

## 2 Methoden

### 2.1 2-D PAGE

Die 2-D PAGE ist eine sehr gut geeignete Methodik die Vielfältigkeit von Proteinen zu erfassen. Beschrieben wurde sie erstmals 1975 zur Auflösung der Proteine in *Escherichia coli* (O'Farrell 1975). Sie ermöglicht die Auftrennung vieler unterschiedlicher Proteine nebeneinander mit großer Sensitivität. Rein theoretisch ist es möglich 18.000 Proteine nebeneinander aufzutrennen (Blunk 1994). Die Trennung der Proteine erfolgt nach zwei voneinander unabhängigen Parametern:

1. dem isoelektrischen Punkt (pI)
2. der Molmasse eines Proteins

Als amphotere Moleküle besitzen Proteine einen isoelektrischen Punkt. Das bedeutet, dass bei einem bestimmten pH-Wert das Proteinmolekül nach außen eine neutrale Ladung besitzt, da sich die Ladungen im Molekül gegenseitig aufheben. Während der Trennung in der 1. Dimension wandert ein Proteinmolekül im elektrischen Feld über einen pH-Gradienten. Am pI bleibt es dann stehen. Dieser Vorgang wird man als „isoelektrische Fokussierung“ (IEF) bezeichnet.

In der zweiten Dimension lässt man die Proteine, nach Behandlung mit SDS, über ein Polyacrylamidgel wandern, dessen Porenstruktur sich kontinuierlich verkleinert. Bei einer bestimmten Porenweite, die ihrer Molekülgröße entspricht, bleiben die Proteine in der Gelmatrix hängen. Diese Trennung in der 2. Dimension bezeichnet man auch als SDS-PAGE. Sie wurde 1967 von (Shapiro, Vinuela et al. 1967) eingeführt.

Entscheidend für die hochauflösende 2-D PAGE ist, dass alle Proteine in Lösung gebracht werden. Dazu ist es notwendig, die Proteine vorher zu denaturieren

(O'Farrel 1975). Dies geschieht durch Anwendung von Wärme sowie dem Zusatz von denaturierenden Chemikalien wie Natriumlaurylsulfat (SDS) und Dithioerythritol (DTE). Zur zusätzlich Hydrophilisierung werden Harnstoff und Thioharnstoff zugesetzt.

### **2.1.1 Probenaufbereitung und Inkubation**

Die Aufbereitung der Proben erfolgte zumeist mit citratstabilisiertem humanem Vollplasma, das vom Blutspendedienst des Deutsche Roten Kreuzes in Berlin bezogen wurde.

Das für eine Vergleichsstudie zwischen Human- und Rattenplasma verwendete Rattenplasma wurde aus Rattenblut hergestellt, das von Herrn Prof. Oliver Liesenfeld vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité zur Verfügung gestellt wurde. Hierzu wurde das entnommene Rattenblut in citratbeimpfte Monovetten gefüllt und anschließend bei  $4.800 \times g$  10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und eingefroren.

Zur Inkubation wurden die entsprechenden Partikelsuspensionen in Inkubationsröhrchen vorgelegt und mit dem aufgetauten und auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmten Plasma übergossen. Das Gemisch wurde danach 10 Sekunden mit dem Vortexer gemischt und dann 5 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert.

### **2.1.2 Partikelseparation**

Die Trennung der mit Protein beladenen Partikel vom Inkubationsmedium erfolgte durch Zentrifugation mit einer Heraeus Biofuge 22R bei  $22^{\circ}\text{C}$ . Die übrigen Zentrifugationsbedingungen wurden den jeweiligen zu untersuchenden Partikeln angepasst. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Die Partikel wurden danach in bidestilliertem Wasser (erhalten durch Umkehrosiose,  $\kappa \sim 5 \mu\text{S}/\text{cm}$ , Milli-Q-System, Millipore, Eschborn) redispergiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Partikel noch dreimal gewaschen.

Die Separation zwischen den einzelnen Waschschrritten erfolgte erneut durch Zentrifugation. Während eines Waschschrttes wurden die Partikel zusätzlich im Ultraschallbad 5 min redispergiert, um während der Zentrifugation eventuell entstandene Agglomerate aufzulösen. Es muss hierbei unbedingt darauf geachtet werden, dass das Sediment durch zu extrem gewählte Zentrifugationsbedingungen nicht zusammen klebt. Diese Gefahr besteht besonders bei Nanopartikeln, die auf ihren Oberflächen Polyethylenglykol-Gruppen besitzen (PEGylierte Nanopartikel). Die Partikel müssen ohne größere Kraftaufwendung redispergierbar sein.

### **2.1.3 Proteindesorption**

Nach erfolgter Aufreinigung wurden die Partikel mit 10 µl einer Lösung (Lösung F) versetzt, die 10% SDS und 2,3% DTE enthält. Anschließend wurde das geschlossene Eppendorf-Gefäß 5 min bei 95°C im Wasserbad erhitzt.

Durch den Zusatz von SDS werden die Proteine vom Partikel abgelöst. Zusätzlich wird durch die Hitzeeinwirkung und DTE die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine gespalten. Nach dieser Behandlung wurde eine zweite Lösung (Lösung D) zugegeben, um die entstandenen Proteinfragmente zu solubilisieren (Retzinger, Chandler et al. 1992). Die exakten Zusammensetzungen der Lösungen finden sich im Anhang. Das in der Lösung D enthaltene CHAPS bewirkt eine Spaltung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinen. Außerdem bildet es Mischmizellen mit dem überschüssigen SDS. Überschüssiges, an den Proteinen adsorbiertes, SDS würde den Proteinen eine „falsche“ Ladung verleihen und die Auftrennung in der 1. Dimension unmöglich machen. Der Zusatz von Harnstoff bewirkt eine Hydrophilisierung der Proteine und stellt somit sicher, dass die Proteine vollständig im zu untersuchenden Medium gelöst sind.

### **2.1.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Wie bereits in Kapitel 2.1. erwähnt, werden die Proteine während der IEF nach ihren isoelektrischen Punkten separiert. Als Trennungsmittel wurden sog. „Immobiline™ DryStrips pH 3-10 NL, 18 cm“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala,

Schweden) verwendet (Gessner 2001). Diese Trennung erfolgt über einen pH-Bereich von 3 - 10. Der pH-Gradient wurde hier in eine Gelmatrix einpolymerisiert. Durch die Fixierung der einzelnen Ampholyte in der Matrix sind die Streifen während der gesamten Elektrophorese sehr stabil. Der Zusatz „NL“ steht für „nicht linear“. Das bedeutet, dass der pH-Bereich zwischen pH 5 und pH 8 aufgefächert wurde, um hier exaktere Trennungen zu erreichen, da viele Proteine hier ihren pI besitzen.

Die Streifen werden vom Hersteller gefriergetrocknet und tiefgekühlt geliefert. Zur weiteren Verarbeitung ist es erforderlich, sie zunächst zu rehydratisieren. Die Zusammensetzung der Rehydratisierungslösung befindet sich im Anhang. Um eine ausreichende Quellung der Streifen zu gewährleisten, mischt man die erhaltene Prüflösung in (Kapitel 2.1.3.) mit der Rehydratisierungslösung zu einem Gesamtvolumen von 350 µl und legt die Streifen auf ein eigens dafür vorgesehenes Tablett. Anschließend wird mit dünnflüssigem Paraffin überschichtet, sodass die Streifen komplett bedeckt sind. Die Streifen müssen nun mindestens 8 Stunden quellen. Danach werden sie der Elektrophorese zugeführt.

Die Trennung in der 1. Dimension erfolgt bei 20°C, const. 150 mA und 300 W bei fünf unterschiedlichen Spannungen mit einem Netzteil der Firma Consort (Turnhout, Belgien) in einer Multiphorell (Amersham Pharmacia Biotech) nach folgendem Zeitschema:

0 h	-	0,5 h	0,15 kV
0,5 h	-	1,5 h	0,3 kV
1,5 h	-	2,5 h	1,5 kV
2,5 h	-	3,5 h	3,5 kV
3,5	-	6,5 h	5 kV

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Streifen in Folie eingeschweißt und bei -70°C tiefgefroren.

### 2.1.5 Herstellung der Gele für die SDS-PAGE

Grundbaustein für die Gele ist das Monomer Acrylamid, das durch radikalische Polymerisation ein Gelgerüst ausbildet.

Zur Herstellung der Gele werden eine 9 und eine 16-%ige wässrige Lösung hergestellt. Diese Lösungen enthalten außerdem Na-thiosulfat, TRIS-Puffer und N,N'-methylen-bis-acrylamid (BIS) (Abbildung 1) als Crosslinker. Der Zusatz von Thiosulfat soll eventuell vorhandene Elektrolyte komplexieren und dadurch die Hintergrundfärbung der Gele minimieren. Die Firma SERVA bietet stabile Fertiglösungen mit einem Gemisch aus Acrylamid und BIS an, die nur noch mit Wasser und den anderen Stammlösungen gemischt werden müssen. Als Radikalstarter wurden 0,11 % Ammoniumpersulfat und TEMED zugesetzt.

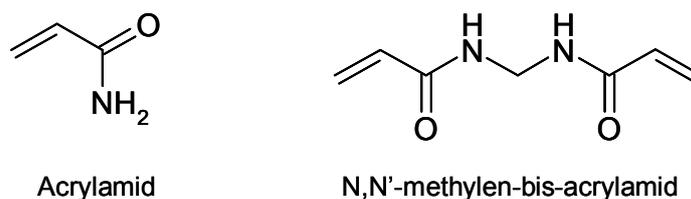


Abbildung 1: Strukturformeln von Acrylamid und BIS

Die Lösungen wurden nun in den Gradientenformer gefüllt. Dieser Gradientenformer besteht aus zwei miteinander kommunizierenden Röhren, wobei sich an einem dieser Zylinder ein Ausfluss befindet. An diesem Ausfluss wird ein Schlauch befestigt, der in die Gießkammer mit den Gelplatten mündet. In die Röhre mit dem Ausfluss wird die geringer konzentrierte Lösung eingefüllt. Durch das Abfließen der niedrig konzentrierten und Nachfluss der konzentrierten Lösung wird die Lösung nach und nach aufkonzentriert. Durch die Dichteunterschiede der entstehenden Acrylamidlösungen wird in der Gelkammer die jeweils niedrig konzentriertere Lösung immer weiter nach oben gedrückt, sodass sich ein Gradient unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen und damit unterschiedlicher Porengröße über das Gel hinweg ausbildet. Nachdem die Gelkammer komplett gefüllt ist, wird die Oberfläche

der Gele mit n-Butanol versiegelt und die Kammer mit Parafilm verschlossen. Nach 3-4 Stunden sind die Gele durchpolymerisiert und werden mit TRIS-Puffer pH 8,8 überschichtet. Auf diese Weise sind sie im Kühlschrank bis zu vier Wochen haltbar. Die entstandenen Gele haben eine Größe von 16 cm x 16 cm bei einer Dicke von 1,5 mm. Die Porengrößen erstrecken sich über das Gel logarithmisch von 6 kDa bis 250 kDa.

### **2.1.6 Äquilibration und SDS-PAGE**

Bei der SDS-PAGE erfolgt die Trennung durch die Größe der Moleküle. Um dies zu gewährleisten müssen die in den IPG-Streifen befindlichen Proteine zunächst äquilibriert werden. Unter Äquilibration versteht man das Überdecken der Eigenladung eines jeden Proteins mit SDS. Größe und Ladung eines Proteins sind nicht proportional zueinander. Ohne Behandlung mit SDS würden die Proteine im Gel unterschiedlich schnell, bzw. überhaupt nicht wandern, da sie in den Streifen nach wie vor am pI neutrale Ladungen besitzen.

Die Äquilibration besteht aus zwei Schritten:

Im ersten Schritt werden die IPG-Streifen in eine Lösung aus 3% SDS und 2% DTE gelegt und 15 min auf einem Schüttler (Bühler-Swip KS-10, Bühler, Tübingen) bewegt. Der Zusatz von DTE soll garantieren, dass alle Disulfidbrücken gespalten bleiben.

Im zweiten Schritt werden die Streifen mit einer Lösung bestehend aus 2% SDS und 4% Iodoacetamid versetzt und 20 min auf dem Rüttler inkubiert. Das Iodoacetamid dient dazu, die freien Mercaptogruppen zu alkanisieren.

Das SDS bindet an die hydrophoben Bereiche der Proteine. Die lipophile Laurylkette lagert sich an die Proteine an, während die negativ geladene Sulfonsäuregruppe nach außen ragt. Es entsteht so eine anionische Mizelle mit einem konstanten Masse-Nettoladungs-Verhältnis, die aufgrund der länglichen Struktur der Fragmente eine elliptische Form besitzt. Pro Gramm Protein werden zwischen 1,2 und 1,4 g SDS adsorbiert (Reynolds and Tanford 1970; Westermeier 1990)

Nach erfolgter Äquilibration werden die Gelstreifen auf die Oberseite der Plattengele aufgelegt und mit heißer 0,5%iger Agarose-Lösung fixiert. Die Fixierlösung enthält einen Zusatz von 0,5% Bromphenolblau, das während der Elektrophorese vor den Proteinen wandert und die Fließfront anzeigt.

Während der gesamten Elektrophorese wandern die Proteine nun mit konstanter Geschwindigkeit bis sie bei einer gewissen, ihrer Molekülgröße entsprechenden, Porenweite im Gelgerüst hängen bleiben.

Es wurden maximal acht Gele nebeneinander der SDS-PAGE zugeführt. Die Elektrophorese wurde in speziellen Elektrophoresekammern (Protean II Multi Cell) und mit einem PowerSupply 1000/500 der Firma BioRad, München durchgeführt. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 40 mA gewählt. Die Spannung stieg während der Elektrophorese von ca. 130 V auf 450 V an.

### **2.1.7 Silberfärbung**

Nach der Auftrennung der Proteine im Gel müssen die Proteine nun durch Anfärben sichtbar gemacht werden. Dafür stehen eine ganze Reihe von Färbemethoden zur Verfügung. So ist es beispielsweise möglich, Gele mit Coomassie Blue oder Eosin (Lin, Fan et al. 1991) anzufärben. Hiermit können Proteine bis zu einer Grenze von 100 ng (Coomassie Blue), bzw. 10 ng (Eosin) detektiert werden.

Die größte Sensitivität wird mit der Silberfärbung (Merril, Switzer et al. 1979; Merrill, Goldman et al. 1982) erreicht. Durch die Silberfärbung können Proteine bis zu einer Grenze von 0,05 bis 0,1 ng/mm<sup>2</sup> auf einem Pherogramm nachgewiesen werden. Die Detektionsgrenze ist damit um den Faktor hundert höher gegenüber der auch weit verbreiteten Coomassie Färbung. Während bei der Färbung mit Coomassie und Eosin lediglich die hydrophoben Bereiche in den Gelen durch Adsorption hydrophober Färbereagenzien sichtbar gemacht werden, so beruht die Silberfärbung auf einer Kaskade chemischer Reaktionen, an deren Ende die Reduktion von Silberionen zu metallischem Silber steht.

Zunächst werden die Proteine in der Gelmembran fixiert. Dies wird erreicht, indem die Gele in eine Lösung aus Ethanol/Essigsäure eingelegt werden. Anschließend folgt die Behandlung mit Glutaraldehyd und Naphthalindisulfonsäure. Diese lagern sich an die freien Aminogruppen der Proteine an und bilden dort reaktive Aldehyde (Rabilloud 1990), die die Proteine für die Färbung sensitivieren. Anschließend werden die Gele in ammoniakalische Silbernitratlösung eingelegt. Dadurch wandern die Silberionen in die Gelmatrix. Silberionen, die sich in der Nähe der Proteine befinden, bilden Komplexe mit den Glu- Asp- und Cys-Resten und werden teilweise zu metallischem Silber reduziert, während die Ionen, die sich frei im Gel befinden weiterhin als Ionen vorliegen. Im letzten Schritt wurden die Gele nun in einer Lösung aus Formaldehyd und Zitronensäure entwickelt. Hierbei werden die in der Gelmatrix befindlichen Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Die in der Nähe der Proteine befindlichen, bereits reduzierten, Silbermoleküle dienen hier als Keime für die noch nicht reduzierten Ionen. Dadurch werden die Silberionen, die an die Proteine adsorbiert sind schneller reduziert als die frei im Gel befindlichen übrigen Ionen. Die Regionen, in denen sich Protein im Gel angesammelt hat, werden je nach Proteinmenge braun bis schwarz eingefärbt. Der Färbeprozess wird gestoppt durch Einlegen der Gele in 5%ige Essigsäurelösung. Ein ausführliches Protokoll der Färbung befindet sich im Anhang (Kap. 9.3).

Neben dem großen Aufwand besteht der Nachteil der Silberfärbung darin, dass danach die Proteine nicht mehr weiter untersucht werden können. Das Blotting silbergefärbter Proteine ist beispielsweise nicht mehr möglich. Auch eine weitere Analyse durch Ausstanzen der Proteine aus dem Gel, wie für MALDI-TOF-MS erforderlich, ist unmöglich.

### **2.1.8 Gelauswertung**

Nach erfolgter Silberfärbung ist es notwendig die Gele zu digitalisieren. Hierzu wurden die Gele mit einem speziellen Scanner, einem Laser Densitometer (Molecular Dynamics, Krefeld), eingelesen. Das Gerät ist mit einem Helium-Neon-Laser ausgestattet (Leistung 1mW) mit einer Wellenlänge von 632 nm und einer Strahlbreite von 100 µm. Densitometer teilen das Gel in kleine Abschnitte ein und messen die optische Dichte von benachbarten Gelabschnitten, wobei die Intensität

eines durch die Probe abgeschwächten Strahls mit der eines Referenzstrahles verglichen wird.

Zur Auswertung der Gele wurde die Software MELANIE 3 verwendet. Diese Software berechnet die Menge der im Gel befindlichen Proteine in der dimensionslosen Einheit „Volume“. Die Menge an Protein wird berechnet aus der optischen Dichte der Pixel eines Spots sowie dessen Fläche. Für mehr Informationen zur Theorie von MELANIE 3 sei auf (Appel, Hochstrasser et al. 1991) und (Lemkin and Lipkin 1981) verwiesen.

### **2.1.9 Archivierung der Gele**

Die Haltbarkeit der Gele in wässriger Lösung ist sehr stark begrenzt. Um Gele für einen längeren Zeitraum zu archivieren, ist es nötig, die Gele zu trocknen. Dies erfolgte mit einem Geltrockner (Model 583 Gel Dryer, BioRad, München). Dieser Geltrockner ist zusätzlich an eine Vakuumpumpe angeschlossen, um den Gelen die Feuchtigkeit zu entziehen. Vor dem Einlegen in den Geltrockner werden die Gele eine Stunde lang in eine spezielle Lösung eingelegt. Die Rezeptur der Lösung findet sich im Anhang. Glycerol dient hier als Feuchthaltemittel. Während des Einlegens begannen die Gele leicht zu schrumpfen. Die Dauer des Trocknungsprozesses betrug 2,5 Stunden bei 80°C.

### **2.1.10 Referenzgele und Datenbanken**

Die qualitative Auswertung der 2-D Pherogramme wurde mit den gängigen Referenzkarten vorgenommen, die in der Literatur verfügbar sind (Anderson and Anderson 1991; Golaz, Hughes et al. 1993). Darüber hinaus ist das Arbeiten mit Online-Datenbanken sehr hilfreich, da sie ständig aktualisiert werden. Als erste Adresse sei hier *www.expasy.ch* der Universität Genf, Schweiz, genannt.

## 2.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Partikelgrößenanalytik wurde durchgeführt mit der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS). Bei der PCS handelt es sich um „dynamisches Streulichtverfahren“, mit dem es möglich ist, Partikel im Messbereich von 5 nm bis maximal 3-5  $\mu\text{m}$ , je nach Dichte der zu vermessenden Partikel, zu erfassen. Gemessen werden die Schwankungen der Intensität eines gestreuten Laserstrahls über einen gewissen Zeitraum (Taktzeit  $\tau$ ) im Winkel von  $90^\circ$ . Durch die Bewegung der zu vermessenden Teilchen, die ihre Ursache in der Brown'schen Molekularbewegung (BM) der Wassermoleküle hat, kommt es zu Schwankungen der Intensität des gestreuten Lichtes. Da kleine Partikel der BM stärker unterliegen als große, kommt es zu größenabhängigen Änderungen der Intensität. Aus diesen Schwankungen wird mit Hilfe eines Korrelators eine Autokorrelationsfunktion erstellt. Danach wird eine theoretische Korrelationsfunktion  $g(\tau)$  angepasst. Die erstellte Korrelationsfunktion wird nun durch Fourier-Transformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt. Daraus lässt sich nun mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung der Partikelradius errechnen. Die PCS liefert zwei Werte:

- den mittleren Partikeldurchmesser
- den Polydispersitätsindex (PI)

Der PI ist ein Maß für die Güte des entstandenen Messwertes. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Der PI errechnet sich aus der Abweichung zwischen der Autokorrelationsfunktion und der angepassten Korrelationsfunktion  $g(\tau)$ . Liegen die Werte des PI unter 0,1, so kann man von einer monodispersen Partikelverteilung ausgehen. Eine enge Verteilung liegt zwischen 0,1 und 0,2 vor. Zwischen 0,2 und 0,5 ist die Streuung breit, jedoch noch tolerabel. Hat der PI einen Wert von über 0,5 angenommen, so muss man die Messung als nicht auswertbar betrachten. Alle Messungen wurden durchgeführt an einem Zetasizer 4 der Firma Malvern Instruments, England. Nähere Informationen über die Theorie und Durchführung der PCS finden sich bei (Müller 1991; Müller and Schuhmann 1996).

## 2.3 Laserdiffraktometrie

Die Laserdiffraktometrie ist eine weitere Methode zur Partikelgrößenanalytik im Submikronbereich. Das Verfahren beruht auf der Beugung des Lichtes an dispergierten Teilchen. Von einem Helium-Neon-Laser wird Licht der Wellenlänge 632 nm emittiert. Der Lichtstrahl wird durch eine Linse aufgeweitet und trifft auf die Messzelle. Hier wird er gebeugt und trifft auf eine Fourier-Linse. Diese sorgt dafür, dass die Partikel unabhängig von ihrer in der Messzelle befindlichen Position immer auf derselben Fläche eines Multielement-Detektors abgebildet werden. Die Intensität wird an den ringförmig angebrachten Elementen des Detektors registriert und zur Auswertung an einen Computer weitergeleitet. Mit Hilfe der sogenannten PIDS-Technologie (Polarization Intensity Differential Scattering-Technologie) kann ein Größenmeßbereich von 0,04  $\mu\text{m}$  bis 2000  $\mu\text{m}$  mit einer Messung abgedeckt werden. Nähere Informationen zur LD finden sich bei (Müller and Schuhmann 1996)).

## 2.4 Zetapotentialmessungen

Die Messung des Zetapotentials erfolgte mittels Laser-Doppler-Anemometrie. Dies ist ein Verfahren zur Messung von Partikelgeschwindigkeiten aufgrund der Streuung von Laserlicht. Geladene Teilchen bewegen sich im elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Dabei ist die Geschwindigkeit des geladenen Partikels proportional zur Feldstärke. Es wird nun eine Feldstärke angelegt, bei der die Partikel so stark beschleunigt werden, dass sie nahezu ihre komplette diffuse Schicht abstreifen. Bei der Messung passieren die Partikel zwei sich kreuzende Laserstrahlen, die von einem Helium-Neon-Laser ausgestrahlt werden und streuen das Licht. Es wird nun lediglich das gestreute Licht von den Partikeln gemessen, die diesen Kreuzungsbereich passieren. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Photomultipliers. Aufgrund des Dopplereffektes ist die Frequenz des gestreuten Lichtes anders als die Frequenz des ursprünglichen Lichtstrahls. Die Größe der Frequenzverschiebung ist proportional zur Partikelgeschwindigkeit und wird bestimmt. Nach Erstellen einer Autokorrelationsfunktion durch den Korrelator und einer Fourier-Transformation erhält man ein Frequenzspektrum, welches die

Frequenzverschiebung beschreibt und aus dem die Teilchengeschwindigkeit errechnet werden kann. Weitere ausführliche Informationen liefert (Müller 1996).

Alle Messungen wurden am Zetasizer 4 durchgeführt. Da das Zetapotential erheblich von unterschiedlichsten Faktoren wie pH-Wert oder Elektrolytkonzentration abhängig ist, ist es nötig gewisse Standardprotokolle einzuhalten. Daher wurde jede Messung bei einem pH-Wert von 6,5, einer Ionenstärke von 50  $\mu\text{S}$  (NaCl) und einer Temperatur von 25°C durchgeführt.

## 2.5 Bengalrosaadsorption

Die Bestimmung des Bengalrosaverteilungskoeffizienten (PQ) ist ein Verfahren, dass zur Bestimmung der Oberflächenhydrophobie herangezogen wird (Davis, Douglas S. et al. 1986; Müller 1991). Das Fluoresceinderivat Bengalrosa löst sich gut in Wasser und hat eine große Affinität zu hydrophoben Oberflächen. Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten zwischen dem Messmedium und einer Partikeloberfläche wird zunächst eine Bengalrosa-Stammlösung hergestellt. Die Konzentration der Stammlösung sollte je nach Oberflächenbeschaffenheit der Partikel zwischen 40  $\mu\text{g/ml}$  bis 120  $\mu\text{g/ml}$  liegen.

Zur Analytik der Partikel wird nun eine Verdünnungsreihe der zu vermessenden Suspension erstellt. Je 500  $\mu\text{l}$  Nanosuspension werden mit 500  $\mu\text{l}$  Stammlösung versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Partikel 2 Stunden bei 25.500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 542,7 nm vermessen (Uvikon 940, Kontron Instruments, Eching).

Der Verteilungskoeffizient (PQ) errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$\text{PQ} = \frac{\text{Menge Bengalrosa auf Partikeln}}{\text{Menge Bengalrosa im Medium}}$$

Der PQ wird nun als Funktion der Partikeloberfläche in einem Koordinatensystem aufgetragen. Die Verbindung der einzelnen Werte ergibt eine Gerade, deren Steigung ( $\text{ml}/\text{m}^2$ ) ein Maß für die Hydrophobie darstellt. Je steiler die Gerade ansteigt, desto hydrophober ist die Partikeloberfläche.

### **2.6 Bestimmung der Oberflächenladungsdichte**

Die Bestimmung der Oberflächenladungsdichte erfolgte mittels Bestimmung der Strömungspotentiale der gescherten Dispersion. Ein Strömungspotential bildet sich immer dann aus, wenn eine Flüssigkeit unter Druck an einer Feststoffoberfläche vorbeifließt. Mit der Flüssigkeit werden Ladungen aus der Kapillarwand mit dem Flüssigkeitsstrom fort getragen, sodass es zum Aufbau eines elektrischen Feldes kommt.

Das nach Ausbildung eines Gleichgewichtes gemessene Potential wird als Strömungspotential bezeichnet. Das Strömungspotential wurde gemessen in einem Partikelladungsdetektor der Firma MÜTEK, Hersching. Darin erfolgte die Titration mit entgegengesetzt geladenen grenzflächenaktiven Substanzen Polydiallyldimethylammoniumchlorid oder Kaliumpolyvinylsulfat (Paulke, Möglich et al. 1995). Das Potential wurde bis zum Ladungsnullpunkt titriert. Der Endwert entspricht einer Bedeckung von 100% der Oberfläche mit gleichsinnig geladenen Gruppen. Er hängt vom jeweiligen geometrischen Platzbedarf einer solchen Gruppe auf der Oberfläche ab. Im Prinzip werden bei der Titration die Elementarladungen addiert und dann auf die in der Probe vorhandene Oberfläche bezogen. Näheres zu diesem Verfahren ist in (Müller and Schuhmann 1996) beschrieben.