

Monoschichten funktioneller Cellulosederivate als Schnittstellen zu biologischen Systemen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

von

Diplom-Chemiker

Claudiu-Nico Bordeanu

Saarbrücken

2005

Tag des Kolloquiums:

Dekan: Prof. Dr. K. Hegetschweiler

Berichtserstatter: Prof. Dr. G. Wenz
Prof. Dr. K. Jacobs

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2001 bis April 2005 am Institut für Organische Makromolekulare Chemie der Universität des Saarlandes unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Wenz angefertigt.

Für Adela und meinen Eltern

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Synthese wasserlöslicher funktioneller Cellulosederivate und die Anwendung deren Monoschichten auf Gold (Au), Silber (Ag) und Silizium (Si)-Oberflächen zum Aufbau von Immun- bzw. Enzymsensoren.

Die hergestellten wasserlöslichen Cellulosederivate besitzen zwei Funktionalitäten: zu einem *Thioankergruppen* (Thioether, Thiosulfate) für die Anbindung an Gold-, und Silberoberflächen, zum anderen *reaktive Gruppen* für die Anbindung an Siliziumoberflächen bzw. der Biokomponente.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Synthesen der Thioether- und Thiosulfat-carboxymethylcellulosen, *MTh-CMC* respektiv *HTSHP-CMC*, hinsichtlich der Regioselektivität, Erhöhung der Anzahl an Thioankergruppen und Reproduzierbarkeit der Synthesen, optimiert. Darüber hinaus wurde eine verbesserte Methode zur Synthese der Bisthiosulfat-carboxymethylcellulose *TSHP-CMC* entwickelt.

Ausgehend von der CMC und den drei Thio-CMC Derivaten konnten reaktive Derivate mit *anionischen* (*MCT*), *kationischen* (*EDC* / *MEDC*) und *neutralen* (*Hydrazid* und *NHS*) Funktionalitäten synthetisiert werden.

Die Abscheidung von *MTh-CMC*, *TSHP-CMC*, *HTSHP-CMC* und deren reaktiven Analoga auf Au-Oberflächen wurde *in situ* mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR) untersucht. Die ermittelten Schichtdicken (d) und Oberflächenbelegungen (Γ) der Derivate liegen zwischen $d = 1.2-2.5$ nm, entsprechend $\Gamma = 1.19-2.49$ mg/cm². Mit Hilfe oberflächenanalytischer Methoden konnten Aussagen über die chemische Zusammensetzung (FTIR), Hydrophilie (Kontaktwinkel) und Belegungsdichte (CV- / EIS) der adsorbierten Monoschichten getroffen werden.

Die Monoschichten der Thio-CMC und reaktiven Thio-CMC auf Ag-Oberflächen zeigen höhere Schichtdicken wie auf Gold aufgrund der Bildung einer Oxidschicht vor und während der Beschichtung mit den Cellulosederivaten. Durch die sehr guten Passivierungseigenschaften der Cellulosederivate eignen sich diese zur antikorrosiven Beschichtung von Silbergegenständen.

Der Aufbau von Monoschichten auf Si- und Glasoberflächen erfolgte durch die Reaktion der *MCT-CMC* aus wässriger Lösung mit den APES (3-Aminopropyltriethoxysilan) funktionalisierten Si- bzw. Glasoberflächen. Die durch Ellipsometrie ermittelte Schichtdicke für die *MCT-CMC* (3.46 nm) auf Silizium ist in guter Übereinstimmung mit den Schichtdicken der Monoschichten auf Gold.

Die reaktive *TSHP-CMC-NHS* konnte erstmals zum kovalenten Aufbau eines BSA

(*Bovine Serum Albumine*)–Immunsensors auf Gold eingesetzt werden. Die SPR-Untersuchung der *konsekutiven* Bindungsexperimenten mit anti-BSA erlaubte die Bestimmung einer Assoziationskonstante von $K_{a,app.} = 5.40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, die in guter Übereinstimmung mit literaturbekannten Werten ist.

Erstmals gelang auch der Aufbau eines aBSA-Immunsensor auf einer mit *MCT-HTSHP-CMC* beschichteten Ag-Oberfläche. Mittels SPR-Spektroskopie konnten *regenerative* Bindungsexperimente mit BSA mehrmals wiederholt werden.

Die Monoschichten der reaktiven *MCT-TSHP-CMC* und *MCT-CMC* konnten zur kovalenten Kupplung der Meerrettichperoxidase (HRP) an Au- bzw. Si-Oberflächen eingesetzt werden. Aus den Michaelis-Menten Kinetiken der immobilisierten HRP wurden K_M -Werte von 2mM (HRP auf Au) respektiv 0.6 mM (HRP in FuSi-Kapillaren) berechnet, die auf einen geringen bzw. keinen Verlust der Aktivität der HRP durch Immobilisierung hindeuten. Die immobilisierte HRP zeigt eine gute Langzeitstabilität der Aktivität und sehr gute Thermo- und Lagerstabilität.

Ein *kompetitives Assay* ermöglichte des Weiteren die Bestimmung von Inhibitionskonstanten (*Pseudo-IC50*-Wert).

Neben einer gesteigerten Stabilität und ausgezeichneter Reproduzierbarkeit kinetischer Messungen bieten in Monoschichten integrierte Enzyme somit auch die Möglichkeit, hocheffiziente Screeningtests für Inhibitoren zu entwickeln.

Abstract

The presented thesis discusses the synthesis of water soluble functional cellulose derivatives and the application of their self-assembled monolayer (SAM) on gold, silver and silicon surfaces, for the assembly of immune and enzyme sensors.

The synthesized cellulose derivatives possess two functionalities: *thio-anchor groups* (thiosulfate, thioether) for the binding on gold and silver surfaces and *reactive groups* for the binding of biomolecules respectively.

In the context of this work the synthesis of thioether and thiosulfate carboxymethylcelluloses, *MTh-CMC* and *HTSHP-CMC* respectively, were optimized with respect to the regioselectivity, increase of the number of thio-anchor groups and reproducibility of this synthesis. Furthermore an improved method was developed to the synthesis of the bithiosulfate carboxymethylcellulose derivative *TSHP-CMC*.

On the basis of the CMC and the three Thio CMC derivatives, reactive derivatives with *anionic* (*MCT*), *cationic* (*EDC* / *MEDC*) and *neutral* (hydrazides and NHS) functionalities could be synthesized.

The SAM formation of the Thio CMC and their reactive analogues on gold surfaces was examined *in situ* by means of surface plasmon resonance spectroscopy (SPR). The determined layer thicknesses (d) and surface density (Γ) of these derivatives on gold are between $d = 1.2\text{-}2.5$ nm, accordingly $\Gamma = 1.19\text{-}2.49$ mg/cm². Using surfaces-analytical methods, information about the chemical composition (FTIR), hydrophilicity (contact angle) and surface density (CV, EIS) of the adsorbed SAMs could be received.

The monolayers of Thio CMC and reactive Thio CMC derivatives on silver surfaces present higher layer thicknesses as on gold due to the formation of an oxide layer, forwards and during the coating with the cellulose derivatives. By the very good passivation characteristics of these cellulose derivatives they are suitable for the anti-corrosive protection of silver articles.

The SAM formation on silicon and glass surfaces took place via the reaction of the *MCT-CMC* derivative from aqueous solution with the APES (3-aminopropyl triethoxysilane) functionalized silicon and/or glass surfaces. The layer thickness for *MCT-CMC* (3.46 nm) on silicon surfaces determined by means of ellipsometry is in good agreement with the layer thicknesses of the monolayers on gold.

The reactive *TSHP-CMC-NHS* was used for the first time to assembly covalently a BSA (*Bovine Serum Albumin*) immune sensor on gold surfaces. The SPR analysis of

the consecutive binding with anti-BSA (aBSA) permitted the determination of an association constant of $K_{a,app.} = 5.40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, which are in good agreement with the values reported in the literature.

The assembly of an aBSA immune sensor on a *MCT-HTSHP-CMC* functionalized silver surface succeeded also for the first time. By means of *in situ* SPR spectroscopy regenerative binding experiments with BSA could be repeated several times.

The monolayers of the reactive *MCT-TSHP-CMC* and *MCT-CMC* derivatives could be used for the covalent, *reagent free* coupling of horseradish peroxidase (HRP) on gold and/or silicon surfaces. From the Michaelis-Menten kinetics of the immobilized HRP, K_M values of 2 mM (HRP on gold) respectively 0.6 mM (HRP in fused silica capillaries) were calculated, which point on a small and/or no loss of the activity of the HRP by immobilization. The immobilized HRP shows a good long-term stability of the activity and a very good storage and thermal stability.

Furthermore a *competitive assay* allows the determination of inhibition constants (*pseudo-IC50-values*).

Apart from an increased stability and excellent reproductibility of kinetic measurements, on cellulose monolayers integrated enzymes offer thus also the possibility of developing high-efficient screening tests for inhibitors.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Cellulose	1
1.2 Celluloseether: Carboxymethylcellulose.....	5
1.3 Regioselektive Einführung von Substituenten an die Cellulose.....	6
1.4 Ultradünne organische Schichten.....	8
1.5 Biosensoren	12
2. Zielsetzung	14
3. Synthese thiofunktionalisierter Cellulosederivate	16
3.1 Einleitung	16
3.2 Synthesekonzept.....	17
3.3 Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulosederivaten	20
3.3.1 Synthese von Cellulose-6- <i>O</i> - <i>p</i> -toluolsulfonat 1	20
3.3.2 Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulose 2.....	23
3.3.3 Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose.....	24
Natrium Salz 3	24
3.3.4 Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-CMC-ethylester 4.....	26
3.4 Synthese von 6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxy-propyl)- carboxymethylcellulose Natrium Salz (TSHP-CMC Na) 6	27
3.4.1 ¹ H-NMR-spektroskopische Bestimmung der Substituentenverteilung in der Carboxymethylcellulose mittels Abbauanalyse	27
3.4.2 Synthese von 6- <i>O</i> -(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz (AHP-CMC Na) 5.....	31
3.4.3 Synthese von 6- <i>O</i> -(2'', 3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxy-propyl)- carboxymethylcellulose Natrium Salz (TSHP-CMC Na) 6a und 6b	36
3.5 Synthese von 6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)- carboxymethylcellulose Natrium Salz 8 (HTSHP-CMC Na)	40
3.5.1 Synthese von 6- <i>O</i> -(2''-Hydroxy-3''-bromopropoxy-2'-hydroxypropyl)- carboxymethylcellulose Natrium Salz (HBrPHP-CMC Na) 7	40
3.5.2 Synthese von 6- <i>O</i> -(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)- carboxymethylcellulose Natrium Salz (HTSHP-CMC Na) 8	42

3.6	Zusammenfassung.....	44
4.	Synthese reaktiver Cellulosederivate	46
4.1	Einleitung	46
4.2	Synthesekonzept.....	49
4.3	Synthese von Cellulosederivaten mit anionischen reaktiven O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl) Gruppen (MCT-Cellulosederivate).....	51
4.4	Synthese von Cellulosederivate mit kationischen reaktiven Gruppen (EDC / MEDC-Cellulosederivate).....	55
4.5	Synthese von Cellulosederivaten mit neutralen reaktiven Gruppen	61
4.5.1	Synthese von reaktiven Hydrazid-Thio-CMC-Derivaten.....	61
4.5.2	Synthese von reaktiven O-(N-hydroxysuccinimidyl)-Thio-CMC-Derivaten (NHS-Aktivester der Thio-CMC-Derivate).....	65
4.6	Zusammenfassung.....	70
5.	Aufbau und Charakterisierung von Monoschichten (SAMs) aus funktionellen Cellulosederivaten auf planaren Objektträgern.....	72
5.1	Aufbau und Charakterisierung von Monoschichten (SAMs) aus funktionellen Cellulosederivaten auf Goldoberflächen.....	72
5.1.1	Einleitung	72
5.1.2	Infrarotspektroskopischer Nachweis der Belegung von Goldoberflächen mit funktionellen Thio-CMC Derivaten.....	75
5.1.3	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) 83	
5.1.4	Berechnung des Brechungsindex und Brechungsindexinkrementes von HTSHP-CMC Na 8.....	90
5.1.5	Bestimmung der Schichtdicken und Oberflächenbelegung der Thio-CMC-Derivate 3, 6a, 6b und 8 mittels SPR-Spektroskopie	92
5.1.6	Bestimmung der Schichtdicken und Oberflächenbelegungen reaktiver Thio-CMC-Derivaten mittels SPR-Spektroskopie.....	102
5.1.7	Untersuchung der Belegungsdichte von funktionellen Thio-CMC Derivaten auf Goldoberflächen durch Cyclovoltammetrie und Impedanzspektroskopie	104
5.1.8	Benetzbarkeit von mit funktionellen Thio-CMC Derivaten beschichteten Goldoberflächen (Kontaktwinkelmessungen).....	121

5.2	Aufbau und Charakterisierung von Monoschichten (SAMs) aus funktionellen Cellulosederivaten auf Silberoberflächen	125
5.2.1	Einleitung	125
5.2.2	EIS-Untersuchungen an Monoschichten aus HTSHP-CMC 8 auf Silberoberflächen	126
5.2.3	Ultradünner Korrosionsschutz aus HTSHP-CMC 8 auf Silber.....	130
5.2.4	SPR-Untersuchungen an Monoschichten aus funktionellen Thio-CMC Derivaten auf Silberoberflächen	132
5.3	Aufbau und Charakterisierung von Monoschichten (SAMs) aus funktionellen Cellulosederivaten auf Silizium und Glasoberflächen.....	135
5.3.1	Einleitung	135
5.3.2	Modifizierte Silizium- bzw. Glasoberflächen.....	136
5.3.3	Messprinzip der Spektral-Ellipsometrie	138
5.3.4	Darstellung von aminofunktionalisierten Silizium- und Glasoberflächen	140
5.3.5	Darstellung von MCT-CMC funktionalisierten Silizium- und Glasoberflächen	141
5.4	Zusammenfassung.....	145
6.	Molekulare Erkennung an reaktiven Cellulosederivate Monoschichten ..	147
6.1	Einleitung	147
6.2	Affinitätssystem: Anti-BSA-BSA	148
6.3	Antigen-Antikörper Bindung	151
6.4	Antikörper-Antigen Affinitätsexperimente an reaktiven Cellulose-Monoschichten auf Gold und Silber.....	152
6.4.1	Unspezifische Bindung von BSA an einer HTSHP-CMC beschichteten Goldoberfläche.....	153
6.4.2	Allgemeiner Aufbau eines Immunosensors auf Basis von reaktiven Cellulosederivaten.....	154
6.4.3	Konsequente aBSA-BSA Affinitätsexperimente an einer mit TSHP-CMC-NHS beschichteten Goldoberfläche	157
6.4.4	Regenerative BSA-aBSA Affinitätsexperimente an einer mit MCT-HTSHP-CMC beschichteten Silberoberfläche.....	159
6.5	Zusammenfassung.....	166

7. Aktivität von Enzymen immobilisiert an reaktiven Cellulosederivate	
Monoschichten	168
7.1 Einleitung	168
7.2 Die Meerrettichperoxidase (HRP) und das ABTS / H ₂ O ₂ Assay	171
7.3 Aktivität von immobilisierter HRP an reaktiven Cellulose-Monoschichten auf Gold.....	173
7.4 Aktivität von immobilisierter HRP an reaktiven Cellulose-Monoschichten auf Silizium- bzw. Glasoberflächen	178
7.5 Kompetitive Hemmung immobilisierter HRP an reaktiven Cellulose-Monoschichten mittels p-Kresol	182
7.6 Zusammenfassung.....	183
8. Experimenteller Teil	185
8.1 Chemikalien	185
8.2 Methoden und Geräte	185
8.3 Präparativer Teil.....	199
8.3.1 Synthese der Thiocellulosederivate	199
8.3.2 Synthese reaktiver Thiocellulosederivate.....	213
9. Literaturverzeichnis	232

1. Einleitung

1.1 Cellulose

Unter den Naturstoffen, die das Leben auf der Erde und die Entwicklung der Menschheit in starkem Maße geprägt haben, nimmt das Biopolymer Cellulose einen besonderen Platz ein. Als faserbildendes Polysaccharid ist sie das wichtigste Strukturpolymer der Pflanzenwelt. Natürliche Cellulose ist jedoch niemals in reiner Form vorzufinden. Allgemein findet sich Cellulose in Holz, Blättern und Pflanzenstengeln meist vermischt mit Lignin und anderen Polysacchariden, den Hemicellulosen. So besteht Holz im getrockneten Zustand aus etwa 40-50% Cellulose, 25-40% Hemicellulosen und 15-35% Lignin ^[1]. Die reinsten natürlichen Quellen für Cellulose sind Pflanzenfasern wie Jute, Flachs, Hanf und vor allem Baumwolle die selten mehr als 5% Verunreinigungen aufweist. Cellulose wird jedoch nicht ausschließlich in Pflanzen produziert. Von wissenschaftlichem Interesse sei die bakterielle Cellulose erwähnt, die von der Gattung *Acetobacter Xylinum* produziert wird ^[2, 3]. Die Isolierung der Cellulose aus Pflanzenhölzern wird im großen Maßstab durch chemische Aufschlußverfahren durchgeführt. Durch chemische Umwandlung und Spaltung werden zuerst die Hemicellulosen und das Lignin herausgelöst. Zurück bleibt die Cellulose in fester Form mit einem Polymerisationsgrad von über 12000.

Cellulose ist ein hydrophiles, biokompatibles und biologisch abbaubares Polysaccharid. Sie ist ein lineares stereoreguläres Homopolymer bestehend aus n β -1,4-glykosidisch verknüpften D-Glucopyranose-Einheiten (GlcP-Einheiten). Jeder der GlcP-Einheiten besitzt eine primäre sowie zwei sekundäre Hydroxylgruppen, die sich an den Kohlenstoffatomen 6 bzw. 2 und 3 befinden (Abb. 1.1). Die GlcP-Einheiten besitzen eine 4C_1 -Sesselkonformation ($C = chair$). Dabei befinden sich sowohl die glykosidischen Bindungen als auch die Hydroxylgruppen in äquatorialer Position in der Ringebene, während alle gebundenen Wasserstoffatome in axialer Position angeordnet sind.

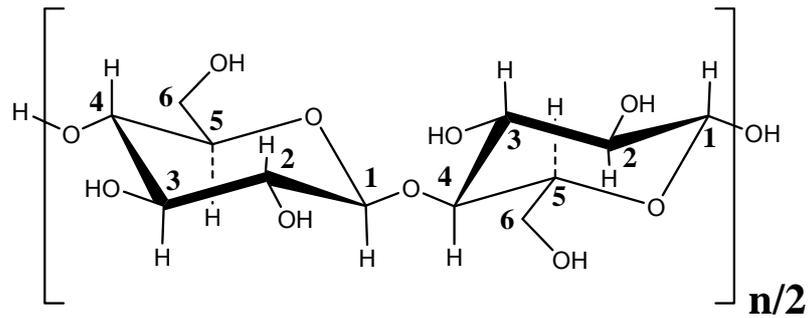


Abb. 1.1: Molekülstruktur von Cellulose.

Cellulose weist je nach biologischer Herkunft eine äußerst komplexe, hierarchisch gegliederte Überstruktur auf ^[4]. Charakteristisch für die Morphologie der Cellulose ist die Ausbildung von Mikrofibrillen. Ihre Dicke beträgt je nach Herkunft 2-10 nm, in Ausnahmefällen 30 nm ^[4, 5]. In den Fibrillen liegt die Cellulose teilkristallin vor. Die Makromoleküle sind über lange Strecken ungefaltet und können parallel oder antiparallel gepackt sein ^[6]. Durch Elektronenbeugungsuntersuchungen konnten mindestens zwei native Modifikationen, Cellulose I_α (triklinische Zell-Einheit) und I_β , unterschieden werden ^[7]. Baker et al. zeigten kürzlich mittels AFM Untersuchungen an hochkristalliner Cellulose (stammend aus den Zellwänden von Algen der Gattung *Valonia ventricosa*) das die I_α Modifikation den größten Anteil der Struktur ausmacht ^[8] (Abb. 1.2).

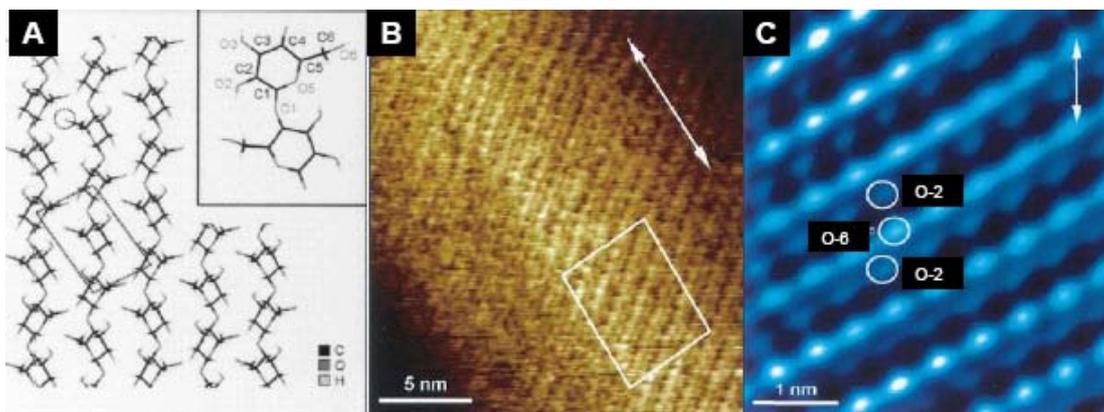


Abb. 1.2: AFM-Aufnahmen von nativer Cellulose (aus *Valonia ventricosa*):

- A** Ausrichtung der Cellulosenketten in einer triklinischen (I_α) Zelle;
- B** AFM Aufnahme der Cellulose-Oberfläche (Auflösung: 5 nm);
- C** AFM Aufnahme des in Abbildung **B** eingezeichneten Rechtecks (Auflösung: 1 nm).

Abbildung 1.2 **C** zeigt die AFM-Untersuchung des in **B** eingezeichneten Rechtecks

(Auflösung: 1 nm). Durch eine entsprechende Bearbeitung dieser Aufnahme (filtern und vergrößern gefolgt von der vertikalen Ausrichtung der Cellulose-Ketten) ist die Zuordnung von O-2 Atome benachbarter Celluloseketten relativ zu O-6 einer Kette, möglich.

Von den nativen Cellulosen unterscheiden sich die regenerierten Cellulosen. Sie entstehen durch Abscheidung von Cellulose aus deren Lösung. Die regenerierte Cellulose ist von der chemischen Struktur her mit der nativen Cellulose identisch, weist aber eine andere, weniger kristalline Packung auf. Der Regeneratcellulose wird die Cellulose Modifikation II mit einer antiparallelen Packung der Polymerketten zugewiesen. Beim verspinnen von Celluloselösungen werden die Ketten orientiert und es entstehen hochfeste Cellulose regeneratfasern ^[9, 10].

Ausgehend von der Monomereinheit Glucose zum Polymer Cellulose nimmt die Wasserlöslichkeit ab einem Polymerisationsgrad von 6 stark ab. Diese Beobachtung ist auf die schon erwähnte übermolekulare Struktur der Cellulose zurückzuführen, die aufgrund von inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, entsteht (Abb. 1.3).

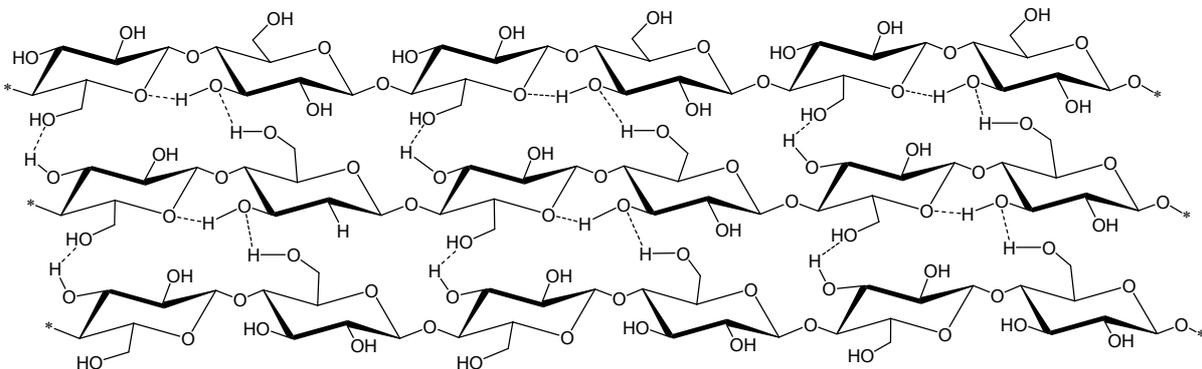


Abb. 1.3: Überstruktur von Cellulose durch inter- und intramolekularen Wasserstoffbrücken.

Dementsprechend ist die unsubstituierte Cellulose in Wasser und den meisten Lösungsmitteln nicht löslich. Um die Cellulose jedoch für Reaktionen zugänglich zu machen müssen die für die Überstruktur verantwortlichen Wasserstoffbrücken aufgebrochen und die Hydroxylgruppen für die angreifenden Reagenzien zugänglich gemacht werden. Diese Aktivierung kann durch Behandlung mit wässriger Natronlauge (Mercerisierung) ^[1, 11], flüssigem oder gasförmigem Ammoniak ^[12-16] oder durch energiereiche Strahlung ^[16] erfolgen. Die Reaktionsfähigkeit der aktivierten Cellulose ist dabei stark abhängig von der Celluloseprobe, der Basenkonzentration und Quellungsdauer ^[17-19].

Um Reaktionen mit nativer Cellulose in homogener Lösung durchführen zu können, bedient man sich spezieller Lösungsmittelsysteme. Hierbei kann man zwischen derivatisierenden und nichtderivatisierenden Lösungsmittel unterscheiden. Nichtderivatisierende Lösungsmittel lösen die Cellulose ausschließlich durch intermolekulare Wechselwirkung zwischen Polymer und Solvens. Man unterscheidet hier zwischen organischen und die auf Übergangsmetall-Komplexe basierenden Lösungsmittelsystemen (Tabelle 1.1). Zu den wässrigen Lösungsmittelsystemen gehören beispielsweise konzentrierte Phosphorsäure und starke Basen. Im Gegensatz zu den nichtderivatisierenden Lösungsmittelsystemen umfassen derivatisierende Lösungsmittel alle Systeme, bei denen der Lösungsvorgang mit einer kovalenten Derivatisierung der Cellulose (instabile Ethern, Estern oder Acetalen) verbunden ist (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Überblick ausgewählter Lösungsmittelsysteme für Cellulose.

	Lösungsmittelsystem	Literatur
Nicht-derivatisierend	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -Oxid (NMO)	[20-23]
	<i>organisch</i> <i>N,N'</i> -Dimethylacetamid / LiCl	[15, 24-27]
	DMSO / TBAF (Tetrabutylammoniumfluorid)	[28]
	<i>Metall-Komplex</i> Cuam [Cu(NH ₃) ₄](OH) ₂	[29]
	Cuen [Cu(H ₂ N-(CH ₂)-NH ₂) ₂](OH) ₂	[30]
	Nioxam [Ni(NH ₃) ₆](OH) ₂	[31]
Derivatisierend	Xanthogenat	[32]
	Trifluoressigsäure	
	Ameisensäure / z.B.: ZnCl ₂	
	Trimethylsilylchlorid / Pyridin	[33]

1.2 Celluloseether: Carboxymethylcellulose

Celluloseether werden seit ungefähr 60 Jahren hergestellt, wobei sich wasserlösliche Produkte durchgesetzt haben. Ziel der Celluloseveretherung ist, durch Einbau von Substituenten den engen Verbund der Wasserstoffbrücken zwischen den Celluloseketten zu stören und so ihren hydrophilen Charakter zu entwickeln ^[34].

Zur Klasse der Celluloseether gehören drei großtechnisch zugängliche Derivate: Carboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose und Methylcellulose. Zur Herstellung dieser Celluloseether geht man von Zellstoff, der aus Holz gewonnen wurde oder von Baumwolle aus. Zunächst erfolgt eine Alkalisierung, um den engen Verbund der Cellulose aufzulockern, wodurch deren OH-Gruppen freigelegt und damit der Veretherung zugänglich gemacht werden.

Die Veretherung zu Carboxymethylcellulose ist in Abb. 1.4 dargestellt. Man erhält Carboxymethylcellulosen mit Substitutionsgraden an Carboxymethyl-Gruppen zwischen $DS_{CH_2COONa} = 0.6-1.1$ ^[34].

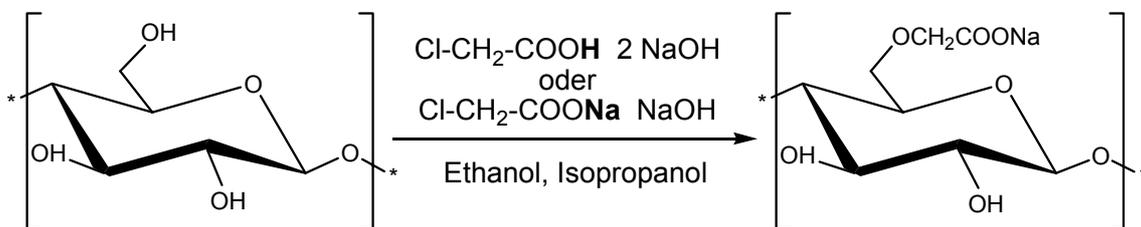


Abb. 1.4: Carboxymethylcellulose: Reaktionsschema.

Bei allen Celluloseveretherungen spielt Wasser eine besondere Rolle. Für den Zellstoffaufschluß ist es im Reaktionssystem notwendig. Andererseits führt es durch Hydrolysereaktionen zur Bildung von Nebenprodukten (*Natrium-Glykolat, Abbauprodukte des Zellstoffs: Kohlenhydratderivate*) und damit zur Ausbeuteminderung.

Technische Carboxymethylcellulose (CMC) enthält alle Nebenprodukte und kommt als 50-70%-ige Ware in den Handel. Aus Rein-CMC dagegen werden die Nebenprodukte durch Extraktion mit einem Wasser/Alkohol-Gemisch entfernt.

Carboxymethylcellulose (sowohl rein als auch technisch) findet Anwendungen auf dem Gebiet der Dispersionsfarben, Textil-, Pharma-, Kosmetik- und Waschmittelindustrie ^[34, 35]. Dabei sind die meisten Eigenschaften der CMC auf zwei

wichtige strukturelle Parameter zurückzuführen, und zwar Substitutionsgrad (DS) der Hydroxylgruppen in der Anhydroglucoseeinheit (AGE) und die Verteilung der Carboxymethylsubstituenten entlang der Cellulosekette^[36]. In den letzten Jahren hat sich die CMC auch als wichtige Ausgangsverbindung zur Synthese funktioneller CMC Derivate erwiesen, die filmbildende Eigenschaften zeigen^[37, 38].

1.3 Regioselektive Einführung von Substituenten an die Cellulose

Die wichtigsten Funktionalitäten der Cellulose, auf denen die meisten chemischen Eigenschaften beruhen, sind die primären und sekundären Alkoholgruppen in jeder Monomereinheit und die glykosidischen Bindungen. Die glykosidischen Bindungen sind dabei nicht leicht zu brechen und führen dazu dass die Cellulose unter vielen Reaktionsbedingungen, mit Ausnahme der gezielten Hydrolyse oder Alkoholyse^[1] stabil ist.

Staudinger prägte schon bereits in den 30er Jahren das Konzept der polymeranalogen Reaktionen, nach dem funktionelle Gruppen von Makromolekülen in gleicher Weise reagieren wie die entsprechenden Monomeren Verbindungen, und dabei ein Abbau des Polymerrückgrats durch passende Wahl der Reaktionsbedingungen verhindert wird. Aufgrund dieser Erkenntnisse können Umsetzungen an Cellulosen analog zu denen an Glucose (Monomer) durchgeführt werden, beispielsweise unter Spaltung von O-H, C-O, C-H oder C-C-Bindungen.

Die primären Hydroxylgruppen in Position C-6 des Glucoserings sollten gegenüber den sekundären Hydroxylgruppen in Position C-2 und C-3 bei einer Umsetzung sterisch begünstigt sein. Jedoch zeigt sich das gerade die primären Hydroxylgruppen leicht Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, so dass bei nativer Cellulose eine erhöhte Reaktivität der sekundären Hydroxylgruppen resultiert. Eine selektive Umsetzung der primären OH-Funktionalitäten kann jedoch mit sterisch anspruchsvollen Reagenzien erreicht werden. Nach Einführung dieser dann auch als Schutzgruppen dienenden Reagenzien ist danach auch eine regioselektive Derivatisierung der Positionen OH-2 und OH-3 mit weniger selektiven Reagenzien möglich^[39].

Eine Vielzahl an Strategien zur Synthese von Cellulosen mit einheitlich mono-, di- oder trisubstituierten Glucosebausteinen wurde entwickelt ^[40-44].

Dabei haben sich für die primäre OH-6 Position regioselektive Schutzgruppen wie Tosyl, Trityl und Silyl durchgesetzt.

Die Veresterung der Cellulose mittels Sulfonylchlorid-Reagenzien wie Methansulfonylchlorid (Mesylchlorid), Benzol- oder *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (Tosylchlorid) in Gegenwart von NaOH oder tertiären Aminen ist eine seit den 60er Jahren bekannte Reaktion ^[45]. Die Reaktion kann sowohl in Pyridin als auch in DMAc (*N,N'*-Dimethylacetamid) / LiCl als Lösungsmittel durchgeführt werden. Heinze *et al.* berichteten 2000 über die erfolgreiche Tosylierung von Cellulose im Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) / Dimethylsulfoxid (DMSO) Lösungsmittelsystem ^[28]. Mittels ¹³C-NMR Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität der OH-Gruppen gegenüber dem Tosylierungsreagenz in der Reihenfolge $k_{O-6} > k_{O-2} > k_{O-3}$ (*k*: Reaktionsgeschwindigkeit) abnimmt ^[46-48].

Cellulose und Cellulosederivate lassen sich mit Trialkylchlorsilanen in aprotischen Medien in Gegenwart von Basen zu Trialkylsilylethern mit verschiedenen DS Graden und Regioselektivitäten umsetzen. Zu den wichtigsten Silylierungsmitteln gehören das Trimethylsilylchlorid, das sterisch anspruchsvolle *tert.*-Butyldimethylchlorsilan und das Thexyldimethylchlorsilan ^[39]. Mit Zunahme des Platzanspruches der einzuführenden Silyl-Gruppe wird unter homogenen Bedingungen in DMAc/LiCl die Position C-6 gegenüber Position C-2 bevorzugt. So konnte ein DS-Grad von 1 bei der Verwendung von Thexyldimethylchlorsilan, mit ausgeprägten O-6 Selektivitäten, erreicht werden ^[49, 50]. Die Abspaltung der Silylgruppen erfolgt mit Salzsäure in Tetrahydrofuran in Gegenwart geringer Wassermengen.

Eine bewährte Methode zur reversiblen Blockierung der primären OH-6 Positionen der Cellulose oder anderer Polysaccharide ist die Tritylierung ^[40, 42, 43, 51]. Die Tritylierung kann homogen in DMAc/LiCl oder heterogen durchgeführt werden. Unter heterogenen Bedingungen kann ein DS an Tritylgruppen in Position C-6 von 0.81 bis 1.21 erreicht werden. Dabei verläuft die Tritylierung an den primären OH-Gruppen 13.8 mal schneller als an den sekundären OH-Gruppen ^[12, 52-55]. Mit wachsender Anzahl an 4-Methoxygruppen im Tritylrest steigt bei der Tritylierung sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Regioselektivität bezüglich Position C-6 an ^[51, 56]. Entsprechend der Abspaltung der Silylgruppen ist auch bei der Detritylierung

aufgrund der sauren Reaktionsbedingungen, durch einen teilweisen Kettenabbau, eine Verringerung des Polymerisationsgrades zu beobachten [40, 57, 58].

Abbildung 1.5 zeigt im Vergleich die Regioselektivität der Cellulose Derivatisierung mittels Sulfonierungs-, Silylierungs- und Tritylierungsreagenzien. Dabei nimmt die Regioselektivität bezüglich der Position O-6 mit dem Platzanspruch der einzuführenden Gruppe zu, bzw. bezüglich der Positionen O-2 und O-3 ab.

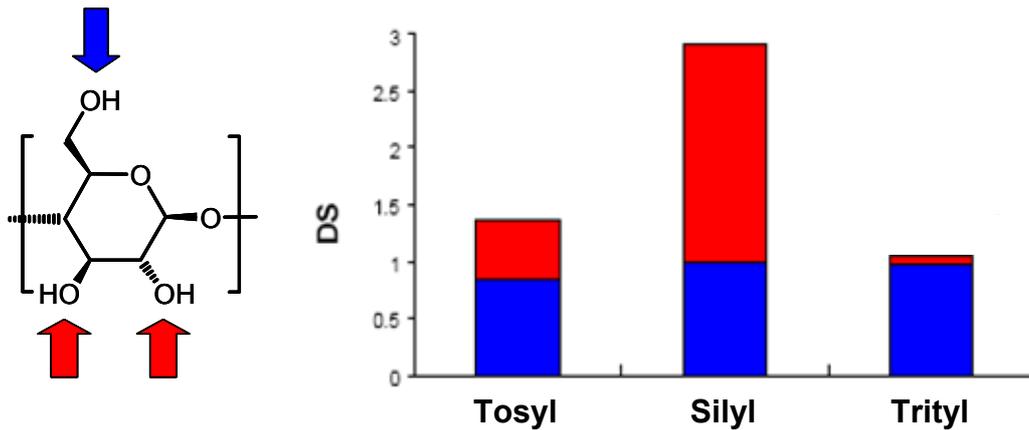


Abb. 1.5: Regioselektivität bei der Derivatisierung der Cellulose mittels Tosyl-, Silyl- und Tritylgruppen.

1.4 Ultradünne organische Schichten

Die Verwirklichung der in der Natur realisierten Prinzipien der molekularen Selbstorganisation und Erkennung sowie der durch sie geschaffenen Eigenschaften erweiterte die Entwicklung und den Einsatz ultradünner organischer Schichten in Forschung und Technologie. Ultradünne organische Filme besitzen Schichtdicken $d \leq 500$ nm. Sie können als Modelle für die Studien von Biomembranen und biokompatiblen Oberflächen, in der Sensortechnik und als Korrosionsschutz dienen [59, 60].

Verfahren zur Herstellung ultradünner Filme sind zum Beispiel die chemische Gasphasenabscheidung (CVD: *Chemical Vapor Deposition*), Plasmabeschichtung, Langmuir-Blodgett-Technik und die Adsorption aus Lösung.

Aus dem Bereich der dünnen Filme sind in den letzten Jahren die molekularen Filme immer mehr in den Vordergrund getreten. Dabei handelt es sich um dünne

organische Schichten mit einer Dicke von wenigen Nanometern (Monoschichten, monolayer) bis zu einigen zehn Nanometern (Multischichten), welche oft eine molekulare Ordnung aufweisen.

Cellulosederivate eignen sich zum Aufbau von ultradünnen Filmen auf verschiedenen Oberflächen. Dafür sind mehrere Gründe zu nennen: Zum einen besitzen Cellulosederivate eine gewisse Kettensteifigkeit. Infolgedessen sind Persistenzlängen normalerweise hoch wie z. B. für Carboxymethylcellulose von 5 nm^[61]. Zum anderen haben Celluloseketten eine hohe strukturelle Perfektion, wie vor kurzem durch AFM bestätigt^[8], sind hoch biokompatibel und zugänglich für mehrfache chemische Funktionalisierungen^[39].

Eine der wichtigsten Verfahren zur Herstellung ultradünner Polymerschichten ist die Langmuir-Blodgett-Technik (LB-Technik). Bei der LB-Technik handelt es sich um ein Tauchverfahren bei dem Mono- und Multischichten auf einen festen Träger aufgebracht werden. Diese bilden sich aufgrund von van der Waals und Dipol / Dipol-Anziehungen zwischen den einzelnen Schichten. Bei dem LB-Verfahren werden amphiphile Moleküle in einem leicht flüchtigen organischen Lösungsmittel auf die Wasseroberfläche gespreitet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels orientieren sich die Moleküle spontan mit den hydrophilen Kopfgruppen zum Wasser und den hydrophoben Schwanzgruppen zur Luft. Mit Hilfe einer Barriere wird nun der Film komprimiert. Beim anschließenden Tauchen werden die Moleküle auf das Substrat übertragen. Es entstehen hoch geordnete Schichten.

Hydrophobe Cellulosederivate sind für die Bildung von Langmuir-Blodgett Multischichten auf hydrophoben Substraten verwendbar. Dazu wurden die planaren Träger durch Eintauchen in die entsprechenden Monoschichten von Trialkanoyl^[62-64], Trialkyl-^[65, 66] oder Trialkylsilylcellulosen^[67, 68] beschichtet. Damit konnte man sowohl die Richtung als auch die Abfolge verschiedener Polymere kontrollieren^[69, 70].

Eine weitere Möglichkeit Multischichtsysteme aufzubauen ist das Decher Verfahren. Decher nutzte dabei die elektrostatische Anziehung von Polyelektrolyten aus. Bei dieser *molecular self-assembly* Technik ist die treibende Kraft der Entropiegewinn beim Ionenaustausch Monoion-Polyion, welche eine sequentielle Adsorption ermöglicht^[71-73]. Mit Hilfe dieses einfachen Tauchverfahrens konnten Multischichtsysteme sowohl mit synthetischen Polyelektrolyten (Polystyrolsulfonate (PSS), Polyammoniumderivate (Poly-DADMAC), usw.), als auch mit natürlichen

Polymere wie Proteinen oder DNA ^[74] hergestellt werden. Über die ersten cellulosischen Polyelektrolytmultischichten berichtete Kern 1999. Er baute Polyelektrolytmultischichten aus regioselektiv substituierten ionischen und anionischen Cellulosederivate (6-Pyridinium-6-desoxy-2,3-di-O-methylcellulose und 6-O-Sulfonato-2,3-methylcellulose) auf ^[75].

Supramolekulare Strukturen können auch durch die auf Chemisorption basierende Technik der molekularen Selbstorganisation (*self-assembly monolayer*, SAM) aufgebaut werden. Die spontane Selbstorganisation geeigneter Moleküle an einer Grenzfläche (*self assembly*) basiert auf den Enthalpiegewinn durch eine Vielzahl an starken spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen (Adsorbate) und der Grenzfläche (Träger). Der durch den hohen Ordnungsgrad verursachte Entropieverlust wird durch den Enthalpiegewinn kompensiert, so dass ein spontaner Prozess stattfinden kann, d. h. eine spontane Ausbildung einer Monoschicht auf dem Träger.

Es sind mehrere Beispiele für selbstorganisierte Monoschichten (SAMs) bereits bekannt. Sagiv und Mitarbeiter arbeiteten als erste mit SAMs aus Organosilanen auf Siliziumdioxid ^[76-79], Allara und Nuzzo mit Fettsäuren auf Aluminiumoxid ^[80, 81]. Auch die Arbeitsgruppe um Whitesides beschäftigte sich eingehend mit der Adsorption von Silanen auf Siliziumdioxid ^[82, 83]. Zudem sind Monoschichten von Alkoholen oder Aminen auf Platin ^[84] und von phosphorylierten Cellulosen auf Metalloxiden wie Aluminiumoxid, Titanoxid sowie Stahl ^[85, 86] bekannt.

Die am meist untersuchten SAMs sind jedoch die von Thiolen auf Goldoberflächen. Nuzzo und Allara berichten als erste über die spontane SAM Bildung von Disulfiden auf Gold und die Charakterisierung der adsorbierten Schichten mittels Infrarotspektroskopie (IR), Ellipsometrie und Kontaktwinkelmessungen (KW) ^[87, 88].

Whitesides und Mitarbeiter untersuchten die Kinetik der Adsorption von langkettigen Alkanthiolen vom Typ HS(CH₂)_nX (2 ≤ n ≤ 21, X: z.B. CH₃, CH=CH₂, Br, Cl, OCH₃, COOCH₃, OH, COOH usw.) auf Gold ^[89]. Mittels Ellipsometrie, KW-Messungen und Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS: *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) konnten sie die Bildung der SAMs auf polykristallinem Gold nachweisen. TEM Beugungsmuster (TEM: *Transmission Electron Microscopy*) zeigten eine zweidimensionale Ordnung in diesen Monoschichten. Infrarotspektroskopische Untersuchungen deuteten auf eine dicht gepackte pseudokristalline Anordnung der Thiole auf den Goldoberflächen hin, und einer *all-trans* Ausrichtung der C-C

Bindungen. Die IR Daten zeigten zusätzlich dass die Alkylketten unter einem Kippwinkel von 20-30° zur Oberflächennormalen ausgerichtet sind. Des Weiteren berichten sie auch vom Einfluss der X-Gruppe auf die Benetzungseigenschaften der adsorbierten Monoschichten auf Gold. So bilden Alkanthiole mit OH- bzw. COOH Endgruppen hydrophile Oberflächen die durch Wasser gut benetzt werden [89, 90]. Langkettige Alkanthiole bilden Filme die thermisch viel stabiler sind als die von kurzkettigen Thiolen.

In neuester Zeit wird auch von Dialkylsulfiden auf Goldoberflächen berichtet [91, 92]. Mitarbeiter um Reinhoudt zeigten mittels Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (TOF-SIMS) das Dialkylsulfide an Goldoberflächen Monoschichten ausbilden, ohne das eine Spaltung der C-S Bindung erfolgt (zerstörungsfreie Adsorption) [93].

Auf dem Gebiet der Untersuchung von Cyclodextrinthioderivaten auf Gold sind Arbeiten von Nelles *et al.* zu nennen [94-96]. Des Weiteren berichten Beulen *et al.* über die SAM-Bildung von Cyclodextrinthiolen bzw. -sulfiden auf Goldoberflächen [97]. AFM (*Atomic Force Microscopy*)-Untersuchungen von β -Cyclodextrin-dialkylsulfiden auf Gold zeigen die Anordnung dieser Derivate in einem pseudohexagonalen Gitter [98].

Polymere Thioderivate zeigen im Gegensatz zu Alkanthioderivaten die Ausbildung von amorphen SAMs auf Goldoberflächen [99-101]. Ringsdorf *et al.* berichten über die SAM-Bildung von Disulfid-funktionalisierten amphiphilen Copolymeren auf Goldoberflächen. Die Charakterisierung der adsorbierten Schichten erfolgte durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR), KW- und elektrochemische Messungen (Cyclovoltammetrie, CV) [99].

Thiosulfatderivate der Cellulose [100] bzw. Carboxymethylcellulose [60, 102] bilden amorphe SAMs aus wässriger Lösung. Die Monoschichten konnten hier durch SPR-, IR-Spektroskopie, XPS, CV- und AFM-Messungen nachgewiesen und charakterisiert werden.

1.5 Biosensoren

Biosensoren setzen sich aus zwei Komponenten zusammen: der *biologischen*, zur spezifischen Erkennung, und der Detektorkomponente, dem *Transducer*, der diese biomolekulare Erkennungsreaktion erfassen soll.

Die selektiven biologischen Komponenten (z. B.: Nukleinsäuren, Antikörper, Antigene, Enzyme oder Mikroorganismen) sind in direkter räumlicher Nähe zum Transducer immobilisiert ^[103].

Die Spezifität des Biosensors wird durch die biologische Komponente vorgegeben, während die Empfindlichkeit (Sensitivität) vor allem durch die verwendeten Transducer beeinflusst wird.

Grundsätzlich kann man Biosensoren in zwei Gruppen unterteilen ^[103]:

Die *Enzym-* oder *Metabolismussensoren* setzen den Analyten metabolisch um, wobei die Zunahme eines Reaktionsproduktes quantifiziert werden kann.

Affinitätssensoren dagegen nutzen jede Art biomolekularer Erkennung, wie Antikörper-Antigen, Nukleinsäure-komplementäre Nukleinsäure oder Rezeptor-Ligand als hochspezifische Affinitätspartner. In Folge sollen einige Messprinzipien erwähnt werden, die in der Affinitätssensorik von besonderer Bedeutung sind ^[104].

Man unterscheidet bei den Transducer zwischen Methoden mit und ohne Markierung (*labelfrei* bzw. *mit Label*) und mit *elektrochemischer* Markierung.

Zu den *labelfreien* Methoden gehören zum einen die *optischen* Transducer, die Phänomene wie Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance, SPR*) ^[105, 106], Totalreflektion von Licht in Wellenleitern ^[107] oder Interferenzen an dünnen Schichten (*Reflektometrische Interferenzspektroskopie, RIfS*) nutzen ^[108].

Zum anderen die *akustischen* Transducer, die Massenänderungen eines piezoelektrischen Schwingquarzes durch Frequenzänderung hochempfindlich nachweisen. Hier kommen *QCM (Quartz Crystal Microbalance)* ^[109, 110] und *SAW (Surface Acoustic Wave)* ^[111, 112] Methoden zum Einsatz.

Zu den Methoden *mit Label* gehören die optischen Transducer (*SPR, RIfS*) die *Fluoreszenzlabel* verwenden, die häufig empfindlicher sind als die labelfreien Methoden ^[113].

Transducer mit *elektrochemischen Label* nutzen Redoxsysteme auf der Oberfläche einer Elektrode aus, die voltammetrisch ^[114] und amperometrisch ^[115] verfolgt werden

können. Auch Enzyme (z. B. Peroxidasen) können verwendet werden, die eine Reaktion katalysieren, bei der ein elektrochemisch aktives Produkt entsteht.

Besonderes Merkmal der Biosensoren ist ihre *Regenerierbarkeit*, d.h. dass die Wechselwirkung mit dem Analyten reversibel ist, und sie damit wieder verwendbar sind. Sie müssen zudem eine schnelle Antwortzeit, gute Reproduzierbarkeit und eine einfache Handhabung vorweisen.

Biosensoren werden z. B. zur Bestimmung der Belastung von Abwässern in der Umweltanalytik eingesetzt. Das wichtigste Anwendungsfeld der Biosensoren ist aber die medizinische Diagnostik. Dort werden Stoffwechselprodukte, wie Blutzucker, Cholesterin oder Harnstoff, aber auch Hormone bestimmt.

Zur Bestimmung niedermolekularer Analyten (z. B.: Zuckern, Aminosäuren, Fetten, Vitaminen, unterschiedliche Metallionen, organische Säuren) haben sich die elektrochemischen Enzymsensoren durchgesetzt. Hingegen wurde mit der Entwicklung optischer Immunosensoren ein technologischer Durchbruch bei der Messung hochmolekularer Substanzen wie z. B. von Eiweißen, Polysacchariden und Nukleinsäuren erreicht ^[116].

Die wichtigsten kommerziellen Biosensoren, basierend auf der Evanescent-Feld-Technologie, sind das Biacore und das IAsys-Verfahren. Das Biacore-Verfahren benutzt als Sensoroberfläche eine Hydrogel-Matrix (aus Dextran) ^[117] die über funktionelle Alkanthiole auf die Goldoberfläche des Sensors fixiert ist. Durch eine entsprechende Aktivierung der Carboxylfunktionen der Dextran-Matrix können anschließend Rezeptormoleküle (z. B.: Antikörper, Nukleinsäuren, usw.) kovalent gebunden werden ^[118, 119]. Das Biacore-Verfahren nutzt als optischen Transducer die SPR-Messtechnik. Beim IAsys-Verfahren werden die Biomoleküle auf speziellen mit Dextran beschichteten Küvetten immobilisiert. Die IAsys benutzt die *Resonant Mirror* (RM)-Messtechnik ^[120, 121].

In neuerer Zeit rücken die funktionellen Cellulosederivate immer mehr im Mittelpunkt der Anwendung als Substrate in der Herstellung von Biosensoren. So berichten Klemm und Berlin über den Aufbau von Oxireductase-Sensoren an Silizium- bzw. Glasoberflächen, die mit Diamino-Cellulosederivate beschichtet sind ^[122-126].

Liebold untersuchte zum ersten Mal die molekulare Erkennung von Streptavidin an biotinylierten Thiocellulosederivaten auf Gold mittels *in situ* SPR-Spektroskopie ^[102].

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, durch entsprechende Modifizierung von Cellulose bzw. Carboxymethylcellulose funktionelle Cellulosederivate herzustellen, die als monomolekulare Sensorsubstrate geeignet sind. Diese sollen zwei unterschiedliche Funktionalitäten tragen: zum einen Thioankergruppen (Thiosulfate, Thioether) für die Anbindung an Gold-, und Silberoberflächen und zum anderen reaktive Gruppen für die Anbindung von Biomolekülen allgemein.

Die Synthese der Thiocellulosederivate soll durch entsprechende regioselektive Funktionalisierung in den primären C-6 Positionen erfolgen. Dabei sollen die von Choi ^[19] und Liepold ^[102] entwickelten Synthesewege hinsichtlich der Erhöhung der Anzahl an Thioankergruppen und der Reproduzierbarkeit optimiert werden. Dadurch soll die Erzeugung von stabilen, ultradünnen Schichten auf Gold bzw. Silberoberflächen induziert werden.

Diese Derivate sollen anschließend mit neutralen, kationischen und anionischen reaktiven Gruppen versehen werden. Zudem sollen auch reaktive Derivate der Carboxymethylcellulose hergestellt werden die als Substrate zur Anbindung von Biomolekülen an Silizium- bzw. Glasoberflächen geeignet sind.

Die neuen funktionellen Cellulosederivate sollen durch Adsorption aus wässriger Lösung zum Aufbau von Monoschichten auf Gold-, Silber-, Glas-, bzw. Siliziumoberflächen verwendet werden. Die gebildeten SAMs sollen durch geeignete oberflächenanalytischen Methoden charakterisiert werden. Dazu zählen Infrarotspektroskopie mit streifendem Einfallswinkel (FTIR-ERS; IR-Spektrum der adsorbierten Cellulosemonoschicht auf Gold) Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR; *in situ* Verfolgung der Adsorptionskinetik auf Gold und Silber, Bestimmung der Dicken der adsorbierten Monoschichten), Kontaktwinkelmessungen (KW; Benetzbarkeit und Hydrophilie der adsorbierten Filme), Cyclovoltammetrie und Impedanzspektroskopie (CV und EIS; Belegungsdichte, Isolierungseigenschaften der Schichten), Ellipsometrie (Bestimmung der Schichtdicke).

Die reaktiven Cellulosemonoschichten auf Gold, Glas- bzw. Siliziumoberflächen sollen zum einen als Plattform zur Untersuchung von molekularen

Erkennungsreaktionen (Antigen-Antikörper) eingesetzt werden. Zum anderen soll nach Immobilisierung von Enzymen deren Aktivität gemessen werden.

Die verwendeten Antigene / Antikörper und Enzyme sollen durch die Reaktion der frei verfügbaren Aminofunktionalitäten ^[127] mit den reaktiven Gruppen der Cellulosemonoschichten an die Cellulose-Matrix kovalent fixiert werden. Um das Ausmass an unspezifischer Wechselwirkung zwischen Proteine und Cellulose-Matrix zu untersuchen, soll die Adsorption von BSA (*Bovine Serum Albumine*, auch Rinderserumalbumin) an nicht reaktive Cellulosemonoschichten mittels SPR-Spektroskopie verfolgt werden.

Die Untersuchung von biomolekularen Antigen-Antikörper-Erkennungsreaktionen an reaktiven Cellulosemonoschichten soll am Beispiel des BSA / Anti-BSA (aBSA) Affinitätssystems gezeigt werden. Dazu soll das BSA kovalent an die Cellulosemonoschicht fixiert werden und bezüglich der spezifischen Wechselwirkung mit aBSA untersucht werden. Hier sollen *konsekutive* Affinitätsversuche durch *in situ* SPR-Spektroskopie (=Transducer) durchgeführt werden.

Zum ersten Mal soll versucht werden ein aBSA-Immunsensor auf Basis von reaktiven Cellulosederivate auf Silber aufzubauen. Die *regenerativen* Affinitätsexperimente mit BSA sollen ebenfalls mittels SPR-Spektroskopie verfolgt und mehrmals reproduzierbar wiederholt werden. Zusätzlich soll der Einfluss der Silberoberfläche bzw. der Silber-Plasmonen auf die Empfindlichkeit der SPR-Messungen untersucht werden.

Die Immobilisierung der Meerrettichperoxidase (*Horse Radish Peroxidase*, HRP) an mit reaktiven Thiocellulosen beschichteten Goldoberflächen soll unter Verwendung der SPR-Messtechnik *in situ* verfolgt und optimiert werden.

Nach Entwicklung eines entsprechenden Immobilisierungsverfahrens der HRP an Glas- bzw. Siliziumoberflächen soll dieses zuerst auf planaren Oberflächen durchgeführt und anschließend auf Quarzkapillaren übertragen werden.

Die Aktivität der immobilisierten HRP soll durch Aufnahme von Michaelis-Menten Kinetiken gemessen werden. Für die Messung der Aktivität des Enzyms immobilisiert in Kapillaren soll ein online Messsystem aufgebaut werden.

Durch Langzeit-Messungen sollen Aussagen über die Stabilität des Enzyms und die Reproduzierbarkeit kinetischer Messungen getroffen werden.

3. Synthese thiofunktionalisierter Cellulosederivate

3.1 Einleitung

Thiol- und Thiosulfatverbindungen, sogenannte Bunte-Salze, bilden mit elementarem Gold kovalente Au-S Bindungen aus ^[89, 128-130]. Dialkylsulfide führen aufgrund von koordinativen Bindungen des Schwefelatoms mit dem Gold zu stabilen Monolagen auf Goldoberflächen ^[92, 93, 97, 131].

Thiofunktionalisierte Cellulosederivate sind schon länger bekannt. Dazu gehören die Desoxymercaptocellulosen, Thiosulfatcellulosen und Thioethercellulosen.

Die Desoxymercaptocellulosen werden durch die Umsetzung von Tosylcellulose oder Halogendesoxycellulose mit Thioharnstoff hergestellt. Zunächst entsteht das Thiouroniumsalz, welches durch basische Hydrolyse zum Thiol überführt wird ^[132, 133].

Diese Desoxymercaptocellulose ist wasserlöslich, neigt aber dazu durch Lichteinfluss unter Bildung von Disulfidbrücken zu vernetzen.

Thiosulfatcellulosen wurden bereits durch Umsetzung von Tosylcellulose mit Natriumthiosulfat in DMSO synthetisiert ^[134, 135] oder durch die Substitution der Tresylgruppe (Trifluorethansulfonyl) von 6-O-Tresyl-2,3-dimethylcellulose durch Thiosulfat, hergestellt ^[75].

Vor kurzem berichteten Wenz *et al.* über die SAM Bildung einer Bisthiosulfatcellulose (TSHP) auf Gold- ^[60, 100] und Silberoberflächen ^[136]. Die Schichtdicke dieser Cellulosefilme wurde mittels Null-Ellipsometrie gemessen und betrug zwischen 2 und 4 nm. Die TSHP-Cellulose wurde durch partielle Addition von Tetrathionat an die C-C Doppelbindung der 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-cellulose (AHP) synthetisiert. Die Additionsreaktion war aber häufig träge und unvollständig. Die wässrigen Lösungen der TSHP-Cellulose neigten dazu, nach einigen Stunden auszufallen, vermutlich aufgrund von Quervernetzung über Disulfidbindungen. Das Verfahren wurde später von Liepold verbessert indem sie ausgehend von der AHP-Carboxymethylcellulose (AHP-CMC), über eine Bromhydrinzwischenstufe, die Thiosulfat-CMC (HTSHP-CMC) herstellte ^[102]. Durch das Verwenden der CMC als Ausgangsverbindung, ist die HTSHP-CMC besser wasserlöslich als die ursprüngliche TSHP-cellulose. Durch den höheren Substitutionsgrad mit

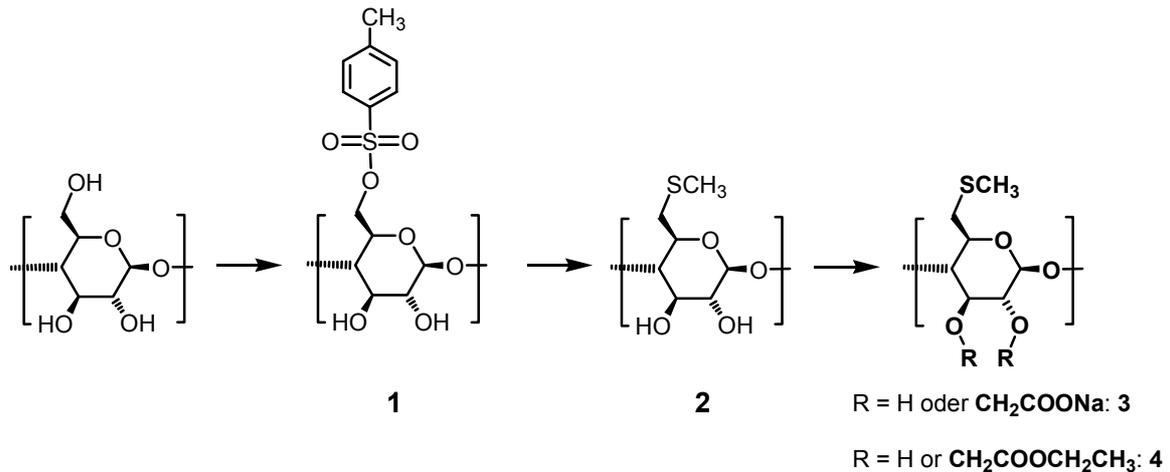
Thiosulfatgruppen ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$) bildet die HTSHP-CMC stabilere Monoschichten auf Gold als die TSHP-cellulose, mit Schichtdicken von 2 nm ^[102]. Aufgrund der *Mono*-Thiosulfat-Funktionalität ist auch die Tendenz zur Quervernetzung durch Disulfidbrücken sehr gering ^[38].

Zur Klasse der Thioethercellulosen gehört die 6-S-Methylthio-CMC (MTh-CMC) ^[38, 102]. Diese wird durch die Umsetzung von Tosylcellulose ($DS = 0.70$) mit Natriumthiomethylat in DMF hergestellt. Nach anschließender Carboxymethylierung erhält man die MTh-CMC. Diese ist gut wasserlöslich und bildet durch koordinative Bindungen des Methylthio-Restes mit der Goldoberfläche SAMs mit Schichtdicken von 1-3 nm ^[38].

3.2 Synthesekonzept

Vier alternative Synthesewege zur Darstellung thiofunktioneller Cellulosederivate sollen in dieser Arbeit verfolgt werden. Erstens soll das von Liepold ^[102] entwickelte Verfahren zur Herstellung der 6-S-Methylthio-carboxymethylcellulose **3** (MTh-CMC) hinsichtlich der Regioselektivität in Position C-6 optimiert werden. Liepold erhielt bei der Synthese der MTh-CMC **3** ein Substitutionsgrad von $DS_{\text{Methylthio}} = 0.65$. Die NMR-Spektren zeigten jedoch das nicht nur die Position C-6 substituiert wurde, sondern auch die Positionen C-2,3 ^[102].

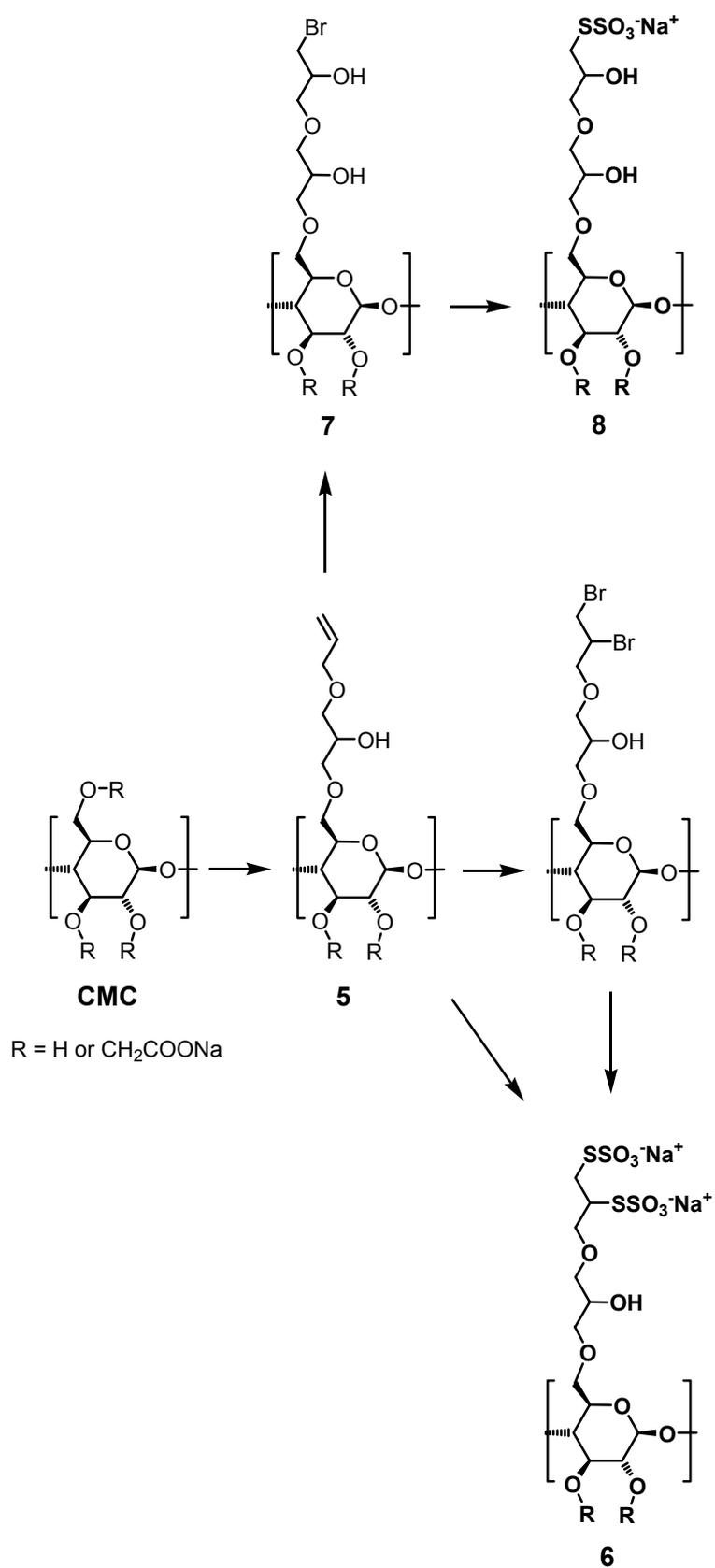
Ausgehend von nativer Cellulose soll nun die Tosylcellulose **1** hergestellt werden die **nur** in Position C-6 der Glcp-Einheit regioselektiv substituiert ist. Durch nukleophilen Angriff von Natriumthiomethylat an den primären Positionen von Tosylcellulose **1** soll der Thioether **2** hergestellt werden. Durch anschließende partielle Carboxymethylierung der Hydroxylgruppen von **2** mittels Chloressigsäurenatriumsalz und Chloressigsäureethylester soll Salz **3** und der Ester **4** synthetisiert werden (Schema 3.1).



Schema 3.1: Synthesewege zu 6-S-Methylthio-cellulosederivate.

Des Weiteren sollen die Synthesewege zur Herstellung der Bunte-Salze **6** und **8** in Hinsicht auf die Erhöhung des Substitutionsgrades (DS) an Thiosulfat-Funktionalität, optimiert werden. Choi erhielt für die Bisthiosulfatcellulose nur sehr kleine DS-Grade an Bisthiosulfat ($\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}}$) zwischen 0.05 und maximal 0.1 ^[19]. Einerseits soll hier durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen bei der Addition des Tetrathionats an die C-C Doppelbindung der Allyl-Funktion von **5** eine Erhöhung des $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}}$ erreicht werden. Andererseits soll über eine Dibromzwischenstufe versucht werden die Erhöhung des $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}}$ zu erreichen (siehe Schema 3.2). Aufgrund des höheren Substitutionsgrades $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}}$ soll die Erzeugung von stabilen Monoschichten auf Gold- und Silberoberflächen ermöglicht werden.

Liebold erhielt bei der Synthese des Bunte-Salzes **8** ein Substitutionsgrad von $\text{DS}_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$ ^[102]. Dabei ging sie von der AHP-CMC **5** mit einem DS_{Allyl} von 0.23 aus. Durch Erhöhung der DS_{Allyl} der Vorstufe **5** soll hier die Synthese eines Thiosulfat-Derivats mit einem höheren $\text{DS}_{\text{Thiosulfat}}$ ermöglicht werden.



Schema 3.2: Synthesewege zu Bithiosulfat (6) - bzw. Thiosulfat (8) - CMCs.

3.3 Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulosederivaten

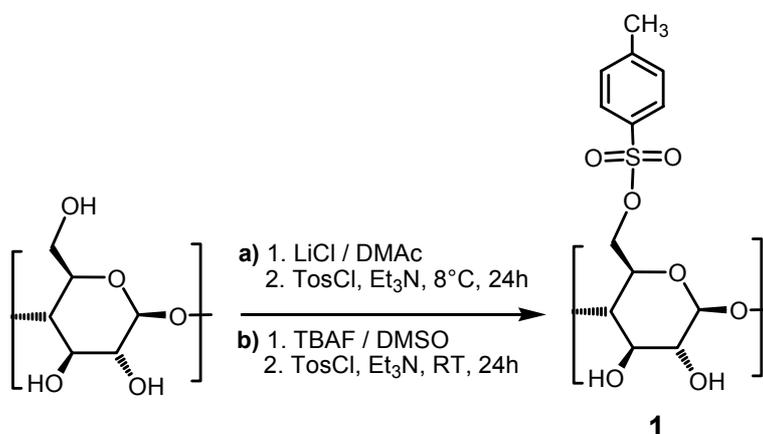
3.3.1 Synthese von Cellulose-6-O-*p*-toluolsulfonat **1**

Die Synthese des Cellulose-6-O-*p*-toluolsulfonats **1** erfolgte aus der nativen Cellulose unter homogenen Reaktionsbedingungen. Dazu wurden folgende Lösungsmittelsysteme verwendet: zum einen das Lösungsmittelsystem Lithiumchlorid (LiCl) / Dimethylacetamid (DMAc) ^[26]. Hier wurde die getrocknete Cellulose in DMAc suspendiert und mit LiCl versetzt. Dadurch werden die inter- und intramolekularen Wasserstoffbrücken aufgebrochen und die Cellulose geht in Lösung. Zum anderen wurde das Lösungsmittelsystem Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) / Dimethylsulfoxid (DMSO) benutzt ^[28]. Dieses System hat den Vorteil dass die Cellulose bei Raumtemperatur (RT) innerhalb von 20 Minuten in Lösung geht.

Klemm und Mitarbeiter zeigten dass bis zu einem Tosylierungsgrad von DS = 0.46 die Cellulose fast ausschließlich an den primären Kohlenstoffatom C-6 substituiert wird. Eine vollständige Tosylierung an C-6, ohne Substitution an C-2 und C-3, ist nicht möglich ^[137].

Die Synthese einer ausschließlich in Position C-6 tosylierten Cellulose sollte hier durch variieren des Anteils an eingesetztem Tosylchlorid erreicht werden.

Die im Lösungsmittelsystem LiCl / DMAc gelöste Cellulose wurde mit Tosylchlorid bei 8°C mit Triethylamin als Base umgesetzt (Schema 3.3 a). Dabei wurden folgende Verhältnisse von Tosylchlorid zu Cellulose ausprobiert: 1:1, 3:1, 5:1.



Schema 3.3: Synthese von Cellulose-6-O-*p*-toluolsulfonat **1**.

Das Produkt wurde jeweils nach 24 h Reaktionszeit isoliert. Man erhält Ausbeuten zwischen 58 und 75%. Aus der Elementaranalyse konnten Substitutionsgrade DS_{Tosyl} von 0.50 bis maximal 0.56 erreicht werden. Dabei erwies sich das Verhältnis Tosylchlorid zu Cellulose von 3:1 als das Beste in Bezug auf Reproduzierbarkeit der Reaktion und Ausbeute.

Die Tosylierung im Lösungsmittelsystem TBAF / DMSO wurde ebenfalls mit Tosylchlorid und Triethylamin als Base durchgeführt (Schema 3.3 b). Die drei Verhältnisse von Tosylchlorid zu Cellulose von 1:1, 3:1, 5:1 wurden auch hier getestet. Das Produkt wurde jeweils nach 24 h Reaktionszeit bei RT isoliert. Die Ausbeuten lagen bei dieser Reaktionsführung bei 70%. Die aus der Elementaranalyse bestimmten Tosylierungsgrade lagen zwischen 0.30 und 0.45. Hier erwies sich das Verhältnis Tosylchlorid zu Cellulose von 3:1 auch als das Beste in Bezug auf Reproduzierbarkeit der Reaktion und Ausbeute. Diese DS_{Tosyl} -Grade liegen um 0.55 niedriger als die von Heinze bestimmten Wert ($DS_{\text{Tosyl}} = 1.10$) bei gleichen Reaktionsbedingungen und gleichem Anteil an eingesetztem Tosylchlorid.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum der Tosylcellulose **1** (z. B.: $DS = 0.56$) ist zu erkennen dass die Tosylierung ausschließlich in Position C-6 erfolgte. Eine Substitution der sekundären Positionen C-2 und/oder C-3 würde dazu führen dass das Signal des Kohlenstoffatoms C-1 aufspaltet^[48]. So würde z. B. das Signal bei $\delta = 103$ ppm für das C-1 Atom eine Hochfeldverschiebung nach $\delta = 98$ ppm durch den Einfluss des substituierten C-2 Atoms erfahren. Diese Aufspaltung des C-1 Signals ist im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht zu erkennen (Abb. 3.1).

Aufgrund der Substitution der Position C-6 der Cellulose mit Tosyl, spaltet das Signal in C-6^A und C-6^B auf. Dabei steht **A** für die Glcp-Einheit die eine Tosyl-Gruppe trägt und **B** für eine unsubstituierte Glcp-Einheit. Im ^{13}C -NMR-Spektrum der Tosylcellulose ist C-6^A ($\delta = 69.4$ ppm) gegenüber C-6^B ($\delta = 60.4$ ppm) tieffeldverschoben. Durch die Tosylierung spaltet auch das Signal des Kohlenstoffs C-4 in C-4^A und C-4^B auf (siehe Abb. 3.1).

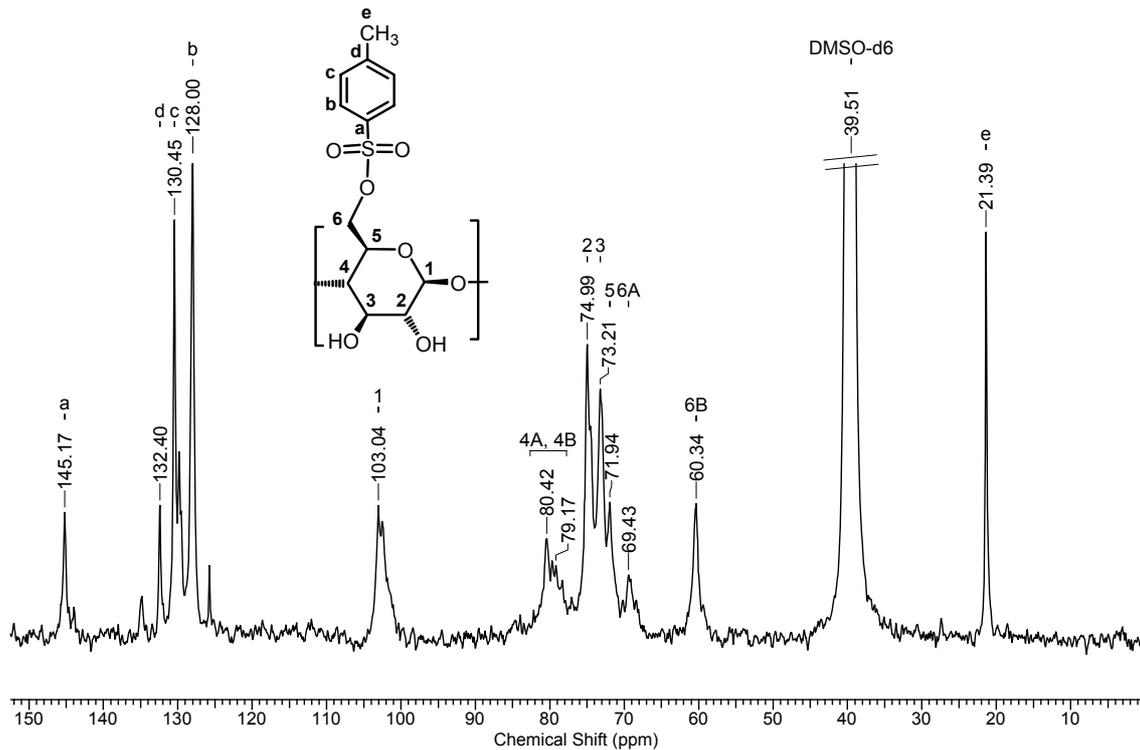


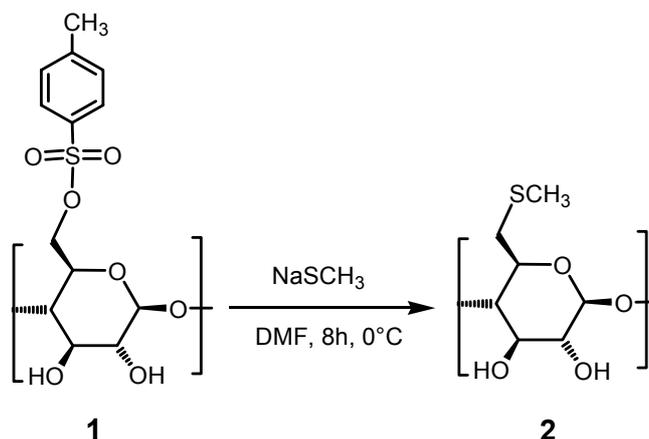
Abb. 3.1: ^{13}C -NMR-Spektrum von Cellulose-6-O-*p*-toluolsulfonat **1** (DS = 0.56) in $\text{DMSO-}d_6$.

Neben den Sulfonaten sind auch Halogenidionen wie Bromid oder Iodid sehr gute Abgangsgruppen [138, 139]. Der Vorteil dabei liegt in der Regioselektivität der Halogenidionen. Sie reagieren nach $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus ausschließlich an primären Positionen. Für die Einführung von Bromgruppen an die Cellulosekette wurde eine Vorschrift nach Furuhashi verwendet [133, 140]. Dabei wurde hier nach dem Lösen der Cellulose in $\text{LiBr} / \text{DMAc}$ Lösungsmittelsystem, über einen Vilsmeier-Haack-Mechanismus bromiert. Als Bromierungsreagenzien wurden Triphenylphosphan / *N*-Bromsuccinimid und Triphenylphosphan / Tetrabromkohlenstoff benutzt. Es traten bei beiden Reaktionen starke Löslichkeitsprobleme auf. Als alternative Reaktion wurde die Bromierung mittels Bromomorpholiniumbromid (Vilsmeier-Hack Reagenz) [138] im Lösungsmittelsystem TBAF / DMF durchgeführt. Obwohl aus der Elementaranalyse ein DS-Grad an Brom von 0.97 berechnet wurde, war diese Bromcellulose in organischen Lösungsmitteln unlöslich und unter Zugabe von TBAF oder LiBr sehr schwer löslich, und deshalb für weitere Derivatisierungen nicht verwendbar.

Das Cellulose-6-O-*p*-toluolsulfonat **1** (DS = 0.56) ist in DMSO , DMF und DMAc gut löslich und eignet sich sehr gut zur Synthese von Thioethercellulosen.

3.3.2 Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulose **2**

Die Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulose **2** erfolgte durch die Umsetzung der Tosylcellulose **1** mit Natriumthiomethylat in DMF bei 0°C (Schema 3.4).



Schema 3.4: Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulose **2**.

Dabei wurde eine vollständige Substitution aller Tosylgruppen in **1** erreicht. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 64% hergestellt werden und ist im Basischen (> 0.3 M NaOH Lösungen) und organischen Lösungsmittel wie DMF und DMSO löslich.

In der Abb. 3.2 ist das ^{13}C -DEPT-NMR Spektrum der Thiocellulose **2** zu sehen. Das Fehlen der Signale der Tosylgruppen bei 21.4 ppm und bei 128.0-145.2 ppm ist ein Beweis für die vollständige Substitution der Tosylgruppen durch die Methylthio-Funktionalität. Zudem ist die Hochfeldverschiebung des mit der Methylthio-Gruppe substituierten C-6 Kohlenstoff von $\delta = 69.4$ ppm nach $\delta = 34.9$ ppm zu sehen. Das Signal der Methylthio-Gruppe erscheint bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 15.8$ ppm. Das Fehlen des Signals bei $\delta = 56.1$ ppm^[102] lässt schließen dass keine Substitution mit Methylthio-Gruppen in den Positionen C-2 und C-3 der Anhydroglucoseeinheit stattgefunden hat (siehe Abb. 3.2).

Aus dem Integrationsverhältnis des Signalbereiches für die Protonen der Methylthio-Gruppe bei 2.08 ppm und des Signals des H-1 Protons der Glcp-Einheit bei 5.19 ppm wurde im ^1H -NMR-Spektrum von **2** ein Substitutionsgrad an Methylthio-Gruppen von $\text{DS}_{\text{Methylthio}} = 0.58$ berechnet werden. Dieser Wert stimmt gut mit dem aus der Elementaranalyse berechneten Wert von $\text{DS}_{\text{Methylthio}} = 0.55$ überein.

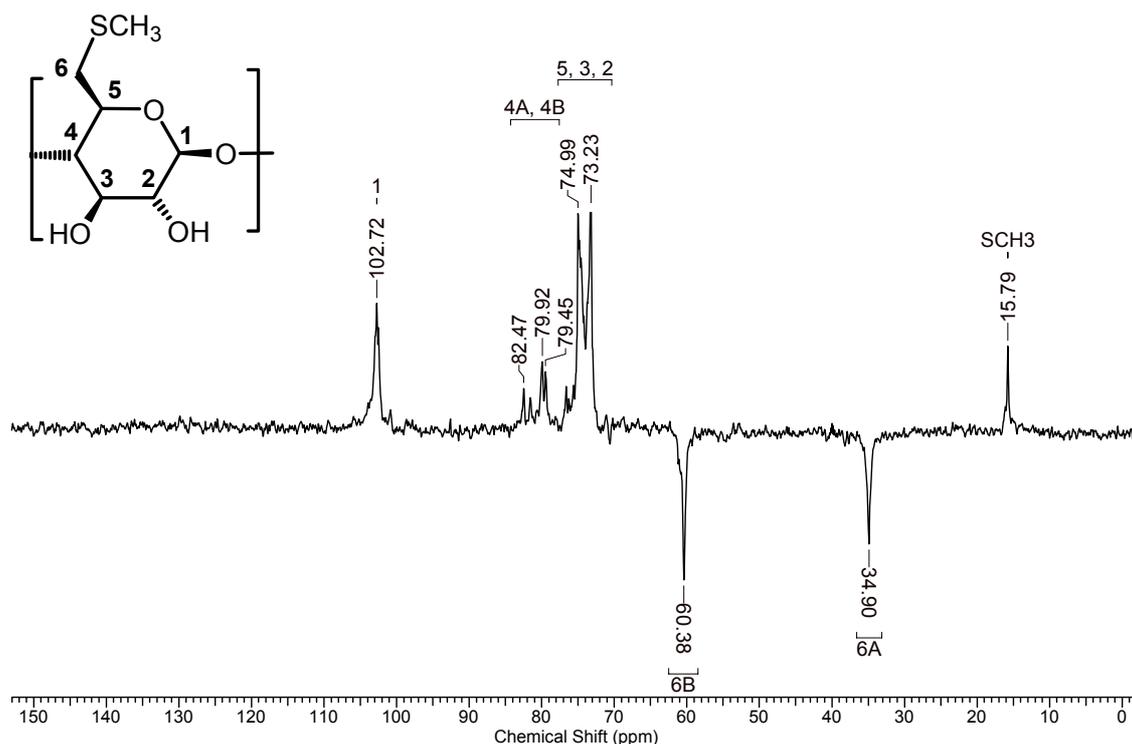


Abb. 3.2: ¹³C-DEPT-NMR-Spektrum von 6-S-Methylthio-6-deoxy-cellulose **2** in DMSO-*d*₆.

Der DS-Grad berechnet aus der Elementaranalyse ist dabei als genauer zu betrachten, da bei der Bestimmung mittels NMR-Spektroskopie die Integration der oben genannten Signalbereiche, aufgrund der nicht optimalen Basislinientrennung der Signale, immer mit einem grösseren Fehler behaftet ist. Zusätzlich wurde auch festgestellt (Elementaranalyse) dass ein sehr geringer Anteil an Tosylgruppen (ca. 1%) während der Reaktion hydrolysiert wird. Im FTIR-Spektrum der thiofunktionalisierten Cellulose **2** kann man deutlich die C-H Valenzschwingungen der Methylthio-Gruppe bei $\nu = 2962 \text{ cm}^{-1}$ erkennen. Die C-S-Bindung zeigt eine Bande bei $\nu = 705 \text{ cm}^{-1}$.

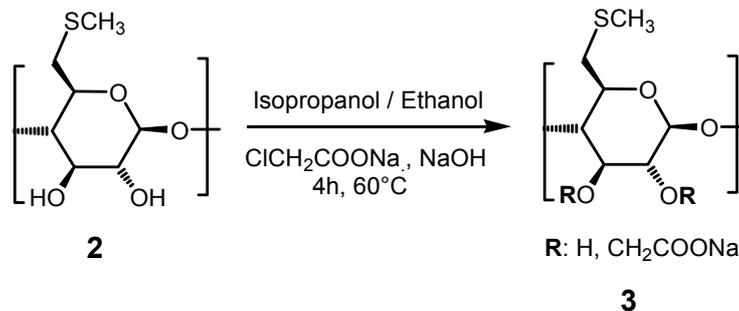
3.3.3 Synthese von 6-S-Methylthio-6-deoxy-carboxymethylcellulose

Natrium Salz **3**

Die Einführung von Carboxyl-Funktionalitäten in die 6-S-Methylthio-6-deoxy-cellulose **2** sollte der besseren Löslichkeit des Derivats in Wasser dienen. Jedoch kann man mit dieser funktionellen Gruppe auch weitere chemische Derivatisierungen durchführen

wie z. B. der Synthese von Reaktivestern der 6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose **3**.

Bei der Reaktion handelt es sich um eine Alkylierung der Hydroxylgruppen der Glcp-Einheiten der Verbindung **2** mittels Chloressigsäure Natrium Salz. Die Reaktion wurde dabei heterogen in einem Isopropanol / Ethanol Gemisch durchgeführt (Schema 3.5).



Schema 3.5: Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose Na Salz **3**.

Nach einer Reaktionszeit von 4 h bei 60°C wurde **3**, nach Ultrafiltration, in einer Ausbeute von 68% isoliert. Das Thio-CMC-Derivat **3** ist ab einem pH-Wert > 3 gut wasserlöslich. Durch Ansäuern der wässrigen Lösung bei pH-Werten ≤ 3 erhält man die protonierte Form von **3** die in aprotischen polaren Lösungsmitteln wie DMF und DMSO gut löslich ist.

Im ¹³C-DEPT-NMR Spektrum von 6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose Na Salz **3** ist eine Carboxymethylierung der Hydroxylgruppen in Position C-2 (δ = 71.8 ppm) und C-6 (δ = 69.6 ppm) der Glcp-Einheit zu erkennen ^[141] (siehe Abb. 3.2). Die Signale für die Protonen der Carboxymethylgruppen liegen im ¹H-NMR-Spektrum im Bereich der Cellulosegerüstprotonen bei δ = 4.25-4.13 ppm. Aus der Elementaranalyse wurde ein Substitutionsgrad DS_{Carboxymethyl} = 1.0 bestimmt.

Im ¹³C-NMR-Spektrum wie auch im FTIR-Spektrum kann das Vorhandensein der Carboxymethylgruppe nachgewiesen werden. So erscheint im ¹³C-NMR Spektrum das Kohlenstoffatom für die Carboxylgruppe bei δ = 178.5 ppm.

Die Valenzschwingungsbande des Carboxylats erscheint im FTIR-Spektrum bei ν = 1597 cm⁻¹.

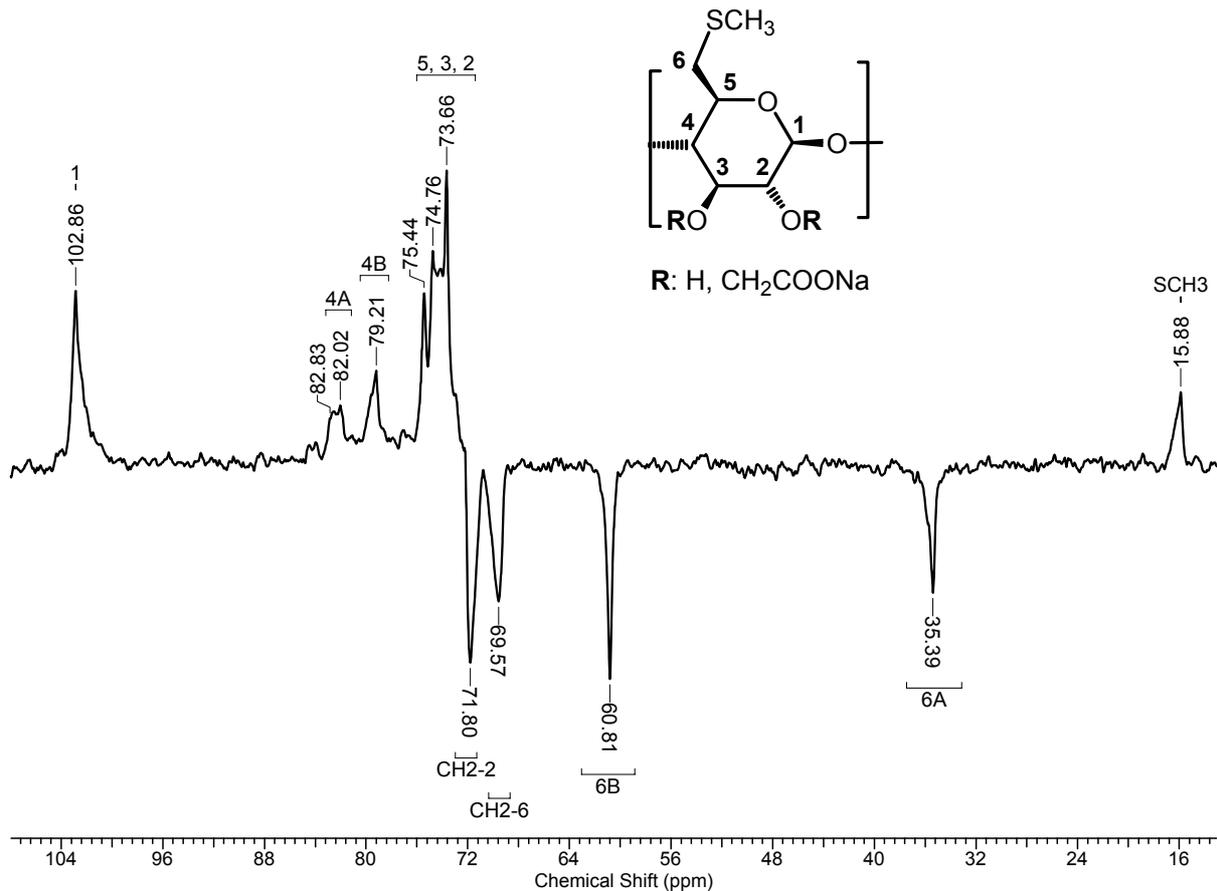


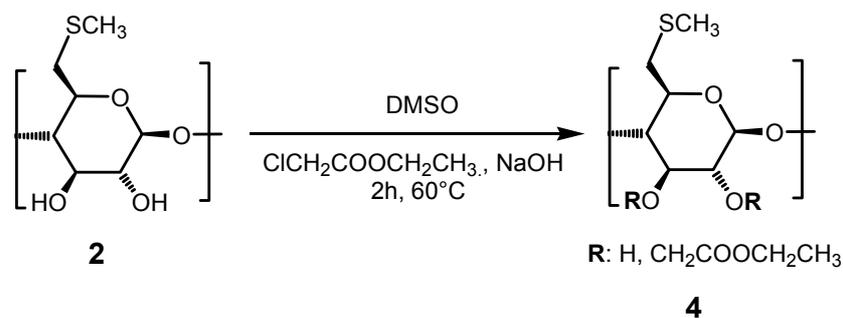
Abb. 3.3: ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum von 6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulose **2** in D_2O (innerer Standard: Acetonitril).

3.3.4 Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-CMC-ethylester **4**

Die 6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulose **2** sollte auch zur Herstellung des 6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose-ethylesters **4** eingesetzt werden. Der Ester **4** sollte mit einem niedrigen Substitutionsgrad an Carboxymethylethylester-Gruppen (DS_{EE}) hergestellt werden, da bei der anschließenden Reaktion mit Hydrazin zum entsprechenden reaktiven Hydrazid-Derivat, eine vollständige Umsetzung der Ester-Gruppen erwünscht war.

Die Alkylierung der Thiocellulose **2** mittels Chloressigsäureethylester wurde hier homogen in Dimethylsulfoxid durchgeführt (Schema 3.6).

Nach nur 2 h bei $60^\circ C$ wird das Produkt **4** in 93%-iger Ausbeute isoliert. Der Ester **4** ist in Wasser gut löslich.



Schema 3.6: Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-CMC-ethylester **4**.

Die Bestimmung des Substitutionsgrades der Estergruppen (EE) erfolgte hier ausschließlich aus der Elementaranalyse, da die entsprechenden Signale, speziell des Cellulose-Rückgrats, bei der NMR-spektroskopischen Auswertung nicht integrierbar waren. Man erhält ein Substitutionsgrad von $DS_{EE} = 0.16$.

Im ¹³C-NMR-Spektrum des Derivats **4** erscheinen die typischen Signale der Carboxymethylethylester-Gruppen wie folgt: bei $\delta = 177.8$ ppm das Kohlenstoffatom der Carboxyl-Funktionen, die CH₂-Gruppen der Carboxymethyl-Funktion bei $\delta = 72.1$ - 69.4 ppm und die CH₂-, bzw. CH₃-Gruppen des Ethylesters bei $\delta = 57.8$ ppm und $\delta = 17.2$ ppm. Die Signale für die Protonen der Carboxymethylgruppen liegen im ¹H-NMR-Spektrum im Bereich der Cellulosegerüstprotonen bei $\delta = 4.22$ - 4.10 ppm, die Signale des Ethylesters bei $\delta = 3.60$ ppm (CH₂-Gruppe) und $\delta = 1.18$ ppm (CH₃-Gruppe).

Im FTIR-Spektrum des Esters **4** ist die Valenzschwingungsbande der Carbonyl-Funktion bei einer Wellenzahl von $\nu = 1590$ cm⁻¹ zu erkennen.

3.4 Synthese von 6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz (TSHP-CMC Na) **6**

3.4.1 ¹H-NMR-spektroskopische Bestimmung der Substituentenverteilung in der Carboxymethylcellulose mittels Abbauanalyse

Bei der Synthese der Bisthiosulfatcellulose **6** ^[19] und der Thiosulfatcellulose **8** ^[102] bestand die Aufgabe darin, eine Erhöhung des Substitutionsgrades an Bisthiosulfat-, bzw. Thiosulfat-Gruppen zu erzielen.

Als Ausgangsverbindung für diese Synthesen wurde die Allylhydroxypropyl-CMC **5**

(AHP-CMC) eingesetzt. Diese wurde ihrerseits aus einer käuflichen Carboxymethylcellulose mit einem Substitutionsgrad an Carboxymethylgruppen von $DS_{CMC} = 0.90$ und einer Molmasse von $M_W = 250000$ g/mol synthetisiert.

Um eine Erhöhung des Substitutionsgrades an Allylhydroxypropyl-Gruppen (DS_{Allyl}) von Derivat **5** zu erreichen war es notwendig den partiellen Substitutionsgrad an CMC-Gruppen in Position C-6 der Glcp-Einheit der CMC zu kennen. Ist dieser bekannt, so kann man den partiellen Substitutionsgrad an freien Hydroxyl-Gruppen in Position C-6 ($x_{6, OH}$) berechnen. Durch gewählte Synthesestrategien sollte dann versucht werden diese freien Hydroxylgruppen vollständig mit Allylhydroxypropyl-Funktionalitäten zu substituieren.

Zur Bestimmung der Substituentenverteilung der käuflichen CMC wurde diese zu den carboxymethylierten Glcp-Monomereinheiten unter Erhalt der Information des Substitutionsortes, abgebaut. Anschließend wurde die Substituentenverteilung mittels 1H -NMR-Spektroskopie bestimmt.

Der Abbau der CMC ($DS_{CMC} = 0.90$) erfolgte säurehydrolytisch nach einer Prozedur von Arisz *et al.* [142]. Dabei wurde die Carboxymethylcellulose mit 2 M Trifluoressigsäure (TFA) hydrolysiert. Nach einer Reaktionszeit von 50 h bei $100^\circ C$ und anschließender Abtrennung der TFA wurden die Abbauprodukte durch Gefriertrocknung isoliert. Das 1H -NMR-Spektrum der CMC Abbauprodukte ist in Abbildung 3.4 zu sehen.

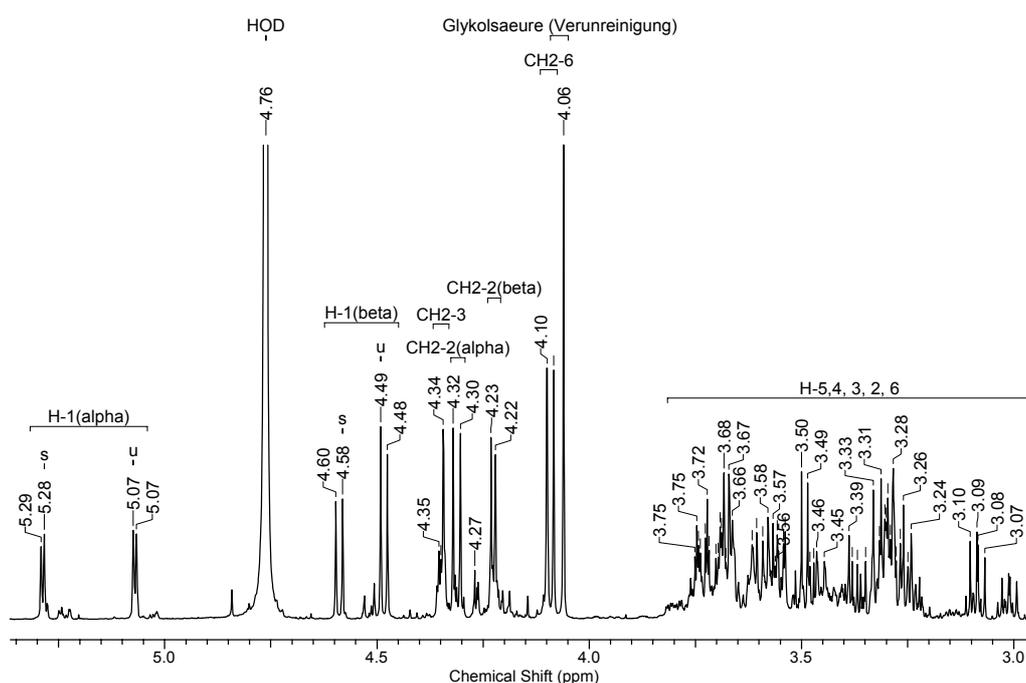


Abb. 3.4: 1H -NMR-Spektrum nach säurehydrolytischem Abbau von CMC.

Die Zuordnung der Signale in Abbildung 3.6 wurde mittels HC-COSY-NMR Spektroskopie durchgeführt und mit literaturbekannten Auswertungen verglichen ^[36]. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt einen vollständigen Abbau der CMC in die entsprechenden monomeren Einheiten. Die Abbaureaktion kann anhand der Intensität der H-1 Protonen der Glcp-Einheiten kontrolliert werden. Ist diese vollständig, so sind die H-1 Signale scharf und spalten in zwei Sätze von Dubletts zwischen $\delta = 4.5-5.3$ ppm. Die Aufspaltung in Dubletts wird durch Kopplung mit dem Proton H-2 verursacht. Der Satz an Dubletts bei tieferer Feldverschiebung ($\delta = 5.3$ und 5.1 ppm) kann dem Proton an der C-1 Position des α -Anomers; die bei höherer Feldverschiebung ($\delta = 4.6$ und 4.4 ppm) dem Proton an der C-1 Position des β -Anomers zugeordnet werden ^[143]. Die „S“ und „U“ Kennzeichnungen der Dubletts in Abbildung 3.6 stehen für die mit Carboxymethyl *substituierten* und *unsubstituierten* Hydroxylgruppen in Position C-2. Die Carboxymethylierung der Hydroxylgruppe in Position C-2 induziert eine erhebliche Tieffeldverschiebung des Protons in C-1 (in Abb. 3.6 mit H-1 (α)_s gekennzeichnet) ^[36].

Im ¹H-NMR-Spektrum sind die bedeutendsten Signale die der Carboxymethylprotonen zwischen $\delta = 4.5-5.3$ ppm und die der Protonen der Glcp-Monomereinheiten zwischen $\delta = 3.0-3.8$ ppm. Die Integration der H-1 Protonen im Verhältnis zu der Integration der Protonen des Glcp-Gerüsts ergab ein Verhältnis von 1:6. Dies ist allgemein zu erwarten wenn die Hydrolyse vollständig abgelaufen ist. Um die anschließende fehlerfreie Bestimmung der partiellen Substitutionsgrade zu gewährleisten, ist es wichtig dass diese Voraussetzung (vollständige Hydrolyse) erfüllt wird.

Die Substituentenverteilung der Carboxymethyl-Gruppen entlang der Cellulosekette wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie als Verhältnis der Integrale zweier Signale A/B bestimmt. Dabei steht A für $\frac{1}{2}$ der Integrale der CH₂-Gruppe der Carboxymethyl-Signale in der Region zwischen $\delta = 4.0-4.5$ ppm, und B für die Integration der Signale des H-1 Protons. Die Integration dieser Signale ist in Abbildung 3.5 zu sehen.

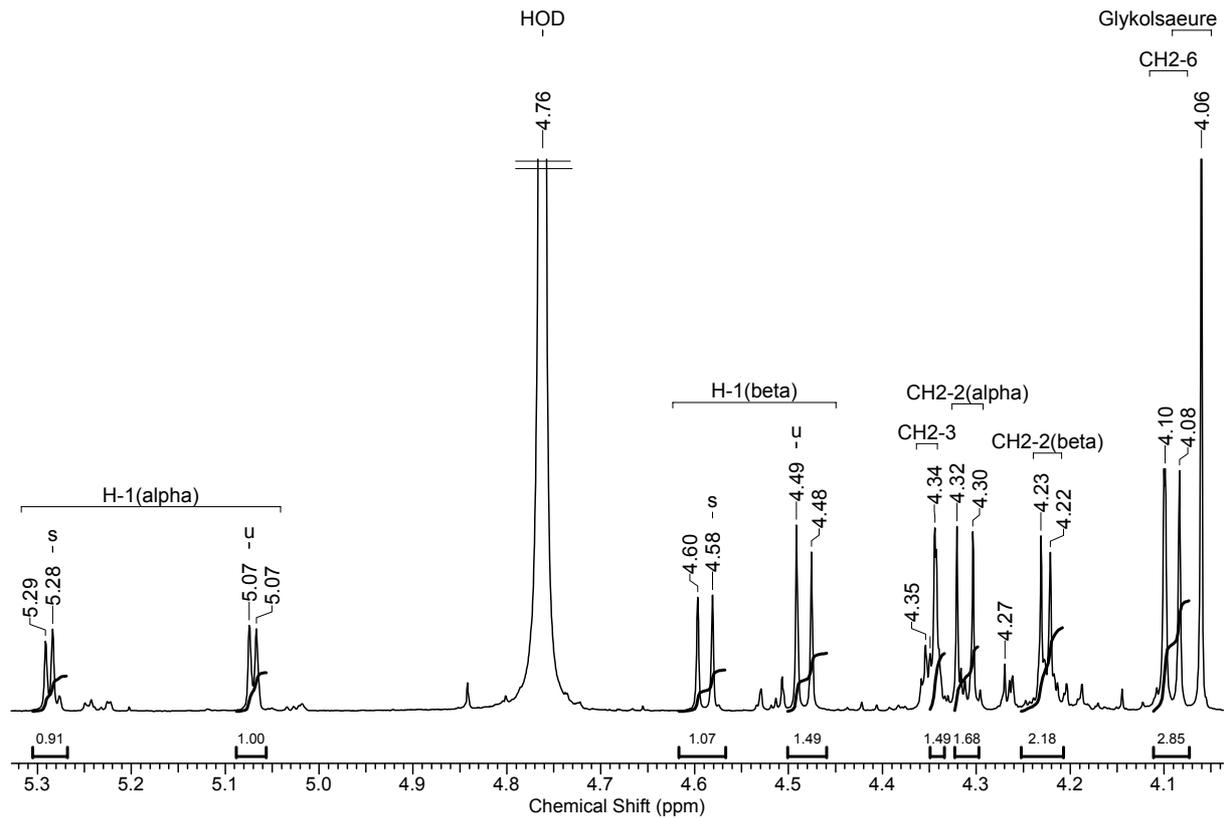


Abb. 3.5: ^1H -NMR-Spektrum von CMC nach säurehydrolytischen Abbau: Integration der Signale für die Berechnung des DS_{CM} bzw. x_2 , x_3 , x_6 .

Man kann nun nach folgenden Formeln den totalen Substitutionsgrad an Carboxymethyl-Gruppen (DS_{CM}) bzw. die partiellen DS-Grade (x) an CM-Gruppen in den Positionen 2, 3 und 6 berechnen:

$$\text{DS}_{\text{CM}} = \frac{A}{B} = \frac{\frac{1}{2} \cdot \int_{4.34}^{4.10} H_{\text{CH}_2-2,3,6}}{\int_{5.07}^{5.29} H_{\text{C}-1\alpha} + \int_{4.48}^{4.60} H_{\text{C}-1\beta}} = \frac{1/2 \cdot (1.49 + 1.68 + 2.18 + 2.85)}{(0.91 + 1.00) + (1.07 + 1.49)} = 0.91 \approx 0.90$$

$$x_2 = \frac{\frac{1}{2} \cdot \left(\int_{4.30}^{4.32} H_{(\text{CH}_2-2)_\alpha} + \int_{4.22}^{4.23} H_{(\text{CH}_2-2)_\beta} \right)}{\int_{5.07}^{4.30} H_{\text{C}-1\alpha} + \int_{4.48}^{4.60} H_{\text{C}-1\beta}} = \frac{1/2 \cdot (1.68 + 2.18)}{4.47} = 0.43$$

$$x_3 = \frac{1/2 \cdot \int_{4.34}^{4.35} H_{CH_2-3}}{\int_{5.07}^{5.29} H_{C-1\alpha} + \int_{4.48}^{4.60} H_{C-1\beta}} = \frac{1/2 \cdot 1.49}{4.47} = 0.17$$

$$x_6 = \frac{1/2 \cdot \int_{4.08}^{4.10} H_{CH_2-6}}{\int_{5.07}^{5.29} H_{C-1\alpha} + \int_{4.48}^{4.60} H_{C-1\beta}} = \frac{1/2 \cdot 2.85}{4.47} = 0.31$$

Es wurde somit ein totaler Substitutionsgrad an Carboxymethyl-Funktionalitäten von $DS_{CM} = 0.91$ bestimmt. Dieser entspricht den Herstellerangaben ($DS_{CM} = 0.90$). Die partiellen Substitutionsgrade in den Positionen 2, 3 und 6 betragen $x_2 = 0.43$, $x_3 = 0.17$ und $x_6 = 0.31$. Die Werte stimmen ganz gut mit denen in der Literatur veröffentlichten Werten überein ^[35].

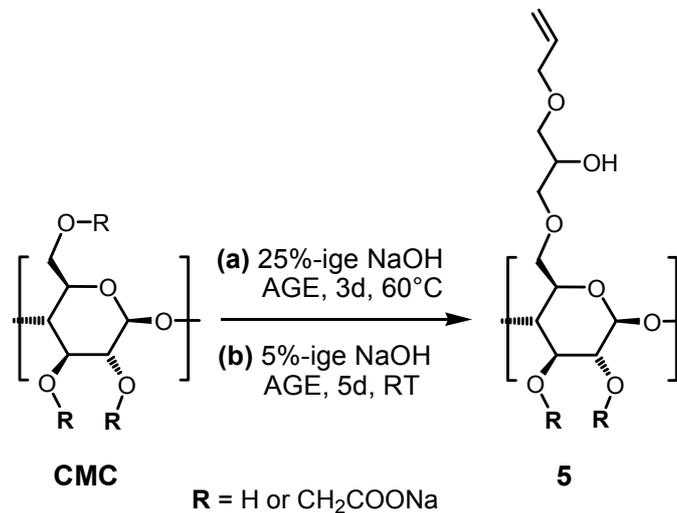
Der maximal erreichbare Substitutionsgrad in Position C-6 ist $DS_{C-6} = 1.00$. Da 0.31 davon die CM-Gruppen einnehmen ist der Rest von 0.69 den freien Hydroxylgruppen zuzuordnen. Das heißt, dass bei regioselektiver Umsetzung in Position C-6, ein maximaler Substitutionsgrad an eingeführter Funktionalität (F) von $DS_F = 0.69$ erreicht werden kann.

3.4.2 Synthese von 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz (AHP-CMC Na) 5

Das Cellulosederivat **5** wurde bereits von Liepold mit einem Substitutionsgrad an Allylhydroxypropylgruppen von $DS_{Allyl} = 0.38$ hergestellt ^[102]. Aufgabe war nun, durch Optimierung der Reaktionsbedingungen, eine Erhöhung des DS-Grades DS_{Allyl} zu erlangen, der aufgrund der Untersuchungen in Kapitel 3.4.1, in Position C-6 der Glcp-Einheit einen maximalen Wert von 0.69 erreichen kann.

Als Ausgangsverbindung für die Synthese wurde die käufliche Carboxymethylcellulose (CMC) ($DS_{Carboxymethyl} = 0.91$, $x_2 = 0.43$, $x_3 = 0.17$, $x_6 = 0.31$; $M_W = 250000$ g/mol) verwendet. Die Allyl-Carboxymethylcellulose **5** wurde auf zwei ähnlichen Synthesewegen hergestellt. Auf dem ersten Weg wird die CMC in 25%-iger

Natronlauge gelöst und mit Allylglycidylether (AGE) 3 Tage bei 60°C gerührt ^[100] (Schema 3.7 (a)). Nach Aufreinigung des Produktes durch Ultrafiltration, wurde das Produkt in 80%-iger Ausbeute hergestellt. Auf dem zweiten Weg wurde die CMC in 5%-iger Natronlauge gelöst und mit AGE 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt (Schema 3.7 (b)).



Schema 3.7: Synthese von 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz **5**.

Bei beiden Synthesewegen wurden unterschiedliche Verhältnisse von AGE zu CMC getestet (Tabelle 3.1). Dabei stellte sich heraus dass die Zugabe des Ethers eine bedeutende Rolle bei der Erhöhung des Substitutionsgrades spielt. Wenn die Zugabe von AGE auf einmal oder zügig erfolgt dann erhält man in der Regel niedrige DS-Grade. Diese Beobachtung ist auf die Tatsache zurückzuführen dass ein Teil des nun überschüssigen Ethers schneller hydrolysiert als die gewünschte Alkylierung mit der Cellulose einzugehen.

Bei der Herstellung von AHP-CMC nach *Syntheseweg (a)* wurde die entsprechende Menge an AGE in zwei gleiche Portionen eingeteilt. Die erste Zugabe erfolgte direkt nach dem Auflösen der CMC; die Zweite erfolgte 24 Stunden nach der ersten Zugabe. Dabei wurde jede Portion an AGE tropfenweise unter kräftigem Rühren zugegeben (siehe Kapitel 8.3.1 im präparativen Teil).

Die Zugabe der entsprechenden Mengen an AGE bei der Synthese von **5** nach *Syntheseweg (b)*, erfolgte in vier gleiche Portionen innerhalb von 4 Tagen, jeweils nach 24 Stunden nach der vorhergegangenen Zugabe. Dazu wurde auch hier jede Portion an AGE tropfenweise unter kräftigem Rühren zugegeben (siehe Kapitel 8.3.1 im präparativen Teil).

In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Mengen an AGE und die berechneten Substitutionsgrade DS_{Allyl} für die AHP-CMC, hergestellt nach *Syntheseweg (b)*, aufgeführt.

Tabelle 3.1: Vergleich zwischen DS und Menge an eingesetztem AGE (*Syntheseweg (b)*).

Verhältnis	DS_{Allyl}		Ausbeute [%]
	$n_{\text{AGE}}:n_{\text{CMC}}$	$^1\text{H-NMR}$	
1:1	0.12	-	94
2:1	0.23	0.25	84
3:1	0.43	0.45	79
5:1	0.64	0.65	87
11:1	0.67	0.69	86

Die Substitutionsgrade wurden sowohl aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum als auch mittels Elementaranalyse bestimmt. Die Bestimmung des Substitutionsgrades DS_{Allyl} mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie erfolgte aus dem Verhältnis der Integrale der Protonensignale von H-2" und H-1 (Abb. 3.6).

Die erhaltenen Werte aus der Elementaranalyse und NMR-Spektroskopie stimmen überein (siehe Tabelle 3.1). Aus der Tabelle 3.1 kann man beobachten das ab einem Verhältnis AGE:CMC von 5:1 ein DS-Grad $DS_{\text{Allyl}} = 0.65$ erreicht wird. Bei einem Verhältnis AGE:CMC von 11:1 wird nur noch eine minimale Erhöhung auf $DS_{\text{Allyl}} = 0.69$ erreicht. Dieser Substitutionsgrad entspricht dem maximal erreichbaren in der Position C-6 der Glcp-Einheit.

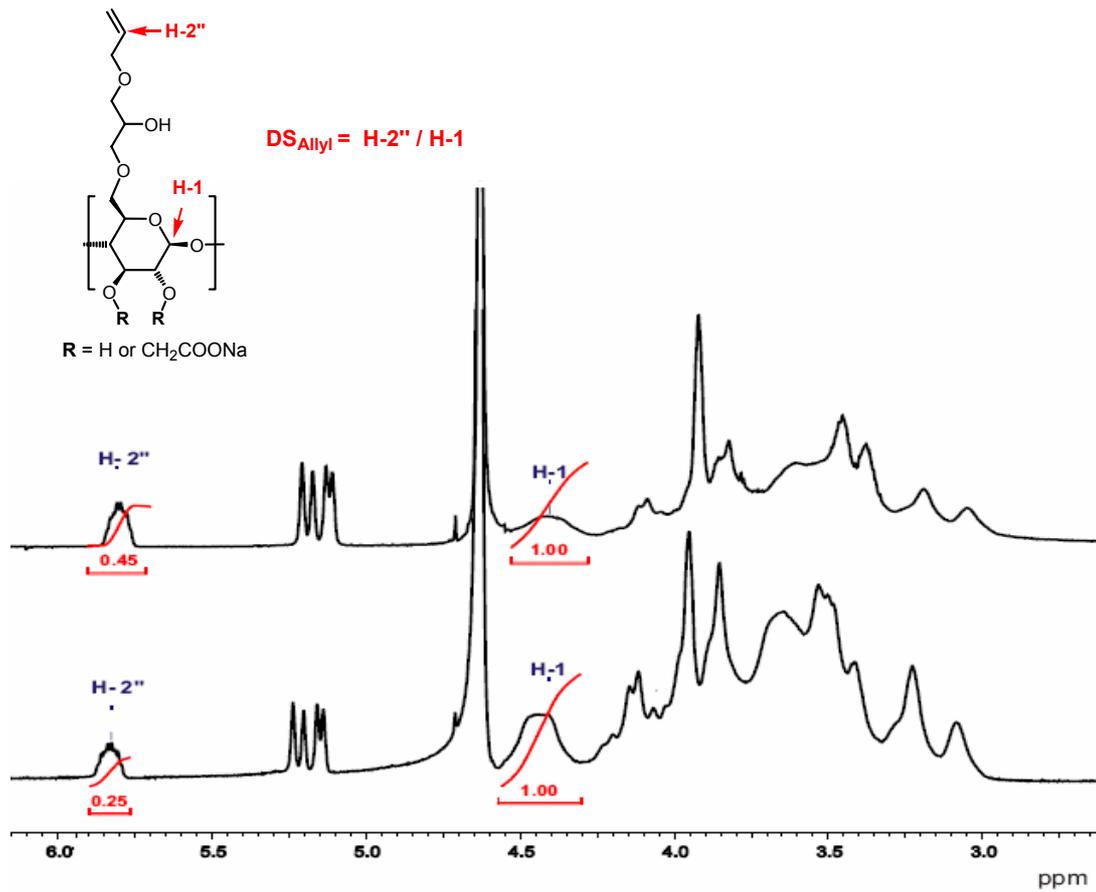


Abb. 3.6: Beispiel für die Berechnung von DS_{Allyl} mittels ¹H-NMR-Spektroskopie.

Die Abhängigkeit des DS_{Allyl} mit der eingesetzten Menge an AGE ist aus der Abb. 3.7 zu entnehmen.

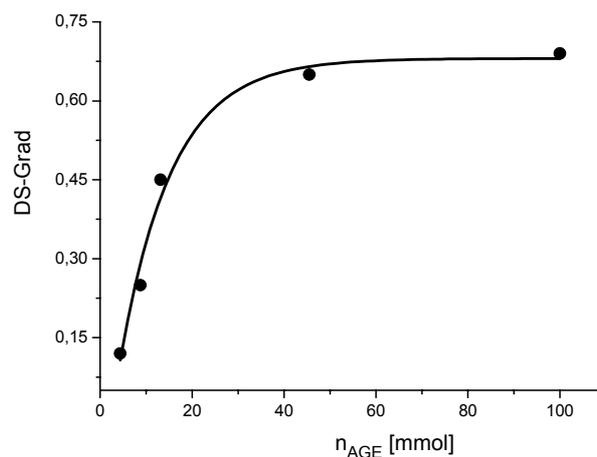


Abb. 3.7: Abhängigkeit des DS_{Allyl} von der eingesetzten Menge an Allylglycidylether (Syntheseweg (b)).

Die erfolgreiche Synthese der AHP-CMC **5** ist auch aus den ¹³C-, bzw. ¹³C-DEPT-NMR-Spektren ersichtbar (Abb. 3.8).

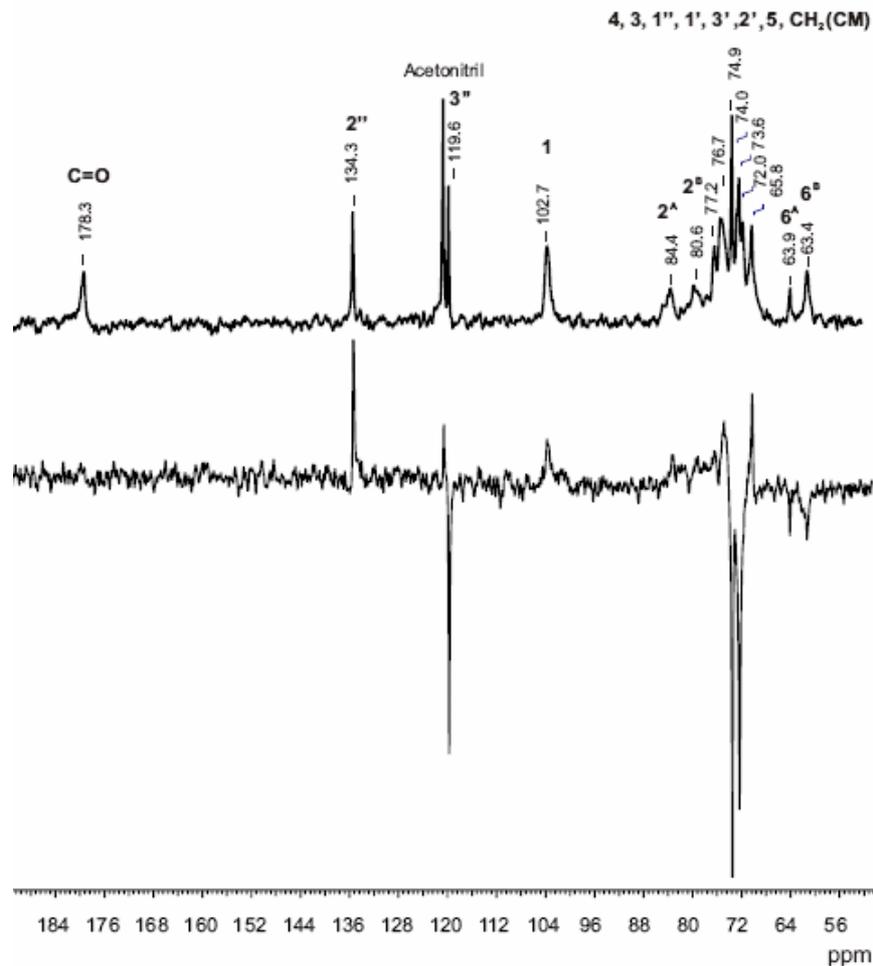


Abb. 3.8: ^{13}C -, bzw. ^{13}C -DEPT-NMR-Spektren von AHP-CMC Na **5** in D_2O (innerer Standard: Acetonitril).

Im ^{13}C -NMR-Spektrum von **5** in D_2O (Abb. 3.8) können die Signale bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 134.3$ ($\text{CH}=\text{CH}_2$), $\delta = 119.6$ ($\text{CH}=\text{CH}_2$) und $\delta = 74.9\text{-}73.6$ ppm der (3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-Gruppe (AHP) zugeordnet werden. Bei $\delta = 178.3$ ppm tritt das Signal des Carbonylkohlenstoffatoms auf. Die Signale des Cellulosegerüsts liegen zwischen $\delta = 102.7$ und 63.4 ppm. Des Weiteren ist eine Aufspaltung des Signals des Kohlenstoffatoms C-6 aufgrund der Substitution mit der AHP-Gruppe zu beobachten. So erfährt das Signal von C-6 durch die regioselektive Substitution mit der AHP-Gruppe eine Tieffeldverschiebung zu $\delta = 63.9$ ppm (C-6^A gekennzeichnet). Das Signal C-6^B bei $\delta = 63.4$ ppm steht für die unsubstituierte Glcp-Einheit. Das Signal der CH_2 -Gruppen der CMC ist bei $\delta = 65.8$ ppm zu sehen.

Aufgrund der statistischen Verteilung der CMC-Gruppen entlang der Cellulosekette und durch den Einfluss benachbarter AHP-Gruppen spaltet auch das Signal des C-2 Kohlenstoffatoms in C-2^A ($\delta = 84.4$ ppm) und C-2^B ($\delta = 80.6$ ppm) auf. Eine

zusätzliche Aufspaltung des C-2 Kohlenstoffatoms, aufgrund der Substitution mit AHP-Gruppen ist in den ^{13}C -NMR-Spektren nicht zu erkennen. Kohlenstoffatom C-3 zeigt auch keine Substitution mit AHP-Gruppen (Abb.3.8).

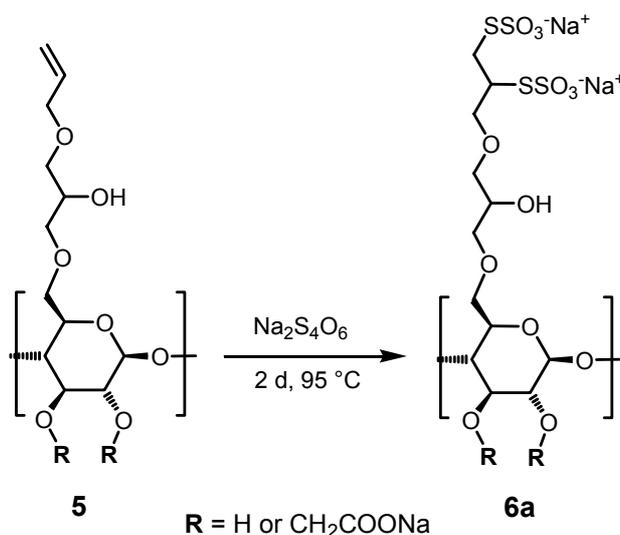
Die chemischen Verschiebungen der zusätzlichen Signale des Cellulosegerüsts stimmen mit literaturbekannten NMR-Auswertungen überein ^[36, 144, 145].

Mit Hilfe von GPC-MALLS-Messungen wurden auch die Molmassen von AHP-CMC Na **5** bestimmt. Die Molmassen von **5** liegen zwischen $M_W = 15000\text{-}40000$ g/mol bei der Herstellung nach *Syntheseweg (a)*. Diese niedrigere Molmasse ist durch den partiellen Abbau des CMC-Rückgrats aufgrund der relativ drastischen Reaktionsbedingungen zu erklären (25%-ige NaOH, 3 d, 60°C).

Durch die milderen Reaktionsbedingungen bei der Synthese der AHP-Cellulose **5** nach *Syntheseweg (b)* (5%-ige NaOH, 5 d, RT) erhält man Molmassen im Bereich von 95000-110000 g/mol.

3.4.3 Synthese von 6-O-(2'', 3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxy-propyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz (TSHP-CMC Na) **6a** und **6b**

Die Synthese der Bisthiosulfat-CMC **6a** erfolgte durch Addition von Tetrathionat an die C-C Doppelbindung des Allylderivats **5** nach einer analogen Synthese der TSHP-Cellulose aus der AHP-Cellulose ^[100]. Dazu wurde eine wässrige Lösung von AHP-CMC **5** mit Tetrathionat 2 Tage bei 95 °C umgesetzt (Schema 3.8).



Schema 3.8: Synthese von 6-O-(2'', 3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxy-propyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz **6a**.

Nach anschließender Aufarbeitung und Isolierung wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 75 - 89% erhalten.

Die TSHP-CMC **6a** wurde mittels ^1H -, ^{13}C -DEPT-, HC-COSY-NMR-Spektroskopie, FTIR-Spektroskopie und Elementaranalyse charakterisiert. In Abbildung 3.9 ist das HC-COSY-NMR-Spektrum der Verbindung gezeigt. Aus der Abbildung 3.9 kann man, vor allem aus dem ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum, entnehmen dass die TSHP-CMC **6** nahezu identisch ist mit der Ausgangsverbindung **5** ist. Jedoch zeigen die Signale der Doppelbindung im Spektrum der TSHP-CMC eine verminderte Intensität.

Die verminderte Intensität der Doppelbindung-Signale ist auch im ^1H -NMR-Spektrum zu erkennen und erlaubt die Berechnung des Substitutionsgrades der Bisthiosulfat-Gruppe ($\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}}$).

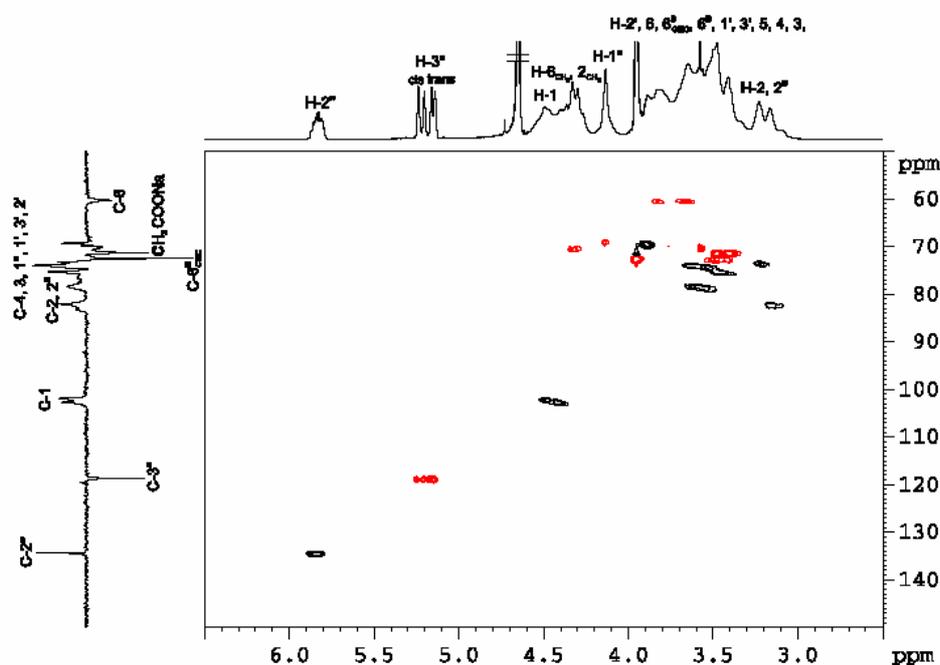


Abb. 3.9: HC-COSY-DEPT-NMR-Spektrum von TSHP-CMC Na **6a** in D_2O .

In Abbildung 3.10 ist als Beispiel das ^1H -NMR-Spektrum einer TSHP-CMC gezeigt die aus einer AHP-CMC **5** mit einem $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.69$ hergestellt wurde. Aus dem Verhältnis der Integralen der Signale der Protonen H-2'' und H-1 wurde ein $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.59$ berechnet. Diese Verminderung im Substitutionsgrad ist auf die Umsetzung der Doppelbindung zum Bisthiosulfat zurückzuführen.

Diese Annahme wurde auch durch die Elementaranalyse bestätigt. Der erhaltene Wert $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$ stimmt mit dem mittels NMR-Spektroskopie berechneten Wert überein.

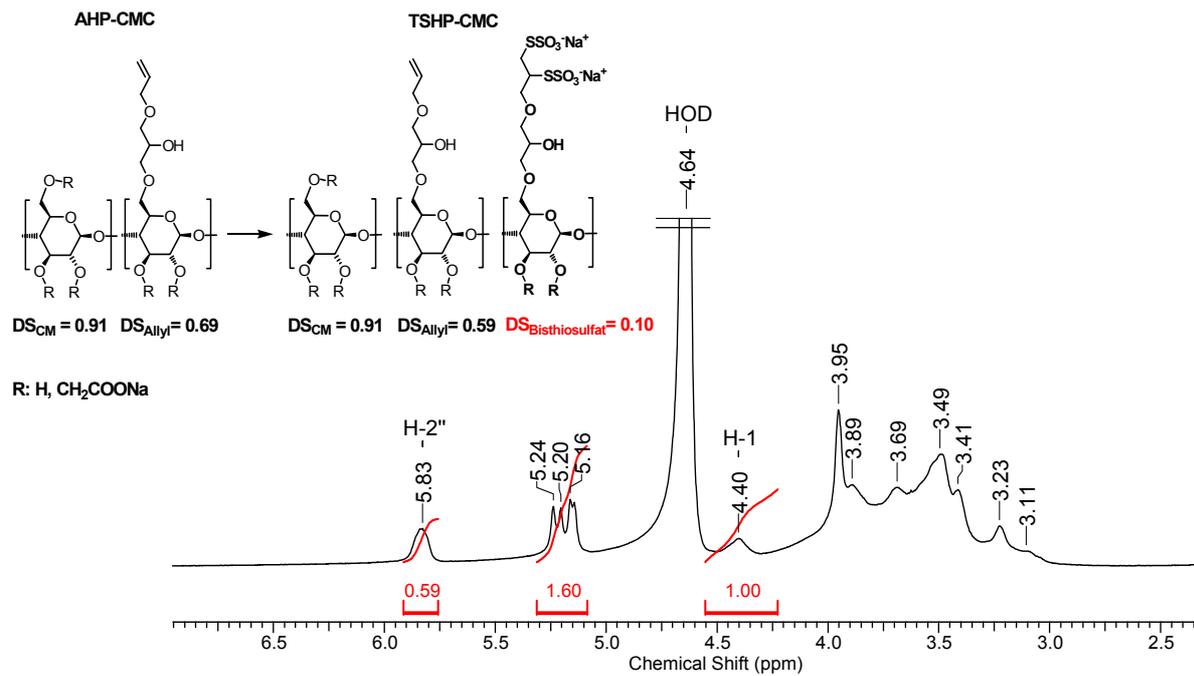


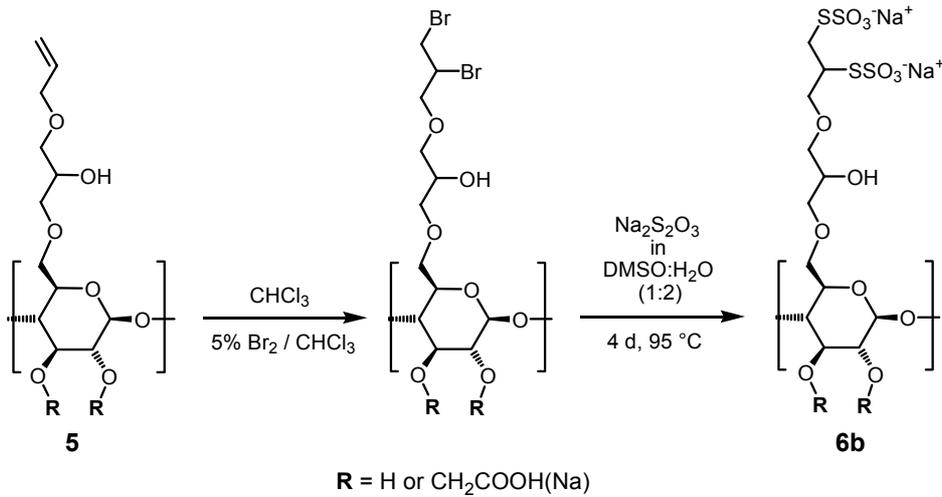
Abb. 3.10: Bestimmung des $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}}$ einer TSHP-CMC Na aus AHP-CMC ($\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.69$) mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

Das FTIR-Spektrum der TSHP-CMC **6a** weist die charakteristischen Schwingungsbanden der Thiosulfatgruppen bei $\nu = 1018 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{S}=\text{O})$) und $\nu = 614 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{S}-\text{S})$) auf^[100].

Die TSHP-CMC **6a** zeigt eine sehr gute Wasserlöslichkeit und wurde mit einer besseren Reproduzierbarkeit hergestellt als die von Choi beschriebene analoge TSHP-Cellulose^[19].

Um eine Erhöhung des $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}}$ der TSHP-CMC zu erreichen, wurde ein zweiter Syntheseweg ausgearbeitet.

Die TSHP-CMC **6b** wurde in einer zweistufigen Synthese (siehe Schema 3.9), nach einer abgeänderten Vorschrift von Axen *et al.*^[146] hergestellt. In der ersten Stufe erfolgte die heterogene Addition von Br_2 in Chloroform an die Doppelbindung der AHP-CMC **H** (freie Säure, $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.43$) **5**. Die Dibromzwischenstufe wurde nach Aufarbeitung direkt, ohne weitere Isolierung mit Natriumthiosulfat in einem DMSO / Wasser-Gemisch (1:2) umgesetzt. Nach 4 d bei 95°C wurde das Produkt **6b** nach Abdestillieren des Lösungsmittels (DMSO) durch Ultrafiltration gereinigt. TSHP-CMC **6b** wurde in einer Ausbeute von 80% hergestellt.



Schema 3.9: Synthese von 6-O-(2'', 3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxy-propyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz **6b** in einer zweistufigen Synthese.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum in Abbildung 3.11 zeigt eine deutliche partielle Umsetzung der Allyl-Doppelbindungen von **5**.

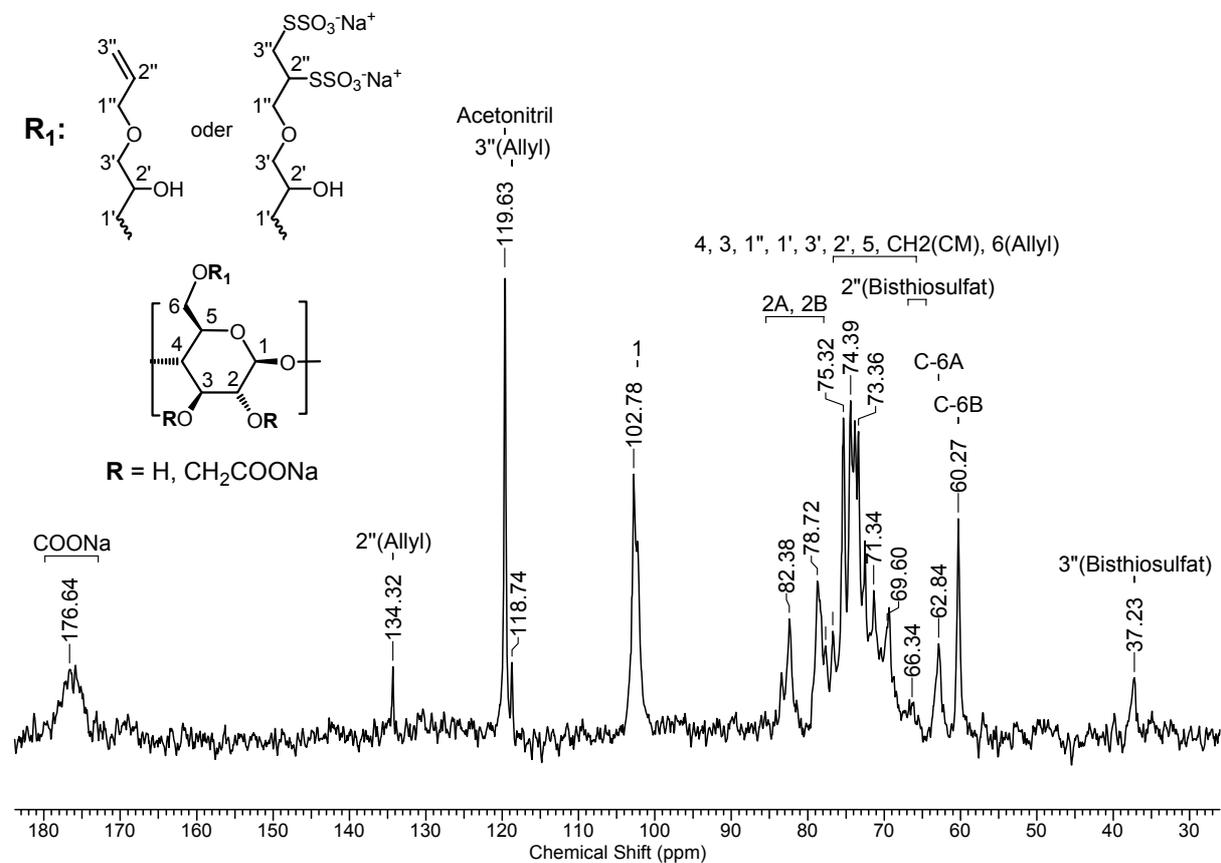


Abb. 3.11: ^{13}C -NMR-Spektrum von TSHP-CMC **6b** (innerer Standard: Acetonitril).

Durch die Substitution mit Bisthiosulfatgruppen erfährt das Kohlenstoffatom C-2" eine starke Hochfeldverschiebung von $\delta = 134.3$ ppm nach $\delta = 66.3$ ppm und C-3" von $\delta = 119.6$ ppm nach $\delta = 37.2$ ppm.

Das C-6^A Kohlenstoffatom aus der AHP-CMC **5** erfährt durch die Substitution auch eine Hochfeldverschiebung von $\delta = 63.9$ ppm zu $\delta = 62.8$ ppm. Das unsubstituierte C-6^B Atom ist bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 60.3$ ppm zu sehen.

Die Substitution der Allyl-Funktionalitäten gelang nur partiell da bei der ersten Stufe die Bromierung der AHP-CMC in Suspension durchgeführt wurde und die Reaktion dementsprechend träger abläuft. Die niedrigen Signale der C-Atome der Doppelbindung (C-2", C-3") sind im ¹³C-NMR-Spektrum noch bei $\delta = 134.3$ ppm und $\delta = 118.8$ ppm zu sehen.

Aus der Elementaranalyse wurde ein $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.17$ berechnet. Dieser liegt um 70% über dem der einstufigen Synthese.

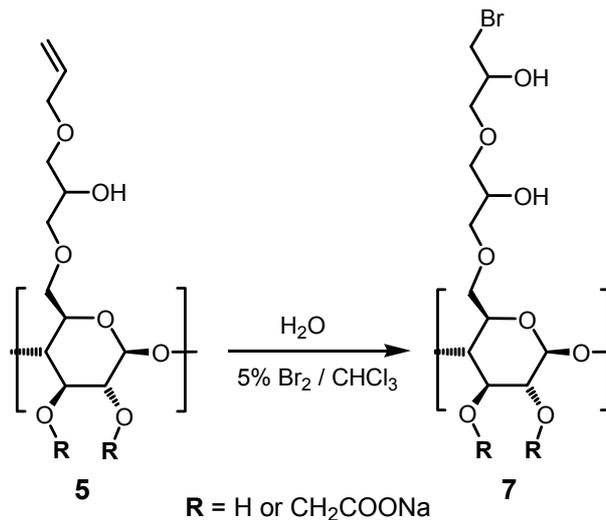
3.5 Synthese von 6-O-(2"-Hydroxy-3"-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz **8 (HTSHP-CMC Na)**

3.5.1 Synthese von 6-O-(2"-Hydroxy-3"-bromopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz (HBrPHP-CMC Na) **7**

Die Synthese der HTSHP-CMC Na **8** erfolgte nach einem von Liepold entwickelten Syntheseverfahren ^[102].

Die Thiosulfatcellulose **8** wurde auch in einer zweistufigen Synthese aus dem Allylderivat **5** hergestellt. Dazu wurden zuerst die Allyl-Gruppen von **5** mit wässriger Brom-Lösung zum Bromhydrin **7** umgesetzt (Schema 3.10).

Diese Reaktion erfolgte bei RT, wobei das Ende der Reaktion durch die gelbliche Färbung der Reaktionslösung durch überschüssiges Brom zu erkennen war. Da die AHP-CMC **5** nur in Wasser vollständig löslich ist, wurde die Umsetzung in Wasser durchgeführt. Dadurch liegt in der Reaktionslösung ein großer Überschuss an Wasser vor, das als konkurrierendes Nukleophil reagieren kann. Bei Bromierungen in Wasser bildet sich ausschließlich der vicinale Bromalkohol ^[147].



Schema 3.10: Synthese von 6-O-(2''-Hydroxy-3''-bromopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz (HBrPHP-CMC Na) **7**.

Durch den elektronenziehenden Effekt (+I-Effekt) des Bromatoms erfährt das Kohlenstoffatom C-3'' im ^{13}C -NMR-Spektrum von **7** eine starke Hochfeldverschiebung von $\delta = 119.6$ ppm nach $\delta = 35.5$ ppm.

Da keine Hochfeldverschiebung des C-2'' Kohlenstoffatoms von $\delta = 134.3$ ppm in den Bereich $\delta = 45 - 50$ ppm zu sehen ist, kann man ein sekundär-bromiertes Derivat ausschließen. Die Zuordnung des C-3'' Kohlenstoffatoms im ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum einem primären C-Atom spricht zusätzlich gegen die Entstehung eines sekundär substituierten Bromalkohol der Cellulose.

Die typischen Signale der Allyl-Funktion des Derivats **5** ($\delta = 134.3$ ppm und $\delta = 119.6$ ppm) sind im ^{13}C -NMR-Spektrum komplett verschwunden, was auf eine vollständige Bromierung der Doppelbindung hinweist.

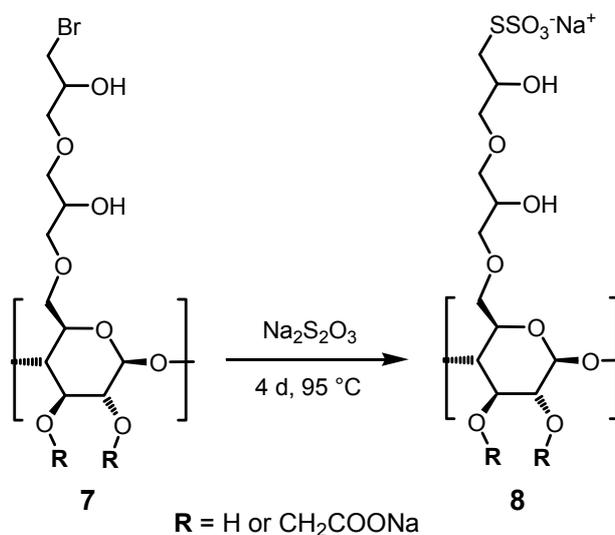
Bei der Synthese des Bromderivats **7** aus der AHP-CMC **5** ($\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.23$) wurde anhand der Brom-Elementaranalyse ein Substitutionsgrad von $\text{DS}_{\text{Brom}} = 0.20$ bestimmt, um 0.03 (3%-Punkte) niedriger als erwartet. Dieser Befund ist wahrscheinlich auf die partielle Hydrolyse einiger Brom-Gruppen zum entsprechenden Diol zu erklären. Da bei der Synthese des Allylderivats **5** zur Aktivierung der CMC Natronlauge benutzt wurde, ist es anzunehmen das Spuren dieser NaOH im AHP-CMC **5** für die partielle Hydrolyse während der Bromierungsreaktion verantwortlich sind.

Da bei diesem Syntheseverfahren die Bromierung der Doppelbindungen vollständig abläuft, wurde bei der Synthese der Thiosulfatcellulose **8** aus den AHP-Cellulosen

mit höherem DS_{Allyl} (0.43-0.69), auf die Isolierung und Charakterisierung der Bromhydrin-Zwischenstufe verzichtet.

3.5.2 Synthese von 6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz (HTSHP-CMC Na) **8**

Die 6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz **8** wurde aus dem Bromderivat **7** hergestellt. Dazu wurde die wässrige Lösung der HBrPHP-CMC **7** mit Natriumthiosulfat vier Tage bei 95°C gerührt (Schema 3.11). Das Produkt **8** konnte nach der Reinigung mittels Ultrafiltration in Ausbeuten zwischen 78-80% isoliert werden. Die HTSHP-CMC **8** ist sehr gut wasserlöslich. Die wässrigen Lösungen von **8** sind auf längerer Zeit stabil (flocken nicht aus). Eine Abnahme der Wasserlöslichkeit aufgrund von Vernetzungen über Disulfidbrücken wurde auch bei Proben älter als 1 Jahr nicht bemerkt.



Schema 3.11: Synthese von 6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz (HTSHP-CMC Na) **8**.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum vom Bunte-Salz **8** (siehe Abb. 3.12) unterscheidet sich im Wesentlichen nicht vom ^{13}C -NMR-Spektrum von **7**. Das Kohlenstoffatom C-3'' der die Thiosulfatgruppe trägt, zeigt eine leichte Tieffeldverschiebung von $\delta = 35.5$ ppm (in Verbindung **7**) nach $\delta = 38$ ppm. Zusätzlich verschiebt sich das Kohlenstoffatom C-2'' von $\delta = 63.4$ ppm nach $\delta = 69.2$ ppm.

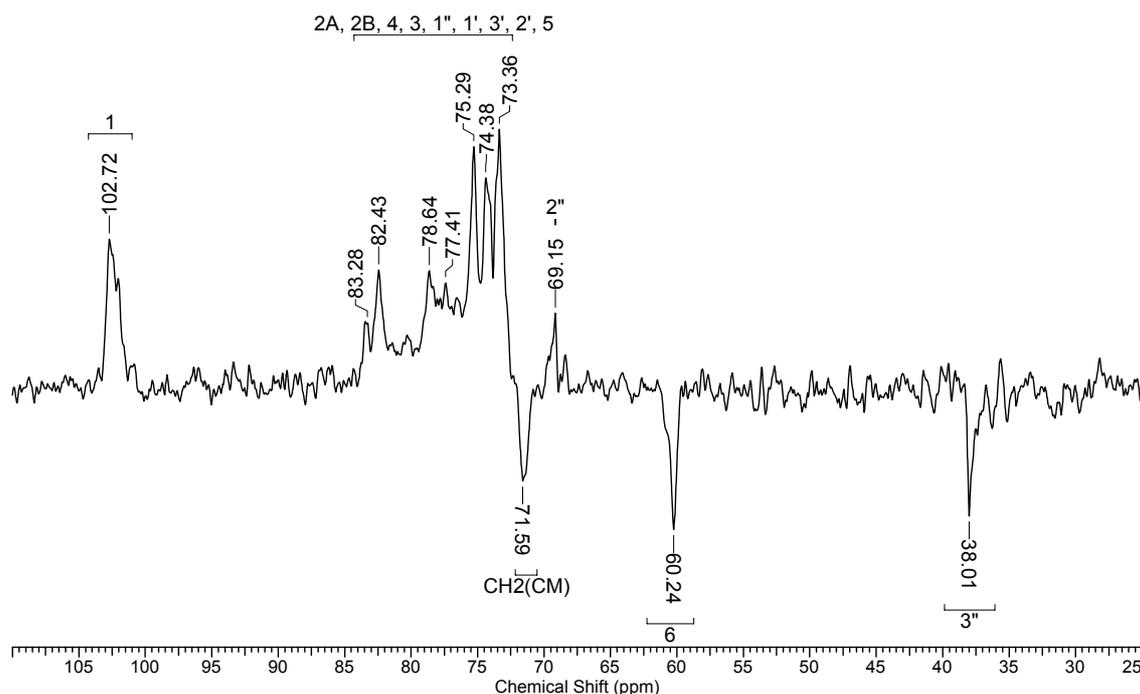


Abb. 3.12: ^{13}C -NMR-Spektrum von HTSHP-CMC **8** (innerer Standard: Acetonitril).

Im FTIR-Spektrum (siehe experimenteller Teil) sind die Banden für die gebundene Thiosulfatgruppe zu sehen. Die typischen Banden treten bei den Wellenzahlen von $\nu = 1203$ ($\nu \text{ SO}_2^-$), 1024 ($\nu \text{ S=O}$), 637 ($\nu \text{ C=S}$) cm^{-1} auf. Schwingungsbanden für das eingesetzte $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ bei $\nu = 1135$, 1102 , 675 cm^{-1} sind nicht zu sehen. Dies spricht zusätzlich für die erfolgreiche Umsetzung des Bromderivats **7** zum Bunte-Salz **8**.

Im ^1H -NMR-Spektrum von **8** liegen die Signale für die Protonen von H-3'' im Bereich der Gerüstprotonen bei $\delta = 3.26$ ppm.

Die Allylcellulosederivate **5a**, **5b**, **5c** wurden zu den Thiosulfatcellulosen **8a**, **8b**, und **8c** umgesetzt. Ihr Schwefelgehalt wurde mittels Elementaranalyse bestimmt (Tabelle 3.2). Geht man z. B. für **5b** von einer vollständigen Substitution des Broms durch Thiosulfat aus, so sollte der Schwefelgehalt 7.32% betragen. Experimentell konnte jedoch nur ein Wert von 4.16% bestimmt werden. Da jedoch der Bromgehalt des Bunte-Salzes **8b** bei 0.1% liegt, kann man daraus schließen, dass die Bromatome fast vollständig mit Thiosulfat substituiert wurden.

Der niedriger als erwartete Schwefelgehalt der Thiosulfatcellulosen **8a**, **8b**, und **8c** ist auf eine partielle Hydrolyse der Bromhydrin-Gruppen zu 2'', 3''-dihydroxypropyl-Gruppen zurückzuführen. Dabei steigt der hydrolysierte Anteil mit dem DS_{Allyl} der eingesetzten AHP-CMC Na (hier **5b** und **5c**) (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Vergleich zwischen DS_{Allyl} von **5a**, **5b**, **5c** und $DS_{\text{Thiosulfat}}$ von **8a**, **8b**, **8c**.

AHP-CMC Na 5		HTSHP-CMC Na 8		Ausbeute [%]	
Probe	DS_{Allyl}	Probe	Schwefelgehalt [%]	$DS_{\text{Thiosulfat}}$	
5a	0.23	8a	2.94	0.15	75
5b	0.43	8b	4.16	0.23	72
5c	0.64	8c	6.18	0.38	62

Die Molmasse der synthetisierten HTSHP-CMC Na **8** beträgt $M = 95000\text{-}98000$ g/mol entsprechend einem Polymerisationsgrad von $DP = 262\text{-}331$.

3.6 Zusammenfassung

Durch nukleophile Substitution der regioselektiv in Position C-6 der Glcp-Einheit substituierten Tosylcellulose, wurde die 6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulose **2** erfolgreich hergestellt. Ein maximaler Substitutionsgrad an Methylthio-Gruppen von $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$ wurde erreicht. Durch Carboxymethylierung des Thioethers **2** konnten die Carboxymethylcellulose **3** und der Carboxymethylcellulose-ethylester **4** synthetisiert werden. Der DS-Grad an Carboxymethyl-Gruppen DS_{CM} betrug bei der Synthese von **3** $DS_{\text{CM}} = 1.0$. Der Ester **4** wurde gezielt mit einem niedrigen DS an Carboxymethylester-Gruppen von $DS_{\text{CM-EE}} = 0.16$ hergestellt.

Ausgehend von dem kommerziellen Carboxymethylcellulose Na Salz ($DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $x_2 = 0.43$, $x_3 = 0.17$, $x_6 = 0.31$) konnte die 6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose (AHP-CMC) **5** mit Substitutionsgraden an AHP-Gruppen von $DS_{\text{Allyl}} = 0.12 - 0.69$ synthetisiert werden. Aufgrund von NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden dass diese Allylgruppen regioselektiv in Position C-6 der Glcp-Einheit eingeführt wurden. Dementsprechend wurden bei der Synthese der AHP-CMC **5** mit einem $DS_{\text{Allyl}} = 0.69$ alle freien Hydroxylgruppen in der Position C-6 der CMC mit den AHP-Gruppen substituiert.

Durch Addition von Tetrathionat an die Doppelbindungen des Derivats **5** wurde die Bisthiosulfatcellulose (TSHP-CMC Na) **6a** mit einem DS-Wert von $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$ hergestellt.

Um eine Erhöhung des $DS_{\text{Bisthiosulfat}}$ zu erzielen, wurde die AHP-CMC **5** heterogen bromiert. Das Dibromderivat konnte anschließend nukleophil mit Natriumthiosulfat substituiert werden. Man erhält die TSHP-CMC Na **6b** mit einem maximalen $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.17$. Dieser liegt um 70% über den Wert von **6a**.

Zudem wurde die AHP-CMC **5** in wässriger Lösung bromiert. Durch die Bromierung wurde die Doppelbindung vollständig zum Bromhydrin umgesetzt. Man erhält, nach anschließender Substitution mit Natriumthiosulfat, die HTSHP-CMC Na **8** mit Substitutionsgraden von $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15, 0.23$ und 0.38 .

Die Thioetherderivate **3** und **4** als auch die Thiosulfatverbindungen **6a**, **6b**, **8** sind sehr gut wasserlöslich und zeigen keine Tendenz zur Vernetzung über Disulfidbrücken. Diese Verbindungen eignen sich zum Beschichten von Metalloberflächen wie Gold und Silber (siehe Kapitel 5) und werden als Ausgangsverbindungen zur Herstellung reaktiver CMC-Derivate verwendet.

4. Synthese reaktiver Cellulosederivate

4.1 Einleitung

Durch die Einführung reaktiver funktioneller Gruppen (-C=O, -COOH, -NH₂, -NCO, anorganische Estergruppierungen, Epoxy-Funktionen, u. a.) in das Cellulosemolekül sind Derivate zugänglich, die als Trägermaterialien für die kovalente Fixierung von biologisch aktiven Wirkstoffen (z. B.: Pharmaka, Enzymen, Zellen oder Agrochemikalien), als Ausgangskomponenten für die Symplekxkapselung und andere Membranbildungsprozesse sowie als Trennmaterialien für chromatographische Verfahren (Ionenaustausch-, Affinitätschromatographie) und die Anreicherung von Schwermetallen ihre Anwendung finden.

Im Folgenden soll eine Zusammenfassung der wichtigsten Methoden zur Einführung reaktiver funktioneller Gruppen in die Cellulose vorgestellt werden. Dabei soll der Schwerpunkt auf die Modifizierung von Cellulose zur Proteinimmobilisierung liegen. Aufgrund ihrer chemischen Komplexität können Proteine über Amino-^[148-151], Hydroxyl-^[150, 152], Carbonyl-^[151], und Thiol-Gruppen^[151, 153] Bindungen mit den reaktiven Cellulosederivaten eingehen.

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Immobilisierung von Proteinen an reaktive Cellulosederivate beruhen größtenteils auf der Fixierung der Proteine über deren *Aminogruppen*^[127]. Die dazu geeigneten funktionellen Cellulosederivate sollen nun zusammenfassend vorgestellt werden.

Als Erstes sind die *aldehydgruppenhaltigen* Cellulosederivate zu nennen. Die in der Literatur am häufigsten untersuchte Methode zur Einführung von Aldehydgruppen in die Cellulose ist die unter Spaltung des Glucopyranoserings verlaufende Oxidation mit Natriumperodat zur sogenannten 2,3-Dialdehydcellulose^[154, 155]. Die Periodat-Oxidation kann zur Immobilisierung von Diaminen und Enzymen angewendet werden^[149].

Als Zweites müssen eine der wichtigsten Cellulosederivate, die *carboxygruppenhaltige* Celluloseether, aufgeführt werden. Als polyfunktionelles, physiologisch unbedenkliches und biologisch abbaubares^[156] hydrophiles Polymer erscheint Carboxymethylcellulose (CMC) für die Trägerfixierung von Wirkstoffen

besonders interessant. Erste Untersuchungen zur Herstellung derartiger Polymer-Wirkstoff-Kombinationen wurden bereits 1949 von Micheel und Ewers beschrieben [148].

Durch Umsetzung der Carboxygruppen der CMC mit Hydrazin zum entsprechenden Hydrazid [148, 157] und weiter mit NaNO_2 zum Azid [148] wurden reaktionsfähige CMC-Derivate erhalten, die eine Bindung aminogruppenhaltiger Wirkstoffe erlauben.

Als weiteres Acylderivat der CMC ist das Säurechlorid zu erwähnen, das durch Behandlung von Na-CMC mit Thionylchlorid in DMF erhältlich ist [158]. Weitführende Strukturuntersuchungen, die Auskunft über das Ausmaß möglicher Nebenreaktionen (Bildung von Chlor-desoxy-cellulose bzw. inneren Estern) bei der Synthese des Säurechlorids, sind bisher nicht bekannt.

Die aus der Peptidchemie bekannte Carbodiimid-Methode hat ebenfalls zur Wirkstoffbindung an CMC Anwendung gefunden [150, 152, 159]. Die Polymerfixierung erfolgte sowohl durch direkte Kopplung an den Träger, als auch unter Verwendung unterschiedlicher Spacer (*p*-Aminobenzoesäure, Alkandiole, Aminoethanol u. a.) [151, 160-162].

Bei der Einwirkung von *Diisocyanaten* auf Cellulosematerialien entstehen entsprechend den gewählten Reaktionsbedingungen unterschiedlich stark vernetzte Cellulosecarbamate mit freien Isocyanat-Gruppen. Als Diisocyanate kamen bisher vor allem Tetra-, Hexa-, und Octamethylendiisocyanat sowie Tolylendiisocyanat zum Einsatz [163, 164]. Die entstehenden reaktiven Zwischenprodukte sind für weitere Modifizierungen geeignet wie z. B. die Anbindung von Aminosäuren [159] und Wirkstoffen.

Sphärische Trägermaterialien zur Immobilisierung von Trypsin lassen sich durch die Umsetzung von Amino-desoxy-cellulose mit 4-Isothiocyantobenzaldehyd gewinnen [165].

Darüber hinaus ist eine Vielzahl weiterer Aktivierungsmethoden bekannt, von denen einige wichtige in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind.

Tabelle 4.1: Aktivierung von Cellulosederivate zur Enzymimmobilisierung.

Reagenz	Eingeführte reaktive Funktionen	Funktionalität Enzym	Literatur
BrCN	$-O-CN$, $\begin{array}{c} -O \\ \diagup \\ C=NH \\ \diagdown \\ -O \end{array}$	NH_2	[166-168]
$Cl-C(=O)-OCR$	$-O-C(=O)-OCR$; $\begin{array}{c} -O \\ \diagup \\ C=O \\ \diagdown \\ -O \end{array}$	NH_2	[169, 170]
$H-C(=O)-CH_2-CH_2-C(=O)-H$	$-C(=O)-H$	NH_2	[126, 171-173]
$\begin{array}{c} Cl \\ \\ N=C \\ / \quad \backslash \\ N \quad N \\ \backslash \quad / \\ Cl \end{array}$, $\begin{array}{c} Cl \\ \\ N=C \\ / \quad \backslash \\ N \quad N \\ \backslash \quad / \\ NH_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} Cl \\ \\ N=C \\ / \quad \backslash \\ N \quad N \\ \backslash \quad / \\ Cl \end{array}$, $\begin{array}{c} Cl \\ \\ N=C \\ / \quad \backslash \\ N \quad N \\ \backslash \quad / \\ NH_2 \end{array}$	NH_2	[174, 175, 176]
$\begin{array}{c} C_2H_5O \\ \\ C_2H_5O-Si-(CH_2)_3-NH_2 \\ \\ C_2H_5O \end{array}$	$\begin{array}{c} C_2H_5O \\ \\ C_2H_5O-Si-(CH_2)_3-NH_2 \\ \\ C_2H_5O \end{array}$	NH_2, CHO	[177]
$\begin{array}{c} \text{Pyridinium ring} \\ \\ N^+ \\ \\ CH_3 \\ \\ F \end{array} TsO^-$	$\begin{array}{c} \text{Pyridinium ring} \\ \\ N^+ \\ \\ CH_3 \end{array} TsO^-$	NH_2	[178]
$\begin{array}{c} O \\ \\ N-C-N \\ / \quad \backslash \\ N \quad N \end{array}$	$-O-C(=O)-N$	NH_2	[179]
$H_2N-CH_2-CH_2-S-S-\text{Pyridine}$	$-C(=O)-NH-CH_2-CH_2-S-S-\text{Pyridine}$	SH	[151]
R-N=C=N-R	$\begin{array}{c} O \\ \\ -C-O-C \\ \quad \\ HN-R \\ \\ HN-R \\ + \end{array}$	NH_2, OH	[150]

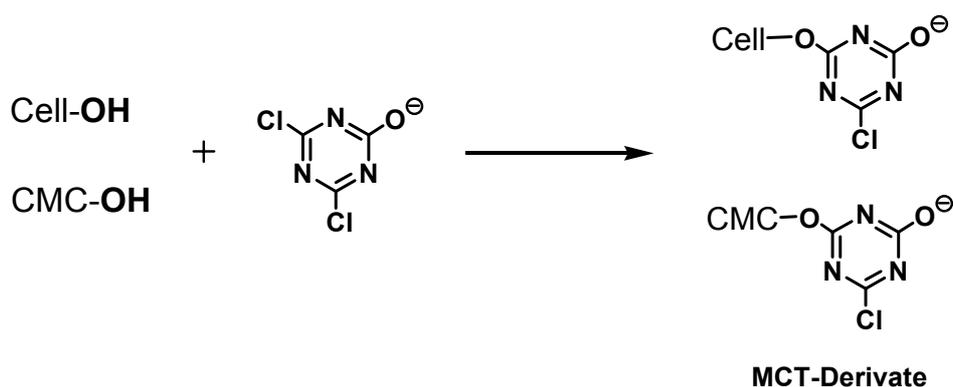
Umfassendere Darstellungen wurden z. B. von Chen *et al.* [166] und Ferruti *et al.* [169] publiziert.

Die genannten Aktivierungsmethoden dienen neben der kovalenten Bindung von Enzymen auch der Immobilisierung von intakten Zellen [180] und Mikroorganismen [176].

4.2 Synthesekonzept

In der vorliegenden Arbeit sollte ausgehend von Carboxymethylcellulose (CMC) bzw. von den in Kapitel 3 vorgestellten Thiocellulosederivaten, wasserlösliche reaktive Produkte hergestellt werden die nach Abscheidung auf Oberflächen, zur Anbindung von Wirkstoffen wie Enzyme, Antigene, Antikörper u. a. geeignet sind. Eine vollständige Charakterisierung dieser Derivate soll Informationen über die Anzahl an reaktiven Gruppen geben.

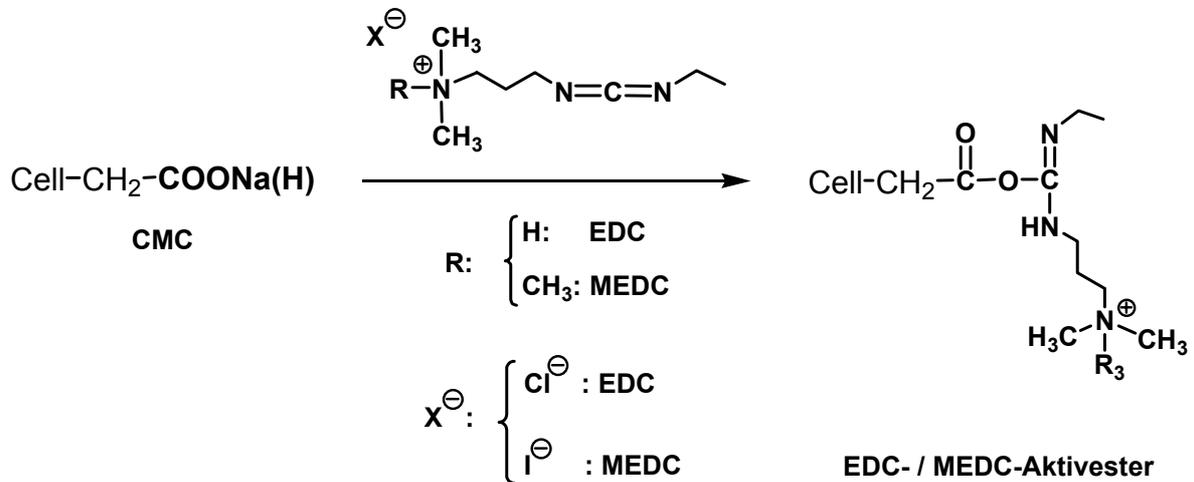
Die Einführung von reaktiven Gruppen in die CMC bzw. Thio-CMC Derivate kann durch Aktivierung der *Hydroxyl-* bzw. *Carbonsäure-*Gruppen dieser Derivate erfolgen. Durch Reaktion der freien Hydroxyl-Gruppen der Cellulosederivate aus Kapitel 3 mit dem wasserlöslichen 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin (DCT), sollen Derivate mit *anionischen* reaktiven Gruppen hergestellt werden (Schema 4.1).



Schema 4.1: Synthese von Cellulosederivaten mit anionischen reaktiven Gruppen;
MCT: „Monochlortriazinyl“.

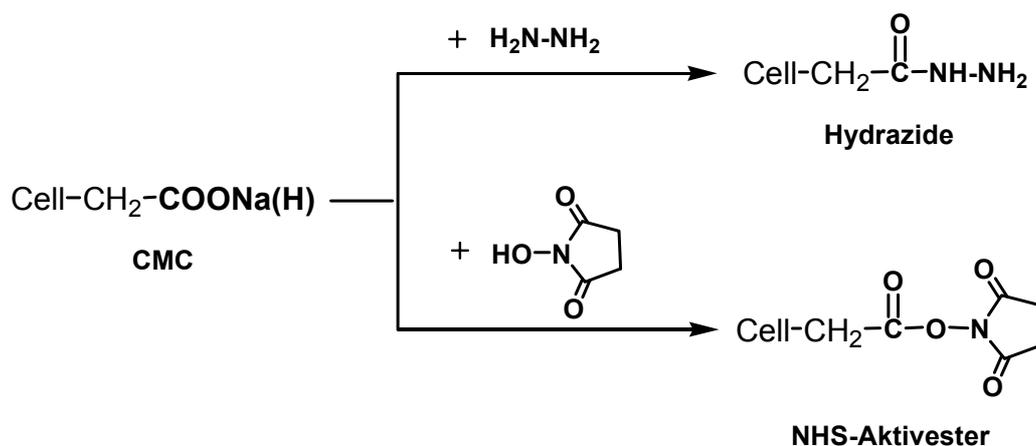
Die Aktivierung der *Carbonsäure-*Gruppen der Cellulosederivate mit den wasserlöslichen Carbodiimiden *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDC) und

N-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Methoiodid (MEDC) soll zum einen zu den entsprechenden Aktivestern mit kationischen reaktiven Gruppen führen (Schema 4.2).



Schema 4.2: Synthese von CMC-Derivaten mit kationischen reaktiven Gruppen: EDC- / MEDC-Aktivester.

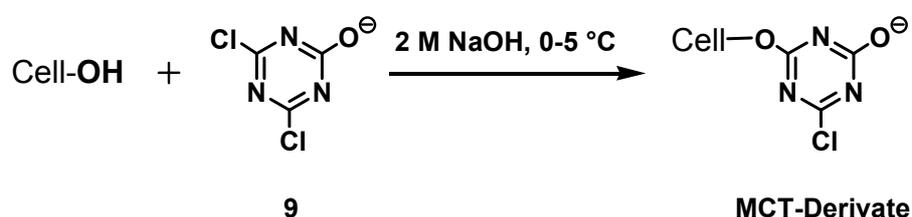
Zum anderem sollen reaktive CMC-Derivate mit neutralen reaktiven Gruppen synthetisiert werden. Dazu sollen die CMC bzw. die Thio-CMCs mit Hydrazin bzw. *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) in Hydrazide und NHS-Aktivester überführt werden (Schema 4.3).



Schema 4.3: Synthese von CMC-Derivaten mit neutralen reaktiven Gruppen: Hydrazide und *N*-Hydroxysuccinimid-Aktivester (NHS-Aktivester).

4.3 Synthese von Cellulosederivaten mit anionischen reaktiven O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl) Gruppen (MCT-Cellulosederivate)

Die Synthese von O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl) Cellulosederivaten (MCT-Cellulosederivate) erfolgte unter homogenen Bedingungen aus den entsprechenden Cellulosederivaten durch Reaktion mit dem wasserlöslichen 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin **9** in wässriger Lösung (Schema 4.4).



Cellulosederivat (Edukte: Cell-OH)	MCT-Cellulosederivate (Produkte)
MTh-Cellulose 2	MCT-MTh-Cellulose 10
TSHP-CMC 6a	MCT-TSHP-CMC 14
HTSHP-CMC 8	MCT-HTSHP-CMC 17
CMC	MCT-CMC 20

Schema 4.4: Synthese von reaktiven O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl)-CMC-Derivaten
 „MCT: Monochlortriazinyl“: O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl).

Zuerst wurde das 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin **9** (DCT) aus dem käuflichen 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (Cyanurchlorid) synthetisiert. Dazu wurde das wasserunlösliche Cyanurchlorid mit 2 M Natronlauge bei einer Temperatur von 0-2°C umgesetzt. Es entstand nur das gewünschte dichlorsubstituierte Triazinderivat **9** (siehe Abb. 4.1) mit einer Ausbeute von 99%.

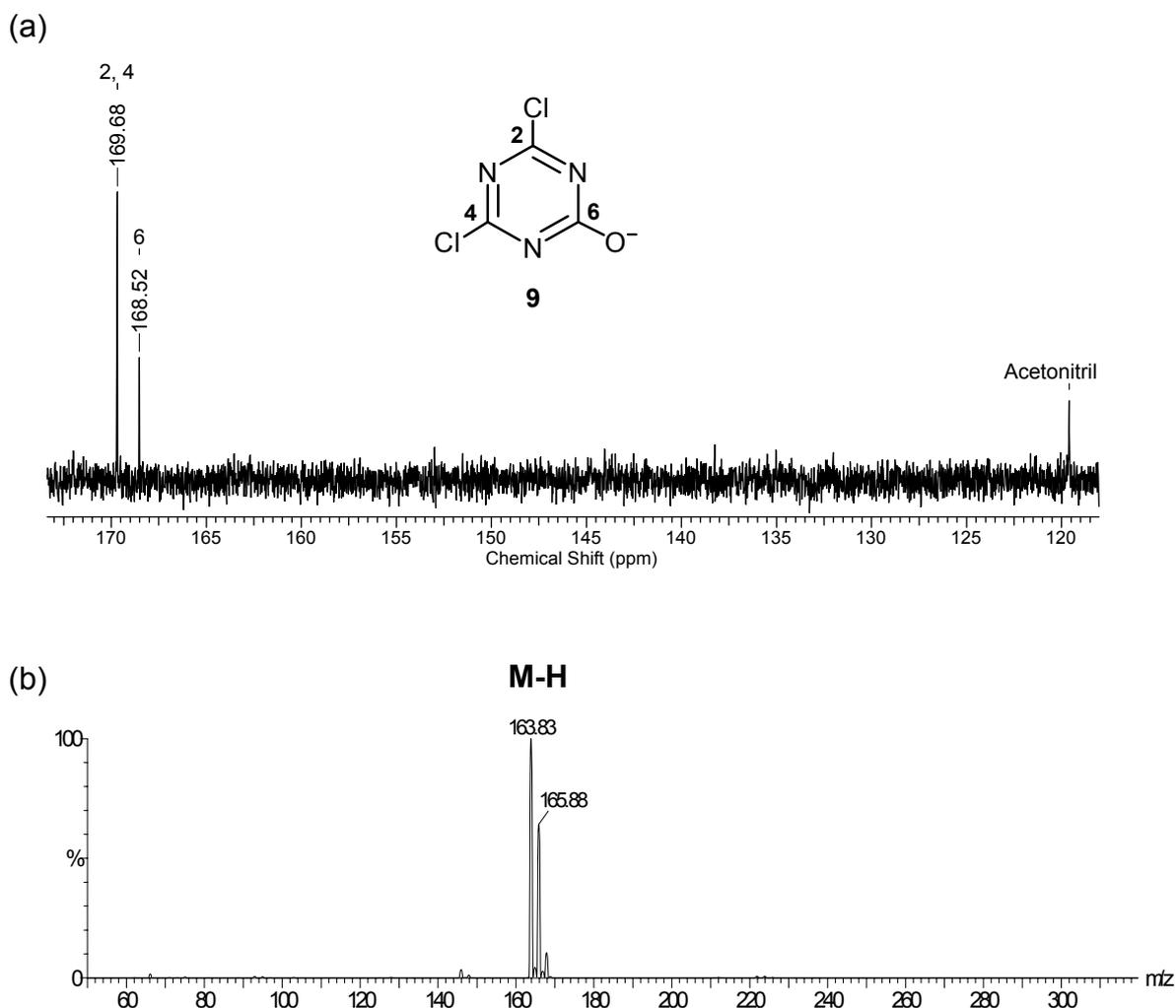


Abb. 4.1: ^{13}C -NMR- (a) und MS (ESI $^{-}$)-Spektrum (b) von 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin.

Im FTIR-Spektrum der Verbindung **9** kann man deutlich die Valenzschwingungen der entstandenen OH(Na)-Funktion bei $\nu = 3371\text{ cm}^{-1}$ erkennen. Die C=N-Schwingungen des Triazinringes sind zwischen $\nu = 1656\text{--}1563\text{ cm}^{-1}$ sichtbar, die C-Cl Schwingungen zwischen $\nu = 1103\text{--}1035\text{ cm}^{-1}$. Bei $\nu = 842\text{ cm}^{-1}$ und $\nu = 805\text{ cm}^{-1}$ sind die C-Cl Deformationsschwingungen für das dichlorsubstituierte Muster von **9** zu erkennen.

Die Umsetzung der Thiocellulosen **2** (6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulose, **MTh-Cellulose**), **6a** (6-O-(2'', 3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxy-propyl)-CMC, **TSHP-CMC**), **8** (6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-cellulose, **HTSHP-CMC**) und der **CMC** in die entsprechenden O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6yl)-Derivate (**MCT-Derivate**) wurde nach einer allgemeinen Synthesevorschrift durchgeführt. Dazu wurden die Thiocellulosederivate und die

CMC mit dem wasserlöslichen MCT-Derivat **9** unter basischen Bedingungen bei einer Temperatur zwischen 0 und 5°C umgesetzt.

Bei den Synthesen spielen *Temperatur* und *pH-Wert* eine wichtige Rolle. Diese Parameter haben einen Einfluss auf die Alkylierungsreaktion, wie folgt:

Die stöchiometrische Zugabe der Natronlauge zur Reaktionslösung muss unter pH-Kontrolle erfolgen. Übersteigt der pH den Wert 13 so kann es als Konkurrenzreaktion zur Hydrolyse des zweiten Cl-Atoms von Verbindung **9** kommen. Um das zu unterbinden wurde während der NaOH Zugabe noch zusätzlich die Reaktionslösung gekühlt (Temperatur: 0-5°C). Nach Beendigung der NaOH Zugabe wurde die Temperatur schrittweise auf Raumtemperatur erhöht. Das Vorschreiten der Reaktion wurde mittels pH kontrolliert. Im Zuge der Alkylierungsreaktion wird HCl frei, welches durch die Natronlauge im Reaktionsmedium neutralisiert wird. Dadurch nimmt der pH der Reaktionslösung mit der Zeit ab. Die Reaktion ist beendet wenn sich der pH-Wert der Lösung nicht mehr ändert (siehe experimenteller Teil).

Die reaktiven Derivate **10**, **14**, **17** und **20** wurden mittels ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie, FTIR-Spektroskopie und Elementaranalyse charakterisiert.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindungen erscheinen die Signale der Kohlenstoffatome der eingeführten MCT-Gruppe in einem Bereich der chemischen Verschiebung zwischen $\delta = 172\text{-}169$ ppm (**C-O**⁻, **C-Cl**, **C-O-CH₂**) je nach MCT-Derivat (siehe experimenteller Teil). Die Signale der Kohlenstoffatome C-2 bzw. C-3 in den ^{13}C -NMR-Spektren der MCT-Derivate zeigen im Vergleich zu den ^{13}C -NMR-Spektren der Edukte keine weitere Aufspaltung (aufgrund der Substitution mit der MCT-Gruppe) so dass man davon ausgehen kann dass die Alkylierungsreaktion hauptsächlich in den freien Positionen C-6 der Glcp-Einheiten stattgefunden hat.

Im FTIR-Spektrum der MCT-Derivate verschwindet die C-Cl Schwingungsbande bei $\nu = 842\text{ cm}^{-1}$ infolge der Substitutionsreaktion. Die C-Cl Schwingungsbande der monochlorsubstituierten Derivate ist je nach MCT-Derivat im Bereich von $\nu = 800\text{-}810\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen.

Anhand des Stickstoff- und Chlor-Gehalts der Derivate aus der Elementaranalyse, konnte der Substitutionsgrad an Triazin- und Cl-Funktionalitäten ($\text{DS}_{\text{Triazin}}$ bzw. DS_{Cl}) bestimmt werden. Die entsprechenden Substitutionsgrade der Derivate sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Geht man z. B. bei der Synthese von **17** von einem nur mit MCT-Gruppen substituierten Derivat aus, so sollte der Chlor Gehalt 4.21% betragen, welchem ein

Substitutionsgrad von $DS_{Cl} = 0.45$ entsprechen würde. Experimentell konnte jedoch nur ein Chlor Gehalt von 2.80% bestimmt werden und somit ein Substitutionsgrad von $DS_{Cl} = 0.30$.

Der niedriger als erwartete Chlorgehalt der MCT-Cellulosederivate **10**, **14**, **17** und **20** ist auf eine partielle Hydrolyse des zweiten Chloratoms der Monochlortriazinyl-Einheiten zu O-(2,4-dioxido-1,3,5-triazin-6-yl) Gruppen (DOT-Gruppen) zurückzuführen. Infolge der Alkylierungsreaktion können die eingeführten MCT-Gruppen aufgrund des basischen Reaktionsmediums mit der Zeit hydrolysieren. Der berechnete Substitutionsgrad an DOT-Gruppen ist von $DS_{DOT} = 0.12$ für Derivat **10**, $DS_{DOT} = 0.10$ für Derivat **14**, $DS_{DOT} = 0.15$ für die Derivate **17** und **20**.

Tabelle 4.2: Substitutionsgrade und Ausbeuten der MCT-Cellulosederivate;

Bemerkung: $DS_{Triazin} = DS_{MOT} + DS_{DOT}$;

MOT: „Monooxido-triazin“; DOT: „Dioxido-triazin“.

Cellulosederivate (Edukte)			$n_{\text{Edukt}}:n_{\text{DCT}}$	MCT-Cellulosederivate (Produkte)			Ausbeute [%]
Probe	DS_{Thio}	DS_{CM}		Probe	DS_{Triazin}	DS_{Cl}	
2	0.55	-	1:3	10	0.29	0.17	56
6a	0.10	0.91	1:3	14	0.26	0.16	52
8	0.15	0.91	1:6	17	0.45	0.30	43
CMC	-	0.91	1:3	20	0.33	0.16	47

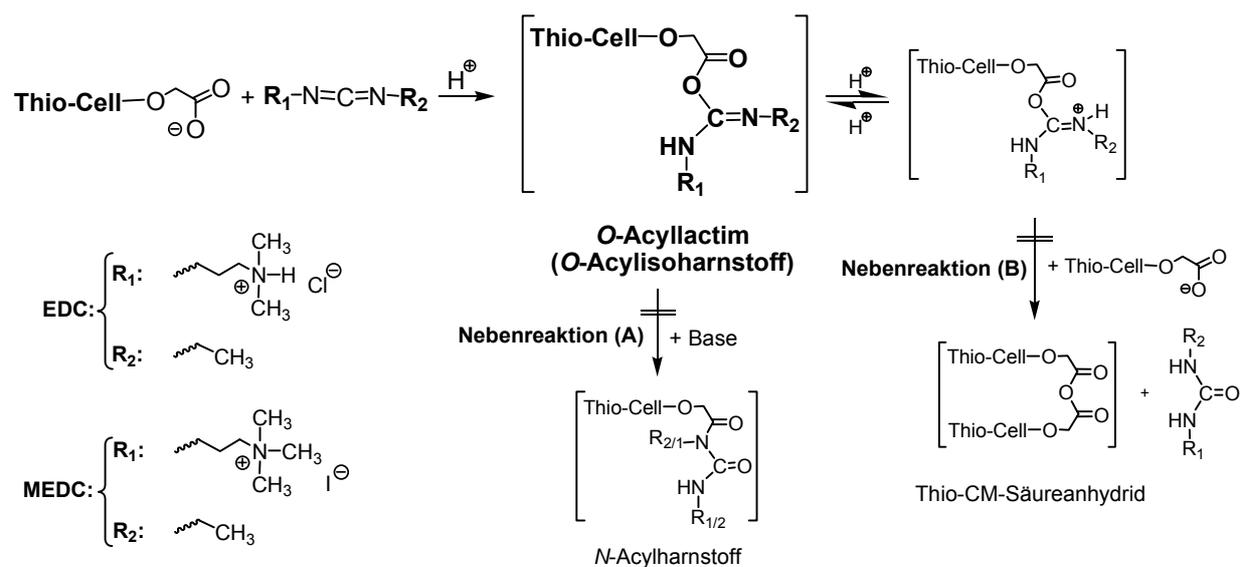
Der Schwefelgehalt der MCT-Thioverbindungen **14** und **17** hat sich nach der Einführung der reaktiven Gruppen nur gering verändert. So ist der $DS_{\text{Thiosulfat}}$ der MCT-HTSHP-CMC **17** um 0.02 (2%-Punkte) niedriger ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.13$) als der der Ausgangsverbindung **8**. Infolgedessen kann man von keiner nennenswerten Spaltung der Thiosulfatfunktionalitäten zum Thiol, aufgrund des basischen Reaktionsmilieus, sprechen.

Die reaktiven MCT-Cellulosederivate **10**, **14**, **17** und **20** sind gut wasserlöslich und sollten sich aufgrund der „aktiven“ Chloratome der Triazin-Gruppen, zur Anbindung von Biomolekülen über deren Amino-Funktionalitäten eignen.

4.4 Synthese von Cellulosederivaten mit kationischen reaktiven Gruppen (EDC / MEDC-Cellulosederivate)

Durch Einführung von kationischen reaktiven Gruppen in die Thio-CMC Derivate sollte es möglich sein Proteine in einem breiteren pH-Bereich zu immobilisieren, wo sie aufgrund ihrer isoelektrischen Punkte z.B. negativ geladen sind. Dadurch sollte auch eine Anreicherung dieser Proteine an die Cellulose-Matrix möglich sein, wodurch eine effiziente und schnelle Immobilisierung der Proteine an die Matrix gewährleistet wäre.

Die Synthese der Cellulosederivate mit *kationischen* reaktiven Gruppen erfolgte nach dem aus der Peptidchemie bekanntem *Carbodiimid-Verfahren*.



Schema 4.5: Mechanismus der Bildung von O-Acyl lactim-Thio-CMC-Derivaten und mögliche Nebenreaktionen zu (A) N-Acylharnstoffderivate und (B) Säureanhydride.

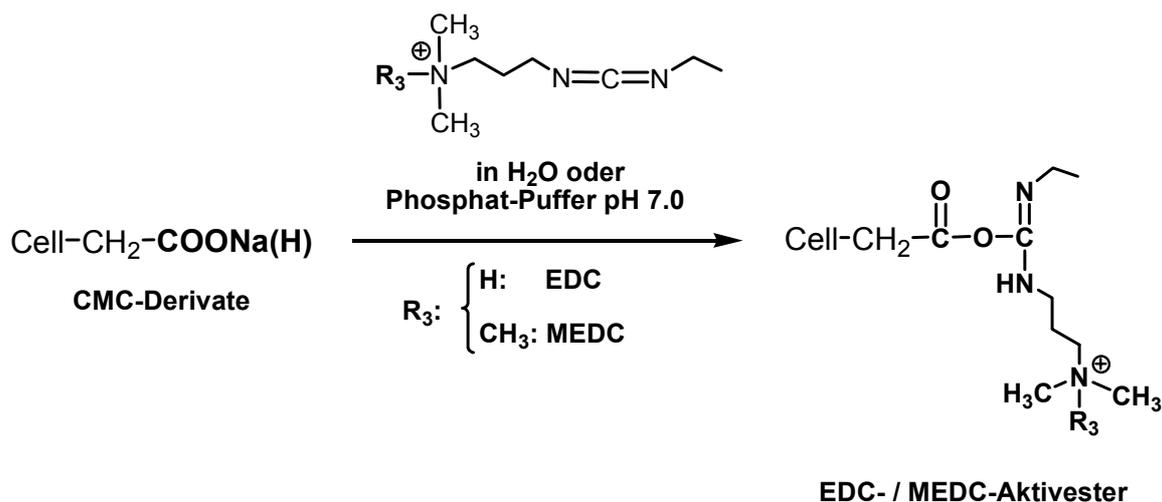
Dabei entstehen bei der Addition der Carboxylgruppen der Thio-CMC Derivate an die C=N-Doppelbindung von z. B. wasserlöslichen Carbodiimiden (*EDC*: *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid und *MEDC*: *N*-(3-Dimethylamino-propyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Methoiodid) reaktive *O-Acylisoharnstoffe* (siehe Schema 4.5), die in der klassischen Peptidchemie aufgrund ihrer hohen Reaktivität nicht isoliert werden können. Diese *O-Acyl lactim*-Zwischenstufen sind gewissermaßen Diaza-

Analoga eines gemischten Säureanhydrids und können dementsprechend selber als aktivierte Carbonsäurederivate fungieren und mit Aminen Amidbindungen ausbilden [181].

Durch die Umsetzung der Thiocellulosederivate mit den wasserlöslichen Carbodiimiden EDC und MEDC, sollten aufgrund der bekanntlich niedrigeren Reaktivität der Cellulosederivate die entsprechenden *kationischen* reaktiven O-Acylactim-Cellulosederivate isolierbar sein. Bei der Synthese dieser Cellulosederivate, genauer bei der Kupplung des Carbodiimids an die Carboxylfunktion, muss man jedoch auf eine genaue Einhaltung des pH-Bereiches achten. Zu basische Bedingungen können zu einer Umlagerung der gebildeten O-Acylisoharnstoffe zu *N*-Acylharnstoffe führen, die aufgrund ihrer Struktur nicht mehr Amidbindungen bilden können (siehe Schema 4.5: Nebenreaktion (A)). Unter saueren Bedingungen ($\text{pH} < 6.5$) kann das protonierte O-Acylisoharnstoff mit der Carboxylfunktion eines weiteren Cellulosederivat-Moleküls ein Säureanhydrid bilden (siehe Schema 4.5: Nebenreaktion (B)).

Durch die Umsetzung der Thiocellulosederivate **3** und **8** mit den wasserlöslichen Carbodiimidderivaten EDC und MEDC wurde versucht die EDC- bzw. MEDC-aktivierten Thiocellulosederivate **11a / 11b** und **18a / 18b** herzustellen (Schema 4.6). Dazu wurden die Carboxylate **3** und **8** in Wasser oder Phosphat-Puffer (50 mM, pH 6.5-7.0) gelöst und mit EDC und MEDC im Überschuss versetzt. Unter regelmäßiger pH-Kontrolle (pH-Bereich zwischen 6.5 und 7.0) wurden die Reaktionslösungen 1 Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reinigung erfolgte anschließend durch Ultrafiltration. Zuerst wurde mit Salzlösung (KCl oder NaCl, 0.2 M bzw. 0.5 M) ultrafiltriert um die löslichen EDC-, bzw. MEDC-Harnstoffderivate als auch die über elektrostatische Wechselwirkungen haftenden EDC und MEDC-Moleküle, abzutrennen. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser ultrafiltriert.

Die Ultrafiltration muss zügig ablaufen um eine frühzeitige Hydrolyse zum Harnstoff zu unterbinden; dabei muss auch hier der pH zwischen 6.5 und 7.0 liegen.



CMC-Derivate (Edukte)	EDC- / MEDC-Aktivester (Produkte)
MTh-CMC 3	MTh-CMC-EDC 11a
	MTh-CMC-MEDC 11b
HTSHP-CMC 8	HTSHP-CMC-EDC 18a
	HTSHP-CMC-MEDC 18b

Schema 4.6: Synthese von reaktiven Thio-CMC-EDC, -MEDC Derivaten.

Die Charakterisierung der reaktiven Cellulosederivate **11a / 11b** und **18a / 18b** erfolgte mittels $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ -, HC-COSY-NMR-Spektroskopie, Elementaranalyse und FTIR-Spektroskopie.

Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von HTSHP-CMC-EDC **18a** ist in Abbildung 4.9 gezeigt.

Durch die Umsetzung der Thiosulfatcellulose **8** zum entsprechenden EDC-Derivat **18a**, sind im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung (Abb. 4.9) zwei neue Signale bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 168.7$ ppm für das Kohlenstoffatom **7** und $\delta = 146.4$ ppm für das C-Atom **8**, aufgrund der Ausbildung der O-Acyllactim Struktur, zu sehen. Die typischen Signale für die EDC-Kohlenstoffatome sind im Spektrum in einem Bereich der chemischen Verschiebung zwischen $\delta = 55.2$ ppm und $\delta = 13.0$ ppm zu beobachten.

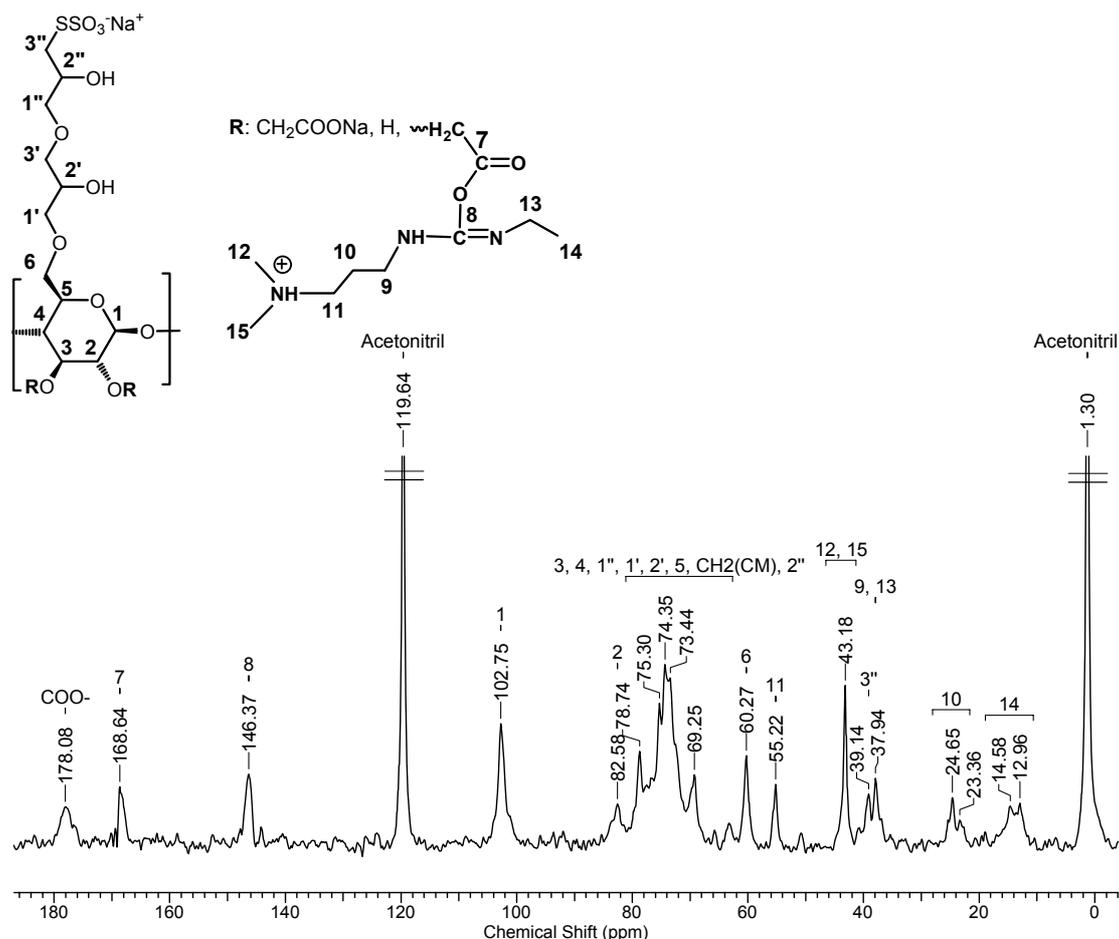


Abb. 4.2: ^{13}C -NMR-Spektrum von HTSHP-CMC-EDC **18a** in Phosphat-Puffer (10mM, pD 7.0); innerer Standard: Acetonitril.

Das Fehlen des Kohlenstoffatom-Signals im Bereich zwischen $\delta = 153\text{--}151$ ppm (Acyl C=O) schließt eine Umlagerung von **18a** zum *N*-Acylharnstoff (nach Nebenreaktion (A) in Schema 4.5) aus. Auch die Entstehung eines Säureanhydrids (nach Nebenreaktion (B) in Schema 4.5) von **18a** konnte nicht beobachtet werden.

In den ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **13a** / **13b** und **18a** / **18b** überlagern ein Teil der Protonen der EDC-, bzw. MEDC-Gruppen mit den Gerüstprotonen der Cellulose. Die Zuordnung der Signale der Protonen erfolgte aus den HC-COSY-NMR Spektren der jeweiligen Verbindung. Als Beispiel für die Zuordnung der Signale der MEDC-Protonen ist in Abbildung 4.3 das HC-COSY-NMR Spektrum der MTh-CMC-MEDC **13b** gezeigt.

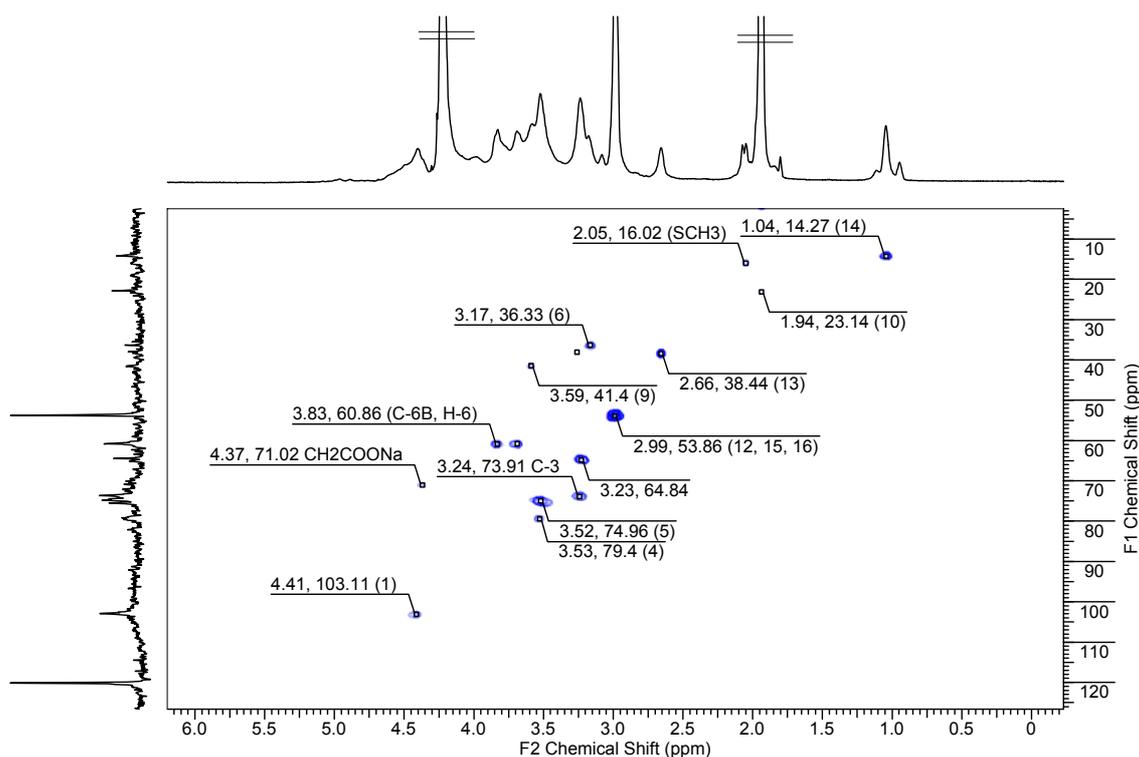


Abb. 4.3: Zuordnung der Signale der Protonen der MEDC-Gruppe aus dem HC-COSY-NMR Spektrum von MTh-CMC-MEDC **13b**.

Um den Einfluss der elektrostatischen Anziehungskraft zwischen den negativ geladenen Carboxylfunktionen der Cellulosederivate und den kationischen Carbodiimiden auf die Umsetzung und Ausbeute der Reaktion zu untersuchen, wurde bei der Synthese von MTh-CMC-MEDC **13b** die Ausgangsverbindung **3** als *saure* Form (MTh-CMC **H 3a**) eingesetzt. Durch die Überführung der Carboxylfunktionen von **3** in die entsprechenden Carbonsäurefunktionen nimmt der negative Charakter dieser Gruppen stark ab, was auch zu einer Verminderung der elektrostatischen Anziehungskraft zwischen Cellulosederivat und Carbodiimid während der Reaktion führen sollte. Die Synthese von **13b** ausgehend von der *sauren* Form **3a** wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt wie die aus dem entsprechenden Carboxylat. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von MTh-CMC **H 3a** erfolgte die Reaktion mit dem MEDC jedoch in wässriger Suspension. Der größte Teil der eingesetzten MTh-CMC **H** ging dabei in Lösung aufgrund der Umsetzung zum wasserlöslichen Derivat **13b**. Nach der entsprechenden Aufreinigung und Isolierung konnte **13b** erfolgreich charakterisiert werden.

Man erhält für das MTh-CMC-MEDC **13b** fast den gleichen Substitutionsgrad an MEDC Funktionalitäten unabhängig von der Form (*Carboxylat* bzw. *Carbonsäure*) der Ausgangsverbindung MTh-CMC **3**. Der einzige Unterschied liegt in den

Ausbeuten. Geht man von der *Carbonsäure 3a* aus so ist die Ausbeute am Ende niedriger, da aufgrund der heterogenen Reaktionsführung ein größerer Anteil an nicht umgesetzten Edukt zu erwarten ist als bei der homogenen Reaktion ausgehend vom Carboxylat.

Die Substitutionsgrade an EDC (DS_{EDC}) bzw. MEDC (DS_{EDC}) wurden aus der Elementaranalyse der entsprechenden Derivate und mittels 1H -NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ermittlung des DS_{EDC} aus dem 1H -NMR-Spektrum der Derivate **11a** / **18a** erfolgte aus dem Integrationsverhältnis des Signalbereiches für die Protonen der Methylgruppen (H-12, 15) der EDC-Funktionalitäten bei $\delta = 2.75$ ppm (für **11a**) und $\delta = 2.77$ ppm (für **18a**), und des Signals des H-1 Protons der Glcp-Einheit bei $\delta = 4.41$ ppm. Die Berechnung des DS_{MEDC} wurde in gleicher Weise durchgeführt wie bei DS_{EDC} und zwar aus dem Integrationsverhältnis des Signalbereiches für die Protonen der Methylgruppen (H-12, 15, 16) der MEDC-Funktionalitäten bei $\delta = 2.99$ ppm und des Signals des H-1 Protons der Glcp-Einheit bei $\delta = 4.41$ ppm.

Die berechneten Substitutionsgrade und Ausbeuten der hergestellten EDC und MEDC Derivate sind in Tabelle 4.5 zusammengestellt.

Tabelle 4.5: Substitutionsgrade und Ausbeuten der Thio-CMC-EDC / -MEDC-Derivate.

Thio-CMC (Edukte)			Thio-CMC-EDC / -MEDC (Produkte)				Ausbeute [%]
Probe	DS_{Thio}	DS_{CM}	Probe	DS_{CM}	$DS_{EDC / -MEDC}$		
					aus EA	1H -NMR	
3	0.55	1.00	11a	0.74	0.26	0.27	72
3a	0.55	1.00	11b	0.75	0.25	0.28	32
8	0.15	0.91	18a	0.68	0.23	0.25	79
	0.19	0.91	18b	0.72	0.19	0.22	94

Die synthetisierten EDC-, und MEDC Derivate **11a**, **11b**, **18a** und **18b** sind sehr gut wasserlöslich und eignen sich als reaktive Substrate zur Anbindung von diversen Wirkstoffen. Es ist jedoch zu beachten, dass die wässrigen Lösungen dieser Derivate für die genannten Zwecke möglichst frisch hergestellt und direkt eingesetzt werden

müssen, da diese in Wasser mit der Zeit in die entsprechenden Harnstoffe hydrolysieren.

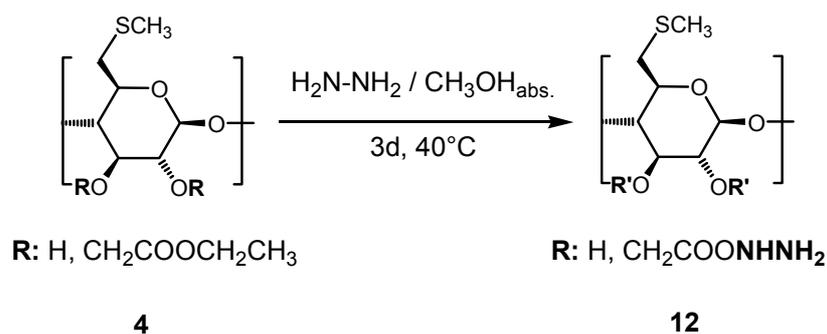
4.5 Synthese von Cellulosederivaten mit neutralen reaktiven Gruppen

4.5.1 Synthese von reaktiven Hydrazid-Thio-CMC-Derivaten

Hydrazide wurden schon 1902 von Curtius als Ausgangsverbindungen zur Synthese von Acyl-Aziden benutzt ^[182]. Im Gegensatz zu den Aziden sind die Hydrazide jedoch stabil ^[182] und finden selber Anwendung als reaktive Substrate für die Anbindung von Biomolekülen ^[151, 183].

Im vorliegenden Kapitel werden die Synthesen zweier reaktiver Hydrazid-Derivate, des 6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose-hydrazids **12** und des 6-O-(2'',3''-Bis-(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose-hydrazids **15**, vorgestellt.

Die Synthese des Hydrazid-Derivats **12** ist im Schema 4.7 dargestellt.



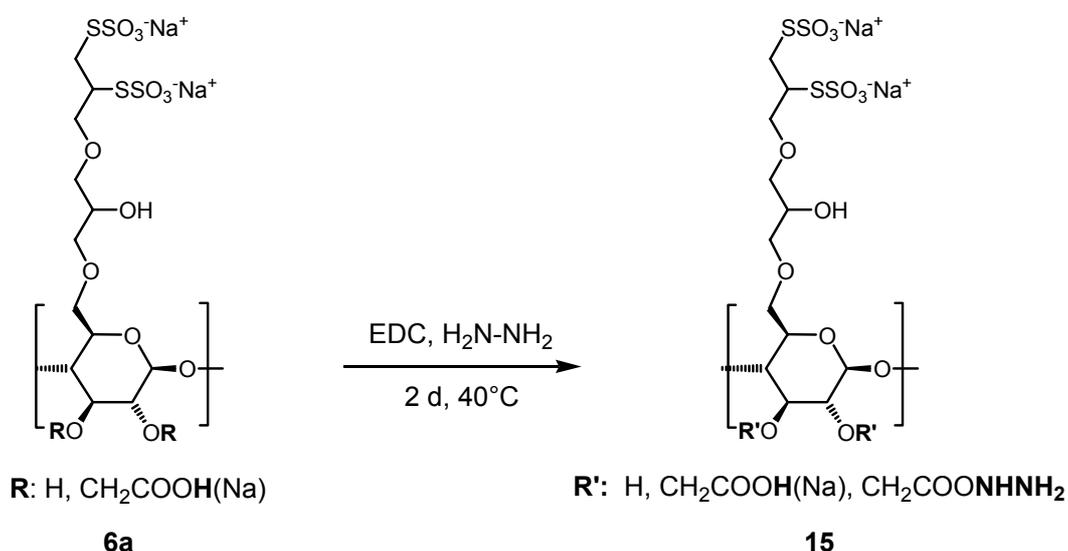
Schema 4.7: Synthese von 6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose-hydrazid **12**.

Das 6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose-hydrazid (MTh-CMC-hydrazid) **12** wurde aus dem Ethylester Derivat **4** ($DS_{EE} = 0.16$) unter heterogenen Bedingungen synthetisiert ^[148]. Nach einer Reaktionszeit von 3 d bei 40°C erhält man nach Aufarbeitung das Produkt in einer Ausbeute von 63%. Nach Einführung der Hydrazidgruppe ist **12** nur bedingt wasserlöslich, aber gut DMF bzw. DMSO löslich.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **12** erfährt das Carbonylkohlenstoffatom der Ethylesterfunktion von Derivat **4** aufgrund der Umsetzung zum Hydrazid eine Hochfeldverschiebung von $\delta = 177.8$ ppm nach $\delta = 164.9$ ppm. Die Signale der Ethylgruppe der Ethylesterfunktion von **4** sind im ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR Spektrum, bei $\delta = 57.8$ ppm (CH_2 -Gruppe) und $\delta = 17.2$ ppm (CH_3 -Gruppe) bzw. bei $\delta = 3.60$ ppm (CH_2 -Gruppe) und $\delta = 1.18$ ppm (CH_3 -Gruppe) infolge der Umsetzung nicht mehr zu sehen.

Aus dem Stickstoffgehalt über eine Elementaranalyse wurde ein Substitutionsgrad an Hydrazid-Gruppen von $\text{DS}_{\text{Hydrazid}} = 0.15$ bestimmt was zusätzlich die erfolgreiche Synthese von 6-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose-hydrazid **12** bestätigt.

Das 6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose-hydrazid (TSHP-CMC-Hydrazid) **15** wurde unter homogenen Bedingungen aus der Bisthiosulfatcellulose **6a** (H(Na)-Form) und Hydrazin, unter Verwendung des wasserlöslichen Aktivierungsreagenzes EDC (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid) synthetisiert (Schema 4.8).



Schema 4.8: Synthese von 6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose-hydrazid (TSHP-CMC-hydrazid) **15**.

Die Bisthiosulfatcellulose **6a** (H(Na)-Form; $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.33$, $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$) wurde mit einem 2-fachen Überschuss an EDC und einem 6-fachen Überschuss an Hydrazin versetzt (Verhältnis EDC zu Hydrazin von 1:4.5). Der 6-fache Überschuss an Hydrazin war nötig da die restlichen Allylhydroxypropyl-Funktionalitäten (AHP) der

TSHP-CMC **6a** vom Hydrazin zu den entsprechenden Propylhydroxypropyl-Gruppen (PHP-Rest) reduziert wurden (siehe Abb. 4.4).

Die Aufreinigung von Produkt **15** erfolgte durch Ultrafiltration. Dazu wurde die wässrige Reaktionslösung zuerst mit KCl-Lösung ultrafiltriert um den entstandenen kationischen EDC-Harnstoff als auch das nicht umgesetzte EDC aus der Lösung zu entfernen. Anschließend folgte die Ultrafiltration mit Wasser. Das TSHP-CMC-hydrazid **15** konnte in 56%-iger Ausbeute durch Gefriertrocknung isoliert werden.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von Hydrazid **15** ist in Abbildung 4.4 zu sehen. Die Carbonylfunktion des Hydrazidrestes erscheint bei einer chemischen Verschiebung von 165.4 ppm. Die Kohlenstoffatome C-2'' und C-3'' der AHP-Funktion aus Derivat **6a** erfahren aufgrund der vollständigen Umsetzung zu PHP-Gruppen eine starke Hochfeldverschiebung von $\delta = 134.3$ ppm nach $\delta = 24.8$ ppm für C-2'' und von $\delta = 119.6$ ppm nach $\delta = 12.7$ ppm für C-3'' (siehe Abb. 4.4).

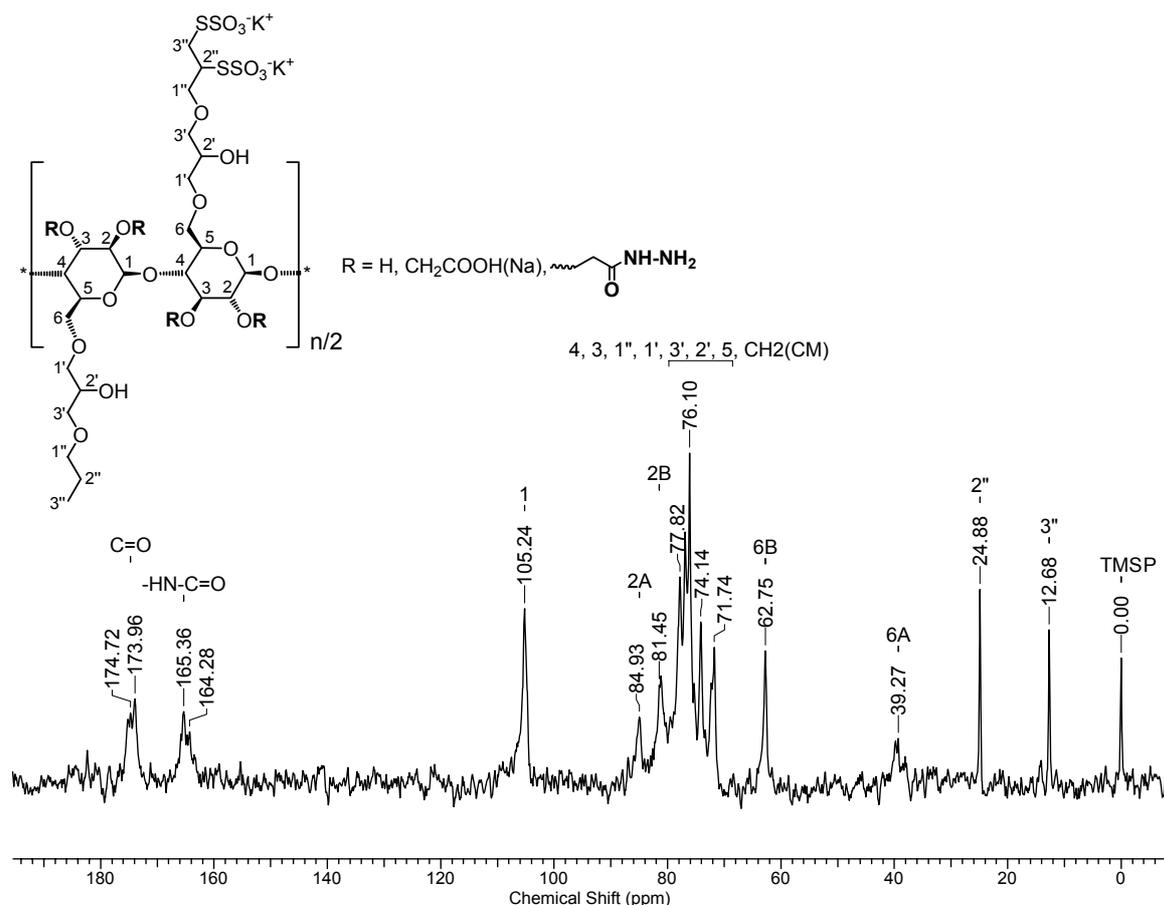


Abb. 4.4: ^{13}C -NMR-Spektrum von TSHP-CMC-hydrazid **15** in D₂O.

Im ^1H -NMR-Spektrum von **15** sind die neuen Signale der Protonen H-2'' und H-3'' bei $\delta = 1.6$ ppm respektive $\delta = 0.9$ ppm zu erkennen (siehe experimenteller Teil).

Im FTIR-Spektrum vom Hydrazid **15** (Abb. 4.5 (b)) nimmt die C=O Schwingungsbande der Carbonsäurefunktion bei $\nu = 1588 \text{ cm}^{-1}$ an Intensität ab und es entsteht eine neue Bande bei $\delta = 1729 \text{ cm}^{-1}$ die der C=O-Deformations-schwingungsbande der Hydrazid-Funktion zuzuordnen ist.

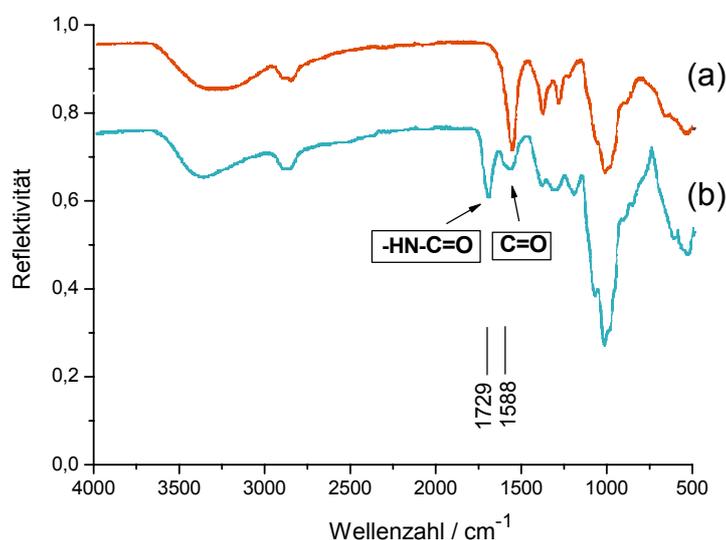


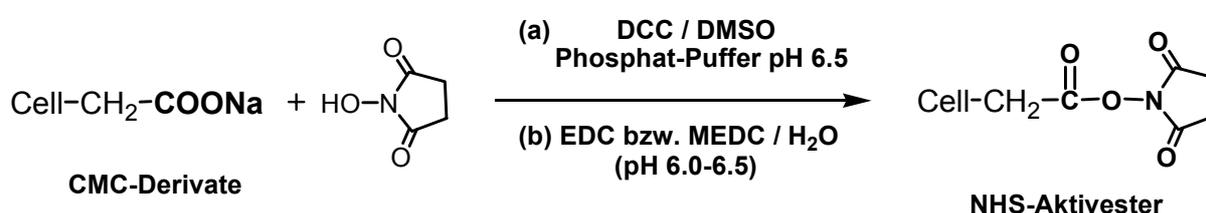
Abb. 4.5: FTIR-Spektren von (a) TSHP-CMC **6a** und (b) TSHP-CMC-hydrazid **15**.

Anhand des Stickstoffgehalts aus der Elementaranalyse wurde ein Substitutionsgrad an Hydrazid-Gruppen von $DS_{\text{Hydrazid}} = 0.20$ bestimmt. Das 6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose-hydrazid (TSHP-CMC-hydrazid) **15** ist gut wasserlöslich und eignet sich als reaktives Substrat zur Anbindung von Carbonylverbindungen (z. B. Glykopeptiden, -proteinen und Glykomimetika über die Carbonylfunktion der oxidierten Zuckerreste) auf Objektträgern wie Gold oder Silber. Durch eine weitere Funktionalisierung von **15** (z. B.: Umsetzung mit Glutardialdehyd, u. a.) ist auch eine Immobilisierung von Proteinen über deren Aminogruppen möglich, analog zu Arbeiten von Weston ^[184] und TERNYNCK ^[185].

4.5.2 Synthese von reaktiven *O*-(*N*-hydroxysuccinimidyl)-Thio-CMC-Derivaten (NHS-Aktivester der Thio-CMC-Derivate)

Die *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) Aktivester Derivate (z. B. von Dextran) finden heutzutage eine wichtige Anwendung in der Biosensorik als reaktive Substrate zur Anbindung von Biomolekülen [117-119, 186]. Dabei werden allgemein die Carboxylgruppen einer mit Dextran beschichteten Sensoroberfläche (Biacore-Verfahren [186]) mit einem wässrigen Gemisch aus EDC und NHS aktiviert. Die NHS-aktivierte Oberfläche kann danach weiter umfunktionalisiert werden, oder direkt zur Anbindung von unterschiedlichen Wirkstoffen benutzt werden [151, 186].

Im Gegensatz zum Biacore-Verfahren sollen in diesem Kapitel die Synthesen reaktiver *O*-(*N*-hydroxysuccinimidyl)-Thio-CMC-Derivaten in Lösung vorgestellt werden. Dazu wurden die reaktiven NHS-Derivate aus den entsprechen Thiocellulosen und NHS synthetisiert. Die zwei benutzten Synthesewege zur Herstellung der reaktiven NHS-Cellulosen sind in Schema 4.9 zusammengestellt.



CMC-Derivate (Edukte)	NHS-Aktivester (Produkte)
MTh-CMC 3	MTh-CMC-NHS 13
TSHP-CMC 6a	TSHP-CMC-NHS 16
HTSHP-CMC 8	HTSHP-CMC-NHS 19

Schema 4.9: Synthese von reaktiven *O*-(*N*-hydroxysuccinimidyl)-Thio-CMC-Derivaten

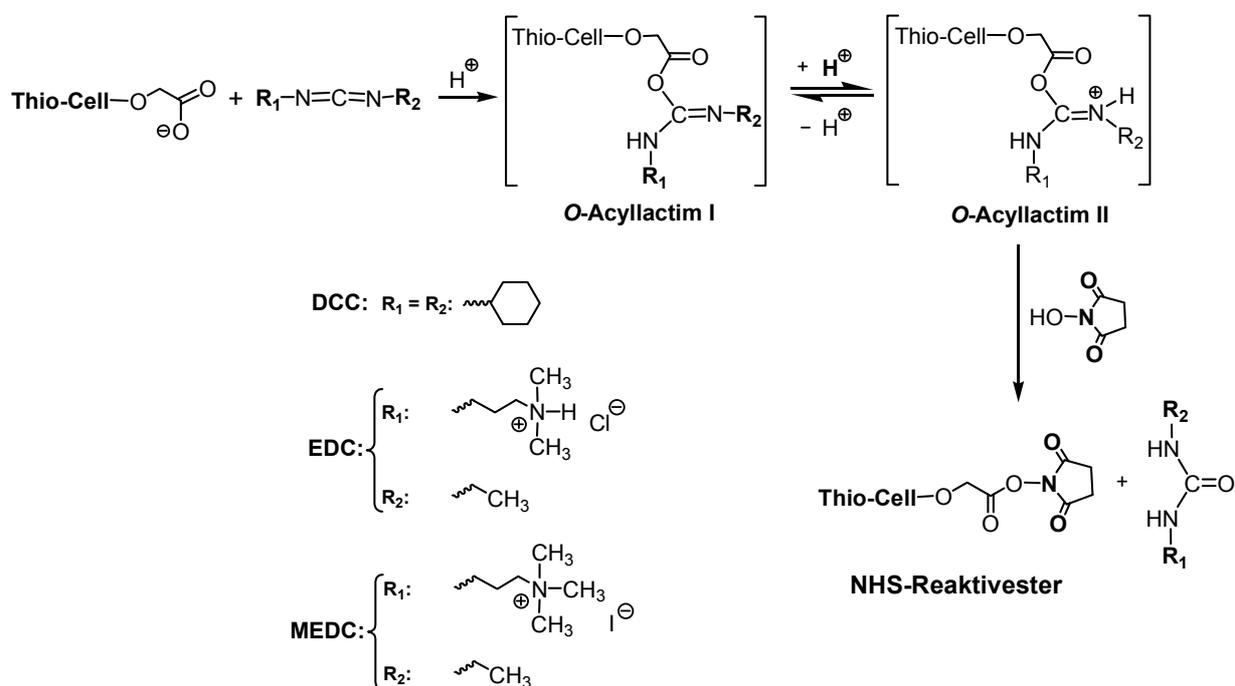
DCC: *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid;

EDC: *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid;

MEDC: *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Methoiodid.

Die Synthese der NHS-Derivate **13**, **16** und **19** erfolgte nach der ersten Syntheseroute (in Schema 4.9 mit **(a)** gekennzeichnet), die der Derivate **16** und **19** auch alternativ auf dem zweiten Syntheseweg (in Schema 4.9 mit **(b)** gekennzeichnet). Da die Thio-CMC-NHS Derivate nach der Herstellung wasserlöslich sein sollten, wurden als Ausgangsverbindungen die Carboxylate der Thiocellulosen **3**, **6a** und **8** eingesetzt.

Bei den ausgewählten Synthesewegen entstehen als reaktive Zwischenstufen die O-Acylisoharnstoffe der eingesetzten Carbodiimide DCC bzw. EDC / MEDC (siehe O-Acylactim I in Schema 4.10). Bei der Umsetzung mit dem Nucleophil NHS, reagieren sie wie ihre Sauerstoffanaloga, am Carbonyl-Kohlenstoff des Carboxylats ^[187]. Die Triebkraft bei der Aktivesterbildung ist dabei die protonierte O-Acylactim-Zwischenstufe **2** (siehe Schema 4.10). Um diese Zwischenstufe bei der Reaktion induzieren zu können werden leicht saure Bedingungen verwendet (pH-Bereich: 6.0 - 6.5) ^[150]. Das anfangs eingesetzte Carbodiimid wird während der Bildung der Aktivesterbindung wieder als Harnstoff abgespalten ^[181] (Schema 4.10).



Schema 4.10: Mechanismus der NHS-Reaktivesterbildung der Thio-CMC-Derivate.

Die Umsetzung der Carboxylgruppen der Thio-CMCs mit NHS wurde auf Route **(a)** (*heterogene* Reaktionsführung) nach einer analogen Kupplungsmethode von Dan *et al.* im Phosphatpuffer pH = 6.5 mit DCC als Kupplungsreagenz durchgeführt ^[150]. Das

DCC wird dabei in DMSO gelöst und zur Reaktionslösung im Überschuss zugetropft. Nach zwei Tagen konnte eine erfolgreiche Umsetzung zum Aktivester durch Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ - bzw. $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum festgestellt werden.

In Abbildung 4.6 ist als Beispiel das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum vom NHS-Aktivester der 6-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose **13** gezeigt. Die Signale der zwei Carbonylkohlenstoffatome ($\text{C}=\text{O}_{\text{NHS}}$) des NHS-Restes erscheinen bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 174.2$ ppm. Bei $\delta = 173.8$ ppm ist das Carbonylkohlenstoffatom der Carboxymethylgruppierung die die NHS-Funktion trägt sichtbar; das CH_2 -Kohlenstoffatom der gleichen Gruppierung erscheint hochfeldverschoben bei $\delta = 63.6$ ppm ($\text{CH}_2(\text{CM-NHS})$). Durch das unterschiedliche Substitutionsmuster der Aktivester-Gruppen entlang der Kette erscheinen die CH_2 -Funktionen (7, 8) der NHS-Reste tiefeldverschoben und sind als zwei Signale bei $\delta = 36.5$ ppm und 35.9 ppm zu beobachten. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind die Signale der Protonen bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 2.30$ ppm, den H-7, 8 Protonen der NHS-Gruppe zuzuordnen.

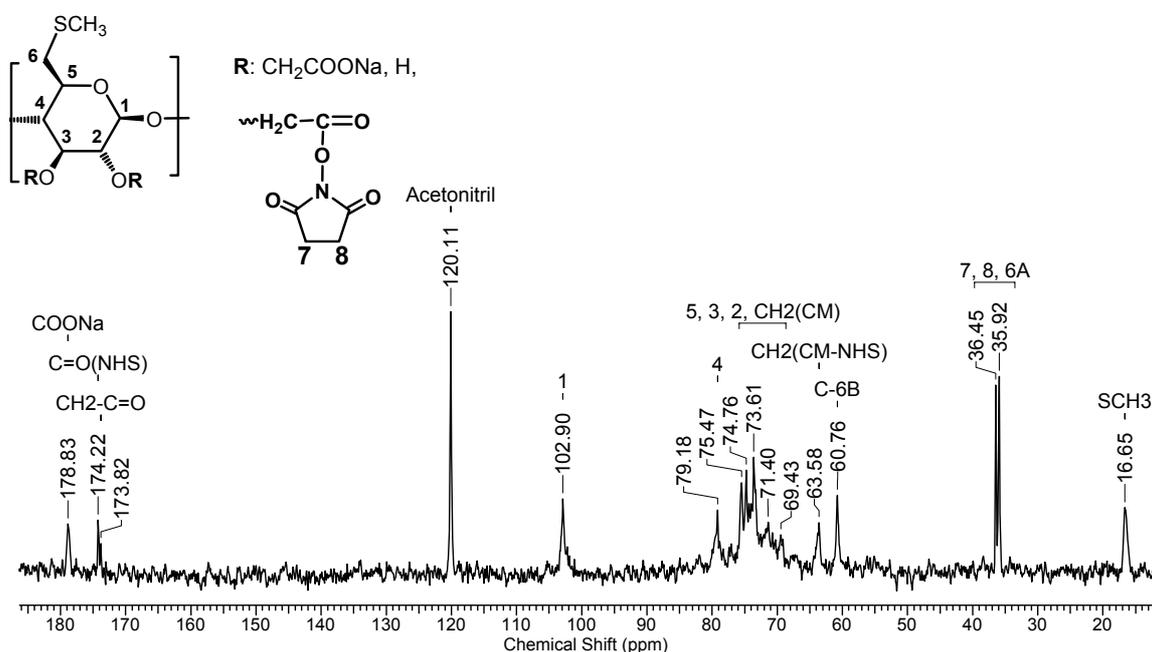


Abb. 4.6: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von MTh-CMC-NHS **13**.

Mittels Elementaranalyse und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnten die in Tabelle 4.6 zusammengestellten Substitutionsgrade an NHS-Funktionalitäten bestimmt werden.

Tabelle 4.6: Substitutionsgrade und Ausbeuten der Thio-CMC-NHS-Derivate.

Thio-CMC (Edukte)			Thio-CMC-NHS (Produkte)			Ausbeute [%]	
Probe	DS _{Thio}	DS _{CM}	Probe	DS _{CM}	DS _{NHS} aus EA ¹ H-NMR		
3	0.55	1.00	13	0.61	0.30	0.32	88
6a	0.10	0.91	16	0.63	0.28	0.29	64-80
8	0.10	0.91	19	0.41	0.50	0.49	77-85

Die Ermittlung des DS_{NHS} aus dem ¹H-NMR-Spektrum der NHS-Derivate (mit Ausnahme von TSHP-CMC-NHS) erfolgte aus dem Integrationsverhältnis des Signalbereiches für die Protonen der NHS-Gruppe (H-7, 8) bei $\delta = 2.34\text{-}2.30$ ppm (je nach Thio-CMC-NHS Derivat) und des Signals des H-1 Protons der Glcp-Einheit bei $\delta = 4.10$ ppm.

Die Bestimmung des DS_{NHS} für die 6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-O-(N-hydroxysuccinimid) cellulose **16** erfolgte im Gegensatz zu den anderen NHS-Derivaten aus dem Integrationsverhältnis des Signalbereiches für die Protonen der NHS-Gruppe (H-7, 8) bei $\delta = 2.34$ ppm und des Signals des H-2'' Protons der AHP-Glcp-Einheiten von **16** bei $\delta = 5.84$ ppm (siehe Abb. 4.7).

Dieser Weg der DS_{NHS} Bestimmung wurde gewählt aufgrund der Tatsache dass im Falle der Verbindung **16** die Integration des H-1 Protons der Glcp-Einheit nicht möglich war. Bei der eingesetzten TSHP-CMC **6a** ist aber der AHP-Anteil bekannt und zwar DS_{Allyl} = 0.33 (siehe Kapitel 3.4.2). Dementsprechend hat das Proton H-2'' im Spektrum (Abb. 4.7) die Integration 0.33. Man erhält nun aufgrund dieses Wertes für das H-2''-Proton, eine Integration für die NHS-Protonen (H-7, 8) von 0.39. Benutzt man die Formel in Abbildung 4.7 unter Berücksichtigung der Anzahl an NHS-Protonen also 4, erhält man einen Substitutionsgrad an NHS-Gruppen von DS_{NHS} = 0.29.

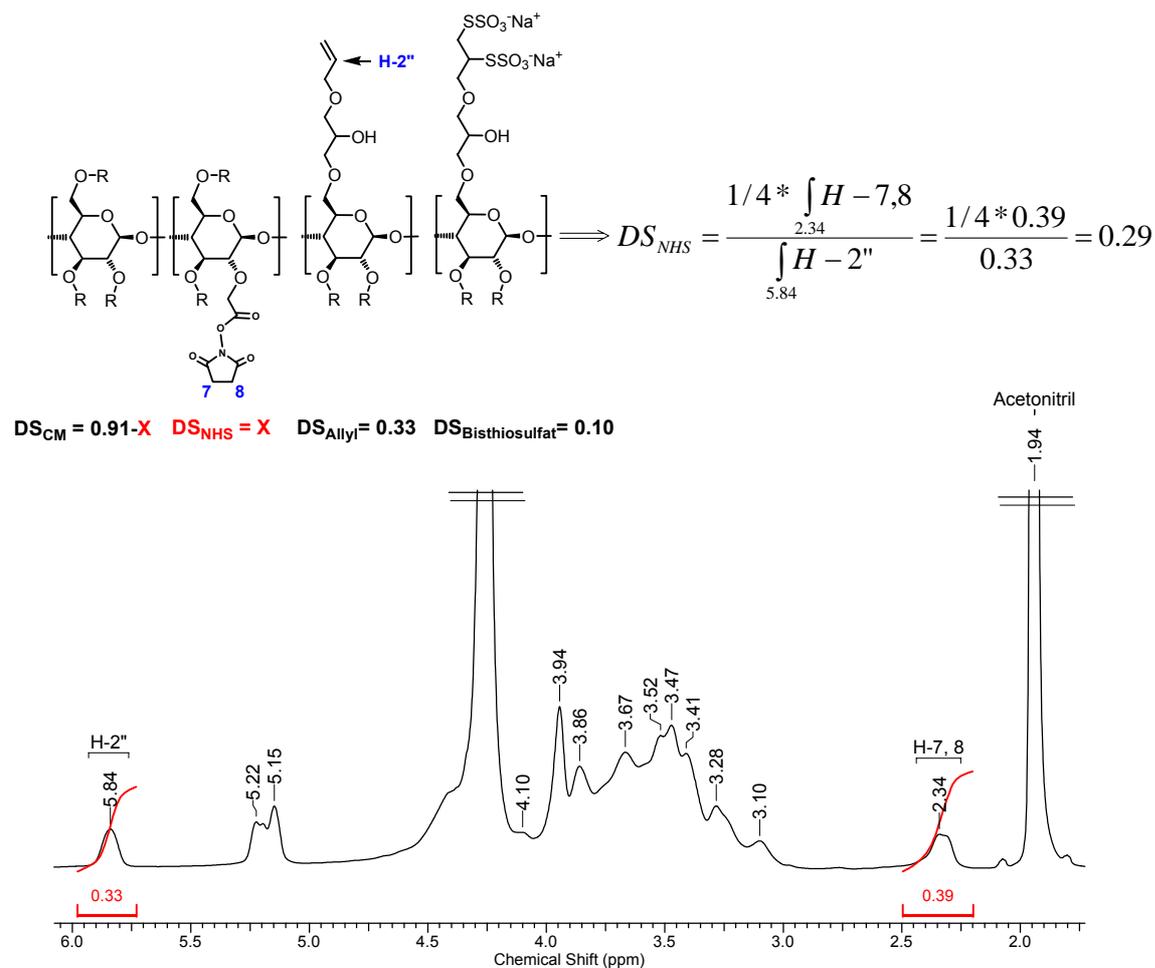


Abb. 4.7: Bestimmung des DS_{NHS} der TSHP-CMC-NHS **16** mittels 1H -NMR-Spektroskopie.

Die Aktivester TSHP-CMC-NHS **16** und HTSHP-CMC-NHS **19** wurden auch nach der in Schema 4.5 gezeigten alternativen Syntheseroute (**b**) hergestellt. Dazu wurden die Ausgangsverbindungen (**6a** und **8**) in Wasser (bei der Synthese von **16**) oder in Phosphatpuffer (bei der Synthese von **19**) gelöst. Das EDC und NHS bzw. MEDC und NHS wurde in einem Verhältnis von 3:1 in fester Form zu den wässrigen Lösungen von **6a** bzw. **8** zugegeben. Der pH-Wert der Reaktionslösungen lag dabei zwischen 6.0 (bei der Synthese von **16**) und 6.5 (bei der Synthese von **19**). Nach einer Reaktionszeit von 2 Tagen wurden die wässrigen Reaktionslösungen zuerst mit einer NaCl-Lösung ultrafiltriert, um den entstandenen kationischen EDC- bzw. MEDC-Harnstoff, als auch das nicht umgesetzte EDC bzw. MEDC aus der Lösung zu entfernen; anschließend folgte die Ultrafiltration mit Wasser. Nach Isolierung durch Gefriertrocknung erhielt man die Aktivester **16** und **19** in einer Ausbeute von 60% bzw. 75%.

Dass die Synthesen erfolgreich waren zeigen z.B. im Vergleich die identischen ^{13}C -NMR-Spektren von HTSHP-CMC-NHS **19** hergestellt nach Route (a) bzw. (b) (Abbildung 4.8).

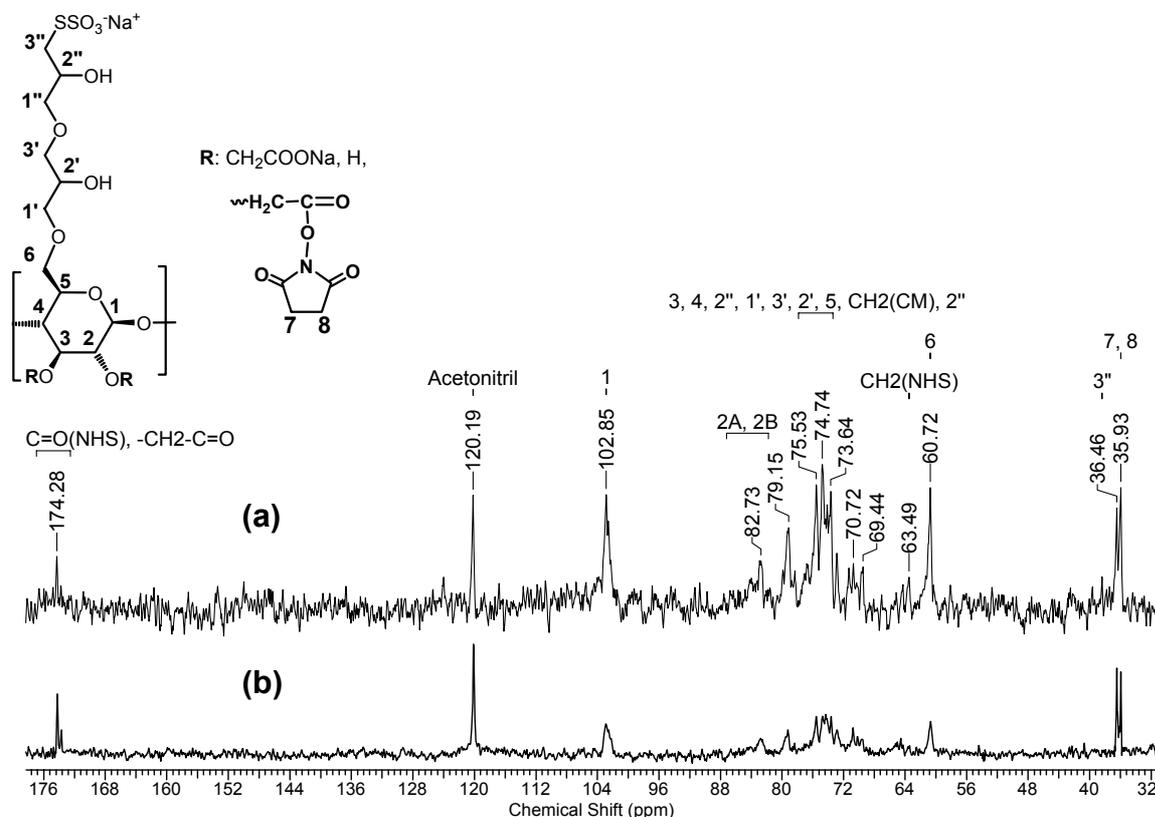


Abb. 4.8: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von **19** nach Synthesevariante (a) bzw. (b).

4.6 Zusammenfassung

Im vorliegenden Kapitel wurden die Synthesen von Carboxymethylcellulosederivaten mit anionischen, neutralen und kationischen reaktiven Gruppen vorgestellt.

Durch Aktivierung der Hydroxylfunktionen der Thiocellulosederivate **2**, **6a**, **8** und der Carboxymethylcellulose (CMC) mit dem wasserlöslichen 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin (DCT), wurden die Cellulosederivate mit anionischen O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl) Gruppen (MCT-Gruppen) **10**, **14**, **17** und **20** hergestellt. Die ermittelten Substitutionsgrade an MCT-Gruppen (DS_{MCT}) für die MCT-Thio-CMC Derivate liegen zwischen $\text{DS}_{\text{MCT}} = 0.16 - 0.30$.

Aufgrund der basischen Bedingungen und der relativ langen Reaktionszeiten bei der Synthese der MCT-Derivate, hydrolysieren ein Teil der MCT-Gruppen zu O-(2,4-

dioxido-1,3,5-triazin-6-yl) Gruppen (DOT-Gruppen). Dieser Anteil liegt bei $DS_{\text{DOT}} = 0.10 - 0.15$.

Durch die Umsetzung der Thiocellulosederivate **3** (MTh-CMC) und **8** (HTSHP-CMC) mit den wasserlöslichen Carbodiimid-Derivaten EDC und MEDC konnten zum ersten Mal kationische, reaktive O-Acylactim-Cellulosederivate hergestellt und isoliert werden. Die MTh-CMC-MEDC **13b** wurde mit fast identischen Substitutionsgraden an MEDC von $DS_{\text{MEDC}} = 0.25$ hergestellt, unabhängig davon ob die eingesetzte MTh-CMC als Carboxylat (**3**) oder freie Carbonsäure (**3a**) vorlag. Für das HTSHP-CMC-EDC **18a** und HTSHP-CMC-MEDC **18b** konnten Substitutionsgrade von $DS_{\text{EDC}} = 0.23$ respektiv $DS_{\text{MEDC}} = 0.19$ bestimmt werden. Die EDC-, bzw. MEDC-Thiocellulosederivate sind sehr gut wasserlöslich. Jedoch werden diese Derivate in Wasser mit der Zeit (2-3 Tage) zu den entsprechenden Harnstoffen hydrolysiert.

Ausgehend vom Methylthioester **4** wurde das MTh-CMC-hydrazid **12** mit einem Substitutionsgrad an Hydrazid-Gruppen von $DS_{\text{Hydrazid}} = 0.15$ hergestellt. MTh-CMC-hydrazid **11** ist nur bedingt wasserlöslich, aber gut DMF bzw. DMSO löslich.

Das reaktive Hydrazid-Derivat **15** wurde aus **6a** (H(Na)-Form) mit Hydrazin und EDC als Aktivierungsmittel in wässriger Lösung hergestellt. Dabei konnte neben der Umsetzung zum Hydrazid, auch die Reduzierung des Allylhydroxypropyl-Anteils (AHP-Anteil) der TSHP-CMC **6a** zum Propylhydroxypropyl-Rest (PHP-Rest) durch das Hydrazin, beobachtet werden. Für die TSHP-CMC-NHS **15** wurde ein Substitutionsgrad an Hydrazid-Gruppen von $DS_{\text{Hydrazid}} = 0.20$ berechnet.

Zur Klasse der Cellulosederivate mit neutralen Gruppen gehören auch die NHS-Aktivester **12**, **16** und **18**. Diese wurden durch die Umsetzung der Thio-CMC Derivaten **3**, **6a** und **8** mit *N*-Hydroxysuccinimid und Carbodiimiden (DCC, EDC bzw. MEDC) als Aktivierungsmittel in wässriger Lösung nach zwei Syntheserouten hergestellt. Die Substitutionsgrade dieser NHS-Aktivester liegen zwischen $DS_{\text{NHS}} = 0.30 - 0.50$.

Mit Ausnahme von MTh-CMC-Hydrazid **11** sind die restlichen reaktiven Cellulosederivate sehr gut wasserlöslich. Durch Abscheidung dieser Derivate aus deren wässrigen Lösungen auf Oberflächen wie Gold, Silber oder Glas können reaktive Substrate erzeugt werden die zur Anbindung von unterschiedlichen Wirkstoffen (z. B. Enzyme, Antikörper, Antigene, Lektine usw.) benutzt werden können.

5. Aufbau und Charakterisierung von Monoschichten (SAMs) aus funktionellen Cellulosederivaten auf planaren Objektträgern

5.1 Aufbau und Charakterisierung von Monoschichten (SAMs) aus funktionellen Cellulosederivaten auf Goldoberflächen

5.1.1 Einleitung

Das Interesse an den Eigenschaften von organischen ultradünnen Filmen, besonders an selbstorganisierten Mono- und Multischichten, ist in den letzten Jahren stark gestiegen. Der Grund dafür sind die breiten Anwendungsmöglichkeiten. So können sie als Korrosionsschutz, in der Sensortechnik und als Modellsysteme für die Studien von Biomembranen und biokompatiblen Oberflächen dienen ^[59].

Eine der wichtigsten Methoden zur Erzeugung von organischen ultradünnen Filmen ist die auf Chemisorption basierende Technik der molekularen Selbstorganisation (*self-assembly-monolayer*, SAM). Diese SAMs basieren auf kovalenter Wechselwirkung zwischen Adsorbat und einem Substrat (Träger), die zur spontanen, irreversiblen Ausbildung einer Monoschicht auf dem Substrat führt ^[188]. Besonders interessant sind organische Verbindungen, die eine Schwefelgruppe als Ankergruppe zum Anbinden an Gold besitzen. Gold ist inert gegenüber den meisten Substanzen, bildet keine Oxidschicht auf der Oberfläche und eignet sich dadurch sehr gut als Träger.

Vor allem haben sich Alkanthiole, Alkylsulfide und Dialkylsulfide für Oberflächenmodifizierung auf Gold bewährt ^[89]. Alkanthiole ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{X}$, $1 \leq n \leq 22$, $\text{X} = \text{H}, \text{OH}, \text{COOH}$) bilden auf Gold stabile, hochgeordnete Monolagen aus. Die Bindung der Schwefelkopfgruppe mit dem Goldsubstrat liegt als Thiolat vor, das eine starke Bindungsenergie von ca. 184 kJ/mol besitzt ^[59]. Die Alkyldisulfide gehen, nach Spaltung der S-S-Bindung, ebenfalls stabile Thiolatbindungen mit der Goldoberfläche ein ^[131, 189-192]. Im Gegensatz zu den Alkylthiolen und Alkyldisulfiden, bilden die

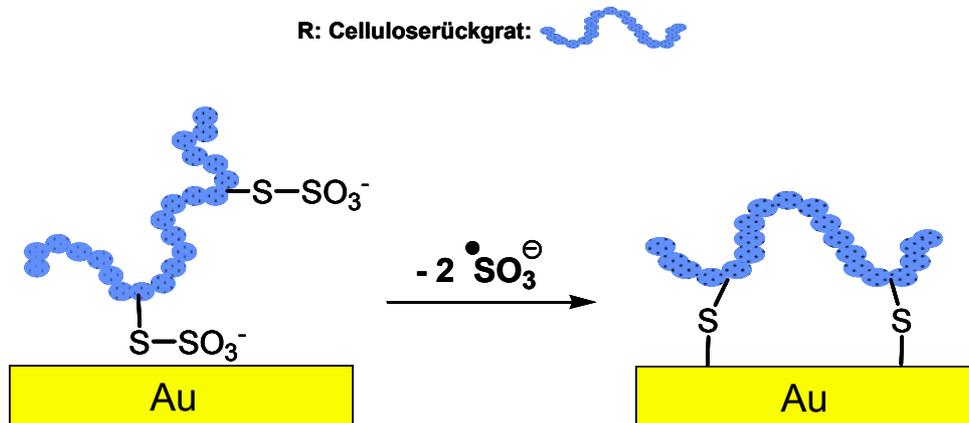
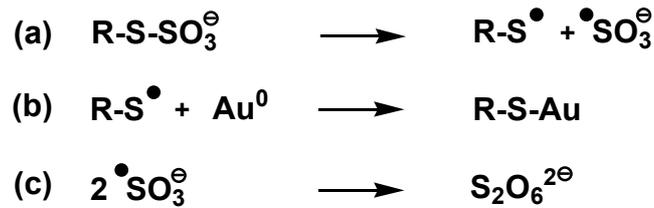
Dialkylsulfide mit Gold koordinative Bindungen aus. Dieser Befund konnte von Beulen *et al.* durch XPS und TOF-MS Messungen nachgewiesen werden ^[193]. Eine Spaltung der C-S-C-Bindung erfolgt erst nach längerer Zeit.

Außer den vorgestellten Alkyl-Thioderivaten wurden auch Cyclodextrin-Thioderivate ^[94, 95, 194, 195] und Cyclodextrinsulfide ^[98] auf Gold abgeschieden.

Aus dem Bereich der polymeren Thioderivaten haben sich die funktionalisierten Dextranschichten auf Gold (Biacore-Verfahren) im medizinischen Bereich durchgesetzt ^[117-119, 186]. Auch Arbeiten von Ringsdorf *et al.* über thiofunktionalisierte Copolymere sind hier zu erwähnen ^[99].

Wegen ihrer Kettensteifigkeit eignen sich Cellulosederivate zur Erzeugung von Mono- und Multischichten auf planaren Trägern ^[62, 65-70]. In unserer Arbeitsgruppe wurden Thiocellulosederivate entwickelt die innerhalb weniger Minuten an Gold stabile Monoschichten ausbilden können. Zunächst sind die von Choi und Kern dargestellten wasserlöslichen Bisthiosulfat- ^[19, 100] und Thiosulfatcellulosen ^[19] zu nennen. Der von Choi vorgeschlagene Reaktionsmechanismus der SAM-Bildung auf Gold basiert auf einer homolytischen Spaltung der S-S-Bindung der Thiosulfat-Gruppen (Schema 5.1 (a)), gefolgt von der oxidativen Addition der entstandenen Thioradikale an die Goldoberfläche (Schema 5.1 (b)) unter Ausbildung von stabilen kovalenten S-Au Bindungen (Schema 5.1). Das durch die homolytische Bindungsspaltung entstehende Sulfit-Radikal dimerisiert zum Dithionat (Schema 5.1 (c)). Dieser Mechanismus der Chemisorption von Disulfiden an Gold wurde zum ersten Mal von Nuzzo *et al.* vorgeschlagen ^[88, 188]. Die Ausbildung von S-Au Bindungen der Bisthiosulfatcellulose auf Gold konnte durch XPS-Messungen bewiesen werden ^[100].

Auch die von Liepold entwickelten Thiosulfat- und Methylthio-Carboxymethylcellulosen ^[102] sind hier zu erwähnen. Aufgrund der sehr guten Wasserlöslichkeit und Stabilität der wässrigen Lösungen gegenüber Vernetzung durch Disulfidbrücken, ist eine schnellere und effektivere Ausbildung der Monoschichten auf Gold gewährleistet. Lukkari *et al.* berichten ebenfalls von organischen monomeren Thiosulfatverbindungen, die unter Sauerstoffausschluss stabile Monoschichten auf Gold bilden ^[130].



Schema 5.1: Reaktionsmechanismus und schematische Darstellung der Adsorption einer Bisthiosulfatcellulose aus wässriger Lösung auf Gold ^[100].

Zur Untersuchung von ultradünnen Oberflächenbeschichtungen eignen sich eine Vielzahl analytischer Methoden. Eine Übersicht der wichtigsten Methoden zeigt Tabelle 5.1. Diese Charakterisierungsmethoden können Aufschluss z. B. über die Dicke, Orientierung, Beschaffenheit oder Belegungsdichte der untersuchten Oberflächen geben.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Charakterisierung der Schichten von Cellulosederivaten auf Gold folgende analytische Oberflächenmethoden benutzt: Infrarotspektroskopie, Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*Surface Plasmon resonance*, SPR), Cyclovoltammetrie (CV), Impedanzspektroskopie (EIS) und Kontaktwinkel-Messungen (KW).

Tabelle 5.1: Übersicht der wichtigsten analytischen Messmethoden in der Oberflächenchemie.

Messgerät	Messgröße	Information
Benetzbarkeit	Kontaktwinkel	Oberflächenpolarität
Infrarot / Raman-Spektroskopie	Optische Adsorption	Chemische Struktur, Molekulare Orientierung
Ellipsometrie / SPR-Spektroskopie	Reflektivität von polarisiertem Licht	Filmdicke, Brechungsindex
Cyclovoltammetrie	Ladungsstrom	Kapazität, Dicke
Impedanzspektroskopie	Komplexer Widerstand	Belegungsdichte
XPS	Bindungsenergie	Element-Zusammensetzung, Oxidationsstufe,
SIMS	Sekundäre Elektronenenergie	Chemische Zusammensetzung
STM	Tunnelstrom	Molekulare Struktur
AFM	Wechselwirkungskraft	Molekulare und supramolekulare Struktur

5.1.2 Infrarotspektroskopischer Nachweis der Belegung von Goldoberflächen mit funktionellen Thio-CMC Derivaten

Zum Nachweis der adsorbierten Thio-CMC Derivaten auf Goldoberflächen wurde zunächst die *Infrarotspektroskopie* angewendet. Sie erlaubt es, Aussagen über die chemische Zusammensetzung und die mögliche Orientierung der adsorbierten Schichten zu treffen.

Zur Untersuchung dünner und ultradünner organischer Filme auf Metalloberflächen ist die Infrarotspektroskopie mit streifendem Einfallswinkel und externer Reflexion

(*Infrared spectroscopy at grazing incidence reflection*, FTIR-GIR oder FTIR-ERS) die geeignete Methode.

Bei FTIR-ERS Messungen trifft der IR-Strahl unter einem relativ zur Flächennormalen großen Winkel ϕ auf eine glatte Oberfläche und wird dort reflektiert. Der Einfallswinkel ϕ muss groß sein (streifender Einfall), da einerseits Totalreflexion gefordert ist, und andererseits das resultierende elektrische Feld für ϕ gegen 90° maximale Stärke erreicht ^[196-198]. Bei der für die FTIR-Messungen der Thio-CMC Monoschichten benutzten Reflexionseinheit (A518 80° , Fa Bruker) betrug der Einfallswinkel $\phi = 80^\circ$.

Trifft nun ein IR-Strahl auf eine Oberfläche, so ist die Einfallsebene definiert durch den einfallenden Strahl und die Oberflächennormale. Das an der Oberfläche resultierende Feld ist die Summe der Feldvektoren der einfallenden, der reflektierten und der gebrochenen IR-Welle. Auf Metallen wird der größte Teil der einfallenden Intensität reflektiert, so dass der Beitrag der gebrochenen Welle zum elektrischen Feld der Oberfläche vernachlässigbar ist. Der einfallende Strahl wird in einer Komponente senkrecht (E_s^i) und eine parallel (E_p^i) zur Einfallsebene aufgeteilt. Es resultieren dementsprechend die elektrischen Felder E_s (= elektrisches Feld der Komponente des Strahls senkrecht zur Einfallsebene), E_p^\perp und E_p^\parallel (= elektrische Felder senkrecht bzw. parallel zur Metalloberfläche der Komponente des Strahls parallel zur Einfallsebene) ^[199, 200].

Die Phasenverschiebung δ bei Reflexion ist stark vom Einfallswinkel ϕ und der Polarisierung der Eingangsstrahlung abhängig. Im Fall der s-Polarisierung liegt die Phasenverschiebung für alle Einfallswinkel bei ca. 180° ^[201]. Bei der Überlagerung der einfallenden und reflektierten Welle an der Grenzschicht Luft/Monolage heben sich die elektrischen Feldvektoren gegenseitig weitgehend auf, d. h. $E_s \approx 0$. Für p-polarisierte Einfallstrahlung ist die Phasenverschiebung sehr stark vom Einfallswinkel abhängig. Während das resultierende elektrische Feld parallel zur Metalloberfläche E_p^\parallel für alle ϕ klein ist, nimmt E_p^\perp mit wachsendem Einfallswinkel ϕ zu. Aus diesem Grund ergeben elektrische Felder an Metalloberflächen nur in der Richtung der Flächennormalen und nur bei streifendem Einfall messbare Absorption. Das resultierende Feld an der Metalloberfläche kann als senkrecht zu dieser betrachtet werden. Da für eine Wechselwirkung mit einem oszillierenden elektrischen Dipol eine endliche elektrische Feldstärke benötigt wird, werden bei Reflexion auf Gold nur Schwingungen beobachtet, die eine Komponente senkrecht zur

Substratebene aufweisen. Das heißt, nur diejenigen Komponenten des Übergangsdipolmoments senkrecht zur Oberfläche koppeln mit dem elektrischen Feld an der Oberfläche. Dies hat zur Folge, dass die Intensität eines IR-Signals abhängig vom Winkel des entsprechenden Übergangsdipolmoments relativ zur Oberfläche ist. Dieser Effekt kann herbeigezogen werden, um Orientierungen von Molekülen oder Molekülsegmenten in geordneten Schichten oder Filmen auf Metalloberflächen aufzuklären^[88, 202].

FTIR-ERS Experimente an Monoschichten der Thiocellulosederivaten 2, 6a und 8

Zur Überprüfung der Adsorption der Thiocellulosen MTh-Cellulose **2**, TSHP-CMC **6a** und HTSHP-CMC **8** auf einer Goldoberfläche, wurden IR-Spektren an den Schichten aufgenommen und mit denen gemessen an fester Substanz (*Golden Gate* ATR-Technik, ATR: *Attenuated total reflectance*) verglichen. Zur Probenpräparation wurde jeweils ein frisch bedampftes Goldsubstrat in die wässrigen Lösungen von **2** (0.3 Gew.-%-ige Lösung von **2** in Wasser), **6a** (0.1 Gew.-%-ige Lösung von **6a** in Wasser, pH 2.0) und **8** (0.1 Gew.-%-ige Lösung von **8** in 0.1 M Zitronensäure, pH 2.0) eingetaucht. Nach einer Adsorptionszeit von 4 Stunden für die MTh-Cellulose **2** bzw. 2 Stunden für die Thio-CMC Derivate **6a** und **8** wurden die Goldsubstrate mit Wasser mehrmals gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die Aufnahme des Hintergrundspektrums wurde als Referenz ein unbeschichtetes Goldsubstrat gleicher Bedampfungs-Charge benutzt. Während eines Experiments wurde das FTIR-Spektrum der adsorbierten Schicht zuerst mit s-polarisiertem Licht gemessen. Dabei sollte für ultradünne Schichten kein Probensignal detektiert werden. Anschließend erfolgte die Probenmessung mit p-polarisiertem Licht. Das Umschalten zwischen s- und p-polarisiertem Licht wurde mit einem Polarisator (A121, Fa Bruker) durchgeführt. Durch Subtraktion des vermessenen s-polarisierten IR-Spektrums vom p-Polarisierten, erhält man das FTIR-Spektrum der adsorbierten Schicht frei von Wasserdampf- und CO₂-Banden (*Bemerkung*: noch eventuell vorhandene Wasserdampf- und CO₂-Banden im FTIR-Spektrum der adsorbierten Schicht wurden mit der Software *OPUS* rausgerechnet). In den Abbildungen 5.1 und 5.2 ((I) und (II)) sind die Spektren der Thiocellulosederivate **2**, **6a** und **8** gezeigt, gemessen jeweils an der festen Probe und an einer an Gold adsorbierten Schicht.

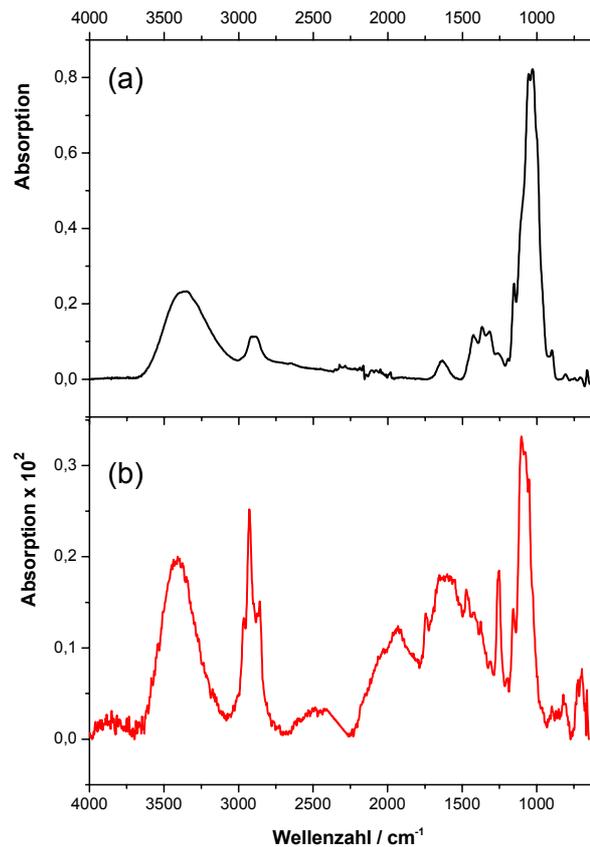


Abb. 5.1: Infrarotspektren von MTh-Cellulose **2** gemessen:

- (a) an Feststoff (ATR-Technik)
- (b) an einer auf Gold adsorbierter Schicht im streifenden Einfall.

Die Gegenüberstellung dieser Spektren belegt eindeutig die Anwesenheit der Thiocellulose-derivate auf den Goldoberflächen. Die für das Cellulosegerüst der jeweiligen Thiocellulose charakteristischen Schwingungsbanden sind deutlich zu erkennen: im Bereich zwischen $\nu = 3425\text{--}3260\text{ cm}^{-1}$ sind die OH-Valenzschwingungen $\nu(\text{O-H})$ zu sehen, zwischen $\nu = 2972\text{--}2857\text{ cm}^{-1}$ die C-H-Valenzschwingungen $\nu(\text{C-H})$. Die antisymmetrischen $\nu_a(\text{C-O-C})$ -Schwingungen der glycosidischen C-O-C-Bindung und die gekoppelten C-C-/C-O-Streckschwingungen $\nu(\text{C-C/C-O})$ sind als die drei intensivsten Banden zwischen $\nu = 1156\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen.

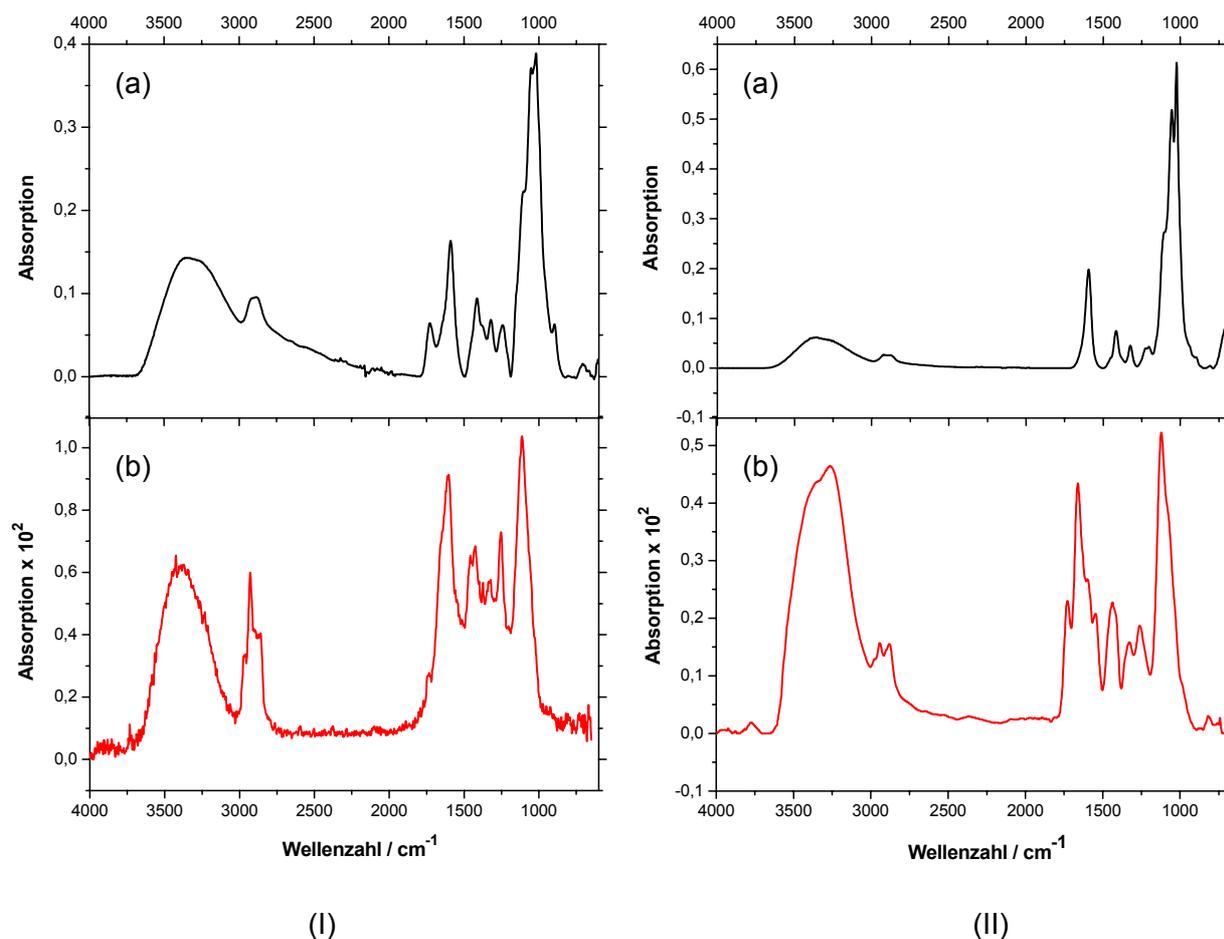


Abb. 5.2: Infrarotspektren von (I) TSHP-CMC **6a** und (II) HTSHP-CMC **8** gemessen:

(a) an Feststoff (ATR-Technik)

(b) an einer auf Gold adsorbierter Schicht im streifenden Einfall.

Die Deformationsschwingungen $\delta(\text{C-H})$ der CH_2 - und $\delta(\text{O-H})$ der OH-Gruppen erscheinen zwischen $\nu = 1457\text{--}1203\text{ cm}^{-1}$. Im Bereich zwischen $\nu = 1728\text{--}1588\text{ cm}^{-1}$ sind die C=O-Valenzschwingungen $\nu(\text{C=O})$ der Carboxylatgruppen der Thio-CMC Derivate **6a** und **8** zu sehen (Abb. 5.2 ((I) und (II))).

Die genauen Werte, Zuordnungen und die charakteristischen Schwingungen der entsprechenden Thiofunktionalitäten des jeweiligen Cellulosederivats sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.

Tabelle 5.2: Charakteristische IR-Schwingungsbanden der Thiocellulosederivate **2**, **6a** und **8** gemessen jeweils an Feststoff (*Golden Gate* ATR Technik) und an Goldoberflächen adsorbierten Filmen (GIR-Technik). Die Abkürzungen neben den Wellenzahlen beschreiben die Intensitäten der Signale und bedeuten: s = *stark*, m = *mittel*, w = *wenig intensiv*, sh = *Schulter*.

	MTh-Cell 2		TSHP-CMC 6a		HTSHP-CMC 8	
	Fest	Film	Fest	Film	Fest	Film
	[cm ⁻¹]					
v(O-H)	3371br	3408br	3349br	3426br	3356br	3261sh
v(C-H)		2965m		2961m		2960w
	2915m	2927s	2910m	2928s	2922m	2942m
	2891m	2875m	2886m	2872m	2881m	2879m
			2859m			
v(C=O)			1727m	1734w		1728m
				1645sh		1661s
			1588m	1602s	1594s	1598sh
					1546m	
δ(C-H)		1472m				
		1456m		1457m		
	1368m	1375m	1379sh	1374m		
	1317m	1309w	1320m	1323m	1323m	1328sh
δ(O-H)	1426sh	1427w	1413m	1425m	1416m	1436br
		1339w				
	1260w	1253s	1241m	1253s	1223w	1261m
v(SO ₂ ⁻)			1204sh		1203w	
ν _a (C-O-C)	1153m	1157m				
		1102s	1101sh	1114s	1101sh	1121s
ν(C-C/C-O)		1077sh				
	1055s	1051s	1052s		1056s	1058sh
	1029s					
v(S=O)			1019s		1024s	
v(C-S)	701w	697m	709w	694w	637m	
v(S-S)			605w		606w	

Diskussion der IR-Spektren

In allen Spektren der Verbindungen **2**, **6a** und **8** liegt die OH-Valenzschwingungsbande $\nu(\text{O-H})$ als breite intensive Bande vor, was auf inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen deutet. Die Lage dieser Bande gestattet Aussagen über die Stärke der Wasserstoffbindungen: je stärker die Bindung ist, desto tiefer die Frequenz der Schwingungsbande^[203]. Ein Vergleich der Lage dieser Banden in den Feststoff-Spektren mit denen in den Film-Spektren zeigt bei den Thiocellulosen **2** und **6a** eine leicht hypsochrome Verschiebung und bei **8** eine bathochrome Verschiebung. Die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten kann durch die unterschiedlichen Ankerketten und den damit verbundenen Unterschieden in der Anordnung der Moleküle an der Oberfläche herrühren. Die Thiocellulose **2** besitzt keine Abstandsgruppe zwischen Methylthio-Gruppe und Celluloserückgrat, so dass aus sterischen Gründen die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen erschwert sein dürfte. Die bathochrome Verschiebung der $\nu(\text{O-H})$ -Bande von **8** beruht auf der hohen Flexibilität der Ankergruppen die zu einer besseren Ausrichtung und Packung der Cellulosestränge an der Goldoberfläche führen kann. Nach Adsorption der Thio-CMC **8** auf Gold können somit Konformationen entstehen, die die Ausbildung von stärkeren intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen gewährleisten als im Falle von Derivat **2**. Dies bedeutet für zwei wechselwirkende adsorbierte Moleküle, eine zur Goldoberfläche eher parallele Orientierung der Celluloseketten. Bei der Bisthiocellulose **6a** würde man aufgrund der Ankergruppe das gleiche Verhalten erwarten; jedoch ist hier wie schon erwähnt, eine hypsochrome Verschiebung sichtbar. Dieser Befund beruht wahrscheinlich auf der Tatsache dass durch die zweite Thiol-Gruppe, nach der Adsorption von **6a** auf Gold, die Beweglichkeit die notwendig ist um eine optimale Ausrichtung und Packung der Cellulosestränge zu gewährleisten, eingeschränkt wird. Dementsprechend können Konformationen der Celluloseketten entstehen die nur *partiell* durch intermolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert sind.

Die Banden der antisymmetrischen Valenzschwingungen der CH_2 -Gruppen finden sich in den Feststoff-Spektren für **2** bei $\nu = 2915 \text{ cm}^{-1}$, für **6a** bei $\nu = 2910 \text{ cm}^{-1}$ und für **8** bei $\nu = 2922 \text{ cm}^{-1}$. Zusätzlich sind auch die symmetrischen C-H-Valenzschwingungen der CH_2 -Gruppen der Thioverbindungen bei $\nu = 2891 \text{ cm}^{-1}$ (**2**), $\nu = 2886 \text{ cm}^{-1}$ (**6a**) und $\nu = 2881 \text{ cm}^{-1}$ (**8**) zu erkennen. In den Spektren der

immobilisierten Thiocellulosen ist die $\nu_a(\text{C-H})$ -Bande leicht hypsochrom verschoben (siehe Tabelle 5.2) und ihre relative Intensität bezüglich der kombinierten C-C und C-O-Streckschwingungen im Vergleich zum Feststoff-Spektrum erhöht. Die $\nu_s(\text{C-H})$ -Bande in den Film-Spektren liegt bei $\nu = 2875 \text{ cm}^{-1}$ für **2**, $\nu = 2872 \text{ cm}^{-1}$ für **6a** und $\nu = 2879 \text{ cm}^{-1}$ für **8**. Die Erhöhung der Intensitäten der $\nu_a(\text{C-H})$ -Banden deutet auf CH_2 -Gruppen, aus deren C-H-Vibrationsschwingungen Dipolmomente resultieren, die einen deutlichen Anteil senkrecht zur Goldoberfläche besitzen. Das heißt, die CH_2 -Gruppen sind unter einem Winkel (= Kippwinkel) relativ zur Oberflächennormalen angeordnet. Eine ähnliche Ausrichtung der CH_2 -Gruppen wurde auch von Nelles *et al.* bei Cyclodextrinthiolen beobachtet^[95]. In den Thio-CMC Derivaten **6a** und **8** sind CH_2 -Gruppen in den Ankerketten und in den C-6 Positionen der Glcp-Einheiten des Celluloserückgrats vorhanden. Daher kann die $\nu_a(\text{C-H})$ -Bande aus Wechselwirkungen zwischen dem elektrischen Feld und dem elektrischen Dipolmoment beider Molekülfragmente herrühren. Eindeutige Aussagen über den Wert des Kippwinkels der Ankerketten von **6a** und **8** relativ zur Oberflächennormale als auch über die Orientierung des gesamten Moleküls an der Goldoberfläche sind jedoch aufgrund der Komplexität dieser Vibrationszustände nicht möglich.

Die Bande der $\nu(\text{C=O})$ -Schwingung erscheint sowohl in den Feststoff- als auch in den Filmspektren von **6a** und **8** bei nahezu gleicher Wellenzahl, jedoch zeigen die $\nu(\text{C=O})$ -Banden der Film-Spektren relativ zu den anderen Film-Banden, im Vergleich zu den Banden der Feststoffspektren, eine höhere Intensität. Diese erhöhte Intensität der $\nu(\text{C=O})$ -Banden kommt wahrscheinlich von den Carboxymethyl-Gruppen mit einer Konformation fast senkrecht zur Goldoberfläche^[87]. Dies wiederum korreliert mit den Veränderungen in den Intensitäten der $\nu_a(\text{C-H})$ -Banden.

Die Banden der Deformationsschwingungen $\delta(\text{O-H})$, $\delta(\text{C-H})$ und die der $\nu_a(\text{C-O-C})$ -Valenzschwingung bzw. der gekoppelten $\nu(\text{C-C/C-O})$ -Streckschwingung erscheinen in allen IR-Spektren der Thiocellulosen bei nahezu gleicher Wellenzahl. Der Unterschied liegt jedoch in der erhöhten Intensität einiger Signale in den Film-Spektren gegenüber den Feststoff-Spektren. So erfährt die $\delta(\text{O-H})$ -Schwingung im Feststoff-Spektrum von Derivat **2** bei $\nu = 1260 \text{ cm}^{-1}$ eine sehr leichte hypsochrome Verschiebung nach $\nu = 1253 \text{ cm}^{-1}$ mit einer sehr starken Erhöhung der Signalintensität. Das gleiche Verhalten wird auch bei den Derivaten **6a** und **8** beobachtet, jedoch ist diese Erhöhung der Intensitäten nicht so ausgeprägt wie bei der Methylthiocellulose **2** (siehe Tabelle 5.2). Die antisymmetrischen $\nu_a(\text{C-O-C})$ -

Valenzschwingungen aller drei Thiocellulosederivate zeigen in den Filmspektren auch eine erhöhte Intensität im Vergleich zu den Feststoff-Spektren was auf eine Konformation senkrecht zur Goldoberfläche hindeuten würde. Diese Veränderungen in den Intensitäten und damit auch teils in den Bandenlagen deuten auf eine veränderte Orientierung und einen erhöhten Ordnungsgrad der Thiocellulosen durch die Adsorption an den Goldoberflächen hin. Die exakte Bestimmung der Orientierung der Cellulosen ist nicht möglich, da die IR-Experimente zunächst nur Aussagen über die Orientierung eines Dipolmoments liefern. Die Übertragung des gemessenen Dipolmoments auf die dazugehörige Molekülgruppe stellt eine Voraussetzung für die Bestimmung der Richtung des Dipolmoments im Molekül dar und verbunden damit, der Ausrichtung des Moleküls an der Oberfläche. Die Zuordnung der einzelnen, gekoppelten C-C- und C-O-Streckschwingungsbanden zu den entsprechenden Molekülgruppen in der Cellulose ist jedoch nicht genau bekannt. Die Orientierungsänderungen, die zu veränderten Bandenintensitäten und -lagen geführt haben, konnten nur qualitativ erfasst werden.

Die charakteristische $\nu(\text{C-S})$ -Schwingung der Methylthio-Funktionalität von Derivat **2** erscheint im Feststoff-Spektrum bei $\nu = 701 \text{ cm}^{-1}$ als wenig intensive Bande, im Filmspektrum ist diese Bande bei $\nu = 697 \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen und zeigt eine leicht erhöhte Intensität. Die $\nu(\text{C-S})$ -Schwingung bei den Derivaten **6a** und **8** ist aufgrund ihrer relativ geringen Intensität nur im Feststoff-Spektrum der Verbindungen bei $\nu = 694 \text{ cm}^{-1}$ (**6a**) und $\nu = 637 \text{ cm}^{-1}$ (**8**) zu sehen. Die charakteristischen Schwingungen der Thiosulfatgruppen von **6a** und **8**, nämlich $\nu(\text{SO}_2^-)$ und $\nu(\text{S-S})$, sind in den Feststoff-Spektren der Verbindungen bei $\nu = 1204 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu = 605 \text{ cm}^{-1}$ für Derivat **6a** und bei $\nu = 1203 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu = 606 \text{ cm}^{-1}$ für Derivat **8** zu erkennen. Aufgrund der Aktivierung dieser Thiosulfat-Gruppen zum Thiol und die anschließende Bindung an die Goldoberfläche, sind diese charakteristischen Banden der Thiosulfat-Gruppen in den Film-Spektren der Verbindungen nicht mehr zu sehen (siehe Tabelle 5.2).

5.1.3 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) ist die wichtigste Methode zur *in situ*-Kontrolle des Schichtaufbaus von Molekülen auf Metallen wie Gold oder Silber. Sie erlaubt die Bestimmung von Schichtdicken im

Nanometerbereich als auch die Ermittlung der Oberflächenbelegung der adsorbierten Schichten.

Oberflächenplasmonen (*Plasmon Surface Polaritons*, PSP) sind Ladungsdichtewellen des fast freien Elektronengases eines Metalls, die sich entlang der Grenzfläche zwischen dem Metall und einem dielektrischen Medium ausbreiten. Das elektrische Feld dieser Wellen fällt dabei sowohl in Ausbreitungsrichtung, als auch senkrecht zur Grenzfläche exponentiell ab^[204] (siehe Abb. 5.3).

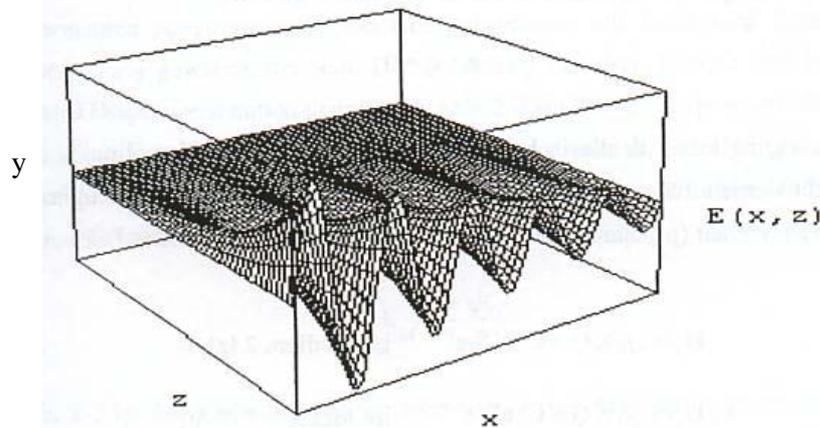


Abb. 5.3: Das elektrische Feld eines Oberflächenplasmons an der Metall / Dielektrikum-Grenzfläche in der xy-Ebene; x = Ausbreitungsrichtung, z = Achse senkrecht zur Grenzfläche^[205].

Oberflächenplasmonen sind elektromagnetische Wellen und können dementsprechend durch Photonen oder Elektronen ausgelöst werden. Elektromagnetische Wellen können in eine p-polarisierte Komponente (der Vektor des Feldes liegt parallel zur Einfallsebene) und eine s-polarisierte Komponente (der Vektor des Feldes liegt senkrecht zur Einfallsebene) aufgeteilt werden. Dabei ist nur das p-polarisierte (parallel) Licht in der Lage, Oberflächenplasmonen (PSP) anzuregen, da dieses eine Feldkomponente E senkrecht zur Oberfläche besitzen.

Die SPR-Spektroskopie beruht auf der resonanten Anregung von Oberflächenplasmonen mit Licht. Diese resonante Anregung der Oberflächenplasmonen erfordert eine Übereinstimmung von Energie und Impuls zwischen den verwendeten Photonen und den PSP. Aus den Maxwell-Gleichungen für ein Zweischichtsystem ergibt sich die Beziehung zwischen der Energie und dem Impuls der PSP, die so genannte Dispersionsrelation für die Oberflächenplasmonen^[206].

$$k_z = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_M \cdot \varepsilon_D}{\varepsilon_M + \varepsilon_D}} \quad (5-1)$$

k_z :	Wellenvektor des Oberflächenplasmons in Ausbreitungsrichtung
ω :	Frequenz
c :	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
$\varepsilon_M / \varepsilon_D$:	Dielektrische Konstanten des Metalls (M) und des Dielektrikums (D)

Betrachtet man nun den Impuls eines freien Photons (k_{Ph}), welches sich im Dielektrikum bewegt:

$$k_{Ph} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_D} \quad (5-2)$$

so ergibt sich, dass dessen Impuls bei einer gegebenen Frequenz ω stets kleiner ist als der Impuls eines Oberflächenplasmons. Die Resonanzbedingung:

$$k_{Ph} = k_z \quad (5-3)$$

kann nicht erreicht werden. Dieses Verhalten wird durch das Fehlen eines Schnittpunktes zwischen der Lichtlinie im Dielektrikum und der Plasmonendispersion erklärt (Abb. 5.4).

Um dennoch an das Feld der PSP koppeln zu können, muss bei konstanter Frequenz der Impuls des Lichtes erhöht werden. Dies ist durch die so genannte Gitter- oder durch Prismenkopplung möglich.

Bei der Prismenkopplung werden die Photonen nicht direkt an die Grenzfläche zwischen Metall und Dielektrikum gekoppelt, sondern über den evaneszenten Anteil des einfallenden Lichtes. Dieser entsteht durch die Totalreflexion des Lichtes an der Basisfläche des Prismas. Dabei muss die Dielektrizitätskonstante ε_{Pr} des Prismas so gewählt werden, dass sie den Photonenimpuls ausreichend erhöht, d. h. es muss gelten:

$$\varepsilon_{Pr} > \varepsilon_D \quad (5-4)$$

Durch Variation des internen Einfallswinkel ϕ des Lichts (z. B.: durch Rotation des Lasers oder des Prismas) ist es nun möglich, den Wellenvektor der Photonen zu verändern, bis die Kopplungsbedingungen erfüllt sind ^[206-209].

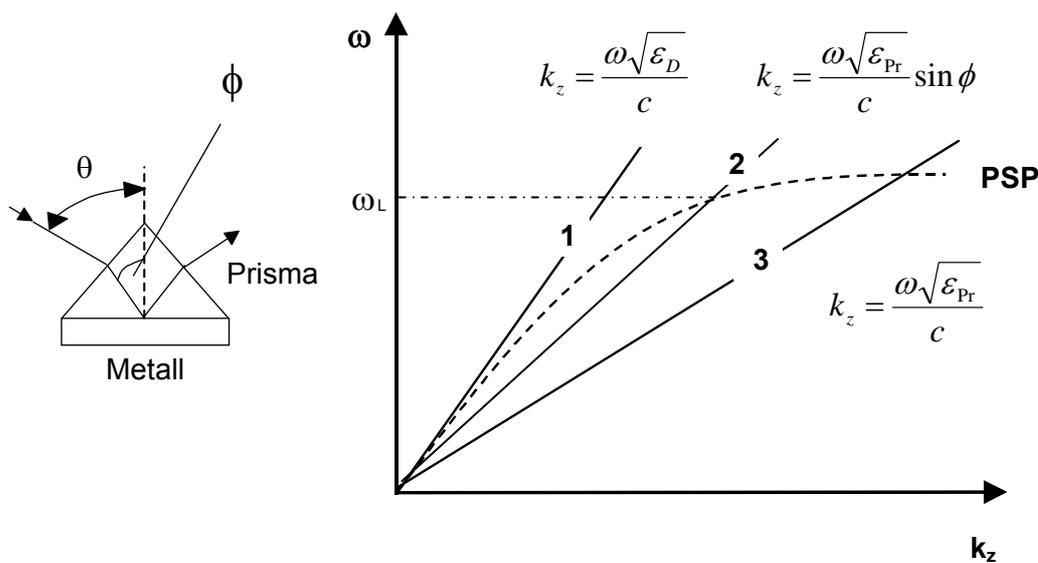


Abb. 5.4: Dispersionsrelation von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Metall / Luft und die Lichtlinie 1 und im Prisma 3. Durch die Wahl des Einfallswinkels ϕ kann bei definierter Laserwellenlänge ω_L die Lichtlinie auf die Plasmonendispersion 2 abgestimmt werden.

In Abbildung 5.5 (a) ist die Kretschmann-Anordnung ^[105, 106] zur Anregung von Oberflächenplasmonen dargestellt. Diese Anordnung wird in den meisten SPR-Geräten angewendet. Dabei wird das auf ein Glassubstrat oder Prisma aufgedampftes Metall (z. B.: Gold), plan auf der Prismenbasis aufgelegt. Der Laserstrahl wird an der Innenseite des Prismas reflektiert. Ab einem kritischen Winkel tritt Totalreflexion ein. Im Bereich der Totalreflexion dringt ein evaneszenter Anteil des elektromagnetischen Feldes durch die dünne Metallschicht ($d_{\text{Metall}} \approx 50$ nm) und regt unter dem Resonanzwinkel ϕ_0 Oberflächenplasmonen an; man spricht auch von „frustrierter Totalreflexion“ (*Attenuated Total Reflection, ATR*). Trägt man die Reflektivität R einer solchen Anordnung in Abhängigkeit vom Winkel θ auf, so tritt bei Anregung des Oberflächenplasmons ein Minimum (= Resonanzminimum) bei einem Winkel θ_0 (siehe Abb. 5.5 (b), Kurve —) auf.

Wird nun auf die Metallschicht zusätzlich eine dünne dielektrische Deckschicht (z. B. Cellulose) mit einem Brechungsindex $n_{\text{Schicht}} > n_2$ aufgebracht, so verschiebt diese

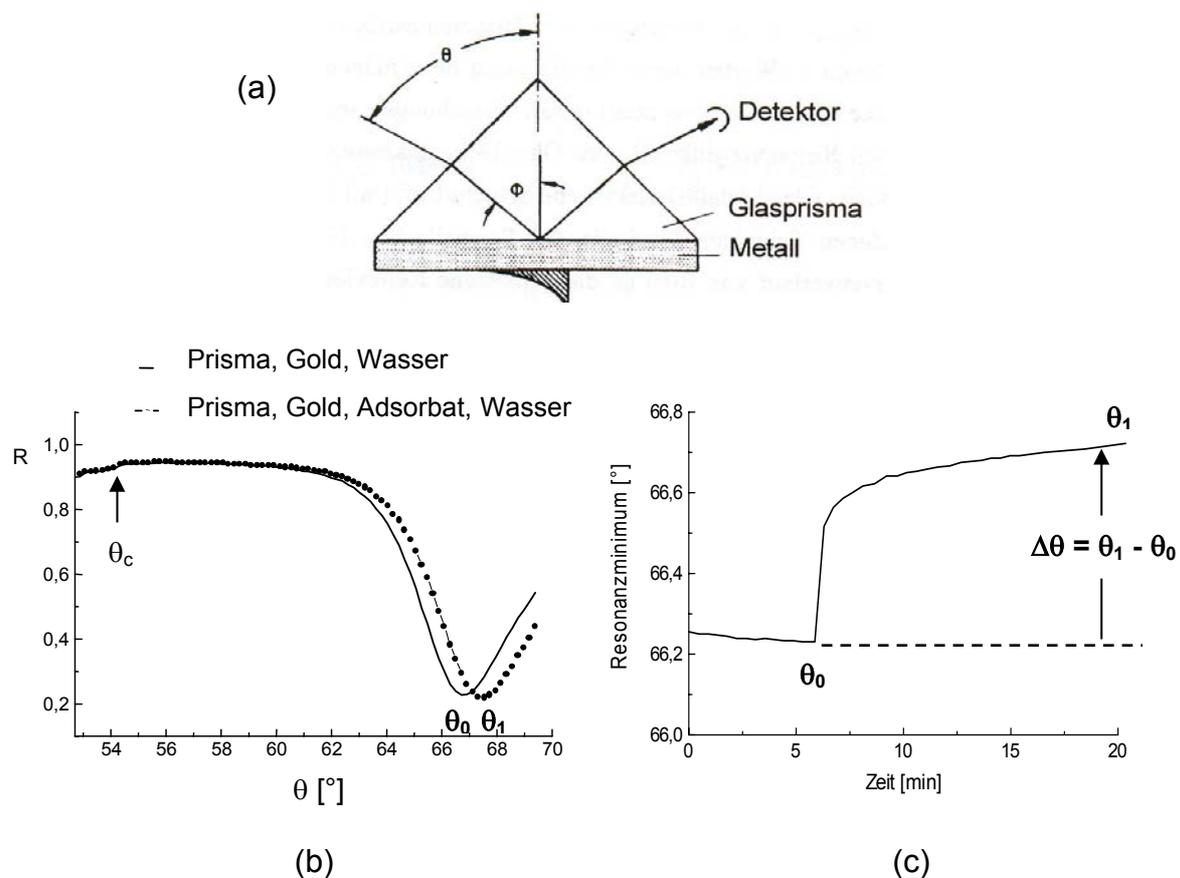


Abb. 5.5: (a) Kretschmann-Anordnung zur resonanten Anregung von Oberflächenplasmonen, (b) Reflektivitätskurven $R(\theta)$ für ein Schichtsystem bestehend aus Prisma, Goldschicht, adsorbierte Schicht und Wasser, (c) kinetische Messung

die Dispersionrelation des Oberflächenplasmons zu höheren k_x -Werten durch Verdrängung des Dielektrikums 2, in diesem Fall Wasser. Eine zunehmende Dicke d_{Schicht} bzw. ein zunehmender Brechungsindex n_{Schicht} dieser Deckschicht erhöht den Resonanzwinkel des Oberflächenplasmons auf θ_1 (siehe Abb. 5.5 (b), Kurve). Die Resonanzwinkeldifferenz $\Delta\theta$ ist proportional zur optischen Dicke dieser zusätzlichen Schicht:

$$\Delta\theta = \theta_1 - \theta_0 \approx \Delta n \cdot d_{\text{Schicht}}, \text{ mit } \Delta n = n_{\text{Schicht}} - n_{\text{LM}} \quad (5-5)$$

θ_c (siehe Abb. 5.5 (b)) ist der kritische Winkel der Totalreflexion und wird nur durch die Brechungsindizes von Prisma und Lösungsmittel (LM) bestimmt ($\sin\phi_c = n_{\text{LM}} / n_{\text{P}}$). Werden die Resonanzminima in Abbildung 5.5 (b) zeitabhängig gemessen, so erhält man den kinetischen Verlauf der Adsorption (Abbildung 5.5 (c)). Bei genauer

Kenntnis der Brechungsindizes von Prisma, Gold, Adsorbat und Lösungsmittel kann aus der Verschiebung des Resonanzminimums die Schichtdicke des Adsorbats bestimmt werden [204, 210].

In der vorliegenden Arbeit wurden die SPR-Messungen zur *in situ*-Kontrolle des Schichtaufbaus der Thiocellulosederivate als auch zur Bestimmung deren Schichtdicke, mit einem Bio-Suplar II Gerät der Firma Mivitec GmbH (Regensburg) durchgeführt. Der Aufbau des SPR-Gerätes ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

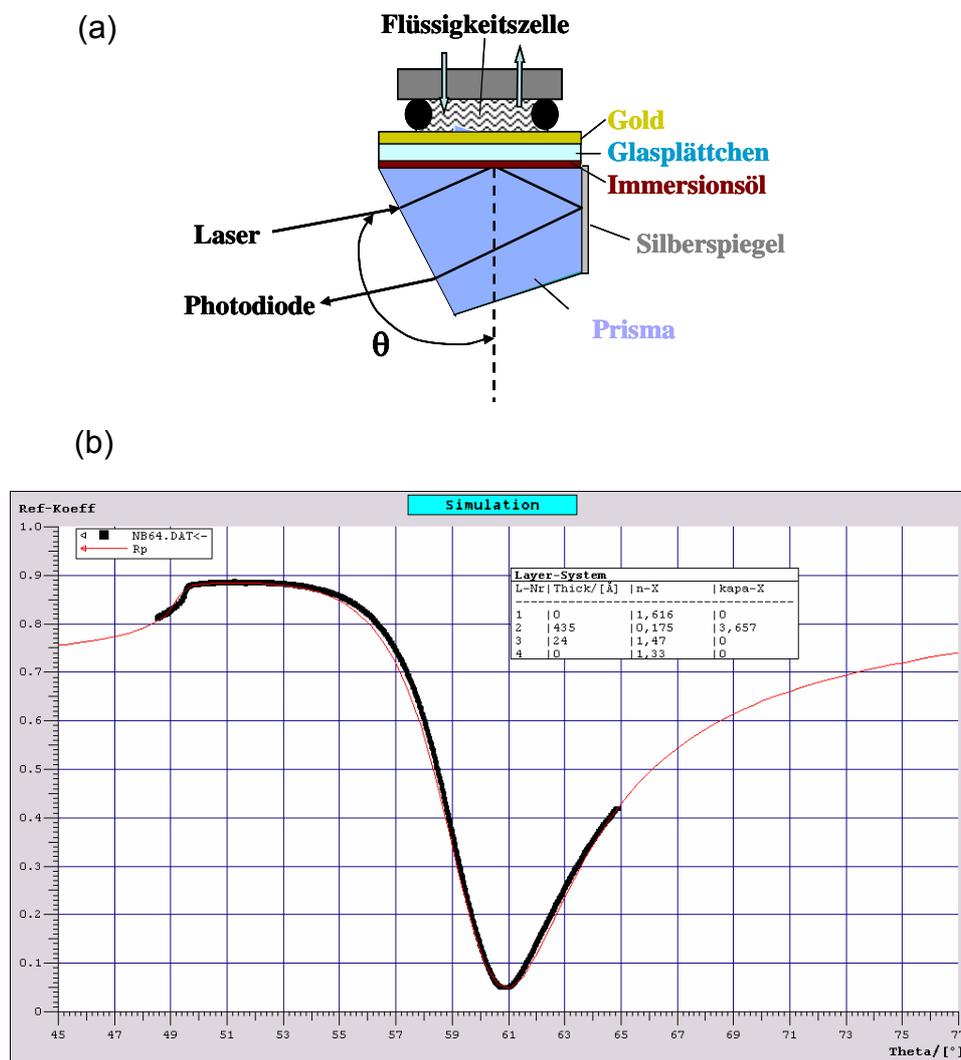


Abb. 5.6: (a) Aufbau und Strahlengang des SPR-Spektrometers Bio-Suplar II;
 (b) Angleichen der gemessenen Reflektivitätskurve (—) an die theoretische Simulationskurve (—) zur Bestimmung der Schichtdicke eines Adsorbats.

Zur Anregung der Oberflächenplasmonen wurde ein GaAs LED Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 670$ nm eingesetzt. Auf einem frei rotierenden Prisma wird mittels eines Immersionsöls ein Glasplättchen, welches mit 40 ± 5 nm Gold bedampft ist, aufgebracht. Prisma und Immersionsöl besitzen in etwa den gleichen Brechungsindex von $n = 1.61$; die benutzten Glasplättchen (aus Glasobjektträgern für die Mikroskopie) haben einen Brechungsindex von $n = 1.51$ (angegeben bei $\lambda = 546$ nm). Auf die Goldoberfläche ist eine Flüssigkeitszelle mit einem Volumen von etwa $20 \mu\text{l}$ befestigt.

Der Laserstrahl trifft mit dem Winkel θ auf das Prisma. Dort wird der Strahl gebrochen und an der Prismenoberfläche reflektiert, gelangt auf einen Silberspiegel und wird dort vollständig zurück reflektiert. Die Intensität des reflektierten Lichtes wird dann an einer Photodiode detektiert (siehe Abb. 5.6 (a)).

Die Auswertung der gemessenen Reflektivitätskurven erfolgte mit dem Auswerteprogramm *Winspall 2.20* (MPI-Polymerforschung, Mainz). Als Erstes werden in das Auswerteprogramm die Wellenlänge des verwendeten Lasers, der Prismenwinkel und der Brechungsindex der jeweils gemessenen Schicht eingegeben. Die gemessene Reflektivitätskurve wurde für die Auswertung auf den äußeren Winkel der Totalreflexion von $\theta_c = 50.2^\circ$ (bei einem Prismenwinkel von $2 \times 25^\circ$) kalibriert (Programm: *Origin*) und in das Auswerteprogramm eingelesen^[102].

Um die gewünschte Schichtdickenänderung zu erhalten wird die gemessene Reflektivitätskurve an eine theoretische Simulationskurve angepasst. Die theoretische Reflektivitätskurve wird vom Auswerteprogramm für das Schichtsystem Prisma / Metall / Lösungsmittel simuliert. Die gemessene Kurve für dasselbe Schichtsystem wird dann durch Variation der Parameter für Gold (Brechungsindex und Schichtdicke) mit der simulierten Kurve in Übereinstimmung gebracht. Nach der Adsorption z.B. einer Polymerschicht auf die Goldoberfläche wird die gemessene Reflektivitätskurve an die berechnete Reflektivitätskurve durch Veränderung der Schichtdicke bei bekanntem Brechungsindex im Auswerteprogramm zur Deckung gebracht (siehe Abb. 5.6 (b)).

In Tabelle 5.3 ist das Schichtsystem für die Bestimmung der Schichtdicke einer Bisthiosulfatcellulose auf Gold als Beispiel dargestellt.

Tabelle 5.3: Schichtsystem für die Ermittlung der Schichtdicke einer adsorbierten Bisthiosulfatcellulose auf Gold (Auswerteprogramm: *Winspall 2.20*).

Nr.	Material	Schichtdicke	Brechungsindex n	
			Realteil	Imaginärteil
1	Glas	0	1.616	0
2	Gold	435	0.175	3.657
3	Bisthiocellulose	24	1.47	0
4	Lösungsmittel	0	1.33	0

5.1.4 Berechnung des Brechungsindex und Brechungsindexinkrementes von HTSHP-CMC Na 8

Die akkurate Bestimmung der Schichtdicken der adsorbierten Thiocellulosederivate auf Gold benötigt eine genaue Kenntnis deren Brechungsindizes (n). Um aus den Schichtdicken die Oberflächenbelegung mit Cellulose berechnen zu können ist es notwendig das Brechungsindexinkrement (dn/dc) der Derivate zu ermitteln ^[211].

Im Folgenden wird die Bestimmung des Brechungsindex` und Brechungsindexinkrementes der Thio-CMC HTSHP-CMC **8** beschrieben.

Die Bestimmung des Brechungsindex (n) von Verbindung **8** erfolgte aus der erstellten Kalibriergerade $n_{\text{HTSHP-CMC}}(w_{\text{HTSHP-CMC}})$, wobei $n_{\text{HTSHP-CMC}}$ = Brechungsindexäquivalente der HTSHP-CMC Lösungen und w = Massenbruch der HTSHP-CMC Lösungen. Die Brechungsindexäquivalente n_{HTSHP} wurden aus den Kalibriergeraden $n(\text{RI})$ für KCl und Rohrzucker berechnet.

Die Aufnahme der $n(\text{RI})$ Kalibriergeraden für KCl- bzw. Rohrzucker erfolgte mittels Laser-Refraktometrie ($\lambda = 670 \text{ nm}$). Dazu wurden KCl- bzw. Rohrzucker Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0-10 mg/ml und bekannten Brechungsindizes eingespritzt, und die entsprechenden RI-Werte aufgenommen ^[212]. Die Kalibriergeraden $n(\text{RI})$ für die KCl- und Rohrzucker Lösungen sind in Abbildung 5.7 (a) dargestellt.

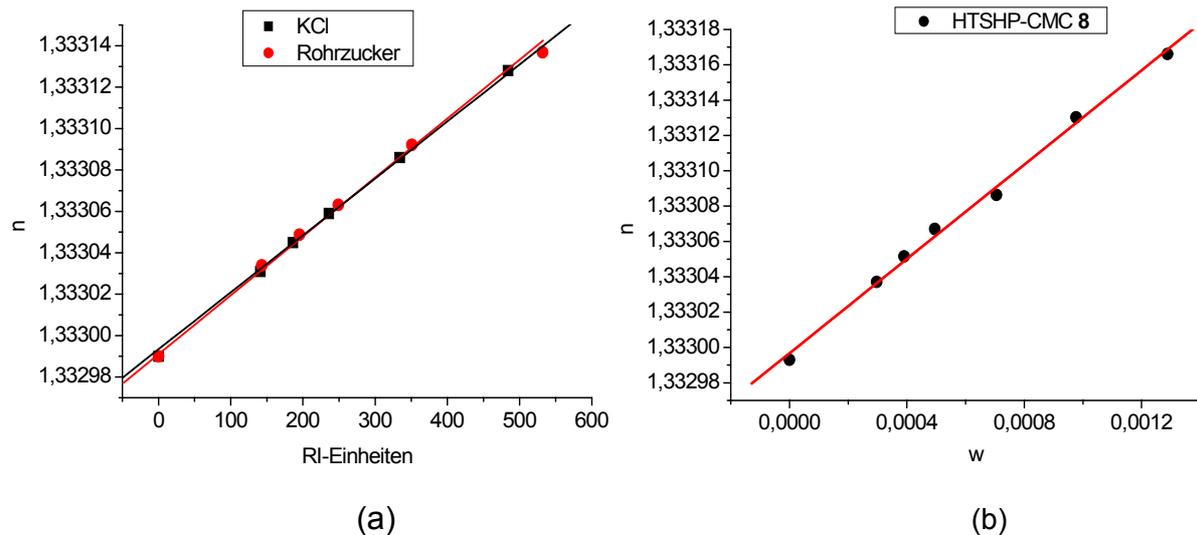


Abb. 5.7: (a) Kalibriergeraden $n(\text{RI})$ für KCl- bzw. Rohrzuckerlösungen zur Ermittlung der $n_{\text{HTSHP-CMC-Äquivalente}}$; (b) $n_{\text{HTSHP-CMC(Rohrzucker)}}(w_{\text{HTSHP-CMC}})$ Abhängigkeit zur Bestimmung des Brechungsindex von Thiocellulose **8**.

Die Geraden-Gleichungen die sich aus der Darstellung $n(\text{RI})$ durch lineare Regression ergeben (siehe Abb. 5.7 (a)), sind:

$$\text{für Rohrzucker: } n = 1.332993 + 2.752 \cdot 10^{-7} \cdot \text{RI} \quad (5-6)$$

und

$$\text{für KCl: } n = 1.332991 + 2.846 \cdot 10^{-7} \cdot \text{RI} \quad (5-7)$$

Anschließend wurden die RI-Werte wässriger HTSHP-CMC ($\text{DS}_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$) Lösungen mit Konzentrationen von 0-1.2 mg/ml mittels Laser-Refraktometer aufgenommen. Setzt man nun diese experimentell bestimmten RI-Werte in den Gleichungen (5-6) und (5-7) ein, so erhält man die äquivalenten Brechungsindizes für die gemessenen HTSHP-CMC-Lösungen ($n_{\text{HTSHP-CMC(Rohrzucker)}}$ und $n_{\text{HTSHP-CMC(KCl)}}$). Trägt man diese Werte in Abhängigkeit des Massenbruchs der eingesetzten Lösung auf, so erhält man aus der Geraden-Gleichung bei $w = 1$ den Brechungsindex der Thiocellulose **8** (siehe Abb. 5.7 (b)):

$$\text{für HTSHP-CMC } \mathbf{8}: \quad n_{\text{HTSHP-CMC}} = 1.332997 + 0.133411 \cdot w \quad (5-8)$$

$$\Rightarrow \text{bei } w = 1 \Rightarrow n_{\text{HTSHP-CMC}} = 1.47 \pm 0.005$$

Die Bestimmung des Brechungsindexinkrementes der Thiocellulose **8** erfolgte aus der Steigung der Geraden $n_{\text{HTSHP-CMC}}(c_{\text{HTSHP-CMC}})$, wobei c = Konzentration der HTSHP-CMC Lösungen darstellt (siehe Abb. 5.6).

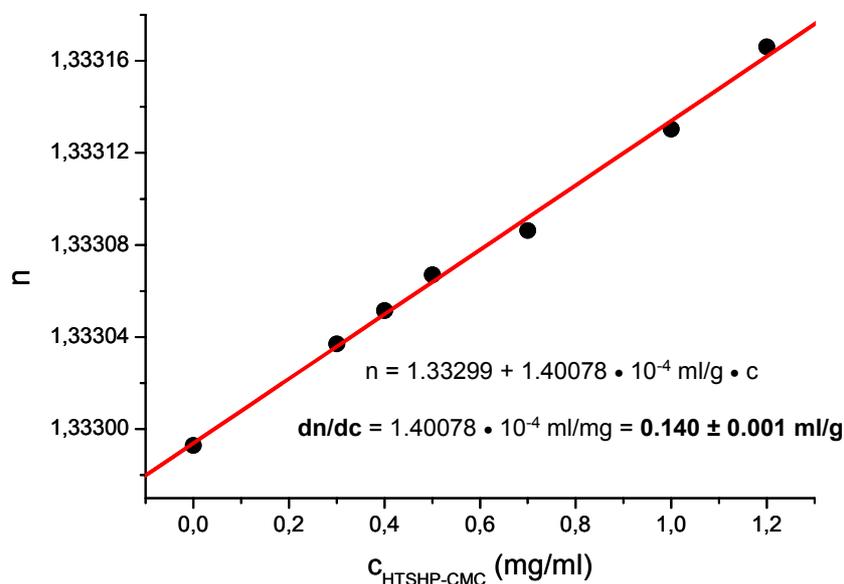


Abb. 5.8: Bestimmung des Brechungsindexinkrementes von Verbindung **8** aus der Steigung der Geraden $n_{\text{HTSHP-CMC}}(c_{\text{HTSHP-CMC}})$.

Man erhält für die Thiosulfatcellulose **8** einen Wert für das Brechungsindexinkrement von $dn/dc = 0.140 \text{ ml/g}$.

Für die Bestimmung der Schichtdicken und Oberflächenbelegungen der Thiocellulosederivate werden im folgenden Kapitel die oben ermittelten Werte n und dn/dc für alle Derivate benutzt.

5.1.5 Bestimmung der Schichtdicken und Oberflächenbelegung der Thio-CMC-Derivate **3**, **6a**, **6b** und **8** mittels SPR-Spektroskopie

Der Aufbau von Monoschichten mit den thiofunktionalisierten Cellulosen **3**, **6a**, **6b** und **8** erfolgte durch Chemisorption aus den wässrigen Lösungen der entsprechenden Thiocellulosen.

Bei der 6-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose **3** (MTh-CMC; $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$) adsorbiert die Methylthiogruppe über eine koordinative Bindung an die Goldoberfläche. Die Kinetik der MTh-CMC SAM-Bildung auf Gold ist in Abbildung 5.9 dargestellt.

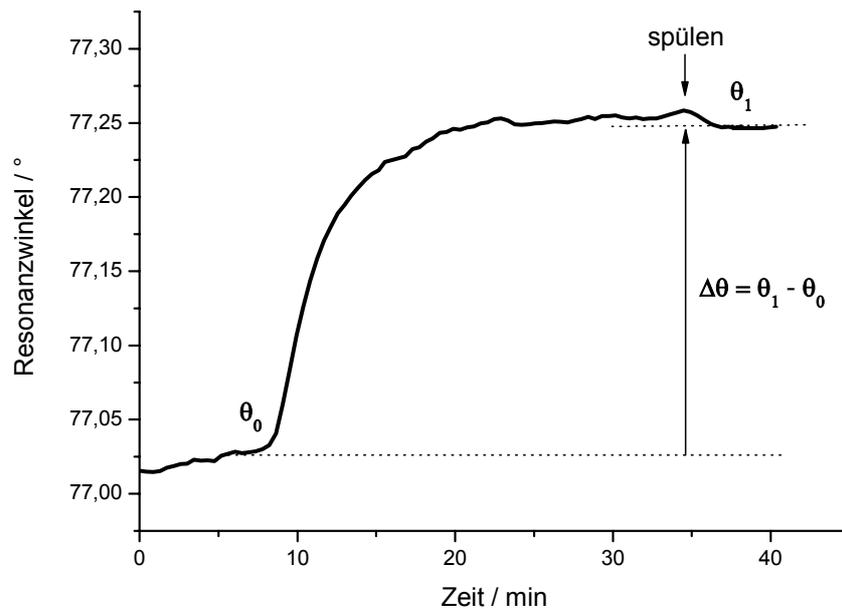


Abb. 5.9: SPR-Kinetik der SAM-Bildung von **3** auf Gold aus einer 0.3%-igen Lösung von **3** in Wasser (Flussrate: 11 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Dazu wurde eine 0.3%-ige Lösung von MTh-CMC **3** in Wasser mit einem Fluss von 11 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf der Goldoberfläche transportiert. Der eingestellte Fluss führt zu einer Einwirkungszeit der MTh-CMC **3** auf Gold von etwa 30 Minuten. Anschließend tritt die Spülphase mit Wasser ein. Die über Physisorption haftenden überschüssigen Cellulosemoleküle werden somit entfernt (siehe Spülschritt in Abb. 5.9). Nach dem spülen fällt die Kurve kurzzeitig etwas ab, bis sie bei einem konstanten Wert bleibt (θ_1). Aus der Kinetik in Abbildung 5.9 kann man erkennen dass dieser physisorptive Anteil sehr gering ist, was auf eine optimierte Durchführung der MTh-CMC SAM Ausbildung zurückzuführen ist.

Man erhält für die Methylthio-CMC **3** Schichtdicken von $d = 1\text{-}3\text{ nm}$, abhängig von der eingesetzten Konzentration. Unter der Annahme, dass die Glucoseringe der Cellulose mit der Ringebene parallel zur Substratoberfläche angeordnet sind, sollte man für eine Monoschicht aus gestreckt adsorbierten Celluloseketten eine Schichtdicke von etwa $d = 0.6\text{ nm}$ erwarten. Im Gegensatz dazu sollte bei einer Anordnung der Ringebene der Glucoseringe senkrecht zur Goldoberfläche die Dicke einer Monoschicht etwa 1 nm betragen ^[75]. Die größer als erwarteten Schichtdicken können durch Schlingen und Verschlaufungen der Celluloseketten an der Oberfläche verursacht werden ^[19].

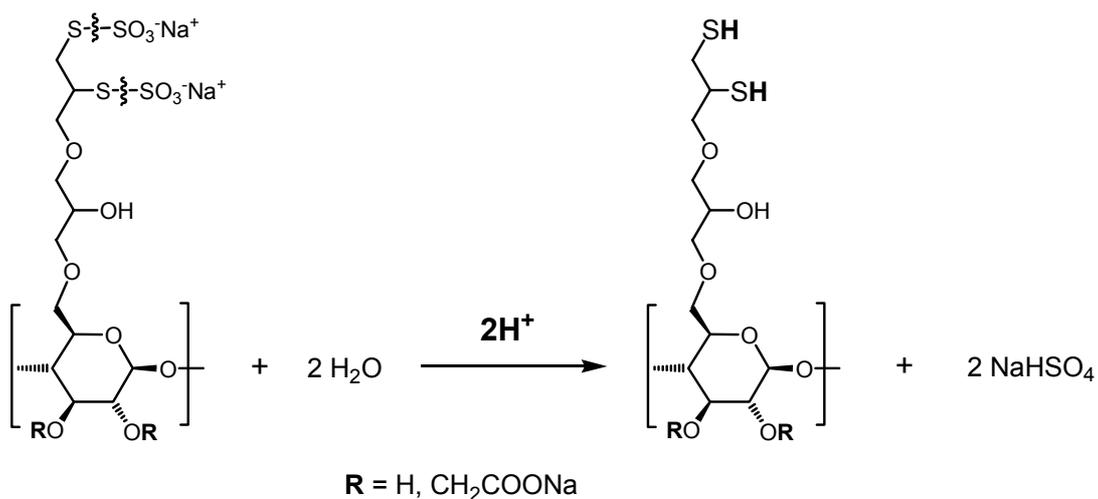
Liebold zeigte bereits eine Erhöhung der Schichtdicke mit der Konzentration an **3** ^[102]. Sie erklärte diese Zunahme durch eine stärkere Verknäulung der

Celluloseketten auf der Goldoberfläche und durch eine höhere Belegung der Oberfläche mit MTh-CMC. Aufgrund der koordinativen Bindung zwischen den Methylthiogruppen und der Goldoberfläche, können sich die Ankergruppen von Derivat **3** frei auf der Metalloberfläche bewegen. Erhöht man nun die Konzentration an MTh-CMC so findet aufgrund der reversiblen Koordination zwischen den Methylthiogruppen und Gold eine Neuausrichtung der Celluloseketten an der Oberfläche statt, was zu einer Erhöhung der Belegungsdichte mit MTh-CMC **3** führt. Eine Erhöhung der Belegungsdichte mit steigender Konzentration wurde auch von Reinhoudt *et al.* bei Cyclodextrinsulfiden beobachtet ^[93].

Verbindungen mit Thiosulfatgruppen sind in der organischen Chemie oft Ausgangsstoffe um Thiole herzustellen. Die Umwandlung der Thiosulfatgruppe zum Thiol kann sowohl durch saure Hydrolyse ^[213] oder durch Spaltung der S-S-Bindung der Thiosulfat-Gruppen mit Boranen ^[214], Phosphinen ^[215] oder H^+/Zn erfolgen.

Die Chemisorption der Bisthiosulfatcellulosen TSHP-CMC **6a** und **6b** auf Gold kann sowohl durch Aktivierung der Thiosulfatgruppen durch saure Hydrolyse, als auch direkt aus der wässrigen Lösung der TSHP-CMC, erfolgen.

Die Spaltung der S-S-Bindungen der Thiosulfatgruppen der Bunte-Salze **6a** und **6b** zum Thiol wurde durch saure Hydrolyse mit Hilfe von Salzsäure, Schwefelsäure und Zitronensäure durchgeführt (siehe Schema 5.2).



Schema 5.2: Säurehydrolytische Aktivierung der Thiosulfatgruppen von Bunte-Salz **6a** und **6b** zum Thiol.

Polymere mit Thiolgruppen können unter Lichteinfluss sehr leicht vernetzen und werden dadurch in Wasser unlöslich. Isoliert man die Bisthiolcellulose (siehe Schema 5.2) nach der Umsetzung, durch Ultrafiltration und anschließender Gefrierdrying, so löst sich diese in keinem Lösungsmittel mehr. Daher müssen die Bisthiosulfat-CMCs **6a** und **6b** bei der Beschichtung nach dieser Aktivierungsmethode *in situ* zum Bisthiol umgewandelt werden.

Zur Abscheidung auf Gold, wurden 0.1%-ige Lösungen der Bunte-Salze **6a** und **6b** in 0.2 M Zitronensäure hergestellt. Die Lösungen wurden zur Vervollständigung der Aktivierung der Thiosulfatgruppen, eine Stunde bei RT gerührt. Die SPR-Kinetiken, (Abb. 5.10 (a) und (b)) aufgenommen bei einem Fluss von 34 $\mu\text{l}/\text{min}$, zeigen eine schnelle Ausbildung der TSHP-CMC Monoschichten auf Gold im Gegensatz zur MTh-CMC **3** (siehe Abb. 5.9). Nach etwa 10 Minuten sind die stabilen Monoschichten völlig ausgebildet. Weitere Injektionen der Bisthiosulfat-CMCs **6a** und **6b** führten zu keinen zusätzlichen Schichtzuwachsen in den SPR-Kinetiken.

In Abbildung 5.10 sind die SPR-Kinetiken der Bisthiosulfat-CMCs **6a** ($DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$) und **6b** ($DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.17$) im Vergleich dargestellt. Dabei kann man beobachten dass der Schichtzuwachs ($\Delta\theta$) bei der TSHP-CMC **6a** ($DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$) größer ist als der von **6b** ($DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.17$).

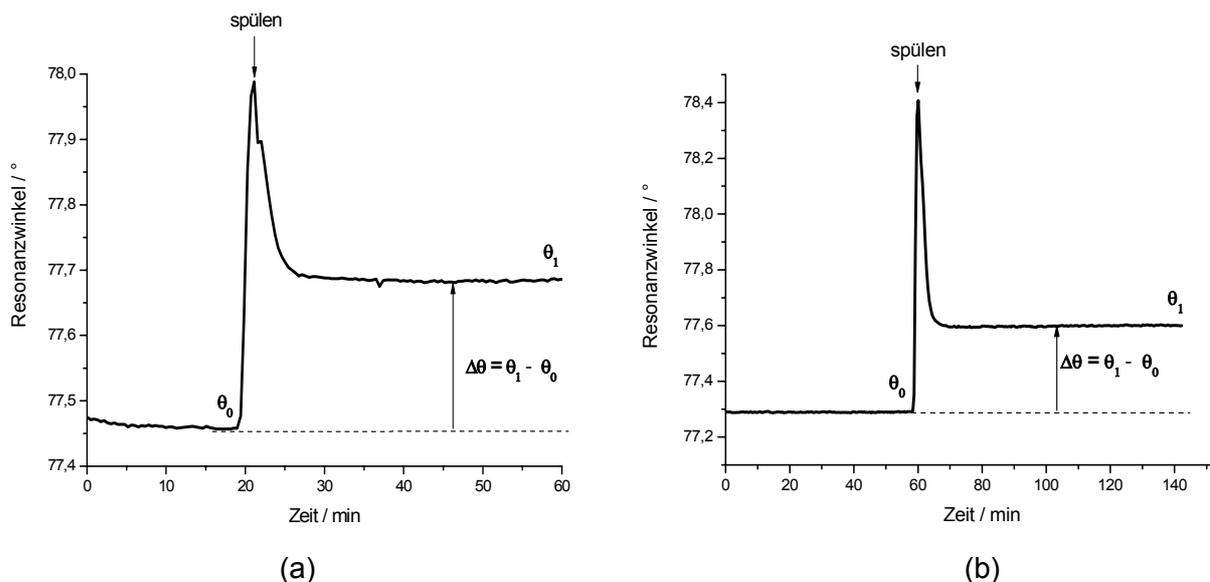
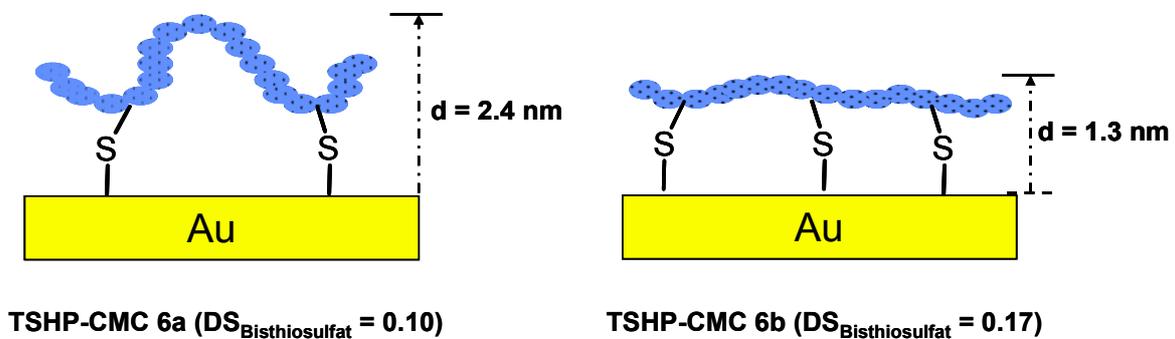


Abb. 5.10: SPR-Kinetik der SAM-Bildung von TSHP-CMC auf Gold aus einer 0.1%-igen Lösung von **6** in 0.2 M Zitronensäure: (a) Kinetik von **6a** ($DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$), (b) Kinetik von **6b** ($DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.17$) (Flussrate: 34 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Bei einem höheren Substitutionsgrad an Bisthiosulfatgruppen würde man erwarten dass mehrere Cellulosemoleküle immobilisiert werden können und durch das bekannte Schlingen und Verschlaufen dieser Ketten ein höherer Schichtzuwachs erzeugt wird. Die SPR-Kinetiken zeigen jedoch dass das nicht der Fall ist. Man erhält für das Bunte-Salz **6a** eine Schichtdicke von $d = 2.4$ nm; für **6b** hingegen $d = 1.3$ nm. Die niedrigere Schichtdicke von **6b** kann darauf beruhen dass bei einem höheren $DS_{\text{Bisthiosulfat}}$ mehrere Anknüpfungsstellen der Bisthiocellulose an der Goldoberfläche vorhanden sind. Dies könnte nach Bindung an der Goldoberfläche zu gestreckteren Konformationen der Monoschichten führen können als im Falle von **6a** ^[38] (siehe Schema 5.3).



Schema 5.3: Schematische Darstellung des Schichtdickenzuwachses mit zunehmendem Substitutionsgrad an Thiosulfat.

Die Abscheidung der TSHP-CMC **6** direkt aus deren wässriger Lösung wurde vor allem bei Substitutionsgraden von $DS_{\text{Bisthiosulfat}} \geq 0.10$ beobachtet. Dazu wurde eine 0.3%-ige Lösung in Wasser bei einer Flussrate von $14 \mu\text{l}/\text{min}$ auf die Goldoberfläche transportiert. In Abbildung 5.11 (a) ist die Kinetik der Adsorption von **6a** dargestellt. Im Vergleich zur Abscheidung aus saurer Lösung (Abb. 5.10 (a)) verläuft hier die Adsorptionskinetik langsamer: erst nach etwa 20 Minuten bildet sich eine stabile Schicht auf Gold aus.

Der Grund für die langsamere Abscheidung von **6a** aus wässriger Lösung auf Gold liegt wahrscheinlich im Mechanismus der Adsorption. Die Ausbildung der Thiol-Funktionalitäten die notwendig sind um mit der Goldoberfläche stabile S-Au Bindungen einzugehen, bedarf hier einer gewissen Zeit (siehe dazu Schema 5.1 (a) und (b)). Dabei muss auch gewährleistet sein dass sich genügend Cellulosemoleküle in der unmittelbaren Nähe der Goldoberfläche befinden um eine optimale Anbindung an die Goldoberfläche zu erlangen.

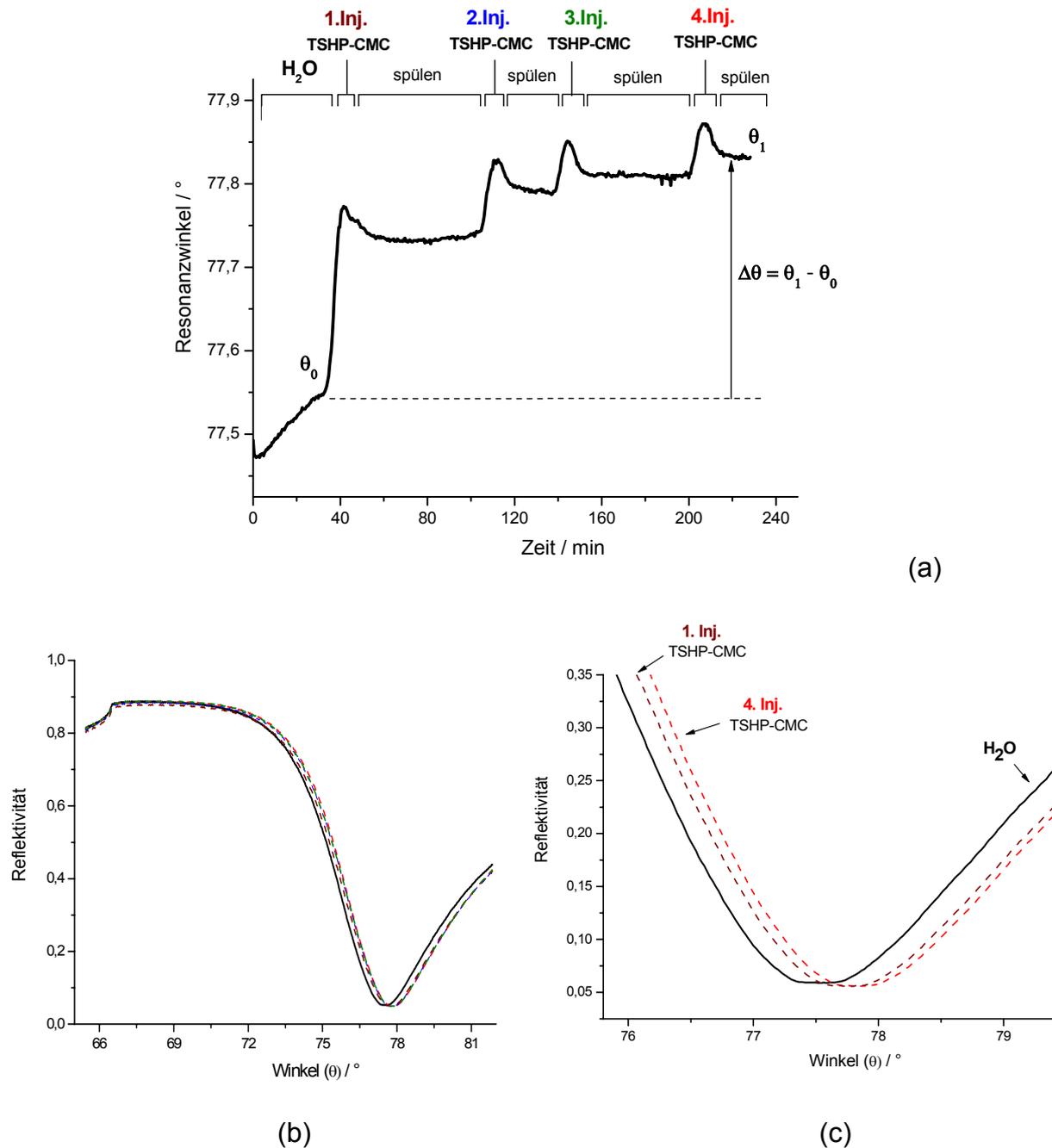


Abb. 5.11: (a) Adsorptionskinetik von TSHP-CMC **6a** auf Gold (Flussrate: 14 $\mu\text{l}/\text{min}$);
 (b) Typische Reflektivitätskurven $R(\theta)$: Reflektivität (R) in Abhängigkeit des Resonanzwinkels (θ):
 $R(\theta)$ von H₂O: —
 $R(\theta)$ von TSHP-CMC **6a**: — Injektion 1; — Injektion 2;
 — Injektion 3; — Injektion 4;
 (c) Vergrößerte Darstellung der $R(\theta)$ -Kurven von H₂O und TSHP-CMC **6a** (1. und 4. Injektion) im Bereich des Resonanzminimums.

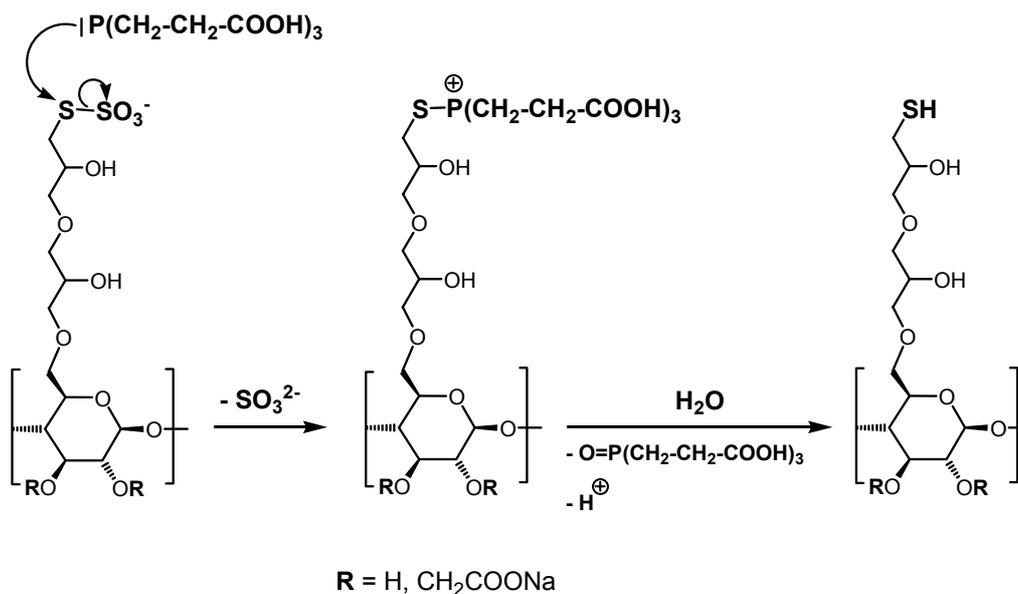
Dies wird erreicht indem man eine relativ hohe Konzentration an Bisthiosulfat-CMC **6a**, und eine niedrige Flussrate wählt: eine 0.3%-ige Lösung, Fluss = 14 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei

der Abscheidung von **6a** aus wässriger Lösung im Vergleich zu einer 0.1%-ige Lösung, Fluss = 34 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei der Adsorption von **6a** aus saurer wässrigen Lösung.

Um die maximale Belegung der Goldoberfläche mit TSHP-CMC **6a** zu untersuchen wurden in gewissen Zeitabständen gleiche Volumina an TSHP-CMC Lösung injiziert (siehe Abb. 5.11 (a)). Aus der Kinetik der Adsorption (Abb. 5.11 (a)) und den Reflektivitätskurven der jeweiligen Injektion (Abb. 5.11 (b)) kann man erkennen dass bei der ersten Injektion der größte Schichtzuwachs ($\Delta\theta$) erreicht wurde. Die nachfolgenden Injektionen erzeugen zwar weitere Schichtzuwächse auf der Goldoberfläche jedoch sind diese geringer. So beträgt der mittlere Schichtzuwachs zwischen erster und letzter Injektion nur $\Delta\theta = 0.06^\circ$ (siehe Abb. 5.11 (c)) was einer Schichtdicke von $d = 0.3 \text{ nm}$ entspricht.

Man erhält für die TSHP-CMC **6a** nach Abscheidung auf der Goldoberfläche Schichtdicken von $d = 2.1 \pm 0.3 \text{ nm}$.

Der Aufbau von HTSHP-CMC Monoschichten auf Gold erfolgte nach Aktivierung der Thiosulfatgruppe in wässriger Lösung. Vorversuche mit dem wasserlöslichen Bunte-Salz **8** zeigten, dass die Anbindung an die Goldoberfläche ohne vorherige Aktivierung der Thiosulfatgruppe, im Gegensatz zur TSHP-CMC **6**, nicht möglich war. Zum einen erfolgte die Aktivierung der Thiosulfatgruppe von **8** mit Säure (HCl, H_2SO_4 oder Zitronensäure), in gleicher Weise wie bei der Aktivierung der Bisthiosulfatgruppen von TSHP-CMC **6** (siehe Schema 5.2). Zum anderen wurde die Spaltung der S-S-Bindung der Thiosulfatgruppe von Bunte-Salz **8** mit Hilfe des wasserlöslichen Tris(carboxyethyl)phosphin (TCEP) durchgeführt ^[215]. Dieses Reagenz wurde bisher vor allem für die Spaltung der S-S-Bindungen von Disulfiden zum Thiol verwendet. Der Mechanismus der Reduktion ist in Schema 5.4 dargestellt. Mit diesem wasserlöslichen Reduktionsmittel konnte ebenfalls die Thiosulfatgruppe ins Thiol überführt werden ^[102]. Der Vorteil bei der Verwendung des TCEPs liegt darin, dass die Reaktion bei einem pH-Bereich von 5-8 durchgeführt werden kann. Dadurch könnte es gerade bei der Abscheidung von reaktiven HTSHP-CMCs auf Gold oder Silber, aufgrund der Säure/Base-Empfindlichkeit einiger reaktiver Gruppen, ein Mittel der Wahl sein.



Schema 5.4: Mechanismus der Reduktion von Bunte-Salz **8** mit Tris(carboxyethyl)phosphin (TCEP) in Wasser.

Zur Aktivierung der Thiosulfatgruppe der HTSHP-CMC **8** ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$) wurde eine 0.1%-ige Lösung von **8** in 0.2 M Zitronensäure hergestellt und 1 h bei RT gerührt (zur Vervollständigung der Aktivierung). Anschließend erfolgte die Aufnahme der Adsorptionskinetik von **8** auf Gold, bei einem Fluss von $34 \mu\text{l}/\text{min}$, mittels SPR-Spektrometer (siehe Abb. 5.12 (a)). In Abbildung 5.12 (b) ist die typische Reflektivitätskurve $R(\theta)$ nach Abscheidung von Derivat **8** zu sehen. Durch Überlagerung dieser experimentellen Kurve (-----) mit der theoretisch ermittelten Kurve (—) kann man im Auswerteprogramm die Schichtdicke von **8** auf Gold bestimmen.

Man erhält für die HTSHP-CMC **8** Schichtdicken von $d = 2.0 \pm 0.4 \text{ nm}$, unabhängig von der Konzentration der eingesetzten Bunte-Salz Lösungen. Das gleiche Verhalten wurde auch im Fall der Beschichtung mittels TSHP-CMC **6** beobachtet.

Die Adsorptionskinetiken unterscheiden sich lediglich bei niedrigen Konzentrationen ($c < 0.1 \text{ mg}/\text{ml}$) von den Kinetiken der höheren Konzentrationen. Bei der Beschichtung unter dynamischen Bedingungen (bei konstantem Fluss), wirkt sich das bei den niedrigen Konzentrationen durch einen niedrigeren Schichtzuwachs in der Adsorptionskinetik aus. Aufgrund der geringeren Teilchendichte in der Lösung der niedriger konzentrierten Proben, brauchen die Cellulosemoleküle länger bis sie an die Metalloberfläche gelangen und dort adsorbiert werden können. Unter

dynamischen Bedingungen wird dementsprechend der größte Teil der Moleküle ausgespült bevor sie an der Goldoberfläche binden können.

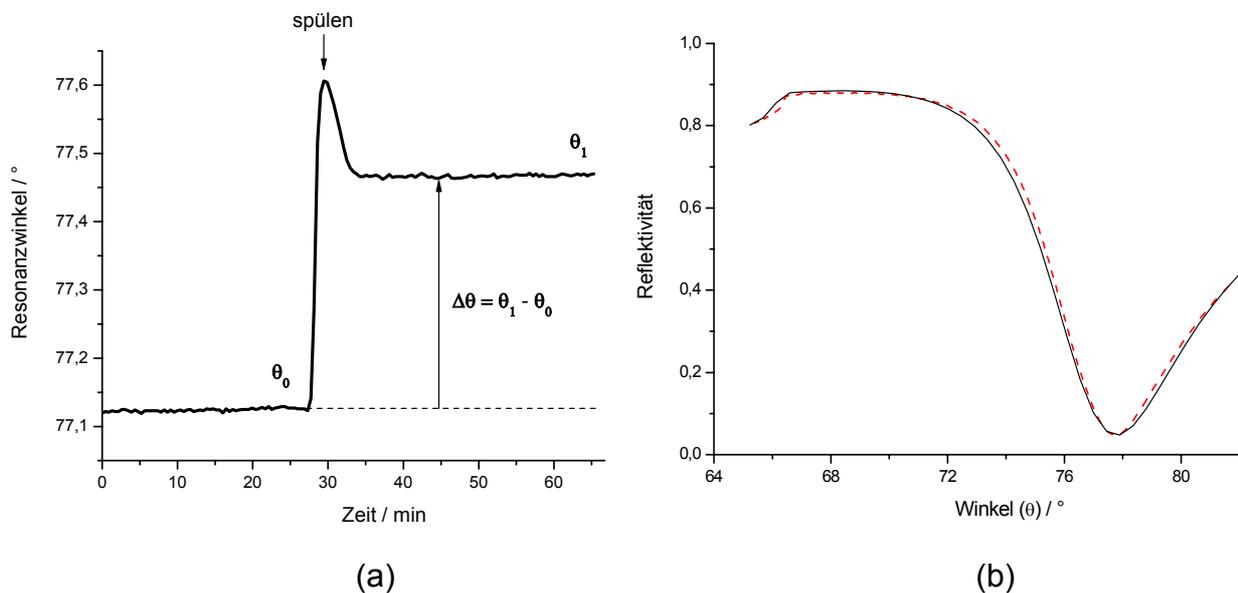


Abb. 5.12: (a) Adsorptionskinetik von Bunte-Salz **8** auf Gold (Flussrate: 34 $\mu\text{l}/\text{min}$);

(b) Typische SPR-Kurve; experimentelle Kurve von **8** (-----) angepasst an die theoretisch erzeugte Kurve (—) zur Bestimmung der Schichtdicke von **8**.

Liebold beobachtete ein ähnliches Verhalten unter statischen Bedingungen. Sie erhielt für Konzentrationen ab $c = 0.01 \text{ mg/ml}$ einen wesentlich langsameren Anstieg in den Kinetikkurven im Vergleich zu den höher konzentrierten Proben, als auch einen niedrigeren Schichtzuwachs^[102].

Aus den Schichtdicken der adsorbierten Thiocellulosen **3**, **6a**, **6b** und **8** auf Gold und dem in Kapitel 5.1.4 bestimmten Brechungsindexinkrement, können nun die entsprechenden Oberflächenbelegungen (-konzentrationen), nach folgender Formel^[211] berechnet werden:

$$\Gamma = \frac{dc}{dn} \cdot \Delta n \cdot d \quad (5-9)$$

wobei Γ die Oberflächenbelegung (-konzentration) [mg/m^2 oder ng/mm^2], dn/dc das Brechungsindexinkrement [ml/mg , oder ml/g] und $\Delta n \cdot d$ die optische Dichte [nm] kennzeichnet. Δn aus der optischen Dichte ist die Differenz zwischen dem

Brechungsindex der Thio-CMC ($n_{\text{Thio-CMC}}$) und dem Lösungsmittel (n_{Wasser}), d ist die Schichtdicke der Thiocellulose SAM auf Gold.

Die Umrechnung der Schichtdicke in die entsprechende Oberflächenbelegung soll hier am Beispiel der HTSHP-CMC **8** näher erläutert werden:

$$d_{\text{HTSHP-CMC}} = 2.4 \text{ nm} = 2.4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$$

$$\frac{dn}{dc} = 1.40078 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{mg} \Rightarrow \frac{dc}{dn} = 7.138 \cdot 10^3 \text{ mg/cm}^3$$

$$\Delta n = n_{\text{HTSHP-CMC}} - n_{\text{water}} = 1.47 - 1.33 = 0.14$$

$$\Rightarrow \Gamma_{\text{HTSHP-CMC}} = \frac{dc}{dn} \cdot \Delta n \cdot d = 7.138 \times 10^3 \times 0.14 \times 2.4 \times 10^{-7} \text{ mg/cm}^2$$

$$\Rightarrow \Gamma_{\text{HTSHP-CMC}} = 2.39 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cm}^2 = 2.39 \cdot 10^{-4} \text{ mg}/10^{-4} \text{ m}^2 = \mathbf{2.39 \text{ mg/m}^2}$$

Tabelle 5.4 zeigt nochmals in Übersicht die bestimmten Schichtdicken und die daraus umgerechneten Oberflächenbelegungen für die Thio-CMC Derivate **3**, **6a**, **6b** und **8**.

Tabelle 5.4: Schichtdicken und Oberflächenbelegungen der Thio-CMC Derivate **3**, **6a**, **6b** und **8** (DS-Grad: Substitutionsgrad; $\Delta\theta$: Schichtzuwachs in mdeg (milli°); $d_{\text{Thio-CMC}}$: Schichtdicke der Thio-CMCs in nm; Γ : Oberflächenbelegung in mg/m^2)
* Adsorption aus 0.3%-iger wässriger Lösung; ** Adsorption aus wässriger Lösung.

Thio-CMC	Funktionalität	DS-Grad	$\Delta\theta$ [mdeg]	$d_{\text{Thio-CMC}}$ [nm]	Γ [mg/m^2]
3	Methylthio	0.55	220*	2.20 ± 0.10	2.19 ± 0.10
6a	Bisthiosulfat	0.10	310	2.40 ± 0.10	2.39 ± 0.10
			280**	2.10 ± 0.30	2.09 ± 0.30
6b	Bisthiosulfat	0.17	230	1.30 ± 0.40	1.29 ± 0.40
8	Thiosulfat	0.15	340	2.00 ± 0.40	1.99 ± 0.40

5.1.6 Bestimmung der Schichtdicken und Oberflächenbelegungen reaktiver Thio-CMC-Derivaten mittels SPR-Spektroskopie

Im Folgenden werden für eine Reihe ausgewählter reaktiver Thio-CMC-Derivate die Schichtdicken und die entsprechenden Oberflächenbelegungen nach Adsorption auf Gold bestimmt. Dabei sollte mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie untersucht werden ob sich die Schichtdicken und dementsprechend die Oberflächenbelegungen der reaktiven Thio-CMC-Derivaten von den Thio-CMCs unterscheiden, um damit Aufschluss über den Einfluss der reaktiven Gruppe auf die Adsorption zu erhalten.

Untersucht wurden die MCT-Thio-CMC-Derivate **10**, **14**, **17**, die NHS-Thio-CMC **16** und die Thio-CMC-EDC **18a**.

Die Abscheidung der 6-Methylthio-6-desoxy-O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl)-cellulose **10** (MCT-MTh-Cellulose) aus wässriger Lösung auf Gold zeigte die gleiche Konzentrationsabhängigkeit der Adsorption wie die entsprechende Thio-CMC **3**. Die Adsorptionskinetiken wurden bei einem Fluss von 11 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgenommen.

Man erhält für **10** eine Schichtdicke auf Gold von $d = 2.3 \pm 0.1$ nm nach Adsorption aus einer 0.26%-igen Lösung, bzw. $d = 1.2 \pm 0.2$ nm nach Adsorption aus einer 0.13%-igen Lösung (siehe Tabelle 5.5).

Der Aufbau von Monoschichten aus reaktiven TSHP-CMC-Derivaten auf Gold soll hier am Beispiel des MCT-Derivats **14** und des NHS-Esters **16** erläutert werden. Aufgrund der guten Säurestabilität der MCT-Gruppen von **14** und um eine schnelle Adsorption auf Gold zu erreichen, wurden die Thiosulfatgruppen von Verbindung **14** mittels 0.1 M Salzsäure aktiviert.

Man erhält für die reaktive MCT-Bisthiosulfatcellulose **14** eine Schichtdicke von $d = 1.9 \pm 0.1$ nm, die um 0.4 nm niedriger ist als die Schichtdicke der entsprechenden Bisthio-CMC **6a** (siehe Tabelle 5.5).

Aufgrund der Säure/Base-Labilität der reaktiven NHS-Gruppe wurde die Adsorption des Aktivesters **16** aus wässriger Lösung ohne zusätzliche Aktivierung der Thiosulfatgruppen durchgeführt. Nach ungefähr einer Stunde bildet sich eine stabile Schicht von **16** auf Gold mit einer Schichtdicke von $d = 1.6 \pm 0.3$ nm.

Die Abscheidung der reaktiven HTSHP-CMC Derivate **17** (MCT-HTSHP-CMC) und **18a** (HTSHP-CMC-EDC) erfolgte nach Aktivierung der Thiosulfatgruppen mit 0.2 M Zitronensäure (pH 2.0) bzw. Tris(carboxyethyl)phosphin (TCEP) in 0.4 M Acetat-Puffer (pH 6.9).

Tabelle 5.5: Schichtdicken und Oberflächenbelegungen der reaktiven Thio-CMC Derivate **10**, **14**, **16**, **17** und **19a** (DS-Grad: Substitutionsgrad; $\Delta\theta$: Schichtzuwachs in mdeg (milli°); $d_{\text{Thio-CMC}}$: Schichtdicke der Thio-CMCs in nm; Γ : Oberflächenbelegung in mg/m^2)
a: Adsorption aus 0.13%-iger wässriger Lösung
b: Adsorption aus 0.26%-iger wässriger Lösung
c: Aktivierung der Thiosulfat-Gruppen mit 0.2 M Zitronensäure (pH 2.0)
d: Aktivierung der Thiosulfat-Gruppen mit TCEP in 0.4 M Acetat-Puffer (pH 6.9).

Reaktive Thio-CMC	Funktionalität	DS-Grad	$\Delta\theta$ [mdeg]	d [nm]	Γ [mg/m^2]
10	Methylthio	0.55	150 ^a	1.20 ± 0.20	1.19 ± 0.20
	MCT	0.17	210 ^b	2.30 ± 0.10	2.29 ± 0.10
14	Bisthiosulfat	0.10	220	1.90 ± 0.10	1.89 ± 0.10
	MCT	0.16			
16	Bisthiosulfat	0.10	200	1.60 ± 0.30	1.59 ± 0.30
	NHS	0.28			
17	Thiosulfat	0.13	310 ^c	1.80 ± 0.20	1.79 ± 0.20
	MCT	0.30	240 ^d	1.40 ± 0.30	1.39 ± 0.30
18a	Thiosulfat	0.15	260	2.00 ± 0.30	1.90 ± 0.30
	EDC	0.23			

Man erhält für Verbindung **17** nach Abscheidung aus 0.2 M Zitronensäure auf Gold eine Schichtdicke von $d = 1.8 \pm 0.2$ nm bzw. $d = 1.40 \pm 0.2$ nm nach Aktivierung der entsprechenden Thiosulfatgruppen mit TCEP in 0.4 M Acetat-Puffer pH 6.9.

5.1.7 Untersuchung der Belegungsdichte von funktionellen Thio-CMC Derivaten auf Goldoberflächen durch Cyclovoltammetrie und Impedanzspektroskopie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Thio-CMC Derivate an der Goldoberfläche adsorbiert werden, sind nun Informationen über die Anordnung bzw. die Belegungsdichte, Beweglichkeit und die Defekte der adsorbierten Celluloseschichten von großem Interesse. Dazu eignen sich elektrochemische Methoden wie die *Cyclovoltammetrie* (CV) und *Impedanzspektroskopie* (EIS).

Mit Hilfe der Cyclovoltammetrie können erste Abschätzungen der Belegungsdichte getroffen werden ^[216-218], die Impedanzspektroskopie hingegen erlaubt aufgrund der Bestimmung der Widerstände dieser Schichten, quantitative Aussagen. In der Literatur sind cyclovoltammetrische Untersuchungen an verschiedenen Cyclodextrinschichten ^[95, 96, 195], Polymer-, Copolymerschichten ^[99], als auch Cellulosemonoschichten ^[102] zur Überprüfung der sterischen Barriere für Redoxreaktionen beschrieben.

Als Redoxpaare für CV- und EIS-Untersuchungen finden Kaliumhexacyanoferrat (III) $K_3[Fe(CN)_6]$ und Ferrocencarbonsäure FCAH häufig Verwendung ^[95, 96, 133, 219-221], aber auch Eisensulfat, Kupfersulfat ^[102], Rutheniumhexaminchlorid $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ ^[94] und *p*-Chinon sind untersucht worden ^[219, 220, 222].

Cyclovoltammetrie (CV)

Die Cyclovoltammetrie (CV) ist die elektrochemische Messmethode, die routinemäßig zur Charakterisierung von redoxaktiven Verbindungen herangezogen wird. Mit ihr lassen sich einfache thermodynamische Parameter wie das Redoxpotential oder auch kinetische Parameter wie Geschwindigkeitskonstanten für Elektronentransfer-Prozesse bestimmen. Auch Reaktionsmechanismen können untersucht werden.

Das CV-Experiment erfordert eine Drei-Elektrodenanordnung: die Arbeits- (AE, dort findet die Reaktion statt), die Referenz- (RE, nicht polarisierbar) und die Hilfselektrode. Der Strom wird über die Arbeits- und Hilfselektrode geführt, während die Referenzelektrode nahezu stromlos bleibt. Um den Ohmschen Spannungsabfall zwischen Arbeits- und Referenzelektrode möglichst klein zu halten, werden beide Elektroden relativ dicht nebeneinander positioniert.

In einem einfachen CV-Experiment wird nun zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode ein zeitlich veränderbares Potential angelegt. Die Messung beginnt bei einem Anfangspotential E_i , welches sich zeitlich linear mit konstanter Vorschubgeschwindigkeit (Scangeschwindigkeit) u ($u = dE/dt = \text{konstant}$) verändert. Nach Erreichen eines Umkehrpotential E_λ wird die Richtung der Potentialänderung invertiert, bis der Ausgangswert wieder erreicht ist.

Ein Cyclovoltammogramm wird üblicherweise als Strom-Spannungskurve dargestellt (siehe Abbildung 5.13). Seine Form kann durch die potentialabhängige Änderung der Konzentration der elektroaktiven Spezies an der Arbeitselektrodenoberfläche und den damit verbundenen Diffusionsprozessen erklärt werden.

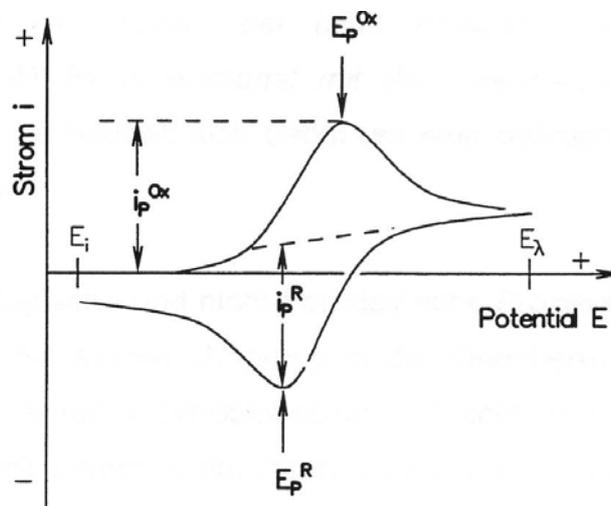


Abb. 5.13: Typischer Verlauf eines Cyclovoltammogramms;

E_i : Anfangspotential, E_λ : Umkehrpotential, E_p^{Ox} : anodisches Spitzenpotential (Peakpotential), E_p^R : kathodisches Spitzenpotential (Peakpotential); i_p^{Ox} : anodischer Spitzenstrom (Peakstrom), i_p^R : kathodischer Spitzenstrom (Peakstrom); Einheiten: E [V], i [μA].

Mit zunehmendem Potential $E(t)$ nimmt die Oberflächenkonzentration der zu oxidierenden Spezies (R) ab, wodurch ein Konzentrationsgradient und damit ein Ladungsfluss anwächst, bis nach Überschreiten des Standardpotentials E^0 die Oberflächenkonzentration von R verschwindend klein wird. Der Strom erreicht ein Maximum i_p^{Ox} , der Konzentrationsgradient nimmt ab und damit auch der Strom. Analoge Phänomene ergeben sich bei umgekehrter Flussrichtung ^[218]. Die wichtigsten Kenngrößen eines Cyclovoltammogramms sind die anodischen und kathodischen Spitzenpotentiale E_p^{Ox} und E_p^R , sowie ihre zugehörigen Spitzenströme i_p^{Ox} und i_p^R , die dem CV direkt entnommen werden können (siehe Abb. 5.13).

Die Belegung einer Elektrode (z. B. Gold) mit einem Film unter Bildung einer so genannten *chemisch modifizierten Elektrode* kann zwei Ziele haben, zum einen die Charakterisierung des Films, zum anderen eine Elektrode mit bestimmten Eigenschaften zu erzeugen. Das klassische Beispiel zur Filmcharakterisierung ist die Messung der *Durchlässigkeit* redoxinaktiver Filme. Dabei wird anhand der an der freien und an den beschichteten Elektroden gemessenen Faradayschen Spitzenströme ($i_p^{\text{Ox}}(\text{Schicht})$ und $i_p^{\text{Ox}}(\text{Gold})$) verglichen, wie sehr die Filme in der Lage sind, die Elektrodenoberfläche abzuschirmen ^[96, 102, 223]. Die Wirksamkeit mit der eine Schicht eine diffusionskontrollierte Elektrodenreaktion unterdrückt, kann zur Beschreibung der Belegungsdichte genutzt werden.

In dem Maße, in dem die strukturelle Einheit einer Schicht (z. B. Monoschicht) abnimmt, z.B. durch Fehlstellen, Korngrenzen, Einschluss von Lösungsmittel usw., nimmt der diffusionskontrollierte Faradaysche Strom zu. Wahrscheinlich findet die Elektroaktivität bei chemisch modifizierten Elektroden in den Fehlstellen der Schichten, in Kanälen oder durch Tunneln der Elektronen durch die Monoschicht statt ^[224, 225].

Auch der nicht-Faradaysche Strom (= kapazitiver Strom) wird durch die Anwesenheit eines Films auf einer Elektrodenoberfläche verändert. Der nicht-Faradaysche Strom hat seinen Ursprung in der Orientierung des Elektrolyten an der Elektrodengrenzfläche. Er ist rein elektrostatischer und nicht chemischer Natur und trägt zum Reststrom bei. Kommt eine Elektrode in Kontakt mit einem Elektrolyten, bildet sich an der gemeinsamen Grenzfläche eine Doppelschicht aus, in der die Ladung der Metallelektrode durch eine Schicht entgegengesetzt geladener Ionen in Lösung kompensiert wird. Diese *Helmholtzsche Doppelschicht* kann als (geladener) Plattenkondensator beschrieben werden, der bei einer Änderung des angelegten Potentials ge- bzw. entladen wird.

Befindet sich nun ein Film auf der Elektrodenoberfläche, so nimmt in der elektrochemischen Doppelschicht der Abstand der den Plattenkondensator bildenden Ionen, wegen der dazwischenverschobenen Moleküle (= dielektrische Schicht), zu und die Kapazität somit ab. Diese Kapazität C kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$C = \frac{\varepsilon\varepsilon_0}{d} A \quad (5-10)$$

C = Kapazität [μF]

ε = relative Dielektrizitätskonstante der adsorbierten Schicht

ε_0 = Dielektrizitätskonstante in Vakuum [F/m]

d = Abstand der Kondensatorplatten = *Dicke der adsorbierten Schicht*

A = Fläche der Elektrode [cm^2]

Der nicht-Faradaysche Strom nimmt mit zunehmender Dicke eines adsorbierten Films ab ^[222, 226]. Die genaue Kenntnis der Dielektrizitätskonstante und die experimentell ermittelte Kapazität der Schicht erlaubt die Bestimmung der Schichtdicke nach der obenbeschriebenen Gleichung.

Durch die Anwesenheit eines isolierenden Films auf einer Elektrodenoberfläche ändert sich die Form der Cyclovoltammogramme. Die Spitzenströme sind kleiner als bei den freien Elektroden. Außerdem wird häufig eine Verschiebung der Spitzenpotentiale beobachtet, wobei die Rückreaktion eine stärkere Verschiebung erfährt. Durch die adsorbierten Schichten kann die zur Reaktion noch zur Verfügung stehende Elektrodenoberfläche so klein werden, dass ihre Eigenschaften denen von Mikroelektroden gleich kommen ^[227].

Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

Die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) erlaubt Elektrodenprozesse frequenz aufgelöst zu untersuchen. Bei der hier angewandten EIS wird mittels einer Drei-Elektroden-Schaltung die Impedanz, d. h. der komplexe Widerstand der Arbeitselektrode (AE) in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi\nu$ (ν = Messfrequenz) bestimmt.

Die Amplitude der über einen Frequenzganganalysator im Potentiostaten angelegten Wechselspannung zwischen Arbeits - (AE) und Bezugselektrode (RE) wird dabei möglichst klein gewählt, um proportionales Verhalten der Strom-Spannungs-Charakteristik zu gewährleisten; gleichzeitig muss sie groß genug sein, damit das Messsignal nicht durch Rauschen überdeckt wird. Üblich sind 2-10 mV. Der in der EIS verwendete Frequenzbereich kann dabei zwischen 1MHz und 1 μHz liegen, meist ist er jedoch kleiner. Mit Hilfe einer internen Gleichspannungsquelle des Potentiostaten kann man gleichzeitig durch einen Gleichstrom zwischen AE und

Gegenelektrode (GE) das Potential der Arbeitselektrode vorgeben. Der durch die Messzelle fließende Wechselstrom (das Antwortsignal) wird an einen Frequenzanalysator weitergegeben, wo die Amplitude (Betrag der Impedanz $|Z|$) und Phasenverschiebung φ gegenüber der Eingangsspannung (Störsignal) registriert werden. Die Impedanz kann in einen *Real-* und *Imaginärteil* (Z' und Z'') zerlegt werden:

$$|Z| = (Z'^2 + Z''^2)^{1/2} \quad (\text{Betrag der Impedanz}) \quad (5-11)$$

$$Z' = |Z| \cos \varphi \quad (\text{Realteil}) \quad (5-12)$$

$$Z'' = |Z| \sin \varphi \quad (\text{Imaginärteil}) \quad (5-13)$$

Impedanzspektren werden durch die drei Messgrößen: Betrag der Impedanz ($|Z|$), Phasenwinkel (φ) und Messfrequenz (ω) charakterisiert. Zur Darstellung der Spektren werden zwei Auftragungen verwendet:

1. der *Nyquist-Plot* (Ortskurve), in dem $-Z''(\omega)$ gegen $Z'(\omega)$ und
2. der *Bode-Plot*, in dem $\log|Z|$ und φ gegen $\log\omega$ aufgetragen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden die gemessenen Impedanzspektren als Nyquist-Plot dargestellt. Dazu wird der Imaginär- gegen den Realteil der Impedanz in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz ω aufgetragen (siehe Abb. 5.14).

Aus dieser Darstellung der Impedanzmessdaten lassen sich zur Beschreibung einer elektrochemischen Zelle wichtige Größen, wie der Elektrolytwiderstand R_u und der Durchtrittswiderstand R_{ct} (auch als Charge-Transfer bezeichnet) durch Extrapolation der Fußpunkte des Halbkreises ablesen. Die Kapazität der Doppelschicht C_{dl} lässt sich wiederum sehr einfach aus einer dem Nyquist-Plot analogen Darstellung der komplexen Kapazitätsebene ablesen. Hier sind Real- und Imaginärteil, C' und C'' durch die entsprechenden Anteile der Impedanz gegeben:

$$C' = \frac{1}{\omega Z'} ; C'' = \frac{1}{\omega Z''} \quad (5-14)$$

Der Durchtrittswiderstand R_{ct} ist die wichtigste Größe bei der quantitativen Bestimmung von Belegungsgraden von Filmen auf Elektrodenoberflächen [234, 235, 236].

Aus der Doppelschichtkapazität C_{dl} kann man, wie bei CV-Messungen, die Schichtdicke dieser Filme ermitteln.

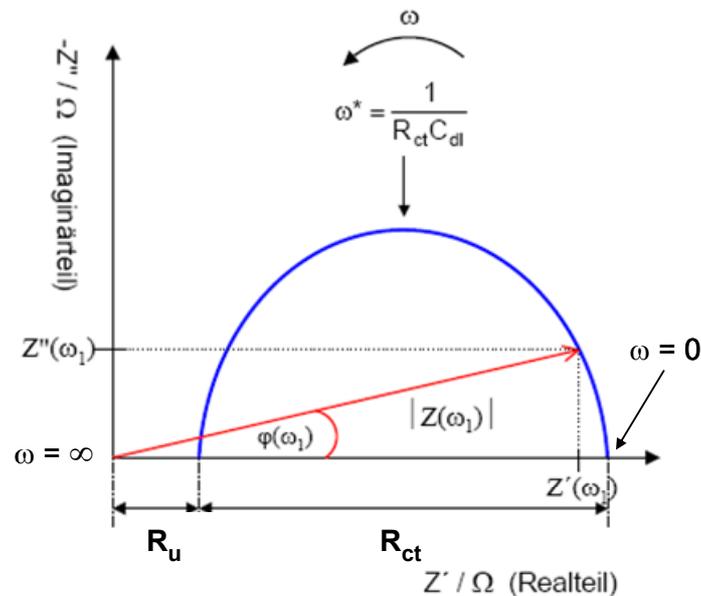


Abb. 5.14: Nyquist Darstellung von Impedanzdaten; R_u : Elektrolyt-Widerstand, R_{ct} : Durchtritts-Widerstand (auch Charge-Transfer-Widerstand genannt), ω^* : maximale Kreisfrequenz, C_{dl} : Doppelschicht-Kapazität der Arbeitselektrode.

Die Auswertung von Impedanzspektren kann entweder durch Berechnung der Elektrodenprozesse mittels mathematischer Funktionen ^[228] die die Vorgänge an der Elektrode beschreiben oder durch Einführung geeigneter Ersatzschaltbilder (ESB) erfolgen ^[229]. Die letztgenannte Methode setzt voraus, dass sich die elektrochemischen Prozesse an der Arbeitselektrode durch ein Netzwerk passiver Schaltelemente wie ohmsche Widerstände und Kondensatoren darstellen lassen, wobei eine eindeutige Zuordnung der Schaltelemente zu den physikalisch-chemischen Größen angestrebt wird.

Ein elektrochemisches System lässt sich im einfachsten Fall, d. h. für eine Elektrode in direktem Kontakt mit dem Elektrolyten, durch ein von Randles vorgeschlagenes Ersatzschaltbild repräsentieren, das als Elemente den Elektrolytwiderstand R_u , den Widerstand der Doppelschicht (Durchtrittswiderstand) R_{ct} , die Doppelschichtkapazität C_{dl} und die Warburg-Impedanz Z_w enthält. Ein solches Schaltbild mit der Übertragung auf das Elektrodensystem in einem flüssigen Analyten ist in Abb. 5.15 gezeigt.

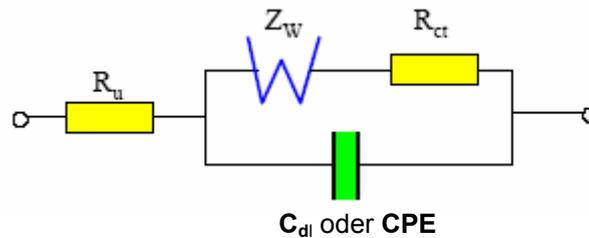


Abb. 5.15: Ersatzschaltbild einer Elektrodenreaktion mit Stofftransport (Randles Ersatzschaltbild): R_u : Elektrolytwiderstand; C_{dl} : Doppelschichtkapazität oder CPE: Konstantphasenelement; R_{ct} : Widerstand der Doppelschicht (Durchtrittswiderstand), Z_W : Warburg-Impedanz: Transportelement (Diffusion in Lösung).

In einer realen elektrochemischen Zelle kann das Impedanzspektrum jedoch komplizierter sein als es durch das Randles Ersatzschaltbild beschrieben wird. Oft sind die beobachteten Halbkreise (siehe Abb. 5.16) abgeflacht, bzw. nur Drittel- oder Viertelkreise sichtbar. Durch Einführung eines so genannten Konstantphasenelements CPE (CPE: *Constant Phase Element*) anstelle der Doppelschichtkapazität C_{dl} kann dieses Verhalten beschrieben werden ^[230-232].

In Abbildung 5.16 ist das dem Randles Ersatzschaltbild zugehörige Impedanzspektrum einer Arbeitselektrode zu sehen.

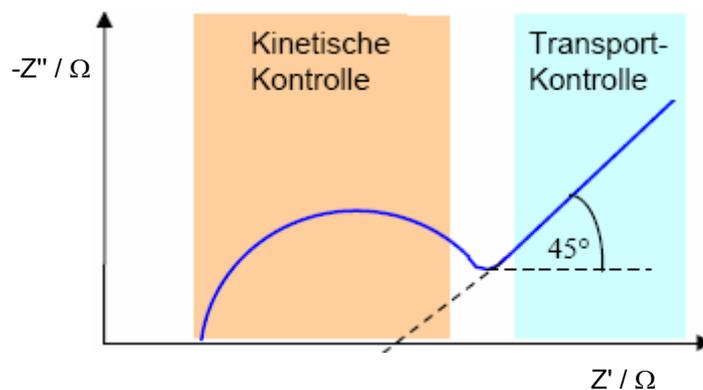


Abb. 5.16: Impedanzspektrum einer Elektrodenreaktion mit Stofftransport wiedergegeben durch ein Randles-Ersatzschaltbild.

Durch diese Darstellung der Impedanzspektren können sowohl Elektrodenreaktionen mit unbegrenzter (*infinite*) als auch mit begrenzter (*semi-infinite* bzw. *finite*) Diffusion beschrieben werden. Zu den Letzteren (*semi-infinite* Diffusion) gehören auch die Impedanzspektren von beschichteten Elektroden (z. B.: mit Cellulosemonoschichten).

CV- und EIS-Messungen an Thio-CMC Monoschichten

Um die Qualität der Celluloseschichten auf den Goldoberflächen bewerten zu können, wurde ihr Einfluss auf das Redoxverhalten von Kaliumhexacyanoferrat (III) $K_3[Fe(CN)_6]$ mit Hilfe der Cyclovoltammetrie und Impedanzspektroskopie untersucht. Beim $K_3[Fe(CN)_6]$ handelt es sich um einen Partner eines Redoxpaars bei dem ein Elektron übertragen wird ($Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$). Da die Cellulosederivate auf Goldoberflächen Schichten ausbilden können, kann das Redoxpaar $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ nur durch Fehlstellen innerhalb dieser Schichten zur Elektrodenoberfläche diffundieren. Bei den CV-Messungen dieser Schichten hat sich eine Vorschubgeschwindigkeit (scan rate) von $u = 100 \text{ mV/s}$ als ausreichend langsam erwiesen, um einen thermodynamischen Gleichgewichtszustand für $K_3[Fe(CN)_6]$ an der Elektrodenoberfläche zu erreichen, bei dem die Elektronenübertragungsrate hinreichend schnell gegenüber dem Massentransport ist. Bei den EIS-Messungen wurde ein Störsignal von 10 mV verwendet. Die Messungen (CV als auch EIS) wurden in einer Drei-Elektroden-Messzelle (KIST Europe GmbH) durchgeführt. Als Arbeitselektrode diente ein Goldplättchen (Au-Elektrode), als Gegenelektrode (GE) ein Platinkontakt und als Referenzelektrode (RE) eine Ag/AgCl-Elektrode. Die Elektrolytlösung war eine 2 mM Lösung von $K_3[Fe(CN)_6]$ in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 (PBS: 10 mM Phosphat-Puffer + 0.15 M KCl).

Für die CV- und EIS-Untersuchung der Schicht eines Cellulosederivats wurden jeweils zwei Goldelektroden (Au-Elektroden) unter gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden Cellulosederivat beschichtet. Dabei wurde mit einer Au-Elektrode das Cyclovoltammogramm aufgenommen und anschließend mit der anderen das EIS-Spektrum. Als Referenzkurve bzw. -spektrum diente das Cyclovoltammogramm bzw. EIS-Spektrum der reinen Goldelektrode ^[225, 226].

In Abbildung 5.17 sind die Cyclovoltammogramme von 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 gemessen an der reinen Goldelektrode und den Thio-CMC Derivaten MTh-CMC **3**, TSHP-CMC **6a** und HTSHP-CMC **8**, zusammengestellt.

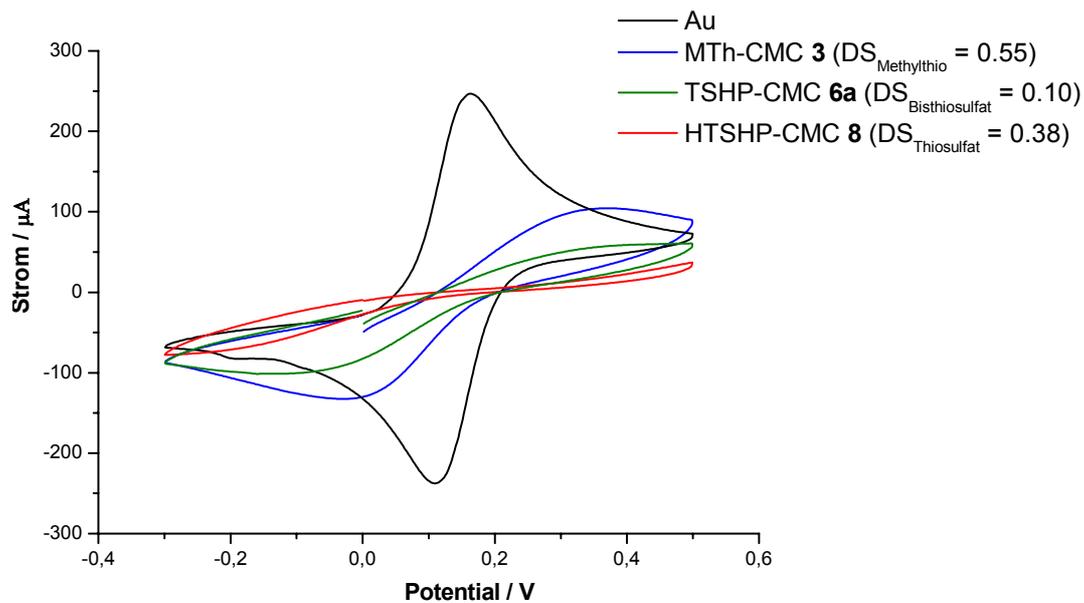


Abb. 5.17: Cyclovoltammogramme von 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 gemessen an der reinen Goldelektrode und an adsorbierten Schichten aus Thio-CMC Derivaten gegen Ag/AgCl. Konzentrationen der Thio-CMC Lösungen: **6a** und **8** als 0.1%-ig Lösung in 0.2 M Zitronensäure, **3** als 0.3%-ige Lösung in Wasser; Messbedingungen CV: $E_i = -300$ mV, $E_\lambda = 500$ mV, $u = 100$ mV/s; Beschichtungszeit $t_{SA} = 1-4$ h, Elektrodenoberfläche $A = 0.502$ cm².

Der Vergleich der Cyclovoltammogramme an den durch Thio-CMC modifizierten Elektroden mit den CV des reinen Goldes zeigt eine Verringerung der Spitzenströme i_p durch die Anwesenheit der Filme, in der Reihenfolge MTh-CMC **3** > TSHP-CMC **6a** > HTSHP-CMC **8** (siehe Abb. 5.17).

Die HTSHP-CMC **8** zeigt gegenüber der Bisthiosulfatcellulose **6a** einen sehr niedrigen Spitzenstrom. Dieser sehr niedrige i_p der Schicht von **8** ist ein zusätzlicher Beweis für die größere Beweglichkeit des Celluloserückgrates von **8** nach der Immobilisierung auf Gold und damit für die Bildung von sehr dicht gepackten Schichten. Im Gegensatz dazu ist die Bisthiosulfat-CMC **6a** bei gleicher Ankerlänge in ihrer Beweglichkeit, aufgrund der zweiten Thiosulfatgruppe, eingeschränkt und dadurch ihre Schichten etwas schlechter gepackt.

Die Schicht des Methylthio-CMC Derivats **3** zeigt die größte Durchlässigkeit (Permeabilität) für die redoxaktive Substanz. Dies ist einerseits durch die kurze Thioankergruppe zu erklären die dazu führt dass die Beweglichkeit der MTh-CMC **3** nach der Bindung an der Goldoberfläche verringert wird und dadurch sich nicht so dicht gepackte Schichten ausbilden. Andererseits ist die Beschichtung mit Derivat **3** konzentrationsabhängig wie durch SPR gezeigt werden konnte und hat bei niedrigen

Konzentrationen eine nicht vollständig mit MTh-CMC belegte Goldoberfläche als Folge.

Diese konzentrationsabhängige Beschichtung mit MTh-CMC **3** wurde nun auch anhand von CV-Messungen untersucht. Dazu wurde jeweils eine 0.1%- bzw. 0.3%ige Lösung von **3** in Wasser hergestellt. Nach einer Beschichtungszeit t_{SA} von 4 h bei Raumtemperatur wurden die CV aufgenommen (Abb. 5.18).

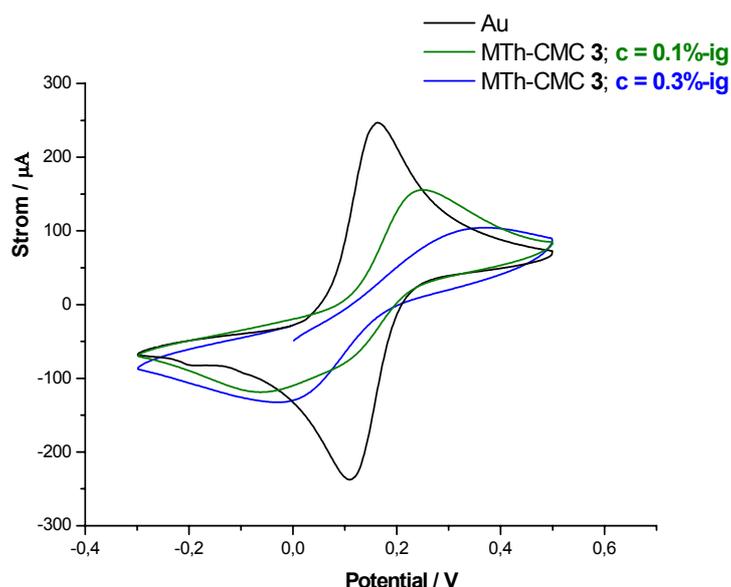


Abb. 5.18: Cyclovoltammogramme von 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 gemessen an der reinen Goldelektrode und an adsorbierten Schichten aus 0.1%- bzw. 0.3%-iger Lösung von MTh-CMC **3** gegen Ag/AgCl. Messbedingungen CV: analog Abb. 5.17.

Der Vergleich der Cyclovoltammogramme an den durch MTh-CMC modifizierten Elektroden mit den CV des reinen Goldes zeigt auch hier eine Verringerung der Spitzenströme i_p durch die Anwesenheit der Filme. Der oxidative Spitzenstrom i_p^{Ox} des Cyclovoltammogramms gemessen an der Schicht von **3** nach Abscheidung aus der 0.1%-igen Lösung zeigt eine deutlich ausgeprägte Spitze. Der reduktive Spitzenstrom i_p^R findet sich dagegen in einem relativ flachen Kurvenverlauf. Im Cyclovoltammogramm von **3** nach Abscheidung aus der 0.3%-igen Lösung finden sich beide Spitzenströme in einem flachen Kurvenverlauf, was auf eine bessere Abschirmung der Goldelektrode gegenüber der Redoxreaktion von $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ hindeutet. Man kann dementsprechend von einer höheren Permeabilität der Schicht von **3** aus der 0.1%-igen Lösung und einer niedrigeren Permeabilität der Schicht von **3** aus der 0.3%-igen Lösung gegenüber dem Redoxpaar $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ sprechen.

Die bessere Abschirmung der Schicht von **3** aus der 0.3%-igen Lösung gegenüber der 0.1%-igen Lösung unterstützt somit zusätzlich die schon bei den SPR-Versuchen beobachtete Erhöhung der Belegungsdichte mit steigender Konzentration an **3**.

In Tabelle 5.6 sind die aus den Cyclovoltammogrammen ermittelten Kenngrößen wie die anodischen Spitzenströme und Ladungen für die Thio-CMCs zusammengestellt.

Tabelle 5.6: Ermittelte Kenngrößen für das Redoxsystem $K_3[Fe(CN)_6]$ (2 mM) in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 an der reinen und an beschichteten Goldelektroden gegen Ag/AgCl; a: Abscheidung aus 0.1%-igen Lösung; i_p^{Ox} : anodischer Spitzenstrom; Q^{Ox} : anodische Ladung, $Q = \int idt = u \int idE$, E: Spannung [V];

*: nicht ermittelbarer Wert aufgrund des flachen Verlaufs des CVs.

Thio-CMC	CV	
	i_p^{Ox} [μA]	Q^{Ox} [μC]
Au	241.50	8.79
MTh-CMC 3 ^a	164.80	7.60
TSHP-CMC 6a	39.00	2.93
HTSHP-CMC 8	-*	1.09

Die EIS-Spektren der mit Thio-CMC beschichteten Goldelektroden sind in Abb. 5.19 zu sehen. Zur Bestimmung des Durchtrittswiderstands R_{ct} und der Doppelschichtkapazität C_{dl} , wurden die gemessenen Impedanzdaten als Ortskurven (Nyquist-Plot) dargestellt und an einem Randles Ersatzschaltbild (siehe detaillierte Beschreibung im experimentellen Teil) angepasst^[233].

Auch bei den EIS-Messungen zeichnet sich die gleiche Tendenz in der Qualität der Schichten aus. Der Durchtrittswiderstand R_{ct} , der ein Maß für die Abschirmung der Elektrode durch die Schicht ist, nimmt in der Reihenfolge MTh-CMC **3** < TSHP-CMC **6a** < HTSHP-CMC **8** zu, die Doppelschichtkapazität C_{dl} in der gleichen Reihenfolge ab (siehe Tabelle 5.7).

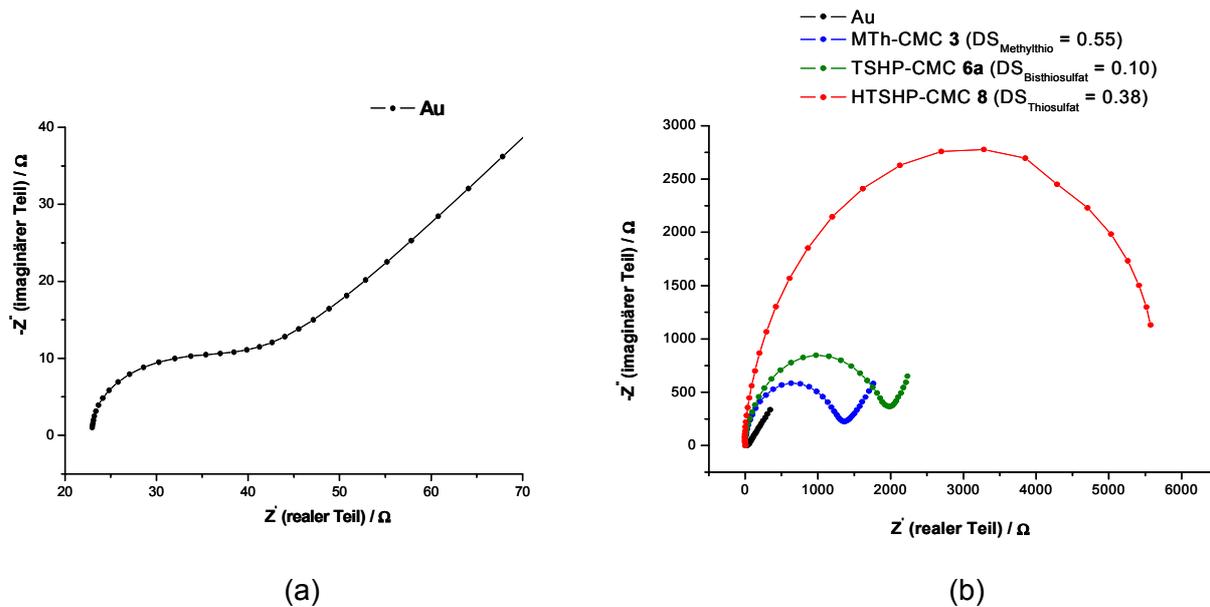


Abb. 5.19: Nyquist-Plot von 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 10mM PBS-Puffer pH 7.0 gemessen an: (a) reiner Goldelektrode; (b) mit Thio-CMC beschichteten Goldelektroden gegen Ag/AgCl-Elektrode. Konzentrationen Thio-CMCs: analog Abb. 5.17. Messbedingungen EIS: 150 mV Potential gegenüber Ag/AgCl mit einer Amplitude von 10 mV, Frequenzbereich: 10 kHz - 50 mHz.

Zudem erhält man für die Schicht von MTh-CMC **3** nach Abscheidung aus der 0.3%-igen Lösung einen höheren Durchtrittswiderstand R_{ct} als im Falle der Schicht aus der 0.1%-igen Lösung (Tabelle 5.7).

Tabelle 5.7: Ermittelte Kenngrößen R_{ct} und C_{dl} für das Redoxsystem $K_3[Fe(CN)_6]$ (2 mM) in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 an der reinen und an beschichteten Goldelektroden gegen Ag/AgCl; R_{ct} : Durchtrittswiderstand; C_{dl} : Doppelschichtkapazität; *a*: 0.1%-ige Lösung, *b*: 0.3%-ige Lösung.

Thio-CMC	EIS	
	R_{ct} [Ω]	C_{dl} [μF]
Au	15.82	15.12
MTh-CMC 3	713 ^a	10.68
	1193 ^b	9.11
TSHP-CMC 6a	2040	7.54
HTSHP-CMC 8	5510	6.10

Um die Qualität der Thio-CMC Schichten auf Gold in Zahlen erfassen zu können, wurden aus den EIS-Messungen der Belegungsgrad θ der Schichten berechnet. Die Berechnung des Belegungsgrades θ aus den Ortskurven (Nyquist-Plots) der Thio-CMC Schichten auf Gold, erfolgte aus den ermittelten Durchtrittswiderständen R_{ct} für die jeweilige Schicht. θ kann nach folgender Gleichung berechnet werden [234-236].

$$\theta = 1 - \frac{R_{ct}(Au)}{R_{ct}(Thio-CMC)} \quad (5-15)$$

Aus den in Tabelle 5.6 dargestellten Doppelschichtkapazitäten C_{dl} war es möglich die Schichtdicken der Thio-CMC Schichten auf Gold wie folgt zu bestimmen:

$$C_{dl} = \frac{\varepsilon\varepsilon_0}{d} A \quad (5-16)$$

C_{dl} = Doppelschichtkapazität [μF]

ε = Dielektrizitätskonstante der adsorbierten Schicht

ε_0 = Dielektrizitätskonstante in Vakuum: 8.854×10^{-12} F/m

d = Abstand der Kondensatorplatten = *Dicke der adsorbierten Schicht*

A = Fläche der Elektrode [cm^2]: 0.502 cm^2

Für die Derivate **3**, **6a** und **8** wurde ein Wert für die Dielektrizitätskonstante von $\varepsilon = 40$ eingesetzt [237]. Dadurch ergibt sich folgende Gleichung zur Bestimmung der Schichtdicken der Thio-CMCs auf Gold mittels EIS:

$$\Rightarrow d = \frac{17.7788}{C_{dl}(\mu F)} \text{ [nm]} \quad (5-17)$$

Der Belegungsgrad θ als auch die ermittelten Schichtdicken der Thio-CMC Derivate sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst.

Alle drei Thio-CMC Derivate zeigen sehr gute Belegungsgrade der Filme auf Gold, was zusätzlich durch die niedrige Permeabilität dieser Schichten gegenüber dem Redoxpaar $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (aus den CV-Messungen) bestätigt wird.

Die berechneten Schichtdicken d_{EIS} aus den EIS-Spektren der Filme liegen im gleichen Größenordnungsbereich wie die aus den SPR-Messungen. Unterschiede zwischen d_{EIS} und d_{SPR} sind durch die nicht genaue Kenntnis der Dielektrizitätskonstanten ε der Thio-CMC Derivate zu erklären.

Tabelle 5.8: Berechnete Belegungsgrade θ und Schichtdicken (aus EIS und SPR) der Thio-CMC Filme auf Gold. Werte für θ berechnet nach Gleichung (5-15) und für d_{EIS} nach Gleichung (5-17) mit $\varepsilon_{\text{Schicht}} = 40$; *a*: 0.1%-ige Lösung, *b*: 0.3%-ige Lösung.

Thio-CMC	θ	d_{EIS} [nm]	d_{SPR} [nm]
MTh-CMC 3	0.987	1.66 ^a / 1.95 ^b	1.50 ^a / 2.30 ^b
TSHP-CMC 6a	0.992	2.36	2.50
HTSHP-CMC 8	0.997	2.91	2.40

Des Weiteren wurde für die HTSHP-CMC **8** der Einfluss des Substitutionsgrades an Thiosulfatgruppen ($\text{DS}_{\text{Thiosulfat}}$) auf die Beschichtung von Goldsubstraten untersucht. Dazu wurden 0.1%-ige Lösungen von **8** mit $\text{DS}_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$ und 0.38 in 0.2 M Zitronensäure hergestellt. Nach einer Beschichtungszeit von $t_{\text{SA}} = 1$ h wurden die CV und EIS Messungen durchgeführt (Abb. 5.20).

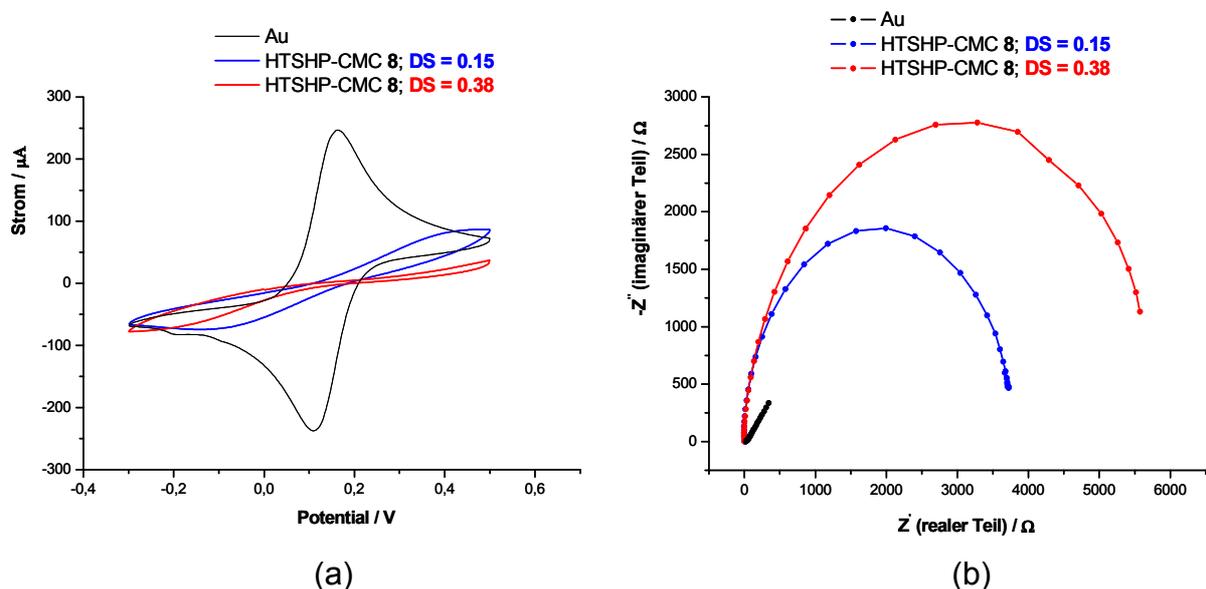


Abb. 5.20: Cyclovoltammogramme (a) und Ortskurven (b) von 2 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 gemessen an der reinen Goldelektrode und an adsorbierten Schichten aus HTSHP-CMC **8** ($\text{DS}_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$ und 0.35) gegen Ag/AgCl. Messbedingungen CV: analog Abb. 5.17; Messbedingungen EIS: analog Abb. 5.19.

Die Spitzenströme i_p aus den CVs und die Durchtrittswiderstände R_{ct} aus den EIS-Spektren zeigen für beide Substitutionsgrade sehr dicht gepackte Schichten. Die

HTSHP-CMC ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.38$) zeigt jedoch eine noch bessere Abschirmung der Elektrode als die mit $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$ (siehe Tabelle. 5.9).

Tabelle 5.9: Berechnete R_{ct} , C_{dl} und Schichtdicken d (aus EIS und SPR) der HTSHP-CMC ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$ und 0.35) Filme auf Gold. Werte für d_{EIS} berechnet nach Gleichung (5-17) mit $\varepsilon_{\text{Schicht}} = 40$.

HTSHP-CMC 8	R_{ct} [Ω]	C_{dl} [μF]	d_{EIS} [nm]	d_{SPR} [nm]
$DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$	3580	7.89	2.25	2.40
$DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.38$	5510	6.10	2.91	

CV- und EIS-Messungen an reaktiven Thio-CMC Monoschichten

In gleicher Weise wie bei den Thio-CMC Derivaten **3**, **6a** und **8** wurden auch an ausgewählten reaktiven Thio-CMC Derivaten CV und EIS Messungen durchgeführt.

Aufgrund der sehr guten Säurestabilität der MCT-Derivate, erfolgte die Beschichtung der Goldelektroden mit den reaktiven MCT-Derivaten **14** ($DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $DS_{\text{MCT}} = 0.16$) und **17** ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$, $DS_{\text{MCT}} = 0.30$) aus den 0.1%-igen Lösungen der Derivate in 0.2 M Zitronensäure (saure Aktivierung der Thiosulfat-Gruppen). Die aus den EIS Messungen ermittelten Kenngrößen R_{ct} , C_{dl} und die berechneten Schichtdicken d sind in Tabelle 5.10 zusammengefasst.

Tabelle 5.10: Berechnete R_{ct} , C_{dl} und Schichtdicken d (aus EIS und SPR) der MCT-TSHP-CMC **14** und MCT-HTSHP-CMC **17** Filme auf Gold. Werte für d_{EIS} berechnet nach Gleichung (5-17) mit $\varepsilon_{\text{Schicht}} = 40$.

MCT-Thio-CMC	Gruppe	DS	R_{ct} [Ω]	C_{dl} [μF]	$d_{\text{EIS / SPR}}$ [nm]
14	Bisthiosulfat	0.10	1322	9.07	1.96 / 2.00
	MCT	0.16			
17	Thiosulfat	0.15	3380	7.69	2.31 / 2.00
	MCT	0.30			

Wie im Falle der Thio-CMC **6a** und **8** zeigt auch hier, wie erwartet, das HTSHP-CMC-Derivat **17** eine bessere Abschirmung der Goldelektrode gegenüber dem Derivat **14**. Das heißt demzufolge dass die reaktive MCT-Cellulose **17** besser gepackte Schichten auf Gold ausbildet als die reaktive Bisthiosulfatcellulose **14**.

Der Durchtrittswiderstand R_{ct} der reaktiven Schicht **14** zeigt gegenüber der Schicht von **6a** ($DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$) einen etwas niedrigeren Wert. Für die Schicht von **17** wird ein fast gleicher Wert für R_{ct} erhalten wie bei Derivat **8** ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$).

Des Weiteren wurden die Schichten der reaktiven Cellulosederivate MCT-HTSHP-CMC **17**, HTSHP-CMC-MEDC **18b** und HTSHP-CMC-NHS **19** nach Aktivierung der Thiosulfat-Gruppen mit TCEP in 0.4 M Acetat-Puffer (pH 6.98), mittels CV und EIS untersucht. Die Wahl des Aktivierungsmittel TCEP wurde aufgrund der Säurelabilität der Derivate **18b** und **19** getroffen. Die Abscheidung der reaktiven Thiocellulosen **17** und **19** auf die Goldelektroden erfolgte aus den 0.02%-igen Lösungen der Derivate in 0.4 M Acetat-Puffer pH 6.98 (+0.02 Gew.% TCEP), von Derivat **18b** aus einer 0.1%-igen Lösung in 0.4 M Acetat-Puffer pH 6.98 (+0.1 Gew.% TCEP).

Aus den entsprechenden Cyclovoltammogrammen und EIS-Spektren der Schichten lässt sich folgende Reihenfolge in der Abschirmung der Goldelektrode gegenüber dem Redoxpaar $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ aufstellen:

MCT-HTSHP-CMC **17** < HTSHP-CMC-MEDC **18b** < HTSHP-CMC-NHS (SR I) **19** \approx HTSHP-CMC-NHS (SR II) **19**

In Tabelle 5.11 sind die dazugehörigen Kenngrößen der reaktiven HTSHP-CMC Derivaten zusammengefasst.

Man erhält für die MCT-Thio-CMC **17** nach Aktivierung der Thiosulfatgruppen mit TCEP einen unerwartet niedrigen Wert für R_{ct} gegenüber der Abscheidung aus saurer Lösung. Auch eine Erhöhung der Konzentration von 0.02% auf 0.1% brachte keine Verbesserung der Beschichtung, die konzentriertere Probe zeigte sogar einen niedrigeren R_{ct} -Wert als die verdünnte Probe.

Die HTSHP-CMC-NHS **19** die auf zwei unterschiedlichen Syntheserouten hergestellt wurde zeigt für beide fast gleiche R_{ct} Werte (siehe Tabelle 5.11).

In Abbildung 5.21 sind die Cyclovoltammogramme und Ortskurven von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (2 mM in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0) an adsorbierten Schichten aus Derivat **19**, nach Abscheidung aus 0.1%- bzw. 0.02%-igen Lösung von **19** in 0.4 M Acetat-Puffer pH 6.98 (+TCEP), dargestellt.

Tabelle 5.11: Berechnete R_{ct} , C_{dl} und Schichtdicken d (aus EIS und SPR) der reaktiven HTSHP-CMC Filme, **17**, **18b** und **19** auf Gold. Werte für d_{EIS} berechnet nach Gleichung (5-17) mit $\epsilon_{Schicht} = 40$;

a. Derivat hergestellt nach Syntheseroute I;

b. Derivat hergestellt nach Syntheseroute II.

MCT-Thio-CMC	Gruppe	DS	R_{ct} [Ω]	C_{dl} [μF]	$d_{EIS/SPR}$ [nm]
17	Thiosulfat	0.15	1152	7.29	2.44 / 1.70
	MCT	0.30			
18b	Thiosulfat	0.19	1247	7.03	2.52 / 2.30
	MEDC	0.19			
19	Thiosulfat	0.15	3065^a	7.65	2.32 / 1.90
	NHS	0.50	3440^b		

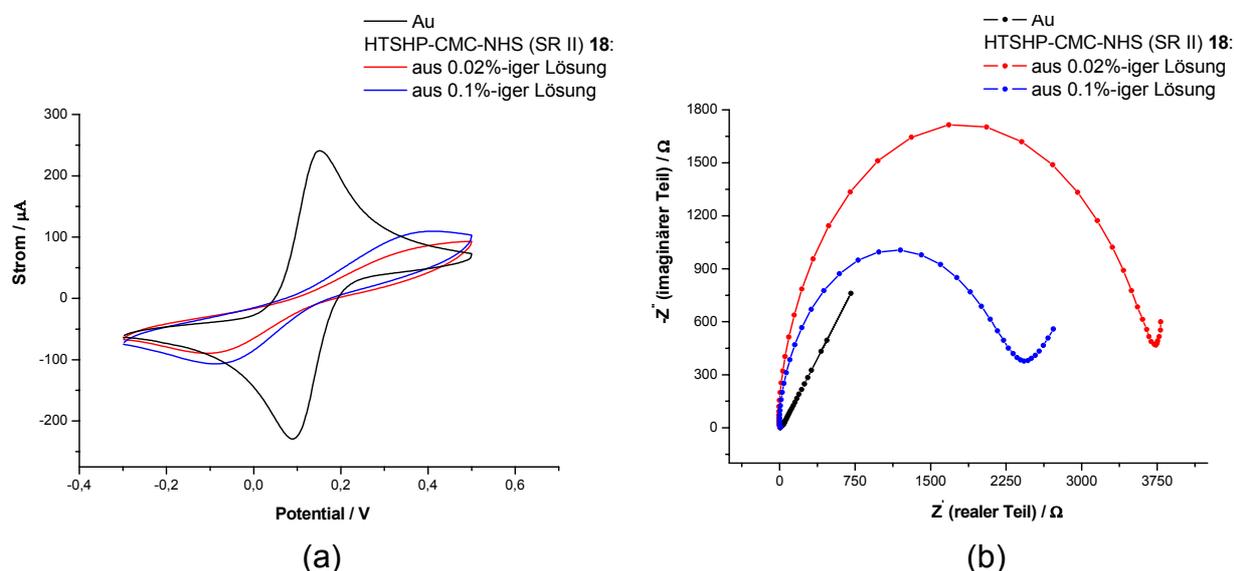


Abb. 5.21: Cyclovoltammogramme (a) und Ortskurven (b) von 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 gemessen an der reinen Goldelektrode und an adsorbierten Schichten aus HTSHP-CMC-NHS **19** (SR II) nach Abscheidung aus einer 0.02%-igen bzw. 0.1%-igen Lösung von **19** in 0.4 M Acetatpuffer (pH 6.98, 0.1 Gew.% TCEP), gegen Ag/AgCl. Messbedingungen CV: analog Abb. 5.17; Messbedingungen EIS: analog Abb. 5.19.

Die Schicht von **19** auf Gold, nach Abscheidung aus der verdünnten Lösung (0.02%-ig) zeigt einen höheren Durchtrittswiderstand von $R_{ct} = 3440 \Omega$ im Vergleich zu der Abscheidung aus der 0.1%-igen Lösung ($R_{ct} = 2077 \Omega$). Diese Beobachtung ist auf die effektivere Spaltung der Disulfidbrücken in den Thiosulfat-Gruppen mittels TCEP in verdünnter Lösung, zurückzuführen.

5.1.8 Benetzbarkeit von mit funktionellen Thio-CMC Derivaten beschichteten Goldoberflächen (Kontaktwinkelmessungen)

Die Benetzbarkeit von Oberflächen kann ein äußerst sensibles Maß für deren Struktur und Beschaffenheit sein. Eine Benetzung mit Wasser liefert Informationen über die Hydrophilie bzw. Hydrophobie einer Oberfläche ^[238].

In einem System, in welchem eine Festkörperoberfläche, ein Flüssigkeitstropfen und eine gasförmige Phase in gegenseitigem Kontakt stehen, bildet die Grenzfläche *flüssig/gasförmig* mit der Grenzfläche *fest/flüssig* in der gemeinsamen Grenzlinie der drei Phasen den Kontaktwinkel Θ ^[238]. Die Bildung eines Winkels Θ durch einen Tropfen, ist das Resultat des Gleichgewichtes zwischen Kohäsionskräften in der Flüssigkeit und den Adhäsionskräften zwischen der Flüssigkeit und der Oberfläche (Abb. 5.22).

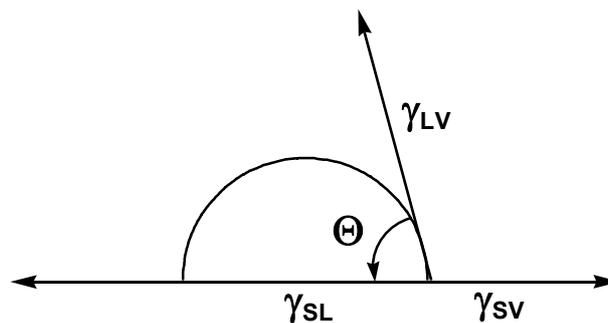


Abb. 5.16: Schematische Darstellung eines Flüssigkeitstropfens auf einer Festkörper-Oberfläche ^[238]; γ = Kraft/Länge (mN/m oder dyn/cm)

Die theoretische Beschreibung des Kontaktwinkels Θ aus der Bilanz der Kräfte parallel zur Oberfläche, ergibt sich aus der Young Gleichung:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos \Theta \quad (5-18)$$

wobei γ_{SV} die Oberflächenspannung des Festkörpers, γ_{SL} die Grenzflächenspannung zwischen Festkörper und Flüssigkeit und γ_{LV} die Oberflächenspannung der Flüssigkeit ist.

Stabile Kontaktwinkel stellen sich in den Fällen ein, in denen sich das System im thermodynamischen Gleichgewicht befindet. Ein solcher stabiler Zustand wird auf ideal glatten, homogenen und nicht deformierbaren Festkörperoberflächen erreicht, während sich auf heterogenen oder rauen Flächen ein metastabiles Gleichgewicht einstellt. Daneben wird zwischen statischen (System in Ruhe) und dynamischen (System in Bewegung) unterschieden. Im Folgenden beschränkt sich die Diskussion auf die in der vorliegenden Arbeit gemessenen *statischen Kontaktwinkel*.

Durch den Kontaktwinkel können die Benetzungseigenschaften einer Oberfläche wie folgt beschrieben werden: treten die Moleküle oder Atome bevorzugt untereinander in Wechselwirkung, d. h. es überwiegen die Kohäsionskräfte, so verringert die flüssige Phase ihre Kontaktfläche mit dem Festkörper. Es resultiert ein großer Winkel, die Oberfläche ist *schlecht* benetzbar. Mit zunehmender Wechselwirkung zwischen den beiden Phasen stellt sich ein kleinerer Winkel ein. Nimmt der Winkel den Wert 0° an, bedeutet dies eine *vollständige* Benetzung: die Flüssigkeit spreitet sich auf der Oberfläche. Bei der Adsorption von Alkanthiolen auf Gold wurde beispielsweise ein Kontaktwinkel von etwa $\Theta = 100^\circ$ gemessen, der durch die von der Oberfläche abstehenden hydrophoben Alkylketten verursacht wird ^[128]. Eine Schicht aus Regeneratcellulose weist hingegen für Wasser einen Kontaktwinkel von $\Theta = 25^\circ$ auf ^[67]. Eine glatte Goldoberfläche besitzt, bedingt durch hydrophobe Verunreinigungen aus der Luft, für Wasser einen Kontaktwinkel von $\Theta = 90^\circ \pm 2^\circ$ ^[239].

Die Wahl der Flüssigkeit zur Kontaktwinkelmessung ergibt sich aus der Beschaffenheit der Festkörperoberfläche. Wasser hat sich z. B. als sehr empfindlich in der Abschätzung der Anordnung von Hydroxylgruppen in Monoschichten erwiesen ^[240].

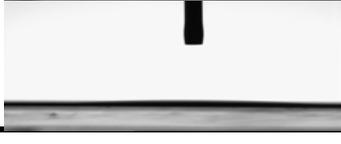
Kontaktwinkelmessungen an Cellulosemonoschichten

Die Kontaktwinkelmessungen wurden in der vorliegenden Arbeit an Wassertropfen (H_2O_{PB} , PB: 10 mM Phosphat-Puffer, pH 7.0), durchgeführt. Dazu wurde ein Tropfen ($5 \mu l$) so auf der Oberfläche aufgebracht, dass der Tropfen während des Aufbringens nicht von der Nadel riss ^[202]. Der sich einstellende *statische Kontaktwinkel* Θ_{stat} wurde danach sofort abgelesen. Die Messungen wurden an mehreren Stellen der

Probe wiederholt. Als Referenz diente ein frisch bedampftes, unbehandeltes Goldsubstrat. Zur Beschichtung der Goldsubstrate wurden folgende Lösungen der Thio-CMC benutzt: 0.3%-ige Lösung von MTh-CMC **3** in Wasser (pH 7.0), 0.1%-ige Lösungen von TSHP-CMC **6a** und HTSHP-CMC **8** in Wasser (pH 1.5) und 0.2%-ige Lösung von **6a** in Wasser (pH 7.0).

Die verwendeten Filme wurden nach einer Adsorptionszeit von 2 Stunden (für die Derivate **6a** und **8**) bzw. 4 Stunden (für MTh-CMC **3**) vermessen. Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen der ausgewählten Thio-CMC Derivate **3**, **6a** und **8** sind in Tabelle 5.12 zusammengestellt.

Tabelle 5.12: Kontaktwinkel von Wassertropfen ($\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}}$) auf mit Thio-CMC beschichteten Goldoberflächen im Vergleich zur reinen unbehandelten Goldoberfläche.

Substrat	pH bei der Beschichtung	Kontaktwinkel $\Theta_{\text{stat}} [^\circ]$	Bild
Au	-	54 ± 2	
MTh-CMC 3	7.0	35 ± 1	
TSHP-CMC 6a	7.0	23 ± 2	
	1.5	11 ± 1	
HTSHP-CMC 8	1.5	7 ± 1	

Der gemessene Kontaktwinkel $\Theta_{\text{stat}}(\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}})$ für das unbeschichtete Goldsubstrat betrug 54° . Im Vergleich zu dieser weisen alle Celluloseschichten niedrigere Werte auf. Der geringere Kontaktwinkel der Schichten lässt auf eine bessere *Benetzbarkeit* der Oberfläche mit dem Wassertropfen rückschließen. Diese bessere Benetzbarkeit rührt von den ungebundenen Hydroxylgruppen und ionischen Carboxylgruppen der Cellulose her. Das heißt, dass beispielsweise Wechselwirkungen zwischen dem

Tropfen und den Hydroxylgruppen ausgebildet werden können (*Wasserstoffbrücken*). Daraus kann gefolgert werden, dass die Hydroxylgruppen zur Grenzfläche Schicht/Wassertropfen hin orientiert sein müssen. Je mehr Wasserstoffbrückenbindungen zwischen PB-Puffer und die OH-Gruppen der Celluloseschichten existieren, desto kleiner ist der Kontaktwinkel Θ_{stat} .

Mit der Abnahme der *Hydrophilie* der Schichten ist eine zunehmende Oberflächenrauigkeit verbunden. Ursache hierfür könnte ein schlechteres Packungsverhalten der Celluloseketten aufgrund einer geringeren Beweglichkeit mit abnehmender Ankerkettenlänge aber auch bedingt durch deren Thiofunktionalität, sein. So zeigt die MTh-CMC **3** den größten Kontaktwinkel von $\Theta_{\text{stat}}(\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}}) = 35^\circ$ der in sehr guter Übereinstimmung mit dem von Liepold berichteten Wert ist ^[102]. Liepold zeigte dass die Kontaktwinkel $\Theta(\text{H}_2\text{O})$ von MTh-CMC Schichten in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration bei der Beschichtung, keine nennenswerten Veränderungen erfuhren. Erst ab einer Cellulosekonzentration von 0.05 mg/ml stieg der Kontaktwinkel für Wasser leicht an. Sie begründete dies mit einer beginnenden, unzureichenden Bedeckung der Goldoberfläche mit Derivat **3** ^[102].

Der größere Wert des Kontaktwinkels für $\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}}$ von **3** im Vergleich zu den anderen Thio-CMC Derivaten kann auf den geringeren Bedeckungsgrad der Goldoberfläche mit **3** zurückgeführt werden. Dies konnte auch durch SPR, CV und EIS-Messungen gezeigt werden.

Die Thiosulfat-CMC Derivate **6a** und **8** besitzen die gleiche Ankerkette, Derivat **6a** aber eine zusätzliche Thiosulfatgruppe. Die Abscheidung von **6a** und **8** auf Gold, nach vorheriger Aktivierung der Thiosulfatgruppen mit 0.1 M Salzsäure, führt zu Schichten die einen sehr niedrigen Kontaktwinkel für $\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}}$ besitzen und zwar von $\Theta_{\text{stat}}(\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}}) = 11^\circ$ für **6a** und $\Theta_{\text{stat}}(\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}}) = 7^\circ$ für **8**. Jedoch ist der Kontaktwinkel Bisthiosulfat-CMC **6a** größer als der von **8**. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der zusätzlichen Thiosulfat-Gruppierung von **6a**. Durch FTIR-ERS Experimente konnte gezeigt werden dass durch diese zusätzliche Thiosulfat-Gruppe, die Celluloseketten von **6a** in ihrer Beweglichkeit stärker geschwächt werden als im Fall nur einer Thiosulfat-Gruppe. Dadurch wird die Packung der Celluloseketten stärker beeinträchtigt, was sich durch eine geringere Belegungsichte von **6a** gegenüber der Thiosulfat-CMC **8** auf Gold auswirkt. Durch die geringere Belegungsichte nimmt die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen $\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}}$ -Tropfen und TSHP-CMC Schicht ab und dementsprechend die Oberflächenrauigkeit zu. Somit zeigt eine mit TSHP-CMC beschichtete Goldoberfläche einen höheren Kontaktwinkel $\Theta_{\text{stat}}(\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}})$

als die Schicht der HTSHP-CMC **8**, was auf eine schlechtere Benetzbarkeit und Hydrophilie zurückzuführen ist.

Die Beschichtung eines Goldsubstrats mit **6a** ohne vorherige Aktivierung der Bisthiosulfatgruppen, zeigt einen doppelt so großen Kontaktwinkel von $\Theta_{\text{stat}}(\text{H}_2\text{O}_{\text{PB}}) = 25^\circ$ gegenüber der Probe mit Aktivierung. Dieser Befund ist dadurch zu erklären, dass aufgrund der anfänglich schwachen Bindung zwischen der Thio-CMC und Goldoberfläche, es zu einer nicht so guten Bedeckung des Goldsubstrats kommt wie im Fall der Beschichtung mit Voraktivierung. Dadurch nimmt die Oberflächenrauigkeit zu, was sich durch den größeren Kontaktwinkel gegenüber der Probe mit Aktivierung ausdrückt.

5.2 Aufbau und Charakterisierung von Monoschichten (SAMs) aus funktionellen Cellulosederivaten auf Silberoberflächen

5.2.1 Einleitung

Die ersten Arbeiten auf dem Gebiet der SAM-Bildung (*Self-Assembled Monolayers*) auf Silberoberflächen stammen aus dem Jahre 1991 von Mitarbeitern um Nuzzo und Whitesides. Diese untersuchten die SAM-Bildung und strukturbezogene Eigenschaften von *n*-Alkanthiolen auf unterschiedlichen Oberflächen wie Cu, Ag und Au [128, 129]. Harder *et al.* berichtete 1998 über den Einfluss der molekularen Konformation von Oligo-(Ethylenglykol) terminierten SAMs auf Ag- und Au-Oberflächen, auf die abweisenden Eigenschaften gegenüber Proteinadsorption.

Auf dem Gebiet der SAM-Bildung von funktionalisierten Polymeren auf Silberoberflächen, sind Arbeiten von Wenz *et al.* zu nennen [136]. Sie berichteten 2000 über die SAM-Bildung einer synthetischen Bisthiosulfatcellulose (TSHP) auf Silber. Das Adsorptions-Gleichgewicht der TSHP auf Silber wurde erst nach 24 h erreicht, verursacht durch die Oxidschicht auf dem Ag-Substrat. Die Monoschichten aus TSHP konnten mittels Ellipsometrie, Kontaktwinkel- und XPS-Messungen charakterisiert werden. Die ermittelten Schichtdicken betragen $d = 5.2 \pm 0.6$ nm. Zusätzlich wurde gezeigt dass aufgrund der dicht gepackten TSHP-Monoschichten, sich diese sehr gut als antikorrosive Beschichtung von Silbergegenständen eignen.

Basierend auf den oben erwähnten Arbeiten von Wenz *et al.* [60, 136] sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, das Verfahren für Silberoberflächen durch Auswahl einer geeigneten funktionellen Cellulose, hinsichtlich der Abscheidung (SAM-Bildung) und der antikorrosiven Eigenschaften, zu verbessern. Des Weiteren sollte die Eignung eines ausgewählten reaktiven Cellulosederivats als Substrat für die Anbindung von Biomolekülen auf Silberoberflächen, untersucht werden.

Nach erfolgreichem Aufbau und Charakterisierung der funktionellen Thiocellulosederivate auf Goldoberflächen, erwiesen sich die Monoschichten von HTSHP-CMC **8** und deren reaktiven Analoga, aufgrund der sehr guten Packung der Celluloseketten, als die Besten in Bezug auf Benetzbarkeit, Stabilität und Isolierungseigenschaften.

Daher wurde die HTSHP-CMC **8** als Substrat für den Aufbau von Monoschichten auf Silberoberflächen verwendet.

Zur Optimierung der Beschichtungsbedingungen (*Konzentration der Celluloselösung, Konzentration des Aktivierungsmittels, Adsorptionszeit*) von Derivat **8** auf Ag-Substrate, eignet sich die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) als Untersuchungsmethode. Zur Bestimmung der Schichtdicke und der Langzeitstabilität der Schichten wurde die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) herangezogen.

5.2.2 EIS-Untersuchungen an Monoschichten aus HTSHP-CMC **8 auf Silberoberflächen**

Die Adsorptionsversuche der HTSHP-CMC **8** wurden an Silberplättchen durchgeführt. Dabei spielen die Verschmutzungen und die Oxidschicht auf den Silberoberflächen eine entscheidende Rolle bei der anschließenden Abscheidung der Thio-CMC **8**. Demzufolge wurde ein Verfahren zur Reinigung der Ag-Plättchen entwickelt. Zuerst wurden die Ag-Plättchen mit Toluol entfettet. Kurz bevor die entfetteten Ag-Plättchen in die Reinigungslösung (*0.1 Gew. % NaCl und 0.001 Vol. % Eisessig*) eingetaucht worden sind, wurde die benutzte Vorlage mit Aluminiumfolie ausgelegt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Ag-Plättchen aus der Reinigungslösung entfernt, mit destilliertem Wasser gespült und anschließend getrocknet.

Bei der Verwendung des $K_3[Fe(CN)_6]$ als Elektrolytlösung war unter den eingesetzten Messbedingungen die Bildung eines $AgCN$ -Niederschlags auf den gereinigten Ag-Plättchen zu beobachten. Um dies zu vermeiden, musste eine andere Elektrolytlösung ausgewählt werden. Für die EIS-Messungen an Silberoberflächen erwies sich eine 1 mM $Fe^{2+/3+}$ -EDTA Lösung (EDTA: Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz) in 0.1 M Phosphat-Puffer pH 7.0 als geeignet.

Zur Bestimmung der Durchtrittswiderstände R_{ct} wurden die gemessenen Impedanzdaten wie im Falle der Messungen an Goldelektroden, als Ortskurven (Nyquist-Plot) aufgetragen und an das in Abbildung 5.17 dargestellte Ersatzschaltbild angepasst.

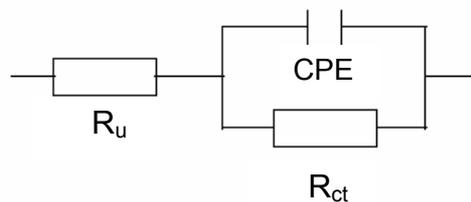


Abb. 5.17: Verwendetes Ersatzschaltbild bei der Auswertung der Impedanzdaten;
 R_u : Elektrolytwiderstand; CPE: Konstantphasenelement;
 R_{ct} : Durchtrittswiderstand.

In Abbildung 5.18 (a) ist die Ortskurve eines gereinigten Ag-Plättchens im Vergleich zu einem ungereinigten dargestellt.

EIS-Messungen an gereinigten Ag-Plättchen mit Defekten in der Oberfläche, wie z.B. Kratzer oder Unebenheiten, zeigten voneinander abweichende R_{ct} -Werte aufgrund der dadurch entstandenen unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten (siehe Abb. 5.18 (b)). Zusätzlich spielt auch die Zeit zwischen Reinigung der Ag-Oberflächen und den EIS-Messungen eine Rolle bei der akkuraten Bestimmung der R_{ct} -Werte der Ag-Plättchen. Es muss gewährleistet sein, dass die Ag-Substrate direkt nach der Reinigung gemessen werden, da sich die Oxidschicht auf den gereinigten Ag-Oberflächen relativ schnell ausbildet und es dementsprechend zu Abweichungen in den R_{ct} -Werten kommen kann.

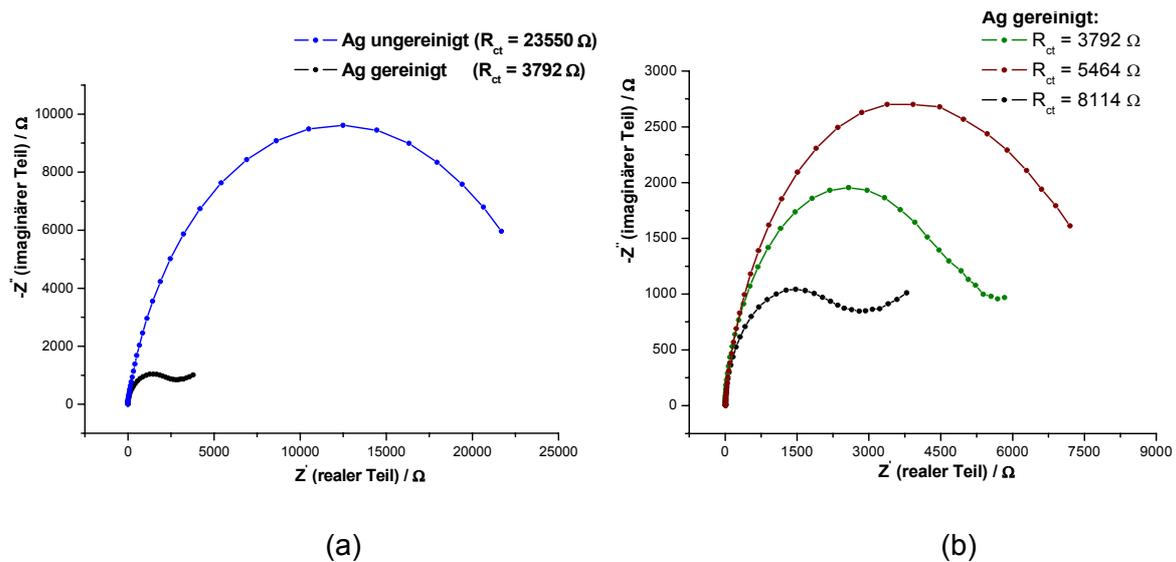


Abb. 5.18: Ortskurven von 1 mM $\text{Fe}^{2+/3+}$ -EDTA Lösung in 0.1 M Phosphat-Puffer pH 7.0 gemessen an:

- (a) einem ungereinigten bzw. gereinigten Ag-Plättchen;
- (b) gereinigte Ag-Plättchen mit unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten, gegenüber Ag/AgCl. Messbedingungen EIS: -300 mV Potential gegenüber Ag/AgCl mit einer Amplitude von 10 mV, Frequenzbereich: 10 kHz – 0.1 Hz; Beschichtungszeit $t_{\text{SA}} = 1$ h, Elektrodenoberfläche $A = 1 \text{ cm}^2$.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse aus den EIS-Messungen der gereinigten Ag-Plättchen, wurde nun versucht, die optimalen Beschichtungsbedingungen der Ag-Substrate mit der HTSHP-CMC **8** zu ermitteln.

Als Erstes wurde der Einfluss der *Konzentration* an Thio-CMC und *Aktivierungsmittel* bei der Abscheidung von **8** aus wässriger Lösung auf Ag-Oberflächen untersucht. Die HTSHP-CMC **8** wurde dazu unter sauren Bedingungen mittels Zitronensäure (ZS) aktiviert. Zur Beschichtung wurden Ag-Plättchen gleicher Oberflächenbeschaffenheit in die entsprechenden Lösungen eingetaucht. Nach einer Beschichtungszeit von $t_{\text{SA}} = 1$ h bei Raumtemperatur, wurden die EIS-Messungen durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen an **8** und an Aktivierungsmittel sind in Tabelle 5.13 zusammengefasst. Aus den R_{ct} -Werten für die gemessenen Schichten, lassen sich, wie im Falle der EIS-Untersuchungen an Goldoberflächen, die Belegungsgrade (θ) der Ag-Plättchen mit HTSHP-CMC **8** berechnen (siehe Tabelle 5.13).

Tabelle 5.13: Berechnete Belegungsgrade θ (nach Gleichung (5-15)) aus den R_{ct} -Werten der mit HTSHP-CMC beschichteten Ag-Plättchen; $R_{ct}(Ag) = 3792 \Omega$.

$C_{HTSHP-CMC}$ [Gew. %]	$C_{Zitronensäure}$ [M]	$R_{ct} [\Omega]$	θ
0.2	0.5	13424	0.72
0.1	0.5	23636	0.84
0.1	0.1	24981	0.85
0.1	0.2	30055	0.87

Aus Tabelle 5.13 lässt sich folgende Reihenfolge in der Beschichtungsqualität der Ag-Plättchen nach Abscheidung aus den unterschiedlichen Beschichtungs-lösungen, aufstellen:

0.1% HTSHP-CMC in 0.2 M ZS > 0.1% HTSHP-CMC in 0.1 M ZS \approx 0.1% HTSHP-CMC in 0.5 M ZS > 0.2% HTSHP-CMC in 0.5 M ZS.

Demzufolge ergab sich die Beschichtungslösung aus 0.1% HTSHP-CMC in 0.2 M Zitronensäure als die Beste in Bezug auf die Abscheidung von **8** auf Silberoberflächen.

Mit der 0.1%-igen Lösung von HTSHP-CMC **8** in 0.2 M Zitronensäure wurde des Weiteren der *Einfluss der Beschichtungszeit* t_{SA} auf die SAM-Bildung auf Silber, untersucht. Dazu wurden die Ag-Plättchen in die Beschichtungslösung eingetaucht und jeweils nach einer Beschichtungszeit von $t_{SA} = 1$ h bzw. 2 h mittels EIS gemessen. Die entsprechenden Ortskurven sind in Abbildung 5.19 dargestellt. Daraus ist zu sehen, dass eine Beschichtungszeit von $t_{SA} = 1$ h ausreichend ist, um Ag-Oberflächen optimal mit der HTSHP-CMC zu beschichten. Eine Verdoppelung von t_{SA} auf 2 h brachte keine zusätzliche Verbesserung.

Aus den in diesem Kapitel dargestellten EIS-Messungen kann man nun schlussfolgern, dass aus einer 0.1%-igen Lösung von HTSHP-CMC **8** in 0.2 M Zitronensäure nach einer Beschichtungszeit von $t_{SA} = 1$ h, sich auf Ag-Oberflächen Schichten ausbilden die den höchsten Belegungsgrad mit Derivat **8** besitzen.

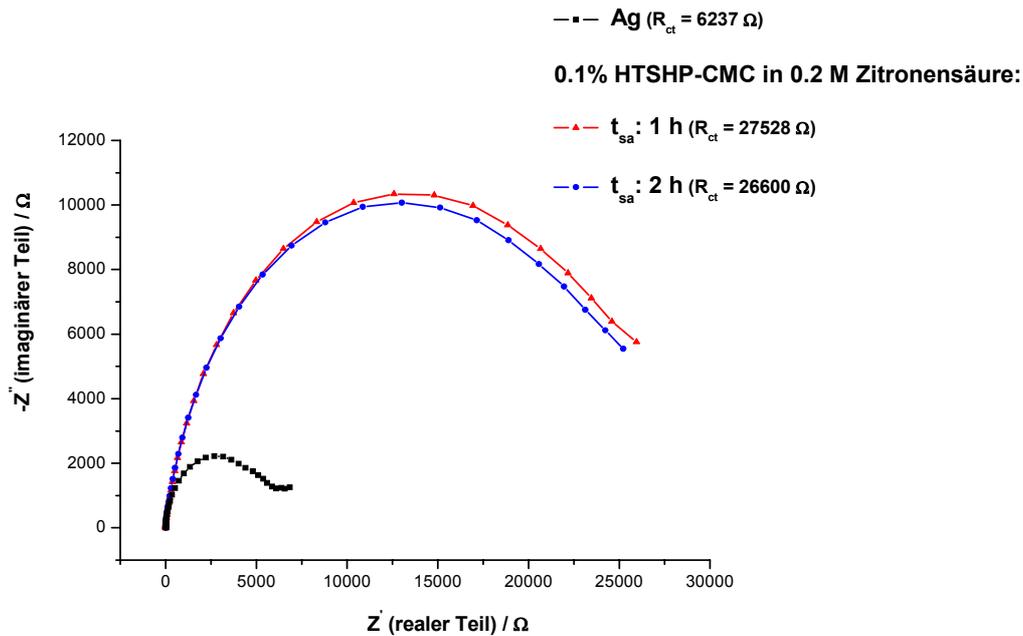


Abb. 5.19: Ortskurven von 1 mM $\text{Fe}^{2+/3+}$ -EDTA Lösung in 0.1 M Phosphat-Puffer pH 7.0 gemessen an mit HTSHP-CMC beschichteten Ag-Plättchen nach einer Beschichtungszeit von $t_{\text{SA}} = 1$ h respektive 2 h, gegenüber Ag/AgCl. Messbedingungen EIS: analog Abb. 5.18.

5.2.3 Ultradünner Korrosionsschutz aus HTSHP-CMC 8 auf Silber

Mit dem in Kapitel 5.2.2 vorgestellten Reinigungsverfahren und unter Verwendung der ermittelten optimalen Beschichtungsbedingungen für die Thiocellulose **8**, wurde nun getestet, ob diese auch die antikorrosiven Eigenschaften gegenüber Silber aufweist wie die schon in der Literatur beschriebenen TSHP-Cellulosen ^[60, 136]. Für diese Zwecke wurden Silberlöffel verwendet. Nach Reinigung der Silberlöffel wurden diese zur Hälfte in die 0.1%-igen Lösung von HTSHP-CMC **8** in 0.2 M Zitronensäure eingetaucht. Nach einer Beschichtungszeit von $t_{\text{SA}} = 1$ h bei Raumtemperatur wurden sie einem Korrosionstest unterzogen. Dazu wurden die Silberlöffel bis zu 48 h einer H_2S -Atmosphäre ausgesetzt. Die H_2S -Atmosphäre wurde *in situ* in der Korrosionskammer durch Lösen von Thioacetamid in Wasser (20 Gew. %-ige Lösung) erhalten. Um während des Korrosionstests eine homogene H_2S -Atmosphäre zu erzeugen, wurde die Korrosionskammer geschwenkt.

In Abbildung 5.20 ist ein gereinigter Silberlöffel und Silberlöffel nach 24 h bzw. 48 h in der Korrosionskammer zu sehen.



Abb. 5.20: Ultradünner HTSHP-CMC Korrosionsschutz an Silberlöffel:

- (a) Gereinigter Silberlöffel zur Hälfte beschichtet mit HTSHP-CMC **8**;
- (b) Gleicher Silberlöffel nach 24 h in der H₂S-Atmosphäre;
- (c) Silberlöffel nach 48 h in der Korrosionskammer.

In Abbildung 5.20 (a) ist zu sehen dass der gereinigte Silberlöffel seinen typischen Metallglanz nach der Beschichtung mit der HTSHP-CMC **8** nicht verliert. In Abbildung 5.20 (b) ist der gleiche Löffel nach 24 h in der sehr korrosiven H₂S-Atmosphäre gezeigt. Man sieht dass die obere unbeschichtete Hälfte des Silberlöffels eine bräunlich-schwarze Farbe aufweist die durch die Bildung von Silbersulfid auf der Silberoberfläche zu erklären ist. Hingegen ist die untere beschichtete Hälfte nur leicht gelblich. Diese Beobachtungen konnten auch bei einem Silberlöffel gemacht werden, der für 48 h der H₂S-Atmosphäre ausgesetzt wurde (siehe Abb. 5.20 (c)). Die gelbliche Farbe der beschichteten Unterhälften der Silberlöffel ist dadurch zu erklären, dass die H₂S-Gasmoleküle trotz der sehr dicht gepackten Celluloseketten, mit der Zeit durch die ultradünnen HTSHP-CMC Schichten an die Silberoberfläche diffundieren können.

Aufgrund der sehr korrosiven H₂S-Atmosphäre und der langen Ausstellungszeit in der H₂S-Atmosphäre, kann man schlussfolgern dass diese ultradünnen HTSHP-

CMC-Schichten als Korrosionsschutz sehr geeignet sind und somit Anwendung in der Galvanotechnik finden könnten.

5.2.4 SPR-Untersuchungen an Monoschichten aus funktionellen Thio-CMC Derivaten auf Silberoberflächen

Zur Bestimmung der Schichtdicke und der Langzeitstabilität der Schichten von funktionellen Thio-CMC Derivaten auf Ag-Oberflächen, wurde die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) herangezogen. Für die SPR-Versuche wurden Glasobjektträger (26 x 20 mm, $n = 1.61$) mit 40 ± 5 nm Ag bedampft.

Die Abscheidung der HTSHP-CMC **8** auf Silber erfolgte zunächst aus einer 0.1%-igen Lösung von **8** in 0.2 M Zitronensäure. Aufgrund der sauren Bedingungen (pH 2.0) löste sich jedoch nach kurzer Zeit die Ag-Schicht vom Objektträger. Somit konnten unter diesen Bedingungen keine Langzeitexperimente durchgeführt werden. Um die sauren Bedingungen zu vermeiden, wurde die Abscheidung von **8** unter neutralen Bedingungen (0.4 M Acetat-Puffer pH 6.8-7.0), unter Verwendung des schon vorgestellten TCEP als Aktivierungsmittel, durchgeführt. Die Kinetik der Abscheidung von **8** aus einer 0.1%-igen Lösung in 0.4 M Acetat-Puffer pH 6.8 (+ 0.1 Gew. % TCEP) auf Silber und die entsprechenden Reflektivitätskurven, sind in Abbildung 5.21 dargestellt.

In Abbildung 5.21 (a) ist zu sehen dass die Basislinie am Anfang der Kinetik (Spülen mit H_2O) aufgrund der sich ändernden Ag-Oberfläche stetig steigt. Nach Abscheidung der HTSHP-CMC **8** gefolgt vom Spülen zeigt die Basislinie einen konstanten Verlauf. Dies ist dadurch zu erklären, dass nach der Abscheidung von **8** sich die Ag-Oberfläche aufgrund der Isolareigenschaften dieser adsorbierten Schicht nicht mehr ändert. Um die Vollständigkeit der Oberflächenbelegung mit der HTSHP-CMC **8** zeitabhängig zu untersuchen wurde nach der Abscheidung das Laufmittel von H_2O auf 10 mM PBS-Puffer umgestellt. Nimmt die Belegungsdichte der adsorbierten Schicht mit der Zeit ab so besteht die Möglichkeit dass das KCl aus dem PBS-Puffer mit der Ag-Oberfläche, unter Bildung von AgCl, reagiert. Dies würde sich in der Kinetik durch ein starkes Driften der Basislinie auswirken. Beobachtet man nun den Verlauf der Kinetik in Abbildung 5.21 (a) so zeigt die Basislinie auch nach 6.5 Stunden einen konstanten Verlauf.

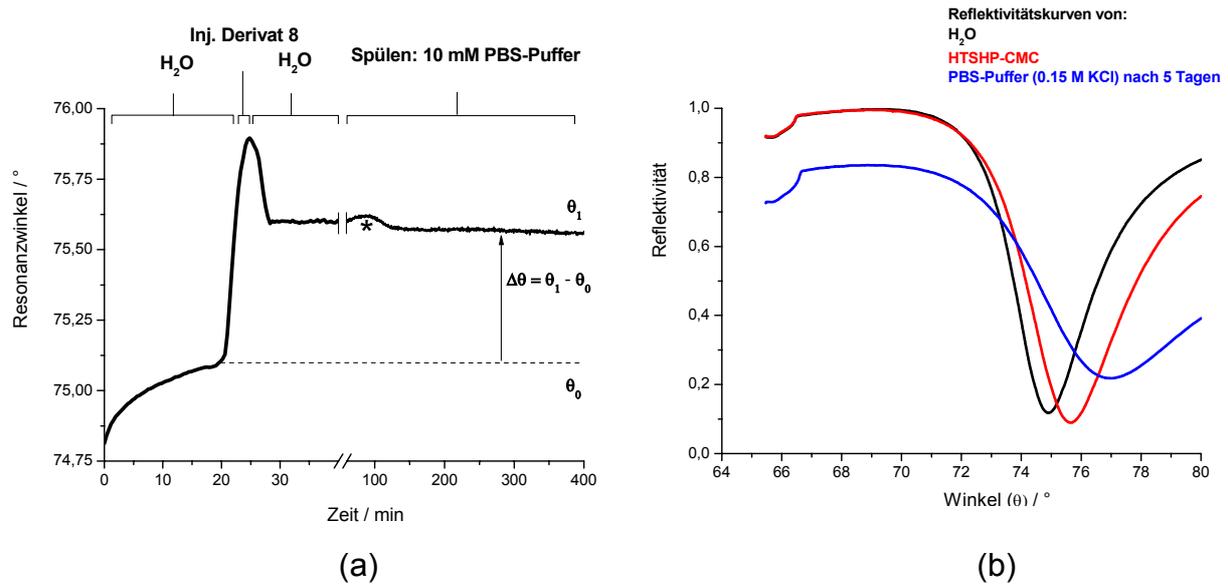


Abb. 5.21: (a) Adsorptionskinetik von Bunte-Salz **8** auf Silber bei $\lambda_{\text{MAX}} = 670 \text{ nm}$ (Flussrate: $68 \mu\text{l}/\text{min}$); *: Laufmittelwechsel: 10 mM PBS-Puffer pH 7.0; (b) Reflektivitätskurven von H₂O, HTSHP-CMC **8** und PBS-Puffer nach 5 Tagen bei Raumtemperatur.

Erst nach 5 Tagen bei Raumtemperatur zeigte sich eine Änderung in der Oberflächenbelegung. Die Änderung entspricht der blauen Reflektivitätskurve in Abbildung 5.21 (b). Diese erfolgte aufgrund der mechanischen Veränderung der Ag-Oberfläche durch das beginnende Ablösen der Ag-Schicht vom Objektträger und nicht durch die Reaktion des KCl-Salzes mit der Ag-Oberfläche. Auch Langzeitmessungen (2 Monate) an mit HTSHP-CMC beschichteten Ag-Plättchen in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 zeigten keine Abscheidung von AgCl auf den Oberflächen als Folge der Reaktion mit dem KCl-Salz aus dem Puffer.

Durch Anpassung der in Abbildung 5.21 (b) dargestellten Reflektivitätskurven für Wasser und Derivat **8** an simulierten Kurven (*Winspill 2.20*), wurde für die HTSHP-CMC **8** auf Silber eine Schichtdicke von $4.5 \pm 0.5 \text{ nm}$ berechnet.

Unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben wurde auch die Adsorptionskinetik der reaktiven MCT-HTSHP-CMC **17** auf Silber untersucht. Hier ist ebenso eine Stabilisierung der Basislinie im SPR, infolge der Ausbildung des MCT-HTSHP-CMC SAMs), zu beobachten. Auch nach 10 Stunden zeigt die Basislinie einen konstanten Verlauf (siehe Abbildung 5.22 (a)) was auf die antikorrosiven Eigenschaften des ultradünnen Films von **17** zurückzuführen ist.

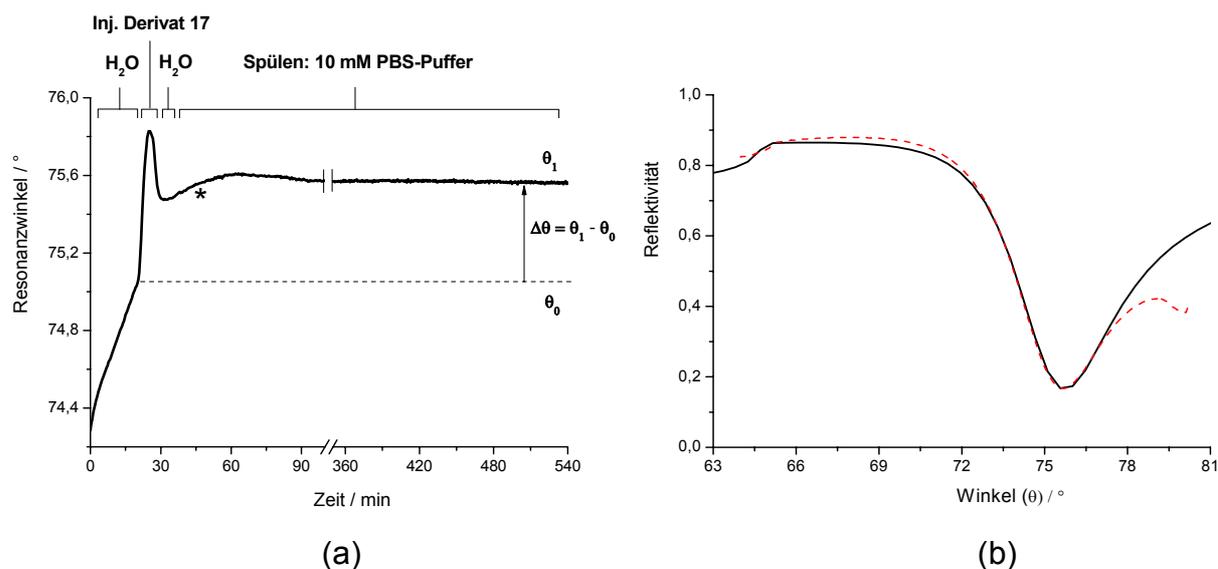


Abb. 5.22: (a) Adsorptionskinetik der reaktiven MCT-HTSHP-CMC **17** auf Silber bei $\lambda_{\text{MAX}} = 670 \text{ nm}$ aus einer 0.1%-igen Lösung von **17** in 0.4 M Acetat-Puffer pH 6.8 (+ 0.1% TCEP); (Flussrate: 68 $\mu\text{l}/\text{min}$);
 *: Laufmittelwechsel: 10 mM PBS-Puffer (0.15 M KCl) pH 7.0;
 (b) Bestimmung der Schichtdicke von **17**: Anpassung der experimentellen Reflektivitätskurve von **17** (-----) an die theoretisch erzeugte Kurve (—).

Für die Monoschicht von MCT-HTSHP-CMC **17** auf Silber wurde eine Schichtdicke von $3.6 \pm 0.5 \text{ nm}$ bestimmt (siehe Abb. 5.22 (b)).

Die Schichtdicken von **8** und **17** auf Silberoberflächen zeigen höhere Werte als erwartet, die fast doppelt so hoch wie die auf Gold sind.

Da zu Beginn der SPR-Experimenten, vor der Injektion der Thio-CMC Derivate **8** und **17**, die Aufnahme der Basislinie in H₂O (MilliQ) erfolgte, ist die gleichzeitige Bildung einer Oxidschicht auf die Ag-Oberfläche denkbar (in den SPR-Kinetiken durch einen stetigen Anstieg sichtbar). Dies würde die höher als erwarteten Werte der Schichtdicken von **8** und **17** erklären.

Durch die gezeigten antikorrosiven Eigenschaften gegenüber Silber, eignen sich die SAMs des MCT-Derivats **17** als Substrate zur Anbindung von Biomolekülen auf Silberoberflächen unter Verwendung der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie als optischer Transducer.

5.3 Aufbau und Charakterisierung von Monoschichten (SAMs) aus funktionellen Cellulosederivaten auf Silizium und Glasoberflächen

5.3.1 Einleitung

Neben den reinen Metallen (z. B.: Gold, Silber) bestehen viele Substratoberflächen für Beschichtungen aus Metalloxiden. Die Bedeutung oxidischer Oberflächen ist durch deren zentrale Bedeutung in der Halbleitertechnologie und die in den letzten Jahren als eigenständige Disziplin herangereifte Integrierte Optik begründet ^[241]. Insbesondere letztere stellt einen Bereich zunehmender technologischer Relevanz dar, welcher Problemlösungsansätze zur Anwendung in der Informationsverarbeitung und -übertragung, Sensorik und Messtechnik bietet. Die Verwendung von Oxiden als Wellenleitermaterial (z. B.: TiO_2 , Ta_2O_5) gewinnt mit der verbesserten Wellenleiterherstellung zunehmend an Bedeutung. Optische Sensoren, die auf oxidischem Material basieren, sind Gegenstand intensiver Forschung ^[101, 242, 243].

Gebräuchliche oxidische Oberflächen sind Silikate wie Gläser, Quarz und Glimmer deren Struktur und Eigenschaften sehr gut untersucht sind ^[244, 245]. So konnte auf Borosilikatgläser negativ geladene DNA durch Aufbringen positiver Ladungen über Coulomb-Wechselwirkungen immobilisiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie abgebildet werden ^[246]. Wieringa und Schouten berichten von Polymerisationen an aminomodifizierten Siliziumoberflächen ^[247, 248]. Burghard *et al.* stellten eine Methode vor, wie Kohlenstoff-Nanoröhren über Coulomb-Wechselwirkungen an einer positiv geladenen Siliziumoberfläche fixiert werden können ^[249]. Keller *et al.* berichteten über die Adsorption von polymeren Cyclodextrin-Einschlussverbindungen auf Glimmer ^[250].

Besonderes Interesse erlangten in den letzten Jahren auch die Untersuchungen von molekularen Erkennungsprozessen mittels atomarer Rasterkraftmikroskopie (AFM). Dabei werden Rezeptor und Ligand jeweils an einer Siliziumnitrid-Cantileverspitze und eine planare Substratoberfläche (z. B.: Siliziumwafer) gebunden. Auf dem Gebiet der Untersuchung von Streptavidin-Biotin Wechselwirkung mittels AFM sind Arbeiten von Florin *et al.* ^[251], Wagner ^[252], Lo *et al.* ^[253] und Yuan *et al.* ^[254] zu nennen. Micic

und Mitarbeiter berichteten über Rasterelektronenmikroskopie-Studien an Protein-funktionalisiertem Cantilever^[255].

Das Vorhaben dieses Kapitels ist der Aufbau von Monoschichten aus reaktiven Cellulosederivaten auf Silizium- bzw. Glasoberflächen, die nach entsprechender Charakterisierung zum Aufbau von Enzymschichtsystemen verwendet werden sollen. Um das reaktive Cellulosederivat an Silizium- bzw. Glasoberflächen kovalent anknüpfen zu können, müssen diese zuerst chemisch modifiziert werden.

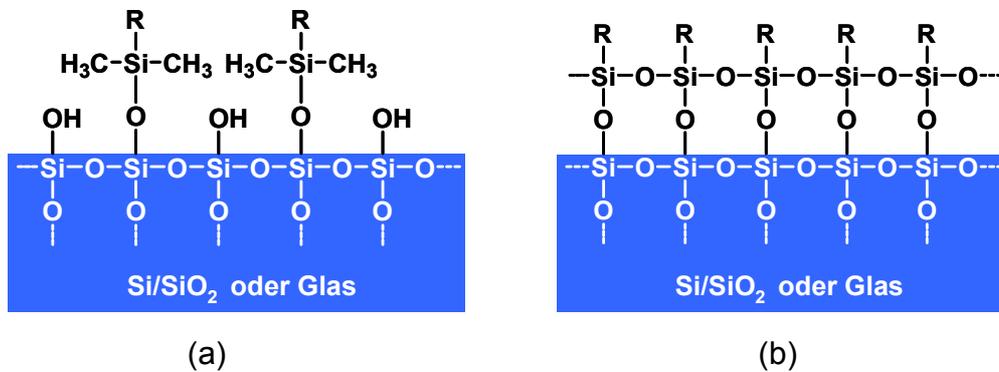
5.3.2 Modifizierte Silizium- bzw. Glasoberflächen

Silizium besitzt eine sehr niedrige Oberflächenrauigkeit und eignet sich somit sehr gut als Substrat zur Untersuchung von metallischen, anorganischen und organischen Schichten. Siliziumwafer haben bei Raumtemperatur einen etwa 2 nm dicken Siliziumdioxidfilm an der Oberfläche und somit auch reaktive Hydroxylgruppen. Im Durchschnitt trägt eine Siliziumoberfläche sieben Hydroxylgruppen pro Quadratnanometer, so dass eine ausreichende Anzahl an Verknüpfungspunkten für eine durchgehende Bedeckung zur Verfügung steht. Über eine gezielte Oxidation (siehe Kapitel 5.3.3) lässt sich noch eine Erhöhung der Zahl an Hydroxylgruppen und damit eine Aktivierung der Oberfläche erreichen^[247]. Durch Reaktion mit den an der Oberfläche des Siliziums vorhandenen Silanolgruppen können funktionelle Gruppen an das Substrat Silizium gebunden werden. Diese dienen wiederum als Verknüpfungspunkte für weitere, kovalent mit der Oberfläche verbundenen Makromolekülen wie Polymere (z. B.: funktionelle Cellulosederivate), Proteinen und Enzymen. Bereits 1978 wurden von Haller^[256] und 1980 von Sagiv^[76] erste SAMs aus Organosilanen auf Siliziumdioxid beschrieben.

Monoschichten aus Organosilanen bilden das Bindeglied zwischen Silizium (bzw. Siliziumdioxid) oder Glas und organischen Adsorbaten. Die meist verwendeten Silanisierungsreagenzien sind Alkyltrichlorsilane^[248] und Alkoxysilane^[257]. Dabei reagieren die Silanolgruppen an der Oberfläche mit den reaktiven Chlorsilanen unter Abspaltung von Salzsäure oder mit den weniger reaktiven Alkoxysilanen unter Abspaltung eines Alkohols.

Die Verwendung der weniger reaktiven Alkoxysilane erlaubt eine einfachere Kontrolle der Polymerisation an der Oberfläche.

Monofunktionelle Organosilane bilden monomere Schichten (Schema 5.5 (a)), trifunktionelle Organosilane hingegen lateral vernetzte Polymere auf der Oberfläche (Schema 5.5 (b)).



Schema 5.5: (a) Monoalkoxysilan-SAM bzw. (b) Trialkoxysilan-SAM auf Silizium- bzw. Glasoberflächen.

Die Abscheidung auf Silizium- und Glasoberflächen kann mittels leichtflüchtiger Silane aus der Gasphase ^[239, 258, 259] oder durch spontane Selbstadsorption aus Lösung ^[257, 260] erfolgen.

Durch geeignete Wahl der Endgruppe X am Silan werden reaktive Gruppen an der Siliziumoberfläche fest verankert. In einem weiteren Schritt können dann Moleküle kovalent an der Oberfläche gebunden werden, vergleichbar der Adsorption von Thiolen auf Goldoberflächen.

Eine der wichtigsten Modifizierungen von Silizium- bzw. Glasoberflächen stellt die Belegung mit Aminogruppen dar. Die Oberfläche kann durch die kovalent gebundene Aminogruppen, abhängig vom pH-Wert, positiv geladene Ammonium-Kationen tragen. Es ist so möglich, negativ geladene Moleküle oder Teilchen an einer mit Aminen modifizierten Silizium- bzw. Glasoberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen zu immobilisieren ^[249, 261]. Auch die Anbindung von Molekülen über deren Carbonsäurefunktionen an die aminosilanisierte Oberfläche eröffnet den Weg zu zahlreichen Anwendungen. So eignet sich ein mit Aminogruppen funktionalisiertes Kieselgel als heterogener, mehrfach verwendbarer Katalysator für die Knoevenagelkondensation ^[257].

Die Belegung der Silizium- bzw. Glasoberflächen mit organischen Schichten kann durch verschiedene oberflächenanalytische Methoden nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Charakterisierung des Aufbaus der Schichten auf Siliziumwafer, die Spektral-Ellipsometrie und als bildgebende Methode ^[262] die Fluoreszenzmikroskopie ^[263-266] verwendet.

5.3.3 Messprinzip der Spektral-Ellipsometrie

Die Bestimmung der Schichtdicke von Filmen auf nicht leitenden Substraten wie Metalloxiden, Silizium, Glas oder Glimmer ist mittels Ellipsometrie möglich [267, 268].

Die Ellipsometrie als zerstörungsfreies optisches Messverfahren beruht auf der Messung der Änderung des Polarisationszustandes einer an einer Probe reflektierten elektromagnetischen Welle, vorrangig im sichtbaren Spektralbereich.

Vollständig polarisiertes Licht lässt sich als Superposition zweier linear polarisierter, zueinander senkrecht stehender Wellen E_p und E_s darstellen (siehe Abb. 5.23 (a)). Die Reflexionseigenschaften einer Probe werden (makroskopisch) durch komplexe Reflexionskoeffizienten R beschrieben, die den Zusammenhang zwischen einfallendem (i) und reflektiertem (r) Feldvektor herstellen: $E^r = RxE^i$.

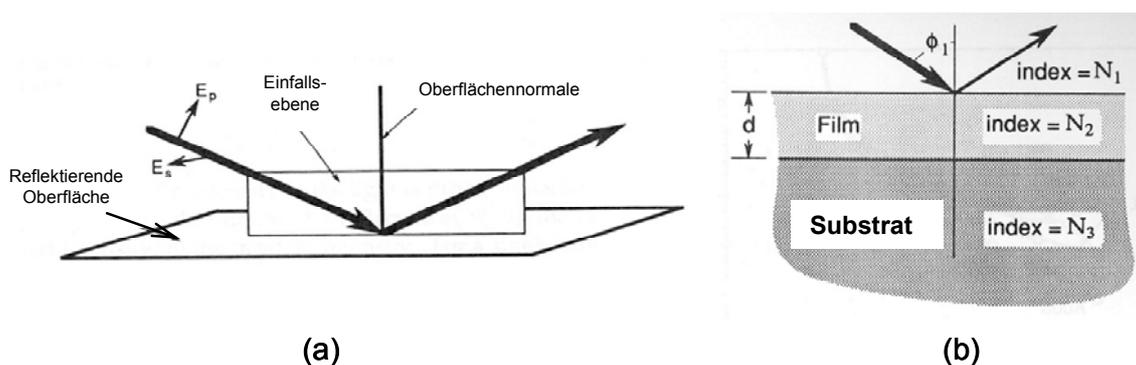
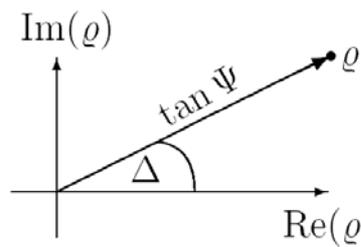


Abb. 5.23: (a) Reflexion von polarisiertem Licht an einer Probe; (b) Abhängigkeit der Reflexionskoeffizienten R von den optischen Eigenschaften der Probe (komplexer Brechungsindex und Schichtdicken); ϕ_1 : Einfallswinkel.

Für die Eigenpolarisationen (parallel und senkrecht zur Einfallsebene) lassen sich die Reflexionskoeffizienten aus den optischen Eigenschaften der Probe (komplexer Brechungsindex, Schichtdicken) berechnen. Nach Abbildung 5.23 (b) gilt:

$$R_p = R_p(N_1, N_2, N_3, d) \quad R_s = R_s(N_1, N_2, N_3, d) \quad (5-18)$$

Die Änderung des Polarisationszustandes bei Reflexion an der Probe wird durch den Quotienten der komplexen Reflexionskoeffizienten der parallel (R_p) und senkrechten (R_s) Komponente erfasst:

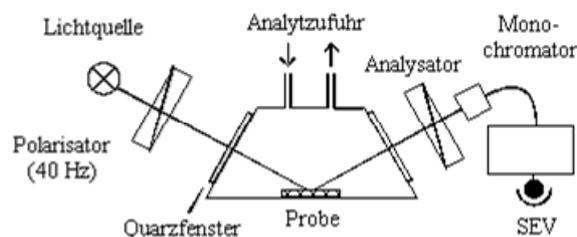


$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan(\Psi) \cdot \exp(i\Delta) \quad (5-19)$$

ψ (Psi) und Δ (Delta) sind die so genannten ellipsometrischen Winkel. $\tan\psi$ ist ein Maß für die Änderung des Amplitudenverhältnisses, die Größe Δ für die Änderung der Phasendifferenz zwischen der parallel und senkrecht polarisierten Teilwelle.

Lässt man Licht definierten Polarisationszustandes (= linear polarisiertes Licht) auf die Probe fallen, so kann man aus der Form der Polarisationsellipse nach der Reflexion auf die optischen Eigenschaften der Probe schließen, falls man ein Modell zugrunde legen kann, das beschreibt, wie die komplexen Reflexionskoeffizienten R_p und R_s von den Parametern der Probe (Brechungsindex, Schichtdicke) und den Messparametern (Einfallswinkel, Wellenlänge) abhängen.

Der schematische Aufbau eines Ellipsometers ist in Schema 5.6 gezeigt.



Schema 5.6: Schematischer Aufbau eines Ellipsometers mit Messzelle.

Das verwendete Spektral-Ellipsometer (Firma Nanofilm *Surface Analysis*) ist in Abbildung 5.24 dargestellt.

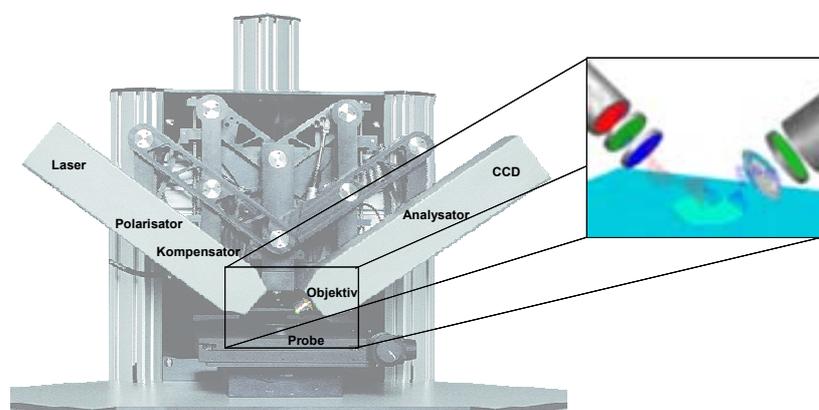


Abb. 5.24: Spektral-Ellipsometer (Firma Nanofilm *Surface Analysis*) mit variablen Einfallswinkel ($35-80^\circ$) und Laser-Wellenlängen (405, 532, 635 und 830nm).

Die Berechnung der Schichtdicken von adsorbierten Filmen mittels Ellipsometrie erfolgt durch Anpassung der experimentell ermittelten Werten für ψ und Δ (ψ_{exp} und Δ_{exp}) an theoretisch berechneten Werten (ψ_{ber} und Δ_{ber}). Die theoretischen Werte ψ_{ber} und Δ_{ber} werden anhand eines Schichtsystem-Modells (siehe Abb. 5.23 (b)) berechnet, bei genauer Kenntnis der Brechungsindizes von Substrat (n , k) und adsorbierter Schicht (n) und unter Angabe eines Anfangswertes für die Schichtdicke (d_{theor}) der adsorbierten Schicht. Der Anfangswert d_{theor} der Schicht wird solange variiert (wenn notwendig auch n bzw. k des Substrats in den erlaubten Grenzen) bis die Werte von $\psi_{\text{ber}} / \Delta_{\text{ber}}$ mit denen von $\psi_{\text{exp}} / \Delta_{\text{exp}}$ in Übereinstimmung gebracht werden.

5.3.4 Darstellung von aminofunktionalisierten Silizium- und Glasoberflächen

Um funktionelle Cellulosederivate auf Silizium- bzw. Glasoberflächen anbringen zu können, wurden diese in der vorliegenden Arbeit zuerst aminofunktionalisiert.

In der Literatur gibt es mehrere Verfahren zur Modifizierung von Silizium- bzw. Silikatoberflächen mit Aminogruppen. So werden neben 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APMS) ^[257, 260] und 4-Aminobutyldimethylmethoxysilan (ABMS) ^[247] auch 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) ^[249, 258] eingesetzt. Teils werden auch noch die sehr reaktiven Trichlorsilane verwendet, wie 1-Brom-11-(trichlorsilyl)undecan, welches an der Oberfläche mit Natriumazid in Dimethylformamid und anschließender Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran zum entsprechenden Alkylamin umgesetzt wird ^[248].

Die Funktionalisierungen der Silizium bzw. Glasoberflächen mit Aminogruppen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) durchgeführt. Aufgrund der geringeren Reaktivität von APES findet ein kontrollierbarer Schichtdickenzuwachs auf der Oberfläche der Siliziumwafer und Glasoberflächen statt.

Zur Darstellung von aminofunktionalisierten Glasoberflächen und Siliziumwafer müssen diese zuerst gereinigt und oxidiert (= aktiviert) werden.

Die Reinigung und Oxidation der benutzten Glas- und Siliziumoberflächen erfolgte nach einer Vorschrift von De Paoli ^[269] (siehe experimenteller Teil).

Die gereinigten und aktivierten Glasobjektträger bzw. Siliziumwafer wurden 5 bis 10 Minuten in eine Lösung 1 Vol. % 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) bei 60°C eingetaucht. Anschließend wurden diese mit reinem Lösungsmittel abgewaschen und mit gasförmigem Stickstoff getrocknet ^[269].

Mittels Ellipsometrie ^[270-272] wurden die Schichtdicken und deren Reproduzierbarkeit für zwei Lösungsmittel (*Ethanol* und *Toluol*) bestimmt und mit den in der Literatur bekannten Werten verglichen ^[269]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.14 zusammengefasst. Es wurden dabei jeweils zwei Proben hergestellt. Für jede Probe erfolgten ellipsometrische Messungen an drei bis vier verschiedenen Stellen der Probenoberfläche.

Tabelle 5.14: Bestimmung der Schichtdicken von APES-SAMs auf Siliziumwafer mittels Ellipsometrie und deren Reproduzierbarkeit in Abhängigkeit vom Lösungsmittel.

Lösungsmittel	Mittlere Schichtdicke d [nm]	Schwankungsbreite [nm]
Ethanol	0.65	0.05
Toluol	1.20	0.10

Die Schwankungsbreite gibt die maximale Abweichung von der mittleren Schichtdicke bei der Zahl der gemessenen Proben an.

Die erhaltenen Werte der Schichtdicken stimmen mit denen in der Literatur bekannten Werten sehr gut überein ^[269].

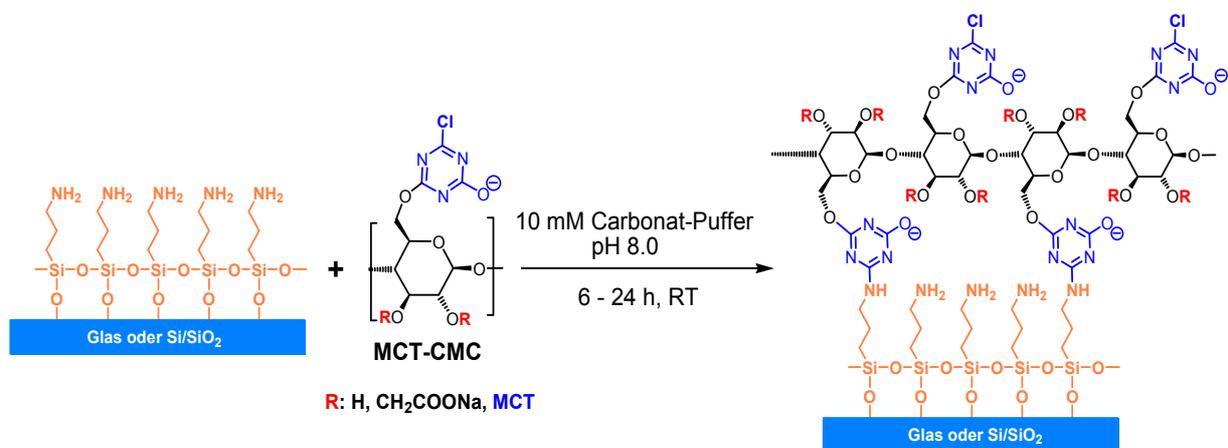
Für weitere Untersuchungen wurden Glas- bzw. Siliziumsubstrate benutzt die mit APES aus ethanolischer Lösung beschichtet wurden.

5.3.5 Darstellung von MCT-CMC funktionalisierten Silizium- und Glasoberflächen

Mit den APES beschichteten planaren Silizium (Si)- bzw. Glasoberflächen sollte es nun möglich sein, reaktive CMC-Derivate kovalent an die Oberfläche zu binden. Dazu eignet sich am besten die im Kapitel 4.3 beschriebene O-(2-Chlor-4-oxido-

1,3,5-triazin-6-yl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz (MCT-CMC Na) **20** (siehe Schema. 5.20).

Die „aktiven“ Chloratome der MCT-Gruppen von **20** können mit den Aminogruppen der APES-Schicht unter Freisetzung von Salzsäure reagieren. Aufgrund der β -1,4-glykosidischen Verknüpfung der Glcp-Einheiten von Derivat **20** ist gewährleistet, dass ein Teil der reaktiven MCT-Funktionalitäten zu den Aminogruppen der APES-Schicht orientiert sind, der restliche Teil hingegen nach außen (siehe Schema 5.7). Somit fungiert die MCT-Funktionalität als Ankergruppe zur Bindung an die APES modifizierte Oberfläche und als reaktive Funktionalität zur Anknüpfung von weiteren Makromolekülen (z. B.: Enzyme).



Schema 5.7: Immobilisierung von MCT-CMC **20** auf einer mit APES beschichteten Glas oder Silizium-Oberfläche.

Zur Anbindung der MCT-CMC **20** an APES funktionalisierten Glas oder Siliziumoberflächen wurden diese in einer 0.1%-igen Lösung von MCT-CMC in 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0-8.5 bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationszeit betrug zwischen 6 und 24 h. Anschließend wurden die beschichteten Si-Wafer gespült und getrocknet.

Mittels Ellipsometrie wurde die Schichtdicke des MCT-CMC-SAMs auf APES beschichtetem Siliziumwafer in Abhängigkeit der Inkubationszeit gemessen. Erst nach 6 h bei Raumtemperatur war der Belegungsvorgang abgeschlossen. Für die Bestimmung der Schichtdicke von **20** wurden jeweils drei Si-Wafer unter gleichen Bedingungen gereinigt und aktiviert. Ein Wafer diente zur Ermittlung der Schichtdicke der nativen SiO₂ Schicht nach der Reinigung. Der zweite und dritte Si-Wafer wurde nach der Reinigung und Aktivierung mit APES beschichtet. Dabei diente einer der

Als Vergleichsprobe wurde ein APES-modifizierter Siliziumwafer ohne MCT-CMC Beschichtung unter identischen Bedingungen in der SA-FITC Lösung inkubiert.

Um ein schnelles Ausbleichen des FITC-Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden, wurden die Proben im Dunkeln aufbewahrt.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie, unter Verwendung des entsprechenden FITC-Filters (siehe experimenteller Teil), wurden nun die zwei *trockenen* Proben abgebildet. Bei der Vergleichsprobe konnte keine Fluoreszenz detektiert werden, da das Streptavidin-FITC beim Spülvorgang ausgewaschen wurde.

Der schematische Schichtaufbau des SA-FITC modifizierten Si-Wafers und die abgebildete Oberfläche sind in Abbildung 5.25 (a) und (b) dargestellt.

In Abbildung 5.25 (b) ist sichtbar, dass nach Anregung des immobilisierten FITC-Fluoreszenzfarbstoffs, die Oberfläche gleichintensiv grün gefärbt ist. Dies spricht für eine gute Belegung des Si-Wafers mit SA-FITC und demzufolge auch mit MCT-CMC **20**. Auch das gleichmäßige Ausbleichen des belichteten Spots (= runder Fleck) (siehe Abb. 5.25 (c)) unterstützt diese Annahme.

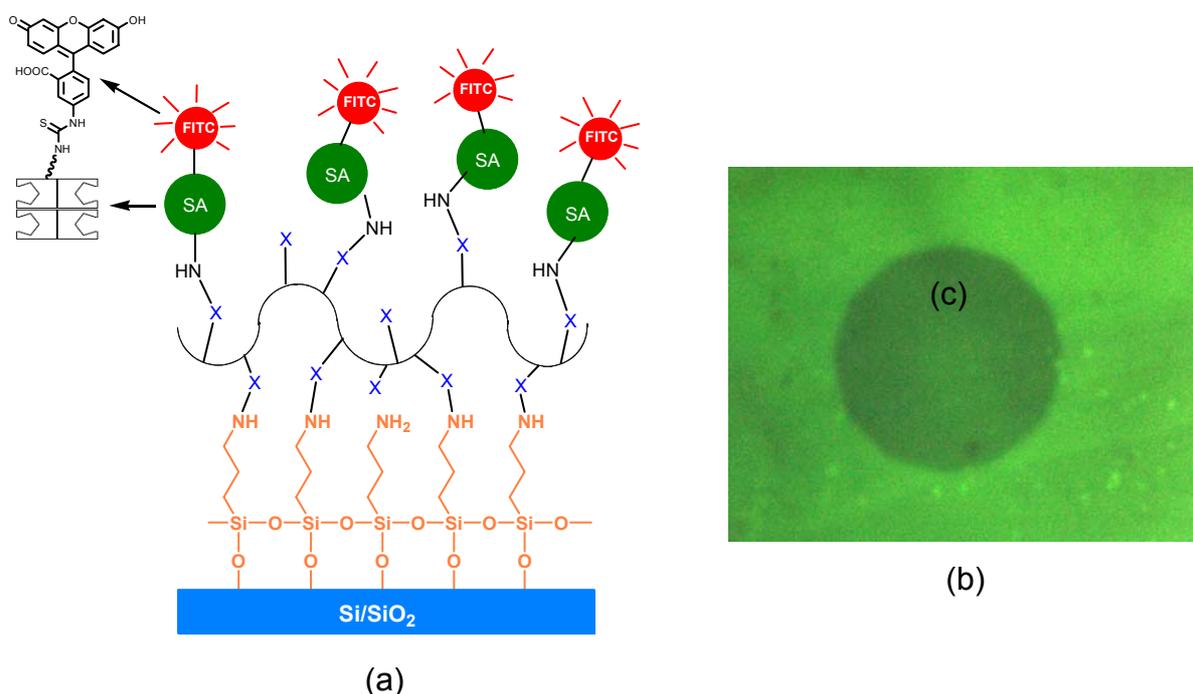


Abb. 5.25: (a) Schematischer Schichtaufbau eines SA-FITC modifizierten Si-Wafers; (b) Fluoreszenzmikroskopische Abbildung eines mit SA-FITC modifizierten MCT-CMC Si-Wafers; Messbedingungen: 400-fache Vergrößerung, Belichtungszeit: 493 ms; (c) Spot nach längerer Belichtungszeit.

5.4 Zusammenfassung

Die Abscheidung von MTh-CMC **3**, TSHP-CMC **6a/6b**, HTSHP-CMC **8** und deren reaktiven Analoga auf Goldoberflächen konnte *in situ* mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) erfolgreich verfolgt und untersucht werden. Dabei konnten aus den SPR-Kinetiken der jeweiligen Derivate die Schichtdicken (d) und Oberflächenbelegungen (Γ) ermittelt werden. Diese liegen in einem Bereich zwischen $d = 1.2$ bis 2.5 nm entsprechend $\Gamma = 1.19$ bis 2.49 mg/cm². Mit Hilfe oberflächenanalytischer Methoden konnten Aussagen über die Ausrichtung (FTIR-ERS), Oberflächenbeschaffenheit (Kontaktwinkel), Belegungsdichte, Beweglichkeit, Defekte und Isolierungseigenschaften (CV- und EIS-Messungen) der adsorbierten Monoschichten der Thio-CMC bzw. reaktiven Thio-CMC Derivaten getroffen werden. Es ergab sich folgende Reihenfolge in der Belegungsdichte der Thio-CMC SAMs auf Gold:

$$\text{HTSHP-CMC } \mathbf{8} > \text{TSHP-CMC } (\mathbf{6a/6b}) > \text{MTh-CMC } (\mathbf{3}).$$

Die reaktiven Thio-CMC Derivaten zeigten die gleiche Tendenz in der Qualität der SAMs wie die entsprechenden Thio-CMC Derivate:

$$\text{HTSHP-CMC}_{\text{reakt.}} > \text{TSHP-CMC}_{\text{reakt.}} > \text{MTh-CMC}_{\text{reakt.}}$$

Mit Hilfe elektrochemischer Untersuchungsmethoden wie CV und vor allem EIS konnte die Konzentrationsabhängigkeit bei der Beschichtung von Goldoberflächen mit MTh-CMC **3** untersucht werden. So ergab sich eine bessere Bedeckung der Goldoberflächen mit **3** nach Abscheidung aus einer 0.3%-igen Lösung als im Falle einer 0.1%-igen Lösung. Dieser Befund konnte durch die Annahme der freien Beweglichkeit der Methylthio-Ankergruppe (aufgrund der koordinativen Bindung zwischen Ankergruppe und Gold) und demzufolge auch der des Celluloserückgrats von **3** entlang der Goldoberfläche, erklärt werden.

Des Weiteren wurden die Isolierungseigenschaften des HTSHP-CMC-SAMs in Abhängigkeit des Substitutionsgrades an Thiosulfatgruppen ($\text{DS}_{\text{Thiosulfat}}$) mittels EIS untersucht. Es ergab sich folgende Reihenfolge in der Abschirmung der Goldoberfläche gegenüber Redoxreaktionen und demzufolge in der Qualität dieser SAMs auf Gold:

HTSHP-CMC ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.38$) > HTSHP-CMC ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.23$) \approx HTSHP-CMC ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$).

Der Aufbau von funktionellen Thiocellulosederivaten auf Silberoberflächen wurde am Beispiel der HTSHP-CMC **8** und der reaktiven MCT-HTSHP-CMC **17** gezeigt.

Mit Hilfe von EIS-Untersuchungen konnten sowohl die Reinigung von Silberoberflächen als auch die Beschichtungsbedingungen für Derivat **8** und **17** optimiert werden.

Durch SPR-Experimente konnten die Schichtdicken von **8** ($d = 4.5 \pm 0.5$ nm) und **17** ($d = 3.6 \pm 0.2$ nm) ermittelt werden. Diese sind fast doppelt so groß wie die auf Gold, wahrscheinlich aufgrund der Bildung einer Oxidschicht auf den Ag-Substraten, vor und während der Beschichtung mit den Cellulosederivaten. Anhand von Langzeitmessungen (SPR-Experimente) konnte des Weiteren gezeigt werden dass die Monoschichten von **8** und **17** zu einer sehr guten Passivierung der Silberoberflächen führen. Anhand von Beschichtungsversuchen an Silberlöffel erwies sich die HTSHP-CMC **8** als geeignet zur antikorrosiven Beschichtung von Silbergegenständen.

Der Aufbau von Monoschichten auf Silizium- und Glasoberflächen erfolgte durch Abscheidung der reaktiven MCT-CMC **20** aus wässriger Lösung auf mit APES (3-Aminopropyltriethoxysilan) funktionalisierten Silizium- bzw. Glasoberflächen. Mittels Ellipsometrie konnte der Schichtaufbau verfolgt werden und die Dicke der jeweiligen Schichten berechnet werden. Für die MCT-CMC Schicht wurde eine Dicke von $d = 3.46 \pm 0.20$ nm ermittelt die in guter Übereinstimmung mit den Dicken der Monoschichten auf Gold ist. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten dass die Silizium-Oberflächen eine gleichmäßige Bedeckung mit MCT-CMC **20** aufweisen.

6. Molekulare Erkennung an reaktiven Cellulosederivate Monoschichten

6.1 Einleitung

Das Immunsystem und die Enzym-Substrat Erkennung sind Beispiele für natürliche, spezialisierte und hoch affine *Erkennungssysteme* [273, 274]. Zum besseren Verständnis solcher physiologischen Erkennungsvorgängen versucht die Forschung der letzten Jahre verstärkt solche Rezeptor-Ligand-Systeme an Oberflächen zu binden und durch spezifische Detektionsmethoden zu untersuchen [274].

Immunosensoren sind ligandaffinitäts-messende Sensoren, bei denen immunochemische Reaktionen (Antigen-Antikörper Wechselwirkung) über eine *Transducerschaltung* aufgezeichnet werden [103, 275-277].

Als Substrate zur Anbindung von Antigenen bzw. Antikörpern auf Sensoroberflächen werden allgemein Alkanthiol- [278] und Polymer-Schichtsysteme [117-119] verwendet. Diese besitzen die notwendigen Funktionalitäten (z. B: COOH) die vor der Anknüpfung der Proteine aktiviert werden müssen [186, 278].

Eine Vielzahl an *Transducern* für die Immunosensorik ist heutzutage bekannt. Die meisten basieren auf *optischen* [119, 279-281, 282] oder *mechano-akustischen* Phänomenen [112, 283-285]. Einige Geräte die solche Transducer benutzen, z. B. das *Biacore* System [119, 286], sind handelsüblich erhältlich.

Eine alternative Methode zur Detektion der Antigen-Antikörper Bindung kann aber auch die Messung der elektrischen Kapazität dieser Rezeptor Schichten sein [287, 288]. Auf dem Gebiet solcher kapazitiven Immunosensoren sind auch Arbeiten von Mirsky *et al.* [278, 289] und Pyun *et al.* [290] zu nennen.

Nach den DNA-Microarrays rücken Protein-Arrays immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Dabei spielt die Immobilisierung eine immer größere Rolle.

Die Eignung von reaktiven Thio-CMC Derivaten als Substrate zur Anbindung von Proteinen und die anschließende Untersuchung deren Erkennungsreaktionen, soll in diesem Kapitel anhand des Antikörper-Antigen Affinitätssystems Anti-BSA (aBSA)-BSA (BSA: *Bovine Serum Albumine; Rinderserum-Albumin*) gezeigt werden.

Die Immobilisierung des aBSA bzw. BSA an reaktiven Thio-CMC Monoschichten auf Gold- bzw. Silberoberflächen und die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen aBSA und BSA soll *in situ* mittels SPR-Spektroskopie verfolgt werden.

6.2 Affinitätssystem: Anti-BSA-BSA

Antikörper: Anti-BSA

Eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung makromolekularer Fremdstoffen (*Antigene*) im Körper spielt die *humorale Immunität*, die durch *Antikörper* vermittelt wird. Antikörper sind eine Klasse von Proteinen, die synonym auch als Immunglobuline bezeichnet werden. Sie sind eine der wichtigsten Proteinkomponenten des Blutes und machen etwa 20% aller Plasmaproteine aus [291]. Sie werden ausschließlich von B-Lymphozyten hergestellt.

Die Grundstruktur eines Antikörpermoleküls besteht aus vier Polypeptidketten (Abb. 6.1). Zwei identische leichte Ketten (L-Ketten) aus jeweils ca. 220 Aminosäuren und zwei identische schwere Ketten (H-Ketten) aus jeweils ca. 450-600 Aminosäuren.

Es gibt nur zwei Arten von L-Ketten, die k und die l Ketten. Im Gegensatz dazu gibt es 5 Hauptklassen von H-Ketten, die man als Isotypen bezeichnet. Sie bestimmen die funktionellen Immunglobulinklassen eines Antikörpermoleküls, und werden als IgM, IgD, IgG, IgA und IgE gekennzeichnet. IgG hat eine schwere Kette vom Typus γ (weil griechisch für g = γ), IgM eine vom Typus μ (weil griechisch für m = μ), usw. Die H-Ketten und L-Ketten werden untereinander durch Disulfidbrücken zusammengehalten (siehe Abb. 6.1).

Die Struktur des Antikörpermoleküls wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt und ist Y-förmig (siehe Abb. 6.1). Jede Kette ist in getrennten *Domänen* aufgefaltet, die Unterregionen von etwa 110 Aminosäuren entsprechen. Die obersten 4 Domänen haben stark variierende Sequenzen: diese Region heißt die variable Region (Domänen VH und VL). Die weiteren Regionen haben konstante Domänen (CH und CL), die typisch sind für den Isotyp (H-Kette) oder für die k- oder l-Kette (L-Kette).

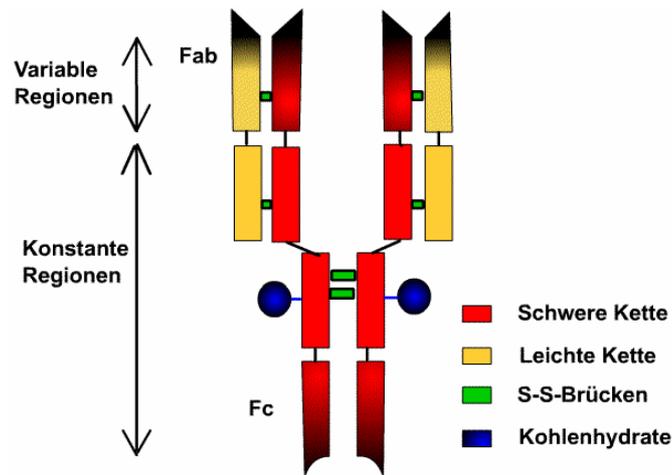


Abb. 6.1: Struktur eines IgG Antikörpers.

Mit Hilfe eines proteolytischen Enzyms (Papain), das Polypeptidsequenzen an einer bestimmten Aminosäure oder Aminosäuresequenz spaltet, werden Antikörper in zwei Fragmenten zerteilt: das Fab-Fragment (= variablen Enden des Antikörpers), welches das Antigen binden kann, und das Fc-Fragment, das an zelluläre Rezeptoren bindet.

In jeder variablen Region (Fab) gibt es des Weiteren drei Bereiche mit hypervariabler Aminosäuresequenz, den komplementaritätsbestimmenden Regionen (*Complementarity Determining Regions*, CDR) ^[292].

Diese sechs CDRs, die aus ca. 50 Aminosäuren bestehen, bilden die Region des Antikörpers, an welcher das Antigen gebunden wird (*Paratop*).

Das verwendete *Anti-BSA* (aBSA) ist ein typisches Antikörpermolekül der IgG-Klasse. Es ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa (Kilodalton).

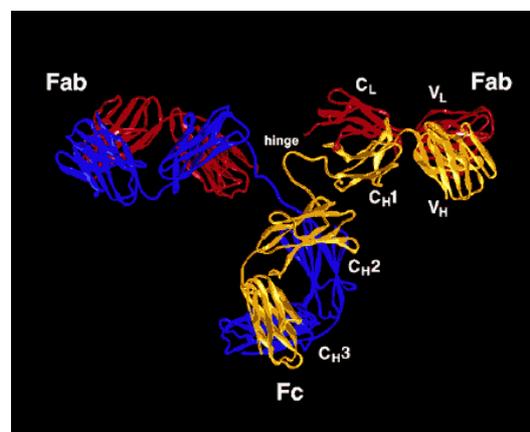


Abb. 6.2: Struktur des aBSA (IgG).

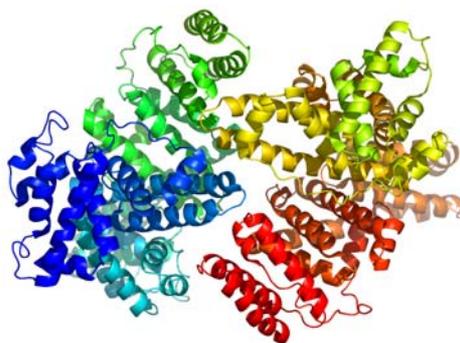
Antigen: BSA

Antigene sind Stoffe der belebten oder unbelebten Umwelt, gegen die in einem Organismus Antikörper gebildet werden. Die genaue Stelle (*Paratop*, etwa 3-4 Aminosäuren oder Kohlenhydratreste groß) an die der Antikörper (Ak) bindet heißt *antigene Determinante* oder *Epitop*. Verschiedene Antikörper binden an verschiedene Antigen determinanten, da jeder Ak spezifisch für eine bestimmte Stelle des Antigens ist. Wichtige Induktoren der Antikörperproduktion sind Mikroorganismen, wie Bakterien, welche in den Organismus eindringen. Jedes Antikörpermolekül verbindet sich nur mit einer bestimmten Antigen determinante eines der Proteine oder Kohlenhydratreste des Mikroorganismus. Da dieser hunderte verschiedene solcher Epitope synthetisiert bedeutet das, dass Mikroorganismen die Produktion vieler verschiedener Antikörper gleichzeitig induzieren.

Ein Antigen muss folgende Eigenschaften besitzen: zum einen soll es an der Oberfläche Strukturen tragen, welche dem Immunsystem fremd sind, zum anderen eine besondere Struktur aufweisen, welche nicht zu einfach sein darf. Des Weiteren soll es ein Molekulargewicht von mindestens 15 kDa besitzen. Es gibt auch kleinere Antigene (die so genannten *Haptene*), die in Verbindung mit anderen Proteinen dennoch zur Antikörperbildung Anlass geben. Antigene sollen letztendlich phagozytiert und enzymatisch abgebaut werden können und in genügend hoher Konzentration vorliegen.

Die klinisch wichtigsten Antigene sind die zellulären (z.B.: Bakterien, Viren) und hochmolekularen (z.B. Glykoproteine, Nukleinsäuren) Antigene.

Das verwendete BSA gehört zu der Klasse der hochmolekularen Antigene mit einer Molmasse von 66 kDa. Die Struktur und Dimensionen des BSAs sind in Abbildung 6.3 dargestellt.



5.97 x 9.70 x 5.97 nm

Abb. 6.3: Bandstruktur (α -Helices) und Dimensionen des BSA Antigens ^[293].

6.3 Antigen-Antikörper Bindung

Bei der Annäherung zweier Proteine (Antigen und Antikörper) in Lösung treten unspezifische Abstoßungskräfte aufgrund der hydrophilen Natur der beiden solvatisierten Moleküle auf. Diese repulsiven Kräfte haben eine Reichweite von ca. 2-3 nm.

Damit eine Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper auftreten kann, müssen diese Kräfte durch entsprechend langreichweitige (>3 nm) Anziehungskräfte überwunden werden ^[294]. Die wichtigsten Kräfte für eine primäre Anziehung zwischen Epitop und Paratop sind hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen. Die treibende Kraft für die hydrophobe Anziehung solvatisierter Verbindungen liegt in der freien Enthalpie der Kohäsion von Wasser, die durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen wird. Abhängig vom betrachteten Molekül kann dieser Effekt überwiegend ein entropischer, enthalpischer oder eine Mischung aus beiden Effekten sein ^[295]. Die Reichweite dieser Kräfte liegt dabei im Bereich von 3-10 nm.

Die elektrostatischen Coulomb-Wechselwirkungen beruhen auf der elektrostatischen Anziehung zwischen gegensätzlich geladenen Gruppen des Epitops und Paratops. Diese Wechselwirkungen sind abhängig vom Abstand der beiden Moleküle (Tabelle 6.1) und der Dielektrizitätskonstante. Somit hängen sie auch von der Ionenstärke und dem pH-Wert des umgebenden Mediums (Tabelle 6.1) ab.

Tabelle 6.1: Abhängigkeit der Orientierungskräfte von der Ladung (q) bzw. Dipolmoment (μ) und dem Abstand (r).

Wechselwirkung	$\overline{E}_{attr.}$ (gemittelt über alle Orientierungen)
Monopol – Monopol	$\sim \frac{1}{\epsilon\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r}$
Monopol – Dipol	$\sim \left(\frac{1}{\epsilon\epsilon_0}\right)^2 \frac{1}{T} \frac{q^2 \mu^2}{r^4}$
Dipol – Dipol	$\sim \left(\frac{1}{\epsilon\epsilon_0}\right)^2 \frac{1}{T} \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{r^6}$

Die Bindung des Antigens an den Antikörper beruht also wie oben aufgeführt auf der Ausbildung vieler schwacher, nicht kovalenter Bindungen, wie hydrophober Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, van der Waals Kräfte und Ionenbindungen. Die Reaktion eines einzelnen Epitops eines Antigens (Ag) mit einer einzelnen Antigenbindungsstelle des Antikörpers (Ak) kann ausgedrückt werden als:



Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich damit für die Affinitätskonstante folgende Gleichung:

$$K_a = \frac{k_{\text{ass}}}{k_{\text{diss}}} = \frac{[\text{AgAk}]}{[\text{Ag}][\text{Ak}]} \quad (6-2)$$

Dabei ist oftmals die Energie, die zur Dissoziation eines Antigen-Antikörper-Komplexes notwendig ist, größer als die Energie, die aus der Assoziationsreaktion gewonnen werden kann. Dieses Phänomen wird als Hysterese bezeichnet und wird durch Ausbildung von zusätzlichen sekundären Bindungen begründet ^[296].

Die Werte für die Affinitätskonstante liegen üblicherweise im Bereich zwischen 10^4 l/mol (niedrigaffin) und 10^{11} l/mol (hochaffin).

6.4 Antikörper-Antigen Affinitätsexperimente an reaktiven Cellulose-Monoschichten auf Gold und Silber

Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Anti-BSA (aBSA) und BSA erfolgte nach Anbindung einer der beiden Komponenten (BSA oder aBSA) an eine reaktive Cellulose-Monoschicht auf Gold oder Silber.

Als Substrate zur kovalenten Anknüpfung von BSA bzw. aBSA wurden der NHS-Aktivester **16** (TSHP-CMC-NHS) und das Monochlortriazinyl-Derivat **17** (MCT-HTSHP-CMC) eingesetzt.

Die *spezifische* (=kovalente) Immobilisierung von Antigen bzw. Antikörper an das reaktive Cellulose-Substrat als auch die anschließenden Affinitätsexperimente wurden *in situ* mittels SPR-Spektroskopie verfolgt.

6.4.1 Unspezifische Bindung von BSA an einer HTSHP-CMC beschichteten Goldoberfläche

Um auf eine kovalente Immobilisierung des BSAs bzw. aBSAs an reaktive Cellulose-Monoschichten rückschließen zu können ist es entscheidend das Ausmaß an *unspezifischer Bindung* (elektrostatische, hydrophobe Wechselwirkungen) dieser Proteine an den Cellulose-Monoschichten auf Gold oder Silber zu kennen. Vor allem ist das BSA für starke unspezifische Wechselwirkungen mit Materialien wie Glas oder hydrophobisiertem Glas bekannt ^[271, 272].

Um das Ausmaß der unspezifischen Bindung zu untersuchen, wurde das BSA an nicht reaktive Thio-CMC Schichten adsorbiert und die Adsorptionskinetik mittels SPR-Spektroskopie verfolgt.

In Abbildung 6.4 ist die Adsorptionskinetik von BSA an einer mit Thiosulfat-CMC Derivat **8** (HTSHP-CMC) beschichteten Au-Oberfläche gezeigt.

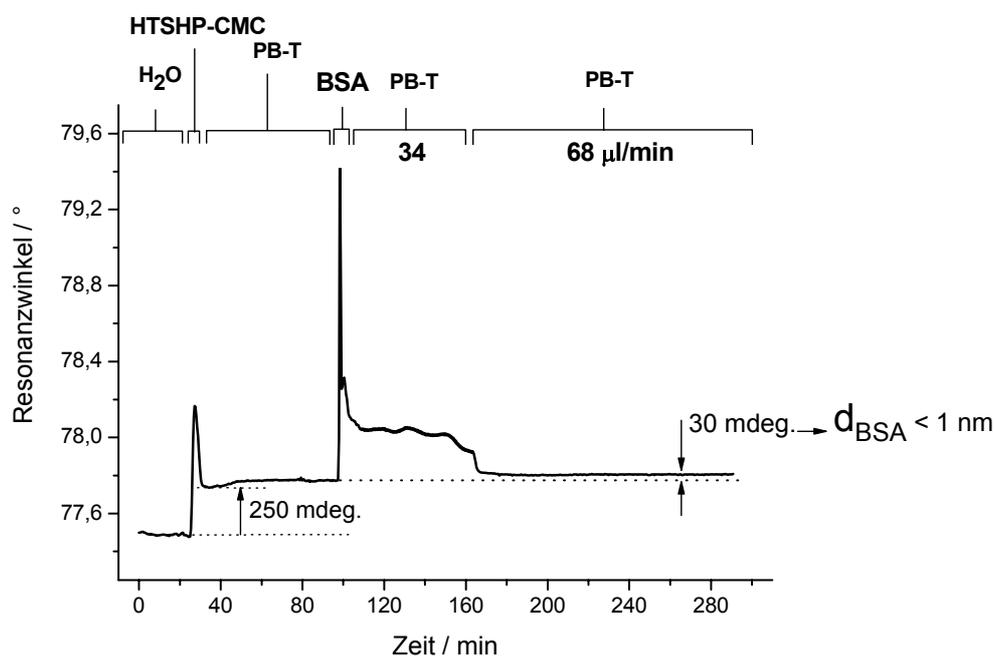


Abb. 6.4: Adsorptionskinetik von BSA an einer HTSHP-CMC funktionalisierten Au-Oberfläche; Konzentration an BSA: 0.5%-ig in 10 mM PBS-Puffer pH 7.2 (PBS: Phosphat-Puffer + 0.15 M KCl); PB-T: 10 mM PBS-Puffer + 0.5% Tween-20.

Die Abscheidung der HTSHP-CMC **8** ($DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$) auf Gold erfolgte aus einer 0.1%-igen Lösung von **8** in 0.2 M Zitronensäure bei einer Flussrate von 34 µl/min. Nach Ausbildung des HTSHP-CMC SAMs auf Gold wurde das Laufmittel von

Wasser auf 10 mM PB-T Puffer pH 7.2 umgestellt, gefolgt von der Adsorption des BSAs aus einer 0.5%igen Lösung von BSA in 10 mM PBS-Puffer pH 7.2. Die Desorptionskinetik in Abbildung 6.4 zeigt, dass das BSA langsam dissoziiert. Die verbleibende BSA-Schichtdicke war kleiner als 1 nm. Diese entspricht einer sehr niedrigen unspezifischen Adsorption des BSAs an die Thio-CMC Schicht.

Das BSA zeigt gegenüber der Bisthiosulfat-CMC **6** (TSHP-CMC) das gleiche Adsorptionsverhalten. Die adsorbierte BSA Schicht zeigte auch hier eine Schichtdicke von weniger als 1 nm.

6.4.2 Allgemeiner Aufbau eines Immunsensors auf Basis von reaktiven Cellulosederivaten

Nachdem gezeigt werden konnte dass das BSA sehr niedrige unspezifische Wechselwirkungen mit Cellulose-Monoschichten eingeht, wurde ein Immunsensor auf Basis von reaktiven Cellulosederivaten (TSHP-CMC-NHS **16** und MCT-HTSHP-CMC **17**) auf Gold und Silber aufgebaut.

Der allgemeine Schichtaufbau umfasst drei Durchführungsschritte:

- 1. Abscheidung der reaktiven Thio-CMC auf Gold oder Silber*
- 2. Immobilisierung des Antikörper oder Antigens an der reaktiven Cellulose-Monoschicht*
- 3. Deaktivierung der restlichen Reaktivgruppen der Cellulose-Monoschicht mit Taurin oder Ethanolamin*

1. Abscheidung der reaktiven Thio-CMC auf Gold oder Silber

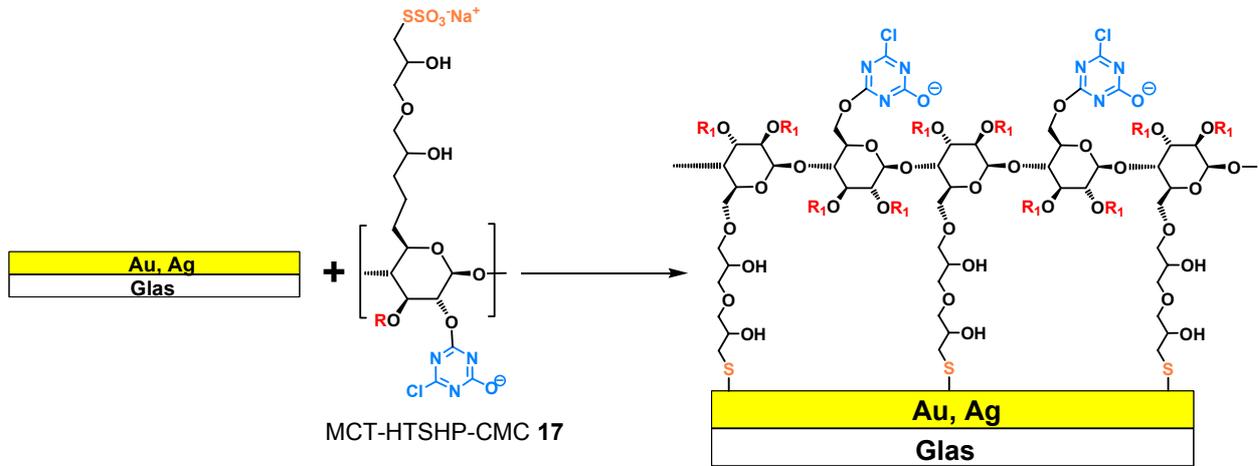
Im ersten Schritt des Aufbaus wurde die reaktive Thio-CMC aus wässriger Lösung auf die Gold (Au)- oder Silber (Ag)-Oberfläche abgeschieden.

Die Ausbildung des TSHP-CMC-NHS SAMs erfolgte aufgrund der Säure/Base-Labilität der *N*-Hydroxysuccinimid-Gruppe, ohne Voraktivierung der Thiosulfat-Gruppen, bei pH 7.0. Die Abscheidung von MCT-HTSHP-CMC **17** wurde durch saure Aktivierung der Thiosulfat-Gruppen erreicht (pH 2.0).

Schema 6.1 zeigt die schematische Abscheidung am Beispiel der MCT-HTSHP-CMC **17** auf eine Au- oder Ag-Oberfläche.

Bei der Beschichtung der Au- bzw. Ag-Oberflächen mit den reaktiven Thio-CMC Derivaten wurde darauf geachtet, dass die zur Verfügung stehende Oberfläche

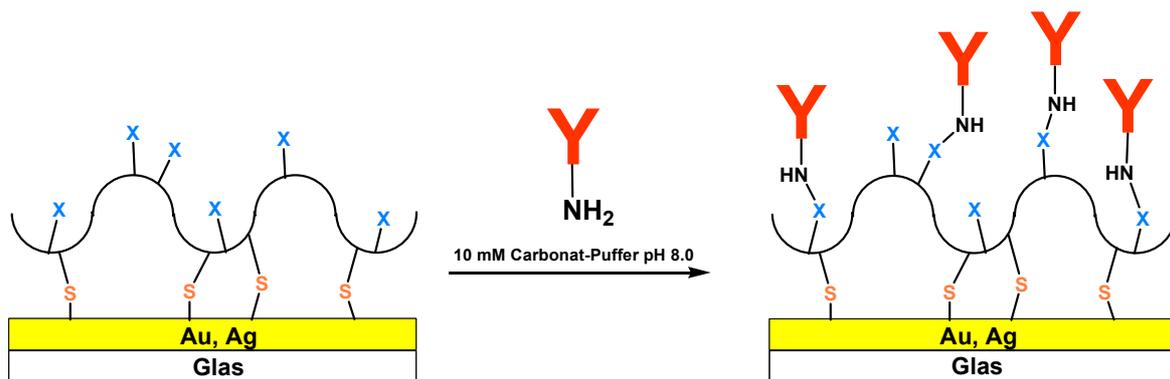
(definiert durch die Messzelle) mit dem entsprechenden Derivat vollständig belegt wird, da Proteine auch an Au- bzw. Ag-Oberflächen unspezifisch haften können.



Schema 6.1: Abscheidung von MCT-HTSHP-CMC **17** auf eine Au- bzw. Ag-Oberfläche; Schichtdicke und Oberflächenbelegung von **17** auf Gold: $d_{\text{MCT-HTSHP-CMC}} = 1.80 \pm 0.20 \text{ nm}$, $\Gamma = 1.79 \pm 0.20 \text{ mg/m}^2$.

2. Immobilisierung des Antikörper oder Antigens an die reaktive Cellulose-Monoschicht

Die Immobilisierung des aBSA oder BSA an die reaktive Cellulose-Monoschicht erfolgte durch die Reaktion der freien Aminofunktionen der Lysin-Reste an der Peripherie des aBSAs oder BSAs ^[127], mit den NHS-Gruppen von Derivat **16** bzw. mit dem Cl-Atomen der MCT-Gruppen von Derivat **17** (Schema 6.2).



Schema 6.2: Immobilisierung eines Antikörpers (z. B.: aBSA) an einer mit MCT-HTSHP-CMC funktionalisierten Au- bzw. Ag-Oberfläche; X: MCT-Gruppe.

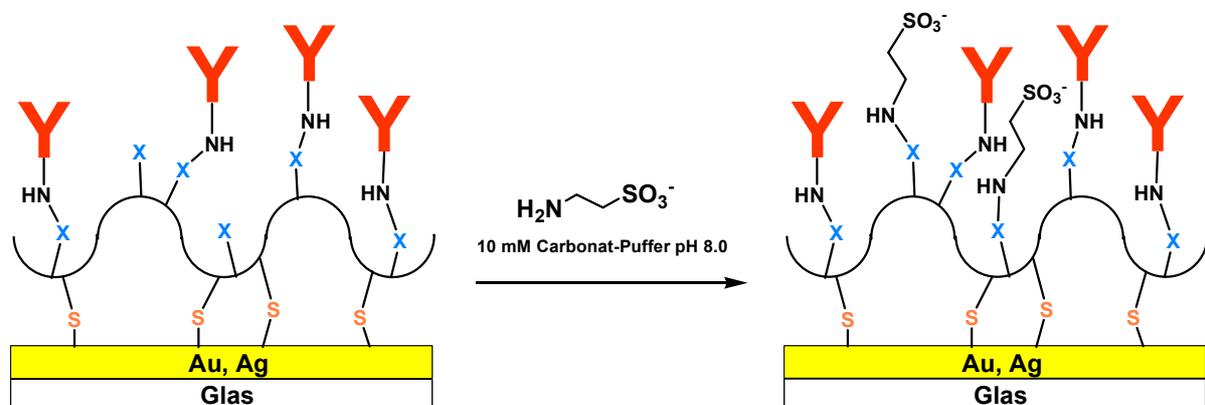
Die Immobilisierung kann mit oder ohne vorherige *Anreicherung* der Proteine (aBSA bzw. BSA) auf der reaktiven Cellulose-Matrix stattfinden.

Das Schlüsselprinzip der Immobilisierung mit vorheriger *Anreicherung* ist die Ausnutzung von elektrostatischen Anziehungskräften zwischen Protein und Matrix. Dazu wird das Protein in einer Pufferlösung mit niedriger Ionenstärke gelöst, die einen pH-Wert besitzt der etwas niedriger ist als der isoelektrische Punkt des Proteins ($pI_1(\text{BSA}): 4.7$ bzw. $pI_1(\text{aBSA}): 5.5$ ^[297]). Infolgedessen wird das nun positiv geladene Protein auf der Cellulose-Matrix, die negativ geladene Gruppen trägt (z.B.: Carboxymethyl, MCT) angereichert. Diese Anreicherung des Proteins auf der Cellulose-Matrix gewährleistet eine effiziente und schnelle kovalente Immobilisierung des Proteins an die Matrix, kann aber gleichzeitig unter gewissen Umständen auch zu einer Erhöhung der unspezifischen Bindung (= elektrostatische Wechselwirkungen) zwischen Protein und Matrix führen. Dieses Problem kann jedoch durch Verwendung von optimierten Puffer-Lösungen (z.B.: PB-T-Puffer, siehe Kapitel 6.4.1) vermieden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das BSA bzw. aBSA sowohl ohne als auch mit vorheriger *Anreicherung* immobilisiert.

3. Deaktivierung der restlichen Reaktivgruppen der Cellulose-Monoschicht mit Taurin oder Ethanolamin

Nach der Immobilisierung des aBSA bzw. BSA muss gewährleistet sein das alle reaktiven Gruppen umgesetzt werden, um beim anschließenden Affinitätsexperiment das kovalente Anbinden des Analyten (BSA bzw. aBSA) zu vermeiden. Dazu können die nicht umgesetzten reaktiven Gruppen der Cellulose-Matrix mit Taurin ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$) oder Ethanolamin ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$) umgesetzt und dadurch deaktiviert werden, wie in Schema 6.3 gezeigt.



Schema 6.3: Deaktivierung der reaktiven MCT-Gruppen des MCT-HTSHP-CMC SAMS mittels Taurin nach Immobilisierung des aBSAs.

6.4.3 Konsekutive aBSA-BSA Affinitätsexperimente an einer mit TSHP-CMC-NHS beschichteten Goldoberfläche

Nach dem in Kapitel 6.4.2 beschriebenen allgemeinen Aufbau eines Immunsensors auf Basis von reaktiven Cellulosederivaten wurde nun das BSA an einer TSHP-CMC-NHS Matrix auf Gold kovalent gebunden (Abb. 6.5).

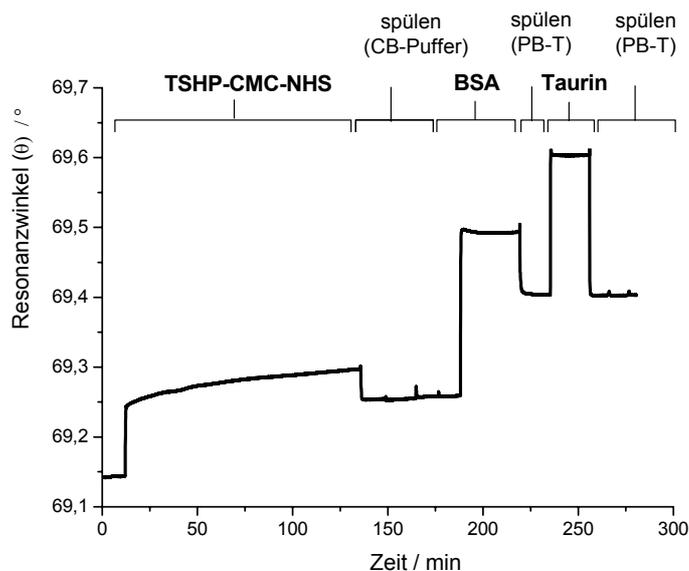


Abb. 6.5: Adsorptionskinetik von BSA an einer TSHP-CMC-NHS funktionalisierten Au-Oberfläche; Konzentration an BSA: 0.5%-ig in 10 mM Carbonat-Puffer (CB-Puffer) pH 8.0; Taurin: 0.1 M in 10 mM CB-Puffer pH 8.0.

Der BSA-Schichtaufbau und die anschließenden Affinitätsmessungen wurden mit Hilfe eines thermostatisierten SPR-Spektrometers mit Spreeta™ Sensoreinheit der Firma *Texas Instruments* bei 37°C durchgeführt.

Zuerst erfolgte die Abscheidung der reaktiven Bisthiosulfat-CMC **16** aus wässriger Lösung (0.3%-ige Lösung von **16** in H₂O) auf die Goldoberfläche. Um eine gute Bedeckung der Au-Oberfläche mit dem Cellulosederivat zu gewährleisten, wurde die wässrige Lösung von **16** mit einem Fluss von 1 ml/min an die Oberfläche transportiert, anschließend der Fluss gestoppt (= statische Bedingungen), und die wässrige Lösung für zwei Stunden zur SAM-Bildung auf die Au-Oberfläche einwirken gelassen. Danach wurden die durch Physisorption haftenden Cellulose-Moleküle mit 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0 abgespült (Flussrate: 1 ml/min) (siehe Abb. 6.5).

Die Immobilisierung des BSAs an die reaktive Monoschicht von **16** wurde ohne

Anreicherung des Proteins (siehe Kapitel 6.4.2) durchgeführt. Die Kupplung erfolgte durch die Reaktion der freien Aminofunktionen des BSA mit den NHS-Gruppen der Monoschicht von TSHP-CMC-NHS in 10 mM CB-Puffer bei pH 8.0. Auch hier wurde, wie im Falle der Cellulose **16**, die BSA-Lösung (Abb. 6.5) zuerst an die Oberfläche transportiert (Fluss: 1 ml/min) und unter statischen Bedingungen (Einwirkungszeit: 1 h) immobilisiert. Danach erfolgte die Spülung der Oberfläche mit PB-T Puffer (Flussrate: 1ml/min) um den unspezifisch „gebundenen“ Anteil zu beseitigen. Anschließend erfolgte die Deaktivierung der nicht umgesetzten reaktiven NHS-Gruppen mit Taurin. Aus der Abbildung 6.5 ist zu beobachten dass aufgrund der sehr guten Belegung der Oberfläche mit BSA, der Anteil an gebundenem Taurin sehr gering ausfällt.

Durch *in situ* SPR-Spektroskopie wurden nun *konsekutive* Bindungsexperimente des aBSAs an das immobilisierte BSA verfolgt.

Dazu wurde das aBSA mit steigender Konzentration (2.5-100 $\mu\text{g/ml}$) auf die BSA-Oberfläche injiziert und der jeweilige Schichtwachs ($\Delta\theta$) gemessen (siehe Abb. 6.6 (a)). Durch die Darstellung der gemessenen $\Delta\theta$ -Werte als Funktion der eingesetzten aBSA Konzentrationen erhält man eine typische Sättigungskurve aus der die apparente Assoziationskonstante $K_{a, \text{app}}$ der Komplexbildung zwischen aBSA und BSA ermittelt werden kann (siehe Abb. 6.6 (b)).

Die Bestimmung von $K_{a, \text{app}}$ erfolgte aus der Sättigungskurve in Abbildung 6.6 (b) und ist die Konzentration an aBSA die der Hälfte des $\Delta\theta$ -Sättigungswertes ($\Delta\theta_{\text{max}}$) entspricht.

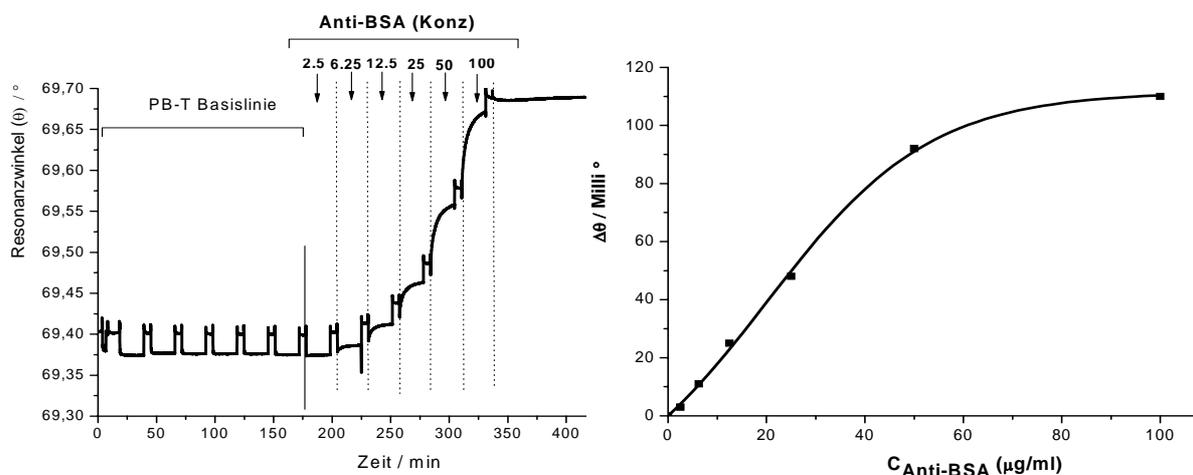


Abb. 6.6: (a) SPR-Kinetik der konsekutiven aBSA-BSA Komplexbildung;
 (b) Sättigungskurve $\Delta\theta = f(c_{\text{aBSA}})$ zur Bestimmung der Assoziationskonstante $K_{a, \text{app}}$.

Zur Erläuterung: $\Delta\theta$ -Sättigung = $\Delta\theta_{\max} = 111.52$ mdeg $\Rightarrow \frac{1}{2} \Delta\theta_{\max} = 55.76$ mdeg;

Die Konzentration an aBSA (c_{aBSA}) der einem $\Delta\theta$ -Wert = 55.76 mdeg entspricht = $c_{\text{aBSA}} = 27.82$ $\mu\text{g/ml}$;

$$c_{\text{aBSA}} = 27.82 \mu\text{g/ml} = 1.85 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l} \Rightarrow K_{\text{a,app}} = \frac{1}{1.85} \cdot 10^7 \text{ l/mol} = 0.54 \cdot 10^7 \text{ l/mol}$$

$$\Rightarrow K_{\text{a,app}} = 5.40 \cdot 10^6 \text{ l/mol} \text{ oder } \mathbf{K_{\text{a,app}} = 5.40 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}}$$

Die berechnete Assoziationskonstante von $K_{\text{a,app}} = 5.40 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ist in guter Übereinstimmung mit literaturbekannten K_{a} -Werten^[298].

6.4.4 Regenerative BSA-aBSA Affinitätsexperimente an einer mit MCT-HTSHP-CMC beschichteten Silberoberfläche

Zum ersten Mal sollte ebenso versucht werden mittels SPR-Spektroskopie (als *Transducer*) ein Immunsensor auf Basis von reaktiven Cellulosederivaten auf Silberoberflächen aufzubauen.

Zum Aufbau eines Immunsensors auf Silber eignen sich vor allem die reaktiven Derivate der Thiosulfat-CMC, HTSHP-CMC, am besten.

In Kapitel 5.2.4 konnte gezeigt werden dass Monoschichten der HTSHP-CMC **8** auf Silber dessen Oxidation passivieren und sich damit als ultradünner Korrosionsschutz für Silber eignen. Diese Eigenschaft ist die Voraussetzung zur Verwendung der reaktiven HTSHP-CMC Derivate als Substrate zum Aufbau von Sensoren auf Silberoberflächen.

Im Folgenden soll die Immobilisierung des aBSAs an einer MCT-HTSHP-CMC Matrix auf Silber erläutert und anschließend *regenerative* Bindungsexperimente mit BSA gezeigt werden.

Der aBSA-Schichtaufbau und die anschließenden Affinitätsmessungen wurden mit Hilfe eines Dual-SPR-Spektrometers (AK Knoll, MPI Polymerforschung Mainz) bei zwei Wellenlängen: λ_{max} : 633 nm (roter Laser) und λ_{max} : 473 nm (blauer Laser) durchgeführt.

Aufgrund der schnellen Oxidation der verwendeten Ag-Substrate ($d_{\text{Ag}} = 33$ nm) wurden diese direkt nach dem Bedampfen in die wässrige Lösung von MCT-HTSHP-

CMC **17** für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Abscheidung der reaktiven Cellulose erfolgte durch Aktivierung der Thiosulfat-Gruppen mittels TCEP.

Die Immobilisierung des aBSAs an die reaktive Monoschicht von **17** wurde mit und ohne Anreicherung durchgeführt.

Bei der Immobilisierung mit Anreicherung wurde das aBSA (0.05%-ig) in 10 mM Acetat-Puffer pH 5.0 ($\text{pH}_i(\text{aBSA}) = 5.5$) gelöst und an die mit MCT-HTSHP-CMC **17** modifizierte Silberoberfläche gekuppelt (Dauer: 1 h, statische Bedingungen). Der unspezifisch gebundenen Anteil an aBSA wurde auch hier wieder mit PB-T Puffer abgespült gefolgt von der Deaktivierung der restlichen reaktiven Gruppen mit Taurin (Abb. 6.7 (a) und (b)).

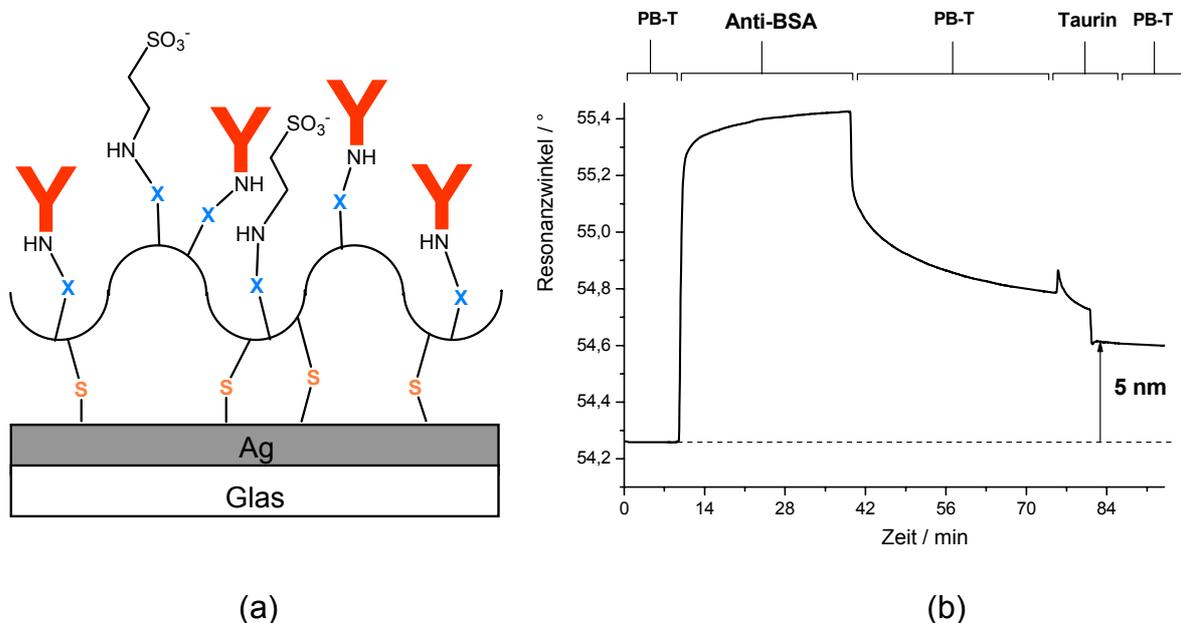


Abb. 6.7: (a) Schematische Darstellung eines aBSA-Immunsensors auf Silber (X: MCT-Gruppen von Derivat **17**, Y: aBSA, Taurin: $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3^-$);
 (b) Adsorptionskinetik von aBSA an einer MCT-HTSHP-CMC funktionalisierten Ag-Oberfläche gemessen bei λ_{max} : 633 nm (roter Laser); aBSA: 0.05%-ig in 10 mM Acetat-Puffer pH 5.0; Taurin: 0.1 M in 10 mM CB-Puffer pH 8.0.

Die Immobilisierung ohne Anreicherung erfolgte durch Abscheidung des aBSA (0.05%-ig) aus einer 10 mM Carbonat-Puffer Lösung pH 8.0. Der Vergleich der Kinetiken in Abbildung 6.8 zeigt eindeutig dass die Immobilisierung mit Anreicherung (blaue Kinetik) zu einer etwa doppelt so hohen Belegungsichte mit aBSA führt als die ohne Anreicherung (schwarze Kinetik).

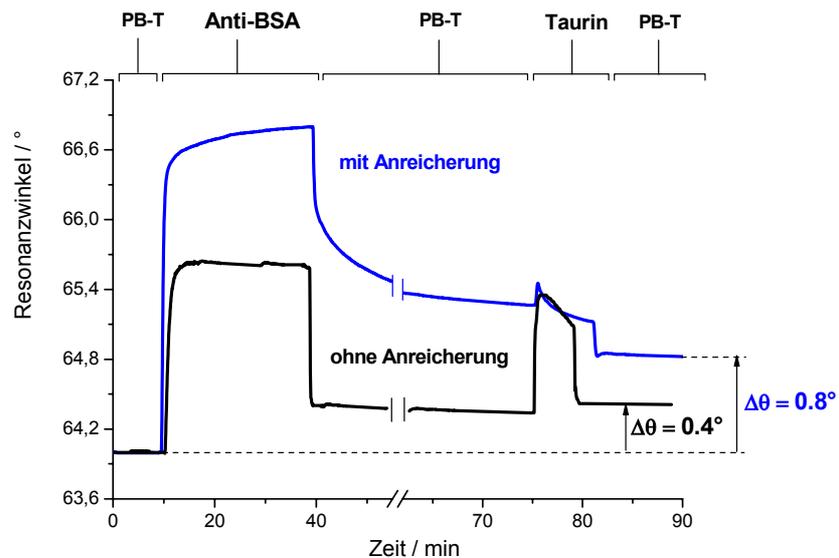
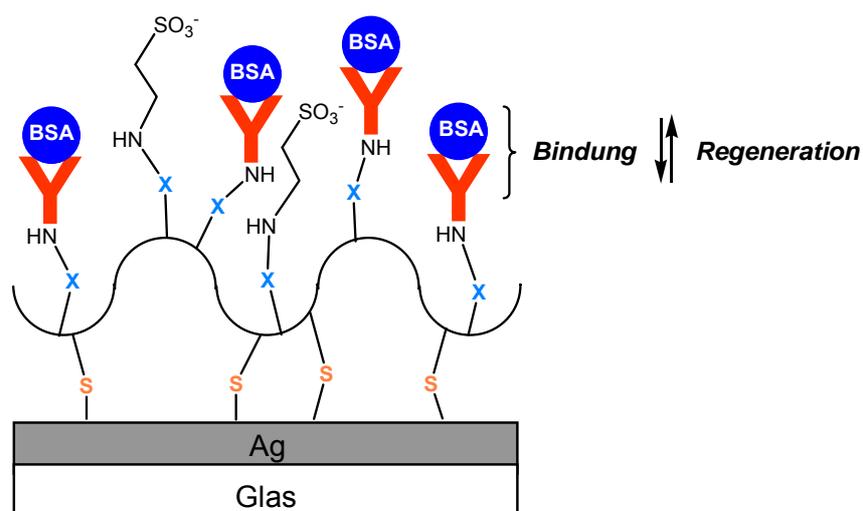


Abb. 6.8: Immobilisierung von aBSA an einer MCT-HTSHP-CMC funktionalisierten Ag-Oberfläche, mit (blaue Kinetik) und ohne (schwarze Kinetik) Anreicherung, gemessen bei $\lambda_{\text{MAX}} = 473 \text{ nm}$ (blauer Laser); aBSA-Lösung: 0.05%-ig in 10 mM Acetat-Puffer pH 5.0 (Abscheidung mit Anreicherung) bzw. 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0 (Abscheidung ohne Anreicherung); Taurin: 0.1 M in 10 mM CB-Puffer pH 8.0.

Nach Immobilisierung von aBSA sollte die Wechselwirkung mit dem Antigen BSA mittels SPR untersucht werden. Dabei sollte überprüft werden ob die Wechselwirkung zwischen aBSA und BSA *regenerierbar* ist, wie in Schema 6.4 dargestellt.

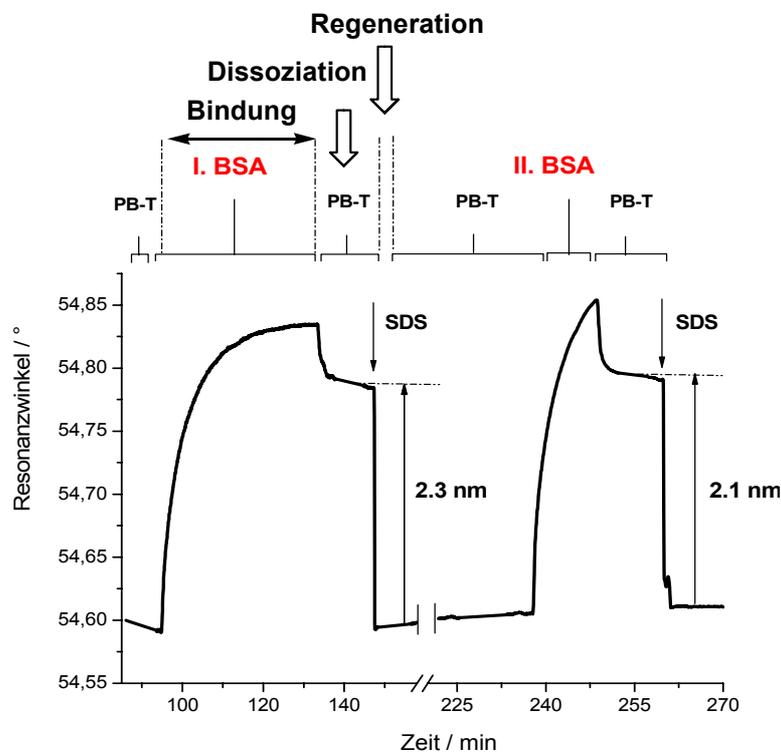


Schema 6.4: Schematische Darstellung der regenerativen Wechselwirkung zwischen BSA und aBSA (Y).

Die regenerativen SPR-Bindungsexperimente zwischen BSA und aBSA immobilisiert an einer reaktiven MCT-HTSHP-CMC Monoschicht sind in Abbildung 6.9 gezeigt.

In der SPR-Kinetik in Abbildung 6.9 (a) ist zu sehen, dass zuerst die *Bindung* des BSAs an die immobilisierte aBSA Schicht erfolgt (**I. BSA**). Für die adsorbierte BSA Schicht konnte eine Schichtdicke von $d = 2.3 \text{ nm}$ berechnet werden.

Durch Spülen mit PB-T Puffer zeigt die Adsorptionskinetik des BSAs eine kontinuierliche Abnahme aufgrund der *Dissoziation* der Bindung zwischen BSA und aBSA. Die Wechselwirkung zwischen BSA und aBSA konnte anschließend mit einer wässrigen SDS Lösung (SDS: Sodium Dodecyl Sulfate; 0.5%-ig in H_2O) vollständig regeneriert werden.



(a)

Abb.6.9: (a) SPR-Kinetik der regenerativen molekularen Erkennung zwischen BSA und aBSA gemessen bei λ_{max} : 633 nm; Konzentration an BSA: 0.5%-ig in 10 mM PBS-Puffer.

Die vollständige *Regeneration* der Bindung zwischen BSA und aBSA belegen deutlich auch die entsprechenden Reflektivitätskurven in Abbildung 6.9 (b): nach Adsorption des BSAs an die aBSA Schicht (— **I. BSA**), verschiebt sich die entsprechende Reflektivitätskurve nach dem Spülen mit der wässrigen SDS-Lösung (•••• **Regeneration**) und überlagert mit der Anfangs-Reflektivitätskurve (— Spülen

mit PB-T), vor der Bindung des BSAs. Die Bindungs- und Regenerationsversuche zwischen BSA und aBSA konnten mehrmals wiederholt werden, wie aus Abbildung 6.9 (a)- zweite BSA Bindung (**II.BSA**) und 6.9 (c) –zweite Regeneration, zu entnehmen ist.

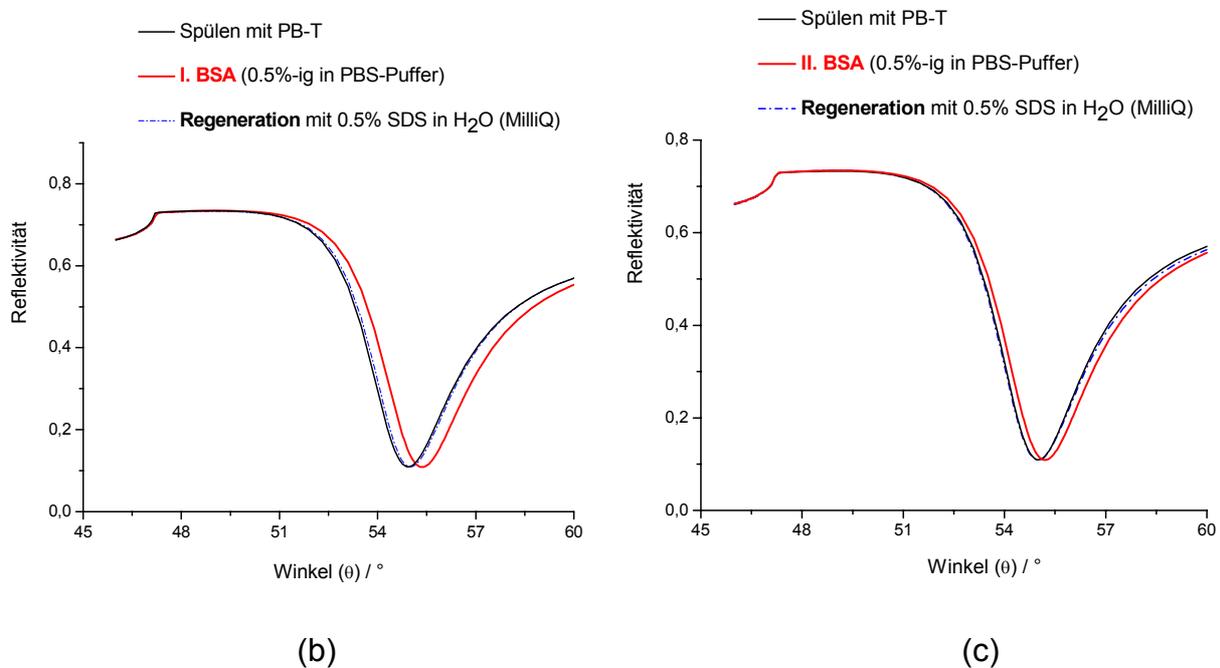


Abb.6.9: (b) Reflektivitätskurven der ersten BSA Adsorption und Regeneration mit SDS:
(c) Reflektivitätskurven der zweiten BSA Adsorption und Regeneration mit SDS.

Der Vorteil eines Immunsensor-Aufbaus auf Silber liegt zum einen in der günstigeren Herstellung, zum anderen und vor allem in der Erhöhung der Empfindlichkeit der SPR-Messungen im Vergleich zu den Messungen auf Gold

Die Empfindlichkeitserhöhung lässt sich aus der Gegenüberstellung der Reflektivitätskurven für das System BSA / aBSA immobilisiert, gemessen bei λ_{\max} : 633 nm (roter Laser) und bei λ_{\max} : 473 nm (blauer Laser), der charakteristischen Wellenlänge zur Anregung der Silber-Plasmonen (siehe Abbildung 6.10), entnehmen. Die experimentellen Reflektivitätskurven in Abbildung 6.10 erlauben die Bestimmung des Schichtzuwachses $\Delta\theta_{\text{aBSA(imm.)}}$ und $\Delta\theta_{\text{BSA}}$ bei den zwei oben genannten Wellenlängen und daraus auch die Schichtdicken von aBSA und BSA. Man erhält für das immobilisierte aBSA und anschließend für das adsorbierte BSA, gemessen bei $\lambda_{\text{MAX}} = 473$ nm, ein $\Delta\theta$ -Wert von $\Delta\theta_{473}$ (aBSA): 800mdeg bzw. $\Delta\theta_{473}$ (BSA): 650 mdeg die um den Faktor (EF) 2.4 bzw. 2.8 höher sind als die gemessen bei $\lambda_{\text{MAX}} = 633$ nm. Diese Größen sind in Tabelle 6.2 zusammengestellt.

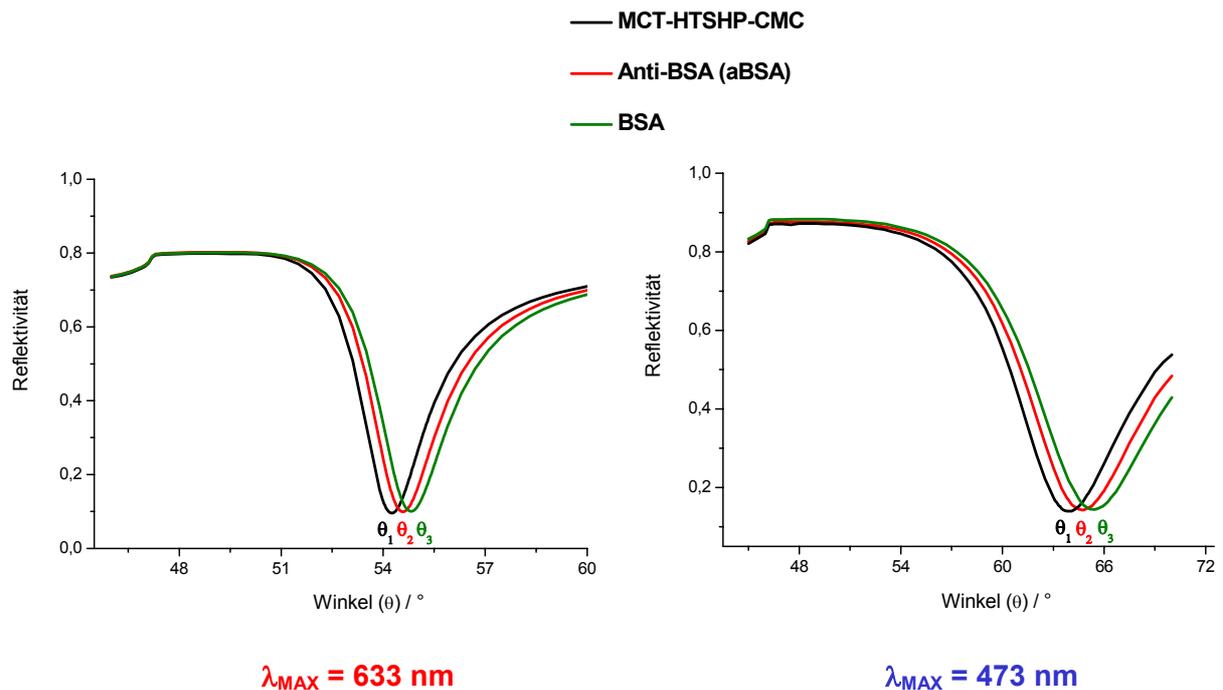


Abb.6.10: SPR-Reflektivitätskurven der aBSA Immobilisierung (— θ_2) an die reaktive Monoschicht von Cellulosederivat **17** (— θ_1) und der anschließenden BSA Adsorption (— θ_3), gemessen bei $\lambda_{MAX} = 633 \text{ nm}$ und $\lambda_{MAX} = 473 \text{ nm}$.

Tabelle 6.2: Schichtzuwachs $\Delta\theta$ für das Anti-BSA (aBSA) und BSA gemessen bei $\lambda_{MAX} = 633 \text{ nm}$ und $\lambda_{MAX} = 473 \text{ nm}$ und die daraus berechneten Empfindlichkeitsfaktoren (EF) und Schichtdicken (d); es gilt:

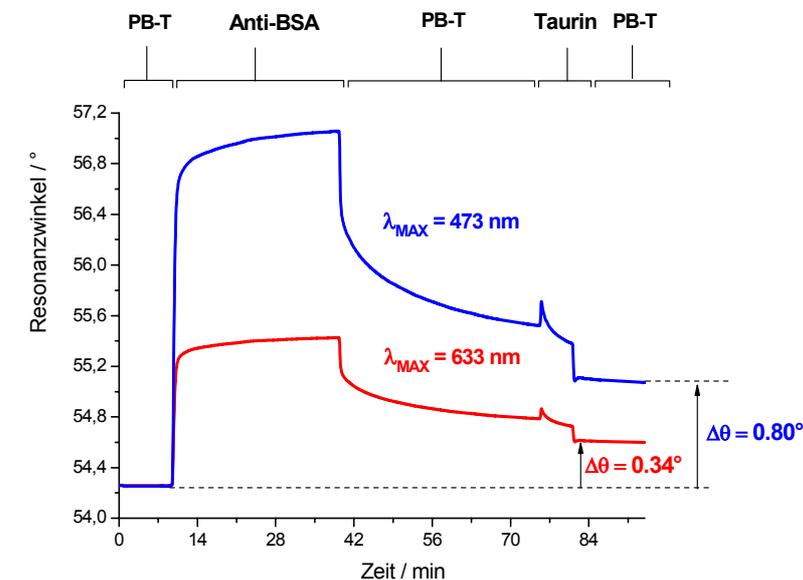
$$\Delta\theta_{633 / 473}(\text{aBSA}) = \theta_2 - \theta_1; \Delta\theta_{633 / 473}(\text{BSA}) = \theta_3 - \theta_2;$$

$$\Delta\theta_{473} = \text{EF} \times \Delta\theta_{633}.$$

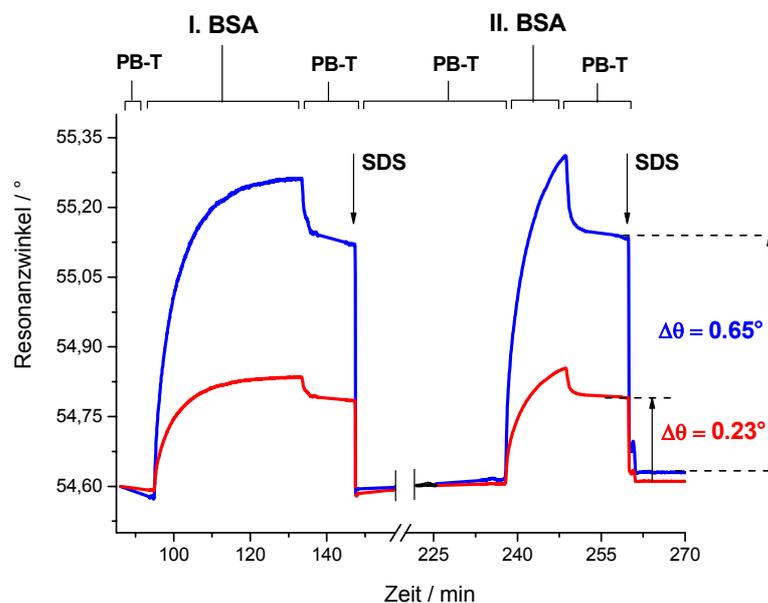
	$\Delta\theta_{633}$ [mdeg]	$\Delta\theta_{473}$ [mdeg]	EF	d [nm]
aBSA	340	800	2.4	4.7 ± 0.3
BSA	230	650	2.8	2.3 ± 0.3

Man kann somit schlussfolgern, dass durch SPR-Messungen an Silberoberflächen unter Verwendung des Lasers mit der Wellenlänge $\lambda_{MAX} = 473 \text{ nm}$, charakteristisch für die Anregung von Silber-Plasmonen, eine bis zu 3-fache Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber der Silber- / Gold-Plasmonen angeregt bei $\lambda_{MAX} = 633 \text{ nm}$

erzielt werden kann. Die Gegenüberstellung der SPR-Kinetiken in Abbildung 6.11 (a) und (b) belegt eindeutig diese Empfindlichkeitserhöhung.



(a)



(b)

Abb.6.11: (a) Immobilisierung von aBSA an einer mit MCT-HTSHP-CMC modifizierten Ag-Oberfläche, bzw.

(b) SPR-Kinetiken der regenerativen molekularen Erkennung zwischen BSA und aBSA, gemessen bei $\lambda_{\text{MAX}} = 633 \text{ nm}$ (—) und $\lambda_{\text{MAX}} = 473 \text{ nm}$ (—);

Bemerkung: für den besseren Vergleich wurde die blaue SPR-Kinetik an die Basislinie der roten Kinetik angepasst.

6.5 Zusammenfassung

Die reaktiven Thio-CMC Derivate **16** (TSHP-CMC-NHS) und **17** (MCT-HTSHP-CMC) wurden als nanoskalische Substrate zum Aufbau von Immunosensoren auf Gold- bzw. Silber-Oberflächen eingesetzt.

Um das Ausmaß an unspezifischer Wechselwirkung zwischen Proteinen allgemein und einer Cellulose-Matrix zu ermitteln, wurde das Protein BSA (BSA: *Bovine Serum Albumin*, Rinderserum-Albumin) an einer nichtreaktiven HTSHP-CMC bzw. TSHP-CMC adsorbiert. Die drauf haftenden BSA Schichten zeigten Dicken $d < 1$ nm, was auf sehr niedrige unspezifische Wechselwirkungen zwischen Protein und Cellulose-Matrix schließen lässt.

Das Antigen BSA konnte nun über die Aminogruppe des Lysin-Restes an der Peripherie des Proteins, an einer mit NHS-Aktivesters **16** modifizierten Goldoberfläche kovalent, ohne Anreicherung, immobilisiert werden. Der BSA-Schichtaufbau auf Gold konnte eindeutig mittels *in situ* SPR-Spektroskopie verfolgt und untersucht werden.

An der BSA modifizierten Goldoberfläche wurden konsekutive Bindungsexperimente mit dem Antikörper Anti-BSA (aBSA) durchgeführt. Daraus konnte die Assoziationskonstante $K_{a,app}$ mit einem Wert von $K_{a,app} = 5.40 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ berechnet werden, die in guter Übereinstimmung mit literaturbekannten K_a -Werten ist.

Der Antikörper Anti-BSA (aBSA) konnte an einer MCT-HTSHP-CMC modifizierten Silberoberfläche mit und ohne Anreicherung kovalent fixiert werden. Dabei zeigte die Immobilisierung mit Anreicherung eine etwa doppelt so hohe Belegungsdichte mit aBSA gegenüber der ohne Anreicherung.

Auch hier wurde der aBSA-Schichtaufbau mittels *in situ* SPR-Spektroskopie verfolgt und die entsprechenden Schichtdicken bestimmt. Man erhält für das immobilisierte aBSA eine Schichtdicke (d) von etwa $d = 5$ nm, die einer Belegung von etwa 4 ng/mm^2 (oder mg/cm^2) entspricht.

An der aBSA modifizierten Silberoberfläche wurden regenerative Affinitätsexperimente mit BSA durchgeführt. Dazu wurde das BSA in hoher Konzentration zugegeben und die Assoziation gefolgt von der Dissoziation mittels SPR-Spektroskopie verfolgt. Die BSA-Anti-BSA Bindung konnte mittels wässriger

SDS-Lösung komplett regeneriert werden. Die Bindungs-Regenerationsversuche konnten mehrmals wiederholt werden.

Die SPR-Kinetiken der BSA/aBSA Erkennung an Silberoberflächen zeigen, bei der Verwendung der charakteristischen Wellenlänge ($\lambda_{MAX} = 473 \text{ nm}$) für die Anregung der Silber-Plasmonen, einen bis zu 3-fachen Anstieg der Empfindlichkeit gegenüber den SPR-Messungen an Goldoberflächen.

7. Aktivität von Enzymen immobilisiert an reaktiven Cellulosederivat Monoschichten

7.1 Einleitung

Die Immobilisierung von Enzymen ist eine Technik, die weitgehend seit den späten sechziger Jahren erforscht wird ^[299]. Seitdem ist das Basiswissen über Enzym-Immobilisierungsverfahren ständig gewachsen ^[300-302], und ist eins der Primärgründe für den laufenden Fortschritt in der Enzymtechnologie (*enzyme engineering*).

Die Anwendung von frei suspendierten Enzymen bringt folgende Nachteile mit sich: die meisten Enzyme sind unter den normalen Arbeitsbedingungen labil und haben folglich eine sehr begrenzte Lebenszeit. Enzyme sind wasserlöslich, was die Trennung von deren Substraten und Produkten, und damit auch eine Wiederverwendung sehr schwierig macht. Dadurch erhöhen sich die Kosten dieser Prozesse beträchtlich.

Die Entwicklung von Prozessen mit immobilisierten Enzymen hingegen würde folgende Vorteile haben: zum einen zeigen die an wasserunlösliche Partikel immobilisierten Enzyme eine höhere Stabilität gegenüber den freien Enzymen; zum anderen besteht die Möglichkeit der leichten Abtrennung vom Substrat und Produkt und eine Wiederverwendung in einem kontinuierlichen Prozess.

Nachteilig bei immobilisierten Enzymen kann die Heterogenität dieser Prozesse sein, welche zu einer Beschränkung der Diffusion führt und somit die Aktivität der Enzyme verringern kann.

Als Trägermaterialien zur Anbindung von Enzymen sind folgende Polysaccharide literaturbekannt: Dextran ^[303], Cellulose ^[304, 305], Sephadex ^[306, 307], Chitin und Chitosan ^[308].

Von den oben genannten Trägermaterialien, die bei Biosensoren bisher eingesetzt wurden, bringen Cellulosestrukturen mit ihren biokompatiblen Eigenschaften beste Voraussetzungen mit ^[309]. Für den Synergieeffekt von Cellulose- und Proteinstrukturen gibt es in der Natur eine Reihe von Beispielen ^[310, 311].

Im Folgenden soll eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten literaturbekanntesten Anwendungen von Cellulose bzw. Cellulosederivaten als Trägermaterialien (sowohl löslich als auch unlöslich) zur Immobilisierung von Enzymen vorgestellt werden.

Bislang wurden eine Anzahl von Cellulosederivate entwickelt, die in der Biotechnologie oder in der praktischen Biochemie als unlösliche Trägermaterialien für die Affinitätschromatographie und vor allem zur Immobilisierung von Enzymen und Immunoproteine benutzt werden ^[312-316]. In diesem Zusammenhang werden alle wesentlichen Immobilisierungsverfahren gefunden, wie Adsorption, Einschluss oder Polymerisation, ionische und kovalente Bindung. Tabelle 7.1 zeigt einige Beispiele der Enzymimmobilisierung an funktionellen Cellulosederivaten (siehe Literaturreferenzen: ^[127, 310, 311, 316, 317, 125]).

Funktionelle Cellulosederivate finden ihre Anwendung auch in der (bio)chemischen Sensortechnologie, vor allem in Enzym- und Immunosensoren ^[318-320]. Die Entwicklungen reichen hier von Enzymelektroden bis zu Elektronen-Vermittelnde funktionalisierte Trägermaterialien wie z.B. Ferrocen-Derivate und Redox-Vermittelnde funktionalisierte Polymere, die die Elektronenübertragungsbarriere zwischen der Enzymstruktur und der Arbeitselektrode verringern und somit auch die Signalübertragung verbessern ^[321-323].

Oxidoreductase Enzyme, wie z.B. Glucose-Oxidase (GOD), Lactat-Oxidase und die Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, *HRP*) sind von großer Bedeutung als Analyt-Erkennungssysteme für die biochemische Sensoren-Entwicklung. Verschiedene Immobilisierungsansätze, wie z.B. ionische und kovalente Immobilisierung ^[314, 324], Vernetzung (*crosslinking*) ^[325], die auf Bioaffinität basierende Methode ^[325], Pfropfpolymerisation ^[326] und Einschluss ^[327, 328] sind in der Literatur beschrieben worden.

Von den erwähnten Methoden weist die kovalente Bindung häufig die höchste Stabilisierung der Enzymaktivität auf, begründet durch die Stabilisierung der aktiven Konformation des immobilisierten Enzyms ^[333, 334]. Trägermaterial und Kupplungsreagenz (-gruppe) bilden die Mikroumgebung des Enzyms. Das Kupplungsreagenz (bzw. die Kupplungsgruppe) kontrolliert zusätzlich die Anbindung des Proteins (wie viel und welche Aminosäure-Reste chemisch modifiziert werden). Beide Faktoren beeinflussen stark die Aktivität und Kinetik des immobilisierten Enzyms.

Tabelle 7.1: Beispiele für Enzymimmobilisierungen an Cellulosederivate

AE: Aminoethyl; CM: Carboxymethyl; DEAE: Diethylaminoethyl;

TEAE: Triethylaminoethyl; PDA: 1,4-Phenylendiamin.

Cellulosederivate	Art der Immobilisierung	Enzyme (Beispiele)
Cellulosebutylacetat	Einbettung im Träger	z.B. Urease ^[329]
Nitrocellulose	Einbettung im Träger	z.B. Lactase, Asparaginase ^[329]
DEAE-, TEAE- Cellulose	Ionisch	z.B. Catalase, Invertase, Pepsin, Aspartase ^[330]
<i>p</i> -Aminobenzyl Cellulose	Diazo-Kupplung	z.B. Catalase, Invertase, Pepsin, Aspartase ^[312]
<i>p</i> -Aminobenzoyl Cellulose	Diazo-Kupplung	z.B. Trypsin, Chymotrypsin ^[331]
Bromcyan aktivierte Cellulose	Bromcyan Aktivierung	z.B. Xanthin-Oxidase, Lactase, Dextranase ^[332]
CM-Cellulose, AE-Cellulose	Carbodiimid Methode	z.B. Peroxidase, Urease ^[150]
Nitrocellulose Membrane	Membran Einbettung	z.B. Glucose-Oxidase, Peroxidase ^[314]
Bromcyan aktivierte Cellulosemembrane	Membran Einbettung, Bromcyan Aktivierung	z.B. Lactase, Trypsin ^[332]
PDA-Cellulosederivate	Glutaraldehyd; Benzo- chinon; Cyanurchlorid; Diazo-Kupplung Aktivierung	z.B. Glucose-Oxidase, Peroxidase, Lactase- Oxidase ^[125, 126]

Im vorliegenden Kapitel soll die Anwendung der wasserlöslichen reaktiven O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl)-Derivate der CMC bzw. Thio-CMC (MCT-Derivate), als Substrate zur kovalenten Immobilisierung der Meerrettichperoxidase (HRP) an unterschiedlichen Oberflächen (Gold, Glas, Silizium), vorgestellt werden.

Durch Aufnahme von Michaelis-Menten Kinetiken der immobilisierten HRP, sollen Aussagen über deren Aktivität getroffen werden.

7.2 Die Meerrettichperoxidase (HRP) und das ABTS / H₂O₂ Assay

Die Meerrettichperoxidase (HRP) ist ein wichtiges Häm-haltiges Enzym das schon länger als ein Jahrhundert untersucht worden ist. Trotzdem konnten erst in den letzten Jahren Informationen über die dreidimensionale Struktur des Enzyms und deren katalytischen Zwischenprodukte, über den Mechanismus der Katalyse und die Funktion von spezifischen Aminosäure-Resten, erhalten werden ^[335, 336].

Die HRP besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 308 Aminosäureresten ^[337] und hat ein Molekulargewicht von etwa $M = 40000 \text{ g/mol}$ ($pH_I = 8.49$). Es enthält zwei verschiedene Typen von Metallzentren, das Eisen(III) Protoporphyrin IX (Häm Gruppe) und zwei Calcium Atome (siehe Abb. 7.1 (a)). Beide sind sehr wichtig für die strukturelle und funktionelle Integrität des Enzyms. Die Häm-Gruppe ist am Enzym über den His170 Rest (*proximaler* (=naher) Histidin-Rest) durch eine koordinative Bindung zwischen dem Stickstoff-Atom der Histidin-Seitenkette und dem Fe-Atom der Häm-Gruppe, angebracht ^[338]. Die zweite axiale Koordinationsseite (die so genannte *distale* (=ferne) Seite der Häm-Ebene) ist im Ruhezustand des Enzyms unbesetzt und steht dem Wasserstoffperoxid (H₂O₂), während des Enzym-Umsatzes (*turnover*), als Bindungsstelle zur Verfügung.

Kleine Ligand-Moleküle wie z.B. Kohlenstoffmonoxid, Cyanide, Fluoride und Azide binden am Fe-Atom der Häm-Gruppe an deren distalen Seite und geben sechskoordinierte Peroxidase-Komplexe. Einige davon binden nur in der protonierten Form, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen mit der distalen Häm-Tasche der Aminosäure-Seitenketten von Arg38 (distales Arginin) und His42 (distales Histidin) stabilisiert werden (siehe Abb. 7.1 (b)) ^[338].

Die zwei Calcium-bindenden Seiten sind in einer distalen und proximalen Position zur Häm-Ebene angeordnet und sind mit der Häm-bindenden Region durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken verbunden. Jede Calcium-Stelle ist siebenfach mit Sauerstoffdonor-Liganden koordiniert, eine Kombination aus Aminosäureseitenketten mit Carboxyl- (Asp), Hydroxyl-Gruppen (Ser, Thr), Rückgrat-Carbonyl und

Wassermoleküle. Der Verlust des Calciums kann zu einer Erniedrigung der Aktivität sowie der thermischen Stabilität der HRP führen ^[339].

Die Struktur der HRP besteht größtenteils aus α -Helices und einer kleinen Region aus β -Faltblattstrukturen (Abb. 7.1 (a)). Die Maße des Enzyms sind 4.03 x 6.75 x 11.7 nm ^[336].

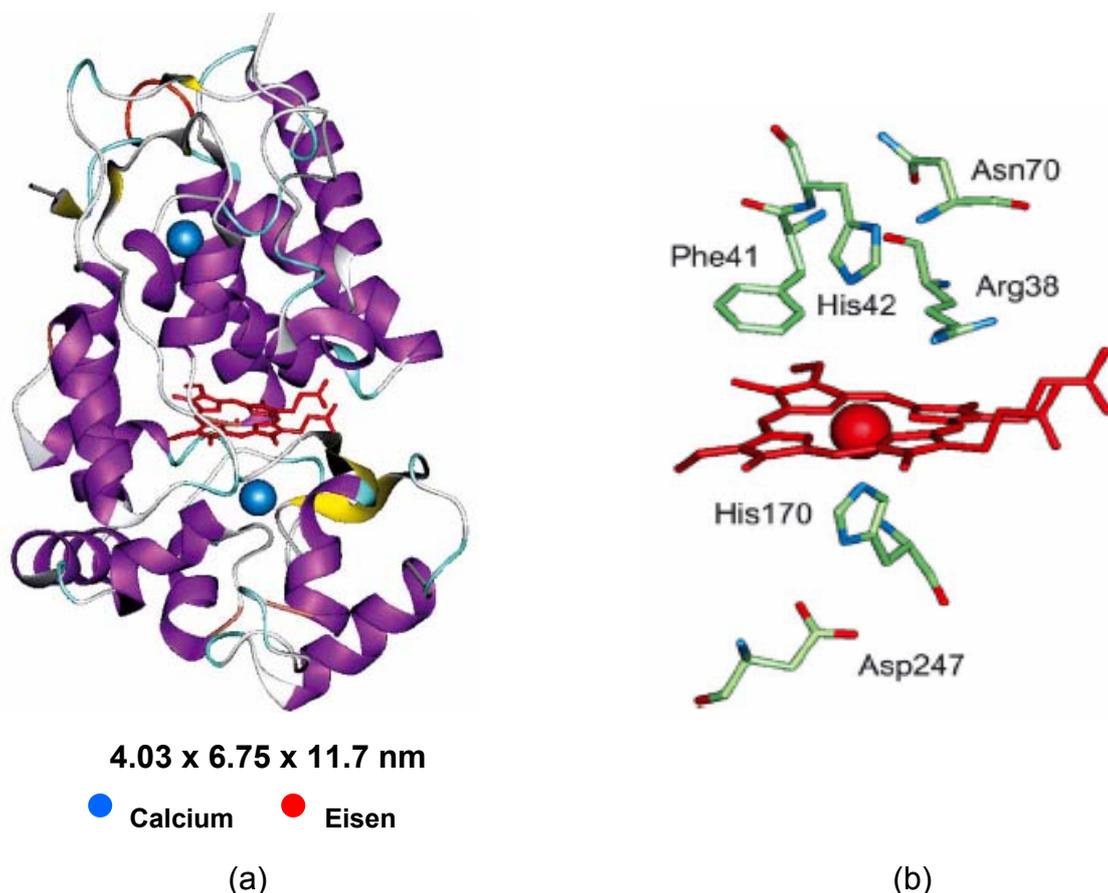
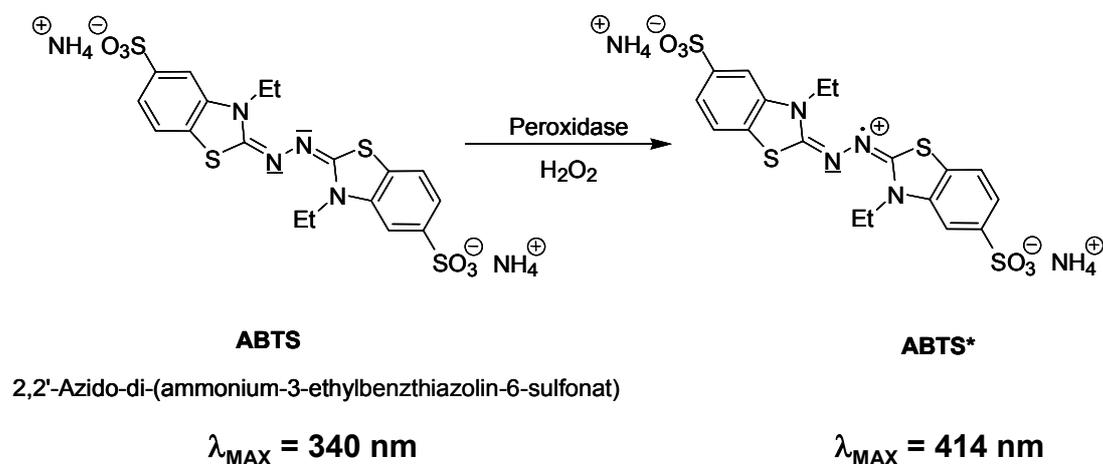


Abb. 7.1: (a) Dreidimensionale Röntgen-Kristallstruktur der Meerrettichperoxidase. Die Häm-Gruppe (rot gefärbt) befindet sich zwischen der *distalen* und *proximalen* Domäne die jeweils ein Ca-Atom enthalten (als blaue Kugel gekennzeichnet). α -Helices (17 an Zahl) und β -Faltblattstrukturen des Enzyms sind mit lila bzw. gelb gekennzeichnet;

(b) Schlüsselaminosäurereste in der Häm-bindenden Region der HRP. Der proximale His170 Rest koordiniert mit dem Fe-Atom der Häm-Gruppe; die distale Koordinationsseite, oberhalb der Häm-Ebene, ist frei.

Typische Substrate für die Meerrettichperoxidase sind das TMB (3,5,3',5'-Tetramethyl-benzidin) ^[340] und das ABTS (2,2'-Azido-di-(ammonium-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)) ^[341]. Da das ABTS in der vorliegenden Arbeit als Substrat benutzt wurde, soll das entsprechende ABTS / H₂O₂ Assay für Peroxidasen

kurz erläutert werden.



Schema 7.1: Das ABTS / H₂O₂ Assay für Peroxidasen ^[341].

Das ABTS ist ein Benzthiazolin-Derivat das von Peroxidasen (z. B.: HRP) in Anwesenheit von H₂O₂ als Cofaktor in das entsprechende ABTS*, ein Radikal-Kation, überführt wird. Dabei verschiebt sich das Maximum der Absorption von $\lambda_{\text{MAX}} = 340$ nm (ABTS = *Edukt*) nach $\lambda_{\text{MAX}} = 414$ nm (ABTS* = *Produkt*) (siehe Schema 7.1). Durch die Detektion der Extinktion des entstandenen Produktes ABTS* kann die Aktivität des Enzyms bestimmt werden.

Die Meerrettichperoxidase (HRP) findet ihre Anwendung zum einen als Reagenz in der organischen Synthese (*N*- und *O*-Dealkylierung, oxidative Kupplung, selektive Hydroxylierung und Sauerstoff-Transfer Reaktionen) und Biotransformation ^[342], in gekoppelte Enzyme Assays ^[343], Chemilumineszenz Assays ^[344] und in der Behandlung von Abwässern ^[338]. Zum anderen zeigen jüngste Arbeiten von Wardmann und Kollegen eine potentielle Anwendung der HRP, in Kombination mit der Indol-3-essigsäure, in der gezielten Krebstherapie ^[345-347].

7.3 Aktivität von immobilisierter HRP an reaktiven Cellulose-Monoschichten auf Gold

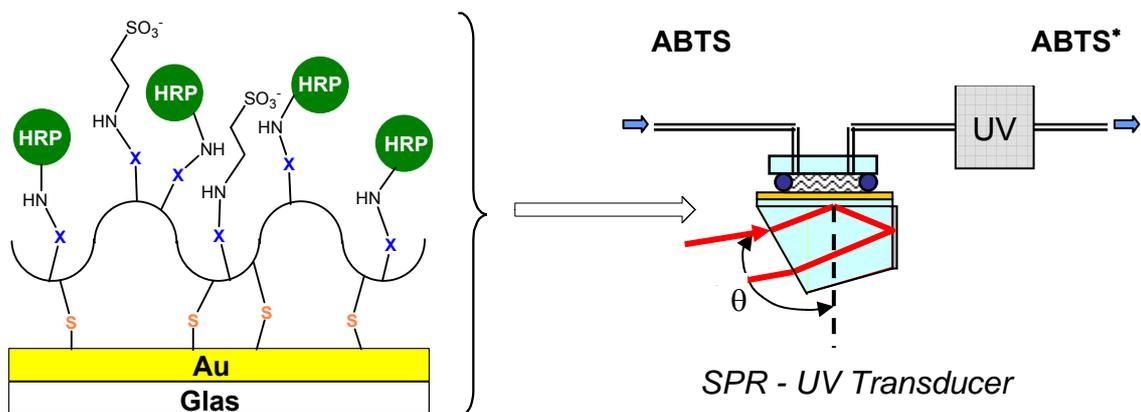
Durch die breit gefächerten Anwendungsmöglichkeiten der HRP erweist sich diese als ein interessantes Modell-Enzym zur Untersuchung des Aufbaus von Enzymschichtsystemen an verschiedenen funktionellen Oberflächen.

Vor allem der Schichtaufbau auf Gold bzw. Silizium / Glas-Oberflächen findet in den letzten Jahren ein immer größeres Interesse aufgrund der Anwendungsmöglichkeiten dieser Systeme in der biochemischen Sensortechnologie ^[125, 320-322].

Die Immobilisierung von Enzymen an Goldoberflächen wird in der Literatur allgemein durch die kovalente Anbindung des Enzyms an Dextran-modifizierte Goldsubstrate (*Biacore Verfahren*) (z. B. ^[348]) oder an Alkanthiole bzw. reaktive Alkandisulfide (z. B.: DTSP: Dithiobis-*N*-succinimidyl propionat) ^[349] beschrieben. Diese Verfahren (mit Ausnahme der reaktiven Alkandisulfide) benötigen zur Anbindung jedoch immer eine Voraktivierung der Carboxyl-Gruppen mit löslichen Reagenzien wie z. B. EDC / NHS.

Im Folgenden soll die reagenzfreie (*reagent free*) Immobilisierung der Meerrettichperoxidase an der reaktiven MCT-TSHP-CMC **14** Monoschicht auf Gold erläutert werden. Der Enzymschichtaufbau und der Aktivitätstest sollen *in situ* mittels SPR-Spektroskopie gekoppelt mit UV, verfolgt werden.

Der HRP-Schichtaufbau an einer mit MCT-Derivat **14** funktionalisierten Goldoberfläche erfolgt in gleicher Weise wie schon im Kapitel 6.4.2 (Aufbau eines Immunsensor an reaktiven Cellulosederivaten) dargestellt.



Schema 7.2: Schematischer HRP-Schichtaufbau an einer MCT-TSHP-CMC **14** modifizierten Goldoberfläche und das verwendete SPR-UV Messsystem (*Transducer*).

Zuerst wurde die wasserlösliche, reaktive MCT-TSHP-CMC **14** auf der Goldoberfläche abgeschieden, gefolgt von der Immobilisierung der HRP durch die Reaktion der Aminofunktionalitäten der Lysin-Reste an der Peripherie des Enzyms,

mit den „aktivierten“ Cl-Atomen der MCT-Gruppen von **14**. Die nicht umgesetzten MCT-Gruppen wurden mit Taurin deaktiviert (siehe Schema 7.2).

Der in Schema 7.2 dargestellte schematische Aufbau eines HRP-Sensors konnte erfolgreich *in situ* mittels SPR-Spektroskopie verfolgt werden (Abb. 7.2 (a)).

Die Abscheidung des reaktiven MCT-Derivats **14** erfolgte aus einer 0.1%-igen Lösung in 0.2 M Zitronensäure. Dabei wurde drauf geachtet dass die gesamte Goldoberfläche mit dem reaktiven Derivat beschichtet wird, indem die Flussrate niedrig gewählt wurde (11 $\mu\text{l}/\text{min}$). Nach dem Wegspülen der physisorptiven Anteile mit H_2O (MilliQ) wurde das Laufmittel auf 10 mM CBS-Puffer pH 8.0 (34 $\mu\text{l}/\text{min}$) umgestellt (siehe Schema 7.2 (a)).

Die Immobilisierung der HRP erfolgte aus einer 12.5 μM Lösung in 10 mM CBS-Puffer pH 8.0 (mit Anreicherung der HRP; $\text{pH}_i(\text{HRP}) = 8.49$). Anschließend wurden die restlichen MCT-Gruppen von Derivat **14** mit Taurin deaktiviert (siehe Abb 7.2 (a)). Die ermittelte Schichtdicke der immobilisierten HRP liegt bei 4 nm (entsprechend 4 mg/cm^2) was in guter Übereinstimmung mit den veröffentlichten Daten ist ^[336].

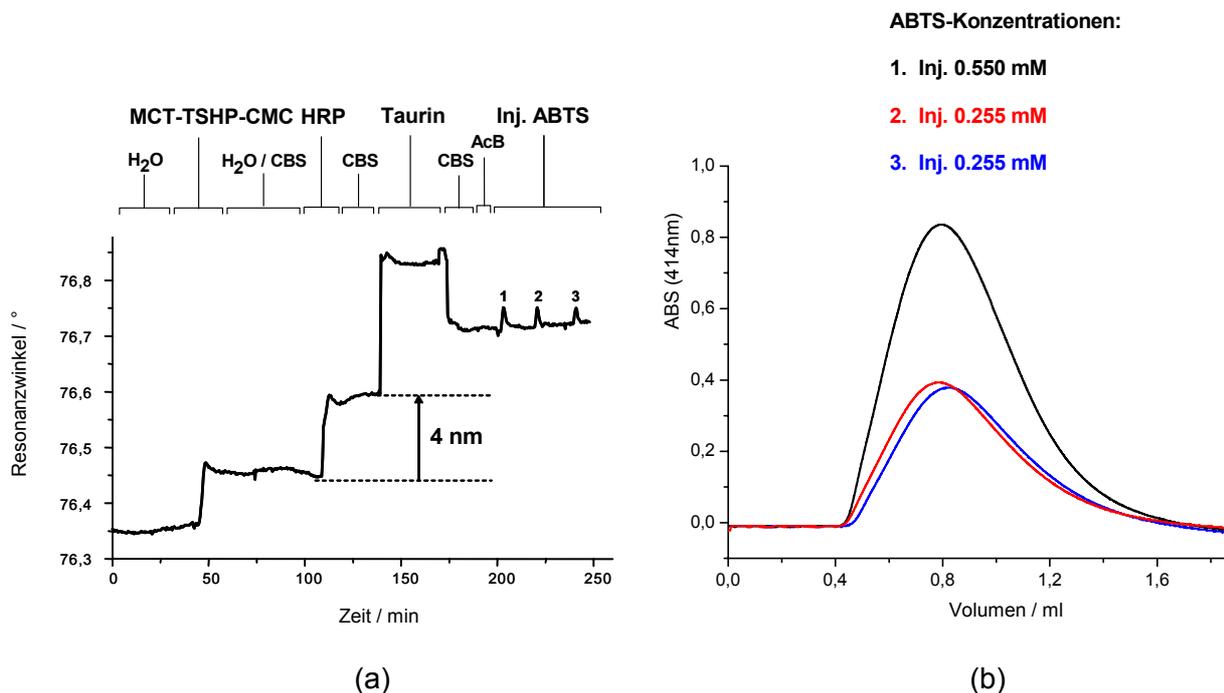


Abb. 7.2: (a) Adsorptionskinetik der HRP an einer MCT-TSHP-CMC funktionalisierten Au-Oberfläche; Konzentration an MCT-TSHP-CMC: 0.1%-ig in 0.2 M Zitronensäure; HRP: 12.5 μM in 10 mM CBS-Puffer pH 8.0 (CBS: 10 mM Carbonat-Puffer+0.15 M KCl); Taurin: 0.1 M in 10 mM CBS-Puffer pH 8.0; AcB: 10 mM Acetat-Puffer pH 4.5 + H_2O_2 (0.01%-ig); (b) Überprüfung der Aktivität der HRP direkt nach der Immobilisierung.

Nach der Durchführung des HRP-Schichtaufbaus wurde überprüft ob die Aktivität des Enzyms nach der Immobilisierung erhalten bleibt. Dazu wurde das Laufmittel von CB-Puffer auf 10 mM Acetat-Puffer pH 4.5 (+H₂O₂) umgestellt und das entsprechende ABTS-Assay durchgeführt^[341]: zwei Konzentrationen an ABTS wurden injiziert (siehe Abb. 7.2 (b)) und die Abnahme des Eduktes ABTS (bei $\lambda_{\text{MAX}} = 340 \text{ nm}$) bzw. die Entstehung des Produktes ABTS* (bei $\lambda_{\text{MAX}} = 414 \text{ nm}$) mittels eines Dual-UV-Spektrometers verfolgt. Aus der Abbildung 7.2 (b) ist zu sehen dass die HRP ihre Aktivität durch Immobilisierung nicht verloren hat und dass der Enzymumsatz (*turnover*) reproduzierbar ist (in Abb. 7.2 (b) am Beispiel der 0.255 mM ABTS-Konzentration gezeigt).

Um jedoch Aussagen über die Aktivität der immobilisierten HRP treffen zu können wurde eine Michaelis-Menten Kinetik aufgenommen und der ermittelte K_M (Michaelis-Menten Konstante)-Wert mit dem des freien Enzyms (in Lösung) verglichen.

Die K_M -Konstante ist eine charakteristische Enzym-Substrat-Konstante (typisch: 10^{-6} bis 10^{-2} M) und wird durch die Michaelis-Menten-Gleichung ausgedrückt^[350]:

$$v = v_{\text{max}} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (7-1)$$

v : Reaktionsgeschwindigkeit [s^{-1}];

v_{max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit [s^{-1}];

[S]: Konzentration Substrat [M];

K_M : Michaelis-Menten Konstante;

Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei konstanter Enzymkonzentration.

Ist die ermittelte K_M -Konstante groß so werden hohe Substratkonzentrationen ([S]) für hohe Reaktionsgeschwindigkeiten (v) gebraucht was auf eine geringe Affinität des Enzyms zum Substrat zurückzuführen ist, und umgekehrt: K_M -Konstante klein heißt hohe Affinität des Enzyms zum Substrat.

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante K_M wurden verschiedene Substratkonzentrationen (ABTS) nacheinander injiziert und die Produktmenge (ABTS*) durch UV-Absorption gemessen (siehe Abb. 7.3 (a)). Durch Auftragung der jeweiligen Produktabsorption gegen die Substratkonzentration wurde eine charakteristische Sättigungskurve erhalten, aus welcher K_M bestimmt wurde (siehe Abb. 7.3 (b)).

Die Ermittlung der K_M -Konstante erfolgte durch die mathematische Hyperbelkurvenannäherung (nichtlineare Regression) der Michaelis-Menten-Gleichung an die experimentellen Daten (siehe Abb. 7.3 (b)). Man erhält eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 1.98 \pm 0.44$ mM die etwas größer ist als die in Lösung ($K_M = 0.70$ mM).

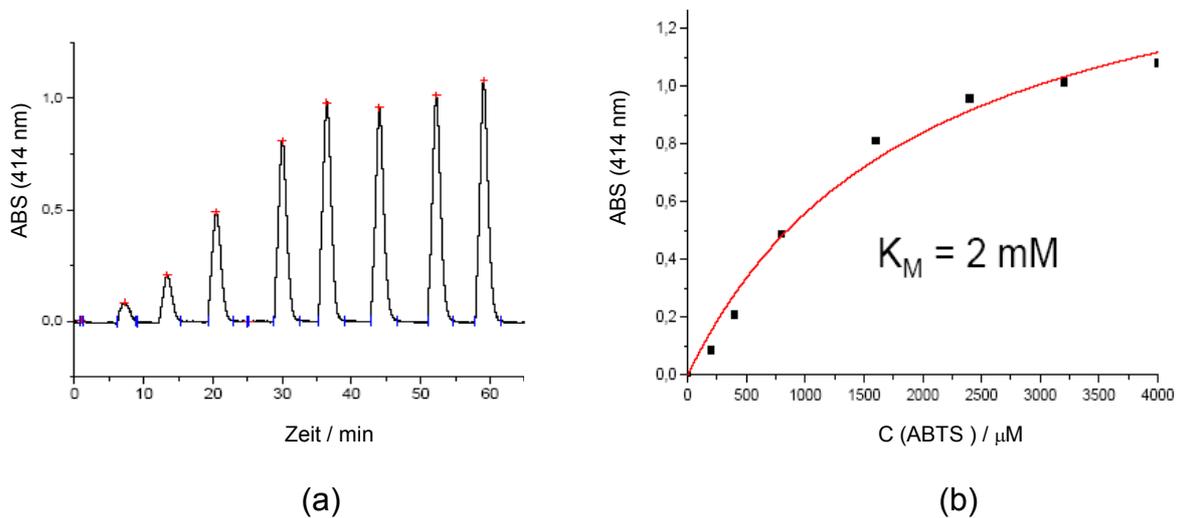


Abb. 7.3: (a) UV-Detektion der Produktmengen ABTS* ($\lambda_{MAX} = 414$ nm) bei verschiedenen ABTS-Substratkonzentrationen (100-4000 μ M);
(b) Typische Michaelis-Menten Sättigungskurve zur Bestimmung von K_M .

Der große Wert der K_M -Konstante für die immobilisierte HRP lässt darauf schließen, dass die Affinität des Enzyms zum Substrat abgenommen hat, wahrscheinlich aufgrund von Konformationsänderungen des Proteins durch die Immobilisierung [351-354].

Für die Änderung der Aktivität und den damit verbundenen kinetischen Parametern von immobilisierten Enzymen sollen, nach Kobayashi und Laidler [355], vier Hauptursachen in Betracht gezogen werden:

- 1) *Konformationsänderungen des Enzyms* (speziell am aktiven Zentrum) infolge der Fixierung: Änderungen der k_{cat} und K_M - Werte durch direkte, quasi irreversible Wechselwirkung des Enzyms mit dem Träger, durch kovalente aber auch hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen;
- 2) *Mikromilieueinflüsse auf das Enzym* (Einfluss auf K_M): meist reversible Effekte, die im Wesentlichen auf Änderungen der Dissoziationsgleichgewichte der geladenen Gruppen des aktiven Zentrums zurückgeführt werden können [356]. Man unterscheidet zwei Typen der Beeinflussung der pK-Werte: a) Verschiebung

des Dissoziationsgleichgewichts durch Änderung des chemischen Potentials von Ionen, die am Gleichgewicht direkt beteiligt sind (H^+ , OH^-) und b) Beeinflussung des Dissoziationsgleichgewichts durch die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums;

- 3) *Einfluss von Verteilungsgleichgewichten auf immobilisierte Enzyme*: infolge von π -Elektroneninteraktion, ionischer, polarer, Wasserstoffbrücken- oder hydrophober Wechselwirkungen zwischen Träger und Substraten, Produkten und/oder Inhibitoren stellen sich Verteilungsgleichgewichte zwischen fester und flüssiger Phase ein ^[357].
- 4) *Diffusionseffekte* (z. B. in Membranelektroden): Enzymbeladungsfaktor (f_E) und Thiele-Modulus ($\sqrt{f_E}$) geben an, ob in einem Immobilisat das Signal durch die Enzymkinetik oder durch die Diffusion des Substrats bestimmt wird.

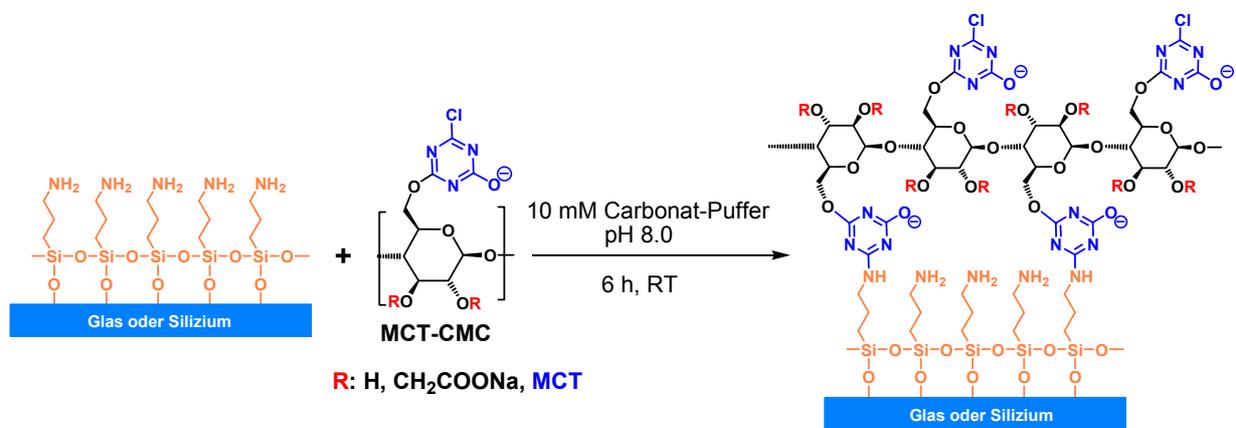
7.4 Aktivität von immobilisierter HRP an reaktiven Cellulose-Monoschichten auf Silizium- bzw. Glasoberflächen

Enzymschichtsystemen immobilisiert auf Glas bzw. Siliziumoberflächen finden in den letzten Jahren immer mehr Interesse aufgrund der kostengünstigeren Herstellung (im Vergleich zu Gold) und der Anwendung dieser Mikroenzymreaktoren in automatisierten Prozessen, gekoppelt mit verschiedenen analytischen Methoden wie z. B. Massenspektrometrie ^[358, 359] oder Kapillarelektrophorese ^[360, 361].

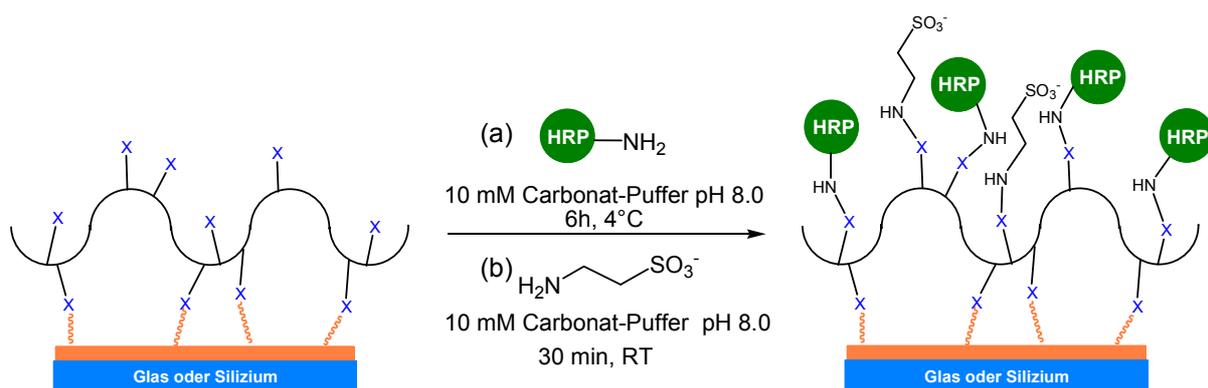
Der Aufbau von Enzymschichtsystemen auf Basis von funktionellen Cellulosederivaten auf Glas bzw. Siliziumnitrid sind in der Literatur durch Arbeiten von Klemm und Berlin bekannt geworden. Sie berichten über die Anwendung von verschiedenen Diamino-Cellulosederivate ^[122-124] zum Aufbau von supramolekularen Enzymstrukturen (verwendete Enzyme: Glucose-Oxidase, Peroxidase, Lactase-Oxidase) ^[122] und über den Einfluss verschiedener Kupplungsreagenzien auf die Aktivität, die Thermo- und Lagerstabilität ^[125, 126].

Im Folgenden soll, im Gegensatz zu den literaturbekannten Verfahren ^[126], die reagenzfreie (*reagent free*) Immobilisierung der Meerrettichperoxidase (HRP) an einer reaktiven MCT-CMC **20** Monoschicht auf Glas bzw. Silizium erläutert werden.

Bei dem Aufbau eines solchen HRP-Schichtsystems auf Glas bzw. Silizium wird zuerst eine aminopropylsilanierte Schicht (APES-Schicht) mit dem MCT-CMC derivatisiert (Durchführung und Charakterisierung siehe Kapitel 5.3.4). Dabei bindet ein Teil der reaktiven MCT-Gruppen von Derivat **20**, über deren Cl-Atome, an die Aminofunktionalitäten der APES-Schicht. Die restlichen MCT-Gruppen werden zur Anbindung der HRP verwendet (Schema 7.4 (a)). Der unspezifisch gebundene Anteil an HRP wird anschließend mit 1 M NaCl-Lösung und CB-Puffer abgespült (siehe experimenteller Teil). Die nicht umgesetzten reaktiven Funktionalitäten werden zuletzt mit einer wässrigen Taurin-Lösung deaktiviert (siehe Schema 7.4 (b)).



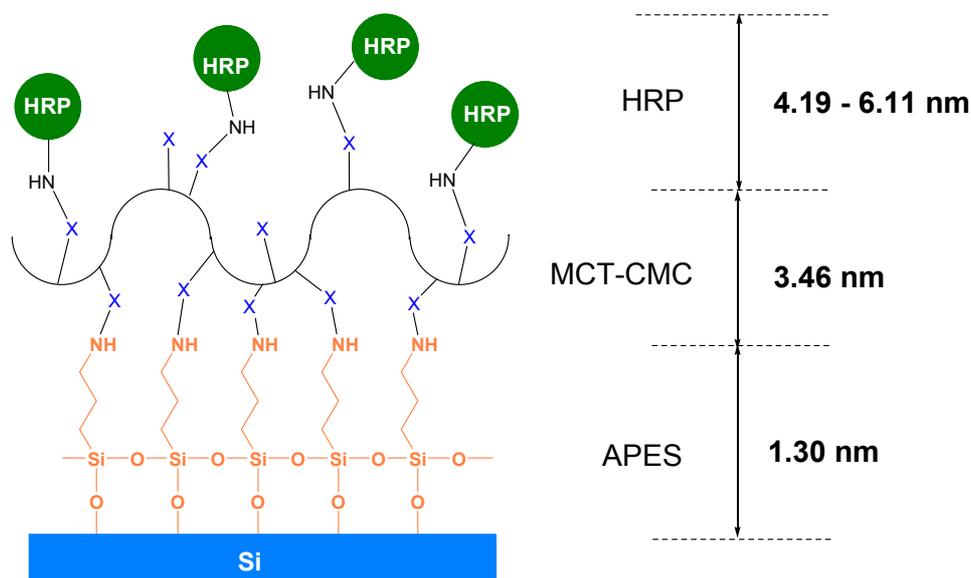
Schema 7.3: Immobilisierung von MCT-CMC **20** auf einer mit (3-Aminopropyl)triethoxysilan beschichteten Glas oder Silizium-Oberfläche.



Schema 7.4: (a) Immobilisierung der HRP (X: monochlortriazinyl: MCT);
(b) Deaktivierung der restlichen Reaktivgruppen (X) mit Taurin.

Der HRP-Schichtaufbau wurde ellipsometrisch untersucht und folgende Dicken der einzelnen Schichten ermittelt: 1.30 nm für die APES-Schicht, 3.46 nm für die MCT-CMC-Schicht und 4.19 - 6.11 nm für die HRP ^[336] (Schema 7.5).

Die Schichtdicke der HRP entspricht den Abmessungen der HRP-Moleküle ^[336], so dass von einer Monoschicht ausgegangen werden kann.



Schema 7.5: Charakterisierung des HRP-Schichtaufbaus mittels Ellipsometrie;

Bemerkung: Schichtdicke SiO₂: 2,0 ± 0,1 nm.

Der HRP-Schichtaufbau konnte auch in Quarzkapillaren (FuSi-Kapillaren; *fused silica*) erfolgreich durchgeführt werden. Dazu wurden FuSi-Kapillaren mit einem Durchmesser von $D = 180 \mu\text{m}$ und einer Länge von $L = 30 \text{ cm}$ verwendet.

In einem ersten Schritt wurde die FuSi-Kapillare mit 1 M NaOH-Lösung aktiviert ^[361]. Nach dem Spülen der Kapillare mit H₂O und Trocknen erfolgte die Beschichtung mit der APES-Lösung. Das überschüssige APES wurde durch Evakuieren der FuSi-Kapillare entfernt und über Nacht bei 60°C getrocknet. Die Anbindung der reaktiven MCT-CMC **20** wurde durch Rezirkulation der wässrigen Lösung (0,1%-ig in 10 mM Carbonat-Puffer pH 8,0) für 2 h durch die APES beschichtete FuSi-Kapillare erreicht. Im Anschluss erfolgte die Immobilisierung der HRP, Entfernung der unspezifisch gebundenen HRP-Anteile mit Salzlösung und Deaktivierung der reaktiven MCT-Gruppen mit Taurin (detaillierte Beschichtungsbedingungen / -parameter siehe experimenteller Teil).

Als Blindproben des HRP-Schichtaufbaus in FuSi-Kapillaren, wurden beschichtete Kapillaren verwendet die nicht mit dem reaktiven MCT-CMC Derivat funktionalisiert wurden. Nach der Zugabe der HRP und anschließendem Aktivitätstest konnte kein Umsatz detektiert werden, was durch das Ausspülen der HRP in Abwesenheit des reaktiven Derivats **20** zurückzuführen ist.

Zur Bestimmung der Aktivität der immobilisierten HRP in FuSi-Kapillaren wurde ein Online-Messsystem entwickelt, bestehend aus: Pumpe, Autosampler, thermostatisierter Enzymkapillare und UV-Detektor (siehe Abb. 7.3).

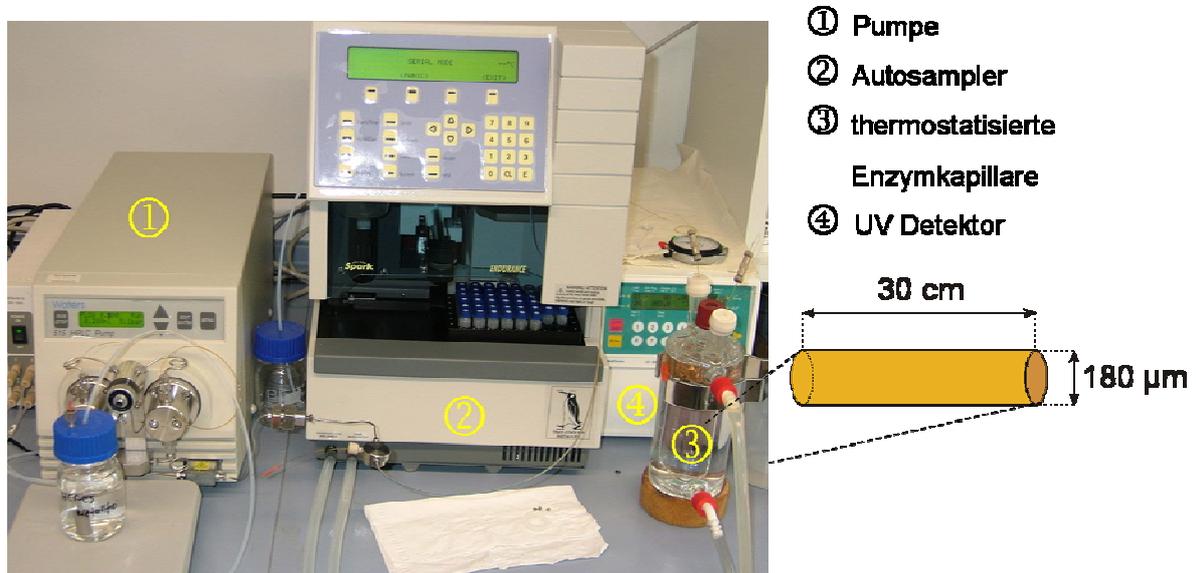


Abb. 7.3: Online-Messsystem zur Bestimmung der Aktivität von immobilisierten Enzymen in FuSi-Kapillaren.

Mit dem Online-Messgerät konnte nun die Michaelis-Menten-Kinetik der Peroxidase aufgenommen und die K_M -Konstante ermittelt werden (siehe Abb. 7.4)

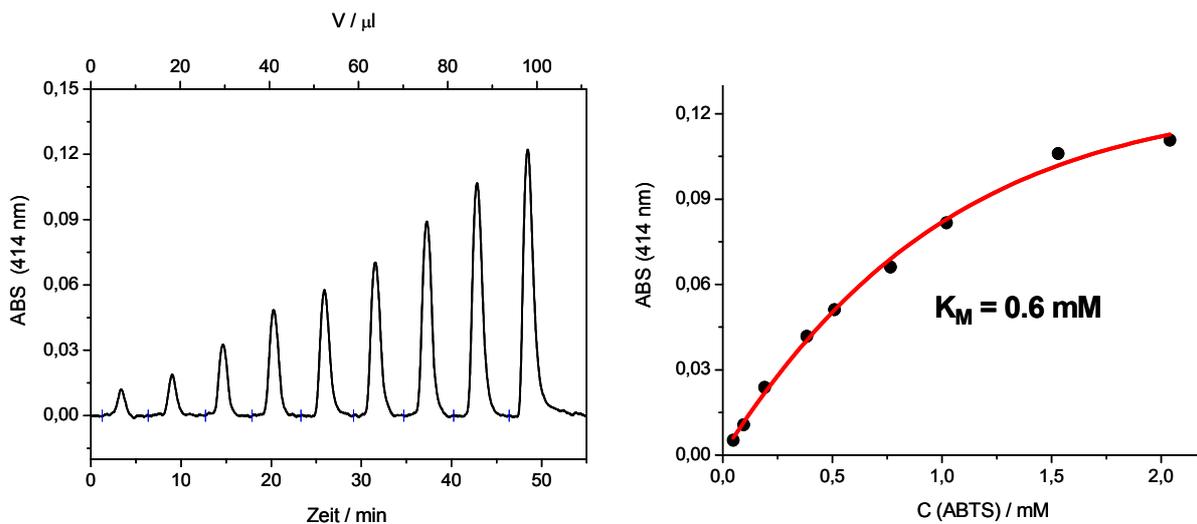


Abb. 7.4: (a) UV-Detektion der Produktmengen ABTS* ($\lambda_{\text{MAX}} = 414 \text{ nm}$) bei verschiedenen ABTS-Substratkonzentrationen (0 - 2 mM);
 (b) Typische Michaelis-Menten Sättigungskurve zur Bestimmung von K_M ;
 K_M (HRP in Lösung) = 0.7 mM.

Man erhält für die immobilisierte Meerrettichperoxidase (HRP) eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 0.60 \pm 0.10$ mM. Dieser Wert ist ähnlich dem K_M -Wert der HRP in Lösung und lässt darauf schließen, dass die HRP durch die Immobilisierung nicht an Bindungsfähigkeit verloren hat. Der ermittelte Wert von $K_M = 0.60$ mM stimmt mit den literaturbekannten K_M -Werten (Literaturwert: $K_M = 0.63$ mM) für die immobilisierte HRP (unter Verwendung des Cyanurchlorids als Kupplungsreagenz) sehr gut überein ^[125, 126].

Die an MCT-CMC immobilisierte HRP weist eine gute Langzeitstabilität der Aktivität auf: erst nach einem Monat wird die Abnahme der Aktivität auf die Hälfte des anfänglichen Werts registriert. Die Erhaltung der Aktivität ist auch durch die gute operative Stabilität des immobilisierten Enzyms zu erklären ^[362], da bekanntlich die HRP in Lösung sehr schnell ihre Aktivität in Anwesenheit des Substrates H_2O_2 verliert ^[363]. Zusätzlich zeigt die immobilisierte HRP auch sehr gute Thermostabilität (Durchführung von Aktivitätstests innerhalb eines Monats bei Raumtemperatur) und Lagerstabilität (eine HRP modifizierte FuSi-Kapillare zeigt nach 30 Tagen Lagerung bei 4°C die gleiche Aktivität wie zu Beginn).

7.5 Kompetitive Hemmung immobilisierter HRP an reaktiven Cellulose-Monoschichten mittels *p*-Kresol

Die Immobilisierung von Enzymen (bzw. Proteinen allgemein) an Glas und/oder Siliziumoberflächen, vor allem an FuSi-Kapillaren, und deren Einführung in automatisierten Online-Messsystemen, bringt die potentielle Anwendung dieser Systeme im Hochdurchsatz-Screening von Inhibitoren (Wirkstoffen) sehr nahe.

Dazu soll nun als Anwendungsbeispiel die kompetitive Hemmung der immobilisierten HRP mittels *p*-Kresol, vorgestellt werden.

In einem *kompetitiven Assay* konkurriert ein dem Substrat ähnliches Molekül ^[364, 365], in diesem Fall *p*-Kresol, mit dem Substrat ABTS um das aktive Zentrum der HRP. Diese Konkurrenzreaktion ist durch die Abschwächung der Farbreaktion von ABTS zu erkennen. Im durchgeführten kompetitiven Assay wurden zu einer konstanten Konzentration an ABTS ($[ABTS] = 0.26$ mM) verschiedene Konzentrationen an *p*-Kresol zugegeben und der Umsatz von ABTS mittels optischer Absorption bestimmt (siehe Abb. 7.5).

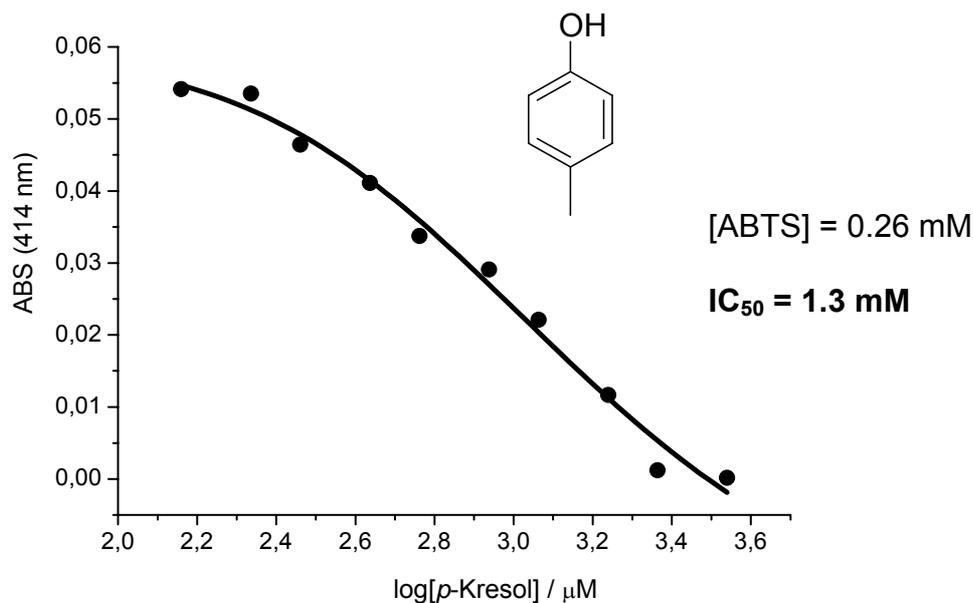


Abb. 7.5: Graphische Darstellung - $ABS = f(\log[p\text{-Kresol}])$ - der kompetitiven Hemmung der HRP-katalysierten Reaktion bei einer Substratkonzentration von $[ABTS] = 0.26 \text{ mM}$.

Anschließend wird die Konzentration an *p*-Kresol ermittelt bei der die Aktivität des Enzyms auf die Hälfte abgenommen hat. Diese charakteristische Konzentration, der so genannte IC₅₀-Wert (in diesem Fall: *Pseudo*-IC₅₀-Wert) betrug 1.3 mM.

Das vorgestellte Anwendungsbeispiel der kompetitiven Hemmung der immobilisierten HRP motiviert zur weiteren Anwendung solcher Systeme im Hochdurchsatz-Screening von Inhibitoren.

7.6 Zusammenfassung

Die Monoschichten der reaktiven MCT-Derivaten **14** (MCT-TSHP-CMC) und **20** (MCT-CMC) konnten erfolgreich zur kovalenten, reagenzfreien Kupplung der Meerrettichperoxidase (HRP) an Gold- bzw. Glas- und Siliziumoberflächen eingesetzt werden.

Der HRP-Schichtaufbau auf Goldoberflächen wurde mittels *in situ* SPR-Spektroskopie verfolgt und charakterisiert. Die ermittelte Belegungsdichte an HRP lag bei 4 mg/cm^2 . Das ABTS/H₂O₂ Assay zeigte, dass beim so erzeugten Enzymsensor auf Gold, die enzymatische Aktivität erhalten bleibt.

Durch Aufnahme von Michaelis-Menten-Kinetiken der immobilisierten HRP auf Gold konnte die Michaelis-Menten Konstante mit einem Wert von $K_M = 1.98 \pm 0.44$ mM ermittelt werden. Dieser Wert ist im Vergleich zum K_M -Wert der HRP in Lösung, $K_M = 0.7$ mM, relativ groß, was auf Konformationsänderungen durch die Immobilisierung zurückgeführt wurde.

Die Meerrettichperoxidase (HRP) konnte erfolgreich an mit MCT-CMC **20** funktionalisierten Glas- / Siliziumoberflächen und in Quarzkapillaren (FuSi-Kapillaren) gekuppelt werden. Der HRP-Schichtaufbau wurde mittels Ellipsometrie charakterisiert und die entsprechenden Dicken der jeweiligen Schichten (APES, MCT-CMC und HRP) berechnet. Für den HRP-Schichtaufbau in FuSi-Kapillaren wurde ein Online-Messsystem entwickelt und damit Michaelis-Menten-Kinetiken des immobilisierten Enzyms gemessen. Die ermittelte K_M -Konstante zeigte hier einen Wert von $K_M = 0.60 \pm 0.10$ mM, der mit dem Wert in Lösung sehr gut übereinstimmt, und auf keinen Verlust der Bindungsfähigkeit durch Immobilisierung zurückzuführen ist.

Die immobilisierte HRP auf Gold- und vor allem auf Glas / Silizium bzw. in FuSi-Kapillaren zeigt eine gute Langzeitstabilität der Aktivität, sehr gute Thermostabilität (Durchführung von Aktivitätstests innerhalb eines Monats bei Raumtemperatur) und Lagerstabilität.

Ein kompetitives Assay (mit *p*-Kresol) ermöglichte des Weiteren die Bestimmung von Inhibitionskonstanten (*Pseudo*-IC50-Wert).

Neben einer gesteigerten Stabilität und ausgezeichneter Reproduzierbarkeit kinetischer Messungen bieten in Monoschichten integrierte Enzyme somit auch die Möglichkeit, hocheffiziente Screeningtests für Inhibitoren zu entwickeln.

8. Experimenteller Teil

8.1 Chemikalien

Die Reagenzien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Aldrich, Fluka oder Riedel-deHaën erworben und, soweit nicht anders beschrieben, ohne weitere Reinigung eingesetzt. Als Ausgangsmaterialien für die Synthesen wurde die mikrokristalline Cellulose AVICEL PH 101 (Fluka; $M_w = 36000$ g/mol, DP = 280) und die Carboxymethylcellulose Natrium Salz (Aldrich, $M_w = 250000$ g/mol, DP = 925) verwendet. Absolute Lösungsmittel (DMF, DMSO) wurden mit der Qualität *puriss.* von der Firma Fluka bezogen. Die übrigen Lösungsmittel wurden in mindestens "zur Synthese" Qualität erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Zur Durchmischung der Reaktionen wurde ein Magnetrührer mit Heizplatte vom Typ *MR 3001 K* der Firma Heidolph und ein KPG-Rührer der Firma IKA Labortechnik verwendet. Zum Erhitzen der Reaktionsansätze wurde ein Ölbad verwendet. Reaktionen bei niedrigen Temperaturen (-5 - 8°C) wurden unter Verwendung eines Kryostaten *Lauda RM 6* der Firma Lauda durchgeführt. Die eingesetzte Cellulose wurde vor den Synthesen in einem Hochvakuum von mindestens 10^{-2} mbar bei 100°C getrocknet. Die Trocknung aller Produkte die nicht durch Ultrafiltration / Gefriertrocknung isoliert wurden erfolgte ebenfalls in Hochvakuum bei mindestens 10^{-5} mbar.

Das für den Aufbau von Thiocelluloseschichten, Immunosensorschichten bzw. Enzymschichtsystemen verwendete MilliQ-Wasser wurde mittels einer *Millipore Simplicity* Reinstwasseranlage der Firma Millipore gereinigt. Das so erhaltene entionisierte Wasser besaß eine spezifische Leitfähigkeit von $\kappa \leq 0.054$ $\mu\text{S}/\text{cm}$.

8.2 Methoden und Geräte

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden an einem Spektrometer des Typs *AVANCE 500* (^1H : 500.00 MHz, ^{13}C : 125.71 MHz) der Firma Bruker Biospin bei Raumtemperatur bzw. 60°C

aufgenommen. Zur Messung der Spektren wurden 30-60 mg der Substanz in 700-1000 μl Lösungsmittel gelöst. Um eine Signalerhöhung bei den anschließenden NMR-Messungen zu erreichen wurden die Proben mit Hilfe eines Titandrahtes in einem *Transsonic 460* Ultraschallbad (Firma Elma) über Nacht partiell abgebaut. Folgende interne Standards wurden für die ^1H -NMR Messungen benutzt: für D_2O als Lösungsmittel wurde Acetonitril (1.94 ppm) und Trimethylsilanpropylsulfonat (TMSP; 0.00 ppm) verwendet; für $\text{DMSO-}d_6$ diente die eigene Lösungsmittelresonanz bei 2.49 ppm bzw. Tetramethylsilan (TMS; 0.00 ppm) als innere Standards. Bei den ^{13}C -NMR Messungen: für D_2O wurde Acetonitril (Signal bei 1.30 ppm und 118.90 ppm), für $\text{DMSO-}d_6$ diente die eigene Lösungsmittelresonanz bei 39.50 ppm bzw. Tetramethylsilan (TMS; 0.00 ppm) als interne Standards. Die Kernresonanzspektren wurden mit der Software *ACDLabs 7.0* der Firma Advanced Chemistry Development Inc. und teilweise mit der Software *Win-NMR* der Firma Bruker ausgewertet. Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) relativ zu TMS / TMSP bzw. Acetonitril angegeben. Die Protonen der Glcp-Einheiten der Cellulosen sind mit H-1, H-2,...H-6 gekennzeichnet, Protonen von Substituenten werden mit H-1', H-2', H-3', H-1'', H-2'', H-3'' beginnend an der Anknüpfungsstelle gekennzeichnet. Die Kohlenstoffatome der Glcp-Einheiten werden beginnend am anomeren Zentrum mit C-1, C-2,...C-6, die Kohlenstoffatome der Substituenten mit C-1', C-2', C-3', C-1'', C-2'', C-3'' gekennzeichnet. Der Exponent A eines Kohlenstoffatoms $\text{C-}\beta^A$ gibt an, dass dieses funktionalisiert ist. Der Exponent B hingegen deutet auf ein unsubstituiertes Kohlenstoffatom hin.

Bei den Multiplizitäten in den ^1H -NMR-Spektren steht *s* für Singulett, *d* für Dublett, *dd* für Doppeldublett, *t* für Triplet, *bs* für breites Signal und *m* für Multiplet.

Infrarotspektroskopie

Infrarotspektren (IR) wurden mit einem FT-IR-Spektrometer *Tensor 27* der Firma Bruker Optik GmbH als Reflexionsspektren mit der GoldenGate-Micro-ATR-Technik aufgenommen. Für die *FTIR-ERS* Experimente an Monoschichten der Thiocellulose-derivate **2**, **6a** und **8** wurde die Reflexionseinheit A518 80° (Einfallswinkel $\phi = 80^\circ$) und ein Polarisator vom Typ A121 der Firma Bruker Optik GmbH verwendet. Die Auswertung aller IR-Spektren erfolgte mit dem Programm *Opus 4* der Bruker Optik GmbH. Die Wellenzahlen charakteristischer Banden sind in cm^{-1} angegeben. Die

lokalisierten Schwingungen werden mit ν für Valenzschwingungen und δ für Deformationsschwingungen gekennzeichnet.

Elementaranalysen

Die C, H, N-Elementaranalysen (EA) wurden am Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik (Arbeitskreis Prof. Dr. C. Huber) an der Universität des Saarlandes gemessen. Die Chlor-, Brom- und Schwefel-Elementaranalysen wurden von der Firma Analytische Laboratorien (Prof. Dr. H. Malissa und G. Reuter GmbH) in Lindlar durchgeführt. Die Genauigkeit der Messungen betrug $\pm 0.2\%$.

Von den gemessenen Werten sind die für die Substanzen berechneten Werte gegeben. Die gemessenen und berechneten Daten sind auf die monomere Wiederholungseinheit des Cellulosemoleküls bezogen. Aus den Daten der Elementaranalysen wurden die Substitutionsgrade mit Hilfe der Software *MMCALC 1.8* der Firma Soft Shell International berechnet.

Massenspektrometrie

Das ESI-Massenspektrum von 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin **9** wurde mit einem *Waters Micromass ZQ-4000* Massenspektrometer (Firma Waters) aus methanolischer Lösung aufgenommen.

Ultrafiltration

Die Ultrafiltration (UF) wurde zur Reinigung der Produkte von Salzen und anderen Verunreinigungen geringer Molmasse verwendet. Dazu wurden die wässrigen Lösungen der dargestellten Cellulosederivate mit dem jeweils zwanzigfachen Volumen an Wasser oder Salzlösung (siehe präparativer Teil) relativ zum Volumen des zu reinigenden Derivats, gegen Cellulosemembranen kontinuierlich filtriert, um eine vollständige Reinigung zu gewährleisten. Ultrafiltrationen wurden zum einen mit Centrex UF-2 Ultrafiltrationsröhrchen der Firma Schleicher & Schüll in einer Zentrifuge vom Typ Rotina 35 der Firma Hettich bei einer Drehzahl von 5000 U/min durchgeführt. Die Ausschlussgrenze der Membrane (Regeneratcellulose) betrug 5 kDa bzw. 10 kDa. Zum anderen wurden die Ultrafiltrationen in einer Rührzelle GH-100 der Firma Berghof und in Rührzellen der Firma Prominent Dosiertechnik GmbH mit kontinuierlichem Wasserzufluss unter 4 bar durchgeführt. Als Membranen wurden UF-C5 bzw. UF-C10 Membranen (Regeneratcellulose; Ausschlussgrenze 5 kDa bzw. 10 kDa) der Firma Microdyn-Nadir eingesetzt.

Bestimmung des Brechungsindex (n) und Brechungsindexinkrementes (dn/dc) der HTSHP-CMC 8

Der Brechungsindex vom Thio-CMC Derivat **8** wurde durch lineare Extrapolation der Brechungsindizes wässriger Lösungen von **8** auf ein Massenbruch (w) von $w = 1$.

Die Brechungsindizes der wässrigen Lösungen von HTSHP-CMC **8** ($c_{\text{HTSHP-CMC}} = 0-1.2$ mg/ml; c = Konzentration) wurden mit einem *LR40 Refraktometer* ($\lambda = 670$ nm) der Firma Viscotek bestimmt. Dieser wurde vorher mit wässrigen Kaliumchlorid (KCl)- bzw. Rohrzucker-Lösungen ($c_{\text{KCl; Rohrzucker}} = 0-10$ mg/ml) kalibriert ^[212]. Für Derivat **8** wurde ein Wert für den Brechungsindex von $n_{\text{HTSHP-CMC}} = 1.470 \pm 0.005$ bestimmt. Das Brechungsindexinkrement für die HTSHP-CMC **8**, $dn/dc = 0.140$ ml/g, wurde aus der Steigung der Geraden $n_{\text{HTSHP-CMC}}(c_{\text{HTSHP-CMC}})$ ermittelt. Der Wert des Brechungsindex ($n = 1.47$) und des Brechungsindexinkrementes ($dn/dc = 0.140$ ml/g) wurde für alle hergestellten Cellulosederivate angenommen.

Gelpermeationschromatographie (GPC-MALLS)

Die Molmassen der Cellulosederivaten wurden mittels GPC in wässriger 0.1 M NaNO_3 -Lösung unter Verwendung von $10 \mu\text{M}$ MCX Trennsäulen (10^3 und 10^6 Å, Polymer Standard Service GmbH, Mainz) ermittelt. Zur Detektion wurde eine *PSS SLD 7000 MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering)*-Lichtstreuereinheit (LS) der Firma Polymer Standards Service GmbH und eine RI (*Refractive Index*)-Brechungsindexeinheit (*LR40*, Viskotek) verwendet. Der Fluss betrug 1 ml/min bei einem Druck von 20 bar. Der Eluent wurde mit einer *Waters 1515* Pumpe der Firma Waters befördert und mit einem Entgaser der Firma VDS Optilab entgast.

Probenvorbereitung: Alle Proben wurden ohne weitere Vorbereitung eingewogen und im Eluent gelöst (Probenkonzentration: 5-20 g/l). Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und vor der Injektion durch ein 0.45 μm Cellulosemembran filtriert. Die reaktiven Cellulosederivaten wurden durch das Lösen in einer 0.1 M NaNO_3 / Taurin Lösung deaktiviert, um eine eventuelle Anbindung an den Säulen zu vermeiden. Als Elutionsmittel wurde hier ebenfalls eine 0.1 M NaNO_3 / Taurin Lösung verwendet.

Die mittleren Molmassen (M_w) der Cellulosederivaten wurden aus den entsprechenden Elutionskurven (sowohl LS als auch RI-Elutionskurven) mit dem Programm *WINGPCTM Version 7.12* (Polymer Standard Service GmbH, Mainz) berechnet. Zur Eichung verwendete man engverteilte Pullulan-Standards mit

Molekulargewichten von 342-710000 g/mol. Bei der Auswertung der M_w s aus den LS-Elutionskurven wurde ein Wert für das Brechungsindexinkrement von $dn/dc = 0.140 \text{ ml/g}$ verwendet.

Bestimmung der Substitutionsgrade der CMC-Derivate

Die Substitutionsgrade (DS) der CMC, MTh-Cellulose **2**, MTh-CMC **3** und AHP-CMC **5** wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, aus dem Verhältnis der Integralen der Signale der Protonen der Carboxymethyl-, Allyl- und Methylthio-Substituenten und des H-1 Protons der Glcp-Einheit. Die DS-Grade der Thio-, Bromo-, Monochlortriazinyl (MCT)- und Hydrazid-Substituenten wurden aus der EA bestimmt. Die DS-Grade der reaktiven EDC/MEDC- und NHS-Thio-CMC Derivaten wurden sowohl aus den Elementaranalysen als auch mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie berechnet. Die Ermittlung der $DS_{\text{EDC/MEDC}}$ bzw. DS_{NHS} aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erfolgte aus dem Integrationsverhältnis des Signalbereiches für die Protonen der Methylgruppen der EDC/MEDC-Funktionalitäten bzw. der Protonen der NHS-Gruppen und des Signals des H-1 Protons der Glcp-Einheit.

Die *partiellen Substitutionsgrade* (x_2 , x_3 , x_6) der Carboxymethylcellulose (CMC) wurden mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt ^[35, 36], nach einem totalen Abbau der CMC mit Trifluoressigsäure ^[142]. Es wurde angenommen dass die ermittelten partiellen Substitutionsgrade der Carboxymethyl-Gruppen der Ausgangsverbindung CMC, bei den CMC Derivate **5-8** unverändert bleiben.

Gold- und Silber-Substrate für die SPR-Messungen

Die Gold (Au)- und Silber (Ag)-Substrate für die SPR-Messungen wurden wie folgt hergestellt. Glasobjektträger für die Mikroskopie (26 x 20 cm, $n = 1.51$ bei 546 nm) wurden jeweils mit Aceton (HPLC Grad, Riedel-deHaën), Wasser (MilliQ) und Methanol (HPLC Grad, Riedel-deHaën) gespült und für 15 Minuten in Wasser (MilliQ) mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Glassubstrate im Stickstoffstrom getrocknet und für 30 Minuten in einer 1 mM NaOH Lösung aktiviert. Danach erfolgte wiederum das Spülen mit Wasser (MilliQ) und das Trocknen im Stickstoffstrom (N_2 -Strom). Gold und Silber (99.9%) wurden bei einem N_2 -Druck von 0.02 mbar und einer Stromstärke von 25 mA innerhalb von 40 s direkt auf die aktivierten Glassubstrate gesputtert (= bedampft), oder auf Glassubstrate mit einer Chrom (Cr) oder Titan (Ti)-Zwischenschicht. Dazu wurde ein *K575 Turbo Sputter Coater* der

Firma Emitech (UK) verwendet. Die Schichtdicken der Au- und Ag-Substrate lagen bei $d = 40 \pm 5$ nm, was einer optischen Transmission von 8% bei einer Wellenlänge von $\lambda = 500$ nm entspricht. Die Chrom (Cr) oder Titan (Ti) Zwischenschichten besaßen Schichtdicken von $d = 1.0 \pm 0.4$ nm. Die verwendeten Sputterbedingungen für Cr und Ti waren: N_2 -Druck 0.02 mbar, Stromstärke 50 mA und Sputterzeit 20 s. Zum Aufbau von Immunosensoren auf Silberoberflächen wurden Ag-Substrate mit einer Schichtdicke für Ag von $d_{Ag} = 30 \pm 0.3$ nm und für die Cr-Zwischenschicht von $d_{Cr} = 1.7 \pm 0.1$ nm verwendet. Die Ag-Substrate wurden aufgrund ihrer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Oxidation in einem Exsikkator unter N_2 -Atmosphäre aufbewahrt, in den meisten Fällen jedoch direkt nach dem Sputtern verbraucht.

UV-VIS Spektroskopie

Die Messung der Aktivität der Meerrettichperoxidase (HRP) in Lösung als auch der UV-Transmission der gesputterten Gold- und Silbersubstrate (bei $\lambda = 500$ nm) für die SPR-Experimente, wurden mit einem heλios UV-VIS Photometer der Firma Unicam durchgeführt.

Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

Der Schichtaufbau der *thiofunktionalisierten Cellulosederivate* auf Gold und Silber wurde *in situ* mit Hilfe eines *Bio-Suplar II* SPR-Spektrometers der Firma Analytical μ -Systems, Mivitec GmbH (Regensburg)^[366] verfolgt. Dieses ist ausgestattet mit einem GaAs LED Laser ($\lambda = 670$ nm) und einem Glasprisma, welches einen Winkel von 65° ($n = 1.61$) besitzt. Die verwendete Durchflusszelle hat ein Volumen von ca. 20 μ l (Totvolumen: ca. 170 μ l). Entgastetes Wasser (MilliQ) wurde durch die Flüssigkeitszelle des SPR-Spektrometers mit einer Spritzenpumpe (kd Scientific) befördert.

Probenvorbereitung: Von den Thio-CMC Derivate **6a**, **6b** und **8** wurden 0.1 Gew. %-ige Lösungen in 0.2 M Zitronensäure hergestellt. Bei der Aktivierung der Thiosulfat-Gruppen der Thiosulfat-CMCs bzw. der reaktiven Thiosulfat-CMCs mit dem Aktivierungsmittel TCEP wurden jeweils 2 mg des Cellulosederivats und 2 mg TCEP in 10 ml 0.4 M Acetatpuffer pH 6.9 gelöst. Diese Lösungen, sowohl bei saurer als auch neutraler Aktivierung, wurden 1 Stunde (1 h) bei Raumtemperatur gerührt um eine vollständige Aktivierung der Thiosulfat-Funktionalitäten zu gewährleisten.

Die wässrigen Lösungen der Thio-CMC Derivate wurden anschließend mit Hilfe eines *Rheodyne 7125*, ausgestattet mit einer 50 μl Probenschleife, im Durchflusssystem injiziert. Die SAM Bildung von **6a**, **6b** und **8** erfolgte bei einem konstanten Fluss von 34 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Abscheidung der TSHP-CMC **6a** aus wässriger Lösung (0.3%-ige Lösung) ohne Aktivierung der Thiosulfat-Gruppen erfolgte bei einem Fluss von 14 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die MTh-CMC **3** wurde aus einer 0.3 Gew. %-igen Lösung in Wasser (MilliQ), bei einem Fluss von 11 $\mu\text{l}/\text{min}$, auf der Goldoberfläche abgeschieden.

Für den *Enzymschichtaufbau auf Gold* wurde das *Bio-Suplar II* Spektrometer verwendet. Die reaktive Cellulose **14**, die Meerrettichperoxidase (HRP; Fluka, $M_w = 40000 \text{ g/mol}$, Aktivität 700 mU, $\text{pH}_i = 8.49$), das Taurin (Fluka) und das Substrat ABTS (Fluka) wurden als wässrige Lösungen ebenfalls mit Hilfe eines *Rheodyne 7125*, ausgestattet mit einer 50 μl Probenschleife, im Durchflusssystem injiziert. Die Immobilisierung der reaktiven Cellulose **14** (0.1%-ige Lösung 0.2 M Zitronensäure) und der HRP (12.5 μM in 10 mM CBS-Puffer pH 8.0; CBS-Puffer: 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0 + 0.15 M KCl) erfolgten bei einem Fluss von 11 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Deaktivierung mit Taurin (0.1 M in 10 mM CBS-Puffer pH 8.0) erfolgte unter statischen Bedingungen (d. h. Fluss gestoppt; Verweilzeit: 15 min). Die jeweiligen Spülschritte (mit Wasser (MilliQ) und CBS-Puffer) wurden bei einem Fluss von 34 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt.

Bei der Aufnahme von Michaelis-Menten-Kinetiken, wurde das *Bio-Suplar II* Spektrometer mit einem *Wellchrom-K-2600* UV-Detektor der Firma Knauer gekoppelt. Als Laufmittel wurde ein 10 mM AcB-Puffer pH 4.5 (AcB: 10 mM Acetat-Puffer pH 4.5 + H_2O_2 (0.01%-ig) verwendet. Für die Aufnahme der Michaelis-Menten Kinetiken wurden ABTS Lösungen mit Konzentrationen von 100–4000 μM injiziert. Die SPR-Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Aufnahme der UV-Spektren von ABTS (Edukt ABTS bei $\lambda_{\text{MAX}} = 340 \text{ nm}$, Produkt ABTS* bei $\lambda_{\text{MAX}} = 414 \text{ nm}$) erfolgte mit der Software *Endurance* der Firma SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH. Die Auswertung der Michaelis-Menten Kinetik wurde mit dem Programm *Origin 7.0* der OriginLab Corp durchgeführt.

Der *BSA-Schichtaufbau auf Goldoberflächen* und die anschließenden Affinitätsexperimente mit aBSA wurden *in situ* mit Hilfe eines thermostatisierten SPR-Spektrometers mit *SpreetaTM*-Sensortechnologie der Firma Texas Instruments Co

(Dallas, Texas) im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. J.-C. Pyun (Abteilung Human Engineering, KIST Europe GmbH) durchgeführt. Alle Reagenzien (reaktive Cellulose **16**, BSA und aBSA) wurden als wässrige Lösungen mittels einer peristaltischen Pumpe der Firma Amersham Biosciences in die SPR-Zelle (500 μ l) transportiert. Die Immobilisierung der reaktiven Cellulose (0.3%-ige Lösung in Wasser), des BSAs (0.5%-ig in 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0) und die Deaktivierung mit Taurin (0.1 M in 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0) erfolgten unter statischen Bedingungen. Die entsprechenden Verweilzeiten in der SPR-Zelle waren: 2 h für die reaktive Cellulose **16**, 1 h für das BSA und 10 min für das Taurin. Die Sensoroberfläche wurde nach jedem Immobilisierungsschritt jeweils 3 x 10 Minuten mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Wasser (MilliQ) bzw. 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0) bei einem Fluss von 1 ml/min gespült.

Die *konsekutiven Affinitätsexperimente mit dem aBSA* wurden wie folgt durchgeführt: nach dem Deaktivierungsschritt mit Taurin wurde das Laufmittel von Carbonat-Puffer auf PB-T Puffer (PB-T: 10 mM Phosphat-Puffer pH 7.0 + 0.15 M KCl + 0.1 (Gew.)% T-20) umgestellt. Die Sensoroberfläche wurde damit 6 X 10 Minuten bei einem Fluss von 1 ml/min gespült.

Die aBSA Lösungen der Konzentrationen: 2.5, 6.25, 12.5, 25, 50 und 100 μ g/ml wurden mit Hilfe eines Autosamplers (*Midas*, Firma Spark, Holland) auf die Sensoroberfläche injiziert. Die Verweilzeit für jede aBSA Konzentration war 20 min. Anschließend wurde 40 sec mit PB-T Puffer gespült, gefolgt von einer 5 minütigen Wartezeit unter statischen Bedingungen bevor die nächste aBSA Probe injiziert wurde. Die SPR-Messungen wurden bei 37°C durchgeführt.

Der *aBSA Schichtaufbau auf Silberoberflächen* und die anschließenden regenerativen Affinitätsversuche mit BSA wurden mittels eines Dual-SPR-Spektrometers (AK Knoll, MPI Polymerforschung Mainz) bei den Wellenlängen λ_{\max} : 633 nm (roter Laser) und λ_{\max} : 473 nm (blauer Laser) durchgeführt.

Aufgrund der schnellen Oxidation der verwendeten Ag-Substrate ($d_{\text{Ag}} = 33$ nm) wurden diese direkt nach dem Sputtern in die wässrige Lösung von MCT-HTSHP-CMC **17** für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Abscheidung der reaktiven Cellulose erfolgte durch Aktivierung der Thiosulfat-Gruppen mittels TCEP: 2 mg des Cellulosederivats **17** und 2 mg TCEP in 10 ml 0.4 M Acetatpuffer pH 6.9.

aBSA und BSA wurden, wie im Falle des BSA-Schichtaufbaus, als wässrige Lösungen mittels einer peristaltischen Pumpe der Firma Amersham Biosciences in

die SPR-Zelle (1 ml) transportiert. Die Immobilisierung des aBSAs (pH_I (aBSA) = 5.5; mit Anreicherung: 0.05%-ig in 10 mM Acetat-Puffer pH 5.0 bzw. ohne Anreicherung: 0.05%-ig in 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0; Verweilzeit in der SPR-Zelle: 1 h) und die Deaktivierung mit Taurin (0.1 M in 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0) erfolgten unter statischen Bedingungen.

Die *regenerativen Affinitätsexperimente mit dem BSA* wurden wie folgt durchgeführt: nach dem Deaktivierungsschritt mit Taurin wurde die Sensoroberfläche 15 min lang mit PB-T Puffer gespült. Anschließend wurde eine 0.5%-ige BSA-Lösung injiziert (4-mal). Nach jeder BSA Injektion wurde nach einer Verweilzeit von etwa 30 min (unter statischen Bedingungen) die Dissoziation des BSAs durch das Spülen mit PB-T Puffer eingeleitet, gefolgt, nach etwa 20min, durch die vollständige Regeneration des BSAs mit einer wässrigen SDS Lösung (SDS: *Natriumdodecylsulfat*, 0.5%-ig in H_2O). Die Auswertungen der SPR-Kinetiken (sowohl bei den Immunosensoren als auch beim Enzymschichtaufbau) erfolgten mit dem Programm *Origin 7.0* der OriginLab Corp.

Die Auswertung der Schichtdicken erfolgte mit dem Programm *Winspill 2.20* vom MPI für Polymerforschung in Mainz. Die verwendeten Brechungsindices betragen für Au $n = 0,16 \pm i 3,14$ ^[367] und für Cr $n = 3,58 \pm i 4,36$ ^[368]. Für die Cellulosederivaten wurde ein Brechungsindex von $n = 1,470$, für das BSA $n = 1,365$ ^[297, 369], für das aBSA $n = 1,390$ ^[370] und für die HRP $n = 1,500$ verwendet.

Cyclovoltammetrie (CV) und Impedanzspektroskopie (EIS)

Die CV und EIS Messungen als auch deren Auswertung wurden von Herrn S.D. Kim aus der Arbeitsgruppe von Dr. J.-C. Pyun (Abteilung Human Engineering, KIST Europe GmbH) im Rahmen einer Kooperation durchgeführt. Die CVs und die EIS-Spektren wurden an einem *ECO Chemie* Potentiostaten der Firma Autolab (Holland) gemessen, unter Verwendung einer Drei-Elektrodenanordnung (Arbeitselektrode AE: Au-Plättchen mit einer Oberfläche von $0,502 \text{ cm}^2$; Gegenelektrode GE: Platinkontakt und Referenzelektrode RE: Ag/AgCl-Elektrode).

Probenvorbereitung: die Thio-CMC Derivate **6a** und **8** wurden als 0.1%-ige Lösungen in 0.2 M Zitronensäure, **3** als 0.1%- bzw. 0.3%-ige Lösung in Wasser hergestellt. Die Beschichtungszeit (t_{SA}) der Gold/Silber-Arbeitselektroden (Gold-AE bzw. Silber-AE) mit den Lösungen von **6a** und **8** war $t_{\text{SA}} = 1 \text{ h}$, mit der Lösung von **3** $t_{\text{SA}} = 4 \text{ h}$.

Für die CV- und EIS-Messungen auf Gold wurde eine 2 mM Lösung von $K_3[Fe(CN)_6]$ in 10 mM PBS-Puffer pH 7.0 als Elektrolytlösung verwendet.

Messbedingungen für die CV-Experimente an beschichteten Gold-AE waren: Anfangspotential $E_i = -300$ mV, Umkehrpotential $E_\lambda = 500$ mV, Vorschubgeschwindigkeit $u = 100$ mV/s.

Messbedingungen für die EIS-Experimente an beschichteten Gold-AE waren: 150 mV Potential gegenüber Ag/AgCl mit einer Amplitude von 10 mV, Frequenzbereich: 10 kHz - 50 mHz.

Für die EIS-Messungen an Silberelektroden (Oberfläche: 1 cm^2) erwies sich eine 1 mM $Fe^{2+/+3}$ -EDTA Lösung in 0.1 M Phosphat-Puffer pH 7.0 als geeignet.

Messbedingungen für die EIS-Experimente an beschichteten Silber-AE waren: -300 mV Potential gegenüber Ag/AgCl mit einer Amplitude von 10 mV, Frequenzbereich: 10 kHz – 0.1 Hz.

Die *Auswertung der EIS-Spektren* erfolgte durch das in der Software des Potentiostaten implementierte Auswertemodul, das auf eine nichtlineare Anpassungsrechnung der Impedanzdaten an einem Ersatzschaltbild basiert ^[229]. Die Auswertung wurde wie folgt durchgeführt: Die Impedanzdaten wurden zuerst als Nyquist-Plot aufgetragen. Man schätzt die Werte für die Elektrolyt-, Durchtrittswiderstände und Doppelschichtkapazitäten des Systems ab. Dann gibt man das Ersatzschaltbild vor und das Auswertemodul berechnet den Fit. Die Güte der Anpassung kann aus der χ^2 -Summe abgeschätzt werden. Die χ^2 -Summe wurde während der Anpassung durch Variation der Startwerte minimiert, um Werte kleiner oder gleich 10^{-3} zu erhalten, die eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment zeigen.

Kontaktwinkelmessungen (KW)

Die statischen Kontaktwinkel (Θ_{stat}) der gemessenen Proben wurden mit einem DSA 10 Gerät der Firma Krüss (Hamburg) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *Drop Shape Analysis* Version 1.80. Für die Durchführung der KW-Messungen wurden Tropfen (Volumen $V = 5\ \mu\text{l}$) einer 10 mM Phosphat-Puffer Lösung pH 7.0 (in der vorliegenden Arbeit mit H_2O_{PB} gekennzeichnet) verwendet.

Spektral-Ellipsometrie

Die Schichtdicken der APES, der MCT-CMC **20** und der HRP auf Silizium-Wafern wurden mit einem EP^3 -Spektral-Ellipsometer ($\lambda(\text{He-Ne-Laser}) = 531.6 \text{ nm}$, Einfallswinkel $\phi = 75^\circ$ für die APES- und MCT-CMC-Schicht bzw. $\phi = 72^\circ$ für die HRP-Schicht) der Firma Nanofilm *Surface Analysis* vermessen. Die Auswertung der Ellipsometrie-Daten (Ψ und Δ) erfolgte mit der Software EP^3 *View Version 2.0*. Für die Bestimmung der Schichtdicken wurden folgende Brechungsindizes verwendet: für Silizium $n = 4.1579 \pm i 0.0494$, für Siliziumoxid (Si/SiO_x) $n = 1.4605$ ^[270, 367], für das APES $n = 1.460$, für die MCT-CMC **20** $n = 1.470$ und für die HRP $n = 1.500$.

Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen der mit Streptavidin-FITC modifizierten MCT-CMC funktionalisierten Siliziumwafer wurden von Herrn H. Bohn (Experimentalphysik, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Hartmann, Universität des Saarlandes) im Rahmen einer Kooperation durchgeführt. Dazu wurde ein *Axioscop* Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss Jena GmbH verwendet. Die Oberflächen wurde mit einer Kamera *Leica DC300F* unter Verwendung eines Streptavidin-FITC Filters (Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, Emissionsmaximum $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) abgebildet. Messbedingungen waren: 400-fache Vergrößerung, Belichtungszeit: 493 ms.

APES Monoschichten auf planaren Glas- bzw. Siliziumoberflächen

Bevor die Glas- bzw. Siliziumsubstrate mit dem 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtet werden müssen diese *gereinigt* und *oxidiert* werden.

Die Reinigung von *Glasobjektträgern* erfolgt zuerst in Dichlormethan (HPLC Grad, Riedel-deHaën) in einem Ultraschallbad 10 Minuten lang bei 20°C , anschließend spült man 2-mal mit H_2O (MilliQ).

Die Oxidation der gereinigten Träger erfolgt für 20 Minuten in einer 80°C heißen Mischung von Wasserstoffperoxid, Ammoniak und destilliertem Wasser (im Verhältnis 1:1:4 Vol.-%). Nach dieser Behandlung werden die Träger fünf Mal mit H_2O (MilliQ) gespült und dann mit Stickstoff getrocknet ^[269].

Planare Siliziumwafer werden ohne weitere Reinigung oxidiert. Dazu werden als erstes die Teflonbehälter, die mit den Substraten in Verbindung kommen, 1 bis 2-mal mit frischer Piranha-Lösung ($50\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ (konz.) + $50\% \text{ H}_2\text{O}_2$ (35%-ige Lösung, nicht

stabilisiert)) gereinigt. Danach werden die Si-Wafer mindestens 30 Minuten in erneut frisch hergestellte Piranha-Lösung gelegt und hin und wieder geschwenkt. Im Anschluss werden die Wafer mit heißem (80-90°C) H₂O (MilliQ) abgespült. Substrate werden bis zu 10-mal in frisches heißes H₂O (MilliQ) gelegt (jeweils 5 bis 10 Minuten).

Am Ende werden die gereinigten Siliziumwafer im N₂-Strom getrocknet.

Die gereinigten und oxidierten Glasobjektträger werden mit APES (Fluka) aus ethanolischer Lösung beschichtet. Dazu wird 1 Vol. % APES gelöst in Ethanol (HPLC Grad, Fluka) auf 60°C erhitzt. Man rührt die Mischung für 10 Sekunden. Nun stellt man die gereinigten und oxidierten Substrate in diese Lösung 5-10 Minuten lang bei 60°C. Anschließend werden die Glasobjektträger aus der Lösung genommen, mit reinem Lösungsmittel gespült und dann direkt mit gasförmigem Stickstoff trocken geblasen. Die Beschichtung von *oxidierten Siliziumwafer* mit APES erfolgte sowohl in gleicher Weise wie oben beschrieben, als auch aus einer 1 Vol. %-igen Lösung von APES in Toluol.

Darstellung von MCT-CMC funktionalisierten Silizium- und Glasoberflächen

Die frischen APES beschichteten Glasobjektträger bzw. Siliziumwafer werden in einer 0.1%-igen Lösung von MCT-CMC in 10 mM Carbonat-Puffer pH 8.0 - 8.5 bei Raumtemperatur für 6 h inkubiert (*Bemerkung*: auch längere Inkubationszeiten von z.B. 24 h sind möglich). Danach werden die Substrate 2-mal mit Wasser (MilliQ) und 2-mal mit Carbonat-Puffer gespült.

Immobilisierung von HRP an MCT-CMC funktionalisierten Silizium- und Glasoberflächen

Nach dem Spülen der MCT-CMC funktionalisierten Silizium- bzw. Glassubstrate mit Carbonat-Puffer (2-mal) werden diese in einer 12.5 µM Lösung der HRP in 10 mM CB-Puffer pH 8.0 bei 4°C (im Kühlschrank) inkubiert (*Bemerkung*: auch längere Inkubationszeiten von z.B. 24 h sind ebenfalls möglich). Die überschüssige, unspezifisch haftende HRP wird 2-mal mit 1 M NaCl Lösung und 2-mal mit 10 mM CB-Puffer pH 8.0 abgespült. Im Anschluss werden die Substrate zur Deaktivierung der restlichen reaktiven MCT-Gruppen in eine Taurin Lösung (0.1 M in 10 mM CB-Puffer pH 8.0) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Spülen mit CB-Puffer können diese unter N₂-Strom getrocknet und im Kühlschrank aufbewahrt (1 Woche bei 4°C), oder direkt für Aktivitätsmessungen eingesetzt werden.

APES Beschichtung von Fused Silica-Kapillaren

Die verwendeten FuSi-Kapillaren (Durchmesser $D = 180 \mu\text{m}$, Länge $L = 30 \text{ cm}$) wurden von den Firmen LC Packings (USA) und SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH erworben.

Beschichtungsprozedur: Die FuSi-Kapillare wird mittels Metall-Fitting (für HPLC) an eine Glasspritze angeschlossen. Alle für die Beschichtung der Kapillare benötigten Reagenzien werden mit Hilfe einer Spritzenpumpe (kd Scientific) durch die Kapillare befördert. Die Kapillare wird als erstes mit einer 1 M NaOH-Lösung^[361] für 30 min bei Raumtemperatur (Fluss von $17 \mu\text{l}/\text{min}$) aktiviert. Danach wird sie 10 min lang mit Wasser (MiliQ) gespült. Nach dem Trocknen der aktivierten Kapillare in Hochvakuum (Anschluss an der Hochvakuum-Apparatur über Metall-Fitting) erfolgt die Beschichtung mit der unverdünnten 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APES)-Lösung für 30 min. Zur Entfernung des überschüssigen APES wird ein Ende der Kapillare mit Hilfe eines Metall-Fittings mit Schraubdeckel abgedichtet, das andere Ende an der Hochvakuum-Apparatur angeschlossen. Nach dem Evakuieren ($2 \cdot 10^{-2} \text{ mbar}$) der FuSi-Kapillare (20 min) bei Raumtemperatur (RT) wird diese über Nacht bei 60°C getrocknet (Trockenschrank).

Darstellung von MCT-CMC funktionalisierten FuSi-Kapillaren

Die APES beschichtete Kapillare wird 10 min mit CB-Puffer (10 mM, pH 8.0) gespült. Die Anbindung der reaktiven MCT-CMC **20** erfolgt durch Rezirkulation der wässrigen Lösung (0.1%-ig in 10 mM CB-Puffer pH 8.0) für 2 h durch die APES beschichtete FuSi-Kapillare (Fluss: $17 \mu\text{l}/\text{min}$). Anschließend wird die Kapillare 10min mit CB-Puffer gespült.

Immobilisierung von HRP an MCT-CMC funktionalisierten FuSi-Kapillaren

Nach dem Spülen der MCT-CMC funktionalisierten FuSi-Kapillare mit Carbonat-Puffer (siehe oben) erfolgt die Beschichtung mit einer $12.5 \mu\text{M}$ Lösung der HRP in 10 mM CB-Puffer pH 8.0 für 90 min bei RT (Fluss: $17 \mu\text{l}/\text{min}$). Im Anschluss wird die Kapillare zuerst 5 min mit einer 1 M NaCl Lösung und danach 10 min mit CB-Puffer gespült. Danach wird mit Taurin-Lösung (0.1 M in 10 mM CB-Puffer pH 8.0) deaktiviert (10 min) und 15min mit CB-Puffer gespült.

Bemerkung: Die Menge an immobilisiertem HRP wurde von Frau Dr. S. Jost (AK Wenz, Organische Makromolekulare Chemie, Universität des Saarlandes) aus der

Abnahme der Konzentration der HRP-Beschichtungslösung nach dem Durchlaufen der Kapillare, mit Hilfe des ABTS Assays ermittelt. Die Menge an immobilisiertem HRP lag in einem Bereich von 7 – 10 μg / Kapillare.

Michaelis-Menten-Kinetik der HRP immobilisiert in FuSi-Kapillaren

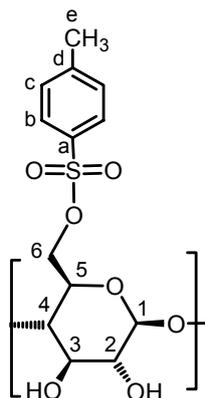
Die HRP beschichtete FuSi Kapillare wurde in ein online Messsystem bestehend aus einer *Waters 515 HPLC* Pumpe (Firma Waters), einem Autosampler *Endurance* (Firma Spark, Holland; Vertrieb durch Firma SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Deutschland) und einem *Wellchrom-K-2600* UV-Detektor der Firma Knauer, eingebaut.

Die eingebaute FuSi-Kapillare wurde vor der Durchführung der Michaelis-Menten Kinetik, 30 min bei RT mit 10 mM AcB-Puffer pH 4.5 (AcB: 10 mM Acetat-Puffer pH 4.5 + H_2O_2 (0.01%-ig) gespült. Für die Aufnahme der Michaelis-Menten Kinetiken wurden ABTS Lösungen mit Konzentrationen von 50–2000 μM , bei einem Fluss von 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, injiziert. Die Aufnahme der UV-Spektren von ABTS (Edukt ABTS bei $\lambda_{\text{MAX}} = 340 \text{ nm}$, Produkt ABTS* bei $\lambda_{\text{MAX}} = 414 \text{ nm}$) erfolgte mit der Software *Endurance* der Firma SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH. Die Auswertung der Michaelis-Menten Kinetik wurde mit dem Programm *Origin 7.0* der OriginLab Corp durchgeführt.

8.3 Präparativer Teil

8.3.1 Synthese der Thiocellulosederivate

Cellulose-6-*O*-*p*-toluolsulfonat 1



Variante I ^[137]

5 g (31.05 mmol) Cellulose (AVICEL PH 101, DP = 280) werden in 200 ml absolutem DMAc suspendiert und auf 160°C erhitzt. Nach 1 h wird auf 100 °C abgekühlt und 10 g wasserfreies LiCl zugegeben. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) geht die Cellulose über Nacht in Lösung.

Zu der Lösung wird eine Mischung von 15 ml (0.10 mol) Triethylamin in 12 ml DMAc unter Rühren zugetropft. Anschließend wird die Lösung auf 8°C abgekühlt.

18 g (94.73 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid werden in 12 ml DMAc gelöst und innerhalb einer 0.5 h zugetropft. Die homogene Lösung wird nun 24 h bei 8°C gerührt. Die Reaktionslösung wird vorsichtig auf 1 l Eiswasser gegossen. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 3 l Wasser und 400 ml Ethanol gewaschen. Die Substanz wird in 200 ml Aceton suspendiert und in 600 ml destilliertem Wasser gewaschen. Es wird nochmals abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Das Produkt wird dann im Vakuum ($5 \cdot 10^{-2}$ mbar) bei 60°C getrocknet.

Variante II ^[28]

20 g (63.40 mmol) Tetrabutylammoniumfluorid Trihydrat (TBAF \times 3H₂O) werden in 100 ml DMSO gelöst. 3.0 g (18.54 mmol) Cellulose (AVICEL PH 101, DP = 280)

werden in kleinen Portionen zugegeben und die Reaktionslösung kräftig gerührt. Nach beendeter Zugabe wird solange gerührt bis eine klare (leicht gelbliche) Lösung entsteht.

10.40 g (54.55 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (*p*-TosCl) und 11.2 g (111.17 mmol) Triethylamin werden gleichzeitig zur Reaktionslösung zugegeben; anschließend wird 24 h bei RT gerührt.

Die Reaktionslösung wird in 500 ml Eiswasser gefällt, abfiltriert und mit 1 l Eiswasser gewaschen. Der Niederschlag wird in 500 ml Ethanol aufgenommen, gerührt, abfiltriert und anschließend mit 500 ml Ethanol gewaschen.

Der weiße Feststoff wird nun in 500 ml Aceton aufgenommen, ca. 15 min gerührt, abfiltriert und anschließend mit 400 ml Wasser und 500 ml Ethanol nachgewaschen. Das Produkt wird dann in Vakuum ($5 \cdot 10^{-2}$ mbar) bei 60°C über Nacht getrocknet.

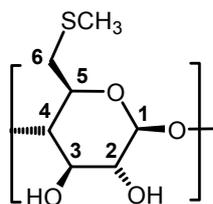
Var.	Cellulose		<i>p</i> -TosCl		Verhältnis $\frac{n_{Cellulose}}{n_{p-TosCl}}$	DS _{tosyl} EA	Ausbeute	
	m [g]	n [mmol]	m [g]	n [mmol]			[g]	[%]
I	5.00	31.05	18.00	94.73	1:3	0.50 - 0.56	5.64	75 %
II	3.00	18.54	10.40	54.55	1:3	0.30 - 0.45	4.11	70%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 25°C): δ = 7.80 (bs, 1H, H-b), 7.45 (bs, 1H, H-c), 5.56-5.33 (m, 2H, OH), 4.81-3.06 (m, 7H, H-1, 4, 6, 3, 5, 2, OH), 2.40 (bs, 3H, H-e) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 25°C): δ = 145.17 (C-a), 132.40 (C-d), 130.45 (C-c), 128.00 (C-b), 103.04 (C-1), 80.42-79.17 (C-4^A, C-4^B), 74.99 (C-2), 73.21 (C-3), 71.94 (C-5), 69.43 (C-6^A), 60.34 (C-6^B), 21.39 (C-e) ppm.

FT-IR: 3523 ν(OH), 3072 ν(CH_{arom}), 2888 ν(CH), 1641, 1597 ν(CH_{arom}), 1494, 1357 ν(SO₂), 1176 ν(SO₂), 1067, 815 ν(CH_{arom}), 673, 553 cm⁻¹:

EA berechnet für [C₆H_{9.44}O_{4.44}][C₇H₇O₂S]_{0.56}•4H₂O (M_{GlcP} = 311.58 g/mol):
C 38.24%, H 6.91%, S 5.76%; gefunden: C 38.56%, H 7.01%, S 5.80%.

6-S-Methylthio-6-desoxy-cellulose 2

Unter Schutzgas wird eine Lösung von 350 mg (5.00 mmol) NaSCH₃ in 40 ml absoluten DMF vorgelegt und auf 0°C abgekühlt.

Eine Lösung von 1.2 g (3.85 mmol; DS_{Tosyl} = 0.56) von **1** gelöst in 60 ml absolutem DMF wird zugespritzt. Die Reaktionslösung wird 8 h bei 0°C gerührt, anschließend in Diethylether gefällt und über Nacht bei RT stengelassen. Der weiße, sehr feine Niederschlag wird abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Der trockengesaugte Feststoff wird in 100 ml 1 N NaOH innerhalb einer 0.5 h gelöst. Die gelbliche Lösung wird anschließend mit Wasser auf 200 ml verdünnt, und durch kontinuierliche Ultrafiltration gegen eine UF-C5 (5kDa) Membran zuerst mit 0.1 N NaOH, danach mit destilliertem Wasser, gereinigt. Das Retenat wird gefriergetrocknet.

Man erhält einen weißen watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 650 mg (2.41 mmol, 64%; DS_{Methylthio} = 0.55).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 25°C): δ = 5.19 (m, H-1), 4.87-2.53 (bs, OH, H-4, 5, 6, 3, 2), 2.08 (t, SCH₃) ppm.

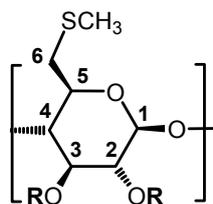
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 25°C): δ = 102.72 (C-1), 82.47 (C-4^A), 79.92 (C-4^B), 74.99-73.23 (C-5, 3, 2), 60.38 (C-6^B), 34.90 (C-6^A), 15.79 (SCH₃) ppm.

FT-IR: 3334 ν(OH), 2962 ν(CH), 2874 ν(CH), 1411, 1368 ν(OH), 1318 ν(OH), 1053, 1018 ν(CO), 897, 705 ν(CS) cm⁻¹.

EA berechnet für [C₆H_{9.44}O_{4.44}][OH]_{0.01}[CH₃S]_{0.55}•5H₂O (M_{Glcp} = 269 g/mol):

C 29.30%, H 7.85%; gefunden: C 29.25%, H 7.89%.

6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose Natrium Salz **3**



R: H, CH₂COONa

2 (150 mg, 0.73 mmol; $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$) wird in einem Gemisch aus 10 ml Isopropanol und 6 ml Ethanol suspendiert und für 30 min gerührt. 0.56 g (4.8 mmol) Chloressigsäure-natriumsalz werden fest zugegeben und 1 h bei RT weitergerührt. Anschließend tropft man 430 μl einer 30% NaOH Lösung (4.5 mmol) zu und erhitzt das Reaktionsgemisch 2 h auf 60°C. Nach Abkühlen auf RT wird die Suspension mit Essigsäure neutralisiert. Man gibt solange destilliertes Wasser zu bis das Produkt in Lösung geht. Anschließend wird die klare Lösung mit destilliertem Wasser gegen ein UF-C 10 Membran (10 kDa) ultrafiltriert. Produkt **3** wird nach der Gefriertrocknung als weißer watteartiger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 142 mg (0.49 mmol, 68%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 1.00$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$).

¹H-NMR (D₂O, 25°C): $\delta = 4.42$ (bs, H-1), 4.25-4.13 (m, H-2,6_{CH2}), 3.73-2.69 (m, H-5, 4, 3, 6, 2), 2.05 (m, SCH₃) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 25°C): $\delta = 178.50$ (COONa), 102.86 (C-1), 82.83 (C-4^A), 79.21 (C-4^B), 75.44 (C-5), 74.76 (C-3), 73.66 (C-2), 71.80 (CH₂-2), 69.57 (CH₂-6), 60.81 (C-6^B), 35.39 (C-6^A), 15.88 (SCH₃) ppm.

FT-IR: 3359 $\nu(\text{OH})$, 2918 $\nu(\text{CH})$, 1595 $\nu(\text{COO}^-)$, 1413 $\nu(\text{COO}^-)$, 1320 $\nu(\text{OH})$, 1247, 1020 $\nu(\text{C-O})$, 920, 805, 711 $\nu(\text{CS})$, 673, 570, 554 cm^{-1} .

EA berechnet für [C₆H_{8.44}O_{4.44}][OH]_{0.01}[CH₃S]_{0.55}[C₂H₂O₂Na]_{1.00}•1.5H₂O

($M_{\text{Glcp}} = 285.73$ g/mol): C 35.94%, H 5.33%; gefunden: C 35.91%, H 5.05%.

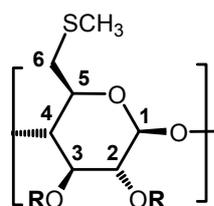
Molmasse: $M_w = 25000$ g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 97.

6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose H (COOH) **3a**

120 mg MTh-CMC Na **3** (0.42 mmol; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 1.00$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$) werden in 10 ml Wasser gelöst (pH = 8.0). Mit einer 1 M Salzsäure Lösung wird nun der pH auf 3.5 eingestellt (Zugabe von ca. 500 μl). Man rührt fünf Minuten bei RT und verdünnt anschließend die Lösung auf 50 ml. **3a** wird durch kontinuierliche Ultrafiltration mit 2 l destilliertem Wasser gegen eine UF-C 5 Membran (5 kDa) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 79.1 mg (0.30 mmol, 71%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 1.00$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$).

6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose-ethylester **4**



R: H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$

380 mg (1.41 mmol) 6-S-Methylthio-6-desoxycellulose **2** ($DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$) werden in 50 ml DMSO innerhalb einer 0.5 h gelöst. 728.2 mg (5.94 mmol) Chloressigsäureethylester werden zugegeben und die Mischung 1 h bei RT gerührt. Nun werden 1.22 ml einer 30%-igen NaOH-Lösung zugetropft. Die gelbe Reaktionsmischung wird auf 60°C erhitzt und 1 h gerührt. Nach dem Abkühlen wird das Gemisch (pH~9) mit Essigsäure neutralisiert und in Isopropanol gefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und in Hochvakuum getrocknet. Der gelbe Feststoff wird in wenig Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser durch kontinuierliche Ultrafiltration (UF-C 5, 5 kDa) gereinigt. Nach dem Gefrier Trocknen erhält man einen watteartigen, schwach gelblichen Feststoff.

Ausbeute: 370 mg (1.3 mmol, 93%; $DS_{\text{Carboxymethylethylester}} = 0.16$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$).

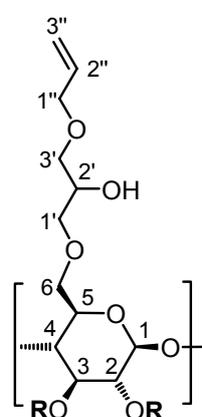
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 25°C): $\delta = 4.56$ (m, H-1), 4.32-3.81 (bs, $\text{CH}_2(\text{CM})$, H-4, 5, 6, 3), 3.67-3.63 (q, CH_2), 3.36 (s, H-2), 2.20 (t, SCH_3), 1.18 (t, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 25°C): $\delta = 177.76$ (C=O), 102.90 (C-1), 82.55 (C-4^A), 79.41 (C-4^B), 75.27-69.40 (C-5, 3, 2, CH_{2(CM)}), 60.31 (C-6^B), 57.83 (CH₂) 35.02 (C-6^A), 17.24 (CH₃), 15.92 (SCH₃) ppm.

FT-IR: 3334 $\nu(\text{OH})$, 2962 $\nu(\text{CH})$, 2874 $\nu(\text{CH})$, 1590 $\nu(\text{C=O})$, 1411, 1368 $\nu(\text{OH})$, 1318 $\nu(\text{OH})$, 1053, 1018 $\nu(\text{CO})$, 897, 705 $\nu(\text{CS})$ cm⁻¹.

EA berechnet für [C₆H_{9.28}O_{4.44}][OH]_{0.01}[CH₃S]_{0.55}[C₄H₇O₂]_{0.16}•5H₂O (M_{GlcP} = 283 g/mol): C 30.57%, H 7.87%; gefunden: C 31.01%, H 7.83%.

6-O-(3'-Allyloxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz 5



R = H, CH₂COONa

Syntheseweg (a)

1.0 g CMC Natrium Salz (4.13 mmol; DS_{Carboxymethyl} = 0.91, x₂ = 0.43, x₃ = 0.17, x₆ = 0.31) wird bei RT in 10 ml 25%-iger Natronlauge gelöst und anschließend mit 30 ml H₂O verdünnt.

Man teilt das entsprechende Volumen an Allylglycidylether (AGE) in 2 gleiche Portionen auf. Die erste AGE-Zugabe erfolgt direkt nach dem Auflösen der CMC, tropfenweise (1 Tropfen / 1 Sekunde) unter kräftigem Rühren. Nach der Zugabe wird die Lösung für 24 h bei 60°C weitergerührt. Die zweite AGE Portion erfolgt direkt zur heißen Reaktionslösung bei 60°C (Vorsicht!!), ebenfalls tropfenweise und unter kräftigem Rühren. Anschließend wird die Lösung weitere 24 h bei 60°C gerührt.

Nach insgesamt 3 d wird die Reaktionslösung auf RT abgekühlt, mit HCl neutralisiert und durch Ultrafiltration (UF-C 5, 5 kDa) gereinigt. Das Produkt wird als weißer Feststoff durch Gefriertrocknung isoliert.

Syntheseweg (b)

1.0 g CMC Natrium Salz (4.13 mmol; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $x_2 = 0.43$, $x_3 = 0.17$, $x_6 = 0.31$) wird bei RT in 40 ml 5%-iger Natronlauge gelöst (Bemerkung: es entsteht eine viskose Lösung, gegebenenfalls KPG-Rührer verwenden).

Man teilt das entsprechende Volumen an Allylglycidylether (AGE) in 4 gleiche Portionen auf. Die erste AGE-Zugabe erfolgt direkt nach dem Auflösen der CMC bei RT, tropfenweise (1 Tropfen / 2 Sekunden) unter kräftigem Rühren. Die anderen 3 Portionen werden bei RT, jeweils nach 24 h nach der hervorgegangenen Zugabe unter kräftigem Rühren, tropfenweise, zugespritzt. Nach der letzten AGE-Zugabe (Tag 4) wird die Reaktionslösung einen weiteren Tag bei RT gerührt.

Nach insgesamt 5 d wird die Reaktionslösung 3-mal mit je 50 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird nun in Isopropanol (200 ml) gefällt. Der Niederschlag wird 3-mal mit 50 ml Isopropanol gewaschen und trockengesaugt. Der Feststoff wird nun in destilliertem Wasser gelöst und die wässrige Lösung gefriergetrocknet.

CMC Na		AGE	Verhältnis		DS _{allyl}		Ausbeute	
m [g]	n [mmol]	V [ml]	n [mmol]	n _{AGE} :n _{CMC}	EA	¹ H-NMR	[g]	[%]
		0.5	4.38	1:1	0.12	-	0.94	94
1	4.13	1.0	8.76	2:1	0.23	0.25	1.06	84
		1.5	13.14	3:1	0.43	0.45	1.05	79
2	8.26	5.0	43.80	5:1	0.64	0.65	2.73	87
		11.0	96.36	11:1	0.67	0.69	2.60	86

¹H-NMR (D₂O, 60°C): $\delta = 5.83$ (m, H-2''), 5.24-5.20 (d, H-3''_{trans}), 5.18-5.14 (m, H-3''_{cis}), 4.41 (s, H-1), 3.95 (s, H-6_{CH2}), 3.85 (s, H-1''), 3.82 (m, H-5, H-4), 3.40-3.37 (m, H-1', H-2', H-3', H-3, H-2, H-6), 3.23 (s, H-2^B), 3.08 (s, H-2^A) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 60°C): $\delta = 178.30$ (COONa), 134.32 (C-2''), 119.63 (C-3''), 102.72 (C-1), 84.43 (C-2^A), 80.61 (C-2^B), 77.23 (C-4), 76.75 (C-3), 74.92 (C-1''), 74.01 (C-1',

C-3'), 73.63 (C-2'), 72.05 (C-5), 65.83 (CH₂-COONa), 63.92 (C-6^A), 63.43 (C-6^B) ppm.

FT-IR: 3312 ν (OH), 2920 ν (CH), 2884 ν (CH), 1591 ν (COONa), 1414, 1322 ν (OH), 1266, 1119, 1052, 932, 896 cm^{-1} .

EA berechnet für [C₆H_{8.86}O₅][C₂H₂O₂Na]_{0.91}[C₆H₁₁O₂]_{0.23}•2.5H₂O
(M_{Glcp} = 306.25 g/mol): C 36.10%, H 6.01%; gefunden: C 35.95%, H 5.70%.

EA berechnet für [C₆H_{8.66}O₅][C₂H₂O₂Na]_{0.91}[C₆H₁₁O₂]_{0.43}•2H₂O
(M_{Glcp} = 320.07 g/mol): C 39.05%, H 6.06%, gefunden: C 38.91%, H 5.88%.

EA berechnet für [C₆H_{8.45}O₅][C₂H₂O₂Na]_{0.91}[C₆H₁₁O₂]_{0.64}•4H₂O
(M_{Glcp} = 380.07 g/mol): C 36.85%, H 6.71%, gefunden: C 36.79%, H 6.61%.

EA berechnet für [C₆H_{8.42}O₅][C₂H₂O₂Na]_{0.91}[C₆H₁₁O₂]_{0.67}•3H₂O
(M_{Glcp} = 365.48 g/mol): C 38.91%, H 6.51%, gefunden: C 38.79%, H 6.47%.

Syntheseweg (a):

Molmasse: M_w = 15000 g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 57.

(M_{Glcp} = 306.25 g/mol; DS_{Allyl} = 0.23).

Molmasse: M_w = 15000-36000 g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 53-127.

(M_{Glcp} = 320.07 g/mol, DS_{Allyl} = 0.43).

Syntheseweg (b):

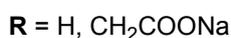
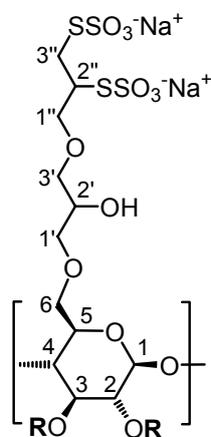
Molmasse: M_w = 95000 g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 363.

(M_{Glcp} = 306.25 g/mol; DS_{Allyl} = 0.23).

Molmasse: M_w = 106000 g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 340.

(M_{Glcp} = 365.48 g/mol; DS_{Allyl} = 0.67).

**6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose
Natrium Salz 6**



Einstufige Synthese (6a): aus AHP-CMC Syntheseweg (a)

5 (400 mg 1.25 mmol; DS_{Allyl} = 0.43, DS_{Carboxymethyl} = 0.91) wird in 90 ml H₂O gelöst. Natriumtetrathionat Dihydrat (2.38 g, 7.88 mmol) in 20 ml H₂O wird tropfenweise (1 Tropfen / 1 Sekunde) zugegeben und die Reaktionslösung auf 95°C erhitzt. Nach 2 d wird die gelbliche Lösung auf RT abgekühlt und durch Ultrafiltration (UF-C 10, 10 kDa) mit destilliertem Wasser gereinigt. Das Produkt **6a** wird als weißer watteartiger Feststoff isoliert.

Ausbeute: 360 mg (1.12 mmol, 89%; DS_{Allyl} = 0.33, DS_{Bisthiosulfat} = 0.10, DS_{Carboxymethyl} = 0.91).

¹H-NMR (D₂O, 25°C): δ = 5.97 (m, H-2''), 5.38-5.34 (d, H-3''_{trans}), 5.30-5.28 (m, H-3''_{cis}), 4.59 (s, H-1), 4.28 (s, H-6_{CH2}), 4.26 (s, H-2_{CH2}), 4.09 (s, H-1''), 3.99 (m, H-2'), 3.95 (m, H-6^A), 3.78 (m, H-6^B), 3.60-3.45 (m, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.36 (s, H-2^A), 3.22 (s, H-2^B) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 25°C): δ = 178.31 (COONa), 134.34 (C-2''), 119.61 (C-3''), 102.73 (C-1), 84.45 (C-2^A), 80.61 (C-2^B), 77.23 (C-4), 76.72 (C-3), 74.91 (C-1''), 74.05 (C-1', C-3'), 73.63 (C-2'), 72.04 (C-5), 65.81 (CH_{2(CM)}), 63.91 (C-6^A), 63.43 (C-6^B) ppm.

FT-IR: 3349 ν(OH) 2885 ν(CH), 1726 ν(COONa), 1588, 1412, 1320 ν(OH), 1240, 1051, 1018, 895 cm⁻¹.

EA berechnet für



($M_{\text{Glcp}} = 337.89 \text{ g/mol}$): C 36.96%, H 5.44%, S 3.80%; gefunden: C 36.75%, H 5.92%, S 3.82%.

Molmasse: $M_w = 15000 \text{ g/mol}$, Polymerisationsgrad: DP = 48.

Einstufige Synthese (6a): aus AHP-CMC Syntheseweg (b)

5 (500 mg 1.37 mmol; $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.67$, $\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$) wird in 90 ml H_2O gelöst. Natriumtetrathionat Dihydrat (2.61 g, 8.64 mmol) in 20 ml H_2O wird tropfenweise (1 Tropfen / 1 Sekunde) zugegeben und die Reaktionslösung auf 95°C erhitzt. Nach 2 d wird die gelbliche Lösung auf RT abgekühlt und durch Ultrafiltration (UF-C 10, 10 kDa) mit destilliertem Wasser gereinigt. Das Produkt **6a** wird als weißer wattartiger Feststoff isoliert.

Ausbeute: 385 mg (1.03 mmol, 75%; $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.57$, $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 5.83$ (m, H-2"), 5.24-5.20 (d, H-3" trans), 5.16-5.14 (m, H-3" cis), 4.40 (s, H-1), 4.25 (bs, $\text{CH}_2\text{-COONa}$), 3.95-3.11 (bs, H-6, 5, 4, 3, 2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 178.89$ (COONa), 134.88 (C-2"), 120.11 (C-3"), 102.10 (C-1), 85.57 (C-2^A), 82.56 (C-2^B), 78.57 (C-4), 75.83 (C-3), 74.68 (C-1"), 74.23 (C-1', C-3'), 73.62 (C-2'), 72.524 (C-5), 69.54-68.37 ($\text{CH}_{2(\text{CM})}$), 60.71 (C-6) ppm.

FT-IR: 3346 $\nu(\text{OH})$ 2887 $\nu(\text{CH})$, 1724 $\nu(\text{COONa})$, 1585, 1410, 1323 $\nu(\text{OH})$, 1245, 1050, 1017, 894 cm^{-1} .

EA berechnet für $[\text{C}_6\text{H}_{8.42}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.91}[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]_{0.57}[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_8\text{S}_4\text{Na}_2]_{0.10} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
($M_{\text{Glcp}} = 374.48 \text{ g/mol}$): C 37.97%, H 5.82%, S 3.42%; gefunden: C 37.75%, H 5.78%, S 3.38%.

Molmasse: $M_w = 97000 \text{ g/mol}$, Polymerisationsgrad: DP = 287.

Zweistufige Synthese (6b): aus AHP-CMC Syntheseweg (a)

5 (840 mg, 2.63 mmol; $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.43$, $\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$) wird in 50 ml CHCl_3 suspendiert und kräftig 2 h gerührt. Innerhalb von 3 h wird eine 5%-ige Lösung von

Br₂ in CHCl₃ zu der kräftig gerührten Suspension so lange zugetropft bis keine Entfärbung der Reaktionslösung mehr zu beobachten ist und die Lösung leicht hellgelb bleibt. Das überschüssige Br₂ wird durch Zugabe einiger Tropfen 0.1 M Na₂S₂O₃ Lösung zerstört. Anschließend wird das CHCl₃ abrotiert und der zurückgebliebene Feststoff in Vakuum getrocknet. Der weiße Feststoff wird in 10 ml DMSO gelöst. Natriumthiosulfat Pentahydrat (2.38 g, 7.88 mmol) gelöst in 20 ml H₂O wird tropfenweise (1 Tropfen / 1 Sekunde) zugegeben und das Gemisch auf 90°C erhitzt. Nach 4 d wird die gelbliche Lösung auf RT abgekühlt und das Lösungsmittelgemisch in Hochvakuum ($5 \cdot 10^{-2}$ mbar) abdestilliert. Der gelbliche Rückstand wird in Wasser gelöst, filtriert und durch Ultrafiltration gereinigt (UF-C 10, 10 kDa). Das Produkt **6b** wird als weißer watteartiger Feststoff isoliert.

Ausbeute: 770 mg (2.10 mmol, 80%; DS_{Allyl} = 0.25, DS_{Bisthiosulfat} = 0.17, DS_{Carboxymethyl} = 0.91).

¹H-NMR (D₂O, 25°C): δ = 5.84 (m, H-2''), 5.24-5.20 (d, H-3''_{trans}), 5.16-5.14 (m, H-3''_{cis}), 4.50 (s, H-1), 4.24-4.21 (br, H-6_{CH2}, H-2_{CH2}), 4.13 (s, H-1''), 4.03 (m, H-2'), 3.95 (m, H-6^A), 3.84 (m, H-6^B), 3.67-3.42 (m, H-1', H-3', H-2''_{Bisthiosulfat}, H-5, H-4, H-3), 3.31 (s, H-3''_{Bisthiosulfat}), 3.23 (s, H-2^A), 3.13 (s, H-2^B) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 25°C): δ = 176.64 (COONa), 134.32 (C-2''), 118.74 (C-3''), 102.78 (C-1), 82.38 (C-2^A), 78.72 (C-2^B), 77.73 (C-4), 76.72 (C-3), 75.32 (C-1''), 74.39 (C-1', C-3'), 73.36 (C-2'), 72.51 (C-5), 71.34-69.60 (CH_{2(CM)}), 66.34 (C-2''_{Bisthiosulfat}), 62.84 (C-6^A), 60.27 (C-6^B), 37.23 (C-3''_{Bisthiosulfat}) ppm.

FT-IR: 3261 ν(OH) 2920 ν(CH), 1726 ν(COONa), 1588, 1414, 1322 ν(OH), 1266, 1053, 1024, 895 cm⁻¹.

EA berechnet für [C₆H_{8.66}O₅][C₂H₂O₂Na]_{0.91}[C₆H₁₁O₂]_{0.25}[C₆H₁₁O₈S₄Na₂]_{0.17}[C₆H₁₃O₄]_{0.01}•2H₂O (M_{GlcP} = 366.34 g/mol): C 34.11%, H 5.30%, S 5.96%;
gefunden: C 34.25%, H 5.57%, S 5.89%.

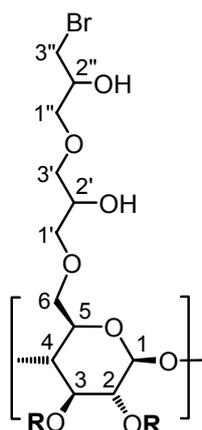
Molmasse: M_w = 28000 g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 85.

6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose H (freie Säure) **6a**

340 mg (1.01 mmol) TSHP-CMC Na **6a** ($DS_{\text{Allyl}} = 0.33$, $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$) werden in 20 ml 0.1 N HCl gelöst, mit Wasser auf die doppelte Menge verdünnt und mit destilliertem Wasser gegen eine UF-C 10 Membran (10 kDa) ultrafiltriert. Nach der Gefriertrocknung des Retentats erhält man einen weißen watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 300 mg (0.94 mmol, 93%; $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$).

6-O-(2''-Hydroxy-3''-bromopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz **7**



R = H, CH₂COONa

Eine 5-ige% Lösung von Br₂ in CHCl₃ wird tropfenweise zu einer wässrigen Lösung aus 1.0 g (3.26 mmol) **5** ($DS_{\text{Allyl}} = 0.23$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$) in 50 ml H₂O zugegeben bis keine Entfärbung der Reaktionslösung mehr zu beobachten ist und die Lösung leicht hellgelb bleibt. Das überschüssige Br₂ wird durch Zugabe einiger Tropfen 0.1 M Na₂S₂O₃ Lösung zerstört. Nach abdestillieren des Lösungsmittels wird die wässrige Lösung durch Ultrafiltration (UF-C 10, 10 kDa) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet. Das Produkt **7** wird als weißer watteartiger Feststoff isoliert.

Ausbeute: 910 mg (2.87 mmol, 88%; $DS_{\text{Bromid}} = 0.20$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 25°C): $\delta = 4.56$ (bs, H-1), 4.32-4.27 (m, H-6_{CH2}, H-2_{CH2}), 4.10-4.02 (m, H-1''), 3.95-3.72 (m, H-6, H-2'', H-3''), 3.67-3.45 (m, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.38 (bs, H-2^A), 3.23 (bs, H-2^B) ppm.

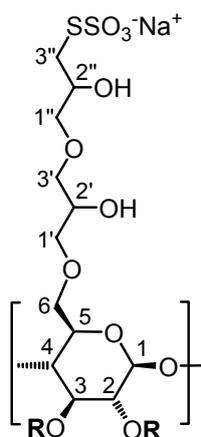
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 25°C): $\delta = 178.2$ (COONa), 102.7 (C-1), 82.3 (C-2^A), 78.7 (C-2^B), 77.7-76.5 (C-4, C-3), 75.3 (C-1''), 74.1-73.6 (C-1', C-3'), 72.4 (C-2'), 71.4 (C-5), 69.5 (CH_{2(CM)}), 63.4 (C-2''), 60.2 (C-6), 35.5 (C-3'') ppm.

FT-IR: 3333 ν_{OH} , 2924 ν_{CH} , 1732 $\nu(\text{COONa})$, 1596, 1421, 1375, 1321 ν_{OH} , 1248, 1117, 1062, 652 cm^{-1} .

EA berechnet für

$[\text{C}_6\text{H}_{8.86}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.91}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Br}]_{0.20}[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.03} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_{\text{Glcp}} = 317.64$ g/mol):
C 34.80%, H 5.55%, Br 5.04%; gefunden: C 35.10%, H 5.65%, Br 4.94%.

6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)- carboxymethylcellulose Natrium Salz 8



R = H, CH₂COONa

7 (1.0 g, 3.26 mmol; $\text{DS}_{\text{Bromid}} = 0.20$, $\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$) wird in 100 ml H_2O gelöst. 1.3 g (8.20 mmol) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ werden in 3 gleiche Portionen aufgeteilt (jeweils 450 mg). Die erste $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Zugabe (450 mg, 2.73 mmol) erfolgt direkt nach dem Auflösen der AHP-CMC **7** bei RT. Anschließend wird die Mischung 24 h bei 95°C gerührt. Die anderen 2 Portionen werden bei 95°C (Vorsicht!!), jeweils 24 h nach der hervorgegangenen Zugabe unter Rühren, zudosiert. Nach der letzten $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Zugabe (Tag 3) wird die Reaktionslösung einen weiteren Tag bei 95°C gerührt. Nach insgesamt 4 d bei 95°C wird die wässrige Lösung ultrafiltriert (UF-C 10, 10kDa).

Produkt **8** (weißer, watteartiger Feststoff) wird durch Gefriertrocknung isoliert.

Ausbeute: 790 mg (2.45 mmol, 75%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 25°C): $\delta = 4.62$ (s, H-1), 4.38-4.24 (m, H-2", H-6 $_{\text{CH}_2}$, H-2 $_{\text{CH}_2}$), 4.10 (m, H-1"), 3.96-3.83 (m, H-6), 3.68-3.50 (m, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.39 (d, H-2 $^{\text{A}}$), 3.30 (d, H-3"), 3.26 (m, H-2 $^{\text{B}}$) ppm.

$^{13}\text{C-DEPT-NMR}$ (D_2O , 25°C): $\delta = 102.72$ (C-1), 83.28 (C-2 $^{\text{A}}$), 82.43 (C-2 $^{\text{B}}$), 78.64-76.32 (C-4, C-3), 75.29-74.38 (C-1', C-3'), 73.36 (C-2'), 72.42 (C-5), 71.59 ($\text{CH}_2(\text{CM})$), 69.15 (C-2"), 60.24 (C-6), 38.01 (C-3") ppm.

FT-IR: 3356 $\nu(\text{OH})$, 2922 $\nu(\text{CH})$, 1599 $\nu(\text{COONa})$, 1416, 1323 $\nu(\text{OH})$, 1203 $\nu(\text{SO}_2^-)$, 1056, 1024 $\nu(\text{S=O})$, 896, 637 $\nu(\text{C-S})$ cm^{-1} .

EA berechnet für $[\text{C}_6\text{H}_{8.86}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.91}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.15}[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.08}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_{\text{Glcp}} = 322.78$ g/mol): C 34.23%, H 5.47%, S 2.98%; gefunden: C 34.26%, H 5.43%, S 2.94%.

EA berechnet für $[\text{C}_6\text{H}_{8.66}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.91}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.23}[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.20}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_{\text{Glcp}} = 352.85$ g/mol): C 35.40%, H 5.38%, S 4.18%; gefunden: C 35.38%, H 5.27%, S 4.16%.

EA berechnet für $[\text{C}_6\text{H}_{8.45}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.91}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.38}[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{0.26}\cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_{\text{Glcp}} = 392.67$ g/mol): C 35.67%, H 5.19%, S 6.21%; gefunden: C 35.63%, H 5.15%, S 6.18%.

Molmasse: $M_w = 95000$ g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 331.

($M_{\text{Glcp}} = 322.78$ g/mol; $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$).

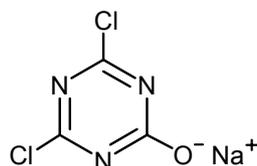
Molmasse: $M_w = 98000$ g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 262.

($M_{\text{Glcp}} = 392.67$ g/mol; $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.38$).

AHP-CMC Na		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$		Schwefel	$DS_{\text{Thiosulfat}}$	Ausbeute		
DS_{Allyl}	m [g]	n [mmol]	m [g]	n [mmol]	[%]	EA	[g]	[%]
0.23	1.00	3.26	1.30	8.20	2.94	0.15	0.79	75
0.43	0.50	1.56	1.00	6.31	4.16	0.23	0.40	72
0.64	1.00	2.85	1.35	8.51	6.18	0.38	0.69	62

8.3.2 Synthese reaktiver Thiocellulosederivate

2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin 9



10 g (54.2 mmol) 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (Cyanurchlorid) werden in 100 ml H₂O suspendiert. Die Suspension wird nun auf 2°C abgekühlt. Unter kräftigem Rühren wird eine 2 M NaOH Lösung zudosiert bis der pH der Lösung zwischen 10 und 12 liegt (ca. 30 ml NaOH Lösung entsprechend 60 mmol NaOH). Die Suspension wird bei diesem pH weitergerührt (eventuell noch NaOH Lösung zugeben) bis das gesamte Feststoff in Lösung geht (Dauer: ca. 1 h).

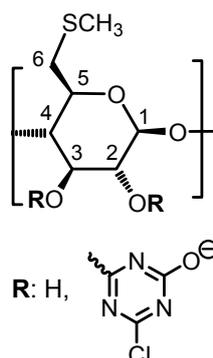
Die klare Lösung wird vom restlichen nicht umgesetzten Cyanurchlorid abfiltriert und mit einer 0.1 M HCl Lösung auf einem pH zwischen 7 und 8 eingestellt. Die Lösung wird anschließend gefriergetrocknet. Der weiße flockenartige Feststoff wird in 200 ml Methanol suspendiert und 30 min gerührt. Anschließend wird abfiltriert und das Methanol am Rotationsverdampfer abdestilliert. Man erhält einen weißen Feststoff der dann in Vakuum (5×10^{-2} mbar) bei 60°C über Nacht getrocknet wird.

Ausbeute: 8.86 g (53.38 mmol, 98%).

¹³C-NMR (D₂O, 25°C): δ = 169.68 (C-Cl), 168.52 (C-O) ppm.

FT-IR: 3371 ν (OH), 1656-1563 ν (C=N), 1436, 1368, 1226, 1103-1035 ν (C-Cl), 888, 842 ν (C-Cl), 805 ν (C-Cl) cm⁻¹.

MS (ESI⁻): $m/z_{\text{gef.}}$ = 163.86 [M(C₃HN₃Cl₂O)-H], $m/z_{\text{ber.}}$ = 164.96 [M(C₃HN₃Cl₂O)].

6-S-Methylthio-6-desoxy-O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl)-cellulose 10

9 (418 mg, 2.22 mmol) wird in 10 ml Wasser gelöst und auf einer Temperatur von 2°C abgekühlt. Unter Rühren wird eine Lösung von 200 mg (0.74 mmol) 6-Methylthio-6-desoxy-cellulose **2** ($DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$) in 5 ml 0.4 M NaOH Lösung (entspricht 2 mmol NaOH) zugetropft so dass der pH der Reaktionslösung zwischen 12 und 13 liegt. Unter regelmäßiger pH Kontrolle wird die Lösung nun 1 d bei 2°C gerührt und ein weiteren Tag bei RT. Der pH der Reaktionslösung liegt am Ende zwischen 9.0 – 9.5. Man verdünnt anschließend die Lösung auf das 10-fache und reinigt diese durch Ultrafiltration mit destilliertem H₂O (UF-C 5, 5 kDa). Produkt **10** wird nach Gefriertrocknung als weißer watteartiger Feststoff isoliert.

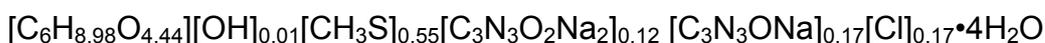
Ausbeute: 122.9 mg (0.416 mmol, 56%; $DS_{\text{Chlor}} = 0.17$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$, $DS_{\text{Triazin}} = 0.29$).

¹H-NMR (D₂O, 27°C): $\delta = 4.27\text{-}2.53$ (bs, H-1, H-4, 5, 6, 3, 2), 2.07 (t, SCH₃) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 27°C): $\delta = 170.81\text{-}169.21$ (C-O⁻, C-Cl, C-O-CH₂), 103.06 (C-1), 82.80 (C-4^A), 80.30 (C-4^B), 75.36-73.00 (C-5, 3, 2), 61.52 (C-6^A_{MCT}), 60.83 (C-6^B), 35.29 (C-6^A), 16.13 (SCH₃) ppm.

FT-IR: 3333 ν (OH), 2926 ν (CH), 2874 ν (CH), 1610-1539 ν (C=N), 1480, 1335 ν (OH), 1223, 1053, 1018 ν (CO), 860, 805 ν (C-Cl), 705 ν (CS) cm⁻¹.

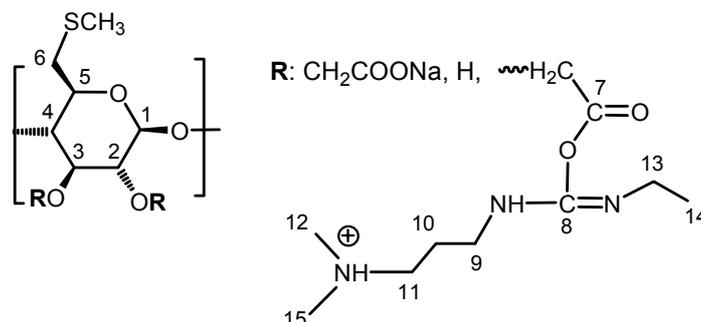
EA berechnet für



($M_{\text{Glcp}} = 294.93$ g/mol): C 30.22%, H 6.37%, N 4.13%, Cl 2.04%; gefunden: C 30.17%, H 6.28%, N 3.97%, Cl 2.11%.

Molmasse: $M_w = 30000$ g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 134.

6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethyl-O-2-(N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidyl)-cellulose Natrium Salz 11 a



158 mg MTh-CMC Na **3** (0.55 mmol; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 1.00$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$) werden in 12 ml Wasser gelöst, mit 320 mg EDC (1.67 mmol) versetzt und unter regelmäßiger pH Kontrolle (Anfangs pH 7.0, pH-Bereich 6.5-7.0) 24 h bei RT gerührt (*Bemerkung*: wenn der pH-Wert der Lösung unter 6.0 oder überhalb von 7.5 liegt, mit Säure/Base wieder im pH-Bereich einstellen). Die Lösung wird anschließend mit Wasser auf 50 ml verdünnt und durch kontinuierliche Ultrafiltration mit 1 l 0.2 M KCl-Lösung und anschließend mit 1 l destilliertem Wasser gegen eine UF-C 5 Membran (5 kDa) gereinigt. Das Produkt wird als weißer watteartiger Feststoff durch Gefriertrocknung isoliert.

Ausbeute: 150 mg (0.39 mmol, 72%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.74$, $DS_{\text{EDC}} = 0.26$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 4.41$ (m, H-1), 4.24 (m, $\text{CH}_2(\text{CM})$), 3.96-3.56 (bs, H-6^B, H-11, H-4, H-5), 3.26 (bs, H-9), 3.24-3.23 (m, H-3, H-2), 3.17 (m, H-6^A), 3.06 (m, H-13), 2.75 (s, 6H, H-12, H-15), 2.06 (bs, SCH_3), 1.87 (m, H-10), 1.04 (bs, H-14) ppm.

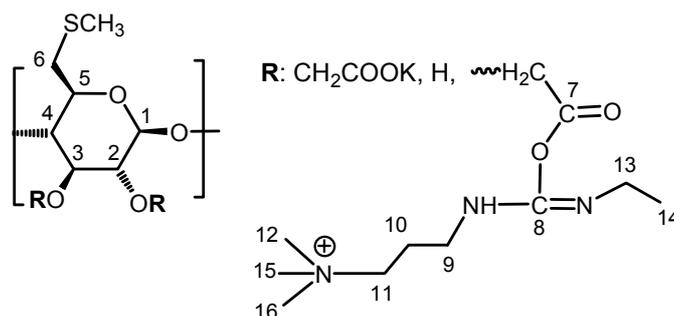
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 178.96$ (COONa), 168.07 (C-7), 146.95 (C-8), 103.24 (C-1), 82.71 (C-4), 79.40-69.90 (C-5, 3, 2, $\text{CH}_2(\text{CM})$), 60.78 (C-6^B), 56.08 (C-11), 43.41 (C-12, C-15), 37.19 (C-9, 13), 35.57 (C-6^A), 25.47 (C-10), 14.96 (SCH_3), 14.02 (C-14) ppm.

FT-IR: 3357 $\nu(\text{OH})$, 2919 $\nu(\text{CH})$, 1593 $\nu(\text{COONa})$, 1407 $\nu(\text{COONa})$, 1317 $\nu(\text{OH})$, 1058 $\nu(\text{CO})$, 713 $\nu(\text{CS})$, 592 cm^{-1} .

EA berechnet für

$[C_6H_{8.44}O_{4.44}][OH]_{0.01}[CH_3S]_{0.55}[C_2H_2O_2Na]_{0.74}[C_{11}H_{23}N_3O_2]_{0.26} \cdot 5H_2O$ ($M_{Glcp} = 383.69$ g/mol): C 33.28%, H 7.10%. N 2.85%; gefunden: C 32.89%, H 7.39%, N 2.89%.

6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethyl-O-2-(N-(3-trimethylammoniumpropyl)-N'-ethylcarbodiimidyl)-cellulose Kalium Salz 11 b



75 mg MTh-CMC H **3a** (0.28 mmol; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 1.00$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$) werden in 10 ml Wasser suspendiert, mit 252 mg EDC-Methiodid (0.85 mmol) versetzt und unter regelmäßiger pH Kontrolle (Anfangs pH 7.0, pH-Bereich 6.5-7.0) 24 h bei RT gerührt (*Bemerkung*: wenn der pH-Wert der Lösung unter 6.0 oder überhalb von 7.5 liegt, mit Säure/Base wieder im pH-Bereich einstellen). Nach dem Abfiltrieren unlöslicher Anteile wird die Lösung mit Wasser auf 50 ml verdünnt und durch kontinuierliche Ultrafiltration mit 0.5 l 0.2 M KCl-Lösung und anschließend 1 l destilliertem Wasser gegen eine UF-C 5 Membran (5 kDa) gereinigt. Das weiße, watteartige Produkt wird durch Gefriertrocknung isoliert.

Ausbeute: 36 mg (0.090 mmol, 32%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.75$, $DS_{\text{MEDC}} = 0.25$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 4.41$ (m, H-1), 4.37 (m, $\text{CH}_2(\text{CM})$), 3.83 (bs, H-6^B), 3.69 (bs, H-11), 3.59 (bs, H-9), 3.53-3.52 (m, H-4, H-5), 3.24-3.23 (m, H-3, H-2), 3.17 (m, H-6^A), 2.99 (s, H-12, H-15, H-16), 2.66 (bs, H-13), 2.05 (bs, SCH_3), 1.94 (m, H-10), 1.04 (t, 3H, H-14) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 179.92$ (COOK), 167.13 (C-7), 149.32 (C-8), 103.11 (C-1), 79.51 (C-4), 74.96 (C-5), 73.91-73.66 (C-3,2), 71.75-69.57 ($\text{CH}_2(\text{CM})$), 64.82 (C-

6^A_{MEDC} , 60.86 (C-6^B, C-11), 53.86 (C-12, C-15, C-16), 41.42 (C-9), 38.44 (C-13), 36.33 (C-6^A), 23.14 (C-10), 16.02 (SCH₃), 14.27 (C-14) ppm.

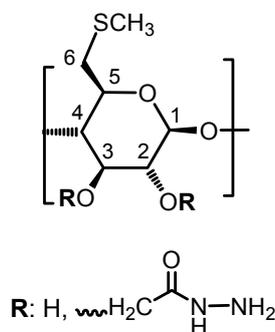
FT-IR: 3356 ν (OH), 2922 ν (CH), 1592 ν (COONa), 1409 ν (COONa), 1317 ν (OH), 1057 ν (CO), 706 ν (CS), 592 cm^{-1} .

EA berechnet für:

$[\text{C}_6\text{H}_{8.44}\text{O}_{4.44}][\text{OH}]_{0.01}[\text{CH}_3\text{S}]_{0.55}[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{K}]_{0.75}[\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2]_{0.25} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

($M_{\text{Glcp}} = 397.94 \text{ g/mol}$): C 32.60%, H 6.93%, N 2.64%; gefunden: C 32.42%, H 6.93%, N 2.71%.

6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose-hydrazid 12



370 mg (1.30 mmol) 6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethylcellulose-ethylester **4** ($\text{DS}_{\text{Carboxymethylethylester}} = 0.16$, $\text{DS}_{\text{Methylthio}} = 0.55$) werden in 60 ml absolutem Methanol suspendiert und mit 3.1 ml (0.061 mol) Hydrazin Monohydrat versetzt. Die Reaktionsmischung wird 3 d bei 40°C stehen gelassen. Anschließend wird der Niederschlag abfiltriert, 3-mal mit je 50 ml absolutem Methanol gewaschen und in Hochvakuum ($5 \cdot 10^{-4}$ mbar) getrocknet. Man erhält ein dunkelgelbes Pulver.

Ausbeute: 230 mg (0.82 mmol; 63%; $\text{DS}_{\text{Hydrazid}} = 0.15$, $\text{DS}_{\text{Methylthio}} = 0.55$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 25°C): $\delta = 4.56$ (m, H-1), 4.35-3.52 (bs, CH_{2(CM)}, H-4, 5, 6, 3), 3.36 (s, CH₂), 2.20 (t, SCH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 25°C): $\delta = 164.93$ (HN-C=O), 103.00 (C-1), 82.69 (C-4^A), 79.17 (C-4^B), 75.29-69.24 (C-5, 3, 2, CH_{2(CM)}), 60.29 (C-6^B), 35.00 (C-6^A), 15.69 (SCH₃) ppm.

FT-IR: 3334 ν (OH), 2962 ν (CH), 2874 ν (CH), 1722 ν (O=C-NH), 1590 ν (C=O), 1411, 1368 ν (OH), 1318 ν (OH), 1260, 1053, 1018 ν (CO), 897, 705 ν (CS) cm^{-1} .

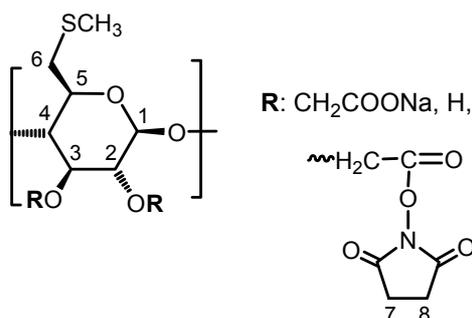
EA berechnet für

$[C_6H_9.28O_{4.44}][OH]_{0.01}[CH_3S]_{0.55}[C_4H_7O_2]_{0.01}[C_2H_5N_2O]_{0.15} \cdot 5H_2O$ ($M_{Glcp} = 280$ g/mol):

C 29.54%, H 7.85%, N 1.50%; gefunden: C 30.01%, H 7.76%, N 1.48%.

6-S-Methylthio-6-desoxy-carboxymethyl-O-(*N*-hydroxysuccinimidyl)-cellulose

Natrium Salz 13



3 (150 mg, 0.525 mmol, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 1.00$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$) wird in 10 ml 50 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 gelöst. 742.8 mg (3.60 mmol) *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 207 mg (1.80 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) gelöst in 1 ml DMSO werden tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird nun 2 d bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung bis zur Trockne einrotiert. Der weiße Niederschlag wird in 100 ml H₂O aufgenommen, 0.5 h gerührt und vom *N,N*-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Die klare Lösung wird anschließend durch Ultrafiltration (mit destilliertem H₂O gegen UF-C 10, 10 kDa) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung erhält man einen weißen watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 164.8 mg (0.46 mmol, 88%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.70$, $DS_{\text{Methylthio}} = 0.55$, $DS_{\text{NHS}} = 0.30$).

¹H-NMR (D₂O, 60°C): $\delta = 4.40$ (bs, H-1), 4.35 (m, CH_{2(CM)}), 3.97-3.29 (m, H-5, 4, 3, 2, 6), 2.30 (bs, H-7, 8), 2.06 (bs, SCH₃) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 60°C): $\delta = 178.83$ (COONa), 174.22 (C=O_{NHS}), 173.82 (-CH₂-C=O), 102.90 (C-1), 79.18 (C-4), 75.47-69.43 (C-5, 3, 2, CH_{2(CM)}), 63.58 (CH_{2(CM-NHS)}), 60.76 (C-6^B), 36.45-35.92 (C-7, 8, 6^A), 16.65 (SCH₃) ppm.

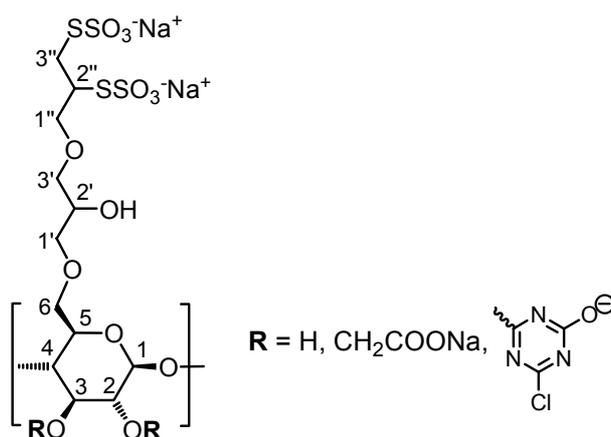
FT-IR: 3336 ν (OH), 2920 ν (CH), 1700 ν (C=O_{NHS}) 1595 ν (COONa), 1410 ν (COONa), 1315 ν (OH), 1058 ν (CO), 704 ν (CS), 592 cm⁻¹.

EA berechnet für



($M_{\text{Glcp}} = 353.29 \text{ g/mol}$): C 33.15%, H 6.08%, N 1.19%; gefunden: C 33.81%, H 5.98%, N 1.23%.

**6-O-(2'', 3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-
O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl)-carboxymethylcellulose Na Salz 14**



200 mg (0.59 mmol) von **6a** ($\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.33$, $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$) wird in 5 ml Wasser gelöst und auf 2°C gekühlt. Unter Rühren wird eine Lösung von 296.5 mg (1.79 mmol) **9** in 10 ml Wasser zugegeben und eine weitere 0.5 h gerührt. Nun tropft man 895 µl einer 2 M NaOH Lösung (1.79 mmol) zu, so dass der pH der Reaktionslösung zwischen 12 und 13 liegt. Unter regelmäßiger pH Kontrolle wird die Lösung nun 22 h bei 2°C gerührt. Der pH der Reaktionslösung liegt am Ende zwischen 8.5 - 9.0. Man verdünnt anschließend die Lösung auf das 10-fache und reinigt diese durch Ultrafiltration (destilliertem H₂O, UF-C 5, 5 kDa). Produkt **17** wird nach Gefriertrocknung als weißer watteartiger Feststoff isoliert.

Ausbeute: 113.6 mg (0.305 mmol, 52%; $\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.33$, $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $\text{DS}_{\text{Chlor}} = 0.16$, $\text{DS}_{\text{Triazin}} = 0.26$).

¹H-NMR (D₂O, 25°C): δ = 5.97 (m, H-2''), 5.38-5.34 (d, H-3''_{trans}), 5.30-5.28 (m, H-3''_{cis}), 4.59 (bs, H-1), 4.28 (s, H-6_{CH2}), 4.26 (s, H-2_{CH2}), 4.09 (bs, H-1''), 3.99 (m, H-2'), 3.95 (m, H-6^A), 3.78 (m, H-6^B), 3.60-3.45 (bs, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.36 (s, H-2^A), 3.22 (s, H-2^B) ppm.

^{13}C -NMR (D_2O , 25°C): $\delta = 178.25$ (COONa), $170.42 - 169.52$ (C-O^- , C-Cl , C-O-CH_2), 134.32 ($\text{C-2}''$), 118.71 ($\text{C-3}''$), 102.59 (C-1), 82.25 (C-2^{A}), 81.34 (C-2^{B}), 78.55 (C-4), 75.28 (C-3), 74.36 ($\text{C-1}''$), 74.01 ($\text{C-1}'$, $\text{C-3}'$), 73.92 ($\text{C-2}'$), 72.48 (C-5), $71.35 - 69.22$ ($\text{CH}_2(\text{CM})$), 61.12 ($\text{C-6}^{\text{A}}_{\text{MCT}}$), 60.23 (C-6^{B}) ppm.

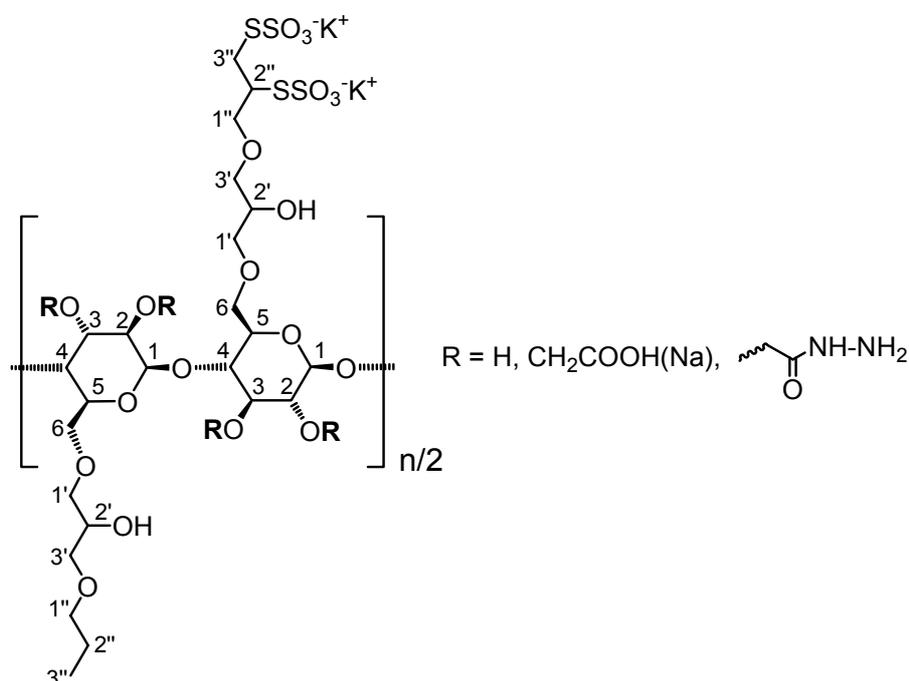
FT-IR: 3349 $\nu(\text{OH})$, 2922 $\nu(\text{CH})$, 2885 , 1596 $\nu(\text{COONa})$, 1454 , 1415 , 1326 $\nu(\text{OH})$, 1240 , 1207 , 1055 , 1018 , 895 , 802 $\nu(\text{C-Cl})$, 650 , 594 cm^{-1} .

EA berechnet für

$[\text{C}_6\text{H}_{8.24}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.91}[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]_{0.33}[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_8\text{S}_4\text{Na}_2]_{0.10}[\text{C}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{HNa}]_{0.10}[\text{C}_3\text{N}_3\text{OH}]_{0.16}[\text{Cl}]_{0.16} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ ($M_{\text{Glcp}} = 371.94$ g/mol): C 36.10%, H 4.89%, S 3.45%, N 2.94%, Cl 1.53%; gefunden: C 35.98%, H 4.88%, S 3.38%, N 2.90%, Cl 1.50%.

Molmasse: $M_w = 29000$ g/mol, Polymerisationsgrad: $\text{DP} = 84$.

6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)- carboxymethylcellulose-hydrazid 15



150 mg (0.45 mmol) TSHP-CMC **H 6a** ($\text{DS}_{\text{Allyl}} = 0.33$, $\text{DS}_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$) werden in 20 ml Wasser gelöst und mit 135.56 mg (0.90 mmol) EDC versetzt. Nach Zugabe von 205 mg (4.05 mmol) Hydrazin Monohydrat lässt sich ein Farbwechsel von blau nach gelb beobachten (pH-Wert der Lösung 6.5). Die

Reaktionslösung wird 2 d bei 40°C gerührt (pH-Bereich zwischen 6.0-6.5), anschließend durch kontinuierliche Ultrafiltration gegen eine UF-C 5 Membran (5 kDa) gereinigt (zuerst mit 500 ml 0.2 M KCl-Lösung und anschließend mit destilliertem Wasser) und gefriergetrocknet. Nach der Gefrierdrying erhält man einen leicht gelblichen, watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 80 mg (0.25 mmol, 56%; $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $DS_{\text{Hydrazin}} = 0.20$, $DS_{\text{Propylhydroxypropyl}} = 0.33$).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 25°C): $\delta = 4.53$ (s, H-1), 4.26 (bs, H-2,6_{CH₂}), 4.14 (bs, H-1''), 3.97 (m, H-2'), 3.95 (m, H-6^A), 3.82 (m, H-6^B_{CMC}), 3.66 (m, H-6^B), 3.60-3.51 (bs, 7H, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.34 (s, 2H, H-2^A), 3.21 (s, 2H H-2^B), 1.59 (m, H-2''), 0.90 (bs, 3H, H-3'') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 25°C): $\delta = 174.72$ (C=O), 165.36 (-HN-C=O), 105.24 (C-1), 84.93 (C-2^A), 81.45 (C-2^B), 77.82 (C-4), 76.89 (C-3), 76.10-74.14 (C-1'', C-1', C-3'), 73.61 (C-2'), 72.32 (C-5), 71.74 (CH_{2(CM)}), 62.75 (C-6^B), 39.27 (C-6^A), 24.88 (C-2''_{PHP}), 12.68 (C-3''_{PHP}) ppm.

FT-IR: 3331 $\nu(\text{OH})$, 2927 $\nu(\text{CH})$, 2878, 1729 $\nu(\text{O}=\text{C}-\text{NH})$, 1588 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1414, 1322 $\nu(\text{OH})$, 1263, 1057, 1020 cm^{-1} .

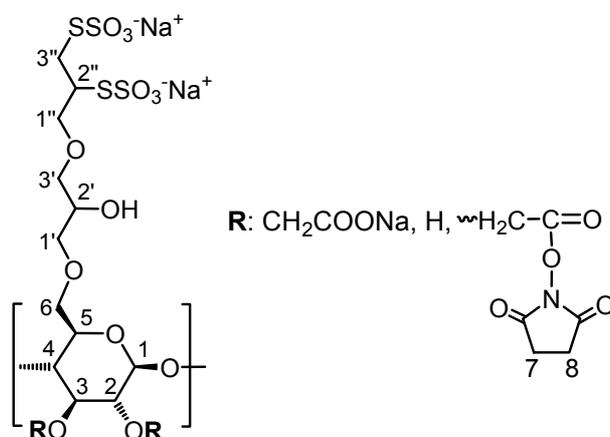
EA berechnet für



($M_{\text{Glcp}} = 324.20$ g/mol):

C 38.46%, H 6.27%, N 1.73%; gefunden: C 38.80%, H 6.16%, N 1.70%.

**6-O-(2'',3''-Bis(thiosulfato)propoxy-2'-hydroxypropyl)-
carboxymethyl-O-(N-hydroxysuccinimidyl) cellulose Na Salz 16**



Variante I

200 mg (0.59 mmol) **6a** Na Salz ($DS_{\text{Allyl}} = 0.33$, $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$) werden in 10 ml 50 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 gelöst. 742.8 mg (3.60 mmol) DCC und 207 mg (1.80 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid gelöst in 1 ml DMSO werden innerhalb einer 0.5 h zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird nun 2 d bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung bis zur Trockne einrotiert. Der weiße Niederschlag wird in 100 ml H₂O aufgenommen, 0.5 h gerührt und vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Die klare Lösung wird anschließend durch Ultrafiltration (destilliertem H₂O, UF-C 10, 10 kDa) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung erhält man einen weißen watteartigen Feststoff.

Variante II

72.3 mg (0.21 mmol) von **6a** Na Salz ($DS_{\text{Allyl}} = 0.33$, $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$) werden in 30 ml Wasser gelöst. 240 mg (1.26 mmol) EDC und 145 mg (1.26 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) werden zu dieser Lösung fest zugegeben (pH-Bereich 6.0-6.5). Die Reaktionslösung färbt sich dunkelblau und wird nun 24 h gerührt. Die klare gelbliche Lösung (pH = 6.0) wird anschließend durch Ultrafiltration (zuerst mit 2 l 0.5 M NaCl Lösung, danach mit destilliertem H₂O gegen UF-C 10 Membran, 10 kDa) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung erhält man einen weißen watteartigen Feststoff.

Ausbeute:

Variante I: 136.1 mg (0.379 mmol, 64%; $DS_{\text{Allyl}} = 0.33$, $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.63$, $DS_{\text{NHS}} = 0.28$).

Variante II: 61.3 mg (0.167 mmol, 80%; $DS_{\text{Allyl}} = 0.33$, $DS_{\text{Bisthiosulfat}} = 0.10$, $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.65$, $DS_{\text{NHS}} = 0.26$).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 25°C): $\delta = 5.84$ (m, H-2''), 5.22-5.15 (m, H-3''), 4.45 (bs, H-1), 4.15-4.13 (m, H-6_{CH₂}, H-2_{CH₂}), 4.10 (bs, H-1''), 3.94 (m, H-2'), 3.86 (m, H-6^A), 3.67 (m, H-6^B), 3.52-3.41 (bs, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.28 (bs, H-2^A), 3.10 (bs, H-2^B), 2.34 (bs, H-7, 8) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 25°C): $\delta = 177.31$ (COONa), 174.12 (C=O_{NHS}), 173.62 (-CH₂-C=O), 134.82 (C-2''), 118.51 (C-3''), 102.82-102.40 (C-1^A, 1^B), 82.50 (C-2), 78.76 (C-4), 75.50 (C-3), 74.69 (C-1''), 74.31 (C-1', C-3'), 73.60 (C-2'), 72.50 (C-5), 71.58-69.50 (CH₂(_{CM}), CH₂(_{CM-NHS})), 60.58 (C-6), 36.45-35.92 (C-7, 8) ppm.

FT-IR: 3359 ν (OH) 2932 ν (CH), 2886, 1710 ν (C=O_{NHS}), 1596 ν (COONa), 1454, 1415, 1326 ν (OH), 1240, 1055, 1018, 895, 650, 594 cm^{-1} .

Variante I:

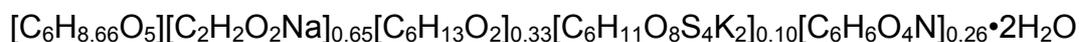
EA berechnet für



($M_{\text{Glcp}} = 359.11$ g/mol): C 38.53%, H 5.43%, N 1.09%; gefunden: C 38.68%, H 5.32%, N 1.13%.

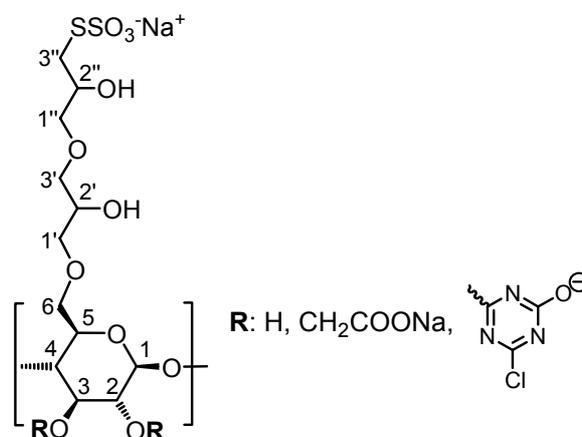
Variante II:

EA berechnet für



($M_{\text{Glcp}} = 366.61$ g/mol): C 37.48%, H 5.57%, N 0.99%; gefunden: C 37.58%, H 5.36%, N 1.08%.

6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz 17



9 (1.05 g, 5.58 mmol) wird in 20 ml Wasser gelöst und auf 1°C abgekühlt. Eine Lösung von 300 mg (0.93 mmol) **8** ($DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$) in 10 ml Wasser wird zugegeben und die Reaktionslösung eine weitere 0.5 h gerührt. Nun tropft man 2.8 ml einer 2 M NaOH Lösung (5.58 mmol) zu, so dass der pH der Reaktionslösung zwischen 12 und 13 liegt. Unter regelmäßiger pH Kontrolle wird die Lösung nun 1 d bei 1°C gerührt und einen weiteren Tag bei RT. Der pH-Wert der Reaktionslösung liegt am Ende zwischen 7.5-8.0. Man verdünnt anschließend die Lösung auf das 10-fache und reinigt diese durch Ultrafiltration gegen dest. H₂O (UF-C 5, 5 kDa). Produkt **17** wird nach Gefriertrocknung als weißer watteartiger Feststoff isoliert.

Ausbeute: 150.9 mg (0.398 mmol, 43%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $DS_{\text{Chlor}} = 0.30$, $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.13$, $DS_{\text{Triazin}} = 0.45$).

¹H-NMR (D₂O, 25°C): $\delta = 4.45$ (bs, H-1), 4.23-4.16 (bs, H-2'', H-6_{CH₂}, H-2_{CH₂}), 4.12 (m, H-1''), 3.97-3.85 (bs, H-6), 3.69-3.51 (bs, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.39-3.30 (bs, H-3''), 3.23 (m, H-2^A), 3.08 (bs, H-2^B) ppm.

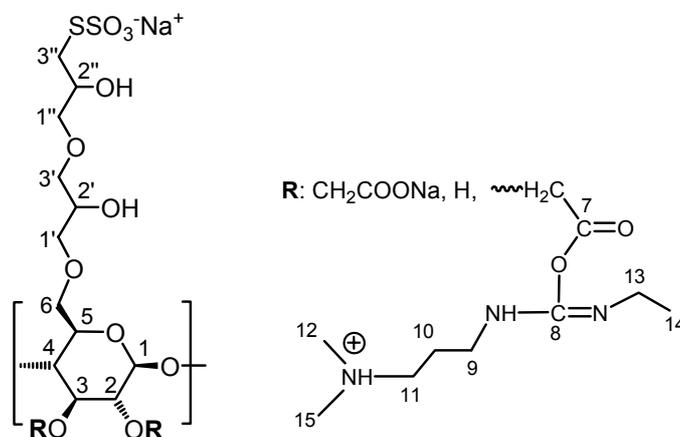
¹³C-NMR (D₂O, 25°C): $\delta = 177.80$ (COONa), 170.52-169.39 (C-O⁻, C-Cl, C-O-CH₂) 102.74 (C-1), 83.49 (C-2^A), 82.37 (C-2^B), 78.72 (C-3), 77.31 (C-4), 75.32-73.37 (C-1', C-3', C-2'), 72.59-71.79 (C-5, CH₂(CM)), 69.17 (C-2''), 63.03 (C-6^A_{MCT}), 60.24 (C-6^B), 38.04 (C-3'') ppm.

FT-IR: 3345 ν OH, 2923 ν CH, 2855, 1740, 591 ν (COONa), 1414, 1376, 1322 ν (OH), 1264, 1205, 1117, 1053, 1025, 896, 810 ν (C-Cl), 705, 638, 591 cm^{-1} .

EA berechnet für:

$[\text{C}_6\text{H}_8.42\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.9}[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}]_{0.13}[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4]_{10}[\text{C}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{HNa}]_{0.15}[\text{C}_3\text{HN}_3\text{OH}]_{0.30}[\text{Cl}]_{0.30} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_{\text{Glcp}} = 378.92 \text{ g/mol}$): C 33.44%, H 4.59%, S 2.20% N 4.99%, Cl 2.81; gefunden: C 33.37%, H 4.62%, S 2.01% N 5.04%, Cl 2.80.

6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-O-2-(N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidyl)-cellulose Kalium Salz 18a



767 mg (4 mmol) EDC werden in 10 ml Wasser gelöst. 199.3 mg (0.62 mmol) HTSHP-CMC Na **8** ($\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $\text{DS}_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$) werden zugegeben (pH \approx 7.0) und unter regelmäßiger pH Kontrolle (pH-Bereich 6.5-7.0) 27 h bei RT gerührt (*Bemerkung*: wenn der pH-Wert der Lösung unter 6.0 oder überhalb von 7.5 liegt, mit Säure/Base wieder im pH-Bereich einstellen). Anschließend wird die Reaktionslösung (pH \approx 7.0) durch kontinuierliche Ultrafiltration mit 0.5 l 0.2 M KCl-Lösung und anschließend mit 1 l destilliertem Wasser gegen eine UF-C 5 Membran (5 kDa) gereinigt und das Produkt gefriergetrocknet.

Ausbeute: 178.3 mg (0.49 mmol, 79%; $\text{DS}_{\text{Carboxymethyl}} = 0.68$, $\text{DS}_{\text{EDC}} = 0.23$, $\text{DS}_{\text{Thiosulfat}} = 0.15$).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 4.41$ (bs, H-1), 4.38-4.24 (m, H-2'', H-6 $_{\text{CH}_2}$, H-2 $_{\text{CH}_2}$), 4.07 (m, H-1''), 3.95-3.82 (m, H-6), 3.73 (m, H-9, 13), 3.68-3.47 (bs, H-1', H-3', H-5, H-4,

H-3, H-11, 13), 3.30 (bs, H-3^{''}), 3.23 (bs, H-2^A), 3.07 (bs, H-2^B), 2.77 (s, H-12,15), 2.04 (m, H-10), 1.11 (bs, H-14) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 60°C) : δ = 178.08 (COONa), 168.64 (C-7), 146.37 (C-8), 102.75 (C-1), 82.6 (C-2), 78.7 (C-5), 75.30 (C-3, C-4), 74.35 (C-1^{''}), 73.44 (C-1[']), 72.57 (C-2[']), 72.43 (C-5), 70.91 (CH₂(C_M)), 69.3 (C-2^{''}), 63.26 (C-6^A_{EDC}), 60.27 (C-6^B), 55.22 (C-11), 43.18 (C-12, 15), 39.14 (C-3^{''}), 37.94 (C-9, 13), 24.65 (C-10), 12.96 (C-14) ppm.

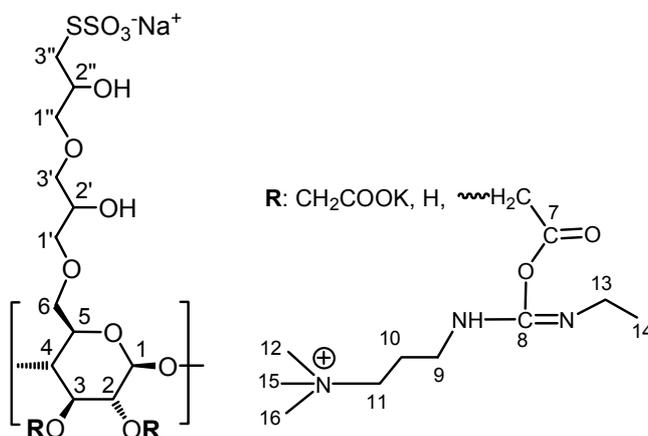
FT-IR: 3273 v(OH), 2919 v(CH), 1589 v(COONa), 1410, 1320 v(OH), 1054 v(CO), 911, 583 cm⁻¹.

EA berechnet für

[C₆H_{8.87}O₅][C₂H₂O₂Na]_{0.01}[C₂H₂O₂K]_{0.68}[C₁₀H₂₁N₃O₂]_{0.23}[C₆H₁₂O₆S₂Na]_{0.15}[C₆H₁₃O₄]_{0.08}•2H₂O (M_{Glcp} = 364.45 g/mol): C 36.38%, H 6.05%, N 2.65%; gefunden: C 36.32%, H 5.88%, N 2.65%.

6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-carboxymethyl-O-2-(N-(3-trimethylammoniumpropyl)-N'-ethylcarbodiimidyl)-cellulose

Kalium Salz 18 b



560 mg EDC-Methiodid (1.83 mmol) werden in 10 ml 50 mM Phosphat-Puffer pH 7.0 gelöst. 196.5 mg (0.61 mmol) **8** ($DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.23$) werden zugegeben und unter regelmäßiger pH Kontrolle (pH-Bereich 6.5-7.0) 28 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung mit Wasser auf 50 ml verdünnt und durch kontinuierliche Ultrafiltration mit 1.5 l destilliertem Wasser, 0.5 l 0.2 M KCl-Lösung und anschließend noch einmal 1 l Wasser gegen eine UF-C 5 Membran (5 kDa) gereinigt. Produkt **18b** wird durch Gefriertrocknung isoliert.

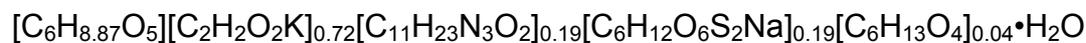
Ausbeute: 200 mg (0.572 mmol, 94%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.72$, $DS_{\text{MEDC}} = 0.19$ $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.19$).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 4.41$ (m, 1H, H-1), 4.22 (bs, H-6_{CH₂}, H-2_{CH₂}), 4.08 (bs, H-1''), 4.04 (m, H-2''), 3.97-3.83 (bs, H-1', H-3', H-5, H-6^A), 3.67 (bs, H-11), 3.59 (bs, H-3, H-4), 3.58 (m, H-9, 13), 3.52 (m, H-3''), 3.47 (bs, H-2'), 3.38-3.23 (bs, H-13, H-6^B, H-2^A), 3.08 (bs, H-2^B), 2.98 (s, H-12, H-15, H-16), 1.95 (m, H-10), 1.02 (bs, 3H, H-14) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 179.65$ (COONa), 166.62 (C-7), 151.08 (C-8), 102.75 (C-1), 83.94 (C-2^A), 82.53 (C-2^B), 78.62 (C-3, C-4), 74.43 (C-1''), 73.66 (C-1', C-3'), 72.92 (C-2'), 71.70 (C-5), 70.80 (CH₂(CM)), 69.42 (C-2''), 64.43 (C-6^A_{MEDC}), 60.42 (C-11, C-6^B), 53.61 (C-12, C-15, C-16), 41.46 (C-9), 39.42 (C-3''), 37.94 (C-13), 22.96 (C-10), 13.88 (C-14) ppm.

FT-IR: 3254 $\nu(\text{OH})$, 2881 $\nu(\text{CH})$, 1590 $\nu(\text{COONa})$, 1408, 1320 $\nu(\text{OH})$, 1264, 1023 $\nu(\text{CO})$, 578, 551 cm^{-1} .

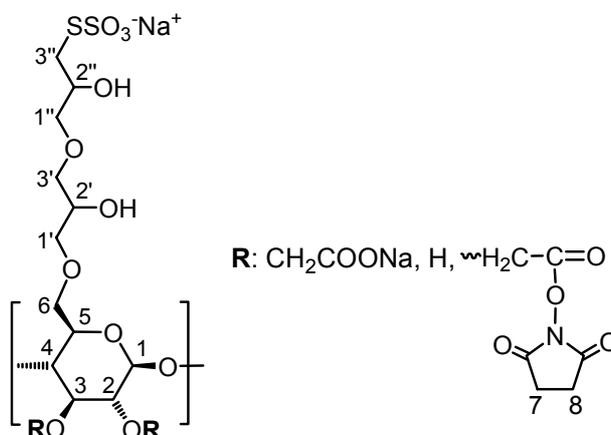
EA berechnet für



($M_{\text{Glcp}} = 349.27$ g/mol): C 37.52%, H 5.62%, N 2.29%; gefunden: C 37.53%, H 5.65%, N 2.29%.

Molmasse: $M_w = 23000$ g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 69.

**6-O-(2''-Hydroxy-3''-thiosulfatopropoxy-2'-hydroxypropyl)-
carboxymethyl-O-(N-hydroxysuccinimidyl)-cellulose Natrium Salz 19**



Variante I

8 (200 mg, 0.62 mmol; DS_{Carboxymethyl} = 0.91, DS_{Thiosulfat} = 0.15) wird in 10 ml 50 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 gelöst. 767.5 mg (3.72 mmol) *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 214.1 mg (1.86 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) gelöst in 1 ml DMSO werden innerhalb einer 0.5 h zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird nun 2 d bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung bis zur Trockne einrotiert. Der weiße übrig gebliebene Niederschlag wird in 100 ml H₂O aufgenommen, 0.5 h gerührt und vom *N,N*-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Die klare Lösung wird anschließend durch Ultrafiltration (mit destilliertem H₂O gegen eine UF-C 10 Membran, 10 kDa) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung erhält man einen weißen watteartigen Feststoff.

Variante II

150 mg (0.465 mmol) von **8** (DS_{Carboxymethyl} = 0.91, DS_{Thiosulfat} = 0.15) werden in 10 ml 50 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 gelöst. 820 mg (2.76 mmol) MEDC und 160 mg (1.38 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) werden zu dieser Lösung fest zugegeben. Die Reaktionslösung wird 2 d bei RT gerührt. Die klare, leicht gelbliche Lösung wird anschließend durch Ultrafiltration (zuerst mit 2 l 0.5 M KCl Lösung, danach mit destilliertem H₂O gegen UF-C 10 Membran, 10 kDa) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung erhält man einen weißen watteartigen Feststoff.

Ausbeute:

Variante I: 176.9 mg (0.475 mmol, 77%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.41$, $DS_{\text{NHS}} = 0.50$
 $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.10$).

Variante II: 142.7 mg (0.395 mmol, 85%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.44$, , $DS_{\text{NHS}} = 0.47$,
 $DS_{\text{Thiosulfat}} = 0.10$).

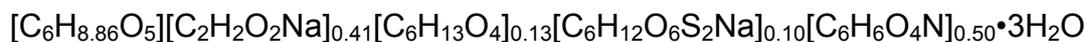
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 4.41$ (bs, H-1), 4.15-4.00 (bs, H-2", H-6 $_{\text{CH}_2}$, H-2 $_{\text{CH}_2}$, 4.05
H-1"), 3.86-3.70 (bs, H-6 $^{\text{A}}$), 3.64-3.53 (bs, H-1', H-3', H-5, H-4, H-3), 3.47 (H-2'),
3.36-3.29 (m, H-6 $^{\text{B}}$, H-3"), 3.24 (bs, H-2 $^{\text{A}}$), 3.11 (bs, H-2 $^{\text{B}}$), 2.30 (bs, , H-7, 8) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 60°C): $\delta = 178.5$ (COONa), 174.28 ($\text{C}=\text{O}_{\text{NHS}}$), 173.77 ($-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$),
102.85 (C-1), 84.18 (C-2 $^{\text{A}}$), 82.73 (C-2 $^{\text{B}}$), 79.15 (C-3), 76.77 (C-4), 75.53-73.64 (C-
2", C-1", C-1', C-3'), 72.86 (C-2'), 71.30 (C-5), 70.72 ($\text{CH}_2(\text{CM})$), 69.44 (C-2"), 63.49
(C-6 $^{\text{A}}_{\text{NHS}}$), 60.72 (C-6 $^{\text{B}}$), , 38.37 (C-3"), 36.46-35.93 (C-7, 8) ppm.

FT-IR: 3369 $\nu(\text{OH})$ 2952 $\nu(\text{CH})$, 2887, 1705 $\nu(\text{C}=\text{O}_{\text{NHS}})$, 1599 $\nu(\text{COONa})$, 1457,
1418, 1324 $\nu(\text{OH})$, 1239, 1058, 1018, 894, 651, 596 cm^{-1} .

Variante I:

EA berechnet für



($M_{\text{Glcp}} = 372.44$ g/mol): C 36.12%, H 5.84%, N 1.88%; gefunden: C 36.25%, H
6.27%, N 1.86%.

Variante II:

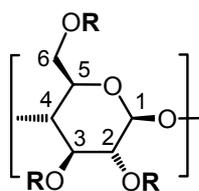
EA berechnet für



($M_{\text{Glcp}} = 361.17$ g/mol): C 36.85%, H 5.71%, N 1.82%; gefunden: C 36.87%, H
5.94%, N 1.83%.

Molmasse: $M_w = 71000$ g/mol, Polymerisationsgrad: DP = 223.

O-(2-Chlor-4-oxido-1,3,5-triazin-6-yl)-carboxymethylcellulose Natrium Salz **20**



1 g (4.13 mmol) CMC Natrium Salz ($DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $x_2 = 0.43$, $x_3 = 0.17$, $x_6 = 0.31$) wird in 50 ml Wasser gelöst (KPG-Rührer, 1-2 h) und auf 5 °C gekühlt. 2.04 g (12.40 mmol) 2,4-Dichlor-6-oxido-1,3,5-triazin **9** werden in 40 ml Wasser gelöst und unter kräftigem Rühren zur Reaktionslösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird eine 1 h bei 5 °C zur Homogenisierung weitergerührt. Man tropft nun 6.2 ml einer 2 M NaOH Lösung (12.40 mmol) zu, so dass der pH-Wert der Reaktionslösung zwischen 11 und 13 liegt. Nach vollendeter Zugabe wird die Lösung über Nacht bei 5 °C weitergerührt. Im Anschluss wird ohne Kühlung weitergerührt bis keine pH Änderung mehr erfolgt (Dauer: 2-3 d). Der pH-Wert der Reaktionslösung liegt am Ende zwischen 8.5-9.0. Man verdünnt die Lösung auf das 10-fache und reinigt diese durch Ultrafiltration (destilliertem H₂O, UF-C 10, 10 kDa). Produkt **20** wird nach Gefriertrocknung als weißer watteartiger Feststoff isoliert.

Ausbeute: 682.7 mg (1.96 mmol; 47%; $DS_{\text{Carboxymethyl}} = 0.91$, $DS_{\text{Chlor}} = 0.16$, $DS_{\text{Triazin}} = 0.33$).

¹H-NMR (D₂O, 25 °C): $\delta = 4.59$ (bs, H-1), 4.10-3.95 (bs, H-2_{CH₂}, H-6_{CH₂}, H-6^A), 3.84 (bs, H-5, H-4), 3.63-3.53 (bs, H-3, H-6^B), 3.22 (s, H-2^A), 3.06 (s, H-2^B) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 25 °C): $\delta = 178.22$ (COONa), 172.45–170.87 (C-O⁻, C-Cl, C-O-CH₂), 102.69 (C-1), 85.21 (C-2^A), 82.60 (C-2^B), 78.42 (C-4), 75.43 (C-3), 73.12 (C-5), 71.79 (CH_{2(CM)}), 59.9(C-6) ppm.

FT-IR: 3332 ν (OH) 2921 ν (CH), 2886, 1656-1596 ν (C=N, COONa), 1489, 1459, 1415, 1367, 1328 ν (OH), 1240, 1208, 1055, 1018, 916, 895, 828-812 ν (C-Cl), 656, 599 cm⁻¹.

EA berechnet für $[\text{C}_6\text{H}_{8.76}\text{O}_5][\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}]_{0.91}[\text{C}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}_2]_{0.17}[\text{C}_3\text{HN}_3\text{ONa}]_{0.16}$
 $[\text{Cl}]_{0.16} \cdot 3.5 \text{ H}_2\text{O}$ ($M_{\text{Glcp}} = 348.44 \text{ g/mol}$): C 30.35%, H 5.08%, N 3.98%, Cl 1.63%;
gefunden: C 30.17%, H 5.08%, N 4.01% Cl 1.65%.

9. Literaturverzeichnis

- [1] T. Nevell, *Cellulose Chemistry and its Applications*, Ellis Horwood Ltd. **1985**, 15, 30-75.
- [2] M. Takai, Carl Hanser Verlag **1994**.
- [3] U. G. H. P. Schmauder, L. Einfeldt, D. Klemm, S. Marsch, *Meded. Fac. Landbouwk. Toegepaste Biol. Wet.* **1994**, 59, 2411.
- [4] D. Fengel, G. Wegener, *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, Walter de Gruyter, **1983**.
- [5] S. A. Klemm D., Erler U., Wagenknecht W., Nehls I., Philipp B., *Cellulosics Materials for Selective Separation and Other Technologies*, Kennedy, J. F., **1993**.
- [6] R. H. Atalla, *The structures of cellulose: Characterization of the Solid State*, **1987**.
- [7] J. Sugiyama, R. Vuong, H. Chanzy, *Macromolecules* **1991**, 24, 4168-4175.
- [8] A. A. Baker, W. Helbert, J. Sugiyama, M. J. Miles, *Biophysical Journal* **2000**, 79, 1139-1145.
- [9] R. D. Gilbert, *Preparation of high strength/high modulus regenerated cellulose fibres*, **1994**.
- [10] H. Krässig, *Cellulose Structure, Accessibility and Reactivity*, **1993**.
- [11] T. Heinze, U. Erler, I. Nehls, D. Klemm, *Angew. Makromol. Chem.* **1994**, 215, 93-106.
- [12] B. R. Harkness, D. G. Gray, *Macromolecules* **1990**, 23, 1452-1457.
- [13] W. M. Hearon, G. D. Hiatt, C. R. Fordyce, *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, 65, 2449-2452.
- [14] J. W. Green, *Triphenylmethyl Ethers*, **1963**.
- [15] H. Herlinger, M. Hengstberger, *Lenzinger Berichte* **1985**, 59, 96-104.
- [16] H. Schleicher, *Papier* **1984**, 38, 589-595.
- [17] W. Koch, H. Herlinger, *Textilpraxis internat.* **1964**, 902-910.
- [18] W. Mormann, T. Wagner, *Silylierung von Cellulose. Eine realistische Alternative als Zugang zu Cellulosederivaten?*, Vch, **1996**.
- [19] S. W. Choi, *Shaker Verlag, Universität Karlsruhe* **1998**.

-
- [20] H. Chanzy, P. Noe, M. Paillet, P. Smith, *J. Appl. Polym. Sci. ,Appl. Polym. Symp.* **1983**, 37, 239-259.
- [21] I. N. Gonobolev, G. A. Petropavlovskij, *Lenz. Beit. fafn* **1981**, 18, 293-296.
- [22] D. Klemm, *persönliche Mitteilung* **1989**.
- [23] G. A. Petropavlovskii, A. M. Bocek, V. M. Sek, *Chimija dredesing* **1987**, 2.
- [24] A. El-Kafrawy, *J. Appl. Polym. Sci.* **1982**, 27, 2435-2443.
- [25] G. Conio, P. Corazza, E. Bianchi, A. Tealdi, A. Cifferi, *J. Polym. Sci. ,Polym. Lett.* **1984**, 22, 273-277.
- [26] C. L. McCormick, P. A. Callais, B. H. Hutchinson, jr, *Macromolecules* **1985**, 18, 2394-2401.
- [27] T. R. Dawsey, *Applications and limitations of LiCl/N,N-dimethylacetamide in the homogeneous derivatization of cellulose*, Carl Hanser Verlag, **1994**.
- [28] T. Heinze, R. Dicke, A. Koschella, A. H. Kull, E.-A. Klohr, W. Koch, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, 201, 627-631.
- [29] P. Klüfers, W. Burchard, N. Habermann, B. Seger, U. Wilhelm, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 936-939.
- [30] K. F. Gadd, *Polym.* **1982**, 23, 1867-1869.
- [31] G. Jayme, W. Verburg, **1954**, 32, 193.
- [32] K. Götze, **1967**, 1-778.
- [33] D. Klemm, A. Stein, *J. M. S. - Pure Appl. Chem.* **1995**, A32, 899-904.
- [34] R. Dönges, *Papier* **1997**, 12, 653-660.
- [35] W.-M. Kulicke, A. H. Kull, W. Kull, H. Thielking, J. Engelhardt, J.-B. Pannek, *Polymer* **1996**, 37, 2723-2731.
- [36] F. F. L. Ho, D. W. Klosiewicz, *Anal. Chem.* **1980**, 52, 913-916.
- [37] G. Wenz, P. Liepold, N. Bordeanu, *Macromol. Symp.* **2004**, 210, 203-208.
- [38] G. Wenz, P. Liepold, N. Bordeanu, *Cellulose* **2005**, 12, 85-96.
- [39] D. Klemm, T. Heinze, B. Philipp, W. Wagenknecht, *Acta Polymer.* **1997**, 48, 277-297.
- [40] T. Heinze, K. Röttig, *Macromol. Rapid Commun.* **1994**, 15, 311-317.
- [41] D. G. Gray, T. Kondo, *Carbohydr. Res.* **1991**, 220, 173-183.
- [42] T. Kondo, *Carbohydr. Res.* **1993**, 238, 231-240.
- [43] E. Husemann, R. Resz, *Bericht aus dem Inst. f. makromol. Chem. der Uni. Freiburg* **1961**, 172-194.

- [44] W. Wagenknecht, I. Nehls, A. Stein, D. Klemm, B. Philipp, *Acta Polym.* **1992**, 43, 266-269.
- [45] F. Liu, X. Yu, S. Li, *J. Polym. Sci. : Part A: Polymer Chemistry* **1993**, 31, 3245.
- [46] S. Suto, *J. Polym. Sci. , Polym. Phys.* **1984**, 22, 637-646.
- [47] E. Heuser, M. Heath, W. H. Shochley, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 670-674.
- [48] T. Fujimoto, S. Takahashi, B. M. Barua, T. Miyamoto, H. Inagaki, *J. of Polymer Sciences* **1986**, 24, 2981-2993.
- [49] B. Philipp, D. Klemm, *Papier. If. Papier* **1995**, 3-7.
- [50] U. Schuldt, B. Philipp, D. Klemm, H. Jancke, I. Nehls, *Das Papier* **1994**, 3-17.
- [51] J. A. Camacho Gómez, U. W. Erler, D. Klemm, *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, 197, 953-964.
- [52] B. Harkness, D. Gray, *Polym. Preprints* **1990**, 31, 644.
- [53] B. R. Harkness, D. G. Gray, *Canadian Journal of Chemistry* **1990**, 68, 1135-1139.
- [54] B. R. Harkness, D. G. Gray, *Polym. Prep. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **1990**, 31, 644-645.
- [55] T. Kondo, D. G. Gray, *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, 45, 417-423.
- [56] U. Erler, D. Klemm, *Makromol. Chem. , Rapid Commun.* **1992**, 13, 195-201.
- [57] B. Philipp, D. Klemm, A. Stein, *Papier* **1995**, 102-108.
- [58] D. Horton, E. Luetzow, O. Theander, *Carbohydr. Res.* **1973**, 26, 1-19.
- [59] L. H. Dubois, G. R. Nuzzo, *Annu. Rev. Chem.* **1992**, 43, 437 - 463.
- [60] G. Wenz, D. F. Petri, S. W. Choi, in *Chem. Abstr.* 130, 183895, Universität Karlsruhe, USA, **2001**, p. 1.
- [61] K. Kamide, M. Saito, *Macromol. Chem. , Rapid Commun.* **1983**, 4, 33-39.
- [62] T. Kawaguchi, *Thin Solid Film* **1985**, 133, 29-38.
- [63] T. Kawaguchi, H. Nakahara, K. Fukuda, *J. Colloid & Interface Sci.* **1985**, 104, 290-293.
- [64] G. Gabrielli, P. Baglioni, *Journal of Colloid and Interface Science* **1980**, 73, 582-587.
- [65] G. Wegner, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1991**, 95, 1326-1333.
- [66] M. Schaub, C. Fakirov, A. Schmidt, G. Lieser, G. Wenz, G. Wegner, P. A. Albouy, H. Wu, M. D. Foster, C. Majrzkak, S. Satija, *Macromolecules* **1995**, 28, 1221-1228.

-
- [67] M. Schaub, G. Wenz, G. Wegner, A. Stein, D. Klemm, *Adv. Mater.* **1993**, *12*, 919-921.
- [68] M. Schulze, M. Seufert, C. Fakirov, H. Tebbe, V. Buchholz, G. Wegner, *Macromolecular Symposia* **1997**, *120*, 237-245.
- [69] S. Schwiegk, T. Vahlenkamp, Y. Xu, G. Wegner, *Macromolecules* **1992**, *25*, 2513-2525.
- [70] M. Schaub, K. Mathauer, S. Schwiegk, P. A. Albouy, G. Wenz, G. Wegner, *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 397-400.
- [71] Y. Lvov, G. Decher, H. Möhwald, *Langmuir* **1993**, *9*, 481-486.
- [72] G. Decher, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 9, Pergamon Press, Oxford, **1996**, pp. 507-528.
- [73] G. Decher, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, **1996**.
- [74] G. Decher, B. Lehr, K. Lowack, Y. Lvov, J. Schmitt, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 677-684.
- [75] H. Kern, *Shaker Verlag* **2000**.
- [76] J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*.
- [77] L. Netzer, J. Sagiv, *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 674.
- [78] R. Maoz, J. Sagiv, *J. Colloid Interf. Sci.* **1984**, *100*, 465.
- [79] R. Maoz, J. Sagiv, *Langmuir* **1987**, *3*, 1045.
- [80] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *Langmuir* **1985**, *1*, 45.
- [81] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *Langmuir* **1985**, *1*, 52.
- [82] G. M. Whitesides, S. R. Wassermann, Y.-T. Tao, *Langmuir* **1989**, *5*, 1074.
- [83] S. R. Wassermann, G. M. Whitesides, I. M. Tidswell, B. M. Ocko, P. S. Pershan, J. D. Axe, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 5852.
- [84] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* **1989**, *4*, 110.
- [85] T. Kowalik, H.-J. Adler, A. Plagge, M. Stratmann, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *15*, 2064-2069.
- [86] E. Jaehne, T. Kowalik, H.-J. Adler, A. Plagge, M. Stratmann, *Macromol. Symp.* **2002**, *177*, 97-109.
- [87] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481-4483.
- [88] R. G. Nuzzo, F. A. Fusco, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2358-2368.

-
- [89] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 321-335.
- [90] G. M. Whitesides, P. E. Laibinis, R. G. Nuzzo, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 5097-5105.
- [91] C.-J. Zhong, M. D. Porter, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 11616-11617.
- [92] H. Takiguchi, K. Sato, T. Ishida, K. Abe, K. Yase, K. Tamada, *Langmuir* **2000**, *16*, 1703-1710.
- [93] M. W. J. Beulen, B.-H. Huisman, P. A. van der Heijden, F. C. J. M. van Veggel, M. G. Simons, E. M. E. F. Biemond, P. J. de Lange, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **1996**, *12*, 6170-6172.
- [94] G. Nelles, *Dissertation, Universität Mainz* **1995**.
- [95] G. Nelles, M. Weisser, R. Back, P. Wohlfart, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5039-5046.
- [96] M. Weisser, G. Nelles, P. Wohlfart, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17893-17900.
- [97] M. W. J. Beulen, J. Bügler, B. Lammerink, F. A. J. Geurts, E. M. E. F. Biemond, K. G. C. van Leerdam, F. C. J. M. van Veggel, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **1998**, *14*, 6424-6429.
- [98] M. W. J. Beulen, J. Bugler, M. R. De Jong, B. Lammerink, J. Huskens, H. Schonherr, G. J. Vancso, B. A. Boukamp, H. Wieder, A. Ofenhauser, W. Knoll, F. C. J. M. Van Veggel, D. N. Reinhoudt, *J. Chem. Eur.* **2000**, *6*, No.7, 1176-1183.
- [99] C. Erdelen, L. Häussling, R. Naumann, H. Ringsdorf, H. Wolf, J. Yang, M. Liley, J. Spinke, W. Knoll, *Langmuir* **1994**, *10*, 1246-1250.
- [100] G. Wenz, S. Choi, M. Bruns, T. Schimmel, H. Beyer, D. F. Siqueira Petri, *Polymer* **1999**, *40*, 1593-1601.
- [101] S. Busse, M. DePaoli, G. Wenz, S. Mittler, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2001**, *80*, 116-124.
- [102] P. Liepold, **2001**.
- [103] F. W. Scheller, F. Schubert, *Birkhäuser-Verlag, Basel, Schweiz* **1989**.
- [104] K. R. Roger, A. Mulchandani, *Humana Press, Totowa, New Jersey, USA* **1998**.
- [105] E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch.* **1968**, *23a*, 2135.

-
- [106] E. Kretschmann, *Z. Physik* **1971**, 241, 313-324.
- [107] C. R. Graham, D. Leslie, D. J. Squirell, *Biosens. Bioelectron.* **1992**, 7, 487-493.
- [108] A. Brecht, G. Gauglitz, *Frontiers in Biosensorics* **1997**, 2: Applications.
- [109] F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2043-2049.
- [110] K. Ijro, H. Ringsdorf, E. Birch-Hirschfeld, S. Hoffmann, U. Schilken, M. Strube, *Langmuir* **1998**, 14, 2796.
- [111] S. Yao, K. Chen, F. Zhu, D. Shen, L. Ne, *Anal. Chim. Acta* **1994**, 287, 65-73.
- [112] W. Welsch, C. Klein, M. von Schickfus, S. Hunklinger, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2000-2004.
- [113] A. P. Abel, M. G. Weller, G. L. Duveneck, M. Ehrat, H. M. Widmer, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2905-2912.
- [114] J. Janata, A. Bezegh, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 62.
- [115] M. Stiene, *Dissertation, TU Braunschweig* **1997**.
- [116] F. W. Scheller, F. F. Bier, D. Pfeiffer, *Technisches Messen* **1995**, 62, 213.
- [117] S. Löfas, B. Johnsson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1526-1528.
- [118] B. Johnsson, S. Löfas, G. Lindquist, *Analytical Biochemistry* **1991**, 198, 268-277.
- [119] B. Johnsson, S. Löfas, G. Lindquist, A. Edström, R.-M. Müller Hillgren, A. Hansson, *J. of Molecular Recognition* **1995**, 8, 125-131.
- [120] P. D. George, R. French, M. Glennies, *J. Immunol. Methods* **1995**, 183.
- [121] P. D. Gershon, S. Khilko, *J. Immunol. Methods* **1995**, 183, 65.
- [122] P. Berlin, R. Rieseler, J. Tiller, D. Klemm, *Das Papier* **1998**, 12, 737-742.
- [123] J. Tiller, P. Berlin, D. Klemm, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, 1, 1-9.
- [124] P. Berlin, D. Klemm, J. Tiller, R. Rieseler, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, 15, 2070-2082.
- [125] J. Tiller, R. Rieseler, P. Berlin, D. Klemm, *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1021-1029.
- [126] P. Berlin, D. Klemm, A. Jung, H. Liebegott, R. Rieseler, J. Tiller, *Cellulose* **2003**, 10, 343-367.
- [127] G. Hermanson, A. Mallia, P. Smith, *Academic Press, INC. San Diego* **1992**.
- [128] R. G. Nuzzo, P. E. Laibinis, D. L. Allara, G. M. Whitesides, Y. T. Tao, A. N. Parikh, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7152-7167.

- [129] P. E. Laibinis, C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 7017-7021.
- [130] J. Lukkari, M. Meretoja, I. Kartio, K. Laajalehto, M. Rajamäki, M. Lindström, J. Kankare, *Langmuir* **1999**, *15*, 3529-3537.
- [131] C. Jung, O. Dannenberger, Y. Xu, M. Buck, M. Grunze, *Langmuir* **1998**, *14*, 1103-1107.
- [132] T. Tashiro, Y. Shimura, *J. of Applied Polymer Science* **1982**, *27*, 747.
- [133] K. Furuhata, K. Koganei, H. Chang, A. Nobuyoshi, M. Sakamoto, *Carbohydr. Res.* **1992**, *230*, 165-177.
- [134] K. Rahn, Dissertation thesis, Friedrich-Schiller-Universität (Jena), **1997**.
- [135] T. Heinze, *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, *199*, 2341-2364.
- [136] S. Choi, H. Lauer, G. Wenz, M. Bruns, D. F. S. Petri, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2000**, *11*, 11-15.
- [137] K. Rahn, M. Diamantoglou, D. Klemm, H. Berghmans, T. Heinze, *Angew. Makromol. Chem.* **1996**, *238*, 143-163.
- [138] K. Chmurski, D. J., *Tetrahedr. Lett.* **1997**, *38*, 7365-7368.
- [139] A. I. Usov, R. G. Krylova, F. R. Suleimanova, *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* **1975**, 2009.
- [140] M. Sakamoto, H. Tseng, K. Furuhata, *Carbohydr. Res.* **1994**, *265*, 271-280.
- [141] A. Baar, W.-M. Kulicke, *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195*, 1483-1492.
- [142] P. W. Arisz, H. J. J. Kauw, J. J. Boon, *Carbohydrate Research* **1995**, *271*, 1-14.
- [143] A. S. Perlin, B. Casu, *Tetrahedron Letters* **1969**, 2921-2924.
- [144] K. Kamide, K. Yasuda, K. Okajima, *Polymer Journal* **1988**, *20*, 259-268.
- [145] J. F. Phillips, G. O. Williams, P. A. Kennedy, *Ellis Horwood Ltd, Chichester, England* **1989**.
- [146] R. E. A. V. Axen, J. O. Porath, P. J. E. Carlsson, in *Chem. Abstr.* *84*, 151744, Exploaterings AB T.B.F., De, **1975**, p. 57 pp.
- [147] K. Vollhardt, N. Schore, *VCH* **1989**.
- [148] F. Micheel, J. Ewers, *Makromolekulare Chemie* **1949**, *3*, 200-209.
- [149] J. Turkova, J. Vajcnev, D. Vancurova, J. Stamberg, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1979**, *44*, 3411.
- [150] F. Dan, S. Dumitriu, M. Popa, V. Artenie, *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *34*, 283-290.

- [151] S. R. Haseley, F. G. Vliegthart, *Topics in Current Chemistry* **2002**, 218, 93-114.
- [152] M. Kobayashi, S. Yanagihara, T. Kitae, E. Ichishima, *Agric. Biol. Chem.* **1989**, 53, 2211-2216.
- [153] K. Nilson, K. Mosbach, *Methods in Enzymology* (K. Mosbach, ed.), Academic Press, Orlando, FL **1987**, 135, Part B, 65.
- [154] E. Maekawa, T. Koshijima, *Cellulose Chem. Technol.* **1984**, 18, 31.
- [155] E. Maekawa, T. Kosaki, T. Koshijima, *Wood Res.* **1986**, 73, 44.
- [156] M. Schnabelrauch, T. Heinze, D. Klemm, *Acta Polym.* **1990**, 41, 112-120.
- [157] P. Gemeiner, M. Benes, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1983**, 48, 267-278.
- [158] O. Kinstlers, M. Pormale, *Khim. Drev.* **1976**, 24.
- [159] S. Dumitriu, M. Popa, C. Beldie, *Makromol. Chemie, Macromol. Symp.* **1988**, 19, 313.
- [160] M. Hartmann, G. Geschwend, D. Klemm, *Z. Chemie* **1982**, 22, 176.
- [161] D. Klemm, G. Geschwend, M. Hartmann, *Acta Polymerica* **1984**, 35, 176.
- [162] V. Stefuca, P. Gemeiner, V. Bales, *Enzym. Microbiol. Technol.* **1988**, 10, 306.
- [163] L. Reichelt, S. Poller, *Acta Polymerica* **1981**, 32, 172.
- [164] P. Gemeiner, A. Breier, *Biotechnol. Bioeng* **1982**, 24, 2573.
- [165] L. F. Chen, G. T. Tsao, *Biotechnol. Bioeng* **1976**, 18, 1507.
- [166] L. F. Chen, G. T. Tsao, *Biotechnol. Bioeng* **1977**, 19, 1463.
- [167] M. Przybył, H. Sugier, *Starch / Stärke* **1988**, 40, 275.
- [168] S. Hasegaza, R. Uenoyama, F. Takeda, H. Chuma, S. Baba, F. Kamaiyama, M. Iwakawa, M. Fushimi, *J. Chromatography* **1983**, 278, 25.
- [169] P. Ferruti, M. C. Tanzi, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **1986**, 2, 175.
- [170] P. Henklein, M. Becker, W. Büttner, C. Rupprich, F. Loth, H. Dautzenberg, *DD-Pat.* **1983**, 219490, 220969.
- [171] A. F. S. A. Habbeb, *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, 119, 264.
- [172] J. J. Linko, R. Viskari, L. Pohjola, P. Linko, *Enzym. Eng.* **1978**, 345.
- [173] J. J. Linko, R. Viskari, L. Pohjola, P. Linko, *C. A.* **1980**, 93, 93741 d.
- [174] G. Kay, E. M. Crook, *Nature (London)* **1967**, 216, 514.
- [175] G. Kay, M. D. Lilly, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, 198, 276-285.
- [176] W. B. Okita, D. B. Bonham, J. L. Gainer, *Biotechnol. Bioeng* **1985**, 27, 632.

- [177] W. Schössler, H. F. Boeden, M. Holtzhauer, F. Loth, F. Hiepe, D. Bertram, R. Müller, D. Konjuchowa, *DD-Pat.* **1986**, 256721.
- [178] T. T. Ngo, *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* **1988**, 17, 229-239.
- [179] M. T. W. Hearn, *Methods in Enzymology* (K. Mosbach, ed.), Academic Press, Orlando, FL **1987**, 135, Part B, 102.
- [180] M. A. Krysteva, P. M. Grigorova, *Enzym. Microbiol. Technol.* **1987**, 9, 538.
- [181] N. Seewald, H. D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag **2002**.
- [182] H. D. Jakubke, *Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verlag.* **1996**.
- [183] J. K. Inman, H. M. Dintzis, *Biochemistry* **1969**, 8, 4074.
- [184] P. O. Weston, S. Avrameas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, 45, 1574.
- [185] T. Ternynck, S. Avrameas, *FEBS Lett.* **1972**, 23, 24.
- [186] J. Bergström, S. Löfas, B. Johnsson, *United States Patent* 5,436,161 **1995**.
- [187] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, Spektrum akad. Verlag 2003, 2 aktualisierte und erweiterte Auflage.
- [188] R. G. Nuzzo, B. R. Zegarski, L. H. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 733.
- [189] G. Nelles, H. Schoenherr, G. J. Vancso, H. J. Butt, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process. A66* **1998**, 1261.
- [190] G. Nelles, H. Schönherr, M. Jaschke, H. Wolf, M. Schaub, J. Küther, W. Tremel, E. Bamberg, H. Ringsdorf, H. J. Butt, *Langmuir* **1998**, 14, 808-815.
- [191] V. Chechik, H. Schoenherr, G. J. Vancso, C. J. M. Stirling, **1998**, 14, 3003.
- [192] C. J. M. Stirling, R. Crooks, V. Chechik, *Advanced Materials* **2000**, 12, 1161-1171.
- [193] M. W. J. Beulen, M. I. Kastenbergh, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **1998**, 14, 7463.
- [194] G. Nelles, M. Weisser, R. Back, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *Supramol. Science* **1994**, in Vorbereitung.
- [195] M. Weisser, G. Nelles, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *Sensors and Actuators B* **1997**, 38-39, 58-67.
- [196] R. A. Dluhy, *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 1373.
- [197] T. Arnd, **1988**.
- [198] R. Schwarz, **1994**.

-
- [199] H. Kuzmany, Springer Verlag Berlin **1989**.
- [200] N. K. Roberts, Springer Verlag Berlin **1992**, *23: Surface Analysis Methods in Materials Science*.
- [201] R. G. Greenler, *J.Chem. Phys.* **1966**, *44*, 310-335.
- [202] S. D. Evans, K. E. Goppert-Berarducci, E. Urankar, L. J. Gerenser, A. Ulman, R. G. Snyder, *Langmuir* **1991**, *7*.
- [203] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York **1987**.
- [204] J. Spinke, Diplomarbeit, **1992**.
- [205] B. Fischer, **1989**.
- [206] E. F. Aust, M. Sawodny, S. Ito, W. Knoll, *TRIP* **1994**, *2*, 313.
- [207] W. Knoll, *Makromol. Chem.* **1991**, *192*, 2827.
- [208] E. Yeatman, *Biosensor & Bioelectronics* **1996**, *11*, 635.
- [209] J. Sambles, G. Bradery, F. Yang, *Contemporary Physics* **1991**, *32*, 173.
- [210] T. Liebermann, *Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **1999**.
- [211] W. Knoll, M. Zizlsperger, T. Liebermann, S. Arnold, A. Badia, M. Liley, D. Piscevic, F. J. Schmitt, J. Spinke, *Colloid. Surf. A.* **2000**, *161*, 115-137.
- [212] S. Michielsen, *Brandrup J. Immergut, E. H. and Grulke E. A., Polymer Handbook. J. Wiley & Sons, New York* **1999**, VII/500.
- [213] H. Distler, *Angewandte Chemie, International Edition in English* **1967**, *6*, 544-553.
- [214] D. S. Iyengar, S. Rajaram, K. Purushothama Chary, *Synthetic Communications* **2000**, *30*, 3905.
- [215] G. M. Whitesides, J. Moran, J. C. Butler, J. A. Burns, *J. Org. Chem* **1991**, *56*, 2648.
- [216] H. J. Bard, L. R. Faulkner, *John Wiley & Sons, Inc., New York* **1980**.
- [217] J. Heinze, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 823-840.
- [218] S. E. Group, *Halsted Press: a Division of John Wiley, New York* **1985**.
- [219] S. Tamagaki, K. Fukuda, H. Sumita, W. Tagaki, *Chem. Express* **1991**, *6*, 695-698.
- [220] K. Odashima, M. Kotato, M. Sugawara, Y. Umezawa, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 927-936.
- [221] Y. Maeda, H. Kitano, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 487-488.
- [222] M. T. Rojas, R. Königer, J. F. Stoddart, A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 336-343.

- [223] R. W. Murray, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 135-141.
- [224] C. Miller, M. Grätzel, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5225-5233.
- [225] E. Sabatani, J. Cohem-Boulakia, M. Bruening, R. I., *Langmuir* **1993**, *9*.
- [226] M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559-3568.
- [227] R. J. Forster, *Chem. Soc. Rev.* **1994**, 289-297.
- [228] J. Lang, *Dissertation, Universität des Saarlandes* **1981**.
- [229] B. A. Boukamp, *Faculty of Chemical Technology, University of Twente* **1993**.
- [230] H. Göhr, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 274-280.
- [231] G. J. Brug, A. L. G. Van Den Eeden, M. Sluyters-Rehbach, J. H. Sluyters, *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *176*, 275-295.
- [232] N. Merl, **1991**.
- [233] B. A. Boukamp, *Solid State Ionics* **1986**, *20*, 31-34.
- [234] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265-322.
- [235] E. Sabatani, I. Rubinstein, R. Maoz, J. Sagiv, *J. Electroanal. Chem* **1987**, *219*, 365-371.
- [236] K. Bandyopadhyay, K. Vijayamohanan, G. S. Shekhawat, R. P. Gupta, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *447*, 11-16.
- [237] P. S. Mukherjee, *Polymer / Polymer Commun.* **1984**, *25*, 382.
- [238] A. Ulman, *Academic Press, San Diego* **1991**.
- [239] D. F. S. Petri, G. Wenz, P. Schunk, T. Schimmel, *Langmuir* **1999**, *15*, 4520-4523.
- [240] N. Tillman, A. Ulman, T. L. Penner, *Langmuir* **1989**, *5*, 101.
- [241] W. Karthe, R. Müller, *Akad. Verlagsges. Geest & Portig, Leipzig* **1991**.
- [242] N. Fabricius, G. Gauglitz, J. Ingenhoff, *Sensors and Actuators B* **1992**, *7*, 672.
- [243] D. Clerc, W. Lukosz, *Sensors and Actuators B* **1994**, *18-19*, 581.
- [244] R. S. Majerle, C. M. Bambenek, J. A. Rice, **1998**, 690.
- [245] E. P. Plueddemann, *Plenum Press, London*.
- [246] H.-U. G. Weier, M. Wang, J. C. Mullikin, Y. Zhu, J.-F. Cheng, K. M. Greulich, A. Bensimon, J. W. Gray, *Human Molecular Genetics* **1995**, *4*, 1903.
- [247] A. J. Schouten, R. H. Wieringa, *Macromolecules* **1996**, *29*, 3032-3034.
- [248] A. Heise, H. Menzel, H. Yim, M. D. Foster, R. H. Wieringa, A. J. Schouten, V. Erb, M. Stamm, *Langmuir* **1997**, *13*, 723-728.

-
- [249] M. Burghard, G. Duesberg, G. Philipp, J. Muster, S. Roth, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 584-588.
- [250] G. Wenz, B. Keller, L. P. Meier, M. Heule, W. R. Caseri, R. A. Shelden, U. W. Suter, *Macromolecules* **1996**, *29*, 718.
- [251] E.-L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science* **1994**, *264*, 415-417.
- [252] P. Wagner, *FEBS Lett.* **1998**, *430*, 112-115.
- [253] Y. Lo, N. D. Huefner, W. S. Chan, F. Stevens, J. M. Harris, T. P. Beebe, *Langmuir* **1999**, *15*, 1373-1382.
- [254] C. Yuan, A. Chen, P. Kolb, M. V. T., *Biochemistry* **2000**, *39*, 10219-10223.
- [255] M. Micic, A. Chen, V. T. Moy, *Scanning* **1999**, *21*, 394-397.
- [256] I. Haller, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 8050-8055.
- [257] E. Angeletti, C. Canepa, G. Martinetti, P. Venturello, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1989**, 107-108.
- [258] Y. L. Lyubchenko, B. L. Jacobs, S. M. Lindsay, *Nucleic Acids Research* **1992**, *20*, 3983-3986.
- [259] D. J. Dunaway, L. McCarley, *Langmuir* **1994**, *10*, 3598-3606.
- [260] V. Burtman, A. Zelichenok, S. Yitzchaik, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2078-2082.
- [261] R. J. Colton, A. Engel, J. E. Frommer, H. E. Gaub, A. A. Gewirth, R. Guckenberger, J. Rabe, W. M. Heckl, B. Parkinson, *Procedures in Scanning Probe Microscopies*, J. Wiley & Sons Weinheim.
- [262] R. Brown, B. Lounis, M. Orrit, *Europhysics News* **1997**, 174-179.
- [263] T. Förster, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen **1951**.
- [264] J. S. Ploem, H. J. Taube, *Oxford University Press* **1987**.
- [265] S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676-1683.
- [266] G. J. Schutz, M. Sonnleitner, P. Hinterdorfer, H. Schindler, *Mol. Membr. Biol.* **2000**, *17*, 17-29.
- [267] R. M. Azzam, N. M. Bashara, *Ellipsometry and Polarized Light*, North Holland Publication, **1979**.
- [268] D. Brune, R. Hellborg, H. J. Whitlow, O. Hunderi, in *Surface Characterization*, Wiley-VCH Weinheim, **1997**.
- [269] M. De Paoli, *Shaker Verlag, Universität Karlsruhe* **2000**.
- [270] H. G. Thompkins, *A user's guide to ellipsometry*, **1993**.
- [271] M. Malmsten, *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *166*, 333-342.

- [272] M. Malmsten, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **1995**, 3, 297-308.
- [273] T. H. Scheper, J. M. Hilmer, F. Lammers, C. Müller, M. Reinecke, *Journal of Chromatography A* **1996**, 725, 3-12.
- [274] M. Keusgen, *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 433-444.
- [275] A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson, Oxford University Press, Oxford **1987**.
- [276] J. Janata, *Principles of Chemical Sensors*, Plenum Press, New York **1989**.
- [277] E. A. H. Hall, *Open University Press, Cambridge* **1990**.
- [278] V. M. Mirsky, M. Riepl, O. S. Wolfbeis, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 977-989.
- [279] J. F. Place, R. M. Sutherland, C. Dähne, *Biosensors* **1985**, 1, 321-353.
- [280] O. S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta* **1991**, 250, 181-201.
- [281] O. S. Wolfbeis, G. E. Boide, G. Gauglitz, *In Sensors. A Comprehensive Survey. Vol. 2. Chemical and Biological Sensors. Part I*, ed. Göpel W., Hesse J., Zemel J. N.; VCH, Weinheim **1991**, 573-645.
- [282] A. Brecht, J. Piehler, G. Lang, G. Gauglitz, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 311, 289-299.
- [283] C. Lu, A. W. Czanderna, *Elsevier, Amsterdam* **1984**.
- [284] M. S. Nieuwenhuizen, A. Venema, *In Sensors. A Comprehensive Survey. Vol. 2. Chemical and Biological Sensors. Part I*, ed. Göpel W., Hesse J., Zemel J. N.; VCH, Weinheim **1991**, 573-645.
- [285] A. A. Suleiman, G. G. Guilbault, *In Handbook of Chemical and Biological Sensors*, ed. Taylor R. F. & Schultz J. S.; Institute of Physics, Bristol **1996**, 203-220.
- [286] G. A. Canziani, S. Klakamp, D. G. Myszka, *Analytical Biochemistry* **2004**, 325, 301-307.
- [287] P. Bataillard, F. Gardies, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, B. Colin, B. Mandrand, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2374-2379.
- [288] V. Billard, C. Martelet, P. Binder, J. Therasse, *Anal. Chim. Acta* **1991**, 249, 367-372.
- [289] V. M. Mirsky, M. Riepl, M. Mass, T. Hirsch, R. Schweiss, O. S. Wolfbeis, *Adv. Sci. Technol. (Faenza, Italy)* **1999**, 26, 441-448.
- [290] J. C. Pyun, H. H. Lee, C. S. Lee, *Sensors and Actuators B* **2001**, 78, 232-236.
- [291] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, 3. Auflage Weinheim: VCH **1995**.

- [292] C. P. Price, D. J. Newman, Second Edition, Stockton Press, New York **1997**.
- [293] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Protein Eng.* **1999**, 12, 439.
- [294] C. J. van Oss, *Molec. Immunol* **1995**, 32, 199-211.
- [295] D. Mirejovski, E. M. Arnett, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 1112-1117.
- [296] C. J. van Oss, *Immunochemistry, Marcel Dekker, New York* **1994**, 581-614.
- [297] T. J. Peters, *Academic Press, San Diego, CA* **1996**.
- [298] D. P. Nelson, W. R. Griswold, *J. Clin. Lab. Immunol.* **1986**, 21, 101-106.
- [299] I. H. Silman, E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.* **1966**, 35, 873.
- [300] A. M. Klibanov, *Science* **1983**, 219, 722.
- [301] O. Ariga, M. Kato, T. Sano, Y. Nakazawa, Y. Sano, *J. Ferment. Bioeng.* **1993**, 76, 203.
- [302] A. L. Crumbliss, J. G. Stonehuerner, R. W. Henkens, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, 8, 331.
- [303] S. V. Klinov, N. P. Sugrobova, B. T. Kurganov, *Molec. Biol. (Moskow)* **1979**, 13, 55.
- [304] C. Huitron, J. Limon-Lason, *Biotechnol. Bioeng* **1978**, 20, 1377.
- [305] S. W. Carleysmith, P. Dunnill, M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng* **1980**, 22, 735.
- [306] J. Lasch, R. Koelsch, *Eur. J. Biochem* **1978**, 82, 101.
- [307] J. Kohn, J. Wilchek, *FEBS Lett.* **1984**, 154, 209.
- [308] H. Kise, A. Hayakawa, H. Noritomi, *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, 13, 584.
- [309] C. Mannhalter, *Sensors and Actuators B* **1993**, 11, 273-279.
- [310] J. R. Wykes, P. Dunnill, M. D. Lilly, *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 250, 522-529.
- [311] G. Vergand, T. B. Christensen, *Biotechnol. Bioeng.* **1975**, 17, 1391-1397.
- [312] R. Ohba, T. Shibata, S. Ueda, *J. Ferment. Technol.* **1979**, 57, 146-150.
- [313] P. Gemeiner, *Biotechnol. Bioeng.* **1982**, 24, 2573-2582.
- [314] J. Woodward, *In: Woodward J. (ed.) Immobilized Cells and Enzymes- a Practical Approach.* IRL Press Limited, Oxford, England **1985**, 3-17.
- [315] W. Göpel, T. A. Jones, M. Kleitz, J. Lundström, T. Seiyaame, *In: Göpel W., Hesse J. and Zemel J. N. (eds.), Sensors - A Comprehensive Survey.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany **1992**, 3.
- [316] J. C. Pyun, A. S. Jang, J. S. Park, *Enzym. Microbiol. Technol.* **1996**, 18, 41-44.

-
- [317] D. Braun, B. Meuret, *Das Papier* **1989**, 43, 688-693.
- [318] T. Tsuchida, K. Yoda, *Clin. Chem.* **1983**, 29, 51-55.
- [319] K. G. I. Nilsson, C. F. Mandenius, *Biotechnology* **1994**, 12, 1376-1378.
- [320] F. Palmisano, A. de Santis, G. Tantillo, T. Volocella, P. G. Zambonin, *Analyst* **1997**, 122, 1125-1128.
- [321] J. E. Frew, H. A. O. Hill, *Anal. Chem.* **1987 a**, 59, A933.
- [322] J. E. Frew, H. A. O. Hill, *Phil. Trans. R. Soc. London B* **1987 b**, 316, 95-106.
- [323] M. L. Fultz, R. A. Durst, *Anal. Chim. Acta* **1982**, 140, 1-18.
- [324] M. N. Gupta, *Biotechnol. Appl. Biochem* **1991**, 14, 1-11.
- [325] W. H. Scouten, *In: Mosbach K. V. (ed.), Methods in Enzymology*. Academic Pres INC, San Diego, USA **1987**.
- [326] G. G. Guilbault, N. G. Olivera, *In: Woodward J. (ed.) Immobilized Cells and Enzymes- a Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford, England **1985**, 55-74.
- [327] M. P. J. Kierstan, Coughlan, *In: Woodward J. (ed.) Immobilized Cells and Enzymes- a Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford, England **1985**, 39-48.
- [328] H. E. Klei, D. W. Sundstrom, D. Shim, *In: Woodward J. (ed.) Immobilized Cells and Enzymes- a Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford, England **1985**, 49-54.
- [329] C. I. Simionescu, S. Dimitriu, M. I. Popa, L. Denisova, *Makromol. Chem. Suppl.* **1985**, 9, 179-187.
- [330] H. Kaboli, P. J. Reilly, *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, 22, 1055.
- [331] D. H. Campbell, E. Luescher, L. S. Lerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, 37, 575.
- [332] R. Axen, S. Ernback, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 18, 351.
- [333] A. V. Barmin, A. V. Eremenko, A. A. Sokolovskij, S. F. Chernov, I. N. Kurochkin, *Biotechnol. Appl. Biochem* **1993**, 18, 369-376.
- [334] J.-r. Li, Y.-k. Du, P. Boullanger, L. Jiang, *Thin Solid Films* **1999**, 352, 213-217.
- [335] M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos, *Nature Struct. Biol.* **1997**, 4, 1032-1038.
- [336] G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szoke, A. Henriksen, J. Hajdu, *Nature* **2002**, 417, 463-468.
- [337] K. G. Welinder, *FEBS Lett.* **1976**, 72, 19-23.

- [338] N. C. Veitch, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249-259.
- [339] R. H. Haschke, J. M. Friedhoff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 1039-1042.
- [340] P. D. Josephy, T. Eling, R. P. Mason, *The Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 3669-3675.
- [341] K. Monde, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 913-921.
- [342] R. Krieg, K.-J. Halbhuber, *Cellular Mol. Biol.* **2003**, *49*, 547-563.
- [343] O. Ryan, M. R. Smyth, C. O'Fagain, *In: Ballou, D. K. (ed.), Essays in Biochemistry*. Portland Press, London, UK **1994**, *28*, 129-146.
- [344] N. C. Veitch, A. T. Smith, *Adv. Inorg. Chem.* **2001**, *51*, 107-162.
- [345] L. K. Folkes, P. Wardman, *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 129-136.
- [346] O. Greco, S. Rossiter, C. Kanthou, L. K. Folkes, P. Wardman, G. M. Tozer, G. U. Dachs, *Mol. Cancer Therapeutics* **2001**, *1*, 151-160.
- [347] P. Wardman, *Current Pharmaceutical Design* **2002**, *8*, 1363-1374.
- [348] J. Borch, P. Roepstorff, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 5243-5248.
- [349] D. Hobara, Y. Uno, T. Kakiuki, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 3437-3441.
- [350] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger's Principles of Biochemistry*, Springer, New York **2001**.
- [351] C. J. Epstein, C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 2175.
- [352] M. D. Lilly, C. Money, W. E. Hornby, E. M. Crook, *Biochem. J.* **1965**, *95*, 45.
- [353] H. D. Brown, S. K. Chattopadhyay, A. Patel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *25*, 304.
- [354] W. E. Hornby, M. D. Lilly, E. M. Crook, *Biochem. J.* **1966**, *98*, 420.
- [355] T. Kobayashi, L. K. J., *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *302*, 1.
- [356] L. Goldstein, S. Blumberg, Y. Levin, M. Pecht, D. Atlas, *Biochemistry* **1970**, *9*, 2322.
- [357] J. Gryszkiewicz, *Folia Biol.* **1971**, *19*, 119.
- [358] L. N. Amankwa, K. Harder, F. Jirik, R. Aebersold, *Protein Science* **1995**, *4*, 113-125.
- [359] D. S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J. M. J. Frechet, *Journal of Proteome Research* **2002**, *1*, 563-568.
- [360] Y. Mechref, Z. El Rassi, *Electrophoresis* **1995**, *16*, 2164-2171.
- [361] Y. Yoshimoto, A. Shibukawa, H. Sasagawa, S. Nitta, T. Nakagawa, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1995**, *13*, 483-488.

-
- [362] J. Tiller, D. Klemm, P. Berlin, *Des. Monomers Polym.* **2001**, 4, 315-328.
- [363] S. A. Adediran, A. M. Lambeir, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186, 571.
- [364] P. Karlson, 14. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart **1994**.
- [365] K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook, Vol. 3.* VCH-Verlagsges., Weinheim, **2004**.
- [366] S. A. Zynio, A. V. Samoylov, E. R. Surovtseva, V. M. Mirsky, Y. M. Shirshov, *Sensors* **2002**, 2, 62-70.
- [367] D. W. Lynch, W. R. Hunter, in *Handbook of Optical Constants of Solids* (Ed.: E. D. Palik), Academic Press, San Diego, **1985**, pp. 286-295.
- [368] H. G. Tompkins, *Academic Press, INC. San Diego* **1993**.
- [369] T. Peters, *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 161.
- [370] H. Elwing, B. Ivarsson, I. Lundström, *Eur. J. Biochem.* **1986**, 156, 359.

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz, danke ich für die interessante Themenstellung, für die fachlichen Anregungen, seine stetige Interesse und Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Karin Jacobs (Experimentalphysik, UdS, Saarbrücken) möchte ich für die sehr nette Zusammenarbeit und für die Bereitstellung des Ellipsometers danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Hartmann (Experimentalphysik, UdS, Saarbrücken) für die Benutzung des Sputter-Gerätes und des AFMs bedanken.

Ein besonderer Dank gilt hier auch Herrn Prof. Wolfgang Knoll (MPI Polymerforschung, Mainz) für die Möglichkeit der Durchführung von SPR-Experimenten in seinem Arbeitskreis.

Bei Herrn Prof. Dr. Joachim Jose (jetzt Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Düsseldorf) möchte ich mich für die Enzyme und für seine Interesse und Diskussionsbereitschaft während unserer Kooperation bedanken.

Herrn PD Dr. Andreas Speicher danke ich für die anfänglich zur Verfügung gestellten Meerrettichperoxidase, die Hilfe bei der Durchführung des Assays und für die tolle Zeit im Grund- und Mediziner-Praktikum.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Wenz: Thomas Albusat, Tobias Bernard, Annegret Engelke, Jutta Ganz, Dr. Stefan Große, Dr. Mathias Großer, Ronny Heisel, Dr. Sandra Jost, Dr. Patrick Jost, Thomas Jung, Anja Kasten, Sang Doo Kim, Christoph Michel, Axel Müller, Katrin Ohliger, Dr. Sylvia Riedel, Carolin Thiele, Thomas Stöhr, Christian Strassnig und Philipp Wimmer danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und für die unvergesslichen Geburtstage die wir gemeinsam gefeiert haben.

Bei Annegret Engelke möchte ich mich für ihren unermüdlichen Einsatz beim Aufbau und Wartung der SPR- und FuSi-Anlage und für ihr Interesse an meiner Arbeit recht herzlich danken. Danke auch für die zahlreichen SPR-Messungen die meine Arbeit erleichtert haben.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Sang Doo Kim (jetzt Firma Samsung, Korea) für die elektrochemischen, SPR- und Kontaktwinkel-Messungen und für seine stetige Diskussionsbereitschaft bedanken. Herrn Dr. Jae-Chul Pyun (Human Engineering, KIST Europe GmbH) danke ich für die Bereitstellung der Geräte.

Besonders danke ich Axel Müller für seine ständige Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Tipps (vor allem im EDV-Bereich), die sehr sorgfältige und kritische Durchsicht dieser Arbeit und für seine ehrliche Freundschaft.

Dirk Rayer und Axel Müller danke ich für die schöne Zeit, die wir mit Wandern oder asiatischer Küche verbracht haben.

Jutta Ganz danke ich für den Aufbau der GPC-MALLS Anlage und für die Durchführung der GPC-Messungen.

Den Herrn Dr. Stefan Grosse und Dr. Josef Zapp (Institut für Pharmakognosie und Analytische Phytochemie) danke ich für die Messung der Cellulose NMR-Spektren. Bei Herrn Dr. Stefan Grosse möchte ich mich zusätzlich für die Hilfe bei der Bestimmung des Brechungsindex der Thiosulfat-CMC bedanken.

Dr. Mathias Große (Firma Magrochem) danke ich für die ESI-Massenspektren des MCT-Derivats.

Frau Dr. Sandra Jost danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die Unterstützung in biochemischen Fragestellungen. Vor allem die Optimierung der Immobilisierungsverfahren in FuSi-Kapillaren und die Bestimmung der immobilisierten Menge an Enzym haben meine Arbeit vorangebracht.

Eine große Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit waren die Vertiefungsstudenten Andreas Besslich, Katrin Ohliger und Thomas Stöhr. Bei Ihnen möchte ich mich für die schöne Zeit und vor allem für den unermüdlichen Einsatz bei der Synthese der Cellulosederivate bedanken.

Frau Gerti Radünz danke ich für die Hilfe bei administrativen Angelegenheiten; Joachim Kriesamer und Thomas Scherer für die professionelle technische Unterstützung und die Reparatur diverser Geräte (vor allem der SPR-Geräte).

Anthony Quinn, Renate Konrad und Hubert Mantz (Arbeitskreis Jacobs) danke ich besonders für die Ellipsometrie-Messungen und für die tolle Zusammenarbeit.

Andreas Englisch und Holger Bohn (Arbeitskreis Hartmann) danke ich fürs Sputtern und für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Cellulose-Schichten.

Einen besonderen Dank gilt auch Dr. Jing Liu (Arbeitskreis Knoll, MPI Polymerforschung, Mainz) für die Durchführung der SPR-Messungen an Silber, für seine stetige Diskussionsbereitschaft und für die schöne Zeit in Mainz.

Ein spezieller Dank gilt meiner gesamten Familie für die Unterstützung und ihrem Interesse an meiner Arbeit. Vor allem meiner allerliebsten Ehefrau danke ich für ihre unendliche Geduld, für die sehr wertvollen Tipps und ihre stetige Unterstützung und Interesse an meiner Arbeit.