

**Haftmechanismen von funktionalisierten magnetischen  
Kompositpartikeln in der Hochgradienten-  
Magnetseparation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFT (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte  
DISSERTATION

von  
Dipl.-Ing. Johannes Knoll  
aus Friedrichroda

Referent: Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl  
Korreferent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten  
Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2017



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -  
Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz  
(CC BY-NC-ND 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.de>

---

## Danksagung

Diese Arbeit entstand während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT).

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl für die Möglichkeit meine Arbeit am MVM schreiben zu können und für die Betreuung während meiner Zeit am MVM. Ich danke Ihnen für die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen und für die Möglichkeit an zahlreichen nationalen sowie internationalen Konferenzen teilzunehmen. Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Hans Guigas, Thomas Reutter, Wolf-Rainer Dammert sowie bei den Mitarbeitern der mechanischen und der elektrischen Werkstatt bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Planung, dem Bau und der Optimierung meiner Versuchsanlagen. Ohne sie wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen. Weiterhin bedanke ich mich bei Kerstin Bertsch, die mir bei der Bildauswertung mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des MVMs und besonders bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe für eine hervorragende Arbeitsatmosphäre. Neben den fachlichen Gesprächen und Diskussionen bleiben viele schöne Erinnerungen an gemeinsame Wanderseminare, Kletterausflüge, Grillabende und Institutsfeiern zu denen hoffentlich noch weitere gemeinsame Aktivitäten hinzukommen. Dank gilt auch meinen Studenten, die mich im Rahmen von Abschlussarbeiten und als HiWis unterstützt haben.

Meinen Eltern und meiner ganzen Familie danke ich für die Unterstützung während meiner Promotion und vor allem während meiner Studienzeit. Ein besonderer Dank gebührt meiner Lebensgefährtin Bianca Cornehl und unserem Töchterchen Finja, die mir beide unter anderem durch tolle Urlaube und Ausflüge immer wieder Kraft und vor allem gegen Ende der Promotion die notwendige Motivation für die Fertigstellung der Arbeit gaben.



---

## Zusammenfassung

Fortschritte in der Genetik und Mikrobiologie ermöglichen die Herstellung von biologischen Makromolekülen im großen Maßstab. Zu den Makromolekülen zählen dabei unter anderem Proteine. Die Proteinherstellung erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt produzieren Mikroorganismen das Produkt in einer Biosuspension. In dem anschließenden zweiten Schritt muss das Produkt von den übrigen Substanzen getrennt werden. Dabei treten zwei Schwierigkeiten auf. Zum einen liegt die Molekülgröße des Zielproteins im Nanometerbereich, sodass sie für klassische Filtrations- oder Zentrifugationsmethoden nicht zugänglich ist, zum anderen handelt es sich bei den Verunreinigungen zum Teil um andere biologische Makromoleküle, die jedoch ähnliche Eigenschaften haben wie das Produkt. Ein Ansatz zur Aufreinigung des Zielproteins aus der Fermentationsbrühe stellt die Hochgradienten-Magnetseparation dar. Dabei kommen produktspezifisch funktionalisierte magnetisierbare Partikel zum Einsatz. Die Partikel werden zu der Biosuspension hinzugegeben. Dort adsorbiert das Produkt an die Partikel. Anschließend wird die Biosuspension durch einen Magnetscheider gepumpt. In diesem bleiben die Partikel samt Produkt hängen und werden somit aus der Suspension getrennt. Die Abscheidung erfolgt aufgrund der Magnetkraft an der Magnetmatrix. Dort bildet sich ein Partikelhaufwerk aus. Aufgrund des direkten Kontakts der Partikel wirken zwischen den Partikeln zusätzlich zur Magnetkraft interpartikuläre Kräfte. Abhängig vom Magnetscheidertyp werden die Partikel mit oder ohne überlagertem Magnetfeld wieder von der Matrix getrennt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Untersuchung der Haftkräfte zwischen den Partikeln in einem Haufwerk. Die Messung der Haftkräfte zwischen den Partikeln und der Magnetmatrix war nicht direkt möglich. Anstelle der Magnetmatrix kamen dafür ebene Haftpartner, sogenannte Substrate, verschiedener Materialien zum Einsatz. Zu untersuchen war die oftmals getroffene Annahme, dass außer der Magnetkraft alle anderen Kräfte vernachlässigbar sind.

Für die Messung der Haftkraft zwischen den Partikeln und einem Substrat war die Zentrifugenmethode aus der Literatur bekannt. Der entsprechende Aufbau musste jedoch zunächst für die vorhandene Zentrifuge

entwickelt und die Methode etabliert werden. Bei der Zentrifugenmethode werden die Partikel mit dem Substrat in Kontakt gebracht und anschließend einem Zentrifugalfeld ausgesetzt. Im Verlauf der Messungen wurden die Drehzahl und damit die Zentrifugalkraft schrittweise erhöht. Eine Kamera, die an ein Mikroskop angeschlossen ist, nimmt Bilder des Substrats vor und nach jedem Zentrifugationsschritt auf. Durch einen Vergleich der Partikelanzahl vor und nach den einzelnen Zentrifugationsschritten ist die Haftkraftverteilung bestimmbar. Ein reales Partikelsystem weist durch Schwankungen in den Eigenschaften der einzelnen Partikel eine Haftkraftverteilung auf. Für die Messung der Partikel-Partikel-Haftkräfte musste die Methode angepasst werden. Als charakteristische Größe für die Wechselwirkungen diente die Höhe des Partikelhaufwerks im Zentrifugalfeld, wobei die Zentrifugalkraft der Haftkraft entgegen wirkte. Die eingesetzte Zentrifuge ermöglichte die Aufnahme der Haufwerkshöhe.

Bei dem Partikelhaufwerk handelt es sich um eine komplexe Kontaktsituation, in der unter anderen die van der Waals-Kraft, die Magnetkraft, hydrophatische Wechselwirkungen als auch elektrostatische Effekte einen Anteil an der Gesamthaftkraft haben. Um einzelne Kraftkomponenten und deren Einflussfaktoren untersuchen zu können, erfolgte zunächst eine Reduktion der Komplexität auf definierte Partikel-Substrat-Kontakte. Im ersten Schritt fanden Messungen mit magnetisierbaren, sphärischen Partikeln mit sehr enger Partikelgrößenverteilung statt. Der Fokus lag dabei auf der van der Waals-Kraft. In der Tat zeigten sich zunächst die bereits bekannten Einflüsse, dass die Haftkraft mit steigendem Partikelradius zunimmt und mit steigender Rauheit sehr stark abnimmt. Erfolgt die Messungen hingegen in einem Magnetfeld eines Permanentmagneten zeigte sich ein unerwartetes Verhalten. Der Anstieg der Haftkraft war größer als die aufgebrachte Magnetkraft. Verantwortlich sind vermutlich elastische Deformationen innerhalb der Kontaktzone, durch die die van der Waals-Kräfte gestärkt werden.

Im zweiten Schritt kamen acht Partikelsysteme zum Einsatz, die verschiedene Oberflächenfunktionalisierungen und damit Ladungsdichten aufwiesen. Vier Partikelsysteme hatten eine chemische Modifikation. Die übrigen vier Partikelsysteme hatten je eine Proteinart (*Bovine Serum Albumin* (BSA), Streptavidin, Avidin und Protein A) kovalent gebunden. Bei den

Partikelsystemen mit *Bovine Serum Albumin*, Streptavidin und Protein A lagen die Haftkräfte oberhalb des Messbereichs. Der Messbereich ergibt sich aus der minimalen und der maximalen Drehzahl der Zentrifuge. Bei den übrigen fünf Systemen traten sehr starke elektrostatische Abstoßungen auf. Durch die Zugabe geringer Salzmengen (0,01 Mol/l) oder die Einstellung des pH-Wertes auf den isoelektrischen Punkt der Partikel konnte die elektrostatische Abstoßung jedoch unterbunden werden. Aufgrund der geringen notwendigen Salzkonzentration ist davon auszugehen, dass im Prozess ebenfalls keine Abstoßung auftritt. Das unterschiedliche Verhalten zeigt weiterhin, dass die Proteinart bzw. das Produkt ebenfalls einen Einfluss auf die Partikelhaftung hat. Für Partikel mit Avidin und mit BSA fanden zusätzlich Versuche zum Einfluss hydrophatischer Wechselwirkungen statt. Die beiden Systeme wurden ausgewählt, da sie sich in den vorangegangenen Versuchen am meisten unterschieden. Für die Versuche wurden zum einen Glassubstrate hydrophobiert bzw. hydrophilisiert und zum anderen die Salzart entsprechend der Hofmeisterreihe variiert. Bei der Hydrophobizität des Substrats gibt es die Tendenz, dass die Partikel mit steigender Hydrophobizität stärker haften. Ein Einfluss der Salzart war bei der eingesetzten Konzentration von 0,1 Mol/l nicht feststellbar.

Für die genauere Betrachtung der Partikel-Partikel-Wechselwirkung musste zuerst eine entsprechende Messmethode erarbeitet werden. Die Betrachtung von klar definierten Partikel-Partikel-Kontakten ist jedoch mit der Zentrifuge nicht möglich. Die eingesetzte Zentrifuge (LUMiSizer) verfügt jedoch über eine Optik, mit der eindimensional die Transmission messbar ist. Das ermöglicht es die Höhe eines Partikelhaufwerkes während der Zentrifugation zu messen. Bei den Partikeln ohne anhaftendes Protein lagen die Haftkräfte zwischen den Partikeln ohne Magnet unterhalb des Messbereichs. Befand sich jedoch Protein auf der Partikeloberfläche kam es teilweise zu einem starken Anstieg der Haftkraft.

Die eingesetzte Laborzentrifuge machte den Einsatz eines externen Mikroskops für die Bildaufnahme bei der Partikel-Substrat-Haftkraftmessung notwendig. Bei den Messungen der Haftkräfte in einem Haufwerk gibt die Optik der Zentrifuge nur eindimensionale Daten. Um diese Nachteile zu beseitigen erfolgten parallel zu den Versuchen die Konstruktion und der Bau einer Zentrifuge mit einem integrierten Mikroskop. Durch den Einsatz

eines mechanischen Bildkorrektors gelang es das rotierende Bild in ein stationäres Bild umzuwandeln. Dadurch ist die rotierende Probe kontinuierlich mit einer festinstallierten Kamera aufnehmbar. Die minimale, praktische Auflösung liegt bei 10  $\mu\text{m}$ . Die optische Vergrößerung beträgt circa 8,9. Das neu entwickelte System erlaubt es unter anderem die Ablösekinetik der Partikel aus einem Haufwerk detaillierter zu untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Annahme der dominanten Magnetkraft nur für die Ausbildung des Partikelhaufwerks gilt. Bei der Abtrennung des Haufwerks scheint vor allem die Proteinart einen weiteren Einflussfaktor darzustellen.



---

## Summary

Advances in genetics and microbiology enable the production of biological macromolecules such as proteins. Their production takes place in two steps. First, microorganisms produce the product in a biosuspension. In the subsequent second step, the product must be separated from the remaining substances. Two difficulties arise. On the one hand, the molecular size of the target protein is in the nanometer range, as a result of which a separation with a filtration or centrifugation step is very difficult or even impossible. On the other hand, the impurities partly are biological macromolecules and have properties similar to those of the product, which makes purification difficult.

One approach to purification is high-gradient magnetic separation (HGMS). HGMS uses particles with a product-specific functionalization. The particles are added to the biosuspension. The product adsorbs to the particles due to functionalization. Subsequently, the biosuspension is pumped through a magnetic filter device. The magnetic particles, including the product, are retained on the magnetic matrix in the filter, while the remaining suspension can pass. The particles form a heap during filtration. Within the heap, the particles are in direct contact with each other, which leads to interparticle interactions in addition to the magnetic force.

Within the framework of the present research, interactions between particles in a heap and between the particles and the filter matrix were investigated. It was impossible to directly measure adhesion of particles to the matrix of the magnetic filter. Instead, flat adhesion partners, so-called substrates, of different materials were used. The aim was to determine the proportion of individual interactions, such as adhesion force and electrostatic forces, in total force.

The centrifugal method known from literature was used to measure the adhesive force between the particles and a substrate. However, the corresponding measurement setup had to be adapted to the existing centrifuge first. In the centrifuge method, the particles are brought into contact with the substrate and, subsequently, subjected to a centrifugal field, so that the centrifugal force is opposed to the adhesive force. In the course of the measurements, the rotational speed and, thus, the centrifugal force

were increased incrementally. A camera attached to a microscope was used to record images of the substrate before and after each centrifugation step. By comparing the number of particles before and after the centrifugation steps, the adhesion force distribution can be determined. The adhesive force distribution of a real particle system results from the fluctuations in the properties of the individual particles. For the measurement of particle-particle interactions, the method had to be adapted. The stability of particle heaps in a centrifugal field served as a characteristic parameter for the interactions. The used centrifuge made it possible to observe the heap height and, hence, the stability of a heap during centrifugation.

A particle heap constitutes a complex contact situation. In order to be able to examine the individual force components and their influencing factors, the complexity was reduced to defined particle-substrate contacts. In the first step, measurements with magnetizable, spherical particles of very narrow particle size distribution were made. The focus was on van der Waals forces. In fact, already known influences, such as the dependence of the adhesion force on the particle radius and the roughness could be verified. When the particles were placed in a magnetic field during the adhesion force measurements, an unexpected behavior was observed. The increase in the adhesive force was greater than the applied magnetic force. This can be explained by elastic deformations within the contact zone, by which the van der Waals forces are increased.

In the second step, eight particle systems based on the same particles, but with different surface modifications and, hence, hydrophobicities and charge distributions, were used. Four particle systems were modified chemically with one of the following functional groups COOH, NH<sub>2</sub>, Peg COOH, and PEG NH<sub>2</sub>. The remaining four particle systems had a covalently bound protein type (Bovine serum albumin (BSA), Streptavidin, Avadin and Protein A) on their surface. In the case of the particle systems with Bovine serum albumin, Streptavidin, and Protein A, the adhesive forces were above the measuring range. The measuring range results from the minimum and maximum speeds of the centrifuge. The other five systems exhibited very strong electrostatic repulsions. The addition of small amounts of salt (0.01 mol / l) or the adjustment of the pH to the isoelectric point of the particles prevented electrostatic repulsion. Due to

---

the low salt concentration necessary, it can be assumed that there also is no repulsion under process conditions. The different adhesion behavior shows that the type of protein or the product has an influence on particle adhesion. For particles with Avidin and with BSA, additional experiments were carried out to determine the influence of hydrophobic interactions. The two systems were selected, as they differed most in the previous experiments. For the tests, glass substrates were hydrophobized or hydrophilized, and the type of salt was varied according to the Hofmeister series. The particles tended to adhere more strongly with increasing hydrophobicity of the substrate. An influence of the salt type was not detectable at the used concentration of 0.1 mol /l.

For the detailed investigation of the particle-particle interactions, a measurement method had to be developed first. The observation of clearly defined particle-particle contacts is not possible with the centrifuge. However, the used centrifuge (LUMiSizer) has an optics with which the sample transmission can be measured one-dimensionally. This makes it possible to measure the height of a particle heap during centrifugation. For the particles without adhering protein and without a magnetic field, the adhesive forces between the particles were below the measuring range. When certain proteins were present on the particle surface, however, a strong increase in adhesive force was observed.

In addition to the used laboratory centrifuge, an external microscope was necessary for image acquisition during particle-substrate adhesion measurement. In the case of the measurements of the adhesive forces in a heap, the centrifuge optics yields one-dimensional data only. In order to eliminate these disadvantages, a centrifuge with an integrated microscope was designed and constructed parallel to the experiments. By using a mechanical image corrector, the rotating image was converted into a stationary image. As a result, the rotating sample can be recorded continuously with a permanently installed camera. The minimum practical resolution is 10  $\mu\text{m}$ . The optical magnification is approximately 8.9. The newly developed system, among others, allows to examine in more detail the detachment kinetics of the particles from a heap.



---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Motivation .....	1
1.2	Abgrenzung zu anderen Themengebieten und Einteilung der Arbeit .....	2
2	Theoretische Grundlagen .....	5
2.1	Hochgradienten-Magnetseparation .....	5
2.1	Proteinstruktur .....	6
2.2	Kräfte .....	9
2.2.1	Van der Waals-Kraft .....	9
2.2.2	Elektrostatik .....	13
2.2.3	Hydropathische Wechselwirkungen.....	15
2.2.4	Magnetismus und Magnetkraft .....	15
2.3	Grundlagen Zentrifugation .....	22
3	Material und Methoden .....	23
3.1	Versuchsprodukte .....	23
3.1.1	Partikelsysteme.....	23
3.1.2	Substrate.....	27
3.1.3	Magnete .....	29
3.1.4	Pufferlösungen.....	30
3.2	Versuchsapparaturen und Versuchsdurchführung .....	30
3.2.1	Zentrifuge .....	30
3.2.2	Laser-Scanning-Mikroskop .....	31
3.3	Haftkraftmessung .....	32
3.3.1	Zentrifugenmethode.....	32
3.3.2	AFM - Messungen .....	42
3.4	Simulationen des Magnetfeldes mittels Finite-Elemente- Methode .....	45
4	Ergebnisse .....	49
4.1	Partikel-Wandwechselwirkung .....	50
4.1.1	Geometrie und Struktur .....	50
4.1.2	Partikelfunktionalisierung.....	71
4.2	Partikel-Partikel-Wechselwirkung.....	85

---

4.2.1	Methodenentwicklung .....	85
4.2.2	Einfluss Medium.....	92
4.2.3	Einfluss Protein .....	93
5	Entwicklung und Bau einer Optikzentrifuge.....	99
5.1	Aufbau und Funktionsweise .....	99
5.2	Partikelhaftkraft und Ablösebewegung bei radialer Belastung.....	108
5.3	Beschreibung des Verhaltens eines Partikelhaufwerks im Zentrifugalfeld.....	110
6	Schlussfolgerung und weiterführende Überlegungen .....	115
7	Symbolverzeichnis.....	119
8	Literaturverzeichnis.....	123

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Fortschritte in der Biologie und Biotechnologie ermöglichen den gezielten Einsatz und die gezielte Veränderungen von Mikroorganismen. Biotechnologische Prozesse kommen zum einen zur Anwendung, wenn der chemische Syntheseweg zu aufwendig und damit nicht ökonomisch ist. Ein Beispiel dafür ist die Herstellung von Bioethanol [3]. Zum anderen wird der biotechnologische Syntheseweg eingeschlagen wenn das Zielprodukt, bspw. Proteine, zu komplex und die chemische Synthese dadurch nicht möglich ist.

Eines der bekanntesten Beispiele für biotechnologisch synthetisierte Proteine ist Insulin für die Behandlung von Diabetes. Im Jahr 2014 betrug der Umsatz mit Biopharmazeutika in Deutschland 7,5 Mrd. Euro und 226 neue Produkte erhielten eine Zulassung [4]. Weltweit machten die 30 größten Biotech- und Pharmakonzerne einen Umsatz von rund 614 Mrd. Dollar (rund 534 Mrd. Euro) [5]. Eine genaue Aufschlüsselung wie hoch dabei der Anteil der Biopharmazeutika war fehlt jedoch. Einen Anhaltspunkt gibt der Blick auf die hundert umsatzstärksten Produkte. Von diesen waren 44 % Biopharmazeutika [6]. Einen Vorteil bei der Produktion biotechnologischer Produkte stellt die Herstellung in einer Biosuspension (Upstream) bei geringen Drücken (meist unter zwei bar) und Temperaturen (unter 70°C) dar. Dem stehen geringe Produktkonzentrationen mit dementsprechend niedriger Reinheit gegenüber. Ist das Produkt ein Protein kommt für die anschließende Aufarbeitung (Downstream) oftmals erschwerend hinzu, dass ein Großteil der Verunreinigungen aus anderen Proteinen und Zellbruchstücken besteht und dadurch ähnliche Eigenschaften aufweist wie das Produkt. Im biopharmazeutischen Bereich, in dem eine sehr hohe Produktreinheit notwendig ist, fallen daher in der Regel zwischen 40 bis 60 %, teilweise bis zu 80 %, der Produktionskosten in der Aufreinigung an [7]. Die Entwicklung neuer und kostengünstigerer Aufarbeitungsmethoden ist deshalb sinnvoll.

Einen Ansatz stellt die Hochgradienten Magnetseparation (HGMS) dar. Dabei kommen funktionalisierte Magnetpartikel zum Einsatz. Die Funktionalisierung ist spezifisch auf das Produkt abgestimmt, sodass im Idealfall nur dieses an die Partikel bindet. Die Partikel können dadurch direkt in die Suspension mit dem Produkt hinzu gegeben werden. Dort bindet das Produkt an die Partikel. Im Anschluss erfolgt die Trennung der Partikel samt Produkt vom Rest der Suspension in einem Magnetseparator. Danach kann das Produkt durch einen Pufferwechsel von den Partikeln eluiert werden. Abschließend ist die Trennung von Produkt und Partikel durch eine zweite Magnetabscheidung möglich[8, 9].

Um den höchsten Wirkungsgrad der HGMS zu erreichen ist es notwendig, die Partikel vollständig aus dem Magnetseparator zurück zu gewinnen und sie zu resuspendieren. Beides kann aufgrund interpartikulärer Wechselwirkungen oder Restmagnetisierung der Materialien schwierig sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden Wechselwirkungen ermittelt und verschiedene Einflussfaktoren untersucht.

## 1.2 Abgrenzung zu anderen Themengebieten und Einteilung der Arbeit

In bisherigen Betrachtungen von HGMS-Prozessen wird die Annahme getroffen, dass die Magnetkraft die alles dominierende Kraft ist und somit die übrigen Wechselwirkungskräfte, bspw. die van der Waals-Kraft (v.d.W.-Kraft) oder elektrostatische Abstoßung etc. vernachlässigbar sind [10-13]. In den dazu realisierten Untersuchungen lag der Schwerpunkt auf der Abscheidung der Partikel im Magnetfilter und dessen Auslegung und Charakterisierung. Im Prozess müssen die Partikel jedoch auch wieder aus dem Magnetscheider ausgetragen und resuspendiert werden. Im Gegensatz zur Partikelanlagerung befinden sich die Partikel dabei in direktem Kontakt, was zu einer Änderung und Verstärkung der partikulären Wechselwirkungen führt. Im Rahmen dieser Arbeit stehen deshalb die einzelnen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und zwischen den Partikeln und Oberflächen im Mittelpunkt. Anhand einer detaillierten Betrachtung der Wechselwirkungen auf partikulärer Ebene sollen die einzelnen Kräfte quantifiziert und anschließend die Einflussfaktoren auf diese Kräfte bestimmt werden. In einem Partikelhaufwerk, wie es sich innerhalb



eines Magnetfilters aufbaut, herrscht eine komplexe Kontaktsituation zwischen den einzelnen Partikeln. Die Untersuchung wurde daher in vier Phasen unterteilt.

*i) Vermessung von definierten Modellpartikel*

In der ersten Phase fand die Betrachtung für den einfachsten Fall von monodispersen, sphärischen Partikeln an einer ebenen Oberfläche statt. Die definierte Kontaktsituation vereinfacht die Interpretation der Daten und ermöglicht einen Vergleich mit vorhandenen Kraftmodellen aus der Literatur.

*ii) Modellpartikel mit kovalent gebundenem Protein*

Durch die Einführung von kovalent gebundenen Proteinen auf der Partikeloberfläche nähern sich die Partikelsysteme dem Anwendungsfall an. Durch die starke kovalente Bindung des Proteins können eine Reihe von Umgebungsbedingungen getestet werden, die mit den HGMS-Partikeln und Protein nicht möglich sind.

*iii) Anwendungsrelevante HGMS-Partikel und der Einfluss der Proteinbelastung*

In der letzten Phase erfolgte die Untersuchung von anwendungsrelevanten HGMS-Partikeln. Im Gegensatz zu den Modellpartikeln binden die Proteine nicht kovalent sondern adsorbieren reversibel an der Partikeloberfläche.

*iv) Weiterentwicklung der Messtechnik*

Parallel zu den durchgeführten Untersuchungen erfolgte eine permanente Weiterentwicklung der Messtechnik. Am Ende stand eine neuartige Zentrifuge, in die ein Mikroskopaufbau integriert wurde. Das ermöglicht die Probe kontinuierlich während der Zentrifugation zu beobachten und damit den Ablöseprozess eines Partikels zu beschreiben.



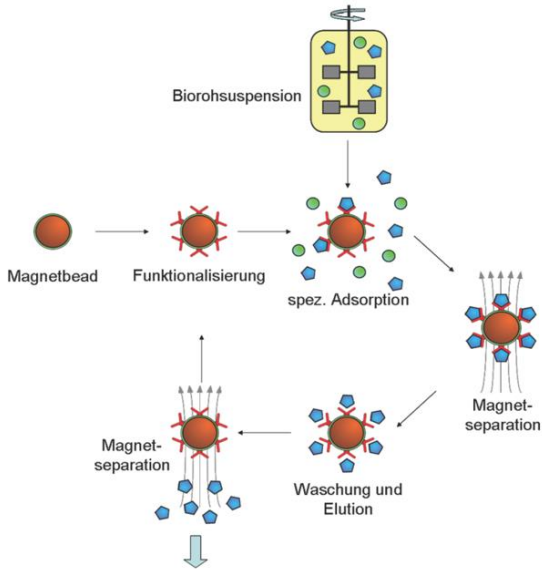
---

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Hochgradienten-Magnetseparation

In der Lebensmittel- und Pharmaindustrie stellen biologische Makromoleküle wie Proteine, Tenside etc. eine interessante Produktklasse dar. Die Herstellung erfolgt mithilfe von Mikroorganismen in einer Biosuspension. Dank Fortschritten in der Genetik und in der Molekularbiologie konnten die Proteinkonzentrationen deutlich gesteigert werden, sodass ihre Produktion in großen Maßstäben möglich ist. Die Produktion bzw. Synthese in der Biosuspension wird als Upstream bezeichnet. Daran schließt sich die Abtrennung und Konzentrierung des Produktes im sogenannten Downstream an. Dabei stellen unter anderem die anderen biologischen Makromoleküle und Zellfragmente ein Problem dar, da sie ähnliche Eigenschaften haben wie das Produkt. Klassische Trennverfahren wie die Filtration oder die Zentrifugation stoßen dabei an ihre Grenzen. Die Aufarbeitung findet deshalb häufig in einer Kaskade von Chromatographie- und Membranfiltrationsschritten statt [14]. Diese sind bei den zu verarbeitenden Volumina jedoch sehr kostenintensiv, sodass in der Regel zwischen 40 bis 60 %, teilweise bis zu 80 % der Produktionskosten auf die Aufreinigung entfallen. Ein alternatives Verfahren stellt die Hochgradienten-Magnetseparation dar. Abbildung 2-1 zeigt ein Prinzipschema des Prozesses. Nach dem Upstream erfolgt eine Zugabe von funktionalisierten, magnetisierbaren Partikel in die Biosuspension. Die Funktionalisierung ist produktspezifisch, sodass überwiegend das Produkt an die Partikel bindet. Anschließend wird die Suspension durch einen Magnetscheider gepumpt. Im einfachsten Fall besteht dieser aus magnetisierbaren Drähten. Durch ein äußeres Magnetfeld magnetisieren sich die Drähte und die Magnetpartikel werden zusammen mit dem gebundenen Produkt an den Drähten abgeschieden. Es gibt diskontinuierliche Magnetscheider, bei denen nach Erreichen der Kapazitätsgrenze das Magnetfeld entfernt werden muss für den Partikelaustrag und kontinuierliche Apparate [12], bei denen die abgetrennten Partikel durch ein überlagertes Zentrifugalfeld von der Matrix entfernt werden. An die Abtrennung schließen sich Wasch- und Elutionsschritte an. Durch eine Änderung des pH-Wertes oder der Salzkonzentration löst sich das Produkt von den Parti-

keln. Die Partikel können anschließend im Magnetfeld vom Produkt getrennt und erneut eingesetzt werden.



**Abbildung 2-1** Prinzipschema eines HGMS-Prozesses [15]

Der prinzipielle Unterschied zu anderen Verfahren besteht also darin, dass die Trennung nicht unmittelbar anhand der Produkteigenschaften stattfindet, sondern die Trenneigenschaft erst induziert werden muss.

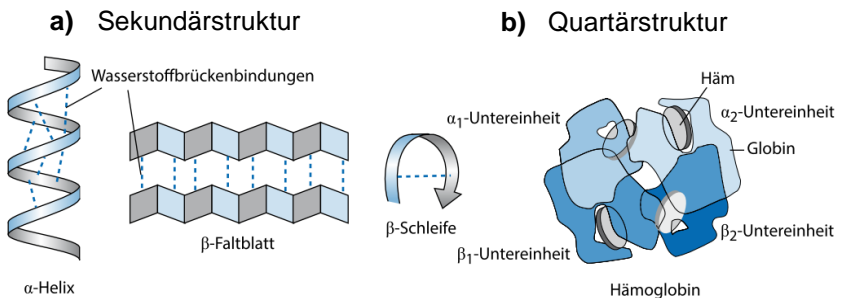
## 2.1 Proteinstruktur

Proteine sind biologische Makromoleküle. Proteine umfassen u.a. Strukturproteine, die für die mechanische Stabilität einer Struktur sorgen, Enzyme, die als Katalysator biochemischer Reaktionen fungieren und Immunglobuline, die ein Teil des Immunsystems bilden. Bekannte Proteine sind u.a. das Hormon Insulin, das an der Regulierung des Blutzuckergehalts beteiligt ist und das Transportprotein Hämoglobin, das Sauerstoff oder Kohlendioxid im Blut transportiert [16]. Aufgrund ihrer multiplen

Funktionen und Omnipräsenz werden sie auch als Grundbausteine des Lebens bezeichnet.

Die Bausteine der Proteine bilden Aminosäuren (AS). Bisher sind über 270 verschiedene Aminosäuren bekannt, von denen 23, sogenannte proteinogene AS, in Proteinen vorkommen. Wie der Name sagt, verfügen AS über eine Säure-Gruppe, genauer über eine Carboxygruppe, und über eine Aminogruppe [17]. Unter Wasserabspaltung können die beiden Gruppen zweier AS miteinander reagieren und eine Peptidbindung eingehen. Da jede AS mit ihrer Säure- und Aminogruppe eine Peptidbindung eingehen kann, sind theoretisch beliebig lange Ketten möglich. Im menschlichen Organismus stellt Titin mit über 34000 AS das größte Protein dar. Am häufigsten sind jedoch Proteine mit einer Länge zwischen 100 und 600 AS [18]. Die AS unterscheiden sich sowohl in ihrer Polarität, und damit in ihrer Hydrophathie, als auch in ihren Säurestärken, wodurch sie bei gleichen pH-Werten unterschiedliche Ladungszustände aufweisen.

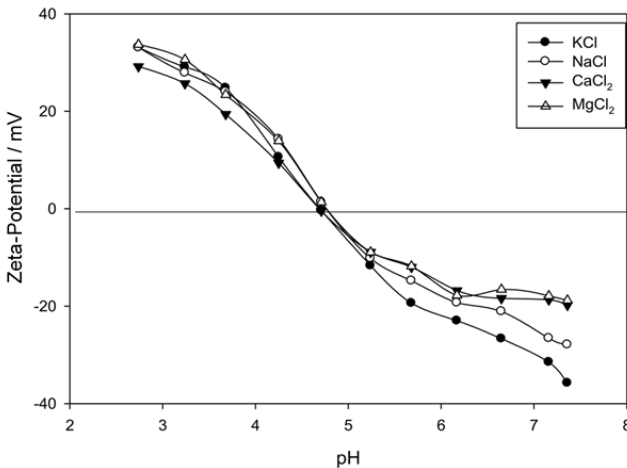
Die Reihenfolge der Aminosäuren wird Primärstruktur genannt. Abhängig von der AS-Sequenz entstehen lokale Unterstrukturen, die als Sekundärstruktur bezeichnet werden. Die Stabilisierung der Sekundärstruktur erfolgt über Wasserstoffbrücken. Die häufigsten Strukturtypen der Sekundärstruktur sind, wie in Abbildung 2-2 a gezeigt, die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt und die  $\beta$ -Schleife.



**Abbildung 2-2 Schematische Darstellung der Proteinstruktur [2]**

Außerdem gibt es noch die ungeordnete Struktur (engl. Random-Coil-Structure). An den Windungen verbinden sich die einzelnen Sekundärstrukturen und formen die übergeordnete Tertiärstruktur. Auf diesem Strukturlevel wirken sowohl nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, v.d.W.-Kräfte, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen, als auch kovalente Disulfidbrücken als Bindungskräfte. Meist bilden solche Peptidketten jedoch noch kein funktionstüchtiges Protein. Sie sind vielmehr als Untereinheit zu betrachten. Für ein endgültiges funktionsfähiges Protein ist ein Zusammenspiel mehrerer Untereinheiten, die die Quartärstruktur bilden, notwendig. Im rechten Teil von Abbildung 2-2 ist die schematische Darstellung der Gesamtstruktur und den entsprechenden Untereinheiten von Hämoglobin zu sehen [2].

Innerhalb einer Proteinstruktur können weder die Amino- noch die Carboxygruppen protoniert bzw. deprotoniert werden (abgesehen von den endständigen Gruppen), trotzdem weist der Zeta-Potentialverlauf von Proteinen eine Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Der genaue Verlauf hängt dabei von der Struktur der Seitenketten ab. Abbildung 2-3 zeigt einen typischen Zeta-Potential-Verlauf für BSA in niedrig konzentrierter Salzlösungen ( $c \sim 0,001$  mol/l).



**Abbildung 2-3** Abhängigkeit des Zeta-Potentials vom pH am Beispiel von BSA bei niedriger Salzkonzentration von 0,001 M [3].

Der Punkt an dem keine Nettoladung feststellbar ist, das Zeta-Potential also null ist, wird als isoelektrischer Punkt ( $pI$ ) bezeichnet. Die Lage des  $pI$  hängt vom Protein ab.

## 2.2 Kräfte

Alle intermolekularen Kräfte sind elektrostatischer Natur. Das erlaubt es die Kräfte mit Gleichungen der Elektrostatik zu berechnen. Die Grundvoraussetzung dafür ist jedoch, dass die exakte Lösung der Schrödinger Gleichung für die Verteilung der Elektronenwolken bekannt ist. Allerdings ist die genaue Berechnung selbst bei sehr einfachen Systemen wie zwei Wasserstoffmolekülen komplex. Um dennoch eine Berechnung der Wechselwirkungen durchführen zu können ist eine Klassifizierung anhand phänomenologischer Effekte, bspw. hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen oder der van der Waals-Kraft (v.d.W.-Kraft), hilfreich [19]. Nachfolgend sind die Grundlagen für die in dieser Arbeit relevanten Kräfte beschrieben.

### 2.2.1 Van der Waals-Kraft

Van der Waals-Kräfte (v.d.W.-Kräfte) sind Wechselwirkungen zwischen Atomen und Molekülen, die durch Fluktuationen in der Elektronenhülle oder durch permanente Dipole entstehen. Bei v.d.W.-Kräften handelt es sich um schwache Wechselwirkungen mit einer kurzen Reichweite. Ihre Bedeutung entsteht durch die sehr hohe Atomanzahl zwischen denen die v.d.W.- Kräfte wirken. Aufgrund der kurzen Reichweite haben dabei oberflächennahe Atome den größten Anteil an der Gesamtkraft. Bei großen Partikeln deren Durchmesser 50 bis 100  $\mu m$  überschreitet dominiert daher meist die Gewichtskraft. Eine feste Grenze ab der die v.d.W.- Kräfte zu berücksichtigen sind gibt es nicht.

Eine Berechnungsmöglichkeit steht durch die Korrelation der Kraft  $F_{ad}$  mit der Hamaker-Konstante  $A$  und einem Geometriefaktor  $\mathcal{Z}$

$$F_{ad} = -A \cdot \mathcal{Z} \quad (2-1)$$

zur Verfügung.  $\mathcal{Z}$  berücksichtigt die Form der interagierenden Körper. Für zwei Kugeln mit den Radien  $R_1$  und  $R_2$  im Abstand  $x$  ergibt sich  $\mathcal{Z}$  zu

$$\mathcal{Z} = \frac{R_1 \cdot R_2}{6 \cdot x^2 \cdot (R_1 + R_2)} \quad (2-2)$$

Für ein Kugel-Platte-System ergibt sich  $\mathcal{Z}$  aus einer Grenzwertabschätzung mit  $R_2$  gegen unendlich

$$\mathcal{Z} = \frac{R}{6 \cdot x^2} \quad (2-3)$$

Grundlegende Arbeiten zur Berechnung der materialspezifischen Hamaker-Konstante erfolgten durch Hamaker und Lifshitz. Hamaker ging von einer Additivität der Wechselwirkungen der einzelnen Atom- bzw. Molekülpaaire aus [20]. Allerdings ändert sich die Polarisation eines Atoms oder Moleküls in der Nähe eines anderen, sodass die Annahme nur bedingt zu trifft. Lifshitz umgeht das Problem indem er die Hamaker-Konstante mit makroskopischen Eigenschaften wie der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  und dem Brechungsindex  $n_B$  korreliert.

Stehen zwei Körper der Materialien 1 und 2 in einem Medium 3 in Kontakt, so müssen die Hamaker-Konstanten der einzelnen Materialien miteinander kombiniert werden. Das kann zum einen direkt bei der Hamaker-Konstantenberechnung erfolgen

$$A_{132} = \frac{3}{4} k_B T \left( \frac{\epsilon_1 - \epsilon_3}{\epsilon_1 + \epsilon_3} \right) \left( \frac{\epsilon_2 - \epsilon_3}{\epsilon_2 + \epsilon_3} \right) + \frac{3h\nu_e}{8\sqrt{2}} \frac{(n_{B1}^2 - n_{B3}^2)(n_{B2}^2 - n_{B3}^2)}{\sqrt{(n_{B1}^2 + n_{B3}^2)} \sqrt{(n_{B2}^2 + n_{B3}^2)} \left( \sqrt{(n_{B1}^2 + n_{B3}^2)} + \sqrt{(n_{B2}^2 + n_{B3}^2)} \right)} \quad (2-4)$$

mit  $k_B$  als der Boltzmann-Konstante,  $h$  als Plancksches Wirkungsquantum und der Absorptionsfrequenz  $\nu_e$ . Zum anderen ist eine Kombination der Hamaker-Konstanten der Reinstoffe

$$A_{132} = \left( \sqrt{A_{11}} - \sqrt{A_{33}} \right) \left( \sqrt{A_{22}} - \sqrt{A_{33}} \right) \quad (2-5)$$



möglich. Die Oberflächenenergie  $\gamma$  [J/m<sup>2</sup>] ist über die Hamaker-Konstante durch die Beziehung

$$\gamma = A \cdot 2,1E18 \quad (2-6)$$

abschätzbar [19].

Eine gute Übersicht zu der Thematik ist in [21] und [22] gegeben.

### Einfluss der Rauheit

Probleme ergeben sich an dieser Stelle, da Partikel keine perfekt runden Kugeln sind sondern Rauheiten aufweisen. Bedingt durch die kurze Reichweite der v.d.W.-Kraft reichen bereits einige Nanometer aus, um die Haftkraft um ein bis zwei Zehnerpotenzen zu senken. Rumpf gelang die Integration einer halbkugelförmige Rauheit in das Modell von Hamaker [23] durch einen Korrekturterm  $\theta$

$$F = -A \cdot \gamma \cdot \theta . \quad (2-7)$$

Rabinovich erweiterte das Modell indem er  $\theta$  durch die mittlere quadratische Rauheit ( $R_q$ ) [24] ausdrückte

$$\theta = \left( \frac{1}{1 + \frac{R}{1,485 \cdot R_q}} + \frac{1}{\left(1 + \frac{1,485 \cdot R_q}{x}\right)^2} \right) . \quad (2-8)$$

Sofern die zwei Körper unterschiedliche Rauheiten aufweisen, ist der quadratische Mittelwert

$$R_{q*} = (R_{q,1}^2 + R_{q,2}^2)^{\frac{1}{2}} \quad (2-9)$$

zu verwenden.

### Einfluss der Deformation

Die bisherigen Modelle gehen von starren Körpern aus. Innerhalb der Kontaktzone kommt es jedoch zu elastischen oder elasto-plastischen Deformationen und damit zur Ausbildung einer Kontaktzone. Ein erstes Modell für die Berechnung des sich durch Deformation ausbildenden Kontaktradius' stammt von Hertz. Jedoch vernachlässigt er die Adhäsion, sodass es zu einem theoretischen Punktkontakt kommen kann [25]. Johnson, Kendal und Roberts griffen diesen Nachteil auf und entwickelten mit ihrem JKR-Modell eine Möglichkeit, um zum einen die Haftkraft  $F_{ad}$

$$F_{ad} = 3 \cdot \gamma \cdot \pi \cdot R \quad (2-10)$$

und zum anderen den Kontaktradius  $a$

$$a = \sqrt[3]{\frac{R}{K} \cdot \left[ \sqrt{3 \cdot \pi \cdot R \cdot \gamma} + \sqrt{F + 3 \cdot \pi \cdot R \cdot \gamma} \right]^2} \quad (2-11)$$

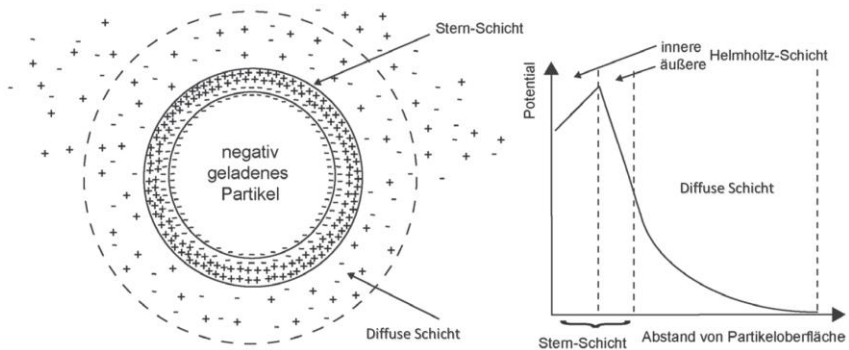
glatter, weicher Körper bei elastischer Deformation in Abhängigkeit der Oberflächenenergie  $\gamma$  und unter einer zusätzlichen Druckkraft  $F$  zu berechnen.  $R$  ist jeweils der Partikelradius. In  $K$

$$K = \frac{4}{3} \cdot \left( \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right)^{-1} \quad (2-12)$$

sind die mechanischen Eigenschaften Elastizität und Querkontraktion in Form des E-Moduls  $E$  bzw. der Poissonzahl  $\nu$  der beiden Körper miteinander kombiniert [26].

## 2.2.2 Elektrostatik

Die Interaktion geladener Moleküle oder Partikel (disperse Phase) in einem Fluid ist komplex und hängt von einer Vielzahl von Faktoren, bspw. der Elektronendichte der dispersen Phase und der Ionenkonzentration  $c_{ion}$  des Fluids ab. Die Ionen reichern sich um den geladenen Körper an und bilden zwei Schichten aus. Die erste, partikelnahe Schicht wird als Stern-Schicht bezeichnet. Sie besteht aus Ionen mit entgegengesetzter Ladung zur Oberfläche. Die Ionen sind starr mit dem Partikel verbunden. Daran schließt sich die diffuse Schicht an. Sie besteht aus Ionen beider Ladungen. Aufgrund der zwei Schichten ist das Modell auch als Doppelschichtmodell bekannt. Eine schematische Darstellung der Ionenverteilung und des Potentialverlaufs ist in Abbildung 2-4 für ein negativ geladenes Partikel gezeigt.



**Abbildung 2-4 Ionenverteilung und Potentialverlauf innerhalb der Doppelschicht eines geladenen Partikels (nach [27]).**

Die Stern-Schicht ist noch einmal in die innere und die äußere Helmholtzschicht unterteilt. In der inneren Helmholtzschicht liegen die Ionen an der Partikeloberfläche. Dort haben die Ionen ihre Hydrathülle teilweise oder vollständig verloren und sind über Chemiesorption an die Oberfläche gebunden. Das dazu gehörige Potential wird Nernst-Potential genannt. Im Gegensatz dazu haben die Ionen in der äußeren Helmholtzschicht eine Hydrathülle und sind über die Physisorption an den Partikeln gebunden.

(Eine Analogie dazu stellen die Wassermoleküle im Meer (Starre-Schicht) und der darüber liegenden Atmosphäre (diffuse Schicht) dar [28].) In der Helmholtzschicht fällt das Potential linear vom Nernst-Potential auf das Stern-Potential ab. In der diffusen Schicht folgt die Abnahme einem exponentiellen Verlauf. Eine charakteristische Größe für die Ausdehnung der diffusen Schicht stellt die Debye-Hückel-Länge  $\lambda$

$$\lambda = \frac{1}{\kappa} = \sqrt{\left(\frac{\epsilon \cdot k_B \cdot T}{\sum_i (c_{ion,i} \cdot z_i^2) \cdot N_A \cdot e_0^2}\right)} \quad (2-13)$$

dar. Sie gibt an, nach welchem Abstand das Potential auf das  $e^{-1}$ -fache des Ausgangswertes abgesunken ist. Sie hängt von der Ionenkonzentration  $c_{ion}$  und -wertigkeit  $z_i$  des Elektrolyts sowie von der Temperatur  $T$  ab. Außerdem fließen die Avogadro-Konstante  $N_A$ , die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ , die Elementarladung  $e_0$  und die Boltzmann-Konstante  $k_B$  ein. Für zwei sphärische Partikel mit den Durchmessern  $d_i$  und  $d_j$ , die sich im Abstand  $r$  befinden, leitete Gregory die folgende Gleichung [29] für die Berechnung der elektrostatischen Kraft  $F_{el}$  in einem Elektrolyten her:

$$F_{el} = \frac{128 \cdot \pi \cdot N_A \cdot c_{ion} \cdot k_B \cdot T}{\kappa^2} \frac{d_i \cdot d_j}{4r} \gamma_{r,i} \gamma_{r,j} \exp\left[-\kappa \left(r - \frac{d_i + d_j}{2}\right)\right] \left(\frac{1}{r} + \kappa\right) \quad (2-14)$$

Das reduzierte Potential  $\gamma_r$

$$\gamma_r = \frac{z \cdot e_0 \cdot \zeta}{k_B \cdot T} \quad (2-15)$$

lässt sich aus dem Zeta-Potential  $\zeta$  berechnen.

Im Gegensatz zum Nernst- und Sternpotential ist das Zeta-Potential messtechnisch zugänglich. Beim Zeta-Potential handelt es sich um ein oberflächennahes Potential, dass durch eine Verschiebung der diffusen Doppelschicht entsteht. Die Verschiebung erfolgt durch das Anlegen eines elektrischen Felds in einer Suspension. Die Partikel bewegen sich entsprechend ihrer Ladung im elektrischen Feld und streifen dadurch einen Teil der diffusen Schicht ab. Das Zeta-Potential hängt, ebenso wie

die Ausdehnung der diffusen Schicht, vom pH-Wert und vom Elektrolytgehalt ab.

### 2.2.3 Hydropathische Wechselwirkungen

Hydropathische Wechselwirkungen beschreiben die Eigenschaft eines Stoffes von Öl oder Wasser benetzbar zu sein bzw. sich darin zu lösen. Die Ursache dafür liegt in den unterschiedlichen Oberflächenpolarisationen der Materialien. Während unpolare Stoffe meist hydrophob sind, also schlecht mit Wasser benetzbar, sind polare Stoffe hydrophil und damit gut mit Wasser benetzbar. Ein Grund dafür liegt in der Strukturierung des Wassers. In sehr kleinem Abstand (zwischen 0,2 und 0,4 nm) [30, 31] von der Oberfläche bildet sich bei hydrophoben Stoffen eine Strukturierung der Wassermoleküle aus, sodass die Wassermoleküle nicht mehr frei beweglich sind und die Entropie in dem System abnimmt. Eine Zusammenlagerung der Partikel verringert die freie Oberfläche und damit die Anzahl bewegungslimitierter Wassermoleküle. Das System nimmt einen energetisch günstigeren Zustand höherer Entropie ein. Entsprechendes gilt für hydrophile Stoffe in unpolaren Flüssigkeiten. Durch eine Salzzugabe können hydrophobe Wechselwirkungen gestärkt (kosmotrope Salze) oder geschwächt werden (chaotrope Salze). In der Hofmeister-Reihe sind die Salze entsprechend ihrer Wirkung sortiert [32].

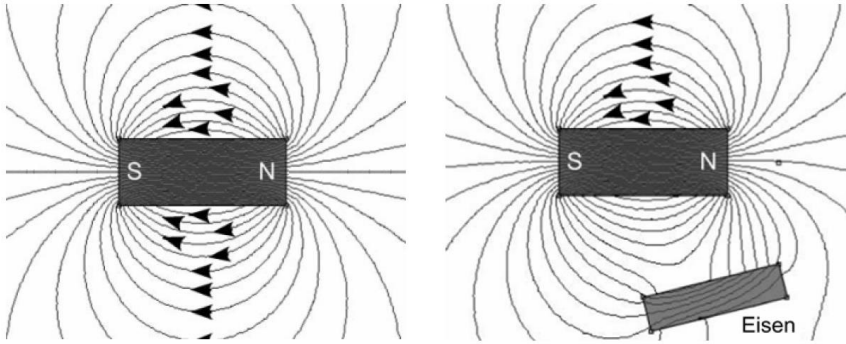
### 2.2.4 Magnetismus und Magnetkraft

In diesem Kapitel sind die Grundlagen des Magnetismus basierend auf den Arbeiten von Franzreb [33], Eichholz [34], Lindner [35] und Coey [1] zusammengefasst.

#### 2.2.4.1 Magnetismus

Magnetfelder können durch bewegte elektrische Ladung oder durch permanente Magnetpole entstehen. Ungeachtet der Quelle können die Magnetfelder durch die magnetische Flussdichte (B-Feld)  $\mathbf{B}$  und die magnetische Feldstärke (H-Feld)  $\mathbf{H}$  beschrieben werden. Zur Veranschaulichung der Felder dienen die Feldlinien. Abbildung 2-5 zeigt den Feldlinienverlauf

am Beispiel eines Permanentmagneten mit und ohne Feldverzerrung durch einen Eisenstab.



**Abbildung 2-5** Feldlinienverlauf eines Permanentmagneten ohne (links) und mit Feldverzerrung durch einen Eisenstab (rechts); S – Südpol, N - Nordpol [36]

Das B-Feld gibt die Feldliniendichte an. Das H-Feld ist ein mathematisches Hilfsfeld, das dem durch Stoffeigenschaften korrigierten B-Feld entspricht [1]. Die Stoffeigenschaften sind durch die Permeabilität  $\mu$  beschreibbar. Der Zusammenhang zwischen den beiden Feldern ist damit gegeben durch

$$\mathbf{B} = \mu \cdot \mathbf{H} . \quad (2-16)$$

Die Permeabilität gibt an, wie stark ein Material die Magnetfeldlinien im Vergleich zum Vakuum bündelt oder ablenkt. Sie ist das Produkt aus der konstanten Permeabilität des Vakuums  $\mu_0$  und der relativen Materialpermeabilität  $\mu_r$ . In Vakuum und als gute Näherung in Luft gilt  $\mu_r=1$ , sodass die beiden Felder denselben Verlauf zeigen. Innerhalb eines Körpers führt das H-Feld jedoch zu einer Magnetisierung  $M$  (Gl. 2-17)

$$\mathbf{M} = (\mu_r - 1) \cdot \mathbf{H} = \chi \cdot \mathbf{H} \quad (2-17)$$

des Körpers. Das Maß für die Magnetisierbarkeit eines Körpers  $\chi$  wird magnetische Suszeptibilität genannt. Die Magnetisierung führt zu einer Änderung des B-Felds entsprechend (Gl. 2-18)

$$B = \mu_0 \cdot (H + M). \quad (2-18)$$

Die magnetische Klassifizierung von Materialien erfolgt anhand ihrer Suszeptibilität in drei Kategorien:

- |                              |              |                               |
|------------------------------|--------------|-------------------------------|
| - Diamagnetika               | $\chi < 0$   | schwächen das Magnetfeld      |
| - Paramagnetika              | $\chi > 0$   | stärken das Magnetfeld        |
| - Ferro- bzw. Ferrimagnetika | $\chi \gg 0$ | stärken das Magnetfeld stark. |

Im einfachen Fall ist die Suszeptibilität unabhängig von der magnetischen Feldstärke. Das ist bei mäßigen Feldstärken bei dia- und paramagnetischen Stoffen der Fall.

Bei Diamagnetika induziert ein äußeres Magnetfeld ein Magnetfeld im Inneren des Körpers, das dem äußeren entgegen wirkt und dieses dadurch abschwächt. Als Konsequenz erfährt der Körper eine Kraft, welche ihn aus dem äußeren Magnetfeld heraus drückt. Bei dem Diamagnetismus handelt es sich um einen relativ schwachen Effekt mit entsprechenden kleinen Suszeptibilitäten, bspw.  $-9,61 \cdot 10^{-6}$  für Kupfer oder  $-165 \cdot 10^{-6}$  für Bismut.

Im Gegensatz zu Diamagnetika richten sich bei Paramagnetika die einzelnen magnetischen Momente so aus, dass das äußere Magnetfeld verstärkt wird. Wichtig ist dabei, dass sich die Momente unabhängig voneinander ausrichten und sie aufgrund der thermischen Fluktuation ohne äußeres Feld wieder eine zufällige Verteilung einnehmen und sich gegenseitig aufheben. Ihre Suszeptibilität liegt typischer Weise zwischen null und  $10^{-4}$ . Sie ist eine Funktion der Temperatur, die durch das Curie-Gesetz beschrieben ist. Paramagnetismus kommt bei Stoffen mit ungepaarten Elektronen wie Lithium oder Natrium vor.

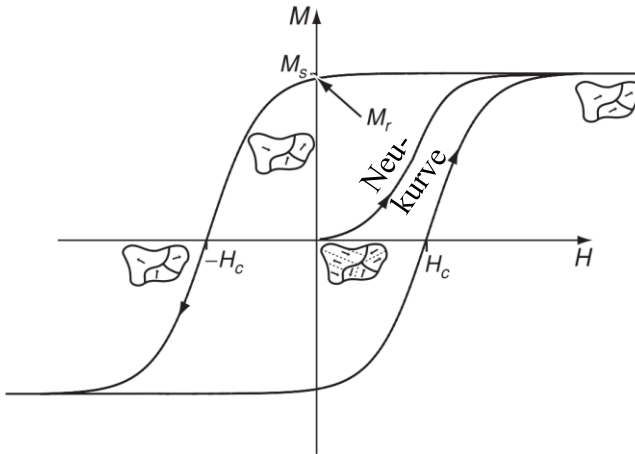
Bei ferro- und ferrimagnetischen Stoffe ist die Suszeptibilität abhängig von der magnetischen Feldstärke, der Partikelform und -größe. Beide Stoffe besitzen sogenannte Weiss'sche Bezirke. Dabei handelt es sich um Teilbereiche innerhalb des Gesamtkörpers, indem die magnetischen Momente gleichgerichtet sind. Zwischen zwei benachbarten Bezirken

liegt die Bloch-Wand. In ihr erfolgt ein fließender Übergang der Magnetisierungsrichtung. Die Größe der Weiss'schen Bezirke reicht von einem Mikrometer bis zu einem Millimeter. Die Dicke der Bloch-Wände liegt zwischen 5 und 50 nm [34].

Ferrimagnetische Stoffe verhalten sich prinzipiell ähnlich zu ferromagnetischen Stoffen. Der Unterschied besteht darin, dass sich bei ferrimagnetischen Stoffe Bezirke antiparallel zum angelegten Magnetfeld ausrichten und die Gesamtmagnetisierung dadurch schwächer ausfällt.

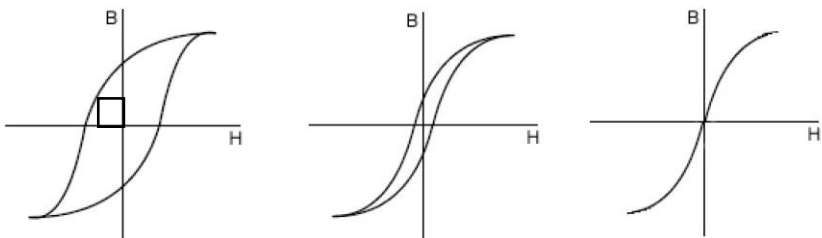
Abbildung 2-6 zeigt schematisch das Magnetisierungsverhalten eines Ferromagneten bei einem wechselnden äußeren Magnetfeld. Sofern der Körper keinem äußeren Feld ausgesetzt war, sind die Weiss'schen Bezirke statistisch verteilt und die Körper weisen keine Magnetisierung aus. Durch das äußere Magnetfeld erfolgt eine parallele Ausrichtung der Weiss'schen Bezirke was mit einer Erhöhung der Magnetisierung entlang der Neukurve einhergeht. Die Magnetisierung steigt solange mit steigender Magnetfeldstärke an, bis alle Bezirke ausgerichtet sind und die magnetische Sättigung ( $M_S$ ) erreicht ist. Liegt die Temperatur unterhalb der Curie-Temperatur behält der Körper auch nach dem Entfernen des äußeren Magnetfeldes eine gewisse Restmagnetisierung – die Remanenzmagnetisierung  $M_R$  - bei. Die thermische Energie reicht in diesem Fall nicht aus, um die Energiebarriere für die Umlagerung aller Weiss'schen Bezirke zu überwinden. Um die Magnetisierung des Körpers zu eliminieren ist ein entgegengesetztes Magnetfeld notwendig. Die Feldstärke, bei der die Magnetisierung auf null zurückgeht ist die Koerzitivfeldstärke  $H_C$ .





**Abbildung 2-6 Hysteresekurve eines Ferromagnets und die schematische Darstellung der Magnetisierungsausrichtung der Weiss'schen Bezirke,  $M_s$ : Sättigungsmagnetisierung;  $M_r$ : Remanenz;  $H_c$ : Koerzitivfeldstärke [1]**

Wie in Abbildung 2-7 gezeigt, lassen sich Materialien abhängig von der Breite der Hysteresekurve in hartmagnetisch, weichmagnetisch und superparamagnetisch einteilen. Hartmagnetische Materialien haben Koerzitivfeldstärken von über 10 000 A/m und weichmagnetische von  $H_c < 1\,000$  A/m. Superparamagnetische Stoffe verlieren außerhalb des Magnetfelds ihre Magnetisierung vollständig.



**Abbildung 2-7 Typische Hysteresekurven von hartmagnetischen, weichmagnetischen und superparamagnetischen Körpern (v.l.n.r.)**

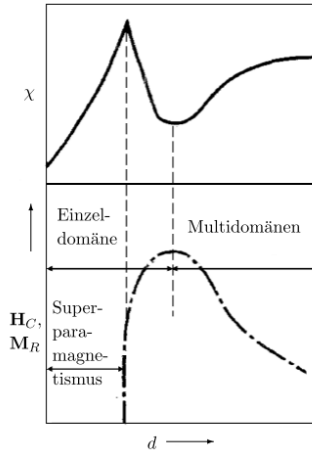
Permanentmagnete bestehen aus hartmagnetischem Material. Ein Maß für die Güte eines Magneten ist das maximale Energieprodukt  $w$ . Es entspricht der Hälfte der Energiemenge  $E_{Mag}$ , die pro Volumeneinheit  $V_E$  in einem Magneten gespeichert ist [37]

$$w = \frac{1}{2} \cdot E_{Mag} = \frac{1}{2} \cdot B \cdot H. \quad (2-19)$$

Veranschaulichen lässt es sich durch das Rechteck mit der größten Fläche, das unterhalb der Hysteresekurve im vierten bzw. zweiten Quadranten möglich ist. Die Gesamtenergie  $W$  eines Magneten ergibt sich aus dem Produkt des Energieprodukts und dem Magnetvolumen  $V$

$$W = w \cdot V = \frac{1}{2} \cdot B \cdot H \cdot V. \quad (2-20)$$

Je höher das Energieprodukt bzw. die Gesamtenergie eines Magnets ist, desto stärker muss ein äußeres Magnetfeld sein um dessen Magnetisierung zu ändern. Wie in Abbildung 2-7 zu sehen, ist das Energieprodukt für superparamagnetische Stoffe null. Superparamagnetismus tritt bei sehr kleinen ferri- und ferromagnetischen Partikeln auf. Unterhalb einer kritischen Größe bestehen die Partikel nur noch aus einem einzigen Weiss'schen Bezirk. Für Eisen oder Eisenoxidpartikel liegt der kritische Durchmesser, ab dem Superparamagnetismus auftritt, zwischen 20 und 50 nm. Abbildung 2-8 zeigt die Abhängigkeit der Remanenz und der Suszeptibilität von der Partikelgröße.



**Abbildung 2-8 Magnetische Suszeptibilität, Koerzitivfeldstärke und Remanenzmagnetisierung in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers [38]**

### 2.2.4.2 Magnetkraft

Analog zu Gl. 2-20 lässt sich die Energie  $E_M$  einer Probe mit dem Volumen  $V_P$  in einem Magnetfeld definieren

$$E_M = \frac{1}{2} \cdot B \cdot H \cdot V_P. \quad (2-21)$$

Daraus lässt sich schließlich die Kraft  $F_M$  ableiten

$$F_M = \mu_0 \cdot V_P \cdot M_P \cdot \nabla H. \quad (2-22)$$

Die Magnetkraft hängt also vom Gradienten des Magnetfeldes und von der Magnetisierung der Probe ab. Problematisch ist dabei einerseits, dass die Stärke der Magnetisierung wiederum von der Stärke des Magnetfeldes abhängt und andererseits, dass es nur für einfache Magnetgeometrien analytische Lösungen für den Verlauf des Magnetfeldes gibt. Auch ist Gl. 2-22 nur für eine magnetisierbare Probe gültig, deren Mag-

netisierung parallel zum Magnetfeld verläuft. Für die Betrachtung komplexer Geometrien oder für ein Mehrkörpersystem stellen FEM-Simulationen eine Möglichkeit für die Kraftberechnung dar.

### 2.3 Grundlagen Zentrifugation

Innerhalb eines Zentrifugalfeldes wirkt auf einen Körper im Abstand  $r$  zur Rotationsachse bei einer Drehzahl  $n$  die relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB). Die Angabe erfolgt als sogenannter C-Wert und gibt die Beschleunigung, die auf die Probe wirkt, als Vielfaches der Erdbeschleunigung  $g$  wieder

$$C = \frac{(2 \cdot \pi \cdot n)^2 \cdot r}{g} \quad (2-23)$$

Bei der RZB handelt es sich um einen Proben und Zentrifugen unabhängigen Wert, der es dadurch ermöglicht verschiedene Prozessbedingungen und Zentrifugen miteinander zu vergleichen. Die absolute Zentrifugalkraft  $F_Z$ , die auf eine Probe wirkt ist proportional, zu deren Masse  $m$  und zum C-Wert

$$F_Z = C \cdot m \cdot g = (2 \cdot \pi \cdot n)^2 \cdot r \cdot m. \quad (2-24)$$

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchsprodukte

#### 3.1.1 Partikelsysteme

Im Rahmen der Arbeit kamen verschiedene Partikelsysteme zum Einsatz. Der Großteil der Versuche erfolgte mit magnetischen Kompositpartikel mit unterschiedlichen Oberflächenmodifizierungen. Die Herstellung solcher Partikel ist meist als zweistufiger Prozess realisiert. Im ersten Schritt findet eine Fällung von Magnetitkolloide aus Eisen(II)Chlorid- und Eisen(III)Chlorid-lösungen statt. Im zweiten Schritt erfolgt dann eine Dispersionspolymerisation. Dabei baut sich eine Polymerschicht um die Magnetitkolloide auf. Durch dieses Verfahren ist zum einen der endgültige Durchmesser der Partikel regulierbar, zum anderen ist die Magnetisierbarkeit der Partikel durch den Magnetitanteil in gewissen Grenzen regelbar. Eine Visualisierung der Partikel ist in Abbildung 4-10 (Seite 68) gezeigt. Der Großteil der Partikel wurde von den Firmen microParticles (Berlin, Deutschland) und micromod Partikeltechnologie GmbH (Rostock, Deutschland) bezogen.

Bei den Partikeln von microParticles handelt es sich um monosphärische, superparamagnetische Partikel. Sie bestehen aus einer Polystyrol-Matrix. Die magnetischen Eigenschaften werden durch Magnetitkolloide im Inneren erreicht. In Tabelle 3-1 sind die wichtigsten Eigenschaften der Partikel zusammen gefasst.

**Tabelle 3-1 Eigenschaften der verwendeten Partikel von microParticles**

Batch-Nr. (und Abk.)	$d_p$ [ $\mu\text{m}$ ]	Dichte [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]	Rauheit <sup>1</sup> $R_q$ [nm]	$M_s^1$ [ $\text{Am}^2/\text{kg}$ ]	$M_R^1$ [ $\text{Am}^2/\text{kg}$ ]
S1645 (PS <sub>1 <math>\mu\text{m}</math></sub> )	1,33	2,24	-	23,4	0,016
S1792 (PS <sub>10 <math>\mu\text{m}</math></sub> )	9,8	1410	70	4,3	0,100
S1985 (PS <sub>19 <math>\mu\text{m}</math></sub> )	18,8	1610	98	8,3	0,007
S1986 (PS <sub>41 <math>\mu\text{m}</math></sub> )	41,1	1530	142	8,1	0,274
(PS <sub>89 <math>\mu\text{m}</math></sub> )	89,0	1490	-	-	-

<sup>1</sup> Die Messungen fanden mit Reinstwasser gewaschenen und anschließend getrockneten Partikeln statt.

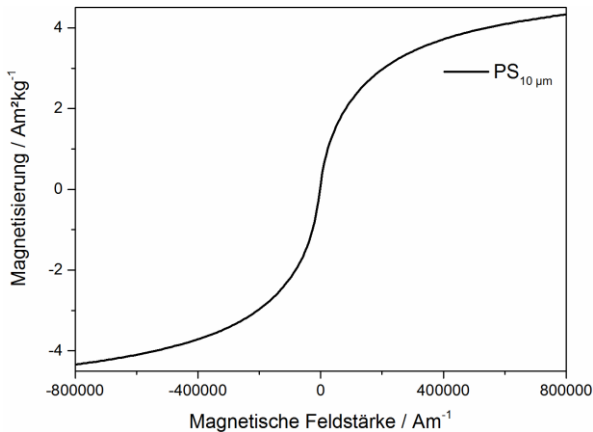
$d_p$ : Partikeldurchmesser

$M_s$ : Sättigungsmagnetisierung

$M_R$ : Remanenz

Mit einer am MVM zur Verfügung stehenden SAXS-Kamera konnten die Durchmesser der Magnetitkerne innerhalb der Polystyrol-Partikel gemessen werden. Der Durchmesser ist ca. 5 nm im Fall der PS<sub>19  $\mu\text{m}$</sub> - und ca. 10,5 nm im Fall der PS<sub>41  $\mu\text{m}$</sub> -Partikel. Magnetit in der Größe weist superparamagnetisches Verhalten auf. Abbildung 3-1 zeigt eine typische Magnetisierungskurve der Partikel am Beispiel der PS<sub>10  $\mu\text{m}$</sub> -Partikel. Die Magnetisierungskurven zeigen, dass sich auch die Kompositpartikel superparamagnetischen verhalten, obwohl ihr Durchmesser im Mikrometerbereich liegt.

Die höchste Remanenz wiesen die PS<sub>41  $\mu\text{m}$</sub> -Partikel auf und selbst diese ist mit 0,275  $\text{Am}^2/\text{kg}$  schwach. Aufgrund der gleichen Herstellungsweise ist davon auszugehen, dass die Magnetitkolloide innerhalb der anderen Partikel eine ähnliche Größe aufweisen.



**Abbildung 3-1 Magnetisierungskurve PS<sub>10 µm</sub>-Partikel**

Weitere acht Partikelsysteme wurden von der Firma micromod bezogen. Vier der Partikelsysteme wiesen eine chemische und vier eine biologische Oberflächenmodifikation auf. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit den Partikeln von microParticles zu erreichen, bestanden die Partikel von micromod ebenfalls aus einer Polystyrol-Matrix mit inkorporierten Magnetitkolloiden. Bei den vier chemischen Oberflächenmodifizierungen handelt es sich um NH<sub>2</sub>-, PEG-NH<sub>2</sub>-, COOH- und PEG-COOH-Gruppen. Die Partikel mit PEG-COOH-Funktionalisierung dienen als Ausgangspunkt für die biologischen Modifizierungen. Abbildung 3-2 zeigt den schematischen Ablauf der Proteinbindung an die Partikeloberfläche. Zunächst erfolgt eine Carbodiimid/ N-Hydroxysuccinimid Aktivierung der Partikel. Das ermöglicht eine anschließende Reaktion der Partikel mit einer Amino-Gruppe der zu bindenden biologischen Komponente (genaue Beschreibung siehe [39]).



**Abbildung 3-2 Schematischer Ablauf der Proteinbindung an die Partikeloberfläche**

In Tabelle 3-2 sind die wichtigsten Eigenschaften der Partikel von Micro-mod zusammengefasst.

**Tabelle 3-2 Eigenschaften der verwendeten Partikel von Micromod**

Partikel-system	$d_p$ [ $\mu\text{m}$ ]	Dichte [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]	$M_s$ [ $\text{Am}^2/\text{kg}$ ]	$M_r$ [ $\text{Am}^2/\text{kg}$ ]	$\zeta$ -Pot.* [mV]	pI [-]
M-Avidin	10	1200	1,5	0,292	-35	3,9
M-SA	10	1160	1,5	0,307	-45	3,3
M-Prot A	10	1170	1,5	0,300	-45	3,4
M-BSA	10	1180	1,5	0,290	-40	3,7
M-COOH	10	1100	2,1	0,340	-45	2,7
M-PEG-COOH	10	1160	2,1*	0,340**	-55	4,4
M-NH <sub>2</sub>	10	1080	2,1*	0,340**	-55	4,8
M-PEG-NH <sub>2</sub>	10	1080	2,1*	0,340**	-45	4,4

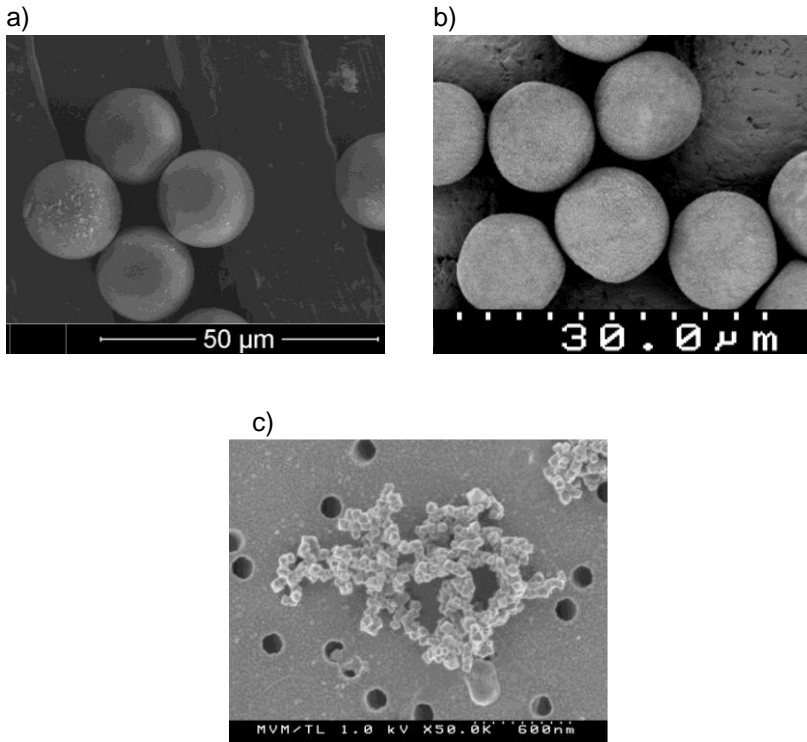
\*  $\zeta$ -Potential bei pH 7

\*\* Werte wurden von Hersteller übernommen

Die Proteinbeladung der Partikel betrug jeweils  $200 \mu\text{g}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Partikel}}$

Bei den Polystyrol-Magnetit-Partikeln handelt es sich um gut definierte Partikel, die mit bis zu 5800 €/g (Vertriebspreis) jedoch sehr kostenintensiv und so in einem Prozess nicht einsetzbar sind. Deshalb fanden zusätzlich Untersuchungen mit MagPrep TMAP-Partikeln (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) statt. Die Partikel weisen die Anionenaustauschgruppe (Trimethylammoniumpropyl) auf. Im Gegensatz zu den Partikeln von Micromod erfolgt die Proteinbindung in diesem Fall über eine vergleichsweise schwache Ionenbindung. Die Partikel sind mit einem Primärpartikeldurchmesser von 100 nm zwei Größenordnungen kleiner als die Partikel der anderen beiden Hersteller. Die Partikel neigen außerdem zur Formung von Agglomeratstrukturen. In Abbildung 3-3 sind beispielhafte REM-Aufnahmen von den einzelnen Partikeltypen gezeigt.



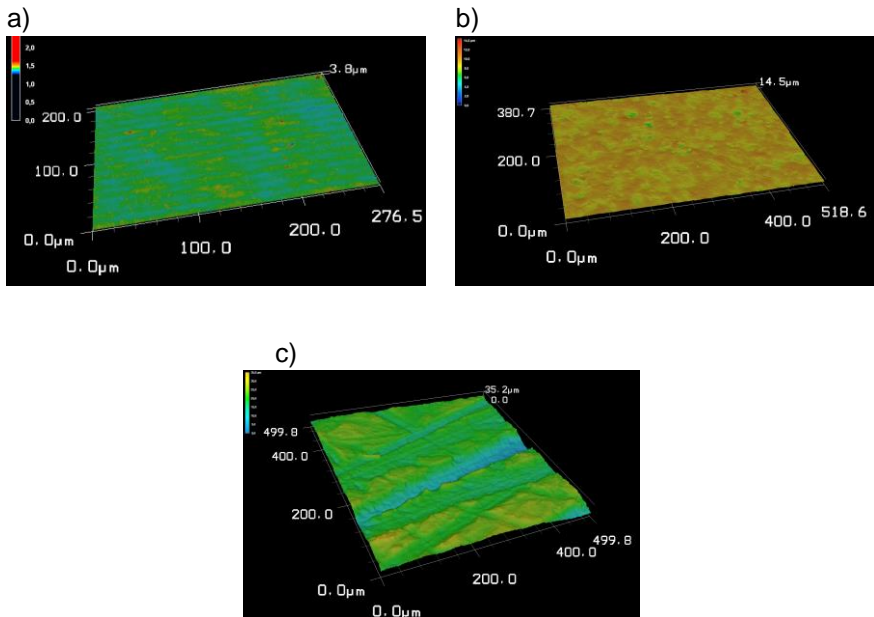


**Abbildung 3-3** Beispielbilder der jeweiligen Partikeltypen von a) microParticles,  $x_{50}=9,8\ \mu\text{m}$ , ohne Funktionalisierung; b) micromod,  $x_{50}=10\ \mu\text{m}$ , COOH-Funktionalisierung; c) MagPrep TMAP;  $x_{50,\text{Partikel}}=0,1\ \mu\text{m}$ ,  $x_{50,\text{Agglomerat}}\sim 1,9\ \mu\text{m}$

### 3.1.2 Substrate

Substrat bezeichnet bei den Versuchen den Haftpartner für die Partikel bei der Untersuchung der Partikel-Substrat-Wechselwirkungen. Zum Einsatz kamen Polyvinylchlorid (PVC) (hart, KTK Kunststofftechnik Vertriebs GmbH, Germany), Polymethylmethacrylat (PMMA) (Plexiglas® 99524 GT, Evonik Industries AG, Darmstadt, Deutschland) und Glas (Typ Kalknatronglas, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland).

Durch Sandstrahlen und Schleifen fand eine Modifizierung der Oberflächenrauheiten der PVC Substrate statt. Für das Sandstrahlen kamen Glaskugeln mit einem Durchmesser zwischen 200 und 400  $\mu\text{m}$  (Apparatyp Strahlboss 140, Osu Günter Hessler GmbH & Co. KG, Bochum, Deutschland) zum Einsatz. Eine zusätzliche Variation der PVC-Substratoberfläche erfolgte durch Bearbeitung mit Schleifpapier (Körnung 100). Abbildung 3-4 zeigt die Falschfarben-Höhenprofile der drei Bearbeitungsarten von PVC-Substraten. Während die Oberflächen der unbearbeiteten Substrate und nach dem Sandstrahlen eine sehr gleichmäßige Oberflächenstrukturierung aufwiesen, war die Oberfläche nach dem Schleifen unregelmäßig und mit Rillen durchsetzt.



**Abbildung 3-4 Falschfarben-Höhenprofile von PVC-Substraten; a) unbearbeitet, b) sandgestrahlt, c) geschliffen**

Die Eigenschaften der Substratmaterialien sind in Tabelle 3-3 zusammengestellt.

**Tabelle 3-3 Eigenschaften der Substratmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Rauheiten <math>R_q</math></b> [nm]	<b>E-Modul</b> [GPa]
PVC	19 / 532* / 5200**	2,7 <sup>1</sup>
Glas	9	73,4 <sup>2</sup>

\*nach Sandstrahlen

\*\* nach Behandlung mit Schleifpapier

Quellen: <sup>1</sup>Herstellerangabe ktk-GmbH;<sup>2</sup>[40];

### 3.1.3 Magnete

Für die Erzeugung der Magnetfelder kamen Neodym-Eisen-Bor-Magnete (NdFeB-Magnete) und Samarium-Kobalt-Magnete (SmCo-Magnete) (alle Magnete von BR Technik Kontor GmbH, Mittelangeln, Deutschland) zum Einsatz. Bei NdFeB-Magneten handelt es sich um die stärksten aktuell verfügbaren Permanentmagnete. Ihre Remanenzflussdichten erreichen bis zu 1,3 T. Im Gegensatz dazu sind SmCo-Magnete mit Remanenzflussdichten ab 0,85 T relativ schwach. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsanordnungen hatten die Magnete zum einen eine Zylindergeometrie mit einem Durchmesser von  $\varnothing$  7 mm und einer Höhe von 7 mm und zum anderen eine Quadergeometrie mit einer Kantenlänge von 10 mm. Die Magnete mit Zylinderform waren in axialer Richtung magnetisiert. Die Eigenschaften der Magnete sind in Tabelle 3-4 zusammen gefasst.

**Tabelle 3-4 Eigenschaften der eingesetzten Magnete**

<b>Magnettyp</b>	<b><math>R_z^*</math></b> [T]	<b><math>B^{**}</math></b> [T]
N33 – zyl.	1,14-1,17	0,45
N52 – zyl.	1,42-1,47	0,51
YX18 – zyl.	0,85-0,90	0,34
N52 – quad.	1,42-1,47	0,50

\*Herstellerangaben

\*\* maximale Flussdichte auf der Oberfläche, gemessen mit HallSonde (typ FH51, Magnet-Physik GmbH, Köln, Deutschland)

$R_z$ : Remanenz

B: Magnetische Flussdichte

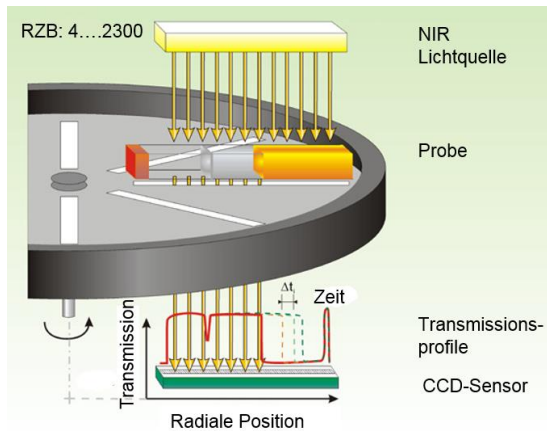
### 3.1.4 Pufferlösungen

Für die Untersuchung des Einflusses der elektrostatischen Abstoßung und der hydrophoben Wechselwirkungen auf die Haftkraft waren unterschiedliche Puffer notwendig. Die Herstellung aller Puffer erfolgte mit Reinstwasser (Arium Pro Reinstwasseranlage, Sartorius, Göttingen, Deutschland). Für das Wiegen der Chemikalien stand eine Feinwaage (Typ LE225D-0CE (Sartorius, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung. Die Chemikalien Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ , Reinheit >99,8 %), Citronensäure ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , Reinheit >99,5 %, wasserfrei), Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ , Reinheit >99 %), Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Reinheit >99 %); Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Reinheit >98 %), Natriumthiocyanat ( $\text{NaSCN}$ , Reinheit >98 %) lieferte die Firma Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland.

## 3.2 Versuchsapparaturen und Versuchsdurchführung

### 3.2.1 Zentrifuge

Für die Versuche stand eine Laborzentrifuge (Typ LUMiSizer, LUM GmbH, Berlin, Deutschland) zur Verfügung (Abbildung 3-6 links, Seite 33). Die Zentrifuge ist mit einem PC verbunden von dem sie mit der Software SepView 6 steuerbar ist. Der Drehzahlbereich liegt zwischen 200 und 4000  $\text{min}^{-1}$ . An der Rotorwand entspricht das einer RZB von 4 bis 2300. Die Temperatur ist in einem Bereich von 4 bis 40°C regelbar. Die Zentrifuge verfügt außerdem über eine integrierte Optik, die die Transmission radial über die Probenlänge während der Zentrifugation erfasst. Abbildung 3-5 zeigt den schematischen Optikaufbau. Eine farbliche Codierung visualisiert den zeitlichen Verlauf der einzelnen Profile. Die erste Transmissionskurve ist grün, die letzte ist rot dargestellt. Den übrigen Kurven werden Zwischenfarbtöne zugeordnet.



**Abbildung 3-5 Schematische Darstellung der Optik innerhalb des LumiSizers und der gemessenen Transmissionsprofile [LUM GmbH].**

### 3.2.2 Laser-Scanning-Mikroskop

Die Vermessung und Charakterisierung der Substrat- und Partikeloberflächen erfolgt mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) (Typ VK-X110 mit Steuergerät VK-X100K, Keyence Corporation, Osaka, Japan). Der Messkopf verwendet einen roten Halbleiterlaser der Wellenlänge 658 nm. Für die Messung führt der Messkopf den Laser in X- und Y-Richtung über die Oberfläche und rastert die Oberfläche dadurch in der Fokusebene ab. Der Vorgang wird über die gesamte Strukturhöhe für eine Vielzahl von Fokusebenen durchgeführt. Im Anschluss setzt die Software die Bilder der einzelnen Ebenen zu einem drei dimensional Bild zusammen. Die genaue Einstellung der Fokusebene erfolgt mit einem Piezokristall mit einem minimalen Verstellschritt von 5 nm.

Aus den Messdaten ist die Rauheit der Probenoberfläche berechenbar. Berechnungsmodelle für die v.d.W.-Kraft in denen die Rauheit berücksichtigt ist, nutzen als Größe meist die mittlere quadratische Rauheit  $R_q$  (siehe Kapitel 2.2.1)

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l} \cdot \int_0^l z^2(x) dx}, \quad (3-1)$$

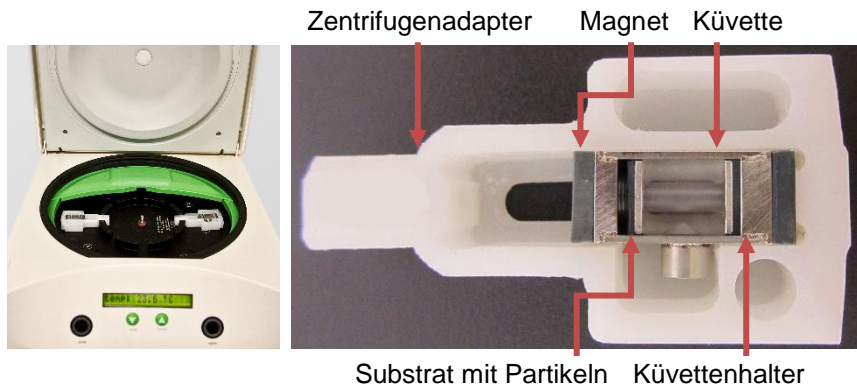
die den quadratischen Mittelwert der Profilhöhe aller Ordinatenwerte  $z(x)$  innerhalb der Einzelmessstrecke  $l$  angibt [41].

Vor der Auswertung ist es möglich eine Neigungskorrektur der Probe durchzuführen. Dadurch kann zum einen eine eventuelle Neigung der Substrate während der Messung korrigiert werden, zum anderen ist dadurch die Kugelform der Partikel kompensierbar.

### 3.3 Haftkraftmessung

#### 3.3.1 Zentrifugenmethode

Die Messung der Haftkräfte erfolgte hauptsächlich mit der Zentrifugenmethode. Bei der Zentrifugenmethode werden die Partikel mit dem Substrat in Kontakt gebracht und anschließend einem Zentrifugalfeld ausgesetzt. Im Verlauf der Messungen werden die Drehzahl und damit die Zentrifugalkraft schrittweise erhöht. Bei bekannter Geometrie der Partikel und der Zentrifuge lässt sich die Zentrifugalkraft berechnen, und somit auch die Haftkraft. Der Messaufbau ist modular gestaltet, sodass ein Großteil der Komponenten für alle Messungen verwendbar ist. Die drei Hauptkomponenten bilden die Küvette, die Küvettenhalterung und der Zentrifugenadapter. Abbildung 3-6 zeigt auf der linken Seite die Zentrifuge mit eingebauten Küvettenadaptern samt Küvetten und auf der rechten Seite eine Nahaufnahme einer Messkonfiguration, wie sie bei Partikel-Wand-Haftkraftmessung in Normalenrichtung einsetzbar ist.



**Abbildung 3-6 Aufnahme der offenen Zentrifuge mit Küvettenadaptern samt Küvetten (links); Detailsicht der Komponenten (Konfiguration Partikel-Wand-Haftkraftmessung in Normalenrichtung) (rechts).**

Durch Dichtungsringe ist die Küvette gegen die Substrate abgedichtet. Von allen Komponenten gibt es verschiedene Varianten, die abhängig von der jeweiligen Messanforderung miteinander kombinierbar sind. Der genaue Aufbau für die speziellen Anordnungen ist im Folgenden beschrieben.

### 3.3.1.1 Haftkraftmessung Partikel-Wandkontakt

Die Messungen der Partikel-Substrat- Haftkräfte fanden in normaler und in radialer Richtung statt. Dank des modularen Aufbaus der Probenhalter, müssen lediglich die Substrate für die entsprechenden Versuche angepasst werden. Auch der prinzipielle Versuchsablauf ist für beide Ablöserichtungen gleich. Er umfasst die Schritte: Probenreinigung, Partikelwaschung, Küvettenzusammenbau, Bildaufnahme samt Bildauswertung und Zentrifugation.

### *Probenreinigung*

Die Reinigung der Substrate ist notwendig, um Verunreinigungen zu entfernen und um definierte Ausgangsbedingungen für die Versuche zu realisieren. Die Reinigung findet in drei Schritten statt. Zuerst werden die Substrate mit Isopropanol und einem faserarmen Linsenreinigungstuch gereinigt, um Fettreste zu entfernen. Danach werden sie mit einem zweiten Linsenreinigungstuch und Reinstwasser gereinigt um eventuelle Rückstände des Isopropanol zu entfernen. Im letzten Schritt werden die Substrate in Reinstwasser in einer 100 ml Schott-Flasche für 10 Minuten im Ultraschall behandelt, um etwaige Reste der Linsentücher zu entfernen. Die Küvetten und Dichtungsringe befinden sich dabei ebenfalls in der Schott-Flasche.

### *Partikelwaschung*

Bei den Partikelsystemen handelt es sich um kommerzielle Partikel, die als Suspension geliefert werden. Durch die Partikelwaschung sollen zum einen Verunreinigungen, die noch in der Muttersuspension enthalten sind, entfernt werden und zum anderen können die Partikel in den Versuchspuffer überführt werden. Für die Waschung werden 500 µl des Versuchspuffers in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß (Eppi) pipettiert und abhängig von der Ausgangskonzentration zwischen 1 und 10 µl der Originalpartikelsuspension dazugegeben. Nach ca. 10 s Mischzeit werden die Partikel durch einen Magneten an den Boden des Eppis gezogen. Der Überstand wird mit einer Pipette abgezogen und durch frischen Versuchspuffer ersetzt. Der Waschschrift wird wiederholt und der Puffer noch einmal ausgetauscht.

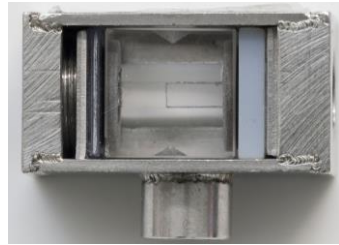
### *Küvettenzusammenbau*

Die einzelnen Komponenten sind nummeriert, sodass die einzelnen Proben immer aus denselben Komponenten bestehen. Das ist zum einen



wichtig, da die Zusammenstellung die Unwucht bei der Zentrifugation minimiert und zum anderen eventuelle systematische Abweichungen oder Fehler einer Probe so besser nachzuvollziehen sind. Finden die Haftkraftmessungen in Normalenrichtung statt, wird die Küvette mit einem Dichtungsring auf beiden Seiten in den entsprechenden Küvettenhalter gelegt. Anschließend wird ein Substratplättchen zwischen dem Küvettenhalterboden und den unteren Dichtungsring gelegt. Als Küvettenhalterboden ist die Seite mit der Bohrung definiert. Ein Edelstahlmontageplättchen ( $10 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$ ) wird auf der oberen Küvettenseite eingefügt und die Küvette durch die Hohlschraube auf der Oberseite verschraubt. Durch einen Drehmomentschraubenzieher (Wera, Wuppertal, Germany) ist es möglich ein Drehmoment von  $0,3 \text{ Nm}$  für die Anpressung aller Dichtungsringe zu erzeugen. Die Küvetten verfügen über eine Konus förmige Vertiefung an der Seite. Durch eine zweite Schraube können die Küvetten dadurch seitlich so fixiert werden, dass die obere Schraube gelöst werden kann, ohne den Anpressdruck der unteren Dichtungsringe zu reduzieren. Das ist notwendig, damit bei der Befüllung mit der Partikelsuspension keine Flüssigkeit ausläuft. Bei den Kunststoffküvetten kommen dabei Metallschrauben mit entsprechender konusförmiger Spitze zum Einsatz. Zum Schutz der Glasküvetten kommen bei ihnen Gummidichtungskugeln zum Einsatz, die von einer Stahlschraube in die Vertiefung der Küvette gedrückt werden. Die Position der Schraube ist in beiden Fällen so gewählt, dass ihr Mittelpunkt ca.  $0,2 \text{ mm}$  unter dem Mittelpunkt der Vertiefung liegt. In Kombination mit der Konusgeometrie lässt sich somit der notwendige Anpressdruck erreichen. Nachdem die seitliche Verschraubung fixiert ist kann die obere Schraube gelöst und das Montageplättchen entfernt werden. Im Anschluss werden ca.  $70 \mu\text{l}$  Versuchspuffer in die Küvetten pipettiert. Dadurch ist es einfacher die  $1$  bis  $4 \mu\text{l}$  gewaschene Partikelsuspension dazu zugeben. Das genaue Volumen richtet sich nach der Partikelkonzentration und muss so gewählt werden, dass die Partikel vereinzelt auf dem Substrat liegen. Bei der Substratbeladung befindet sich ein Magnet in der unteren Bohrung, wodurch die Partikel schneller sedimentieren und sich nicht an der Küvettenwand anlagern. Abschließend wird solange Puffer in die Küvette pipettiert, bis sich ein Meniskus an der Küvettenoberseite ausbildet. Mit einem durchsichtigen Deckplättchen wird die Küvette abgeschlossen. Der Meniskus ist notwendig, damit beim Abdecken keine Luftblasen in der Küvette verbleiben. Im Anschluss wird die obere Schraube fixiert und die Küvette verschlossen.

Der Zusammenbau für die Versuche in radialer Richtung erfolgt prinzipiell gleich. Ein Unterschied ergibt sich durch die unterschiedlichen Substratgeometrien. Bei den Versuchen in radialer Richtung sind die Substrate zum einen mit  $7 \times 2 \times 1 \text{ mm}^3$  (LxBxT) kleiner und zum anderen befinden sie sich, wie in Abbildung 3-7 zu sehen ist, in der Küvette und nicht an deren Rand. Die Substrate selbst sind in Hilfsplättchen geklebt. Die Hilfsplättchen sind 3D gedruckt und haben eine Aussparung für die Substrate an der entsprechenden Stelle. Während sich bei dem Aufbau in Normalenrichtung lediglich das Substrat (1 mm) zwischen den Partikeln und dem Magneten befindet, kommt beim Aufbau in radialer Richtung noch die Küvettenwand (insgesamt 3 mm) hinzu. Für die Anziehung der Partikel wäre daher ein wesentlich größerer Magnet notwendig. Dieser könnte die Partikel beim Einbringen und Entfernen der Küvette in das bzw. aus dem Magnetfeld jedoch von dem Substrat herunter ziehen. Aus diesem Grund wird das Substrat zuerst, wie oben beschrieben, beladen und die Küvette verschlossen. Anschließend wird sie auf einen Elektromagneten (Typ GTO50, Magnetfläche  $\varnothing 5 \text{ mm}$ , Nennkraft 1000 N, Tremba GmbH, Hallbergmoos-Goldach, Deutschland) gelegt und der Elektromagnet für 10 s aktiviert, dadurch werden die Partikel auf das Substrat gezogen.



**Abbildung 3-7 Küvettenhalter mit Küvette; Konfiguration für Messungen in radialer Richtung**

Nach dem Beladen erfolgt die erste Mikroskopaufnahme der Substrate um die Ausgangspartikelanzahl zu bestimmen. Im Anschluss wechseln sich jeweils ein Zentrifugations- und ein Bildaufnahmeschritt ab.

### *Bildaufnahme und Bildauswertung*

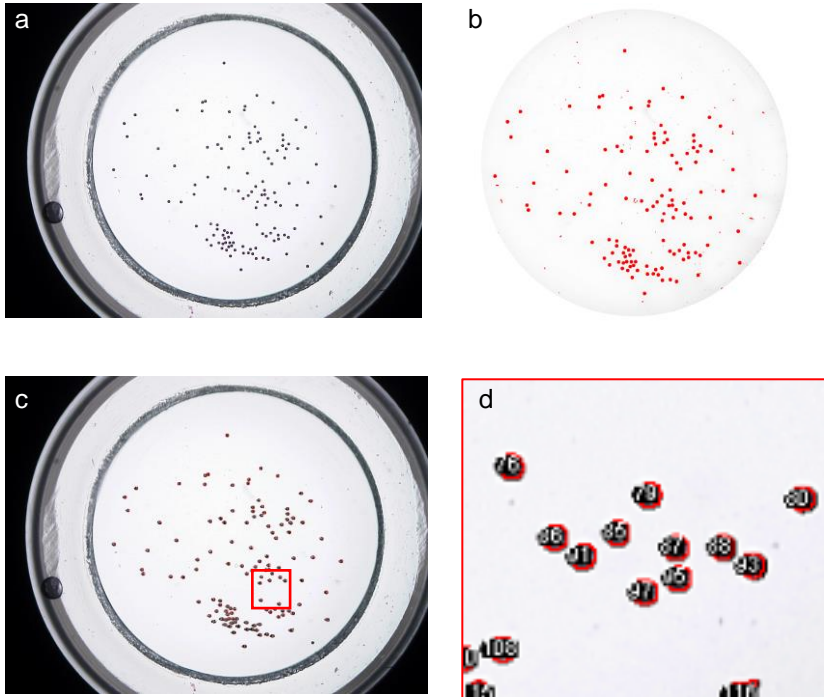
Für die Aufnahme der Partikel auf der Substratoberfläche steht das Durchlichtmikroskop (Typ BZ-8000, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) zur Verfügung. Aus diesem Grund müssen die Substrate durchsichtig sein. Das Mikroskop verfügt über einen elektronischen XY-Tisch und über eine integrierte Kamera. Das ermöglicht es einen Bildausschnitt mit mehreren Einzelbildern zu erfassen und ihn dadurch mit einer höheren Vergrößerung abzubilden. Für das System

stehen ein 4x-Objektiv mit einer numerischen Apertur (NA) von 0,2 und einem Arbeitsabstand (AB) von 20 mm und ein 10x-Objektiv mit einer NA von 0,3 und einem AB von 16 mm (beide Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) zur Verfügung.

Die Auswertung der Bilder erfolgt für alle Konfigurationen mit der freiverfügbaren und quelloffenen (engl. Open Source) Software ImageJ. Der prinzipielle Ablauf der Bildauswertung ist immer der gleiche. Die einzelnen Auswerteparameter müssen jedoch für das jeweilige Objektiv, Probenaufbau, Partikelgröße etc. angepasst werden. Bei der Bildauswertung der Versuche in radialer Richtung werden zusätzlich zu der Partikelanzahl auch deren Koordinaten gespeichert. Dadurch ist es möglich eine Partikelbewegung infolge der Zentrifugation zu verfolgen. Bei den Versuchen in Normalenrichtung ist das hin gegen nicht notwendig, da sich die gelösten Partikel von der Oberfläche wegbewegen.

In Abbildung 3-8 sind die wichtigsten Stufen der Bildauswertung am Beispiel eines Bild eines Versuchs in Normalenrichtung zusammengefasst. Bild a) stellt das Originalbild dar. Der innere helle Kreis ist die Substratoberfläche, auf der die Partikel liegen. Daran schließt sich ein zweiter, etwas dunklerer Kreis an. Das ist ein Teil der PMMA-Küvette, die durchleuchtet wird. Im Anschluss daran blockiert der eingesetzte Dichtungsring das Licht und das Bild ist schwarz. Für die Bildauswertung wird für jedes Bild der interessierende Bereich ausgewählt und das restliche Bild verworfen. Kleinere Substrat- und Beleuchtungsungleichmäßigkeiten sind durch eine Korrektur des Hintergrundes mit *subtract background* korrigierbar. Danach erfolgt die Konvertierung des Bilds in ein 8-bit Graustufenbild. In diesem Bild liegen die Farbwerte zwischen 255 (weiß) und 0 (schwarz). Für die Zählung der Partikel ist jedoch ein schwarzweißes Binärbild notwendig. Um die Konvertierung des graustufen Bildes durchführen zu können ist ein Schwellenwert (engl. *threshold*) festzulegen. Pixel deren Werte kleiner sind als der Schwellenwert bekommen den Wert 1 zugewiesen und sind damit weiß, alle Pixel deren Wert gleich und größer ist erhalten den Wert 0 und sind damit schwarz. Im Bild b) sind die Bereiche, deren Wert über dem Schwellenwert von 235 liegt (zur besseren Sichtbarkeit) rot markiert. Obgleich alle Bilder mit denselben Einstellun-

gen aufgenommen werden, sind dennoch für viele Bilder individuelle Einstellungen des Schwellenwertes notwendig.



**Abbildung 3-8** Beispielhafter Auswertungsverlauf für die Konfiguration in Normalrichtung für ein PVC-Substrat mit  $PS_{41\ \mu m}$ -Partikeln. a) Ausgangsbild; b) nach den Bearbeitungsschritten Arbeitsfläche ausschneiden, Hintergrund abziehen (*rolling= 50 light*), Threshold (0-231); c) Überlagerung der Ergebnismaske der Partikelzählung und des Originalbilds, Zählparameter Fläche zwischen 30 und 130  $px^2$  und Zirkularität zwischen 0,6 und 1,0; d) Vergrößerter Bildausschnitt aus c); insgesamt 121 Partikel

Oftmals wird dabei ein Teil der Partikel nicht erkannt und die entsprechenden Pixel zu 1 (weiß) gesetzt. Das kann zum einen Teile des Partikelrands, aber auch Bereiche innerhalb der Partikelfläche betreffen. Durch eine Reihe von Anpassungen ist es dennoch möglich die Partikel in der Zählung mit zu erfassen. Mit *close* können zunächst Partikelränder

geschlossen werden, bei denen ein Stück des Randes bei der Schwellenwertsetzung nicht erkannt wurde. Durch *Fill holes* ist im Anschluss der innere Bereich ausfüllbar. Liegen zwei oder mehrere Partikel aneinander, so sind die Bereiche teilweise durch *Watershed* voneinander trennbar. Nach den Korrekturen kann die Partikelanzahl mit der *Analyze Particle-Funktion* ausgewertet werden. Die einstellbaren Parameter umfassen die Fläche, die ein Bereich haben darf um als Partikel gezählt zu werden, sowie die Zirkularität, mit deren Hilfe sich nicht runde Bereiche, bspw. Bruchstücke, aussortieren lassen. Aufgrund kleiner Unterschiede bei der Beleuchtung, Substratungleichmäßigkeiten sowie Fehlern bei Bearbeitungs- und Korrekturschritten kann es zu Abweichungen der gezählten von der tatsächlichen Partikelanzahl kommen. Deshalb schließt sich ein manueller Prüfvorgang an die automatisierte Auszahlung an. Dafür werden die Bilder mit den gezählten Bereichen (siehe Abbildung 3-8 c und d) betrachtet. Bereiche die gezählt wurden, jedoch keinen Partikel darstellen können aus der Ergebnisliste gelöscht und fehlende Partikel können durch die Funktion *point picker* zusammen mit den Koordinaten an die Ergebnisliste übergeben werden. Durch das Vorgehen können Fehler bei der Partikelzählung ausgeschlossen werden.

### *Zentrifugation*

Für den Zentrifugationsschritt wird die Probe mit dem Zentrifugationsadapter in die Zentrifuge gelegt. Es ist darauf zu achten, dass das Substrat mit den Partikeln näher an der Rotationsachse liegt als das Detektorplättchen, damit die Partikel abgeschleudert werden können. Die Zentrifugationsdauer beträgt 90 s inklusive der Beschleunigungszeit. Die Beschleunigungszeit beträgt maximal fünf Sekunden.

#### 3.3.1.2 Haftkraftmessung Partikel-Partikel-Kontakt

Die Messung der Haftkraft zwischen zwei kleinen Partikeln ( $d < 50 \mu\text{m}$ ) ist mit gewissen Schwierigkeiten verbunden. Zum einen sind die Haftkräfte

kleiner als im Partikel-Substrat-Kontakt, zum anderen müssen die Partikel genau positioniert werden. Mit einem AFM sind solche Messungen möglich. Die Messungen sind jedoch sehr zeitintensiv.

Im Rahmen der Arbeit wurde jedoch ein anderer Ansatz zur Haftkraftmessung entwickelt. Dieser basiert auf der Betrachtung der Haftkräfte innerhalb eines Partikelhaufwerks. Dafür wird ein Partikelhaufwerk in der Küvette aufgebaut. Im LumiSizer wird die Küvette mit Partikelhaufwerk so eingebaut, dass die Zentrifugalkraft das Partikelhaufwerk auflöst. An einem bestimmten Punkt herrscht ein Kräftegleichgewicht zwischen der trennenden Zentrifugalkraft und der Haftkraft der Partikel im Haufwerk. Die Lage der Gleichgewichtsposition ist unter anderem abhängig von der Drehzahl. Je höher die Drehzahl ist, desto weiter nähert sich die Haufwerksgrenze der Küvettenwand an. Mit Hilfe der integrierten Optik kann die Position der Haufwerksgrenze und dadurch die Haftkraft der obersten Partikelschicht ermittelt werden.

Abbildung 3-9 zeigt auf der linken Seite die Küvette mit zwei Varianten der Substratplättchen. Die verwendeten Glasküvetten sind dieselben wie für die Partikel-Wand-Haftkraftmessungen in radialer Richtung. Jedoch unterscheiden sich die Substratplättchen. Das obere Plättchen weist eine  $3 \times 2 \times 1 \text{ mm}^3$  starke Erhöhung auf. Durch diese Erhöhung wird der undurchsichtige Bereich des O-Rings überbrückt und der Küvettenboden verlagert sich in den Messbereich des LumiSizers. Die Drähte des unteren Substratplättchens bestehen aus stark magnetisierbarem Stahl (1.4016) mit dem Durchmesser von 0,6 mm und einer Höhe von 3,5 mm.

Auf der rechten Seite sind der Zentrifugenadapter mit Küvettenhalter samt Küvette und Substraten im zusammengebauten Zustand jedoch ohne Partikel zu sehen. Die roten Rechtecke markieren die Bereiche in denen ein Magnet angebracht werden kann. Aufgrund geometrischer Einschränkungen kommen zwei verschiedene Magnetgeometrien zum Einsatz. In den Küvettenboden können zylindrischen Magnete eingesetzt werden, wodurch das Magnetfeld parallel zur Zentrifugalkraft wirkt. In die Seite des Zentrifugenadapters sind quaderförmige Magnete einsetzbar. Damit ist der Verlauf der Magnetkraft orthogonal zur Zentrifugalkraft.

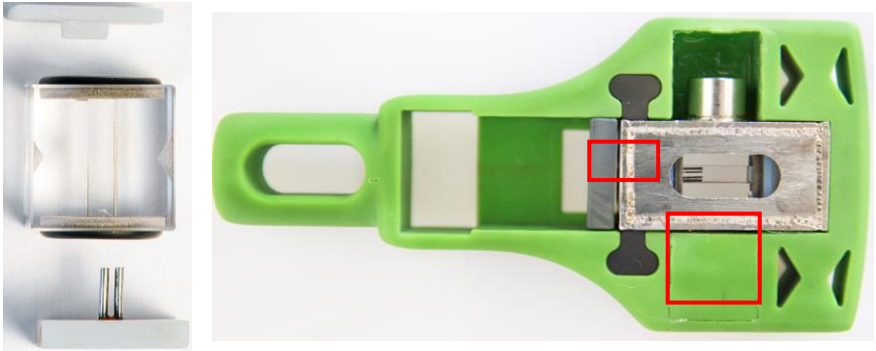


Abbildung 3-9 Links) Kuvette; das obere Substratplättchen ist für Versuche mit der Magnetkraft parallel zur Zentrifugalkraft, das untere Substratplättchen mit Metalldrähten ist für Versuche mit Magnet orthogonal zur Zentrifugalkraft; rechts) Zentrifugenadapter mit Kuvettenhalter, die roten Rechtecke markieren die Positionen an denen während der Versuche ein Magnet angebracht werden kann.

In Abbildung 3-10 sind die schematischen Darstellungen der beiden Versuchsanordnungen gezeigt.

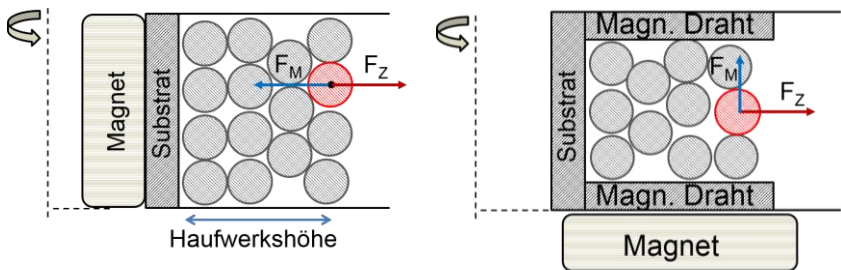
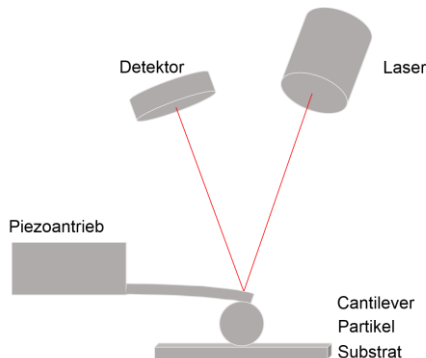


Abbildung 3-10 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung; links) Magnetkraft parallel zu Zentrifugalkraft; rechts) Magnetkraft orthogonal zu Zentrifugalkraft.

### 3.3.2 AFM - Messungen

Die Messungen erfolgten an einem AFM (Typ NanoWizard®II, JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland) des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung in Mainz.

Abbildung 3-11 zeigt den schematischen Aufbau eines AFMs für die Partikelhaftkraftmessung. Die Hauptkomponenten des AFMs bilden ein Laser, ein Piezoantrieb, an dem eine mikroskopische Blattfeder (engl. Cantilever) angebracht ist und einem Photodetektor. Der Laser ist so angeordnet, dass der Laserstrahl von der Rückseite des Cantilevers reflektiert wird. Ändert der Cantilever seine Position ändert sich auch der Punkt, an dem der Laserstrahl auf den Photodetektor auftritt. Dadurch ist die Auslenkung des Cantilevers messbar. Für die Partikelhaftkraftmessung wird ein Partikel an die Unterseite des Cantilevers geklebt. Mit Hilfe des Piezomotors ist es möglich, den Partikeln kontrolliert mit der Oberfläche des Substrats in Kontakt zu bringen und anschließend den Partikeln abzuziehen. Treten anziehende Kräfte zwischen Partikel und Substrat auf, so bleibt der Partikel auf der Oberfläche haften und der Cantilever verbiegt sich während er vom Piezoantrieb von der Oberfläche entfernt wird.



**Abbildung 3-11 Schematischer Aufbau eines AFMs für die Partikelhaftkraftmessung.**



Über das hooksche Gesetz lässt sich aus der Auslenkung  $l$  und der Federkonstante  $D$  die Haftkraft  $F$

$$F = D \cdot l \quad (3-2)$$

berechnen.

### *Cantilever-Präparation*

Das Aufkleben der Partikel erfolgt mit einem 2-Komponenten Epoxidharz unter einem Makroskop. Dabei besteht die Gefahr, dass sich Klebstoffreste an den Partikel anlagern und damit die Haftergebnisse verfälschen. Deshalb ist es wichtig eine sehr geringe Klebstoffmenge zu verwenden. Um das zu erreichen wird zunächst ein Klebstofftropfen auf einem Mikroskopobjektträger vermischt. Die Menge ist dabei unwichtig, da der Tropfen nur als Ausgangspunkt dient, aus dem mit einem Cantilever eine kleine Klebstoffmenge entnommen wird. Dafür wird ein Cantilever mit doppelseitigem Klebeband so an einem Mikromanipulator befestigt, dass er unter dem Makroskop zu sehen ist. Der Cantilever wird nun in den Klebstofftropfen gefahren. Eine kleine Klebstoffmenge bleibt am Cantilever haften. Nun wird der Cantilever fünf bis sechs Mal auf dem Objektträger neben dem Ausgangstropfen aufgesetzt. Bei jedem Aufsetzen bleibt eine kleine Menge Klebstoff auf dem Substrat zurück, wobei jeder neue Tropfen kleiner ist als der vorherige. Anschließend wird der Cantilever getauscht und der Cantilever für den Versuch wird am Mikromanipulator angebracht. Die Cantileverspitze wird mittig auf den Klebstofftropfen aufgesetzt und der Tropfen durch kleine Bewegungen verteilt. Genaue Angaben sind aufgrund der manuellen Bedienung nicht möglich bzw. sinnvoll. Im Anschluss wird der Cantilever über den Partikel gefahren und soweit abgesenkt, bis er auf dem Partikel aufsitzt. Nach ca. 20 s ist der Kleber angetrocknet und der Cantilever kann mit dem Partikel angehoben, entfernt und gelagert werden. Ob der Partikel richtig auf der Cantile-

veroberfläche liegt kann unter dem Makroskop geprüft werden. Nach einer Stunde Trocknungszeit ist der Kleber vollständig getrocknet und die Proben können für die Messung genutzt werden.

### Messung

Für die Messung wird der Cantilever an verschiedenen Stellen mit der Oberfläche in Kontakt gebracht und wieder gelöst. In Abbildung 3-12 ist auf der linken Seite eine idealisierte, schematische Darstellung einer AFM-Haftkraftmessung gezeigt. Beginnend von der rechten Seite wird der Abstand des Partikels zur Oberfläche verringert. Die Kraft bleibt bei 0 nN, bis der Partikel am sogenannten *jump-in* Punkt durch kurzreichweitige Kräfte auf die Probe gezogen wird. Danach steigt die Kurve bis zum Umkehrpunkt linear an. Auf dem Rückweg verläuft die Kurve entlang der Annäherungskurve, bleibt jedoch länger auf der Oberfläche haften bis die Adhäsionskraft überschritten ist. Wie auf der rechten Seite der Abbildung zu sehen ist, ist der prinzipielle Verlauf der Haftkraftmesskurven der Partikel ähnlich. Die Adhäsionskraft wird aus der Differenz der Nulllinie und der maximalen Kraftauslenkung berechnet.

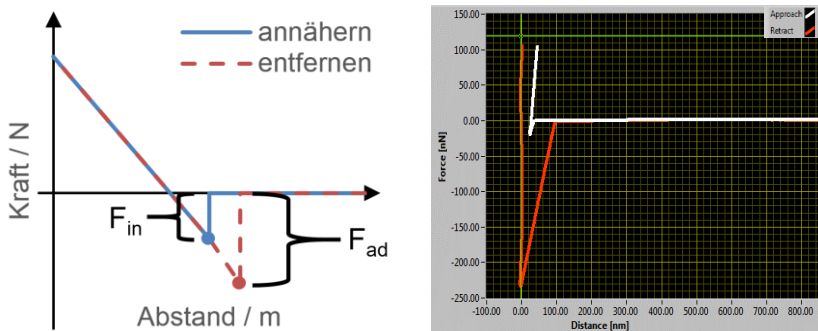


Abbildung 3-12 Vergleich einer idealisierten, schematischen Darstellung einer AFM-Messung (links) mit einer Messkurve ( $PS_{41\ \mu m}$ -Partikel & PMMA) (rechts).

### 3.4 Simulationen des Magnetfeldes mittels Finite-Elemente-Methode

Bei der Finite-Elemente-Methode (FEM) handelt es sich um ein numerisches Verfahren zur Lösung von partiellen Differentialgleichungen. Simulationen können zum einen dabei helfen Aufwand für Experimente zu reduzieren zum anderen können sie genutzt werden, um messtechnisch nicht oder nur schwierig zugängliche Größen zu erfassen. Aufgrund der endlichen Rechen- und Speicherkapazität von Computern ist es nicht möglich die Differentialgleichungen für jeden Punkt der Geometrie zu berechnen. Die Geometrie muss daher diskretisiert werden. Abhängig von der Dimensionsanzahl der Modelle (2 oder 3-D) kommen dafür häufig Rechtecke/Zylinder oder Dreiecke/Tetraeder zum Einsatz. Letztere werden standardmäßig für die Netzerstellung verwendet. Nach dem Zerlegen der Geometrie in einzelne Elemente werden diesen im Anschluss Knoten zugewiesen, an denen die DGL gelöst werden. Die Anzahl der Knoten, die sich auf oder in einem Element befinden, ist von der Ordnung  $o$  des Elements abhängig. Als Simulationsprogramm kam Comsol (Version 5.1) zum Einsatz. In COMSOL ist die maximal mögliche Elementordnung auf  $o = 4$  beschränkt. Abbildung 3-13 zeigt die Knotenverteilung für ein Tetraederelement mit einer linearen, quadratischen und kubischen Knotenverteilung.

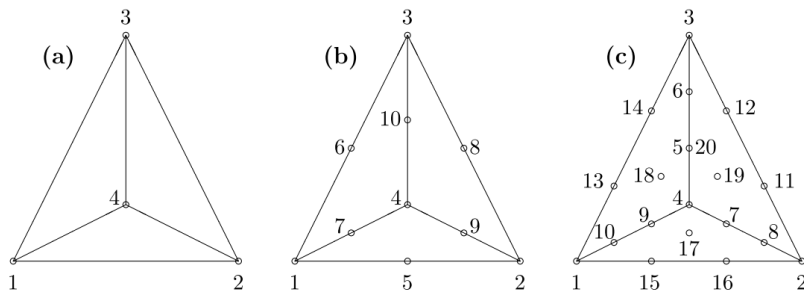


Abbildung 3-13 Tetraederelement, (a) linear, (b) quadratisch, (c) kubisch

Die in dieser Arbeit verwendeten Modelle werden mit Elementen der Ordnung  $o = 2$  (quadratisch) diskretisiert. Ein quadratisches Tetraederelement hat, wie in Abbildung 3-13 zu sehen ist, 10 Knoten. Es stellt einen Kompromiss zwischen der Auflösung und der Rechenzeit dar. Die Knoten sind infinitesimal kleine Punkte der Dimension  $d = 0$ . Bei instationären Problemen ist außerdem noch eine zeitliche Diskretisierung notwendig.

Die Simulation erfolgte auf einem Windows-Server mit 128 GB Arbeitsspeicher und zwei Intel Xenon E5-2640 Prozessoren mit einer Taktfrequenz von 2,5 GHz.

Für die Versuche kamen Permanentmagnete zum Einfluss. Die entsprechenden physikalischen Grundlagen sind in Comsol in dem Modul *Magnetische Felder, keine Ströme* integriert. Permanentmagnete erzeugen quellenfreie, zeitliche konstante Magnetfelder. Dadurch vereinfachen sich die Maxwell-Gleichungen zu

$$\nabla \times \mathbf{H} = 0 \quad (3-3)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = 0 \quad (3-4)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{j} = 0 \quad (3-5)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (3-6)$$

Gl. 3-3 impliziert, dass sich die magnetische Feldstärke

$$\mathbf{H} = -\nabla V_m \quad (3-7)$$

auch über das skalare magnetische Potential  $V_m$  ausdrücken lässt.

Das Skalarpotential weist jedem Ort im Raum einen Zahlenwert zu. Eine Analogie zu  $V_m$  stellt eine Höhenkarte der Erdoberfläche dar. In dieser ist die Höhe an jedem Punkt als Zahl (Skalar) eingetragen. Der Gradient davon gibt die stärkste Neigung an jedem Punkt an.

Durch Einsetzen von Gl. 2-18 und Gl. 3-7 in Gl. 3-6 ergibt sich die von Comsol genutzte Gleichung

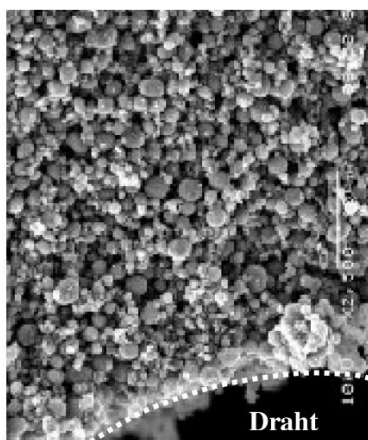
$$-\nabla \cdot d(\mu_0 \nabla V_m - \mu_0 M) = 0 \quad (3-8)$$

für magnetostatische Probleme ohne Ströme.



## 4 Ergebnisse

Bei der Abtrennung von Proteinen mittels Magnetseparation entsteht an der Magnetmatrix ein Haufwerk, welches nach erfolgter Entfernung der Verunreinigungen von der Magnetmatrix entfernt werden muss. Abbildung 4-1 zeigt eine REM-Aufnahme eines Partikelhaufwerks auf einem Draht, wie er in einer HGMS-Einheit zum Einsatz kommen kann.



**Abbildung 4-1** REM-Aufnahme eines Haufwerks aus magnetischen Partikeln auf einem magnetisierten Draht.

Wie zu sehen ist, stellt das Haufwerk einen extrem komplexen Kontaktzustand für die einzelnen Partikel dar. Gegenstand der Arbeit war es das Zusammenspiel der einzelnen Haftkraftkomponenten und deren Anteil an der gesamten Haftkraft sowohl zwischen den Partikeln als auch zwischen Partikel und einer Wand zu untersuchen. Bei den Prozesspartikeln handelt es sich um unregelmäßig geformte, geladene Partikel bei denen bereits die Charakterisierung schwierig ist. Aus diesem Grund kamen in der ersten Phase kommerzielle Modellpartikel zum Einsatz, die monodispers und ungeladen waren. Im zweiten Schritt erfolgten Untersuchungen, um zu ermitteln, welchen Einfluss an der Partikeloberfläche gebundene Pro-

teine haben. Das erfolgte ebenfalls mit Modellpartikeln, bei denen, im Gegensatz zu den Prozesspartikeln, die Proteine kovalent an der Oberfläche gebunden sind. Das ermöglicht den Einsatz unterschiedlicher Puffersysteme und Salze. Im letzten Schritt wurden die Haftkräfte von Prozesspartikeln mit verschiedenen Proteinen untersucht. Bei den Prozesspartikeln erfolgt die Proteinbindung über Ionenbindungen, wodurch die Versuche auf den Einsatz eines bestimmten Puffersystems begrenzt sind.

## 4.1 Partikel-Wandwechselwirkung<sup>1</sup>

### 4.1.1 Geometrie und Struktur

#### 4.1.1.1 Einfluss der Partikelgröße

Die van der Waals-Kraft ist eine Oberflächenkraft und hängt dem zufolge stark von der Oberflächenstruktur ab. Bei der Magnetseparation ändern die sich anlagernden Proteine die Struktur der Partikel. Da es sich dabei um ein komplexes biologisches System handelt, fanden im ersten Schritt Untersuchungen mit Polystyrol-Magnetit-Partikeln statt. Abbildung 4-2 zeigt die Haftkraftkurven von Polystyrol-Magnetit-Partikeln für drei verschiedene Durchmesser. Bei den Haftkraftkurven ist die Partikelhafttrate (*PHR*) über der Haftkraft aufgetragen. Die Partikelhafttrate

$$PHR = \frac{N_i}{N_0} \cdot 100 \quad (4-1)$$

bezeichnet die Partikelanzahl auf dem Substrat  $N_i$  nach dem Zentrifugationsschritt  $i$  dividiert durch die Ausgangspartikelanzahl  $N_0$  in Prozent. Im Falle eines idealen Systems gibt es eine definierte Haftkraft, sodass die

---

<sup>1</sup> Der Großteil der in diesem Kapitel gezeigten Daten ist in der Publikation *Influence of the magnetic force on the van der Waals force of superparamagnetic composite particles*. Powder Technology, 2014. **259**: p. 30-36 veröffentlicht.



Kurve eine Sprungfunktion darstellt, die für eine bestimmte Kraft von 100 auf 0 % abfällt. Im Gegensatz dazu weisen die Messkurven der drei Partikelgrößen eine breite Verteilung der Haftkräfte auf. Das zeigt, dass es Ungleichmäßigkeiten und Rauheiten auf den Partikeloberflächen gibt. Die enge Standardabweichung zwischen den einzelnen Messungen (vierfach Bestimmung) zeigt jedoch auch, dass diese gleichmäßig über das gesamte Partikelkollektiv verteilt sind. Um die Kurven miteinander vergleichen zu können, sind charakteristische Größen notwendig. Dafür eignet sich die mediane Haftkraft  $F_{50}$ . Das entspricht genau der Kraft, bei der 50 % der Partikel auf der Oberfläche haften. Da dieser Wert in den Versuchen nur selten exakt getroffen wird, ist zwischen den entsprechenden Werten zu interpolieren. Der Verlauf bzw. die Breite der Kurve kann durch die Trennschärfe  $k$

$$k = \frac{F_{25}}{F_{75}} \quad (4-2)$$

(analog zur Trennschärfe in der Klassiertechnik) beschrieben werden.  $F_{25}$  und  $F_{75}$  sind dabei die Kräfte, bei denen noch 25 bzw. 75 % der Partikel an der Oberfläche haften. Es ist zu sehen, dass die PS<sub>41 μm</sub> Partikel deutlich höhere Haftkräfte aufweisen, die Trennschärfe ist mit 0,32 jedoch noch im selben Bereich wie bei den PS<sub>19 μm</sub> Partikel mit 0,19 und den PS<sub>10 μm</sub> Partikeln mit 0,21.

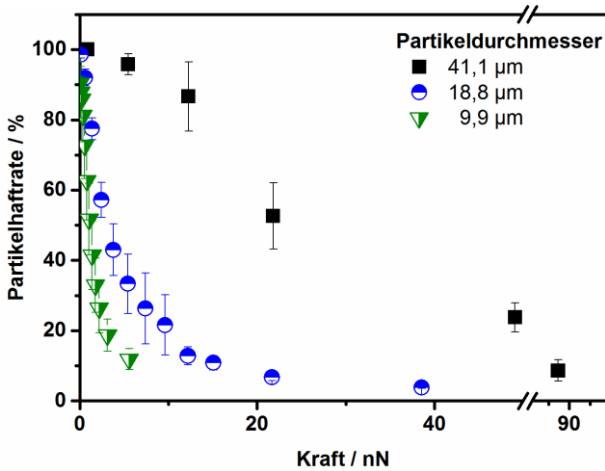


Abbildung 4-2 Haftkraftkurven von PS-Partikeln verschiedener Größe in Wasser auf PVC ( $R_q$  19 nm) [42].

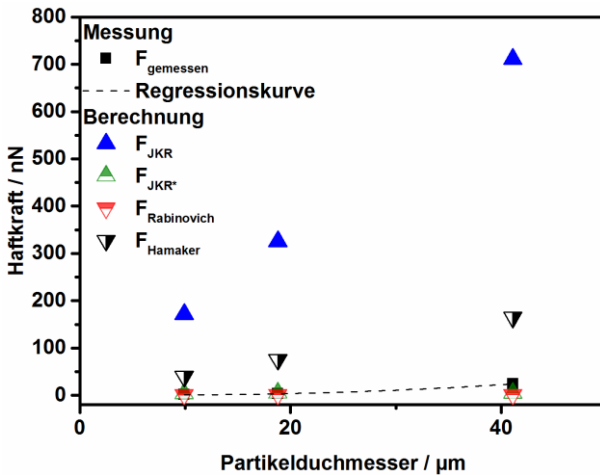


Abbildung 4-3 Einfluss der Partikelgröße auf die mediane Haftkraft (inkl. Regressionskurve), Vergleich mit Berechnungen verschiedener Modelle; Regressionskurvengleichung  $F=0,01774*d^2-0,13946*d$

In Abbildung 4-3 sind die gemessenen Haftkräfte  $F_{50}$  den berechneten Haftkräften gegenüber gestellt. Für die Berechnung kamen die Modelle nach JKR (Gl. 2-10), Hamaker (Gl. 2-1) direkt und mit einer Rauheitskorrektur zum Einsatz. Die Korrektur wurde von Rabinovich für das Hamaker-Modell eingeführt [24] und ist durch den Korrekturterm in Gl. 2-8 gegeben. Die Korrektur JKR\* des JKR-Modells erfolgte ebenfalls durch Multiplikation von Gl. 2-10 mit Gl. 2-8. Für alle Berechnung muss entweder die Hamaker-Konstante oder die Oberflächen-Energie bekannt sein. Befinden sich Körper unterschiedlicher Materialien in Kontakt, ergibt sich eine kombinierte Hamaker-Konstante, die das Gesamtsystem beschreibt. Die kombinierte Hamaker-Konstante kann mit Gl. 2-4 direkt berechnet werden. Mit Gl. 2-5 können die Hamaker-Konstanten der Reinstoffe miteinander kombiniert werden, um die Hamaker-Konstante der Gesamtsystems zu erhalten. Für beide Fälle gilt, dass die notwendigen Materialdaten der Literatur entnommen werden müssen und bereits dadurch Abweichungen in der Berechnung zu erwarten sind.

**Tabelle 4-1 Materialdaten für Hamaker-Konstantenberechnung**

Material	Dielektrizitätskonstante [-]		Brechungsindex [-]		Hamaker-Konstante [J]	
PVC	$\epsilon_1$	3,20	$n_1$	1,527	$A_{11}$	7,8 E-20
PS	$\epsilon_2$	2,55	$n_2$	1,557	$A_{22}$	7,9 E-20
Wasser	$\epsilon_3$	80,00	$n_3$	1,33	$A_{33}$	3,7 E-20

Daten: [19] Seite 260

Mit den gegebenen Daten ergibt sich nach Gl. 2-4 die kombinierte Hamaker-Konstante von  $A_{132,L}=1,41 \text{ E-20 J}$  und nach Gl. 2-5 von  $A_{132,K}=0,771 \text{ E-20 J}$ . Über Gl. 2-6 ist aus der Hamaker-Konstante die Oberflächenenergie abschätzbar, die für die Haftkraftberechnung nach JKR notwendig ist. In allen Fällen geht die Hamaker-Konstante linear in die Haftkraft ein, sodass bereits aufgrund der Auswahl des Berechnungsmodells der Hamaker-Konstante die berechneten Haftkräfte für dasselbe Haftkraftmodell um 80 % abweichen können. Noch wesentlich stärker sind die Unterschiede zwischen den Haftkraftmodellen. Die Berechnung der Daten in Abbildung 4-3 fand mit  $A_{132,K}=0,771 \text{ E-20 J}$  statt. Die idealisierten

sierten Modelle JKR und Hamaker überschätzen die auftretenden Haftkräfte deutlich. Mit den korrigierten Modellen liegen die berechneten Werte zumindest in derselben Größenordnung. Der Verlauf kann dennoch nicht wieder gegeben werden. Aus den Gleichungen der Modelle ergibt sich ein linearer Anstieg der Haftkraft mit dem Partikelradius. Aus den Messdaten der Partikelsysteme ergibt sich hingegen ein quadratischer Zusammenhang zwischen dem Partikeldurchmesser  $d$  und der Haftkraft  $F_{ad}$

$$F_{ad} = 0,01774 \cdot d^2 - 0,13946 \cdot d. \quad (4-3)$$

Dabei ist vorgegeben, dass die Fit-Kurve den Koordinaten Ursprung schneiden soll, die für  $d \rightarrow 0$  aus die Haftkraft gegen Null laufen muss. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ermittelt Origin dabei zu 0,996.

Die quadratische Abhängigkeit deutet auf einen Einfluss der Kontaktfläche hin. Dazu passt ebenfalls, dass bei der Haftkraftberechnung die mit der Rauheit korrigierten Werte deutlich näher an den gemessenen Haftkräften liegen als die unkorrigierten Werte, da durch die Rauheit die Kontaktfläche beeinflusst wird.

### *Vergleichsmessungen mit AFM*

Im Rahmen von Testmessungen war es möglich AFM-Messungen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz durchzuführen. Als Substrat stand PMMA mit einer Rauheit  $R_q$  von 30 nm zur Verfügung. Die Messungen erfolgten jeweils für ein PS<sub>41 μm</sub>- und PS<sub>19 μm</sub>-Partikeln in Reinstwasser auf drei verschiedenen Positionen auf dem Substrat. Pro Position fanden ca. 140 Messungen statt. Die mediane Haftkraft der PS<sub>41 μm</sub>-Partikel betrug 75,9 nN und die der PS<sub>19 μm</sub>-Partikeln 6,4 nN. In der Zentrifuge waren die ermittelten Werte mit 18,3 nN (PS<sub>41 μm</sub>) und 2,2 nN (PS<sub>19 μm</sub>) ähnlich. Die Messungen zeigten, dass für dieses System keine elektrostatische Abstoßung auftrat.

Es ist zu beachten, dass für die Messungen mit dem AFM die Partikel zum einen getrocknet werden müssen und zum anderen nur jeweils ein Partikel vermessen werden konnte.

#### 4.1.1.2 Einfluss der Rauheit

Für die Untersuchung des Einflusses der Rauheit auf die Haftkraft erfolgte eine Behandlung von PVC-Substraten durch Glasperlenbestrahlung (Kugeldurchmesser 200-400  $\mu\text{m}$ ) und durch Schleifpapier (Körnung 100). Die resultierenden Oberflächenstrukturen sind in Abbildung 3-4 (Seite 28) gezeigt. Während die Rauheit des unbehandelten PVC 19 nm betrug, lag sie nach der Glasperlenbestrahlung bei 532 nm und bei 5200 nm nach der Behandlung mit dem Schleifpapier. Die kombinierten Rauheiten ergeben sie somit nach Gl. 2-9 zu 100, 541 und 5201 nm. Es ist zu sehen, dass jeweils der Einfluss der größeren Rauheit überwiegt, worauf in der Diskussion von Abbildung 4-5 detaillierter eingegangen wird. In Abbildung 4-4 sind auf der linken Seite die Haftkraftkurven der  $\text{PS}_{19\ \mu\text{m}}$ -Partikel auf den drei PVC-Substrattypen jeweils in Wasser gezeigt. Es ist ersichtlich, dass die Haftkräfte mit steigender Rauheit sinken. Für die genaue Darstellung des Verlaufs sind auf der rechten Seite von Abbildung 4-4 die Medianwerte der Haftkräfte über der kombinierten Rauheit aufgetragen. Die Symbole der Messwerte der einzelnen Rauheiten entsprechen denen der linken Seite. Die Regressionskurve für die Daten ist durch die Exponentialfunktion

$$F = 31,48 \cdot R_q^{-0,5039} \quad (4-4)$$

gegeben.

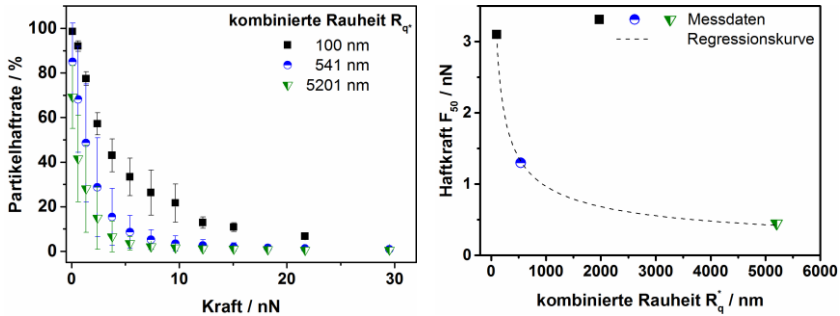
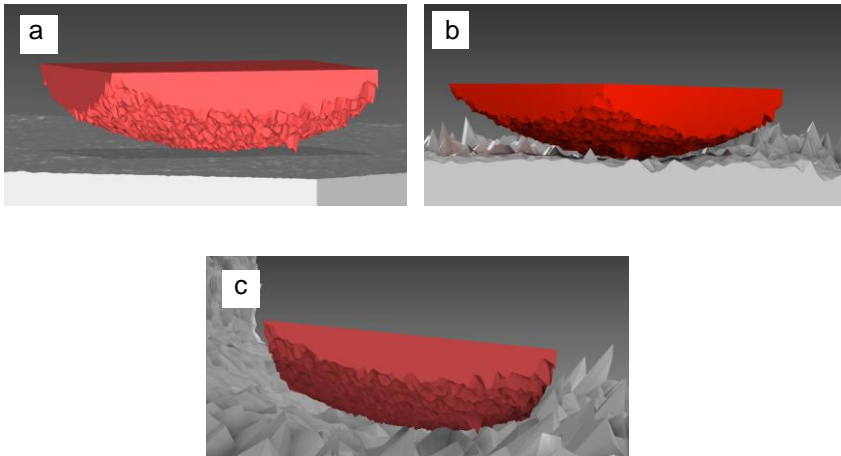


Abbildung 4-4 Links) Haftkraftkurven von PS<sub>19</sub> µm-Partikeln in Wasser auf PVC verschiedener Rauheiten; rechts) Medianwerte der Haftkräfte in Abhängigkeit der kombinierten Rauheit (von Substrat und Partikel)

Für die Visualisierung der Ursache des extrem starken Abfalls der Haftkraft mit der Rauheit ist in Abbildung 4-5 ein Partikel Ausschnitt (rot) auf je einem PVS-Substrat (grau) der entsprechenden Rauheit dargestellt. Für die Darstellung wurden die Daten der Partikel- und der Substratoberflächen aus den LSM-Messungen in einem CAD-Programm (Autodesk Inventor Professional 2014) eingelesen und so positioniert, dass sie in Kontakt stehen. Die Darstellungen verdeutlichen in welchem Ausmaß die Kontaktzone mit steigender Rauheit abfällt. Aufgrund der kurzen Reichweite der wirkenden v.d.W.-Kräfte fällt damit auch die Haftkraft rapide ab. Der gleiche Effekt wurde bei der Betrachtung des Partikelgrößeneinflusses gesehen. Weiterhin erklärt Abbildung 4-5 die größeren Standardabweichungen in den Haftkraftkurven in Abbildung 4-4. Bei den unbearbeiteten PVC-Substraten dominiert die Rauheit der Partikel während die Substrate sehr gleichmäßig sind.



**Abbildung 4-5 Falschfarbendarstellung von LSM-Aufnahmen eines Partikelausschnitts auf PVC Substraten verschiedener Rauheit a) 19 nm; b) 532 nm und c) 5200 nm, die Positionierung des Partikelausschnitts erfolgte mit Inventor**

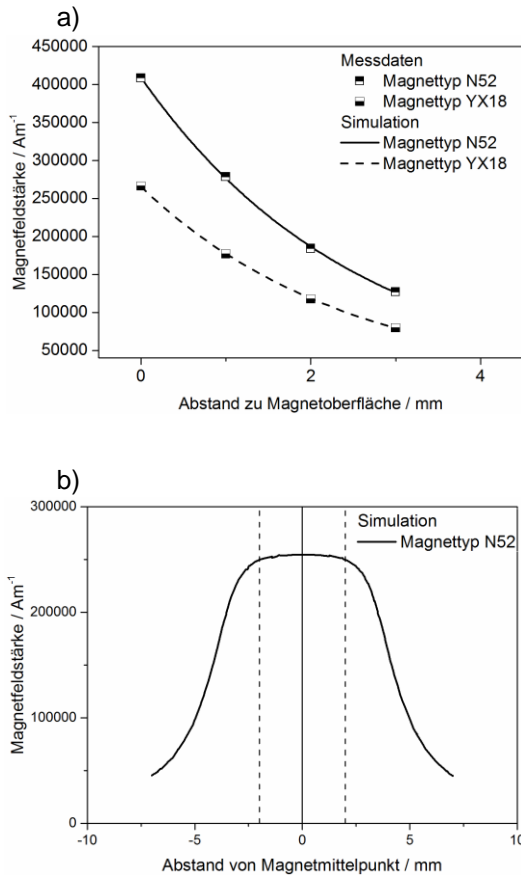
Im Gegensatz dazu dominiert bei den bearbeitet Plättchen die Struktur der Substratoberfläche. Dazu passt ebenfalls, dass die Trennschärfe von 0,19 für unbearbeitetes über 0,14 für Glasperlen bestrahltes auf 0,05 für das geschliffene PVC abnimmt.

#### 4.1.1.3 Einfluss der Deformation und der Magnetfeldstärke

Wie in Abbildung 4-5 zu sehen ist, kann die reale Kontaktfläche zwischen dem Partikel und dem Substrat, besonders bei rauen Oberflächen, sehr klein werden. Dadurch wirken in den Kontaktflächen auch bei kleinen adhäsiven Kräften sehr hohe Drücke. Bei dem Matrixmaterial der verwendeten Partikeln handelt es sich um Polystyrol, welches ein relativ weiches Material mit einem E-Modul von 3 GPa ist (zum Vergleich Stahl 180-210 GPa). In einem Magnetabscheider, wie sie in der HGMS vorkommen werden die Partikel an der Abscheidematrix zusätzlich zu der v.d.W.-Kraft noch durch die Magnetkraft angezogen, was zu einer Änderung des Kon-

taktbereichs führen kann. Wie aus Gl. 2-22 hervorgeht, wirkt eine Magnetkraft nur dann, wenn ein Magnetfeldgradient vorhanden ist. Um eine definierte Magnetkraft zu erhalten, erfolgte die Dimensionierung der Versuchsküvetten und der Magneten so, dass sich ein Magnetfeldgradient nur senkrecht zu der Substratoberfläche ausbildet. Durch die Verwendung des LUMiSizer waren die Abmessungen des Zentrifugenadapters vorgegeben. Aufgrund der vorgegebenen Abmessungen erwiesen sich axial magnetisierte Stabmagnete mit den Abmaßen  $\varnothing 7 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$  als die größten, einsetzbaren Magnete. Für die Versuche kamen zum einen Stabmagnete des Materialtyps YX18 und des Typs N52 zum Einsatz. Bei den YX18-Magneten handelt es sich um sehr schwache Magnete und bei den N52 um extrem starke Magnete. Abbildung 4-6 zeigt den Magnetfeldverlauf der Stabmagnete. In Abbildung 4-6 a ist der Magnetfeldverlauf senkrecht zur Magnetoberfläche beginnend in der Mitte der Magnetoberfläche gezeigt. Der Verlauf wurde zum einen mit Comsol simuliert und zum anderen mit der Hall-Sonde in vier verschiedenen Abständen gemessen. Da eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Messdaten und der Simulation gegeben ist, wurde die Simulation für die Dimensionierung verwendet. In Abbildung 4-6 b ist der simulierte Magnetfeldverlauf entlang des Magnetradius in einer um einen Millimeter verschobenen, parallelen Ebene gezeigt. Der Abstand entspricht der Substratdicke und damit auch dem Abstand, den die Partikel zur Magnetoberfläche haben. Eine genaue orts aufgelöste Messung war in diesem Fall mit der vorhandenen Hall-Sonde nicht möglich. Die gestrichelten Linien markieren die gewählten Grenzen der Küvette.





**Abbildung 4-6 Magnetfeldverlauf von Stabmagneten  $\text{Ø}7\text{mm} \times 7\text{mm}$ ; a) senkrecht zur Magnetoberfläche ausgehend vom Mittelpunkt der Magnetoberfläche; b) entlang des Magnetradius in 1 mm Abstand**

Wie zu sehen ist, ist das Magnetfeld innerhalb der Küvet tengrenzen in der Partikelebene nahezu konstant und für die Magnetkraftberechnung reicht die Betrachtung des Gradienten in Z-Richtung. In Tabelle 4-2 sind die Magnetkräfte der PS-Partikel für die beiden Magnettypen zusammengefasst.

**Tabelle 4-2 Berechnete Magnetkraft für die PS-Mag-Partikel und die Magnettypen YX18 und N52 im Abstand von einem Millimeter von der Magnetoberfläche**

Partikeldurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Magnetkraft [N]	
	YX18	N52
9,9	0,19E-9	0,32E-9
18,8	1,73E-9	3,33E-9
41,1	17,30E-9	48,40E-9

In Abbildung 4-7 sind die Haftkurven von PS<sub>41</sub>  $\mu\text{m}$ -Partikeln in Wasser auf PVC der Rauheit 19 nm ohne und mit Magneten zu sehen. In Abbildung 4-7 a sind die absoluten Messwerte aller drei Konfigurationen gezeigt. Die gefüllten Quadrate sind die Messwerte der Referenzmessung ohne Magnetfeld und stellen die v.d.W.- Haftkräfte der Partikel dar. Die AFM-Messungen zeigten, dass für dieses System keine elektrostatische Abstoßung auftritt. Bei den halbgefüllten Quadraten wirkt zusätzlich noch eine Magnetkraft auf die Partikel. Wie zu sehen ist verschieben sich die Haftkraftkurven dadurch nach rechts zu höheren Kräften. Bei kleinen Kräften (0-3 nN) lösen sich zunächst keine Partikel. In diesem Bereich dominiert die Magnetkraft. Ist diese überwunden entspricht das Ablöseverhalten dem der Referenzmessung. Um zu sehen ob die Magnetkraft einen Einfluss auf die intrinsische Haftkraft hat, wurde sie von der Gesamtkraft abgezogen. In Abbildung 4-7 b sind die entsprechenden korrigierten Haftkraftkurven zu sehen. Die Berechnung der Magnetkraft erfolgt durch Gl. 2-22. Für den leichteren Vergleich ist die Referenzmessung als Linie dargestellt.

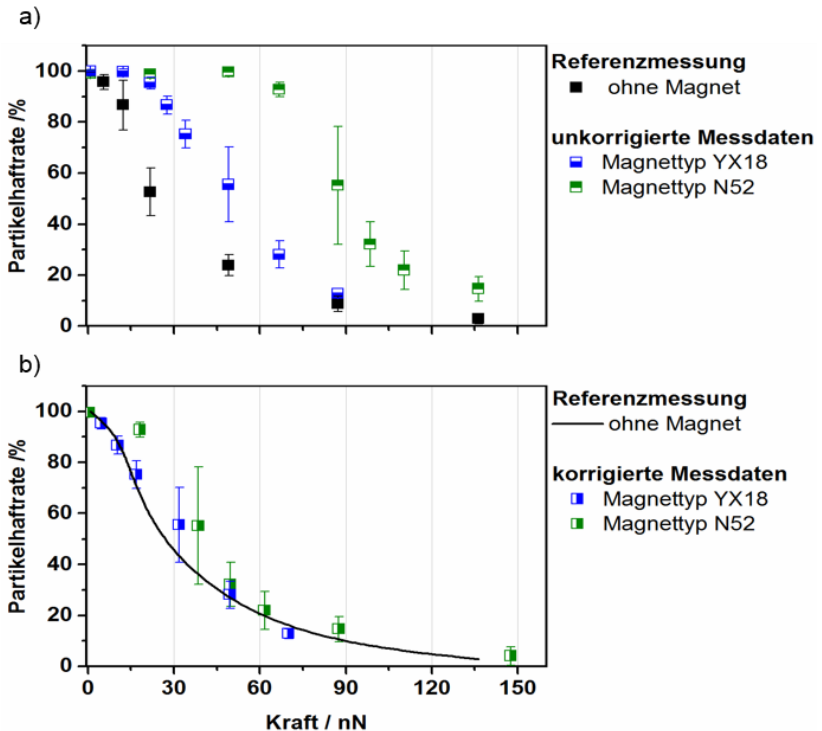


Abbildung 4-7 Haftkraftkurven von  $PS_{41 \mu m}$ -Partikeln in Wasser auf PVC der Rauheit 19 nm a) Messwerte, b) Messwerte von denen die entsprechende Magnetkraft subtrahiert ist

Wie zu sehen ist, sind auch die korrigierten Kurven noch leicht nach rechts zu größeren Kräften verschoben. Das deutet daraufhin hin, dass die Magnetkraft zu einer Erhöhung der v.d.W.-Kräfte führt. Dabei ist die Verschiebung für den stärkeren Magneten N52 stärker. Die genauere Betrachtung des Einflusses der Magnetkraft erfolgte mit den  $PS_{19 \mu m}$ -Partikel. Durch den kleineren Durchmesser erhöht sich das Verhältnis von v.d.W.-Kraft zu Gewichtskraft und Änderungen in der v.d.W.-Kraft sollten besser messbar sein. Für die weitere Variation der v.d.W.-Kraft fanden Messungen für alle drei PVC-Rauheiten statt. In Abbildung 4-8 sind die Haftkraftkurven der  $PS_{19 \mu m}$ -Partikel gezeigt. In der oberen sind die Werte für die Messungen mit den Magneten des Typs YX18 und in

der unteren Reihe mit dem Magnettyp N52 gezeigt. Auf der linken Seite sind dabei die absoluten Messwerte gezeigt. Wie bereits bei den PS<sub>41 μm</sub>-Partikeln zu sehen war, ist die Haftkraft für den stärkeren Magneten höher. Ebenfalls erkennbar sind die zwei Haftbereiche mit dem Magnetkraft-dominierten Bereich bei kleinen Kräften und dem v.d.W.-Kraft dominierten Bereich bei hohen Kräften. Deutlich wird das durch einen Vergleich mit Abbildung 4-4 (Seite 56) bei denen sich die Haftkraftkurven mit steigender kombinierter Rauheit nach unten verschieben. Die Gründe hierfür werden nachfolgend diskutiert.

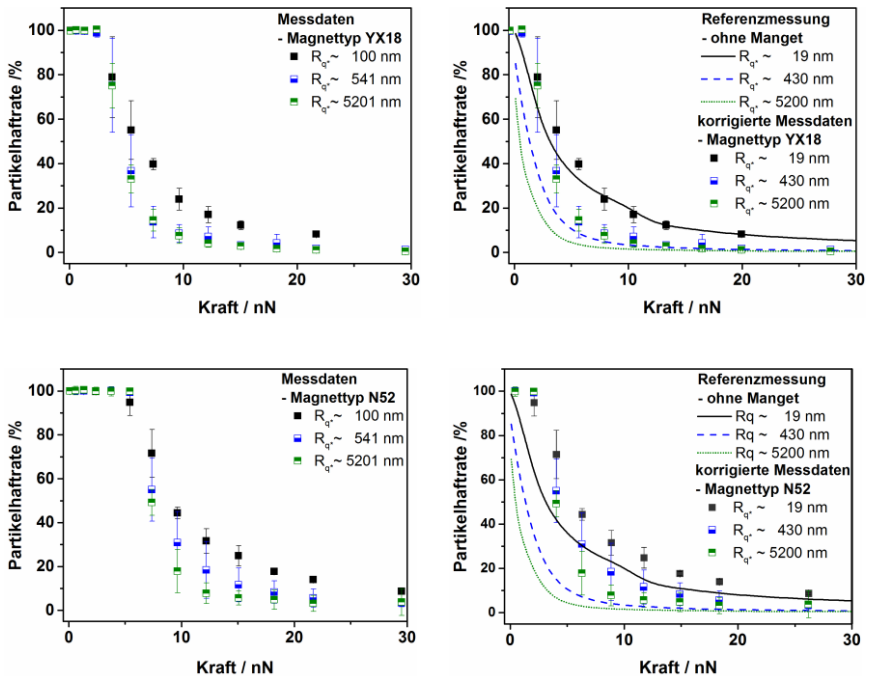


Abbildung 4-8 Haftkraftkurven von PS<sub>19 μm</sub>-Partikeln in Wasser auf PVC verschiedener Rauheiten; obere Reihe) Daten für Magnettyp YX18; untere Reihe) Daten für Magnettyp N52; linke Seite) Messwerte, rechte Seite) Messwerte von denen die entsprechende Magnetkraft subtrahiert ist im Vergleich zu den Referenzmessungen

Auf der rechten Seite sind die Messdaten um die Magnetkraft korrigiert. Als Referenzmessungen dienen in beiden Fällen die in Abbildung 4-4 gezeigten Werte. Betrachtet man die Abweichungen der korrigierten Messkurven, zu der entsprechenden Referenzmessung, so ist zu sehen, dass die Abweichungen zum einen für den starken Magneten höher sind als für den schwachen und zum anderen mit steigender Rauheit zunehmen. Die Quantifizierung des Effekts erfolgt anhand des Quotienten  $q$  der korrigierten Kraft bezogen auf die Referenzmessung  $F_{50,0}$ . Die korrigierte Kraft ist die Differenz aus der gemessenen Haftkraft im Magnetfeld  $F_{50,total}$  und der Magnetkraft  $F_{Mag}$ . Der Wert  $q$  ergibt sich damit zu

$$q = \left( \frac{F_{50,total} - F_{Mag}}{F_{50,0}} \right). \quad (4-5)$$

Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 4-3 wiedergegeben. Für nicht diamagnetisches Material kann  $q$  Werte größer oder gleich Eins annehmen. Diamagnetisches Material erfährt eine (schwache) Abstoßung vom Magneten, sodass  $q$  in diesem Fall kleiner oder gleich Eins ist. Nimmt  $q$  einen Wert von eins an, so entspricht die Haftkraftzunahme im Magnetfeld genau der Magnetkraft. Ist  $q$  größer als Eins, ist die Haftkraftzunahme größer als die Magnetkraft.

**Tabelle 4-3 Übersicht des Verschiebungsquotienten  $q$  für verschiedene Messkonfigurationen**

Konfiguration	Substratmaterial	Partikeldurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	$R_q^*$ [nm]	$q_{YX18}$	$q_{N52}$
1	PVC	9,9	73	1,69	2,88
2	PVC	18,8	99	1,41	1,89
3	PVC	18,8	440	2,40	3,56
4	PVC	18,8	5200	6,69	8,98
5	PVC	41,1	180	1,46	1,70

$q_{YX18}$ : Werte für Magnettyp YX18

$q_{N52}$ : Werte für Magnettyp N52

Aus den Messungen ergab sich, dass alle Werte von  $q$  größer waren als Eins (siehe Tabelle 4-3). Die Werte spiegeln ebenfalls die bereits bei den Haftkraftkurven gemachten Beobachtungen, dass die Haftkraftzunahme mit steigender Magnetkraft und steigender Rauheit zunimmt. Die Ursache hierfür liegt in der kurzen Reichweite der v.d.W.-Kräfte. Aus einer Molekulardynamik-Simulation eines Kooperationspartners für die Haftkraft glatter Partikel auf einem glatten Substrat geht hervor, dass 99,9% der Haftkraft durch das Partikelmaterial hervorgerufen wird, dass sich in einem Abstand unter 15 nm von der Substratoberfläche befindet [43]. Wie bereits in Abbildung 4-5 zu sehen ist, sinkt der Materialanteil innerhalb dieses Bereichs durch die steigende Rauheit. Bei den glatten Strukturen bildet sich auch ohne Magnet eine relativ große Kontaktfläche zwischen Partikel und Substrat aus. Die, durch den Magneten, hervorgerufene Kraft verteilt sich auf diese Kontaktfläche, wodurch der zusätzliche Druck und dadurch auch die Deformation innerhalb der Kontaktzone gering bleiben. Bei rauen Oberflächen ist die Kontaktfläche kleiner. Da die hervorgerufene Magnetkraft jedoch gleich groß ist, ist auch der Druck innerhalb der Kontaktzone größer. Das führt wiederum zu stärkeren Deformationen. Diese beiden Punkte führen in Kombination dazu, dass mehr Material in die Haftungszone kommt und die Haftkraft stärker ansteigt als bei glatten Substraten.

Für die Messung der realen Kontaktfläche so kleiner Partikel steht keine Routinemessmethode zur Verfügung, sodass die Deformation und die Kontaktfläche über eine Modellrechnung zu bestimmen ist. Dafür bietet sich das JKR-Modell an. Dieses berücksichtigt jedoch keine Oberflächenrauheiten. Ein Ansatz diese in das Modell zu integrieren bietet die Partikelradienkorrektur nach Rabinovich Gl. 2-8. Die Gl. 2-11 für den Kontaktradius ergibt sich damit zu

$$a = \sqrt[3]{\frac{R^*}{K} \cdot \left[ \sqrt{3 \cdot \pi \cdot R^* \cdot \gamma} + \sqrt{F_{Mag} + 3 \cdot \pi \cdot R^* \cdot \gamma} \right]^2} \quad (4-6)$$

mit

$$R^* = R \cdot \left( \frac{1}{1 + \frac{R}{1.485 \cdot R_q^*}} + \frac{1}{\left(1 + \frac{1.485 \cdot R_q^*}{x}\right)^2} \right). \quad (4-7)$$

In Abbildung 4-3 (Seite 52) ist zu sehen, dass sich die Haftkräfte mit dieser Modifikation gut annähern lassen. Das ist ein Indiz dafür, dass dadurch die Kontaktradien und somit auch die Kontaktfläche und die Deformation berechenbar sind. Tabelle 4-4 fasst die berechneten Kontaktflächenvergrößerungen für die Partikelsysteme für die beiden Magnettypen zusammen.

**Tabelle 4-4 Berechnete Werte der Kontaktflächenvergrößerung von PS-Partikeln auf PVC mit  $R_q$  19 nm durch eine zusätzliche Magnetkraft und der Vergleich durch eine gleiche Absolutkraft**

Partikeldurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	9,9	18,8	41,1
Magnettyp	Kontaktflächenvergrößerung [%]		
YX18	1,69	10,81	59,21
N52	2,88	19,82	132,34
*angenommene Magnetkraft von 48,4 nN	219,17	174,63	132,34

Für alle drei Partikelsysteme steigt die Kontaktflächenvergrößerung mit zunehmender Magnetkraft. Das entspricht den Erwartungen. Auffällig ist jedoch die starke Zunahme der Werte mit der Partikelgröße. Die Ursache dafür liegt in den unterschiedlichen absoluten Magnetkräften, die mit steigender Partikelgröße ebenfalls stark ansteigen. Die letzte Spalte zeigt deshalb eine Vergleichsrechnung, wie sich die Kontaktflächen verhielten, wenn alle Partikel mit derselben Absolutkraft belastet würden. In diesem Fall sinkt die Vergrößerung mit steigender Partikelgröße. Das ist plausibel, da bei größeren Partikel die Kraft auf eine größere Ausgangskontaktzone wirkt, was einen kleineren Druck zur Folge hat. Da alle Partikel aus dem gleichen Material sind wäre folglich auch die Deformation geringer.

Eine Überprüfung der Berechnungsmethode konnte in einem anderen Zusammenhang für ein ähnliches Partikelsystem im Rahmen von Probenmessungen an einem Nanoindenter (G200, Keysight Technologies, Santa Rosa, USA) erfolgen. Getestet wurden die M-COOH-Partikel. Diese bestehen ebenfalls aus einer Polystyrolmatrix mit Magnetitkolloiden sind jedoch von einem anderen Hersteller und haben zusätzlich eine COOH-Funktionalisierung auf der Oberfläche. Der Durchmesser betrug  $10\ \mu\text{m}$ . In Abbildung 4-9 sind die Messwerte der Deformation mit den Berechnungen der JKR und der JKR\* verglichen. Der Messbereich des Nanoindenters beginnt im niedrigen Mikroneutronbereich. Verglichen mit den wirkenden Haft- und Magnetkräften ist das jedoch immer noch drei Größenordnungen größer. Abbildung 4-9 ist deshalb zweigeteilt. Das obere Diagramm zeigt einen relativ großen Ausschnitt der Deformationskurve. In diesem Bereich ist das Signal/Rauschverhältnis sehr gut. Ein Trend für den Kraftbereich der Haftkräfte, lässt sich daraus jedoch nicht erkennen. Das untere Diagramm zeigt deshalb einen vergrößerten Ausschnitt für kleine Deformationskräfte bis  $21\ \mu\text{N}$ . In diesem Bereich erfolgt eine Überlagerung des Messsignals durch Rauschen, sodass der Verlauf qualitativ zu bewerten ist.

Die Abbildung zeigt, dass bei hohen Belastungen das klassische JKR-Modell die Deformation der Partikel gut annähert. Bis  $600\ \mu\text{N}$  stimmt das Modell fast vollständig mit den Messungen überein. Im Gegensatz dazu sagt das JKR\*-Modell viel zu geringe Deformationen bevor. In diesem Kraft-Bereich dominiert die Gesamtgeometrie des Partikels und die Rauheiten spielen nur eine untergeordnete Rolle.

Bei sehr kleinen Deformationskräften nähert sich die Messkurve jedoch der JKR\*-Berechnung an und JKR überschätzt die Deformation. In diesem Bereich sind die Rauheiten nicht mehr vernachlässigbar. Die Anwendung des JKR\*-Modells für die Deformationsberechnung aufgrund der Magnetkräfte ist also gerechtfertigt.



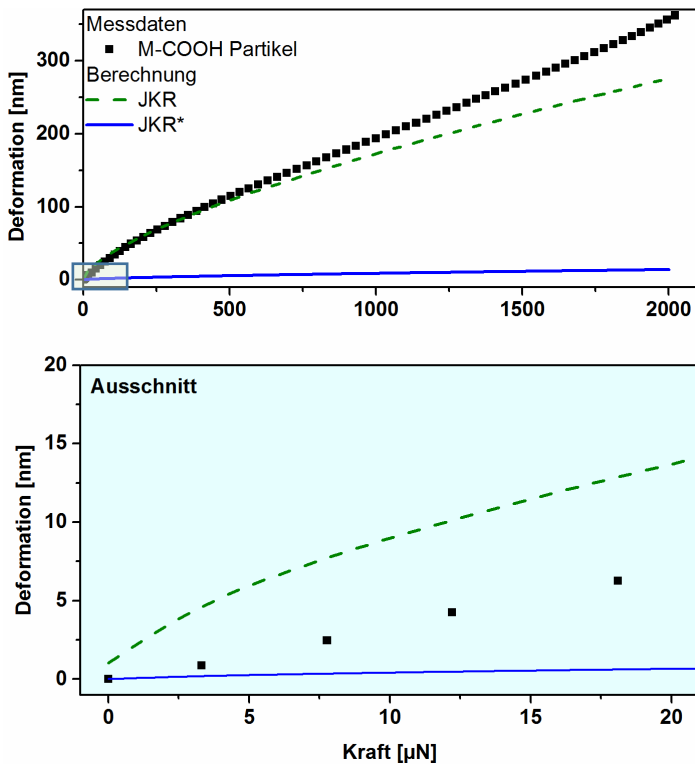
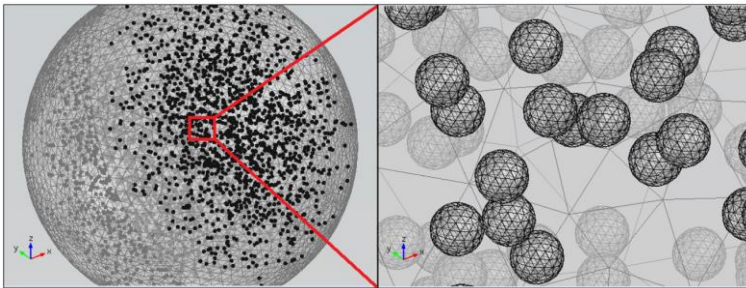


Abbildung 4-9 Vergleich der Deformationskurve von PS-Partikeln mit einer COOH-Funktionalisierung mit einem Durchmesser von  $10\ \mu\text{m}$  auf PVC der Rauheit  $R_q=19\ \text{nm}$  mit den Berechnungen nach dem JKR- und dem JKR\*-Modell.

### Simulationen des Magnetfeldes mittels Finite Elemente Methode (FEM)

Begleitend zu den experimentellen Arbeiten fanden FEM-Simulationen der Magnetkraft und der Deformation statt. Ziel war es einen möglichst hohen Detaillierungsgrad zu erreichen. Aus diesem Grund fanden die Betrachtungen für das kleinste Partikelsystem statt, dass auch experimentell untersucht wurde. Dabei handelte es sich um das Partikelsystem  $\text{PS}_{10\ \mu\text{m}}$  von MicroParticles mit einem Durchmesser von  $10\ \mu\text{m}$ . Der Anteil an Eisenoxid wird nur ungefähr mit 20 Gew.-% angegeben. Bei den gemessenen Haftkräften ist die eindeutige Identifizierung des Anteils der Magnetkraft nicht möglich, da sich die v.d.W.-Kraft und die Magnetkraft aufgrund

der Deformation nicht additiv verhalten. Die Simulation stellt damit eine zweite unabhängige Methode dar, um die berechneten Magnetkräfte zu überprüfen. Dafür wurde das Kompositpartikel in Comsol nachgebaut. Abbildung 4-10 zeigt die Visualisierung der vernetzten Partikelgeometrie. In einer Kugel mit einem Durchmesser von  $9,87\ \mu\text{m}$ , die das Polystyrolpartikel darstellt, wurden Kugeln mit einem Durchmesser von  $275\ \text{nm}$  zufällig verteilt. Die kleinen Partikel sind die Magnetitkolloide. Um den Füllgrad von 20 Gew.-% zu erreichen waren 2500 Partikel notwendig. Mit dem realen Durchmesser der Magnetitkolloide von ca.  $10\ \text{nm}$  ist eine Simulation aufgrund der begrenzten Rechenkapazitäten nicht möglich.



**Abbildung 4-10 Visualisierung der erzeugten Kompositpartikelgeometrie; der Durchmesser der großen Kugel beträgt  $9,87\ \mu\text{m}$ , der Durchmesser der kleinen Kugel  $275\ \text{nm}$ ; links: Übersichtsbild Partikelmatrix mit Magnetitkernen; rechts: Vergrößerter Ausschnitt der Magnetitkolloide**

Die Verteilung der Kolloide erfolgt mit einem Matlab-Skript, das zufällige Koordinaten erzeugt und anschließend prüft, ob diese innerhalb der Matrix liegen und ob an dieser Stelle bereits ein Kolloid vorhanden ist. Der minimale Abstand zwischen den Kolloidmittelpunkten und von einem Kolloid zur Matrixwand ist das 2,5-fache des Kolloidradius. Liegt keine Überschneidung vor, wird das Kolloid an den Koordinaten erzeugt. Andernfalls werden neue Koordinaten erzeugt und die Schleife beginnt erneut. Das Partikel an sich befindet sich in einem zylindrischen Luftraum mit einer Höhe von  $3\ \text{mm}$  und einem Durchmesser von  $7\ \text{mm}$ . Das ist notwendig, da Comsol Materialdefinitionen für eine Berechnung benötigt. Die beiden Kreise des Zylinders bilden den Ein- bzw. Ausgang des Magnetfeldes.

Die entsprechenden Magnetfeldstärken an der Position und für die beiden Magnete sind aus den Daten (siehe Abbildung 4-6 links, Seite 59) der Magnetsimulation entnommen. Der Mittelpunkt der Partikelmatrix befindet sich einen Millimeter vom Magnetfeldeingang entfernt.

Die Vorgaben für die räumliche Diskretisierung sind in Tabelle 4-5 zusammen gefasst.

**Tabelle 4-5 Vorgaben für die räumliche Diskretisierung für die Magnetkraftsimulation**

	Bereich		
	Kolloid	Matrix	Luftraum
Maximale Elementgröße [m]	$0,275 \cdot r_{\text{Koll}}$	$4 \cdot r_{\text{Koll}}$	$1,4\text{E}-4$
Minimale Elementgröße [m]	$0,010 \cdot r_{\text{Koll}}$	$1 \cdot r_{\text{Koll}}$	$1,4\text{E}-6$
Maximale Elementwachstumsrate	1,3	1,7	1,3
Auflösung von Biegungen	0,2	0,8	0,2
Auflösung benachbarter Regionen	1,0	0,3	1,0

*$r_{\text{Koll}}$  ist der jeweilige gewählte Kolloidradius*

Als Grundlage für die Beschreibung der Kolloidmagnetisierung diente eine Magnetisierungsmessung von fast reinem Eisenoxid (99 Gew.-%  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Bayoxide, Bayer, Leverkusen Germany).

Für die Simulation benötigt Comsol die Magnetisierungsdaten des Materials. Abbildung 4-11 zeigt die Magnetisierungsdaten für Bayoxide. Die Symbole stellen die Messdaten dar. Für die bessere Übersichtlichkeit ist die Anzahl auf 40 Messpunkte reduziert. Für die Einbindung in Comsol ist es vorteilhaft, den Kurvenverlauf mit einer Fit-Funktion anpassen zu können. Daraus ergibt sich für die Magnetisierung  $M$  die von der Magnetfeldstärke  $H$  abhängige Fit-Funktion

$$M(H) = 3,97 \cdot 10^5 \cdot \tanh\left(\frac{H}{8,5 \cdot 10^4}\right) + 0,7 \cdot 10^5. \quad (4-8)$$

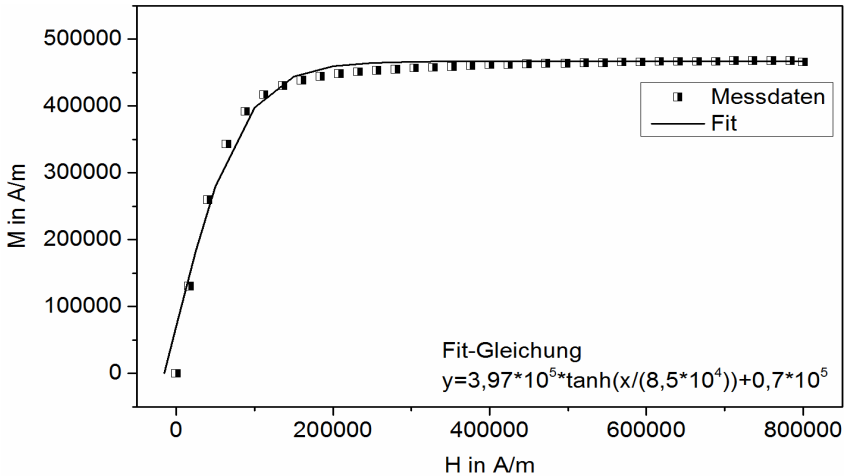
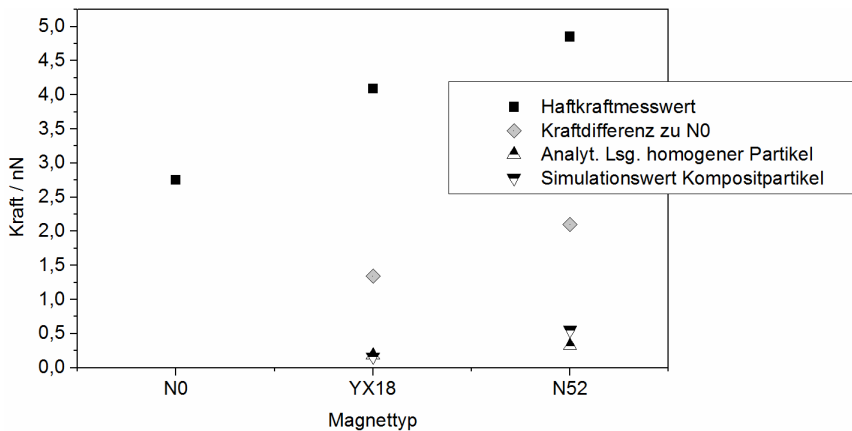


Abbildung 4-11 Fitkurve für die Magnetisierungsdaten von Bayoxide.

In Abbildung 4-12 sind die gemessenen Haftkräfte ohne Magnet und mit den beiden Magnettypen YX18 und N52 den berechneten bzw. simulierten Kräften gegenübergestellt. Außerdem ist die Differenz der im Magnetfeld gemessenen Haftkräfte zu den Messungen ohne Magnet gezeigt. Bei einer additiven Überlagerung der Magnetkraft und der v.d.W.-Kraft entspräche diese Differenz der Magnetkraft. Das ist aufgrund der Deformationen im Kontaktbereich jedoch nicht der Fall ist.



**Abbildung 4-12 Vergleich der gemessenen Haftkräfte der  $PS_{10\ \mu m}$ -Partikel mit den berechneten bzw. simulierten Werten. Die Kraftdifferenz bezieht sich auf die Differenz der Haftkraftwerte zwischen den Messwerten im Magnetfeld zu den Werten ohne Magnet.**

Wie zu sehen ist, stimmen die Simulationswerte für das Kompositpartikel sehr gut mit der analytischen Berechnung für den homogene Partikel überein. Die beiden theoretischen Werte sind unabhängig voneinander für zwei verschiedene Ansätze berechnet und kommen zu sehr ähnlichen Ergebnissen. An dieser Stelle kann die Berechnung der Magnetkraft als gesichert angesehen werden und die Abweichung zu der Kraftdifferenz muss durch Deformationen im Kontaktbereich hervorgerufen werden.

#### 4.1.2 Partikelfunktionalisierung

Im nächsten Schritt kamen Partikel mit vier unterschiedlichen chemischen und vier verschiedenen biologischen Oberflächenmodifikationen zum Einsatz. Alle acht Partikelsysteme basieren auf denselben Grundpartikeln und unterscheiden sich nur in ihrer Oberfläche. Bei den biologischen Modifikationen handelt es sich um die Proteine Avidin, Rinderalbumin (engl. Bovine serum albumin, BSA), Protein A (Prot A) und Streptavidin (SA). Zwei der chemischen Funktionalisierungen bestehen aus COOH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen. Dadurch kann geprüft werden, ob eine der Funktionalen-Gruppen der Aminosäuren der Proteine einen dominanten Effekt hat. Die anderen beiden Funktionalisierungen bestehen aus

COOH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen, jedoch ist zusätzlich ein PEG-Molekül zwischen der Funktionalisierung und den Partikeln eingefügt. Die genauen Partikeleigenschaften sind in Tabelle 3-2 (Seite 26) aufgelistet.

Die Partikelsysteme stellen eine Annäherung an die Prozessbedingungen dar, bei denen ebenfalls die Proteinart und der Beladungszustand der Partikel variieren.

Im ersten Schritt fanden Haftkraftmessungen mit allen Partikeltypen statt. Bei diesen Messungen wurden zunächst Doppelbestimmungen durchgeführt, um zu testen ob Unterschiede auftreten. Mit ausgewählten Partikelsystemen erfolgten im zweiten Schritt detaillierte Untersuchungen. Die Partikel besitzen verschiedene Dichten (siehe Tabelle 3-2 Seite 26), dadurch erfahren sie bei der Messung in der Zentrifuge unterschiedliche Kräfte, was sich in den abweichenden Messpunkten in den nachfolgenden Diagrammen widerspiegelt

In Abbildung 4-13 sind die Haftkraftkurven der funktionalisierten Partikel und einem PVC-Substrat in Reinstwasser dargestellt. Die Partikel mit Prot A waren zu dieser Zeit noch nicht verfügbar. In den nachfolgenden Versuchsreihen verhielten sie sich jedoch gleich wie die Partikel mit Avidin und SA, sodass die Versuche in Reinstwasser und PVC nicht nachgeholt wurden. Die untersuchten Partikelsysteme lassen sich für diese Messung grob in haftend und nicht haftend einteilen. Die Partikelsysteme mit den chemischen Funktionalisierungen und mit Avidin weisen geringe Haftkräfte auf. Von ihnen lösen sich bereits bei 0,4 nN 50 bis 80 % der Partikel. Im Gegensatz dazu bleiben die Partikel mit BSA vollständig haften. Partikel mit SA bewegen sich dazwischen.

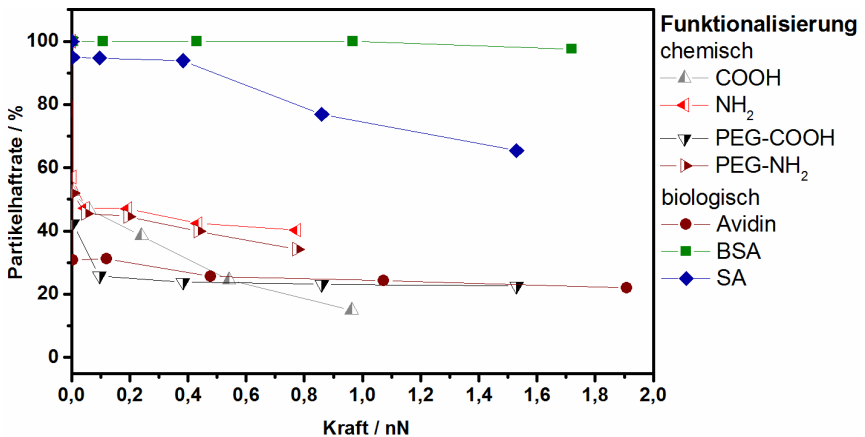
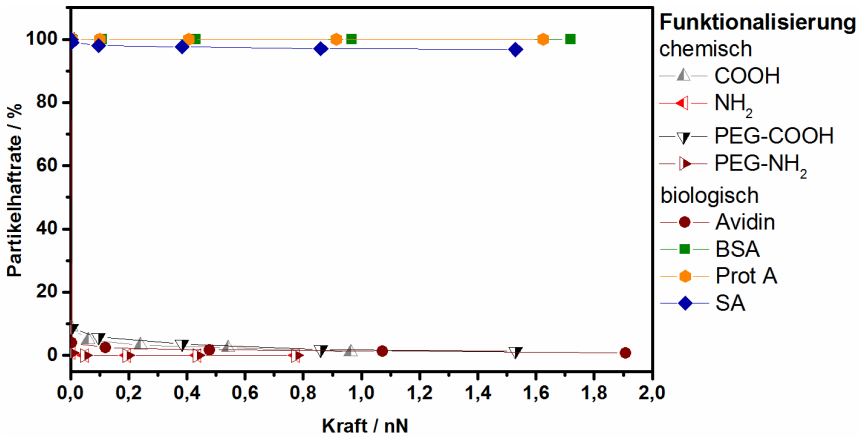


Abbildung 4-13 Haftkraftkurven der funktionalisierten PS-Partikel und PVC in Reinstwasser.

Als zweites Substratmaterial kam Glas zum Einsatz. In Abbildung 4-14 sind die entsprechenden Haftkraftkurven in Reinstwasser zu sehen. Anhand der Versuche mit den Modellpartikeln wurde erwartet, dass sich die Haftkraft der Partikelsysteme auf Glas erhöht, da Glas eine kleinere Rauheit ( $R_q=9$  nm) als PVC ( $R_q=19$  nm) aufweist. Die Abschätzung der Haftkräfte nach Rabinovich (Gl. 2-8) ergibt allerdings, dass die Haftkräfte auf Glas, aufgrund der kleineren Hamaker-Konstante, ca. 30 % kleiner sein sollten. Tatsächlich zeigt der Vergleich mit den Kurven in Abbildung 4-13 die gleichen Tendenzen, jedoch stärker ausgeprägt. Die Partikel mit den chemischen Funktionalisierungen und Avidin lösen sich bereits bei dem Versuch mit der kleinsten Trennkraft fast vollständig (über 90 %) ab. Die Partikel, die auf PVC gut hafteten, bleiben auf Glas vollständig haften.



**Abbildung 4-14** Haftkraftkurven der funktionalisierten PS-Partikel und Glas in Reinstwasser.

Die unterschiedlichen Verschiebungen der Haftkraftkurven deuten darauf hin, dass bei den funktionalisierten Partikeln und den gewählten Bedingungen außer der v.d.W.-Kraft noch weitere Kräfte einen Einfluss haben. Unter Berücksichtigung der Funktionalisierungen und der daraus resultierenden Oberflächenladungen bei neutralem pH ist davon auszugehen, dass elektrostatische Wechselwirkungen auftreten. Allerdings ergibt sich auch kein direkter Zusammenhang zwischen der Oberflächenladung und der Haftkraft. Wie in Tabelle 3-2 (Seite 26) zu sehen ist, haben alle Partikel ein Zeta-Potential zwischen -35 mV (Avidin) und -55 mV (-NH<sub>2</sub>). Die Diagramme zeigen jedoch, dass sich diese Partikelsysteme ähnlich verhalten. Im Gegensatz dazu stehen beispielsweise die Partikel mit BSA, die sich trotz ihres Zetapotentials von -40 mV nicht ablösen. Wie genau sich die Ladungen auf den Partikeln und auf den Proteinen verteilen, ist anhand des Zetapotentials nicht bestimmbar.

Ein weiterer Unterschied zwischen Glas und PVC besteht in deren Hydrophathie. An der Oberfläche der Proteine befinden sich sowohl hydrophile als auch hydrophobe AS. Der Anteil und die Struktur unterscheiden sich dabei bei den einzelnen Proteinen. Das könnte erklären, warum sich biologisch funktionalisierten Partikel unterschieden. Zwar ist der Kontaktwinkel sowohl zwischen Wasser und Glas (54°) als auch zwischen Wasser



und PVC ( $81^\circ$ ) kleiner als  $90^\circ$  und beide Materialien sind damit per Definition hydrophil, trotzdem kann das zu unterschiedlich starken Wechselwirkungen zwischen den entsprechenden Gruppen führen. Ebenfalls sind Strukturveränderungen der Proteine im Kontakt vorstellbar. Durch Variation des pH-Wertes, der Salzart und -konzentration soll der Einfluss der elektrostatischen und der hydrophatischen Wechselwirkungen genauer untersucht werden.

#### 4.1.2.1 Einfluss elektrostatische Wechselwirkung

Zur Reduktion der elektrostatischen Effekte müssen die vorhandenen Ladungen abgeschirmt oder reduziert werden. Die Abschirmung kann durch Ionen erfolgen, die Reduktion der Ladungen durch die Anpassung des pH-Werts.

Zunächst erfolgte die Anpassung des pH-Werts des Mediums, so dass dieser dem isoelektrischen Punkt (pI) des jeweiligen Partikelsystems entsprach. Am pI weisen die Partikel keine Nettoladung mehr auf. In Abbildung 4-15 und Abbildung 4-16 sind die gemessenen Haftkraftkurven (jeweils als Mittelwert einer zweifach Bestimmung) dargestellt. Der Vergleich der Kurven mit denen aus Abbildung 4-13 bzw. Abbildung 4-14 zeigt, dass die Haftkräfte mit beiden Substraten höher sind als in Reinstwasser. Die Tendenz, dass die chemisch funktionalisierten Partikel und die Partikel mit Avidin die kleinsten Haftkräfte haben, zeigt sich auch hier. Aufgrund der insgesamt kleineren Haftkräfte auf Glas im Vergleich zu PVC, ist der Effekt mit Glas deutlicher sichtbar.

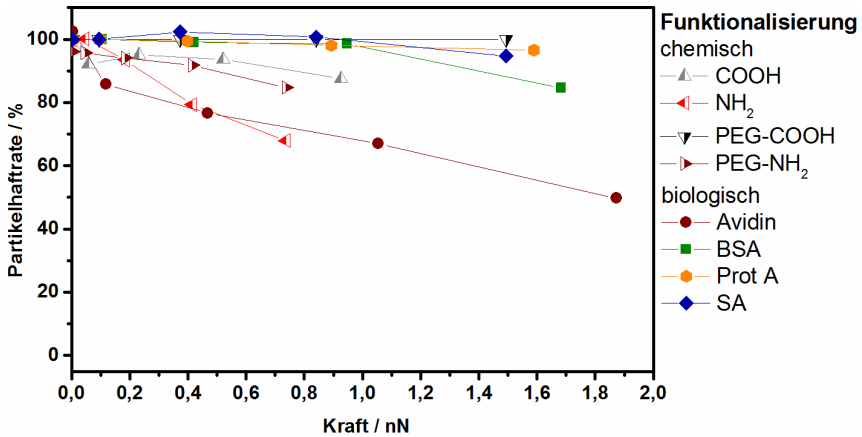


Abbildung 4-15 Haftkraftkurven der funktionalisierten PS-Partikel und PVC in 0,1 M Zitronensäure-Lösung. Der pH entspricht dem pI des jeweiligen Partikelsystems.

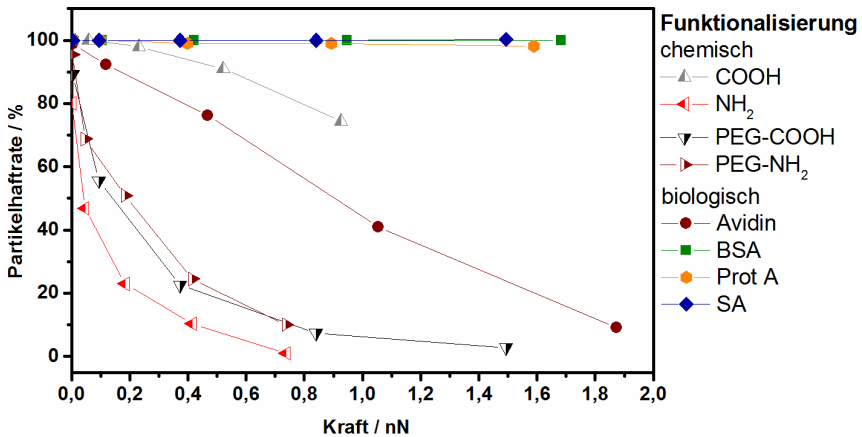


Abbildung 4-16 Haftkraftkurven der funktionalisierten Partikel und Glas in 0,1 M Zitronensäure-Lösung. Der pH entspricht dem pI des jeweiligen Partikelsystems.

Eine Abschätzung der v.d.W.-Kraft ergibt je nach Modell für PVC eine Haftkraft zwischen 0,5 nN (Rabinovich, Gl. 2-7) bis 2,3 nN (JKR\*-Modell, Gl. 2-10 und Gl. 4-7) und von 0,35 nN bis 1,5 nN für Glas. Für die Berechnung kamen die Stoffdaten unfunktionalisierter Polystyrol-Partikel zum Einsatz. Genaue Stoffdaten für die verwendeten Partikelsysteme sind nicht verfügbar. Für die Messungen mit PVC-Substraten scheinen die gemessenen Haftkräfte der chemisch und mit Avidin funktionalisierten Partikel über den berechneten Werten zu liegen, jedoch noch dieselbe Größenordnung zu haben. Eine eindeutige Aussage ist nicht möglich, da der Messbereich zu klein ist. Im Fall der Glas-Substrate lagen die Haftkräfte innerhalb des Messbereichs und im berechneten Bereich.

Aus theoretischen Betrachtungen geht hervor, dass die Haftkraft in radialer Ablöserichtung geringer als in normaler Richtung ist. Aus diesem Grund erfolgten Messungen mit den biologisch funktionalisierten Partikeln, bei denen die Zentrifugalkraft orthogonal zur Haftkraft stand. Das Ziel war auch die Partikelsysteme abzulösen, die in normaler Ablöserichtung haften blieben. Zur Reduktion der elektrostatischen Abstoßung erfolgten die Versuche in 0,1 M Zitronensäure-Lösung am pl der Partikel. Abbildung 4-17 zeigt die Haftkraftkurven der Partikel auf PVC. Die Bildauswertung der Versuche in radialer Richtung ist aufwendiger als in normaler Richtung. Löst sich ein Partikel in normaler Richtung ab, so wird es von der Zentrifugalkraft von der Substratoberfläche entfernt und ist bei der Bildauswertung nicht mehr zu sehen. In radialer Richtung können sich die Partikel über die Substratoberfläche bewegen, sind jedoch immer noch auf den Bildern zu sehen. Die Auswertung ist daher fehleranfälliger, was sich in den Fehlerbalken widerspiegelt. Die Kurven zeigen jedoch das gleiche Partikelverhalten wie bei der Ablösung in normaler Richtung. Bei den Partikeln mit BSA-, Prot A- und SA-Funktionalisierung lösen sich weniger als 40 %. Im Gegensatz dazu lösen sich von den Partikeln mit Avidin bereits über 50% der Partikel bei 0,13 nN.

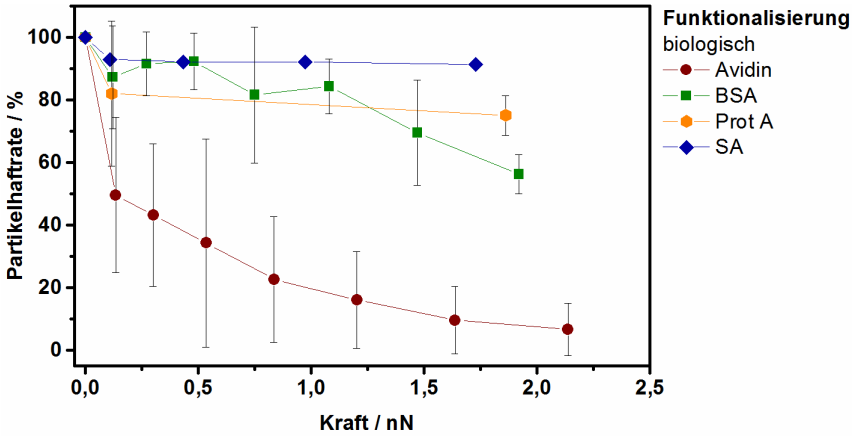


Abbildung 4-17 Haftkraftkurven der biologisch funktionalisierten Partikel und PVC in 0,1 M Zitronensäure-Lösung in radialer Ablöserichtung. Der pH entspricht dem pI des jeweiligen Partikelsystems.

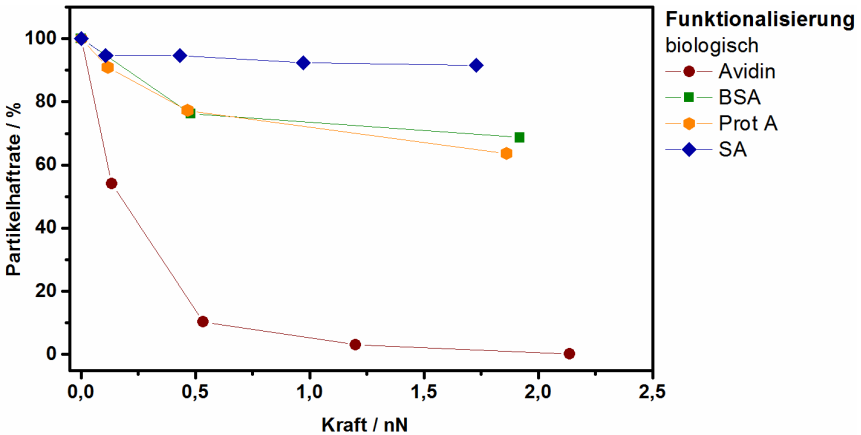
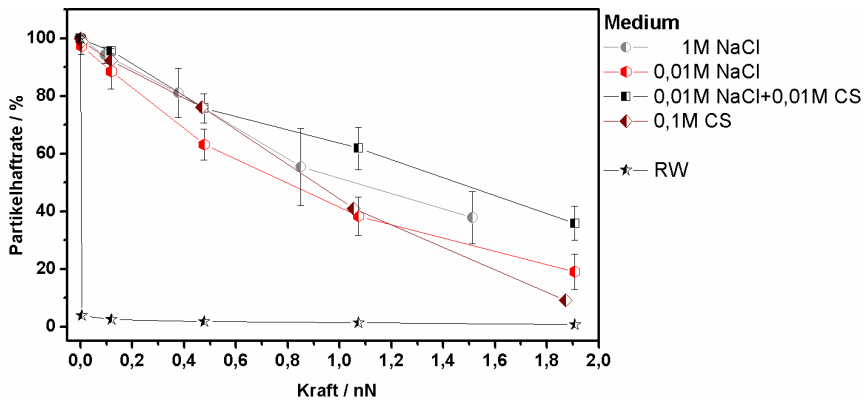


Abbildung 4-18 Haftkraftkurven der biologisch funktionalisierten Partikel und Glas in 0,1 M Zitronensäure-Lösung in radialer Ablöserichtung. Der pH entspricht dem pI des jeweiligen Partikelsystems.

Als zweites erfolgte die Messung auf Glas. Aufgrund der zeitintensiven Auswertung wurde nur eine Doppelbestimmung durchgeführt. Abbildung 4-18 zeigt die jeweiligen Mittelwerte. Wie zu sehen ist ergab sich kein unerwartetes Verhalten. Die Haftkraft der Avidin-Partikel ist auf Glas geringer als auf PVC und die BSA-, Prot A- und SA-Partikel lösen sich nur zu einem geringen Anteil (<40 %).

Die erhoffte Erhöhung der Haftkraftauflösung war auch durch die Änderung der Ablöserichtung nicht erreichbar. Da die Partikelsysteme mit BSA und mit Avidin von den biologisch funktionalisierten Partikeln die größten Unterschiede aufwiesen, erfolgten die weiteren Untersuchungen mit diesen ausgewählten Partikelsystemen.

In Abbildung 4-16 ist zu sehen, dass der Haftkraftverlauf von Avidin auf Glas den gesamten Messbereich umfasst. Dadurch bietet sich diese Kombination für weitere Untersuchung zum Einfluss der Oberflächenladung an. Nach der Reduktion der Ladung durch eine pH-Anpassung erfolgte die Abschirmung der Ladung durch den Einsatz einer NaCl-Lösung. Untersucht wurden NaCl-Konzentrationen von 0,01 und 1 M sowie eine Kombination aus NaCl und Citronensäure von jeweils 0,01 M. Die untere Konzentration wurde gewählt, da in HGMS Prozessen die Proteinadsorption an die Partikel oftmals bei Salz- und Pufferkonzentration um die 0,01 M erfolgt. Bei dem vorliegenden Messprinzip ist der Salzkonzentration durch die sinkende Dichtedifferenz zu den Partikeln eine obere Grenze gesetzt. Bei einer oberen Konzentration von 1 M ist zum einen die Dichtedifferenz noch groß genug um Messungen durchführen zu können, und zum anderen sollte die Steigerung groß genug sein, um mögliche Einflüsse auf die Haftkraft zu detektieren. In Abbildung 4-19 sind die Haftkraftkurven bei Ablösung in normaler Richtung gezeigt. Zum Vergleich sind Messungen in Reinstwasser und in 0,1 M ebenfalls aufgetragen.



**Abbildung 4-19** Haftkraftkurven der mit Avidin funktionalisierten Partikel und Glas in verschiedenen Medien bei Ablösung in Normalenrichtung. Die Messungen mit der NaCl-Lösung erfolgten bei neutralem pH; die Messungen in Citronensäure erfolgten am pl der Partikel.

Die Haftkräfte stiegen in allen Medien im Vergleich zu Reinstwasser um ein ähnliches Maß an. Eine eindeutige Reihenfolge ist nicht zu erkennen. Die tendenziell höchsten Haftkräfte weisen die Partikel in dem CS-NaCl-Medium auf. Also in dem Medium, in dem sowohl die Ladungszahl reduziert ist, als auch eine Abschirmung der verbleibenden Ladungen stattfindet. Jedoch befinden sich auch diese Haftkräfte noch im Bereich der anderen, in Puffer gemessenen, Haftkräfte.

#### 4.1.2.2 Einfluss der Hydrophathie

Die 3D-Struktur der Proteine ist maßgeblich durch hydrophathische Wechselwirkungen geprägt. In wässriger Umgebung lagern sich die hydrophoben AS hauptsächlich im Inneren des Proteins zusammen. Dadurch entsteht eine überwiegend hydrophile Oberfläche.

## 4.1.2.2.1 Salztart

Die Anwesenheit bestimmter Salze kann die Wasserstrukturierung und damit die hydrophoben Wechselwirkungen stärken (kosmotrop) oder zerstören und damit die hydrophoben Wechselwirkungen schwächen (chaotrop). Je stärker die hydrophoben Wechselwirkungen sind, desto stabiler ist die Proteinstruktur. Das heißt umgekehrt, dass sich die Proteinstruktur bei Zugabe von chaotropen Salzen destabilisiert und die Proteine sogar denaturieren können. Bei den Modellpartikeln zeigte sich, dass bereits kleine Änderungen in der Oberflächenstruktur zu Änderungen der Haftkräfte führen können (Kapitel 4.1.1.3). Eine Änderung der Proteinstruktur auf den Partikeln könnte somit ebenfalls zu einer Änderung der Haftkraft führen. Basierend auf der Hofmeisterreihe wurden zusätzlich zu NaCl noch NaSCN (chaotrop) und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (kosmotrop) als Salze gewählt. Da Anionen einen größeren Einfluss haben, wurden Natriumsalze gewählt. Die Haftkraftkurven von Avidin sind in Abbildung 4-20 für PVC und Glas gezeigt. Es ist zu sehen, dass sich bei der gewählten Konzentration keine Änderung der Haftkraft ergibt.

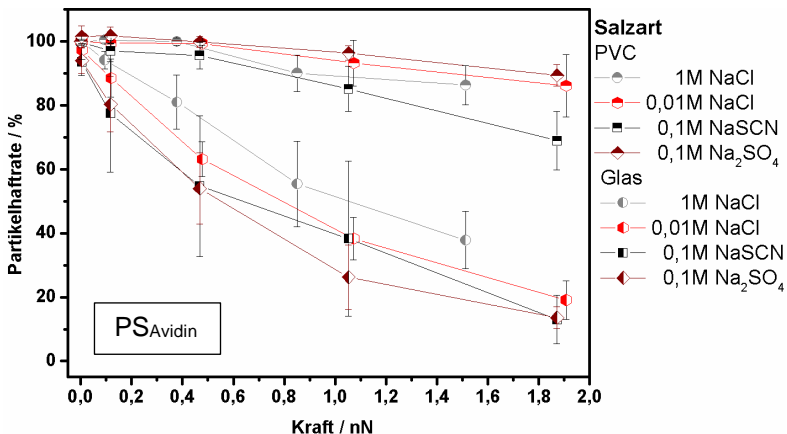


Abbildung 4-20 Haftkraftkurven der mit Avidin funktionalisierten Partikel mit PVC und Glas in verschiedenen Medien bei Ablösung in Normalenrichtung.

Analog zeigt Abbildung 4-21 die Haftkräfte von BSA auf PVC und Glas. Wie bei den vorangegangenen Versuchen sind bei allen Konfigurationen

die Haftkräfte sehr stark, sodass sich weniger als 20 % der Partikel lösen.

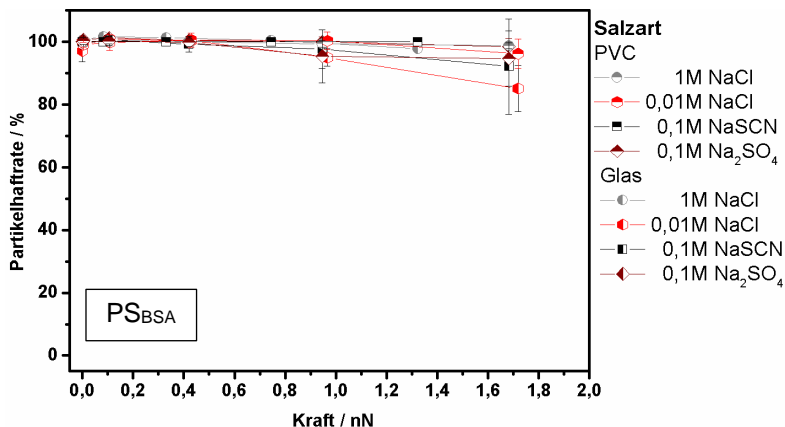


Abbildung 4-21 Haftkraftkurven der mit BSA funktionalisierten Partikel mit PVC und Glas in verschiedenen Medien bei Ablösung in Normalenrichtung.

Wie bei Avidin zeigten sich bei BSA keine salzspezifischen Haftkraftunterschiede. Die Salzkonzentration war mit 0,1 M so gewählt, dass sie prozessrelevant ist, für einen starken Einfluss auf die Wasserstrukturierung sind jedoch höhere Konzentrationen notwendig. Da diese zum einen zu einem Problem mit dem Messprinzip führen (Dichtedifferenz) und zum anderen nicht mehr prozessrelevant sind, fand für die weiteren Untersuchungen der Hydropathie eine Funktionalisierung der Substratoberflächen statt (siehe Kapitel 4.1.1.3).

#### 4.1.2.2.2 Substratfunktionalisierung

Die zweite Möglichkeit den Einfluss der hydropathischen Wechselwirkungen zu untersuchen besteht in der Modifizierung der Substratoberfläche. Ein Projektpartner beschäftigte sich mit der Funktionalisierung von Glas und führte die entsprechenden Modifikationen durch. Als Maß für die Hydrophobizität bzw. Hydrophilizität wurde der statische Kontaktwinkel  $\alpha$  mit Wasser betrachtet. Die Glassubstrate wurden zum einen mit 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltriethoxysilan (PFOTES,  $\alpha = 109^\circ$ ) und mit Trichloro(3,3,3-trifluorpropyl)silan (FPTS,  $\alpha = 92^\circ$ ) hydrophobiert und



zum anderen mit Peroxomonoschwefelsäure (POS,  $\alpha = 15^\circ$ ) gereinigt, was die Hydrophilizität gegenüber dem unbehandelten (mit Ethanol gereinigtem) Glas (UBG,  $\alpha = 54^\circ$ ) erhöhte.

In Abbildung 4-22 sind die Haftkraftkurven für mit Avidin funktionalisierte Partikel auf den vier Glasarten in 0,01 NaCl-Lösung und in Reinstwasser zu sehen. Zum Vergleich ist zusätzlich noch die Haftkurve in 0,1M Citronensäurepuffer eingetragen.

Sowohl in Reinstwasser als auch in der NaCl-Lösung weisen die Partikel auf den chemisch funktionalisierten – und damit hydrophoben- Gläser höhere Haftkräfte auf als auf den nicht funktionalisierten Gläsern. In NaCl-Lösung haben die PFOFTES-Partikel die höchsten und die FPTS-Partikel die zweithöchsten Haftkräfte. In Reinstwasser ist die Reihenfolge umgekehrt. Eventuell spielen dabei elektrostatische Effekte eine Rolle, die durch die Zugabe von NaCl unterdrückt werden.

Abbildung 4-23 zeigt die gleichen Daten für mit BSA funktionalisierte Partikel. Die BSA Partikel wiesen bereits auf dem unbehandelten Glas in NaCl eine Haftkraft oberhalb des Messbereichs auf, sodass eine eventuelle Erhöhung durch die chemische Funktionalisierung nicht messbar ist. Auf dem geätzten Glas sank die Haftkraft der Partikel ab.

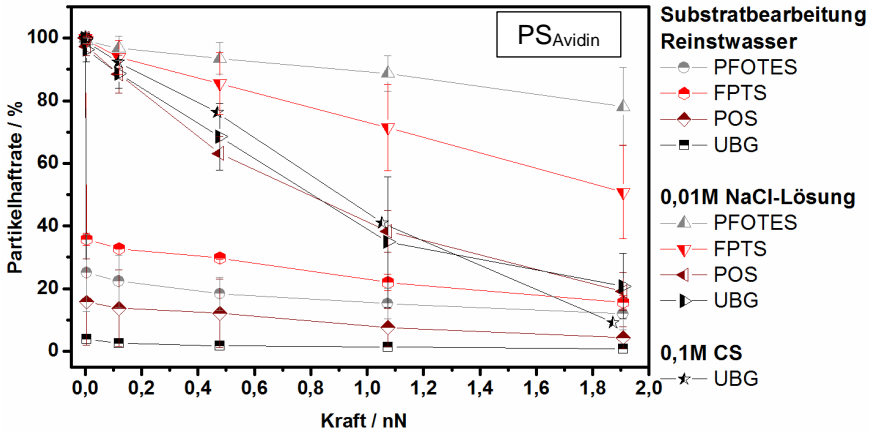


Abbildung 4-22 Haftkraftkurven der mit Avidin funktionalisierten Partikel auf verschiedenen Glassubstraten und in verschiedenen Medien. Die Nomenklatur der Glasbearbeitungen ist wie folgt: PFOTES, FPTS – chemische Oberflächenfunktionalisierung mit 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltriethoxysilan bzw. Trichloro(3,3,3-trifluoropropyl)silan; gereinigt – mit Peroxomonoschwefelsäure gereinigte unfunktionalisierte Glasoberfläche; unbehandelt – mit Ethanol gereinigte Glasoberfläche.

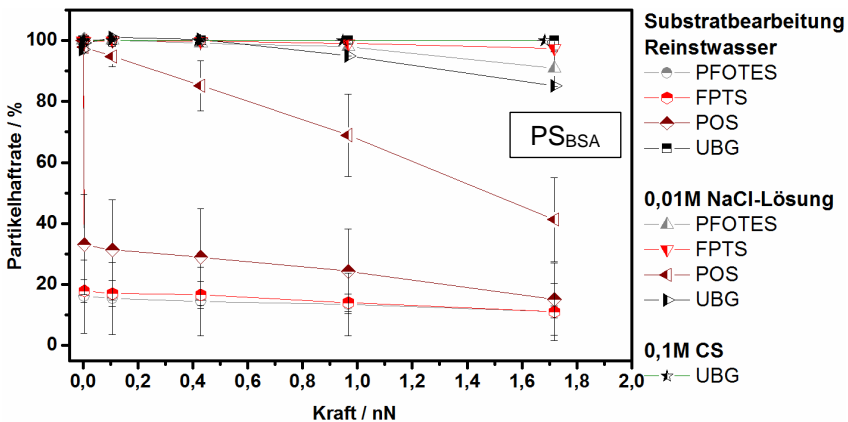


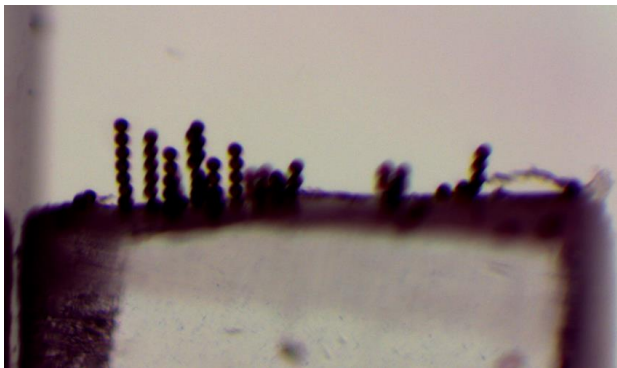
Abbildung 4-23 Haftkraftkurven der mit BSA funktionalisierten Partikel auf verschiedenen Glassubstraten und in verschiedenen Medien. Die Nomenklatur der Glasbearbeitungen ist wie folgt: PFOTES, FPTS – chemische Oberflächenfunktionalisierung mit 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltriethoxysilan bzw. Trichloro(3,3,3-trifluoropropyl)silan; gereinigt – mit Peroxomonoschwefelsäure gereinigte unfunktionalisierte Glasoberfläche; unbehandelt – mit Ethanol gereinigte Glasoberfläche.

## 4.2 Partikel-Partikel-Wechselwirkung<sup>2</sup>

In einem Partikelhaufwerk stehen die meisten Partikel im Kontakt mit anderen Partikeln, sodass für die vollständige Beschreibung des Partikelverhaltens in einem Magnetfilter ebenfalls die Partikel-Partikel-Haftkräfte erfasst werden müssen.

### 4.2.1 Methodenentwicklung

Das dafür notwendige Messverfahren musste zunächst entwickelt werden. In Vorversuchen gelang es Partikelketten in einem Magnetfeld zu erzeugen. Abbildung 4-24 zeigt beispielhaft Partikelketten aus  $PS_{41\ \mu\text{m}}$ -Partikel. Mit  $PS_{19\ \mu\text{m}}$ -Partikel konnten ähnliche Ketten erzeugt werden. Für die Vermessung der Haftkräfte war diese Anordnung jedoch nicht zielführend, da während der Zentrifugation im LUMiSizer Umlagerungsprozesse stattfanden und im Anschluss nicht mehr nachvollziehbar war welche Partikel aus welcher Kette stammten.



**Abbildung 4-24** Partikelketten von  $PS_{41\ \mu\text{m}}$ -Partikeln auf einem Glassubstrat in Reinstwasser im Magnetfeld eines N52 Magneten.

---

<sup>2</sup> Der Großteil der in diesem Kapitel gezeigten Daten ist in der Publikation *Characterization of the adhesion force between magnetic microscale particles and the influence of surface-bound protein*. Powder Technology, 2015. **283**: p. 163-170 veröffentlicht.

Aus diesem Grund erfolgte die Betrachtung nicht an einzelnen Partikelketten sondern an einem Partikelhaufwerk. Abbildung 4-25 zeigt auf der oberen Seite ein Partikelhaufwerk aus  $PS_{41\ \mu\text{m}}$ -Partikel in der Glasküvette. Auf der Seite des Partikelhaufwerks befand sich während des Versuchs ein Magnet vom Typ N52. Die Küvette wird so in die Zentrifuge eingebaut, dass die Zentrifugalkraft das Haufwerk in der Abbildung nach rechts abtrennt. Auf der unteren Seite der Abbildung ist eine Aufnahme der entsprechenden Transmissionsprofile des LumiSizers zu sehen. Während dieses Versuchs erfolgte eine Drehzahlsteigerung in Schritten von 200 1/min von 200 1/min auf 1000 1/min. Bei jeder Drehzahlerhöhung lösen sich solange Partikel aus dem Haufwerk bis ein neues Kräftegleichgewicht erreicht ist, gleichzeitig lagern sich die abgetrennten Partikel auf der gegenüberliegenden Seite an und bilden dort ein neues Partikelhaufwerk. In den Transmissionsprofilen zeigt sich das, indem die Profile von rechts (rot – Versuchsstart) nach links (grün – Versuchsende) wandern. Der linke Bereich der Kurven zeigt dabei die Haufwerksdesintegration.

Die Transmissionsprofile geben die Drehzahl und die dazugehörige Position der Haufwerksgrenze an. Daraus ist die Zentrifugalkraft berechenbar, die auf ein Partikel in der obersten Partikelschicht im Haufwerk wirkt und somit die Haftkraft, die zwischen den Partikeln der oberen beiden Partikelschichten auftritt. Die Messungen der Haufwerksdesintegrationskurven der Modellpartikelsysteme  $PS_{1\ \mu\text{m}}$  und  $PS_{19\ \mu\text{m}}$  und der funktionalisierten MagPrep-Partikel erfolgte in einem 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer bei pH 8. Für die  $PS_{\text{PEG-COOH}}$ -Partikel kam ein 0,01M Citronensäurepuffer, dessen pH-Wert von 4,4 dem pl der Partikel entsprach zum Einsatz. Der gleiche Puffer wurde bereits bei den Partikel-Wand-Haftkraftmessungen verwendet. Die unterschiedlichen Puffer sind aufgrund der verschiedenen Partikeleigenschaften notwendig. Die MagPrep-Partikel binden in dem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer die Proteine Katalase und BSA an ihre Oberfläche. Der Einsatz des Citronensäurepuffers war damit nicht möglich. Die Ergebnisse der Partikel-Wand-Haftkraftmessungen zeigen, dass sowohl durch einen Puffer am pl als auch ein ionenhaltiger Puffer die elektrostatischen Wechselwirkungen minimiert werden. Dadurch sind die Ergebnisse miteinander vergleichbar.

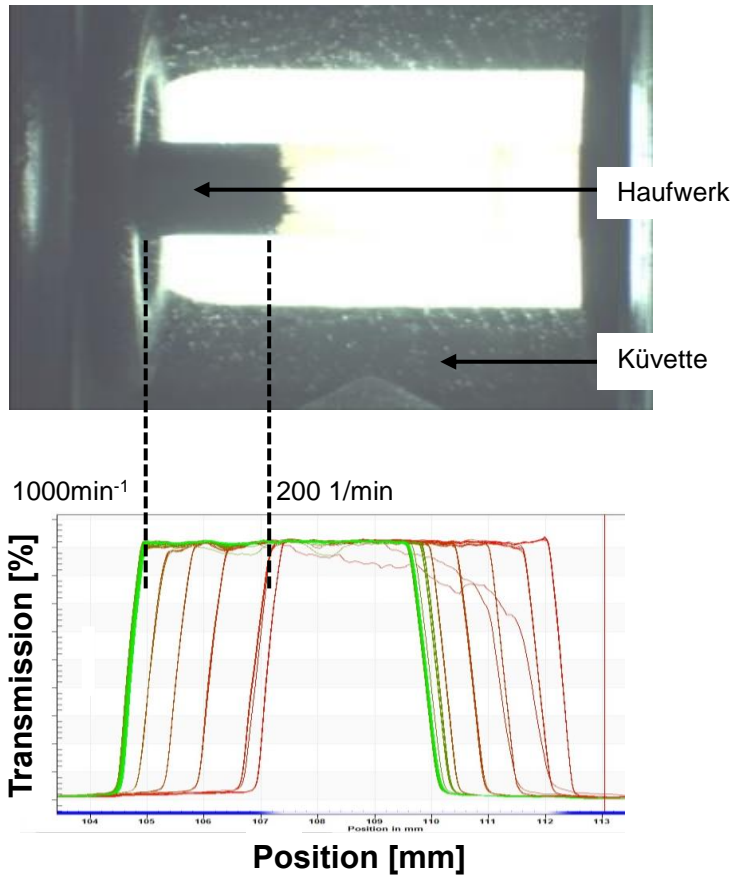


Abbildung 4-25 oben) Partikelhaufwerk aus PS<sub>19</sub> μm-Partikel in Küvette; unten) Aufnahme der LumiFugen-Transmissionsprofile des Partikelhaufwerks bei den Drehzahlen 200, 400, ..., 1000 1/min, während des Versuchs war ein Magnet N52 an der Unterseite der Küvette angebracht

In Abbildung 4-26 sind die Haufwerksdesintegrationskurven der Partikelsysteme jeweils ohne Magnet und mit den Magnettypen YX18 und N52 gezeigt. Im Fall der PS-Partikel lösten sich die Haufwerke ohne Magnetfeld bereits bei der kleinsten Drehzahl vollständig auf. Die Haftkraft zwischen den Partikeln kann daher für  $PS_{1\ \mu\text{m}}$  nur als kleiner  $0,7 \cdot 10^{-4}$  nN und für  $PS_{19\ \mu\text{m}}$  als kleiner 0,1 nN angegeben werden. Bei den  $PS_{\text{PEG-COOH}}$ -Partikeln beträgt die Haftkraft ca.  $6,3 \cdot 10^{-3}$  nN. Nach dem Haftkraft-Modell von Hamaker sollten die Haftkräfte zwischen zwei Kugeln der gleichen Größe und des gleichen Materials halb so groß sein, wie zwischen einer Kugel und einer ebenen Oberfläche. Der Vergleich der gemessenen Haftkräfte im Haufwerk mit denen zwischen Partikel und Substrat zeigt jedoch, dass die Abschätzung nach dem Hamaker-Modell nicht zutrifft. Auf unbearbeiteten PVC betrug die Haftkraft der  $PS_{19\ \mu\text{m}}$ -Partikel 3 nN und die von  $PS_{\text{PEG-COOH}}$  über 1,5 nN. Im Haufwerk waren die Haftkräfte also über 30- bzw. 238-mal kleiner. Eine quantitative Aussage ist nicht möglich, da die Haftkräfte teilweise außerhalb des Messbereichs lagen. Auch ist zu berücksichtigen, dass das PVC nicht dieselben Oberflächeneigenschaften wie die Partikel hat.

In Anwesenheit eines Magnetfeldes sind höhere Kräfte notwendig um die Haufwerke aufzulösen. Die Desintegrationskurven sind dabei grob in zwei Bereiche einzuteilen. Im ersten Bereich ist das Haufwerk stabil (unterkritischer Bereich). Im zweiten Bereich wird die Magnetkraft überschritten und die oberen Partikelschichten lösen sich ab, bis das neue Kräftegleichgewicht erreicht ist (überkritischer Bereich). Auf diese Weise zeigen die Kurven den Anstieg der Magnetkraft mit zunehmender Annäherung an den Magneten. Eine Besonderheit zeigt sich dabei bei den  $PS_{1\ \mu\text{m}}$ - und den MagPrep-Partikeln. Bei diesen kommt es vor der Partikelablösung zu einem Anstieg der Haufwerkshöhe. Die Magnetisierbarkeit der beiden Partikelsysteme ist höher als die der PS-Partikel (siehe Tabelle 3-1 Seite 24). Es ist also davon auszugehen, dass sich die Partikel zunächst entlang der Magnetfeldlinien ausrichten bevor sie sich ablösen.

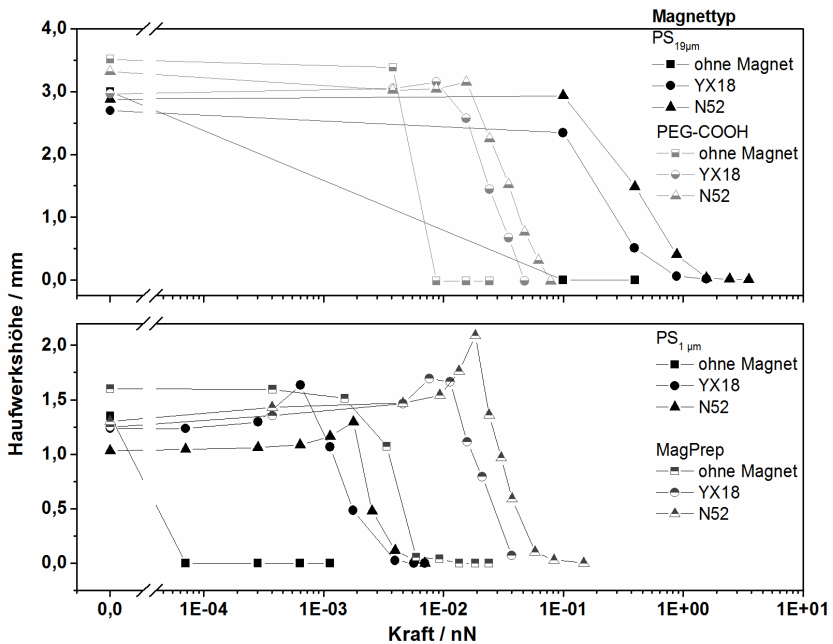
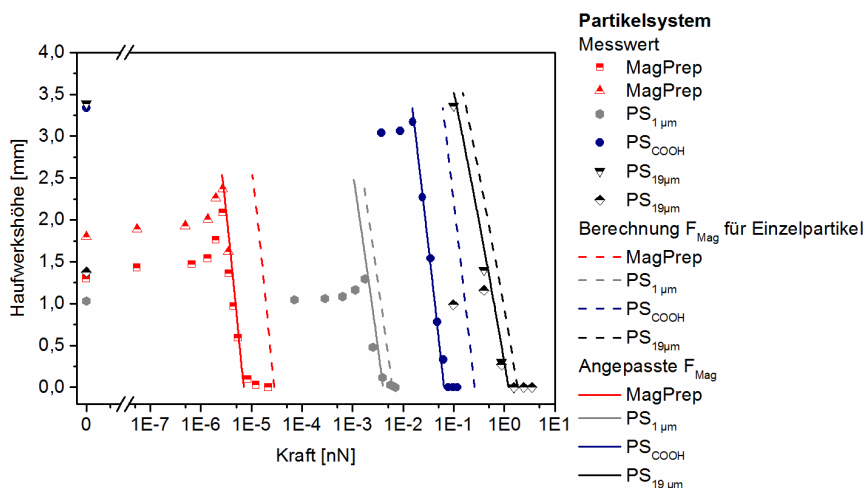


Abbildung 4-26 Haufwerksdesintegrationskurven für die Partikelsysteme  $PS_{1\mu m}$ ,  $PS_{19\mu m}$ , MagPrep jeweils in 0,02M  $NaH_2PO_4$ -Puffer (pH 8) und  $PS_{PEG-COOH}$  (in 0,01M Citronensäurepuffer, pH=4,4). Die Messungen erfolgten ohne Magnet und mit den Magnettypen YX18 und N52

In Abbildung 4-27 sind die Haufwerks-Desintegrationskurven von Mag-Prep,  $PS_{1\mu m}$ ,  $PS_{19\mu m}$  und  $PS_{PEG-COOH}$  in den entsprechenden Puffern für den Magnettyp N52 gezeigt. Die gestrichelten Linien geben die nach Gl. 2-22 berechnete Magnetkraft eines Einzelpartikels an. Die erhaltene Kraft ist die Kraft, die auf ein entsprechendes Partikel an der Stelle wirkt, wenn es sich in Luft befindet, d.h. also in Abwesenheit des Haufwerks. Qualitativ stimmen die Verläufe der Messung mit denen der Rechnung überein. Zum einen steigt die Magnetkraft mit steigendem Partikeldurchmesser bzw. Volumen, was die Tatsache widerspiegelt, dass die Magnetkraft eine Volumenkraft ist. Zum anderen stimmt der Anstieg der gemessenen Magnetkraft mit sinkender Haufwerkshöhe mit der Rechnung überein. Die absoluten Werte der berechneten Kraft sind doch größer als die gemessene Kraft. Erst wenn sich das Haufwerk fast vollständig auflöst und gegen eine Monopartikellage strebt, nähern sich Rechnung

und Messung an. Das Magnetfeld wird also durch das Haufwerk abgeschwächt. Für die unfunctionalisierten PS-Partikel entsprach die Magnetkraft im Haufwerk in etwa  $2/3$  der für ein Einzelpartikel berechneten Kraft. Für MagPrep und  $PS_{PEG-COOH}$  betrug die Kraft lediglich  $1/4$  der berechneten Kraft. Die entsprechenden Kurven sind mit durchgezogenen Linien eingezeichnet. Für  $PS_{19\ \mu\text{m}}$ - und MagPrep-Partikel sind die Daten für zwei Anfangshöhen gezeigt. Wie zu sehen ist, verläuft die Haufwerksdesintegration unabhängig von der Ausgangshöhe entlang der korrigierten Magnetkraftkurve.

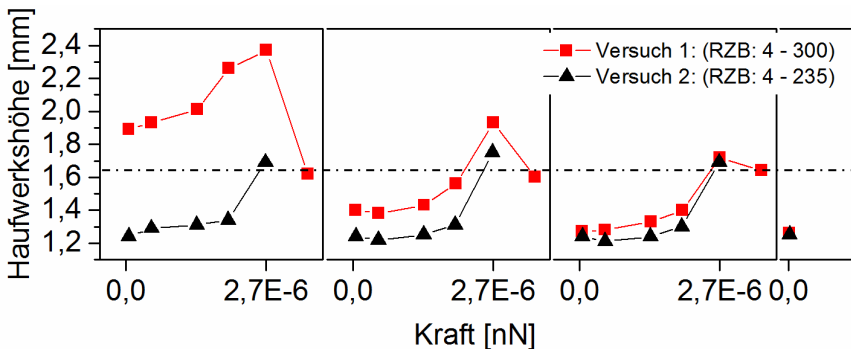


**Abbildung 4-27** Haufwerksdesintegrationskurven von MagPrep,  $PS_{1\ \mu\text{m}}$ ,  $PS_{19\ \mu\text{m}}$  (jeweils in  $0,02\ \text{M}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 8) und  $PS_{PEG-COOH}$  (in  $0,01\ \text{M}$  Citronensäurepuffer, pH=4,4) mit Magnettyp N52

Für die weitere Untersuchung des Effekts der Erhöhung der Haufwerkshöhe vor der Partikelablösung kamen die MagPrep-Partikel zum Einsatz. Die MagPrep-Partikel haben die höchste Magnetisierbarkeit, wodurch der Effekt am stärksten ausgeprägt ist. Außerdem handelt es sich bei ihnen um ein Partikelsystem, das aufgrund seiner Anionentauscherguppe auf der Oberfläche prozessrelevant und damit von besonderem Interesse ist. In den vorangegangenen Versuchen sank die Haufwerkshöhe ab einer Zentrifugalkraft von ca.  $2,7\text{E}-6\ \text{nN}$ . Das entspricht einem RZB-Wert von 235 und einer Drehzahl von  $1400\ \text{min}^{-1}$ . Im Rahmen des Versuchs wurde



die Haufwerksausdehnung zum einen im unterkritischen Bereich, das heißt bei RZB-Werten kleiner als 235, zum anderen im überkritischen Bereich mit einem RZB-Wert von maximal 300 erfasst. Für den Versuch wurde die Drehzahl dementsprechend schrittweise von der minimalen Drehzahl ( $200 \text{ min}^{-1}$ ) bis zum jeweiligen Maximum von  $1400$  bzw.  $1600 \text{ min}^{-1}$  erhöht und anschließend wieder auf  $200 \text{ min}^{-1}$  reduziert. Direkt im Anschluss erfolgte die nächste schrittweise Erhöhung bis zum Maximum. Insgesamt wurden drei Durchgänge durchlaufen. In Abbildung 4-27 zeigen die dreieckigen Symbole den Verlauf, sofern die kritische Kraft nicht überschritten wird und die viereckigen Symbole zeigen den Verlauf wenn sie überschritten wird.



**Abbildung 4-28** Haufwerksdesintegrationskurven von MagPrep-Partikel bei über- und bei unterkritischer Belastung.

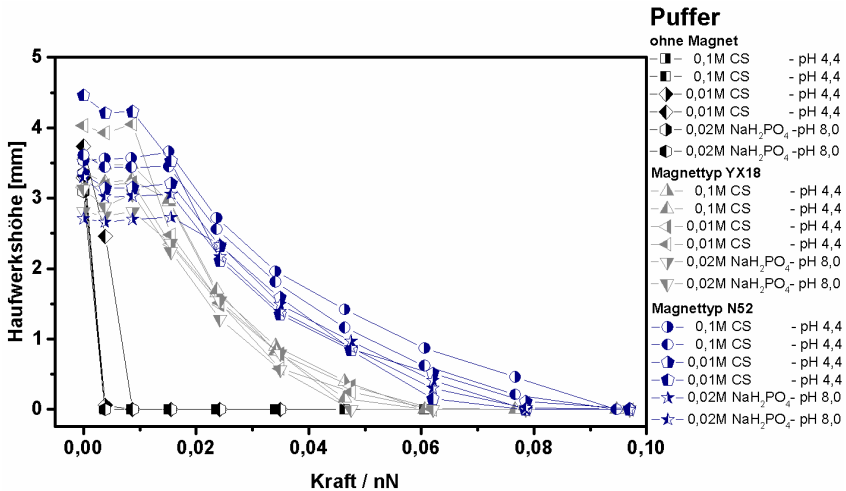
Im Versuch 1 (überkritisch) dehnt sich das Haufwerk in jedem Durchgang von seiner Ausgangshöhe bis zu seiner jeweiligen maximalen Höhe bei  $2,7E-6 \text{ nN}$  aus. Die weitere Erhöhung der Trennkraft führt anschließend zu einer Reduktion der Haufwerkshöhe bis eine Höhe von  $1,6 \text{ mm}$  erreicht ist. Die Reduktion der Höhe erfolgt durch die Abtrennung von Partikeln. Aus diesem Grund nimmt sowohl die Starthöhe mit der Durchgangszahl ab, als auch die Differenz zwischen der maximalen Höhe und den erreichten  $1,6 \text{ mm}$ . Dass im zweiten und teilweise noch im dritten Durchgang Partikel abgetrennt werden, zeigt, dass innerhalb des Haufwerks Umstrukturierungsvorgänge stattfinden. Andernfalls dürften sich

nach dem ersten Durchgang, in dem dieselbe maximale Trennkraft auftrat, keine Partikel mehr abtrennen. Die Endhaufwerkshöhe aus Versuch 1 wurde anschließend als Starthöhe für Versuch 2 (neue Probe) ausgewählt. Im unterkritischen Bereich ist zu sehen, dass sich das Haufwerk in allen drei Durchgängen mit steigender Trennkraft von 1,2 mm auf ca. 1,7 mm ausdehnt. Nach der Reduktion der Drehzahl sinkt die Haufwerkshöhe wieder auf die Ausgangshöhe zurück. Es lösen sich also keine Partikel ab.

Die Daten zeigen, dass es mit dem Aufbau und der Durchführung möglich ist die Kräfte, insbesondere Magnetkräfte, zwischen Partikeln in einem Haufwerk zu charakterisieren.

#### 4.2.2 Einfluss Medium

Abhängig von dem Zielprotein können verschiedene Puffer- und Salzlösungen für einen Abtrennprozess zum Einsatz kommen. In Kapitel 4.1.2.1 zeigte sich, dass der Einfluss der Pufferart auf die Partikel-Wand-Wechselwirkung gering ist. Wichtig war nur, dass überhaupt Ionen in der Lösung vorhanden waren, die die Oberflächenladungen abschirmen konnten. Anhand der  $\text{PS}_{\text{PEG-COOH}}$ -Partikel sollte validiert werden, dass dies auch für die Wechselwirkungen in einem Partikelhaufwerk gilt. Zum Einsatz kamen zum einen zwei Citronensäurepuffer mit einer Konzentration von 0,01 bzw. 0,1 M. Der eingestellte pH von 4,4 entspricht dem  $pI$  der Partikel. Zum anderen erfolgten die Messungen in einem 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer bei pH 8. Der  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer wurde gewählt, da in diesem BSA und Katalase an die MagPrep-Partikel binden. In Abbildung 4-29 sind die Haufwerksdesintegrationskurven gezeigt. Bei den gezeigten Kurven handelt es sich um die Kurven, deren Anfangshöhen am besten übereinstimmten. Bei den Symbolen derselben Form und Farbe handelt es sich jeweils um die gleichen Versuchsbedingungen.



**Abbildung 4-29** Haufwerksdesintegrationskurven von  $\text{PS}_{\text{PEG-COOH}}$ -Partikeln in verschiedenen Puffern ohne Magnet und mit den Magneten YX18 und N52.

Ohne einen Magneten sind die Haftkräfte zwischen den Partikeln zu gering um mit der Messmethode erfasst zu werden. Das gilt unabhängig von dem verwendeten Puffer. Wie bereits für Abbildung 4-26 und Abbildung 4-27 gezeigt und diskutiert steigt die Haftkraft mit steigender Magnetstärke. Für die unbeladenen Partikel zeigt Abbildung 4-29 zusätzlich, dass die Haufwerkshöhe sich wiederholbar und unabhängig von der Pufferzusammensetzung einstellt. In diesem Fall hat die Magnetkraft einen dominanten Einfluss.

#### 4.2.3 Einfluss Protein

Für die Untersuchung des Einflusses der Proteinbeladung standen zum einen  $\text{PS}_{\text{BSA}}$ -Partikeln und zum anderen mit BSA bzw. Katalase beladene MagPrep-Partikel in ausreichendem Maß zu Verfügung.

Bei den  $\text{PS}_{\text{BSA}}$ -Partikeln handelt es sich um die  $\text{PS}_{\text{PEG-COOH}}$ -Partikel auf die 200  $\mu\text{g}$  BSA pro Gramm Partikel kovalent gebunden sind. Die Haufwerksdesintegrationskurven für  $\text{PS}_{\text{BSA}}$  in verschiedenen Puffern sind zusammen mit einer Vergleichskurve der  $\text{PS}_{\text{PEG-COOH}}$ -Partikel in Abbildung 4-30 gezeigt. Für die Auftragung sind die Messkurven nach

Magnetfeldstärke getrennt und untereinander gezeichnet. Im Vergleich zu Abbildung 4-29 zeigt bereits die unterschiedliche Darstellung, dass sich die Partikel anders verhalten. Im Gegensatz zu den unbeladenen Partikeln waren die Haftkräfte der mit BSA beladenen Partikel in dem Citronensäure-Puffer höher als im Natriumdihydrogenphosphat-Puffer. Außerdem sind die Messungen mit und ohne Magnet nicht so klar voneinander zu unterscheiden wie es ohne BSA der Fall ist. Besonders deutlich ist das an den Messungen mit dem 0,1 M Citronensäurepuffer zu sehen. Dort erreichen die Partikel Haftkräfte wie sie auch bei den Messungen mit den starken N52-Magneten auftraten.

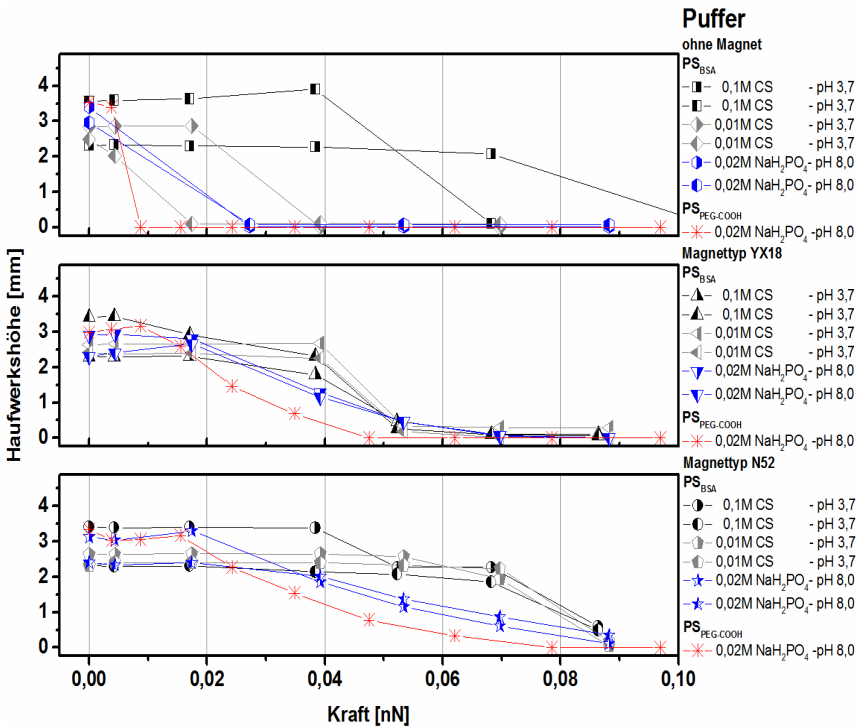


Abbildung 4-30 Hautwerksdesintegrationskurven von PS<sub>BSA</sub>-Partikeln in verschiedenen Puffern ohne Magnet und mit den Magneten YX18 und N52. Zum Vergleich ist eine Kurve der unbeladenen Grundpartikel PS<sub>PEG-COOH</sub> gezeigt.

Insgesamt sind die Haftkräfte zwischen den  $PS_{BSA}$ -Partikeln höher als zwischen den Ausgangspartikeln ohne BSA. Ein Grund für die gestiegene Haftkraft kann in dem hydrophoben Charakter des BSA liegen. In wässrigen Medien sorgen die hydrophoben Wechselwirkungen dann dafür, dass eine höhere Trennkraft benötigt wird um die Partikel voneinander zu trennen. Bereits bei den Partikel-Wandhaftkraftmessungen waren die Haftkräfte der  $PS_{BSA}$  umso stärker, je hydrophober das Substrat war.

Bei den MagPrep-Partikel erfolgt in einem geeigneten Puffer eine Adsorption der Proteine an die Partikeloberfläche. Für die Adsorption von BSA ist ein 0,02 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 8 geeignet. Außer BSA bindet auch Katalase bei diesen Bedingungen an die Partikel. Die Beladung der Partikel betrug  $0,328 \text{ g}_{BSA} / \text{g}_{Partikel}$  bzw.  $0,235 \text{ g}_{Katalase} / \text{g}_{Partikel}$ . Da es sich bei den MagPrep-Partikeln um ein industrielles Produkt handelt, das für die Abtrennung von Proteinen konzipiert ist, stand genügend Produkt für Mehrfachmessungen zu Verfügung. Die in Abbildung 4-31 gezeigten Kurven stellen die Mittelwerte aus einer sechsfach Bestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen dar. Die Auftragung erfolgt über die relative Zentrifugalbeschleunigung, da für die Berechnung der Kraft die genaue Masse, bzw. die Dichte und das Volumen der Partikel bekannt sein müssen. Für die MagPrep-Partikel ist dies in Anwesenheit der Proteine jedoch schwierig zu bestimmen, da die Partikel aufgrund ihrer Größe und Remanenz zu Agglomeration neigen (siehe Abbildung 3-3, Seite 27).

Durch die Auftragung über die RZB können keine direkten Unterschiede in der Haftkraft der Partikel abgelesen werden, jedoch zeigt die Auftragung eine Veränderung des Abtrennverhaltens bei gleichen Zentrifugalbeschleunigungen bzw. Drehzahlen und ist somit prozessrelevant. Bei Betrachtung der Abbildung fällt sofort der unterschiedliche Verlauf der Haufwerksdesintegrationskurve von  $\text{MagPrep}_{Katalase}$  ohne Magnet auf. Während sich die Haufwerke der anderen beiden Partikelsysteme bereits bei  $RZB=75$  vollständig auflösten, sinkt die Haufwerkshöhe der  $\text{MagPrep}_{Katalase}$  bis  $RZB=100$  auf 1,5 mm ab und bleibt bis  $RZB=750$  konstant. Bereits bei der Handhabung, d.h. beim der Probenvorbereitung und beim Befüllen der Küvetten erwiesen sich die Partikel als „klebrig“ und schwierig zu verarbeiten. Auch mit Magnet liegen die Kurven der  $\text{MagPrep}_{Katalase}$ -Partikel über denen von  $\text{MagPrep}$  und  $\text{MagPrep}_{BSA}$ , jedoch verkleinert

sich der Unterschied. Das Verhalten kann eventuell auf eine Netzwerkbildung zwischen den Katalase-Molekülen zurück zu führen sein. Um möglichst konstante Anfangsbedingungen zu schaffen erfolgt vor dem Versuch eine Kompaktierung der Haufwerke mit  $RZB=280$ . Dabei erfahren die oberen Partikelschichten einen geringeren Druck als die unteren Schichten. Durch den höheren Druck kommen die unteren Schichten stärker in Kontakt, sodass sich auch stärkere Wechselwirkungen ausbilden können. Die Kurven zeigen jedoch auch, dass die Endhöhe des Haufwerks der  $MagPrep_{Katalase}$ -Partikel mit steigender Magnetstärke abnimmt. Das deutet daraufhin, dass die Partikel versuchen sich entlang des Magnetfeldes auszurichten, wodurch die Netzwerkstruktur zum Teil wieder aufbricht.

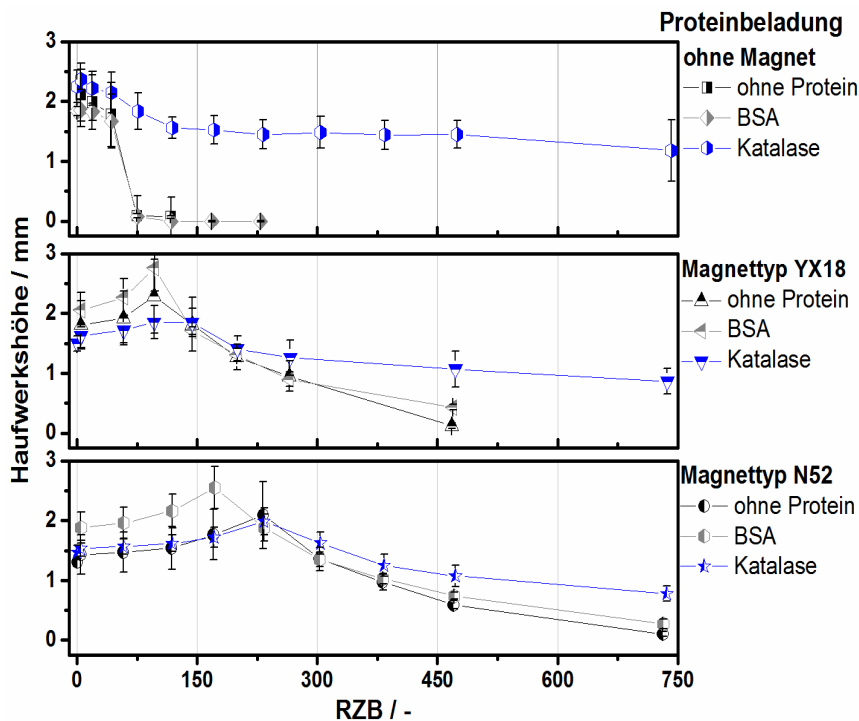
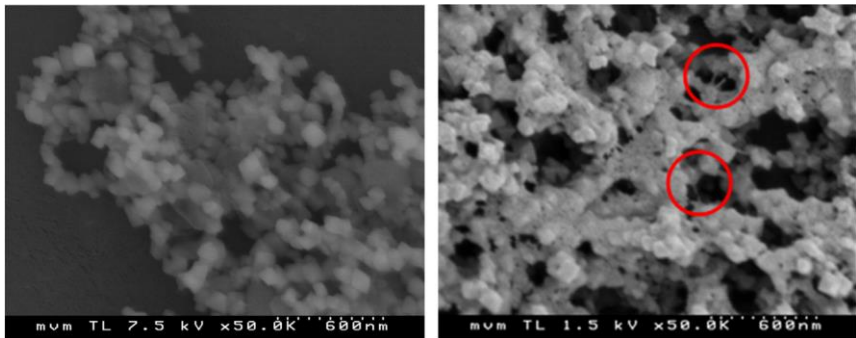


Abbildung 4-31 Haufwerksdesintegrationskurven von  $MagPrep$ -Partikeln ohne gebundene Proteine und mit Beladungen von  $0,328 \text{ g}_{BSA} / \text{g}_{Partikel}$  bzw.  $0,235 \text{ g}_{Katalase} / \text{g}_{Partikel}$  in einem  $0,02 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer jeweils gemessen ohne Magnet und mit den Magnettypen YX18 bzw. N52.

In Abbildung 4-32 sind REM-Bilder der unbeladenen und der mit Katalase beladenen Partikel gezeigt. Die Oberfläche der MagPrep<sub>Katalase</sub>-Partikel sieht im Vergleich zugesezt aus. Auch sind vereinzelt lange fadenartige Strukturen zu erkennen, die die unbeladenen Partikel nicht aufweisen. Aufgrund es kleinen Bildausschnittes können die Bilder jedoch nur als Indiz gewertet werden. Besonders kritisch ist dabei der für die Aufnahmen notwendige Trocknungsschritt, bei dem die beobachteten Strukturen ebenfalls entstehen könnten.



**Abbildung 4-32** REM-Aufnahmen von MagPrep-Partikeln; links) ohne Katalase; rechts) mit Katalase

Im Gegensatz zu der Beladung mit Katalase hat die Beladung mit BSA keinen Einfluss auf das Auflöseverhalten des Sediments. Die Änderungen der Dichte und des Anteils des nicht magnetisierbaren Materials heben sich an der Stelle also auf.





## 5 Entwicklung und Bau einer Optikzentrifuge<sup>3</sup>

Die in Kapitel 3.3 (Seite 32) beschriebene Methode der Haftkraftmessung mittels Zentrifugenmethode funktioniert sehr gut für die Partikelablösung in normalen Richtung. Für die Ablösung in radialer Richtung ist sie jedoch nur eingeschränkt nutzbar, da es zu Bewegungen der Partikel auf dem Substrat kommen kann und die Zuordnung der Partikel anhand des Vergleichs der Bilder vor und nach dem Versuch nur schwierig oder teilweise gar nicht mehr möglich ist. Eine weitere Limitierung der Methode zeigt sich bei der Vermessung der Partikel-Partikel-Wechselwirkung in Form der Haufwerksdesintegration (Kapitel 4.2.1 Seite 85). So ist es zwar möglich den Verlauf der Haufwerkshöhe zu verfolgen, die Abtrennkinetik ist jedoch anhand der ein-dimensionalen Informationen nicht nachvollziehbar. Deshalb erfolgte parallel zu den Untersuchungen in der Laborzentrifuge der Bau einer Optikzentrifuge. Das Ziel bestand darin ein kontinuierliches, zwei dimensionales Bild der Probe während der Zentrifugation zu erhalten.

### 5.1 Aufbau und Funktionsweise

Die Optikzentrifuge besteht aus einer klassischen Zentrifuge, mit stationären und rotierenden Teilen, in welche ein Mikroskop integriert ist. Abbildung 5-1 zeigt eine Aufnahme des Aufbaus. Für den Bau konnte auf ein Betonfundament samt Edelstahl-Trägersäulen zurückgegriffen werden. Die Zentrifuge wird von einem Elektromotor angetrieben mit dem sie über Zahnriemen verbunden ist. Bei der Zentrifugenwelle handelt es sich um eine Hohlwelle. Das ermöglicht es, die für das Mikroskop notwendigen Linsen, Blenden und Spiegel in deren Inneren zu platzieren. Durch diesen Aufbau ist es möglich, das benötigte Licht kontinuierlich durch die Zentrifuge zu führen. Die Positionierung der Lampe wird durch einen XY-Tisch erreicht. Der genaue Aufbau der optischen Komponenten wird später anhand Abbildung 5-2 erklärt. Die Halterung der Kamera ist von der

---

<sup>3</sup> Der Aufbau der Optikzentrifuge ist in der Publikation *Integration of a microscope into a centrifuge for adhesion force measurement of particles*, Powder Technology, 305 (2017) 147-155 veröffentlicht.

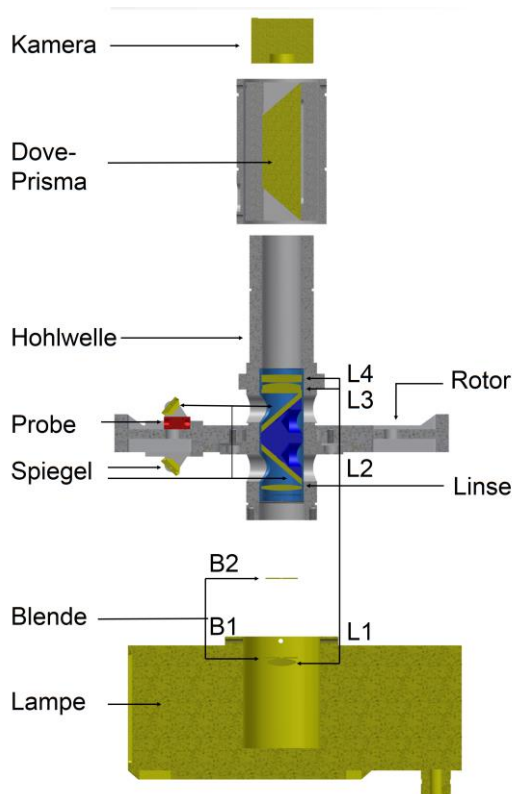
Zentrifuge entkoppelt und an einem Doppel T-Träger des Raumes befestigt. Dadurch werden keine Schwingungen von der Zentrifuge auf die Kamera übertragen. Außerdem bleibt somit mehr Platz für notwendige Justierarbeiten an der Optik. Die Kameraaufnahme erfolgt mittels Bajonettverschluss. Die notwendigen Teile wurden aus einem Canon-Objektiv ausgebaut. Dadurch ist die Kamera abhängig vom Anwendungsfall auswählbar. Ein Adapter für Kameras mit C-Mount-Gewinde steht ebenfalls zu Verfügung.



Abbildung 5-1 Aufnahme der Optikzentrifuge

Mikroskopaufbau

In Abbildung 5-2 ist ein Schema der Hohlwelle mit den optischen Komponenten und des Rotorarms im Halbschnitt gezeigt. Die Bauteile, die ausschließlich mechanische Relevanz, jedoch nicht für den Mikroskopaufbau wichtig sind, sind nicht dargestellt. Die einzelnen Baugruppen sind farblich codiert: Gelb – optische Bauteile; Grau – Hohlwelle und Rotorarm; Blau – Halterung für Linsen und Spiegel.



**Abbildung 5-2** Schnittschema des Rotors samt optischer Komponenten der Optikzentrifuge. (Der Abstand zwischen Kamera und Welle wurde verkleinert.). Farbcodierung: Gelb – optische Bauteile; Grau – Hohlwelle und Rotorarm; Blau – Halterung für Linsen und Spiegel

Die Besonderheit des Aufbaus besteht darin, dass die Lampe, die erste Linse, die Blenden und die Kamera starr sind, während die übrigen Linsen und die Probe rotieren. Die Korrektur des rotierenden Bildes in ein stehendes Bild, das mit der Kamera erfasst werden kann, erfolgt über ein Dove-Prisma das mit halber Drehzahl der Probe dreht.

Die Lampe ist an einem XY-Tisch befestigt, der es ermöglicht sie zentrisch unter der Hohlwelle zu positionieren. Das Licht erzeugt eine XBO Xenon-Kurzbogenlampe (Typ XBO 75W/2, Osram, München, Deutschland) deren Steuerung über das Vorschaltgerät ebx 75-04 (Leistungselektronik Jena GmbH, Jena, Deutschland) erfolgt. Bevor das Licht in die Hohlwelle eintritt, passiert es zunächst die Linse L1 sowie die Blenden B1 und B2. Zusammen mit der Linse L2 bilden diese den Kondensator, und sorgen für eine gleichmäßige Beleuchtung der Probe. Die Abmessungen aller verwendeten Linsen und Blenden, sowie deren Abstand zur Lampe sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst. Das Licht wird über vier Planspiegel (Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland) um jeweils  $90^\circ$  abgelenkt und so aus der Hohlwelle durch die Probe und wieder zurück in die Hohlwelle geführt. Die Linsen L3 und L4 vergrößern das Bild.

**Tabelle 5-1 Übersicht der optischen Komponenten in der Optikzentrifuge**

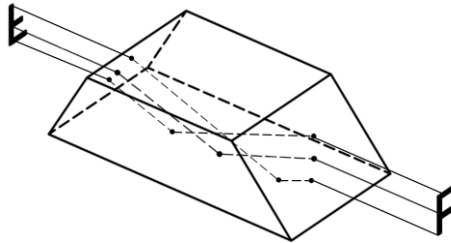
<b>Linse</b>	<b>Brennweite [mm]</b>	<b>Durchmesser [mm]</b>	<b>Abstand zur Lampe [mm]</b>	<b>Typ</b>
L1	25	22,4	37,5	Bikonvex
L2	70	31,5	193,5	Bikonvex
L3	600	31,5	447,3	Achromat
L4	120	31,5	457,1	Achromat
<b>Spiegel</b>	<b>Dicke [mm]</b>	<b>Abmessung [mm]</b>		
Innere	4	31,5/ 45	211,7 / 433,6	Plan
Äußere	2	10/14	296,0 / 349,3	Plan

\*Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland

<b>Blende</b>	<b>Öffnungsweite [mm<sup>2</sup>]</b>	<b>Durchmesser [mm]</b>	<b>Abstand zur Lampe [mm]</b>
B1	2,5*2,5	25	40,5
B2	2,5*2,5	255	113

Nach den beiden Linsen L3 und L4 rotiert das Bild immer noch mit derselben Drehzahl wie die Probe. Aus diesem Grund ist ein Dove-Prisma (Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland) zwischen der Linse L4 und der Kamera eingebaut. Abbildung 5-3 zeigt ein Schema eines Dove-Prismas mit dem Strahlengang. Licht, welches an der Stirnseite des Prismas eintritt, wird zur langen Seite des Prismas gebrochen. Dort findet eine totale Reflexion statt und das Licht verlässt durch die gegenüberliegende Stirnseite das Prisma. Bei Austritt wird das Licht erneut gebrochen und hat nach dem Durchgang durch das Prisma dieselbe Richtung wie zuvor. Im Falle eines zwei dimensionaligen Bildes, in der Abbildung als *F* symbolisiert, kommt es durch die Anordnung zu einer Drehung des Bildes. Dabei ist es eine Besonderheit des Prismas, das bei einer Rotation des Prismas um die Längsachse, die Drehung des Bildes

doppelt so schnell ist wie die des Prismas.



**Abbildung 5-3 Schema eines Dove-Prismas mit Strahlengang [Quelle Qioptics]**

Aus diesem Grund ist die Hohlwelle zweigeteilt. Die Kopplung des Prismas mit dem Motor erfolgt über eine Riemenscheibe, dessen Durchmesser doppelt so groß ist, wie der Riemenscheibendurchmesser an der Rotorwelle. Durch die Verwendung von Zahnriemen und gleichen Riemenscheiben auf der Motorwelle sind die notwendigen Übersetzungen realisiert. Im Anschluss an das Dove-Prisma ist das Bild stationär und kann mit einer starren Kamera aufgenommen werden. Für die Versuche kam die Spiegelreflex-Kamera Canon EOS 5D Mark III zum Einsatz. Die Kamera verfügt über einen Vollformat-CMOS-Sensor (36\*24 mm<sup>2</sup>) mit 22,3 MP mit dem es möglich ist, den gesamten Bildausschnitt aufzunehmen. Ein weiterer Vorteil liegt in der Video-Bildrate von 50 Bildern pro Sekunde mit HD Auflösung.

Für die Auflösung der Optikzentrifuge  $d_{oz}$  sind die Linsen L3 und L4 maßgeblich. Die Berechnung der Auflösung kann für eine Einzellinse anhand der Abbe-Limitierung [44]

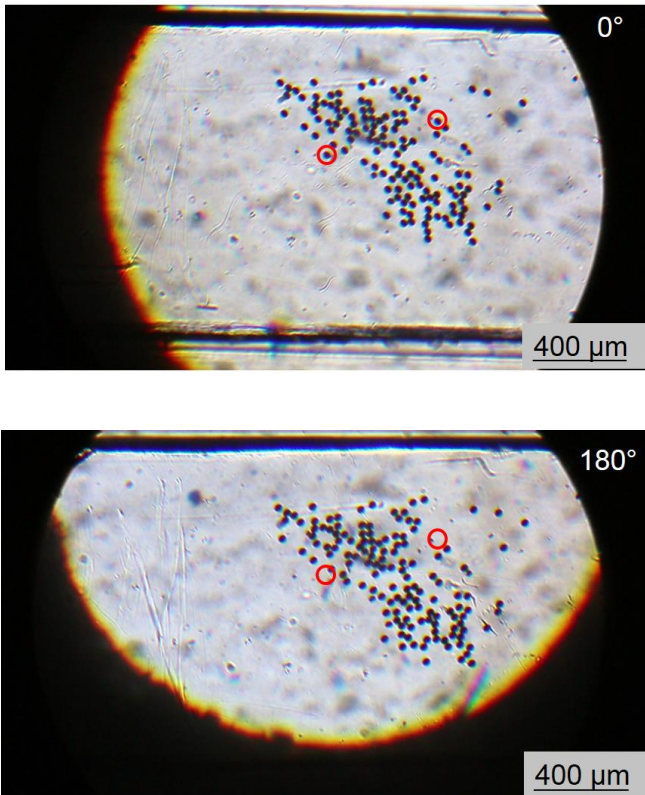
$$d_{oz} = \frac{1,22 \cdot \lambda_L}{2 \cdot NA} \quad (5-1)$$

mit der Wellenlänge des Lichts  $\lambda_L$  und der numerischen Apertur  $NA$  erfolgen. Die numerische Apertur

$$NA = n_B \cdot \sin\alpha \quad (5-2)$$

geht aus dem Brechungsindex  $n_B$  und dem Winkel  $\alpha$ , der zwischen dem Brennpunkt der Linse und dem äußeren Rand der Linse aufgespannt wird, hervor. Für ein Linsensystem ist die Berechnung jedoch deutlich schwieriger. Mit der Software WinLens3D Basic (Version 1.2.6, Qioptiq, Göttingen, Deutschland) kann der Strahlengang für komplexe optische Systeme nachvollzogen und berechnet werden. Für die Optikzentrifuge beträgt die numerische Apertur demnach 0,174 und es wird eine Vergrößerung von 8,95 erreicht. Daraus ergibt sich nach Gl. 5-1 eine Auflösung von 2  $\mu\text{m}$ .

Der Aufbau des Probenhalters entspricht dem, wie er in Abbildung 3-7 (Seite 36) gezeigt ist. Für die Optikzentrifuge waren lediglich zwei Anpassungen notwendig. Zum einen wurde die Höhe der Küvette um einen Millimeter reduziert, damit diese unter dem Spiegel durchpasst und zum anderen musste der Aufsatz für die seitliche Verschraubung auf einen Millimeter gekürzt werden, damit die Probe in den Rotorarm passt. Das restliche Material kann sowohl in der Optikzentrifuge als auch in dem LUMISizer verwendet werden. In Abbildung 5-4 sind zwei Bilder von PS<sub>41</sub>  $\mu\text{m}$ -Partikel auf einem Glassubstrat in 0,01 M NaCl-Lösung in der Optikzentrifuge zu sehen, die mit der Canon EOS 5D Mark III aufgenommen wurden. Das obere Bild zeigt die Probe während der Rotorarm in der Ausgangsposition ist, das untere Bild zeigt die Probe nach einem Versuch mit einer Drehzahl von 100  $\text{min}^{-1}$  (RZB~1) während der Rotorarm im Vergleich zur Ausgangsposition um 180° gedreht ist. Die schwarzen horizontal verlaufenden Linien stellen die Grenze des Substrats dar.



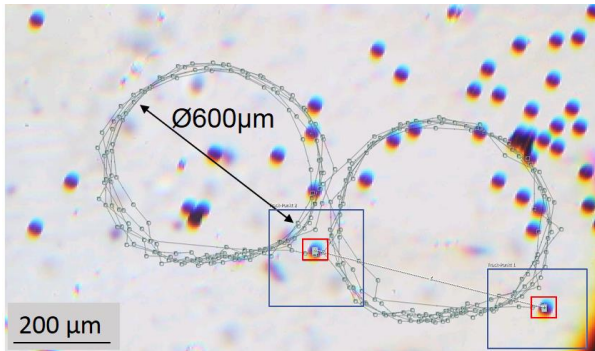
**Abbildung 5-4** Bilder von  $PS_{41\ \mu\text{m}}$ -Partikeln auf einem Glassubstrat in  $0,01\ \text{M}$  NaCl-Lösung in der Optikzentrifuge aufgenommen mit Canon EOS 5D Mark III; a) Rotorarm in Ausgangsposition bei  $0^\circ$ ; b) Standbild während der Zentrifugation bei  $100\ \text{min}^{-1}$ , Rotorarm um  $180^\circ$  gedreht, rot markiert sind Partikel, die sich während des Versuchs bewegten

Der Vergleich der beiden Bilder zeigt drei Dinge. Erstens ist es möglich, die Bewegung von Partikeln während der Zentrifugation zu verfolgen. Beispielfhaft ist die Position von zwei Partikeln, die sich bewegten mit roten Kreisen markiert. Zweitens zeigt sich, dass sich das Sichtfeld bewegt, obwohl, drittens, die Bildorientierung gleich bleibt. Im unteren Bild ist der Rotorarm um  $180^\circ$  gedreht, trotzdem findet auch ohne Bildkorrektur keine



Drehung des Bildes statt, sondern es bleibt die Ausgangsorientierung erhalten. Es ist lediglich eine kleine Winkelverschiebung zu beobachten. Das zeigt, dass das Prinzip funktioniert.

Bei der Auswertung werden die Positionen der einzelnen Partikel und deren Änderung erfasst. Die Bildschwankungen führen dabei zu einer scheinbaren Veränderung der Positionen, was eine Korrektur nötig macht. Die Quantifizierung der Bildverschiebungen geschah mit dem Videobearbeitungsprogramm After Effects (Version After Effects CC 2015.2). Das Programm führt eine Bildanalyse jedes Einzelbildes eines Videos durch und erlaubt es dadurch charakteristische Bereiche über die gesamte Länge des Videos zu verfolgen. Dabei ist es wichtig, dass die Bereiche auf jedem Bild zu erkennen sind. Für die Auswertung der Bildbewegung geschah anhand eines Videos von  $\text{PS}_{41 \mu\text{m}}$ -Partikel auf einem Glassubstrat in einer 0,01 M NaCl-Lösung bei einer Drehzahl von 100 Umdrehungen pro Minute. Als charakteristische Bereiche dienten zwei Partikel, die sich während des Versuchs nicht bewegten. Die Positionen der Partikel wurden für sechs Umdrehungen des Rotors Bild für Bild erfasst. Abbildung 5-5 zeigt das erhaltene Bild. Die verfolgten Partikel sind mit einem roten Quadrat markiert. Der blaue Rahmen zeigt den Bereich in dem die Software nach dem markierten Bereich sucht. Außerdem sind alle Positionen, die im Verlauf der Nachverfolgung erfasst wurden, mit kleinen grauen Quadraten markiert und mit grauen Linien verbunden. Der Durchmesser der entstehenden Kreise beträgt  $600 \mu\text{m}$ . Das heißt, dass die Abweichung des Strahlengangs von der Rotationsachse  $300 \mu\text{m}$  beträgt.



**Abbildung 5-5** Bild von  $PS_{41 \mu m}$ -Partikeln auf einem Glassubstrat in 0,01 M NaCl-Lösung mit Nachverfolgungspunkten von zwei Partikeln über 6 Umdrehungen, bearbeitet mit After Effekts

Unter der Berücksichtigung, dass der Strahlengang eine Länge von 1,4 m hat und vier Mal umgeleitet wird, ist das ein gutes Resultat. Nach der Analyse der Einzelbilder, korrigiert die Software die Bilder so, dass alle Verfolgungspunkte anschließend übereinander liegen. Aus der Abbildung lässt sich außerdem die tatsächliche Vergrößerung berechnen. Bei den gewählten Kameraeinstellungen haben die Pixel des Sensors eine Kantenlänge von  $28,125 \mu m$ . Bei einer stärkeren Vergrößerung der Abbildung ist zu sehen, dass der Durchmesser der Partikel durch 13 Pixel visualisiert ist. Daraus ergibt sich die Länge des vergrößerten Partikeldurchmessers von  $365,625 \mu m$ . Das Verhältnis des vergrößerten zum realen Durchmesser gibt die Vergrößerung an und beträgt 8,90 und somit fast identisch mit der berechneten theoretischen Vergrößerung.

## 5.2 Partikelhaftkraft und Ablösbewegung bei radialer Belastung

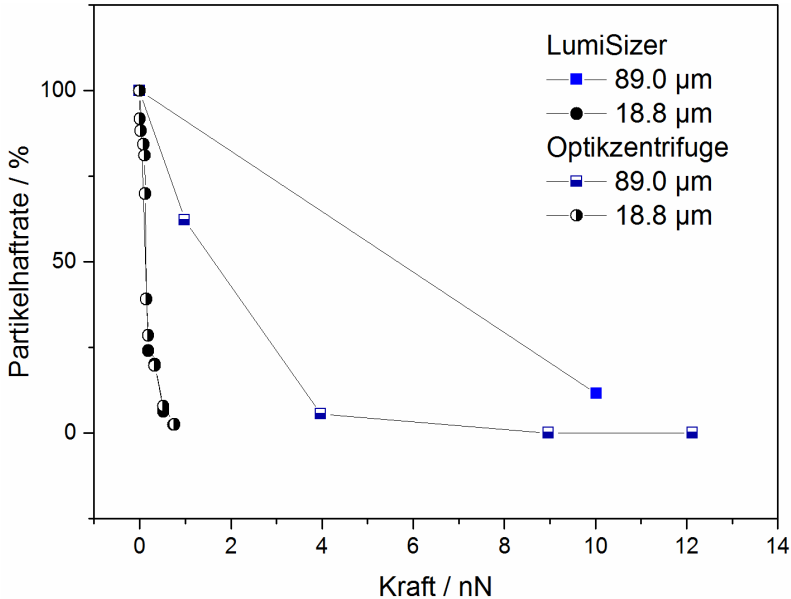
Für die  $PS_{19 \mu m}$ - und  $PS_{89 \mu m}$ -Partikel erfolgten Vergleichsmessung zwischen der Optikzentrifuge und dem LUMiSizer. Dabei handelt es sich um die kleinsten bzw. größten vermessbaren Partikelsysteme in der Optikzentrifuge. Die obere Größenlimitierung ist zum einen durch die Geometrie des Probenraums vorgegeben. Zum anderen fangen bei Partikeln dieser Größe die Gewichtskräfte an die anderen Kräfte zu dominieren,

sodass eine Haftkraftmessung nicht mehr sinnvoll ist. Die untere Limitierung ist durch die Optik der Zentrifuge vorgegeben. Partikel deren Durchmesser kleiner als  $18 \mu\text{m}$  ist, sind optisch nicht mehr so auflösbar, dass eine Auswertung möglich ist.

In beiden Zentrifugen sind die Küvette und der Küvettenhalter der Optikzentrifuge nutzbar. Dadurch ist der Probenaufbau identisch und probenspezifische Fehler können ausgeschlossen werden.

Die Vergleichsmessungen fanden auf Glas in einer  $0,01 \text{ M NaCl}$ -Lösung statt um die elektrostatischen Wechselwirkungen zu minimieren. Die Beschleunigungsrate der Zentrifuge betrug  $300$  Umdrehungen pro Minute. Die Bildrate des Videos war  $60$  Bilder pro Sekunde. Die Auswertung fand mit Matlab (Version 2016a, MathWorks, Natick, USA) statt. Ein Partikel gilt als bewegt, wenn er sich um einen Partikelradius verschoben hat. Das mitreißen eines Partikels durch einen anderen wurde in beiden Fällen nicht berücksichtigt.

Abbildung 5-6 zeigt die entsprechenden Haftkraftkurven. Von den  $\text{PS}_{89 \mu\text{m}}$ -Partikeln lösten sich im LUMiSizer bereits bei der kleinsten Drehzahl von  $200 \text{ min}^{-1}$  fast alle Partikel. Mit der Optikzentrifuge sind kleinere Drehzahlen möglich, dadurch ergibt sich eine bessere Kraftauflösung.



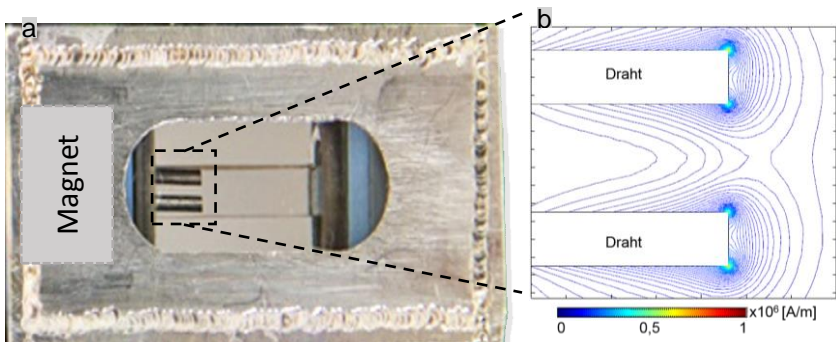
**Abbildung 5-6** Haftkraftkurven der  $PS_{19\ \mu\text{m}}$ - und  $PS_{89\ \mu\text{m}}$ -Partikel auf Glas in 0,01 M NaCl bei radialer Belastung, Vergleich der Messdaten von Optikzentrifuge und LUMiSizer

Bei den  $PS_{19\ \mu\text{m}}$ -Partikeln gibt es eine Überschneidung der Messbereiche ab ca. 0,2 nN. Dort ist der Kurvenverlauf nahezu identisch. Unterhalb der 0,2 nN ist die Auflösung nur mit der Optikzentrifuge möglich.

### 5.3 Beschreibung des Verhaltens eines Partikelhaufwerks im Zentrifugalfeld

Ergänzend zu den Versuchen mit der Laborzentrifuge zum Desintegrationsverhalten eines Partikelhaufwerks im Zentrifugalfeld (Kapitel 4.2) kann mit der Optikzentrifuge die Ablösung einzelner Partikel und Partikelagglomerate nachvollzogen werden. Als Annäherung an die Magnetmatrix wurden zwei magnetisierbare Stahldrähte (1.4016) in den Probenraum eingebracht. Ein Bild des Aufbaus ist in Abbildung 5-7a zu sehen.

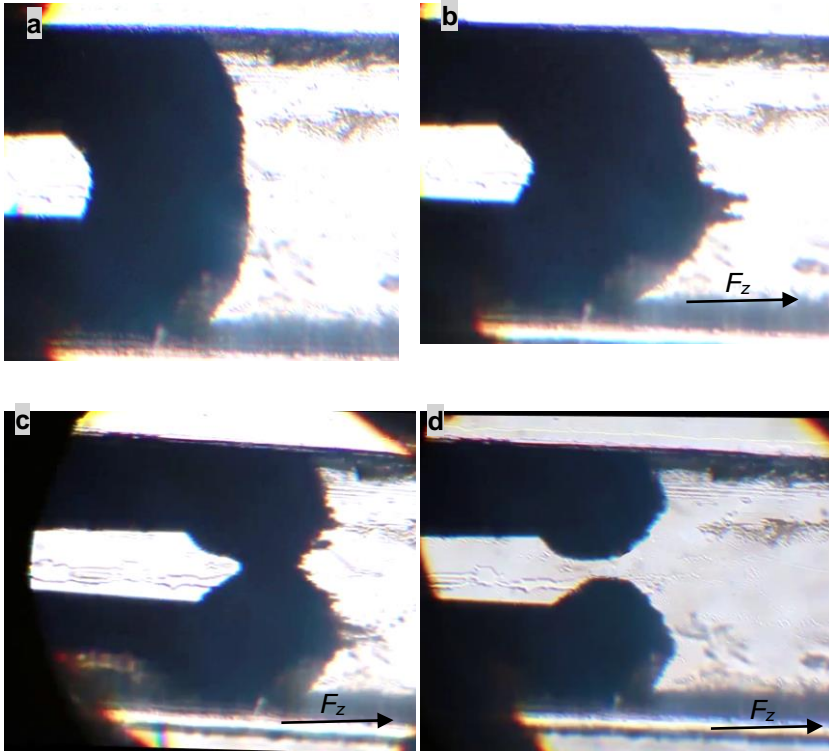
Abbildung 5-7b zeigt einen Ausschnitt einer FEM-Simulation des magnetischen Feldes um die Drahtenden. Die Darstellung zeigt die Isolines des magnetischen Felds  $H$ . Es ist zu erkennen, dass sich die höchsten Feldliniendichten und damit die höchsten Gradienten, sowie die höchsten Feldstärken an den Enden der Drähte befinden. Aus Gl. 2-22 geht hervor, dass an diesen Stellen damit auch die höchsten Magnetkräfte wirken.



**Abbildung 5-7 a) Foto der Küvettenhalterung samt Küvette. Im Inneren der Küvette befinden sich magnetisierbare Stahldrähte. Die Magnetposition ist grau markiert. b) Ausschnitt einer FEM-Simulation des magnetischen Feldes. Darstellung zeigt Isolines des Betrags des magnetischen Felds  $H$  um die Drahtenden.**

Abbildung 5-8 zeigt eine Bildsequenz eines Haufwerksdesintegrationsversuchs mit  $PS_{19\ \mu m}$ -Partikeln in 0,01 M NaCl und dem Magnettyp N52. In Abbildung 5-8a ist die Ausgangssituation nach dem Einfüllen der Partikel zu sehen. Zwischen den beiden Drahtenden bildet sich beim Befüllen der Küvette mit Partikelsuspension eine Brückenstruktur aus, die dem Magnetfeldverlauf aus Abbildung 5-7b folgt. Der Raum zwischen den Drähten bleibt hingegen Partikelfrei. Auch dies in der Simulation zu sehen, da dort ein nahezu homogenes und schwaches Feld herrscht. Im Verlauf des Versuchs erhöhte sich die Drehzahl von 0 auf  $1000\ \text{min}^{-1}$  mit einer Beschleunigung von 2000 Umdrehungen pro Minute. Bis zu einer RZB von 15 blieb die Brückenform stabil. Danach erfolgte eine Aufweitung der Brücke entlang der Zentrifugalkraft bis es bei einer RZB von 24

zur ersten Partikelablösung aus der Brückenmitte kommt (siehe Abbildung 5-8b). Die Zentrifugalkraft beträgt 0,5 nN.



**Abbildung 5-8** Bildsequenz eines Haufwerksdesintegrationsversuchs mit  $PS_{19\ \mu\text{m}}$ -Partikeln in einer 0,01 M NaCl-Lösung und Magnettyp N52; a) Versuchsbeginn, Ausbildung einer Brückenstruktur zwischen Drahten; b) RZB ist 24,  $F_{\text{Mag,EZ}} \sim 0,5\ \text{nN}$  – Brückenverformung und Partikelablösung aus der Brückenmitte treten auf; c) RZB ist 95,  $F_{\text{Mag,EZ}} \sim 2,1\ \text{nN}$  – durch Partikelablösung schnürt sich Brücke in der Mitte ein, Partikel wandern aus der Brückenmitte an die Drahtenden und lösen sich erst von dort ab; d) RZB ist 95,  $F_{\text{Mag,EZ}} \sim 2,1\ \text{nN}$  – erreichen des Kräftegleichgewichtszustands; In den Bildern c-d wirkt die Zentrifugalkraft von links nach rechts.

Durch die kontinuierliche Partikelablösung kommt es zu einer Einschnürung der Brücke in der Mitte (siehe Abbildung 5-8c). Dadurch verschiebt sich die Brückenoberfläche hinter die Drahtenden. Die Bereiche der

stärksten Magnetkraft liegen nun vor den Partikeln. Die Partikel aus der Brückenmitte wandern deshalb entlang der Brückenoberfläche Richtung Drahtenden. Die RZB beträgt zu diesem Zeitpunkt bereits 95. Die wandernden Partikel sind als kleine Nadeln zu erahnen (der Vorgang ist im Video deutlicher zu erkennen). Die Partikelablösung erfolgt nun an zwei Stellen, nämlich an dem jeweiligen Drahtende. Auf dem Bild ist dies als Pyramiden- oder Säulenstruktur zu erkennen. Auf Abbildung 5-8d ist das Kräftegleichgewicht erreicht und es lösen sich keine Partikel mehr. Zu diesem Zeitpunkt wirkt eine Zentrifugalkraft von  $2,1 \text{ nN}$  auf jeden Einzelpartikel.





## 6 Schlussfolgerung und weiterführende Überlegungen

Bei HGMS-Prozessen lagern sich die magnetischen Partikel an der Magnetmatrix an und müssen anschließend von dieser wieder entfernt werden. Die Betrachtung und die Simulation dieser Vorgänge geschehen meist unter der Annahme, dass die Magnetkraft die alles dominierende Kraft ist und die übrigen Kräfte vernachlässigbar sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Annahme überprüft und die einzelnen Einflussfaktoren auf die Haftung der Magnetpartikel detailliert untersucht werden.

Da die auftretenden Partikelhaufwerke einen extrem komplexen und undefinierten Haftkraftzustand darstellen, erfolgte zunächst eine starke Reduktion der Komplexität in dem die Haftkräfte von unfunktionalisierten Einzelpartikeln an ebenen Oberflächen untersucht wurden. Durch die schrittweise Einführung von Oberflächenfunktionalisierungen und abschließenden den Übergang zu Partikelhaufwerken fand eine Annäherung an die Systemkomplexität der Prozessbedingungen statt.

Zum einen zeigte sich, dass es starke Unterschiede der Haftkraft gibt, abhängig davon ob der Kontakt zwischen Partikeln oder zwischen Partikeln und einem Substrat betrachtet wird. Zum anderen hatte die Partikeloberflächenstruktur und –funktionalisierung großen Einfluss – auch im Vergleich zur Magnetkraft – auf die Partikelablösung.

### *Partikel-Substrat-Haftung*

Bei den untersuchten unfunktionalisierten Modellpartikeln zeigte sich der Unterschied in den Kraftwirkmechanismen. Die Magnetkraft ist eine Volumenkraft. Durch den Herstellungsprozess ist die Verteilung des magnetischen Materials in den Partikel homogen und dadurch auch die magnetische Kraft. Die v.d.W.-Kraft hingegen ist eine Oberflächenkraft und abhängig von der Oberflächenstruktur. Herauszuheben ist an dieser Stelle der Einfluss der Rauheit von beiden Kontaktpartnern. Selbst eine Änderung der Rauheit um wenige Nanometer kann ausreichen um die v.d.W.-Kraft um ein bis zwei Zehnerpotenzen zu senken. Daraus ergab sich auch für die gemessenen v.d.W.-Kräfte eine relativ breite Verteilung.

Als Folge kam es bei bis zu 30 % der Kontakte dazu, dass die v.d.W.-Kraft höher war als die (stärkste erzeugbare) Magnetkraft. Der Anteil sank mit zunehmender Rauheit des Systems, d.h. mit sinkender v.d.W.-Kraft.

Die funktionalisierten Partikeln bestanden aus denselben Grundpartikeln, die anschließend modifiziert wurden. Das Haftverhalten der Partikel hing stark von der Modifizierung ab. Teilweise ließen sich Partikelsysteme gar nicht von der Oberfläche trennen, während sich andere bereits bei der kleinsten Trennkraft ablösten. Bemerkenswert ist, dass die größten Haftkraftunterschiede für verschiedene Proteine auf der Partikeloberfläche auftraten. Das zeigt, dass eine Vorhersage der Partikelhaftung ohne Kenntnis der späteren Prozessbedingungen nicht möglich ist. Als Hauptfaktoren für das verschiedene Verhalten wurden elektrostatische Wechselwirkungen sowie Hydrophathie-Effekte identifiziert. Bereits durch geringe Salzkonzentrationen von 0,01 M war die elektrostatische Abstoßung stark reduziert. Das galt unabhängig vom betrachteten Salz und es kam lediglich auf die Anwesenheit abschirmender Ionen an. Im Prozess dürfte die Salzkonzentration über den betrachteten 0,01 M liegen, sodass Elektrostatik auch im Prozess vernachlässigbar sein dürfte. Abhängig von der eingesetzten Salzart und der Salzkonzentration kann es zu einer Stärkung oder Schwächung hydrophathischer Wechselwirkungen kommen. Bei den verwendeten Salzkonzentrationen, die prozessrelevant sein dürften, konnte jedoch kein Einfluss festgestellt werden.

### *Partikel-Partikel-Wechselwirkung*

Eine direkte Vermessung der Partikel-Partikel-Haftkräfte war nicht möglich, sodass die Kraft untersucht wurde, die nötig ist um ein Partikelhaufwerk aufzulösen. Trotz des miniaturisierten Versuchsaufbaus ist für die Versuche relativ viel Material notwendig. Die Datenbasis ist deshalb geringer als für die Partikel-Substrat-Haftkraftmessungen. Im Fall der Partikelsysteme ohne gebundene Proteine stimmte die Annahme, dass die Magnetkraft die interpartikulären Wechselwirkungen deutlich übersteigt. Das gilt für alle untersuchten Medien. Bei den Partikelsystemen mit gebundenem Protein waren höhere Kräfte für die Auflösung der Haufwerke notwendig. Innerhalb eines Magnetfeldes ist das umso bemerkenswerter, da der Anteil an nicht magnetisierbaren Material steigt.

---

Eine Prüfung ob sich die Ergebnisse des miniaturisierten Versuchs auf prozessrelevante Anlagen übertragen lassen, bzw. die beobachteten Effekte auch auftreten konnte nicht durchgeführt werden und sollte im Rahmen weiterer Arbeiten untersucht werden. Basierend auf den vorliegenden Daten steht die Schlussfolgerung, dass bei der Auslegung, dem Betrieb oder der Simulation von HGMS-Filtereinheiten die reine Betrachtung der Magnetkräfte nur eine Abschätzung des tatsächlichen Partikelverhaltens liefert. Während die elektrostatische Abstoßung im Prozess wahrscheinlich zu vernachlässigen ist, können die v.d.W.-Kräfte und hydrophatische Wechselwirkungen die Größenordnung der Magnetkraft erreichen oder sogar übertreffen. Die Eigenschaften des Produkts (Proteins) müssen berücksichtigt werden.



## 7 Symbolverzeichnis

### Lateinische Buchstaben

<b>Symbol</b>	<b>Einheit</b>	<b>Beschreibung</b>
<i>A</i>	J	Hamaker Konstante
<i>a</i>	m	Kontaktradius
<i>B</i>	T	Magnetische Flussdichte
<i>C</i>	-	Relative Zentrifugal Beschleunigung
<i>c<sub>ion</sub></i>	Mol l <sup>-1</sup>	Ionenkonzentration
<i>d</i>	m	Durchmesser
<i>D</i>	N m <sup>-1</sup>	Federkonstante
<i>E</i>	Pa	E-Modul
<i>E<sub>Mag</sub></i>	J m <sup>-3</sup>	Energiemenge
<i>F</i>	N	Kraft
<i>H</i>	A m <sup>-1</sup>	Magnetische Feldstärke
<i>k</i>	-	Trennschärfe
<i>K</i>	Pa	kombiniertes E-Modul
<i>L</i>	m	Auslenkung
<i>M</i>	A m <sup>-1</sup>	Magnetisierung
<i>n</i>	s <sup>-1</sup>	Drehzahl
<i>PHR</i>	%	Partikelhafrate
<i>R</i>	m	Partikelradius
<i>r</i>	m	Partikelabstand
<i>R<sub>q</sub></i>	nm	Mittlere quadratische Rauheit
<i>R<sub>q</sub>*</i>	nm	Kombinierte Mittlere quadratische Rauheit
<i>T</i>	K	Temperatur
<i>v</i>	m s <sup>-1</sup>	Sinkgeschwindigkeit
<i>V</i>	m <sup>3</sup>	Volumen
<i>V<sub>m</sub></i>	A	magnetisches skalares Potential
<i>w</i>	J m <sup>-3</sup>	Energieprodukt (Magnet)
<i>W</i>	J	Gesamtenergie (Magnet)
<i>x</i>	m	Abstand
<i>z<sub>i</sub></i>	-	Ionenwertigkeit
<i>N</i>	-	Anzahl

## Griechische Buchstaben

Symbol	Einheit	Beschreibung
$\alpha$	$^\circ$	Kontaktwinkel
$\epsilon_r$	-	relative Permittivität
$\gamma$	J	Oberflächenenergie
$\gamma_r$		reduziertes Zetapotential
$\zeta$	V	Zetapotential
$\theta$	-	Korrekturterm für Partikelrauheit
$\kappa$	$m^{-1}$	Debye-Hückel-Parameter
$\kappa$	-	Trennschärfe
$\lambda$	m	Debye-Hückel-Länge
$\mu_r$	-	relative Permeabilität
$\nu$	-	Poissonzahl
$\rho$	$kg/m^3$	Dichte
$\chi$	-	magnetische Suszeptibilität
$\varnothing$	-	Geometriefaktor

## Indices

Symbol	Beschreibung
s	Feststoff
l	Flüssigkeit
Mag	Magnetisch/ Magnet
ad	Adhäsion
P	Partikel
r	relativ

## Konstanten

Symbol	Wert	Beschreibung
$e_0$	$1,60218 \cdot 10^{-19} \text{ C}$	Elementarladung
$h$	$6,62607 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$	Plancksches Wirkungsquantum
$N_A$	$6,02214 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	Avogadro-Konstante
$k_B$	$1,38065 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$	Boltzmann-Konstante
$\epsilon_0$	$8,85417 \cdot 10^{-12} \text{ AsV}^{-1}\text{m}^{-1}$	Permittivität des Vakuums
$\mu_0$	$1,25664 \cdot 10^{-6} \text{ VsA}^{-1}\text{m}^{-1}$	Permeabilität des Vakuums

---

## Abkürzungen

AB	Arbeitsabstand
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. atomic force microscope)
AS	Aminosäuren
B	Blende
BSA	Rinderalbumin (engl. Bovine serum albumin)
DGL	Differentialgleichung
FEM	Finite-Elemente-Methode
FPTS	Trichloro(3,3,3-trifluorpropyl)silan
HGMS	Hochgradienten-Magnetseparation
JKR	Johnson, Kendal, Roberts
L	Linse
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
NA	numerische Apertur
PFOTES	1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltriethoxysilan
PHR	Partikelhafrate
pI	isoelektrischer Punkt
PMMA	Polymethylmethacrylat
POS	Peroxomonoschwefelsäure
Prot A	Protein A
PS	Polystyrol
PVC	Polyvinylchlorid
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
UBG	unbehandeltes Glas
v.d.W.	van der Waals





## 8 Literaturverzeichnis

- [1] J.M.D. Coey, Magnetism and Magnetic Material, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS 2011.
- [2] B.A. Daniel Boujard, Christophe Cullin, Céline Zell- und Molekularbiologie im Überblick, in: A. Simeon (Ed.) Zell- und Molekularbiologie im Überblick, Springer Spektrum 2014.
- [3] J.M. Otero, G. Panagiotou, L. Olsson, Fueling Industrial Biotechnology Growth with Bioethanol, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, (2007) 1-40.
- [4] V.F.A. e.V., Statistics 2015 - Die Arzneimittelindustrie in Deutschland, 2015.
- [5] F. Times,  
<http://de.statista.com/statistik/daten/studie/184433/umfrage/umsatz-der-top-10-biotech-und-pharmakonzerne-weltweit>, 04.05.2016,
- [6] Evaluate,  
<http://de.statista.com/statistik/daten/studie/311766/umfrage/biotech-produkte-anteil-an-den-top-100-praeparaten-der-pharmaindustrie-seit-2006>, 04.05.2016,
- [7] S.S. Farid, Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 848 (2007) 8-18.
- [8] J. Lindner, K. Wagner, C. Eichholz, H. Nirschl, Efficiency Optimization and Prediction in High-Gradient Magnetic Centrifugation, Chemical Engineering & Technology, 33 (2010) 1315-1320.
- [9] N. Tippkötter, H. Al-Kaidy, S. Wollny, R. Ulber, Functionalized Magnetizable Particles for Downstream Processing in Single-Use Systems, Chemie Ingenieur Technik, 85 (2013) 76-86.
- [10] K. Menzel, J. Lindner, H. Nirschl, Removal of magnetite particles and lubricant contamination from viscous oil by High-Gradient Magnetic Separation technique, Separation and Purification Technology, 92 (2012) 122-128.
- [11] J. Lindner, K. Menzel, H. Nirschl, Simulation of magnetic suspensions for HGMS using CFD, FEM and DEM modeling, Computers & Chemical Engineering, 54 (2013) 111-121.
- [12] J. Lindner, K. Menzel, H. Nirschl, Parameters influencing magnetically enhanced centrifugation for protein separation, Chemical Engineering Science, 97 (2013) 385-393.

- [13] C. Eichholz, J. Knoll, D. Lerche, H. Nirschl, Investigations on the magnetization behavior of magnetic composite particles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 368 (2014) 139-148.
- [14] P. Gronemeyer, R. Ditz, J. Strube, Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing, *Bioengineering*, 1 (2014) 188-212.
- [15] M. Stolarski, C. Eichholz, H. Nirschl, Playing tag with bioproducts, *Tce-the Chem Eng*, 789 (2007) 33-35.
- [16] K. Munk, *Biochemie - Zellbiologie*, 1 ed., Thieme2008.
- [17] T.K. Constanze Abröll, Thomas Langer, Katharina Munk, Regina Nethe-Jaenchen, *Biochemie - Zellbiologie*, Thieme2008.
- [18] UniProt, <http://www.uniprot.org/statistics/TrEMBL>, 10.08.2016, Oxford University Press
- [19] J.N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, 3 ed., Academic Press2011.
- [20] H.C. Hamaker, The London—van der Waals attraction between spherical particles, *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications*, 4 (1937) 1058-1072.
- [21] J.N. Israelachvili, *Van der Waals Forces between Particles and Surfaces*, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press2011, pp. 253-289.
- [22] J. Visser, On Hamaker constants: A comparison between Hamaker constants and Lifshitz-van der Waals constants, *Advances in Colloid and Interface Science*, 3 (1972) 331-363.
- [23] H. Rumpf, Die Wissenschaft des Agglomerierens, *Chemie Ingenieur Technik*, 46 (1974) 1-11.
- [24] Y.I. Rabinovich, J.J. Adler, A. Ata, R.K. Singh, B.M. Moudgil, Adhesion between Nanoscale Rough Surfaces: I. Role of Asperity Geometry, *Journal of colloid and interface science*, 232 (2000) 10-16.
- [25] H. Hertz, Ueber die Berührung fester elastischer Körper, *Journal für die reine und angewandte Mathematik (Crelles Journal)*, 1882 (1882) 156-171.
- [26] K.L. Johnson, K. Kendall, A.D. Roberts, Surface Energy and the Contact of Elastic Solids, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 324 (1971) 301-313.
- [27] D.C. Grahame, The Electrical Double Layer and the Theory of Electrocapillarity, *Chemical Reviews*, 41 (1947) 441-501.

- [28] J.N. Israelachvili, *Electrostatic Forces between Surfaces in Liquids, Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press 2011, pp. 291-340.
- [29] J. Gregory, *Interaction of Unequal Double-Layers at Constant Charge*, *Journal of colloid and interface science*, 51 (1975) 44-51.
- [30] W. Billes, R. Tscheliessnig, L. Sobczak, M. Wendland, J. Fischer, J. Kolafa, *Adsorption isotherms for dilute solutions via the mean force method*, *Molecular Simulation*, 33 (2007) 655-666.
- [31] N. Galamba, *Water's structure around hydrophobic solutes and the iceberg model*, *J Phys Chem B*, 117 (2013) 2153-2159.
- [32] Hofmeister, *Zur Lehre von der Wirkung der Salze*, *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 24 (1888) 247-260.
- [33] M. Franzreb, *Magnettechnologie in der Verfahrenstechnik wässriger Medien*, *Habilitation, Universität Karlsruhe (TH)*, 2003, pp. 212.
- [34] C. Eichholz, *Zur magnetfeldinduzierten Strukturierung von Filterkuchen* (2011).
- [35] J. Lindner, *On Continuous Magnetically Enhanced Centrifugation in Large Scale Downstream Processing of Bioproducts*, *Dr. Hut Verlag* 2014.
- [36] N. Pamme, *Magnetism and microfluidics, Lab on a chip*, 6 (2006) 24-38.
- [37] J. Svoboda, *Magnetic Techniques for the Treatment of Materials*, *Springer-Verlag New York Inc.* 2004.
- [38] J. Svoboda, *Magnetic methods for the treatment of minerals*, *Elsevier* 1987.
- [39] m.P. GmbH,  
[http://www.micromod.de/daten/File/Technotes/Technote\\_200\\_1.pdf](http://www.micromod.de/daten/File/Technotes/Technote_200_1.pdf),  
13.08.2015,
- [40] S.M. Wiederhorn, *Fracture Surface Energy of Glass*, *Journal of the American Ceramic Society*, 52 (1969) 99-105.
- [41] D.I.f. Normung, *Geometrische Produktspezifikation (GPS) – Oberflächenbeschaffenheit: Flächenhaft – Teil 2: Begriffe und Oberflächen-Kenngrößen (ISO 25178-2:2012); Deutsche Fassung EN ISO 25178-2:2012*, 2012, pp. 61.
- [42] J. Knoll, H. Nirschl, *Influence of the magnetic force on the van der Waals force of superparamagnetic composite particles*, *Powder Technology*, 259 (2014) 30-36.

[43] A. Haarmann, E. Schmidt, Simulation of a Particle Wall Contact at an Atomic Scale Concerning the Van Der Waals-interaction, *Procedia Engineering*, 102 (2015) 1380-1389.

[44] E. Abbe, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 9 (1873) 413-468.