# Herstellung und Charakterisierung von Polymernetzwerken im Kontext der präparativen Membranchromatographie

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium" der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsstudiengang Chemie der Georg-August-University School of Science (GAUSS)

> vorgelegt von Stella Weber aus Göttingen

Göttingen, 2022

## Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Philipp Vana, MBA	Institut für Physikalische Chemie Georg-August Universität Göttingen
Prof. Dr. Andreas Janshoff	Institut für Physikalische Chemie Georg-August Universität Göttingen
Dr. Florian Ehlers	Institut für Physikalische Chemie Georg-August Universität Göttingen

## Prüfungskommission

#### Referent Prof. Dr. Philipp Vana, MBA Institut für Physikalische Chemie Georg-August Universität Göttingen Korreferent Prof. Dr. Andreas Janhshoff Institut für Physikalische Chemie Georg-August Universität Göttingen Weitere Mitglieder Prof. Dr. Michael Buback Institut für Physikalische Chemie Georg-August Universität Göttingen Prof. Dr. Thomas Zeuch Institut für Physikalische Chemie Georg-August Universität Göttingen Prof. Dr. Dietmar Stalke Institut für Anorganische Chemie Georg-August Universität Göttingen Dr. Tim Schäfer Institut für Physikalische Chemie Georg-August Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2022

# Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2019 bis Dezember 2021 im Arbeitskreis für *Makromolekulare Chemie* von Herrn Prof. Dr. Philipp Vana, MBA am Institut für Physikalische Chemie der Georg-August-Universität Göttingen in Kooperation mit der Abteilung *Purification Materials* von Herrn Dr. Volkmar Thom bei der *Sartorius Stedim Biotech GmbH* in Göttingen angefertigt. Auszüge dieser Arbeit wurden zu einer Patentschrift veröffentlicht.<sup>[1]</sup>



# SARTORIUS

# Kurzfassung

Die präparative Chromatographie ist ein essentieller Bestandteil zur industriellen Aufreinigung von Biopharmazeutika und ermöglicht damit die gezielte Therapie von schwerwiegenden Krankheiten wie Krebs, Multiple Sklerose oder Rheuma. Sie dient der Auftrennung von Zielmolekülen aus Zellkulturen mit hohem Reinheitsgrad und hoher Ausbeute. Dazu werden üblicherweise poröse Beads als stationäre Phase verwendet, welche jedoch starke Limitierungen im Massentransport aufweisen, wodurch Prozesse ineffizient und teuer werden. Dem gegenüber stehen konvektive chromatographische Medien, wie z.B. Membranadsorber, die schnelle Auftrennungsgeschwindigkeiten zulassen, jedoch in ihrer Bindungskapazität limitiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine multimodale (Mixed-Mode) Membran entwickelt, die aufgrund ihrer Struktur im Vergleich zu State of the Art Materialien deutlich höhere bis gleichwertige Bindungskapazitäten bei zugleich stark verkürzten Prozesszeiten aufweist. Für die gezielte Entwicklung der leistungsbestimmenden Struktur wurde sowohl das Ausgangsmaterial Agarose als auch der Membranbildungsprozess systematisch untersucht, um essentielle Steuerparameter zu identifizieren. Die Größe der diffusiven Poren im Nanometer-Bereich ließ sich dabei über die Agarosekonzentration im Emulsionsprozess einstellen. Die organische Phase, bestehend aus einem Lösungsmittel und mindestens einem Tensid, bildete Poren im Mikrometer-Bereich, die für den konvektiven Fluss durch die Membran verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mindestmenge Tensid zum Erhalt einer bikontinuierlichen Struktur nötig war und dass diese kritische Konzentration abhängig vom verwendeten organischen Lösungsmittel ist. Eine Zunahme der Tensidkonzentration führte zu einer Vergrößerung der konvektiven Poren, einhergehend mit einer steigenden Permeabilität der Membran. Zudem konnte das Verhältnis aus Poren- und Stegdurchmessern über die volumetrische Menge organischer Phase eingestellt und die diffusive Weglänge und damit die Erreichbarkeit der stationären Phase gezielt gesteuert werden. Schließlich wurde N-Benzyl-N-Methylethanolamin als multimodaler Ligand auf der Membranoberfläche immobilisiert und die chromatographische Leistungsfähigkeit der Membran mit  $\gamma$ -Globulin als Modellprotein analysiert. Dabei resultierten nahezu dreifache

Bindungskapazitäten der Membran im Vergleich zu den unter identischen Bedingungen vermessenen Beads bei bis zu 95% kürzeren Prozesszeiten. Anhand dessen konnte gezeigt werden, dass eine Membranstruktur, die einen ausreichend hohen konvektiven und gleichzeitig diffusiven Stofftransport ermöglicht, eine geeignete Herangehensweise darstellt, die allgemeine Produktivität in der präparativen Mixed-Mode Chromatographie durch kürzere Trennzeiten und gleichzeitig hohen Bindungskapazitäten bedeutend zu steigern und somit u.a. entstehende Prozesskosten zu verringern.

# Inhaltsverzeichnis

1	Ein	leitung	r D		3	
	1.1	Biotec	hnologisc	he Prozesse therapeutischer Biomoleküle	3	
		1.1.1	Grundla	gen und <i>Downstream</i> Prozess	3	
		1.1.2	Chromat	tographie als essentieller Prozessschritt im Downstre	am	4
			1.1.2.1	Mixed-Mode-Chromatographie	5	
	1.2	Chron	natograph	ische Medien	6	
		1.2.1	Bead-ba	sierte Medien	6	
		1.2.2	Integrale	e konvektive Medien	8	
		1.2.3	Material	ien für chromatographische Medien	10	
	1.3	Zielset	zung .		11	
_						
<b>2</b>	The	heoretischer Hintergrund				
	2.1	Kapite			15	
		2.1.1	Polymer	e Netzwerke und Hydrogele	15	
			2.1.1.1	Polysaccharid-basierte physikalische Netzwerke	16	
			2.1.1.2	Phasenseparation	18	
		2.1.2	Mikrosk	opie	21	
			2.1.2.1	Rasterelektronenmikroskopie	21	
			2.1.2.2	Laser-Konfokal-Mikroskopie und 3D-Strukturanaly	yse	
				von Membranen	23	
		2.1.3	Fluoresz	enz-Korrelations-Spektroskopie	27	
		2.1.4	Diffusion	nsmodelle	29	
			2.1.4.1	Cussler-Modell	30	
			2.1.4.2	Ogston-Modell	31	
			2.1.4.3	Erweitertes Ogston-Modell nach Hagemann	31	
	2.2	Kapite	el II		32	
		2.2.1	Emulsio	nen	32	
			2.2.1.1	Grenzflächen	33	
			2.2.1.2	Tenside	34	
			2.2.1.3	Wechselwirkungen zwischen Emulsionströpfchen	35	
			2.2.1.4	Alterung von Emulsionen	37	

	2.3	Kapite	91 III	39
		2.3.1	Chromatographie	39
			2.3.1.1 Interaktionsmodi	39
			2.3.1.2 Chromatographische Medien	40
		2.3.2	Präparative Membranchromatographie	45
			2.3.2.1 Betriebsmodi	45
			2.3.2.2 Struktur- und Leistungsparameter	46
		2.3.3	Mixed-Mode Chromatographie	50
3	Erg	ebnisse	e und Diskussion	53
-	3.1	Kapite	el I - Agarose als chromatographisches Material	53
	0.1	3.1.1	Vorwort	53
		3.1.2	Chemische und mechanische Eigenschaften von Agarose	54
		0.1.2	3.1.2.1 Bestimmung des Molekulargewichts und des	01
			Methoyyanteils der Agarosen	54
			3.1.2.2 Einfluss der Agarosekonzentration und des Metho-	01
			vvantails auf Cal und Salpunkt	56
			3.1.2.3 Finfluss der Konzentration und des Molekular	00
			5.1.2.5 Emiliuss der Konzentration und des Molekular-	
			yen Ageregegelen und gelen	50
		919	Strukturalle und diffusive Figuresheften von Agenegehr	00
		3.1.3	Strukturene und dinusive Eigenschaften von Agaroseny-	<i>C</i> 1
				01
			3.1.3.1 Porenstruktur des Agarosenetzwerks	01
			3.1.3.2 Diffusion von monoklonalen Antikorpern in Aga-	00
		0.1.1	rosegelen	66
		3.1.4	Diskussion	71
	3.2	Kapite	el II - Herstellung einer geeigneten Membranstruktur	74
		3.2.1	Vorwort	74
		3.2.2	Emulsionsprozess als Grundlage für die Herstellung einer	
			chromatographischen Membran	75
		3.2.3	Einfluss der Tensid–Lösungsmittel-Interaktion auf die	
			übergeordnete Membranstruktur	77
			3.2.3.1 Einfluss der Tensidkonzentration	77
			3.2.3.2 Einfluss des Lösungsmittels	80
			3.2.3.3 Hydrophilie, Mizellenbildungskonzentration und	
			Grenzflächenspannung	88
			3.2.3.4 Diskussion	93
		3.2.4	Einfluss der Lösungsmittelmenge auf die übergeordnete	
			Membranstruktur	95
		3.2.4	Grenzflächenspannung	88 93
			Memoranstruktur	9

		3.2.5	Diskussion	100	
	3.3	Kapite	itel III - Herstellung einer chromatographischen Mixed-Moc		
		Memb	ran	102	
		3.3.1	Vorwort	102	
		3.3.2	Wahl geeigneter Membranparameter	102	
		3.3.3	Kopplung des Liganden	103	
		3.3.4	Wahl geeigneter Bindungs- und Elutionsbedingungen	107	
		3.3.5	Dynamische Bindungsexperimente	108	
		3.3.6	Vergleich mit Literatur und Diskussion	111	
4	Zus	amme	nfassung	117	
5 Mat		terialie	en und Methoden	121	
	5.1	Kapite	el I - Agarose als chromatographisches Material	121	
		5.1.1	Chemikalien	121	
		5.1.2	Herstellung von Agarosesolen und -gelen	122	
		5.1.3	Bestimmung der Molekulargewichts-Verteilung	122	
		5.1.4	Bestimmung des Methylierungsgrads der Agarose mittels		
			NMR-Spektroskopie	123	
		5.1.5	Bestimmung des Gel- und Solpunkts	124	
		5.1.6	Bestimmung der Viskosität	124	
		5.1.7	Dynamisch–Mechanische Analyse	124	
<ul> <li>5.1.8 Bestimmung der Agarose-Porenstruktur und -größe mi Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (REM)</li> <li>5.1.9 Bestimmung von Diffusionskonstanten mittels Fluores</li> </ul>		Bestimmung der Agarose-Porenstruktur und -größe mittels			
		Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (REM)	124		
		Bestimmung von Diffusionskonstanten mittels Fluoreszenz-			
			Korrelations-Spektroskopie	125	
			5.1.9.1 Labeling von Immunglobulin G	125	
			5.1.9.2 Probenvorbereitung	126	
			5.1.9.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	126	
	5.2	Kapite	el II - Herstellung einer geeigneten Membranstruktur	128	
		5.2.1	Chemikalien	128	
		5.2.2	Membranherstellung über Emulsionsverfahren	128	
		5.2.3	Konfokale Laserscanmikroskopie (CLSM)	129	
			5.2.3.1 Labeling der Membranproben mit Fluorophor .	130	
		<b>-</b>	5.2.3.2 3D-Strukturanalyse	130	
		5.2.4	Permeabilitatsmessungen	130	
		5.2.5	Bestimmung des Tensidgehalts der organischen Phase	131	
		5.2.6	Bestimmung der Grenzflächenspannung zweier Phasen .	131	

	5.3 Kapitel III - Herstellung einer chromatographischen Mixed-Mode				
Membran				. 133	
		5.3.1	Chemik	alien	. 133
		5.3.2	Vernetz	ung	. 133
		5.3.3	Ligande	nkopplung	. 134
			5.3.3.1	Allylierung der Agarosemembranen	. 134
			5.3.3.2	Bromierung der Allylgruppen	. 134
			5.3.3.3	BMEA Kopplung	. 135
			5.3.3.4	Qualitativer Nachweis einer erfolgreichen Li-	
				gandenkopplung	. 135
		5.3.4	Bestim	nung der Ligandendichte	. 136
			5.3.4.1	Titration	. 136
		5.3.5	Bestimn	nung der Bindungskapazitäten	. 137
			5.3.5.1	Statische Bindungskapazität	. 137
			5.3.5.2	Dynamische Bindungskapazität der Membran	. 137
			5.3.5.3	Dynamische Bindungskapazität der Capto <sup>TM</sup> Adł	nere
				Beads	. 138
6	Lite	eratury	verzeichr	nis	141
7	Anl	nang			155
	7.1	Kapit	el I - Aga	rose	. 156
	7.2	Kapit	el II - He	rstellung einer geeigneten Membranstruktur	. 158
8	Abl	oildun	gsverzeio	chnis	161
9	9 Tabellenverzeichnis			is	167
10	) A hI	ziirzun	agon		160
10		suizui	igen		105
11	Dar	ıksagu	ng		173
12	12 Lebenslauf 173				175

# 1 Einleitung

# 1.1 Biotechnologische Prozesse therapeutischer Biomoleküle

## 1.1.1 Grundlagen und Downstream Prozess

Während der letzten Jahrzehnte hat die Produktion von Biopharmazeutika wie rekombinanten Antikörpern, Enzymen, Peptiden und DNA stark an Bedeutung gewonnen.<sup>[2–4]</sup> Insbesondere die industrielle Herstellung monoklonaler Antikörper (mAb) hat große Fortschritte gemacht, um der stetig wachsenden Nachfrage für den Einsatz als Therapeutikum gegen Krankheiten wie Krebs, Multiple Sklerose, Rheuma, etc. gerecht zu werden.<sup>[5–9]</sup> Deren Marktwert wird für 2025 auf über 300 Mio US\$ geschätzt, womit mAbs den größten Anteil im pharmazeutischen Markt weltweit darstellen.<sup>[8]</sup> Während der Produkttiter vor wenigen Jahrzehnten noch bei wenigen Milligramm pro Liter Zellbrühe lag, ist er mittlerweile in fed-batch Prozessen auf einige Gramm pro Liter und in modifizierten Perfusionsprozessen auf bis zu  $25 \,\mathrm{g \, L^{-1}}$  gestiegen.<sup>[2,6,10,11]</sup> Zudem werden die Prozesse stetig weiterentwickelt, sodass nicht nur die absoluten Titer sondern auch die spezifische Produktleistung (Raum-Zeit-Ausbeute) durch z.B. hybride Perfusion-fed-batch Prozesse wächst.<sup>[12-14]</sup> Dabei stellt sich die Biopharmazie der extremen technischen Herausforderung, den Aufreinigungsprozess des Rohprodukts (Downstream) an die zunehmende Produktkonzentration im Herstellungsprozess (Upstream) anzupassen. Diese Schwierigkeit wird als Downstream Bottleneck bezeichnet und beschreibt die aktuellen Kapazitätsgrenzen des *Downstreams* im Vergleich zum *Upstream*.<sup>[15]</sup> Die Aufreinigung von Biopharmazeutika verursacht hohe Kosten, die 50-80% der Gesamtproduktionskosten ausmachen.<sup>[15,16]</sup> Der *Downstream* bietet somit den größten Spielraum, um Prozesskosten zu senken und schließlich auch das finale Produkt vergünstigt anbieten zu können.

Ein beispielhafter Prozess zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern ist in Schema 1.1 dargestellt. Während der *Upstream* die biotechnologische Synthese des Zielprodukts (Target) darstellt, beinhaltet der *Downstream* die Abtrennung und Aufreinigung dessen.<sup>[6,17]</sup> Der *Downstream*-Prozess besteht aus

#### 1 Einleitung

einer Serie von Verfahrensschritten, wobei das genaue Verfahren für jeden mAb variiert.<sup>[6,15,17]</sup> Zunächst kann mittels Zentrifugation, Mikro- und Ultrafiltration oder Fällmethoden das Target und weitere Bestandteile des Mediums von der Zellbrühe abgetrennt (Klärung) und aufkonzentriert werden. Diese Teilbereiche werden je nach Definition und Prozess auch dem *Upstream* zugeordnet. Die Isolation des Zielprodukts erfolgt über eine Kombination aus Chromatographieund Membranverfahren mit anschließender Sterilisation und Verpackung. Jeder einzelne Prozessschritt führt zu mehr Zeitaufwand, zusätzlichen Kosten und weiteren Verlusten in der Ausbeute des Produkts, sodass eine Prozessoptimierung an jeder Stelle notwendig ist.<sup>[17]</sup>



Schema 1.1: Schematische Darstellung eines beispielhaften Herstellungsprozesses von monoklonalen Antikörpern und grobe Aufteilung in den Upstream- (USP) und Downstream-Prozess (DSP). Erstellt nach<sup>[15,17]</sup>.

# 1.1.2 Chromatographie als essentieller Prozessschritt im Downstream

Sowohl der *Upstream* als auch der *Downstream*-Prozess müssen individuell an das herzustellende Produkt angepasst sein. Besonders im *Downstream* müssen die einzelnen Aufreinigungsschritte abhängig vom Zielmolekül gewählt und aufeinander abgestimmt werden.<sup>[6,17]</sup> Dabei spielt die chromatographische Auftrennung eine entscheidende Rolle, um das Produkt in der nötigen Reinheit und Ausbeute zu isolieren.

In der Chromatographie werden verschiedene Moleküle, die in einer mobilen Phase gelöst vorliegen, durch unterschiedlich starke Interaktion mit einer stationären Phase voneinander getrennt.<sup>[18]</sup> Im Herstellungsprozess von monoklonalen Antikörpern sind die chromatographischen Operationen grundsätzlich in drei Schritte unterteilt: product capture, intermediate purification und polishing.<sup>[17]</sup> Product capture ist ein essentieller Schritt, um das Zielmolekül mit hoher Reinheit und Ausbeute von der zuvor geklärten Zellbrühe zu separieren. Außerdem wird dadurch eine Aufkonzentrierung und Stabilisierung des Produkts ermöglicht. Bei der Isolation von Immunglobulin G (IgG) wird hier vor allem die Protein A Chromatographie angewandt.<sup>[19]</sup> Diese basiert auf biospezifischen Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Protein A, welches auf der Oberfläche der stationären Phase immobilisiert ist. Dieser Vorgang wird im bind and elute (B&E)-Modus betrieben.<sup>[16,19]</sup> Im B&E-Modus wird das chromatographische Medium mit dem aufzutrennenden Gemisch beladen, wobei das Zielmolekül gebunden wird und die Verunreinigungen ungebunden aus dem Medium austreten. Im Anschluss kann das Produkt durch eine geeignete Änderung der Umgebungsbedingungen eluiert werden (z.B. Senken des pH-Werts), wodurch eine Reinheit des IgG von bis zu 98% resultiert.<sup>[16]</sup> Die gröbsten verbliebenen Verunreinigungen wie DNA, RNA, Viren und host-cellproteins werden in der folgenden intermediate purification vom Antikörper abgetrennt. Polishing bezeichnet den finalen Reinigungsschritt des Produkts, in dem Multimere und Isomere vom gewünschten Antikörper separiert werden.<sup>[15]</sup> Dieses Vorgehen findet meist im flow-through-Modus statt, bei dem nicht das Zielmolekül sondern die restlichen Verunreinigungen an die stationäre Phase gebunden werden, sodass das Produkt direkt hinter dem Medium aufgefangen, anschließend sterilisiert und abgepackt werden kann.

#### 1.1.2.1 Mixed-Mode-Chromatographie

Der oben beschriebene *capture*-Schritt beinhaltet meist sehr teure biospezifische Liganden, wie z.B. Protein A, die den gesamten Prozessschritt sehr kostspielig machen. Wie schon zuvor erwähnt, muss an jeder Stelle eines biotechnologischen Prozesses optimiert werden, um Prozesskosten zu senken und somit die Preise für die teuren Biotherapeutika zu verringern. An Stelle von Proteinen als Liganden auf der stationären Phase können sogenannte Mixed-Mode oder multimodale Liganden zum Einsatz kommen.<sup>[20–23]</sup> Diese bestehen aus mehreren chemischen

Funktionalitäten, die mindestens zwei Interaktionsarten miteinander kombinieren, wie z.B. ionische und hydrophobe.<sup>[24]</sup> Aufgrund der verschiedenen Wechselwirkungen ist ihre Selektivität für die Bindung von Biomolekülen sehr hoch, sodass chemisch sehr ähnliche Moleküle wie Monomere und Aggregate voneinander getrennt werden können.<sup>[24–29]</sup> Daher wird Mixed-Mode Chromatographie in einigen Prozessen auch im *polishing* angewandt. Aufgrund der Kombination mehrerer Interaktionen besteht zudem die Möglichkeit, durch geeignete Bedingungen zwei chromatographische Schritte durch einen einzelnen zu ersetzten und somit Zeit, Material und Kosten einzusparen.<sup>[25,26]</sup>

# 1.2 Chromatographische Medien

Der *Downstream* macht in der Produktion von Biopharmazeutika den Großteil der Gesamtkosten aus, weshalb es einer Optimierung jedes Prozessschritts und neuer Entwicklungen bedarf, um die resultierenden Kosten zu verringern.<sup>[15,16]</sup> Dies gilt auch für die chromatographischen Prozesse.

Die größte Anforderung an chromatographischen Medien ist eine hohe Produktivität, d.h. hohe Ausbeute bei geringer Zyklusdauer und geringem Volumen des chromatographischen Mediums.<sup>[30]</sup> Die Ausbeute korreliert in der Chromatographie u.a. mit der Bindungskapazität des chromatographischen Mediums. Ein Ansatzpunkt, um die Produktivität zu steuern, ist die stationäre Phase. Dabei sind ihre Struktur und Porosität entscheidend für die Bindungskapazität und den Stofftransport des Zielmoleküls zu den Bindungsstellen, der sowohl diffusiver als auch konvektiver Natur sein kann.

Es werden unterschiedliche stationäre Phasen genutzt, um verschiedene Eigenschaften hervorzurufen. Zu den gängigsten Varianten gehören Membranadsorber, Monolithsäulen und insbesondere sphärische Partikel (auch Beads oder Resins genannt).<sup>[15,31–33]</sup>

#### 1.2.1 Bead-basierte Medien

Beads sind die meistgenutzte Variante der stationären Phase in der Chromatographie. Sie weisen hohe spezifische Oberflächen und demnach auch hohe Bindungskapazitäten bei 10% Durchbruch von bis zu 100 g mAb  $L^{-1}$  für Protein A, bis zu 150 g mAb  $L^{-1}$  für Kationenaustausch und bis zu 71 g mAb  $L^{-1}$ für Mixed-Mode Chromatographie auf und können das Produkt mit sehr hoher Reinheit separieren.<sup>[15,34,35]</sup> Partikel werden in Säulen gepackt und sind etablierte Systeme, deren Funktionsweise und Eigenschaften bekannt und gut verstanden sind, was sie zu einer verlässlichen Methode zur Aufreinigung macht.<sup>[18,31]</sup> Allerdings weisen sie Limitierungen aufgrund ihrer sphärischen und hochporösen Struktur auf. Bis zu 70% der Bindungsstellen befinden sich im Inneren der Beads, wodurch ein diffusionskontrollierter Stofftransport entsteht, der lange Verweilzeiten des Zielmoleküls im chromatographischen Medium voraussetzt.<sup>[36]</sup> Aufgrund der Diffusionslimitierung ist nur eine begrenzte Erhöhung der Flussrate möglich, um die Prozessdauer zu verkürzen. Längere Säulen führen eine höhere Trennleistung im chromatographischen Medium herbei, sodass schnellere Flussraten ermöglicht würden.<sup>[18]</sup> Allerdings würde dies eine hohe treibende Druckdifferenz voraussetzen, was eine Kompression der Beads und der Bead-Packung und einen damit einhergehenden Verlust der Permeabilität hervorrufen würde.<sup>[30,33,37]</sup> Dadurch muss ein weiterer Druckanstieg erfolgen, um die nötige Flussrate aufrecht zu erhalten, was nicht mehr praktikabel wäre. Eine Möglichkeit, die Flussrate im Prozess zu erhöhen, ohne signifikante Druckverluste einzubußen, bietet eine Verringerung der Betthöhe der stationären Phase, da so der Widerstand der mobilen Phase verringert wäre und höhere Flüsse resultieren würden.<sup>[38,39]</sup> Jedoch birgt das Packen solch geringer Betthöhen große Schwierigkeiten, eine uniforme Schicht zu erhalten, welche besonders über große Flächen Inhomogenitäten aufweist und zu Verlusten der Trenneffizienz führen würde.<sup>[40]</sup> Dadurch würde sich eine Abnahme der chromatographischen Trennleistung ergeben, für die eine hohe Betthöhe vorteilhaft ist.<sup>[18]</sup>

Eine Alternative, die Zykluszeit zu verringern, bietet die Verkürzung des Diffusionswegs des Zielmoleküls. Dies kann durch kleinere Beads erfolgen, was allerdings eine verringerte Permeabilität zur Folge hat, da kleinere Partikelzwischenräume entstehen und somit höhere Prozessdrücke notwendig werden.<sup>[41]</sup> Dieses Problem könnte nur durch sehr flache Betten der stationären Phase angegangen werden, was anhand der oben genannten Gründe praktisch nicht lösbar wäre. Daher werden meist Säulen von einigen Zentimetern Betthöhe verwendet, deren Beads Durchmesser von typischerweise 50-180 µm besitzen, um einen geringeren Widerstand zu realisieren, was wiederum in hohen Verweilzeiten von mehreren Minuten resultiert.<sup>[20,23,42-44]</sup>

Generell bedeutet das Packen von Säulen mit Beads einen gewissen Aufwand, der sich in Zeit und Personalkosten widerspiegelt, weshalb chromatographische Säulen so lange wie möglich verwendet werden müssen.<sup>[45]</sup> Die Validierung, Spülung und Lagerung der Säulen erzeugen jedoch zusätzliche Kosten. Zudem birgt eine lange Verwendung Kontaminationsrisiken, was die Lebensdauer der Beads signifikant verkürzt.<sup>[15,45–47]</sup>

## 1.2.2 Integrale konvektive Medien

Alternativen zu Beads stellen stationäre Phasen dar, die einen schnellen Massentransfer ermöglichen, also eine schnelle Bindung von Zielmolekülen aus der mobilen an die stationäre Phase bewirken.<sup>[33]</sup> Dies lässt sich durch eine starke Abnahme der Diffusionswege oder durch rein konvektiven Stofftransport zu den Bindungsstellen ermöglichen.

Zu solchen Medien zählen Monolithen und Membranadsorber. Beide Typen besitzen kontinuierliche Poren, die hauptsächlich einen konvektiven Fluss zu den Bindungsstellen ermöglichen.<sup>[33,48]</sup> Diese sich selbst stützenden Materialien werden im Folgenden als "integral" bezeichnet und unterscheiden sich zu Beads in ihrem Aufbau. Während Beads in Säulen gepackt werden und somit in ihrer Position nicht fixiert sind, liegen integrale Medien aufgrund ihrer Geometrie fest verankert in ihrer Form vor. Dies ermöglicht eine gleichmäßige Packung des chromatographischen Moduls auch bei geringer Betthöhe, sodass diese Module aufgrund des geringeren Widerstands schneller betrieben werden können.

Ein weiterer großer Vorteil von integralen konvektiven Materialien besteht darin, dass sie kaum Diffusionslimitierung aufweisen, wodurch eine fast vollständige Unabhängigkeit der Bindungskapazität von der Flussrate resultiert und somit kurze Verweilzeiten im Vergleich zu Beads ermöglicht werden, die im Bereich von Sekunden liegen, s. Abbildung 1.1.<sup>[3,30,32,45,48,49]</sup> Daraus können sich hohe Produktivitäten ergeben. Aufgrund der kurzen Verweilzeit und der hohen möglichen Flussrate können so viele chromatographische Zyklen inklusive Pufferaustausch und Waschschritte in kurzer Zeit hintereinander erfolgen, sodass das Material noch am gleichen Tag bis zum Erreichen seiner Lebensdauer verwendet werden kann, ohne dass es zwischengelagert werden muss.<sup>[30,50]</sup> Bei diesem sogenannten *rapid cycling* spielt die *single-use* Technologie eine große Rolle, die sowohl die Keimbildung im Medium verhindert als auch zu einer Kosteneinsparung im Bezug auf Lagerung und Personal führt.<sup>[4,45,51]</sup>



Abb. 1.1: Abhängigkeit der dynamischen Bindungskapazität von der Flussrate für Beads und Membranadsorber. Erstellt nach<sup>[48]</sup>.

Ein entscheidender Nachteil von rein konvektiven Materialien mit einer hinreichenden Permeabilität ist ihre geringe innere Oberfläche, was in einer niedrigeren statischen Bindungskapazität im Vergleich zu Beads resultiert.<sup>[33]</sup> Dies führt dazu, dass Monolithen und Membranadsorber im Bereich des *product capture* nur geringfügig eingesetzt werden, da hier hohe Bindungskapazitäten entscheidend für die Produktivität sind.<sup>[52]</sup> Eine Möglichkeit, die Bindungskapazität von konvektiven Medien zu erhöhen, stellt eine bikontinuierliche Struktur der stationären Phase dar, die sowohl konvektiven als auch diffusiven Stofftransport ermöglicht.<sup>[53,54]</sup> Solche Materialien besitzen zum einen größere kontinuierliche Poren, durch die das Medium konvektiv durchströmt werden kann. Gleichzeitig weist die stationäre Phase selbst kleine diffusive Poren auf, die die innere Oberfläche relativ zu rein konvektiven Materialien erhöht, wie bereits von z.B. *Ley* gezeigt.<sup>[55]</sup> Dabei muss die diffusive Weglänge so gewählt werden, dass die Verweilzeit bei hoher Flussgeschwindigkeit ausreicht, um den vollständig diffusiven Stofftransport in den Stegen zu gewährleisten.<sup>[53]</sup>

Ein solches integrales Material würde bei hoher Permeabilität durch große konvektive Poren und gleichzeitig hoher Betthöhe und somit hoher Trennleistung eine hohe Produktivität des chromatographischen Mediums hervorrufen, da sowohl geringe Zykluszeiten als auch hohe Bindungskapazitäten aufgrund der diffusiven Unterstruktur erreicht werden.



Abb. 1.2: Darstellung eines porösen Partikels (links) und eines konvektiv-diffusiven Materials (rechts). Der Doppelpfeil stellt die diffusive Weglänge ins Innere des diffusiven Materials (schraffierte Bereiche) dar.

## 1.2.3 Materialien für chromatographische Medien

In der Chromatographie werden verschiedenste Materialien für stationäre Phasen verwendet. Dazu zählen sowohl natürliche als auch synthetische Polymere sowie diverse anorganische Materialien.<sup>[31–33,48,56–58]</sup> Dazu zählen Polysaccharide wie Cellulose und Agarose, Polymethacrylate oder Polyethersulfone und Silica oder Hydroxylapatit. Ein ideales chromatographisches Material sollte bestimmten Anforderungen genügen. Zum einen ist eine hohe mechanische Stabilität von Bedeutung, um den Drücken im chromatographischen Prozess standzuhalten.<sup>[59,60]</sup> Des Weiteren erleichtert eine hohe diffusiv erreichbare innere Oberfläche des Materials das Anbringen einer ausreichenden Menge an Ligand auf der stationären Phase, um eine hohe Bindungskapazität zu ermöglichen.<sup>[59]</sup> Dafür muss zudem eine gute Erreichbarkeit der Bindungsstellen gewährleistet sein, was eine hohe Diffusivität bis hin zu einem konvektiven Fluss innerhalb des Materials erfordert.<sup>[33,48]</sup> Außerdem muss die stationäre Phase inerte Eigenschaften besitzen, die eine Chemi- und Physisorption jeglicher Moleküle an ihr verhindert, da die Trennleistung des chromatographischen Mediums sonst aufgrund unspezifischer Bindung verringert werden würde.<sup>[54]</sup> Weiterhin benötigt das Material geeignete funktionelle Gruppen, um eine Modifizierung dessen vornehmen und so die Liganden auf der stationären Phase immobilisieren zu können.<sup>[61]</sup> Speziell für die Protein-Chromatographie ist eine hydrophile stationäre Phase vonnöten, da Biomoleküle in organischen Lösungen größtenteils instabil sind.<sup>[59]</sup> Schließlich ist eine hohe Beständigkeit gegenüber eines breiten

pH-Bereichs von großer Relevanz, da chromatographische Medien nach ihrer Benutzung für die Separation von Proteinen von verbliebenen Verunreinigungen befreit werden müssen, wofür Laugen oder auch Säuren eingesetzt werden.<sup>[54]</sup>

# 1.3 Zielsetzung

Die Herstellung monoklonaler Antikörper ist ein stetig wachsender Markt, der in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen hat.<sup>[2]</sup> Während der Upstream immer effizienter wird, zeigten sich die Kapazitätsgrenzen des Downstreams, mit der steigenden Produktivität des Upstreams Schritt zu halten. Um die Effektivität des Downstreams zu steigern, welcher bisher die meisten Kosten in der Produktion von Biopharmazeutika verursacht, bedarf es unter anderem Innovationen in der Chromatographie.<sup>[15]</sup> So sind z.B. stationäre Phasen nötig, die höhere Produktivitäten in der chromatographischen Auftrennung von Biomolekülen ermöglichen. Solche Prozesse sollten einen geringeren zeitlichen Aufwand, weniger Personal- und Materialkosten erfordern und geringere Produktverluste mit sich bringen, sodass die allgemeine Produktivität gesteigert und die Gesamtkosten minimiert werden können.<sup>[17]</sup> Ein Lösungsansatz für diese Problemstellung ist der Einsatz eines integralen Materials für die stationäre Phase von chromatographischen Medien, das sowohl konvektiven als auch diffusiven Stofftransport ermöglicht. Solche Materialien können eine hohe Bindungskapazität bei gleichzeitiger hoher Flussrate aufweisen, was in einer hohen Effizienz des Materials resultieren würde.

Ein weiterer Ansatz besteht in dem Ersatz von kostspieligen Ausgangsmaterialien. Im Bereich des *capture* Schritts wird teures Protein A eingesetzt, welches für die biospezifische Bindung von IgG entscheidend ist. Eine kosteneffizientere potentielle Alternative bietet die Mixed-Mode Chromatographie, in der mehrere Interaktionen gleichzeitig für eine hohe Spezifität sorgen und die Affinitätsbindung von Protein A ansatzweise imitieren können.<sup>[20–23]</sup>

Ziel dieser Arbeit ist es, eine chromatographische Mixed-Mode Membran mit einer bikontinuierlichen Struktur der stationären Phase zu entwickeln, die perspektivisch zu einer hohen Produktivität im Kontext der präparativen Chromatographie monoklonaler Antikörper führt.

Für diese Problemstellung ist es von großer Relevanz, die chemischen, mechanischen und strukturellen Eigenschaften des diffusiven Materials, welches die stationäre Phase bildet, zu kennen und die durch den Herstellungsprozess generierte Membranstruktur zu kontrollieren, um so den Einfluss auf die Performance der Membran zu steuern.

Das erste Kapitel dieser Arbeit thematisiert das Material Agarose. Agarose gehört mit zu den gängigsten Materialien für stationäre Phasen und wird vorwiegend in Form von Beads eingesetzt.<sup>[61]</sup> Es bildet als Hydrogel selbstständig dreidimensionale Netzwerke aus, wodurch eine hohe diffusive Porosität mit einer Vielzahl an verschiedenen diffusiven Porengrößen und einer hohen inneren Oberfläche generiert wird.<sup>[54,61–65]</sup> Das natürliche Polysaccharid ist ein ungiftiges, inertes Material, welches keine physikalischen Interaktionen zu Proteinen aufweist.<sup>[54,61]</sup> Es besitzt zudem viele Hydroxy-Gruppen, die sich chemisch leicht modifizieren lassen, wodurch es sich hervorragend für chromatographische Zwecke eignet.<sup>[61]</sup> Da das Agarose-Hydrogel im Verhältnis zu synthetischen Polymeren jedoch sehr weich ist, muss dies chemisch verstärkt werden. Dies geschieht meist über eine Vernetzung des Materials, was zu verbesserten mechanischen Eigenschaften führt.<sup>[59,60]</sup> Ziel von Kapitel I ist es, die Einflüsse der chemischen und physikalischen Eigenschaften von Agarose als Sol und Gel auf ihre Prozessierbarkeit in der Herstellung und auf ihre Anwendung als chromatographisches Material zu kennen. Dafür wurden die chemischen, mechanischen, strukturellen und diffusiven Eigenschaften des Polysaccharids analysiert.

Im zweiten Kapitel wird die Struktur der Membran und der Membranbildungsprozess untersucht. Die Herstellung der Membran erfolgt über eine Ölin-Wasser-Emulsion einer tensidhaltigen organischen Phase in einer wässrigen agarosehaltigen Phase bei erhöhten Temperaturen, wie erstmals von *Larsson* beschrieben.<sup>[66]</sup> Beim Abkühlen der Emulsion entsteht durch Gelieren der Agarose eine feste Membranstruktur, deren konvektive Poren von der zuvor enthaltenen organische Phase herrühren und somit ein bikontinuierliches integrales Material mit hoher Performance entsteht. Ziel dieses Kapitels ist ein Verständnis für den Membranbildungsprozess zu generieren, um die finale Membranstruktur und ihre daraus resultierenden Eigenschaften zu kontrollieren. Zudem sollen die Inhaltsstoffe der organischen Phase variiert werden, um Einflüsse auf die finale Membranstruktur zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Methoden wie Konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Permeabilitäts und Kontaktwinkel-Messungen angewandt.

Im letzten Kapitel dieser Arbeit soll das aus Kapitel I und II generierte Wissen genutzt werden, um eine Mixed-Mode Membran mit Agarose als stationärer Phase herzustellen und in ihrer Anwendung für die Bindung von Antikörpern als mögliche Alternative zu Protein A zu testen. Ziel ist es, eine hochkapazitive Membran für die potentielle Anwendung im *capture* Schritt herzustellen und ihre Performance zu charakterisieren.

# 2 Theoretischer Hintergrund

# 2.1 Kapitel I

## 2.1.1 Polymere Netzwerke und Hydrogele

Polymer-Netzwerke sind Gebilde bestehend aus einem einzigen makroskopischen Molekül, welches aus dreidimensional verknüpften Polymerketten aufgebaut ist.<sup>[67]</sup> In chemischen Netzwerken werden kovalente Bindungen zwischen mehreren Polymerketten geknüpft, wodurch Knotenpunkte gebildet werden. Ein solches Netzwerk kann durch Polymerisation von multifunktionellen Monomeren oder durch Vernetzung von bereits vorhandenen Polymerketten entstehen. Physikalische Netzwerke bilden sich durch intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen oder Coulomb'schen Kräften aus oder entstehen durch Verschlaufungen der Polymerketten.<sup>[67]</sup> Während chemische Netzwerke in der Regel unlöslich bleiben, können physikalische Netzwerke durch Änderung der Umgebungsbedingungen (Lichteinfall, Temperatur, Lösungsmittel, etc.) ihre Verknüpfungspunkte reversibel in den unvernetzten Ausgangszustand zurückversetzen.<sup>[67-74]</sup> Bestimmte Polvmer-Netzwerke besitzen die Eigenschaft, durch Lösungsmittelaufnahme zu quellen und so Gele auszubilden, die in der Lage sind, Hunderte Vielfache ihres Eigengewichts an Flüssigkeit aufzunehmen.<sup>[75]</sup> Ist Wasser das aufgenommene Lösungsmittel, so werden die gequollenen Netzwerke als Hydrogele bezeichnet. Die Hydrophilie des Netzwerks entsteht durch hydrophile Gruppen innerhalb des Polymers, wie z.B. Amine, Carboxygruppen, Alkohole oder Sulfonsäuren. Hydrogele werden typischerweise in natürliche und synthetische Materialen eingeteilt. Zu den natürlichen Polymeren zählen unter anderem Agarose, Alginate und Collagen, zu den synthetischen Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure und Polyacrylamid.<sup>[74,76]</sup> Typische Anwendungen von Hydrogelen liegen im Bereich der Chromatographie, Filtration, (Lebensmittel-)Technologie, Medizin und Pharmazie.<sup>[61,69,74,77–80]</sup>



Abb. 2.1: Chemisches (links) und physikalisches (rechts) Netzwerk. Orange: Knotenpunkte. Grün: Bereiche stärkerer intermolekularer Wechselwirkungen.

#### 2.1.1.1 Polysaccharid-basierte physikalische Netzwerke

Polysaccharide natürlichen Ursprungs können oft Hydrogele ausbilden, deren Netzwerkstruktur auf physikalischen Wechselwirkungen beruht. Diese sogenannten Geliermittel werden häufig in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel eingesetzt. Bekannte Vertreter dieser Art sind Agar-Agar, Carrageen, Gellan, Xanthan oder Pektin.<sup>[81]</sup> Auch in der Chromatographie, Bioanalytik und Pharmazie finden solche Geliermittel vielfältige Anwendung, besonders das Polysaccharid Agarose. Dieses wird vor allem in mikrobiellen Kulturmedien und als stationäre Phase in Gelelektrophorese und chromatographischen Säulen verwendet.<sup>[61,82,83]</sup>

Agarose ist ein lineares Polysaccharid, welches aus vielen Agarobiose-Einheiten besteht, die aus zwei glycosidisch verknüpften sechsgliedrigen Zuckerringen aufgebaut sind: 1,3-verknüpfte  $\beta$ -D-Galactopyranose und 1,4-verknüpfte 3,6anhydro- $\alpha$ -L-Galactopyranose.<sup>[84]</sup> Agarose wird aus den Rotalgen *Gelidium* und Gracillaria gewonnen und ist zusammen mit Agaropektin eines der Hauptbestandteile von Agar-Agar. Agarose zählt zu den neutralen Polymeren und weist einen sehr geringen Substitutionsgrad an geladenen Spezies wie z.B. Sulfaten auf. In heißem Wasser ist Agarose löslich und bildet ein Sol, in dem die Polymerketten eine random coil-Konformation mit umgebender Hydrathülle einnehmen.<sup>[85]</sup> Beim Abkühlen unter den Gelpunkt der Lösung geliert die Agarose aufgrund von starken intermolekularen Wechselwirkungen aus. Diese bestehen vornehmlich aus Wasserstoffbrückenbindungen der –OH Gruppen, die aufgrund der Struktur der Agarobiose eine doppelhelikale Geometrie zweier Moleküle begünstigen, s. Schema 2.1.<sup>[86]</sup> Die Zusammenlagerung von Teilbereichen der Agarosemoleküle kann durch einen Keimbildungs- und Wachstumsmechanismus beschrieben werden, s. Schema 2.2.<sup>[77]</sup> Durch die Ausbildung der Doppelhelices und Aggregierung dieser (Induktionsphase) kommt es zu polymerreichen Keimen, die durch fortführendes Wachstum polymerreiche Phasen bilden (Gelierphase). Durch weitere Aggregierung entsteht ein Netzwerk aus agarosereichen Bereichen, die im finalen Gel als Agarosefilamente bezeichnet werden. Schließlich kommt der Geliervorgang zum Erliegen (Pseudo-Gleichgewicht), wobei die polymerarme Phase die Poren des dreidimensionalen Netzwerks bildet. Durch erneutes Aufheizen des Gels wird oberhalb vom Solpunkt (>80 °C) das Netzwerk aufgebrochen und es entsteht wieder ein wässriges Agaroselsol. Zwischen Solund Gelpunkt liegt eine große Hysterese von bis zu 50 °C.<sup>[87]</sup>



**Abb. 2.2:** Chemische Struktur einer Agarose-Einheit: 1,3-verknüpfte  $\beta$ -D-Galactopyranose und 1,4-verknüpfte 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-Galactopyranose.



Schema 2.1: Bildung von Agarose Doppelhelices und Aggregierung dieser beim Abkühlen des Agarosesols.<sup>[88]</sup>



Schema 2.2: Geliervorgang von Agarose anhand eines Keimbildungs-Mechanismus und Entstehung des dreidimensionalen Polymer-Netzwerks. Erstellt nach<sup>[77]</sup>.

Agarosegele weisen eine hochporöse Struktur mit Porengrößen im Nanometerbis Mikrometerbereich auf, durch dessen Porosität sich eine hohe Oberfläche ergibt.<sup>[89]</sup> Zudem ist Agarose ein biokompatibles, hydrolysestabiles Material, welches sich leicht über die –OH Gruppen modifizieren lässt und somit das Anbringen von funktionellen Gruppen ermöglicht.<sup>[54]</sup> Durch diese Eigenschaften und die Fähigkeit der Agarose, selbständig ihre poröse Struktur auszubilden, eignet sich das Gel-Material hervorragend für chromatographische Zwecke, wo es bereits vielseitig eingesetzt wird.<sup>[54,61–65]</sup>

#### 2.1.1.2 Phasenseparation

Die Auftrennung eines homogenen Gemischs in mindestens zwei Phasen wird Phasenseparation genannt. Diese tritt auf, wenn sich die Umgebungsbedingungen des Systems ändern, z.B. durch Variation des Drucks, der Temperatur oder der Zusammensetzung der Komponenten.<sup>[90]</sup> Phasenseparation beruht auf thermodynamischen Effekten, die über die Änderung der Mischungs-Gibbs-Energie  $\Delta G_{\text{mix}}$  beschrieben werden. Sie setzt sich aus der Mischungsenthalpie  $\Delta H_{\text{mix}}$ , der Mischungsentropie  $\Delta S_{\text{mix}}$  und der Temperatur *T* zusammen:

$$\Delta G_{\rm mix} = \Delta H_{\rm mix} - T\Delta S_{\rm mix}.$$
(2.1)

Ist die Anderung der Gibbs-Energie bei den gegebenen Bedingungen negativ, so mischen sich die zwei Phasen eines binären Gemischs zu einer gemeinsamen homogenen Phase. Das Verhalten von binären Systemen ist abhängig von den vorhandenen Wechselwirkungen zwischen beiden Komponenten. Sind sowohl  $\Delta H_{\text{mix}}$  als auch  $\Delta S_{\text{mix}}$  positiv, so entsteht ein Bereich, in dem  $\Delta G_{\text{mix}}$  ebenfalls positiv ist. Dies entspricht dem Fall einer oberen kritischen Lösungstemperatur upper critical solution temperature (UCST). Mit steigender Temperatur überwiegt der Entropie-Term in Gleichung 2.1 und  $\Delta G_{\text{mix}}$  wird < 0, sodass eine Mischung beider Komponenten begünstigt wird.<sup>[91]</sup> Abbildung 2.3 zeigt beispielhaft ein Phasendiagramm von T gegen den Molenbruch eines Polymers in Lösung. Die Grenze zwischen den Bereichen, wo  $\Delta G_{\text{mix}} < 0$  und  $\Delta G_{\text{mix}} > 0$ ist, wird als Binodale bezeichnet. Sie bezeichnet den Übergang zwischen "vollständig mischbar"und "ineinander unlöslich"und beschreibt die Verteilung beider Phasen im thermodynamischen Gleichgewicht.<sup>[90]</sup> Der Fall, dass das Phasendiagramm ein Maximum in der Binodalen aufweist, wird wie bereits beschrieben als UCST bezeichnet. Ist jedoch ein Minimum zu beobachten, ergibt sich eine eine lower critical solution temperature (LCST), oberhalb dieser eine Entmischung der Komponenten stattfindet, da  $\Delta H_{\text{mix}} < 0$  und  $\Delta S_{\text{mix}} < 0$ .<sup>[91,92]</sup>



Abb. 2.3: Exemplarisches Phasendiagramm einer typischen binären Polymer-Lösung für den Fall einer UCST als auch einer LCST. Erstellt nach<sup>[91]</sup>.

Häufig beinhalten Systeme thermodynamisch metastabile Zustände, die

durch statistische Fluktuationen einen Nukleationsprozess bewirken, die in einer spontanen Entmischung resultiert.<sup>[92]</sup> Dieser Vorgang wird als spinodale Entmischung bezeichnet und die Grenze diese Region zum thermodynamisch instabilen Bereich wird Spinodale genannt.<sup>[93,94]</sup>

Wie bereits beschrieben geliert Agarose durch temperaturinduzierte Phasenseparation und bildet ein dreidimensionales Netzwerk aus. Das Verhalten von Agarose–Wasser-Systemen in Abhängigkeit der Temperatur und der Agarosekonzentration wurde von Morita et al. untersucht und in einem Phasendiagramm dargestellt, s. Abbildung 2.4. Zu sehen sind drei Kurven, die zum einen den Sol–Gel-Übergang und zum anderen den Trübungspunkt und die Spinodale des Systems abbilden.<sup>[95]</sup> Der Sol–Gel-Übergang beschreibt erste Änderungen der mechanischen Festigkeit des Sols. Der Trübungspunkt wird durch Phasenseparation im Gel erreicht, wodurch das poröse Netzwerk entsteht und das Gel opak wird. Diese Kurve wurde als Binodale angesehen, da sie die Phasenseparation im Gel wiederspiegelt. Eine weitere Änderung der Netzwerkstruktur konnte mittels Kleinwinkel-Lichtstreuung detektiert und somit ein Verlauf der Spinodalen ermittelt werden, die unterhalb der Binodalen liegt.<sup>[95]</sup> Aus den Daten geht hervor, dass es sich beim Gelieren von Agarose um eine Entmischung mit einer UCST handelt, deren Phasendiagramm einen metastabilen Bereich zwischen Spinodale und Binodale aufweist. Der Verlauf der Spinodalen hängt stark von Verunreinigungen der Agarose ab und spiegelt somit die empfindliche metastabile Region unterhalb der Binodalen wieder, die durch Nukleationsprozesse kontrolliert wird.<sup>[95]</sup>



Abb. 2.4: Phasendiagramm von Agarose in Wasser. Ein erster Sol–Gel-Übergang wurde als Quadrate dargestellt, der Verlauf des Trübungspunkts als unausgefüllte Kreise und die Spinodale als ausgefüllte Kreise. Erstellt nach<sup>[95]</sup>.

## 2.1.2 Mikroskopie

Zur Charakterisierung von Oberflächen und Festkörpern werden verschiedenste mikroskopische Methoden angewandt. Dazu zählen Licht-, Rasterelektronenund Rasterkraftmikroskopie. Insbesondere die Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Rasterkraftmikroskopie (*atomic-force-microscopy*, AFM) kommen aufgrund ihrer hohen Auflösung häufig zum Einsatz und können Strukturen im niedrigen Mikrometer- bis Nanometerbereich nachweisen. Eine weitere Technik, die Laser-Konfokal-Mikroskopie (*confocal-laser-scanning-microscopy*, CLSM), die zwar nicht die hohe Auflösung eines REMs erreicht, jedoch zusätzliche Möglichkeiten bietet, Objekte insbesondere dreidimensional zu untersuchen.

#### 2.1.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Optische Lichtmikroskope sind aufgrund des Abbe-Limits nicht zu hochauflösenden Aufnahmen im  $\mu$ m- und nm-Bereich in der Lage. Hingegen bietet die Verwendung von Elektronen die Möglichkeit, die Wellenlänge stark abzusenken

und somit die Auflösung zu erhöhen. Dieses wird in der Rasterelektronenmikroskopie ausgenutzt, wobei ein definierter Elektronenstrahl als "Lichtquelle" verwendet wird.

REM beruht auf einem Elektronenstrahl, der das zu untersuchende Objekt abfährt (abrastert), um so durch Wechselwirkungen des Strahls mit der Probe und eines geeigneten Detektors Punkt für Punkt ein Abbild der Oberfläche zu erzeugen.<sup>[96]</sup> Der Elektronenstrahl (Primärelektronen, PE) entsteht durch eine Glühkathode (Elektronenkanone), die i.d.R. erhitzt wird und Elektronen emittiert. Diese werden durch eine angelegte Spannung beschleunigt, mittels Magnetspulen gebündelt und über eine Säule in den Probenraum geführt, s. Abbildung 2.5. Als Detektoren werden meist *Everhart-Thornley*- (ETD) oder auch in-lens-Detektoren eingesetzt, die elastisch und unelastisch gestreute Elektronen aus der Probe detektieren.<sup>[97]</sup> Während der *in-lens*-Detektor in der Säule des REMs sitzt, befindet sich der ETD seitlich in der Probenkammer. Dabei wird zwischen Sekundärelektronen (SE) und Rückstreuelektronen (RE) unterschieden. Die Intensität des Rückstreu-Signals ist materialabhängig und steigt mit der Ordnungszahl der sich auf der Probe befindenden Atome, weswegen sich RE insbesondere für die Analytik der Materialzusammensetzung der Probe eignen.<sup>[96]</sup> Da Sekundärelektronen keine äußerst hohe Energie besitzen (wenige eV), stammen sie ausschließlich aus der obersten Schicht der Probe und können somit ihre Topografie und räumliche Struktur wiedergeben. Hierfür ist der Neigungswinkel des PE-Strahls zur untersuchenden Stelle von Relevanz: Während beim Auftreffen des PE-Strahls im rechten Winkel weniger SE emittiert werden, steigt die Emission der SE mit steigendem Neigungswinkel der Probe, wodurch hellere Bereiche im Abbild entstehen.<sup>[97]</sup>

Ein entscheidender Nachteil der klassischen REM-Technik ist das für den Elektronenstrahl benötigte Hochvakuum, damit Interaktionen des Elektronenstrahls mit Teilchen in der Luft verhindert werden. Somit ist klassische REM insbesondere für mit Flüssigkeit gefüllte Proben ungeeignet. Organisch-chemische Moleküle wie Polymere reagieren zudem sehr sensibel auf den hochenergetischen Elektronenstrahl, weshalb die Proben häufig besputtert werden müssen. Außerdem mangelt es bei ihnen oftmals an Kontrast im Bild, da die typischen Elemente eines Polymers (C, H, O) nur schwach mit den Primärelektronen interagieren.<sup>[97]</sup>



Abb. 2.5: Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops.<sup>[98]</sup>

Für Polymere kann ein besonderes REM-Verfahren - Kryo-REM - angewandt werden. Es handelt sich um eine Technik, bei der die Probe zunächst mit flüssigem Stickstoff oder flüssigem Helium schockgefroren und bei tiefen Temperaturen untersucht wird.<sup>[97]</sup> Um speziell die Netzwerkstruktur eines Hydrogels zu untersuchen wird zudem die gefrorene Flüssigkeit unter Vakuum sublimiert.<sup>[99]</sup> Um die Sublimation des Eises im Hydrogel kontrolliert stattfinden zu lassen, wird die Probe in einer externen Vorbereitungskammer gebrochen und dort die Temperatur geringfügig erhöht, sodass nur wenige Mikrometer der Eisschicht sublimieren und das Polymergerüst unbeschadet zurückbleibt. Dieses kann nach Besputtern mit z.B. Gold oder Platin unter normalen REM Bedingungen untersucht werden. Es besteht jedoch immer ein gewisses Risiko, dass die Probe durch die harschen Bedingungen beim Schockgefrieren oder beim Sublimieren ihre Struktur verändern.

#### 2.1.2.2 Laser-Konfokal-Mikroskopie und 3D-Strukturanalyse von Membranen

Im Gegensatz zum REM können mit Fluid benetzte Oberflächen unter Umgebungsbedingungen mittels Laser-Konfokal-Mikroskopie (CLSM) untersucht werden. Diese Technik ermöglicht aufgrund eines konfokalen Laservolumens das dreidimensionale Abbilden einer Probe. Durch eine Lochblende (*pinhole*) wird das Anregungs- und Detektionslicht auf ein konfokales Volumen begrenzt und jegliches Licht unterdrückt, welches sich nicht im Fokus befindet.<sup>[100]</sup> Ein schematischer Aufbau eines einfachen Laser-Konfokal-Mikroskops ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Das kohärente Licht eines Lasers (schwarze gestrichelte Linie) wird auf die Probe fokussiert. Während nur das aus dem Fokus stammende Licht durch das *pinhole* zum Detektor gelangt (grüne Linie), wird alles andere von der Blende abgeschirmt und nicht detektiert (blau und rot gestrichelte Linien). Hierdurch wird das Signal-zu-Rausch Verhältnis im Vergleich zur Weitfeld-Mikroskopie enorm gesteigert.<sup>[100]</sup> Im Gegensatz zur Weitfeld-Mikroskopie kann in der Konfokal-Mikroskopie eine Aufnahme der gesamten Probe nicht zur selben Zeit geschehen. Hierzu muss die Probe ähnlich zum REM abgerastert und das Bild aus vielen Einzelpunkten zusammengesetzt werden.<sup>[101]</sup> Durch Verschiebung der Probe in z-Richtung können mehrere x,y-Aufnahmen in unterschiedlichen z-Ebenen aufgenommen und durch Rekonstruktion am Computer ein dreidimensionales Bild der Probe erstellt werden. Bedingung hierfür ist, dass die Probe einen sehr ähnlichen Brechungsindex wie das Immersionsmedium hat, damit das Anregungslicht tief genug in die Probe eindringen kann.<sup>[102]</sup>


**Abb. 2.6:** Schematischer Aufbau eines einfachen Konfokalmikroskops. Erstellt nach<sup>[100]</sup>.

Typischerweise werden für CLSM die Proben mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert, um einen stärkeren Bildkontrast zu erzielen.<sup>[100]</sup> Farbstoffmoleküle besitzen ein optisches Fenster, in dem sie durch eine geeignete Lichtquelle elektronisch angeregt werden können. Besitzen diese Farbstoffe fluoreszente Eigenschaften, so emittieren sie nach der Anregung Licht längerer Wellenlänge. Der Anregungsvorgang eines Elektrons findet vom Grundzustand S<sub>0</sub> in einen energetisch höher liegenden, vibronisch angeregten Zustand, typischerweise S<sub>1</sub>, statt. Durch anschließende vibronische Relaxation gelangt das Elektron in den Grundzustand von S<sub>1</sub>, wonach es durch Emission von energieärmeren Licht (fluoreszierendes Photon) im Vergleich zur Anregungswellenlänge zurück in S<sub>0</sub> fällt.<sup>[100,103]</sup> Durch Wahl eines geeigneten Detektorfensters kann diese Fluoreszenz beobachtet werden und es entsteht ein Bild mit hellen und dunklen Bereichen (hell dort, wo Fluoreszenz detektiert wurde).



Schema 2.3: Jablonski-Diagramm des Fluoreszenz-Vorgangs. Erstellt nach<sup>[103]</sup>.

Für die Charakterisierung von Membranen im nassen Zustand und Strukturen im Mikrometerbereich hat sich CLSM als qualitativ hochwertige Methode etabliert. Eine beispielhafte CLSM Aufnahme einer farbstoffmarkierten Agarosemembran ist in Abbildung 2.7 gezeigt. Die grünen Bereiche im Bild geben den Polymeranteil der Membran wieder, die schwarzen Bereiche stellen die Poren der Membran dar.



Abb. 2.7: Beispielhafte 2D-Bildaufnahme einer Agarosemembran. Grün sind fluoreszierende Bereiche.

Eine quantitative Charakterisierung von dreidimensionalen Membranstrukturen findet in der Regel über computerbasierte Bildanalyse statt. *Ley et al.* haben eine Methode entwickelt, mittlere Poren- und Steggrößen, ihre Verteilungen und spezifische Oberflächen von Membranen anhand von CLSM Bildstapeln zu berechnen.<sup>[104]</sup> Binarisierung der x,y-Bilder in Poren- und Membransteg-Bereiche und anschließende Zusammensetzung des Bildstapels führt zur Rekonstruktion der Membran-3D-Struktur. Über eine vorzeichenbehaftete Abstandsfunktion werden die kleinsten Abstände zwischen den Porengrenzen bestimmt. Ein Algorithmus berechnet das Zentrum der Abstandsfunktion, wodurch eine Medialachse für jede Pore entsteht und somit der jeweilige Porendurchmesser ermittelt wird.<sup>[55]</sup> Diese Methode ermöglicht es, Membranstrukturen nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ zu analysieren, um so ihre Eigenschaften objektiv miteinander vergleichen zu können.



Abb. 2.8: Als Kugeln dargestellte Zentren der vorzeichenbehafteten Abstandsfunktion, die den lokalen Porendurchmesser innerhalb der Membran-3D-Struktur wiedergeben.<sup>[104]</sup>

# 2.1.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Diffusion von Biomolekülen spielt eine entscheidende Rolle für viele biologische, pharmazeutische und analytische Prozesse. Speziell in der Chromatographie hat die Diffusion ein entscheidenden Einfluss auf die Trennleistung.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) ist eine optische Messtechnik, die Fluktuationen der Fluoreszenzintensität detektiert und so Informationen über die Diffusivität des zu untersuchenden System extrahiert.<sup>[105]</sup> Die FCS-Methodik wurde erstmals von Madge, Elson und Webb beschrieben und findet bis heute vielseitige Einsatzgebiete.<sup>[106-108]</sup> Besonders in der Biologie findet FCS Anwendung, um die Mobilität von Biomolekülen in Lipiden und Zellmembranen zu untersuchen, Bindungseigenschaften von DNA, RNA und Rezeptoren zu analysieren oder auch Konzentrationen von gelabelten oder autofluoreszierenden Proteinen in lebenden Zellen zu bestimmen.<sup>[109-111]</sup> Auch im Bereich der Materialwissenschaften sind FCS Methodiken etabliert, um die Diffusivität von porösen Medien wie Hydrogelen und Blockcopolymeren zu bestimmen, meist mit dem Hintergrund, das Verhalten von Molekülen in biologischem Gewebe zu imitieren.<sup>[112–117]</sup>

Das Prinzip von FCS beruht auf der Technik eines Konfokalmikroskops. Farbstoff-Moleküle, die durch das konfokale Volumen des CLSM diffundieren, welches im Femtoliter-Bereich liegt, s. Abbildung 2.9, werden durch eine geeignete Laserwellenlänge angeregt und emittieren energieärmeres Licht. Da das fluoreszierende Teilchen zu mehreren Zeitpunkten Photonen emittiert, ist die Fluktuation dieser Fluoreszenz zeitlich korreliert. Das Signal wird in Abhängigkeit der Zeit detektiert und im Anschluss mithilfe einer Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  ausgewertet, s. Schema 2.4 A+B. Dabei wird die Änderung der Fluoreszenzintensität  $\delta F(t)$  am Zeitpunkt t gegen sich selbst um die Zeit  $\tau$  verschoben  $(\delta F(t + \tau))$  und die Übereinstimmung dessen berechnet, s. Gleichung 2.2.<sup>[118]</sup> Es resultiert eine Korrelationskurve  $G(\tau)$  gegen  $\tau$  (2.4, C), aus der über eine exponentielle Fitfunktion (z.B. für dreidimensionale translationale Diffusion, Gleichung 2.3) die Diffusionszeit  $\tau_{\rm D}$  des fluoreszenten Moleküls extrahiert werden kann.<sup>[119]</sup>

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$
(2.2)

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_{\rm D}} \right)^{-1} \left( 1 + \left( \frac{\omega_{x,y}}{\omega_z} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{\rm D}} \right)^{-\frac{1}{2}}$$
(2.3)

Hierbei bezeichnet N die Anzahl an detektierten Photonen und  $\omega_z$  den axialen Radius und  $\omega_{x,y}/\omega_z = \kappa$  den Strukturparameter des konfokalen Detektionsvolumens, der seine elliptische Form beschreibt. Die Form kommt aufgrund der Beugung des Lichts an der Beugungsscheibe zustande. Je geringer  $\kappa$  desto schmaler ist das konfokale Volumen und desto genauer wird die FCS-Messung.

Der laterale Radius des konfokalen Volumens  $\omega_{x,y}$  entspricht der halben Breite des Laserprofils (angenommen als Gauss-Funktion), bei der die Lichtintensität  $I(r) = \frac{1}{e^2}$  beträgt. Über eine Kalibriermessung, bei der  $\omega_{x,y}$  bestimmt wird, kann so die Diffusionskonstante D des Moleküls im untersuchten Medium über die zweidimensionale Einstein-Gleichung berechnet werden:<sup>[119]</sup>

$$D = \frac{\omega_{x,y}^2}{4\tau_{\rm D}} \tag{2.4}$$



**Abb. 2.9:** Farbstoff-markierte Moleküle, die durch das konfokale Detektionsvolumen eines CLSM diffundieren und dabei fluoreszieren.  $\omega_{x,y}$  und  $\omega_z$  geben den lateralen und axialen Radius des konfokalen Detektionsvolumens wieder.



Schema 2.4: Prinzip einer FCS Messung. A) Fluoreszente Moleküle diffundieren durch das konfokale Volumen des Mikroskops. B) Die dadurch erzeugte Fluktuation der Signalintensität und allgemeine Korrelationsfunktion. C) Resultierende Autokorrelationskurve durch Verschiebung des zeitlichen Intensitätsprofils.<sup>[118]</sup>

# 2.1.4 Diffusionsmodelle

Im Folgenden werden mehrere theoretische und empirische Modelle erläutert, die die gehinderte Diffusion von Molekülen allgemein und speziell beschreiben. Als Diffusion in Flüssigkeiten und Gasen wird der Massentransport aufgrund von brownscher Molekularbewegung (random walk) in Folge von Konzentrationsunterschieden beschrieben.<sup>[103]</sup> Das erste Fick'sche Gesetzt beschreibt die proportionale Abhängigkeit der Teilchenstromdichte J vom vorliegenden Konzentrationsgradienten  $\frac{\partial c}{\partial x}$ :<sup>[103]</sup>

$$J = -D\frac{\partial c}{\partial x}.$$
(2.5)

Hierbei ist D der Diffusionskoeffizient des diffundierenden Teilchens, c seine Konzentration und x der Ort. Die Stokes-Einstein-Beziehung gibt die freie Diffusion  $D_0$  von sphärischen Teilchen in einer newtonschen Flüssigkeit wieder, wobei der Zusammenhang mit der Temperatur T, der dynamischen Viskosität der Flüssigkeit  $\eta$  und dem Radius R des Teilchens hervorgeht:

$$D = \frac{k_{\rm B}T}{6\pi\eta R}.\tag{2.6}$$

Hierbei stellt  $k_{\rm B}$  die Boltzmann-Konstante dar.

Eine Beschreibung der Diffusionskonstante für Proteine in freier Lösung  $D_0$ und in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts M wurde von Young et al. 1980 entwickelt:<sup>[120]</sup>

$$D_0 = 8,34 \cdot 10^{-8} \frac{T}{\eta \ M^{1/3}}.$$
(2.7)

Für diese Gleichung wurde ein partielles spezifisches Volumen des Proteins von  $0.73 \,\mathrm{cm}^3 \,\mathrm{g}^{-1}$  angenommen.

#### 2.1.4.1 Cussler-Modell

In porösen Strukturen erfolgt keine freie Diffusion mehr. Die Kollision des diffundierenden Moleküls mit Hindernissen resultiert in einer gehinderten Diffusion des Teilchens. Die zugehörige effektive Diffusionskonstante  $D_{\text{eff}}$  ist geringer als in freier Lösung  $(D_0)$  und hängt mit der Porosität  $\epsilon$  des porösen Mediums und der Tortuosität  $\tau_p$  zusammen:

$$D_{\rm eff} = D_0 \frac{\epsilon}{\tau_{\rm p}}.$$
(2.8)

Die Tortuosität ist ein Maß für die Gewundenheit einer Strecke C mit dem Abstand beider Enden L:

$$\tau_{\rm p} = \frac{C}{L}.\tag{2.9}$$

Das Modell nach *Cussler* beschreibt die Diffusion einer starren Kugel in einer großen, flüssigkeitsgefüllten Pore:<sup>[121]</sup>

$$\frac{D_{\rm eff}}{D_0} = 1 + \frac{9}{8} \frac{R}{r_{\rm Pore}} \ln\left(\frac{R}{r_{\rm Pore}}\right) - \frac{3,092\,R}{2\,r_{\rm Pore}}.$$
(2.10)

Hierbei ist R den Radius der starren Kugel und  $r_{\text{Pore}}$  den Porenradius.

#### 2.1.4.2 Ogston-Modell

Das Ogston-Modell liefert eine empirische Beschreibung der gehinderten Diffusion von Proteinen zwischen zylindrischen Polymerfasern mit dem Radius  $r_{\rm f}$ .<sup>[122]</sup> Dabei besitzt das Protein den Stokes-Radius  $r_{\rm s}$ . Hier ist der volumetrische Polymeranteil  $\phi$  von Relevanz, da dieser den volumetrischen Faseranteil des Systems angibt.

$$\frac{D_{\text{eff}}}{D_0} = \exp\left(-\frac{r_{\text{s}} + r_{\text{f}}}{r_{\text{f}}}\sqrt{\phi}\right).$$
(2.11)

#### 2.1.4.3 Erweitertes Ogston-Modell nach Hagemann

Hagemann et al. veröffentlichten eine Erweiterung des Ogston-Modells in Bezug auf Diffusion von Molekülen speziell in Agarosegelen.<sup>[123]</sup> Hier wurde die Annahme einer Netzwerkstruktur mit kubischen Poren und zylindrischen Filamenten (*cubic grid model*) statt linearen Fasern für die Polymerfilamente angenommen. Das Filamentvolumen  $V_{\rm f}$  wird hier über den Kubus- bzw. Porendurchmesser  $d_{\rm p}$  und den Filamentdurchmesser  $d_{\rm f}$  ermittelt und der Zusammenhang mit der Polymervolumenfraktion  $\phi$  dargestellt:<sup>[124]</sup>

$$V_{\rm f} = N_{\rm cyl} \left(\frac{\pi}{4} d_{\rm f}^2 d_{\rm p} + \frac{1}{3} d_{\rm f}^3\right) = (1 - \epsilon_{\rm p}) V_{\rm Agarose} = \phi V_{\rm Agarose}.$$
 (2.12)

Hierbei ist  $N_{cyl}$  die Anzahl an Filament-Zylindern:

$$N_{\rm cyl} = 3 \frac{V_{\rm Agarose}}{\left(d_{\rm p} + d_{\rm f}\right)^3},\tag{2.13}$$

 $\epsilon_{\rm p}$  die Porosität des Netzwerks und  $V_{\rm Agarose}$  das betrachtete Agarosegel-Volumen. Der Polymeranteil  $\phi$  lässt sich auch über folgenden Zusammenhang berechnen:

$$\phi = \frac{c_{\text{Agarose}}}{\psi_{\text{Agarose}} \,\omega_{\text{Agarose}}} \tag{2.14}$$

wobei  $\psi_{\text{Agarose}} = 1,64 \text{ g mL}^{-1}$  die Agarosedichte im Filament und  $\omega_{\text{Agarose}} = 0,625$  den Massenanteil im Filament darstellt.<sup>[125,126]</sup> Eine Erweiterung des Ogston-Modells um den empirischen Parameter C = 3,7379 resultierte in einer geeigneten Vorhersage der Diffusionskoeffizienten speziell für Agarose-Netzwerke, die vernetzt und mit Protein A gekoppelt vorliegen:<sup>[123]</sup>

$$\frac{D_{\text{eff}}}{D_0} = \exp\left(-C\frac{r_{\text{s}} + r_{\text{f}}}{r_{\text{f}}}\sqrt{\phi}\right).$$
(2.15)

# 2.2 Kapitel II

# 2.2.1 Emulsionen

Die in dieser Arbeit untersuchten Membranen wurden über einen Emulsionsprozess hergestellt. Emulsionen sind Dispersionen zweier oder mehrerer ineinander nicht mischbarer flüssiger Phasen, die durch Zugabe von Emulgatoren (Tensiden) und durch Scherkräfte vermengt werden können.<sup>[127,128]</sup> Durch die Fragmentierung der einen Phase liegen Tröpfchen dieser in einer zweiten kohärenten Phase vor. Häufig besteht die eine Phase aus Wasser oder einer wässrigen Lösung und die zweite Phase aus einer organischen Flüssigkeit.<sup>[129]</sup> Emulsionen können in diverse Typen unterteilt werden, die einfachsten Vertreter davon sind Wasser-in-Öl (W/O) und Öl-in-Wasser (O/W) Emulsionen, s. Abbildung 2.10. Weiterhin existieren komplexere Formen wie Wasser-in-Öl-in-Wasser (W/O/W) und Öl-in-Wasser-in-Öl (O/W/O), die auch als multiple Emulsionen bezeichnet werden.<sup>[130]</sup> Aufgrund ihrer Vielseitigkeit kommen Emulsionen in den verschiedensten Bereichen zum Einsatz, wie z.B. in der Lebensmittelbranche, in der Kosmetikherstellung und in der Pharmazie als Arzneimittelträger.<sup>[131–133]</sup>



**Abb. 2.10:** Vereinfachte Darstellung zweier Emulsionen: Wasser-in-Öl (W/O) und Öl-in-Wasser (O/W).

Emulsionen werden in Makro- und Mikro-Emulsionen unterteilt, deren Unterschied in der Größe ihrer Emulsionströpfchen liegt. Makroemulsionen, oft auch nur Emulsionen genannt, weisen Tröpfchen der dispergierten Phase in einer Größenordnung > 0,1 µm auf und sind thermodynamisch instabil.<sup>[134]</sup> Mikroemulsionen hingegen besitzen Tröpfchendurchmesser von nur wenigen Nanometern, was einen stärkeren entropischen Beitrag der Tropfenanzahl auf das System bewirkt. In Kombination mit einer geringeren Grenzflächenspannung werden Mikroemulsionen als thermodynamisch stabil bezeichnet.<sup>[128,134]</sup>

#### 2.2.1.1 Grenzflächen

Makroemulsionen, im Folgenden als "Emulsionen" bezeichnet, sind aufgrund eines hohen enthalpischen und eines relativ niedrigen entropischen Beitrags thermodynamisch instabil ( $\Delta G_{\rm f} > 0$ ).  $\Delta H_{\rm f}$  ist hier die Bildungsenthalpie, die mit der Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung  $\sigma$  und der Grenzfläche Azusammenhängt:<sup>[135]</sup>

$$\Delta G_{\rm f} = \Delta H_{\rm f} - T\Delta S_{\rm f} = \sigma A - T\Delta S_{\rm f}.$$
(2.16)

Die Grenzflächenspannung gibt an, welche Arbeit dW pro Fläche dA geleistet werden muss, um die Grenzfläche zwischen zwei Phasen zu vergrößern:<sup>[103]</sup>

$$\sigma = \frac{\mathrm{d}W}{\mathrm{d}A}.\tag{2.17}$$

Sie ist der Grund für das Bestreben eines mehrphasigen Systems nach minimaler Grenzfläche.  $\sigma$  steht ebenso mit dem Laplace-Druck  $\Delta p$  in Verbindung, der den Druckunterschied über die Grenzfläche zweier Phasen beschreibt:

$$\Delta p = -\sigma H = -\sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}\right). \tag{2.18}$$

H ist die mittlere Krümmung der Oberfläche und  $R_{1,2}$  die adien einer beliebig gekrümmten Fläche. Diese Gleichung ist als Young-Laplace Gleichung bekannt und beschreibt die Abhängigkeit des Laplace Drucks oder auch der Krümmung einer Grenzfläche von ihrer Grenzflächenspannung. Wird eine sphärische Grenzfläche betrachtet, so wird dieser Ausdruck vereinfacht zu:

$$\Delta p = p_{\rm in} - p_{\rm ex} = \frac{2\sigma}{r} \tag{2.19}$$

wobei  $p_{in}$  und  $p_{ex}$  als interner und externer Druck an der Grenzfläche bezeichnet werden und r den Radius der Kugel beschreibt. Wenn die Grenzfläche abflacht,

der Krümmungsradius also unendlich wird, geht die Druckdifferenz zwischen beiden Phasen gegen Null.<sup>[103]</sup>

Die Bildung von Emulsionströpfchen kann anhand der Rayleigh Instabilität beschrieben werden.<sup>[128]</sup> Die Plateau–Rayleigh Instabilität bezeichnet das Verhalten eines linearen Flüssigkeitsstroms, welcher in kleinere sphärische Teilchen zerfällt, die das gleiche Gesamtvolumen aber eine deutlich geringere Oberfläche wie der ursprüngliche Strom besitzen.<sup>[136]</sup> Ein konkretes Beispiel dafür ist tropfendes Wasser, dessen Form zunächst kapillarenförmig ist und sich anschließend in einzelne Tropfen teilt. Der Ursprung liegt in Unregelmäßigkeiten des Stroms, die zu unterschiedlichen Krümmungsradien führen. Aufgrund dessen ist der Laplace Druck an vielen Stellen unterschiedlich, was letztlich die Tropfenbildung und somit eine geringere Oberfläche verursacht. Sobald in einem unvermischten mehrphasigen System Scherung auftritt, beginnt die innere Phase, sich zu teilen und kleinere Fraktionen zu bilden. Diese werden bei konstanter Scherung in längliche Zylinder deformiert, die aufgrund der Rayleigh Instabilität zu Tröpfchen identischer Größe zerfallen.<sup>[136]</sup> Dieser Vorgang erfolgt innerhalb kürzester Zeit (< 1 s). Durch die konstante Scherung folgt im Anschluss eine weitere aber langsame Abnahme der Tröpfchengröße, bis eine Sättigung des Tropfendurchmessers erreicht ist.

#### 2.2.1.2 Tenside

Wird einem Emulsionssystem ein Tensid zugesetzt, so lagert sich dieses an die Grenzfläche zwischen beiden Phasen an. Dadurch wird das thermodynamisch instabile System kinetisch stabilisiert.<sup>[135]</sup> Tenside können ionische oder nichtionische Moleküle sein und bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil, welche sich entsprechend an der Grenzfläche zwischen wässriger und Öl-Phase anordnen. Durch die so verringerte Kontaktfläche zwischen beiden Phasen wird deren Oberflächenspannung herabgesetzt.<sup>[137]</sup> Somit kann eine größere Grenzfläche entstehen, resultierend in Tröpfchen mit verringertem Radius.

Tenside sind aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften in der Lage, Mizellen oder andere aggregierte Strukturen zu bilden, deren Form vom Längenverhältnis der hydrophilen und lipophilen Anteile (*aspect ratio*) des Moleküls abhängt. Diese Aggregate entstehen erst ab einer bestimmten Tensidkonzentration, die kritische Mizellenkonzentration (*critical micelle concentration*, CMC) genannt wird.<sup>[138]</sup> Diese ist abhängig von der vorhandenen Grenzfläche, die zunächst vollständig vom Tensid besetzt wird. Die Struktur des Tensids hat ferner einen entscheidenden Einfluss auf die Art von Emulsion, die durch beide Phasen entsteht. Je nach *aspect ratio* kann eine O/W oder eine W/O Emulsion begünstigt sein.<sup>[128]</sup>

Die hydrophilic–lipophilic balance (HLB)-Skala gibt die präferierte Löslichkeit eines Tensids in Öl oder Wasser wieder.<sup>[139]</sup> Sie läuft von 0 (stark lipophil) bis 20 (stark hydrophil) und gibt Aussagen darüber, welche Art von Emulsion entstehen wird bzw. für welche Art von Emulsion ein spezielles Tensid geeignet ist. Emulgatoren mit einem HLB = 3-6 können für W/O-Emulsionen eingesetzt werden und solche mit HLB = 8-16 für O/W-Emulsionen.<sup>[139]</sup>

#### 2.2.1.3 Wechselwirkungen zwischen Emulsionströpfchen

Wie bei allen Teilchen weisen auch Emulsionströpfchen bestimmte Wechselwirkungen zueinander auf. Bei Verwendung eines ionischen Tensids besteht zwischen den Tröpfchen elektrostatische Abstoßung. Durch Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht an der Tropfenoberfläche resultiert ein elektrisches Potential, welches exponentiell mit ansteigendem Abstand abflacht.<sup>[140]</sup> Zusätzlich zur elektrostatischen Abstoßung existiert unabhängig von der Art des Tensids die sogenannte depletion force oder depletion interaction.<sup>[141]</sup> Dies ist eine attraktive Wechselwirkung, die durch kleine Partikel in der kohärenten Phase induziert wird. Zu diesen Partikeln zählen Tensid-Aggregate (Mizellen) aber auch gelöstes Polymer. Die *depletion interaction* beschreibt die sterische Exklusion von Mizellen oder Polymerknäulen aus dem Zwischenraum (depletion zone) zweier Kolloide (Emulsionströpfchen), was in einer Änderung des osmotischen Drucks in dieser Zone resultiert, s. Abbildung 2.5.<sup>[142]</sup> Dieser Effekt wird auch mit der Entropiezunahme des gesamten Systems begründet, wobei die Entropiezunahme durch kleine frei werdende Partikel die Entropiezbnahme der Kolloide überwiegt. Die *depletion force* ist abhängig von der Konzentration der Partikel in der kohärenten Phase und steigt ab Erreichen der CMC stark an.<sup>[143,144]</sup>



Schema 2.5: Schematische Abbildung einiger kolloidaler Partikel in einer polymerhaltigen Lösung. Die gestrichelten Linien zeigen die depletion zone. Durch Überlappung dieser Zonen entsteht ein osmotischer Druck auf die Kolloide, symbolisiert durch Pfeile.<sup>[143]</sup>

Außer den weitreichenden elektrostatischen und *depletion* Interaktionen existieren auch Wechselwirkungen mit kurzer Reichweite, die besonders wichtig für die Stabilität von Emulsionen sind.<sup>[128]</sup> Sterische Repulsion und Solvatationseffekte sind nötig, um die Tröpfchen vor Koaleszenz zu bewahren. Auch Adhäsion zwischen Emulsionströpfchen spielt eine entscheidende Rolle. Sie führt zur Ausbildung von rigiden Gelen, die aus zusammengelagerten Tröpfchen-Clustern bestehen.<sup>[128]</sup> Bei der Aggregation zweier Emulsionströpfchen wird eine Doppelschicht aus Tensid gebildet. Die Interaktion  $\Pi(h)$  setzt sich aus Anziehung bei geringfügigem Abstand h und starker Repulsion bei Kontakt zusammen und kann mit dem Energieprofil in Abbildung 2.11 beschrieben werden.



**Abb. 2.11:** Zwei adhäsive Emulsionströpfchen (links) mit dem Abstand h zueinander, zwischen denen sich eine flache Tensid-stabilisierte Schicht ausgebildet hat. Das Energiediagramm (rechts) zeigt den Verlauf des Interaktionspotentials in Abhängigkeit vom Abstand h beider Tröpfchen.<sup>[128]</sup>

#### 2.2.1.4 Alterung von Emulsionen

Emulsionen sind metastabile Systeme, die über Lebensdauern von Sekunden über Jahre verfügen. Die Alterung von Emulsionen kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen, die letztendlich zur Auftrennung beider Phasen führt: Aufrahmung oder Sedimentation, Flokkulation, Diffusion und Koaleszenz.<sup>[135,145]</sup>

Der Diffusions-Mechanismus wird Ostwald-Reifung genannt.<sup>[146]</sup> Dabei diffundieren Teile der dispergierten Phase durch die kontinuierliche Phase, wodurch gleichzeitiges Wachstum der größeren und Schrumpfen bis Auflösen von kleineren Emulsionströpfchen stattfindet. Dieser Effekt des Massentransfers wird durch den Unterschied im Laplace Druck der Tröpfchen mit verschiedenen Krümmungsradien hervorgerufen.<sup>[135]</sup>  $\Delta p$  ist bei kleineren Tropfen größer und bewirkt eine Auflösung dieser, da sich die freie Energie des Systems somit minimiert. Koaleszenz hingegen erfolgt durch Auftrennung der Tensidschicht zwischen zwei benachbarten Tröpfchen, wodurch aus zwei kleineren Tröpfchen ein größeres entsteht.<sup>[128]</sup> Das Aufbrechen dieser Schicht ereignet sich, wenn ein kleines thermisch induziertes Loch in der Trennschicht die weitere Auftrennung der Schicht aufgrund der Grenzflächenspannung hervorruft. Hierbei spielt die Lebensdauer des Trennfilms eine entscheidende Rolle für die Lebensdauer der gesamten Emulsion.

Die beiden Prozesse der Aufrahmung/Sedimentation und Flokkulation resultieren im Gegensatz zur Ostwald-Reifung und Koaleszenz nicht in einer Vergrößerung von Emulsionströpfchen, sind aber entscheidend für den Mechanismus der Koaleszenz, da dieser Tröpfchen in unmittelbarer Nähe zueinander voraussetzt.<sup>[135]</sup> Flokkulation entspricht der meistens reversiblen Aggregation von Emulsionströpfchen durch interpartikuläre Wechselwirkungen zu einem Cluster, ohne eine Veränderung der Tröpfchengröße hervorzurufen.<sup>[145]</sup> Aufrahmung oder Sedimentation beschreibt die Migration von Emulsionströpfchen zur Oberfläche des Gemischs oder zum Boden des Emulsionsgefäßes.<sup>[147]</sup> Beide Prozesse führen dazu, dass sich die Tröpfchen sehr nahe kommen und erhöhen somit die Wahrscheinlichkeit für Koaleszenz.

Im Allgemeinen können Parameter, die die Bewegung der Emulsionströpfchen einschränken, zu einer Erhöhung der Stabilität der gesamten Emulsion führen. Dazu zählen beispielsweise eine Erniedrigung der Temperatur oder eine Erhöhung der Viskosität. Im Wesentlichen spielt jedoch die Art des Tensids für das jeweilige System und die Zusammensetzung der Emulsion eine entscheidende Rolle. Dabei ist letztendlich entscheidend, die Größe der Emulsionströpfchen möglichst gering zu halten.<sup>[134,148]</sup>



Schema 2.6: Schematischer Prozess der Emulsionsalterung anhand verschiedener Prozesse. Erstellt nach<sup>[135]</sup>.

# 2.3 Kapitel III

# 2.3.1 Chromatographie

Chromatographie ist ein Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen (Feed) in Ziel- und Nebenprodukte. Die in einer mobilen Phase (flüssig oder gasförmig) gelösten Komponenten wechselwirken dabei mit einer festen stationären Phase, wodurch sich unterschiedliche Verweilzeiten der zu trennenden Stoffe im chromatographischen Medium ergeben.<sup>[18]</sup> Der vorliegende Trennmechanismus kann aus ionischen, polaren, hydrophoben und sterischen Wechselwirkungen bestehen und führt je nach Grad der Interaktion zu verzögerten Laufzeiten der Komponenten. Die vorliegenden Wechselwirkungen werden i.d.R. durch Liganden ausgebildet, die chemisch an eine Matrix gebunden sind. Chromatographische Prozesse werden in analytische und präparative Vorgänge unterteilt. Während die analytische Chromatographie eine qualitative oder quantitative Bestimmung der einzelnen Bestandteile liefert, führt die präparative Chromatographie zur gezielten Aufreinigung von Produkten im großen Maßstab und kommt vorwiegend in biopharmazeutischen Prozessen zum Einsatz.<sup>[18,31]</sup>

Im Kontext der Proteinchromatographie sind folgende Eigenschaften eines chromatographischen Mediums wünschenswert: eine hohe innere Oberfläche der stationären Phase für eine ausreichende Ligandendichte und somit häufig hohe Bindungskapazität, eine hohe Selektivität des verwendeten Liganden und eine ausreichende konvektive und diffusive Porosität des Materials mit Porendurchmessern, die groß genug sind, um den Proteintransport durch das Medium sowohl konvektiv als auch diffusiv ungehindert stattfinden zu lassen und einen hohen Massentransfer zu gewährleisten. Außerdem sind eine geringe unspezifische Adsorption von Molekülen, eine chemisch inerte Matrix (Laugenund Ligandenstabilität), eine hohe Wiederverwertbarkeit und Kosteneffizienz von Relevanz.<sup>[31]</sup> Je nach Anwendung unterscheiden sich die Prioritäten dieser Eigenschaften. Sie können über den Interaktionsmodus, die gewählte Prozessart, das chromatographische Medium und die stationäre Phase gesteuert werden.

#### 2.3.1.1 Interaktionsmodi

Das einfachste Prinzip der Chromatographie ist die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC), wobei die Auftrennung des Gemischs nach der Größe der Komponenten erfolgt. Während kleine Moleküle bis in die kleinsten Poren der stationären Phase diffundieren können,

werden die größeren Moleküle aus diesen Poren ausgeschlossen und verweilen für einen kürzeren Zeitraum im Medium. Weitere Interaktionen der aufzutrennenden Moleküle kommen meist durch auf der Oberfläche der stationären Phase befindliche Liganden zustande, die über spezielle funktionelle Gruppen verfügen. Die bedeutsamsten Interaktionsmodi in der präparativen Proteinchromatographie stellen Ionenaus-tausch- (ion exchange chromatography, IEX), hydrophobe Interaktions- (HIC) und Affinitätschromatographie (AC) dar, die auf elektrostatischen, hydrophoben und biospezifischen Wechselwirkungen beruhen, s. Abbildung 2.12.<sup>[18,57,61]</sup> In der IEX werden ionische Gruppen gegensätzlicher Ladung zu denen auf der stationären Phase gebunden, in HIC bestehen die Interaktionen aus Van-der-Waals- bzw.  $\pi - \pi$ -Wechselwirkungen und in AC befinden sich meist Biomoleküle (z.B. Proteine) auf der Oberfläche, die spezifische physikalische Bindungen zu anderen Biomolekülen ausbilden (z.B. Antigen–Antikörper-Wechselwirkung). Die Trennleistung beruht bei allen Modi auf Interaktionsunterschieden von Zielmolekülen und Nebenprodukten mit der mobilen und stationären Phase und ist u.a. abhängig von der Betthöhe und dem Durchmesser des Mediums.



Abb. 2.12: Verschiedene Interaktionsmodi in der Chromatographie. SEC: Größenausschlusschromatographie, IEX: Ionenaustauschchromatographie, HIC: hydrophobe Interaktionschromatographie, AC: Affinitätschromatographie.

#### 2.3.1.2 Chromatographische Medien

Die Isolation eines gewünschten Zielmoleküls bedarf eines individuell angepassten Prozesses, in dem neben verschiedenen Interaktionsmodi auch unterschiedliche chromatographische Medien zum Einsatz kommen können.<sup>[31]</sup> Zu den wesentlichen Vertretern zählen Beads, Monolithen und Membranadsorber. Zur besseren Verständlichkeit werden zunächst einige Begriffe definiert und differenziert, s. Tabellen 2.1-2.3:

Allgemein chromatographische Medien				
Begriff	Definition			
diffusive Poren	Poren, die vorwiegend über Diffusion erreicht werden			
konvektive Poren	Poren, die vorwiegend über Konvektion erreicht werden			
innere Oberfläche [m <sup>2</sup> ]	gesamte konvektiv & diffusiv erreichbare Oberfläche			
Porosität [%]	Volumenanteil nicht-stationärer Phase			
diffusive Porosität [%]	vorwiegend über Diffusion erreichbarer Volumenanteil nicht-stationärer Phase			
konvektive Porosität [%]	vorwiegend über Konvektion erreichbarer Volumenanteil nicht-stationärer Phase			
diffusiver Stofftransport	Stofftransport, der nur über diffusive Prozesse stattfindet (z.B. innerhalb der diffusiven Poren)			
konvektiver Stofftransport	Stofftransport, der nur über konvektive Prozesse stattfindet (z.B. innerhalb der konvektiven Poren)			
Filament	Polymerstrang, der eine diffusive Pore begrenzt			

 ${\bf Tab. \ 2.1:} \ {\rm Allgemeine \ Definitionen \ von \ Begriffen \ für \ chromatographische \ Medien.}$ 

 ${\bf Tab. \ 2.2:} \ {\rm Definitionen} \ {\rm von} \ {\rm Begriffen} \ {\rm für} \ {\rm partikuläre} \ {\rm chromatographische} \ {\rm Medien}.$ 

Partikuläre Medien			
Begriff	Definition		
interpartikulär	im Inneren der Partikel		
extrapartikulär	außerhalb der Partikel, im Zwischenraumvolumen		
Zwischenraumvolumen	Volumen zwischen den Partikeln in einer chroma- tographischen Säule		
diffusive Poren	Poren innerhalb eines Partikels, die vorwiegend diffusiv erreicht werden		

Integrale Medien				
Begriff	Definition			
Steg	Teil der stationären Phase, der verbrückend zwischen zwei oder mehreren konvektiven Poren liegt			
konvektive Pore	große Pore relativ zur diffusiven Porengröße durch die der konvektive Fluss vorwiegend strömt			
diffusive Pore	Pore innerhalb eines Steges, die diffusiv erreichbar ist			
Phasengrenzfläche, spezifische Oberflä- che [m <sup>2</sup> mL <sup>-1</sup> ]	Grenzfläche zwischen Stegen und konvektiven Poren pro Mediumvolumen			

 Tab. 2.3: Definitionen von Begriffen f
 ür integrale chromatographische Medien.

Beads, auch Resins genannt, sind sphärische und oftmals poröse Partikel, die in Säulen gepackt und vorwiegend in der Chromatographie angewandt werden. Der Vorteil klassischer Beads ist die aus den kleinen diffusiven Poren (5-200 nm) und ihrer diffusiven Porosität resultierende hohe innere Oberfläche, welche zu einer hohen Bindungskapazität führen kann.<sup>[15,31,34,35,123]</sup> Aufgrund der geringen diffusiven Porengrößen innerhalb der Beads und ihrem großen Partikeldurchmesser von etwa 50-180 µm ergibt sich ein diffusionslimitierter Massentransport.<sup>[53]</sup> Dies führt bei hohen Flussraten zu einer eingeschränkten Erreichbarkeit der gesamten verfügbaren inneren Oberfläche und somit zu Verlusten in der Bindungskapazität. Infolgedessen darf der Bead-basierte Prozess nicht bei zu geringen Verweilzeiten durchgeführt werden.<sup>[30,33,37]</sup> Außerdem bewirkt eine hohe Flussrate hohe Drücke, wodurch es zur Kompression des Materials kommen kann, was in einem weiterem Druckanstieg und Verlusten in der Permeabilität resultieren würde.<sup>[30,33,37]</sup>

Typische Materialien, die für Beads verwendet werden, sind natürliche Polymere wie Cellulose, Agarose, Dextran und Chitosan, aber auch synthetische Polymere wie Polyacrylamide und Polyvinylstyrole. Ebenso können anorganische Materialien wie Hydroxylapatit, Silica oder auch Glas verwendet werden.<sup>[31]</sup> Vorteil der natürlichen Polymere sind eine hohe Hydrophilie aufgrund ihrer hohen Hydroxygruppen-Dichte und eine geringe unspezifische Bindung von Proteinen.<sup>[31]</sup> Meist unterliegen natürliche Polymere einer gewissen Druckoder Laugeninstabilität, weshalb sie modifiziert, z.B. vernetzt, werden müssen. Synthetische Polymere weisen hingegen eine hohe Beständigkeit gegenüber extremen chemischen Bedingungen und hohen Drücken auf. Allerdings sind diese Polymere relativ hydrophob, weshalb sie ebenfalls chemisch modifiziert werden müssen, um ein gewisses Maß an Hydrophilie zu erhalten. Anorganische Materialien weisen zwar eine hohe Druckstabilität und z.T. auch Selektivität auf, jedoch sind sie nicht ausreichend resistent gegenüber extremer chemischen Bedingungen.<sup>[31]</sup>

Abgesehen von Beads spielen integrale Materialien eine entscheidende Rolle für die chromatographische Aufreinigung. Als integrale Medien werden im Folgenden solche Materialien bezeichnet, die fest in ihrer Form verankert sind und sich selbst stützen. Dies ist durch eine bikontinuierliche Struktur gewährleistet, die eine kontinuierliche stationäre Phase aufweist. Solche Materialien lösen das Problem der limitierten und aufwändigen Packbarkeit von Beads in Säulen.

Ein integrales Medium stellen Monolithen dar. Monolithe besitzen eine kontinuierliche stationäre Phase, die *in situ* in einer Säule oder einer Scheibe hergestellt wird und so ein Netzwerk aus Poren und stationärem Material bildet.<sup>[56,149]</sup> Monolithe bestehen hauptsächlich aus synthetischen Polymeren wie Polyacrylamide oder Polymethacrylaten, deren Struktur sich durch Phasenseparation beim Herstellungsprozess ergibt.<sup>[56]</sup> Darüber hinaus werden aber auch andere Materialien wie Silica oder Agarose verwendet.<sup>[32,150]</sup> Aufgrund der Abwesenheit von diffusiven Poren findet der Massentransport zur Oberfläche des Materials fast ausschließlich konvektiv statt, was in geringeren Prozessdrücken resultiert, wobei die Adsorption der Zielmoleküle von der Flussgeschwindigkeit unbeeinflusst bleibt.<sup>[30,32,49]</sup> Dadurch kann der Prozess schneller als bei Beadbasierten Verfahren vonstatten gehen, was eine höhere Produktivität bedeutet und das Risiko der Protein-Inaktivierung verringert.<sup>[30,50]</sup> Monolithe eignen sich aufgrund ihrer Struktur für große Biomoleküle wie Plasmide, Antikörper und Viren, da die innere Oberfläche des Materials durch seine konvektiven Poren im  $\mu$ m-Bereich erreichbar ist.<sup>[58,151,152]</sup> Ein entscheidender Nachteil stellt jedoch die vergleichsweise geringere innere Oberfläche dar, die zu niedrigeren Bindungskapazitäten für kleinere Proteine führt.<sup>[50]</sup>

Membranadsorber gehören ebenfalls zu den integralen Medien und besitzen wie Monolithen eine kontinuierliche stationäre Phase und konvektive Porengrößen im Nanometer- bis Mikrometerbereich. Sie werden aber nicht im Gehäuse sondern zunächst als flaches Material hergestellt und im Anschluss gewickelt oder in mehreren Lagen gestapelt, um eine geeignete Betthöhe zu erreichen.<sup>[18,33,57]</sup> Sie bieten die gleichen Vorteile wie Monolithen: Durch den vorwiegend konvektiven Stofftransport werden hohe Flussraten und geringe Drücke ohne negativen Einfluss auf die Trennleistung ermöglicht.<sup>[33,58]</sup> Allerdings stellt die geringe innere Oberfläche rein konvektiver Membranen wie bei Monolithen einen Nachteil gegenüber Beads im Bezug auf eine geringere Bindungskapazität dar. Membranen bestehen meist aus regenerierter Cellulose und Polyethersulfon, es werden aber auch vielerlei weitere organische und anorganische Materialien wie Polyglycidylmethacrylat, Nylon und Alkoxysilan verwendet.<sup>[33,48,57,58]</sup>

Um die Bindungskapazität von integralen Materialien zu erhöhen, kann die stationäre Phase modifiziert werden, um eine deutlich höhere innere Oberfläche zu bilden.<sup>[153]</sup> Dies geschieht durch Propfung von Polymer auf die Stege der Membranadsorber, wodurch eine dünne Gelschicht gebildet wird. Die Bindungskapazität kann so um mehrere Vielfache erhöht werden.<sup>[154–156]</sup> Zudem kann das Material der stationären Phase so gewählt werden, dass es selbst in sich porös ist und diffusive Poren aufweist, die die innere Oberfläche der stationären Phase stark vergrößert, wie bereits von *Ley* demonstriert.<sup>[55]</sup> Das Potential solcher integraler Materialien in Bezug auf eine gesteigerte Bindungskapazität konnte bereits von *Hagemann et al.* gezeigt werden.<sup>[123,124]</sup>



Schema 2.7: Chromatographische Medien. Links: Partikuläre Medien. Rechts: Integrale Medien. Die schraffierten Bereiche der integralen Medien sind entweder porös oder impermeabel für die aufzutrennenden Moleküle, abhängig vom verwendeten Material und seiner Modifizierung. Falls ein impermeables Material vorliegt, so entfällt die Diffusion ins Innere der Stege.

# 2.3.2 Präparative Membranchromatographie

#### 2.3.2.1 Betriebsmodi

Aufgrund der kontinuierlichen stationären Phase von Membranadsorbern und ihrer vergleichsweise großen Porendurchmesser im Vergleich zu den diffusiven Poren von Beads stellen diese eine geeignete Alternative zu ihnen dar, um schnelle Prozesse und eine höhere Produktivität in chromatographischen Verfahren zu ermöglichen.<sup>[33,157]</sup> Membranchromatographische Prozesse können je nach Anwendung auf zwei verschiedene Arten betrieben werden. Diese sind *bind and elute* (B&E) und *flow-through* (FT), s. Schema 2.8.

Im B&E-Modus wird das chromatographische Medium mit Feed, dem aufzutrennenden Gemisch, durchströmt, wobei zunächst das gewünschte Zielmolekül (Target, Substrat) an die Membran gebunden wird (Beladung).<sup>[29]</sup> Im Idealfall geschieht dies so lange, bis alle Bindungsstellen belegt sind, sodass erst nach vollständiger Beladung nicht gebundenes Substrat aus der Membran austritt (Durchbruch). I.d.R. wird die Beladung noch vor Durchbruch des Targets durch den Membranadsorber gestoppt, um Verluste des Produkts zu vermeiden. Es folgt ein Prozessschritt, der alle restlichen Verunreinigungen aus der Membran spült (Waschen), wonach lediglich gebundenes Zielmolekül im Medium verbleibt. Während der Elution wird die Interaktion zwischen Substrat und Ligand durch geeignete Umgebungsbedingungen gestört, sodass das reine Zielmolekül aus dem chromatographischen Medium eluiert wird.<sup>[57]</sup>

Im FT-Modus hingegen findet der gegenteilige Prozess statt, da hier die Verunreinigungen im Feed an die Membran binden.<sup>[29,50,158,159]</sup> Hierbei werden die Wechselwirkungen zwischen Membranadsorber und Feed so gewählt, dass möglichst wenig Substrat aber viele Verunreinigungen ans Medium bindet und es direkt durchbricht. Dadurch werden mehrere Einzelschritte und somit auch Pufferlösung im Vergleich zu B&E eingespart und der Prozess kann kontinuierlich betrieben werden.<sup>[50,158]</sup> FT eignet sich somit für Verfahren, bei denen wenig Verunreinigung im Feed vorliegt, da der Membranadsorber erst bei voller Beladung getauscht oder regeneriert werden muss. Dahingegen bietet sich B&E z.B. beim *capture* Schritt im *Downstream* an, da hier die Konzentration an ungewünschten Nebenprodukten sehr hoch ist.



Schema 2.8: Betriebsmodi in der Membranchromatographie: *bind and elute* (links) und *flow-through* (rechts).

#### 2.3.2.2 Struktur- und Leistungsparameter

Bevor entschieden wird, welcher Prozess für das jeweilige Zielmolekül angewandt werden soll, ist Kenntnis über die Material- und Bindungseigenschaften des Membranadsorbers und Substrats vonnöten. Dabei sind zum einen Strukturparameter wie Poren- und Steggrößen und die innere Oberfläche bzw. die Phasengrenzfläche der Membran, zum anderen Leistungseigenschaften wie Permeabilität, Ligandendichte und Bindungskapazität von Relevanz.<sup>[57]</sup>

Eine Eigenschaft des chromatographischen Mediums ist die Porosität. Sie beschreibt den Anteil an mobilem Phasenvolumen im chromatographischen Medium. Dabei wird im Folgenden zwischen intrapartikulärer  $\epsilon_{in}$  und extrapartikulärer Porosität  $\epsilon_{ex}$  bei Beads bzw. diffusiver und konvektiver Porosität bei Membranen unterschieden.<sup>[18]</sup>  $\epsilon_{in}$  gibt die diffusive Porosität der stationären Phase (in den Partikeln oder Stegen) wieder und  $\epsilon_{ex}$  den Hohlraumanteil zwischen den einzelnen Bereichen der stationären Phase (Zwischenraumvolumen bei Beads und konvektive Poren bei Membranen). Die Gesamtporosität eines Systems kann über folgenden Zusammenhang beschrieben werden:<sup>[18]</sup>

$$\epsilon = \epsilon_{\rm ex} + (1 - \epsilon_{\rm ex}) \epsilon_{\rm in} \tag{2.20}$$



**Abb. 2.13:** Poröse Partikel (links) in einer Säule mit dem Zwischenraumanteil  $\epsilon_{ex}$  und der intrapartikulären Porosität  $\epsilon_{in}$ . Vereinfacht dargestellte Membran mit zylindrischen Poren (rechts) und ihrer konvektiven und diffusiven Porosität  $\epsilon_{ex}$  und  $\epsilon_{in}$ , dem Porendurchmesser  $d_p$ , dem Stegdurchmesser  $d_s$  und der Membrandicke  $L_{eff}$ .

Bei rein konvektiven Membranadsorbern gilt  $\epsilon = \epsilon_{ex}$ . Der Fluss in einem chromatographischen Medium wird hauptsächlich durch das extrapartikuläre bzw. konvektive Volumen beeinflusst. Je höher  $\epsilon_{ex}$  desto höher die Permeabilität im System bei gleichbleibendem Druck. Strömungen in den diffusiven Poren können meist vernachlässigt werden, da sie i.d.R. deutlich langsamer als im konvektiven Raum sind.<sup>[18]</sup> Der Massentransport innerhalb der stationären Phase findet daher hauptsächlich diffusiv statt, abhängig vom ausgeübten Druck.

Die Permeabilität in Membranen ist von hoher Bedeutung für die resultierende Verfahrenszeit im chromatographischen Prozess und kann über das Gesetz von Hagen-Poiseuille hergeleitet werden.<sup>[124,160]</sup> Hiernach besteht eine Membran aus einem Medium mit durchgehenden zylindrischen konvektiven Poren des Durchmessers  $d_{\rm p} = 2r$  und der Grundfläche A. Die Dicke der Membran wird mit der Länge der Zylinder  $L_{\rm eff} = \tau_{\rm p}L$  beschrieben.  $\tau_{\rm p}$  ist die Tortuosität und beschreibt den Grad der Gewundenheit der Zylinder. Das Gesetzt von Hagen-Poiseuille lautet:<sup>[161]</sup>

$$\dot{V} = \frac{\pi r^4}{8\eta} \frac{\Delta p}{\Delta x}.$$
(2.21)

Hierbei sind  $\dot{V} = \dot{u}A$  der Volumenstrom mit der Strömungsgeschwindigkeit  $\dot{u}, \eta$  die Viskosität der durchfließenden Flüssigkeit und  $\Delta p / \Delta x$  der Druckunterschied

 $\Delta p$  entlang der Membrandicke  $L_{\text{eff}} = \Delta x$ . Mit  $\dot{V} = \dot{u}A$ ,  $\Delta x = L_{\text{eff}} = \tau_{\text{p}}L$ ,  $A = \pi r^2$  und  $r = \frac{d_{\text{p}}}{2}$  wird folgender Zusammenhang für Membranen erhalten:

$$\frac{\Delta p}{L} = \frac{32\eta\tau_{\rm p}\dot{u}}{d_{\rm p}^2}.$$
(2.22)

Die Gleichung für die Permeabilität P nach  $Darcy^{[162,163]}$  lautet:

$$P = \frac{\dot{V}\eta L_{\text{eff}}}{A_{\text{M}}\Delta p}.$$
(2.23)

 $A_{\rm M}$  stellt die durchströmte Gesamtfläche der Membran dar. Die Kombination aus Gleichung 2.22 und 2.23 ergibt für die Permeabilität von Membranen nach dem Modell von *Hagen–Poiseuille*:<sup>[124]</sup>

$$P = \frac{A}{A_{\rm M}} \frac{d_{\rm p}^2}{32} = \epsilon d_{\rm p}^2 \frac{1}{32}.$$
 (2.24)

P ist somit linear von der konvektiven Porosität  $\epsilon = \epsilon_{\text{ex}}$  der Membran und quadratisch vom konvektiven Porendurchmesser abhängig.<sup>[18,124]</sup>

Analog zu den Partikeldurchmessern bei Beads besitzen Membranen sogenannte Stegdurchmesser  $d_{\rm s}$ . Die Phasengrenzfläche zwischen konvektiven Poren und Stegen einer Membran wird im Folgenden als spezifische Oberfläche  $A_{\rm sp}$ definiert. Sie beschreibt die gesamte konvektiv erreichbare Oberfläche der stationären Phase pro Membranvolumen und wird durch die Strukturparameter  $\epsilon$ ,  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$  vorgegeben.

Die Ligandendichte beschreibt die Anzahl an Bindungsstellen bzw. die Menge an immobilisiertem Ligand (hydrophobe, ionische oder weitere bindungsrelevante funktionelle Gruppe) und wird als Mol gebundenem Target pro Membranvolumen angegeben. Sie korreliert idealerweise linear mit der inneren Oberfläche.<sup>[33,164]</sup> Über die Ligandendichte kann die Bindungskapazität des chromatographischen Mediums gesteuert werden. Als Bindungskapazität eines chromatographischen Mediums wird der Parameter bezeichnet, der die Masse an gebundenem Substrat pro Membranvolumen  $V_{\rm M}$  wiedergibt.<sup>[18]</sup> Dabei wird zwischen statischer (SBC) und dynamischer Bindungskapazität (DBC) unterschieden. Die SBC gibt an, welche Masse an Target m pro Membranvolumen  $V_{\rm M}$ im thermodynamischen Gleichgewicht an die Membran gebunden wird:<sup>[18,164,165]</sup>

$$SBC = \frac{m}{V_{MV}}$$
(2.25)

Dieser Parameter wird aus statischen Experimenten bestimmt und hängt sowohl von der Ligandendichte als auch vom Bindungsgleichgewicht zwischen Ligand und Zielmolekül sowie den Targeteigenschaften und Prozessbedingungen ab.<sup>[18]</sup> Er gibt unter den gewählten Bedingungen die maximal mögliche Bindung an den Membranadsorber wieder. Die DBC hingegen ist eine kinetische Kenngröße, da sie unter dynamischen Bedingungen ermittelt wird, die keine Gleichgewichtssituation widerspiegeln.<sup>[18]</sup> Zur Bestimmung der dynamischen Bindungskapazität wird der Membranadsorber mit Feed konvektiv durchströmt und der Durchbruch des Zielmoleküls in einem Chromatogramm beobachtet. Dieser erfolgt noch vor Erreichen der SBC und die detektierte Konzentration hinter der Membran wird mit der Ausgangskonzentration ins Verhältnis gesetzt.<sup>[18]</sup> I.d.R. werden Werte für 1, 2, 5 und 10% Durchbruch als charakteristische Größe bestimmt, da das aufzureinigende Substrat zu teuer ist, um den Adsorber maximal zu beladen und dabei Produkt zu verlieren.<sup>[164]</sup> Eine beispielhafte Durchbruchskurve für einen idealen und realen Membranadsorber ist in Abbildung 2.14 gezeigt.



Abb. 2.14: Durchbruchskurve eines idealen und realen Membranadsorbers. Das Chromatogramm zeigt die relative Substratkonzentration hinter dem chromatographischen Medium in Abhängigkeit des Beladungsvolumens. Die rote Fläche gibt die Bindungskapazität bei 10% Durchbruch wieder, der schraffierte Bereich die DBC bei 100% Beladung. Erstellt nach [166].

Einige der oben genannten Eigenschaften führen zu einer hohen Produktivität

des chromatographischen Mediums. Die Produktivität  $P_{\%}$  bei einem bestimmten prozentualen Durchbruch ist definiert als:<sup>[30]</sup>

$$P_{\%} = \frac{m_{\rm Elu}}{V_{\rm Medium} t_{\rm Zyk}} = \frac{\rm DBC}{t_{\rm Zyk}}$$
(2.26)

Hierbei ist  $m_{\rm Elu}$  die Masse des eluierten Produkts,  $V_{\rm Medium}$  das Volumen des chromatographischen Mediums, welches  $V_{\rm MV}$  bei Membranadsorbern entspricht und  $t_{\rm Zyk}$  die Zeit eines Prozesszyklus. Die Permeabilität kann  $t_{\rm Zyk}$  beeinflussen, die spezifische Oberfläche und Ligandendichte die DBC. Membranadsorber weisen im Vergleich zu Beads geringere Prozesszeiten, dafür aber auch eine deutlich niedrigere DBC auf.<sup>[33,58]</sup> Die Produktivität von Membranen kann sowohl höher als auch niedriger als die von Beads liegen, abhängig vom jeweiligen Prozess und Membrantyp.<sup>[30,50]</sup>

## 2.3.3 Mixed-Mode Chromatographie

In Abschnitt 2.3.1.1 wurden diverse Interaktionsmodi in chromatographischen Prozessen aufgeführt. Darüber hinaus können in der multimodalen, auch Mixed-Mode genannten, Chromatographie (MMC) mehrere Arten physikalischer Wechselwirkungen gleichzeitig kombiniert werden, wie z.B. Kation- und Anion-Austausch oder ionische und hydrophobe Interaktionen.<sup>[24,31,167,168]</sup>

Die Multimodalität kann auf verschiedene Weisen umgesetzt werden, s. Abbildung 2.15. Zu den physikalischen Methoden zählen die Tandem- (a), die Zweiphasen- (b) und die Hybrid-Säule (c).<sup>[25]</sup> In der Methode der Tandem-Säule werden zwei unimodale chromatographische Säulen in Serie hintereinander geschaltet, ohne das Eluat zwischendurch aufzufangen. Zweiphasen-Säulen vereinen zwei stationäre Phasen mit unterschiedlichen Interaktionsmodi in einer Säule, wobei sich die eine Phase am einen Ende und die andere am zweiten Ende der Säule befindet. Als Hybrid-Säulen werden solche bezeichnet, in denen mindestens zwei stationäre Phasen miteinander gemischt vorliegen und so zwei verschiedene Wechselwirkungen in der selben Säule ermöglichen.<sup>[24]</sup> Der Vorteil von phyikalischen MMC Methoden besteht in einem verringertem Totvolumen des Systems und einem vereinfachten Betrieb im Vergleich zu zwei separaten Prozesschritten. Allerdings erweist es sich als schwierig, ein geeignetes Laufmittel zu finden, welches mit beiden stationären Phasen kompatibel ist.<sup>[169]</sup> Zudem müssen Hybrid-Säulen durchweg homogen gemischt gepackt werden.<sup>[25]</sup>

Darüber hinaus kann eine multimodale stationäre Phase durch chemische Methoden erhalten werden. Zum einen können verschiedene Liganden chemisch an dieselbe stationäre Phase gebunden werden (d), wodurch mehrere Funktionalitäten in einem Medium vorliegen.<sup>[24]</sup> Hierbei kann das Verhältnis der funktionellen Gruppen zueinander durch Änderung der Konzentrationen im Kopplungs-Schritt variiert werden. Eine Schwierigkeit besteht jedoch darin, die beiden Ligandentypen homogen auf der stationären Phase anzubringen. Eine weitere Möglichkeit der chemischen MMC besteht durch eine Kombination von mehreren funktionellen Gruppen im selben Liganden (e).<sup>[169,170]</sup> Somit wird stets das gleiche stöchiometrische Verhältnis der Funktionalitäten und eine homogene Verteilung dieser auf der Oberfläche erreicht. Als dritte Variante gilt das sogenannte *responsive* Material (f). Dieses verändert seine chemischen Eigenschaften z.B. bei Änderung des pH-Werts oder der Temperatur. So würde eine schwache Säure abhängig vom pH-Wert einen unterschiedlichen Dissoziationsgrad aufweisen, der in verschiedenen Ionenstärken des Liganden bei gleichbleibenden hydrophoben Wechselwirkungen resultiert.<sup>[25]</sup>



Abb. 2.15: Verschiedene Typen multimodaler Chromatographie. Physikalische (a-c), chemische (d-f) Methoden.

Aufgrund der Verknüpfung mehrerer Trennungsprinzipien in einem Medium besteht die Möglichkeit, unter bestimmten Umständen zwei Prozessschritte in einem zu vereinen und somit Prozesszeiten erheblich zu verkürzen.<sup>[25,26]</sup> Auch eine z.T. höhere Auflösung und eine extrem hohe Selektivität zeichnet multimodale Verfahren aus, wodurch chemisch sehr ähnliche Moleküle, wie z.B. Protein-Monomere und -Aggregate über MMC voneinander separiert werden können.<sup>[24–29]</sup> Dies ist relevant, um hochreine Produkte in der Biopharmazie zu gewährleisten, da jede Unreinheit, auch Aggregate desselben Moleküls, Nebenwirkungen bei Patienten hervorrufen kann.<sup>[171–173]</sup>

# 3 Ergebnisse und Diskussion

# 3.1 Kapitel I - Agarose als chromatographisches Material

Wesentliche Bestandteile dieses Kapitels wurden bereits in Bachelorarbeiten von Antonia Griesz (Technische Universität Berlin) und Alina Schmidt (Georg-August-Universität Göttingen) unter Anleitung der Autorin dieser Dissertation beschrieben und diskutiert.<sup>[174,175]</sup>

# 3.1.1 Vorwort

Biopharmazeutische Prozesse spielen eine große Rolle in der heutigen Medikamentenherstellung für die Therapie von diversen Krankheiten mit monoklonalen Antikörpern, z.B. Immunglobulin G (IgG).<sup>[2–4]</sup> Für die Anwendung ist ein hochreines Produkt vonnöten, weshalb die Aufreinigung von Biopharmazeutika ein essenzieller Bestandteil ihrer Produktion darstellt. Eine wesentliche Komponente dabei ist die präparative Chromatographie. Hierfür werden poröse Materialien benötigt, die eine Trennung des gewünschten Produkts von der Zellbrühe und Verunreinigungen ermöglichen. Gleichzeitig bedarf es an Methoden, die sowohl eine hohe Trennleistung als auch einen schnellen Prozess bewirken.<sup>[33]</sup> Ein Ansatzpunkt ist die Entwicklung von chromatographischen Membranen, die sowohl über eine diffusive als auch eine konvektive Struktur besitzen, um gleichzeitig eine quantitative Aufreinigung aber auch kurze Prozesszeiten zu gewährleisten. Für diese Zwecke wurde eine chromatographische Membran entwickelt, erstmals erwähnt von Larsson, deren Matrix aus dem Polysaccharid Agarose besteht.<sup>[66]</sup> Für die Anwendbarkeit von Agarose ist es von essentieller Bedeutung, ein grundlegendes Verständnis für dieses Material zu etablieren, um gleichzeitig seine ausgezeichneten strukturellen Eigenschaften mit einer geeigneten Prozessierbarkeit zu kombinieren.

In diesem Teil der Arbeit wurde Agarose als Reinstoff, als Hydrogel und in Form von Beads auf seine chemischen, mechanischen und strukturellen Eigenschaften hin untersucht. Hierbei wurde insbesondere auf das Diffusionsverhalten von monoklonalen Antikörpern innerhalb eines Agarosenetzwerks eingegangen, welches im chromatographischen Prozess zur Aufreinigung dieses Biopharmazeutikums von hoher Wichtigkeit ist.

# 3.1.2 Chemische und mechanische Eigenschaften von Agarose

Um den Einfluss auf die Struktur und die Handhabbarkeit von Agarose im Prozess zu erkennen, wurden die chemischen und mechanischen Eigenschaften von sechs Agarosen verschiedener Hersteller mithilfe von Gelpermeationschromatographie (SEC), UV/Vis Spektrometrie, NMR-Spektroskopie, Dynamisch-Mechanische-Analyse (DMA) und Viskosimetrie charakterisiert. Dafür wurde Agarose in Pulverform oder in Form eines Hydrogels bzw. Sols in Konzentrationen von 1-6 Gew.-% verwendet. Das genaue experimentelle Vorgehen der Sol/Hydrogel-Herstellung und der Analysen-Durchführung ist in Abschnitt 5.1 beschrieben.

## 3.1.2.1 Bestimmung des Molekulargewichts und des Methoxyanteils der Agarosen

Zunächst wurde mithilfe von Größenausschlusschromatographie das Molekulargewicht der verschiedenen Agarosen bestimmt, s. Abschnitt 5.1 für Details. Die Agarosen und ihre Molekulargewichte sind in Tabelle 3.1 dem Massenmittel nach sortiert aufzufinden. Insgesamt lässt sich eine recht breite Molmassenverteilung mit Dispersitäten zwischen 1,8 und 2,4 für alle Agarosen feststellen. Dies ist aufgrund des natürlichen Ursprungs des Polymers nicht ungewöhnlich.<sup>[84,176]</sup> Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das Massenmittel  $\overline{M}_w$  als Ausdruck des Molekulargewichts der untersuchten Agarosen verwendet.

Agarose	#	Тур	$\frac{\overline{M}_w}{\mathrm{kg}\mathrm{mol}^{-1}}$	$\frac{\overline{M}_{\rm n}}{\rm kgmol^{-1}}$	Đ
Litex Agarose 8057-I	Ι	Gelidium	371	168	2,2
Agarose D-5	II	Gelidium	314	195	2,4
LSL-4020	III	Gelidium	307	174	2,2
Litex Agarose 8057-II	IV	Gracilaria	287	136	2,1
Litex Agarose 8057-III	V	Gracilaria	274	143	1,9
HSB-LV 2800	VI	Gracilaria	217	118	1,8

**Tab. 3.1:** Für die Analysen verwendete Agarosen und deren Molekulargewichte als Zahlen- $\overline{M}_n$  und Massenmittel  $\overline{M}_w$  und Polydispersitäten D.

Zusätzlich zur Molmasse des Polysaccharids ist eine chemische Unterscheidung zwischen den Agarosen vonnöten, um Einflüsse dieser auf das finale Hydrogel und dessen Herstellungsprozess zu untersuchen. Hierfür wurde bereits anhand von Elementaranalysen festgestellt, dass der Schwefel- und somit der Sulfatanteil der hier analysierten Agarosen verschwindend gering und somit zu vernachlässigen ist. Mittels Hochtemperatur <sup>1</sup>H-Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie fiel jedoch auf, dass das Signal bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 4.01$  ppm im Spektrum stark variierte und konnte mithilfe von <sup>13</sup>C- und HSQC-NMR-Spektroskopie und Literaturdaten einer methylierten -OH-Gruppe zugeordnet werden.<sup>[177–180]</sup> Das experimentelle Vorgehen ist in Abschnitt 5.1 beschrieben. Ein beispielhaftes <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Agarose IV ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Durch Integration dieses Signals und Referenz auf das Signal des C1-Atoms der  $\beta$ -D-Galactose bei  $\delta = 5,74$  ppm konnte ein Methylierungsgrad, im Folgenden auch Methoxyanteil genannt, berechnet werden. Der Methoxyanteil beschreibt den Anteil an Agarose-Monomereinheiten. die eine methylierte – OH-Gruppe besitzen. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der NMR-Analyse aufgelistet. Zwischen Agarosen I-III und IV-VI liegt ein deutlicher Sprung des Methoxyanteils von  $\leq 5\%$  auf  $\geq 20\%$ . Ein Vergleich mit Tabelle 3.1 zeigt, dass I-III Agarosen des Typs Gelidium und IV-VI Agarosen des Typs Gracilaria sind. Somit scheint der Methylierungsgrad ebenfalls natürlichen Ursprungs zu sein und lässt sich anhand der Algenart unterscheiden.<sup>[181]</sup> Methylierungsgrade derselben Größenordnung (0,17-0,33) wurden bereits für Agarose des Typs Gracilaria beobachtet.<sup>[182]</sup>



Abb. 3.1: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Agarose IV in D<sub>2</sub>O bei 400 MHz und 80 °C mit den integrierten Signalen  $I(-\text{OCH}_3)$  für die Protonen der Methoxygruppe bei  $\delta = 4,01$  ppm und I(-CH-) für die Protonen des C1-Atoms der  $\beta$ -D-Galactose bei  $\delta = 5,74$  ppm.

**Tab. 3.2:** Mittels <sup>1</sup>H-NMR bestimmte absolute und auf die Protonenzahl normierte Integrale der Methoxygruppen  $I(-\text{OCH}_3)$ , das Integral der Referenzprotonen I(-CH-) = 1 und der daraus resultierende Methoxyanteil  $x_{\text{OMe}}$ .

#	$I(-OCH_3)$	$I(-OCH_3)/3$	$x_{\rm OMe}$
Ι	$0,\!12$	0,04	0,04
II	0,04	0,01	0,01
III	0,06	$0,\!02$	0,02
IV	0,59	0,20	0,20
V	0,61	0,20	0,20
VI	$0,\!67$	0,22	0,22

## 3.1.2.2 Einfluss der Agarosekonzentration und des Methoxyanteils auf Gel- und Solpunkt

Nachdem die chemischen Unterschiede der Agarosen in Form von Molekulargewicht und Methoxyanteil analysiert wurden, sollen im Folgenden ihr Einfluss auf die Phasenübergange von Agarose untersucht werden. Diese sind relevant für den Herstellungsprozess des Hydrogels und die Umgebungsbedingungen für dessen Anwendung als chromatographisches Medium. Zur Untersuchung dieser Eigenschaften wurden Gel- und Solpunkte von Agarosegelen und -solen UV/Vis spektrometrisch bestimmt. Nach vollständiger Lösung der Agarose in heißem Wasser entsteht ein klares Sol, welches beginnt, sich beim Abkühlen unter den Gelpunkt zu trüben. Diese Trübung wurde mittels Absorptionsmessungen bei  $\lambda = 400 \,\mathrm{nm}$  in Abhängigkeit der Temperatur detektiert und der Wendepunkt der Absorptionskurve als Gelpunkt im Abkühlvorgang und als Solpunkt im Aufheizvorgang definiert. Abbildungen 3.2 A und B zeigen Auftragungen des Gel- bzw. Solpunkts in Abhängigkeit der Agarosekonzentration  $c_{\text{Agarose}}$  für verschiedene Agarosesorten. Für den Gelpunkt ist eine Zunahme mit steigender Agarosekonzentration für alle Agarosen von 33-36 °C für 2 Gew.-% auf 36-39°C für 6 Gew.-% zu erkennen. Der Solpunkt hingegen verringert sich mit zunehmender Agarosekonzentration von 73-84 °C für 2 Gew.-% auf 70-80 °C für 6 Gew.-%, wobei aufgrund der vorliegenden Schwankungen und des Fehlerbereichs von  $\pm 2$  °C nicht immer eindeutig von einer Abnahme gesprochen werden kann. Folglich verringert sich die Hysterese zwischen beiden Punkten mit größerer Agarosekonzentration um ca. 15%.

Aus den Auftragungen fällt zudem eine Separation zwischen Agarosen des Typs *Gracilaria* und Agarosen des Typs *Gelidium* auf. Ein höherer Methoxy-Anteil von ca. 20% tritt bei *Gracilaria* Agarosen auf und führt scheinbar zu einem höheren Gel- und einem geringeren Solpunkt gegenüber *Gelidium* Agarosen, deren Agarobiose-Einheiten nur zu < 5% einfach methyliert vorliegen.



**Abb. 3.2:** Auftragung des photometrisch bestimmten Gel- (links) bzw. Solpunkts (rechts) sechs verschiedener Agarosen in Abhängigkeit der Agarosekonzentration. Schwarz sind *Gelidium*-Agarosen, rot sind *Gracilaria*-Agarosen.

Ein Vergleich mit Literaturdaten bestätigt eine Erhöhung des Gelpunkts mit steigender Agarosekonzentration.<sup>[183–185]</sup> Ein möglicher Grund hierfür ist eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von Agarosemolekülen in Lösung bei höheren Konzentrationen, welches den Geliervorgang unterhalb einer kritischen Temperatur auslöst. Eine Erniedrigung des Solpunkts mit zunehmender Agarosekonzentration kann hingegen nicht eindeutig erklärt werden. Es ist möglich, dass durch eine höhere Agarosekonzentration die Geliergeschwindigkeit zunimmt, weshalb es ggf. zu Defekten innerhalb der Doppelhelices und somit in der Netzwerkstruktur kommt, die eine Störung der Wasserstoffbrückenbildung verursachen. Dies würde zu verringerten intermolekularen Wechselwirkungen pro Agarosemolekül führen, wodurch dem System weniger Energie hinzugeführt werden müsste, um das dreidimensionale Netzwerk aufzubrechen und in den Solzustand zu überführen. In der Literatur wird im Gegensatz zu den hier generierten Daten keine Erniedrigung des Solpunkts mit zunehmender Agarosekonzentration beschrieben.<sup>[183]</sup> Diese Abweichung kann auf die gewählte Methode zurückzuführen sein, die hier auf Trübungseffekten beruht und nicht auf rheologischen Änderungen des Systems.

Eine verstärkte Methylierung der Agarose führt zu einem höheren Gelpunkt, der mit einer höheren Hydrophobizität des Moleküls begründet werden kann. Je hydrophober die Agarose desto früher setzt die Phasenseparation in wässrigen Medien ein. Der größere Methylierungsgrad führt außerdem vermehrt zu Fehlstellen in den Agarose-Doppelhelices, da die Ausbildung der Wasserstoffbrücken durch die Methoxy-Reste gestört ist und H-Brücken somit nicht im gleichen Maße und der gleichen Anordnung auftreten wie bei Agarosen mit geringem Methylierungsgrad. Dies führt zu einer schwächeren Interaktion der Moleküle und folglich zu geringerem Energieaufwand beim Gel-Sol-Übergang.

#### 3.1.2.3 Einfluss der Konzentration und des Molekulargewichts auf die mechanischen Eigenschaften von Agarosegelen und -solen

Die mechanische Stabilität eines chromatographischen Mediums ist notwendig für dessen Anwendung. Ebenso muss eine geeignete Prozessierbarkeit des Materials gegeben sein. Im Folgenden wird auf die mechanischen Eigenschaften von Agarosegelen und -solen verschiedener Agarosen und ihrer Abhängigkeit von Konzentration und Molekulargewicht eingegangen. Dafür wurden Viskositätsmessungen von Agarosesolen und Dynamisch-Mechanische-Analyse (DMA) an Agarosegelen durchgeführt. Genaueres ist in Abschnitt 5.1 beschrieben. Abbildung 3.3 zeigt den Verlauf der Viskosität von Agarosesolen verschiedener Agarosesorten und -konzentrationen sowohl bei 80 °C (A) als auch bei 60 °C (B). In allen Fällen ist eine exponentielle Zunahme der Viskosität mit der Konzentration zu beobachten. Zusätzlich finden sich unterschiedliche Verläufe für die verschiedenen Agarosen. Bei 80 °C ist ein maximaler Anstieg der Viskosität durch Agarose I auf 2065 mPa s bei 6 Gew.-% zu erkennen und ein minimaler Anstieg von Agarose VI auf 285 mPa s. Dieser Effekt tritt bei 60 °C verstärkt auf. Hierbei fällt auf, dass ein höheres Molekulargewicht der Agarose stets eine höhere Viskosität des zugehörigen Sols hervorruft ( $\overline{M}_w = 370 \text{ kg mol}^{-1}$ für Agarose I und  $\overline{M}_w = 220 \text{ kg mol}^{-1}$  für Agarose VI).



**Abb. 3.3:** Auftragung der mittels Spindelviskosimeter ermittelten Viskosität verschiedener Agarosesole in Abhängigkeit der Agarosekonzentration bei 80 °C (links) und 60 °C (rechts)).

Um weiterhin die mechanischen Eigenschaften von Agarosegelen zu untersuchen, wurde DMA durchgeführt. Die in einer Cantilever-Halterung eingespannten Agarosegele wurden dynamisch verbogen, wodurch Biegemodule B' bestimmt werden konnten, die in Abbildung 3.4 in Abhängigkeit der Agarosekonzentration zu sehen sind. Daraus geht hervor, dass eine steigende Agarosekonzentration mit einem erhöhten Biegemodul, also einer erhöhten Festigkeit des Materials, einhergeht. Es ist ein linearer Anstieg von B' mit  $c_{\text{Agarose}}$  von ca. 0,5 MPa für 2 Gew.-% auf 1,0-1,7 MPa für 6 Gew.-% festzustellen, wobei weder Agarosetyp noch Molekulargewicht von Relevanz zu sein scheint. Eine detaillierte Analyse dazu hat *Griesz* unter Anleitung der Autorin dieser Arbeit angefertigt.<sup>[174]</sup> 1 Gew.-%ige Gele konnten mit dieser Methode nicht vermessen werden, da ihre Festigkeit nicht ausgereicht hat, um sie im Probenhalter zu fixieren, was wiederum einen noch niedrigeren Biegemodul erwarten lässt. Über lineare Extrapolation lässt sich dieser auf ca. B' = 0,2 MPa abschätzen.



**Abb. 3.4:** Auftragung des mittels DMA ermittelten Biegemoduls B' verschiedener Agarosegele in Wasser in Abhängigkeit der Agarosekonzentration bei 20 °C,  $\nu = 1$  Hz.

Eine Zunahme der Viskosität des Agarosesols und der Festigkeit des Agarosegels mit steigender Agarosekonzentration wurde bereits in der Literatur festgestellt.<sup>[185]</sup> Auch die Auswirkung des Molekulargewichts auf die Viskosität der Sole und somit deren Verarbeitbarkeit spielt eine entscheidende Rolle.<sup>[84]</sup> Eine Zunahme der Viskosität mit steigender Agarosekonzentration kann damit erklärt werden, dass sich mehr Moleküle in Lösung befinden, die die Dichte des Sols erhöhen und untereinander Wechselwirkungen aufweisen. Das Molekulargewicht ist dabei entscheidend für die Reichweite der Wechselwirkungen. Je länger die Polymerkette ist, desto größer ist das Polymerknäul in Lösung. Dies bewirkt zum einen eine größere Diffusionszeit aufgrund des größeren hydrodynamischen Radius, zum anderen sind Verschlaufungen mit weiteren Agarosemolekülen wahrscheinlicher. Durch solche sterischen Interaktionen und der Größe der Knäul benötigt es mehr Energie, die Polymerknäul aneinander vorbeigleiten zu lassen. Im Bezug auf die mechanische Festigkeit der Agarosegele ist das Molekulargewicht in dem untersuchten Bereich nicht mehr von Relevanz, da durch Ausbildung des dreidimensionalen Netzwerks eine feste Porenstruktur entsteht, deren Gerüstgröße rein von der Polymerkonzentration abhängt. Wie von Normand et al. beschrieben, kann hier sowohl die absolute Masse im Hy-
drogel als auch die Filamentlänge und somit die Anzahl an Knotenpunkten entscheidend sein.<sup>[184]</sup> Da jedoch beides miteinander korrelliert, s. Abschnitt 3.1.3.1, ist es nicht möglich, diesen Effekt hier separat voneinander zu untersuchen. Es ist dennoch wahrscheinlich, dass eine gewisse Mindestkettenlänge benötigt wird, um bei niedrigen Agarosekonzentrationen (< 2 Gew.-%) eine Ausbildung des dreidimensionalen Netzwerks zu ermöglichen und dass in diesem Bereich die Festigkeit des Gels vom Molekulargewicht abhängt. Dies konnte in dieser Arbeit aufgrund der fehlenden Stabilität von 1 Gew.-%igen Gelen nicht weiter analysiert werden, wurde aber in der Literatur beschrieben.<sup>[184]</sup>

# 3.1.3 Strukturelle und diffusive Eigenschaften von Agarosehydrogelen

Nachdem die chemischen und mechanischen Eigenschaften von verschiedenen Agarosen im Bezug auf den Herstellungsprozess des Hydrogels und seiner Stabilität untersucht wurden, ist es notwendig, die resultierende Netzwerkstruktur im Agarosegel zu analysieren. Die Polymerstruktur und die Porengröße des Netzwerks einer chromatographischen Matrix sind entscheidend für das Diffusionsverhalten von monoklonalen Antikörpern im chromatographischen Prozess. Daher wurden im Folgenden Einflüsse auf die Porenstruktur und auf die Diffusion von IgG in dieser beleuchtet.

#### 3.1.3.1 Porenstruktur des Agarosenetzwerks

Im folgenden Abschnitt wurden Agarosegele verschiedener Agarosesorten und -konzentrationen mittels Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM) untersucht. Dafür wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einer Probenpräparationskammer gebrochen, das im Hydrogel befindliche Eis oberflächlich sublimiert und im Anschluss mit Platin besputtert. Die resultierenden REM-Aufnahmen wurden mithilfe eines Bildbearbeitungsprogramms ausgewertet. Eine detaillierte Beschreibung dazu befindet sich in Abschnitt 5.1. Kryo-REM Aufnahmen von Agarose I Hydrogelen sind in Abbildung 3.5 für zwei verschiedene Agarosekonzentrationen gezeigt, in denen man das dreidimensionale Polysaccha-rid-Netzwerk der Agarose im Hydrogel bei 10 000 x Vergrößerung erkennt. Vom 2 Gew.-%igen (links) zum 6 Gew.-%igen Gel (rechts) wird eine deutliche Abnahme der Porengröße ersichtlich. Bei genauerer Betrachtung der Kryo-REM Aufnahmen fällt auf, dass die Porengrößenverteilung im Bereich mehrerer Größenordnungen liegt. Anhand der Struktur des Polymernetzwerks lassen sich diese für einen einfacheren Vergleich in zwei Porenarten unterteilen.

#### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die im Folgenden genannten Supraporen befinden sich in der Größenordnung von mehreren Hundert Nanometern, die hier benannten Subporen in der Größenordnung 10-200 nm. Als Subporen wurden solche Poren definiert, die zusammen eine Suprapore bilden, s. Abbildung 3.7. In Abbildung 3.6 sind Häufigkeitsverteilungen der Supra- (unten) und Subporendurchmesser (oben) der beiden Kryo-REM Aufnahmen aus Abbildung 3.5 aufgeführt. Anhand dessen ist eine quantitative Einschätzung der mittleren Supra- bzw. Subporengröße des Agarosenetzwerks und der zugehörigen Porengrößenverteilung möglich. Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass die Breite der Supra- und Subporengrößen-Verteilung für 6 Gew.-% deutlich geringer ist als für 2 Gew.-%. Während die Supraporen für das 2 Gew.-%ige Netzwerk Werte von 200-1000 nm annehmen, ist die Porengrößenverteilung bei 6 Gew.-% deutlich schmaler (150-450 nm). Auch die mittlere Supraporengröße für Agarose I sinkt sichtbar von ca. 500 nm für 2 Gew.-% auf ca. 200 nm für 6 Gew.-%, s. Abbildung 3.8. Das gleiche Verhalten lässt sich auch für die Subporen beobachten. Während die Verteilung bei 2 Gew.-% eine Breite von 25-325 nm abdeckt, weist die Verteilung bei 6 Gew.-% eher einen Verlauf ähnlich einer Gaußfunktion im Bereich 25-125 nm auf, s. Abbildung 3.6. Die mittlere Subporengröße nimmt von 2 auf 6 Gew.-% von 110 nm auf 50 nm ab, s. Abbildung 3.9.



Abb. 3.5: Kryo-REM Aufnahmen von Hydrogelen der Agarose I mit 2 Gew.-% (links) und 6 Gew.-% (rechts) bei 10 000 x Vergrößerung. Die Bildaufnahmen fanden mit 2.3 kV mittels SE-Detektor statt.



Abb. 3.6: Relative Häufigkeitsverteilungen der Porendurchmesser von Agarose I Hydrogelen mit 2 Gew.-% (links) und 6 Gew.-% (rechts). Oben: Supraporendurchmesser. Unten: Subporendurchmesser.



Abb. 3.7: Bildliche Darstellung der Supra- und Subporen der Agarosehydrogele.

Im Folgenden wurden die mittleren Porendurchmesser aller Agarosehydrogele über Bildauswertung bestimmt und in Abbildung 3.8 und 3.9 in Abhängigkeit der Agarosekonzentration dargestellt. Da kein Einfluss der Agarosesorte festgestellt werden konnte, wurde hier zur besseren Ansicht nicht zwischen den Agarosen unterschieden. Sowohl für die Supra- als auch für die Subporen ist ein Abfall der Porengröße mit der Konzentration festzustellen. Es fällt auf, dass die Streuung der Werte bei 1 Gew.-% Agarose besonders hoch ist. Die Supraund Subporengrößenverteilungen aller Konzentrationen sind beispielhaft für Agarose I im Anhang 7.1 in Abbildung 7.1 und 7.2 zu finden.



**Abb. 3.8:** Auftragung des mittleren Supraporendurchmessers  $d_{supra}$  des Polymernetzwerks in Abhängigkeit der Agarosekonzentration für alle Agarosen. Die gestrichelte Linie ist ein exponentieller Fit und dient lediglich der Anschauung.



**Abb. 3.9:** Auftragung des mittleren Subporendurchmessers  $d_{sub}$  des Polymernetzwerks in Abhängigkeit der Agarosekonzentration für alle Agarosen. Die gestrichelte Linie ist ein exponentieller Fit und dient lediglich der Anschauung.

Die Ursache der Unterteilung der Agarosenetzwerk-Poren in Supra- und Subporen liegt nicht nur in ihrer Größenordnung. Bei genauerem Betrachten von Abbildung 3.7 fällt auf, dass das gebildete Netzwerk wabenartige Strukturen besitzt, wobei die Subporen die Außenhülle einer Suprapore bilden. In Abbildung 3.10 ist eine Skizze dieser Struktur abgebildet, die die Entstehung der Supraporen in den REM-Bildern verdeutlichen soll. Zu erkennen sind sogenannte "Bläschen" des Hydrogels, deren äußere Struktur aus Agarosefilamenten besteht und deren Innenleben mit Wasser gefüllt ist. Durch die Kryo-REM Probenvorbereitung werden die Bläschen des gefrorenen Gels entlang einer Kante aufgebrochen, wodurch die oben beschriebenen Supraporen nach Sublimation des vorhandenen Eises sichtbar werden. Der Ursprung dieser Struktur liegt höchstwahrscheinlich an der thermischen Vorgeschichte der Agarose beim Gelierprozess. Für die Herstellung dieser Gele wurde heißes Agarosesol in PESU-Formen gefüllt und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch die geringe Wärmeleitfähigkeit von Polyethersulfon (PESU) ist das Agarosesol vergleichsmäßig langsam abgekühlt und der Geliervorgang fand verzögert statt. Dadurch wurde nur allmählich in die Mischungslücke der Spinodalen von Agarose und Wasser eingedrungen, weshalb es teilweise schon zur Doppelhelix-Ausbildung der Polymermoleküle und Aggregierung dieser kam, während noch weitere Moleküle in Lösung vorlagen. Diese konnten aufgrund der Temperatur nahe des Gelierpunkts durch das allmählich entstehende Gel diffundieren und in bestimmten Bereichen stärker akkumulieren als in anderen, ähnlich eines Keimbildungsprozesses.



Abb. 3.10: Skizze der hypothetischen Agarosenetzwerkstruktur durch dessen Bruch in der Probenvorbereitung die Supraporen entstehen.

Die Abnahme des Porendurchmessers von sowohl Supra- als auch Subporen der Agarosegele hängt klar mit der Massenzunahme der Agarose im Gel zusammen. Je mehr Polymer im Gel vorhanden ist, desto mehr Agarosefilamente entstehen beim Gelierprozess. Eine Zunahme der Filamentdicke an sich ist ebenfalls denkbar, wurde jedoch in der Literatur mehrfach ausgeschlossen und konnte auch in diesem Experiment nicht signifikant nachgewiesen werden.<sup>[125,186]</sup> Durch ein gleichbleibendes Gelvolumen und trotzdem zunehmender Polymermasse müssen die Filamente nicht nur gehäuft sondern auch verkürzt auftreten, wodurch im dreidimensionalen Netzwerk kleinere Poren entstehen. Außerdem besitzt ein Agarosesol mit höherer Polymerkonzentration eine deutlich höhere Viskosität (s. Abschnitt 3.1.2.3), wodurch es zur Diffusionshemmung der Moleküle beim Geliervorgang kommt. Durch die verringerte Beweglichkeit tritt die Phasenseparation gleichmäßiger auf, sodass auch die Porengrößen eine schmalere Verteilung aufweisen.

Aufgrund dessen, dass keine Änderung der Netzwerkstruktur in Abhängigkeit des Methoxyanteils oder des Molekulargewichts ausgemacht werden konnte, wurde dieser Aspekt im Folgenden nicht weiter betrachtet.

#### 3.1.3.2 Diffusion von monoklonalen Antikörpern in Agarosegelen

Nach einer erfolgreichen Analyse der Struktur des resultierenden Polymernetzwerks im Hydrogel wird im folgenden Abschnitt auf die Diffusion von monoklonalen Antikörpern, im Speziellen IgG, in Agarosematrizes (Gele und Beads) verschiedener Konzentrationen eingegangen. Diese sind relevant für das Verhalten der Moleküle während der chromatographischen Aufreinigung. Für die Bestimmung von Diffusionskonstanten wurde Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) mithilfe eines Konfokalmikroskops betrieben. Dafür wurde IgG mit einem fluoreszenten Farbstoff (ATTO488) gelabelt und die Agarosegele bzw. -beads in einer IgG-ATTO488 haltigen wässrigen Lösung eingelegt. Genauere Informationen zum Vorgehen befinden sich in Abschnitt 5.1. Die Beads wurden als Referenzsystem zu den eigens hergestellten Hydrogelen (Agarose II) verwendet, da sie industriell gefertigt wurden und als solche für chromatographische Prozesse eingesetzt werden. Abbildung 3.11 zeigt eine Auftragung der mittels FCS bestimmten Diffusionskonstanten D von mit ATTO488 gelabeltem IgG in Agarosegelen und -beads gegen die Agarosekonzentration. Es ist ein exponentieller Abfall von D mit zunehmender Agarosekonzentration ersichtlich, wobei Gele und Beads sehr ähnliche bzw. in Betrachtnahme der Fehlerbalken gleiche Diffusivitäten aufweisen. Die Diffusionskonstante beträgt bei 1 Gew.-% Agarose  $D \approx 26 \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-1}$  und sinkt um fast 70% auf  $D \approx 8 \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-1}$  bei 10 Gew.-% Agarose. Als Vergleich wurde ein Diffusionsmodell nach Ogston gefittet, welches zuvor von Hagemann mit dem cubic grid model für Agarosenetzwerke angepasst wurde. Das empirische, im Folgenden genannte Ogston-Hagemann-Modell beschreibt die gehinderte Diffusion  $D_{\text{eff}}$  eines Proteins mit dem Stokes-Radius  $r_{\rm s}$  in porösen, vernetzten und Protein-gekoppelten Agarosenetzwerken mit dem Filamentradius  $r_{\rm f}$  in Relation zur Diffusionskonstante des Proteins in freier Lösung  $D_0$  anhand der Polymervolumenfraktion  $\phi$  und der Konstante C = 3,7379:<sup>[123]</sup>

$$\frac{D_{\rm eff}}{D_0} = \exp\left(-C\frac{r_{\rm s} + r_{\rm f}}{r_{\rm f}}\sqrt{\phi}\right). \tag{3.1}$$

 $\phi$ lässt sich über das cubic grid model mithilfe des Poren- und Filamentdurchmessers des Agarosenetzwerks berechnen, siehe Gleichung 2.12. Die hier verwendeten mittleren Porendurchmesser  $d_{\rm p}$  wurden zuvor aus Kryo-REM Experimenten ermittelt und  $\phi$  aus Gleichung 2.14 berechnet.  $d_{\rm f}$  wurde so gewählt, dass die resultierende Polymervolumenfraktion aus dem cubic grid model dem aus der Agarosekonzentration berechneten  $\phi$  entsprach. Es ergab sich  $d_{\rm f} = 10,5$  nm für 2-6 Gew.-% Agarose. Für den ermittelten Porendurchmesser von  $d_{\rm p} = 240$  nm für 1 Gew.-% Agarose resultierte ein Filamentdurchmesser von  $d_{\rm f} = 17$  nm. Da $d_{\rm f} = 10,5$  nm überwiegend übereinstimmende Werte für beide  $\phi$  ergab und im Vergleich zur Literatur ( $d_{\rm f} = 2r_{\rm f} = 3-10$  nm  $^{[125,186,187]}$ ) ein sinnvolles Ergebnis erzielte, wurde dieser Parameter auch für 1 Gew.-% Agarose verwendet, obwohl

die Abweichung zwischen beiden  $\phi$  hier bei über 50% liegt, s. Tabelle 3.3. Da für 10 Gew.-% Agarose kein Porendurchmesser bestimmt wurde, wurde hier für das Modell mit  $\phi_{c_{\text{Agarose}}} = 9,76\%$  und  $d_{\text{f}} = 10,5$  nm gearbeitet.

**Tab. 3.3:** Verwendete mittlere Porendurchmesser  $d_{\rm p}$  und daraus resultierende Volumenanteile  $\phi_{\rm CGM}$  nach  $Hagemann^{[124]}$  und  $\phi_{c_{\rm Agarose}}$  nach Gleichung 2.14 für verschiedene Agarosekonzentrationen in Gew.-% und  $d_{\rm f} = 10,5$  nm.

Gew%	$d_{ m p}/{ m nm}$	$\phi_{ m CGM}/\%$	$\phi_{c_{ m Agarose}}$ / %
1	240	0,40	$0,\!98$
2	102	$1,\!94$	$1,\!95$
4	68	$3,\!89$	$3,\!90$
6	53	$5,\!83$	$5,\!85$
10	-	-	9,76

Die Volumenanteile  $\phi_{\text{CGM}}$  resultierend aus den in Abschnitt 3.1.3.1 ermittelten Porendurchmessern bei der jeweiligen Agarosekonzentration und die hier verwendeten  $\phi_{c_{\text{Agarose}}}$  für das Ogston-Hagemann-Modell sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Weiterhin wurden C = 3,7379 nach Hagemann und  $d_{\text{s}} = 2r_{\text{s}} = 11,5$  nm für den hydrodynamischen Durchmesser von IgG<sup>[188]</sup> verwendet.  $D_0 = 42,6 \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-1}$ wurde über die Stokes-Einstein Gleichung als Diffusionskonstante von IgG bei  $T = 298 \,\text{K}$  mit  $\eta = 8,90 \cdot 10^{-4} \,\text{Pa} \,\text{s}^{[189]}$  in freier wässriger Lösung berechnet. Aus Abbildung 3.11 ist leicht zu erkennen, dass die experimentell ermittelten Daten nicht zum Ogston-Hagemann-Modell mit C = 3,7379 passen. Um die experimentellen Daten gut beschreiben zu können, wurde C über eine Regression neu gefittet. Der best-fit für  $D_{\text{eff}}/D_0$  gegen  $\phi_{c_{\text{Agarose}}}$  wurde mit C = 2,3761und  $R^2 = 0,90$  erreicht und stellt somit ein neues Modell für unmodifizierte Agarosegele und -beads dar.



Abb. 3.11: Auftragung der per FCS bei Raumtemperaturen ermittelten Diffusionskonstanten von mit ATTO488 gelabeltem IgG in Agarosegelen und -beads gegen die Agarosekonzentration. Die Linien zeigen das auf diese Daten angewandte *Ogston-Hagemann*-Modell mit C = 3,7379 und C = 2,3761.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die Subporen statt der Supraporen für die Diffusion von Molekülen in Agarosegelen entscheidend sind, wurden die in diesem Abschnitt ermittelten Diffusionskonstanten schließlich mit der via Kryo-REM bestimmten Subporengrößen für verschiedene Agarosekonzentrationen korreliert, s. Abbildung 3.12. Die Auftragung zeigt die auf  $D_0 = 42.6 \,\mu m^2 \, s^{-1}$ normierte Diffusionskonstante gegen den zugehörigen Subporendurchmesser des Agarosenetzwerks. Es ist ein hyperbolischer Anstieg zu beobachten. Diese Werte stimmen gut mit dem empirischen Modell nach *Cussler* überein, worin eine starre Kugel in einer flüssigkeitsgefüllten Pore diffundiert, s. Gleichung 2.10.<sup>[121]</sup> Lediglich bei sehr hohen Porendurchmessern (> 200 nm) weichen die experimentell ermittelten Werte von den Modellen ab und zeigen für IgG niedrigere Diffusionskonstanten als es theoretisch besitzen sollte.



Abb. 3.12: Auftragung der per FCS ermittelten normierten Diffusionskonstanten  $D/D_0$ bei Raumtemperatur von mit ATTO488 gelabeltem IgG in Agarosegelen gegen den mittels Kryo-REM bestimmten Subporendurchmesser  $d_{sub}$ . Die durchgezogene Kurve zeigt den modellierten Verlauf der Diffusivität einer starren Kugel in einer flüssigkeitsgefüllten Pore in Abhängigkeit der Porengröße nach *Cussler*.

Durch die oben gezeigten Ergebnisse geht hervor, dass mit zunehmender Agarosekonzentration in Agarosegelen eine Abnahme der Diffusionskonstante von IgG innerhalb des Polymernetzwerks erfolgt. Dies beruht auf dem kleiner werdenden Porendurchmesser des Netzwerks mit steigender Polymerkonzentration, wodurch das diffundierende Molekül sterisch immer mehr eingeschränkt wird und sich somit seine mittlere freie Weglänge verkürzt. Das auf native Agarose angepasste Ogston-Hagemann-Modell mit C = 2,3761 beschreibt den Verlauf der Diffusionskonstante mit zunehmender Agarosekonzentration mit Ausnahme der 1 Gew.-% igen Agarose sehr gut. Die Abweichung der Konstante Cvom ursprünglichen Modell nach Hagemann kann damit begründet werden, dass unterschiedliche Agarosenetzwerke betrachtet wurden. Das Agarosehydrogel von Hagemann lag vernetzt und mit Protein gekoppelt vor, was den Filamentradius signifikant vergrößert. Allein die Vernetzung resultiert laut Hagemann et al. in einer Gewichtszunahme der Filamente von 100%.<sup>[123]</sup> Zudem kann eine Vernetzung und Ligandenkopplung zu einer veränderten Struktur des Polymernetzwerks führen, welche durch eine reine Zunahme des Filamentdurchmessers

nicht berücksichtigt wird. Unabhängig davon konnte das Modell auf die hier untersuchten nativen Agarosegele angewandt werden. Das vereinfachte *Cussler*-Modell hingegen weist ohne weitere Anpassung eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten auf. Besonders die vorhergesagten Werte der normierten Diffusivität in Abhängigkeit der Porengröße zeigen, dass die Diffusion von IgG in Agarosegelen durch den Subporendurchmesser limitiert ist. Die in diesem Kapitel bestimmte Größenordnung der Supraporen liegt außerhalb des Bereichs der hier prognostizierten Porendurchmesser, die für eine entsprechende Abnahme der Diffusionskonstante im Vergleich zur freien Lösung nötig ist. Dies bestätigt die Annahme, dass die Supraporen im Gegensatz zu den Subporen einen sehr geringen Beitrag zur gehinderten Diffusion von Molekülen in Agarosegelen leisten.

### 3.1.4 Diskussion

Agarose ist ein Polysaccharid, welches selbstständig mit Wasser hochporöse dreidimensionale Netzwerke ausbildet und sich somit hervorragend für chromatographische Zwecke eignet. In diesem Kapitel wurden die Einflüsse von Agarosekonzentration und -sorte auf die physikalischen, mechanischen, strukturellen und diffusiven Eigenschaften von Agarosegelen bzw. -solen untersucht. Im ersten Teil wurden Gel- und Solpunkte in Abhängigkeit der Agarosekonzentration und des Agarosetyps bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Agarosen des Typs *Gracilaria* eine geringere Hysterese und somit einen höheren Gel- und einen niedrigeren Solpunkt als Agarosen des Typs *Gelidium* aufweisen, was vornehmlich an einem höheren Methylierungsgrad von ca. 20% liegt. Eine Zunahme der Polymerkonzentration verringert weiterhin die Hysterese für beide Typen. Aus den gewonnenen Daten konnte festgestellt werden, dass der Bereich der Zubzw. Abnahme der Gel-Sol- und Sol-Gel-Übergangstemperaturen keine große Relevanz für die Prozessierbarkeit des Materials darstellt, solange das Sol oberhalb des Gelpunktes verarbeitet wird.

Obwohl das Hydrogel im Vergleich zu anderen Materialien wie Silica und Polymethylmethacrylat (Elastizitätsmodul von mehreren GPa)<sup>[190,191]</sup> keine so hohe Festigkeit besitzt (0,5-1,7 MPa für 2-6 Gew.-%), reicht seine mechanische Stabilität aus, eine gute Handhabbarkeit zu gewähren und gewissen Prozessdrücken standhalten zu können. Im Vergleich zu Gelatine benötigen Agarosehydrogele nur wenige Gew.-% Agarose, um die gleiche Festigkeit bei 30 Gew.-% Gelatine zu erreichen.<sup>[186]</sup> Auch die Verarbeitbarkeit des Materials ist verhältnismäßig einfach, solange die Konzentration der Agarose nicht zu hoch gewählt wird, da die Viskosität des Sols exponentiell mit ihr steigt. Das Mole-

kulargewicht hat hier ebenfalls einen Einfluss, da längere Polymerketten eine verstärkte Wechselwirkung untereinander und somit eine erhöhte Viskosität des Sols hervorrufen. Außerdem muss die Temperatur des Sols im Prozess berücksichtigt werden, da auch hier eine Abhängigkeit zur Viskosität besteht. Ist eine hohe Agarosekonzentration dennoch gewünscht, so kann durch die Wahl einer Agarose mit niedrigerem Molekulargewicht und höheren Soltemperaturen ein Ausgleich zum Viskositätsanstieg durch zunehmender Polymerkonzentration geschaffen werden.

Für die Chromatographie sind die poröse Struktur der stationären Phase und das Diffusionsverhalten von Zielmolekülen in dieser von höchster Relevanz. Durch Kryo-REM Experimente konnte eine Abnahme der Porengröße und der Porengrößenverteilung der Hydrogele mit zunehmender Agarosekonzentration beobachtet werden und diese mit Diffusionskonstanten von monoklonalen Antikörpern in Agarosegelen mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie korreliert werden. Eine Abnahme der Porengröße führte zu einer Verringerung der Diffusivität des Zielmoleküls in Agarose-Matrizes. Hierbei ist entscheidend, die Diffusionslimitierung des Zielmoleküls im chromatographischen Medium zu kennen, um Prozesszeiten nicht unnötig zu verlängern und eine gute Trennleistung zu gewährleisten. Für die Anwendung von Agarose als diffusives chromatographisches Material konnte gezeigt werden, dass nur die kleineren Subporen für den Stofftransport entscheident sind, da sie die Diffusion von Zielmolekülen im chromatographischen Prozess kontrollieren. Es erscheint daher sinnvoll, die Agarosekonzentration nicht zu hoch zu wählen, um eine höhere Diffusivität des Zielmoleküls zu erreichen. Hagemann et al. zeigten, dass eine Agarosekonzentration > 4% zu einer verringerten Erreichbarkeit von IgG in Protein-gekoppelten Agarosebeads führt, was die hier gemachte Vermutung bestätigt.<sup>[123]</sup> Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass eine Abnahme der Polymerkonzentration mit einer verringerten Oberfläche der Agarosefilamente einhergeht. Außerhalb des Bereichs der Größenausschlusschromatographie werden als stationäre Phase häufig modifizierte Materialien eingesetzt, die bestimmte funktionelle Gruppen auf der Oberfläche tragen, um mit dem gewünschten Zielmolekül in Wechselwirkung zu treten. Je größer die innere Oberfläche der stationären Phase ist, desto höher kann auch die Ligandendichte bis zu einem gewissen Grad variiert werden, was widerum Einflüsse auf die chromatographischen Eigenschaften hat. Nach Hagemann et al. hat die spezifische Bindungskapazität von IgG pro Ligandendichte ein Maximum bei 4 Gew.-% Agarose, erreicht bei 2 Gew.-% aber immer noch 70% des Maximums.<sup>[123]</sup> Die Agarosekonzentration sollte daher nicht kleiner als 2 Gew.-% gewählt werden, da gegebenenfalls nicht genügend innere Oberfläche für das Anbringen von Liganden zur Verfügung steht.

## 3.2 Kapitel II - Herstellung einer geeigneten Membranstruktur

Teile dieses Kapitels, insbesondere die Daten zur Lösungsmittelabhängigkeit der Grenzstruktur und des Poren–Steggrößen-Verhältnisses, wurden von *Sara Drechsler* (Georg-August-Universität Göttingen) in Form einer Bachelorarbeit unter Anleitung der Autorin dieser Dissertation angefertigt.<sup>[192]</sup> Des Weiteren wurden diverse Inhalte dieses Kapitels zu einem Patent angemeldet.<sup>[1]</sup>

### 3.2.1 Vorwort

Im Bereich der Chromatographie spielt die Struktur der stationären Phase eine essenzielle Rolle für die allgemeine Leistung des chromatographischen Mediums. Hierbei steht seine Produktivität im Vordergrund, die als Bindungskapazität pro Zykluszeit definiert ist.<sup>[30]</sup> Membranadsorber haben sich aufgrund ihrer kurzen Zyklusdauern als eine gute Alternative zu Beads erwiesen, um hohe Produktivitäten zu erzielen.<sup>[3,30,32,45,48,49]</sup> Das Trennverfahren wird beschleunigt. da die diffusive Weglänge der stationären Phase eines Membranadsorbers im Gegensatz zu der von Beads drastisch verkürzt oder sogar gänzlich aufgehoben wird. Durch die Minimierung oder Abwesenheit einer diffusiven Porenstruktur können somit hohe Flussraten bei verhältnismäßig niedrigen Prozessdrücken erzielt werden, ohne die Bindungskapazität durch Änderung der Flussrate stark zu beeinträchtigen.<sup>[30,48,50]</sup> Ein wünschenswerter Membranadsorber muss folglich eine geeignete Struktur besitzen, die hohe Flussraten ermöglicht (hohe Permeabilität) und gleichzeitig eine annehmbare Bindungskapazität aufweist, um in hohen Produktivitäten zu resultieren. Dieses Ziel kann durch eine bikontinuierliche Membranstruktur erreicht werden, die sowohl diffusiven als auch konvektiven Stofftransport ermöglicht und deren diffusiver Anteil durch eine hochporöse stationäre Phase in den Stegen mit geringen Durchmessern gebildet wird.

In diesem Teil der Arbeit geht es um eine neuartige chromatographische Membran, die über einen Emulsionsprozess gebildet wird. Die diffusive stationäre Phase bildet das in Kapitel I untersuchte Polysaccharid Agarose. In diesem Kapitel wird vorrangig auf die konvektive Struktur (konvektive Porengrößen, Stegdurchmesser und spezifische Oberflächen) und die daraus resultierende Permeabilität der Membran eingegangen. Zudem wird analysiert, wie diese Eigenschaften durch den Herstellungsprozess variiert und kontrolliert werden können.

## 3.2.2 Emulsionsprozess als Grundlage für die Herstellung einer chromatographischen Membran

Die im Folgenden beschriebene chromatographische Membran besteht aus dem Polysaccharid Agarose in Form eines Hydrogels, welches über einen Emulsionsprozess seine Membranstruktur erhält. Ein ähnlicher Prozess wurde erstmalig von Larsson beschrieben.<sup>[66]</sup> Bei dem hier untersuchten Prozess, der an das Patent von Larsson angelehnt ist, handelt sich um eine Öl-in-Wasser (O/W) Emulsion, deren wässrige Phase aus einem Agarosesol besteht, welches die organische Phase umgibt, die aus einem organischen Lösungsmittel und mindestens einem Tensid zusammengesetzt ist. Die Emulsion wird bei Temperaturen oberhalb des Gelpunkts  $(T_{\rm g})$  der Agarose gerührt und auf eine temperierte Platte  $(T < T_g)$  gegossen, wodurch der Geliervorgang der Agarose induziert wird. Die wässrige Phase erstarrt und durch Spülen der Membran mit geeigneten Lösungsmitteln wird eine doppelporöse Membranstruktur erhalten, die aus einem Agarosegerüst besteht, s. Schema 3.1. Durch die organische Phase entstehen konvektive Poren mit Durchmessern in der Größenordnung einiger Mikrometer, die im chromatographsichen Prozess für den konvektiven Fluss durch die Membran sorgen. Die erstarrte Agarose bildet die Stege der Membran, die aufgrund des dreidimensionalen Polymernetzwerks diffusive Poren in der Größenordnung mehrerer Dutzend Nanometer aufweisen, analog zu den Agarosegelen aus Kapitel 3.1. Somit wird eine Membran erhalten, die sowohl konvektive als auch diffusive Eigenschaften besitzt. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Membranen wurden durch konfokale Lasermikroskopie (CLSM) untersucht, wofür sie zunächst mit einem fluoreszenten Farbstoff angefärbt wurden. Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Ablaufs ins in Abschnitt 5.2 gegeben. Abbildung 3.13 zeigt eine beispielhafte übergeordnete Membranstruktur, hergestellt durch einen Emulsionsprozess und aufgenommen mit einem Konfokalmikroskop. Die schwarzen Bereiche des Bildes stellen die konvektiven Poren dar, die grünen Bereiche die diffusiven Agarosestege. Die Poren des Agarosenetzwerks sind aufgrund der begrenzten Auflösung des Mikroskops nicht erkennbar.



Schema 3.1: Schematische Darstellung des Membranbildungsprozesses durch Herstellung einer Emulsion und anschließender Gelierung der Agarose in der wässrigen Phase.



Abb. 3.13: Konfokalmikroskop-Aufnahme einer Agarosemembran entstanden durch einen Emulsionsvorgang. Die konvektiven Poren der Membran sind hier in schwarz dargestellt, die diffusiven Agarosestege in grün.

Für die Emulsionen dieser Arbeit wurde 3 Gew.-%<br/>ige Agarose II in der wässrigen Phase verwendet. Das eingesetzte Tensid war ein Gemisch aus nicht-ionischem TWEEN® 80 und Span® 80 im volumetrischen Verhältnis $V_{\rm TWEEN^{\otimes} 80}/V_{\rm Span^{\otimes} 80} = 2,35$  und das organische Lösungsmittel je nach Experiment

*n*-Hexanol, *n*-Octanol, *n*-Nonanol, *n*-Decanol, *n*-Dodecanol, *n*-Octan oder *n*-Decan. Alle Emulsionen wurden - soweit technisch möglich - gleich behandelt, um lediglich Auswirkungen des zu variierenden Parameters zu beobachten.

## 3.2.3 Einfluss der Tensid–Lösungsmittel-Interaktion auf die übergeordnete Membranstruktur

#### 3.2.3.1 Einfluss der Tensidkonzentration

Um Verständnis für den Membranbildungsprozess zu generieren, wurde im Folgenden der Einfluss der Tensidkonzentration auf die Membranstruktur untersucht. Dafür wurde das volumetrische Tensid-Lösungsmittel-Verhältnis so variiert, dass die Lösungsmittelmenge mit 33 Vol.-% stets gleich blieb und nur die Tensidkonzentration geändert wurde. In Abbildung 3.14 a-d sind Konfokalmikroskopaufnahmen von vier Decanol-Membranen gezeigt, die durch Variation der Tensidmenge erhalten wurden. Diese weisen zum Teil stark unterschiedliche Strukturen auf, die hier als Schaum- und bikontinuierliche Strukturen beschrieben werden. Während Bilder a und b an eine Schwammstruktur erinnern, in der die eine Phase die zweite kontinuerlich durchläuft, ähnelt Bild d einem blasenartigen Gebilde, wobei die Poren die Blasen und die Agarose die umgebende Phase bilden. Bild c zeigt weder eine eindeutig bikontinuierliche noch eine eindeutig schaumartige Struktur. Mithilfe einer computergesteuerten 3D Analyse, s. Abschnitt 5.2, konnten die mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser, ihre Verteilungen und die Phasengrenzfläche zwischen erstarrter wässriger Agarosephase und konvektiven Poren (zuvor organische Phase) der Membran aus CLSM-Bilderstapeln berechnet werden. Die Phasengrenzfläche wird im Folgenden als spezifische Oberfläche bezeichnet. Die resultierenden mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser  $(d_{p})$ und  $d_{\rm s}$ ) und die spezifische Oberfläche  $A_{\rm sp}$  der Decanol-Membranen sind in Abbildung 3.15 gegen das volumetrische Tensid–Lösungsmittel-Verhältnis  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ der Emulsion aufgetragen. Hier ist zunächst ein linearer Abfall der Porenund Steggröße mit zunehmendem Tensidgehalt zu erkennen, dessen Verlauf ein Minimum bei  $V_{\rm T}/V_{\rm L} \approx 5\%$  und  $d_{\rm p} \approx 1.7 \,\mu{\rm m}$  und  $d_{\rm s} \approx 2.6 \,\mu{\rm m}$  erreicht. Im Anschluss steigen Poren- und Steggrößen linear mit der Tensidkonzentration. Die spezifische Oberfläche der Membranen zeigt ein konträres Verhalten zu Poren- und Stegdurchmessern. Bis zu  $V_{\rm T}/V_{\rm L} \approx 5\%$  nimmt sie stetig zu, bis sie ein Maximum von  $A_{\rm sp} \approx 0.32 \,\mu {\rm m}^2 \,{\rm m} {\rm L}^{-1}$  erreicht. Wenn  $V_{\rm T}/v_{\rm L} > 5\%$ , ist eine konstante Abnahme der spezifischen Oberfläche zu beobachten. Beim Vergleich mit Abbildung 3.14 fällt auf, dass bei  $V_{\rm T}/v_{\rm L} \approx 5\%$  ein Umschlagspunkt der

Strukturart erfolgt. Der Bereich  $V_{\rm T}/v_{\rm L} < 5\%$  resultiert in einer Schaumstruktur während bei  $V_{\rm T}/v_{\rm L} > 5\%$  bikontinuierliche Strukturen gebildet werden. Die Struktur der Membran an diesem Umschlagspunkt wird im Folgenden als Grenzstruktur bezeichnet, da keine eindeutige Zuordnung zu einer bikontinuierlichen oder schaumartigen Struktur erfolgen konnte. Hier befindet sich das Minimum der konvektiven Poren- und Steggröße und das Maximum der spezifischen Oberfläche.

Für die weitere Charakterisierung der Membranen wurde ihre Permeabilität bestimmt. Näheres dazu findet sich in Abschnitt 5.2. Abbildung 3.16 zeigt den Verlauf der Permeabilität P mit  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  für die Decanol-Membranen. Unterhalb von  $V_{\rm T}/v_{\rm L} \approx 5\%$  fällt die Permeabilität von  $P \approx 25 \,\mathrm{mD}$  bei  $V_{\rm T}/v_{\rm L} = 1\%$  mit zunehmendem  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  geringfügig ab, bis sie im Bereich der Grenzstruktur einen Wert von nahezu Null erreicht. Oberhalb der Grenzstruktur ist ein exponentieller Anstieg der Permeabilität von  $P < 10 \,\mathrm{mD}$  für  $V_{\rm T}/v_{\rm L} \approx 5\%$  auf  $P > 700 \,\mathrm{mD}$  für  $V_{\rm T}/v_{\rm L} \approx 15\%$  zu beobachten.



**Abb. 3.14:** Konfokalmikroskop-Aufnahmen mehrerer Agarosemembranen nach Emulgieren mit Decanol und verschiedenen volumetrischen Tensid-Lösungsmittel-Verhältnissen  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ . Die grünen Bereiche stellen die diffusiven Agarosestege dar.



Abb. 3.15: Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$  und der spezifischen Oberfläche  $A_{\rm sp}$  der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  in der Emulsion mit Decanol.



**Abb. 3.16:** Auftragung der experimentell bestimmten Permeabilität der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  in der Emulsion mit Decanol.

Das gegenteilige Verhalten von Poren-/Stegdurchmessern und spezifischer Oberfläche der übergeordneten Membranstruktur kann damit begründet werden, dass bei kleineren Poren bzw. Stegen bei sonst gleichen Volumenverhältnissen mehr Grenzfläche zwischen beiden Phasen entsteht. Ein Minimum in der Poren und Steggröße führt somit zu einem Maximum von  $A_{sp}$ .

Die Zunahme der Permeabilität mit  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  oberhalb der Grenzstruktur lässt sich mit dem steigenden Durchmesser der konvektiven Poren erklären. Nach *Hagen-Poiseuille* und *Darcy* ist die Permeabilität einer Membran mit zylinderartigen Poren proportional zum quadratischen Porendurchmesser:<sup>[124]</sup>

$$P = \frac{\epsilon \, d_{\rm p}^2}{32}.\tag{3.2}$$

 $\epsilon$  bezeichnet hierbei die Porosität der Membran. Wenngleich die Anzahl an Poren pro Bildausschnitt mit größer werdendem  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  abnimmt, geht  $d_{\rm p}$  quadratisch in die Permeabilität ein und überwiegt somit den gegenläufigen Effekt. Das Minimum von P im Bereich der Grenzstruktur kann damit begründet werden, dass auch die Porengröße hier ihr Minimum erreicht. Eine Schaumstruktur wie in Abbildung 3.14 a und b zu sehen sollte eigentlich zu einer Permeabilität von Null führen, da keine Kontinuität der Poren mehr vorliegt und somit kein konvektiver Fluss bestehen dürfte. Die trotzdem vorhandene geringe Durchlässigkeit der Membran liegt darin begründet, dass die Agarosematrix selbst porös ist und einen Stofftransport durch die Membran ermöglicht. Die geringe Zunahme von P mit abnehmendem  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  ist auf die größer werdenden sphärischen Poren zurückzuführen.

#### 3.2.3.2 Einfluss des Lösungsmittels

Nachdem verschiedene Membranstrukturen für unterschiedliche Tensidkonzentrationen bei Verwendung von Decanol erhalten wurden, soll im kommenden Abschnitt der Einfluss des organischen Lösungsmittels in der Emulsion auf die übergeordnete Membranstruktur untersucht werden. Hierfür wurden die n-Alkohole Hexanol, Octanol, Nonanol, Decanol und Dodecanol verwendet. Außerdem wurde der Einfluss der n-Alkane Octan und Decan im Bezug auf die resultierende Membranstruktur analysiert. Analog zu Abschnitt 3.2.3.1 wurde der Tensidanteil in der Emulsionslösung bei gleichbleibender Lösungsmittelmenge varriert, sodass sich  $V_T/V_L$  änderte. In allen Fällen wurden Konfokalmikroskopaufnahmen und 3D Strukturanalysen durchgeführt. Permeabilitäten wurden für ausgewählte Membranen bestimmt, um den in Abschnitt 3.2.3.1 beobachteten Effekt der Permeabilitätsabhängigkeit der Membran von der Tensidkonzentration im Emulsionsprozess zu bestätigen oder zu wiederlegen.

#### n-Alkohole

Abbildung 3.17 zeigt vier übergeordnete Strukturen von Membranen, die mittels Emulsion mit *n*-Octanol und verschiedenen Tensidkonzentrationen hergestellt wurden. Wie schon im vorherigen Abschnitt beobachtet, finden sich auch hier bikontinuierliche und schaumartige Membranstrukturen bei unterschiedlichen Tensid-Lösungsmittel-Verhältnissen. Ein Übergang von Schaum- zu bikontinuierlicher Struktur findet hier zwischen  $V_{\rm T}/V_{\rm L} = 5.0\%$  und 9.9% statt. Ein Vergleich mit Abbildung 3.18 bestätigt diese Beobachtung. Es ist ein deutlicher Abfall des mittleren Poren- und Stegdurchmessers von  $V_{\rm T}/V_{\rm L} = 0.5\%$  auf 7,6% zu erkennen, gefolgt von einem erneuten Anstieg von  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$ . Wie auch für Decanol in Abschnitt 3.2.3.1 beobachtet, verhält sich die spezifische Oberfläche konträr zur Poren- und Steggröße und findet ihr Maxiumum in der Grenzregion beider Strukturen. Außerdem wird in Abbildung 3.19 ersichtlich, dass auch die Permeabilität ab Erreichen der Grenzstruktur exponentiell zunimmt, wie bereits zuvor bei Decanol festgestellt. Das generelle Verhalten zwischen Membranstrukturen, die durch Decanol- und Octanol-Emulsionen erhalten wurden, scheint somit dem gleichen Trend zu folgen. Lediglich die absoluten Werte von  $d_{\rm p}, d_{\rm s}$  und P und die Lage der Grenzstruktur unterscheiden sich.

## 3 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3.17:** Konfokalmikroskop-Aufnahmen mehrerer Agarosemembranen nach Emulgieren mit Octanol und verschiedenen volumetrischen Tensid-Lösungsmittel-Verhältnissen  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ . Die grünen Bereiche stellen die diffusiven Agarosestege dar.



**Abb. 3.18:** Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$  und der spezifischen Oberfläche  $A_{\rm sp}$  der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  in der Emulsion mit Octanol.



**Abb. 3.19:** Auftragung der experimentell bestimmten Permeabilität der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  in der Emulsion mit Octanol.

Um eine eindeutigere Aussage über die Abhängigkeit von  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  der Grenzstruktur von verschiedenen Lösungsmitteln zu treffen wurden weiterhin Hexanol, Nonanol und Dodecanol auf gleiche Art und Weise wie zuvor Decanol und Octanol untersucht. Die Auftragungen der Poren- und Stegdurchmesser sowie der spezifischen Oberfläche sind im Anhang 7.2 in den Abbildungen 7.3-7.5 aufgeführt. Abbildung 3.20 zeigt eine Auftragung von  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  der Grenzregion zwischen Schaum- und bikontinuierlicher Struktur in Abhängigkeit der Kohlenstoffanzahl des verwendeten Lösungsmittels. Tabelle 3.4 zeigt die Resultate für  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  der Grenzstruktur, bestimmt durch Konfokalmikroskopie und 3D-Strukturanalyse, für die verschiedenen Lösungsmittel in der Emulsion. Die homologe Reihe der *n*-Alkohole zeigt eine lineare Abhängigkeit des  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  von der Kohlenstoffkettenlänge. Je kürzer das Lösungsmittelmolekül ist, desto größer muss  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  sein, um die Grenzregion zu erreichen. Auch eine Zunahme der mittleren Porengröße mit steigender Kohlenstoffanzahl kann beobachtet werden. Die Steggröße sowie die spezifische Oberfläche scheinen davon unberührt.



**Abb. 3.20:** Auftragung von  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  bei Erreichen der Grenzstruktur in Abhängigkeit des verwendeten organischen Lösungsmittels im Emulsionsprozess.

**Tab. 3.4:** Für die Grenzstruktur nötiges  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  und resultierende Poren- und Stegdurchmesser  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$  und spezifische Oberfläche  $A_{\rm sp}$  dieser. Die Fehlerangaben für  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$  geben die Standardabweichung der Verteilungsbreite wieder.

Lösungsmittel	$V_{\rm T}/V_{\rm L}$ / $\%$	$d_{\rm p}/\mu{ m m}$	$d_{ m s}/\mu{ m m}$	$A_{\rm sp}/{\rm m}^2{\rm m}{\rm L}^{-1}$
<i>n</i> -Dodecanol	3,0	1,9	$_{3,0}$	0,29
n-Decanol	5,0	1,7	$^{2,6}$	0,31
<i>n</i> -Nonanol	7,6	1,8	$_{3,0}$	$0,\!30$
<i>n</i> -Octanol	7,6	1,5	$^{2,7}$	$0,\!32$
n-Hexanol	15	$1,\!1$	$1,\!5$	$0,\!36$

#### n-Alkane

Eine scheinbare Abhängigkeit der Grenzstrukturlage von der Kettenlänge des verwendeten Alkohols führt zu der Frage, ob ein ähnlicher Verlauf für Alkane beobachtet werden kann. Für die untersuchten n-Alkane Octan und Decan ist ein derartiges Verhalten allerdings nicht sofort ersichtlich. Bei Betrachtung von Abbildung 3.21 fällt auf, dass die allgemeinen Membranstrukturen der n-Alkane im Vergleich zu den n-Alkoholen sehr inhomogen erscheinen, was eine qualitative Bildanalyse erschwerte. Die zugehörige 3D Strukturanalyse ermöglichte zwar eine Abschätzung über die Lage der Grenzregion, konnte aber keine großen Diskrepanzen zwischen beiden Alkanen hervorbringen, s. Abbildungen 3.22-3.23. Für beide Alkane wurde so eine Grenzregion schon bei  $V_{\rm T}/V_{\rm L} \approx 3\%$  festgestellt. Ein Vergleich des Permeabilitätsverlaufs mit  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  ergab keine gute Übereinstimmung mit den Daten der 3D Strukturanalyse bezüglich der Lage der Grenzstruktur. Ein signifikanter Anstieg von P erfolgte erst ab einem Tensid-Lösungsmittel-Verhältnis von > 5%, s. Abbildung 3.24. Hierbei ist der experimentelle Fehler der Permeabilität aufgrund der Inhomogenität der Membranstrukturen sehr groß, wodurch fraglich ist, ob in diesem Fall eine Bestimmung der Grenzregion durch Permeabilitätsmessungen erfolgen kann.

## 3 Ergebnisse und Diskussion



Abb. 3.21: Resultierende Membranstrukturen aus Decan- und Octan-Emulsionen bei $$V_{\rm T}/v_{\rm L}$=0,051$ und 0,030.



Abb. 3.22: Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$  und der spezifischen Oberfläche  $A_{\rm sp}$  der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  in der Emulsion mit Decan.



Abb. 3.23: Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$  und der spezifischen Oberfläche  $A_{\rm sp}$  der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  in der Emulsion mit Octan.



**Abb. 3.24:** Auftragung der experimentell bestimmten Permeabilität der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  in Emulsionen mit Decan und Octan.

#### 3.2.3.3 Hydrophilie, Mizellenbildungskonzentration und Grenzflächenspannung

#### Hydrophilie des Lösungsmittels

Nachdem festgestellt wurde, dass verschiedene Lösungsmittel unterschiedliche Lagen der Grenzregion zwischen Schaum- und bikontinuierlicher Struktur aufweisen, konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass die Hydrophilie des verwendeten Lösungsmittels einen Einfluss auf die Struktur der Membran haben könnte. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Verteilung des Tensids in der organischen Phase zu untersuchen, wurden Modell-Emulsionen mit *n*-Hexanol, *n*-Octanol oder *n*-Decanol und TWEEN<sup>®</sup> 80 in der organischen Phase und reinem Wasser als wässrige Phase bei Raumtemperatur hergestellt. In allen drei Fällen betrug  $V_{\rm T}/v_{\rm L} = 9.9\%$ . Die organische Phase wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie auf ihren Tensidgehalt hin untersucht, Näheres dazu befindet sich in Abschnitt 5.2. Die Phasen wurden durch Zentrifugation voneinander separiert und die Extinktionen *E* der charakteristischen Wellenlängen von TWEEN<sup>®</sup> 80 bei 234 nm und 296 nm der organischen Phasen photometrisch bestimmt. Mithilfe von Kalibriergeraden wurde der Tensidgehalt  $c_{\rm TWEEN^{@} 80}$  in der orga-

nischen Phase berechnet. In Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse dieses Experiments aufgeführt. Abbildung 3.25 zeigt den daraus bestimmten Mittelwert der Konzentration an TWEEN<sup>®</sup> 80 in der organischen Phase der Modell-Emulsionen für die drei verschiedenen Lösungsmittel. Während für Hexanol der Tensidgehalt in der organischen Phase mit 8,1% am höchsten liegt, nimmt dieser in Lösungsmitteln mit abnehmender Molekülgröße bis auf 1,3% für Decanol nahezu linear ab.

**Tab. 3.5:** UV/Vis-spektroskopische Ergebnisse der mittels Zentrifugation aufgetrennten Emulsionen.  $E_{234}$  und  $E_{269}$  sind die gemessenen Extinktionen der organischen Phase bei 234 nm und 269 nm und  $c_{234}$  und  $c_{269}$  die daraus resultierenden Konzentrationen von TWEEN<sup>®</sup> 80 in der abgetrennten organischen Phase der jeweiligen Emulsion.  $a = c/c_{\lambda}$  ist die Verdünnung der Phase, wobei c die Konzentration der gemessenen Lösung und  $c_{\lambda}$  die Ausgangskonzentration der organischen Phase ist.  $t_{sep}$  gibt die Zeit bis zur Auftrennung beider Phasen wieder.

Lösungsmittel	$E_{234}$	$E_{269}$	a	$c_{234} / \text{Gew}\%$	$c_{269} / \text{Gew}\%$	$t_{ m sep}$ /min
n-Decanol	0,336	0,021	0,010	$1,\!17$	1,5	> 150
n-Octanol	1,04	$0,\!053$	0,010	$3,\!60$	$3,\!8$	120
<i>n</i> -Hexanol	1,83	0,093	0,008	7,97	8,3	60



**Abb. 3.25:** Auftragung der photometrisch ermittelten mittleren Tensidkonzentration  $c_{\text{TWEEN}^{\otimes} 80}$  in der organischen Phase der Modell-Emulsionen gegen die Kohlenstoffanzahl des Lösungmittels. Der Mittelwert wurde aus  $c_{234}$  und  $c_{269}$  berechnet.

Graphik 3.25 verdeutlicht, dass die Lösungsmittel unterschiedliche Verteilungskoeffizienten von TWEEN<sup>®</sup> 80 in der organischen Phase bei ansonsten gleicher Tensidkonzentration in der Emulsion aufweisen. Daher und aufgrund der in Abschnitt 3.2.3.2 gemachten Beobachtung für die Abhängigkeit von  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  von der Molekülgröße der *n*-Alkohole kann die Vermutung bestärkt werden, dass es sich hierbei um einen Effekt der Hydrophilie des Lösungsmittels handelt. Da sich mit zunehmender Kettenlänge des Alkohols die Polarität und somit die Hydrophilie des Lösungsmittels verringert, kann angenommen werden, dass die Abnahme von  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  der Grenzstruktur mit der Löslichkeit des hydrophilen TWEEN<sup>®</sup> 80 in den verschiedenen Lösungsmitteln korreliert. Abbildung 3.26 zeigt die für die verschiedenen Lösungsmittel ermittelten  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$ der Grenzstrukturen in Abhängigkeit ihrer Löslichkeit in Wasser  $\chi$  bei 70 °C (Emulgiertemperatur) als Maß der Hydrophilie. Wie erwartet ist ein Anstieg von  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  mit  $\chi$  zu erkennen. Auch *n*-Octan fügt sich dem Trend der Alkohole. *n*-Decan ( $V_{\rm T}/V_{\rm L} = 3\%$ ) konnte aufgrund der logarithmischen Auftragung nicht gezeigt werden, da  $\chi_{\text{Decan}} = 0$ , was wiederum mit dem Verlauf von  $\chi$  übereinstimmen würde. Schließlich resultierte eine Mischung aus Hexanol und Octanol

 $(V_{\text{Hex}}/v_{\text{Oct}} = 1:1)$  auch in einem Mittelwert von  $V_{\text{T}}/v_{\text{L}}$  beider Lösungsmittel und fügt sich bei Annahme einer mittleren Löslichkeit ebenfalls in den Trend.



**Abb. 3.26:** Auftragung von  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  der Grenzstruktur in Abhängigkeit der Löslichkeit  $\chi$  des verwendeten organischen Lösungsmittels in Wasser bei 70 °C als Maß der Hydrophilie.<sup>[193–197]</sup>

#### Grenzflächenspannung

Um die zuvor erstellte Hypothese des Einfluss der Hydrophilie des Lösungsmittels zu bestätigen, wurden in weiteren Untersuchungen Grenzflächenspannungen  $\sigma$  zwischen organischer und wässriger Phase von Emulsionen ermittelt. Hierfür wurde mithilfe eines Goniometers nach der *pendant drop*-Methode die Krümmung eines Wassertropfens in einer umgebenden organischen Phase bildlich bestimmt. Als Modell-System funigerte Reinstwasser als wässrige Phase und *n*-Hexanol, *n*-Octanol und *n*-Decanol mit einem Zusatz an TWEEN<sup>®</sup> 80 als organische Phase. Die Tensidkonzentration der organischen Phase wurde im Verlauf des Versuchs variiert. Bereits geringfügige Mengen an Tensid führten zu einer starken Abnahme von  $\sigma$  auf nahezu Null im Vergleich zum reinen organischen Lösungsmittel. Durch weitere Zugabe an Tensid konnte keine quantitative Diskrepanz der Grenzflächenspannung außerhalb des Fehlerbereichs beobachtet werden. Jedoch wurde eine qualitative Änderung der Wassertropfenform ab einer bestimmten Menge Tensid festgestellt. Hier bildete sich statt eines hängenden birnenförmigen Tropfens ein langgezogener Tropfen, der nahe der Dispersionsnadel keine Krümmung mehr aufwies. Dieses Verhalten wurde für alle drei Lösungsmittel festgestellt, jedoch bei unterschiedlichen Tensidkonzentrationen. In Abbildung 3.27 ist das Tensid–Lösungsmittel-Verhältnis  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  in der organischen Phase, das zum Erreichen dieser Grenze benötigt wird, gegen die Kohlenstoffkettenlänge des verwendeten n-Alkohols aufgetragen. Es ist ein starker Abfall von  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  mit zunehmender Molekülgröße des Alkohols zu beobachten. Dieses  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  gibt die nötige Tensidkonzentration an, um die Krümmung des Wassertropfens und somit auch die Grenzflächenspannung zwischen beiden Phasen auf nahezu Null zu bringen. Weiterhin wurde das für eine Membran-Grenzstruktur verantwortliche  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  der organischen Phase einer Emulsion, wie in Abschnitt 3.2.3.2 bestimmt, aufgetragen. Es fällt auf, dass beide Verläufe sich stark ähneln und beide Kurven nahezu identische Werte für  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  für *n*-Hexanol und *n*-Octanol aufweisen. Lediglich bei *n*-Decanol tritt ein Unterschied für beide  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  auf, was jedoch keinen Einfluss auf den generellen Trend des Verlaufs hat.



Abb. 3.27: Auftragung des nötigen  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  an TWEEN<sup>®</sup> 80 in der organischen Phase, um  $\sigma = 0$  zu erreichen, in Abhängigkeit des verwendeten organischen Lösungsmittels. In schwarz sind die Vergleichswerte für die Grenzregion der Membranstrukturen im Emulsionsprozess angegeben.

Anhand dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass die Menge an Tensid, die die Grenzflächenspannung zwischen beiden Phasen auf Null herabsetzt, mit der Menge an Tensid korreliert, die zum Erreichen der Grenzstruktur der Membran vonnöten ist. Die geringfügige Abweichung der Werte voneinander kann mit dem Unterschied der verwendeten wässrigen Phasen begründet werden. Dies bekräftigt weiterhin die Vermutung, dass die Hydrophilie des organischen Lösungsmittels einen Einfluss auf die Lage der Grenzstruktur aufweist, wie im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

#### 3.2.3.4 Diskussion

Die oben beschriebenen Experimente lieferten einige Einblicke in die Tensid-Lösungsmittel-Interaktionen der Emulsion in Bezug auf die übergeordnete Membranstruktur. Im ersten Teil wurde gezeigt, dass je nach verwendeter Tensidmenge in der Emulsion unterschiedliche Strukturen der Membran entstehen. Die sogenannte Schaumstruktur ähnelt starkt einem Standbild einer normalen Emulsion: Tröpfchen der einen Phase sind in der anderen Phase dispergiert. Hierbei handelt es sich um Öl-Tröpfchen, die in der wässrigen Agaroselösung verteilt vorliegen. Da mehr Tensid eine größere Grenzfläche zwischen beiden Phasen besetzen kann, führt eine Zunahme der Tensidkonzentration zu kleineren Tröpfchen in der Emulsion, was folglich in kleineren Poren in der Schaumstruktur resultiert.

Die Entstehung der bikontinuierlichen Membranstruktur ist deutlich komplexer. In Grenzflächenspannungs-Experimenten konnte gezeigt werden, dass ab einer bestimmten Tensidkonzentration die Grenzflächenspannung zwischen der organischen und wässrigen Phase auf nahezu Null fällt, sodass eine Krümmung der Grenzfläche zwischen beiden Phasen teilweise nicht mehr vorhanden ist und sich keine vollständigen Tröpfchen mehr ausbilden. Dies beruht auf der starken Abnahme des Laplace Drucks der Phasengrenze und resultiert zu einem gewissen Grad in zwei kontinuierlichen koexistierenden Phasen. Es muss folglich zum Überschuss an Tensid kommen, damit eine bikontinuerliche Membranstruktur entsteht. Ein solcher Überschuss kann sich nicht mehr ausschließlich an der Phasengrenze befinden, da es eine minimale Tröpfchengröße gibt, die von der Geometrie des Tensids vorgegeben wird und eine maximale Krümmung des Tröpfchens verursacht. Es ist anzunehmen, dass eine dritte sogenannte Tensidphase entsteht, die sich nahe der Grenzfläche aufhält, wie auch schon von Larsson vermutet.<sup>[66]</sup> Da sowohl Agarose als auch TWEEN<sup>®</sup> 80 Polymere sind, ist es wahrscheinlich, dass sich diese Tensidphase nahe der Grenzfläche zu den Öl-Tröpfchen befindet, um sich von der Agarosephase abzusondern, da der starke enthalpische Beitrag bei Entmischung von Polymeren trotz Entropieverlusten zu einem Energiegewinn des Systems führt. Je mehr Tensid dem System zugeführt wird, desto größer wird diese Phase, die gemeinsam mit der organischen Phase nach dem Gelierprozess der Agarose herausgespült wird, sodass kanalartige Poren zurückbleiben. Denkbar ist auch, dass durch einen Tensidüberschuss die Interaktion zwischen den Emulsionströpfchen zunehmen. Die sogenannte *depletion interaction* beschreibt die induzierte Wechselwirkung zwischen Kolloiden in einer Lösung durch den Entropiegewinn von freiem Polymer in der umgebenden Phase. Im Bezug auf die Emulsion würden die Öl-Tröpfchen die Kolloide darstellen und das freie Polymer die Agarose in der umgebenden wässrigen Phase. Ab einer bestimmten Tensidkonzentration wird die kritische Mizellenkonzentration des Tensids in der wässrigen Phase erreicht, wodurch Mizellen gebildet werden. Diese sorgen für einen Anstieg der depletion interaction, wie bereits für Emulsionen beobachtet wurde.<sup>[143,144]</sup> Durch die Zusammenlagerung der Kolloide erfolgt zwar eine Entropieabnahme dieser, jedoch steigt die Entropie des gesamten Systems aufgrund des starken Entropieanstiegs der frei beweglichen Polymermoleküle und der Mizellen. Je mehr Mizellen sich also in der wässrigen Phase befinden, desto stärker sind auch die Wechselwirkungen zwischen den Öl-Tröpfchen, sodass größere Aggregate dieser entstehen würden und dies zu einem Anstieg der konvektiven Porengröße führen würde.

Der Übergang von Schaumstruktur zur bikontinuierlichen Struktur der Membran durch einen Anstieg der Tensidkonzentration kann also damit begründet werden, dass zum einen der Laplace Druck zwischen beiden Phasen so gering wird, dass lokal zwei koexistente kontinuierliche Phasen entstehen können und dass zum anderen ein Tensidüberschuss eine dritte Phase aus Tensid hervorruft, in der die Öl-Tröpfchen aggregiert vorliegen.

Schließlich scheint die Art des verwendeten organischen Lösungsmittels von großer Bedeutung für die Lage dieses Übergangs zu spielen. Es konnte herausgefunden werden, dass in dem hier betrachteten Rahmen die Hydrophilie des Lösungsmittels ausschlaggebend für die Lage der Grenzstruktur zu sein scheint. Eine stärkere Hydrophilie des Lösungsmittels resultiert in einer höheren Löslichkeit des TWEEN<sup>®</sup> 80 in diesem, was dazu führt, dass zunächst weniger Tensid für die Phasengrenze zur Verfügung steht. Je hydrophiler das Lösungsmittel ist, desto mehr TWEEN<sup>®</sup> 80 muss dem System zugesetzt werden, damit es zu einem Tensidüberschuss und einer bikontinuierlichen Struktur der Membran kommt.

Abschließend muss erwähnt werden, dass nicht nur thermodynamische sondern besonders kinetische Effekte bei Emulsionen eine große Rolle spielen. Ein lokaler Konzentrationsgradient der verschiedenen Komponenten der Emulsion kann Änderungen der Grenzflächenspannung hervorrufen, die die Krümmung der Phasengrenze und somit auch die Struktur der finalen Membran beeinflussen können. Ebenso kann dadurch eine Änderung der Wechselwirkung der Tenside zwischen den Emulsionströpfchen bewirkt werden, die die Flokkulation der Tröpfchen hervorruft. Zudem kann es zwischen dem Emulgieren und dem Gelieren der Agarose bereits zur kurzzeitigen Alterung der Emulsion (Koaleszenz, Ostwald-Reifung, etc.) gekommen sein. Obwohl versucht wurde, den Zeitabstand zwischen diesen beiden Punkten möglichst gering zu halten, kam es hin und wieder zu geringfügigen Verzögerungen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies zu leicht unterschiedlichen Membranstrukturen führt, die wohlmöglich mit der Tröpfchengröße und ihrer Verteilung zusammenhängt. Generell wurde der Effekt der Emulsionsalterung in dieser Arbeit nicht näher betrachtet.

## 3.2.4 Einfluss der Lösungsmittelmenge auf die übergeordnete Membranstruktur

Nachdem der Einfluss der Tensidmenge und des gewählten organischen Lösungsmittels in der Emulsion auf die finale Membranstruktur eindringlich untersucht wurde, wird im Folgenden der Effekt der Lösungsmittelmenge auf die übergeordnete Membranstruktur diskutiert. Es stellt sich die Frage, inwiefern sich die Struktur der Membran verändert, wenn das Tensid–Lösungsmittel-Verhältnis konstant gelassen wird, jedoch die allgemeine Menge an organischer Phase varriiert wird. Dafür wurden Agarose-Emulsionen mit verschiedenen Alkoholen und Alkanen hergestellt und dabei deren Konzentration von 20 Vol.-% bis 50 Vol.-% variiert. Für jedes Lösungsmittel wurde ein  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  gewählt, welches der doppelten Tensidmenge zum Erreichen der jeweiligen Grenzstruktur entspricht ( $^{2V_{\rm T}}/v_{\rm L}$ ), s. Tabelle 3.6. Dieses wurde für jedes Lösungsmittel konstant gelassen, um stets bikontinuierliche Strukturen zu erhalten.

Lösungsmittel	$V_{\rm T}/V_{\rm L}$ /%	$2V_{\mathrm{T}}/V_{\mathrm{L}}/\%$
<i>n</i> -Dodecanol	3,0	$6,\!0$
n-Decanol	$^{5,5}$	11
n-Octanol	7,6	15
<i>n</i> -Decan	3,0	6,0
<i>n</i> -Octan	3,5	$^{7,0}$

**Tab. 3.6:** Die hier verwendeten Lösungsmittel und ihre  $V_{\rm T}/V_{\rm L}$  im Grenzbereich.  ${}^{2V_{\rm T}}/V_{\rm L}$  entspricht der doppelten Tensidkonzentration nach Erreichen der Grenzstruktur.

In Abbildung 3.28 sind die mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser von verschiedenen Decanol-Membranen gegen die verwendete volumetrische Konzentration der organischen Phase (Lösungsmittel und Tensid)  $c_{\rm org}$  in der Emulsion aufgetragen. Zu erkennen ist eine Abnahme von  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$ mit zunehmendem  $c_{\rm org}$ , wobei der Verlauf des Porendurchmessers deutlich schwächer abfällt (2,6 µm auf 2,1 µm) als der des Stegdurchmessers (5,8 µm auf 2,0 µm). Die Diskrepanz zwischen beiden Parametern lässt sich über das Poren–Steggrößen-Verhältnis P/S ausdrücken:

$$P/S = \frac{d_{\rm p}}{d_{\rm s}}.\tag{3.3}$$

Dieses ist ebenfalls in Abbildung 3.28 aufgetragen und zeigt eine stetige Zunahme mit  $c_{\rm org}$ . Während bei  $c_{\rm org} = 20$  Vol.-% eine konvektive Pore eine Dicke von rund 40% eines Steges aufweist, nähern sich die Durchmesser der Poren und Stege immer mehr an, bis sie bei  $c_{\rm org} > 50$  Vol.-% identisch sind.


Abb. 3.28: Auftragung der mittleren konvektiven Poren-  $(d_p)$  bzw. Stegdurchmesser  $(d_s)$  von Decanol-Membranen in Abhängigkeit der Menge an organischer Phase  $c_{\text{org}}$  bei  $V_{\text{T}}/V_{\text{L}} = 11\%$ . Auf der rechten Achse ist das zugehörige Poren–Steggrößen-Verhältnis P/S aufgetragen.

Die gleichen Experimente wurden auch für Dodecanol, Octanol, Decan und Octan durchgeführt. Die Resultate des P/S sind in Abbildung 3.30 abgebildet. Es fällt auf, dass alle Lösungsmittel die gleichen Werte für P/S bei gleichem volumetrischen Anteil der organischen Phase  $c_{\rm org}$  aufweisen, unabhängig ob Alkan oder Alkohol. Das Verhältnis von konvektiven Poren- zu Stegdurchmesser steigt von 0,4 für 20 Vol.-% auf 1,0 für 50 Vol.-% und weiter bis auf 1,2 für  $c_{\rm org} = 55$  Vol.-%. Aus der gleichen Abbildung sind zwei modellierte Verläufe von P/S mit  $c_{\rm org}$  zu vernehmen. Hintergrund ist das *cubic grid model* von Hagemann et al.<sup>[124]</sup>, welches die geometrischen Eigenschaften von porösen Netzwerkstrukturen anhand kubischer Poren und zylindrischen Filamenten beschreibt. Die zugrunde liegende Gleichung lautet wie folgt:

$$V_{\rm s} = N_{\rm cyl} \left(\frac{\pi}{4} d_{\rm s}^2 d_{\rm p} + \frac{1}{3} d_{\rm s}^3\right) = (1 - \epsilon_{\rm p}) V_{\rm M}.$$
 (3.4)

Hierbei ist  $N_{\rm cyl}$  die Anzahl an Zylindern, die in diesem Fall die Stege der Membran bilden,  $V_{\rm s}$  das Volumen der Stege,  $\epsilon_{\rm p}$  die konvektive Porosität des Netzwerks und  $V_{\rm M}$  das betrachtete Membranvolumen. Durch Einsetzen von

 $N_{\rm cyl}$  und Umstellen dieser Gleichung können durch ein iteratives Verfahren die Nullstellen von Gleichung 3.6 bestimmt werden. Dadurch ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen  $d_{\rm p}$  und  $d_{\rm s}$  in Abhängigkeit von  $\epsilon_{\rm p}$ , dessen Proportionalitätsfaktor das Poren–Steggrößen-Verhältnis ist, s. Abbildung 3.29. Die unterschiedlichen Steigungen der Geraden wurden durch verschiedene konvektive Porositäten  $\epsilon_{\rm p}$  erhalten. Je höher  $\epsilon_{\rm p}$  desto größer auch P/S, siehe Tabelle 3.7. Aufgrund der Annahme, dass die Porosität der Membranen über den volumetrischen Anteil der organischen Phase  $c_{\rm org}$  beschrieben werden kann, wurden die aus dem Modell erhaltenen P/S in Abbildung 3.30 aufgetragen (3D Modell). Der Verlauf von Modell und experimentellen Daten zeigt den gleichen Trend, jedoch mit einem Versatz in *y*-Richtung zueinander. Daher wurde die konvektive Porosität im Modell um jeweils 8,8% erhöht ( $\epsilon'_{\rm p} = \epsilon_{\rm p} + 0,088$ ), sodass experimentelle und modellierte Daten gut miteinander übereinstimmen ( $R^2 = 0.91$ ).

$$N_{\rm cyl} = \frac{3V_{\rm M}}{(d_{\rm p} + d_{\rm s})^3}$$
(3.5)

$$0 = \frac{\frac{3\pi}{4}d_{\rm s}^2d_{\rm p} + d_{\rm s}^3}{\left(d_{\rm p} + d_{\rm s}\right)^3} - (1 - \epsilon_{\rm p})$$
(3.6)



**Abb. 3.29:**  $d_p$  gegen  $d_s$  in Abhängigkeit der Porosität  $\epsilon_p$  für das *cubic grid model*<sup>[124]</sup> nach *Hagemann*.



Abb. 3.30: Auftragung des Poren–Steggrößen-Verhältnisses (P/S) von verschiedenen Membranen in Abhängigkeit der Menge an organischer Phase  $c_{\text{org}}$  inklusive modellierter Daten nach *Hagemann* mit und ohne Korrektur.

	$\mathrm{CGM}^{[124]}$	CGM r	nit Korrektur
$\epsilon_{\rm p}$	P/S	$\epsilon_{ m p}^{\prime}$	P/S
0,23	0,31	0,32	0,44
0,28	$0,\!38$	$0,\!37$	0,52
0,36	$0,\!51$	$0,\!45$	$0,\!67$
0,42	$0,\!64$	$0,\!52$	0,80
$0,\!53$	$0,\!86$	$0,\!62$	1,11

**Tab. 3.7:** Aus dem *cubic grid model* (CGM) bestimmte Poren–Steggrößen-Verhältnisse P/S für verschiedene Porositäten  $\epsilon_{\rm p}$  ohne und mit Korrektur  $\epsilon'_{\rm p} = \epsilon_{\rm p} + 0.088$ .

Ein Vergleich der modellierten und experimentellen Daten für P/S zeigt, dass konvektive Poren- und Stegdurchmesser über die Geometrie des Systems linear miteinander verknüpft sind. Diese Abhängigkeit zueinander (P/S) kann nur über die Porosität des Systems gesteuert werden. Die konvektive Porosität  $\epsilon_p$  der Membran beschreibt den volumentrischen Anteil an Poren  $V_p$  im betrachteten Membranvolumen  $V_{\rm M}$  und ist somit mit der Menge an organischer Phase in der Emulsion gleichzusetzen:

$$\epsilon_{\rm p} = \frac{V_{\rm p}}{V_{\rm M}} \stackrel{\circ}{=} c_{\rm org}. \tag{3.7}$$

Der Ursprung der Abweichung von  $\epsilon_{\rm p}$  zwischen Modell und Experiment liegt vermutlich in der vereinfachten geometrischen Annahme eines kubischen Gitters. Bei Betrachten der Membranstrukturen in diesem Kapitel ist ersichtlich, dass die konvektiven Poren der Membranen keine kubische Struktur besitzen. Es liegt also nahe, dass die Korrelation zwischen  $d_{\rm s}$  und  $d_{\rm p}$  nicht exakt durch das GCM wiedergegeben werden kann, obwohl der lineare Zusammenhang eindeutig in den experimentellen Daten wiederzufinden ist.

#### 3.2.5 Diskussion

Die in diesem Kapitel dargestellten Erkenntnisse über die verschiedenen Einflüsse der Emulsionsparameter auf die übergeordnete Membranstruktur lieferten tiefgehende Einblicke in das Membranbildungsverhalten. Durch eine gezielte Anpassung der Emulsionszusammensetzung können konvektive Poren- und Steggrößen und ihr Verhältnis zueinander gesteuert werden. Im chromatographischen Kontext ist es wichtig, zusätzlich zu einer geeigneten Permeabilität die volle Erreichbarkeit eines diffusiven Membranstegs durch das Zielmolekül zu gewährleisten. Werden die Stege zu breit gewählt, so können die aufzutrennenden Moleküle nicht alle Bindungsstellen der Membran besetzen und Teile der stationären Phase bleiben ungenutzt. Sind die Stege zu schmal, so werden zwar alle vorhandenen Bindungsstellen besetzt, jedoch kann dies in einer geringen Bindungskapazität der Membran resultieren. Für eine chromatographische Membran ist es daher nötig, ein Optimum aus konvektiver Porengröße und Stegdicke zu erreichen, sodass sich eine geeignete Permeabilität und Erreichbarkeit der Bindungsstellen bei hoher Bindungskapazität ergibt. Hierfür sind Tensidmenge, Lösungsmittelart und der Anteil der organischen Phase im Emulsionsprozess entscheidend. Die Permeabilität der entstehenden Membran kann zum einen über die verwendete Tensidmenge und zum anderen über das Poren–Steggrößen-Verhältnis gesteuert werden, da hier die konvektive Porengröße maßgeblich verändert wird aber auch eine Kontrolle der Stegdicke erfolgt.

Um eine geeignete Membranstruktur für die Anwendung in der Mixed-Mode Chromatographie zu erlangen, müssen sowohl die konvektiven Poren- und Steggrößen als auch die Permeabilität der Membran und die Diffusivität der stationären Phase in Betracht gezogen werden. In Kapitel I wurde bereits geschlussfolgert, dass eine für IgG chromatographisch geeignete Netzwerkstruktur eine Agarosekonzentration von 2-4 Gew.-% besitzen muss. Hagemann konnte weiterhin über Modellierung von aus Agarose bestehenden Membranadsorbern die optimalen Stegdurchmesser für eine vollständige Erreichbarkeit der Agarosematrix durch IgG berechnen.<sup>[124]</sup> Dabei wurde sich auf vernetzte und Protein gekoppelte stationäre Phasen bezogen, die aus verschiedenen Agarosekonzentrationen bestanden und deren konvektive Porosität bei  $\epsilon_{\rm p} = 0.3$  lag. Für eine Verweilzeit des IgG im Membranadsorber von  $12\,\mathrm{s}$  wurden für  $2\,\mathrm{Gew}.-\%$ Agarose ein optimaler Stegdurchmesser von 2,2-3,8 µm errechnet, für 4 Gew.-% waren es  $d_s = 2,0-3,4 \,\mu\text{m}$ . Da das von Hagemann verwendete Protein nach der Immobilisierung auf der inneren Oberfläche der Agarose vermutlich eine stärkere Abnahme des diffusiven Porendurchmessers als ein einfacher kleiner Ligand bewirkt, kann davon ausgegangen werden, dass bei der Anwendung der Membran als multimodales chromatographisches Material ein größerer diffusiver Porendurchmesser und somit eine höhere Diffusivität der stationären Phase vorliegt. Daher würden sich auch geringfügig größere Stegdurchmesser für eine vollständige Erreichbarkeit der Matrix eignen. Aus diesem Grund wurden Stegdurchmesser zwischen 2 und 5 µm als geeignet erachtet, um eine vollständige Zugänglichkeit der gesamten Agaroseoberfläche bei den Zielverweilzeiten für die im kommenden Kapitel untersuchte Mixed-Mode Membran zu gewährleisten. Schließlich liegt eine adäquate Permeabilität von Membranadsorbern im Bereich 40-150 mD, was über Gleichung 3.2 einen konvektiven Porendurchmesser von 2-4 µm ergeben würde. Die hier diskutierten Parameter wurden bei der Auswahl der im folgenden Kapitel III angewandten Membranen berücksichtigt.

# 3.3 Kapitel III - Herstellung einer chromatographischen Mixed-Mode Membran

Inhalte dieses Kapitels wurden in einem Patent aufgeführt, welches zur Anmeldung eingereicht wurde.<sup>[1]</sup>

#### 3.3.1 Vorwort

Bei der Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern wie IgG ist der *capture* Schritt mit kostspieligem Material der chromatographischen Matrix verbunden. Um das teure Protein A zu ersetzen, könnte statt der Affinitäts- eine Mixed-Mode Chromatographie angewandt werden, dessen multimodale Liganden deutlich preiswerter sind.<sup>[20–23]</sup> Mixed-Mode Chromatographie ist eine Methode, die mehrere intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Ligand und Zielmolekül vereint und somit hohe Selektivitäten bei der Auftrennung ermöglicht.<sup>[24,31,167,168]</sup> Dadurch findet sie bereits Anwendung im *polishing*, wo chemisch sehr ähnliche Moleküle voneinander separiert werden müssen. Zudem erlaubt die Kombination mehrerer Interaktionen in einer Matrix den Verzicht von einzelnen Teilschritten im Aufreinigungsprozess und resultiert somit in einer Reduktion des Zeitaufwands und der Prozesskosten.<sup>[25,26]</sup>

In den vorangegangenen beiden Kapitel 3.1 und 3.2 wurden die strukturellen Eigenschaften und ihre Abhängigkeiten der hier neu vorgestellten chromatographischen Membran und ihres Ausgangsmaterials erläutert. In diesem Teil der Arbeit wurde eine chromatographische Mixed-Mode-Membran auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse hergestellt und auf ihre Leistung hin untersucht. Für die hier produzierten Mixed-Mode-Membranen wurde ein Ligand gewählt, der zusätzlich zu hydrophoben Wechselwirkungen über eine dauerhaft positive Ladung in Form eines quartären Amins verfügt. N-Benzyl-N-Methylethanolamin (BMEA) wird bereits auf chromatograpischen Resins angewandt. Der Capto<sup>TM</sup> Adhere-Ligand von CYTIVA wurde in dieser Arbeit als Referenzmaterial verwendet, um die Leistung der hier hergestellten Membran mit den korrespondierenden Beads zu vergleichen.

#### 3.3.2 Wahl geeigneter Membranparameter

Kapitel 3.1 befasste sich mit dem Polysaccharid Agarose, welches in Form von Hydrogelen als poröse stationäre Phase in chromatographischen Prozessen eingesetzt wird. Hier wurde die Agarosekonzentration im Hydrogel als maßgeblicher Steuerungsparameter für die Leistung der stationären Phase festgelegt. Eine hohe Polymerkonzentration resultiert in einer hohen Oberfläche der Agarosefilamente, jedoch nimmt auch die diffusive Porengröße dadurch stark ab. Hier musste zwischen hoher innerer Oberfläche für potentiell hohe Ligandendichten und hinreichend großen diffusiven Poren für eine geeignete Diffusivität der Zielmoleküle abgewägt werden. Im folgenden Abschnitt wurden Agarosekonzentrationen von 2.5 und 5.0 Gew.-% für die stationäre Phase der chromatographischen Membran gewählt.

In Kapitel 3.2 wurde die Membranbildung mit Hinblick auf den Emulsionsprozess und die daraus resultierenden übergeordneten Membranstrukturen untersucht. Hier musste ein geeigneter Bereich der konvektiven Poren- und Steggröße gewählt werden, sodass hohe, aber nicht zu hohe Permeabilitäten vorliegen und die Membranstruktur eine maximale Ausnutzung der Agarosematrix ermöglicht. Wie bereits in Kapitel 3.2 diskutiert, würden sich für IgG als Zielmolekül Stegdurchmesser von 2-5  $\mu$ m eignen. Mit einem konvektiven Porendurchmesser von 2-4  $\mu$ m würden Permeabilitäten zwischen 40 und 150 mD resultieren. Tabelle 3.8 zeigt die Strukturparameter der verwendeten Membranen.

**Tab. 3.8:** Membranparameter für die hergestellten Membranen, die mit dem Mixed-Mode Liganden funktionalisiert wurden: Agarosekonzentration  $c_{\text{Agarose}}$ , mittlerer Porendurchmesser  $d_{\text{p}}$  mit Standardabweichung der Verteilung, mittlerer Stegdurchmesser  $d_{\text{s}}$  mit Standardabweichung der Verteilung, Poren-Steggrößen-Verhältnis P/S und Permeabilität P.

$c_{\text{Agarose}}/\text{Gew}\%$	$d_{ m p}/\mu{ m m}$	$d_{\rm s}/\mu{ m m}$	P/S	$P/\mathrm{mD}$
2,5	$2,0\pm 1,2$	$2{,}6\pm1{,}3$	0,77	$67\pm8$
5,0	$3,8\pm1,5$	$4{,}8\pm1{,}5$	0,79	$91 \pm 2$

#### 3.3.3 Kopplung des Liganden

Für die Mixed-Mode-Membran wurde N-Benzyl-N-Methylethanolamin (BMEA) über mehrere Kopplungsschritte an die Agarosematrix angebracht, s. dafür Abschnitt 5.3. Die chemischen Strukturen von BMEA und des finalen Liganden sind in Abbildung 3.31 gezeigt. Es handelt sich hierbei um ein tertiäres Amin, welches nach nukleophiler Substitution durch das Stickstoff-Atom an eine funktionelle Gruppe der Membran angebracht wird und dadurch in ein quartäres Amin umgewandelt wird, welches eine positive Ladung trägt. Weitere funktionelle Gruppen des Liganden sind ein Phenylrest, ein aliphatischer Alkohol sowie eine Methylgruppe. Während durch die aliphatischen und aromatischen Reste hydrophobe Wechselwirkungen zu Zielmolekülen hervorgerufen werden, bildet die positive Ladung ionische Interaktionen aus.



Abb. 3.31: Kopplung von BMEA an die Agarosematrix durch nukleophile Substitution.

Um den Einfluss der Agarosekonzentration auf die Ligandendichte zu prüfen, wurden beide oben gezeigten Membranen gleichermaßen behandelt, d.h. Mengen und Konzentrationen der verwendeten Chemikalien und sämtlichte Reaktionsbedingungen waren identisch. Ein qualitativer Test durch Anfärbung der Membran mit Ponceau S, einem negativ geladenen Farbstoff, gab erste Auskunft darüber, ob die Ligandenkopplung erfolgreich war. Durch die gegenseitige Ladung von Membran und Farbstoff fand nur eine Färbung der Membran statt, die zuvor mit BMEA modifiziert wurde. Anhand dieses Tests konnte qualitativ festgestellt werden, dass die 5,0 Gew.-%ige Agarosemembran eine höhere Ligandendichte als die 2,5 Gew.-%ige aufweist, da hier eine intensivere Rotfärbung beobachtet wurde, s. Abbildung 3.32.



Abb. 3.32: Qualitativer Nachweis der Ligandenkopplung durch Anfärbung der Membran mit Ponceau S. Links: 2,5 Gew.-% Agarose. Rechts: 5,0 Gew.-% Agarose.

#### 3.3 Kapitel III - Herstellung einer chromatographischen Mixed-Mode Membran

Für die quantitative Bestimmung der Ligandendichte wurde eine Titration mit HCl (10 mM) an einer Äkta<sup>TM</sup> avant 150 durchgeführt, Details sind in Abschnitt 5.3 beschrieben. Die Titration erfolgte nach einem vorherigen Beladen der Membran mit NaOH und anschließendem Spülen mit Reinstwasser, um die positiven Ladungen der Amine durch ionische Wechselwirkung mit OH<sup>-</sup>-Ionen abzusättigen und die restlichen Na<sup>+</sup>-Ionen aus der Membran zu entfernen. Im Verlauf dieses Experiments wurde die Leitfähigkeit (LF) des Eluats gemessen und der Verlauf gegen das Retentionsvolumen  $V_{\rm ret}$  aufgetragen, s. Abbildung 3.33. Zu Beginn der Titration (nach dem Spülschritt) beträgt die Leitfähigkeit noch annähernd  $0 \,\mathrm{mS} \,\mathrm{cm}^{-1}$ , da hier nur Wasser aus der Membran austritt. Nach einigen Millilitern erfolgt ein steiler Anstieg der Leitfähigkeit bis auf  $LF \approx 4 \,\mathrm{mS \, cm^{-1}}$ , was der Leitfähigkeit der eingesetzten Salzsäure entsprach. Nach Erreichen des Plateaus wurde die Membran erneut mit Reinstwasser gespült, was zu einem wiederholten Abfall von LF führte. Durch Integration des LF-Signals über das Retentionsvolumen und Abzug dessen vom verwendeten HCl-Volumen konnte die Stoffmenge an HCl ermittelt werden, die zur Neutralisation der vorhandenen OH<sup>-</sup>-Ionen benötigt wurde, was der Stoffmenge an quartären Aminen auf der Membran entsprach. Durch vorherige Bestimmung der Membrandicke wurde somit die Ionendichte, also auch die Ligandendichte auf der Membran ermittelt, s. Tabelle 3.9. Bereits in der Titrationskurve fällt auf, dass der Durchbruch der Salzsäure für die 5 Gew.-%ige Membran deutlich später kommt als für die 2,5 Gew.-%ige Membran. Nach Auswertung der Daten wird quantitativ mehr als eine Verdopplung der Ligandendichte für 5 Gew.-% Agarose mit ID =  $200 \,\mu$ mol mL MV<sup>-1</sup> im Vergleich zu 2,5 Gew.-% Agarose mit  $ID = 75 \,\mu mol \,mL \,MV^{-1}$  erreicht.



**Abb. 3.33:** Titrationsverlauf der Leitfähigkeit LF mit dem Retentionsvolumen  $V_{\rm ret}$  für beide Agarosemembranen.

**Tab. 3.9:** Durch Titration bestimmte Ionendichte ID beider Membranen durch Berechnung der Differenz des Flächenintegrals der Leitfähigkeit  $I_{\rm LF}$  von dem verwendeten HCl-Volumen  $V_{\rm ges}$  abzüglich des Totvolumens bezogen auf das Membranvolumen MV. Als Referenz ist die Ligandendichte bezogen auf Säulenvolumen (CV) für den Capto<sup>TM</sup> Adhere-Resin laut Hersteller angegeben.

$c_{\text{Agarose}}/\text{Gew}\%$	$I_{\rm LF}/{ m mSmLcm^{-1}}$	$V_{\rm ges}/{ m mL}$	${ m ID}/{\mu}{ m molmL}~{ m MV}^{-1}$
2,5	27	20	75
5,0	55	20	200
Capto <sup>TM</sup> Adhere	90-1	$120 \mu molmL$	$\mathrm{CV}^{-1}$

Beide Ligandendichten liegen in der gleichen Größenordnung wie die Ligandendichte des Referenzmaterials Capto<sup>TM</sup> Adhere nach Herstellerangaben:  $ID = 90 - 120 \,\mu\text{mol}\,\text{mL}\,\text{MV}^{-1}$ . Die mehr als Verdopplung von ID für die 5 Gew.-%ige Membran im Vergleich zur 2,5 Gew.-%igen Membran bei identischen Reaktionsbedingungen kann mit der deutlich höheren Oberfläche der Agarosefilamente im Hydrogel begründet werden, wie schon in Kapitel 3.1 diskutiert. Eine Verdopplung der Konzentration an Agarose sollte demnach zu einer Verdopplung der Oberfläche führen, solange keine Verdickung oder Verdichtung der Agarosefilamente erfolgt und lediglich mehr Filamente gebildet werden. Die hier beobachtete Abweichung kann auf die unterschiedlichen Membranstrukturen zurückzuführen sein, da hier geringfügig unterschiedliche Porositäten verwendet wurden (67 Vol.-% wässrige Phase für 5 Gew.-% und 62 Vol.-% für 2,5 Gew.-%). Sie kann aber auch auf strukturelle Unterschiede der Membranen und Hydrogele zurückzuführen sein, was hier aber nicht weiter betrachtet wurde.

### 3.3.4 Wahl geeigneter Bindungs- und Elutionsbedingungen

Aufgrund der Erkenntnisse aus Kapitel 3.1 bezüglich der Diffusivität von IgG in Agarosehydrogelen, wurde im weiteren Verlauf nur auf die 2,5 Gew.-%ige Membran eingegangen, da die Diffusionskonstante von IgG bei 5 Gew.-% um knapp 30% verglichen mit einem 2,5 Gew.-%igen Hydrogel abnimmt. Dies ist zudem nur auf native Agarosegele bezogen, die nicht weiter modifiziert wurden. Es ist stark davon auszugehen, dass die Diffusivität von vernetzter und mit Ligand gekoppelter Agarose noch stärker abnimmt, da hier eine Verbreiterung der Agarosefilamente einen zusätzlichen Einfluss auf das Diffusionsverhalten von Molekülen hätte. Zusätzlich liegt die Ligandendichte der 2,5 Gew.-%igen Membran näher an der des Capto<sup>TM</sup> Adhere Resins, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit geschaffen wird.

Um die Leistung der chromatographischen Membran zu beurteilen, ist zunächst die Wahl geeigneter Bindungs- und Elutionsbedingungen von großer Relevanz. Aufgrund der starken Abhängigkeit der Trennleistung chromatographischer Prozesse von Zielmolekül und Aufreinigungsmethode, müssen die Rahmenbedingungen für jeden Prozess individuell angepasst werden. In dieser Arbeit wurden Bedingungen gewählt, die sich an Literaturdaten für IgG als Zielmolekül orientieren, für die BMEA bereits als Ligand auf Agarose-Beads eingesetzt wurde.<sup>[35,198,199]</sup> In den Versuchen dieser Arbeit wurde als Modellsystem die chromatographische multimodale Aufreinigung von  $\gamma$ -Globulin im *bind & elute*-Modus durchgeführt. Es wurden zwei Bindungspuffer bei zwei unterschiedlichen pH-Werten verwendet und die statische Bindungskapazität (SBC) von  $\gamma$ -Globulin im Kreuzversuch getestet. Die statische Bindungskapazität beschreibt die maximale Bindungskapazität eines chromatographischen Mediums unter Gleichgewichtsbedingungen. Hierfür wurden Membranstanzlinge in proteinhaltigem Bindungspuffer ( $\gamma$ -Globulin,  $3 \text{ g L}^{-1}$ ) eingelegt und über Nacht äquilibriert. Im Anschluss wurde photometrisch die Konzentration des Proteins im Überstand gemessen und mit der Ausgangskonzentration verglichen, um so die Masse an Protein zu bestimmen, die sich auf der Membran befand. Zusätzlich dazu wurde die gebundene Proteinkonzentration über Elution bestimmt. Dafür wurde der beladene Stanzling mit Bindungspuffer gespült und anschließend in eine definierte Menge Elutionspuffer (20 mM Glycin-HCl, pH = 2,5) geschwenkt. Die Konzentration von  $\gamma$ -Globulin wurde hier ebenfalls photometrisch bestimmt. Tabelle 3.10 zeigt die SBC Resultate der 2,5 Gew.-%igen Membran für die angewandten Bindungsbedingungen.

**Tab. 3.10:** SBC Daten für die 2,5 Gew.-%ige Agarosemembran und  $\gamma$ -Globulin  $(3 \, \mathrm{g \, L^{-1}})$ in Glycin-NaOH und Tris-HCl Puffer (20 mM) bei pH = 8 und 9. Es erfolgteeine Doppelbestimmung. Ue, Eluat: Aus dem Überstand, aus der Elutionbestimmt.

Puffer	pН	${ m SBC}_{ m Ue}/{ m mgmL^{-1}}$	$\mathrm{SBC}_{\mathrm{Eluat}}/\mathrm{mg}\mathrm{mL}^{-1}$
Glycin-NaOH	8	$96 \pm 1$	$99 \pm 1$
	9	$81 \pm 2$	$86 \pm 1$
Tris-HCl	8	$67 \pm 2$	$68 \pm 2$
	9	$65 \pm 1$	$70 \pm 1$

Die in Tabelle 3.10 gelisteten Ergebnisse der SBC lassen feststellen, dass sich mit Glycin-NaOH als Bindungspuffer eine höhere Bindungskapazität ergab als für Tris-HCl beim gleichen pH-Wert (80-100 mg mL<sup>-1</sup> statt 65-70 mg mL<sup>-1</sup>). Außerdem fällt auf, dass sich für Glycin-NaOH bei pH = 8 höhere SBC ergaben als bei pH = 9. Ein Vergleich der Bindungskapazitäten bestimmt aus dem Überstand und durch Elution zeigten sehr gute Übereinstimmung, was auf gute Elutionsbedingungen hindeutet. Die etwas höheren Werte für die Elution sind vermutlich auf Fehler bei der Verdünnung der Überstandslösung bzw. der Ausgangslösung zurückzuführen. Anhand der hier präsentierten Ergebnisse wurde Glycin-NaOH (20 mM, pH = 8) fortführend als Bindungspuffer und Glycin-HCl (20 mM, pH = 2,5) als Elutionspuffer für die dynamischen Bindungsexperimente verwendet.

#### 3.3.5 Dynamische Bindungsexperimente

Eine wichtige Eigenschaft chromatographischer Medien ist nicht nur ihre statische sondern vor allem ihre dynamische Bindungskapazität (DBC). Diese

gibt Auskunft über die maximal mögliche Bindung des Zielmoleküls, ohne dass ein Durchbruch dieses erfolgt. Im Folgenden wurden Durchbruchskurven von  $\gamma$ -Globulin (1 g L<sup>-1</sup>) auf der 2,5 Gew.-% igen Agarosemembran für verschiedene Verweilzeiten (3-60 s residence time (RT)) anhand unterschiedlicher Flussgeschwindigkeiten aufgenommen. In Abbildung 3.34 ist die prozentual detektierte Proteinkonzentration  $c_{\gamma/c_0}$  an  $\gamma$ -Globulin gegen das Beladungsvolumen  $V_{\text{load}}$ aufgetragen. Für alle Verweilzeiten ist ein erster Durchbruch von  $\gamma$ -Globulin nach 10-15 mL Beladung zu erkennen. Statt eines kontinuierlichen Anstiegs nimmt  $c_{\gamma/c_0}$  zunächst steil von 0 auf ca. 20-25% zu, wo eine Schulter der Kurven zu sehen ist, gefolgt von einer weiteren abflachenden Zunahme der prozentualen Proteinkonzentration bis auf annähernd 100%. Zu beobachten ist eine leichte Verschiebung der Durchbruchskurven zu geringerem  $V_{\text{load}}$  mit abnehmender Verweilzeit. Tabelle 3.11 zeigt die berechnete DBC für 10% und 100% Durchbruch für alle vier Kurven. Für beide DBC Werte ist eine Abnahme mit geringer werdenden Verweilzeit zu erkennen mit Ausnahme von  $DBC_{100\%}$ von RT = 60 s auf RT = 12 s.



**Abb. 3.34:** Durchbruchskurven der 2,5 Gew.-%igen Mixed-Mode-Membran mit  $\gamma$ -Globulin (20 mM Glycin-NaOH, pH = 8, 1 g L<sup>-1</sup>) bei RT = 3-60 s.

**Tab. 3.11:** DBC Daten für die 2,5 Gew.-%ige Agarosemembran und  $\gamma$ -Globulin  $(1 \, \mathrm{g} \, \mathrm{L}^{-1})$  in Glycin-NaOH Puffer (20 mM, pH = 8) für verschiedene Verweilzeiten RT. Die Fehlerabschätzung bezieht sich auf die Auswertung der Daten und gibt nicht die Abweichung zu  $c_{\gamma}/c_0 = 1$  wieder.

RT/s	${\rm DBC_{100\%}/mgmL^{-1}}$	$\mathrm{DBC}_{10\%}/\mathrm{mgmL^{-1}}$
60	$86 \pm 3$	$25\pm2$
12	$88 \pm 3$	$24 \pm 2$
6	$76 \pm 3$	$19 \pm 2$
3	$66 \pm 3$	$18 \pm 2$

Die Beladung der Membran mit  $\gamma$ -Globulin erfolgte bis zu einem Volumen von  $V_{\text{load}} = 10\text{-}15 \,\text{mL}$  ohne Durchbruch des Proteins. Bis dahin wurden Bindungsstellen auf der Membran mit 100% des durchströmten Proteins besetzt. Auch nach dem Durchbruch erfolgte weitere Bindung von  $\gamma$ -Globulin an die chromatographische Matrix, jedoch nicht mehr vollständig. Der Durchbruch verlief für Verweilzeiten von RT = 3-12 s schleichend und  $c_{\gamma/c_0} = 1$  wurde bis zum Ende der Messung nicht erreicht. Aufgrund von Material- und Kostengründen wurden die Versuche nach 120 mL Beladungsvolumen eingestellt. Dies erklärt auch, warum die DBC<sub>100%</sub> nicht bei allen Verweilzeiten gleich ist. Der Wert für DBC<sub>100%</sub> würde bei fortführender Beladung allmählich den Werte für die SBC entsprechen. Da diese bereits bekannt sind und die DBC<sub>10%</sub> ein deutlich relevanterer Parameter im Kontext der Chromatographie darstellt, kann dieser Aspekt vernachlässigt werden.

Ein Idealverlauf einer Durchbruchskurve würde einer Stufenfunktion ähneln: Bis zur vollständigen Besetzung aller Bindungsstellen würde Protein auf der Matrix verbleiben ( $c_{\gamma}/c_0 = 0$ ) und im Anschluss würde ein steiler Anstieg des Durchbruchs beobachtet werden ( $c_{\gamma}/c_0 = 1$ ). Ein solches Verhalten wird in der realen Chromatographie aufgrund von Massentransport und Dispersion nie erhalten, mit Beads gepackte Säulen sind jedoch bekannt dafür, einen recht steilen Durchbruch zu ermöglichen. Der Grund für die hier beobachtete Schulter kann nicht endgültig geklärt werden. Eine mögliche Ursache dafür ist ein Bypass, der durch den Verbau oder durch einen Defekt in der Membran selbst entstanden ist. Andere Experimente, in denen weitere BMEA-Mixed-Mode-Membranen hergestellt und verbaut wurden, zeigten allerdings ein ähnliches Verhalten, was diese Erklärung verwirft. Da  $\gamma$ -Globulin eine Mischung aus den Antikörpern IgA, IgD, IgE, IgG und IgM ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass es zu einem frühen Durchbruch eines Teils der Proteine kommt. Durch die hohe Selektivität von multimodaler Chromatographie können chemisch sehr ähnliche Moleküle voneinander separiert werden. Es besteht also die Möglichkeit, dass bereits bei der Beladung der Membran eine Trennung der verschiedenen Antikörper durch unterschiedlich starke Bindungskonstanten der einzelnen Spezies erfolgt.

Die Betrachtung der  $DBC_{10\%}$  lieferte das Ergebnis, dass diese mit abnehmender Verweilzeit der Antikörper auf der Membran ebenfalls abnehmen. Je schneller das Medium durchströmt wird, desto weniger Protein bindet also bei gleichem Beladungsvolumen. Dieses Verhalten ist typisch für diffusiv kontrollierte Prozesse und wird damit erklärt, dass eine höhere Flussrate dem Zielmolekül weniger Zeit gibt, vollständig in die Beads zu diffundieren und alle Bindungsstellen zu besetzten. Dieselbe Erklärung lässt sich auch im Zusammenhang der Agarosemembran anwenden. Die Membranstege bestehen aus porösem Agarose-Hydrogel, s. Kapitel 3.1, in welches das  $\gamma$ -Globulin hinein diffundieren muss, um die Bindungskapazität der Membran vollständig auszuschöpfen. Wird der Beladungsstrom zu hoch gewählt, so verweilt das Protein nicht lang genug im Steg und Bindungstellen bleiben unbesetzt. Der Einfluss der Verweilzeit wird vom Sprung von 12s auf 6s besonders deutlich. Hier machen sich Verluste der  $\mathrm{DBC}_{10\%}$ von mehr als 20% bemerkbar. Zwischen  $12\,\mathrm{s}$  und  $60\,\mathrm{s}$  RT ist nahezu kein Unterschied zu erkennen, was dafür spricht, dass die Verweilzeit in dieser Größenordnung keinen großen Einfluss mehr auf die Bindungskapazität hat.

#### 3.3.6 Vergleich mit Literatur und Diskussion

Im Folgenden werden die hier generierten Daten einer 2,5 Gew.-%igen BMEA-Agarosemembran mit experimentellen und Literaturdaten des gleichen Liganden auf Agarosebeads verglichen. Die Capto<sup>TM</sup> Adhere Beads wurden von CYTIVA in vorgepackten Säulen mit einem Volumen von 1 mL erworben und unter den identischen Bedingungen wie die Membran untersucht. Aufgrund der Verwendung von Beads mussten allerdings deutlich geringere Flussraten gewählt werden.

Abbildung 3.35 zeigt die Durchbruchskurven von  $\gamma$ -Globulin auf der Capto<sup>TM</sup>-Adhere Säule. Es ist zu erkennen, dass hier der Durchbruch quasi sofort erfolgt, zunächst sehr schleichend und anschließend steil ansteigend. Der Verlauf beider Kurven erreicht wie bei den Membranen nicht 100% der Ausgangskonzentration, was in diesem Fall nicht nur an materiellen sondern auch an zeitlichen Gründen lag, da die Säule bei sehr hohen Verweilzeiten gefahren wurde. Tabelle 3.12 gibt die aus den Durchbruchskurven ermittelten dynamischen Bindungskapazitäten wieder. Es ist eine deutlich geringere DBC<sub>100%</sub> festzustellen, die lediglich 30-50% der Membran-DBC<sub>100%</sub> ausmacht. Ebenso ist eine vergleichsmäßig niedrige  $DBC_{10\%}$  von nur 25-50% im Gegensatz zur Membran festzustellen. Diese Daten wurden in Abbildung 3.36 zusätzlich zu Literaturwerten für  $DBC_{10\%}$  des Capto<sup>™</sup> Adhere Resins gegen die Verweilzeit aufgetragen. Die Literaturdaten wurden nicht unter den exakt gleichen Bedingungen wie die in dieser Arbeit bestimmten Werte erhalten, sind aber annähernd vergleichbar mit dem hier betrachteten System. In der Literatur wurde reines IgG als Zielmolekül in anderer Konzentration  $c_{IgG} = 25 \,\mathrm{g} \,\mathrm{L}^{-1}$  und ein anderer Bindungspuffer bei ähnlichen Bedingungen verwendet ( $28 \text{ mM NaP}_i$ , pH = 7,75). Die Auftragung zeigt eine starke Abhängigkeit der Bindungskapazität von der Verweilzeit des Zielmoleküls in den chromatographischen Modulen. Je höher die Verweilzeit desto höher ist auch die  $DBC_{10\%}$ . Ein Vergleich von  $DBC_{10\%}$  der Membran mit den hier vermessenen Beads weist eine deutlich höhere Bindungskapazität bei erheblich niedrigerer RT unter den identischen Bedingungen auf. Im Gegensatz dazu passen die Werte der Membran gut in den Verlauf der Literaturdaten und stimmen bei einer Verweilzeit von 60s sogar sehr gut überein.



**Abb. 3.35:** Durchbruchskurven der 1 mL Capto<sup>TM</sup> Adhere Säule mit  $\gamma$ -Globulin (1 g L<sup>-1</sup> in 20 mM Glycin-NaOH, pH = 8) bei RT = 2 & 4 min.

**Tab. 3.12:** DBC Daten für die Capto<sup>TM</sup> Adhere Beads und  $\gamma$ -Globulin  $(1 \text{ g L}^{-1})$  in Glycin-NaOH Puffer (20 mM, pH = 8) für verschiedene Verweilzeiten RT. Die Fehlerabschätzung bezieht sich auf die Auswertung der Daten und gibt nicht die Abweichung zu  $c_{\gamma}/c_0 = 1$  wieder.

$\mathrm{RT}/\mathrm{min}$	$\mathrm{DBC}_{100\%}/\mathrm{mgmL^{-1}}$	$\mathrm{DBC}_{10\%}/\mathrm{mgmL^{-1}}$
4	$39 \pm 3$	$9\pm 2$
2	$27 \pm 3$	$6\pm 2$



Abb. 3.36: Auftragung der experimentellen  $DBC_{10\%}$  der 2,5 Gew.-%igen Agarosemembran und der Capto<sup>TM</sup> Adhere Beads in Abhängigkeit der Verweilzeit. Bindungsbedingungen:  $\gamma$ -Globulin  $(1 \text{ g L}^{-1})$  in 20 mM Glycin-NaOH, pH = 8. Die Literaturdaten für Capto<sup>TM</sup> Adhere beziehen sich auf Messungen mit IgG (25 g L<sup>-1</sup> in 28 mM NaP<sub>i</sub>, pH = 7,75). Die gestrichelte Linie dient der Veranschaulichung.

Der Vergleich der Bindungskapazitäten bei 10% Durchbruch der 2,5 Gew.-%igen Agarosemembran mit denen der Capto<sup>TM</sup> Adhere Beads macht deutlich, dass die in dieser Arbeit hergestellte Membran mindestens genauso gute Leistung erbringt wie die analogen Beads bei ähnlichen Bedingungen. Wird nur der direkte Vergleich der hier generierten experimentellen Daten bei identischen Bedingungen betrachtet, so erzielt die Membran sogar eine deutlich höhere Leistung als die korrespondierenden Beads. Nicht nur die statische sondern auch die dynamische Bindungskapazität der Membran übertrifft klar die der Beads bei ähnlicher Ligandendichte. Als Ursache hierfür wird die unterschiedliche diffusive Weglänge in Membran und Beads genannt. Die Beads haben einen mittleren Durchmesser von  $d_{\text{Bead}} = 75 \,\mu\text{m}$  und somit eine mittlere diffusive Weglänge von  $d_{\text{diff}} = 38 \,\mu\text{m}$ , um ins Zentrum des Beads zu gelangen. Im Gegensatz dazu sind die Stege der Membran im Mittel nur  $2,6 \,\mu\text{m}$  breit, was eine diffusive Weglänge von durchschnittlich  $d_{\text{diff}} = 1.3 \,\mu\text{m}$  ergibt. Durch die geringe Weglänge können Zielmoleküle die vorhandenen Bindungsstellen im Zentrum des Membransteges schneller erreichen als die Bindungsstellen im Zentrum des Beads. Somit liegt eine vollständige Erreichbarkeit aller Bindungsplätze bei bereits viel geringeren Verweilzeiten vor. Zudem ist es möglich, dass die diffusiven Poren der Agarosematrix in der Membran größere Durchmesser besitzen als die diffusiven Poren in den Beads. Diese sind der Autorin unbekannt, sodass hier nur Mutmaßungen angestellt werden können. Größere Agaroseporen bedeuten eine höhere Diffusivität in der stationären Phase, was in dieser Arbeit gezielt als Steuerparameter eingesetzt wurde. Dadurch kann eine noch höhere Erreichbarkeit aller Bindungsstellen bei sonst gleichbleibender Verweilzeit erfolgen.

Im Verlauf dieser Arbeit ist es anhand der Ergebnisse aus Kapitel I und II gelungen, eine geeignete chromatographische Mixed-Mode Membran herzustellen, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften eine stärkere *performance* im Vergleich zu analogen Beads zeigt. Es wurden sowohl höhere Bindungskapazitäten als auch kürzere Prozesszeiten ermöglicht, was die Produktivität dieses chromatographischen Mediums enorm steigert.

# 4 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Produktivität der präparativen Chromatographie von Biopharmazeutika durch eine neuartige Mixed-Mode Membran mit einer geeigneten integralen Struktur zu erhöhen, die sowohl konvektiven als auch diffusiven Stofftransport bei geringen Verweilzeiten ermöglicht. Dazu wurden sowohl die Eigenschaften des Materials als auch der Membranbildungsprozess detailliert untersucht, um die essentiellen Parameter zum Erhalt einer leistungsfähigen Membranstruktur zu identifizieren.

In Kapitel I wurde das Material der stationären Phase, das Polysaccharid Agarose, auf seine chemischen, physikalischen und strukturellen Eigenschaften und auf seine Verarbeitbarkeit hin untersucht.

Durch die hier erlangten Daten konnten Schlussfolgerungen für die Anwendbarkeit von Agarosesolen und -gelen im Kontext der Chromatographie getätigt werden. Während die Variation von Gel- und Solpunkt aufgrund von Änderung der Agarosekonzentration oder des Methoxyanteils unerheblich für den Verarbeitungsprozess des Sols waren, spielten Molekulargewicht und Konzentration eine relevante Rolle für seine Viskosität. Gleichzeitig wirkte sich eine zunehmende Polymerkonzentration positiv auf die Festigkeit des Hydrogels aus, welches eine gute Handhabbarkeit und Standhaftigkeit gegenüber erhöhten Prozessdrücken gewährleisten muss. Für die chromatographische Anwendung des Hydrogels war stets eine poröse Struktur mit großer Oberfläche vorhanden, die von der Polysaccharid-Konzentration abhing. Aufgrund einer abnehmenden Porengröße mit steigendem Polymer-Anteil und damit einhergehenden verringerten Diffusivität des Materials, musste ein Kompromiss aus großer Oberfläche für die Liganden-Anbringung und einer ausreichenden Diffusion für IgG als Zielmolekül gefunden werden. Ein Vergleich mit Literaturdaten resultierte in einer idealen Agarosekonzentration im Bereich von 2-4 Gew.-% für die Anwendung in der Membranchromatographie.

In Kapitel II wurde die Membranbildung durch einen Emulsionsprozess nach Larsson eingehend untersucht. Dabei wurde der Schwerpunkt auf strukturelle Eigenschaften wie konvektive Poren- und Steggrößen und deren Relevanz für

#### 4 Zusammenfassung

die resultierende Permeabilität und Zugänglichkeit aller potentiellen Bindungsstellen gelegt. Dafür wurde zunächst der Einfluss der Tensid-Menge in der Emulsion untersucht. Es resultierten zwei unterschiedliche Strukturen: Bei der Verwendung von geringen Mengen Tensid war eine Schaumstruktur zu beobachten, während bei größeren Anteilen eine bikontinuierliche Struktur erkennbar war. Die Permeabilität der Membranen war im bikontinuierlichen Bereich stets höher als bei Schaumstrukturen, was auf den sich kontinuierlich durch die Membran ziehenden konvektiven Poren und der damit einhergehenden Konvektion beruht. Die Verringerung der konvektiven Porendurchmesser in der Schaumstruktur durch Zugabe von Tensid konnte auf eine Herabsenkung der Oberflächenspannung der Grenzschicht zwischen organischer und wässriger Phase zurückgeführt werden und entsprach dem zu erwartenden Verhalten einer Emulsion.

Die Entstehung der bikontinuierlichen Struktur der Membran ist deutlich komplexer und setzt sich aus Grenzflächeneffekten, Mizellenbildung und Polymerentmischung zusammen. Hier konnte ein Abfall der Grenzflächenspannung zwischen organischer und wässriger Phase auf Null bei Zugabe einer bestimmten Mindestmenge Tensid identifiziert werden, wodurch keine Tropfenbildung der organischen in der wässrigen Phase mehr beobachtet werden konnte. Dies wurde mit dem stark erniedrigten Laplace Druck und einer resultierenden Krümmung von Null begründet, wodurch zwei koexistierende kontinuierliche Phasen entstanden. Außerdem konnte eine Zunahme der depletion interaction durch Mizellenbildung des Tensids in der wässrigen Phase erfolgen, wodurch es zu verstärkter Aggregatbildung der Öltröpfchen kommen würde. Diese könnten kanalartige Strukturen bilden, die den finalen Membranporen entsprechen. Je hydrophiler dabei das Lösungsmittel ist, desto mehr hydrophiles Tensid TWEEN<sup>®</sup> 80 löst sich zunächst darin, bevor Mizellen entstehen, was in einem späteren Umschlagpunkt zu einer bikontinuierlichen Struktur resultiert. Modell-Emulsionen zeigten zudem eine unterschiedliche Verteilung von TWEEN<sup>®</sup> 80 in den verschiedenen organischen Phasen. Die Lage der Grenze zwischen Schaumund bikontinuierlicher Struktur erschien somit abhängig von der Hydrophilie des verwendeten organischen Lösungsmittels. Weiterhin würde sich ein Überschuss an Tensid als mögliche dritte Phase nahe der Öltröpfchen äußern, da die Mischung von Agarose und TWEEN<sup>®</sup> 80 als Polymere nicht begünstigt wäre.

Als weiterer strukturgebender Parameter wurde der Einfluss der Lösungsmittel-Menge bei gleichbleibendem Tensid–Lösungsmittel-Verhältnis untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass das Poren–Steggrößen-Verhältnis (P/S) nur durch die vorgegebene Lösungsmittel-Menge gesteuert wird, was der konvektiven Porosität der Membran entspricht und geometrischen Ursprungs ist. Dabei wurde beobachtet, dass die Art des Lösungsmittels irrelevant für das P/S ist, wodurch ein weiterer Steuerparameter für die Struktur der Membran festgelegt werden konnte.

Ein Vergleich mit Literaturdaten ergab die Voraussage einer idealen Membranstruktur bei 2-4 Gew.-% Agarose von Membranstegen mit einem Durchmesser zwischen 2,0 und 3,8  $\mu$ m und von konvektiven Poren mit einem Durchmesser von 2 bis 4  $\mu$ m, um eine angemessene Permeabilität zwischen 40 und 150 mD in der resultierenden Membran zu erreichen.

Die bereits aufgeführten strukturellen Voraussetzungen wurden in Kapitel III für die Herstellung zweier chromatographischer Mixed-Mode Membranen mit unterschiedlicher Agarosekonzentration erfüllt. *N*-Benzyl-*N*-Methylethanolamin (BMEA) wurde auf die Membranen über mehreren Reaktionsschritte gekoppelt, wodurch zwei Ligandendichten rein durch Variation der Agarosekonzentration erzielt werden konnten. Die statische und dynamische Bindungskapazität wurden über *bind & elute* Experimente mit dem Modellsystem  $\gamma$ -Globulin ermittelt. Durch geeignete Bindungs- und Elutionsbedingungen wurde im Vergleich zu den auf identische Weise vermessenen Capto<sup>TM</sup> Adhere Beads eine deutliche Steigerung der Bindungskapazität auf fast 280% durch die Membran erzielt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass durch die hier erzeugte Membranstruktur viel geringere Verweilzeiten bei chromatographischen Mixed-Mode Membranen nötig sind, um die gleiche oder sogar höhere Bindungskapazität zu erreichen wie Beads. Dies führt insgesamt zu einer deutlich höheren Produktivität von der hier designten Membran im Vergleich zu den analogen Beads, da 95% kürzere Prozesszeiten pro Zyklus ohne signifikante Verluste in der Bindungskapazität ermöglicht wurden.

# 5 Materialien und Methoden

# 5.1 Kapitel I - Agarose als chromatographisches Material

### 5.1.1 Chemikalien

Agarose	Bezeichnung	Тур	Hersteller
Litex Agarose 8057-I	Ι	Gelidium	Lonza
Agarose D-5	II	Gelidium	Hispanagar
LSL-4020	III	Gelidium	Lonza
Litex Agarose 8057-II	IV	Gracilaria	Lonza
Litex Agarose 8057-III	V	Gracilaria	Lonza
HSB-LV 2800	VI	Gracilaria	Lonza

Tab. 5.1: Für die Analysen verwendete Agarosen. CAS-Nr. 9012-36-6.

Bezeichnung	CAS-Nr.	Hersteller
ATTO488 Carbonsäure	-	ATTO-TEC
ATTO488 NHS-Ester	-	ATTO-TEC
Immunglobulin G	-	Sartorius Stedim Cellca
Dimethylsulfoxid	67-68-5	Merck
Bovines Serumalbumin	9048-46-8	Sigma-Aldrich
Guanidinhydrochlorid	50-01-1	Sigma-Aldrich
B Agarose Bead Standard	-	Agarose Bead Technologies
Natriumacetat	127-09-3	Merck
Phosphate-buffered Saline (PBS)	-	Chemsolute

Tab. 5.2: Verwendete Chemikalien für Kapitel I.

### 5.1.2 Herstellung von Agarosesolen und -gelen

Für die Untersuchung der chemischen, mechanischen und strukturellen Eigenschaften von Agarose wurden sechs unterschiedliche Agarosen der Hersteller LONZA und HISPANAGAR verwendet, s. Tabelle 5.1. Je nach gewünschter Gewichtskonzentration wurde Agarose in einem verschließbaren Gefäß eingewogen, *reverse-osmosis-water* (ROW) zugefügt und bei 95 °C im Trockenschrank mit gelegentlichem Schwenken gelagert, bis die Agarose vollständig gelöst als Sol vorlag. Die Agarosesole wurden direkt analysiert oder zunächst blasenfrei in hantelförmige Formen gegossen, worin sie 1 h bei Raumtemperatur in Ruhe zum Ausgelieren lagen. Im Anschluss wurden die ausgehärteten Agarosegele im Kühlschank gelagert und weitere Analysen der Gele durchgeführt. Der Steg der Gussform wurde im Folgenden für dynamisch-mechanische Analyse und die Backen für Kryo-REM Aufnahmen verwendet.

### 5.1.3 Bestimmung der Molekulargewichts-Verteilung

Die Molekulargewichts-Verteilung der verwendeten Agarosen wurde über eine Größenaus-schlusschromatographie an einer HPLC Ultimate<sup>TM</sup>3000 der Firma THERMO FISHER SCIENTIFIC mit der Säule PolySep<sup>TM</sup>-GFC-P 5000 300 x 7,8 mm der Firma PHENOMENEX<sup>®</sup> bestimmt. Agarosepulver wurde in dem Laufmittel (2,5 M Guanidinhydrochlorid, 0,05 Gew.-% Natriumazid) mit einer Konzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> bei 95 °C gelöst, auf Raumtemperatur abgekühlt und in

ein HPLC-Gläschen mit einem Minisart<sup>®</sup> RC4 Spritzenvorsatzfilter mit 0,2 µm Porengröße der Firma SARTORIUS filtriert. Die Proben wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,6 mL min<sup>-1</sup> bei 40 °C vermessen. Die Kalibrierung wurde mit Hilfe eines ReadyCal Kit Pullulan-high von PSS POLYMER STANDARD SERVICE im Bereich von 0,180-1220 kg mol<sup>-1</sup> erstellt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm PSS WinGPC UniChrom V 8.32.

### 5.1.4 Bestimmung des Methylierungsgrads der Agarose mittels NMR-Spektroskopie

Zur Probenvorbereitung von Kernspinresonanz-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) wurden 20 mg Agarosepulver in ein NMR Röhrchen (5 mm Durchmesser) abgewogen und mit D<sub>2</sub>O (0,6 mL) aufgefüllt. Das Röhrchen wurde in ein Peltierelement gestellt und solange bei 95 °C temperiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Durch Abkühlen auf Raumtemperatur gelierte die Agarose aus. Für die Aufnahme der NMR Spektren wurde ein Avance III 400 der Firma BRUKER verwendet. Die Probe wurde im Gerät auf 95 °C erhitzt, 20 min temperiert und <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Spektren bei 80 °C und 400 MHz durchgeführt. Mittels heteronuklearem Einzelquantenkorrelationsexperiment (HSQC) konnte nachvollzogen werden, welches <sup>1</sup>H-Signal der Methoxygruppe ( $\delta(-\text{OCH}_3) = 4,01$  ppm) zuzuordnen ist. Durch Integration und Referenz auf das <sup>1</sup>H-Signal des C1  $\beta$ -D-Galactose Kohlenstoffs ( $\delta(-\text{CH}-) = 5,74$  ppm) konnte der Methoxyanteil bzw. Methylierungsgrad ermittelt werden. Dieser beschreibt, wie viele Agaroseeinheiten eine Methoxygruppe tragen bzw. wie viele Monomereinheiten im Schnitt einfach methyliert vorliegen.



Abb. 5.1: <sup>1</sup>H- (links) und <sup>13</sup>C- (rechts) NMR Spektren von Agarose IV in  $D_2O$  bei 400 MHz und 80 °C.

### 5.1.5 Bestimmung des Gel- und Solpunkts

Agarosesole wurden nach Abschnitt 5.1.2 hergestellt. 3 mL der heißen Lösung wurden in eine Makro-Quarzglas-Küvette der Firma HELLMA<sup>®</sup> mit einer Schichtdicke von 1 cm pipettiert und diese in ein UV/Vis-Spekralphotometer SPECORD<sup>®</sup> 200 Plus der Firma ANALYTIK JENA mit eingebautem Peltier-Element gestellt. Das Peltier-Element war zunächst auf 80 °C temperiert und kühlte nach Start der Messmethode die Probe mit 1 K min<sup>-1</sup> bis auf 8 °C ab. Im Anschluss wurde die Probe bei gleicher Geschwindigkeit auf 99 °C aufgeheizt. Während des gesamten Experiments wurde pro Minute eine Messung bei  $\lambda = 400$  nm getätigt. Durch Trübung der Probe beim Gelieren der Agarose nahm die Absorbanz der Messung zu. Der Gel- und Solpunkt wurde jeweils im Wendepunkt der Abkühl- bzw. Aufheizkurve bestimmt.

### 5.1.6 Bestimmung der Viskosität

Die in Abschnitt 5.1.2 hergestellten Agarosesole wurden zur Bestimmung ihrer Viskosität mit einem Spindelviskosimeter RVA Tecmaster der Firma PERKIN-ELMER<sup>®</sup> untersucht. Die Viskosität der Sole wurde bei 80 °C und 60 °C und bei einer Umdrehungszahl von 300 rpm gemessen.

### 5.1.7 Dynamisch–Mechanische Analyse

Zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften wurde eine DMA 242 E Artemis der Firma NETZSCH-Gerätebau verwendet. Die aus Absatz 5.1.2 erhaltenen Gelstücke wurden in einen Cantilever-Probenhalter mit den Maßen 2 x 16 mm eingespannt und die Messung in Wasser mit einer Amplitude von 120 µm, einer Frequenz von 1 Hz und einem Temperaturgradienten von 1 K min<sup>-1</sup> zwischen 10 °C und 60 °C durchgeführt. Der Biegemodul *B'* wurde mithilfe des Auswertungsprogramms NETZSCH Proteus<sup>®</sup> C- Thermal Analysis V 6.1.0 bei 20 °C entnommen.

### 5.1.8 Bestimmung der Agarose-Porenstruktur und -größe mittels Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Agarosegele wurden nach Abschnitt 5.1.2 hergestellt und vom FRAUNHOFER-Institut für Angewandte Polymerforschung in Potsdam mit einem GeminiSEM 300 der CARL ZEISS MICROSCOPY untersucht. Dafür wurde aus den Backen der Hantelform ein ca. 5 mm x 3 mm x 2 mm großes Stück herausgeschnitten, bei -90 °C und < 0.1 Pa gefriergetrocknet und mit Platin besputtert. REM Aufnahmen wurden bei -120 °C und einer Beschleunigungsspannung von 2,3 kV bei 10 kx und 20 kx Vergrößerung mit einem SE2- und InLens-Detektor aufgenommen. Die Bildauswertung erfolgte manuell mit dem Programm ImageJ 1.50e.

### 5.1.9 Bestimmung von Diffusionskonstanten mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

#### 5.1.9.1 Labeling von Immunglobulin G

ATTO-488-NHS-Ester (1,0 mg) wurde in DMSO (0,6 mL) zu einer Konzentration von  $1.7 \,\mathrm{mg}\,\mathrm{mL}^{-1}$  gelöst. Für die Kopplungslösung wurde ein Puffer aus  $1 \times PBS$  (pH = 7,4) und wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,2 M, pH = 9) im Verhältnis 20:1 angesetzt (Puffer 1). IgG in 50 mM NaAc  $(9.5 \text{ mg mL}^{-1}, \text{ pH} = 3.9, 3.87 \text{ mS cm}^{-1}, 316 \mu\text{L})$  sowie der gelöste Farbstoff  $(25 \,\mu\text{L})$  wurden zu Puffer 1 (659  $\mu\text{L})$  gegeben, sodass eine Farbstoffkonzentration von  $3.0 \text{ mg mL}^{-1}$  (1,5 Åq.) und eine IgG-Konzentration von  $0.03 \text{ mg mL}^{-1}$ (1,0 Äq.) in der Kopplungslösung resultierte. Die Lösung wurde über Nacht im Kühlschrank equilibriert. Eine anschließende Aufreinigung der gelabelten IgG Monomere erfolgte chromatographisch an einem HPLC-System 1260 Infinity II der Firma AGILENT mit einer Yarra<sup>TM</sup> SEC-3000 Säule (300 x 7.8 mm) der Firma PHENOMENEX<sup>®</sup>. Die Säule wurde mit 1 x PBS bei 25 °C und einer Geschwindigkeit von 1 mL min<sup>-1</sup> betrieben. Als Vorsäule wurde eine Security-Guard<sup>TM</sup> (4 x 3 mm) verwendet. Das UV/Vis-Signal wurde bei  $\lambda = 220 \,\mathrm{nm}$ und 500 nm überwacht und das Eluat nach einer Retentionszeit von ca. 7-8 min aufgefangen. Der Degree-of-Labeling (DOL) gibt anteilig an, wieviele Farbstoffmoleküle auf einem Protein gekoppelt wurden und wurde über folgende Beziehung photometrisch bestimmt:

$$DOL = \frac{c_{dye}}{c_{prot}} = \frac{A_{max} \epsilon_{prot}}{(A_{280} - A_{max} \operatorname{CF}_{280}) \epsilon_{max}}.$$
(5.1)

Hierbei stehen  $c_{\rm dye}$  und  $c_{\rm prot}$  für die molaren Konzentrationen des Farbstoffs und des Proteins,  $A_{\rm max}$  für die Absorption des gelabelten Proteins bei der Absorptionswellenlänge des verwendeten Farbstoffs ( $\lambda_{\rm max} = 500 \,\mathrm{nm}$  für ATTO-488),  $\epsilon_{\rm max} = 90000$  für den Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs bei seiner  $\lambda_{\rm max}$ ,  $\epsilon_{\rm prot} = 210000$  für den Extinktionskoeffizienten von IgG bei 280 nm und  $A_{280}$  für die gemessene Absorbanz der Farbstoff-Protein-Lösung bei  $\lambda = 280$  nm. Der Korrekturfaktor CF<sub>280</sub> =  $\frac{\epsilon_{280}}{\epsilon_{\text{max}}}$  bei  $\lambda = 280$  nm beträgt für den ATTO-488 Farbstoff CF<sub>280</sub> = 0,09.

Durch die beschriebene Kopplung wurde ein DOL zwischen 0,66 und 1,20 erreicht, dessen starke Schwankung durch Pipettierfehler resultierte. Der gelabelte Antikörper wurde bei T = -18 °C gelagert.

#### 5.1.9.2 Probenvorbereitung

Die zu untersuchenden Proben (Agarosehydrogele oder -beads) wurden mit ROW gespült ( $3 \ge 10 \mod$ ). Das gelabelte IgG wurde aufgetaut und mit  $1 \ge PBS$ verdünnt (c = 30 nM). Die Gele wurden mit einer Rasierklinge auf ca. 5 mm große Stücke zugeschnitten und über Nacht in der verdünnten IgG-Lösung (0,5-1,0 mL je nach Gelgröße und Stückzahl) im Kühlschrank equilibriert. Die Beads wurden zunächst vakuumfiltriert und im Anschluss in der IgG-Lösung ebenfalls bei  $T = 6 \degree C$  equilibriert (ca. 0,1 mL Beads in 1 mL IgG-Lösung). Zur Verhinderung von Adsorption des IgG an der Glasoberläche wurden Objektträger des Typs SuperFrost® der Firma MENZEL und hochpräzisions-Deckgläser der Firma MARIENFELD über Nacht in eine Lösung aus Bovines Serumalbumin (BSA) und ROW (2 Gew.-%) gelegt und im Anschluss vorsichtig mit ROW gespült.

#### 5.1.9.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Nach dem Equilibrieren in der gelabelten IgG-Lösung wurde das mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zu untersuchenden Hydrogel oder Bead auf mit BSA beschichteten Objektträgern positioniert und ein mit BSA beschichtetes Deckglas auf die Probe gelegt. Die FCS Analyse erfolgte mit einem Mikroskop TCS SP8 der Firma LEICA MICROSYSTEMS, welches mit der Software Leica Application Suite X Version 3.5.7.23225 gesteuert wurde. Verwendet wurde ein HC PL APO CS2 63x Wasser-Objektiv von LEICA MICROSYSTEMS. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs erfolgte mit einem Dioden-Laser der Wellenlänge 488 nm. Streulichtbilder wurden mit einem Photomultiplier-Detektor (PMT) und einer Verstärkerspannung von 700 V im Detektionsbereich von 450-500 nm aufgenommen. Fluoreszenzaufnahmen und FCS-Messungen erfolgten mit einem Hybrid-Detektor (HyD) im Detektionsfenster von 510-550 nm und variierenden Verstärkerspannungen. Das Pinhole für die Detektion mit dem HyD wurde auf 530 nm und 1 Airy eingestellt. Alle Bilder wurden in xz-Ebene mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln und einem Zoomfaktor von 1,23 aufgenommen.

Zur Bestimmung des konfokalen Volumens wurde als Kalibrierung eine 30 nM wässrige Lösung von ATTO-488-Carboxy-Säure verwendet und die Diffusionskonstante des Farbstoffs in Lösung als  $D = 400 \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-1}$  angenommen. <sup>[200]</sup> Es wurden für jede Probe mindestens 15 Messpunkte je 90 s Messdauer aufgenommen. Die Messungen wurden für jede Probe an mindestens zwei Tagen wiederholt, um Fehlerquellen auszuschließen, die von äußeren Einflüssen wie Temperatur, Helligkeit oder Luftstößen stammen. Es wurde ein *Fit with Triplet* verwendet, der an die gemessenen Korrelationskurven angepasst wurde, s. Gleichung 5.2. Für die Kalibrierung wurde ein Fit mit einer Spezies gewählt, für die gekoppelten IgG-Lösungen ein Fit mit zwei Spezies (IgG und freier Farbstoff). Messungen, deren Fitfunktionen zu stark von der Korrelationsfunktion abweichen  $(\chi^2 > 10)$ , wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Die aus den Fits bestimmten Diffusionskonstanten wurden gemittelt und die Fehler über die Standardabweichung berechnet.

$$G(\tau) = \left[1 - T + T \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T}\right)\right] \sum_{i=1}^n p_i \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i \kappa^2}\right)^{-\frac{1}{2}}$$
(5.2)

Hierbei stehen T für die Tripletzustandsfraktion,  $\tau_T$  für die Lebensdauer des Triplet-Zustands, n für die Anzahl diffundierender Spezies,  $p_i$  für die Diffusionsamplitude,  $\tau_i$  für die Diffusionszeit einer betrachteten Spezies und  $\kappa = \frac{\omega_{x,y}}{\omega_z}$  für den Strukturparameter des konfokalen Volumens.

# 5.2 Kapitel II - Herstellung einer geeigneten Membranstruktur

### 5.2.1 Chemikalien

Bezeichnung	CAS-Nr.	Hersteller
Agarose D-5	9012-36-6	HISPANAGAR
Polyoxyethylen(20)-sorbitan- monooleat (TWEEN <sup>®</sup> 80)	9005-65-6	Merck
Sorbitan monooleat (Span <sup>®</sup> 80)	1338-43-8	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Hexanol	111-27-3	Alfa Aesar
<i>n</i> -Octanol	111-87-5	AppliChem
<i>n</i> -Nonanol	143-08-8	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Decanol	112-30-1	Merck
<i>n</i> -Octan	111-65-9	Merck
<i>n</i> -Decan	124-18-5	Sigma-Aldrich
2-Heptanol	543-49-7	J&K Scientific
Isopropanol	67-63-0	Merck
Alexa Fluor <sup>TM</sup> 532 NHS-Ester	-	ThermoFisher Scientific
1,4-Butandioldiglycidylether BuDGE	2425-79-8	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	1310-73-2	Carl Roth
Cysteamin	60-23-1	Sigma-Aldrich

Tab. 5.3: Verwendete Chemikalien für Kapitel II.

### 5.2.2 Membranherstellung über Emulsionsverfahren

Für eine typische Herstellung einer Emulsionsmembran wurde ein Agarosegel nach Abschnitt 5.1.2 mit gewünschter Gewichtskonzentration hergestellt. Für die organische Phase wurden das verwendete Lösungsmittel (33 Vol.-%) und die Tenside TWEEN<sup>®</sup> 80 (2,3 Vol.-%) und Span<sup>®</sup> 80 (1,0 Vol.-%) gemeinsam eingewogen und in einem Wasserbad auf 60 °C erwärmt. Die wässrige Phase

in Form von Agarosesol wurde in einem Becherglas vorgelegt (64 Vol.-%) und in einem Wasserbad bei ca. 40 °C positioniert. Durch Zugabe der organischen Phase und Vermischen der beiden Phasen mit einem Dispergierer (T 25 digital ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> der Firma IKA<sup>®</sup>, 20 000 rpm, 10 min) entstand eine meist farblose Emulsionslösung, deren Temperatur bei ca. 70-75 °C gehalten wurde. Die Emulsion wurde auf ein Vlies gegossen, welches auf einem bei 40°C vortemperierten Ziehtisch der Firma SARTORIUS befestigt war. Mit einem Rakel wurde die Emulsionslösung auf dem Trägermaterial verteilt und der Tisch im Anschluss auf < 18 °C abgekühlt, wodurch die Agarose in der Emulsion ausgelierte. Nachdem sich die Emulsion verfestigte, wurde sie samt Trägermaterial vom Ziehtisch genommen und in einem großen Behälter gründlich gespült (20 min fließend ROW, 2 x 10 min Isopropanol, 2 x 10 min ROW: Isopropanol = 1:1, 20 min fließend ROW), wodurch die organische Phase entfernt und die feste Agarosephase mit einer Dicke von üblicherweise 0,3 mm zurückblieb. Aus der Membran wurden runde Stanzlinge mit einem Durchmesser von 47 mm ausgestanzt und in wässriger Isopropanollösung  $(10 \, \text{Gew.-}\%)$  im Kühlschrank gelagert. Für die Mikroskopaufnahmen wurden vor dem Benetzen des Trägermaterials mit Emulsionslösung runde Löcher mit einem Durchmesser von 13 mm ausgestanzt, um unverstärkte Membranproben zu erhalten.

### 5.2.3 Konfokale Laserscanmikroskopie (CLSM)

Für die Analyse der konvektiven Membranstruktur wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop des Typs TCS SPE DM6 der Firma Leica Microsystems<sup>®</sup> verwendet. Die Bildaufnahme geschah mithilfe des Computerprogramms Leica Applications Suite X V 3.5.2.18963 über ein Wasser- (HC PL APO 63X/1.20 W Corr. CS2) oder ein Öl- (HC PL APO 63x/1.40 oil CS2) Objektiv der Firma LEICA MICROSYSTEMS<sup>®</sup>. Das verwendete Immersionsmedium war entweder Wasser (ROW) oder ein Typ F Immersionsöl mit Brechungsindex 1,512 von LEICA MICROSYSTEMS<sup>®</sup>. Die Probe wurde wie in Abschnitt 5.2.3.1 beschrieben mit dem Fluorophor Alexa Fluor<sup>™</sup> 532 NHS-Ester von THERMOFISHER SCIENTIFIC gelabelt. Die Probe wurde auf einem Objektträger der Firma FISHER SCIENTIFIC<sup>TM</sup>(Ultra White Glass;  $75 \times 25 \times 1 \text{ mm}$ ) positioniert und mit einem Deckglas der Firma FISHER SCIENTIFIC<sup>TM</sup> $(20 \times 20 \times 0.25 \text{ mm})$  abgedeckt. Das Fluorophor wurde mit einem Argon–Krypton Laser im Emissionswellenlängenbereich von  $\lambda = 458-591 \,\mathrm{nm}$  angeregt. Die Detektion fand im Bereich von 542-710 nm mittels eines CCD-Detektors bei einem Gain von 700 V statt. Es wurden Bilder in x-y-Ebene i.d.R. mit einer Auflösung von  $512 \times 512$  Pixel

und einem Zoomfaktor von 1,00 aufgenommen. Es wurde ein Stapel von 30-100 Bildern in z-Richtung erstellt und dieser nach 5.2.3.2 ausgewertet.

#### 5.2.3.1 Labeling der Membranproben mit Fluorophor

Um die Membranstruktur mithilfe von Laserscanmikroskopie zu untersuchen, müssen zunächst Fluorophore auf die Oberfläche der Membran gekoppelt werden. Dafür wurde je eine Probe mit einem 13 mm Durchmesser als erstes mit 1,4-Butandioldiglycidylether (0,65 mL, 25 Gew.-% BuDGE in 0.1 M NaOH, 25 °C, 22 h) umgesetzt, um freie Epoxy-Gruppen auf die Membran zu bringen. Nach einem Spülschritt (3 x 15 min ROW), wurde die Probe in eine Cysteamin-Lösung (2 mL, 2 mg mL<sup>-1</sup> in ROW, 25 °C, 2 h) gegeben und schließlich mit ROW gespült (3 x 10 min). Im Folgeschritt wurde der Farbstoff Alexa Fluor<sup>TM</sup> 532 NHS-Ester (532 nm) von THERMOFISHER SCIENTIFIC (1 mL, 10 µg mL<sup>-1</sup> in ROW, 25 °C, 1 h) auf der Probe immobilisiert und mit ROW gespült (3 x 10 min).

#### 5.2.3.2 3D-Strukturanalyse

Die mittels CLSM aufgenommenen Bildstapel wurden mit einer algorithmischen 3D-Strukturanalyse ausgewertet. Über diese Methode werden die einzelnen xy-Aufnahmen binarisiert, um zwischen Poren (schwarz) und Stegen (weiß) zu unterscheiden. Der Schwellenwert wurde dabei über die experimentelle Porosität der Membran vorgegeben. Durch eine dreidimensionale Rekonstruktion der binarisierten Bilder konnte die räumliche Struktur der Membran nachgebildet und über einen Algorithmus Informationen dieser Struktur wie mittlere Porenund Steggröße, spezifische Oberfläche, uvm. berechnet werden. Zitat

#### 5.2.4 Permeabilitätsmessungen

Die Bestimmung von Permeabilitäten erfolgte an einer Durchflussanlage der Firma SARTORIUS. Diese besitzt acht Messzellen (*stainless steel pressure holders*, 200 mL Füllkapazität), welche mit einer Peristaltikpumpe der Typs TC der Firma MEREDOS mit RO-Wasser befüllt wurden. Membranstanzlinge mit einem Durchmesser von 47 mm wurden in die Messzellen eingebracht und mit RO-Wasser befüllt bis ein Druck von 100 mbar erreicht wurde. Das nach dem Öffnen der Messhähne durchlaufende Permeat wurde gewogen und bei Erreichen der gewünschten Zielmasse die Messung gestoppt. Währenddessen wurde die Zeit erfasst. Die Durchflussrate D und die zugehörige Permeabilität P der Membranen wurden über Gleichungen 5.3-5.4 berechnet.

$$D = \frac{C}{t \, p_{\text{bar}} \, A} \tag{5.3}$$

$$P = \frac{D \, p_{\rm bar} \, \eta \, d}{60 \, p_{\rm atm}} \tag{5.4}$$

Hierbei stellt V das aufgefangene Volumen, t die Durchlaufzeit,  $p_{\text{bar/atm}}$  den Druck innerhalb der Messzelle in bar bzw. in atm, A die Fläche der Membran,  $\eta$  die Viskosität der Flüssigkeit und d die Dicke der Membran dar.

### 5.2.5 Bestimmung des Tensidgehalts der organischen Phase

Zur Bestimmung der Konzentration an TWEEN<sup>®</sup> 80 in der organischen Phase einer Modell-Emulsion wurde die Emulsion zunächst in einer 2-16KL Zentrifuge der Firma SIGMA bei 20 °C und 9000 g für 1-4 h zentrifugiert, bis sich beide Phasen zumindest teilweise auftrennten. Die organische Phase wurde mit einer Spritze entnommen und in einer Küvette UV-Cuvette micro der Firma BRAND mit einer Schichtdicke von  $d_{cuv} = 1 \text{ cm}$  mit einem UV/Vis-Spekralphotometer SPECORD<sup>®</sup> 200 Plus der Firma ANALYTIK JENA bei  $\lambda = 234$  und 269 nm nach vorheriger Verdünnung mit dem jeweiligen Lösungsmittel untersucht. Als Referenz diente das reine organische Lösungsmittel. Zuvor wurden Kalibriergeraden der Tensidkonzentration in Isopropanol aufgenommen und daraus der jeweilige Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{234} = 28,7 \text{ Gew.-}\%^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und  $\epsilon_{269} =$ 1,40 Gew.- $\%^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ermittelt. Die Konzentration von TWEEN<sup>®</sup> 80 in der organischen Phase der Emulsion wurde über folgende Beziehung berechnet:

$$c_{\lambda} = \frac{E}{d_{\rm cuv} \,\epsilon_{\lambda} \, a}.\tag{5.5}$$

Hierbei steht E für die Extinktion der Probe und  $a = c/c_{\lambda}$  für die Verdünnung der ursprünglichen Probenkonzentration  $c_{\lambda}$  auf die gemessene Probenkonzentration c.

### 5.2.6 Bestimmung der Grenzflächenspannung zweier Phasen

Zur Ermittlung Grenzflächenspannung zwischen zwei Phasen wurde ein Goniometer OCA 15Pro von DATAPHYSICS INSTRUMENTS verwendet. Dafür wurde eine im Gerät verbaute (500µL) Spritze der Marke HAMILTON<sup>®</sup> mit einer Flüssigkeit befüllt und eine Kanüle der Marke BLABLA mit einem Außendurchmesser von 1,65 mm aufgesetzt. Mit Hilfe der *pendant drop*-Methode konnten Grenzflächenspannungen zwischen zwei flüssigen (a) oder einer flüssigen und einer gasförmigen Phase (b) bestimmt werden. Dafür wurde der Aufbau des Geräts zunächst mit Reinstwasser (Arium<sup>TM</sup>) überprüft. In beiden Fällen wurde ein Tropfen der Flüssigkeit aus der Kanüle in die umgebende Phase abgegeben und der Tensidgehalt in der (äußeren) flüssigen Phase variiert. Im rechten Winkel zur Kanüle befand sich eine Kamera, die den Prozess als Bild oder Video aufzeichnete, welches im Nachgang mit der Software SCA 22 ausgewertet werden konnte. Dafür wurde ein Bild oder Standbild des Videos gewählt, in dem ein noch gerade so an der Kanüle hängender Tropfen zu sehen war. Die Grenzflächenspannung wurde automatisiert vom Gerät nach der Young– Laplace-Gleichung geometrisch berechnet.

Für Szenario (a) wurde die Spritze mit Reinstwasser (Arium<sup>TM</sup>) befüllt und die Kanüle in eine Quartz-Küvette der Marke BLIBLUBB und einer Schichtdicke von 1 cm mit flüssiger organischer Phase getaucht. Die wässrige Phase wurde kontinuierlich über die Kanüle in die organische abgegeben. Die Abgaberate betrug hierbei  $1 \,\mu L \, s^{-1}$ .

Für Szenario (b) blieb die Kanüle an Luft und die Spritze wurde mit einer Flüssigkeit (mit Tensid versetztes organisches Lösungsmittel oder Reinstwasser) befüllt. Das Volumen des Tropfens wurde so gewählt, dass der Tropfen noch an der Küvette hängen blieb (bspw.  $15 \,\mu$ L) und Bildaufnahmen davon gemacht werden konnten.
## 5.3 Kapitel III - Herstellung einer chromatographischen Mixed-Mode Membran

### 5.3.1 Chemikalien

Bezeichnung	CAS-Nr.	Hersteller
1,4-Butandioldiglycidylether (BuDGE)	2425-79-8	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	1310-73-2	Carl Roth
Allylbromid	106-95-6	Sigma-Aldrich-Merck
Brom	7726-95-6	Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat- Pentahydrat	10102-17-7	Carl Roth
$N\text{-}\mathrm{Benzyl}\text{-}N\text{-}\mathrm{Methylethanolamin}$	101-98-4	Sigma-Aldrich
Salzsäure 1M	7732-18-5	Bernd Kraft
Ponceau S	6226-79-5	Carl Roth
$\gamma\text{-}\textsc{Globulin}$ aus Rinderblut	9007-67-1	Sigma-Aldrich
Glycin	56-40-6	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	77-86-1	Carl Roth

Tab. 5.4: Verwendete Chemikalien für Kapitel III.

## 5.3.2 Vernetzung

Für die Vernetzung von Agarosemembranen wurden die Proben (47 mm Durchmesser) mit 1,4-Butandioldiglycidylether (Flottenverhältnis =  $0.5 \,\mathrm{g\,cm^{-2}}$ , 25 Gew.-% BuDGE in 0,25 M NaOH) bei 50 °C für 22 h unter Schwenken umgesetzt. Die Membranen wurden mit ROW (30 min fließend) gespült und anschließend nochmals für 22 h bei 25 °C mit einer frischen Reaktionslösung analog zum vorherigen Vorgehen vernetzt.



Schema 5.1: Reaktion der -OH-Gruppen der Agarose mit BuDGE unter alkalischen Bedingungen. Dargestellt ist der erste Schritt der Vernetzung (Aktivierung). Durch Reaktion des zweiten Epoxids mit einem weiteren Agarosemolekül findet die vollständige Vernetzung statt.

### 5.3.3 Ligandenkopplung

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf jeweils 6 runde Membranstanzlinge mit einem Durchmesser von 47 mm.

#### 5.3.3.1 Allylierung der Agarosemembranen

Die vernetzten Membranen wurden in einer wässrigen NaOH-Lösung (2,0 bzw. 3,0 M, 51,6 g) für 5 min imprägniert. Allylbromid (13,3 g) wurde zur Reaktionslösung hinzugegeben und das Zwei-Phasen-System wurde kräftig bei 25 °C für 24 h geschwenkt. Anschließend wurden die Proben mit ROW (1 x 15 min), mit Isopropanol (3 x 10 min) und mit ROW (30 min fließend) gespült.



Schema 5.2: Reaktion der –OH-Gruppen oder freien Epoxide der Agarose mit Allylbromid unter stark alkalischen Bedingungen.

#### 5.3.3.2 Bromierung der Allylgruppen

Die allylierten Membranen wurden in wässriger Natriumacetat-Lösung (0,6 M, 33 g) vorgelegt. Frisches Bromwasser wurde hinzugegeben bis die Reaktionslösung tieforange gefärbt war. Die Membranen wurden 15 min geschwenkt und das verbliebene Brom wurde mit Natriumthiosulfat-Lösung (5 Gew.-%, Pentahydrat) gequentscht. Die bromierten Membranen wurden mit ROW (1 x 5 min) und EtOH/ROW (20 Gew.-%, 2 x 5 min) gespült und direkt in die BMEA-Reaktionslösung gegeben, siehe Abschnitt 5.3.3.3.



Schema 5.3: Reaktion der Allylgruppen mit Brom.

#### 5.3.3.3 BMEA Kopplung

Für die finale Immobilisierung des Liganden wurde eine wässrig-ethanolische Lösung mit N-Benzyl-N-Methylethanolamin (BMEA) (60 Gew.-% BMEA, EtOH: ROW = w : w = 0,2, 33 g) vorgelegt und der pH-Wert mit wässriger NaOH (0,1 M) auf pH = 12 angepasst. Die bromierten Membranen wurden in die BMEA-Lösung gegeben und bei 50 °C für 20 h geschwenkt. Nach der Reaktion wurden die Membranen mit EtOH/ROW (20 Gew.-% , 3 x 10 min) und ROW (15 min fließend) gespült.



Schema 5.4: Nukleophile Substitution der Bromidgruppen durch BMEA und Erhalt des finalen Liganden.

#### 5.3.3.4 Qualitativer Nachweis einer erfolgreichen Ligandenkopplung

Ein Nachweis des auf der Membran erfolgreich angebrachten Liganden erfolgte über Anfärbung der Membran mit Ponceau S, einem negativ geladenen Farbstoff, der durch die ionische Interaktion mit dem positiv geladenen Liganden eine Rotfärbung der Membran hervorruft. Für den Test wurden einige Spatelspitzen Ponceau S in ROW gelöst, bis die Lösung tiefrot war. Ein Membran-Stanzling (d = 13 mm) wurde in 5 mL dieser Lösung für 30 min unter leichtem Schwenken äquilibriert. Anschließend wurde die Membran mit ROW  $(3 \times 10 \text{ min})$  gespült, bis die Spüllösung farblos blieb. Verblieb die Membran nach dem Spülen mit einer roten Färbung, so waren positive Ladungen auf ihr vorhanden und die Ligandenkopplung erfolgreich, s. Abbildung 5.5.



Schema 5.5: Qualitativer Nachweis der Ligandenkopplung durch Anfärbung der Membran mit Ponceau S. Ohne BMEA-Kopplung wurde keine Färbung erzielt.

### 5.3.4 Bestimmung der Ligandendichte

#### 5.3.4.1 Titration

Zur Bestimmung der Ionendichte bzw. Ligandendichte auf der Membran wurde eine Titrationsmethode an einer Äkta<sup>TM</sup> avant 150 der Firma CYTIVA verwendet. Dafür wurden die modifizierten Membranen in mehreren Lagen in spezielle Gehäuse verbaut, sodass eine Betthöhe von ca. 1 mm resultierte. Die Anströmfläche der Membranmodule lag bei 5 cm<sup>2</sup>. Das Modul wurde mit NaOH (0,1 M) äquilibriert, wodurch eine Absättigung der Ammoniumionen mit OH<sup>-</sup>-Ionen erfolgte. Im Anschluss wurde die Membran mit HCl (10 mM) durchströmt und die Leitfähigkeit des Permeats beobachtet. Durch die Reaktion der Hydronium-Ionen mit Protonen der HCl-Lösung erfolgte erst nach vollständiger Neutralisation der OH<sup>-</sup>-Ionen ein Anstieg der Leitfähigkeit. Die Ionendichte (ID) wurde duch folgenden Zusammenhang berechnet:

$$ID = \frac{\left(\left(V_{ges} - V_{tot}\right) LF_{max} - I_{LF}\right) k}{V_{MV}}$$
(5.6)

wobei  $V_{\text{ges}}$  das Gesamtvolumen an zugegebener HCl-Lösung,  $V_{\text{tot}}$  das Totvolumen der Schläuche und des Gehäuses,  $\text{LF}_{\text{max}}$  die maximal gemessene Leitfähigkeit,  $I_{\text{LF}}$  das Integral der Titrationskurve,  $V_{\text{MV}}$  das Membranvolumen und  $k = 4,15 \,\mu\text{mol}\,\text{cm}\,\text{mL}^{-1}\,\text{mS}^{-1}$  ein Umrechnungsfaktor ist.

#### 5.3.5 Bestimmung der Bindungskapazitäten

#### 5.3.5.1 Statische Bindungskapazität

Zur Ermittlung der statischen Bindungskapazität (SBC) der chromatographischen Membranen wurden je ein Stanzling mit 13 mm Durchmesser in Bindungspuffer (Glycin-NaOH, 20 mM, pH = 8,  $\text{LF} = 40 \,\mu\text{S}\,\text{cm}^{-1}$ ) gespült  $(3 \times 10 \text{ min})$  und in 3 mL einer Protein-Bindungspuffer-Lösung  $(3 \text{ mg mL}^{-1})$  $\gamma$ -Globulin) überführt. Diese wurde 18h bei 25 °C geschwenkt. Zum einen wurde die Proteinkonzentration aus dem Überstand der Lösung bestimmt und zum anderen durch Elution des gebundenen Proteins. Für ersteres wurde die Überstandslösung so verdünnt, sodass ihre Absorbanz <1 betrug. Für die Elution wurde der Membranstanzling nach der Beladung mit Bindungspuffer gespült  $(2 \times 10 \text{ min})$ . Die Proben wurden der Lösung entnommen, vorsichtig abgetupft und in 5 mL Elutionspuffer (Glycin-HCl,  $20 \,\mathrm{mM}$ ,  $\mathrm{pH} = 2.5$ ,  $LF = 2.1 \text{ mS cm}^{-1}$ ) für 1 h geschwenkt. Die Konzentration des  $\gamma$ -Globulins wurde mit einem UV/Vis-Spekralphotometer SPECORD<sup>®</sup> 200 Plus der Firma ANALYTIK JENA bei  $\lambda = 280 \,\mathrm{nm}$  mit Hilfe einer Kalibriergeraden ermittelt. Die SBC über den Überstand  $SBC_{Ue}$  und durch Elution  $SBC_{Eluat}$  ließen sich über folgende Zusammenhänge berechnen:

$$SBC_{Ue} = \frac{V_0 \left( E_0 - E_{Ue} \right) VF}{d \,\epsilon_{280} \, V_{MV}},$$
 (5.7)

$$SBC_{Eluat} = \frac{E_{Eluat} V_{Eluat} c_0}{5 E_0 V_{MV}}.$$
(5.8)

 $E_{0,\text{Ue,Eluat}}$  und  $V_{0,\text{Eluat}}$  definieren hierbei die gemessene Extinktion und das Volumen der Ausgangslösung (0), der Überstandslösung (Ue) und des Eluats (Eluat) und  $c_0$  und  $E_0$  die Ausgangskonzentration und Extinktion des Proteins in der Bindungslösung. d ist in diesem Fall die Schichtdicke der verwendeten Küvette,  $\epsilon_{280}$  der Extinktionskoeffizient des Proteins bei  $\lambda = 280$  nm und VF der Verdünnungsfaktor der gemessenen Lösung.

#### 5.3.5.2 Dynamische Bindungskapazität der Membran

Zur Bestimmung der dynamischen Bindungskapazität (DBC) der Membran wurde eine Äkta<sup>TM</sup> avant 150 der Firma CYTIVA verwendet. Die Mixed-Mode-Membranen wurden analog zu Abschnitt 5.3.4.1 auf 1 mm Betthöhe mit einer

Anströmfläche von 5 cm<sup>2</sup> verbaut. Das Modul wurde mit Bindungspuffer (Glycin-NaOH, 20 mM, pH = 8, LF = 35  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>, 50 mL) äquilibriert und anschließend mit einer  $\gamma$ -Globulin–Bindungspuffer-Lösung (Feed) (1 mg mL<sup>-1</sup>) beladen (1, 5, 10 und 20 MV min). Das UV-Signal bei 280 nm wurde mithilfe eines UV-Detektors hinter der Membranposition gemessen und die Signalintensität in Abhängigkeit des Beladungsvolumens aufgenommen. Nach vollständiger Beladung wurde der Membranstapel mit Bindungspuffer gespült (100 mL) und anschließend eluiert (Glycin-HCl, 20 mM, pH = 2,5, LF = 2,1 mS cm<sup>-1</sup>) und regeneriert. Die dynamische Bindungskapazität bei 100% Bindung errechnet sich wie folgt:

$$DBC_{100\%} = \frac{((V_{ges} - V_{tot}) \ UV_{max} - I_{UV}) \ c_0}{UV_{max} \ V_{MV}}.$$
 (5.9)

Hierbei stellt  $V_{\text{ges}}$  das Gesamtvolumen an zugegebenem Elutionspuffer,  $V_{\text{tot}}$  das Totvolumen der Schläuche und des Gehäuses, UV<sub>max</sub> die maximal gemessene UV-Intensität,  $I_{\text{UV}}$  das Integral der Bindungskurve,  $c_0$  die Proteinkonzentration des Feeds und  $V_{\text{MV}}$  das Membranvolumen dar. Zur Bestimmung der Bindungskapazität bei 10% Durchbruch wird das Beladungsvolumen bei 10% des UV-Ausgangssignals  $V_{10\%}$  genommen:

$$DBC_{10\%} = \frac{(V_{10\%} - V_{tot}) c_0}{V_{MV}}.$$
(5.10)

#### 5.3.5.3 Dynamische Bindungskapazität der Capto<sup>TM</sup> Adhere Beads

Zur Bestimmung der dynamischen Bindungskapazität (DBC) der Capto<sup>TM</sup> Adhere Beads wurde eine Äkta<sup>TM</sup> avant 25 der Firma CYTIVA verwendet. Als Säule diente HiTrap<sup>®</sup> Capto<sup>TM</sup> Adhere mit einem Volumen von 1 mL und einer Betthöhe von 7 mm × 25 mm. Das Modul wurde mit Bindungspuffer (Glycin-NaOH, 20 mM, pH = 8, LF = 40  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>, 50 mL) äquilibriert und anschließend mit einer  $\gamma$ -Globulin–Bindungspuffer-Lösung (1 mg mL<sup>-1</sup>) beladen (2 und 4 CV min). Das UV-Signal bei 280 nm wurde mithilfe eines UV-Detektors hinter der Säulenposition gemessen und die Signalintensität in Abhängigkeit des Beladungsvolumens aufgenommen. Nach 120 mL Beladung wurde die Säule mit Bindungspuffer gespült (50 mL) und anschließend eluiert (Glycin-HCl, 20 mM, pH = 2,5, LF = 2,1 mS cm<sup>-1</sup>) und regeneriert. Die Vorgehensweise zur Berechnung der DBC Werte war identisch zu Abschnitt 5.3.5.2.

## 6 Literaturverzeichnis

- V. Thom, R. Petersen, A. Ley, F. Taft, K. Toeppner, P. Adametz, A. Thiefes, S. Weber, N. Gehrmann, F. Hagemann (Sartorius Stedim Biotech GmbH), S14894EU 2020.
- [2] R. A. Rader, E. S. Langer, *BioProcessing J.* **2014**, *13*, 1–9.
- [3] J. Curling, U. Gottschalk, *Biopharm Int.* 2007, 20, 10–19.
- [4] M. Holzer, *Biopharm. Int.* **2011**, *24*, 48–53.
- [5] J. K. H. Liu, Ann. Med. Surg. 2014, 3, 113–116.
- [6] A. A. Shukla, J. Thömmes, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 253–261.
- [7] A. J. T. George, C. E. Urch, *Diagnostic and therapeutic antibodies*, Vol. 40, Humana Press, Totowa N.J., 2000.
- [8] R.-M. Lu, Y.-C. Hwang, I.-J. Liu, C.-C. Lee, H.-Z. Tsai, H.-J. Li, H.-C. Wu, J. Biomed. Sci. 2020, 27, 1–30.
- [9] D. M. Ecker, S. D. Jones, H. L. Levine, *mAbs* **2015**, *7*, 9–14.
- [10] F. Li, N. Vijayasankaran, A. Y. Shen, R. Kiss, A. Amanullah, *mAbs* 2010, 2, 466–479.
- [11] S. Xu, J. Gavin, R. Jiang, H. Chen, *Biotechnol. Progr.* 2017, 33, 867–878.
- [12] M. Schulze, J. Niemann, R. H. Wijffels, J. Matuszczyk, D. E. Martens, *Biotechnol. Progr.* 2021, e3213.
- [13] G. W. Hiller, A. M. Ovalle, M. P. Gagnon, M. L. Curran, W. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* 2017, 114, 1438–1447.
- [14] C. Chen, H. E. Wong, C. T. Goudar, Curr. Opin. Chem. Eng. 2018, 22, 191–198.
- [15] P. Gronemeyer, R. Ditz, J. Strube, *Bioengineering* **2014**, *1*, 188–212.

- [16] G. Guiochon, L. A. Beaver, J. Chromatogr. A **2011**, 1218, 8836–8858.
- [17] S. Sommerfeld, J. Strube, Chem. Eng. Process. 2005, 44, 1123–1137.
- [18] A. J. G. Carta, Protein Chromatography: A practical guide to good chromatographic data: Process Development and Scale-Up, Wiley-VCH, Weinheim, 2010.
- [19] G. R. Bolton, K. K. Mehta, *Biotechnol. Progr.* 2016, 32, 1193–1202.
- [20] W. Liu, Y. Sun, J. Yu, Q. Chen, Z. Bao, X. Fan, Y. Liang, X. Peng, M. Xian, R. Nian, *Biochem. Eng. J.* **2019**, *142*, 145–152.
- [21] L. Guerrier, I. Flayeux, E. Boschetti, J. Chromatogr. B 2001, 755, 37–46.
- [22] S. Maria, G. Joucla, B. Garbay, W. Dieryck, A.-M. Lomenech, X. Santarelli, C. Cabanne, J. Chromatogr. A 2015, 1393, 57–64.
- [23] J. Pezzini, G. Joucla, R. Gantier, M. Toueille, A.-M. Lomenech, C. Le Sénéchal, B. Garbay, X. Santarelli, C. Cabanne, J. Chromatogr. A 2011, 1218, 8197–8208.
- [24] K. Zhang, X. Liu, J. Pharmaceut. Biomed. 2016, 128, 73–88.
- [25] Y. Yang, X. Geng, J. Chromatogr. A **2011**, 1218, 8813–8825.
- [26] V. Halan, S. Maity, R. Bhambure, A. S. Rathore, *Curr. Protein Pept. Sc.* 2019, 20, 4–13.
- [27] P. Gagnon, Curr. Pharm. Biotechnol. 2009, 10, 434–439.
- [28] Protein Downstream Processing, (Ed.: N. E. Labrou), Springer, Humana, New York, 2021.
- [29] D. Stein, V. Thom, J. Hubbuch, *Biotechnol. Prog.* **2021**, e3230.
- [30] E. Lalli, J. S. Silva, C. Boi, G. C. Sarti, *Membranes* **2019**, *10*, 1–12.
- [31] A. Jungbauer, J. Chromatogr. A 2005, 1065, 3–12.
- [32] E. L. Pfaunmiller, M. L. Paulemond, C. M. Dupper, D. S. Hage, Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, 2133–2145.
- [33] C. Boi, J. Chromatogr. B **2007**, 848, 19–27.

- [34] Screening and optimization of the loading conditions Merck Capto S, (Ed.: GE Healthcare), **2006**.
- [35] Polishing of monoclonal antibodies using Capto adhere ImpRes in bind and elute mode, (Ed.: Cytiva), 2013.
- [36] Protein Purification: Separation by adsorption I: General principles, (Ed.: R. K. Scopes), Springer, New York, 1994.
- [37] G. Chen, U. Umatheva, L. Alforque, H. Shirataki, S. Ogawa, C. Kato, R. Ghosh, J. Membr. Sci. 2019, 590, 117305.
- [38] G. Chen, R. Roshankhah, R. Ghosh, J. Chromatogr. A 2021, 1647, 462167.
- [39] J. Guo, M. Jin, D. Kanani, *Biotechnol. J.* **2020**, *15*, e2000192.
- [40] M. R. Schure, R. S. Maier, J. Chromatogr. A 2006, 1126, 58–69.
- [41] Strategies for Protein Purification Handbook, (Ed.: GE Healthcare), **2010**.
- [42] S. Hall, *Rules of Thumb for Chemical Engineers*, Butterworth-Heinemann, **2017**.
- [43] S. Hofer, A. Ronacher, J. Horak, H. Graalfs, W. Lindner, J. Chromatogr. A 2011, 1218, 8925–8936.
- [44] S. Schweiger, A. Jungbauer, J. Chromatogr. A 2018, 1537, 66–74.
- [45] Tim N. Warner, Sam Nochumson, *Biopharm. Int.* **2003**, *16*, 58–60.
- [46] J. F. Hester, X. Lu, J. D. Calhoun, R. A. Hochstein, E. J. Olson, J. Chromatogr. A 2021, 1654, 462445.
- [47] A. Grönberg, M. Eriksson, M. Ersoy, H. J. Johansson, *mAbs* 2011, 3, 192–202.
- [48] H. Fröhlich, L. Villian, D. Melzner, J. Strube, Chem.-Ing.-Tech. 2012, 84, 905–917.
- [49] S. Rao, *BIOspektrum* **2008**, *14* (2), 178–180.

- [50] S. Vogg, T. Müller-Späth, M. Morbidelli, Curr. Opin. Chem. Eng. 2018, 22, 138–144.
- [51] U. Gottschalk, *Biopharm Int.* **2013**, *8*, 1–46.
- [52] C. Boi, S. Dimartino, Current Organic Chemistry 2017, 21 (17), 1753– 1759.
- [53] N. B. Afeyan, N. F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Varady, S. P. Fulton, Y. B. Yang, F. E. Regnier, J. Chromatogr. A 1990, 519, 1–29.
- [54] P.-E. Gustavsson, P.-O. Larsson, J. Chromatogr. A 1996, 734, 231–240.
- [55] Adrian Ley, *Dissertation*, Georg-August-Universität Göttingen, **2018**.
- [56] Y. W. Chan, T. Kansil, C. M. Ongkudon, Colloid. Polym. Sci. 2017, 295, 2373–2382.
- [57] D. Keith Roper, E. N. Lightfoot, J. Chromatogr. A 1995, 702, 3–26.
- [58] C. Teepakorn, K. Fiaty, C. Charcosset, Processes 2016, 4, 31.
- [59] P. Zucca, R. Fernandez-Lafuente, E. Sanjust, *Molecules (Basel Switzerland)* **2016**, *21 (11)*, 1577–1601.
- [60] M. C. Nweke, R. G. McCartney, D. G. Bracewell, J. Chromatogr. A 2017, 1530, 129–137.
- [61] E. L. Rodriguez, S. Poddar, S. Iftekhar, K. Suh, A. G. Woolfork, S. Ovbude, A. Pekarek, M. Walters, S. Lott, D. S. Hage, *J. Chromatogr.* B 2020, 1157, 122332.
- [62] P. Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 1970, 245, 3059–3065.
- [63] I. Axelsson, J. Chromatogr. A 1978, 152, 21–32.
- [64] L. Zhao, Y. Huang, K. Zhu, Z. Miao, J. Zhao, X. J. Che, D. Hao, R. Zhang, G. Ma, *Eng. Life Sci.* **2020**, *20*, 504–513.
- [65] J. A. Roberts, L. Kimerer, G. Carta, J. Chromatogr. A 2020, 1628, 461444.
- [66] P. O. Larsson (Pharmacia Biotech AB), US005723601A **1998**.

- [67] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, U. Guhr, *Makromolekulare Chemie*, Springer, **1993**.
- [68] H.-G. Elias, Makromoleküle: Chemische Struktur und Synthesen, Wiley-VCH, 1999.
- [69] S. S. Babu, V. K. Praveen, A. Ajayaghosh, Chemi. Rev. 2014, 114, 1973–2129.
- [70] K. Zhang, K. Xue, X. J. Loh, Gels **2021**, 7, 77–93.
- [71] K. P. Nair, V. Breedveld, M. Weck, *Macromolecules* **2008**, *41*, 3429–3438.
- [72] S. Hara, M. Tomono, K. Fukumoto, M. Kubodera, N. Kato, T. Kaneko, T. Toyama, S. Shimizu, H. Ikake, ACS Appl. Polym. Mater. 2020, 2, 5654–5663.
- [73] W. Cui, R. Zhu, Y. Zheng, Q. Mu, M. Pi, Q. Chen, R. Ran, J. Mater. Chem. A 2021, 9, 9706–9718.
- [74] S. Mondal, S. Das, A. K. Nandi, Soft matter **2020**, 16, 1404–1454.
- [75] D. L. O. Wichterle, *Nature* **1960**, *185*, 117–118.
- [76] S. B. Majee, Emerging concepts in analysis and applications of hydrogels, BoD–Books on Demand, 2016.
- [77] J.-Y. Xiong, J. Narayanan, X.-Y. Liu, T. K. Chong, S. B. Chen, T.-S. Chung, J. Phys. Chem. B 2005, 109, 5638–5643.
- [78] B. A. Getachew, S.-R. Kim, J.-H. Kim, Environ. Sci. Technol. 2017, 51, 905–913.
- [79] H. M. Shewan, J. R. Stokes, J. Food Eng. 2013, 119 (4), 781–792.
- [80] S. O. Ebhodaghe, Int. J. Polym. Mater. Po. 2020, 1, 1–18.
- [81] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 5. Emulgatoren, Stabilisatoren, Verdickungs- und Geliermittel, 08.09.2021, 16:08, https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q= &esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwivwLLjxe\_ yAhVKS\_EDHYxQBycQFnoECBIQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.bvl. bund.de%2FSharedDocs%2FDownloads%2F02\_Futtermittel%

2F01\_Zusatzstoffe\_70\_524%2Ffuttermittel\_zusatzstoffe\_ emulgatoren\_stabilisatoren\_verdickungsmittel\_geliermittel. pdf%3F\_\_blob%3DpublicationFile%26v%3D4&usg=AOvVaw3g\_ xBmRuK80eADbR1WX-aR.

- [82] M. Guastaferro, E. Reverchon, L. Baldino, Front. Bioeng. Biotechnol. 2021, 9, 688477.
- [83] Y. Zhang, Z. Deng, D. Lou, Y. Wang, R. Wang, R. Hu, X. Zhang, Q. Zhu, Y. Chen, F. Liu, Anal. Chem. 2020, 92 (11), 7493–7499.
- [84] M. L. C. Rochas, Carbohydr. Polym. 1989, 10, 289–298.
- [85] G. F. R. Armisen, FAO Fish. Tech. Pap. 1987, 288, 1–57.
- [86] I. C. M. Dea, A. A. McKinnon, D. A. Rees, J. Mol. Biol. 1972, 68, 153–172.
- [87] D. A. Rees, *Biochem. J.* **1972**, *1972*, 257.
- [88] P. Zarrintaj, B. Bakhshandeh, I. Rezaeian, B. Heshmatian, M. R. Ganjali, *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 17187.
- [89] N. Pernodet, M. Maaloum, B. Tinland, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 55–58.
- [90] G. Kostorz, *Phase transformations in materials*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, 2001.
- [91] B. Ebeling, Smart Nanohybrids of RAFT Polymers and Inorganic Particles, Springer International Publishing, Cham, 2015.
- [92] B. Tieke, Functional polymers by post-polymerization modification: Concepts, guidelines, and applications, Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [93] J. W. Cahn, J. Chem. Phys. **1965**, 42 (1), 93–99.
- [94] J. W. Cahn, Acta Metall. **1961**, 9, 795–801.
- [95] T. Morita, T. Narita, S.-a. Mukai, M. Yanagisawa, M. Tokita, AIP Adv. 2013, 3 (4), 042128.
- [96] G. H. Michler, Kompakte Einführung in die Elektronenmikroskopie, Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, 2019.

- [97] G. H. Michler, *Electron Microscopy of Polymers*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008.
- [98] Ultramikrotomie in der Materialforschung, (Ed.: Michler, G. H., und Lebek, W.), Hanser, München, 2014.
- [99] Bosi Mao, *Ph.D. Thesis*, Université de Bordeaux, Bordeaux, **2017**.
- [100] Fluorescence microscopy: From principles to biological applications, (Ed.: U. Kubitscheck), Wiley-VCH, Weinheim, 2nd ed., 2017.
- [101] J. G. White, W. B. Amos, M. Fordham, J. Cell Biol. 1987, 105, 41–48.
- [102] A. Diaspro, F. Federici, M. Robello, Appl. Optics **2002**, 41 (4), 685–690.
- [103] Physikalische Chemie, (Ed.: Atkins, Peter W. and de Paula, Julio), Wiley-VCH, Weihnheim, 5th ed., 2013.
- [104] A. Ley, P. Altschuh, V. Thom, M. Selzer, B. Nestler, P. Vana, J. Membr. Sci. 2018, 564 (2), 543–551.
- [105] J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, 3rd ed., 2006.
- [106] Douglas Magde, Elliot Elson, W. W. Webb, Phys. Rev. Lett. 1972, 29 (11), 705–708.
- [107] E. L. Elson, D. Magde, *Biopolymers* **1974**, *13*, 1–27.
- [108] D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb, *Biopolymers* **1974**, *13*, 19–61.
- [109] E. Haustein, P. Schwille, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2007, 36, 151–169.
- [110] S. T. Hess, S. Huang, A. A. Heikal, W. W. Webb, *Biochemistry* 2002, 41, 697–705.
- [111] G. B. O. Krichevsky, Rep. Prog. Phys. 2002, 65, 251–297.
- [112] L. Kisley, R. Brunetti, L. J. Tauzin, B. Shuang, X. Yi, A. W. Kirkeminde, D. A. Higgins, S. Weiss, C. F. Landes, ACS nano 2015, 9, 9158–9166.
- [113] S. Basak, K. Chattopadhyay, Langmuir 2013, 29 (47), 14709–14717.

- [114] N. K. Reitan, A. Juthajan, T. Lindmo, C. Davies, J. Biomed. Optics 2008, 13 (5), 054040.
- [115] A. Saini, L. Kisley, J. Appl. Phys. 2019, 126 (8), 081101.
- [116] A. Vagias, K. Sergelen, K. Koynov, P. Košovan, J. Dostalek, U. Jonas, W. Knoll, G. Fytas, *Macromolecules* 2017, 50, 4770–4779.
- [117] S. P. Zustiak, H. Boukari, J. B. Leach, Soft matter 2010, 6 (15), 3609– 3618.
- [118] J. Ries, P. Schwille, *BioEssays* **2012**, *34* (5), 361–368.
- [119] D. Wöll, RSC Adv. 2014, 4, 2447–2465.
- [120] M. E. Young, P.A. Carroad, R. L. Bell, Biotechnol. Bioeng. 1980, 22, 947–955.
- [121] Diffusion : Mass transfer in fluid systems, (Ed.: E. L. Cussler), Cambridge University Press, Cambridge, 1984.
- [122] A.G. Ogston, B.N. Preston, J.D. Wells, Proc. R. Soc. Lond. Ser. A 1973, 333, 297–316.
- [123] F. Hagemann, P. Adametz, M. Wessling, V. Thom, Journal of chromatography. A 2020, 1626, 461319.
- [124] Franziska Hagemann, *Dissertation*, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, **2021**.
- [125] T. C. Laurent, Biochim. Biophys. Acta 1967, 136(2), 199–205.
- [126] E. M. Johnson, D. A. Berk, R. K. Jain, W. M. Deen, *Biophys. J.* 1995, 68, 1561–1568.
- [127] Y. Yang, Z. Fang, X. Chen, W. Zhang, Y. Xie, Y. Chen, Z. Liu, W. Yuan, Front. Pharmacol. 2017, 8, 287.
- [128] Emulsion Science: Basic Principles, An Overview, (Ed.: J. Bibette, F. Leal-Calderon, V. Schmitt, P. Poulin), Springer, Berlin Heidelberg, 2002.
- [129] Dispersionen und Emulsionen: Eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschließlich der Tonminerale, (Ed.: G. Lagaly, O. Schulz, R. Zimehl), Springer, Berlin, 2013.

- [130] A. Aserin, Multiple emulsions: Technology and applications, John Wiley & Sons, Hoboken N.J., 2008.
- [131] M. Kumar, R. S. Bishnoi, A. K. Shukla, C. P. Jain, Prev. Nutr. Food Sci. 2019, 24 (3), 225–234.
- [132] J. Serna, P. C. Narváez Rincón, V. Falk, V. Boly, M. Camargo, Ind. Eng. Chem. Res. 2021, 60 (14), 5220–5235.
- [133] C. Tan, D. J. McClements, Foods **2021**, 10, 812.
- [134] F. Goodarzi, S. Zendehboudi, Can. J. Chem. Eng. 2019, 97 (1), 281–309.
- [135] P. Taylor, Adv. Colloid Interface Sci. 1998, 75, 107–163.
- [136] F. D. Rumscheidt, S. G. Mason, J. Colloid Sci. 1962, 17, 260–269.
- [137] S. M. Shaban, J. Kang, D.-H. Kim, Compos. Commun. 2020, 22, 100537.
- [138] X. Cui, S. Mao, M. Liu, H. Yuan, Y. Du, Langmuir 2008, 24 (19), 10771–10775.
- [139] I. Kralova, J. Sjöblom, J. Dispers. Sci. Technol. 2009, 30 (9), 1363–1383.
- [140] F. Leal Calderon, T. Stora, O. Mondain Monval, P. Poulin, J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, 72 (18), 2959–2962.
- [141] P. K. P. Richetti, *Physi. Rev. Lett.* **1992**, *68* (12), 1951–1954.
- [142] F. O. s. Asakura, J. Polym. Sci. 1958, 33, 183–192.
- [143] Soft Matter at Aqueous Interfaces, (Eds.: P. Lang, Y. Liu), Springer International Publishing, Cham, 2016.
- [144] J. Bibette, D. Roux, and F. Nallet, Phys. Rev. Lett. 1990, 65 (19), 2470–2473.
- [145] R. P. Borwankar, L. A. Lobob, D. T. Wasanb, Colloids Surf. 1992, 69, 135–146.
- [146] C. Wagner, Z. Elektrochem. **1961**, 65 (7), 581–591.
- [147] M. M. Robins, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2000, 5, 265–272.

- [148] M. A. Ghoush, M. Samhouri, M. Al-Holy, T. Herald, J. Food Engin. 2008, 84 (2), 348–357.
- [149] Z. Li, E. Rodriguez, S. Azaria, A. Pekarek, D. S. Hage, *Electrophoresis* 2017, 38, 2837–2850.
- [150] R. Mallik, D. S. Hage, J. Sep. Sci. 2006, 29 (12), 1686–1704.
- [151] M. Oschatz, L. Borchardt, M. Thommes, K. A. Cychosz, I. Senkovska, N. Klein, R. Frind, M. Leistner, V. Presser, Y. Gogotsi, S. Kaskel, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51 (30), 7577–7580.
- [152] A. Jungbauer, R. Hahn, J. Sep. Sci. 2004, 27, 767–778.
- [153] Stefan Fischer-Frühholz, GIT Labor-Fachzeitschrift **2004**, 2004, 603–605.
- [154] K.H. Gebauer, J. Thömmes, M.R. Kula, Chem. Eng. Sci. 1997, 52, 405–419.
- [155] J. Schwellenbach, P. Kosiol, B. Sölter, F. Taft, L. Villain, J. Strube, *React. Func. Polym.* 2016, 106, 32–42.
- [156] J. Schwellenbach, F. Taft, L. Villain, J. Strube, J. Chromatogr. A 2016, 1447, 92–106.
- [157] R. Freitag, H. Splitt, O.-W. Reif, J. Chromatogr. A 1996, 728, 129–137.
- [158] X. Lu, D. Zhao, Z. Su, Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 2004, 32 (2), 209–227.
- [159] K. Reiter, P. P. Aguilar, V. Wetter, P. Steppert, A. Tover, A. Jungbauer, J. Chromatogr. A 2019, 1588, 77–84.
- [160] R. Liu, Y. Jiang, B. Li, L. Yu, Microfluid Nanofluid 2016, 20 (8), 704.
- [161] K. M. C. Loudon, Ann. Entomol. Soc. Am. 1999, 92 (1), 153–158.
- [162] Henry Darcy, Les fontaines publiques de la ville de Dijon: exposition et application, Victor Dalmont, 1856.
- [163] Marie Haas, *Diplomarbeit*, Universität Stuttgart, Stuttgart, 2012.
- [164] A. Górak, P. Kreis, P. van Beijeren Bergen en Henegouwen, R. Faber, W. Demmer, C. Frerick (Sartorius Stedim Biotech GmbH), US 2011/0272357 A1 2011.

- [165] E. Müller, Chem. Eng. Technol. 2005, 28 (11), 1295–1305.
- [166] Björn Malte Sölter, Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen, 2014.
- [167] T. Kawasaki, J. Chromatogr. A 1991, 544, 147–184.
- [168] F.-M. Chen, G. S. Naeve, A. L. Epstein, J. Chromatogr. A 1988, 444, 153–164.
- [169] L. Wang, W. Wei, Z. Xia, X. Jie, Z. Z. Xia, Trend. Anal. Chem. 2016, 80, 495–506.
- [170] G. Zhao, X.-Y. Dong, Y. Sun, J. Biotechnol. 2009, 144 (1), 3–11.
- [171] A. S. Rosenberg, AAPS J. 2006, 8 (3), E501–E507.
- [172] R. Franco, G. Daniela, M. Fabrizio, G. Ilaria, H. Detlev, Cytotechnology 1999, 29, 11–25.
- [173] M. M. C. van Beers, M. Sauerborn, F. Gilli, V. Brinks, H. Schellekens, W. Jiskoot, *Pharm. Res.* **2010**, *27 (9)*, 1812–1824.
- [174] Antonia Griesz, Bachelorarbeit, Technische Universität Berlin.
- [175] Alina Schmidt, *Bachelorarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen, **2021**.
- [176] E. Murano, R. Toffanin, F. Zanetti, S. H. Knutsen and S. Paoletti, R. Rizzo, *Carbohydr. Polym.* 1992, 18, 171–178.
- [177] A. Gamini, R. Toffanin, E. Murano, R. Rizzo, Carbohydr. Polym. 1997, 304, 293–302.
- [178] F. C. N. Barros, D. C. da Silva, V. G. Sombra, J. S. Maciel, J. P. A. Feitosa, A. L. P. Freitas, R. C. M. de Paula, *Carbohydr. Polym.* 2013, 92, 598–603.
- [179] C. Rochas, M Lahaye, W. Yaphe, Carbohydr. Res. 1986, 148, 199–207.
- [180] J. MACIEL, L. CHAVES, B. SOUZA, D. TEIXEIRA, A. FREITAS, J. FEITOSA, Depaula R., Carbohydr. Polym. 2008, 71, 559–565.

- [181] Workshop on Marine Algae Biotechnology, National Academies Press, Washington D.C., 1986.
- [182] J. Praiboon, A. Chirapart, Y. Akakabe, O. Bhumibhamon, T. Kajiwara, Sci. Asia 2006, 32, 11–17.
- [183] Lonza, Agarose Physical Chemistry, 10.12.2021, 14:45, https://bioscience.lonza.com/lonza\_bs/CH/en/search/?text= agarose+physical+chemistry.
- [184] V. Normand, D. L. Lootens, E. Amici, K. P. Plucknett, P. Aymard, Biomacromolecules 2000, 1 (4), 730–738.
- [185] A. Hayashi, K. Kinoshita, S. Yasueda, Polym. J. 1980, 12 (7), 447–453.
- [186] M. Djabourov, A. H. Clark, D. W. Rowlands, S. B. Ross-Murphy, *Macromolecules* 1989, 22, 180–188.
- [187] J. M. Guenet, Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers, Academic Press, 1992.
- [188] P. Gagnon, R. Nian, D. Leong, A. Hoi, J. Chromatogr. A 2015, 1395, 136–142.
- [189] Anton Paar, Viscosity of Water, 22.09.2021, 15:51, https://wiki. anton-paar.com/en/water/.
- [190] Investigation of Thermo-mechanical Properties of PMMA, 2010.
- [191] Steffen Klumbach, *Dissertation*, Karlsruher Instituts für Technologie, Karlsruhe, **2015**.
- [192] Sara Drechsler, *Bachelorarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen, **2020**.
- [193] A. Maczynski, D. G. Shaw, M. Goral, B. Wisniewska-Goclowska, J. Phys. Chem. Ref. Data 2007, 36 (3), 685–731.
- [194] A. Maczynski, D. G. Shaw, M. Goral, B. Wisniewska-Goclowska, J. Phys. Chem. Ref. Data 2007, 36 (2), 399–443.
- [195] A. Maczynski, D. G. Shaw, M. Goral, B. Wisniewska-Goclowska, J. Phys. Chem. Ref. Data. 2006, 35 (1), 93–151.

- [196] C. Marche, C. Ferronato, J. Jose, J. Chem. Eng. Data 2003, 48 (4), 967–971.
- [197] Hydrocarbons with water and seawater: Part II: Hydrocarbons C8-C36, (Eds.: D. G. Shaw, A. Maczynski, M.-C. Haulait-Pirson, G. T. Hefter), Pergamon Press, Oxford, 1989.
- [198] MAb polishing step development using Capto<sup>™</sup> adhere ImpRes in bindelute mode, Vol. 2014, (Ed.: Cytiva), 2014.
- [199] Capto Adhere Instructions, (Ed.: Cytiva), 2006.
- [200] R. S. Fisher, S. Elbaum-Garfinkle, Nat. Commun. 2020, 11 (1), 4628.

# 7 Anhang

# 7.1 Kapitel I - Agarose



Abb. 7.1: Relative Häufigkeitsverteilungen der Supraporendurchmesser von Agarose I Hydrogelen. Von oben links nach unten rechts: 1, 2, 3, 4, 6 Gew.-% .



Abb. 7.2: Relative Häufigkeitsverteilungen der Subporendurchmesser von Agarose I Hydrogelen. Von oben links nach unten rechts: 1, 2, 3, 4, 6 Gew.-%.

## 7.2 Kapitel II - Herstellung einer geeigneten Membranstruktur



Abb. 7.3: Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser  $d_p$  und  $d_s$  und der spezifischen Oberfläche  $A_{\rm sp}$  der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  in der Emulsion mit Dodecanol.



Abb. 7.4: Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser  $d_p$  und  $d_s$  und der spezifischen Oberfläche  $A_{sp}$  der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_T/v_L$  in der Emulsion mit Nonanol.



Abb. 7.5: Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser  $d_p$  und  $d_s$  und der spezifischen Oberfläche  $A_{sp}$  der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_T/v_L$  in der Emulsion mit Hexanol.



**Abb. 7.6:** Auftragung der experimentell bestimmten Permeabilität der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses  $V_{\rm T}/v_{\rm L}$  in der Emulsion mit Octanol.

# 8 Abbildungsverzeichnis

1.1	Abhängigkeit der dynamischen Bindungskapazität von der Flussrate für Beads und Membranadsorber. Erstellt nach <sup>[48]</sup>
1.2	Darstellung eines porösen Partikels (links) und eines konvektiv– diffusiven Materials (rechts). Der Doppelpfeil stellt die diffusive Weglänge ins Innere des diffusiven Materials (schraffierte Bereiche)
	dar
2.1	Chemisches (links) und physikalisches (rechts) Netzwerk. Orange: Knotenpunkte. Grün: Bereiche stärkerer intermolekularer Wechsel-
2.2	wirkungen
2.2	Chemische Struktur einer Agarose-Einheit: 1,3-verknupfte $\beta$ -D-Galactopyranose und 1.4-verknüpfte 3.6-anhydro- $\alpha$ -L-Galactopyranose 17.
2.3	Exemplarisches Phasendiagramm einer typischen binären Polymer-
	Lösung für den Fall einer UCST als auch einer LCST. Erstellt nach <sup>[91]</sup>
2.4	Phasendiagramm von Agarose in Wasser. Ein erster Sol–Gel-
	Übergang wurde als Quadrate dargestellt, der Verlauf des Trübungspunkts als unausgefüllte Kreise und die Spinodale als ausgefüllte Kreise.
	Erstellt nach <sup>[95]</sup>
2.5	Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops. $^{[98]}$ 23
2.6	Schematischer Aufbau eines einfachen Konfokalmikroskops. Erstellt nach <sup>[100]</sup> 25
2.7	Beispielhafte 2D-Bildaufnahme einer Agarosemembran Grün
	sind fluoreszierende Bereiche
2.8	Als Kugeln dargestellte Zentren der vorzeichenbehafteten Ab-
	standsfunktion, die den lokalen Porendurchmesser innerhalb der
	Membran-3D-Struktur wiedergeben. <sup>[104]</sup> $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 27$
2.9	Farbstoff-markierte Moleküle, die durch das konfokale Detektionsvolumen
	eines CLSM diffundieren und dabei fluoreszieren. $\omega_{x,y}$ und $\omega_z$
	geben den lateralen und axialen Radius des konfokalen Detek-
	tionsvolumens wieder
2.10	Vereinfachte Darstellung zweier Emulsionen: Wasser-in-Ol (W/O)
	und Ol-in-Wasser $(O/W)$

2.11	Zwei adhäsive Emulsionströpfchen (links) mit dem Abstand $h$ zueinander, zwischen denen sich eine flache Tensid-stabilisierte Schicht ausgebildet hat. Das Energiediagramm (rechts) zeigt den Verlauf des Interaktionspotentials in Abhängigkeit vom Abstand	
0.10	h beider Tröpfchen. <sup>[128]</sup>	37
2.12	Verschiedene Interaktionsmodi in der Unromatographie. SEC: Größenausschlusschromatographie, IEX: Ionenaustauschchromatograp HIC: hydrophobe Interaktionschromatographie, AC: Affinitäts-	phie,
	chromatographie	40
2.13	Porose Partikel (links) in einer Säule mit dem Zwischenraumanteil $\epsilon_{\text{ex}}$ und der intrapartikulären Porosität $\epsilon_{\text{in}}$ . Vereinfacht dargestellte Membran mit zylindrischen Poren (rechts) und ihrer konvektiven und diffusiven Porosität $\epsilon_{\text{ex}}$ und $\epsilon_{\text{in}}$ , dem Porendurchmesser $d_{\text{p}}$ , dem Standurchmesser $d_{\text{p}}$ ,	17
2.14	dem Stegdurchmesser $a_s$ und der Membrandicke $L_{eff}$ 4 Durchbruchskurve eines idealen und realen Membranadsorbers. Das Chromatogramm zeigt die relative Substratkonzentration hinter dem chromatographischen Medium in Abhängigkeit des Beladungsvolumens. Die rote Fläche gibt die Bindungskapazität bei 10% Durchbruch wieder, der schraffierte Bereich die DBC	ŧ(
2.15	bei 100% Beladung. Erstellt nach <sup>[166]</sup>	49 51
3.1	<sup>1</sup> H-NMR Spektrum von Agarose IV in D <sub>2</sub> O bei 400 MHz und 80 °C mit den integrierten Signalen $I(-\text{OCH}_3)$ für die Protonen der Methoxygruppe bei $\delta = 4,01$ ppm und $I(-\text{CH}-)$ für die	
3.2	Protonen des C1-Atoms der $\beta$ -D-Galactose bei $\delta = 5,74$ ppm 5 Auftragung des photometrisch bestimmten Gel- (links) bzw. Solpunkts (rechts) sechs verschiedener Agarosen in Abhängigkeit der Agarosekonzentration. Schwarz sind <i>Gelidium</i> -Agarosen, rot	56
3.3	sind <i>Gracilaria</i> -Agarosen	57
3.4	tration bei 80 °C (links) und 60 °C (rechts))	59 er
	Agarosegele in Wasser in Abhängigkeit der Agarosekonzentration	
	bei 20 °C, $\nu = 1$ Hz	50

3.5	Kryo-REM Aufnahmen von Hydrogelen der Agarose I mit 2 Gew	
	$\%$ (links) und 6 Gew $\%$ (rechts) bei $10000\mathrm{x}$ Vergrößerung. Die	
	Bildaufnahmen fanden mit 2.3 kV mittels SE-Detektor statt.	62
3.6	Relative Häufigkeitsverteilungen der Porendurchmesser von Agarose	
	1 Hydrogelen mit 2 Gew% (links) und 6 Gew% (rechts). Oben:	co
27	Pildliche Derstellung der Supre- und Subperen der Ageregehu	03
5.7	drogolo	63
38	Auftragung des mittleren Supraporendurchmessers des	00
0.0	Polymernetzwerks in Abhängigkeit der Agarosekonzentration für	
	alle Agarosen. Die gestrichelte Linie ist ein exponentieller Fit	
	und dient lediglich der Anschauung.	64
3.9	Auftragung des mittleren Subporendurchmessers $d_{sub}$ des Poly-	
	mernetzwerks in Abhängigkeit der Agarosekonzentration für alle	
	Agarosen. Die gestrichelte Linie ist ein exponentieller Fit und	
	dient lediglich der Anschauung.	65
3.10	Skizze der hypothetischen Agarosenetzwerkstruktur durch dessen	
	Bruch in der Probenvorbereitung die Supraporen entstehen	66
3.11	Auftragung der per FCS bei Raumtemperaturen ermittelten	
	Diffusionskonstanten von mit ATTO488 gelabeltem IgG in Aga-	
	rosegelen und -beads gegen die Agarosekonzentration. Die Linien	
	zeigen das auf diese Daten angewandte Ogston-Hagemann-	<u> </u>
0.10	Modell mit $C = 3,7379$ und $C = 2,3761$ .	69
3.12	Auftragung der per FUS ermittelten normierten Diffusionskons-	
	tanten $D/D_0$ bei Raumtemperatur von mit A110488 gelabeitem	
	Subperendurchmesser d . Die durchgezogene Kurve zeigt den	
	modellierten Verlauf der Diffusivität einer starren Kugel in einer	
	flüssigkeitsgefüllten Pore in Abhängigkeit der Porengröße nach	
	Cussler.	70
3.13	Konfokalmikroskop-Aufnahme einer Agarosemembran entstanden	•••
	durch einen Emulsionsvorgang. Die konvektiven Poren der Membran	
	sind hier in schwarz dargestellt, die diffusiven Agarosestege in	
	grün	76
3.14	Konfokalmikroskop-Aufnahmen mehrerer Agarosemembranen	
	nach Emulgieren mit Decanol und verschiedenen volumetrischen	
	Tensid–Lösungsmittel-Verhältnissen $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ . Die grünen Bereiche	
	stellen die diffusiven Agarosestege dar.	78

3.15	Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren	
	konvektiven Poren- und Stegdurchmesser $d_{\rm p}$ und $d_{\rm s}$ und der	
	spezifischen Oberfläche $A_{\rm sp}$ der Membranen in Abhängigkeit des	
	volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ in der	
	Emulsion mit Decanol.	79
3.16	Auftragung der experimentell bestimmten Permeabilität der	
	Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid-Lösungsmitte	el-
	Verhältnisses $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ in der Emulsion mit Decanol	79
3.17	Konfokalmikroskop-Aufnahmen mehrerer Agarosemembranen	
	nach Emulgieren mit Octanol und verschiedenen volumetrischen	
	Tensid–Lösungsmittel-Verhältnissen $V_{\rm T}/v_{\rm L}$ . Die grünen Bereiche	
	stellen die diffusiven Agarosestege dar.	32
3.18	Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren	
	konvektiven Poren- und Stegdurchmesser $d_{\rm p}$ und $d_{\rm s}$ und der	
	spezifischen Oberfläche $A_{\rm sp}$ der Membranen in Abhängigkeit des	
	volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses $V_{\rm T}/v_{\rm L}$ in der	
	Emulsion mit Octanol.	33
3.19	Auftragung der experimentell bestimmten Permeabilität der	
	Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid-Lösungsmitte	el-
	Verhältnisses $V_{\rm T}/v_{\rm L}$ in der Emulsion mit Octanol	33
3.20	Auftragung von $V_{\rm T}/v_{\rm L}$ bei Erreichen der Grenzstruktur in Ab-	
	hängigkeit des verwendeten organischen Lösungsmittels im Emul-	
	sionsprozess	84
3.21	Resultierende Membranstrukturen aus Decan- und Octan-Emulsionen	
	bei $V_{\rm T}/V_{\rm L} = 0.051$ und 0.030.	86
3.22	Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren	
	konvektiven Poren- und Stegdurchmesser $d_{\rm p}$ und $d_{\rm s}$ und der	
	spezifischen Oberfläche $A_{\rm sp}$ der Membranen in Abhängigkeit des	
	volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses $V_{\rm T}/v_{\rm L}$ in der	
	Emulsion mit Decan.	37
3.23	Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren	
	konvektiven Poren- und Stegdurchmesser $d_{\rm p}$ und $d_{\rm s}$ und der	
	spezifischen Oberfläche $A_{\rm sp}$ der Membranen in Abhängigkeit des	
	volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ in der	
	Emulsion mit Octan.	37
3.24	Auftragung der experimentell bestimmten Permeabilität der	
	Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid-Lösungsmitte	el-
	Verhältnisses $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ in Emulsionen mit Decan und Octan.	38

3.25	Auftragung der photometrisch ermittelten mittleren Tensidkon-	
0.20	zentration $c_{\text{TWEEN}_{9,90}}$ in der organischen Phase der Modell-	
	Emulsionen gegen die Kohlenstoffanzahl des Lösungmittels. Der	
	Mittelwert wurde aus $c_{234}$ und $c_{269}$ berechnet.	90
3.26	Auftragung von $V_{\rm T}/v_{\rm L}$ der Grenzstruktur in Abhängigkeit der	
	Löslichkeit $\chi$ des verwendeten organischen Lösungsmittels in	
	Wasser bei 70 °C als Maß der Hydrophilie. $^{[193-197]}$	91
3.27	Auftragung des nötigen $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ an TWEEN <sup>®</sup> 80 in der organischen	
	Phase, um $\sigma = 0$ zu erreichen, in Abhangigkeit des verwendeten	
	für die Grenzregien der Membranstrukturen im Emulsionsprozess	
	angegeben	92
3.28	Auftragung der mittleren konvektiven Poren- $(d_p)$ bzw. Steg-	01
	durchmesser $(d_s)$ von Decanol-Membranen in Abhängigkeit der	
	Menge an organischer Phase $c_{\rm org}$ bei $V_{\rm T}/v_{\rm L} = 11\%$ . Auf der	
	rechten Achse ist das zugehörige Poren–Steggrößen-Verhältnis	
	P/S aufgetragen	97
3.29	$d_{\rm p}$ gegen $d_{\rm s}$ in Abhängigkeit der Porosität $\epsilon_{\rm p}$ für das <i>cubic grid</i>	00
2 20	$model^{[124]}$ nach Hagemann	98
5.50	schiedenen Membranen in Abhängigkeit der Menge an organisch-	
	er Phase com inklusive modellierter Daten nach Hagemann mit	
	und ohne Korrektur.	99
3.31	Kopplung von BMEA an die Agarosematrix durch nukleophile	
	Substitution.	04
3.32	Qualitativer Nachweis der Ligandenkopplung durch Anfärbung	
	der Membran mit Ponceau S. Links: 2,5 Gew% Agarose. Rechts:	<b>.</b>
<u></u>	5,0 Gew% Agarose.	.04
<u> </u>	I itrationsverlauf der Leitfänigkeit LF mit dem Retentionsvolu- mon $V_{\rm c}$ für beide Agarogemenbranen 1	06
3 3/	men $v_{ret}$ für beide Agarosemennbrahen	.00
0.01	mit $\gamma$ -Globulin (20 mM Glycin-NaOH, pH = 8, 1 g L <sup>-1</sup> ) bei RT =	
	3-60 s	.09
3.35	Durchbruchskurven der 1 mL Capto <sup>TM</sup> Adhere Säule mit $\gamma$ -Globulin	
	$(1{\rm g}{\rm L}^{-1}$ in 20 mM Glycin-NaOH, ${\rm pH}{=}8)$ bei RT = 2 & 4 min 1	12

3.36	Auftragung der experimentellen DBC <sub>10%</sub> der 2,5 Gew%igen Agarosemembran und der Capto <sup>TM</sup> Adhere Beads in Abhängig- keit der Verweilzeit. Bindungsbedingungen: $\gamma$ -Globulin (1 g L <sup>-1</sup> ) in 20 mM Glycin-NaOH, pH = 8. Die Literaturdaten für Capto <sup>TM</sup> Adhere beziehen sich auf Messungen mit IgG (25 g L <sup>-1</sup> in 28 mM NaP <sub>i</sub> , pH = 7,75). Die gestrichelte Linie dient der Veranschaulichung. 113
5.1	<sup>1</sup> H- (links) und <sup>13</sup> C- (rechts) NMR Spektren von Agarose IV in $D_2O$ bei 400 MHz und 80 °C
7.1	Relative Häufigkeitsverteilungen der Supraporendurchmesser von Agarose I Hydrogelen. Von oben links nach unten rechts: 1, 2, 3,
7.2	4, 6 Gew%
7.3	4, 6 Gew%
	Emulsion mit Dodecanol
7.4	Auftragung der mittels 3D Strukturanalyse bestimmten mittleren konvektiven Poren- und Stegdurchmesser $d_{\rm p}$ und $d_{\rm s}$ und der spezifischen Oberfläche $A_{\rm sp}$ der Membranen in Abhängigkeit des volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses $V_{\rm T}/V_{\rm L}$ in der
7.5	Emulsion mit Nonanol
7.6	volumetrischen Tensid–Lösungsmittel-Verhältnisses $V_{\rm T}/v_{\rm L}$ in der Emulsion mit Hexanol

# 9 Tabellenverzeichnis

2.1	Allgemeine Definitionen von Begriffen für chromatographische Medien	41
2.2	Definitionen von Begriffen für partikuläre chromatographische	11
	Medien.	41
2.3	Definitionen von Begriffen für integrale chromatographische	
	Medien	42
3.1	Für die Analysen verwendete Agarosen und deren Molekularge-	
	wichte als Zahlen- $\overline{M}_n$ und Massenmittel $\overline{M}_w$ und Polydispersitäten	
	D	55
3.2	Mittels <sup>1</sup> H-NMR bestimmte absolute und auf die Protonenzahl	
	normierte Integrale der Methoxygruppen $I(-\text{OCH}_3)$ , das Integral	
	der Referenzprotonen $I(-CH-) = 1$ und der daraus resultierende	
	Methoxyanteil $x_{OMe}$ .	56
3.3	Verwendete mittlere Porendurchmesser $d_{\rm p}$ und daraus resultierende	
	Volumenanteile $\phi_{\text{CGM}}$ nach $Hagemann^{[124]}$ und $\phi_{c_{\text{Agarose}}}$ nach	
	Gleichung 2.14 für verschiedene Agarosekonzentrationen in Gew	co
<b>∩</b> 4	% und $d_f = 10.5$ nm.	68
3.4	Fur die Grenzstruktur notiges $v_{\rm T}/v_{\rm L}$ und resultierende Poren- und	
	Stegdurchmesser $a_p$ und $a_s$ und spezifische Obernache $A_{sp}$ dieser.	
	Die Feinerangaben für $a_p$ und $a_s$ geben die Standardabweichung	05
35	UV/Vis spoktroskopische Ergebnisse der mittels Zentrifugation	00
0.0	aufgetrennten Emulsionen $E_{rest}$ und $E_{rest}$ sind die gemessenen	
	Extinktionen der organischen Phase bei $234$ nm und $269$ nm	
	und card und care die daraus resultierenden Konzentrationen	
	von TWEEN <sup>®</sup> 80 in der abgetrennten organischen Phase der	
	jeweiligen Emulsion. $a = c/c_{\lambda}$ ist die Verdünnung der Phase.	
	wobei $c$ die Konzentration der gemessenen Lösung und $c_{\lambda}$ die	
	Ausgangskonzentration der organischen Phase ist. $t_{sep}$ gibt die	
	Zeit bis zur Auftrennung beider Phasen wieder.	89

3.6	Die hier verwendeten Lösungsmittel und ihre $V_T/V_L$ im Grenzbereich. ${}^{2V_T}/V_L$ entspricht der doppelten Tensidkonzentration nach Erreichen
	der Grenzstruktur.
3.7	Aus dem <i>cubic grid model</i> (CGM) bestimmte Poren–Steggrößen-
	Verhältnisse $P/S$ für verschiedene Porositäten $\epsilon_{\rm p}$ ohne und mit
	Korrektur $\epsilon'_{\rm p} = \epsilon_{\rm p} + 0.088.$ 99
3.8	Membranparameter für die hergestellten Membranen, die mit
	dem Mixed-Mode Liganden funktionalisiert wurden: Agarosekon-
	zentration $c_{\text{Agarose}}$ , mittlerer Porendurchmesser $d_{\text{p}}$ mit Standardabweichung
	der Verteilung, mittlerer Stegdurchmesser $d_s$ mit Standardabweichung
	der Verteilung, Poren-Steggrößen-Verhältnis $P/S$ und Permeabilität
	P
3.9	Durch Titration bestimmte Ionendichte ID beider Membranen
	durch Berechnung der Differenz des Flächenintegrals der Leitfähigkeit
	$I_{\rm LE}$ von dem verwendeten HCl-Volumen $V_{\rm res}$ abzüglich des Totvolumens
	bezogen auf das Membranvolumen MV. Als Referenz ist die Li-
	gandendichte bezogen auf Säulenvolumen (CV) für den Capto <sup>TM</sup> Adhere-
	Resin laut Hersteller angegeben 106
3 10	SBC Daten für die 25 Gew -%ige Agarosemembran und $\gamma$ -
0.10	Globulin $(3  \text{g L}^{-1})$ in Glycin-NaOH und Tris-HCl Puffer $(20  \text{mM})$
	bei $pH = 8$ und 9. Es erfolgte eine Doppelbestimmung $H_{eff}$
	Aus dem Überstand aus der Elution bestimmt 108
3 11	DBC Daten für die $25 \text{Gew}$ -%ige Agarosemembran und $\gamma_{-}$
0.11	Clobulin (1 g $L^{-1}$ ) in Clycin NaOH Puffer (20 mM $_{\rm D}H - 8$ ) für
	vorschiedene Verweilzeiten BT. Die Fehlerabschätzung bezieht
	sich auf die Auswortung der Daten und gibt nicht die Abweichung
	sich auf die Auswertung der Daten und gibt nicht die Abweichung $110$
2 1 9	$DBC$ Deten für die Capte TM Adhere Beede und $\alpha$ Clobulin (1 g I $^{-1}$ )
0.12	in Chucin NoOH Duffer (20 mM, $pH = 8$ ) für verschiedene Verweilzeiten
	PT Die Fehlersbeshötzung begieht sich auf die Auswertung der
	R1. Die Feinerabschatzung bezieht sich auf die Auswertung der Daten und gibt nicht die Abweichung zu $C/c = 1$ wieden 112
	Daten und gibt ment die Abweichung zu $\gamma/c_0 = 1$ wieder 113
5.1	Für die Analysen verwendete Agarosen. CAS-Nr. 9012-36-6 121
5.2	Verwendete Chemikalien für Kapitel I.
5.3	Verwendete Chemikalien für Kapitel II
5.4	Verwendete Chemikalien für Kapitel III.
## 10 Abkürzungen

A	Fläche
Abb.	Abb.
AC	Affinitätschromatographie
$A_{\rm sp}$	spezifische Oberfläche
B'	Biegemodul
BCA	Bichinonsäure
B&E	bind and elute
BMEA	N-Benzyl- $N$ -Methylethanolamin
BuDGE	1,4-Butandioldiglycidylether
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
с	Konzentration
$\operatorname{CGM}$	cubic grid model
CLSM	confocal-laser-scanning-microscopy
CMC	kritische Mizellenbildungskonzentration
CV	Säulenvolumen
D	Diffusionskonstante
d	Dicke, Durchmesser
δ	chemische Verschiebung, Differenz
Đ	Polydispersität
DBC	dynamische Bindungskapazität
$\Delta G$	Gibbs-Energie
$\Delta H$	Enthalpie
DMA	Dynamisch-Mechanische-Analyse
DNA	Desoxyribonukleinsäure
$d_{\mathrm{p}}$	Porendurchmesser
$\Delta p$	Laplace-Druck
$d_{\rm s}$	Stegdurchmesser
$\Delta S$	Entropie
DOL	degree- $of$ -labeling
E	Extinktion

$\epsilon$	Porosität
$\eta$	dynamische Viskosität
F(t)	Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t$
FCS	$fluorescence\-correlation\-spectroscopy$
$\mathrm{FT}$	flow-through
Gew%	Gewichtsprozent
$G(\tau)$	Korrelation bei der zeitlichen Verschiebung $\tau$
H	Oberflächenkrümmung
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HLB	hydrophilic-lipophilic balance
Ι	Integral, Intensität
ID	Ionendichte
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IgG	Immunglobulin G
J	Teilchenstromdichte
$\kappa$	Strukturparameter
LCST	lower critical solution temperature
LF	Leitfähigkeit
M	Molekulargewicht
m	Masse
mAb	monoklonaler Antikörper
MMC	Mixed-Mode Chromatographie
MV	Membranvolumen
$\overline{M}_w$	Massenmittel
N	Anzahl
$NaP_i$	Natriumphosphat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
ν	Frequenz
$\omega_{x,y,z}$	Radius in $x$ -, $y$ - oder $z$ -Richtung
ω	Massenanteil
O/W	Öl-in-Wasser-Emulsion
P	Permeabilität
p	Druck
P%	Produktivität
PBS	phosphate saline buffer
PE	Primärelektronen
PESU	Polyethersulfon

$\phi$	Polymervolumenfraktion
$\dot{P}/S$	Poren-zu-Steggrößen-Verhältnis
$\stackrel{'}{R,r}$	Radius
ŔĔ	Rückstreuelektronen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
ROW	reverseosmosiswater
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Verweilzeit (engl. residence time)
s.	siehe
SBC	statische Bindungskapazität
SE	Sekundärelektronen
SEC	size exclusion chromatography
$\sigma$	Grenzflächenspannung
T	Temperatur, Tripletzustandsfraktion
t	Zeit
Tab.	Tabelle
au	zeitliche Verschiebung in FCS
$ au_{\mathrm{D}}$	Diffusionszeit
$ au_T$	Triplettzustands-Lebensdauer
$V_{\rm T}/V_{\rm L}$	Tensid–Lösungsmittel-Verhältnis
$T_{\rm g}$	Gelpunkt
$T_{\rm sol}$	Solpunkt
u.a.	unter anderem
UCST	upper critical solution temperature
UV	Ultraviolett
V	Volumen
Vol%	Volumenprozent
Vis	sichtbarer Bereich des Lichts (engl. visual)
W	Arbeit
W/O	Wasser-in-Öl-Emulsion
$x_{\rm OMe}$	Methoxyanteil
z.B.	zum Beispiel

## 11 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Philipp Vana, MBA, der mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchzuführen und die Kooperation mit Sartorius einzugehen. Er unterstützte mich stets in meinen Entscheidungen und ermöglichte mir jederzeit eine unkomplizierte Arbeitsweise und Flexibilität.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Andreas Janshoff für die Übernahme des Korreferats und für die hilfreichen Ideen in den TAC Meetings bedanken.

Ferner richte ich meinen Dank an Dr. Florian Ehlers, der Teil meines Betreuungsausschusses war und mich mit kritischen Fragen zum Nachdenken anregte.

Der gesamten Prüfungskommission danke ich für die Zeit, die sie sich für meine Verteidigung und zum Lesen meiner Arbeit nahm.

Mein größter Dank richtet sich an Dr. Adrian Ley, der mich von Anfang bis Ende mit voller Tat und Kraft unterstützte, Ideenanreize lieferte, mich häufig zum Lachen brachte und auch in schwierigen Zeiten immer ein offenes Ohr und einen guten Ratschlag parat hatte. Danke, dass du dich so stark für mich eingesetzt hast, es hat unfassbar viel Spaß gemacht, mit dir zusammen zu arbeiten!

Danke auch an Dr. Volkmar Thom, in dessen Abteilung ich meine Arbeit schreiben durfte und der mit seinen zum Teil verrückten aber cleveren Ideen und seinem Enthusiasmus einen großen Beitrag zu meiner Arbeitsweise leistete.

Ein herzlicher Gruß geht an meine Bachelorandinnen Antonia Griesz, Sara Drechsler, Sofya Nechunaeva und Alina Schmidt, ohne deren fleißige Arbeit ich nicht halb so viel geschafft hätte.

Außerdem erweise ich meinen Dank der gesamten Abteilung *Purification Materials* bei Sartorius, in der ich viele freundliche und hilfsbereite Gesichter kennengelernt habe. Ein besonderer Dank geht an die Doktorand\*innen der Abteilung, Dr. Franziska Hagemann, Nils Gehrmann und Katharina Thien, für die vielen Gespräche über unsere Membranadsorber und die weitaus lustigeren privaten Erzählungen. Patrick Adametz möchte ich für die vielen Diskussionen und Ratschläge bezüglich verschiedenster mathematischer Modelle danken. Lorenz Aldefeld danke ich für die vielen Antworten im Bezug auf die chromatographische Verfahrenstechnik, die er mir geduldig und mehrfach gegeben hat. André Krause danke ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die FCS-Technik und den Tipps im Umgang mit Proteinen. Danke auch an Dana, Markus, Max und Martin und den Rest des Doktorandenbüros für die vielen heiteren Momente.

Ich möchte mich herzlich bei allen Mitgliedern des AK Vana für die unterhaltsame Zeit bedanken, in der viel gelacht und manchmal auch etwas viel herumgealbert wurde. Dieser Dank gilt insbesondere meinen Kolleg\*innen Dr. Darius Rohleder, Dr. Annika Nitschke, Dr. Judith Rauschendorfer, Dr. Niklas Frerichs, Dr. Torsten Fornefeld und Enno Meyer.

Meinen Eltern danke ich für ihre uneingeschränkte mentale und finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung und für die vielen Ratschläge, ohne die ich häufig vor schwierigen Situationen gestanden hätte.

Auch bei meinen Freunden und meinem Volleyball-Team möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich immer wieder erfolgreich von der Arbeit ablenken konnten und ohne die ich den auftretenden Stress nicht hätte bewältigen können.

Mein letzter, aber nicht weniger großer Dank gilt meinem Freund Darius, mit dem ich fast mein gesamtes Studium verbracht habe und der immer für mich da ist, wenn ich ihn brauche. Danke, dass du so geduldig mit mir bist und mich immer wieder zum Lachen bringst!