfe der Elektronenenergieverlust-Spektroskopie (EELS) kann die Elementzusammensetzung einer Probe analysiert werden. Die Methode nutzt die inelastische Streuung des Primärstrahls durch die

Elektronen der in der Probe befindlichen Atome. Durch die inelastische Streuung verlieren die Elektronen des Primärstrahls einen Teil ihrer Energie, der Energieverlust der Elektronen wird anschließend im EELS-Spektrum aufgetragen.

Da das Objekt im TEM in Transmission betrachtet wird und die Eindringtiefe von Elektronen begrenzt ist, können nur sehr dünne Proben oder dünne Schnitte von Proben betrachtet werden. Außerdem wird im TEM ein Elektronenstrahl hoher Intensität verwendet, um eine ausreichende Helligkeit und guten Kontrast zu erreichen, was zu Veränderungen oder der Zerstörung der Probe führen kann.

3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie

In der Rasterelektronenmikroskopie wird der Elektronenstrahl nur auf eine winzige Stelle der Probe fokussiert und die aus der Probe austretenden Elektronen werden gemessen. Die Oberflächentopografie der Probe wird dabei unter Verwendung der Sekundärelektronen abgebildet, wohingegen die chemische Zusammensetzung der Probe unter Verwendung der rückgestreuten Elektronen analysiert werden kann. Da der Austritt von Sekundärelektronen an Kanten erleichtert ist und diese deshalb heller erscheinen, wird im REM ein kontrastreiches, räumlich wirkendes Bild erhalten. Da im REM nur Sekundärelektronen gemessen werden, reicht hier ein schwacher primärer Elektronenstrahl aus. Außerdem müssen die Elektronen im REM die Probe nicht durchdringen, weshalb auch dickere Proben (als im TEM) abgebildet werden können.

3.2 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) wird auch als Photonen-Korrelationsspektroskopie oder quasielastische Lichtstreuung bezeichnet. Mit Hilfe der DLS können Partikelgrößenverteilungen in stark verdünnten Dispersionen im Bereich von ungefähr 1 nm bis 2 μm bestimmt werden. In einer DLS-Messung wird die Probe zunächst von Laserlicht durchstrahlt und die entstehende Streustrahlung wird anschließend in einem bestimmten Winkel gemessen. Um eine Vielfachstreuung des Laserlichts und Wechselwirkungen zwischen den Teilchen auszuschließen, muss die Probe in hochverdünntem Zustand gemessen werden.

Das Prinzip der DLS geht auf den Doppler-Effekt zurück, welcher durch die freie Diffusion (Brownsche Molekularbewegung) von Teilchen verursacht wird. Trifft Laserlicht auf ein Teilchen, so wirkt dieses als Streuzentrum und sendet Sekundärwellen aus. Aufgrund der Bewegung der Teilchen kommt es zu einer Frequenzverschiebung des gestreuten Lichtes, wobei der Betrag der Verschiebung abhängig ist von der mittleren Geschwindigkeit der diffundierenden Teilchen. In der Lichtstreuung werden die zeitabhängigen Fluktuationen der Streuintensität gemessen, die durch die Interferenz des gestreuten Lichtes entstehen. Durch Vergleichen der zu unterschiedlichen Zeitpunkten (t und $t+\tau$) erhaltenen Intensitäten ($I(t)$ und $I(t+\tau)$) wird dann eine Korrelationsfunktion berechnet. Kleine Teilchen bewegen sich schneller als große, wodurch die Korrelationsfunktion bei kleinen Teilchen schneller abnimmt. Mit Hilfe der zeitabhängigen Autokorrelationsfunktion ist es daher möglich, den Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Der hydrodynamische Radius (R_h) kann anschließend im Falle einer kugelförmigen Symmetrie über die Stokes-Einstein-Gleichung aus dem Diffusionskoeffizienten bestimmt werden:

$$R_h = \frac{K_B T}{6\pi n_0 D} \quad 3-1$$

mit K_B als Boltzmann-Konstante, T als Temperatur, n_0 als Viskosität des Mediums und D als Diffusionskoeffizient.

Für polydisperse Systeme wird die Autokorrelationsfunktion durch eine Summe verschiedener e-Funktionen beschrieben. Zur Berechnung der Partikelgrößenverteilung können unterschiedliche Fit-Funktionen verwendet werden. In dieser Arbeit wurde die CONTIN-Methode (sogenannter regularisierter Fit) verwendet, welche die erhaltenen Daten glättet, um statistische Fehler möglichst zu eliminieren.

3.3 Ionenselektive Elektroden

Die potentiometrische Messung der Aktivität von Calciumionen in einer Lösung verschiedener Ionen ist in vielen Bereichen der Biologie, Geologie und des Wassermanagements von großem praktischem Interesse. Aus diesem Grund wurden neben anderen ionenselektiven Elektroden Calciumionen-sensitive Elektroden entwickelt. Die Messung von Ionenpotentialen geht auf die Nernstgleichung zurück:

$$U = U^\circ + \frac{RT}{zF_A} \ln \frac{a_{ox.}}{a_{red.}} \quad 3-2$$

Mit U als Reduktionspotential, U° als Standardreduktionspotential, R als universelle Gaskonstante, T als Temperatur, z als Zahl transferierter Elektronen, F_A als Faraday-Konstante, a_{ox} als Aktivität der oxidierten Spezies, und a_{red} als die Aktivität der reduzierten Spezies. In ideal verdünnten Systemen kann die Konzentration direkt in die Nernst-Gleichung eingesetzt werden, da die Aktivitätskoeffizienten beider Spezies annähernd eins sind. Um Ionenpotentiale zu messen, muss eine Referenzelektrode mit einer Messelektrode verbunden werden. In **Abbildung 7** ist der Messaufbau einer solchen Messapparatur schematisch dargestellt. Als Referenzelektrode wurde in dieser Arbeit eine Glaselektrode eingesetzt, mit der gleichzeitig der pH-Wert bestimmt werden konnte.

Prinzipiell wird bei den ionenselektiven Elektroden je nach Art der ionenselektiven Membran zwischen festen oder flüssigen sowie Spezialmembranen unterschieden. Als feste Membranen dienen zum Beispiel Glas- oder Kristallmembranen und flüssige Membranen gehen häufig auf klassische Ionenaustauscher oder ionenleitende Membranen zurück. Die ionenselektiven Flüssigmembranen enthalten eine organische Phase (flüssig) mit Komponenten, die spezifische Ionen austauschen oder komplexieren können. In Matrixmembranen wird diese organische Flüssigphase in eine polymere Matrix eingebettet. In dieser Arbeit wurde eine Elektrode mit einer Calciumionen-selektiven Polymermembran verwendet. Die ionenselektive Membran erlaubt nur bestimmten Ionen die Diffusion durch die Grenzfläche zwischen dem inneren Elektrolyten und der äußeren Probenlösung. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivitäten des zu analysierenden Ions in der äußeren Lösung und der in der Polymermembran

befindlichen organischen Lösung entsteht eine Spannungsdifferenz an der Grenzfläche der Lösungen, welche durch die ionenselektive Elektrode detektiert wird.

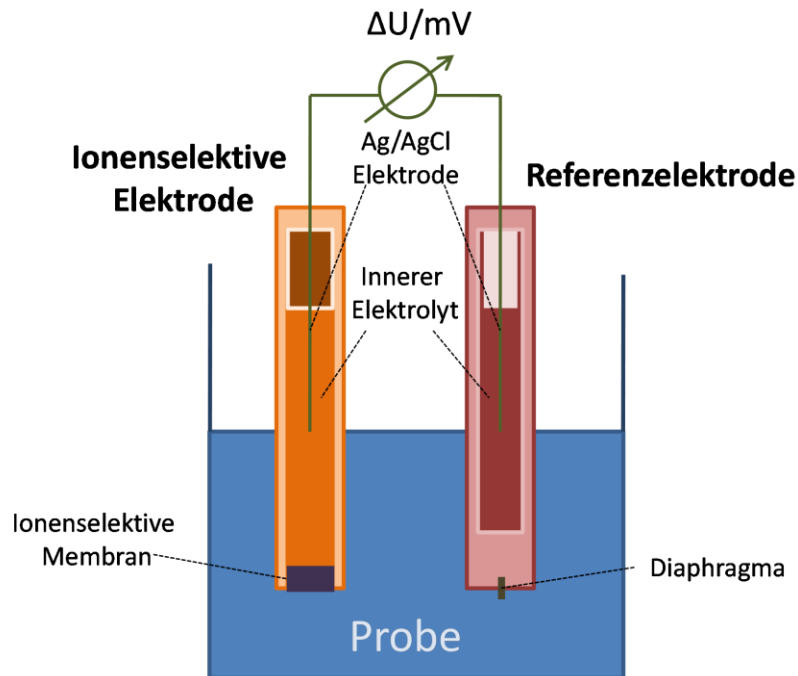


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Zellaufbaus von ionenselektiven Elektroden.

Der elektrochemische Aufbau kann wie folgt schematisch dargestellt werden:
 $\text{Ag(s)}|\text{AgCl(aq)}||\text{Membran}||\text{Probenlösung}||\text{Diaphragma}||\text{AgCl(aq)}|\text{Ag(s)}$

Die untere Detektionsgrenze liegt bei den meisten ionenselektiven Elektroden bei einer Konzentration zwischen 10^{-5} von 10^{-6} M. Diese untere Grenze entsteht in hoher Verdünnung auf Grund nicht ausreichender Selektivität durch konkurrierende Kationen. Die obere Detektionsgrenze liegt bei ungefähr 10^{-1}M und geht auf die Störung durch Anionen zurück, die Lösung verhält sich in hoher Konzentration aus physikalisch-chemischer Sicht nicht mehr ideal.

3.4 Röntgenbeugung

Röntgenbeugung (engl. X-ray diffraction, XRD) bezeichnet die Beugung von Röntgenstrahlen an geordneten Strukturen (wie z.B. Kristallen). Kristalle enthalten eine periodisch wiederkehrende geometrische Anordnung der Grundbausteine (Atome oder Moleküle). Die Wellenlänge von Röntgenstrahlung liegt in der Größenordnung von Atomen und Molekülen, weshalb sie sich zur Strukturaufklärung deren Anordnung eignet. In kristallinen Materialien bilden die Atome oder Atomgruppen ein räumliches Gitter. Wird ein Kristall mit Röntgenwellen durchstrahlt, so werden die Wellen an der Elektronenhülle der Atome gestreut, wobei die Elektronen zu Schwingungen angeregt werden und wiederum Sekundärwellen aussenden. Die gestreuten Wellen interferieren konstruktiv, wenn der Abstand zwischen den Strahlen 1 und 2 ein mehrfaches (n) der Wellenlänge der Röntgenstrahlen (λ) beträgt (**Abbildung 8**).

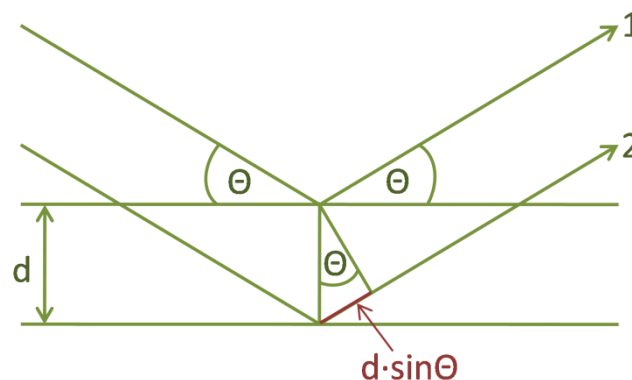


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Entstehung von Interferenz bei der Beugung von Röntgenstrahlung an periodisch geordneten Strukturen.

Die Bedingung für konstruktive Interferenz wird durch die Bragg-Gleichung beschrieben:

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad 3-3$$

mit d als dem Abstand der Netzebenen im Kristall oder dem Abstand zweier Gitterpunkte und n als der Ordnung der Reflexe. Der Winkel, unter dem sich die interferierenden Wellen verstärken wird mit θ bezeichnet.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Ergebnisteil dieser Arbeit werden in den ersten drei Kapiteln verschiedenartige Polymer/Calciumphosphat-Hybridpartikel und -Kapseln beschrieben, die über die bioinspirierte Mineralisation von Calciumphosphat unter Verwendung von organischen Templaten hergestellt wurden. Im ersten Kapitel werden die Synthese von Polymer/Calciumphosphat-Nanopartikeln mit kontrollierter Morphologie sowie deren ausführliche Charakterisierung behandelt. Im zweiten Kapitel werden medizinisch interessante Partikel- und Kapselsysteme mit Calciumphosphat mineralisiert und deren mögliche Anwendung als Implantatbeschichtung untersucht. Im dritten Kapitel wird die Synthese von Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln über die Grenzflächenmineralisation in Miniemulsion sowie die Verkapselung und Freisetzung verschiedener Substanzen gezeigt. Das vierte Kapitel behandelt die Herstellung von Polymer-Einzelkettenpartikeln über die Miniemulsions-/Verdampfungs-technik sowie die genaue Untersuchung deren Eigenschaften.

4.1 Polymer/Calciumphosphat-Nanopartikel mit kontrollierter Morphologie

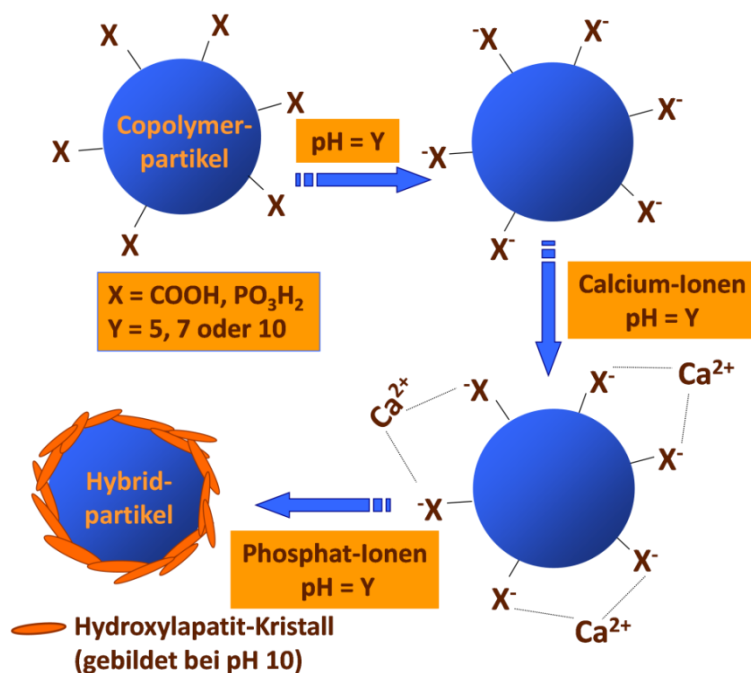
Die Synthese organisch-anorganischer Partikel durch die Verwendung von Polymerpartikeln als Templat stellt eine biomimetische Methode zur Herstellung von Kompositmaterialien dar. Organisch/anorganische Hybridpartikel mit kontrollierter Morphologie besitzen interessante Eigenschaften für verschiedene Anwendungsgebiete wie der Medizin, der Katalyse oder der Optoelektronik. Dieses Kapitel beschreibt die Herstellung von Hybridpartikeln mit Hilfe der bioinspirierten Mineralisation von Calciumphosphat auf Oberflächen-funktionalisierten Polymer-Nanopartikeln. Im Biomineralisationsprozess von Calciumphosphat spielen die funktionellen Gruppen der Templatmoleküle, insbesondere Phosphonat- und Phosphatgruppen, eine wichtige Rolle (siehe auch Kapitel 2.3.6).¹³³ Phosphonatgruppen zeigen unter anderem eine starke Anbindung an das Knochenmineral HAP, weshalb organische Bisphosphonate heute in der Medizin als physiologische Regulatoren der Knochenresorption eingesetzt werden.¹³⁴ Aus diesem Grund wurden hier Phosphonat-funktionalisierte Partikel für die templatgesteuerte Mineralisation von Calciumphosphat verwendet.

Außerdem wurde der Einfluss verschiedener funktioneller Gruppen sowie unterschiedlicher pH-Werte auf die Kristallphase und Morphologie der Hybrid-Nanopartikel verglichen. Dazu wurden elektronenmikroskopische Methoden (REM und TEM) sowie Elektronen- und Röntgenbeugung eingesetzt. Die genaue Steuerung der Morphologie der Kompositpartikel ist für die potentielle Anwendung als Knochenfüllmaterial oder Implantatbeschichtung von großer Bedeutung, da die Leistung eines Biomaterials stark von der Oberflächentopografie abhängt.

Die Neigung verschiedener funktioneller Oberflächengruppen, Calcium-Ionen zu binden, wurde mit Hilfe von Calciumionen-selektiven Elektroden in Titrationsexperimenten bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Auf diese Weise sollte die Mineralisationskinetik sowie die Grenzflächenchemie zwischen den komplexierenden Ionen und den sich ausbildenden Kristallphasen näher beleuchtet werden. Die hierbei gewonnenen Kenntnisse legen die Grundlage, um in Zukunft verschiedene anorganische Materialien kontrolliert auf der Oberfläche von Polymernanopartikeln zu kristallisieren, um somit funktionelle Kompositmaterialien mit gezielt einstellbaren Eigenschaften herzustellen.

4.1.1 Oberflächen-funktionalisierte Polymerpartikel als Templat

Die Synthese organisch-anorganischer Hybridpartikel mit Calciumphosphat als anorganischem Bestandteil über die Mineralisation Oberflächen-funktionalisierter Nanopartikel ist in **Schema 1** gezeigt. In früheren Experimenten, die von A. E. durchgeführt wurden, wurde diese Methode bereits zur Herstellung von mit HAP beladenen Partikeln verwendet.³⁴ In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss verschiedener funktioneller Oberflächengruppen sowie unterschiedlicher Mineralisationsbedingungen auf die erhaltenen Hybridpartikel untersucht. Hierzu wurden Partikel bei unterschiedlichem pH-Wert zunächst mit Calcium-Ionen und anschließend mit Phosphat-Ionen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 5:3 beladen.



Schema 1: Schematische Darstellung der Synthese von Polymer/Calciumphosphat-Hybridpartikeln durch die Beladung von Oberflächen-funktionalisierten Nanopartikeln mit Calcium- und Phosphat-Ionen.

Die Polymer-Nanopartikel mit unterschiedlichen funktionellen Oberflächengruppen wurden mittels des Miniemulsionsprozesses hergestellt, indem funktionelle Comonomere eingesetzt wurden. Die Vielseitigkeit der Miniemulsionstechnik zeigt sich in der Synthese stabiler, einheitlicher und monodispers verteilter oberflächenfunktionalisierter Polymerpartikel mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen.^{15, 160, 161} Verschiedene Comonomere mit variierender Hydrophilie,

Acrylsäure (AA), Vinylphosphonsäure (VPA) und Vinylbenzylphosphonsäure (VBPA), wurden in der Copolymerisation mit Styrol eingesetzt, um die entsprechenden Carboxylat- und Phosphonat-funktionalisierten Polymer-Nanopartikel herzustellen. In **Abbildung 9** sind die Strukturformeln der verwendeten Comonomere gezeigt. Die Phosphonat-funktionalisierten Partikel wurden von A. Z. synthetisiert.^{160, 161} Die funktionalisierten Partikel wurden anschließend als Templat für die Kristallisation von Calciumphosphat auf der Partikeloberfläche verwendet. Die Bildung von Calciumphosphat hängt sehr stark von Faktoren wie dem pH-Wert, der Temperatur oder der Anwesenheit von Templaten ab, da diese großen Einfluss auf die Nukleation und das Wachstum der Kristalle haben. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Mineralisation detailliert untersucht und die Mineralisation von Phosphonat-funktionalisierten Partikeln mit der Mineralisation von Carboxyl-funktionalisierten Partikeln verglichen.

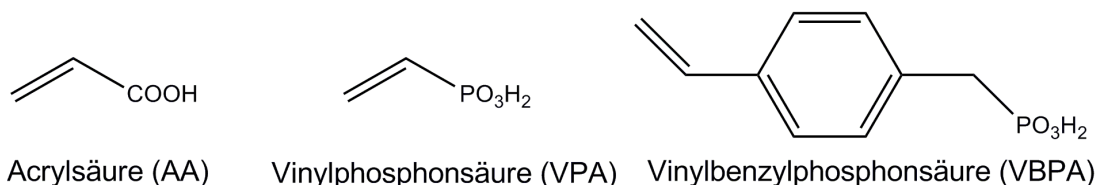


Abbildung 9: Strukturformeln der in der radikalischen Miniemulsionspolymerisation eingesetzten funktionellen Comonomere.

Frühere Versuche ergaben, dass durch die Verwendung des nichtionischen Tensids Lutensol AT50 Carboxyl-funktionalisierte Partikel mit relativ hoher Oberflächendichte an funktionellen Gruppen hergestellt werden konnten. Im Vergleich hierzu führte die Verwendung des ionischen Tensides SDS bei der gleichen Menge an funktionellem Comonomer zu einer geringeren Zahl an funktionellen Oberflächengruppen. Zudem zeigten die mit nichtionischem Tensid hergestellten Partikel eine gute kolloidale Stabilität gegenüber Elektrolytzusatz und führten folglich zu einer guten Bedeckung der Partikel mit Hydroxylapatit-Kristallen. Die mit SDS stabilisierten Partikel mussten vor der Beladung mit HAP einem Tensidaustausch mit Lutensol unterzogen werden und zeigten nach der Beladung eine geringere Dichte an HAP auf der Partikeloberfläche.³⁴ Aus diesen Gründen wurden in der hier vorliegenden vergleichenden Untersuchung alle Partikel mit dem nicht-ionischem Tensid Lutensol AT50 hergestellt.

4.1.2 Einfluss unterschiedlicher funktioneller Gruppen

Die Partikelgröße und die Menge verschiedener funktioneller Oberflächengruppen wurden mittels DLS und PCD (engl. „particle charge detection“) bestimmt (**Tabelle 1**). Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass es mit unterschiedlichen Comonomeren möglich war, Oberflächen-funktionalisierte Partikel herzustellen. Allerdings ist hier für die unterschiedlichen verwendeten Comonomere kein linearer Zusammenhang zwischen dem Anteil an eingesetztem Comonomer und der Menge an resultierenden funktionellen Oberflächengruppen erkennbar. Dies könnte im Falle der Proben A02 und A04 mit der unterschiedlichen Wasserlöslichkeit der funktionellen Comonomere und der wachsenden Polymerketten zusammenhängen, was großen Einfluss auf die Kinetik der Miniemulsionspolymerisation hat. Im Falle des öllöslichen Comonomer VBPA könnte die strukturelle Ähnlichkeit von VBPA mit Styrol einer der Gründe für den vermehrten Einbau in die entstehenden Partikel bei Probe A03 sein. Dies führte in diesem Fall zur höchsten Zahl an funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche. Es sollte hier erwähnt werden, dass es nicht in allen Fällen möglich ist, die Dichte an funktionellen Oberflächengruppen nur durch das Steigern des Comonomer-Anteils zu erhöhen. Die Hauptursache hierfür ist, dass der maximale Prozentsatz an eingesetztem funktionellen Comonomer in der Miniemulsionspolymerisation für eine gegebene Tensidkonzentration auch durch die Stabilität der gebildeten Miniemulsion begrenzt wird.^{15, 160, 161}

Tabelle 1: Partikelgröße und Anzahl funktioneller Oberflächengruppen von Partikeln, die mit verschiedenen funktionellen Comonomeren durch die Miniemulsionspolymerisation mit Styrol (S) hergestellt wurden.

Probe	Comonomer	Menge Comonomer (Gew.-% bez. S)	Partikelgröße ^[a] (nm)	Oberflächengruppen ^[b] (nm ⁻²)
A01	-	-	205 ± 60	-
A02	AA	3	264 ± 2	2.6
A03	VBPA	5	235 ± 13	3.3
A04	VPA	10	180 ± 18	0.4

[a] Partikelgrößen und deren Standardabweichung (±) bestimmt mittels DLS.

[b] Menge an Oberflächengruppen/nm² bestimmt mittels PCD.

Da in der vorliegenden Untersuchung möglichst hohe Beladungsdichten mit HAP-Kristallen erreicht werden sollten, wurden für jedes Comonomer die Partikel mit den meisten funktionellen Oberflächengruppen pro Oberfläche verwendet. Die jeweiligen

Partikel wurden nach mehreren Waschzyklen in den im Folgenden beschriebenen Beladungsexperimenten eingesetzt.

Die mit unterschiedlichen Mengen an Comonomer, bezogen auf die Gesamtmenge an Monomer, hergestellten Polymer-Nanopartikel (0 Gew.-% Comonomer, 3 Gew.-% AA, 10 Gew.-% VPA, 5 Gew.-% VBPA) wurden bei konstantem pH-Wert von 10 mit HAP beladen. Es wurde herausgefunden, dass die Dichte von HAP-Kristallen auf den Partikeln mit der Menge an funktionellen Oberflächengruppen zunimmt, wie in **Abbildung 10** zu erkennen ist. Die TGA-Analyse der Gesamtprobe zeigt, dass der anorganische Anteil jeweils bei 31 ± 2 Gew.-% liegt, was dem theoretischen Wert von 33% (berechnet aus der Masse der eingesetzten Ionen und Partikel) sehr nahe kommt. Es sollte hier beachtet werden, dass die Gesamtmenge an gebildetem HAP immer gleich groß ist, die Bildung der Kristalle auf der Partikeloberfläche jedoch von a) bis d) zunehmend bevorzugt ist.

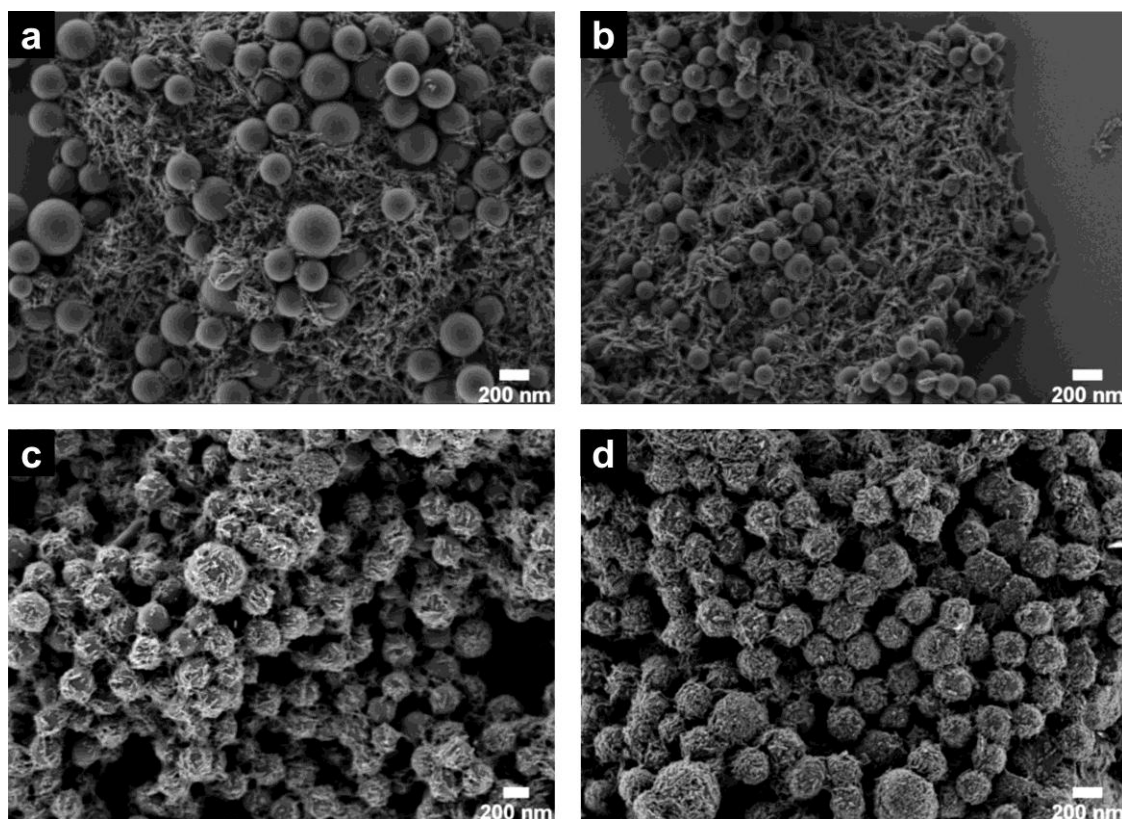


Abbildung 10: REM-Aufnahmen verschiedener mit Carboxylat- und Phosphonatgruppen funktionalisierten Polystyrolpartikel, die mit Calcium- und Phosphat-Ionen bei pH 10 beladen wurden: (a) ohne Funktionalität (A01), (b) 0,4 Phosphonatgruppen/nm² (A04), (c) 2,6 Carboxylatgruppen/nm² (A02), (d) 3,3 Phosphonatgruppen/nm² (A03).

Da kein direkter Einfluss der unterschiedlichen funktionellen Comonomere auf die Beladungsdichte gefunden wurde, wird angenommen, dass vor allem die Zahl der Oberflächenladungen die HAP-Bildung auf der Partikeloberfläche unter diesen Bedingungen bestimmt. In einer Referenzprobe mit 0 Gew.-% Comonomer wurden keine HAP-Kristalle auf der Partikeloberfläche gefunden. Die oben beschriebenen Beobachtungen belegen folgendes:

- (i) Die Kristalle werden nur auf Grund der geladenen Oberflächengruppen auf den Partikeln gebildet.
- (ii) Die Menge an Kristallen, die auf der Partikeloberfläche gefunden werden, nimmt mit der Menge an funktionellen Gruppen zu, obwohl die Gesamtmenge an gebildetem HAP immer gleich ist.

4.1.3 Einfluss des pH-Wertes

Es ist in der Literatur bekannt, dass die Bedingungen während der Mineralisation enormen Einfluss auf Nukleation und Wachstum von Calciumphosphat haben und zu unterschiedlichen Calciumphosphat-Phasen und Kristallmorphologien führen können.¹⁶²

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Mineralisation von Calciumphosphat auf funktionalisierten Partikeln zu untersuchen, wurden Partikel, die mit 3 Gew.-% AA und 5 Gew.-% VBPA als funktionellen Comonomeren hergestellt wurden, jeweils bei pH 10, 7 und 5 beladen (**Abbildung 11**). Während des gesamten Beladungsvorgangs wurde der jeweilige pH-Wert sorgfältig konstant gehalten. Obwohl die Konzentration an während der Beladung zugegebenen Calcium- und Phosphat-Ionen immer konstant gehalten wurde, konnte mit abnehmendem pH-Wert eine Abnahme des Anteils an anorganischem Material auf der Oberfläche Carboxylat-funktionalisierter Partikel, jedoch nicht auf Phosphonat-funktionalisierten Partikeln beobachtet werden (**Abbildung 11 a-c**). Dieser Effekt entsteht wahrscheinlich auf Grund unterschiedlicher Mengen an negativen Ladungen auf der Partikeloberfläche entsprechend der pH-abhängigen Deprotonierung der Carboxylgruppen, wie später im Detail untersucht wird (siehe Kapitel 4.1.4). Im Gegensatz dazu zeigen die REM-Aufnahmen der Phosphonat-funktionalisierten Partikel bei allen pH-Werten eine sehr dichte Bedeckung der Partikeloberfläche mit anorganischem Material (**Abbildung 11 d-f**).

Interessanterweise können unterschiedliche Kristallformen beobachtet werden, wie in den in höherer Vergrößerung abgebildeten REM-Aufnahmen in Abbildung 11 g-i gezeigt ist. Diese variieren von Kristallnadeln nach einer Beladung bei pH 10 (g) über Plättchen bei pH 7 (h) zu einer homogenen Calciumphosphat-Schicht bei pH 5 (i). Dieselben nadel- und plättchenförmigen Kristallmorphologien wurden nach der Beladung bei pH 10 und pH 7 auf der Oberfläche Carboxylat-funktionalisierter Partikel gefunden, während bei pH 5 nur wenige sehr große Kristalle neben den Polymerpartikeln zu erkennen waren (Abbildung 11 a-c). In diesem Fall ist die Oberflächenladung wahrscheinlich zu gering für eine erfolgreiche Beladung, dies wird später in Kapitel 4.1.4 näher diskutiert.

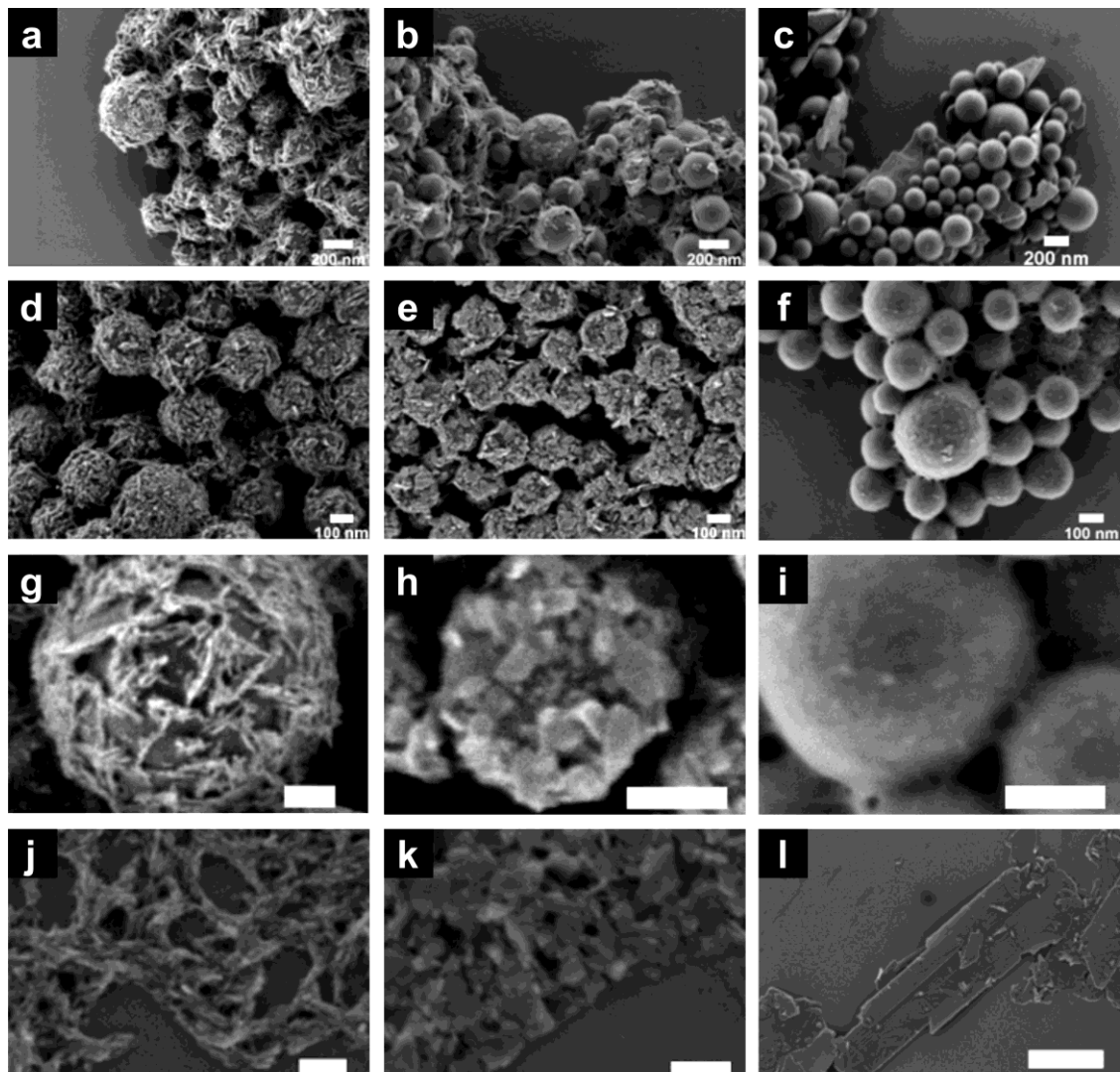


Abbildung 11: REM-Aufnahmen beladener Carboxylat-funktionalisierter Partikel (a-c) und Phosphonat-funktionalisierter Partikel in niedriger Vergrößerung (d-f) und hoher Vergrößerung (g-i); Beladungen durchgeführt bei pH 10 (erste Spalte: a, d, g, j), pH 7 (zweite Spalte: b, e, h, k) und pH 5 (dritte Spalte: c, f, i, l). In der letzten Reihe sind Kristalle zu sehen, die in Abwesenheit von Partikeln bei pH 10, 7, und 5 gebildet wurden (j, k, l, Messbalken entspricht 100 nm, wenn nicht anders angegeben).

Um den Einfluss der Anwesenheit von Polymerpartikeln auf die Calciumphosphat-Bildung zu untersuchen, wurde unter den gleichen Bedingungen wie vorhergehend die Fällung aus der Lösung ohne Partikel durchgeführt. In Abwesenheit der Partikel entstanden bei pH 10 und pH 7 jeweils dieselben nadelförmigen und plättchenförmigen Kristallmorphologien (Abbildung 11 j, k) wie zuvor, während bei pH 5 Mikrometer-große Kristalle gebildet wurden (Abbildung 11 l). Alle hergestellten Kristalle wurden mittels Röntgenbeugung und TEM weiter untersucht, die Ergebnisse werden im Verlauf des Kapitels diskutiert. Die bisher beschriebenen Ergebnisse zeigen jedoch bereits, dass

sich unabhängig von der Art und Menge an funktionellen Gruppen, die Morphologie von sowohl auf der Partikeloberfläche als auch in Lösung gebildetem Calciumphosphat mit variierendem pH-Wert ändert.

Anschließend wurde eine XRD-Analyse durchgeführt, um die Calciumphosphat-Phase in den unterschiedlichen Proben zu identifizieren. Theoretisch sind je nach Beladungsbedingungen verschiedene Calciumphosphat-Phasen wie amorphes Calciumphosphat, Brushit, OCP oder HAP (mit steigender thermodynamischer Stabilität aufgezählt) möglich.^{163, 164} Des Weiteren beeinflusst der Verlauf der Kristallisation die daraus entstehenden Kristalle, da sich eine thermodynamisch stabilere Form aus einer kinetisch stabilen Phase, die sich in einem früheren Stadium der Kristallisation gebildet hat, herausbilden kann.¹⁶⁵ Die XRD-Analyse der bei pH 7 und 10 beladenen Hybridpartikel mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen und Morphologien zeigt, dass bei beiden Arten von funktionellen Comonomeren (AA und VBPA) nur kristallines HAP gebildet wurde, welches die thermodynamisch stabilste Calciumphosphat-Phase darstellt (**Abbildung 12**). Dieser Zusammenhang findet sich so auch in der Literatur zur Calciumphosphat-Mineralisation.¹⁶³ Im Falle der bei pH 5 beladenen Partikel stammen die Hauptreflektionen in der XRD von kristallinem Brushit. Vor den jeweiligen Messungen wurden die Proben durch mehrfache Zentrifugation und Redispergierung gewaschen, um Ammoniumnitrat, welches als mögliches Nebenprodukt auftreten kann, zu entfernen. Zur Kontrolle wurden vor und nach dem Waschen XRD-Analysen durchgeführt, welche jedoch bis auf die Abwesenheit von Ammoniumnitrat nach dem Waschen keinen Unterschied aufwiesen.

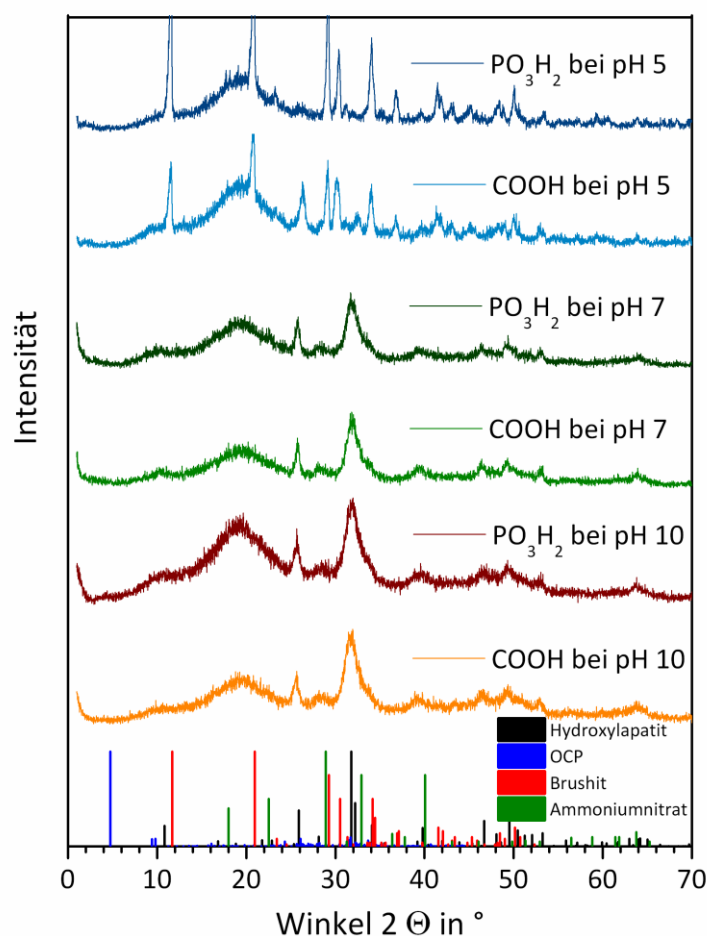


Abbildung 12: Röntgendiffraktogramme von Carboxylat- und Phosphonat-funktionalisierten Partikeln (PO₃H₂ und COOH), die bei unterschiedlichen pH-Werten mit Calcium- und Phosphat-Ionen beladen wurden.

Die Analyse mit Hilfe des TEM wurde durchgeführt, um zu bestätigen, dass die Kristallphase, welche in der Röntgenbeugung jeweils für die gesamte Probe gefunden wurde, tatsächlich mit der auf der Partikeloberfläche gefundenen Calciumphosphat-Phase übereinstimmt (**Abbildung 13**). In den TEM-Aufnahmen der Hybridpartikel wechselt die Morphologie von einer himbeerartigen Morphologie bei pH 7 zu einer Kern-Schale-Morphologie bei pH 5 (siehe **Abbildung 13b** und **c**), was gut mit den zuvor gezeigten REM-Aufnahmen übereinstimmt (vgl. **Abbildung 11**). Die hellen Bereiche der Dunkelfeldaufnahmen von bei pH 7 beladenen Partikeln zeigen deutlich den kristallinen Charakter der anorganischen Phase (**Abbildung 13d**). Das Elektronenbeugungsmuster eines größeren Bereiches dieser Partikel zeigt die Kristallebenen von HAP, was deutlich macht, dass es sich bei den Kristallen, welche auf der Partikeloberfläche gefunden wurden, tatsächlich um HAP-Kristalle handelt. Dies stimmt sehr gut mit den Ergebnissen der XRD überein. Die Ergebnisse der

Dunkelfeldaufnahmen und Elektronenbeugung bei pH 10 beladener Proben (hier nicht gezeigt) sind ähnlich zu den bei pH 7 erhaltenen sowie zu früheren Untersuchungen zur HAP-Mineralisation Carboxylat-funktionalisierter Partikel unter den gleichen Bedingungen.³⁴

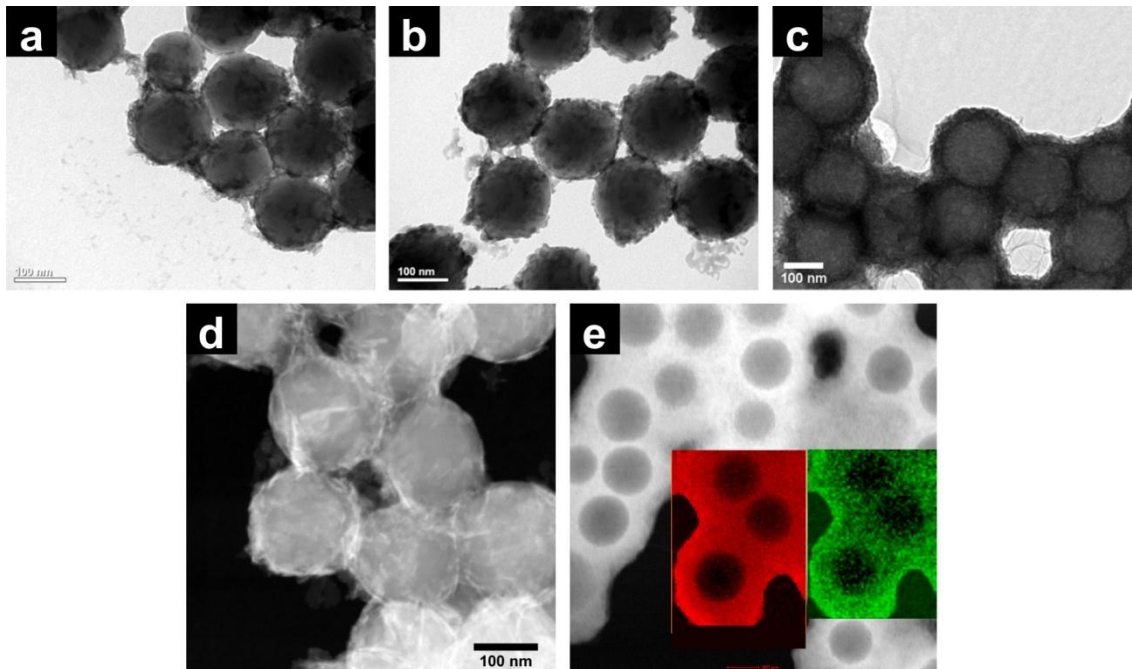


Abbildung 13: TEM-Aufnahmen von Phosphonat-funktionalisierten Partikeln, die bei pH 10 (a), pH 7 (b) und bei pH 5 (c) beladen wurden; (d) Dunkelfeldaufnahmen bei pH 7 beladener Partikel, (e) Dunkelfeldaufnahmen bei pH 5 beladener Partikel, im Inset ist ein Elektronen-Mapping von Calcium (in rot) und Phosphor (in grün) gezeigt.

Im Gegensatz dazu sind in der Dunkelfeldaufnahme der bei pH 5 gebildeten Hybridpartikel keine kristallinen Bereiche sichtbar (Abbildung 13e), was auf eine amorphe Calciumphosphat-Hülle hinweist. Zudem zeigen die Ergebnisse der Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) die Anwesenheit von Calcium und Phosphor in der Partikelhülle, wie im Calcium- und Phosphor-Mapping in Abbildung 13e in rot und grün zu sehen ist. Hierdurch kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der anorganischen Hülle um das als Nebenprodukt auftretende Ammoniumnitrat handelt. Obwohl mit Hilfe der XRD die Anwesenheit von Brushit nachgewiesen werden konnte, wurde hier kein Hinweis auf kristalline Bereiche auf der Partikeloberfläche gefunden. Deshalb können die Beugungsmuster von Brushit in der XRD wahrscheinlich Kristallen zugeordnet werden, welche sich in der Lösung anstatt auf der Partikeloberfläche gebildet haben. Dieses Argument wird unterstützt sowohl durch die Anwesenheit großer Kristalle in den REM-Aufnahmen (Abbildung 11 c und l), als auch durch die scharfen

Reflexe im Röntgenbeugungsmuster. Diese Reflexe deuten auf Grund der Beugung an einer großen Zahl von Gitterebenen auf die Anwesenheit relativ großer Kristalle hin (Abbildung 12).

Außerdem wurden im Kontrollexperiment, bei dem Calciumphosphat bei pH 5 in Abwesenheit von Partikeln gefällt wurde, nur relativ große Kristalle gefunden, wie in der Dunkelfeldaufnahme der Referenzprobe zu sehen ist (**Abbildung 14f**). Die Röntgenbeugung an dieser Referenzprobe ergab, dass es sich hierbei tatsächlich um Brushit-Kristalle handelt. Folglich kann aus der Kombination von REM-, TEM- und Röntgenbeugungsuntersuchungen geschlossen werden, dass bei pH 5 Brushit in der Lösung gebildet wurde, obwohl auf der funktionalisierten Partikeloberfläche selbst kein Brushit gefunden wurde. Die Röntgenbeugungsdiffraktogramme und die Hellfeld- und Dunkelfeldaufnahmen der Referenzproben, welche bei unterschiedlichen pH-Werten hergestellt wurden, sind in Abbildung 14 zu sehen.

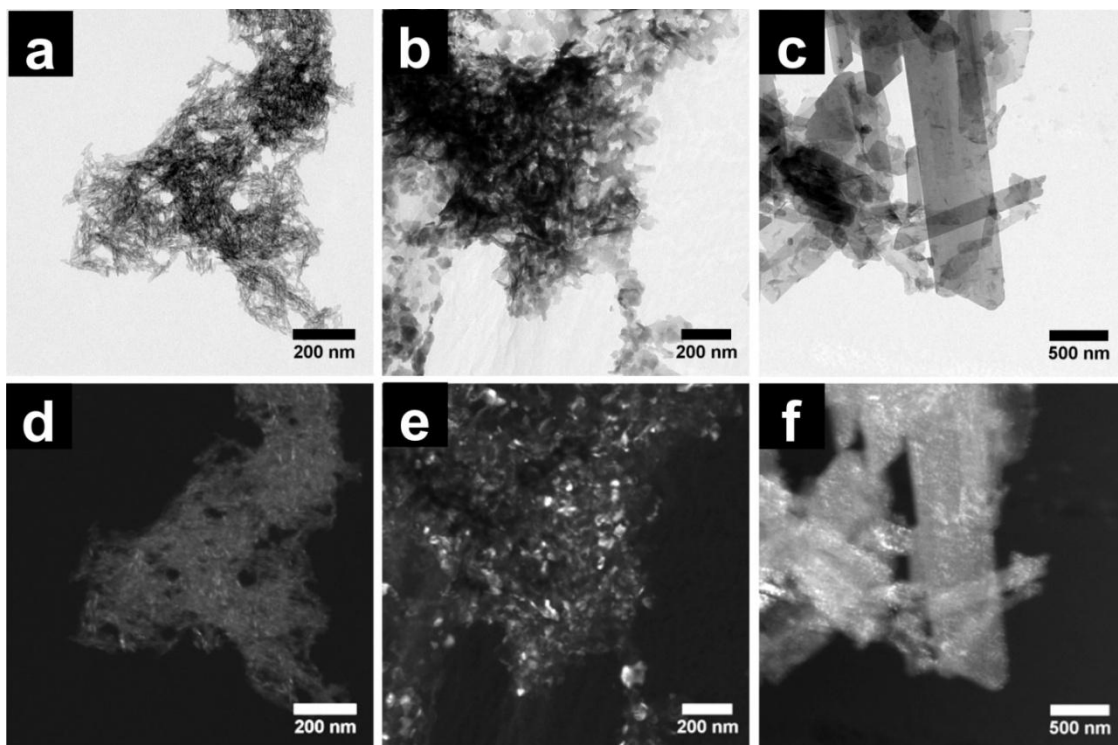


Abbildung 14: Hellfeld- (a-c) und Dunkelfeld-TEM-Aufnahmen (d-f) von Kristallen, die in Abwesenheit von Partikeln bei pH 10 (a, d), pH 7 (b, e) und pH 5 (c, f) gebildet wurden.

Da die Löslichkeit der Kristalle in Wasser ein charakteristisches Merkmal der verschiedenen Calciumphosphat-Phasen ist, könnte das Waschen der Hybridpartikel mit unterschiedlichen Morphologien einen weiteren Hinweis auf die Stabilität der

gebildeten Calciumphosphat-Phasen geben. Aus diesem Grund wurden Silicium-Wafer, auf denen sich die Hybridpartikel befanden, mehrmals mit Wasser gewaschen, und anschließend erneut im REM untersucht. Die gewaschenen Hybridpartikel, die bei pH 10 und pH 7 gebildet wurden, zeigten keinen Unterschied zu den ungewaschenen Proben. Im Gegensatz dazu änderte sich die homogene anorganische Hülle der bei pH 5 beladenen Partikel nach dem Waschen zu einer porösen Partikelhülle (**Abbildung 15**). Dieser Materialverlust der anorganischen Hülle unterstützt die These, dass es sich hier um eine sehr instabile Calciumphosphat-Phase wie zum Beispiel amorphes Calciumphosphat handelt, das durch den Waschvorgang teilweise aufgelöst wurde.

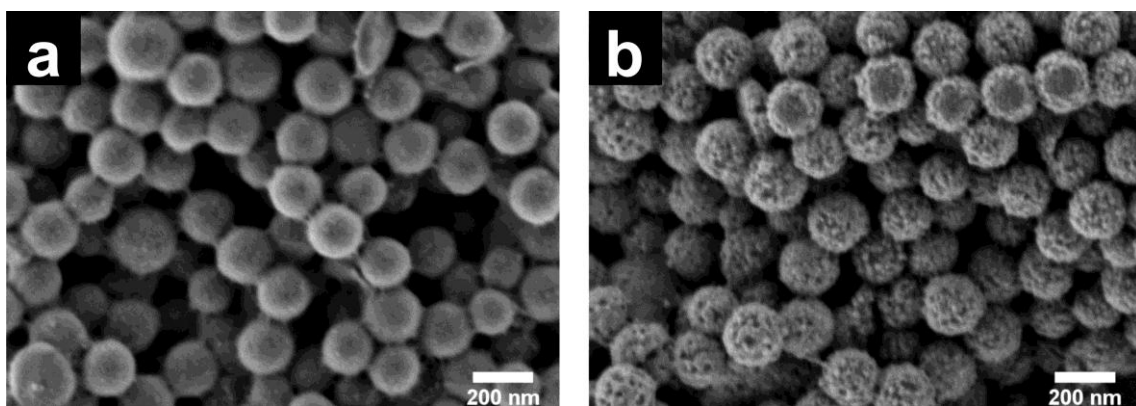


Abbildung 15: REM-Aufnahmen von Phosphonat-funktionalisierten Partikeln, die bei pH 5 beladen wurden vor (a), und nach (b) dem Waschen mit Wasser.

Nach der Herstellung der Hybridpartikel konnte in allen Fällen eine abnehmende kolloidale Stabilität beobachtet werden. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich sowohl die verringerte Flexibilität der PEO-Ketten von Lutensol AT50 auf Grund der Anwesenheit von HAP-Kristallen auf der Partikeloberfläche, als auch die erhöhte Dichte der Hybridpartikel verglichen mit der der reinen Polymerpartikel. Die kolloidale Stabilität der Hybridpartikel konnte jedoch wiederhergestellt werden, indem entweder ein elektrostatisch wirkendes Tensid wie SDS oder ein sterisch wirkendes Tensid wie Poly(vinylpyrrolidon) (PVP) zur Partikeldispersion gegeben wurde.

Im Hinblick auf die mögliche Anwendung der Polymer/HAP-Hybridpartikel als Implantatbeschichtung stellt sich die Frage, wie stark die HAP-Kristalle an die Oberfläche der Partikel gebunden sind. Um dies zu untersuchen, wurde eine Probe der Hybridpartikel nach der Beladung in ein Ultraschallbad gegeben. Anschließend wurden die Partikel erneut im REM untersucht. Hierbei wurde gefunden, dass die HAP-Kristalle

trotz der starken Scherkräfte während der Ultraschallbehandlung weiterhin auf der Oberfläche der Partikel gebunden sind (siehe **Abbildung 16**).

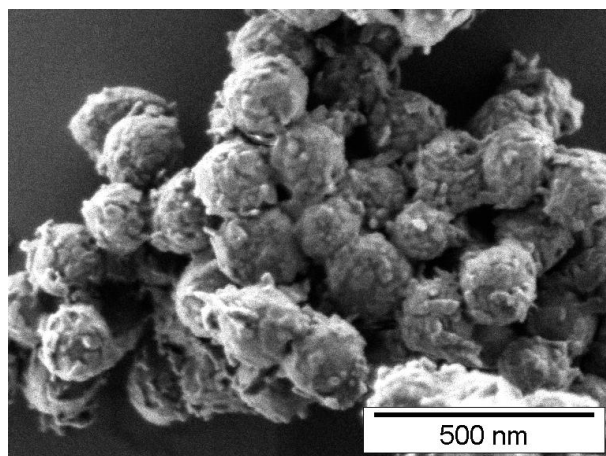


Abbildung 16: REM-Aufnahme von Polymer/HAP-Partikeln (bei pH 7 beladen) nach der Behandlung mit Ultraschall.

4.1.4 Kinetik der Mineralisation

Die Anzahl funktioneller Gruppen auf der Partikeloberfläche, besonders die Menge negativ geladener Gruppen bei verschiedenen Beladungsbedingungen, scheinen die Mineralisation unterschiedlich funktionalisierter Partikel zu beeinflussen, wie in Abbildung 11 a-c zu sehen ist. Deshalb wurde die pH-abhängige Oberflächenladung der Polymerpartikel, die mit AA und VBPA als funktionalem Comonomer hergestellt wurden, durch die Polyelektrolyt-Titration mittels PCD quantifiziert. Die Menge an Oberflächengruppen pro Flächeneinheit für beide Arten von funktionalisierten Partikeln sind in **Abbildung 17** gegen verschiedene pH-Werte aufgetragen. Durch den Vergleich der Menge an Ladungen, die bei verschiedenen pH-Werten gefunden wurden, ist erkennbar, dass die Dichte an Ladungen auf der Partikeloberfläche mit steigendem pH-Wert stark zunimmt. Dies kann der erhöhten Deprotonierung der Säuregruppen mit steigendem pH-Wert zugeordnet werden. Zudem ist die Menge an Ladungen auf Phosphonat-funktionalisierten Partikeln immer 3-4mal höher als die auf den Carboxylat-funktionalisierten Partikeln. Dies könnte der Grund sein für die abnehmende Dichte an Kristallen im Falle der Carboxylat-funktionalisierten Partikeln, bei denen allen pH-Werten eine nahezu vollständige Bedeckung mit Kristallen gefunden wurde, wie zuvor in den REM-Bilder gezeigt wurde (Abbildung 11). Diese Beobachtung weist

darauf hin, dass eine bestimmte Mindestmenge an Oberflächenladungen für eine beinahe vollständige Oberflächenbedeckung nötig ist.

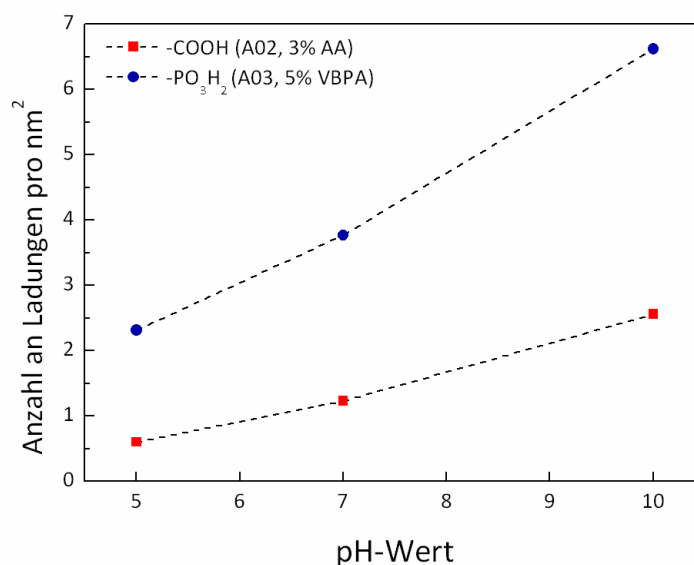


Abbildung 17: pH-abhängige Partikelladungsanalyse von Carboxylat- und Phosphonat-funktionalisierten Partikeln.

Um die Chemie an der Grenzfläche zwischen der Partikeloberfläche und den komplexierenden Ionen in der umgebenden Lösung genauer zu verstehen, wurde die Menge an Calcium-Ionen, die im ersten Schritt der Beladung an die Partikeloberfläche angebunden wird (siehe Schema 1, der erste Schritt der Mineralisation ist die Calciumionen-Zugabe, der zweite Schritt ist die Phosphationen-Zugabe), unter den verschiedenen Beladungsbedingungen bestimmt. Diese Experimente zur Calcium-Ionen Aufnahme wurden mit Hilfe eines speziellen Titrationsaufbaus durchgeführt, der in Kapitel 5.5.1 (Seite 124) gezeigt ist. Die Titrationsexperimente wurden durchgeführt, indem die Calciumionen-Konzentration mit Hilfe einer Calciumionen-selektiven Elektrode bestimmt wurde, während eine Calciumlösung mit konstanter Geschwindigkeit zur Partikeldispersion zugegeben wurde. Der pH-Wert wurde dabei während der gesamten Zugabe und Messung mit Hilfe von wässriger Ammoniaklösung konstant gehalten. Ein ähnlicher Titrationsaufbau hat sich bereits bei der Analyse der Calciumionen-Aufnahme verschiedener Materialien in Lösung und während der Mineralisation als sehr präzise erwiesen.^{166, 167}

Die auf diese Weise erhaltenen Kurven beschreiben die zeitabhängige Menge an freien Calcium-Ionen, während Calcium-Ionen zu einer Dispersion Phosphonat-funktionalisierter Partikel (B03) gegeben werden, wie in **Abbildung 18** zu sehen ist. Die in schwarz gezeigte Referenzkurve entspricht der Menge an Calcium-Ionen, die zur Dispersion titriert werden, und die farbigen Kurven spiegeln den zeitabhängigen Verlauf der Menge an freien Calcium-Ionen in der Partikeldispersion bei verschiedenen pH-Werten wider. Es ist klar erkennbar, dass nach einem ersten Zeitraum, in dem kaum Calcium-Ionen detektiert wurden, mit zunehmender Zeit in Abhängigkeit des pH-Wertes danach alle Kurven parallel zur Referenz verlaufen. Der beobachtete Achsversatz in den zeitabhängigen Kurven entspricht jeweils der Calcium-Ionen-Aufnahmekapazität der Phosphonat-funktionalisierten Partikel bei den gegebenen Bedingungen. Es ist deutlich sichtbar, dass mit steigendem pH-Wert mehr Calcium-Ionen von den Partikeln aufgenommen werden. Die genaue Menge an Calcium-Ionen, die an die Partikeloberfläche gebunden werden, kann anschließend über die Differenz zur Referenz berechnet werden (ausführliche Erklärung siehe 5.5.1.4).

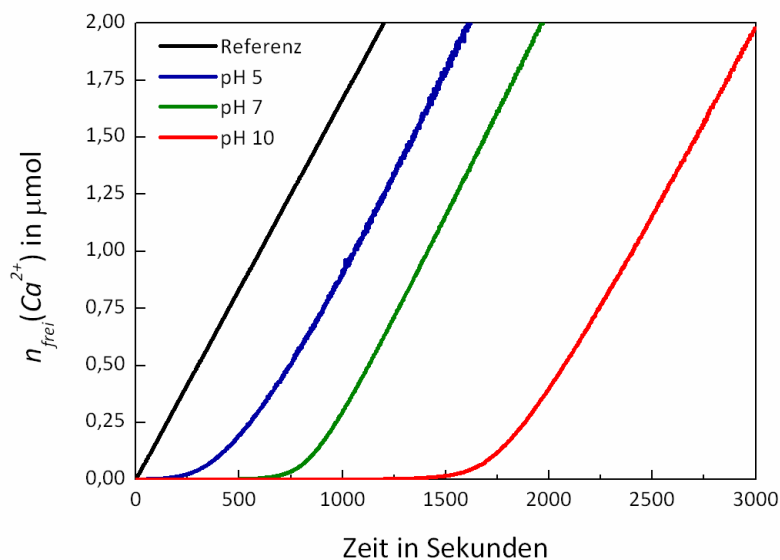


Abbildung 18: Zeitabhängiger Verlauf der Menge freier Calcium-Ionen während der Zugabe einer Calciumionen-Lösung zu einer Dispersion Phosphonat-funktionalisierter Partikel (A03) bei verschiedenen pH-Werten.

Die Menge an Oberflächenladungen, die mittels der Calciumionen-Aufnahme und PCD für Carboxylat- und Phosphonat-funktionalisierte Partikel unter verschiedenen Bedingungen bestimmt wurden, sind in **Tabelle 2** zusammengefasst. Die Menge an

Ladungen, die mit Hilfe der Calciumionen-Titration bestimmt wurden, stimmen für alle pH-Werte sowie beide Funktionalitäten, bis auf die Messung der Carboxyl-funktionalisierten Partikel bei pH 5, sehr gut mit den mittels PCD gewonnen Werten überein. Im letzteren Fall ist die Menge an Calcium-Ionen, die durch die Calciumionen-Titration bestimmt wurde, beinahe zehnmal geringer als die über PCD bestimmte Menge. Diese Abweichung könnte auf folgende Ursache zurückgehen: Im Gegensatz zu den Phosphonat-funktionalisierten Partikeln, ist die Menge an Ladungen auf der Partikeloberfläche und die daraus resultierende Ladungsdichte im Fall der Carboxylat-funktionalisierten Partikel zu gering für eine wirkungsvolle Komplexierung von divalenten Ionen wie Calcium-Ionen. Diese verringerte Anbindung von Calcium-Ionen spiegelt sich dementsprechend in einer erniedrigten Menge an Ladungen, wie sie über die Calciumionen-Titration detektiert werden, wider. Dieses Argument könnte auch die erfolgreiche Ausbildung der Calciumphosphat-Hülle um die Phosphonat-funktionalisierten Partikel bei pH 5 im Gegensatz zu den Carboxylat-funktionalisierten Partikeln erklären.

Mit Hilfe der Calciumionen-Aufnahmeexperimente wurde herausgefunden, dass maximal eine Menge von ungefähr 3 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmenge an Calcium-Ionen im ersten Schritt der Beladung von den Partikeln aufgenommen wurde (A03, pH 10). Obwohl diese Menge zunächst relativ niedrig erscheint, könnte der Effekt möglicherweise die Calciumphosphat-Bildung auf der Partikeloberfläche fördern, insbesondere wenn man die durch die Calciumaufnahme erhöhte Calciumionen-Konzentration auf der Partikeloberfläche berücksichtigt.

Tabelle 2: Menge an Oberflächenladungen Carboxylat- und Phosphonat-funktionalisierter Partikel bei pH 5, 7 und 10, wie sie mittels Calciumionen-Aufnahmeexperimenten und PCD bestimmt wurden.

Probe	Funktionelles Comonomer	pH-Wert	Oberflächenladungen in mol·g ⁻¹	
			mittels PCD	mittels Ca ²⁺ -Aufnahme
A02	AA (-COOH)	5	2,2·10 ⁻⁵	1,0·10 ⁻⁶
		7	4,4·10 ⁻⁵	3,6·10 ⁻⁵
		10	9,2·10 ⁻⁵	8,8·10 ⁻⁵
A03	VBPA (-PO ₃ H ₂)	5	9,4·10 ⁻⁵	8,6·10 ⁻⁵
		7	15,3·10 ⁻⁵	15,1·10 ⁻⁵
		10	25,6·10 ⁻⁵	29,5·10 ⁻⁵

Im Hinblick auf das Gebiet der Biomineralisation ist es interessant, die Kinetik von Nukleation und Wachstum von Kristallen zu untersuchen. Auf diese Weise kann mehr Wissen darüber erlangt werden, wie in der Natur die Herausbildung von unterschiedlichen Kristallphasen mit faszinierenden Formen und Funktionen kontrolliert wird, um anschließend dieses Verhalten nachzuahmen. Die Ergebnisse, die im Abschnitt zuvor beschrieben wurden, zeigen, wie die Beladungsbedingungen die Komplexierung von Calcium-Ionen durch unterschiedliche funktionelle Oberflächengruppen im ersten Schritt der Mineralisation beeinflussen.

Im Folgenden wird der Einfluss von Oberflächen-funktionalisierten Partikeln auf die Kinetik der Mineralisation als Funktion des pH-Wertes während der Phosphationen-Zugabe im zweiten Schritt der Beladung genauer untersucht. Obwohl die Mineralisation hauptsächlich auf der Oberfläche der Partikel stattfindet, wenn geladene Gruppen vorhanden sind, wird zusätzlich zu einem geringen Anteil die Ausbildung von Kristallen aus der Lösung, sogar im Falle von in hohem Maße funktionalisierten Partikeln, beobachtet. Als Folge daraus ist die nähere Untersuchung der Kristallisationskinetik nicht nur wichtig, um mehr Informationen darüber zu erhalten, wie die unterschiedlichen HAP-Morphologien gebildet werden, sondern auch darüber, wie viele Calcium- und Phosphat-Ionen für eine ausschließliche Mineralisation auf der Partikeloberfläche wirklich nötig sind.

Die Kinetikuntersuchungen wurden ausgeführt, indem eine Phosphat-Ionen enthaltende Lösung entweder zu einer reinen wässrigen Calciumionen-Lösung oder zu einer Calcium-Ionen enthaltenden Partikeldispersion gegeben wurde. Hierbei wurden Bedingungen gewählt, die vergleichbar zu den zuvor beschriebenen

Beladungsbedingungen waren. Die Calciumionen-Konzentration wird während des gesamten Experiments aufgezeichnet, während der pH mit Hilfe eines Titrationsgerätes entweder bei einem Wert von 7 oder 10 konstant gehalten wird. Daraus lässt sich anschließend der zeitabhängige Verlauf der relativen Calciumionen-Aufnahme während der Mineralisation bei pH 7 und pH 10 bestimmen. Die Calciumionen-Aufnahme stellt den Verbrauch an Calcium-Ionen während der Kristallisation dar.

Es wurde herausgefunden, dass die Calciumionen-Aufnahme während der Mineralisation bei pH 10 wesentlich schneller verläuft als bei pH 7 (siehe **Abbildung 19**), was auf eine größere Triebkraft für die Mineralisation und damit eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle mit steigendem pH-Wert hinweist. Dieses Ergebnis scheint sich in der morphologischen Änderung niederzuschlagen, die bei unterschiedlichen pH-Werten beobachtet wird. Die Morphologie der HAP-Kristalle ändert sich von nadelförmigen Kristallen bei pH 10 zu plättchenförmigen Kristallen bei pH 7 (Abbildung 11 g,h). Die langen HAP-Nadeln bilden sich bei einer höheren Wachstumsgeschwindigkeit, während die Plättchen nur bei einer niedrigeren Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle gebildet werden konnten. Das weist darauf hin, dass sich mit abnehmender Mineralisationsgeschwindigkeit die Wachstumsgeschwindigkeiten einiger der verschiedenen Kristallebenen annähern. Dieser Effekt ermöglicht ein unterschiedliches Kristallwachstum in verschiedene Richtungen, was zur Ausbildung der plättchenförmigen Kristallmorphologie bei pH 7 und der nadelförmigen bei pH 10 führt. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle ist bei pH 10 so schnell, dass das Kristallwachstum bevorzugt entlang einer Kristallebene erfolgt und zur Ausbildung der HAP-Nadeln führt.

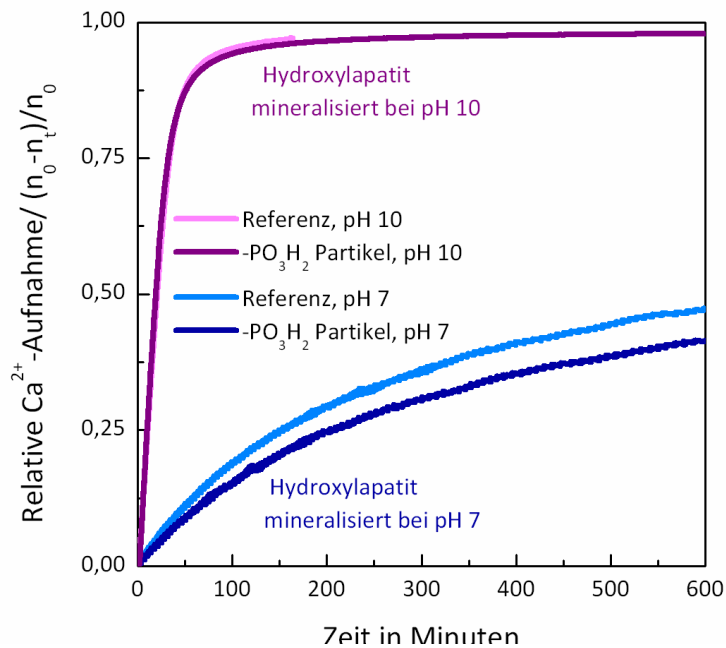


Abbildung 19: Relative Calciumionen-Aufnahme während der Calciumphosphat-Mineralisation bei pH 7 und pH 10 in Anwesenheit und Abwesenheit von Phosphonat-funktionalisierten Partikeln (A03).

Allgemein können sich verschiedene Einflussgrößen wie die Temperatur und der pH-Wert auf die Wachstumsgeschwindigkeit von Kristallen auswirken und damit die erhaltenen Kristallmorphologien bestimmen.¹⁶⁸⁻¹⁷¹ Es wurde zum Beispiel herausgefunden, dass sich durch das Verändern der Kristallisationstemperatur das Aspektverhältnis von HAP-Kristallen mit der steigenden Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle erhöht. Dies führte zu einem Wechsel der Kristallmorphologie von eher runden zu nadelförmigen HAP-Kristallen.¹⁶⁸ Zudem wurde eine Erhöhung der Kristallwachstums-Geschwindigkeit von HAP mit steigendem pH-Wert beobachtet.^{169, 170} In weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, dass sich bei niedrigerem pH-Wert (pH 6,3) plättchenförmige HAP-Kristalle bildeten, deren Größe sich mit steigendem pH-Wert verringerte.^{111, 171} Da in unseren Experimenten kein direkter Einfluss der als Templat eingesetzten Partikel auf die Kristallisationsgeschwindigkeit festgestellt wurde, belegt dies, dass hier nur die Reaktionsbedingungen die endgültige Kristallmorphologie bestimmen. In einem analog in Abwesenheit von Partikeln durchgeführten Kristallisations-Experiment wurden ähnliche Kristallmorphologien wie in Anwesenheit der Partikel unter den gleichen Reaktionsbedingungen gefunden, was in Abbildung 14 gezeigt ist.

4.1.5 Zusammenfassung und Ausblick

Verschiedene Oberflächen-funktionalisierte Polymer-Nanopartikel, die über die Miniemulsionspolymerisation hergestellt wurden, wurden erfolgreich als Templat für die Mineralisation von Calciumphosphat eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass unabhängig von der Art des funktionellen Comonomers die Menge an HAP-Kristallen auf der Partikeloberfläche einzig von der Anzahl an negativen Ladungen auf der Partikeloberfläche abhängt. Im Fall von VBPA als funktionellem Comonomer wurde eine annähernd vollständige Bedeckung der Partikel mit Kristallen gefunden. Es wurde herausgefunden, dass die Mineralisation bei verschiedenen pH-Werten zu vollkommen unterschiedlichen Kristallmorphologien (nadel- und plättchenförmige Kristalle) auf der Oberfläche der Partikel führt. Untersuchungen der Mineralisationskinetik zeigten, dass die Morphologie der HAP-Kristalle auf der Partikeloberfläche mit der Änderung der Kristallisationsgeschwindigkeit durch eine sorgfältige Wahl des pH-Wertes gezielt kontrolliert werden kann. Die unterschiedlichen erhaltenen Oberflächentopografien sind besonders für eine mögliche Anwendung des Materials als Knochenfüller oder Implantatbeschichtung von großer Bedeutung, da die Leistung eines Biomaterials stark durch die Morphologie der Hybridpartikel beeinflusst wird.

Die synthetisierten HAP/Polymerpartikel könnten in Zukunft in der Gewebezüchtung („tissue engineering“) eingesetzt werden, wo sie zu einer guten Anbindung von Zellen und möglicherweise zum Wachstum neuen Knochenmaterials führen könnten. Mit unserem sehr empfindlichen Titrationsaufbau wäre es zukünftig spannend, die Kinetik der Calciumphosphat-Mineralisation auf Implantat-Oberflächen, die mit Polymerpartikeln beschichtet wurden, unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Diese Kinetikexperimente könnten dann den sehr komplexen Prozess der Biomineralisation auf Implantatoberflächen mit unterschiedlichen Oberflächentopographien in physiologischer Umgebung beleuchten.

4.2 Polymer/Calciumphosphat-Partikel für biomedizinische Anwendungen

Calciumphosphat-beschichtete Polymerpartikel sind interessant für biomedizinische Anwendungen, da die winzigen HAP-Kristalle auf der Oberfläche dem Knochenmineral sehr ähnlich sind. Um herauszufinden, wie sich die Anwesenheit von HAP auf der Partikeloberfläche auf die Aufnahme der Nanopartikel in biologische Zellen auswirkt, wurde die Wechselwirkung der Partikel mit Zellen untersucht. Da die Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Zellen jedoch nicht nur von der Oberfläche der Nanopartikel, sondern auch von deren Größe und Form abhängt, wurden sowohl unterschiedlich große Nanopartikel als auch anisotrope Nanopartikel mit HAP beladen. Diese Partikelsysteme unterschiedlicher Oberflächenkrümmung eignen sich zusätzlich, um den Einfluss der Krümmung auf die Kristallisation von HAP zu untersuchen.

Eine weitere zukünftige Anwendung von mineralisierten Nanopartikeln ist die Beschichtung von medizinischen Implantaten. Ziel ist es hierbei, eine Implantatbeschichtung herzustellen, die natürlichem Knochen ähnelt, und auf diese Weise das Aufwachsen des umgebenden Knochens an das Implantat fördert.^{11, 10} Phosphonat-funktionalisierte Polymerpartikel haben den Vorteil, dass sie mit Titandioxid-Oberflächen starke Bindungen ausbilden, wodurch eine hervorragende Haftung der Partikelschicht an die Implantatoberfläche gewährleistet ist.¹⁶⁰ Außerdem kann auf der freien Oberfläche der an das Substrat gebundenen Partikel anschließend HAP abgeschieden werden, um eine knochenähnliche Beschichtung herzustellen. Indem Oberflächen-funktionalisierte Partikel durch Oberflächen-funktionalisierte, bioabbaubare Kapseln ersetzt werden, könnte zudem eine gezielte Freisetzung aktiver Substanzen, die die Geweberegeneration und Wundheilung kontrollieren, erreicht werden. Aus diesem Grund wurden hier DNA-Kapseln, die Phosphat-Gruppen auf der Oberfläche und einen flüssigen hydrophilen Kern besitzen, auf einem Substrat mit Calciumphosphat mineralisiert.

4.2.1 Wechselwirkung von Polymer/HAP-Partikeln mit Zellen

Die Wechselwirkung der mit HAP beladenen Partikel mit Zellen wurde von Steffen Lorenz in verschiedenen Zellexperimenten näher untersucht. Es wurde sowohl die Aufnahme der Hybridpartikel in mesenchymale Stammzellen (MSC, Vorläuferzellen des Bindegewebes, die in unterschiedliche Gewebearten ausdifferenzieren können) als auch ihre Toxizität untersucht.

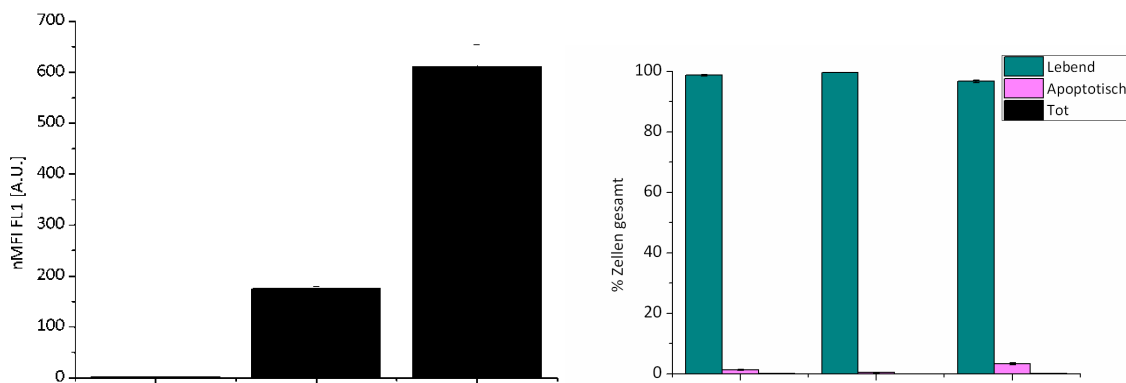


Abbildung 20: FACS-Analyse von MSC nach der Inkubation mit Phosphonat-funktionalisierten Partikeln (VBPA-Partikel, A03) und HAP-beladenen VBPA-Partikeln (VBPA-HAP) für 20 Stunden. Links: Aufnahme der Partikel in Zellen, dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität im FL1 in arbiträren Einheiten. Die Normierung erfolgte auf gemessene Fluoreszenz zum unbeladenen Partikel. Rechts: Zellvitalität nach 20 h Partikel-Inkubation (mit einer 7-AAD-Färbung im FACS gemessen).

Mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) wurde nachgewiesen, dass die Partikel in MSC aufgenommen wurden (**Abbildung 20** links). Der Vergleich der Aufnahme von mit HAP-beladenen Phosphonat-funktionalisierten Partikeln (VBPA-HAP) und unbeladenen VBPA-Partikeln (A03, Tabelle 1) ergab, dass die Beladung der Partikel mit HAP ungefähr eine Verdreifachung der Aufnahme in Zellen bewirkt. Dies deutet darauf hin, dass die Beschichtung von Partikeln mit HAP deren Zellaufnahme verbessert. Ursache hierfür ist möglicherweise die hohe Hydrophilie der HAP-Kristalle. Außerdem konnte für die mit HAP beladenen Partikel keine Toxizität nachgewiesen werden, mehr als 95% der Zellen blieben nach der Inkubation mit Partikeln für 20 h am Leben (siehe Abbildung 20 rechts).

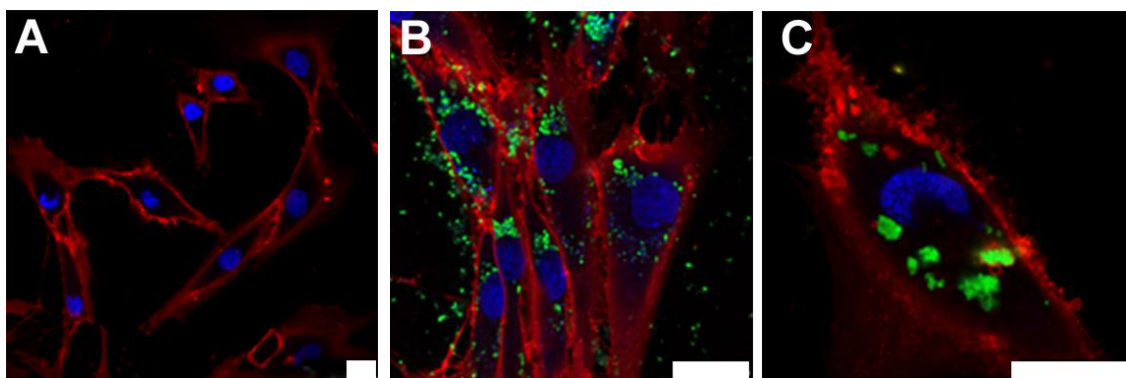


Abbildung 21: MSC nach Betrachtung im CLSM (Aufnahmen von Steffen Lorenz): a) Negativkontrolle, b) Zellen wurden mit VBPA-Partikeln (A03) für 20 h inkubiert, c) Zellen wurden mit HAP-beladenen Partikeln für 20 h inkubiert (Messbalken entspricht 25 µm, Zellwand rot, Partikel grün und Zellkern blau gefärbt).

Die Untersuchung im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) bestätigte zudem die Aufnahme von VBPA-Partikeln mit und ohne HAP-Beladung in Zellen. In den CLSM-Aufnahmen ist die gute Aufnahme der Partikel ins Zellinnere deutlich zu sehen (**Abbildung 21**).

Die hier untersuchten Partikel hatten eine Größe von 235 nm (vor der Beladung). Da die Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Zellen jedoch nicht nur von der Oberfläche der Nanopartikel, sondern auch von deren Größe und Form abhängt, wurden im Folgenden sowohl unterschiedlich große Nanopartikel als auch anisotrope Nanopartikel mit HAP beladen.

4.2.2 Polymer/HAP-Partikel unterschiedlicher Größe

Nachdem unterschiedlich funktionalisierte Partikel von ca. 200 nm Größe (A01-A03, vgl. Kapitel 4.1.2) erfolgreich mit HAP beladen wurden, sollte der Einfluss der Partikelgröße auf die Mineralisation an der Partikeloberfläche untersucht werden. Hierzu wurden mit Hilfe einer erhöhten SDS-Konzentration in der Miniemulsionspolymerisation kleinere Carboxyl-funktionalisierte Partikel mit einem Partikeldurchmesser von ungefähr 60 nm hergestellt (siehe **Tabelle 3**). Um die kolloidale Stabilität während der Elektrolytzugabe zu erhalten, wurde ein Tensidaustausch zu Lutensol AT50 (nichtionisches Tensid) durchgeführt. Nach der Dialyse und wiederholten Zentrifugation und Redispergierung dieser Partikel wurden die kleinen Partikel bei pH 10 analog zu den vorherigen Beladungsexperimenten an größeren Partikeln mit HAP beladen (Kapitel 4.1.2).

Diese sehr kleinen, SDS-stabilisierten Partikel konnten erfolgreich beladen werden, in den REM-Aufnahmen in **Abbildung 22** (links) sind winzige HAP-Kristalle auf der Partikeloberfläche zu sehen. Allerdings ist die Dichte an HAP-Kristalliten etwas geringer, als sie zuvor für (größere) Partikel erhalten wurde (vgl. **Abbildung 10**). Frühere Beladungsexperimente von A. E. zeigten bereits, dass die Beladung von SDS-stabilisierten Partikeln zu einer geringeren Dichte von HAP Kristalliten auf der Partikeloberfläche führt, da die maximale Dichte an funktionellen Gruppen in diesem Fall niedriger ist als für Lutensol-stabilisierte Partikel. Als weitere Ursache für die geringere Menge an Kristallen auf der Partikeloberfläche wurden geringe Mengen an

SDS-Molekülen, welche bei der Dialyse nicht von der Partikeloberfläche entfernt werden konnten, vermutet.³⁴

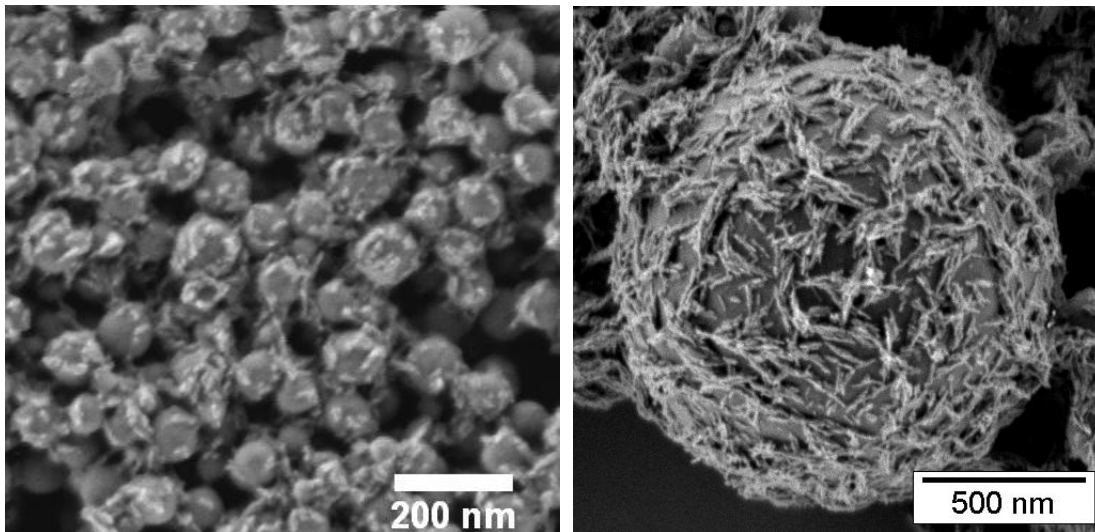


Abbildung 22: REM-Aufnahmen von mit HAP beladenen Carboxyl-funktionalisierten Partikeln geringer Größe (links, 62 nm Durchmesser) im Vergleich zu einem einzelnen sehr großen, Carboxyl-funktionalisierten Partikel (rechts, 1,4 µm Durchmesser).

In der Templat-gesteuerten Mineralisation anorganischer Mineralien spielt die Menge an Ladungen sowie die Ladungsverteilung an der Oberfläche des Templates im Kristallisationsprozess eine bedeutende Rolle. Wie in Kapitel 2.3.5 bereits beschrieben wurde, beeinflusst die Krümmung einer Oberfläche die Ladungsverteilung auf der Oberfläche. Besitzt die Oberfläche eine konvexe Krümmung, so werden die Ladungen in der Umgebung der Oberfläche stärker im Raum verteilt vorliegen, als bei einer ebenen oder konkav geformten Oberfläche, wo es sogar zu einer Akkumulation von Ladungen kommt. Oberflächen-funktionalisierte Partikel unterschiedlicher Größe zeigen auf Grund ihrer unterschiedlich stark ausgeprägten Krümmung einen ähnlichen Effekt.

Um den Einfluss der Krümmung auf die Kristallisation von HAP auf der Partikeloberfläche zu untersuchen, wurden die REM-Aufnahmen der sehr kleinen mineralisierten Partikel mit einem sehr großen mineralisierten Partikel verglichen. In Abbildung 22 (rechts) ist als Vergleich ein einzelner Mikrometer großer, Carboxyl-funktionalisierter Partikel nach der Beladung mit HAP gezeigt (wurde als „Ausreißer“ in einer Probe beladener, im Mittel ungefähr 200 nm großer Partikel gefunden, Durchmesser ca. 1,4 µm). Die Größe der HAP-Kristalle auf den Partikeln scheint im Falle der kleineren Partikel geringer zu sein, als auf dem sehr großen Partikel.

Möglicherweise lagern sich jedoch einzelne winzige HAP-Kristalle an der Oberfläche des großen Partikels zu größeren Aggregaten zusammen, wodurch dieser Eindruck entsteht. Allerdings ist es experimentell schwierig, bei unterschiedlich großen Partikeln dieselbe Anzahl an funktionellen Gruppen pro Flächeneinheit zu erreichen, was die Interpretation des Einflusses der Krümmung auf die Mineralisation erschwert.

In den zuvor beschriebenen Experimenten (siehe Kapitel 4.1.2) führte die Beladung Carboxyl- und Phosphonat-funktionalisierter Nanopartikel mit einer Größe von ungefähr 200 nm zu einer nahezu vollständigen Bedeckung der Partikeloberfläche mit HAP-Kristallen. Im Vergleich dazu konnten die kleineren 62 nm großen Carboxyl-funktionalisierten Partikel ebenfalls mit HAP beladen werden, allerdings war der Bedeckungsgrad mit Kristallen stark erniedrigt (siehe Abbildung 22). Um eine dichtere Bedeckung der Partikeloberfläche mit HAP zu erreichen und gleichzeitig den aufwändigen Reinigungsprozess, der zur Entfernung des Tensides SDS erforderlich ist, zu umgehen, wurden sogenannte „Surfmere“ (oberflächenaktive Monomere) als funktionelle Monomere eingesetzt. In der Miniemulsionspolymerisation wurde hierbei ein Phosphonsäure-funktionalisiertes Monomer (C₁₁-PET, siehe **Abbildung 23**) verwendet, das oberflächenaktiv ist und die Verwendung zusätzlicher Tenside überflüssig macht (Synthese R. S.).

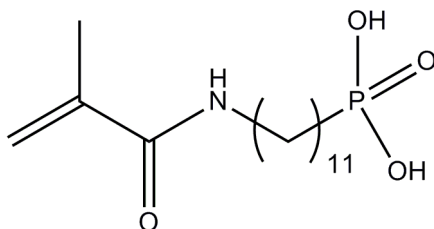


Abbildung 23: Strukturformel des Surfmers C₁₁-PET.

Die Funktionalisierung der Nanopartikel mit Hilfe des Phosphonsäure-funktionalisierten Surfmers C₁₁-PET ermöglichte so die Herstellung kleiner Partikel (112 nm) mit einer großen Anzahl an funktionellen Oberflächengruppen (siehe Tabelle 3). Gleichzeitig konnte die Verwendung eines zusätzlichen Tensides in der Synthese umgangen werden, was für die Beladung der Partikel, wo selbst kleine Mengen an Tensid störend wirken, von großem Vorteil ist. Sowohl das Surfmer C₁₁-PET als auch die mit Hilfe von C₁₁-PET funktionalisierten Partikel wurden von R. S. synthetisiert.

Tabelle 3: Eigenschaften der in Beladungen eingesetzten Oberflächen-funktionalisierten Partikel.

Probe	Funktionalität	Comonomer	Partikelgröße ^[a] (nm)	Oberflächenladungen ^[b] (nm ⁻²)
A05	-COOH	3% AA	62 ± 18	0,73
A06	-PO ₃ H ₂	2% C ₁₁ -PET	112 ± 16	1,02

[a] Partikelgrößen wurden nach der Synthese (vor Tensidaustausch) mittels DLS bestimmt.

[b] Anzahl an Oberflächenladungen mittels PCD bestimmt.

Um die kolloidale Stabilität der Dispersion während der Mineralisation zu erhalten, wurde vor der Beladung eine geringe Menge des nichtionischen Tensides Lutensol AT50 zugefügt. Die Mineralisation der funktionalisierten Partikel führte zu einer dichten, homogenen Anordnung von HAP-Kristallen auf der Oberfläche der Partikel, wie in der REM-Aufnahme in **Abbildung 24** zu sehen ist. In der hochaufgelösten TEM-Aufnahme sind außerdem viele kleine HAP-Kristalle, die sich an der Partikeloberfläche befinden, erkennbar. Die XRD-Analyse der Probe ergab, dass es sich bei den Kristallen wie in den zuvor beladenen Proben um HAP handelt. Der Anteil an anorganischem Material in der Probe wurde mit Hilfe der TGA bestimmt und lag bei 32,9%, was dem theoretischen Wert gebildeter HAP-Kristalle von 33% entspricht (siehe Anhang).

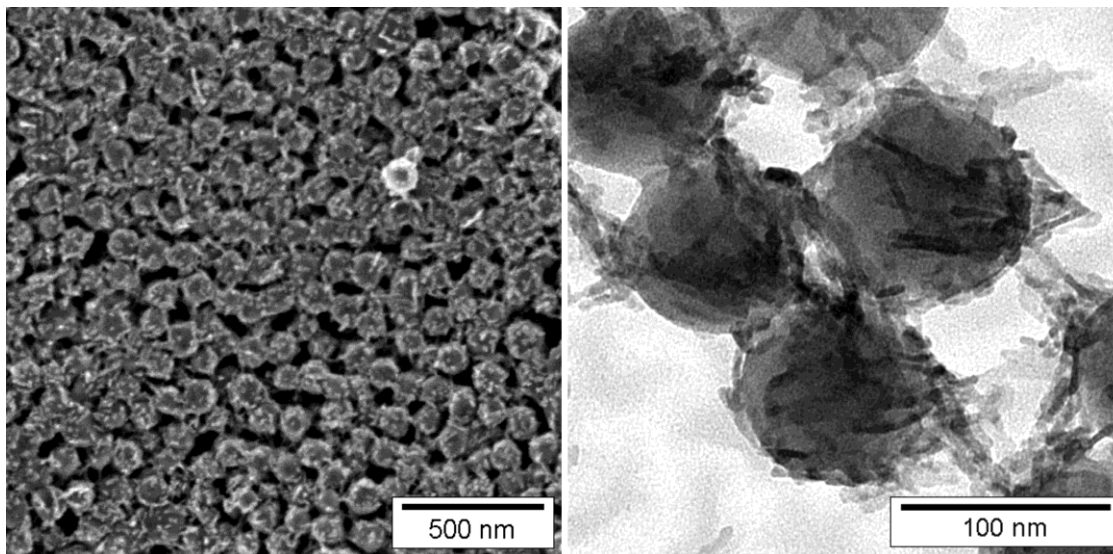


Abbildung 24: Die REM- (links) und TEM-Aufnahmen (rechts) zeigen die Bedeckung von Phosphonat-funktionalisierten Partikeln (hergestellt mit dem Surfmmer C11-Pet) mit HAP-Kristallen.

Es konnte damit gezeigt werden, dass sich die mit einem Surfmmer funktionalisierten, sehr kleinen Partikel wesentlich besser für die Kristallisation von HAP auf der Partikeloberfläche eignen als die mit AA als Comonomer und SDS als Tensid hergestellten Partikel.

4.2.3 Anisotrope Polymer/HAP-Partikel

Anisotrope Nanopartikel werden technisch als Stabilisator in Pickering-Emulsionen eingesetzt, wo sie auf Grund des niedrigeren Perkulationsverhältnisses kugelförmigen Partikeln überlegen sind.¹⁷² Im Hinblick auf biomedizinische Anwendungen wurde sowohl die Wechselwirkung von Nanopartikeln unterschiedlicher Form mit Zellen als auch deren Verteilung in physiologischen Systemen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Wechselwirkung der Partikel mit Zellen durch die Form und das Aspektverhältnis der Nanopartikel gesteuert werden kann.^{173, 174}

Um den Einfluss der Partikelform auf die Mineralisation zu untersuchen, wurden Phosphonat-funktionalisierte anisotrope Partikel mit HAP beladen. Hierzu wurden die Partikel mit der höchsten Anzahl an Phosphonat-Gruppen auf ihrer Oberfläche (A03, siehe Tabelle 1) von C. H. in einer Matrix aus Polyvinylalkohol (PVA) verstreckt. Die Eigenschaften der erhaltenen anisotropen Partikel sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Tabelle 4: Eigenschaften der Phosphonat-funktionalisierten Partikel (VBPA als Comonomer, A03) vor und nach der Verstreckung in einer PVA-Matrix.

Funktionalisierte Partikel	Länge (L) in nm	Breite (B) in nm	Aspektverhältnis (L/B)
vor der Verstreckung	235 ± 13	235 ± 13	1
nach der Verstreckung	440 ± 70	130 ± 30	3,33 ± 0,62

Die anisotropen Partikel wurden nach der Verstreckung mehrfach mit einem Isopropanol/Wasser-Gemisch gewaschen, um Reste der PVA-Matrix zu entfernen und anschließend mit HAP zu beladen. Die REM-Aufnahmen der anisotropen Partikel vor und nach der Beladung mit HAP sind in **Abbildung 25** gezeigt. Es ist eine gleichmäßige Beladung der anisotropen Partikel mit HAP erkennbar. Die Bedeckung der Partikeloberfläche mit Kristallen ist in diesem Fall jedoch etwas geringer, als sie für die unverstreckten Partikel erhalten wurde (Abbildung 10).

Die Mineralisierung anisotroper, Phosphonat-funktionalisierter Partikel hat den Vorteil, dass ein einzelner Partikel sowohl Bereiche mit sehr starker als auch mit schwacher Krümmung enthält. Die gestreckten Partikel eignen sich daher ideal, um den Einfluss der Oberflächenkrümmung auf die Kristallisation von HAP zu untersuchen. Die REM-Bilder der erhaltenen Polymer/HAP-Partikel zeigen jedoch eine relativ einheitliche Bedeckung der Partikeloberfläche mit HAP. Die REM-Analyse ist allerdings darauf

beschränkt, die Anwesenheit der Kristalle auf den Partikeln sichtbar zu machen. Um zu untersuchen, ob sich die Ausrichtung der Kristalle auf den Partikeln abhängig von der Krümmung der Partikeloberfläche ändert, könnte eine Analyse im hochauflösenden TEM durchgeführt werden.

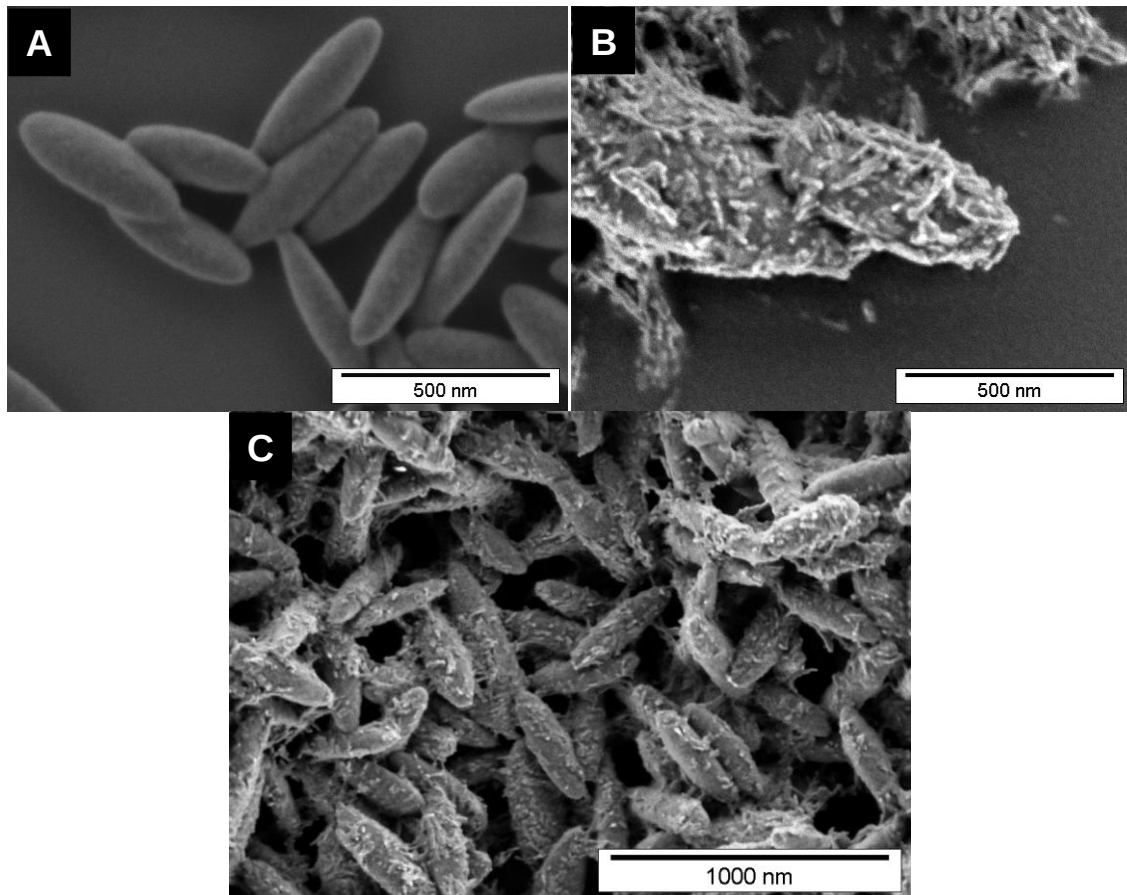


Abbildung 25: REM-Aufnahmen von verstreckten, Phosphonat-funktionalisierten Partikeln vor (a) und nach der Beladung mit HAP (b und c).

4.2.4 Mineralisation von Substrat gebundenen Partikeln

Für die Anwendung von HAP-beladenen Partikeln als Implantatbeschichtung auf Titandioxid (TiO_2) wurden Substrate mit TiO_2 -Oberfläche mit Phosphonat-funktionalisierten Partikeln beschichtet und anschließend mit HAP beladen. Die auf der Oberfläche der Partikel vorliegenden Phosphonat-Gruppen dienen als Ankergruppen an das Implantatmaterial. Mit Hilfe von AFM-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Oberflächen-funktionalisierten Partikel auf Grund der Wechselwirkung der Phosphonsäure-Gruppen mit der TiO_2 -Oberfläche sehr stark an das Substrat anbinden, und daher ausgezeichnet als Beschichtung geeignet sind.¹⁶⁰ Gleichzeitig können die überschüssigen Phosphonat-Gruppen zur Bildung von HAP auf der Partikeloberfläche verwendet werden. Die Beladung der an das TiO_2 -Substrat gebundenen Partikel mit HAP könnte bei einer Anwendung als Implantatbeschichtung die Wechselwirkung zwischen Substrat und Knochengewebe unterstützen.

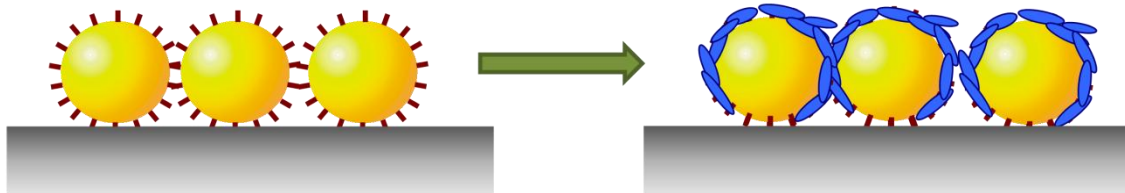


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Beladung von an eine TiO_2 -Oberfläche gebundenen, Phosphonat-funktionalisierten Partikeln mit HAP-Kristallen.

Die mit Phosphonat-funktionalisierten Partikeln beschichteten TiO_2 -Substrate wurden bei 37 °C mit HAP beladen. In den REM-Aufnahmen der resultierenden mineralisierten Substrate sind dicht mit HAP-Kristallen bedeckte Partikel zu sehen (siehe **Abbildung 27**). Dies zeigt, wie homogen die Kristallbildung auf der Oberfläche der Partikel erfolgt. Die dichte Bedeckung der Partikel mit HAP-Kristallen ist vergleichbar zu früheren Experimenten, in denen Phosphonat-funktionalisierte Partikel direkt in der Dispersion beladen wurden (Abbildung 10). Dieses Ergebnis zeigt, dass die mit Partikeln beschichteten TiO_2 -Substrate als funktionelle Template für die Nukleation und das Wachstum des Knochenminerals HAP eingesetzt werden können.

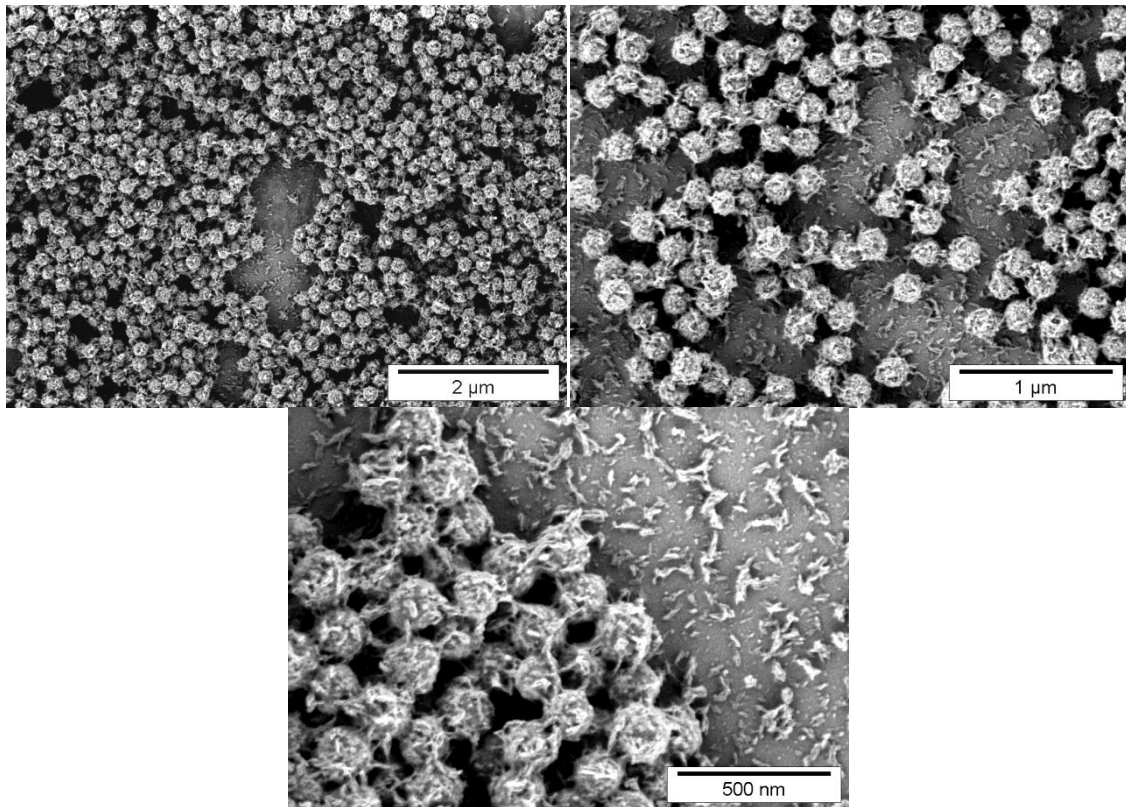


Abbildung 27: REM-Aufnahmen von Phosphonat-funktionalisierten Partikeln, die nach der Anbindung auf ein TiO_2 -Substrat mit HAP beladen wurden (in unterschiedlichen Vergrößerungen).

Nach der Mineralisation sind zu einem geringen Anteil HAP-Kristallite auf der reinen TiO_2 -Oberfläche zu sehen (vergleiche Abbildung 27). In der Literatur ist seit langem bekannt, dass reine TiO_2 -Substrate aufgrund ihrer Hydrophilie und Oberflächenbeschaffenheit unter bestimmten Bedingungen die Nukleation von HAP ermöglichen können.¹⁷⁵ Eine effektive und dichte Beladung mit HAP-Kristalliten ist jedoch nur auf den Partikeln zu sehen, was darauf hinweist, dass auf der Partikeloberfläche unter den Beladungsbedingungen eine weit höhere Anzahl negativ geladener funktioneller Gruppen vorhanden ist als auf der reinen TiO_2 -Oberfläche. Als Vergleich wurde aus diesem Grund ein reines TiO_2 -Substrat mit HAP beladen. Es zeigte sich, dass sich auch auf der reinen TiO_2 -Oberfläche HAP-Kristalle ausbilden. In **Abbildung 28** sind REM-Aufnahmen eines mit HAP beladenen TiO_2 -Substrates von oben (a, b) sowie eines Schnittes von der Seite (c, d) zu sehen. Im Gegensatz zur Mineralisation auf den funktionalisierten Partikeln erfolgte die Kristallisation hier jedoch auf sehr undefinierte Weise, was zu großen, ungleichmäßigen Kristallstrukturen und vielen freien Stellen auf der Substratoberfläche führte. Außerdem war die Anbindung der Kristalle an die TiO_2 -Oberfläche sehr schwach, sie konnten leicht mit

Wasser von der Substratoberfläche abgespült werden. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, die auf den Partikeln gebildeten, winzigen HAP-Kristalle durch Spülen mit Wasser zu entfernen.

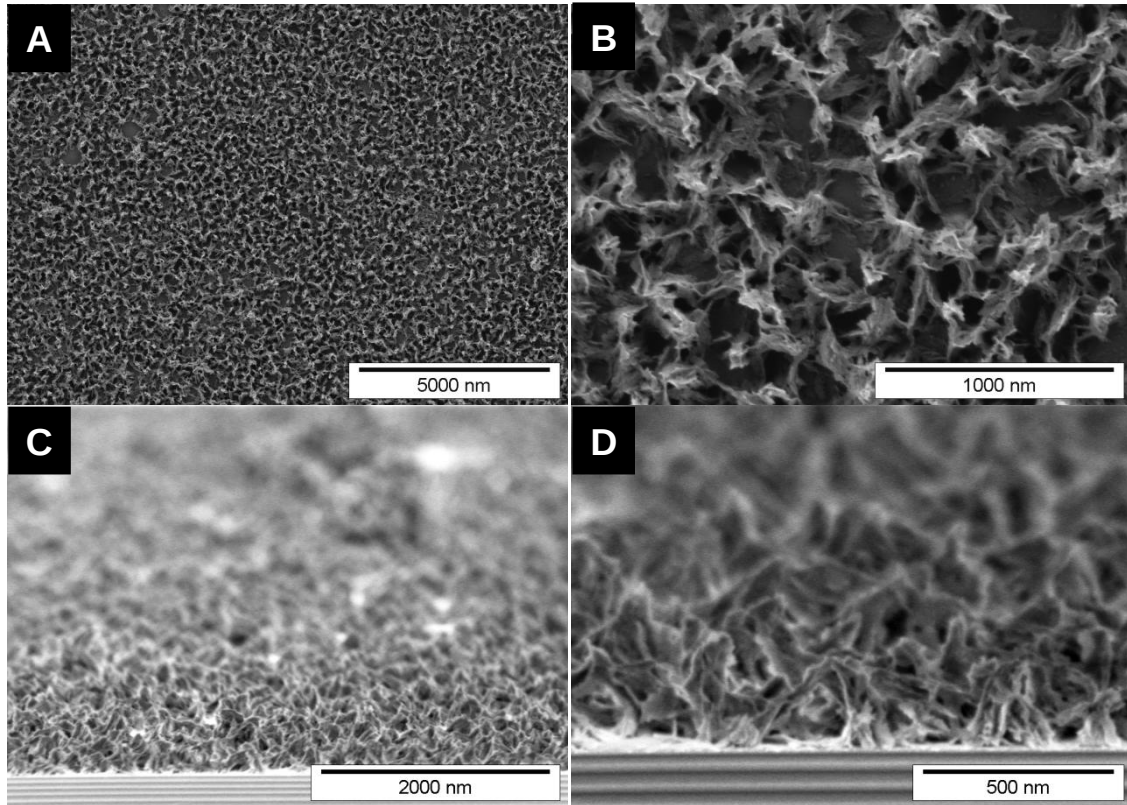


Abbildung 28: REM-Aufnahmen des mit HAP beladenen TiO_2 -Substrates von oben (a, b) und eines Schnittes des beladenen Substrates von der Seite (c, d), in unterschiedlichen Vergrößerungen.

Die Bedeckung des Substrates mit Partikeln war bei den in Abbildung 27 gezeigten mineralisierten Substraten nicht vollständig, an einigen Stellen ist die TiO_2 -Oberfläche zu sehen. Für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Substrat und lebenden Zellen sowie für die Anwendung der Substrate als Implantatbeschichtung sollte die Partikelkonzentration über einen größeren Bereich auf der Oberfläche sehr gleichmäßig sein. Aus diesem Grund wurden TiO_2 -Substrate von Kilian Schuller mittels eines spin-coating-Verfahrens homogen beschichtet. In **Abbildung 29** sind REM-Aufnahmen eines solchen Substrats nach der Mineralisation (in der Seitenansicht einer Bruchkante) gezeigt. In der linken Aufnahme ist eine Multilage von Partikeln auf der Substratoberfläche zu sehen. Eine Bedeckung der Partikel mit HAP-Kristallen erfolgte nur auf der obersten Lage Partikel. In der vergrößerten Aufnahme auf der rechten Seite ist zudem erkennbar, dass sich in den Zwischenräumen der Partikelschicht ebenfalls

keine Kristalle befinden. Deshalb wurden anschließend Substrate mit Monolagen von Partikeln hergestellt und mit HAP beladen.

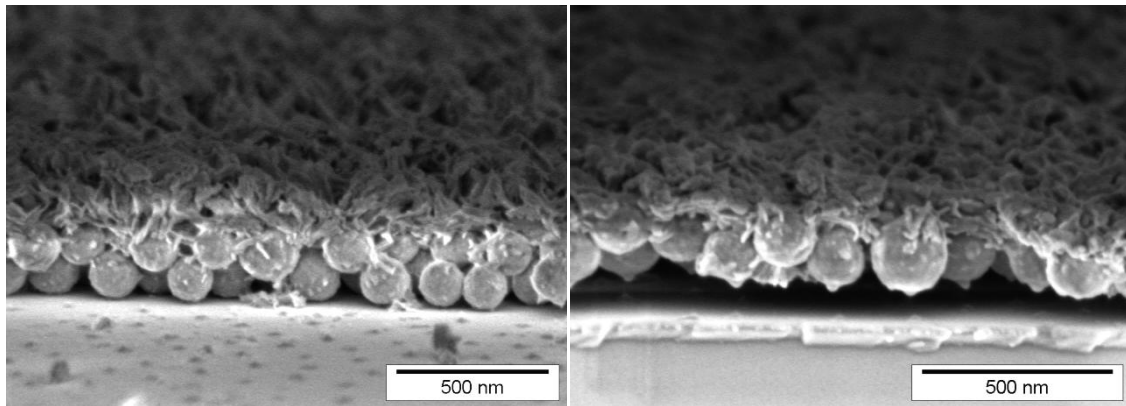


Abbildung 29: REM-Aufnahmen eines mineralisierten, mit Phosphonat-funktionalisierten Partikeln beschichteten TiO_2 -Substrates (Seitenansicht einer Bruchkante), in unterschiedlichen Vergrößerungen.

Wie in **Abbildung 30** zu sehen ist, wurde eine dichte und relativ einheitliche Monolage an Partikeln auf der Substratoberfläche erhalten. Dies ist wichtig, um eine gleichmäßige Beladung der Partikel mit HAP zu erreichen und um die starke Anbindung aller Partikel an das TiO_2 -Substrat zu gewährleisten, sodass während der Beladung oder Zellversuchen möglichst keine Ablösung der Partikel vom Substrat stattfindet.

Die mit Phosphonat-funktionalisierten Partikeln beschichteten TiO_2 -Substrate wurden mit HAP beladen. Auf diese Weise wurde eine nahezu vollständige, homogene Bedeckung der Partikeloberfläche mit HAP-Kristallen erhalten, wie in Abbildung 30c zu sehen ist. Außerdem zeigt die dichte Bedeckung des Substrates nach der Mineralisation, dass die Partikel durch die Beladungsbedingungen (37 °C, starkes Rühren und Elektrolytzusatz) nicht vom Substrat abgelöst wurden. Die starke Anbindung der Partikel an die Substratoberfläche ist für eine Anwendung als Implantatbeschichtung nötig.

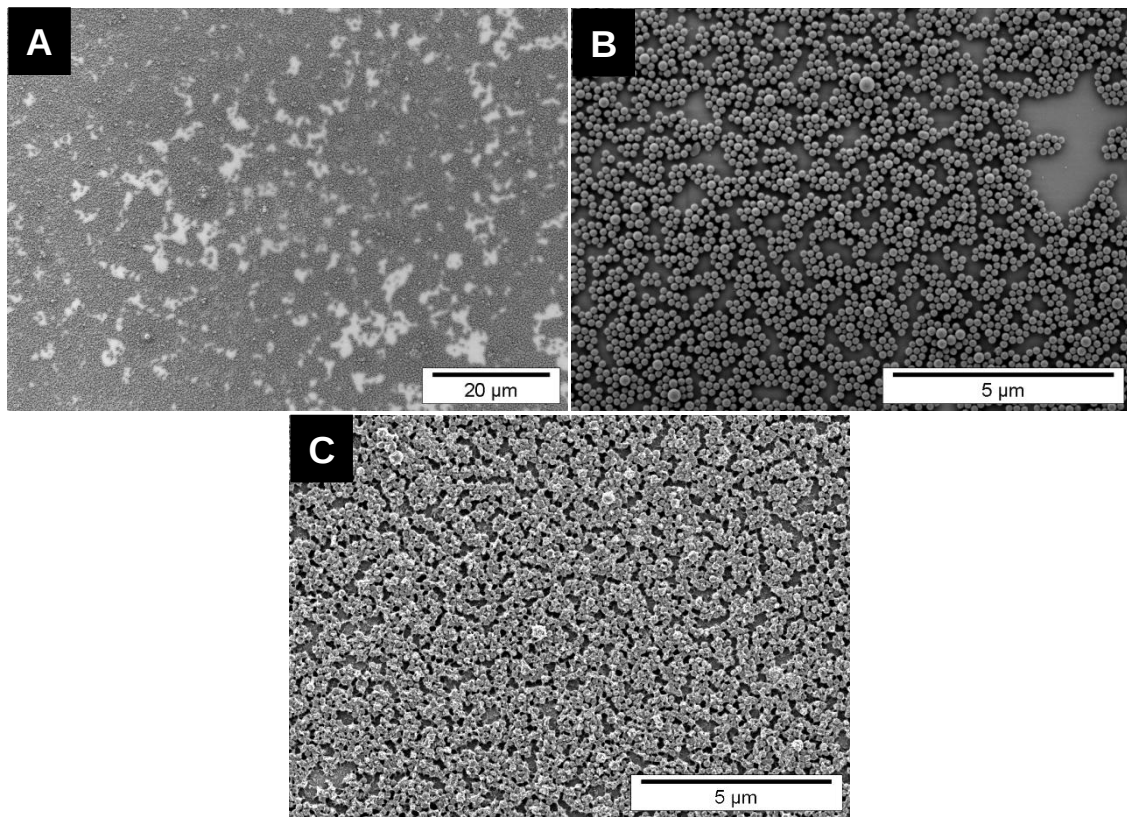


Abbildung 30: REM-Aufnahmen eines mit Phosphonat-funktionalisierten Partikeln beschichteten TiO_2 -Substrates vor (a) und (b), sowie nach der Beladung mit HAP-Kristallen (c).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass HAP sehr homogen auf substratgebundenen Partikeln kristallisiert werden konnte. Das Kristallwachstum erfolgte dabei wie bei der Mineralisation von Partikeln in Dispersionen definiert auf der Partikeloberfläche. Analog zu den Kristallisationen in Dispersion könnte im nächsten Schritt die Kristallmorphologie durch Verändern der Kristallisationsbedingungen kontrolliert werden, um unterschiedliche Oberflächentopografien zu erhalten.

In Zukunft wäre es interessant, die Wechselwirkung der beschichteten und mineralisierten Titandioxid-Substrate unterschiedlicher Oberflächentopografien mit Zellen sowie deren mögliches Anwachsen und Differenzierungsverhalten auf der Substratoberfläche zu untersuchen. Von Interesse wäre zudem eine Untersuchung der Substratoberflächen im REM, nachdem diese ins Zellmedium gegeben wurden, da in diesem genügend hohe Konzentrationen an Calcium- und Phosphat-Ionen vorhanden sind, um möglicherweise weiteres Wachstum von Calciumphosphat auf den Substraten zu bewirken.

4.2.5 Mineralisation von DNA-Nanokapseln

Die zuvor als Templat für die Calciumphosphat-Mineralisation verwendeten Oberflächen-funktionalisierten Partikel sollten durch Oberflächen-funktionalisierte Nanokapseln ersetzt werden. Nanokapseln haben den Vorteil, dass sie einen flüssigen (wässrigen) Kern besitzen, in dem für die biomedizinische Anwendung interessante Substanzen (z.B. Medikamente oder Proteine) verkapselt werden können. Indem die Kapselwand aus einem natürlichen Biomaterial, nämlich Einzelstrang-cDNA, aufgebaut ist, kann eine zusätzliche Funktionalität und Biokompatibilität der Kapseln erreicht werden. Gleichzeitig dient DNA als ideales Templat für die Mineralisation mit HAP, da DNA durch die Phosphat-Einheiten im Rückgrat des DNA-Stranges eine hohe Konzentration an Phosphatgruppen besitzt und somit eine hohe Funktionalisierung der Kapseloberfläche mit negativ geladenen Gruppen möglich ist.

Bisher war die direkte Synthese von Kapseln mit funktionellen Oberflächengruppen durch die inverse Miniemulsionstechnik problematisch. Aufgrund der hier eingesetzten wässrigen dispersen Phase tendierten die hydrophilen funktionellen Gruppen der eingesetzten Polymere dazu, sich an der inneren Grenzfläche der Kapseln (zwischen Wasser und DNA) anzuordnen, anstatt an der Kapseloberfläche (DNA-Cyclohexan-Grenzfläche).

Die DNA-Kapseln wurden von Umaporn Paiphansiri durch Vernetzung von c-DNA mit Toluoldiisocyanat (TDI) als Vernetzungsreagenz in inverser Miniemulsion hergestellt (22,75 µg ss-DNA in 0,325 ml Wasser, 8,35 g Cyclohexan und 65 mg PGPR als kontinuierliche Phase, Zugabe von 35 mg TDI). Die Größe der Kapseln wurde mittels DLS bestimmt und beträgt 118 nm ($\pm$ 40 nm). In **Abbildung 31** sind TEM-Aufnahmen der DNA-Kapseln vor der Mineralisation mit Calciumphosphat gezeigt. Die Kapselmorphologie mit einer kontrastreichen Kapselhülle und kontrastarmem Kern ist hier deutlich erkennbar. Das Zetapotential der Kapseln ist bei neutralem pH deutlich negativ (-13 mV), was auf eine erfolgreiche Funktionalisierung der Kapseloberfläche mit negativ geladenen Phosphatgruppen aus der DNA hinweist.

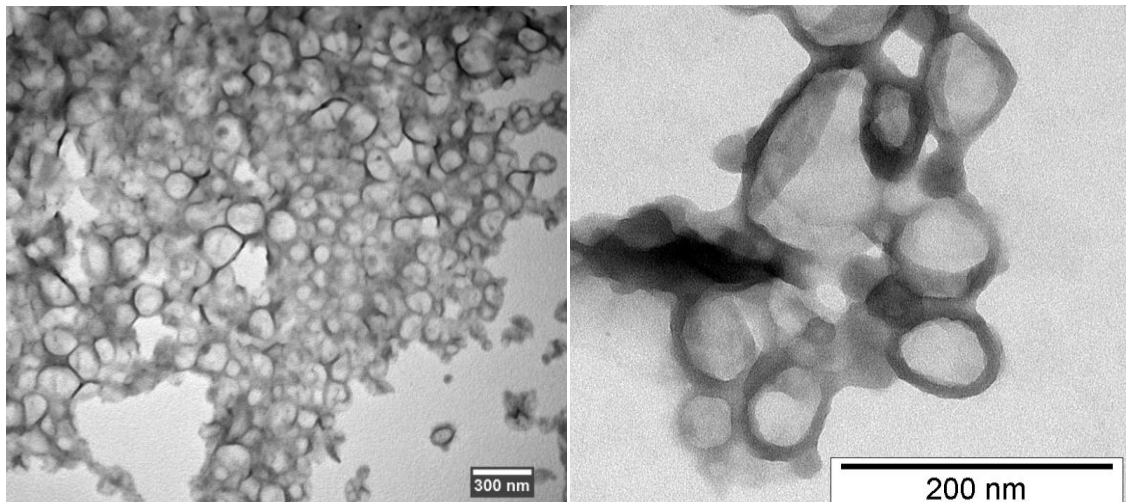


Abbildung 31: TEM-Aufnahmen von DNA-Kapseln, die über Vernetzungsreaktionen in inverser Miniemulsion hergestellt wurden.

Die DNA-Kapseln liegen nach der Synthese in inverser Miniemulsion zunächst dispergiert in Cyclohexan vor und können anschließend durch Redispergieren in eine wässrige Lutensol AT50-Lösung überführt werden. Lutensol AT50 stört jedoch die Kristallisation von Calciumphosphat, indem es vermutlich während der Kristallisation an die wachsenden Kristallflächen adsorbiert. Die Entfernung des Lutensol AT50 nach dem Redispergieren bei gleichzeitigem Erhalten der kolloidalen Stabilität ist bei den Kapseln problematisch, da sie eher zur Agglomeration neigen als die in Kapitel 4.1.1 mineralisierten Polymerpartikel. Aus diesem Grund wurden die Kapseln direkt aus der Cyclohexanphase auf SiO_2 -Wafer aufgebracht und anschließend analog zu den mit Partikeln beschichteten TiO_2 -Substraten (Kapitel 4.2.4) mit Calciumphosphat beladen. Die Mineralisation der DNA-Kapseln mit Calciumphosphat erfolgte unter basischen Bedingungen durch Zugabe von Calciumnitrat im ersten und Ammoniumphosphat im zweiten Beladungsschritt, wie in **Abbildung 32** schematisch gezeigt ist.

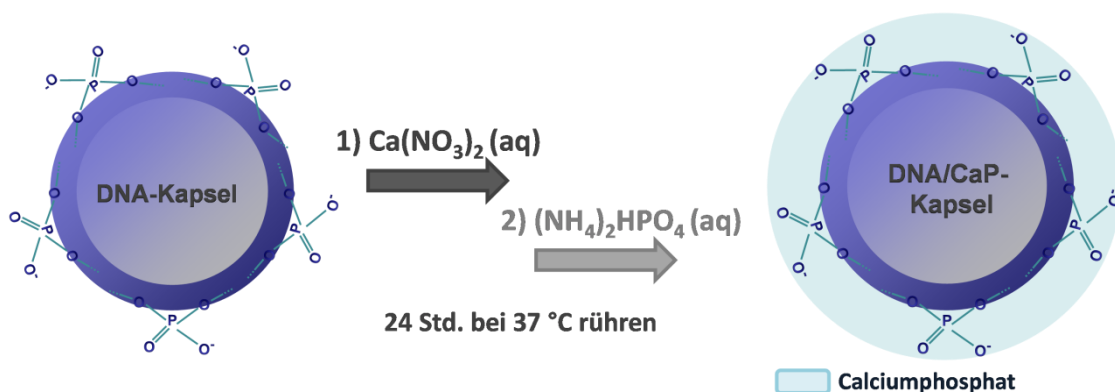


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Mineralisation von DNA-Kapseln mit Calciumphosphat.

In den REM-Aufnahmen in **Abbildung 33** sind die DNA-Kapseln vor und nach der Mineralisation mit Calciumphosphat gezeigt. Die Kapseln sind im REM als offene Strukturen mit hell erscheinender Kapselwand erkennbar, was wahrscheinlich auf ein Einfallen der Kapseln unter dem Vakuum des REM zurückzuführen ist. Nach der Mineralisation mit Calciumphosphat sind in den REM-Aufnahmen winzige Kristalle auf den Kapseln zu sehen. In der höheren Vergrößerung sind nach der Mineralisation sowohl die Kristalle als auch die Kapselmorphologie noch deutlich erkennbar. Damit konnte gezeigt werden, dass DNA-Kapseln ähnlich zu den Phosphonat-funktionalisierten Partikeln (Kapitel 4.2.4) als Templat für die Kristallisation von Calciumphosphat dienen können. Eine XRD-Analyse von Kristallen, die in Abwesenheit der Kapseln unter den gleichen Bedingungen gebildet wurden, zeigte, dass sich unter diesen Bedingungen HAP-Kristalle gebildet haben. Wahrscheinlich handelt es sich damit bei den Kristallen, die sich in Gegenwart der Kapseln auf der Substratoberfläche gebildet haben, ebenfalls um HAP.

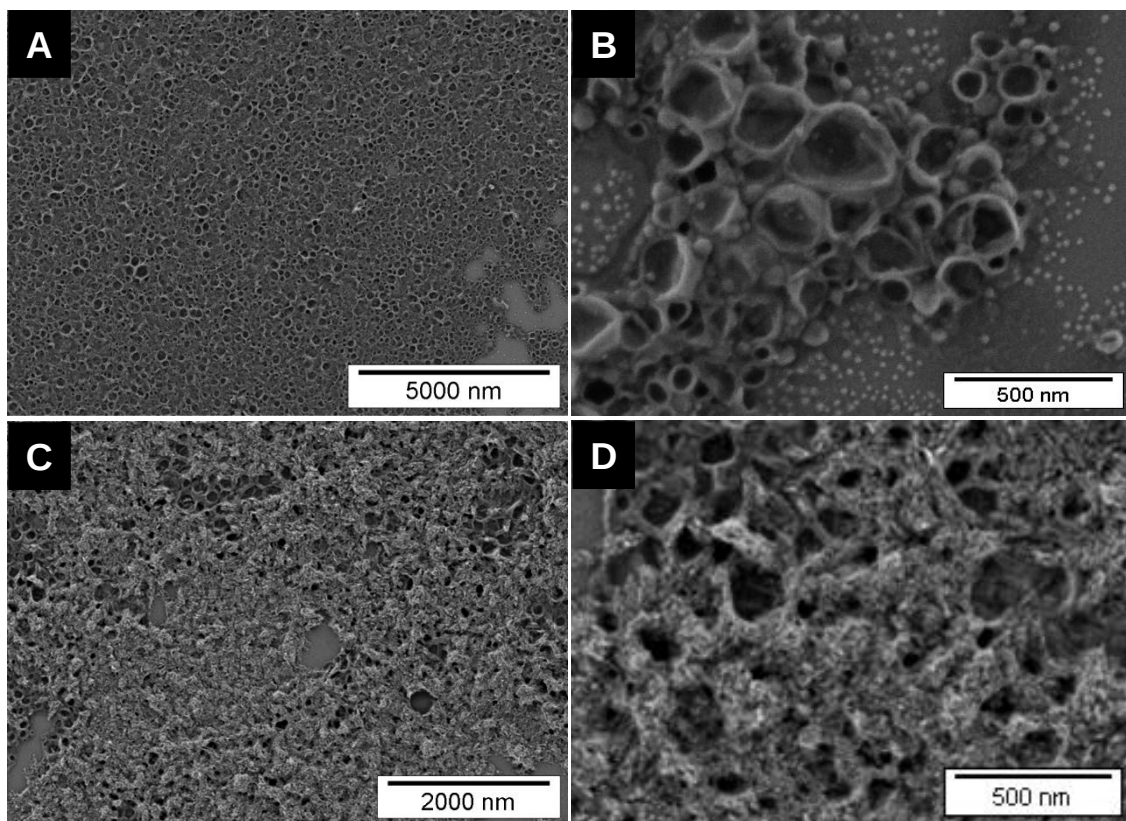


Abbildung 33: REM-Aufnahmen von Nanokapseln aus c-DNA vor (a und b) sowie nach der Mineralisation mit Calciumphosphat (c und d).

Um eine definiertere Mineralisation der Kapselwände mit Calciumphosphat zu erreichen, wurde anschließend eine modifizierte Methode angewandt. In den zuvor mineralisierten DNA-Kapseln befand sich eine verdünnte NaCl-Lösung, stattdessen wurde nun eine Ammoniumphosphat-Lösung im Kapselinneren verwendet. Es wurde angenommen, dass auf diese Weise allein durch die Zugabe von Calciumnitrat im ersten Beladungsschritt die Bildung von Calciumphosphat an der Kapselwand erreicht werden kann. Nach der Calciumionen-Zugabe wurden die Proben 24 h lang bei 37 °C gerührt, wobei auf den zweiten Beladungsschritt (die Phosphationen-Zugabe) verzichtet wurde. Die REM-Aufnahmen der mit Kapseln beschichteten SiO₂-Wafer vor und nach der Mineralisation mit Calciumphosphat sind in **Abbildung 34** gezeigt. Im Gegensatz zu den zuvor mineralisierten Kapseln sind hier keine Kristalle erkennbar, es könnte sich jedoch auch um amorphes Calciumphosphat handeln. Erste experimentelle Hinweise darauf sind, dass die Stabilität der Kapseln im Elektronenstrahl nach der Mineralisation deutlich höher war als vorher. Auch erscheint die Kapselwand nach der Mineralisation mit deutlich höherem Kontrast zum Kapselinneren. Um nachzuweisen, dass sich tatsächlich Calciumphosphat an der Kapselwand gebildet hat, wurden Substrate so mit DNA-Kapseln beschichtet, dass eine deutliche Grenze zwischen der Kapselbeschichtung und dem unbeschichteten SiO₂-Waver erkennbar ist (Abbildung 34). Im nächsten Schritt kann mit Hilfe einer Elementaranalyse im REM die Anwesenheit von Calcium und Phosphor in den Bereichen, in denen sich Kapseln befinden untersucht werden. Die kapselfreien Bereiche werden hierbei aus messtechnischen Gründen als Referenz benötigt.

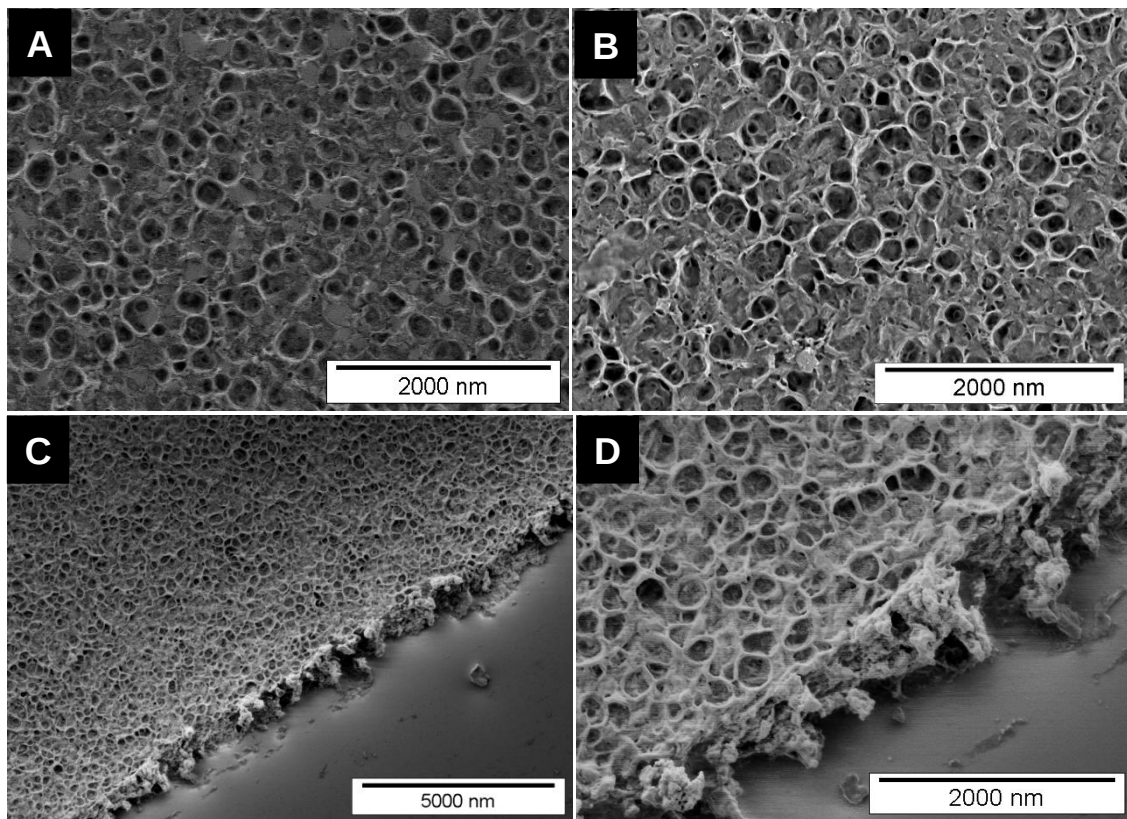


Abbildung 34: REM-Aufnahme eines mit DNA-Kapseln beschichteten SiO₂-Wafer vor (a) und nach der Mineralisation mit Calciumphosphat (b). In den unteren beiden REM-Aufnahmen (c und d) ist der Rand einer mit Calciumphosphat mineralisierten Kapselschicht zu sehen.

Es wurde gezeigt, dass dünne und homogene Schichten von DNA-Kapseln auf einem Wafer hergestellt und mit Calciumphosphat mineralisiert werden können. Im nächsten Schritt könnten funktionelle Substanzen wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren oder Medikamente im hydrophilen Kapselinneren verkapselt werden, um auf diese Weise biologisch aktive Implantatbeschichtungen herzustellen.

4.3 Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln über Grenzflächenmineralisation

In den letzten Jahren wurden in der biomedizinischen Forschung enorme Anstrengungen unternommen, um multifunktionelle Nanokapseln zu entwickeln. Einige Bestrebungen zielten auf die Verkapselung von Medikamenten in bioabbaubaren Nanokapseln oder Nanogelen ab, um eine kontrollierte Medikamentenfreisetzung zu erreichen ohne dabei toxische Materialien einzusetzen.¹⁴² Besonders organisch-anorganische Hybridmaterialien zeigen ein großes Potential als multifunktionelle Freisetzungssysteme, da sie die unterschiedlichen Materialeigenschaften und Funktionalitäten der organischen und anorganischen Komponenten verbinden.^{9, 143} Außerdem ermöglichen neue Synthesestrategien wie die templatgesteuerte Mineralisation eine Synthese unter milden Reaktionsbedingungen.

Die wasserlöslichen Gelatinemoleküle werden normalerweise durch organische Moleküle vernetzt, um stabile Gelatinenetzwerke zu erhalten, welche unlöslich in Wasser sind. Anschließend können die vernetzten Gelatinepartikel mit Calciumphosphat zu Hybridpartikeln mineralisiert werden.^{109, 33} In diesem Kapitel wird ein neues Konzept zur in-situ-Herstellung von Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln vorgestellt, welches auf der direkten in-situ-Mineralisation der Gelatine-Moleküle an der Tröpfchengrenzfläche von Wasser-in-Öl (w/o) Miniemulsionen basiert. In diesem Fall ist keine zusätzliche Vernetzung nötig, das Calciumphosphat selbst fungiert als Vernetzer der Gelatineketten und stabilisiert die kompakte organisch-anorganische Hybrid-Hülle der Nanokapseln. Das hier eingesetzte Miniemulsionssystem eignet sich zudem sehr gut zur Verkapselung hydrophiler Substanzen im Kapselinneren.

Die Verwendung von Gelatine und Calciumphosphat als Kapselmaterial ist für eine mögliche Anwendung der Kapseln zur Behandlung von Knochendefekten vorteilhaft. Calciumphosphat wird bereits als Trägermaterial von pharmakologisch wirksamen Substanzen eingesetzt^{107, 158, 159} und gilt zusätzlich selbst als Medikament, da die aus Calciumphosphat freigesetzten Ionen das Wachstum neuen Knochenmaterials unterstützen können.^{11, 10} Auf Grund der intrinsischen Eigenschaften von Gelatine und Calciumphosphat können die Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln zudem potentiell durch verschiedene äußere Reize wie Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur, der Ionenstärke oder der Anwesenheit von Enzymen angesprochen werden. Die multifunktionellen Nanokapseln könnten daher beispielsweise als regeneratives Material in der Behandlung von Knochendefekten eingesetzt werden.

4.3.1 Synthese und Charakterisierung von Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln

Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln wurden hergestellt, indem eine Calcium-Ionen enthaltende wässrige Gelatine-Lösung unter basischen Bedingungen zu einer inversen Miniemulsion gegeben wurde. Diese Miniemulsion enthielt 100-250 nm große Tröpfchen einer wässrigen Natriumphosphatlösung in Cyclohexan als kontinuierlicher Phase (**Abbildung 35**). Unter basischen Bedingungen enthalten die Gelatinemoleküle deprotonierte Carboxylgruppen, welche Calcium-Ionen durch Komplexbildung binden können. Die starken Wechselwirkungen der Calcium-Ionen mit den negativ geladenen Gruppen der Gelatineketten erhöhen zudem die Löslichkeit von Gelatine in Wasser. Diese mit Calcium-Ionen gesättigten Gelatinemoleküle adsorbieren nach der Zugabe zu einer inversen Miniemulsion an die Grenzfläche der Phosphat-Ionen enthaltenden Nanotröpfchen. Anschließend führt die Diffusion der gegensätzlich geladenen Calcium- und Phosphat-Ionen in Richtung der Tröpfchen-Grenzfläche zu einer kontrollierten Mineralisation von Calciumphosphat an der Grenzfläche, die im Folgenden als Grenzflächenmineralisation bezeichnet wird.

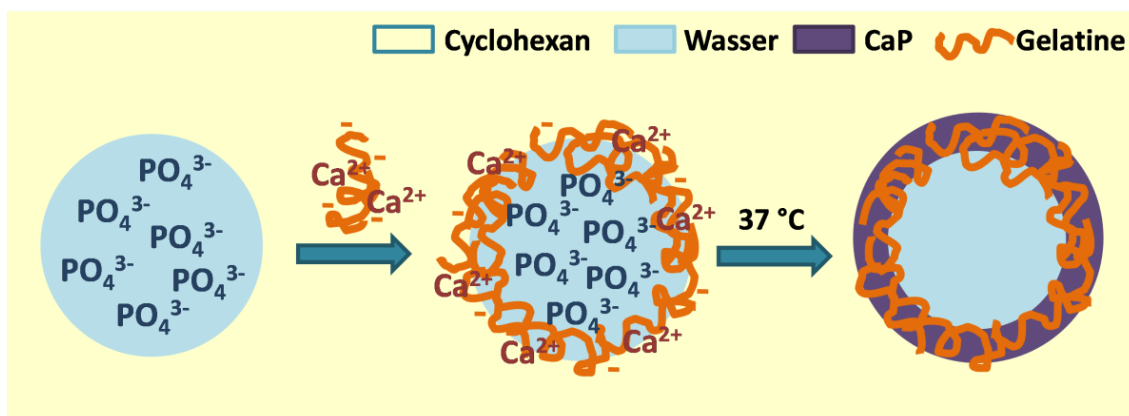


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Herstellung von Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln durch die Mineralisation von Gelatine an der Grenzfläche von Miniemulsionströpfchen (in inverser Miniemulsion).

Nach der Mineralisation wurden die Hybridkapseln durch Redispergieren von der organischen Cyclohexanphase in eine wässrige Poly(vinylpyrrolidon) (PVP) enthaltende Dispersion überführt. PVP ist ein polares, wasserlösliches Polymer, das als Emulgator für die hydrophilen Nanokapseln wirkt. Für die mögliche Anwendung der Kapseln in der Medikamentenfreisetzung ist die Verwendung von PVP als Emulgator attraktiv, da es adsorbiert auf der Partikeloberfläche dafür bekannt ist, die Zirkulation

der Partikel im Blut zu verlängern.¹⁷⁶ DLS-Messungen der Calciumphosphat/Gelatine-Kapseln in Cyclohexan und nach dem Redispergieren in Wasser zeigen nahezu unveränderte hydrodynamische Durchmesser von 220-290 nm vor und nach dem Redispergieren (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: In der Synthese von Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln eingesetzte experimentelle Bedingungen und mittels DLS erhaltene hydrodynamische Durchmesser vor und nach dem Redispergieren in Wasser.

Probe	pH	Gelatine (mg)	Ca ²⁺ (μMol)	PO ₄ ³⁻ (μMol)	HAP-Kristalle (mg)	Durchmesser (nm)	
						in CH	in Wasser
F01	7,4	15	5	30	-	217 ± 36	225 ± 55
F02	10	15	5	30	-	227 ± 41	216 ± 47
F03	10	15	10	60	-	287 ± 54	287 ± 58
F04	10	15	10	60	2,5	232 ± 48	290 ± 53
F05	10	15	10	60	5	240 ± 40	-

Ein entscheidendes Merkmal der Synthese von Nanokapseln über die Grenzflächenmineralisation ist das Ausnutzen der Grenzflächenaktivität der polyampholyten Gelatinemoleküle.¹⁷⁷ Gelatine wirkt in Emulsionen als Cotensid, indem sie durch die Adsorption an die Tröpfchengrenzfläche die Grenzflächenspannung herabsetzt.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Indem bei der Herstellung der Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln relativ niedrige Gelatinekonzentrationen eingesetzt (0,75 Gew.-%) werden, kann dieser Effekt für die Bildung einer mineralisierten Kapselhülle ausgenutzt werden. Gleichzeitig wird auf diese Weise die Gelbildung der Gelatineketten im Kern der Kapseln vermieden, da diese typischerweise erst bei Konzentrationen über 1 Gew.-% einsetzt. Da die Eigenschaften der Hybridkapseln sowohl von der Kapselmorphologie als auch von der gebildeten Calciumphosphat-Phase abhängen, ist die bewusste Wahl der Mineralisationsparameter von großer Bedeutung.

Im ersten Schritt wurde die Komplexierung der Calcium-Ionen an Gelatinemoleküle optimiert, indem eine spezielle Art Gelatine (Gelatine Typ S, Gelita), deren Menge an negativ geladenen Gruppen durch Derivatisieren erhöht ist, eingesetzt wurde. Mit Hilfe von Titrationsexperimenten wurde die Fähigkeit verschiedener Gelatinearten, Calcium-Ionen zu binden, bestimmt (**Abbildung 36**). Dabei wurde herausgefunden, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen 1 g Gelatine (Typ S) $2,2 \times 10^{-5}$ Mol Calcium-Ionen binden kann. Indem anschließend bei der Herstellung der Hybridkapseln

Calciumionen-Konzentrationen eingesetzt wurden, die der Calciumionen-Aufnahmekapazität von Gelatine entsprechen, konnte eine unkontrollierte Kristallisation von Calciumphosphat weitestgehend unterdrückt werden. Stattdessen ist die Calciumphosphat-Bildung auf die Umgebung der Gelatineketten beschränkt, von denen angenommen wird, dass sie sich hauptsächlich an der Tröpfchengrenzfläche befinden. Dies führt zu einem definierten Reaktionsraum für die Mineralisation an der Grenzfläche (siehe TEM-Aufnahmen in Abbildung 38). Zudem beeinflussen das Verhältnis von Calcium- zu Phosphat-Ionen und der pH-Wert wesentlich die Bildung von Calciumphosphat. Aus diesem Grund wurden verschiedene pH-Werte, nämlich physiologischer pH (pH 7,4) und basischer pH (pH 10), sowie verschiedene Ionenkonzentrationen getestet (Tabelle 5).

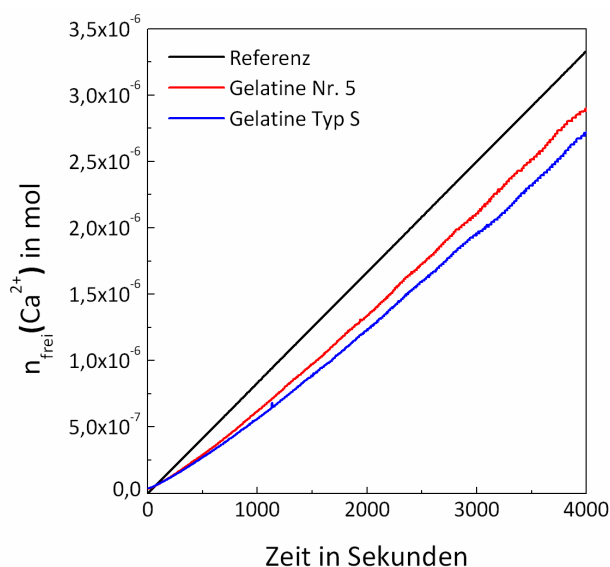


Abbildung 36: Messung der Calciumionen-Aufnahmekapazität unterschiedlicher Gelatine-Arten unter basischen Bedingungen (pH 10) bei 37 °C.

In den **Abbildung 37** und **Abbildung 38** sind REM- und TEM-Aufnahmen der mineralisierten Hybrid-Nanokapseln gezeigt. Die Ausbildung der Kern-Hülle-Morphologie mit einer elektronenreichen Hülle um einen weniger elektronenreichen Kern ist in der TEM-Aufnahme deutlich erkennbar. Da Gelatine im TEM nur einen sehr geringen Kontrast zeigt, ist das anorganische Calciumphosphat, das sich an der Grenzfläche befindet, für den starken Kontrast verantwortlich. Die REM-Aufnahmen bestätigen diese Kapselmorphologie, in Abbildung 37 sind sowohl geschlossene als auch offene Kapselstrukturen erkennbar, wobei die offenen Strukturen eventuell ein Trocknungsartefakt sind.

Das Dunkelfeldbild einer vergrößerten Probenfläche in Abbildung 38b zeigt keine kristallinen Eigenschaften (Kristalle sind im Dunkelfeld des TEM als helle Punkte zu erkennen), was auf die Bildung einer amorphen Calciumphosphat-Hülle hinweist. In der Literatur ist bekannt, dass funktionelle, als Matrix fungierende Moleküle wie Gelatine als Templat für die Calciumphosphat-Mineralisation dienen können.³³ Gleichzeitig können diese Makromoleküle thermodynamisch weniger stabile Phasen wie amorphes Calciumphosphat unter Bedingungen stabilisieren, unter denen normalerweise nur thermodynamisch stabilere Phasen wie Octacalciumphosphat (OCP) oder HAP gebildet werden.¹⁸¹ Amorphes Calciumphosphat ist für die biomedizinische Anwendung ein interessantes Material, da es sich in die thermodynamisch stabileren Phasen umformen kann.^{29, 30} In der Medizin wird amorphes Calciumphosphat aus diesem Grund oft als resorbierbares Präkursor-Material für die Bildung des Knochenminerals HAP eingesetzt.

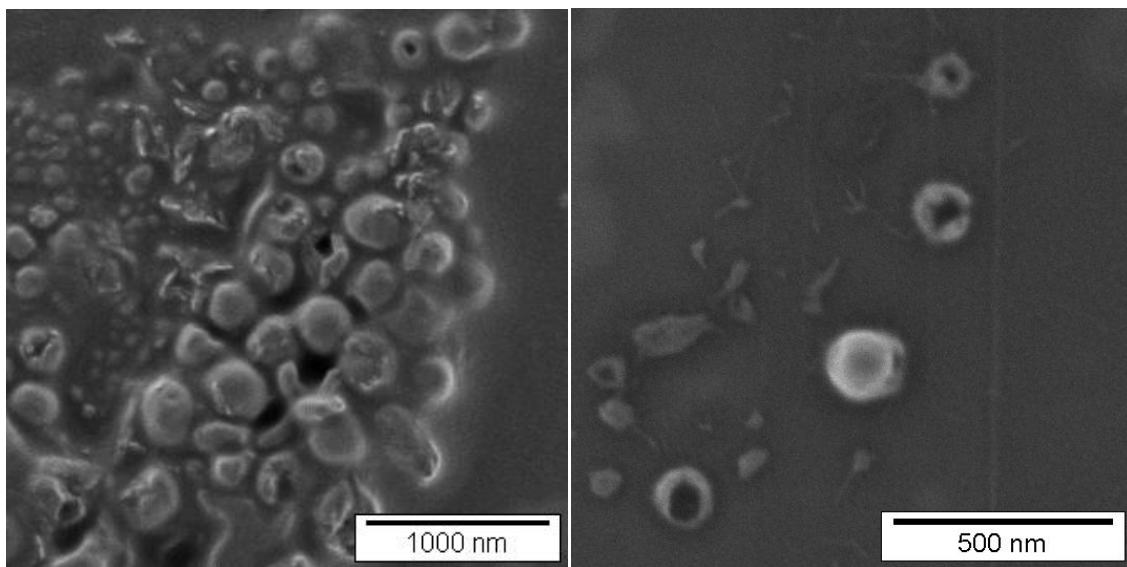


Abbildung 37: REM-Aufnahmen von Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln, die mit Hilfe der Grenzflächenmineralisation hergestellt wurden (Probe F03).

In früheren Untersuchungen wurden mit Glutardialdehyd vernetzte nanometergroße Gelatinepartikel als Templat für die Bildung von Calciumphosphat in den Nanopartikeln eingesetzt.³³ Dabei wurde zuerst amorphes Calciumphosphat im Inneren der vernetzten Gelatinepartikel gebildet, das sich dann nach der Ostwald'schen Stufenregel in das thermodynamisch stabilere HAP umwandelte. Im Gegensatz zu diesem Vorgang basiert die in diesem Kapitel beschriebene Herstellung von Hybridkapseln auf der Adsorption unvernetzter Gelatineketten an die

Tröpfchengrenzfläche, welche im nächsten Schritt als Templat für die Calciumphosphat-Mineralisation dient. In diesem Fall wurde vor dem Redispergieren in Wasser kein kristallines Calciumphosphat in der Kapselhülle gefunden. Dennoch könnte eine Umwandlung zu thermodynamisch stabileren Calciumphosphat-Phasen entweder mit der Zeit oder durch die sequentielle Zugabe von Calcium- und Phosphat-Ionen zu den in Wasser redispergierten Nanokapseln erfolgen. Zusätzlich könnte dies eine Möglichkeit bieten, die Dicke der Kapselhülle zu variieren und damit unterschiedliche Freisetzungskinetiken einzustellen.

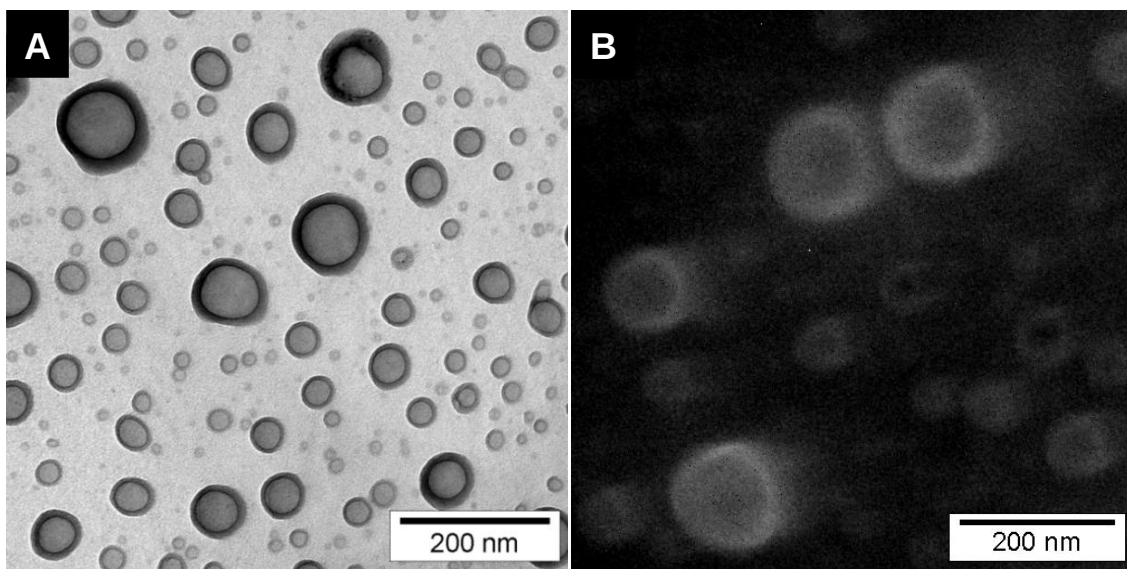


Abbildung 38: TEM-Aufnahmen der über die Grenzflächenmineralisation hergestellten Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln. (a) Hellfeld-Aufnahme und (b) Dunkelfeld-Aufnahme der Kapseln.

4.3.2 Verkapselung von Hydroxylapatit-Kristallen

Die Grenzflächenmineralisation ermöglicht die erfolgreiche Verkapselung verschiedener Materialien im wässrigen Kern der Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln. Die inverse Miniemulsionstechnik eignet sich dabei ideal für die Verkapselung hydrophiler Substanzen, weil diese zunächst gelöst oder dispergiert in der wässrigen Phase vorliegen und dann im Emulgierschritt homogen über die Nanotröpfchen verteilt werden.^{9, 13} Anschließend dient die Tröpfchengrenzfläche, an der mit Calcium-Ionen gesättigte Gelatinemoleküle adsorbiert vorliegen, als Templat für die Mineralisation und gleichzeitige Verkapselung. Als Modellsystem für die Verkapselung und Freisetzung kleiner Moleküle wurde der wasserlösliche Farbstoff Rhodamin eingesetzt. Entsprechend wurden als Beispiel für eine größere Substanz winzige ca. 10 nm große

HAP-Kristalle, die von A. E. hergestellt wurden, in den Hybridkapseln verkapselt (vgl. Tabelle 5).

Die Verkapselung von HAP-Kristallen wurde erreicht, indem die Kristalle zunächst in einer wässrigen PVP-Lösung dispergiert und mit Phosphat-Ionen versetzt wurden. Anschließend wurde die auf diese Weise erhaltene Dispersion als disperse Phase in einer Miniemulsion analog zur Vorgehensweise in Kapitel 4.3.1 eingesetzt. Anschließend wurden durch Zugabe einer Calcium/Gelatine-Lösung durch Grenzflächenmineralisation Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln mit verkapseltem HAP erhalten. TEM-Aufnahmen der HAP-Kristalle enthaltenden Nanokapseln zeigen eine homogene Verkapselung der winzigen Kristallite in den Kapseln (**Abbildung 39**). In der Dunkelfeld-Aufnahme heben sich die verkapselten HAP-Kristalle deutlich in heller Farbe von den amorph erscheinenden Calciumphosphat/Gelatine-Kapselhüllen ab. Die Ergebnisse der XRD bestätigen zudem die Anwesenheit von HAP im untersuchten System (**Abbildung 40**).

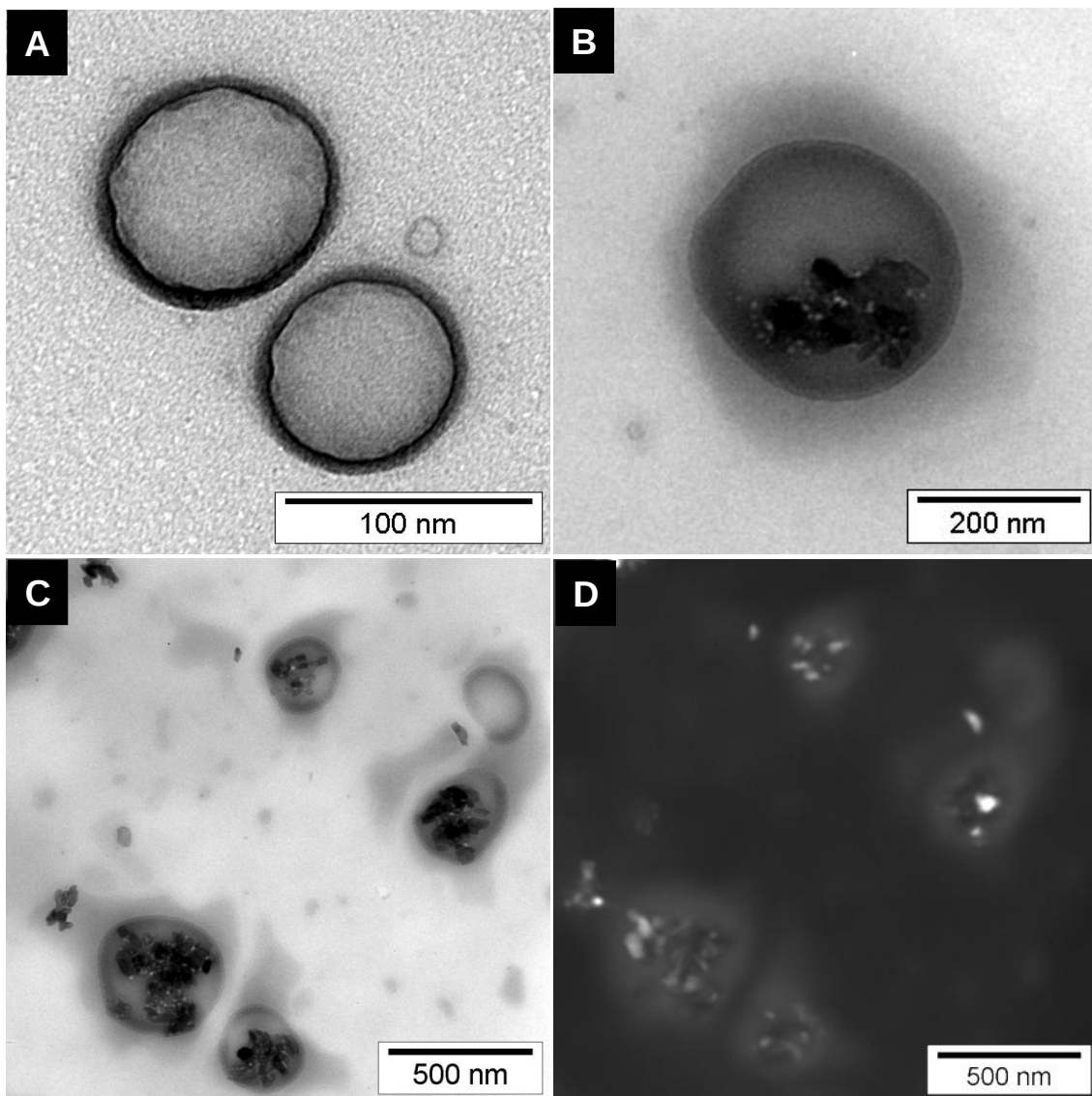


Abbildung 39: TEM-Aufnahmen von Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln mit flüssigem Kern (a) und verkapselten HAP-Kristallen in hoher (b) und niedrigerer Vergrößerung (c), sowie eine Dunkelfeld-TEM-Aufnahme von verkapselten HAP-Kristallen (d).

Die erhaltenen Kapseln mit und ohne verkapseltem HAP wurden im Anschluss an die Synthese durch Redispergieren von der Cyclohexanphase in die wässrige Phase überführt. Die Kapseln konnten erfolgreich in wässriger PVP- oder Lutensol-Lösung, nicht jedoch in verdünnter SDS-Lösung redispergiert werden. Um eine mögliche Ursache für die Schwierigkeiten bei der Redispergierung in einer SDS-Lösung zu finden, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin in den Kapseln verkapselt (siehe Kapitel 4.3.3). Nachdem die Rhodamin enthaltenden Kapseln in SDS-Lösung redispergiert und zentrifugiert wurden, war der Überstand stark rot gefärbt, wohingegen der Kapselrückstand farblos erschien. Dies deutet auf eine Freisetzung des Farbstoffes

während dem Redispergieren in SDS-Lösung hin. Wurden die Kapseln in einer Lösung des nichtionischen Tensid Lutensol AT50 oder PVP redispergiert, erschien der Überstand der Lösung nach der Zentrifugation nahezu farblos und der Kapselrückstand stark rot gefärbt. Wurde der wässrigen PVP-Lösung jedoch eine größere Menge Calciumnitrat zugefügt, war ein ähnlicher Effekt (Farbstoff-Freisetzung), wie für das ionische Tensid SDS zu beobachten. Diese Beobachtungen geben erste Hinweise darauf, dass die Kapselhülle in Anwesenheit hoher Ionenkonzentrationen bricht. Eine Ursache hierfür könnte der osmotische Druck zwischen dem Kapselinneren und der umgebenden Lösung (im Falle hoher Ionenkonzentrationen) sein. Im nächsten Kapitel wird die Verkapselung des Farbstoffes Rhodamin sowie dessen Freisetzung durch Änderungen des pH-Wertes detailliert beschrieben.

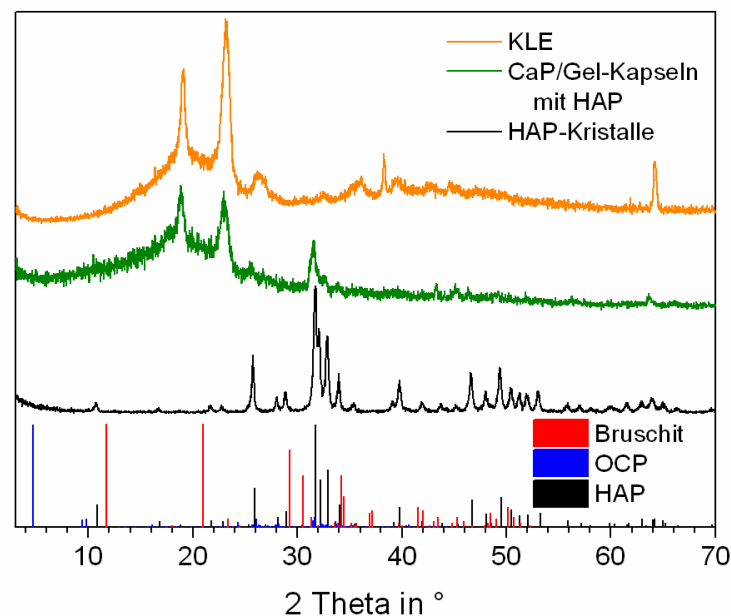


Abbildung 40: Röntgendiffraktogramme der in Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln verkapselten HAP-Kristalle sowie reine HAP-Kristalle und Tensid (KLE) als Referenzen.

In **Abbildung 41** ist eine TEM-Aufnahme der Kapseln (ohne verkapseltes HAP) nach dem Redispergieren in PVP-Lösung gezeigt. Die dunkle Kapselhülle ist deutlich erkennbar, wobei die Kapseln stärker als vor der Redispergierung zur Agglomeration (während des Trocknungsprozesses) neigen. Diese Aufnahme zeigt damit, dass die mit Calciumphosphat mineralisierte Gelatine, welche die Kapselwand bildet, auch nach der Redispergierung in Wasser stabil ist.

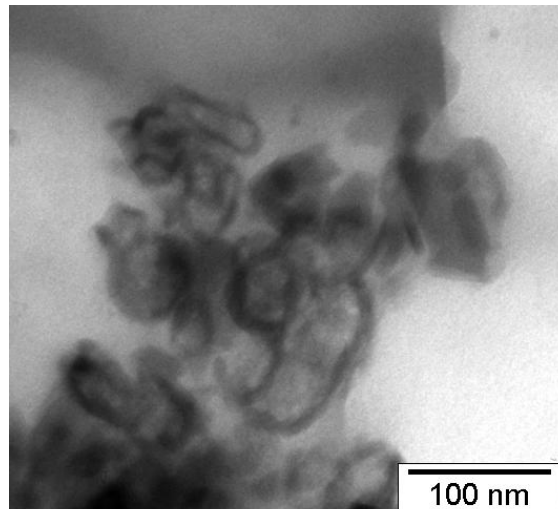


Abbildung 41: TEM-Aufnahme von Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln nach dem Redispergieren in wässriger PVP-Lösung.

4.3.3 Verkapselung und Freisetzung von Rhodamin

Nach der erfolgreichen Verkapselung von HAP-Kristallen, wurde Rhodamin 6G in den Calciumphosphat/Gelatine-Kapseln verkapselt. Die Strukturformel von Rhodamin 6G ist in **Abbildung 42** gezeigt. Rhodamin ist ein wasserlöslicher Fluoreszenzfarbstoff und eignet sich daher als Modell-Substanz, um eine mögliche Anwendung der Kapseln für die Verkapselung und Freisetzung von Medikamenten aufzuzeigen. Die Calciumphosphat/Gelatine-Kapseln sind nicht nur wegen der vorteilhaften Eigenschaften von Calciumphosphat, sondern auch wegen des Zersetzungsverhaltens von Gelatine aussichtsreich als multifunktionelles System für die Medikamentenfreisetzung. Verschiedene Auslöser für eine gezielte Freisetzung durch die Zersetzung von Gelatine sind möglich, so zum Beispiel Änderungen des pH-Wertes oder der Temperatur sowie die Anwesenheit von Enzymen.

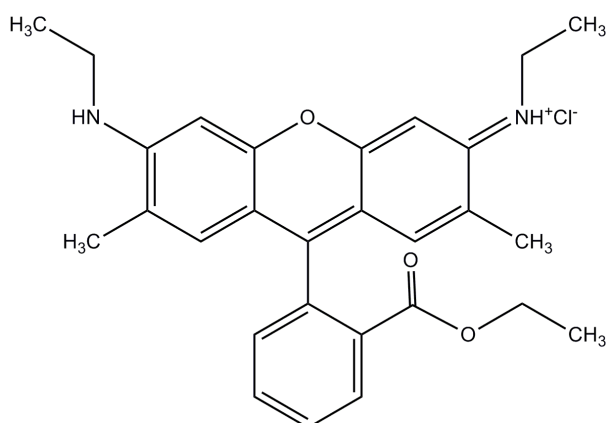


Abbildung 42: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 6G.

Die Verkapselung von Rhodamin wurde erreicht, indem dieses in einer Phosphatlösung gelöst wurde, bevor das System emulgiert und die Calcium/Gelatine-Lösung für die Grenzflächenmineralisation zugegeben wurde. Für eine mögliche Anwendung als pH-spaltbare Kapseln wurde anschließend die Freisetzung von Rhodamin aus den Kapseln untersucht. Dazu wurden die Kapseln zunächst bei pH 7,4 (physiologischer pH) für 12 h in der Wasserphase redispergiert. Danach wurde in 6 Aliquoten der Probe der pH-Wert auf unterschiedliche Werte eingestellt (pH 2, 3, 4, 5, 6 und 7,4). Nach der Zentrifugation der Kapseln nach verschiedenen Zeitintervallen wurde die Fluoreszenzintensität des Überstandes gemessen und daraus die Menge an freigesetztem Farbstoff bestimmt.

Hierbei wurde die Menge an Farbstoff, die bei einem pH-Wert von 2 freigesetzt wurde, als 100%-ige Freisetzung festgesetzt, da unter diesen Bedingungen von einer vollständigen Zersetzung von Gelatine und Auflösung von Calciumphosphat ausgegangen werden kann. Die Freisetzung unter allen anderen pH-Werten wird als prozentualer Anteil zur vollständigen Freisetzung angegeben.

Interessanterweise wurden abhängig von dem in der Dispersion während des Freisetzungsexperimentes vorliegenden pH-Werts unterschiedliche Mengen an Farbstoff freigesetzt. Dies deutet darauf hin, dass die Kapseln gegenüber Änderungen des pH-Wertes unterschiedlich stabil sind. Gleichzeitig wurde herausgefunden, dass nach der ersten Stunde der Messung in den weiteren 30 h keine zusätzliche Freisetzung mehr stattfindet (**Abbildung 43**). Obwohl eine Zeitabhängigkeit der pH-gesteuerten Freisetzung hier nicht detektiert wurde, war es möglich, eine zweite Freisetzung auszulösen, indem der pH-Wert von allen verschiedenen Proben (bei pH 3, 4, 5, 6 und 7,4) nach längerer Zeit (30 h) auf pH 2 gebracht wurden. Die Menge an freigesetztem

Farbstoff war bei allen Proben mit der von Anfang an bei pH 2 eingestellten Probe vergleichbar.

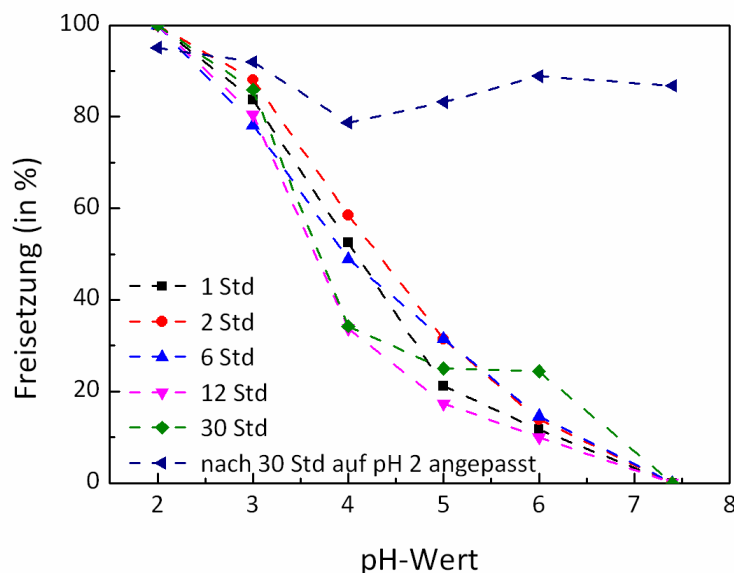


Abbildung 43: Prozentualer Anteil an freigesetztem Farbstoff (Rhodamin 6G) in Abhängigkeit des in der Dispersion vorliegenden pH-Wertes nach unterschiedlichen Zeitpunkten. Die blauen Markierungen zeigen die Freisetzung nach einer Anpassung des jeweiligen pH-Wertes auf pH 2 nach 30 h.

Der Wechsel von physiologischem pH-Wert (pH 7,4) zu saurem pH wurde hier als Auslöser für die Farbstoff-Freisetzung aus den Hybridkapseln verwendet. Um den Freisetzungsmechanismus zu verstehen, ist es auf Grund der Komplexität des Gelatine/Calciumphosphat-Systems nötig, mindestens drei verschiedene Effekte zu berücksichtigen. Zum einen ist die Auflösung von Calciumphosphat ein vom pH-Wert der Dispersion abhängiger Prozess.¹⁶³ Zum anderen beeinflussen äußere Einflüsse wie der pH-Wert die hydrolytische Zersetzung der Gelatine.¹⁵⁷ Zusätzlich spielt die Zeit, die das System den jeweiligen Bedingungen ausgesetzt ist, für die Freisetzung eine wichtige Rolle. Da die Kapselhülle aus mineralisierter Gelatine zusammengesetzt ist, müssen darüber hinaus Wechselwirkungen zwischen Gelatinemolekülen und Calciumphosphat im Hinblick auf die pH-Empfindlichkeit des Systems berücksichtigt werden. Möglicherweise wird die Auflösung der Kapselwände beeinflusst durch die pH-abhängige Komplexbildung von Calcium-Ionen an Gelatine-Moleküle und die damit verbundene Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Gelatinesträngen. Der Einfluss der Komplexbildung von Calcium-Ionen auf die Bildung

von Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Polypeptid-Strängen von Gelatine wurde in der Literatur bereits beschrieben und unterstützt diese Vermutung.^{182, 183}

4.3.4 Verkapselung von Vancomycin

Nachdem Rhodamin als Modellsubstanz erfolgreich verkapselt werden konnte, sollte ein wasserlösliches Antibiotikum, Vancomycin, verkapselt werden. Vancomycin wird medizinisch zur Behandlung von multiresistenten Bakterien, die insbesondere nach Knochenoperationen schwere Infektionen auslösen können, eingesetzt. In diesen Fällen ist eine reine intravenöse Verabreichung nicht ausreichend, weshalb Vancomycin enthaltende Knochentransplantate eingesetzt werden, die dieses Antibiotikum über längere Zeit freisetzen.¹⁸⁴ In **Abbildung 44** ist die Strukturformel von Vancomycin, das zur Wirkstoffgruppe der Glykopeptid-Antibiotika gehört, gezeigt.

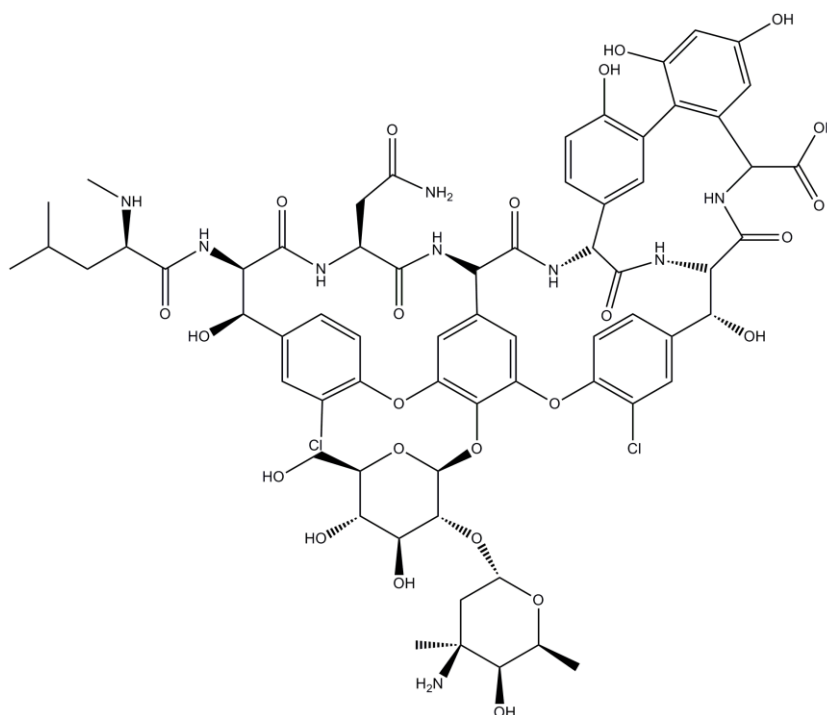


Abbildung 44: Strukturformel des als Antibiotikum wirksamen Medikaments Vancomycin.

Die Verkapselung von Vancomycin in den Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln erfolgte analog zur Verkapselung von Rhodamin. Im Anschluss an die Verkapselung wurden die Kapseln in wässriger PVP-Lösung bei pH 7,4 redispersiert. Um die pH-abhängige Freisetzung von Vancomycin aus den Kapseln zu untersuchen, wurde ein Teil der Probe bei einem pH-Wert von 7,4 belassen und der andere Teil auf pH 2 angepasst.

Anschließend wurde der Überstand mittels HPLC untersucht. Die HPLC-Ergebnisse zeigten jedoch in beiden Fällen die gleiche Menge an freigesetztem Vancomycin. Dieses Ergebnis zeigt, dass bereits in der bei pH 7,4 redispergierten Probe das Vancomycin während des Redispergierens freigesetzt wurde.

Möglicherweise wurde in unserem Fall während der Mineralisation die Mehrzahl der Vancomycin-Moleküle in die Kapselwand aus Calciumphosphat und Gelatine eingeschlossen. Es ist aus der Literatur bereits bekannt, dass Vancomycin in die Calciumphosphat-Matrix von Calciumphosphat-Knochenzementen und Beschichtungen eingebaut wird, was für diese Annahme spricht.^{184, 185} Zudem zeigten Studien zur Freisetzung von Vancomycin aus Calciumphosphat-Zementen, dass Vancomycin leicht durch die meist poröse Polymer/Calciumphosphat-Phase zur Oberfläche diffundiert und je nach Strömungsgeschwindigkeit (welche zum Beispiel durch Rühren variiert wird) relativ schnell freigesetzt wird.¹⁸⁶ Da sich Vancomycin aus den genannten Gründen nicht zur Freisetzung aus den Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln eignet, könnte in zukünftigen Experimenten die Verkapselung und Freisetzung eines anderen Antibiotikums, wie zum Beispiel Gentamicin, getestet werden.

4.3.5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde die Synthese von Nanokapseln aus dem Biomaterial Gelatine (hergestellt aus Kollagen) und Calciumphosphat beschrieben. Hierzu wurde eine neue Methode, die Grenzflächenmineralisation in Miniemulsion angewendet, welche ein in-situ-Verfahren zur Herstellung von organisch/anorganischen Hybridkapseln darstellt. Durch die erfolgreiche Verkapselung winziger Hydroxylapatit-Kristalle, eines Fluoreszenz-farbstoffes (Rhodamin) und eines als Antibiotikum eingesetzten Medikamentes (Vancomycin) wurde das Potential für die Anwendung als multifunktionaler Nanocarrier gezeigt. Rhodamin wurde als Beispiel eines wasserlöslichen Moleküls und zur Detektion der Freisetzung verkapselt. Die winzigen verkapselten HAP-Kristalle könnten durch andere Substanzen ähnlicher Größe wie Biomakromoleküle (Enzyme, Peptide), Quantum dots oder verschiedene Kristalle ersetzt werden.

Auf Grund der intrinsischen Eigenschaften von Gelatine und Calciumphosphat können die Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln potentiell durch verschiedene äußere Reize

wie Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur, der Ionenstärke oder der Anwesenheit von Enzymen angesprochen werden. Die multifunktionellen Nanokapseln könnten daher beispielsweise als regeneratives Material in der Behandlung von Knochendefekten eingesetzt werden. In diesem Kapitel wurde beispielhaft die pH-abhängige Freisetzung von Rhodamin 6G aus den Kapseln gezeigt. Das verkapselte HAP wirkt osteokonduktiv (natürliches Knochenwachstum erleichternd) und hat sich als Dotiersubstanz in Implantaten bewährt. Medikamente wie das Antibiotikum Vancomycin könnten gleichzeitig gegen Wundinfektionen wirken. Zudem werden während des Abbaus der Kapselhülle wertvolle Proteine und Aminosäuren (aus der Gelatine) sowie Calcium-Ionen (aus Calciumphosphat) freigesetzt, welche das Wachstum neuen Knochenmaterials unterstützen könnten. Die in Gelatine vorhandenen funktionellen Gruppen sind außerdem für die kovalente Anbindung verschiedener Medikamente, DNA oder anderer Biomoleküle von großem Nutzen und könnten eine gezielte Freisetzung und sogenanntes „Targeting“ ermöglichen.

4.4 Polymer-Einzelkettenpartikel

In diesem Kapitel wird die Synthese und Charakterisierung von extrem kleinen Nanopartikeln, die aus nur einer einzigen Polymerkette bestehen, beschrieben. Die Grenzfläche zwischen wässriger und disperser Phase in Nanometer-großen Miniemulsionströpfchen sollte hier zur Separation einzelner in der dispersen Phase gelösten Polymerketten eingesetzt werden. Nach der Verdampfung der dispersen Phase sollten auf diese Weise Polymer-Einzelkettenpartikel erhalten und anschließend mit Hilfe verschiedener Analysetechniken untersucht werden. Es wird vermutet, dass sich die Materialeigenschaften (wie zum Beispiel das Schmelzverhalten) der Polymer-Einzelkettenpartikel auf Grund der fehlenden intermolekularen Wechselwirkungen bzw. Verschlaufungen der Polymerketten von denen konventioneller Polymere unterscheiden. Die hergestellten Polymer-Einzelkettenpartikel könnten deshalb zur materialwissenschaftlichen Untersuchung dieses Zusammenhangs verwendet werden. In der industriellen Anwendung könnten Polymer-Einzelkettenpartikel zu einer verbesserten Prozessierbarkeit von Polymeren führen, deren auf konventionelle Weise hergestellte Schmelzen hochviskos sind.

4.4.1 Herstellung von Einzelkettenpartikeln

Ziel dieses Themenkomplexes ist es, Nanopartikel herzustellen, die aus einer geringen, genau definierten Anzahl Polymerketten oder nur einer einzigen Polymerkette bestehen. Die Anzahl der Polymerketten pro Partikel soll dabei soweit minimiert werden, bis Polymer-Einzelkettenpartikel, welche aus genau einer Polymerkette bestehen, vorliegen. Die erhaltenen wässrigen Polymerdispersionen sollen anschließend unter anderem durch DLS und TEM charakterisiert sowie das rheologische Verhalten von Schmelzen der Polymerpartikel untersucht werden.

Ein erster Ansatz, Einzelmolekülpartikel zu synthetisieren, bestand darin, eine wässrige Miniemulsion herzustellen, deren disperse Phase aus einer hochverdünnten Polymerlösung besteht. Die Verdünnung sollte dabei so groß sein, dass im Durchschnitt weniger als eine Polymerkette pro Tröpfchen vorliegt. Indem das Lösungsmittel anschließend verdampft wird, entstehen im Idealfall kompakte Partikel, die jeweils genau eine Polymerkette enthalten. Reine Lösungsmitteltröpfchen verschwinden

hierbei. In **Abbildung 45** ist die Herstellung von Einzelkettenpartikeln über den kombinierten Miniemulsions-Verdampfungsprozess schematisch gezeigt.

Die benötigte PS-Konzentration der dispersen Phase kann ungefähr abgeschätzt werden, indem zunächst über das Volumen der Miniemulsionströpfchen bei gegebenem Tropfendurchmesser (ca. 100 nm) die Anzahl der Tropfen in einer Miniemulsion berechnet wird. Unter der Annahme, dass genau gleich viele Tropfen wie Polymerketten in der Miniemulsion vorliegen sollen, kann dann das Gewicht der entsprechenden Polymerkettenzahl und damit die maximale Polymerkonzentration in der dispersen Phase bestimmt werden. Die hier beschriebene Rechnung wurde als erste Näherung verwendet, um die Größenordnung der in der Einzelkettensynthese einzusetzenden PS-Konzentration zu bestimmen. Anschließend wurde versucht, über die Miniemulsions-Verdampfungs-methode, unter Verwendung der zuvor abgeschätzten Polymerkonzentrationen, Einzelkettenpartikel herzustellen.

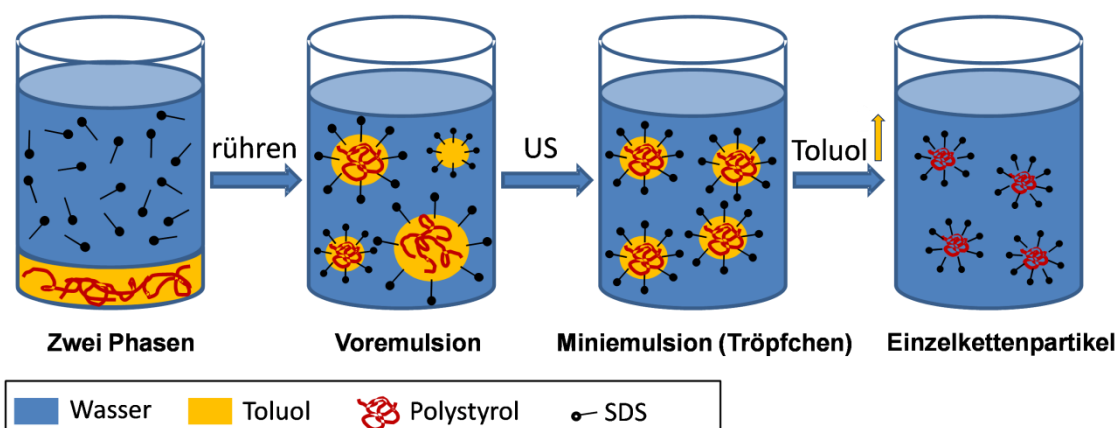


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Synthese von Einzelkettenpartikeln über den kombinierten Miniemulsions-/Verdampfungsprozess.

Parallel zur Miniemulsions-Verdampfungs-methode wurde versucht, über eine alternative Methode, die Miniemulsions-Diffusionsmethode, Einzelkettenpartikel herzustellen. In dieser Methode wird nach der Herstellung der Miniemulsion das Lösungsmittel nicht durch Verdampfung aus der dispersen Phase entfernt, sondern durch Zugabe großer Mengen an kontinuierlicher Phase, sodass das in der dispersen Phase vorliegende Lösungsmittel vollständig in der kontinuierlichen Phase löslich ist und durch Diffusion in diese übergeht. TEM-Aufnahmen zeigen, dass es auf diese Weise möglich ist, Nanopartikel mit einem Durchmesser von weniger als 50 nm herzustellen. Allerdings waren die auf diese Weise erhaltenen Dispersionen nach der

Herstellung so stark verdünnt, dass eine Messung der Partikelgröße mittels DLS nicht mehr möglich war, weshalb diese Methode nicht weiterverfolgt wurde (siehe Anhang).

Außerdem wurde versucht, über den Ouzo-Effekt Einzelkettenpartikel herzustellen. Auch in diesem Fall war es möglich, kleine Polymernanopartikel mit einem Durchmesser von unter 50 nm herzustellen. Unter den gewählten Bedingungen konnten jedoch keine Partikel mit einer Größe im Einzelketten-Bereich (ca. 7-10 nm) erhalten werden (siehe Anhang).

Da sich die beiden zuletzt genannten Methoden im Gegensatz zur Miniemulsions-Verdampfungsmethode in der Herstellung von Einzelkettenpartikeln als nicht erfolgversprechend erwiesen haben, wurde in den folgenden Experimenten die Miniemulsionsverdampfungsmethode verwendet, um Einzelkettenpartikel herzustellen. Zur Herstellung von Miniemulsionen ist es nötig, den Prozess der Ostwaldreifung zu unterdrücken, um stabile Tröpfchen zu erhalten. Normalerweise wird zu diesem Zweck ein Ultrahydrophob eingesetzt, das als osmotisches Reagenz gegen die Ostwaldreifung wirkt. Bei der Herstellung der Einzelkettenpartikel konnte kein zusätzliches Hydrophob eingesetzt werden, da dessen Entfernung nach der Synthese problematisch ist und die Materialeigenschaften der erhaltenen Einzelkettenpartikel stark beeinflussen würde. In der Miniemulsions-Verdampfungsmethode sind üblicherweise die in der dispersen Phase gelösten Polymerketten für die Stabilität der Miniemulsionen verantwortlich. Da im Fall der Einzelkettensynthese die verwendete Polymerkonzentration jedoch stark verringert wurde (Anwesenheit von reinen Lösungsmitteltröpfchen), musste versucht werden, die kolloidale Stabilität der Miniemulsionen auf andere Weise zu erhalten.

Aus diesem Grund wurde der Miniemulsions-Verdampfungsprozess hier optimiert und entsprechend den Anforderungen modifiziert. Hierfür wurden unterschiedliche Lösungsmittel, Tensidkonzentrationen und Verdampfungstemperaturen getestet sowie der Einsatz eines zusätzlichen Co-Tensides versucht, was im Anhang dieser Arbeit zusammengefasst ist. Als optimale Bedingungen erwiesen sich im Vergleich zur konventionellen Miniemulsions-Verdampfungsmethode eine leicht erhöhte Tensidkonzentration sowie die Verwendung von Toluol als Lösungsmittel. Eine weitere Erhöhung der Tensidkonzentration und zusätzliches Co-Tensid führten nicht zu einer Verbesserung. Da die hergestellten Miniemulsionen trotz der optimierten Bedingungen bereits nach mehreren Minuten Anzeichen kolloidaler Instabilität zeigten (beginnendes

Aufrahmen), wurde die Verdampfungszeit stark verkürzt, indem durch starkes Rühren die Oberfläche der Dispersion vergrößert und die Temperatur erhöht wurde. Auf diese Weise konnte beobachtet werden, wie sich die milchig-trübe Miniemulsion bereits nach ca. 20 min aufklarte, was darauf hinweist, dass sich schon nach dieser Zeit die Tröpfchengröße erheblich verkleinert hat.

Unter Verwendung der zuvor berechneten Polymerkonzentration konnten auf diese Weise sehr kleine Polymernanopartikel hergestellt werden. Um eine möglichst enge Partikelgrößenverteilung zu erhalten, wurden nur Polymere mit sehr enger Molekulargewichtsverteilung, die zuvor über die anionische Polymerisation hergestellt wurden, in der Einzelkettensynthese eingesetzt. Um die Größe von Partikeln, die aus nur einer Polymerkette bestehen, abzuschätzen, wurde über die Dichte und das Molekulargewicht des verwendeten Polymers die zu erwartende Partikelgröße berechnet:

$$N = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3 \delta N_A}{M_w} \quad 4-1$$

mit r als Partikelradius, δ als Dichte von PS ($1,05 \text{ g/cm}^3$), N_A als Avogadro-Konstante und M_w als Molekulargewicht von PS.

DLS-Messungen an in Lösung kollabierten einzelnen Polymerketten haben ergeben, dass der Durchmesser der einzelnen Ketten ungefähr mit der über die konventionelle Polymerdichte berechneten Vorhersage übereinstimmt. Trotzdem sollte beachtet werden, dass es sich hierbei um eine Näherung handelt, da die exakte Dichte einzelner Polymerketten bisher nicht bekannt ist und möglicherweise geringfügig von der Dichte im Feststoff abweicht. In **Abbildung 46** ist die theoretisch berechnete Partikelgröße von Einzelkettenpartikeln, die für unterschiedliche Molekulargewichte erwartet wird, aufgetragen.

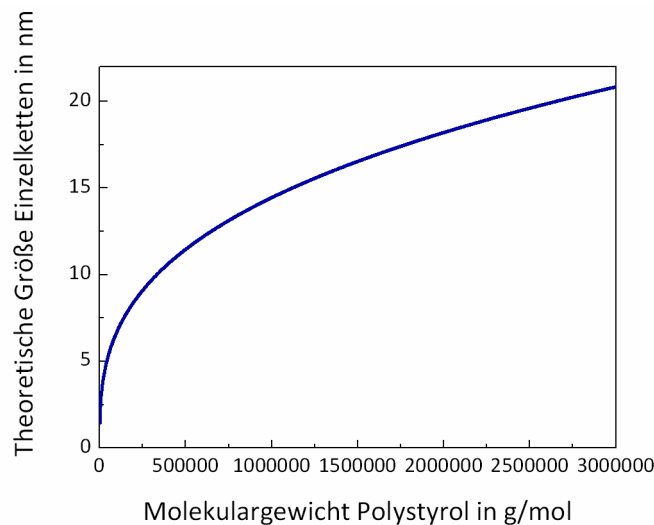


Abbildung 46: Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht von PS und der zu erwartenden Größe von Einzelkettenpartikeln.

Ein Vorteil der Miniemulsions-Verdampfungsmethode ist, dass die erhaltenen Polymerpartikel nach der Synthese dispergiert in Wasser vorliegen und daher sehr gut mittels winkelabhängiger DLS charakterisiert werden können. Anschließend können die so erhaltenen Werte mit der theoretischen Vorhersage verglichen werden, um herauszufinden, ob es sich tatsächlich um Einzelkettenpartikel handelt. Bei den sehr kleinen Einzelkettenpartikeln (ca. 10 nm Durchmesser) hat die Anwesenheit von SDS (ca. 0,8 nm Länge) auf der Partikeloberfläche einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die erhaltene Partikelgröße. Da mit Hilfe der DLS der hydrodynamische Radius der Partikel bestimmt wird, was das Tensid SDS, welches sich auf der Oberfläche der Partikel befindet mit einschließt, wurde untersucht, wie sich die Dialysezeit auf die erhaltene Partikelgröße auswirkt.

In **Abbildung 47** ist der mittels DLS bestimmte Partikeldurchmesser von „Einzelkettenpartikeln“ gegen die Dialysezeit aufgetragen. Es zeigte sich, dass die Partikelgröße mit der Dialysezeit leicht abnimmt, ab einer Dialysezeit von 5 Tagen jedoch ungefähr konstant bleibt. Die in dieser Arbeit gezeigten Partikelgrößen wurden aus diesem Grund immer nach einer Dialysezeit von ungefähr 5 Tagen gemessen. Die erhaltenen Dispersionen waren selbst nach der Entfernung von überschüssigem Tensid durch Dialyse noch ca. 2-4 Wochen kolloidal stabil.

Die Lichtstreuintensität hängt in der DLS von der Größe der gemessenen Partikel ab, weshalb in der Intensitätsverteilung der Partikelgrößen größere Partikel stärker

gewichtet werden als kleinere. Dies führt dazu, dass einzelne größere Partikel einen sehr großen Einfluss auf die erhaltene Partikelgröße ausüben. Aus diesem Grund werden für sehr kleine Partikel, wie sie zum Beispiel auch in der Mikroemulsionspolymerisation erhalten werden, die Partikelgrößen üblicherweise als Zahlenmittel angegeben.⁶⁶ Als Vergleich sind in **Abbildung 47** die Partikelgrößen sowohl als Intensitäts-, Massen-, und Zahlenverteilung angegeben.

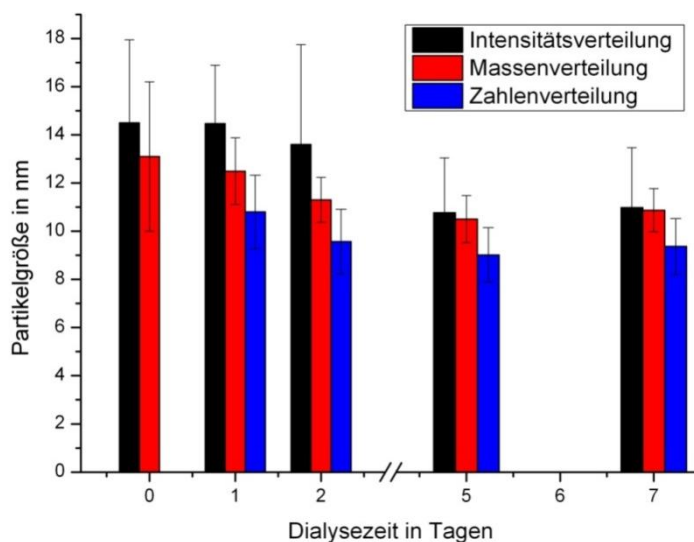


Abbildung 47: Einfluss der Dialysezeit auf die mittels DLS bestimmte Partikelgröße (Intensitäts-, Massen und Zahlenverteilung) von Einzelkettenpartikeln.

In der Zahlenverteilung der Partikelgrößen wurde stets eine monomodale Verteilung erhalten, im Folgenden werden alle Partikelgrößen aus diesem Grund und den zuvor genannten Vorteilen als Zahlenverteilung angegeben. Dies erleichtert zusätzlich den späteren Vergleich mit aus TEM-Bildern erhaltenen Partikelgrößen. Im Falle der Einzelkettenpartikel wurde in der Intensitätsverteilung und der Massenverteilung zusätzlich zu den Einzelkettenpartikeln eine zweite hier nicht dargestellte Partikelgröße erhalten, die jeweils im Bereich von ca. 100 nm (Durchmesser) liegt. Dieses zweite Signal entsprach typischerweise einem Massenanteil von ungefähr 5 Gew.-% der Gesamtmasse an Partikeln und geht möglicherweise auf Aggregate der Einzelkettenpartikel, die sich nach der Dialyse in der Dispersion gebildet haben, zurück oder ist ein Artefakt der Partikelgrößenbestimmung. Einzelne große Partikel sind vermutlich eher nicht für diese zweite Partikelgröße verantwortlich, da in den zahlreichen TEM- und REM-Untersuchungen (vgl. **Abbildung 49** und **Abbildung 50**) keine Partikel in dieser Größenordnung gefunden wurden.

4.4.2 Einfluss des Molekulargewichtes

Um den Einfluss des Molekulargewichtes der verwendeten Polymere auf die resultierenden Durchmesser der Einzelkettenpartikel zu untersuchen, wurden Einzelkettenpartikel mit unterschiedlichen Molekulargewichten hergestellt und deren Größe mit Hilfe von winkelabhängiger DLS und aus TEM-Bildern bestimmt und verglichen. In **Tabelle 6** sind die wichtigsten Eigenschaften der in der Synthese verwendeten Polymere sowie die theoretischen (D_{Theorie}) und erhaltenen Partikelgrößen (D_n) zusammengefasst. Es ist erkennbar, dass für alle Molekulargewichte sehr kleine Nanopartikel mit einem Durchmesser von zwischen 9 nm und 23 nm erhalten wurden. Die mittels DLS bestimmten Partikelgrößen nehmen dabei (bei gleicher in der Synthese eingesetzter Polymerkonzentration) mit steigendem Molekulargewicht deutlich zu. Allerdings liegen die Partikeldurchmesser geringfügig über den theoretisch berechneten Partikelgrößen von Einzelkettenpartikeln der jeweiligen Molekulargewichte. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die mittels DLS bestimmten Partikelgrößen dem hydrodynamischen Radius der Partikel entsprechen, welcher auf Grund der Anwesenheit von Tensid auf der Partikeloberfläche etwas größer ist als der reine Polymerpartikel.

Tabelle 6: Abhängigkeit der erhaltenen Partikelgröße und der pro Partikel bestimmten Anzahl an Polymerketten vom Molekulargewicht des verwendeten PS.

Probe	Molekulargewicht (M_w) in g/mol	D^a	D_{Theorie}^b in nm	D_n^c in nm	Anzahl Ketten/Partikel ^d
E01	45 000	1,02	5,2	$9,8 \pm 2,1$	6,7
E02	100 000	1,05	6,7	$9,4 \pm 2,3$	2,7
E03	170 000	1,05	8,0	$10,8 \pm 1,7$	2,4
E04	300 000	1,02	9,7	$11,0 \pm 1,7$	1,5
E05	515 000	1,07	11,6	$13,7 \pm 1,6$	1,6
E06	830 000	1,08	13,6	$14,4 \pm 2,0$	1,2
E07	1 850 000	1,05	17,8	$22,8 \pm 4,0$	2,1

a: D steht für die Polydispersität des verwendeten Polymers.

b: D_{Theorie} : theoretisch berechneter Partikeldurchmesser (siehe 4-1), der für das jeweilige Molekulargewicht erwartet wird.

c: Zahlenmittel der Partikelgröße (D_n), bestimmt mittels winkelabhängiger DLS.

d: Anzahl an Polymerketten bestimmt mit der Formel $N = \frac{4/3\pi r^3 \delta N_A}{M_w}$ mit r als Partikelradius, δ als Dichte von PS ($1,05 \text{ cm}^3/\text{g}$), N_A als Avogadro-Konstante und M_w als Molekulargewicht von PS.

Aus den erhaltenen Partikelgrößen wurde die Anzahl an Polymerketten pro Partikel berechnet (vgl. Tabelle 6). In den in **Abbildung 48** gezeigten Diagrammen ist sowohl die erhaltene Partikelgröße als auch die daraus bestimmte Anzahl an Polymerketten pro Partikel gegenüber dem in der Synthese eingesetzten Molekulargewicht aufgetragen. Mit steigendem Molekulargewicht steigt die Partikelgröße und die Anzahl an Ketten pro Partikel fällt (ab einem Molekulargewicht von 300 000 g/mol) auf einen Wert von ungefähr eins, wie es für Einzelkettenpartikel erwartet wird. In der Synthese dieser Einzelkettenpartikel (E04) enthielten bei einer Tröpfchengröße von 100 nm nach theoretischer Berechnung ungefähr 10% der Miniemulsionströpfchen genau eine Polymerkette und 90% der Tröpfchen enthielten ausschließlich Lösungsmittel. Dies ist ein Grund dafür, dass in diesem Fall im Mittel nur Einzelkettenpartikel erhalten wurden, da die statistische Wahrscheinlichkeit für ein Auftreten von zwei Ketten pro Tröpfchen damit sehr gering ist. Bei dem höchsten eingesetzten Molekulargewicht (1 800 000 g/mol) steigt die Anzahl an Polymerketten wieder leicht auf einen Wert von ca. 2 Ketten pro Partikel.

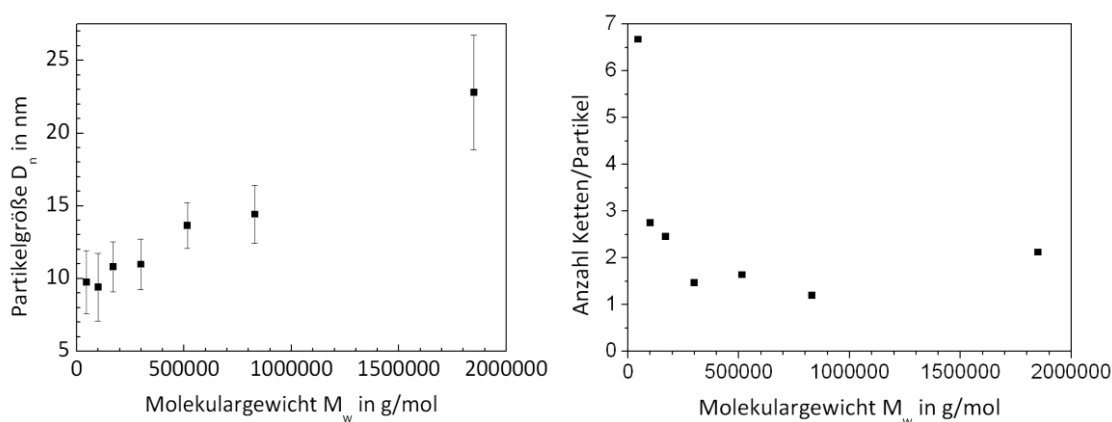


Abbildung 48: Einfluss des Molekulargewichts des verwendeten Polymers auf die Größe der erhaltenen Partikel (links) und die daraus bestimmte Menge an Polymerketten pro Partikel (rechts).

Da es sich bei den in der DLS erhaltenen Partikelgrößen um hydrodynamische Durchmesser handelt, wurden die erhaltenen Partikel zusätzlich im TEM untersucht, um deren Hartkugeldurchmesser zu bestimmen. In den **Abbildung 49** und **Abbildung 50** sind TEM-Aufnahmen von Einzelkettenpartikeln, die mit einem Molekulargewicht von 300 000 g/mol und 830 000 g/mol hergestellt wurden, gezeigt. Die hergestellten Polymerpartikel zeigen auf Grund ihrer extrem kleinen Größe im TEM nur einen sehr geringen Kontrast. Deshalb wurden die Partikel hier zur besseren Abbildbarkeit mit

Phosphorwolframsäure negativ kontrastiert. Auf diese Weise war es möglich, die sehr kleinen Partikel im TEM sichtbar zu machen.

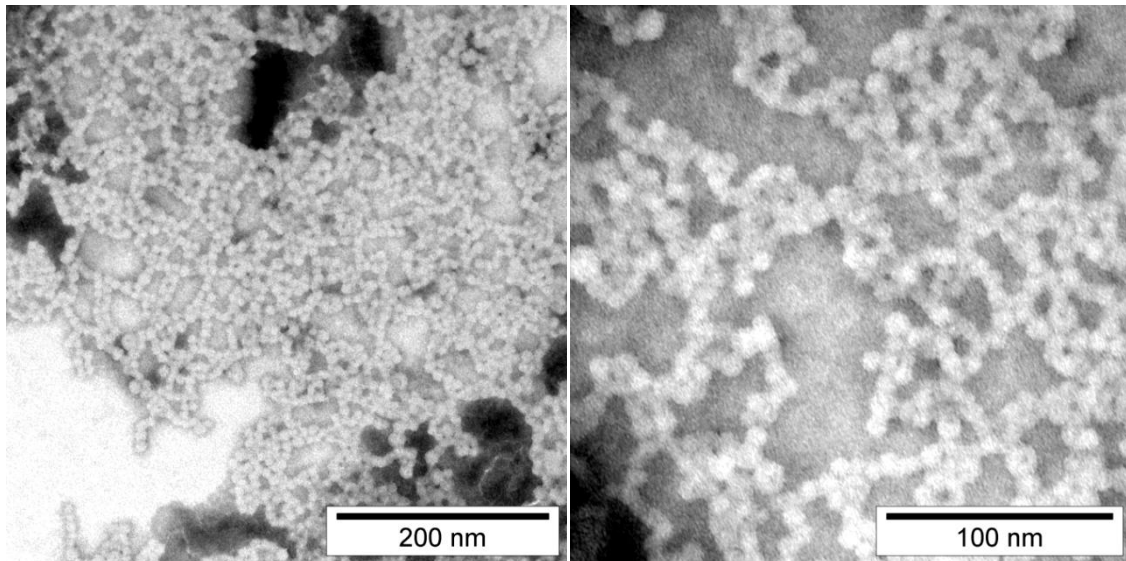


Abbildung 49: TEM-Aufnahmen von PS-Partikeln mit einem Molekulargewicht von 300 000 g/mol (E04), negativ kontrastiert mit Phosphorwolframsäure.

In Abbildung 49 ist zu sehen, dass für die mit einem Molekulargewicht von 300 000 g/mol hergestellten Einzelkettenpartikel eine sehr enge Partikelgrößenverteilung erhalten wurde.

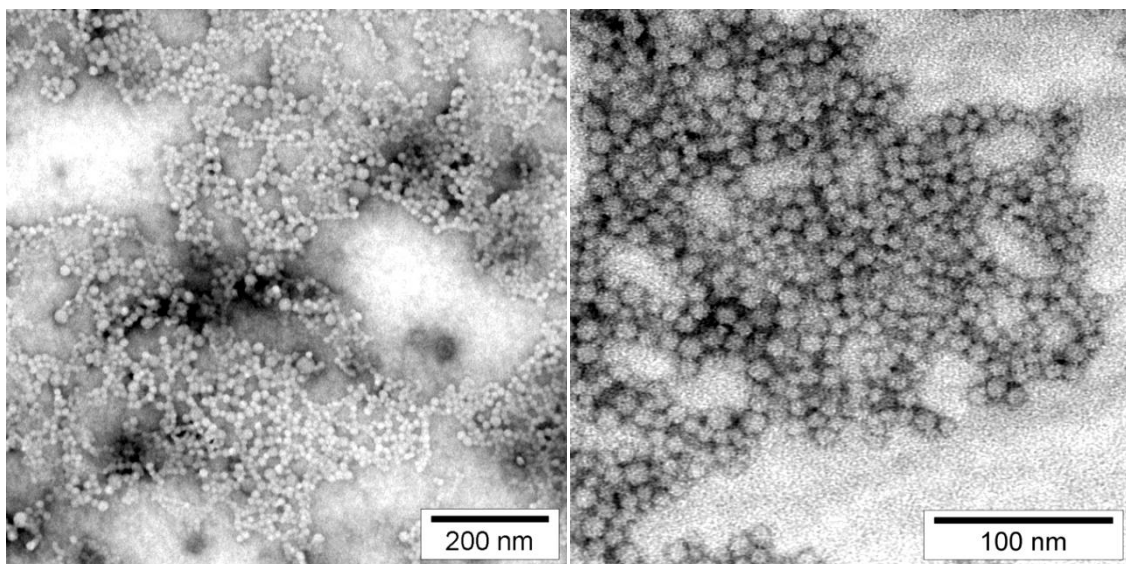


Abbildung 50: TEM-Aufnahmen von PS-Partikeln mit einem Molekulargewicht von 830 000 g/mol (E06), negativ kontrastiert mit Phosphorwolframsäure.

Die mit einem höheren Molekulargewicht (800 000 g/mol) hergestellten Partikel zeigen in den TEM-Aufnahmen (**Abbildung 50**) ebenfalls eine sehr hohe Einheitlichkeit. In

Abbildung 51 sind die aus den TEM-Aufnahmen bestimmten Partikelgrößenverteilungen dargestellt.

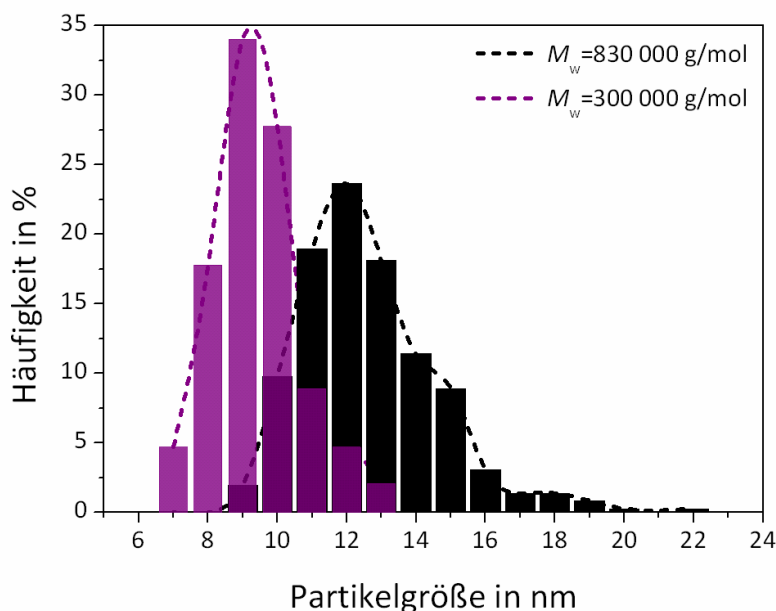


Abbildung 51: Aus TEM-Aufnahmen bestimmte (jeweils mind. 200 Partikel) Partikelgrößenstatistik (D_n , Zahlenmittel) von Einzelkettenpartikeln, die mit PS unterschiedlichen Molekulargewichts hergestellt wurden.

Die mittels DLS-Messungen und TEM-Aufnahmen erhaltenen Partikelgrößen und die daraus bestimmte Anzahl an Ketten pro Partikel sind zum Vergleich für die beiden verwendeten Molekulargewichte in **Tabelle 7** aufgelistet. Die mit Hilfe der TEM-Aufnahmen bestimmte Anzahl an Polymerketten pro Partikel liegt dabei jeweils etwas unter der mit Hilfe der DLS bestimmten Größe. Eine mögliche Fehlerquelle bei der Berechnung der Anzahl an Polymerketten pro Partikel aus dem experimentell bestimmten Partikeldurchmesser ist die Annahme, dass die Dichte der Einzelkettenpartikel mit der Dichte konventioneller Polymere übereinstimmt. Kleinere Abweichungen können zudem durch das negative Kontrastieren in der TEM-Präparation entstehen. Allerdings stimmen die erhaltenen Partikelgrößen in allen Fällen sowohl für die TEM-Auswertung als auch die Bestimmung mittels DLS gut mit den für Einzelkettenpartikel des jeweiligen Molekulargewichtes erwarteten Werten überein. Auch die Polydispersität der Partikelgröße, die aus dem Zahlen- und Gewichtsmittel der Partikelgrößen (aus TEM-Aufnahmen) berechnet wurde, entspricht der Polydispersität der verwendeten Polymere, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass annähernd ausschließlich Einzelkettenpartikel erhalten wurden.

Tabelle 7: Vergleich der mittels DLS und TEM-Auswertung erhaltenen Partikelgrößen.

Probe	M_w in g/mol	D^c	Partikelgröße D_n in nm	Anzahl Ketten/Partikel ^d	D (D_w/D_n) ^e
KS-E04	300 000	1,02	$9,4 \pm 1,2^a$	0,9	1,05
			$11,0 \pm 1,7^b$	1,5	
KS-E06	830 000	1,08	$12,6 \pm 2,0^a$	0,8	1,08
			$14,4 \pm 2,0^b$	1,2	

[a] Zahlenmittel des Partikeldurchmessers mittels TEM-Aufnahmen bestimmt (Fehler entspricht der Standardabweichung der einzelnen Partikelgrößen).

[b] Zahlenmittel des Partikeldurchmessers mittels DLS bestimmt (Fehler entspricht der Standardabweichung).

[c] Polydispersität des verwendeten Polymers.

[d] Anzahl an Polymerketten bestimmt mit der Formel $N = \frac{4/3\pi r^3 \delta N_A}{M_w}$ mit r als Partikelradius, δ als Dichte von PS ($1,05 \text{ cm}^3/\text{g}$), N_A als Avogadro-Konstante und M_w als Molekulargewicht von PS.

[e] Polydispersität der Partikelgrößen (D) berechnet aus dem Zahlenmittel der Partikelgröße (D_n aus TEM-Aufnahmen, $D_n = \sum \frac{D_i}{n}$) und dem Gewichtsmittel der Partikelgröße (D_w , $D_w = \frac{\sum D_i^4}{\sum D_i^3}$).

4.4.3 Einfluss der Polymerkonzentration

Um nachzuweisen, dass die Mehrzahl der Polymerpartikel tatsächlich aus nur einer Polymerkette besteht, ist es nötig, kleinste Variationen der Partikelgröße (im Nanometer- bis Angström-Bereich) zu messen. Insbesondere für relativ niedrige Molekulargewichte ist der Unterschied in der Partikelgröße zwischen einem Polymerpartikel aus einer Kette und einem Partikel, der aus zwei Polymerketten besteht, sehr gering. Die theoretische Größe eines Polystyrolpartikels mit einem Molekulargewicht von 100 000 g/mol, der aus einer Kette besteht, beträgt zum Beispiel 6,8 nm, eines Partikels aus zwei Polymerketten 8,6 nm, eines Partikels aus drei Polymerketten 9,8 nm und eines Partikels aus vier Polymerketten 10,8 nm. Es wurde versucht, die Anzahl an Polymerketten pro Partikel von einer Kette pro Partikel bis zu mehreren Ketten gezielt zu steigern, indem die in der Synthese eingesetzte Menge an Polymerketten langsam gesteigert wurde. In der dynamischen Lichtstreuung war es jedoch schwierig, diese sehr geringe Variation der Partikelgröße zu detektieren, da der Größenunterschied im Bereich des statistischen Fehlers der Messung liegt. Ein weiterer Grund für die erwähnten Schwierigkeiten ist wahrscheinlich die breiter werdende Partikelgrößenverteilung, die für die steigende Menge an Polymerketten erwartet wird.

In **Tabelle 8** sind die erhaltenen Partikelgrößen und die daraus berechnete Anzahl an Polymerketten pro Partikel für die unterschiedlichen, in der Synthese eingesetzten, Polymermengen zusammengefasst. Es ist erkennbar, dass sich die Partikelgröße bis zu einer Polymermenge von 2 mg kaum ändert. Bei 5 mg eingesetzter Polymermenge konnten die in der DLS erhaltenen Ergebnisse nicht ausgewertet werden, möglicherweise ist hier die Partikelgrößenverteilung für eine zuverlässige und bei allen gemessenen Winkeln reproduzierbare Berechnung der Partikelgröße zu breit. Für die deutlich größeren Polymermengen, die zum Vergleich mit den Einzelkettenpartikeln in der Partikelsynthese eingesetzt wurden, wurden Partikelgrößen zwischen 20 und 27 nm erhalten. Interessanterweise stimmen diese beiden Werte sehr gut mit den theoretisch berechneten Partikelgrößen überein, die bei der eingesetzten Polymermenge (50 bzw. 100 mg PS), dem verwendeten Molekulargewicht (100 000 g/mol) und einer Tröpfchengröße von 100 nm (5 ml Gesamtvolumen der Tröpfchen) erwartet werden (21 nm für E12 und 27 nm für E13).

Tabelle 8: Einfluss der in der Synthese eingesetzten PS-Konzentration auf die erhaltene Partikelgröße und Anzahl an Polymerketten pro Partikel.

Probe	Menge PS in mg	Partikelgröße D_n^a in nm	Anzahl Ketten/Partikel ^b
E08	0,2	7,5 ± 0,6	1,4
E02	0,5	9,4 ± 1,2	2,7
E09	1	9,8 ± 3,2	3,1
E10	2	12,0 ± 2,7	5,7
E11	5	-	-
E12	50	20,4 ± 7,5	28,0
E13	100	27,2 ± 9,4	66,4

[a] Zahlenmittel des Partikeldurchmessers mittels DLS bestimmt (Fehler entspricht der Standardabweichung).

[b] Anzahl an Polymerketten bestimmt mit der Formel $N = \frac{4/3\pi r^3 \delta N_A}{M_w}$ mit r als Partikelradius, δ als Dichte von PS (1,05 cm³/g), N_A als Avogadro-Konstante und M_w als Molekulargewicht von PS.

4.4.4 Fluoreszenzanisotropie-Untersuchung

Aus den im vorigen Kapitel genannten Gründen wurden von Dr. A. T. zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie-Messungen durchgeführt, um die Anzahl an Polymerketten pro Partikel quantifizieren zu können. Diese Technik nutzt die Abhängigkeit der

Fluoreszenzanisotropie von der Bewegung eines Fluorophors (zum Beispiel eines Polymer-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes) in einem bestimmten Medium. Die Rotationsdiffusion des Fluorophors führt zu einer Änderung der Richtung des Übergangsdipolmoments, was zur Depolarisation der Emission führt. Durch die Messung der Fluoreszenzanisotropie (Ausmaß der Emissionspolarisation) wird die durchschnittliche winkelförmige Auslenkung des Fluorophores (und damit des fluoreszenzmarkierten Partikels) zwischen der Absorption und Emission eines Photons bestimmt. Da diese Auslenkung von der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Rotationsdiffusion während der Lebenszeit des angeregten Zustandes des Fluorophors abhängt, ermöglicht dies die Bestimmung von Rotationskonstanten. Experimentell können daher mit Hilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie Informationen über die Geschwindigkeit und Art der Rotation einer Substanz erhalten werden.¹⁸⁷

Um die Rotationsdiffusion eines bestimmten Fluoreszenz-markierten Makromoleküls zu beobachten, muss dessen Rotationsdiffusionszeit mit der Lebenszeit des eingesetzten Fluorophors vergleichbar sein (typischerweise im Bereich von <100 ns). Angewendet wird diese Methode deshalb vor allem in der Biochemie, wo die Rotationsdiffusion von Proteinen und anderen Biomolekülen beobachtet wird, um zum Beispiel deren Dynamik oder die Anbindung kleiner Moleküle an die Proteine zu untersuchen. Dies ist möglich, da bereits sehr kleine Änderungen der Molekularmasse und der Größe von Proteinen in hochverdünnter Lösung mit dieser Methode detektiert werden können.¹⁸⁷ Ähnlich wie die in dieser Arbeit hergestellten Partikel besitzen Proteine eine Größe von nur wenigen Nanometern und die sphärische Form der Partikel erleichtert die anschließende Partikelgrößenbestimmung zusätzlich, wie in der Literatur bereits für extrem kleine Silikapartikel gezeigt wurde.¹⁸⁸ Aus diesem Grund wurden hier Fluoreszenzanisotropiemessungen zur exakten Bestimmung der Größe der Einzelkettenpartikel angewandt.

Wird ein Fluoreszenzfarbstoff kovalent an die zu untersuchenden Partikel angebunden, so hängt die Rotation des gebundenen Farbstoffmoleküls von der Größe und dem Gewicht des Partikels sowie der Viskosität der Dispersion ab. Aus der mit Hilfe des zeitlichen Verlaufes der Fluoreszenzanisotropie bestimmten Rotationskorrelationszeit des Farbstoffes kann anschließend die Partikelgröße berechnet werden (siehe Formel 4-2). Um die genaue Größe der Einzelkettenpartikel mit Hilfe der

zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie zu bestimmen, wurde deshalb Polystyrol mit einem fluoreszierenden Molekül (Anthracen bzw. Phenanthren) markiert. Die Markierung erfolgte, indem die lebende Polystyrolkette in einer anionischen Polymerisation entweder mit 9-Vinylnanthracen oder mit 9-Vinylphenanthren abgebrochen wurde (Synthesen durchgeführt von Thomas Wagner). Anschließend wurden aus dem Fluoreszenz-markierten Polystyrol (Molekulargewicht ca. 100 000 g/mol) mit Hilfe der Miniemulsions/Verdampfungstechnik Polymerpartikel unterschiedlicher Größe hergestellt.

Anschließend wurden die Abklingfunktionen der Fluoreszenz der Einzelmolekülpartikel (ca. 10 nm Durchmesser) aufgenommen (**Abbildung 52**). Als Vergleich wurde Anthracen-markiertes PS in einer Toluol-Lösung (freie Rotation des Fluorophores) und in einer Dispersion größerer Nanopartikel (Durchmesser ca. 30 nm), in denen die Rotation des Fluorophors vollständig gehindert ist, gemessen (siehe **Abbildung 52**). Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie der Lösung liegt konstant bei null, was auf die sehr schnelle Rotation des frei rotierenden Fluorophores zurückzuführen ist, wodurch die gemittelte Anisotropie bei null liegt. Die Fluoreszenzanisotropie der größeren Partikel liegt hingegen bei einem konstanten Wert von ca. 0,15, die Rotation des an die großen Partikel gebundenen Farbstoffes ist zu langsam, um während der Lebensdauer des Farbstoffes zu einer messbaren Fluoreszenzdepolarisation zu führen (gehinderte Rotation). Für die Einzelkettenpartikel ist ein exponentieller Abfall der Anisotropie erkennbar (teilweise gehinderte Rotation), was die Berechnung der damit verbundenen Rotationskorrelationszeit ermöglicht.

Sowohl in Lösung als auch in den größeren Nanopartikeln wurde eine monoexponentielle Abklingfunktion der Fluoreszenz gefunden, wohingegen im Fall der Einzelkettenpartikel ein biexponentieller Verlauf gefunden wurde, wie in **Abbildung 52 (links)** deutlich zu erkennen ist.

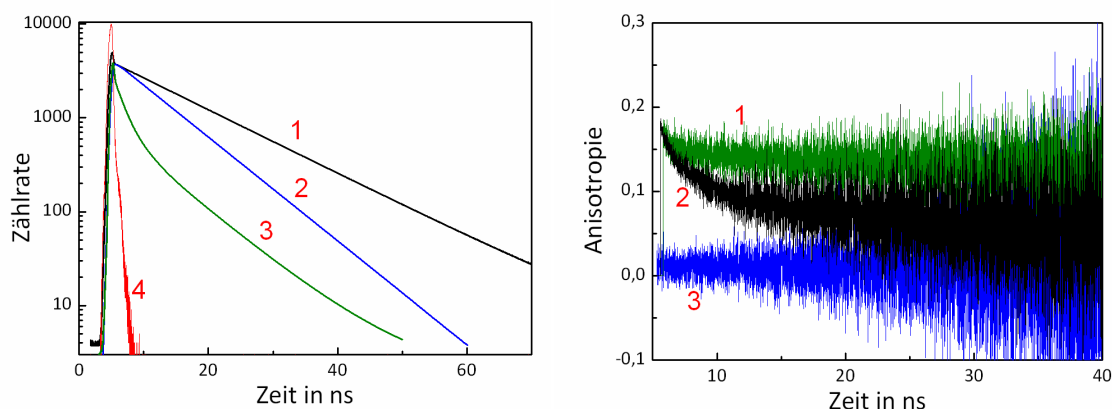


Abbildung 52: Abklingfunktion der Fluoreszenz (links) und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzanisotropie von Anthracen-markiertem Polystyrol (rechts), als Vergleich: 1) große Nanopartikel (ca. 30 nm Durchmesser) (im Feststoff); 2) Lösung in Toluol (im flüssigen Medium); 3) Einzelkettenpartikel (ca. 10 nm Durchmesser); 4) Antwortfunktion des Gerätes (Streuanteil).

Für sphärische Partikel wird ein monoexponentieller Verlauf der Anisotropie mit einer einzigen Rotationskorrelationszeit (Rotation des partikelgebundenen Fluorophors) erwartet. Da für die fluoreszenzmarkierten Einzelkettenpartikel ein biexponentieller Verlauf gefunden wurde, wurde hier zur Berechnung der Anisotropie ein biexponentielles Modell verwendet (siehe Formel 4-2). Aus der angepassten biexponentiellen Funktion wurden auf diese Weise die Fluoreszenzkorrelationszeiten θ_1 und θ_2 berechnet, wobei θ_1 im Bereich von ca. 2 ns und θ_2 je nach in der Synthese eingesetzter Polymermenge im Bereich zwischen 35 und 110 ns liegt. Die zweite Korrelationszeit θ_2 kann der Rotationsdiffusion der markierten Polymerpartikel zugeordnet werden. Die Ursache der ersten Korrelationszeit konnte nicht abschließend geklärt werden, möglicherweise handelt es sich hier um die Rotation der markierten Polymerkettenenden in Bereichen an der Partikeloberfläche, in denen deren Beweglichkeit im Vergleich zum kompakten Partikelinneren stark erhöht ist.

Da die Fluoreszenzlebenszeit von Anthracen mit ca. 10 ns relativ niedrig ist, um die Korrelationszeiten der Einzelkettenpartikel (ca. 40 ns) zu berechnen, wurde in den folgenden Experimenten das Anthracen-markierte PS durch Phenanthren-markiertes PS (ca. 40 ns Lebenszeit) ersetzt. Um den Einfluss der Polystyrolkonzentration auf die Größe der erhaltenen Partikel zu untersuchen, wurden in der Partikelsynthese unterschiedlichen Mengen an Phenanthren-markiertem PS (0,75 bis 10 mg) eingesetzt und deren zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie gemessen. Die mit Hilfe des einfachen biexponentiellen Modells ($\beta=0$) berechneten Korrelationszeiten (θ_2) sind in **Abbildung**

53 gezeigt (ausgefüllte Kreise). Es ist erkennbar, dass bis zu einer Polymermenge von 2 mg Korrelationszeiten von 33 bis 37 ns und ab einer Polymermenge von 3 mg sehr viel höhere Korrelationszeiten von 94 bis 110 ns erhalten wurden.

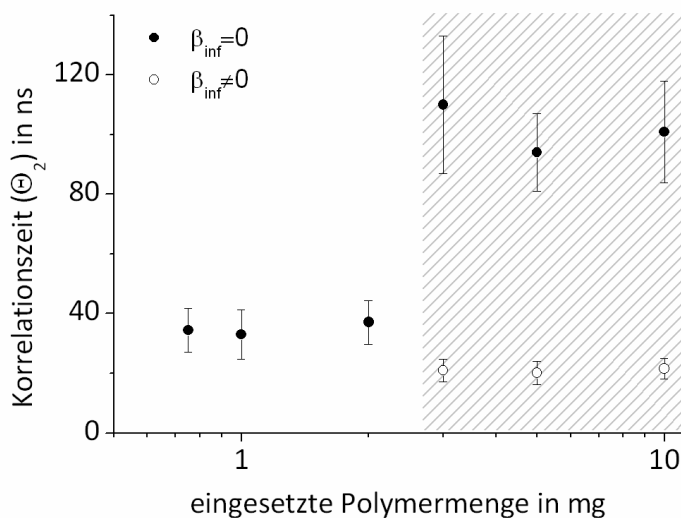


Abbildung 53: Abhängigkeit der Rotationskorrelationszeit (Θ_2) Phenanthren-markierter Polymerpartikel von der in der Partikelsynthese eingesetzten Polymermenge.

Außerdem zeigte sich, dass der zeitliche Verlauf der Anisotropie bis zu einer Polymermenge von 2 mg sehr gut durch das einfache biexponentielle Modell ($\beta=0$) angepasst werden kann. Wie anhand der Autokorrelationsfunktionen zu erkennen ist, ist dieses Modell ab einer Polymermenge von 3 mg jedoch nicht mehr gut geeignet (siehe **Abbildung 54**). Indem ein zusätzlicher Faktor zur Subtraktion des „Hintergrundes“ in die Fitfunktion eingeführt wurde ($\beta_{inf}\neq 0$) war es möglich, den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzanisotropie besser anzupassen, wie die Korrelationsfunktion in **Abbildung 54** zeigt. Allerdings scheint dieses angepasste Modell das System (ab 3 mg) ebenfalls nicht passend zu beschreiben, wie die sehr kleinen Korrelationszeiten ab 3 mg in **Abbildung 53** zeigen. Möglicherweise müsste das System, sobald zusätzlich zu Einzelkettenpartikeln Partikel mit mehreren Polymerketten vorliegen, mit einem viel komplizierteren Modell beschrieben werden, da sich die Partikelgrößenverteilung ab diesem Wert (3 mg eingesetzte Polymermenge) stark verbreitert.

Als Fitfunktion wurde zur Anpassung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzanisotropie folgende Funktion verwendet:

$$r(t) = \beta_{inf} + \sum_{i=1}^n \beta_i e^{-\frac{t}{\theta_i}} \quad 4-2$$

mit $r(t)$ als zeitlichem Verlauf der Fluoreszenzanisotropie, $\theta_j = (6R_j)^{-1}$ als individuelle Rotationsrelaxationszeiten, R_j als Rotationsgeschwindigkeit, β_j als Vorfaktoren, die den Anteil der jeweiligen Rotationskomponente an der Fluoreszenzdepolarisation beschreiben und β_{inf} als „Hintergrund“.

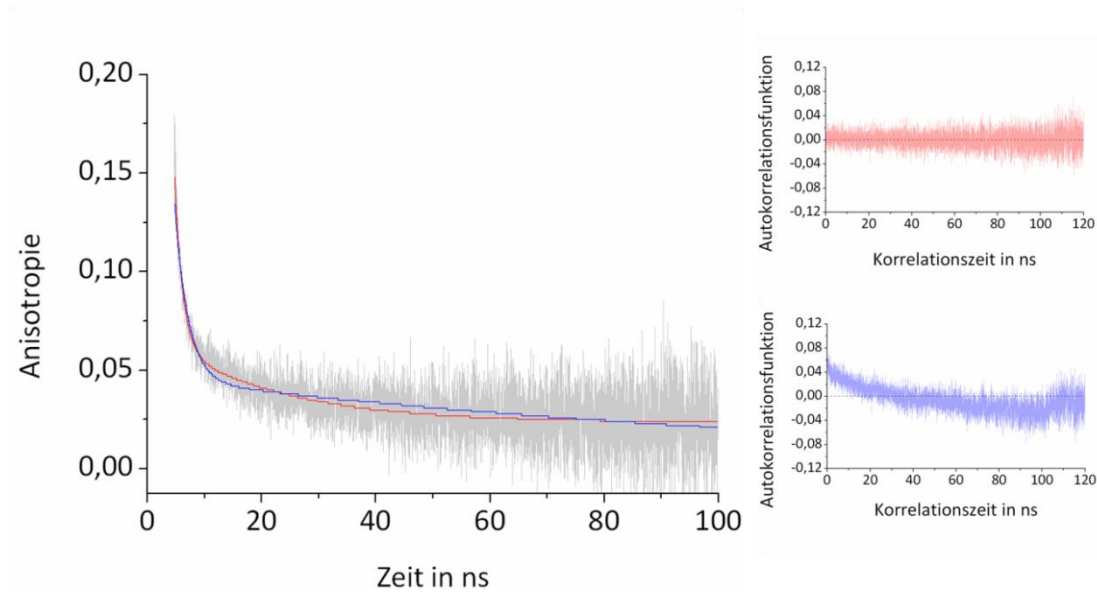


Abbildung 54: Links: Experimenteller Verlauf der zeitlichen Anisotropie (mit 3 mg eingesetzter Polymermenge) in grau; mit biexponentiellem Modell ($\beta_{inf}=0$) angepasster Verlauf (in blau) und mit biexponentiellem Modell und zusätzlichem Abzug des „Hintergrundes“ ($\beta_{inf} \neq 0$) angepasster Verlauf (in rot); rechts: Autokorrelationsfunktionen des angepassten Verlaufes für die beiden verwendeten Modelle (in hellblau für biexponentielles Modell und in hellrot für biexponentielles Modell minus „Hintergrund“).

Mit Hilfe der gefundenen Rotationskorrelationszeiten des Fluorophores (θ_2), die mit dem Rotationsdiffusionskoeffizienten (D_r) über $\theta = (6D_r)^{-1}$ verbunden sind, wurde jeweils der Radius (R) der rotierenden Einheit bestimmt:¹⁸⁹

$$R = \sqrt[3]{\frac{3k_B T \theta}{4\pi\eta}} \quad 4-3$$

mit η als Viskosität, T als Temperatur in Kelvin und k_B als Boltzmannkonstante.

Die für die unterschiedlichen Polymermengen erhaltenen Korrelationszeiten und die daraus bestimmten Partikelgrößen sind in **Tabelle 9** zusammengefasst. Bis zu einer Polymermenge von 2 mg wurden Partikelgrößen erhalten, die mit dem theoretisch für eine Polymerkette pro Partikel erwarteten Wert sehr gut übereinstimmen. Dies zeigt, dass wahrscheinlich bis zu einer in der Synthese eingesetzten Polymermenge von 2 mg annähernd ausschließlich Einzelkettenpartikel erhalten wurden. Ab einer Polymermenge von 3 mg betrug die erhaltene Anzahl an Polymerketten zwischen 2,2 und 2,5 Ketten pro Partikel, wobei wie oben beschrieben die Partikelgrößenbestimmung hier nur noch bedingt möglich war. Bei einer Tröpfchengröße von 100 nm würde das bedeuten, dass annähernd solange Einzelkettenpartikel erhalten wurden, bis die Zahl der Polymerketten die Zahl der Tröpfchen in der Miniemulsion erreicht hat. Die Ergebnisse, die mittels der Fluoreszenzanisotropie-Messungen erhalten wurden, weisen daher darauf hin, dass sogar bis zu einer Polymerkonzentration, die der Anzahl Tröpfchen entspricht, Einzelkettenpartikel mit hoher Einheitlichkeit erhalten werden können und somit die verwendete Miniemulsions-Verdampfungsmethode bei der Herstellung von Einzelkettenpartikeln sehr effektiv ist.

Tabelle 9: Aus dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzanisotropie von Phenanthren-markierten Partikeln bestimmte Werte.

Probe	Polymermenge ^a in mg	Θ_2 ^b in ns	D ^c in nm	Anzahl Polymerketten pro Partikel ^c
E14	0,75	35 ± 7	6,4	0,8
E15	1	33 ± 8	6,3	0,8
E16	2	37 ± 7	6,6	0,9
E17	3	110 ± 23	9,5	2,5
E18	5	94 ± 13	9,0	2,2
E19	10	101 ± 17	9,2	2,3

[a]: Menge an in der Synthese eingesetztem Phenanthren-markierten PS mit $M_w=111\,000$ g/mol.

[b]: Rotationskorrelationszeiten (Θ_2) berechnet mit biexponentiellem Modell ($\beta_{inf}=0$), siehe Formel 4-2.

[c]: Partikeldurchmesser D berechnet aus der Rotationskorrelationszeit (Θ_2) mit Formel 4-3.

[d] Anzahl an Polymerketten bestimmt mit der Formel $N = \frac{4/3\pi r^3 \delta N_A}{M_w}$ mit r als Partikelradius, δ als Dichte von PS ($1,05\text{ cm}^3/\text{g}$), N_A als Avogadro-Konstante und M_w als Molekulargewicht von PS.

4.4.5 Upscale der Synthese

Um größere Mengen der Einzelkettenpartikel herzustellen, wurde die mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropie-Messungen herausgefundene maximal einsetzbare Polymerkonzentration verwendet und größere Mengen der entsprechenden Miniemulsionen hergestellt. Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen wurde eine größere Menge Einzelkettenpartikel über die Miniemulsions-Verdampfungsmethode hergestellt, indem viele einzelne Miniemulsionen (mit Einzelkettenpartikeln), die mit Hilfe eines Ultraschallstabes (US) hergestellt wurden, nach der Synthese vereinigt wurden. Zum anderen wurde ein Hochdruckhomogenisator (HDH), als eine sogenannte kontinuierliche Homogenisierungsmethode, zur Herstellung der Miniemulsionen verwendet. In diesem Fall konnten in einem Syntheseschritt bis zu einem Liter einer Einzelkettendispersion hergestellt werden (im Gegensatz zu 30 ml im Fall der Ultraschall-Homogenisierung). Mit beiden Methoden war es möglich, größere Mengen von Einzelkettenpartikeln (50-100 mg) herzustellen.

Zur Entfernung des Tensides wurden die Dispersionen zunächst mit einer Schlauchmembran für ca. 4 Wochen dialysiert. Indem diese Methode durch eine Durchflusszelle ersetzt wurde, konnte die Dialysezeit auf 2 Wochen reduziert werden. Nach der Gefriertrocknung der aufgereinigten Dispersionen wurde ein weißes Pulver erhalten, das im nächsten Schritt die Untersuchung von Materialeigenschaften wie zum Beispiel des Schmelzverhaltens der Einzelkettenpartikel ermöglicht. In **Tabelle 10** sind die Eigenschaften der in größeren Mengen hergestellten Einzelkettenpartikel zusammengefasst. Um den Einfluss des Glaspunktes und des Molekulargewichtes des Polymers auf das Schmelzen der Einzelkettenpartikel zu untersuchen, wurden sowohl Partikel aus Polystyrol ($T_g=100\text{ °C}$) und Poly(ethylmethacrylat) (PEMA, $T_g=66\text{ °C}$) als Polymer als auch Partikel mit unterschiedlichen Molekulargewichten in größerer Menge hergestellt.

Tabelle 10: Eigenschaften der in der Synthese größerer Mengen von Einzelkettenpartikeln eingesetzten Polymere, verwendete Methoden, sowie charakteristische Daten der erhaltenen Partikel.

Polymer	M_w (in g/mol)	Methode	Anzahl/Vol. der Ansätze	Ausbeute (in mg/%)	D_n^a in nm	Anzahl Ketten/ Partikel
PS	330 000	HDH	2x840 ml	73/65	$15,6 \pm 3,9$	3,8
PS	830 000	US	48x30 ml	66/69	$18,7 \pm 5,4$	2,6
PEMA	142 000	US	48x30 ml	48/50	$11,4 \pm 1,0$	3,7

[a] Zahlenmittel des Partikeldurchmessers mittels winkellabhängiger Lichtstreuung bestimmt.

[b]: Durchschnittliche Anzahl Polymerketten pro Partikel bestimmt mit $N = \frac{4/3\pi r^3 \delta N_A}{M_w}$ mit r als Partikelradius, N_A als Avogadro-Konstante und M_w als Molekulargewicht des Polymers, δ als Dichte von PS ($1,05 \text{ cm}^3/\text{g}$) und von PEMA ($\delta=1,12 \text{ cm}^3/\text{g}$).

4.4.6 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde gezeigt, wie die Grenzfläche von Nanometer-großen Miniemulsionströpfchen eingesetzt werden kann, um einzelne in der dispersen Phase gelöste Polymerketten, zu separieren. Nach der Verdampfung des in den Tröpfchen vorhandenen Lösungsmittels, wurden stabile Dispersionen sehr kleiner Polymer-Nanopartikel ($<10 \text{ nm}$ Durchmesser) erhalten, die aus nur wenigen oder einer einzigen Polymerkette bestehen. Die kolloidale Stabilität der Partikel nach der Synthese, gewährleistet durch die Anwesenheit von SDS in der wässrigen Phase der Dispersionen, ist vorteilhaft für die anschließende Charakterisierung der Polymer-Nanopartikel. Die Partikelgröße der Nanopartikel wurde mittels DLS und TEM bestimmt und mit Hilfe der Dichte und des Molekulargewichts der verwendeten Polymere die Anzahl an Polymerketten pro Partikel bestimmt. Wie es für Partikel, die aus nur einer Polymerkette bestehen, erwartet wird, stieg die mittels DLS bestimmte Partikelgröße mit steigendem Molekulargewicht, des in der Synthese der Partikel eingesetzten Polymers, deutlich an. Außerdem stimmten die mittels DLS- und TEM-Messungen erhaltenen Partikelgrößen bei erhöhtem Molekulargewicht ($300\,000 \text{ g/mol}$ und $830\,000 \text{ g/mol}$) sehr gut mit der für einen Einzelkettenpartikel theoretisch berechneten Größe überein. Die Quantifizierung der Kettenzahl pro Partikel mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie-Messungen ergab zudem, dass mit einem Molekulargewicht von $100\,000 \text{ g/mol}$ ebenfalls Polymer-Einzelkettenpartikel hoher Einheitlichkeit hergestellt wurden. Die Quantifizierung der Kettenzahl pro Partikel mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie-Messungen ergab zudem, dass Polymer-Einzelkettenpartikel hoher Einheitlichkeit hergestellt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist,

Polymer-Einzelkettenpartikel herzustellen, indem in der Partikelsynthese die statistische Wahrscheinlichkeit des Auftretens mehrerer Ketten pro Miniemulsionströpfchens, durch eine Verringerung der Anzahl an eingesetzten Polymerketten unter die Anzahl an Polymertröpfchen, minimiert wurde.

In Zukunft könnte die hier entwickelte Methode zur räumlichen Separation einzelner Polymerketten in Miniemulsionströpfchen zur Durchführung von Einzelmolekülreaktionen, wie der intramolekularen Ringschlussreaktion einzelner Polymerketten, angewandt werden (siehe **Abbildung 56**). Auf diese Weise könnte die intermolekulare Reaktion erfolgreich unterdrückt werden, ohne die Notwendigkeit extrem hoher Verdünnungen, wie sie üblicherweise bei intramolekularen Ringschlussreaktionen eingesetzt werden.

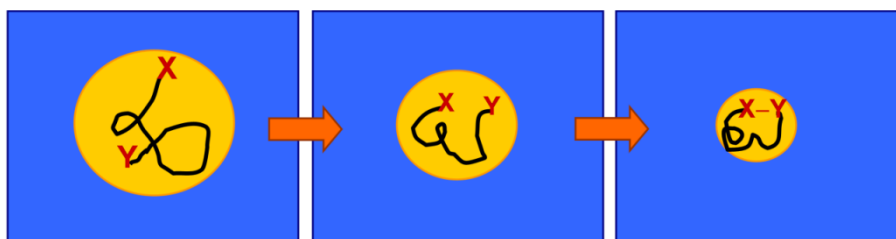


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Cyclisierung von einzelnen Polymerketten, die separiert in Miniemulsionströpfchen vorliegen. Die Tröpfchengröße verringert sich während der Lösungsmittelverdampfung und gleichzeitigen Ringschlussreaktion.

Durch die Verwendung eines Hochdruckhomogenisators zur Herstellung der Einzelkettendispersionen war es möglich, größere Mengen der Einzelkettenpartikel aus Polymeren mit unterschiedlichen Glasübergangstemperaturen und Molekulargewichten herzustellen. Die Materialeigenschaften der pulverförmigen Einzelkettenpartikel werden zurzeit näher untersucht.

5 Experimenteller Teil

5.1 Synthese von Oberflächen-funktionalisierten Polymer-Nanopartikeln

5.1.1 Materialien

Styrol (Merck) und Acrylsäure (AA) (Aldrich) wurden unter reduziertem Druck Frisch destilliert und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Vinylphosphonsäure (VPA) (Aldrich, 97%) wurde mit Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet, um den Inhibitor zu entfernen. Vinylbenzylphosphonsäure (VBPA) wurde wie in der Literatur berichtet synthetisiert.¹⁶⁰ Alle anderen Chemikalien waren kommerzielle Produkte und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet: Der hydrophobe Initiator 2,2'-azobis(2-methylbutyronitril) (V59) von Wako Chemicals, Japan; das Ultrahydrophob Hexadekan (Aldrich, 99%) und das nichtionische Tensid Lutensol AT50 (BASF), was ein Poly(ethylenoxid)-hexadecylether mit einer EO-Blocklänge von ungefähr 50 Einheiten ist. Für die Beladung der Partikel und die Titrationsexperimente wurden Calciumnitrat Tetrahydrat (Aldrich, 99%), Diammoniumhydrogenphosphat (Merck) und 28%-ige Ammoniak-Lösung (VWR) verwendet. In allen Experimenten wurde demineralisiertes Wasser eingesetzt.

5.1.2 Synthese über direkte Miniemulsionspolymerisation

Die Oberflächen-funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikel wurden über die Miniemulsionspolymerisation von Styrol mit unterschiedlichen Mengen an funktionellen Comonomeren und einem gleichbleibenden Anteil an dem nicht-ionischen Tensid Lutensol AT50 hergestellt. Die exakten Mengen an eingesetzten Substanzen sind in **Tabelle 11** zusammengefasst. Carboxylat-funktionalisierte Nanopartikel wurden durch die Copolymerisation von Styrol mit AA synthetisiert, Phosphonat-funktionalisierte Nanopartikel durch die Copolymerisation von Styrol mit entweder VPA oder VBPA. Als disperse Phase dienten die entsprechenden Mengen an Styrol,

funktionellem Comonomer, dem als Ultrahydrophob verwendeten Hexadekan und der Initiator V59. Nachdem die disperse Phase zu der kontinuierlichen Phase bestehend aus Wasser und Lutensol AT50 gegeben wurde, erfolgte durch einstündiges Rühren eine Voremulgierung. Anschließend wurde die jeweilige Miniemulsion durch eine Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W450 Digital, ½ Zoll Spitze, 120 s bei 90% Amplitude) unter Eiskühlung (um vorzeitige Polymerisation zu vermeiden) hergestellt. Die Polymerisation erfolgte daraufhin bei 72 °C in ungefähr 20 Std.

Tabelle 11: Mengen, die in der Miniemulsionspolymerisation zusätzlich zu jeweils 24 g Wasser, 100 mg V59 und 250 mg Hexadekan eingesetzt wurden.

Probe	Comonomer	Styrol	Comonomer	Lutensol AT50	SDS
		Menge in g			
A01	-	6	-	0,2	-
A02	AA	5,82	0,18	0,2	-
A03	VBPA	5,7	0,3	0,2	-
A04	VPA	5,4	0,6	0,2	-
A05	AA	5,82	0,18	-	0,25
A06	C ₁₁ -PET	5,88	0,12	-	-

Durch eine Filtration der Dispersion wurden nach der Polymerisation eventuell vorhandene Agglomerate entfernt. Außerdem wurden möglicherweise anwesende Ketten von Homopolymeren, die sich aus den funktionellen Monomeren in der Wasserphase gebildet haben könnten, entfernt, indem die erhaltenen Polymerpartikel durch wiederholte Zentrifugation und Redispergierung gereinigt wurden. Zur Herstellung kleinerer Carboxyl-funktionalisierter Partikel wurde statt Lutensol AT50 Natriumdodecylsulfat (SDS) als Tensid eingesetzt, das im Anschluss an die Synthese durch wiederholte Zentrifugation entfernt, und durch eine wässrige Lutensol AT50-Lösung ersetzt wurde. Danach wurde überschüssiges Lutensol durch erneute Aufreinigung mittels Zentrifugation und Redispergierung entfernt. Die mit Surfmmer (C₁₁-PET) als funktionellem Monomer hergestellten Partikel wurden vor der Beladung auf die gleiche Weise mit Lutensol stabilisiert.

5.2 Synthese von Polymer/Calciumphosphat-Partikeln

5.2.1 Materialien

Für die Beladung der Partikel und die Titrationsexperimente wurden Calciumnitrat Tetrahydrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), Diammoniumhydrogenphosphat $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Merck) und 28%-ige Ammoniak-Lösung (VWR) verwendet. In allen Experimenten wurde demineralisiertes Wasser eingesetzt.

5.2.2 Mineralisation von Oberflächen-funktionalisierten Partikeln

Die unterschiedlich funktionalisierten Partikel wurden jeweils mit einer konstanten Menge an Calcium- und Phosphat-Ionen beladen, wobei der pH-Wert der Dispersion während des gesamten Beladungsvorgangs konstant gehalten wurde. Der pH-Wert aller verwendeten Lösungen wurde als erstes mit 28%-iger Ammoniaklösung (aq) eingestellt. Anschließend wurden die Beladungen bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt, indem zunächst Calcium- und anschließend Phosphat-Ionen unter Rühren zur Partikeldispersion gegeben wurden. Hierbei wurden zunächst 0,5 mMol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ zu einer 0,1 g Feststoff enthaltenden Partikeldispersion zugegeben und für zwei Stunden gerührt, um die Komplexbildung der Calcium-Ionen an die Partikeloberfläche zu ermöglichen. Anschließend wurde eine wässrige Lösung von 0,3 mMol $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ während einer Stunde langsam zugetropft. Nach dem Beladungsprozess wurden die Proben ungefähr 24 Std. lang weiter gerührt. Alle Beladungen wurden mit einem konstanten Verhältnis von 5:3 bezogen auf Calcium- und Phosphat-Ionen durchgeführt, da dieses dem stöchiometrischen Verhältnis von Calcium- zu Phosphat-Ionen in HAP entspricht. Die beladenen Proben wurden vor der Charakterisierung durch Zentrifugation und Redispersierung gewaschen und gefriergetrocknet. Alle Referenz-Proben, die in Abwesenheit von Partikeln hergestellt wurden, wurden bei den jeweiligen pH-Werten unter denselben Beladungsbedingungen synthetisiert.

Die Beladung der kleinen Carboxyl-funktionalisierten Partikel, sowie der mit Surfmern funktionalisierten Partikel wurde nach der Stabilisierung mit Lutensol AT50 analog zu den zuvor beschriebenen Beladungsexperimenten durchgeführt. Die anisotropen

Partikel wurden von Christine Hermann hergestellt, indem Phosphonat-funktionalisierte Partikel (Probe A03) in einer PVA-Matrix verstreckt wurden. Die Beladung der anisotropen Partikel erfolgte analog zur Beladung der unverstreckten Phosphonat-funktionalisierten Partikel mit dem Unterschied, dass der Anteil an anorganischem Material im Vergleich zur Masse eingesetzter Polymerpartikeln bei ungefähr 7 Gew.-% lag (anstatt bei 33 % wie in den zuvor beschriebenen Beladungen).

5.2.3 Mineralisation von Substrat gebundenen Partikeln

Zunächst wurden eine Dispersion von Phosphonat-funktionalisierten Partikeln (A03, FSG = 0,1%) auf ein Titandioxid-Substrat aufgetropft. Das Substrat wurde vorsichtig mit Wasser gewaschen und auf einen Substrathalter gelegt und in eine Calciumnitratlösung gegeben. Die Calciumnitratlösung wurde zuvor hergestellt, indem 1 ml einer 0,005 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung zu 9 ml Wasser gegeben wurde. Der pH der Lösung wurde mit verdünnter wässriger Ammoniaklösung auf pH 10 angepasst. Die Lösung wurde zunächst für 2 Std. mit dem Substrat bei 37 °C gerührt, um die Bindung der Calciumionen an die Partikel zu ermöglichen. Anschließend wurde 1 ml einer 0,003 M $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ -Lösung tropfenweise in 1 h zugegeben. Die Proben wurden dann für ca. 20 Std. bei 37 °C weiter gerührt, erneut mit Wasser gewaschen und im REM untersucht.

Die mit Hilfe von Spin-Coating mit Partikeln beschichteten Substrate wurden analog mit HAP beladen, allerdings wurden die Konzentrationen der zugegebenen Lösungen verdoppelt.

5.2.4 Mineralisation von DNA-Kapseln

Die Mineralisation von Substrat gebundenen Kapseln erfolgte analog zur Beladung Substrat gebundener Partikel. Im ersten Schritt der Beladung wurde 1 ml wässrige 0,01 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung zum Substrat gegeben und 2 Std. bei 37 °C gerührt. Im zweiten Schritt der Beladung wurde 1 ml 0,006 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung während 1 Std. langsam zugetropft, anschließend wurde die Probe ca. 20 Std. bei 37 °C weiter gerührt.

In der zweiten beschriebenen Variante, wurde auf den zweiten Zugabeschritt (Ammoniumhydrogenphosphat-Zugabe) verzichtet.

5.3 Synthese von Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln

5.3.1 Materialien

Die Calciumionen-Aufnahme wurde von Gelatine Nr. 5 aus Schweineschwarten (Typ A, 160 Bloom) und einer speziellen Gelatine Typ S (Gelatine aus Schweineschwarten, Typ A, 205 Bloom, modifiziert mit Succinsäureanhydrid) von Gelita Deutschland GmbH (in pharmazeutischer Reinheit) bestimmt. Für die Kapselsynthese wurde Gelatine Typ S verwendet. Als Tensid wurde das amphiphile Blockcopolymer Poly[(butyl-co-ethyl)-b-(ethylenoxid)] P(B/E-b-EO) verwendet. Desweiteren wurden in der Kapselsynthese Cyclohexan (VWR), Calciumchlorid CaCl_2 , Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 , konzentrierte Natronlauge (Fisher Scientific), Rhodamin 6G (Aldrich) sowie Polyvinylpyrrolidon ($M_w=55000$ g/mol, Aldrich) eingesetzt. Die verkapselten Hydroxylapatit-Nanokristalle wurden wie in der Literatur beschrieben synthetisiert.¹⁶⁸ Vancomycin-Hydrochlorid (United Biotech Limited) wurde in pharmazeutischer Reinheit verwendet. Alle Experimente wurden mit demineralisiertem Wasser durchgeführt.

5.3.2 Allgemeiner Syntheseweg

Als kontinuierliche Phase diente eine Lösung von 20 mg P(B/E-EO) in 12 g Cyclohexan und als disperse Phase 1 ml wässrige $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung (mit NaOH-Lösung auf pH 9 angepasst). Es wurde durch US-Behandlung (2 min, 90%) eine Miniemulsion hergestellt und anschließend während einer Stunde langsam 1 ml einer wässrigen Lösung aus Gelatine und CaCl_2 (Konzentrationen siehe **Tabelle 12**), die zuvor mit NaOH-Lösung auf pH 9 angepasst wurde, bei 37 °C zugetropft. Danach wurde die Probe ungefähr für 20 Stunden bei Raumtemperatur weiter gerührt.

Nach der Synthese wurden die Kapseln in einer wässrigen PVP-Lösung (0,3 Gew.-%) redispergiert, indem 1 ml der inversen Miniemulsion zu 3 ml PVP-Lösung gegeben und für 12 h bei RT in einem offenen Gefäß gerührt wurde.

Tabelle 12: In der Herstellung von Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln eingesetzte Synthesebedingungen und Mengen an Gelatine, Calcium- und Phosphat-Ionen sowie HAP-Kristallen.

Probe	pH	Gelatine (mg)	Ca ²⁺ (mMol)	Phosphat (mMol)	HAP-Kristalle (mg)
F01	7,4	15	0,005	0,03	-
F02	10	15	0,005	0,03	-
F03	10	15	0,01	0,06	-
F04	10	15	0,01	0,06	2,5
F05	10	15	0,01	0,06	5

5.3.3 Verkapselung von Rhodamin und Vancomycin

Die Verkapselung von Rhodamin 6G erfolgte analog zur oben beschriebenen Synthesevorschrift (F03), nur dass hier für die disperse Phase 0,06 mM Natriumhydrogenphosphat in 1 ml einer wässrigen Rhodamin-Lösung (0,1 mg/ml) gelöst wurden. Bei der Verkapselung von Vancomycin wurde anstatt einer wässrigen Rhodaminlösung eine wässrige Vancomycin-Lösung in der Kapselsynthese eingesetzt.

5.3.4 Verkapselung von Hydroxylapatit-Kristallen

Zur Verkapselung von HAP-Kristallen wurden 2,5 mg (KS-F06) beziehungsweise 5 mg (KS-F07) HAP in jeweils einem Milliliter wässriger PVP-Lösung (1 Gew.-%) durch Rühren und US-Behandlung (im US-Bad) dispergiert. Nachdem die entsprechenden Mengen an Natriumhydrogenphosphat zugegeben wurden (siehe **Tabelle 12**), diente diese Lösung als disperse Phase analog zur Herstellung der Kapseln mit flüssigem Kern. Die verwendeten HAP-Kristalle wurden von A. E. während ihrer Promotion nach einer Methode von Kumar et al. hergestellt.¹⁶⁸

5.4 Synthese von Einzelkettenpartikeln

5.4.1 Materialien

Toluol (Sigma-Aldrich), THF (Acros Organics), Chloroform (VWR), Polymere (PSS, siehe **Tabelle 13**), SDS (Biomol BmbH), demineralisiertes Wasser (Milli-Q).

Tabelle 13: Molekulargewicht und Polydispersität der in der Synthese verwendeten Polymere.

Polymer	Molekulargewicht (M_w) in g/mol	D
Polystyrol	45 000	1,02
	100 000	1,05
	170 000	1,05
	300 000	1,02
	515 000	1,07
	830 000	1,08
	1 850 000	1,05
PEMA	140 000	1,02

5.4.2 Miniemulsions-/Verdampfungsmethode

Im Folgenden wird ein Standardansatz, wie er zur Herstellung von Einzelkettenpartikeln über die Miniemulsions-/Verdampfungsmethode hergestellt wurde, beschrieben. Abweichungen vom Standardansatz sind im Anhang zusammengefasst. Das jeweils verwendete Polymer wurde zunächst in 5 ml Toluol gelöst und mindestens 12 h gerührt, um eine vollständige Lösung der einzelnen Polymerketten zu gewährleisten. Die Polymerlösung wurde mit einer Lösung, die aus 125 mg SDS in 24 Wasser besteht, gemischt und für 1 h zur Herstellung einer Emulsion gerührt. Durch eine Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W450 Digital mit ½ Zoll-Spitze, 90% Amplitude, 2 min) unter Eiskühlung wurde daraus anschließend eine Miniemulsion hergestellt. Das Toluol wurde daraufhin durch starkes Rühren bei 86 °C während 2-4 h verdampft. Direkt im Anschluss an die Synthese wurden die erhaltenen Polymerdispersionen mit Hilfe einer Schlauchmembran dialysiert, um überschüssiges SDS zu entfernen. Bei den mit Chloroform als Lösungsmittel hergestellten Dispersionen wurde analog vorgegangen, allerdings betrug die Verdampfungstemperatur hier 60 °C.

5.4.3 Miniemulsions-/Diffusionsmethode

Es wurden unterschiedliche Mengen Polystyrol ($M_w=100\,000\text{ g/mol}$) in 3 g Chloroform gelöst und mit einer Lösung aus 50 mg SDS in 10 g Wasser gemischt und für 1 h zur Herstellung einer Emulsion gerührt. Anschließend wurde durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W450 Digital mit $\frac{1}{2}$ Zoll-Spitze, 90% Amplitude, 2 min) unter Eiskühlung eine Miniemulsion hergestellt. Indem die erhaltene Miniemulsion schnell unter starkem Rühren in 400 ml Wasser gegeben wurde, wurde die Diffusion des Chloroforms aus der dispersen Phase in die Wasserphase (kontinuierliche Phase) erzwungen und nach ca. 2 min Rühren eine klare Dispersion erhalten. Das Lösungsmittel wurde daraufhin bei 40 °C unter reduziertem Druck entfernt und überschüssiges SDS durch Dialyse mit Hilfe einer Schlauchmembran entfernt.

5.4.4 Synthese über den Ouzo-Effekt

Es wurden unterschiedliche Mengen Polystyrol ($M_w=100\,000\text{ g/mol}$) in 5 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst und während ca. 5 min mit einer Spritze (mit feiner Kanüle) unter starkem Rühren entweder in reines Wasser oder in eine Lösung von SDS in Wasser zugetropft. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei 60 °C (ca. 6 h) entfernt.

5.4.5 Upscale mittels Hochdruckhomogenisator

Es wurden pro Ansatz 56 mg Polystyrol ($M_w=330\,000$) in 122 g Toluol gelöst und zu einer Lösung aus 3,5 g SDS in 670 g Wasser gegeben. Durch einstündiges Rühren und Homogenisierung mittels Ultraturax wurde anschließend eine Emulsion hergestellt. Diese Emulsion wurde in 10 Durchläufen bei 230-260 bar durch einen Hochdruckhomogenisator gegeben, um eine stabile Miniemulsion herzustellen. Das Lösungsmittel wurde daraufhin unter starkem Rühren bei 86 °C entfernt und überschüssiges SDS mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle entfernt.

5.5 Charakterisierung der Proben

5.5.1 Titrationsexperimente mit ionensensitiven Elektroden

5.5.1.1 Experimenteller Aufbau der Titrationsexperimente

Die Titrationsexperimente wurden mit Hilfe eines kommerziellen Computer-gesteuerten Titrationsaufbaus durchgeführt, der aus einem Steuerungsgerät (Titrand 836, Metrohm) und zwei getrennten 20-ml Dosiereinheiten (Dosino 800 und Dosing unit 807, Metrohm) mit einem minimal dosierbaren Volumen von 2 μ l besteht. Um den pH-Wert während der Experimente konstant zu halten, wurde eine pH-Elektrode (Metrohm Nr. 6.0262.100), die gleichzeitig als Referenzelektrode für die Calciumionen-sensitive Elektrode (Metrohm Nr. 6.1241.050) diente, in Kombination mit einer Dosiereinheit verwendet. Die pH-Elektrode diente gleichzeitig als Referenzelektrode der Calciumionen-sensitiven Elektrode, welche für die Messung des Calciumionen-Potentials eingesetzt wurde. Zur automatischen Steuerung und Aufzeichnung der Titrationsexperimente wurde die Software Tiamo 2.0 (Metrohm) verwendet. Die Kalibration der Elektroden wird in Kapitel 5.5.1.3 näher erläutert. Alle verwendeten Lösungen und Dispersionen wurden zuvor auf denselben pH-Wert eingestellt und während der Zugabe der Calciumionen-Lösung wurde der pH-Wert durch das Titrationssystem mit wässriger Ammoniaklösung konstant gehalten. Die Titrationsexperimente wurden unter Stickstoff-Atmosphäre in einem 50-ml Glasgefäß durchgeführt und die verwendeten Salzlösungen wurden aus den entsprechenden Salzen und Millipore-Wasser frisch hergestellt. Nach jedem Titrationsexperiment wurden die Elektroden, das Glasgefäß, die Bürettenspitzen und Schläuche mehrmals mit 10%-iger Essigsäure und Millipore-Wasser gereinigt.



Abbildung 56: Aufbau der Computer-gesteuerten simultanen Titration von Calcium-Ionen und des pH-Wertes.

5.5.1.2 Messung der Calciumionen-Konzentration

Für die Messungen der Calciumionen-Aufnahmekapazitäten wurde eine verdünnte Calciumnitrat-Lösung bekannter Konzentration mit einer konstanten Geschwindigkeit von 10 μl pro Minute zu der jeweiligen Partikeldispersion mit bekanntem Feststoffgehalt zugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe verdünnter Ammoniaklösung konstant gehalten. Gleichzeitig wurde das Calciumionen-Potential mit Hilfe der Calciumionen-sensitiven Elektrode aufgezeichnet. In Kapitel 5.5.1.4 ist beispielhaft gezeigt, wie aus dem zeitlichen Verlauf des Calciumionen-Potentials die Menge an freien und gebundenen Calcium-Ionen und daraus die Menge an Oberflächenladungen pro Gramm Partikel berechnet werden kann.

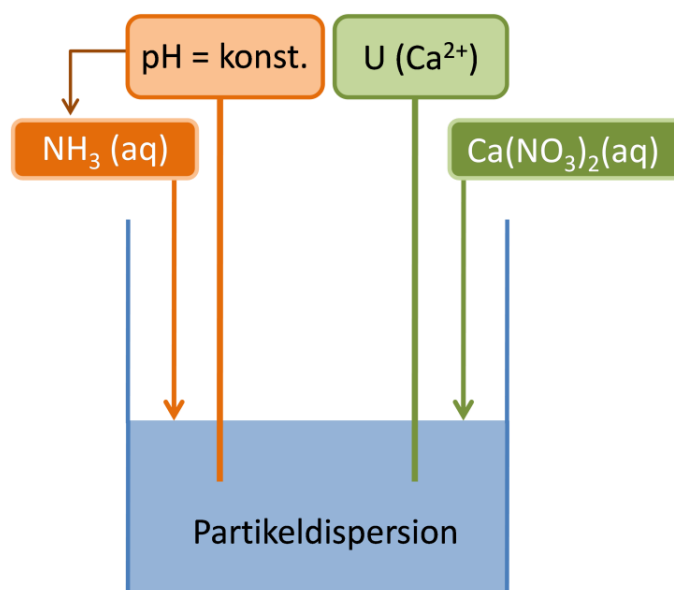


Abbildung 57: Experimenteller Aufbau der Titrationsexperimente schematisch dargestellt.

Die Calciumionen-Aufnahmekapazität der verschiedenen Gelatine-Arten wurde auf ähnliche Weise bestimmt. 25 mg Gelatine wurden hierzu bei 37 °C in 25 g Millipore-Wasser gelöst und der pH-Wert mit verdünnter Natronlauge auf pH 10 angepasst. Anschließend wurde eine verdünnte Calciumnitrat-Lösung zur Gelatinelösung (FSG = 0,1 Gew.-%) gegeben und das Calciumionen-Potential bei konstantem pH-Wert gemessen.

Die Messung der Kristallisationskinetik wurde analog zu den Beladungsexperimenten durchgeführt. Dazu wurde eine verdünnte Ammoniumphosphat-Lösung bei einer Temperatur von 37 °C zu einer Partikeldispersion, welche zuvor mit einer Calciumnitrat-Lösung versetzt wurde, gegeben. In den Referenzexperimenten wurde die Ammoniumphosphat-Lösung unter denselben Bedingungen zu einer partikelfreien Calciumnitrat-Lösung gegeben. Während der Titration wurde der pH konstant gehalten und das Calciumionen-Potential gemessen.

5.5.1.3 Kalibrierung der Elektroden

Die Kalibrierung der pH-Elektrode wurde durch 3-Punkt-Kalibration jeweils vor den Messungen durchgeführt. Die Kalibrierung der Calciumionen-selektiven Elektrode erfolgte nach einer vor kurzem in der Literatur beschriebenen Methode.^[2] Hierzu wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei der späteren Messung Calcium-Ionen in reines Wasser (Millipore-Wasser) gegeben und gleichzeitig über die Calciumionen-

selektive Elektrode das Potential aufgenommen. Über eine Auftragung der gemessenen Spannung gegen den Logarithmus der in der Lösung vorliegenden Konzentration kann dann eine Kalibriergerade berechnet werden. Diese Methode hat Vorteile gegenüber der gewöhnlichen 3-Punkt-Kalibration, da eine Vielzahl an Messpunkten bei denselben Bedingungen der späteren Messung aufgenommen werden kann. In **Abbildung 58** sind die Messpunkte sowie die berechnete Kalibriergerade aufgetragen. Die Abweichung der Geraden von den Messpunkten ist sehr gering, was zeigt, wie genau diese Methode ist.

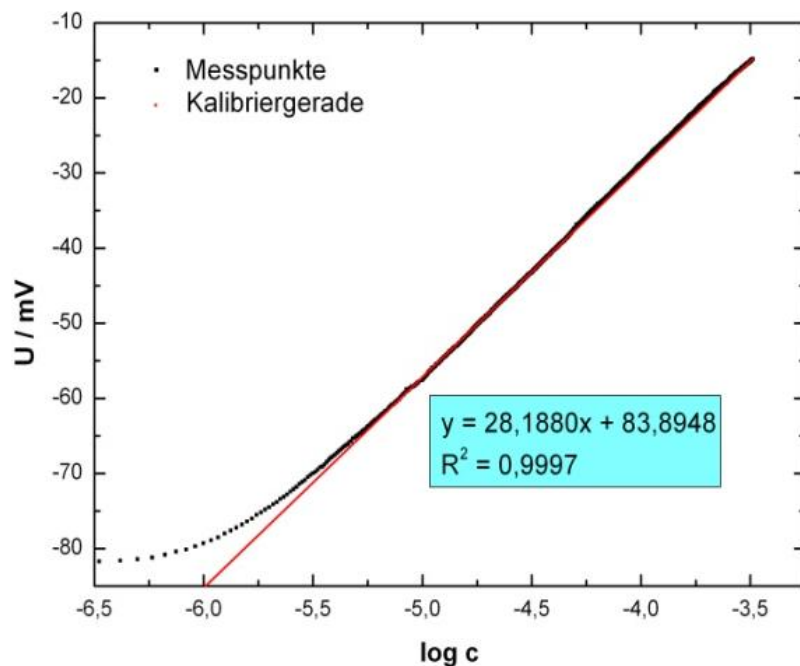


Abbildung 58: Messpunkte der Kalibrationsmessung sowie Kalibriergerade bei pH 10.

5.5.1.4 Bestimmung der Calciumionen-Konzentration

Die Messung der in der Dispersion vorliegenden Calciumionen-Konzentration wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie die Kalibrationsmessung (Kapitel 5.5.1.3). In der Dispersion lagen Carboxyl- und Phosphonat-funktionalisierte Partikel mit bekanntem Feststoffgehalt vor. Es wurde analog zur Kalibrationsmessung während der Calciumionen-Zugabe und pH-Konstanttitration über eine Calciumionen-sensitive Elektrode das Potential aufgenommen. Mit Hilfe der Kalibrationsgeraden wurde daraus der zeitabhängige Verlauf der Calciumionen-Konzentration berechnet. Im zur Referenz parallelen dem Bereich der Kurve wurde eine Tangente angelegt. Anschließend wurde aus der Differenz der Tangente zur Referenz (Menge an zutitrierten Calcium-Ionen) die Menge an aufgenommenen Calciumionen bestimmt, wie

in **Abbildung 59** beispielhaft gezeigt ist. Mit Hilfe des Feststoffgehaltes der Dispersion kann daraus die Menge an Calcium-Ionen, die pro Gramm Partikel aufgenommen wurde, berechnet werden.

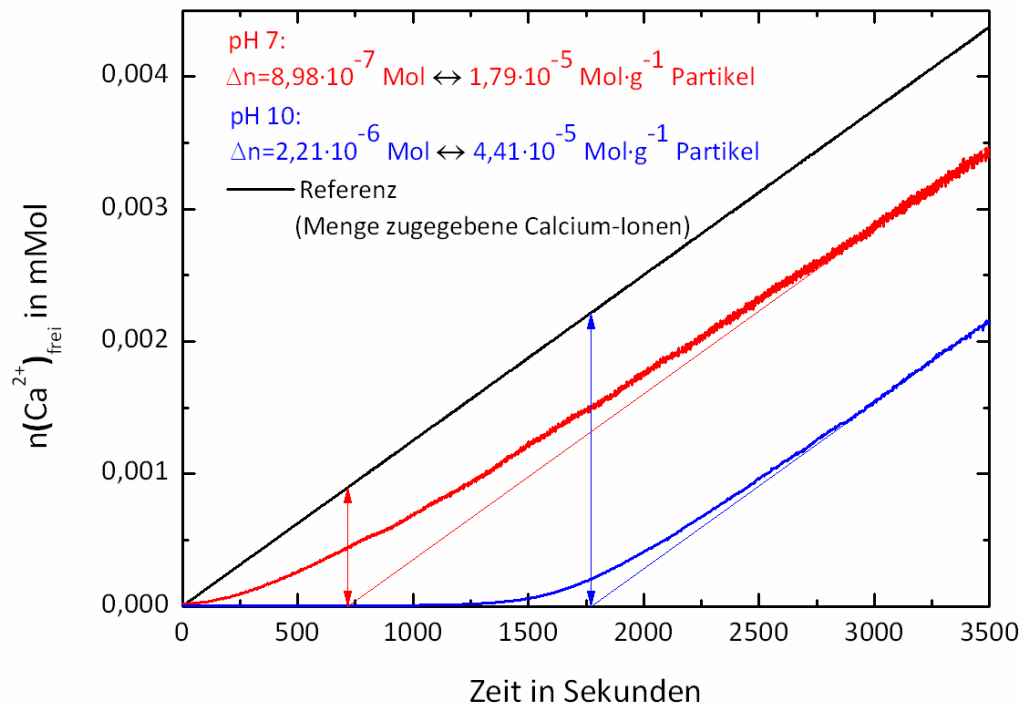


Abbildung 59: Zeitabhängiger Verlauf der Menge an freien Calcium-Ionen während des Titrationsexperimentes und Bestimmung der Calciumionen-Aufnahmekapazität von Oberflächen-funktionalisierten Partikeln bei unterschiedlichen pH-Werten aus der Verschiebung des y-Achsenabschnittes.

5.5.2 Röntgenbeugung

Die Röntgendiffraktogramme wurden mit Cu-K α Strahlung ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) bei 40 kV Spannung und einem Strom von 30 mA mit einem Phillips Typ PW Diffraktometer gemessen. Vor der Messung wurden die Proben gefriergetrocknet und viermal durch Zentrifugation (20 Minuten bei 14 000 Umdrehungen) und Redispergierung in demineralisiertem Wasser gereinigt. Anschließend wurden die Proben erneut gefriergetrocknet und im Röntgendiffraktometer gemessen. Die Referenzdiffraktogramme der unterschiedlichen Calciumphosphat-Phasen wurden aus der ICDD-Datenbank verwendet.

5.5.3 Partikelladungsdetektion

Die Oberflächenladung der Polymerpartikel wurde über eine Polyelektrolyt-Titration mit Hilfe eines Partikelladungsdetektors (PCD 02, Mutek GmbH), der mit einem automatischen Titriersystem (Titrino 702SM, Metrohm AG) ausgerüstet ist, gemessen. Die negativ geladenen Oberflächengruppen wurden mit dem positiv geladenen Polyelektrolyt Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDADMAC) titriert. Vor den Messungen wurden alle Proben durch wiederholte Zentrifugation und Redispergierung gründlich gereinigt. Die Messungen wurden mit 10 ml des verdünnten Latex mit bekanntem Feststoffgehalt und jeweils genau eingestelltem pH-Wert (pH 5, 7 oder 10) durchgeführt. Die Menge an Oberflächenladungen (aus den funktionellen Gruppen) pro Gramm Polymer wurde anschließend aus dem Volumen an Polyelektrolyt, das während der Titration verbraucht wurde, berechnet:

$$\frac{\text{Ladungen}}{g_{\text{Polymer}}} = \frac{V \cdot M \cdot N_A}{\text{FSG}} \quad 5-1$$

mit V als Volumen an verbrauchtem Elektrolyten (in L), M als molarer Konzentration an Polyelektrolyt (in mol·L⁻¹), N_A als Avogadro-Konstante (6,022·10²³ mol·L⁻¹) und FSG als Feststoffgehalt der Probe (in g). Mit Hilfe der über die DLS bestimmten Partikelgröße kann anschließend aus der Menge an Oberflächenladungen, die Anzahl Ladungen pro Partikel oder pro Flächeneinheit berechnet werden.

5.5.4 Thermogravimetrische Analyse

Die thermogravimetrische Analyse (TGA) der Proben wurde mit einer Mettler Toledo Thermowage (ThermoSTAR TGA/SDTA851) unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die Temperatur wurde dabei von RT auf 900 °C mit einer Heizrate von 10 °C·min⁻¹ erhöht.

5.5.5 Rasterelektronenmikroskopie

Die REM-Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops des Typs LEO Gemini 1530 bei einer Beschleunigungsspannung von 0,5 kV aufgenommen.

5.5.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Experimente (Standardaufnahmen, Hell- und Dunkelfeldaufnahmen, Elektronenbeugung) wurden mit einem LEO EM912 Omega bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV durchgeführt. Das Element-Mapping wurde an einem Transmissionselektronenmikroskops des Typs FEI Tecnai F20 bei einer Spannung von 200 kV ausgeführt. Um die sehr kleinen Einzelkettenpartikel im TEM sichtbar zu machen, wurden die Proben mit 2%-iger Phosphorwolframsäure behandelt (negative Kontrastierung), indem ein Tropfen Phosphorwolframsäure für 1 min auf den Probenträger gegeben und anschließend mit einem Filterpapier entfernt wurde.

5.5.7 Freisetzungsexperimente

Die Freisetzung von Rhodamin aus den Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen untersucht. Dazu wurden die redispergierten Proben zunächst auf unterschiedliche pH-Werte angepasst (2, 3, 4, 5, 6 und 7.4) und zu unterschiedlichen Zeiten (nach 1, 2, 6, 12 und 30 h) 0,5 ml der Probe entnommen und nach der Zentrifugation (14 000 U/min, 20 min) jeweils 3 mal 100 µl des Überstandes in eine 96-Well Platte gegeben. Die Proben wurden mit einer Wellenlänge von 530 nm bestrahlt und die Emission bei 554 nm aufgenommen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit einem Plate reader (multimode, M1000, Tecan GmbH) gemessen.

5.5.8 Dynamische Lichtstreuung

Die Partikelgrößen wurden mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) bestimmt, indem die verdünnten Dispersionen bei einem konstanten Streuwinkel von 90° mit einem Nicomp Partikelmessgerät (Modell 370, PSS Santa Barbara, CA, USA) vermessen wurden.

Die Bestimmung der Partikelgröße der Einzelkettenpartikel wurde mit einer Lichtstreuanlage der Firma ALV mit einem ALV/CGS3 Kompakt Goniometer-System mit He/Ne-Laser (632,8 nm), ALV/LSE-5004-Korrelator und ALV5000-Software in einem Winkelbereich von 30-150° durchgeführt. Vor den Messungen wurden die Proben zweifach filtriert (0,2 µm Porengröße). Zur Berechnung der Partikelgrößenverteilung aus der Autokorrelationsfunktion wurde die CONTIN-

Methode angewandt. Da die Partikelgröße bei den sehr kleinen Partikeln keine Winkelabhängigkeit zeigte, wurde aus den bei unterschiedlichen Winkeln erhaltenen Partikelgrößen (mind. 8 verschiedene Winkel) anschließend ein Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

5.5.9 Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie

Abklingfunktionen der Fluoreszenz wurden mit Hilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (Time Correlation Single Photon Counting Technique TCSPC) gemessen (FluoTime 200, PicoQuant GmbH). Eine Küvette (10 mm Dicke) mit der wässrigen Dispersion wurde mit Hilfe einer Lichtquelle angeregt (PLS 280, 2 MHz, ~1 µW, Pulsdauer ~ 900 ps, Picoquant GmbH). Die Fluoreszenz wurde im rechten Winkel zur Probe gemessen. Glan-Thompson-Polarisatoren (für die Anregung und Detektion) wurden im benötigten Winkel angeordnet, um eine horizontale oder vertikale Polarisation des Lichts zu erreichen. Zusätzliche Langpassfilter (Brightline 300/LP, Semrock Inc.) wurden vor einem Monochromator (Sciencetech Model 9030) angeordnet, um gestreutes Licht besser auszulöschen. Ein Photoelektronenvervielfacher PMA 165 (PicoQuant GmbH) wurde zur Detektion der Fluoreszenz verwendet.

Die Fluoreszenzlebensdauer (τ) für das einfache exponentielle Modell oder die gemittelte Lebensdauer ($\bar{\tau}$) für das multiexponentielle Modell wurden mit der FluoFit-Software (PicoQuant GmbH) mit Hilfe der folgenden Formeln bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie wurde mit Hilfe der Formeln 5-2, 5-3 und 5-4 berechnet. Der auf diese Weise erhaltene Verlauf wurde anschließend unter Verwendung von Formel 5-5 als Fitfunktion angepasst, nachdem ein passendes Modell ausgewählt wurde:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt' \quad 5-2$$

mit $I(t)$ als zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität, IRF als Antwortfunktion der Gerätes, A_i als präexponentielle Faktoren und τ_i als Abklingzeiten.

Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie wurde mit Hilfe der folgenden Gleichungen bestimmt:¹⁸⁷

$$r(t)_{Exp.} = \frac{I_{VV}(t) - G \cdot I_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2 \cdot G \cdot I_{VH}(t)} \quad 5-3$$

$$G = \frac{I_{HV}(t)}{I_{HH}(t)} \quad 5-4$$

mit $r(t)$ als zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzanisotropie, G als Gerätekorrekturfaktor und $I(t)$ als zeitlicher Verlauf der folgenden Fluoreszenzintensitäten: $I_{VV}(t)$ entspricht der Fluoreszenzintensität, wenn Anregungs- und Emissionspolarisator vertikal polarisiertes Licht transmittieren, und $I_{HH}(t)$ entspricht der Fluoreszenzintensität, wenn Anregungs- und Emissionspolarisator horizontal polarisiertes Licht transmittieren. $I_{HV}(t)$ bezeichnet die Fluoreszenzintensität, wenn der Anregungspolarisator horizontal und der Emissionspolarisator vertikal verwendet werden, und $I_{VH}(t)$ bezeichnet die Fluoreszenzintensität, wenn der Anregungspolarisator vertikal und der Emissionspolarisator horizontal verwendet werden.

Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie kann auch als Summe von Exponentialgleichungen beschrieben werden:¹⁸⁷

$$r(t) = \beta_{inf} + \sum_{i=1}^n \beta_i e^{-\frac{t}{\theta_i}} \quad 5-5$$

mit $r(t)$ als zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzanisotropie, $\theta_j = (6R_j)^{-1}$ als individuelle Rotationsrelaxationszeiten, R_j als Rotationsgeschwindigkeit, β_j als Vorfaktoren, die den Anteil der jeweiligen Rotationskomponente an der Fluoreszenzdepolarisation beschreiben und β_{inf} als „Hintergrund“. Durch Lösen der Exponentialfunktion kann auf diese Weise die Rotationskorrelationszeit des reinen Fluorophores oder des partikelgebundenen Fluorophores bestimmt werden.

Für sphärische Partikel (oder Moleküle) kann anschließend mit Hilfe der Rotationskorrelationszeit des Fluorophores (θ_j) das Volumen der rotierenden Einheit bestimmt werden (Stokes-Einstein-Beziehung):¹⁸⁹

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} \quad 5-6$$

mit η als Viskosität, T als Temperatur in K, R als Gaskonstante und V als Volumen der rotierenden Einheit. Durch Umformen dieser Gleichung kann aus der Rotationskorrelationszeit der Radius des rotierenden Partikels (oder Moleküls) berechnet werden:¹⁸⁹

$$R = \sqrt[3]{\frac{3k_B T \theta}{4\pi\eta}} \quad 5-7$$

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Miniemulsionen als räumliche Begrenzungen für die Synthese von unterschiedlichen funktionellen Materialien mit neuartigen Eigenschaften verwendet. Das erste Themengebiet umfasst die Herstellung von Polymer/Calciumphosphat-Hybridpartikeln und –Hybridkapseln über die templatgesteuerte Mineralisation von Calciumphosphat. Die funktionalisierte Oberfläche von Polymernanopartikeln, welche über die Miniemulsionspolymerisation hergestellt wurden, diente als Templat für die Kristallisation von Calciumphosphat auf den Partikeln. Der Einfluss der funktionellen Carboxylat- und Phosphonat-Oberflächengruppen auf die Komplexierung von Calcium-Ionen sowie die Mineralisation von Calciumphosphat auf der Oberfläche der Nanopartikel wurde mit mehreren Methoden (ionenselektive Elektroden, REM, TEM und XRD) detailliert untersucht. Im Fall von Vinylbenzylphosphonsäure als funktionellem Comonomer in der Miniemulsionspolymerisation mit Styrol wurde eine annähernd vollständige Bedeckung der Partikel mit Kristallen gefunden. Es wurde zudem herausgefunden, dass die Mineralisation bei verschiedenen pH-Werten zu vollkommen unterschiedlichen Kristallmorphologien (nadel- und plättchenförmige Kristalle) auf der Oberfläche der Partikel führt. Untersuchungen der Mineralisationskinetik zeigten, dass die Morphologie der Hydroxylapatit-Kristalle auf der Partikeloberfläche mit der Änderung der Kristallisationsgeschwindigkeit durch eine sorgfältige Wahl des pH-Wertes gezielt kontrolliert werden kann.

Sowohl die Eigenschaften der als Templat verwendeten Polymernanopartikel (z. B. Größe, Form und Funktionalisierung), als auch die Oberflächentopografie der entstandenen Polymer/Calciumphosphat-Hybridpartikel wurden gezielt verändert, um die Eigenschaften der erhaltenen Kompositmaterialien zu steuern. Die hierbei gewonnen Erkenntnisse über die Wechselwirkung zwischen Templatpartikeln und entstehenden Kristallen sowie den gesamten Mineralisationsprozess führen hin zu einer kontrollierten Synthese einer Vielzahl organisch/anorganischer Nanopartikel für unterschiedliche

Anwendungsgebiete von der Optoelektronik und Katalyse bis hin zu biomedizinischen Materialien.

Eine ähnliche bio-inspirierte Methode wurde zur in situ-Herstellung von organisch/anorganischen Nanokapseln entwickelt. Hierbei wurde die flexible Grenzfläche von flüssigen Miniemulsionströpfchen zur Mineralisation von Calciumphosphat an der Grenzfläche eingesetzt, um Gelatine/Calciumphosphat-Hybridkapseln mit flüssigem Kern herzustellen. Der große Vorteil der Gelatine/Calciumphosphat-Nanokapseln ist, dass die Kapselhülle aus den Biomaterialien Gelatine und Calciumphosphat aufgebaut ist, wodurch diese Kapseln nicht nur biokompatibel und bioabbaubar sind, sondern zusätzlich potentiell durch verschiedene äußere Reize, wie Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur, der Ionenstärke oder der Anwesenheit von Enzymen, angesprochen werden können. Die organisch/anorganischen Hybridkapseln könnten aus diesem Grund in verschiedenen Anwendungen als funktionelle Freisetzungssysteme eingesetzt werden. Der flüssige Kern der Nanokapseln ermöglicht dabei die Verkapselung unterschiedlicher hydrophiler Substanzen, was in dieser Arbeit durch die erfolgreiche Verkapselung winziger Hydroxylapatit-Kristalle sowie eines Fluoreszenzfarbstoffes (Rhodamin 6G) demonstriert wurde. Aufgrund der intrinsischen Eigenschaften der Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln konnten abhängig vom pH-Wert der Umgebung unterschiedliche Mengen des verkapselten Fluoreszenzfarbstoffes aus den Kapseln freigesetzt werden.

Eine mögliche Anwendung der Polymer/Calciumphosphat-Partikel und –Kapseln ist die Implantatbeschichtung, wobei diese als Bindeglied zwischen künstlichem Implantat und natürlichem Knochengewebe dienen. Aufgrund ihrer knochenähnlichen Struktur und Multifunktionalität könnten diese Beschichtungen das aktive Aufwachsen von Knochengewebe auf der Implantatoberfläche fördern.

Im zweiten Themengebiet dieser Arbeit wurde die Grenzfläche von Nanometer-großen Miniemulsionströpfchen eingesetzt, um einzelne in der dispersen Phase gelöste Polymerketten zu separieren. Nach der Verdampfung des in den Tröpfchen vorhandenen Lösungsmittels wurden stabile Dispersionen sehr kleiner Polymer-Nanopartikel (<10 nm Durchmesser) erhalten, die aus nur wenigen oder einer einzigen Polymerkette bestehen. Die kolloidale Stabilität der Partikel nach der Synthese,

gewährleistet durch die Anwesenheit von SDS in der wässrigen Phase der Dispersionen, ist vorteilhaft für die anschließende Charakterisierung der Polymer-Nanopartikel. Die Partikelgröße der Nanopartikel wurde mittels DLS und TEM bestimmt und mit Hilfe der Dichte und des Molekulargewichts der verwendeten Polymere die Anzahl an Polymerketten pro Partikel bestimmt. Wie es für Partikel, die aus nur einer Polymerkette bestehen, erwartet wird, stieg die mittels DLS bestimmte Partikelgröße mit steigendem Molekulargewicht des in der Synthese der Partikel eingesetzten Polymers deutlich an. Die Quantifizierung der Kettenzahl pro Partikel mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie-Messungen ergab, dass Polymer-Einzelkettenpartikel hoher Einheitlichkeit hergestellt wurden.

In Zukunft könnte die hier entwickelte Methode zur räumlichen Separation einzelner Polymerketten in Miniemulsionströpfchen zur Durchführung von Einzelmolekülreaktionen, wie der intramolekularen Ringschlussreaktion einzelner Polymerketten, angewandt werden. Auf diese Weise könnte die intermolekulare Reaktion erfolgreich unterdrückt werden, ohne die Notwendigkeit extrem hoher Verdünnungen, wie sie üblicherweise bei intramolekularen Ringschlussreaktionen eingesetzt werden.

Durch die Verwendung eines Hochdruckhomogenisators zur Herstellung der Einzelkettendispersionen war es möglich, größere Mengen der Einzelkettenpartikel herzustellen, deren Materialeigenschaften zurzeit näher untersucht werden. Möglicherweise könnten die Polymer-Einzelkettenpartikel auf Grund von veränderten intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Polymerketten in der industriellen Anwendung zu einer verbesserten Prozessierbarkeit von Polymeren führen, deren konventionell hergestellte Schmelzen hochviskos sind.

Summary

In this work, miniemulsions were employed as spatial confinement for the synthesis of different functional materials with new material properties. The first part of the work was dealing with the synthesis of hybrid nanoparticles and nanocapsules that consist of polymer and calcium phosphate by using a template assisted approach for the mineralization of calcium phosphate.

The functionalized surface of polymeric nanoparticles synthesized via the miniemulsion polymerization served as template for the crystallization of calcium phosphate on the particles. The influence of functional carboxylate and phosphonate surface functionalities on the complexation of calcium ions as well as the mineralization of calcium phosphate on the surface of the particles was studied in detail using different analytical methods (ion selective electrodes, SEM, TEM and XRD). In the case of vinylbenzylphosphonic acid as functional comonomer in the miniemulsion polymerization with styrene, an almost complete coverage of the particles with calcium phosphate crystals was found. In addition it was found that the mineralization at different pH resulted in completely different crystal morphologies (needle- and platelet-like crystals) on the surface of the particles. Studies on the kinetics of mineralization showed that the morphology of the HAP crystals on the surface of the polymer particles can be effectively controlled by changing the crystallization rate and thus the driving force for HAP growth through a thoughtful choice of pH.

The properties of the polymeric template (e.g. the particle size, shape and surface functionalization) as well as the surface topography of the polymer/calcium phosphate hybrid particles were effectively and independently changed in order to control the material properties of the resulting composite materials. The results obtained on the interplay between the template particles and the growing crystals could be applied to the systematic synthesis of a variety of organic/inorganic nanoparticles for different applications ranging from optoelectronics and catalysis to biomedical materials.

In a similar bio-inspired approach the flexible interface of miniemulsion nanodroplets was used for the interfacial mineralization of calcium phosphate leading to gelatin/calcium phosphate capsules. The big advantage of these hybrid nanocapsules is that they are composed of the biominerals gelatin and calcium phosphate. This leads not only to biocompatible and biodegradable hybrid capsules but also permits them to be

potentially addressed by external stimuli like changes in pH value, temperature, ionic strength or the presence of enzymes. Therefore these organic-inorganic hybrid capsules could be employed as functional release systems in various applications. The liquid core of the nanocapsules enables the encapsulation of different hydrophilic substances inside the capsules. In this work, this is demonstrated by the successful encapsulation of tiny hydroxy apatite crystals and dye molecules (Rhodamine 6G) in the gelatin/calcium phosphate capsules. It was found that depending on the surrounding pH value different amounts of dye were released from the capsules which can be attributed to the intrinsic properties of gelatin and calcium phosphate. The combined material properties of both the inorganic and the organic phase of the resulting polymer/calcium phosphate nanoparticles and nanocapsules might allow the latter to be used in tissue engineering applications providing excellent cell attachment and possibly inducing growth of new bone.

In the second part of the work miniemulsion droplets were used as confinement to separate single polymer chains which are dissolved in the dispersed phase. Following the evaporation of the solvent, stable dispersions of extremely small polymeric nanoparticles (<10 nm) were obtained that consist of very few or only a single polymer chain. The colloidal stability of the particles - maintained after the synthesis by the presence of SDS in the aqueous phase - is advantageous for the subsequent characterization of the nanoparticles. The size of the nanoparticles was measured using DLS and TEM. In combination with the mass density and molecular weight of the polymer, the number of polymer chains per particle was determined. As expected for particles that consist of only a single polymer molecule, it was found that the size of the particles increased with increasing molecular weight of the polymers used in the synthesis of the particles. The quantification of the amount of polymer chains per particle via fluorescence anisotropy measurements showed that polymeric single chain particles of high uniformity were obtained.

In the future the concept of separating single polymer chains in miniemulsion droplets could be employed for single molecule reactions like the intramolecular ring-closure of single polymer chains. In this case, the intermolecular reaction could be effectively suppressed, without the need for high dilution conditions as conventionally employed in intramolecular polymer cyclizations. An up-scaling of the single-chain particles synthesis was achieved via high-pressure homogenization to obtain higher amounts of the single-chain particles. At the moment the material properties of the single-chain particles are investigated. In the future, the single-chain particles are envisioned to increase the industrial processability of polymers with high melt viscosities.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Acrylsäure	AA
Desoxyribonukleinsäure	DNA
Dynamische Lichtstreuung	DLS
Elektronenenergieverlustspektroskopie	EELS
Feststoffgehalt	FSG
Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	FACS
Gelpermeationschromatographie	GPC
Gewichtsprozent	Gew.-%
Titandioxid	TiO ₂
Hochleistungsflüssigchromatographie	HPLC
Hydroxylapatit	HAP
Konfokales Laser-Raster-Mikroskop	CLSM
Lutensol AT50	Lutensol
Natriumdodecylsulfat	SDS
o/w	Öl-in-Wasser
Octacalciumphosphat	OCP
Partikelladungsdetektion	PCD
Poly[(butyl-co-ethyl)-b-ethylenoxid]	P(B/E-EO)
Polylactid	PLA

Polymethylmethacrylat	PMMA
Polystyrol	PS
Polyvinylalkohol	PVA
Polyvinylpyrrolidon	PVP
Rasterelektronenmikroskopie	REM
Rasterkraftmikroskopie	AFM
Rastertunnelmikroskopie	STM
Raumtemperatur	RT
Röntgenbeugung	XRD
Stunden	h
Styrol	S
Thermogravimetrische Analyse	TGA
Transmissionselektronenmikroskopie	TEM
Vinylbenzylphosphonsäure	VBPA
Vinylphosphonsäure	VPA
w/o	Wasser-in-Öl

7.2 Symbole

A_i	Präexponentieller Faktor
D	Polydispersität
D_n	Partikeldurchmesser (Zahlenmittel)
$I(t)$	Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität
IRF	Antwortfunktion des Gerätes

J_N	Keimbildungsgeschwindigkeit
M_w	Molekulargewicht (Gewichtsmittel)
R	Gaskonstante
$r(t)$	Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzanisotropie
r^*	kritischer Keimbildungsradius
R_h	Hydrodynamischer Radius
S_R	Übersättigung
T	Temperatur
T_g	Glasübergangstemperatur
V_m	Molares Volumen
γ	Grenzflächenspannung
ΔG_N	freie Keimbildungsenergie
ΔG_N^*	Aktivierungsenergie der homogenen Keimbildung
ΔG_V	freie Phasenumwandlungsenergie
η	Viskosität
θ_i	Rotationsrelaxationszeit
λ	Wellenlänge
τ_i	Abklingzeit

7.3 Zusätzliche experimentelle Ergebnisse

TGA-Analyse der Polymer/HAP-Partikel:

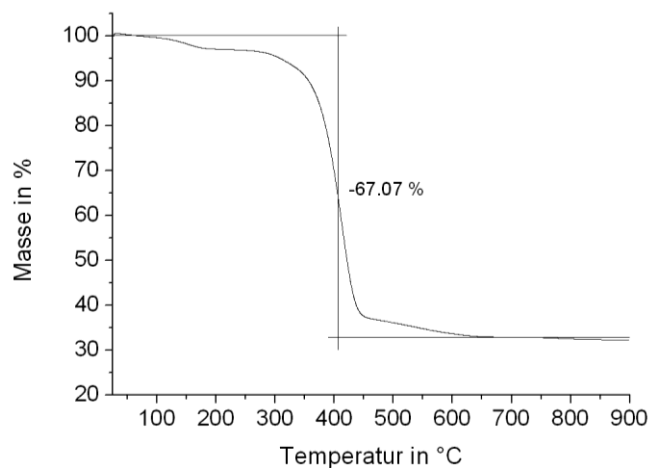


Abbildung 60: TGA-Ergebnisse, die mit den Polymer/HAP-Hybridpartikeln erhalten wurden.

HPLC-Ergebnisse zur Freisetzung von Vancomycin aus Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln:

Die verwendete HPLC-Anlage besteht aus einer quaternären Gradientenpumpe und einem DAD-Detektor (Serie 1200 von Agilent) sowie einer RP-Säule (von Machery und Nagel, HD8, Durchmesser 4 mm, Länge 125 mm, Korngröße 5 μm). Der eingesetzte Lösungsmittelgradient wurde bei RT mit THF/Wasser+0,1% TFA (Trifluoressigsäure) in einem Verhältnis von 2/98 gestartet und innerhalb von 10 min auf 100% THF gebracht.

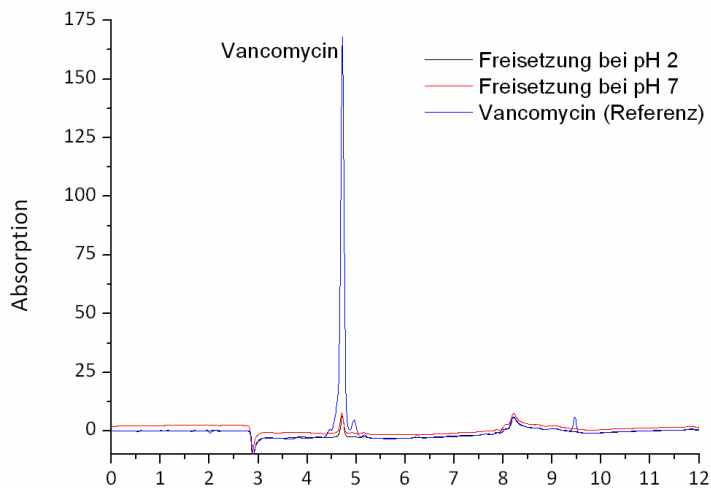


Abbildung 61: Ergebnisse der HPLC-Analyse der Vancomycin-Freisetzung aus Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln (Wellenlänge 280 nm).

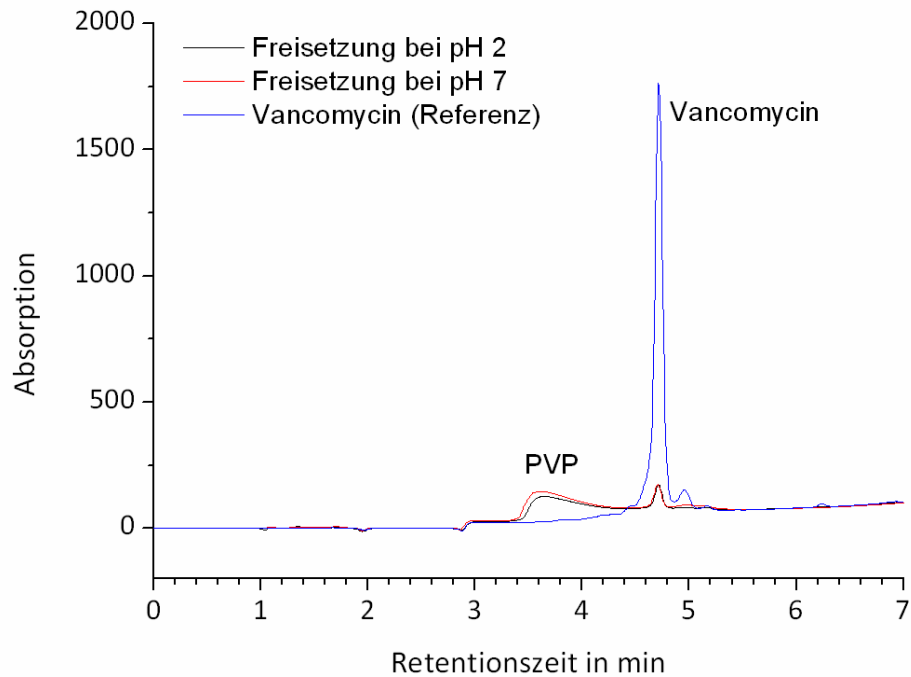


Abbildung 62: Ergebnisse der HPLC-Analyse der Vancomycin-Freisetzung aus Gelatine/Calciumphosphat-Kapseln (Wellenlänge 220 nm).

TEM-Untersuchung der mittels des Miniemulsions-Diffusionsprozess hergestellten Dispersion:

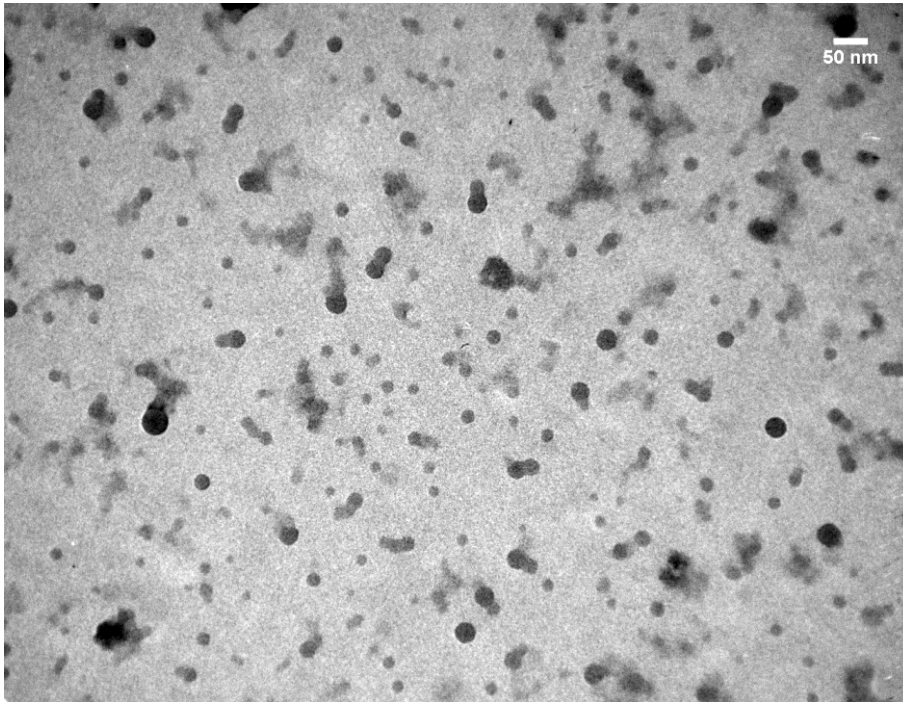


Abbildung 63: TEM-Aufnahme der mittels Miniemulsions-Diffusionsprozess hergestellten Dispersion (Polystyrol mit $M_w = 100\,000$ g/mol).

Ergebnisse der Herstellung von Polymerdispersionen über den Ouzo-Effekt:

Eine mögliche Fehlerquelle bei der Berechnung der Anzahl an Polymerketten pro Partikel ist die Annahme, dass die Dichte der Einzelkettenpartikel mit der Dichte konventioneller Polymere übereinstimmt.

Tabelle 14: Einwaagen der mittels des Ouzo-Effektes hergestellten Proben.

Probe	Methode	PS-Menge in mg	SDS-Menge in mg	THF-Menge in mL	Wasser-Menge in mL
KS-C01	rühren	0,2	-	5	24
KS-C07	US	0,2	-	5	24
KS-C02	rühren	1	-	5	24
KS-C03	rühren	1	-	1	99
KS-C04	rühren	0,2	125	5	24
KS-C08	US	0,2	125	5	24
KS-C05	rühren	1	125	5	24
KS-C06	rühren	1	125	5	24

Tabelle 15: Zusammenfassung der mittels Ouzo-Effekt ohne Tensid erhaltenen Ergebnisse.

Probe	Methode	PS-Menge in mg	Verhältnis THF/H ₂ O	Partikeldurchmesser in nm
KS-C01	rühren	0,2	1/4,8	130
KS-C07	US	0,2	1/4,8	106
KS-C02	rühren	1	1/4,8	137
KS-C03	rühren	1	1/99	139

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse, die mittels Ouzo-Effekt und SDS als Tensid erhalten wurden.

Probe	Methode	PS-Menge in mg	SDS-Menge in mg	Verhältnis THF/H ₂ O	Partikeldurchmesser in nm
KS-C04	rühren	0,2	125	1/4,8	142
KS-C08	US	0,2	125	1/4,8	149
KS-C05	rühren	1	125	1/4,8	174
KS-C06	rühren	1	200	1/4,8	130

Ergebnisse der Variationen des Emulsions-Verdampfungsprozesses zur Optimierung der Einzelkettenpartikel-Synthese:

Tabelle 17: Ergebnisse der bei verschiedenen PS-Konzentrationen und SDS-Konzentrationen mit Chloroform als Lösungsmittel hergestellten Partikel.

Probe	PS-Konzentration ^a in Gew.-%	SDS-Konzentration ^a in Gew.-%	Partikeldurchmesser in nm ^b
KS-A17	$2,7 \cdot 10^{-2}$	1,7	18,9
KS-A16	$1,3 \cdot 10^{-2}$	1,7	14,9
KS-A14	$6,7 \cdot 10^{-3}$	1,7	15,5
KS-A19	$5,3 \cdot 10^{-3}$	1,7	15,9
KS-A18	$4 \cdot 10^{-3}$	1,7	14,9
KS-A23	$2,6 \cdot 10^{-3}$	1,7	15,6
KS-A21	$2,6 \cdot 10^{-3}$	1	15
KS-A22	$2,6 \cdot 10^{-3}$	2,7	13,4

[a] bezogen auf disperse Phase; [b]: gemessen mittels winkelabhängiger DLS, Intensitätsmittel

Tabelle 18: Ergebnisse der bei verschiedenen Temperaturen mit Chloroform als Lösungsmittel hergestellten Partikel.

Probe	Temperatur in °C	PS-Menge in mg	SDS-Menge in mg	Partikelgröße in nm
KS-A50	60	1,00	125	15,1
KS-A52	40	1,00	125	15,5
KS-A17	60	2,00	125	18,9
KS-A53	40	2,00	125	18,9

Tabelle 19: Eigenschaften der mit Dichlormethan als Lösungsmittel hergestellten Partikel.

Probe	PS-Menge in mg	SDS-Menge in mg	Partikelgröße in nm
KS-A35	0,50	125	90
KS-A36	1,00	125	52
KS-A37	2,00	125	38
KS-A38	2,00	200	38

Tabelle 20: Eigenschaften der mit Toluol und verschiedenen SDS-Mengen hergestellten Partikel.

Probe	PS-Menge in mg	SDS-Menge in mg	Partikelgröße in nm
KS-A46	1	72	13,5
KS-A32	1	125	12,2
KS-A47	1	200	10,7
KS-A48	1	300	11,5
KS-A49	1	500	12

8 Literaturverzeichnis

- (1) D. Taylor, *Materials Today* **2010**, 13, 6.
- (2) S. Weiner, H. D. Wagner, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, 28, 271.
- (3) P. Fratzl, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4547.
- (4) B. R. Heywood, S. Mann, *Adv. Mater.* **1994**, 6, 9.
- (5) E. Dujardin, S. Mann, *Adv. Mater.* **2002**, 14, 775.
- (6) J. W. C. Dunlop, R. Weinkamer, P. Fratzl, *Materials Today* **2011**, 14, 70.
- (7) A. Ethirajan, K. Landfester, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 9398.
- (8) K. Landfester, *Adv. Mater.* **2001**, 13, 765.
- (9) K. Landfester, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, 48, 4488.
- (10) L. L. Hench, J. M. Polak, *Science* **2002**, 295, 1014.
- (11) M. Bohner, *Materials Today* **2010**, 13, 24.
- (12) J. Ugelstad, M. S. El-Aasser, J. W. Vanderhoff, *J. Polym. Sci. C: Polym. Lett.* **1973**, 11, 503.
- (13) K. Landfester, M. Willert, M. Antonietti, *Macromolecules* **2000**, 33, 2370.
- (14) K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, M. Antonietti, *Macromolecules* **1999**, 32, 5222.
- (15) A. Musyanovych, R. Rossmanith, C. Tontsch, K. Landfester, *Langmuir* **2007**, 23, 5367.
- (16) A. Ziegler, K. Landfester, A. Musyanovych, *Colloid Polym. Sci.* **2009**, 287, 1261.
- (17) K. Landfester, A. Musyanovych, V. Mailänder, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2010**, 48, 493.
- (18) W. T. S. Huck, *Chem. Commun.* **2005**, 4143.
- (19) R. Montenegro, M. Antonietti, Y. Mastai, K. Landfester, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 5088.
- (20) R. Montenegro, K. Landfester, *Langmuir* **2003**, 19, 5996.
- (21) A. Taden, K. Landfester, *Macromolecules* **2003**, 36, 4037.
- (22) A. Taden, K. Landfester, M. Antonietti, *Langmuir* **2004**, 20, 957.
- (23) D. C. Sundberg, A. P. Casassa, J. Pantazopoulos, M. R. Muscato, B. Kronberg, J. Berg, *J. Appl. Polym. Sci.* **1990**, 41, 1425.

- (24) Y. G. Durant, D. C. Sundberg, *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, *58*, 1607.
- (25) L. J. Gonzalez-Ortiz, J. M. Asua, *Macromolecules* **1995**, *28*, 3135.
- (26) F. Tiarks, K. Landfester, M. Antonietti, *Langmuir* **2001**, *17*, 908.
- (27) T. Kietzke, D. Neher, M. Kumke, O. Ghazy, U. Ziener, K. Landfester, *Small* **2007**, *3*, 1041.
- (28) P. Lambooy, T. P. Russell, G. J. Kellogg, A. M. Mayes, P. D. Gallagher, S. K. Satija, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *72*, 2899.
- (29) K. Shin, H. Xiang, S. I. Moon, T. Kim, T. J. McCarthy, T. P. Russell, *Science* **2004**, *306*, 76.
- (30) B. Yu, B. Li, Q. Jin, D. Ding, A.-C. Shi, *Macromolecules* **2007**, *40*, 9133.
- (31) Y. Kagawa, H. Minami, M. Okubo, J. Zhou, *Polymer* **2005**, *46*, 1045.
- (32) R. H. Staff, P. Rupper, I. Lieberwirth, K. Landfester, D. Crespy, *Soft Matter* **2011**, *7*, 10219.
- (33) A. Ethirajan, U. Ziener, A. Chuvilin, U. Kaiser, H. Cölfen, K. Landfester, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 2221.
- (34) A. Ethirajan, U. Ziener, K. Landfester, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2218.
- (35) K. Tauer, Latex Particles. In *Colloids and Colloid Assemblies*, F. Caruso, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2004; pp 1.
- (36) D. Quintanar-Guerrero, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker, *International Journal of Pharmaceutics* **1999**, *188*, 155.
- (37) I. D. Rosca, F. Watari, M. Uo, *Journal of Controlled Release* **2004**, *99*, 271.
- (38) V. D. A. Huizen, J. Furton, V. D. A. Waal, Process for the preparation of an artificial latex. 2009.
- (39) D. L. Tillier, J. Meuldijk, C. E. Koning, *Polymer* **2003**, *44*, 7883.
- (40) J. Xu, V. L. Dimonie, E. D. Sudol, M. S. El-Aasser, *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *69*, 965.
- (41) Y.-C. Chen, V. Dimonie, M. S. El-Aasser, *J. Appl. Poly. Sci.* **1992**, *46*, 691.
- (42) C. E. Astete, C. S. S. R. Kumar, C. M. Sabliov, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, *299*, 209.
- (43) T. Kietzke, D. Neher, K. Landfester, R. Montenegro, R. Guntner, U. Scherf, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 408.
- (44) A. Musyanovych, J. Schmitz-Wienke, V. Mailänder, P. Walther, K. Landfester, *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 127.
- (45) M. Urban, A. Musyanovych, K. Landfester, *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 961.

- (46) G. Mistlberger, A. Medina-Castillo, S. Borisov, T. Mayr, A. Fernández-Gutiérrez, J. Fernandez-Sanchez, I. Klimant, *Microchimica Acta* **2011**, 172, 299.
- (47) D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, E. Doelker, H. Fessi, *Colloid Polym. Sci.* **1997**, 275, 640.
- (48) N. Csaba, P. Caamaño, A. Sánchez, F. Domínguez, M. J. Alonso, *Biomacromolecules* **2004**, 6, 271.
- (49) D. Moinard-Checot, Y. Chevalier, S. Briancon, L. Beney, H. Fessi, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, 317, 458.
- (50) S. A. Vitale, J. L. Katz, *Langmuir* **2003**, 19, 4105.
- (51) F. Ganachaud, J. L. Katz, *ChemPhysChem* **2005**, 6, 209.
- (52) P. Lucas, M. Vaysse, J. Aubry, D. Mariot, R. Sonnier, F. Ganachaud, *Soft Matter* **2011**, 7, 5528.
- (53) M. Antonietti, K. Landfester, *ChemPhysChem* **2001**, 2, 207.
- (54) D.-P. Hertel, *CHIUZ* **2008**, 42, 192.
- (55) D. Wöll, H. Uji-i, T. Schnitzler, J.-i. Hotta, P. Dedeker, A. Herrmann, F. C. De Schryver, K. Müllen, J. Hofkens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 783.
- (56) G. A. Ozin, *Adv. Mater.* **1992**, 4, 612.
- (57) N. J. Turro, *Accounts of Chemical Research* **2000**, 33, 637.
- (58) C.-G. Wu, T. Bein, *Science* **1994**, 264, 1757.
- (59) F. U. Hartl, *Nature* **1996**, 381, 571.
- (60) D. H. W. Hubert, M. Jung, A. L. German, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 1291.
- (61) S.-H. Shin, H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10462.
- (62) A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1824.
- (63) D. Marenduzzo, C. Micheletti, E. Orlandini, *J. Phys.-Condes. Matter* **2010**, 22.
- (64) D. Reith, P. Virnau, *Computer Physics Communications* **2011**, 182, 1945.
- (65) J. S. Guo, M. S. El-Aasser, J. W. Vanderhoff, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1989**, 27, 691.
- (66) S. C. Pilcher, W. T. Ford, *Macromolecules* **1998**, 31, 3454.
- (67) H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. Springer Verlag: Berlin, 2002.
- (68) W. H. Ming, J. Zhao, X. L. Lu, C. C. Wang, S. K. Fu, *Macromolecules* **1996**, 29, 7678.
- (69) J. Gao, S. Q. Zhou, C. Wu, *Polym Engin. Sci.* **1996**, 36, 2968.

- (70) J. S. Guo, E. D. Sudol, J. W. Vanderhoff, M. S. Elaasser, *Acs Symposium Series* **1992**, 492, 99.
- (71) L. Kolb, V. Monteil, R. Thomann, S. Mecking, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2005**, 44, 429.
- (72) V. Monteil, P. Wehrmann, S. Mecking, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14568.
- (73) J. Huber, S. Mecking, *Macromolecules* **2010**, 43, 8718.
- (74) M. Antonietti, T. Pakula, W. Bremser, *Macromolecules* **1995**, 28, 4227.
- (75) C. M. Roland, P. G. Santangelo, M. Antonietti, M. Neese, *Macromolecules* **1999**, 32, 2283.
- (76) A. Tuteja, M. E. Mackay, C. J. Hawker, B. Van Horn, D. L. Ho, *J. Polym. Sci. Part B-Polym. Phys.* **2006**, 44, 1930.
- (77) E. Harth, B. Van Horn, V. Y. Lee, D. S. Germack, C. P. Gonzales, R. D. Miller, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8653.
- (78) J. B. Beck, K. L. Killops, T. Kang, K. Sivanandan, A. Bayles, M. E. Mackay, K. L. Wooley, C. J. Hawker, *Macromolecules* **2009**, 42, 5629.
- (79) J. He, L. Tremblay, S. Lacelle, Y. Zhao, *Soft Matter* **2011**, 7, 2380.
- (80) O. Altintas, T. Rudolph, C. Barner-Kowollik, *J. Polym. Sci. Part A-Polym. Chem.* **2011**, 49, 2566.
- (81) L. Cheng, G. Hou, J. Miao, D. Chen, M. Jiang, L. Zhu, *Macromolecules* **2008**, 41, 8159.
- (82) M. Seo, B. J. Beck, J. M. J. Paulusse, C. J. Hawker, S. Y. Kim, *Macromolecules* **2008**, 41, 6413.
- (83) E. J. Foster, E. B. Berda, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6964.
- (84) T. Mes, R. van der Weegen, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 5085.
- (85) E. B. Berda, E. J. Foster, E. W. Meijer, *Macromolecules* **2010**, 43, 1430.
- (86) E. Dauty, J. S. Remy, G. Zuber, J. P. Behr, *Bioconjugate Chemistry* **2002**, 13, 831.
- (87) W. H. Stockmayer, *Die Makromolekulare Chemie* **1960**, 35, 54.
- (88) B. Chu, Q. Ying, A. Y. Grosberg, *Macromolecules* **1995**, 28, 180.
- (89) M. Li, M. Jiang, C. Wu, *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **1997**, 35, 1593.
- (90) X. J. Xu, F. X. Chen, *Langmuir* **2004**, 20, 528.
- (91) R. Festag, S. D. Alexandratos, K. D. Cook, D. C. Joy, B. Annis, B. Wunderlich, *Macromolecules* **1997**, 30, 6238.
- (92) G. D. Ji, G. Xue, J. L. Ma, C. Y. Dong, X. H. Gu, *Polymer* **1996**, 37, 3255.
- (93) J. Kumaki, *J. Polym. Sci. Part B-Polym. Phys.* **1990**, 28, 105.

- (94) C. F. Wu, C. Szymanski, J. McNeill, *Langmuir* **2006**, 22, 2956.
- (95) C. Wu, C. Szymanski, Z. Cain, J. McNeill, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12904.
- (96) S. Auer, D. Frenkel, *Nature* **2001**, 409, 1020.
- (97) S. Mann, *Biomineralization*.
- (98) S. Mann, D. D. Archibald, J. M. Didymus, T. Douglas, B. R. Heywood, F. C. Meldrum, N. J. Reeves, *Science* **1993**, 261, 1286.
- (99) S. Mann, G. A. Ozin, *Nature* **1996**, 382, 313.
- (100) S. Mann, *Nature* **1988**, 332, 119.
- (101) J. Aizenberg, A. J. Black, G. M. Whitesides, *Nature* **1999**, 398, 495.
- (102) A. Dey, G. de With, N. A. J. M. Sommerdijk, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 397.
- (103) L. Wang, G. H. Nancollas, *Dalton Transactions* **2009**, 2665.
- (104) X. Lu, Y. Leng, *Biomaterials* **2005**, 26, 1097.
- (105) J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science* **2001**, 294, 1684.
- (106) F. Nudelman, K. Pieterse, A. George, P. H. H. Bomans, H. Friedrich, L. J. Brylka, P. A. J. Hilbers, G. de With, N. A. J. M. Sommerdijk, *Nat. Mater.* **2010**, 9, 1004.
- (107) A. W. Xu, Y. R. Ma, H. Cölfen, *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 415.
- (108) S. Mann, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 781.
- (109) A. Ethirajan, K. Schoeller, A. Musyanovych, U. Ziener, K. Landfester, *Biomacromolecules* **2008**, 9, 2383.
- (110) S. Schachschal, A. Pich, H. J. Adler, *Langmuir* **2008**, 24, 5129.
- (111) M. Antonietti, M. Breulmann, C. G. Göltner, H. Cölfen, K. K. W. Wong, D. Walsh, S. Mann, *Chemistry-a European Journal* **1998**, 4, 2493.
- (112) D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov, H. Mohwald, *Chem. Mater.* **2003**, 15, 3947.
- (113) D. Walsh, J. D. Hopwood, S. Mann, *Science* **1994**, 264, 1576.
- (114) M. R. Mucalo, Y. Yokogawa, M. Toriyama, T. Suzuki, Y. Kawamoto, F. Nagata, K. Nishizawa, *J. Mater. Sci. –Mater. M.* **1995**, 6, 597.
- (115) H. Cölfen, M. Antonietti, *Langmuir* **1998**, 14, 582.
- (116) A. Shkilnyy, A. Friedrich, B. Tiersch, S. Schone, M. Fechner, J. Koetz, C. W. Schlapfer, A. Taubert, *Langmuir* **2008**, 24, 2102.
- (117) A. S. Milev, A. McCutcheon, G. S. K. Kannangara, M. A. Wilson, T. Y. Bandara, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 17304.
- (118) H. Cölfen, L. Qi, *Chemistry* **2001**, 7, 106.

- (119) S. Fujii, M. Okada, H. Sawa, T. Furuzono, Y. Nakamura, *Langmuir* **2009**, 25, 9759.
- (120) D. K. Dubey, V. Tomar, *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* **2009**, 29, 2133.
- (121) B. Palazzo, M. Iafisco, M. Laforgia, N. Margiotta, G. Natile, C. L. Bianchi, D. Walsh, S. Mann, N. Roveri, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, 17, 2180.
- (122) M. Zhang, A. Ishii, N. Nishiyama, S. Matsumoto, T. Ishii, Y. Yamasaki, K. Kataoka, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 3520.
- (123) G. Mendonca, D. B. S. Mendonca, F. J. L. Aragao, L. F. Cooper, *Biomaterials* **2008**, 29, 3822.
- (124) A. L. Boskey, *Bone Miner* **1989**, 6, 111.
- (125) A. George, A. Veis, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4670.
- (126) E. Dalas, J. K. Kallitsis, P. G. Koutsoukos, *Langmuir* **1991**, 7, 1822.
- (127) M. Tanahashi, T. Matsuda, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 34, 305.
- (128) G. Busch, E. Jaehne, X. Cai, S. Oberoi, H.-J. P. Adler, *Synthetic Metals* **2003**, 137, 871.
- (129) A. Henke, E. Jaehne, H.-J. P. Adler, *Macromol. Symposia* **2001**, 164, 1.
- (130) H. Park, E. Bae, J.-J. Lee, J. Park, W. Choi, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 8740.
- (131) J.-Y. Wach, B. Malisova, S. Bonazzi, S. Tosatti, M. Textor, S. Zürcher, K. Gademann, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 10579.
- (132) A. Zeller, A. Musyanovych, M. Kappl, A. Ethirajan, D. Markova, M. Klapper, K. Landfester, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, 2, 2421.
- (133) H. Fleisch, R. G. G. Russell, M. D. Francis, *Science* **1969**, 165, 1262.
- (134) R. G. G. Russell, M. J. Rogers, *Bone* **1999**, 25, 97.
- (135) M. Agrawal, A. Pich, N. E. Zafeiropoulos, S. Gupta, J. Pionteck, F. Simon, M. Stamm, *Chem. Mater.* **2007**, 19, 1845.
- (136) M. Agrawal, A. Pich, S. Gupta, N. E. Zafeiropoulos, P. Formanek, D. Jehnichen, M. Stamm, *Langmuir* **2010**, 26, 526.
- (137) H. Tamai, H. Yasuda, *J. Col. Interf. Sci.* **1999**, 212, 585.
- (138) S. Schachschal, A. Pich, H. J. Adler, *Col. Polym. Sci.* **2007**, 285, 1175.
- (139) C. E. Chen, J. Geng, F. Pu, X. J. Yang, J. S. Ren, X. G. Qu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 882.
- (140) X. Q. Yang, J. J. Grailer, I. J. Rowland, A. Javadi, S. A. Hurley, V. Z. Matson, D. A. Steeber, S. Q. Gong, *ACS Nano* **2010**, 4, 6805.
- (141) K. S. Soppimath, L. H. Liu, W. Y. Seow, S. Q. Liu, R. Powell, P. Chan, Y. Y. Yang, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, 17, 355.

- (142) J. K. Oh, D. I. Lee, J. M. Park, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 1261.
- (143) C. E. Ashley, E. C. Carnes, G. K. Phillips, D. Padilla, P. N. Durfee, P. A. Brown, T. N. Hanna, J. Liu, B. Phillips, M. B. Carter, N. J. Carroll, X. Jiang, D. R. Dunphy, C. L. Willman, D. N. Petsev, D. G. Evans, A. N. Parikh, B. Chackerian, W. Wharton, D. S. Peabody, C. J. Brinker, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 389.
- (144) D. W. Green, S. Mann, R. O. C. Oreffo, *Soft Matter* **2006**, *2*, 732.
- (145) C. E. Fowler, M. Li, S. Mann, H. C. Margolis, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3317.
- (146) W. H. He, J. H. Tao, H. H. Pan, X. R. Xu, R. K. Tang, *Chem. Lett.* **2010**, *39*, 674.
- (147) K. K. Perkin, J. L. Turner, K. L. Wooley, S. Mann, *Nano Letters* **2005**, *5*, 1457.
- (148) H. J. Lee, S. E. Kim, I. K. Kwon, C. Park, C. Kim, J. Yang, S. C. Lee, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 377.
- (149) H. T. Schmidt, A. E. Ostafin, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 532.
- (150) A. W. Perriman, D. S. Williams, A. J. Jackson, I. Grillo, J. M. Koomullil, A. Ghasparian, J. A. Robinson, S. Mann, *Small* **2010**, *6*, 1191.
- (151) G. Jutz, A. Boker, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 4299.
- (152) E. D. Spoerke, S. G. Anthony, S. I. Stupp, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 425.
- (153) A. Verch, H. Hahn, E. Krause, H. Cölfen, H. G. Börner, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8938.
- (154) H. T. Schmidt, B. L. Gray, P. A. Wingert, A. E. Ostafin, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4942.
- (155) S. C. G. Leeuwenburgh, J. Jo, H. A. Wang, M. Yamamoto, J. A. Jansen, Y. Tabata, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2653.
- (156) W. Babel, *CHIUZ* **1996**, *30*, 86.
- (157) A. Veis, *Macromolecular Chemistry of Gelatin* 1965; Vol. 34, p 223ff.
- (158) M. Epple, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, V. Sokolova, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 18.
- (159) V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2008**, *47*, 1382.
- (160) A. Zeller, A. Musyanovych, M. Kappl, A. Ethirajan, M. Dass, D. Markova, M. Klapper, K. Landfester, *ACS Appl. Mater. Interf.* **2010**, *2*, 2421.
- (161) A. Ziegler, K. Landfester, A. Musyanovych, *Col. Polym. Sci.* **2009**, *287*, 1261.
- (162) G. H. Nancollas, W. Wu, *J. Crystal Growth* **2000**, *211*, 137.
- (163) L. J. Wang, G. H. Nancollas, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4628.
- (164) M. Leskiv, A. L. C. Lagoa, H. Urch, J. Schwiertz, M. E. M. da Piedade, M. Epple, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 5478.

- (165) E. D. Eanes, Gillesse.Ih, A. S. Gosner, *Nature* **1965**, 208, 365.
- (166) D. Gebauer, A. Völkel, H. Cölfen, *Science* **2008**, 322, 1819.
- (167) D. Gebauer, H. Cölfen, A. Verch, M. Antonietti, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 435.
- (168) R. Kumar, K. H. Prakash, P. Cheang, K. A. Khor, *Langmuir* **2004**, 20, 5196.
- (169) J. L. Meyer, G. H. Nancollas, *Archives of Oral Biology* **1972**, 17, 1623.
- (170) C. Liu, Y. Huang, W. Shen, J. Cui, *Biomaterials* **2001**, 22, 301.
- (171) L. M. Rodriguez-Lorenzo, M. Vallet-Regi, *Chem. Mater.* **2000**, 12, 2460.
- (172) B. Madivala, S. Vandebril, J. Fransaer, J. Vermant, *Soft Matter* **2009**, 5, 1717.
- (173) P. Decuzzi, B. Godin, T. Tanaka, S. Y. Lee, C. Chiappini, X. Liu, M. Ferrari, *J. Control. Rel.* **2010**, 141, 320.
- (174) X. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Tang, J. He, *Biomaterials* **2010**, 31, 438.
- (175) T. Kokubo, H.-M. Kim, M. Kawashita, *Biomaterials* **2003**, 24, 2161.
- (176) K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 6288.
- (177) K. B. Djagny, Z. Wang, S. Y. Xu, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2001**, 41, 481.
- (178) L. Lobo, *J. Col. Interf. Sci.* **2002**, 254, 165.
- (179) V. V. Rodin, V. N. Izmailova, *Col. Surf. A* **1996**, 106, 95.
- (180) H. Caldararu, G. S. Timmins, B. C. Gilbert, *PhysChemPhys* **1999**, 1, 5689.
- (181) S. H. Yu, H. Colfen, *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2124.
- (182) H. Tlatlik, P. Simon, A. Kawska, D. Zahn, R. Kniep, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1905.
- (183) R. I. Kühnle, D. Gebauer, H. G. Börner, *Soft Matter* **2011**, 7, 9616.
- (184) S. Radin, J. T. Campbell, P. Ducheyne, J. M. Cuckler, *Biomaterials* **1997**, 18, 777.
- (185) A. Dion, B. Berno, G. Hall, M. J. Filiaggi, *Biomaterials* **2005**, 26, 4486.
- (186) U. Gbureck, E. Vorndran, J. E. Barralet, *Acta Biomaterialia* **2008**, 4, 1480.
- (187) J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York und London: 2006.
- (188) D. Tleugabulova, A. M. Duft, Z. Zhang, Y. Chen, M. A. Brook, J. D. Brennan, *Langmuir* **2004**, 20, 5924.
- (189) B. Valeur, *Molecular fluorescence: principles and applications*. Wiley-VCH: 2002, pp 147.

9 Danksagung

10 Lebenslauf



Promotion

10/2008 – 02/2012	Promotion am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz
-------------------	--

Studium

02/2008 – 09/2008	Diplomarbeit durchgeführt in der Abteilung Makromolekulare Chemie und organische Materialien (Universität Ulm)
10/2003 – 09/2008	Studium der Chemie an der Universität Ulm Abschluss: Diplom-Chemiker

Schule

06/2003	Abitur
09/1995 – 06/2003	Gymnasium in der Glemsaue, Ditzingen

11 Veröffentlichungen

- 2012 R. Sauer, P. Froimowicz, K. Schöller, J. Cramer, S. Ritz, V. Mailänder, K. Landfester, *Design, synthesis, and miniemulsion polymerization of new phosphonate surfmers and application studies of the resulting nanoparticles as model systems for biomimetic mineralization and cellular uptake*, accepted
- Katrin Schöller, Anitha Ethirajan, Katharina Landfester
Smart Release using CaP/Gelatin Nanocapsules prepared via Interfacial Mineralization (in preparation)
- Katrin Schöller, Andrey Turshatov, Katharina Landfester
Preparation of Single-Chain Polymeric Nanoparticles and their Characterization via Fluorescence Spectroscopy (in preparation)
- 2011 Katrin Schöller, Anitha Ethirajan, Anke Zeller, Katharina Landfester
Biomimetic Route to Calcium Phosphate Coated Polymeric Nanoparticles: Influence of Different Functional Groups and pH
Macromol. Chem. Phys. **2011**, 212, 1165.
- 2009 Sonja Theisinger, Katrin Schöller, Barry Osborn, Manish Sarkar, Katharina Landfester, *Encapsulation of a Fragrance via Miniemulsion Polymerization for Temperature-Controlled Release*, Macromol. Chem. Phys. **2009**, 210, 411.
- 2008 Anitha Ethirajan, Katrin Schöller, Anna Musyanovych, Ulrich Ziener, Katharina Landfester, *Synthesis and Optimization of Gelatin Nanoparticles Using the Miniemulsion Process*, Biomacromolecules **2008**, 9, 2383.

Eingeladene Vorträge

- 05/2010 *Hydroxylapatit/Polymer-Hybridpartikel kontrollierter Morphologie durch die Verwendung Oberflächen-funktionalisierter Polymerpartikel als Template*
BASF, Ludwigshafen, Deutschland

Konferenzen/Posterbeiträge

- 09/2011 *Functional hybrid nanoparticles via biomimetic mineralization at the interface*
Polymers in Medicine and Biology 2011, Santa Rosa, USA
- 06/2009 *Biomimetic Mineralization using Polymeric Nanoparticles as Templates*
25 Jahre Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz

12 Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Januar 2012 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz erstellt.

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

Mainz, den 19.01.2012

Katrin Schöller