

Polymere Oberflächenbeschichtung – eine Methode zur Herstellung von Trägermaterialien für die Biochromatographie

Habilitationsschrift

Von **Dr. Egbert Müller**

Geb. 20.09.1957 in Wilkau-Haßlau, Deutschland

zur Verleihung des akademischen Grades

Doktor habitatus

genehmigt von der Fakultät Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von Guericke-Universität Magdeburg am 06.05.2003.

Gutachterinnen/Gutachter: Herr Prof. A. Seidel-Morgenstern
Herr Prof. U. Reichl
Herr Prof. H. Jennissen

Wissenschaft hat etwas Faszinierendes an sich. So eine geringfügige Investition an Fakten liefert einen so reichen Ertrag an Voraussagen.

Mark Twain (1835-1910)

Vorwort

Mit der stürmischen Entwicklung der Biotechnologie gibt es immer neue Anforderungen an chromatographische Trägermaterialien zur Reinigung von Biomolekülen. Das optimale „Design“ von neuen Trägermaterialien erfordert Kenntnisse von der Funktionsweise der Trennung. Bei chromatographischen Trennungen von Biomakromolekülen laufen aber sehr komplexe Prozesse ab und man hat eigentlich immer zu wenig experimentelle Informationen für eine Beschreibung.

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis meiner experimentellen Arbeiten bei der Fa. Merck KGaA. Ich möchte mich hier nochmals für die Möglichkeit bedanken, diese Ergebnisse zusammenzufassen.

Folgende Personen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen :

Meinen ehemaligen Kollegen von der Fa. Merck KGaA, Herr Dr. habil. L. Britsch, Herr Dr. K.-H. Derwenskus und Herr D. Lubda bin ich für ihre Unterstützung und fachlichen Diskussionen sehr dankbar.

Besonders möchte an dieser Stelle Herrn Prof. W. Müller (emir.) danken. Unter seiner Anleitung habe ich die Technologien der polymeren Oberflächenmodifikation von Trägermaterialien erlernt.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. J. Friedle der Firma TOSOH BIOSEP GmbH, der es mir ermöglichte diese Arbeit neben meiner eigentlichen Tätigkeit anzufertigen.

Hervorzuheben ist auch die Hilfe und freundliche Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Ing. habil. A. Seidel - Morgenstern und Herr Prof. Dr. Ing. U. Reichl von der Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Wesentlich war auch die Unterstützung meiner Frau Heike und meines Sohnes Robert, die viel Geduld und Toleranz in dieser Zeit mit mir zeigten.

Zusammenfassung

Die chromatographische Reinigung von Proteinen aus Fermentationslösungen hat sich von einer in der Anfangszeit mehr empirischen Verfahrensweise zu einer etablierten Technologie entwickelt. Während früher nur die Gewinnung des Proteins (unabhängig von der quantitativen Ausbeute) im Vordergrund stand, wird heute eine maximale Ausbeute bei der Durchführung der großtechnischen chromatographischen Trennprozesse angestrebt.

Das wichtigste Element einer Chromatographieanlage ist das Trägermedium oder das Gel, auf welchem die jeweilige Trennung durchgeführt wird. Das Trägermaterial muss zur Abtrennung eines gewünschten Proteins besonderen Anforderungen genügen:

1. Eine gute Selektivität für das zu Zielprotein
2. Eine ausreichende mechanische Stabilität (Druckstabilität)
3. Chemische Stabilität (insbesondere gegenüber alkalischen Lösungen)
4. Nichtdenaturierende Wechselwirkungen mit Proteinen
5. Eine hohe spezifische Bindungskapazität (auch als dynamische Proteinbindungskapazität bezeichnet)

Die gleichzeitige Erfüllung aller Parameter erscheint nicht möglich, da sich einige dieser Kriterien gegenseitig ausschließen. So ist z.B. ein sehr hydrophiles Gel häufig nicht stabil genug, da der Vernetzungsgrad der Polymerketten untereinander zu gering ist. Die mechanisch stabileren Polystyrol-Divinylbenzolgele sind jedoch zu hydrophob, so dass sie nicht ohne nachfolgende Derivatisierungen, welche die Biokompatibilität erhöhen, zur Reinigung von Proteinen verwendet werden können.

Die dynamische Proteinbindungskapazität von Gelen charakterisiert die Bindungskapazität von Trägermaterialien unter Prozessbedingungen. Sie ist keine Konstante, sondern nimmt mit steigendem linearem Fluss ab. Ursache dafür ist der zeitraubende Diffusionsprozess der Proteine in den Poren. Man verwendet deshalb makroporöse Gele mit mittleren Porendurchmessern von mehr als 100 nm, welche die Diffusion weniger behindern. Doch mit zunehmender Porengröße nimmt auch die verfügbare Oberfläche für die Funktionalisierung mit Liganden ab, wodurch die spezifische Bindungskapazität wiederum einschränkt wird.

Eine Lösung dieser Probleme ist die Kombination eines mechanisch stabilen Trägerpartikels als Kern mit einer hydrophilen Polymerbeschichtung. Die Herstellung solcher Beschichtungen erfordert die Verwendung von speziellen Derivatisierungstechniken: Pfropfpolymerisationen, die von der Geloberfläche gestartet oder zur Geloberfläche übertragen werden können. Vom Autor wurden Polymerisationsverfahren entwickelt, welche die Beschichtung sowohl von Gelen als auch von Membranen mit 2,3-Epoxypropylmethacrylat

ermöglichen. Durch nachfolgende polymeranaloge Reaktionen konnten verschiedene Trägermaterialien hergestellt werden. Ein Teil dieser Gele ist kommerzialisiert.

Polymerbeschichtete Trägermaterialien haben Vorteile gegenüber den nach herkömmlichen Verfahren beschichteten Trägern. Neben der Verbesserung der mechanischen Stabilität kann eine hohe dynamische Bindungskapazität auf einer kleinen Oberfläche realisiert werden. Das ist bei der chemischen Modifikation von Membranen wesentlich, da diese grundsätzlich kleine spezifische Oberflächen besitzen. Durch die polymere Beschichtung der Oberflächen konnten Membranadsorber mit vergleichsweise hoher Bindungskapazität hergestellt werden.

Bei polymermodifizierten Trägermaterialien übernehmen die gebundenen Polymerketten die Funktion eines hydrophilen Spacers. (Ein Spacer unterbindet den Kontakt von Proteinen mit der Oberfläche und erhöht gleichzeitig die Selektivität.) Dadurch erübrigt sich die Einführung des sonst in der Affinitätschromatographie üblichen Spacers mit sechs Kohlenstoffatomen in einer aliphatischen Kette.

Die Herstellung von polymermodifizierten Trägermaterialien erfordert jedoch die Einhaltung bestimmter Randbedingungen bei ihrer Herstellung:

Die Masse des Beschichtungspolymers von polymermodifizierten Trägermaterialien durchläuft ein Optimum und ist eine Funktion der Wechselwirkungen des Basismaterials mit dem Pfropfpolymer. Beim Überschreiten eines Grenzwertes der Masse des Beschichtungspolymers kommt es zur Ausbildung einer porenfüllenden, ionischen Hydrogelstruktur. Dieses ionische Hydrogel ist die Voraussetzung für die Realisierung einer hohen Gleichgewichtsproteinbindungskapazität, da sie eine Adsorption der Proteine im gesamten Porenraum und nicht nur in einer Monolage auf der spezifischen Oberfläche des Sorbens ermöglicht.

Die Geschwindigkeit des Transports von Proteinen in porösen Trägern wird jedoch durch bestimmte Widerstände eingeschränkt. Hierbei handelt es sich um den Einfluss der Reaktionskinetik, der Poren- und Oberflächendiffusion sowie der Filmdiffusion. Die mathematische Beschreibung des Adsorptionsprozesses kann durch komplexe Modelle erfolgen, welche numerisch gelöst werden müssen. Mit entsprechenden Vereinfachungen, wie der Annahme irreversibler Isothermen und von jeweils nur einem bestimmenden Transportmechanismus können einfache analytische Gleichungen abgeleitet werden. Bei der Analyse der Konzentrations-Zeit-Daten im Batchversuch von polymerbeschichteten Ionenaustauscherpartikeln konnte vom Autor gezeigt werden, dass die Porendiffusion der bestimmende Transportmechanismus in einem Hydrogel ist.

Die offene Hydrogelstruktur innerhalb einer Partikelpore behindert die Diffusion von Proteinen mit entgegengesetzter Ladung nicht, schließt aber gleichnamig geladene Proteine aus.

Die dreidimensionale Anordnung der Liganden verkürzt die Diffusionswege in den Poren, was einen schnelleren Transport in den Poren zur Folge hat. Dieses Verhalten trifft allerdings nur für die Batchadsorption zu. Bei der Verwendung polymermodifizierter Trägermaterialien in gepackten Säulen wird die dynamische Bindungskapazität durch die Filmdiffusion der Proteine in der äußeren Polymerhülle der Partikel verschlechtert. Jedoch kann durch eine genaue Abstimmung des Beschichtungsgrades und die Verwendung von sehr hydrophilen Polymeren dieser Effekt klein gehalten werden.

Durch die Verlagerung der Adsorption in den Außenbereich der Partikel mittels polymerer Beschichtungsverfahren kann eine Beschleunigung des Adsorptionsprozesses erreicht werden. Trotz aller Bemühungen gelingt es jedoch nicht die Diffusionsprozesse in Partikeln zu unterdrücken. Somit sind die Möglichkeiten beim „Design“ von porösen Partikeln nahezu ausgeschöpft. Neue Ansätze sind die Verwendung von Trägermaterialien in denen die Transportprozesse konvektiv sind. Das sind Membranen oder monolithische Trägermaterialien.

Vom Autor wurden chemisch-modifizierte Membranen mit hoher Gleichgewichtsbindungskapazität entwickelt. Die dynamische Bindungskapazität dieser Materialien ist unabhängig vom linearen Fluss. Allerdings ist die erfolgreiche Überführung solcher Systeme bisher an technologischen Schwierigkeiten gescheitert. Das betrifft insbesondere die Verfahrenstechnik der Anwendung und die preiswerte Herstellung. Diese Hürden könnten aber in Zukunft überwunden werden. Insgesamt kann festgestellt werden, dass es noch einen beträchtlichen Entwicklungsbedarf bei der Herstellung und Anwendung von Trägermaterialien für die Reinigung von Proteinen gibt und die Anforderungen in Zukunft noch steigen werden.

1	Einführung.....	10
1.1	Der Herstellungsprozeß von biotechnologischen Produkten	11
2	Eigenschaften von Trägermaterialien für die Biochromatographie.....	17
2.1	Kenngößen	17
2.2	Allgemeine Methoden zur Charakterisierung	19
2.3	Dynamische Bindungskapazität	21
2.4	Anpassung der Adsorptionsfläche an die Proteinfläche	27
2.5	Die chromatographische Trennung von niedermolekularen Substanzen im Vergleich zur Proteinreinigung	30
2.6	Stabilitätsverhalten von Proteinen an Grenzflächen	32
3	Polymere Oberflächenmodifikationen von Gelen.....	37
3.1	Die verschiedenen Methoden der Oberflächenmodifikation	37
3.2	Beschichtungsgrad	40
3.3	Beschichtungsgrad und spezifische Oberfläche	41
3.4	Radikalisch initiierte Beschichtungsreaktionen	44
3.5	Analytische Charakterisierung von oberflächengebundenen Polymeren	50
4	Herstellung und Diskussion von polymermodifizierten Trägermaterialien.....	51
4.1	Einführung	51
4.1.1	Reaktionen von Epoxiden	52
4.2	Ergebnisse der polymeren Beschichtung mit Epoxygruppen	53
4.3	Ergebnisse der polymeranalogen Umsetzungen an den Epoxygruppen	58
4.3.1	Diolgruppe	58
4.3.2	Anionenaustauscher	59
4.3.3	Kationenaustauscher	61
4.3.4	Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC)	62
4.3.5	Thiophile Adsorption	63
4.4	Polymere Liganden als Spacer	65
5	Veränderungen der Partikeleigenschaften durch Pfropfpolymerisationen.....	73
5.1	Thermodynamische Beschreibung von Pfropfpolymerisaten	73
5.2	Geometrische Veränderungen der Partikel	81
5.3	Gelfiltrationsbestimmungen des Porenvolumens	85
5.3.1	Rinderserumalbumin	85
5.3.2	Lysozym	87
5.4	Das ionische Hydrogel	90
5.5	Adsorptionsisothermen	92

6	Stofftransport in polymer-beschichteten Trägermaterialien.....	96
6.1	Stofftransportwiderstände in Ionenaustauschern	96
6.1.1	Das Konzept der Rechteckisotherme	98
6.2	Modellgleichungen zur Charakterisierung der Batchadsorption	99
6.3	Ergebnisse	106
6.4	Diskussion	115
6.4.1	Das Reaktionsmodell	115
6.4.2	Anfangsgeschwindigkeiten der Proteinadsorption	116
6.4.3	Oberflächendiffusion und Porendiffusion	118
6.4.4	Das Filmdiffusionsmodell	120
6.4.5	Konzentrationsabhängigkeit der Transportkoeffizienten	121
6.4.6	Porendiffusionskoeffizienten in Abhängigkeit von den Beschichtungsgraden	122
6.4.7	Die Beschleunigung der Diffusion als sterisches Phänomen	124
6.5	Analyse der Durchbruchkurven	127
6.5.1	Ergebnisse	127
6.5.2	Das Konzept der Übertragungseinheiten	133
6.5.3	Modellgleichungen der Durchbruchkurve	134
6.5.4	Berechnung der Übertragungseinheiten	140
6.5.5	Vorausberechnung von Durchbruchkurven mit berechneten Transportkoeffizienten der Batchadsorption	143
6.5.6	Modellierung der Durchbruchkurven unter Berücksichtigung eines zusätzlichen Filmwiderstandes	144
6.6	Zusammenstellung der Ergebnisse	146
7	Modifizierte Membranen für die Biochromatographie.....	147
7.1	Vorteile von Membranadsorbern	147
7.2	Hohlfasermembranadsorber für die Biochromatographie	151
7.2.1	Proteinbindungskapazitäten und Geschwindigkeit der Adsorption von Membranadsorbern	152
7.3	Schnellere Zykluszeiten mit Membranadsorbern	155
8	Methoden	156
8.1	Methoden der chemischen Modifizierung und Charakterisierung	156
8.2	Methoden zur Untersuchung der Massentransfereigenschaften	162
9	Literatur	165
10	Symbole, Abkürzungen, Griechische Symbole.....	182
11	Übersicht der verwendeten Trägermaterialien.....	187

- 12 Physikalisch-Chemische Eigenschaften des Basismaterials Fractogel[®] HW 650 (M) 189
- 13 Datenblatt eines Anionenaustauscher-Hohlfasermoduls..... 190
- 14 Ableitung des Verteilungskoeffizienten von Pfropfpolymeren zwischen
Trägeroberfläche und Lösung (modifizierte Flory-Huggins Beziehung Glg. 5.4).... 191

1 Einführung

Die Biotechnologie ist keine Entwicklung der letzten Jahrzehnte. Betrachtet man die Weinherstellung oder die Herstellung von Käse als biotechnologische Verfahren, so werden die Stoffwechselprozesse von Zellen schon seit 5000 Jahren zur Herstellung von Dingen des täglichen Bedarfs genutzt [1]. Die biokatalytischen Eigenschaften von Zellen ermöglichen die Durchführung von Reaktionen unter schonenden Bedingungen. In den Zellen sind die sogenannten Enzyme die Katalysatoren. Enzyme sind Proteine. Diese sind Homopolymere welche aus 20 essentiellen Aminosäuren aufgebaut sind. Die Synthese der Proteine wird in den Ribosomen jeder Zelle durchgeführt und erfolgt nach einem Programm welches in seinem Muster für alle Organismen gleich ist. Es war deshalb naheliegend Gene von einem Organismus in den anderen zu übertragen. Das gelang erstmalig im Jahr 1973 [2]. Man bezeichnet diese Verfahrensweise als Gentechnik oder Rekombination.

Die Möglichkeiten der Gentechnik sind groß. Es können Proteine von Wirbeltieren in Bakterien oder Hefe gezüchtet werden. Diese Zellen wachsen schneller als körpereigene Zellen und exprimieren größere Mengen eines Zielproteins. Jedoch nicht nur gentechnisch hergestellte Enzyme sind in der Biotechnologie von Bedeutung. Den größten Anteil an gentechnisch erzeugten Produkten machen Antikörper und Peptidhormone, hier zum Beispiel Insulin, aus. Durch gentechnische Verfahren können neue Medikamente gegen bisher nicht heilbare Krankheiten wie die Alzheimersche Krankheit oder bestimmte Arten von Krebs hergestellt werden, welche heute noch nicht zur Verfügung stehen. Während es 1982 nur ein zugelassenes gentechnisch erzeugtes Pharmaprodukt auf dem Markt gab (Insulin) sind es heute 43 und es sind vermutlich etwa 350 in den nächsten zwei Jahren zu erwarten. Neben Pharmaprodukten können auch leistungsfähigere Pflanzen und künstliche Organe hergestellt werden. Die Liste der Vorteile der Gentechnik ist lang. Wenn man das 20. Jahrhundert als das Jahrhundert der Informationstechnik bezeichnet, so ist das 21. Jahrhundert vielleicht dasjenige des Aufbruchs in die Bio- und Gentechnologie [3].

Die Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen ist immer mit einer Reinigung der Produkte verbunden. Erschwerend bei der Isolierung von Produkten aus biologischen Materialien ist die Tatsache, daß die Anzahl der unerwünschten Komponenten häufig größer als 1000 ist und die rekombinanten Proteine nur in sehr verdünnter Form anfallen.

Das erfordert selektive und schnelle Reinigungsverfahren. Chromatographische Verfahren sind sowohl selektiv und schnell als auch schonend und werden deshalb zur Produktisolierung von Proteinen und Peptiden in der Analyse als auch in Produktionsverfahren eingesetzt. In dem Maße wie die Bedeutung der Gentechnologie wächst wird auch die

Bedeutung der chromatographischen Reinigung zunehmen. Die Herstellung von Chromatographiematerialien ist ein mittlerweile etablierter Industriezweig.

Die Trennung und Isolierung von niedermolekularen Verbindungen ist gut untersucht. Die Isolierung von Proteinen ist aber weitaus schwieriger. Zur Lösung aller Trennprobleme ist deshalb eine große Palette von Trägermaterialien erforderlich. Manche Firmen haben mehr als 1000 Produkte in ihren Katalogen [4]. Man kann jedoch der Komplexität der Trennprozesse auch durch ein entsprechendes Design von einigen wenigen ausgewählten Trägermaterialien gerecht werden, so daß diese für viele verschiedene Applikationen gut geeignet sind. Die Entwicklung solcher "Plattformträgermaterialien" war ein Anliegen dieser Arbeit.

1.1 Der Herstellungsprozeß von biotechnologischen Produkten

Die Zielprodukte eines biotechnologischen oder gentechnologischen Produktionsverfahrens sind biologisch aktive Substanzen. Die Herstellung solcher Moleküle erfolgt im Wesentlichen in zwei Stufen: 1. Die Anzucht einer Zellmasse welche das gewünschte Molekül enthält und 2. Die Abtrennung und Reinigung. Der zweite Schritt ist der wichtigste Teil der Herstellung und verursacht die meisten Kosten [5].

Zur Aufreinigung biotechnisch produzierter Produkte können eine Vielzahl unterschiedlicher Chromatographie- und Elektrophoreseverfahren, sowie membranvermittelte- und Phasenseparationsprozesse eingesetzt werden. Das Problem der Proteinreinigung besteht darin, eine einzelne Proteinspezies in seiner nativen, wirksamen Konformation aus einer Vielzahl von Makromolekülen, die alle in ihren Eigenschaften sehr ähnlich sind, abzutrennen. In einer E.coli Zelle können beispielsweise ca. 3000 bis 4000 verschiedene Proteine synthetisiert werden. Aber nur eines dieser Proteine soll isoliert werden.

Proteine sind nicht die einzigen Biomoleküle, die abgetrennt werden müssen. Eine repräsentative Biotrockermasse setzt sich im Durchschnitt wie folgt zusammen [6]:

- Protein 55 %
- RNA 20 %
- DNA 3 %
- Lipide 9 %
- Lipopolysaccharide 3,5 %
- Peptidoglycan 2,5 %
- niedermolekulare Metabolite, Cofaktoren und Ionen ca. 3 %

Der Anteil des Zielproduktes am Gesamtprotein liegt in einer Fermentationslösung oft unter einem Prozent. Folglich müssen Reinigungsschemata erstellt werden, in deren Ergebnis

Anreicherungsfaktoren von 100 bis 10000 erreicht werden. Das Reinigungsregime kann in drei Phasen unterteilt werden:

- Primäraufreinigung
- Feinreinigung
- Endreinigung

Für rekombinante Proteine unterscheiden sich die Primäraufreinigung und Feinreinigung kaum von den entsprechenden Verfahren zur Isolierung nicht rekombinationstechnisch hergestellter Proteine.

Ziel der Primäraufreinigung ist die Gewinnung einer angereicherten Wirkstoffsuspension, entweder aus der Kulturlösung oder nach dem Zellaufschluß. Hier erfolgt eine entscheidende Volumen- und Massenreduktion. Die Entfernung der Zellbruchstücke erfolgt durch Zentrifugation, Filtration und wässrige Zweiphasenverteilungssysteme.

Während der Feinreinigung und in der Endreinigung wird der Wirkstoff durch hochselektive Separationsschritte weiter angereichert beziehungsweise in eine stabile lagerfähige Form überführt. Besonders effektiv sind hierbei chromatographische Methoden [8]. Eine Übersicht über die wichtigsten chromatographischen Verfahren und ihrer Trennprinzipien zeigt Tabelle 1.1:

Tabelle 1.1: Prinzipien von chromatographischen Reinigungsverfahren

Separationstechnik	Physikalisches Trennprinzip	Kapazität
Chromatographie		
Ionenaustausch	Ionenladung	hoch
Größenausschluss	hydrodynamische Volumen	niedrig
Hydrophobe	Hydrophobizität	hoch
Adsorptionen	Oberflächeneigenschaften	mittel
Affinität		
Metallionenaffinität	Koordination (Histidin)	hoch
Thiophile Adsorption	Koordination, Hydrophobizität	mittel
Farbstoffaffinität	spezifische Bindung	mittel
Immunaaffinität-	Antigen-, Antikörper-Reaktion	hoch
Protein A und Protein G	gruppenspezifische Bindung von Antikörpern	hoch

Für einen chromatographischen Trennprozess ist ein sogenanntes Trägermaterial erforderlich. Ein Chromatographiematerial für Ionenaustausch, hydrophobe Chromatographie und Affinität ist folgendermaßen aufgebaut [9]:

1. Ein polymerer poröser Feststoff ist die Grundstruktur. Ist die geometrische Form kugelförmig, bezeichnet man dieses Medium als Gel oder Harz.
2. Ein sogenannter Ligand, d.h. ein Molekül welches mit einem Ende an der Trägeroberfläche befestigt ist und mit dem anderen Ende eine spezifische Adsorption von Molekülen ermöglicht.

Alle chromatographischen Trennverfahren werden in vergleichbarer Weise durchgeführt: Ein Gel oder ein anderes Trägermaterial (es können auch Monolithen, Membranen oder Schwämme sein) wird in eine Glas-oder Kunststoffröhre gefüllt oder in ihr befestigt und eine Lösung wird durchgepumpt. Die Zielprodukte werden gebunden und können mit kompetitiven Lösungen wieder eluiert werden. Sie werden mit geeigneten Detektoren quantitativ und qualitativ bestimmt. Pumpen, Verbindungen, Säulen, Detektoren und Probenaufgabe sowie Probenaufnahme stellen die "Hardware" eines chromatographischen Reinigungsprozesses dar. Das Trägermaterial ist die "Software" und muss auf jeden Trennprozess speziell abgestimmt werden.

Die bevorzugt verwendeten Formen der Trägermaterialien in der industriellen Praxis sind poröse Partikel mit mittleren Größen von 10 bis 300 µm und mit Porendurchmessern von 10 bis 1000 nm.

Ein großer Teil aller Gele wird durch Polymerisationsreaktionen produziert. Im Gegensatz zu technischen Massenpolymerisaten müssen die Reaktionsprodukte hier Kugelform besitzen und können porös sein [10]. Das sind grundlegende Voraussetzungen für Biochromatographiegele. Funktionelle Gruppen können entweder direkt durch die Verwendung geeigneter Monomere oder durch die Herstellung eines Compositgels erfolgen. Ein Composit Trägermaterial verbindet gute Eigenschaften eines Basismaterials mit der Funktionalität einer geeigneten Beschichtung.

Das Syntheseverfahren eines Compositträgers ist zweistufig. Im ersten Schritt wird ein stabiles Basismaterial hergestellt. In einem nachfolgenden Syntheseschritt wird dann ein geeignetes Beschichtungspolymer aufgebracht.

Der prinzipielle Aufbau eines Compositträgers ist in Abbildung 1.1 dargestellt:

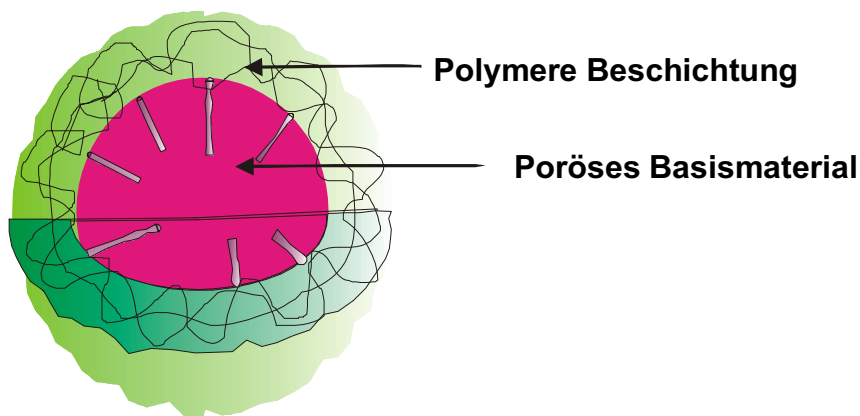


Abb.1.1: Polymer-beschichtetes Partikel (Compositräger)

Die Herstellung und Charakterisierung solcher Gele wurde vom Autor seit 1990 bei der Fa. Merck KGaA durchgeführt.

Die Gele tragen den Handelsnamen Fractogel[®] EMD und einen Zusatz der auf die entsprechende Funktionalität hinweist (z.B. DEAE oder Chelat, entsprechend der Art des Liganden) [11] und den Literaturnamen Tentakelgele[®]. Dieser Begriff wurde aus der Vorstellung abgeleitet, dass auf die Oberfläche eines Trägermaterials Polymerketten gebunden werden bei denen, ähnlich wie an den Fangarmen eines Tintenfisches die Saugnäpfe, die Liganden an den Seitenketten hängen.

Die ersten Gele dieser Familie waren Ionenaustauschermaterialien [12]. Die Technik der Derivatisierung wurde dann auch auf die Herstellung von Affinitätsgelelen, Gelen für die hydrophobe Interaktionschromatographie und die Größenausschlusschromatographie [13] übertragen. Die Technologie ist vom Autor patentiert [1421] und auch in der Literatur dokumentiert worden [22].

Die Herstellung von Compositrägermaterialien ist unabhängig von der geometrischen Form des zu beschichtenden Substrates möglich. Es wurden auch Mikrofiltrationsmembranen polymermodifiziert [23-26]. Membranen haben Vorteile bei der Geschwindigkeit der Adsorption da die Proteine an Membranoberflächen schneller gebunden und desorbiert werden können. Membranadsorber haben auch bezüglich der Zeitökonomie des gesamten Trennprozesses Vorteile, da Äquilibrierungs- und Waschzyklen drastisch verkürzt werden können.

Alle Tentakelgele[®] haben eine hohe Proteinbindungskapazität und eine gute Proteinwiederfindung [27]. Die Ursachen für diese vorteilhaften Eigenschaften wurden bisher nicht ausreichend charakterisiert. Es existieren heuristische Modellvorstellungen, bei denen man annimmt eine Polymerkette sei mit einem Ende auf einer Oberfläche befestigt und das andere Ende sei in Lösung frei beweglich [28]. Dadurch könnte eine Multischichtanordnung von Pro

teinmolekülen auf einer Oberfläche und letztendlich eine hohe Bindungskapazität erreicht werden.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die oben angenommene räumliche Anordnung der Polymerketten nicht die Ursache für eine hohe Bindungskapazität ist, sondern ein ionisches Hydrogel welches in den Trägerporen durch die Polymerisation gebildet wird.

Die experimentelle Voraussetzung dieser Untersuchungen war die definierte Herstellung von polymermodifizierten Trägermaterialien mit Polyglycidylmethacrylat. Die entsprechenden Synthesebedingungen wurden vom Autor erarbeitet. Diese aktivierten Träger (aktivierte Träger sind Gele, die reaktive Liganden tragen) waren die Ausgangsmaterialien für die Herstellung von Ionenaustauschern- als auch anderen Affinitätsträgermaterialien.

Im Rahmen dieser Arbeit wird auch die Möglichkeit aufgezeigt, mittels polymermodifizierter Epoxygele und Membranen eine große Palette von Biochromatographiematerialien herzustellen. Mit einigen ausgewählten Ionenaustauschermaterialien wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in folgende Kapitel:

1. Einführung
2. Eigenschaften von Trägermaterialien für die Biochromatographie
3. Polymere Oberflächenmodifikationen von Gelen
4. Herstellung von polymermodifizierten Trägermaterialien
5. Veränderung der Partikeleigenschaften durch Pfropfpolymerisationen
6. Stofftransport in polymer-beschichteten Trägermaterialien
7. Modifizierte Membranen für die Biochromatographie

In Kapitel 3 werden die Herstellungsmethoden, der vom Autor entwickelten Tentakelgele[®] beschrieben. In Kapitel 5 werden die sterischen Vorteile bei der Bindung von Proteinen der polymermodifizierten Trägermaterialien charakterisiert.

Die Proteinbindungskapazität eines Gels wird auch durch die Wechselwirkungen zwischen Beschichtungspolymer und Basispolymer bestimmt. Im Rahmen einer Analyse mit dem

Flory-Huggins Modell werden im Kapitel 5 Anforderungen an die Struktur des Trägermaterials herausgearbeitet und experimentell charakterisiert.

Besonders wichtige Aspekte zu den Massentransfereigenschaften von partikulären Trägermaterialien zur Trennung von Biomolekülen sind in den Publikationen von Chase [29], Arnold [30], Tsou [31], Graham [32], Yoshida [33], Miyabe und Guichon [34] und Carta [35], [36] zu finden. Als Widerstände des Massentransfers wurden, in diesen Arbeiten, folgende Transportprozesse experimentell untersucht:

1. Gleichgewichtsreaktion zwischen dem Ligand und dem Analyten
2. Filmdiffusion
3. Oberflächendiffusion
4. Porendiffusion

Die Transporteigenschaften von Proteinen in einer chromatographischen Matrix werden sehr wesentlich von deren Struktur und Funktionalität bestimmt [9]. Die Eigenschaften von kommerziell erhältlichen Gelen wurden jedoch bisher nicht systematisch variiert, so dass die funktionelle Abhängigkeit der Transportkoeffizienten von der Derivatisierungschemie bisher nicht untersucht werden konnte. Compositgele sind für solche Untersuchungen sehr gut geeignet, da sich der polymere Beschichtungsgrad leicht variieren lässt. Im Rahmen dieser Arbeit (siehe Kapitel 6) wurde der polymere Beschichtungsgrad von Glycidylmethacrylat auf Fractogel® HW 650 (M) systematisch verändert. Die in dieser Weise polymermodifizierten Gele wurden durch Reaktionen mit Diethylamin und Hydrogensulfit zu Anionen- und Kationenaustauschergelen weiter umgesetzt. Für verschiedene Anionenaustauschergele wurden die Adsorptions-Zeit Kurven und die Durchbruchkurven für Proteine ermittelt. Unter Benutzung von einfachen Modellen für die Transportwiderstände wurden die Koeffizienten bestimmt.

Trotz aller Bemühungen partikuläre Trägermaterialien zu optimieren, ist der Massentransport durch die Diffusion in den Poren limitiert. Trägermaterialien mit konvektivem Transport in den Poren sind z.B. Membranen. Vom Autor wurden Membraradsorber für die Chromatographie entwickelt, die deutliche Vorteile gegenüber den polymermodifizierten Partikeln aufweisen. Darauf wird in Kapitel 7 eingegangen.

Das Ziel der Entwicklung von Trägermaterialien für die Biochromatographie ist eine maximal mögliche und schnell zugängliche Proteinbindungskapazität auf kleinstem Raum. Theoretisch mögliche Bindungskapazitäten sind zur Zeit noch 10 mal höher als die bisher in der Literatur beschriebenen Werte. Die bisher verfügbaren Trägermaterialien haben folglich noch nicht ihr optimales Design. Diese Arbeit soll ein Beitrag zur weiteren Verbesserung von Trägermaterialien für die Biochromatographie sein.

2 Eigenschaften von Trägermaterialien für die Biochromatographie

2.1 Kenngrößen

In der Biochromatographie teilt man die Trägermaterialien bezüglich der Anwendungsbe-
reiche in Gele für analytische Anwendungen und Prozeßgele ein. Die Partikelgrößen von
analytischen Gelen liegen im Bereich von 5-20 µm. Die Gele werden meist in Säulen mit
Durchmessern von < 15 mm gepackt. Beispiele für analytische Trennsäulen sind die MONO
Säulen von Amersham Pharmacia oder die TSK Säulen von TOSOH [4]. Für diese Säulen ist
die Höhe einer theoretischen Trennstufe klein (ca. 2-10 µm). In Abhängigkeit vom Trenn-
mechanismus sind Bodenzahlen von 100 000 pro Meter und mehr möglich. Aufgrund der
kleinen Partikelgröße sind jedoch die Druckabfälle sehr hoch (größer 200 bar). Die
analytische Biochromatographie ist meist eine Hochdruckchromatographie (HPLC).

Bei Produktions- und Prozessanwendungen von chromatographischen Gelen gibt es andere
Anforderungen. In den ersten Reinigungsschritten einer Aufarbeitung von einer
Fermentationslösung muss ein großer Anteil Wasser (ca. 90 %) schnell entfernt werden. Es
kommt deshalb nicht so sehr auf die Anzahl der theoretischen Böden, sondern eher auf den
Durchsatz pro Zeiteinheit an (auch als Produktivität bezeichnet) [37]. Deshalb verwendet
man hier Gele mit Partikelgrößen von 30-300 µm. Die Bodenzahlen sind infolgedessen etwa
um den Faktor 100 kleiner als bei den analytischen Materialien.

Chromatographische Prozessmaterialien werden unter anderem auch für die Herstellung von
therapeutischen Proteinen verwendet. Sie werden als kritische Rohmaterialien betrachtet
und unterliegen bei ihrer Verwendung in entsprechenden Produktionsprozessen strengen
Richtlinien der FDA (Federal Drug Administration Bereich, Center for Biologics Evaluation
and Research) und der EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal
Products).

Die Eigenschaften der Trägermaterialien müssen deshalb von einem Hersteller an diese
Forderungen angepasst werden. Die Herstellung der Gele sollte unter GMP Bedingungen
erfolgen und der DIN ISO Norm 9001 genügen [38], [39].

Bei der Planung der Herstellung sowie der Verwendung eines neuen Trägermaterials sollte
folgender Kriterienkatalog von Parametern beachtet werden [40]:

(Die Werte beziehen sich auf Materialien für die Ionenaustausch-, Hydrophobe-, Affinitäts-
und Gelfiltrationschromatographie):

Tabelle 2.1. *Eigenschaften von chromatographischen Trägermaterialien für die Bioseparation*

Parameter	Werte	Bemerkungen
Partikelgröße	20–300 µm für Prozeßgele	Eine kleine Varianz der Partikelverteilung verringert die Dispersion des Analyten
Porengröße	30–400 nm	Große Poren > 30 nm und eine kleine Varianz der Porenverteilung ist erwünscht
Mechanische Stabilität (Druckstabilität)	Bis ca. 10 bar Druckabfall über die Länge der Säulen	Eine zu kleine mechanische Stabilität führt zu einer irreversiblen Kompression des Säulenbettes
Linearer Fluss	Ca. 600 cm/h	Bei Gelfiltration kleiner, bei Ionenaustausch höher
Chemische Stabilität	Stabil in Natronlauge (1 M), Essigsäure, Salzsäure	Wichtige Forderung, trifft jedoch für manche Affinitätsgele (z.B. Protein A) nicht zu
Dynamische Bindungskapazität	Vom Zielmolekül abhängig, jedoch möglichst hoch, bei Ionenaustauschern ca. 100 mg/ml für ein Protein mit einer Molmasse < 100 KDa	Die dynamische Bindungskapazität wird unter Prozessbedingungen bestimmt
Wiederfindung (recovery) für ein Biomakromolekül	Bilanzgröße : charakterisiert die Wiederfindung der Masse und der Aktivität eines Biomakromoleküls für ein gegebenes Trägermaterial	Diese Größe wird ebenfalls unter Anwendungsbedingungen ermittelt, sie charakterisiert die Reversibilität des Bindungsprozesses und die Eignung des Trägermaterials für den Reinigungsprozess
Eluierbare Bestandteile	Unter Elutionsbedingungen oder bei Rezirkulation aus dem Gel austretende Bestandteile	Charakterisiert die chemische Stabilität des Gels

2.2 Allgemeine Methoden zur Charakterisierung

Bei der Entwicklung und analytischen Charakterisierung von Trägermaterialien für die Biochromatographie werden hauptsächlich die folgenden experimentellen Methoden angewendet [41] (bezüglich der Einzelheiten der analytischen Methoden muss auf die Fachliteratur verwiesen werden z.B. [195]):

1. Elementaranalyse

Bestimmung des Stickstoff, Phosphor- und Schwefelgehaltes zur Ausbeuteberechnung bei der chemischen Modifizierung von Trägeroberflächen mit Liganden.

2. Total Organic Carbon (TOC)

Mit dieser Methode wird die abgelöste oder ausgewaschene Menge von Gelbestandteilen aus Eindampfrückständen von Stabilitätsuntersuchungen oder Extraktionen bestimmt.

3. Titrationsen

Die wichtigsten Titrationsmethoden sind die Säure-Base Titration von ionischen Liganden oder immobilisierten Affinitätsliganden (Amino- oder Epoxygruppen).

4. Sonstige eluierbare Bestandteile

Die Bestimmung wird meist in folgender Weise durchgeführt:

Eine vorher bekannte Gelmengen wird in eine Säule gepackt und eine wässrige Salzlösung oder ein Lösungsmittel (z.B. Ethanol) wird eine definierte Zeit im Kreislauf durch das Bett gepumpt.

Die Zirkulationslösung wird eingedampft und meist mit Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektroskopie (GC-MS) und /oder TOC weiter charakterisiert.

5. Stabilitätsuntersuchungen

Durchführung der Methode:

Gelaliquote werden in Natronlauge verschiedener Konzentration oder entsprechenden Säuren beziehungsweise bestimmten Lösungen gelagert (häufig werden Stabilitäten in

den folgenden Lösungen benötigt: 3 M Kochsalz, Essigsäure bis 50 %, 0,1 M Salzsäure, 6 M Harnstoff, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, Ethanol bis 70 %, Isopropanol bis 50 % oder 5 % Natriumhyperchloritlösung). Es sind auch Kombinationen der verschiedenen Lösungen möglich. Zu bestimmten Zeitpunkten werden Proben genommen. Die Lösungen werden einrotiert und mit GC-MS sowie TOC weiter charakterisiert.

6. Partikelgrößenbestimmungen

Die Partikelgrößenverteilung kann mittels Nasssiebverfahren oder wie heute allgemein üblich mittels Coulter-Counter Messungen über die Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit einer durchströmten Messkapillare in Abhängigkeit von der Partikelgröße bestimmt werden.

7. Bestimmungen der Porengröße

Die Bestimmung der Porengrößen von polymeren Trägermaterialien wird meist mittels Vergleichsmessungen durchgeführt. Durch Gelfiltration mit wasserlöslichen Polymeren mit genau bekannter Molmassenverteilung kann die Ausschlussgrenze bestimmt und unter Verwendung von halbempirischen Beziehungen eine angenäherte Porengröße ermittelt werden.

Genauere Werte liefert die Quecksilberporosimetrie, welche jedoch mit einem vorher getrockneten Gel durchgeführt werden muss und deshalb nur bedingt eine Korrelation zum gequollenen, wässrigen Zustand ermöglicht.

8. Bestimmung der spezifischen Oberfläche

Die Bestimmung der spezifischen Oberfläche erfolgt mittels Stickstoffadsorption nach dem Verfahren von Brunauer-Emmett-Teller (BET).

9. Bodenzahlbestimmung

Diese Methode gestattet die Charakterisierung der Qualität der Packung einer fertigen chromatographischen Säule. Sie wird meist mittels einer nicht retardierten Substanz durchgeführt (Salz oder Lösungsmittel).

Eine Methode der Bestimmung der Bodenzahl einer gepackten Säule ist die isokratische Elution von Aceton und die näherungsweise Berechnung der Bodenzahl nach der

Formel[42]:

$$N_B = 5,54 \cdot \left(\frac{V_R}{V_{E,0.5}} \right)^2 \quad 2.1$$

N	Anzahl der theoretischen Böden
V_R	Retentionsvolumen von Aceton [ml]
$V_{E,0.5}$	Peakvolumen in halber Peakhöhe [ml]

10. Die Batchproteinbindungskapazität oder Gleichgewichtsbindungskapazität (Q_{max})

Die Gleichgewichtskapazität wird durch Batchadsorption einer Proteinlösung an eine definierte Menge Trägermaterial bestimmt (siehe Kapitel 11).

11. Die dynamische Proteinbindungskapazität (Q_b)

Die dynamische Proteinbindungskapazität wird durch kontinuierliche Beladung einer Adsorbersäule mit einer Protein-Pufferlösung vorgegebener Konzentration bis zum Durchbruch durchgeführt. Nach erfolgtem Durchbruch wird mit Pufferlösung nachgewaschen und das gebundene Protein anschließend mit einem geeigneten Elutionsmittel (für Ionenaustauschergele meist 1 M Kochsalz in Pufferlösungen) desorbiert.

Von allen angeführten Parametern ist die dynamische Proteinbindungskapazität die weitaus wichtigste Größe. Ihre Bedeutung wird im folgenden Kapitel näher charakterisiert.

2.3 Dynamische Bindungskapazität

Die Chromatographie kann definiert werden [42] als: „...ein physikalisch chemischer Trennvorgang bei dem die zu trennenden Komponenten zwischen zwei Phasen verteilt werden, von denen die eine, die stationäre Phase festliegt, während die andere, die mobile Phase sich in eine bestimmte Richtung bewegt“ (Abb. 2.2).

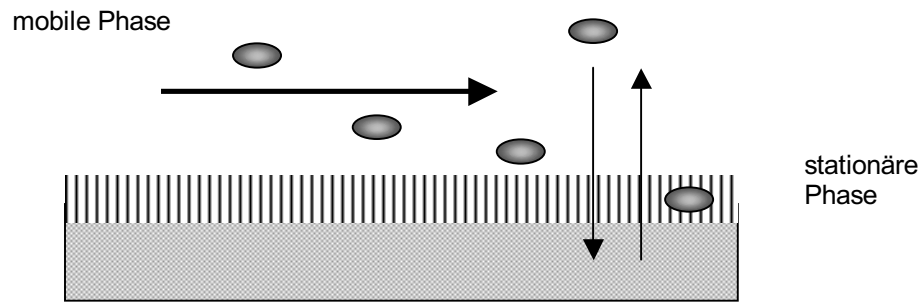


Abb. 2.2: Der chromatographische Trennprozess

Unter stationären Bedingungen ist eine chromatographische Trennung ein Adsorptionsprozess, der durch die Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der stationären Phase bestimmt wird. Ein geeignetes Trägermaterial sollte eine möglichst hohe spezifische Gleichgewichtsbindungskapazität für den Analyten haben, da nur so ein Trennprozess sinnvoll ist. Es ist aber zusätzlich wichtig, dass die Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Analyt nicht zu stark ist, da sonst eine Desorption der gebundenen Verbindungen nur unter drastischen Bedingungen möglich ist. Das ist insbesondere bei empfindlichen biologischen Substanzen unerwünscht, da dies zum Verlust der biologischen Eigenschaften führen kann [33]. Die Wechselwirkung des Analyten mit dem Liganden muss deshalb genau abgestimmt werden.

Unter der Annahme eines Gleichgewichtszustandes für die Verteilung der Konzentrationen eines Analyten in Lösung und gebundene an einen Liganden an der Trägeroberfläche,



erhält man mit dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{a_{A-L}}{a_A \cdot a_L} \quad 2.3$$

wobei

- K_A Assoziationskonstante
- K_D Dissoziationskonstante
- a_{A-L} Gleichgewichtsaktivität des Analyten-Liganden Komplexes
- a_L Gleichgewichtsaktivität des Liganden
- a_A Gleichgewichtsaktivität des Analyten

Die Gleichgewichtsaktivitäten werden gewöhnlich durch die Gleichgewichtskonzentrationen näherungsweise ersetzt. Das kann fehlerhaft sein, da es bei hohen Proteinkonzentrationen zu nicht zu vernachlässigenden Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen kommt. Zum Erzielen einer dynamischen Bindungskapazität von ca. 0,5 mg/ml bis 200 mg/ml Protein sind bestimmte Werte der Gleichgewichtskonstanten erforderlich. Die folgende Darstellung zeigt die Größenordnungsbereiche der Gleichgewichtskonstanten für verschiedene Chromatographiemethoden der Bioseparation [44]:

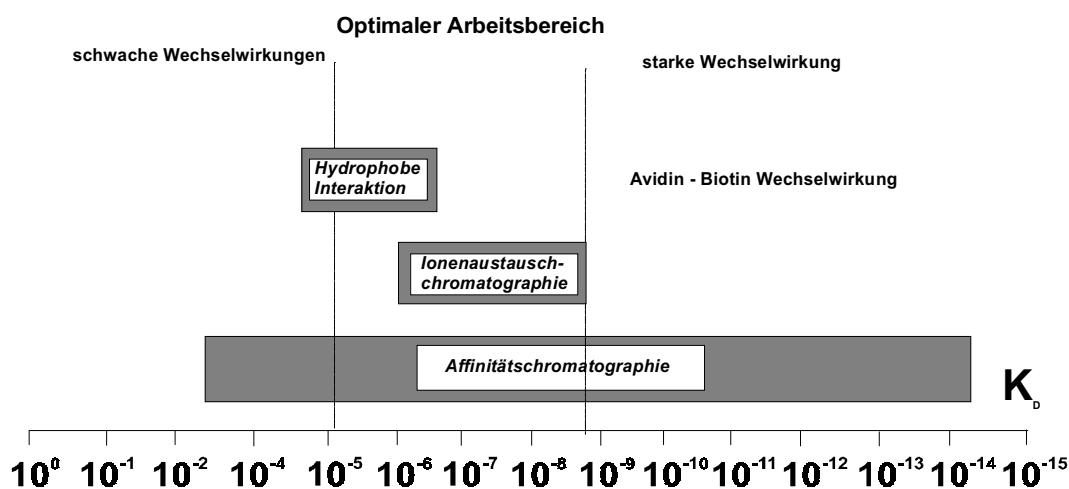


Abb. 2.3: Größenordnungen der Gleichgewichtskonstanten K_D in der Biochromatographie

Die Affinitätschromatographie ermöglicht durch ihr großes Repertoire an verwendeten Liganden eine Variation der Gleichgewichtskonstanten über einen weiten Bereich [197]. Die Biotin Avidin Wechselwirkung hat eine z.B. vergleichbare Stärke zu einer kovalenten Bindung.

In der Ionenaustauschchromatographie ist dieser Bereich durch die kleinere Anzahl an Liganden eingeschränkt und wird mehr durch die ionischen Ladungen des Analyten bestimmt. Hohe Affinitätskonstanten werden bei hoch geladenen Analyten beobachtet (DNA und andere Polyelektrolyten) [152].

Für alle Chromatographietechniken liegt der "optimaler Arbeitsbereich" für K_D im Intervall von 10^{-5} M^{-1} bis 10^{-9} M^{-1} hier ist die Gleichgewichtskapazität groß aber der Analyt kann noch reversibel von der Oberfläche des Sorbens abgelöst werden. Nach Gleichung 2.3 ist eine hohe Ligandendichte an der Sorbensoberfläche einer hohen Gleichgewichtsbindungskapazität proportional.

Diese Überlegungen sind nur für die Interaktion in freier Lösung richtig. Auf einer Trägeroberfläche kommt es zu erheblichen Behinderungen bei der Wechselwirkung. Es gibt

zwei wesentliche Hindernisse für eine optimale Wechselwirkung des Analyten mit dem Liganden:

1. Behinderungen beim Transport des Analyten zum Liganden (z.B. durch Diffusion oder den Filmwiderstand) in einer porösen Matrix [45].
2. Ungeeignete räumliche Anordnung der Liganden [46]

Die Behinderung beim Transport des Analyten zu den Liganden durch kinetische Widerstände kann nicht in Gleichung 2.3 erfasst werden.

Die Einschränkung bezüglich der Zugänglichkeit der Analyten zu den Liganden tritt insbesondere bei großen Molekülen mit unsymmetrischer Verteilung der wechselwirkenden Gruppen auf der Oberfläche auf. Die Liganden sind meist auf einer Fläche gebunden, wohingegen die Analyten eine dreidimensionale Struktur haben. Dadurch gibt es sterische Probleme bei der Adsorption und diese können nur summarisch in der Gleichgewichtskonstante erfasst werden.

Aufgrund der Größe und der Komplexität der zu reinigenden Moleküle in der Biochromatographie sind die Anforderungen sowohl an die Struktur des Basismaterials als auch an die Anordnung der Liganden, im Vergleich zur Chromatographie von niedermolekularen Liganden, hoch. Die oben diskutierten Abweichungen von einem Gleichgewichtszustand in Lösung werden für ein Sorbens mittels der dynamischen Bindungskapazität charakterisiert. Die dynamische Bindungskapazität ist von verschiedenen Parametern abhängig. Bei vielen partikulären Sorbentien beobachtet man eine Abnahme der Durchbruchkapazität bei Steigerung der linearen Fließgeschwindigkeit u_s [47]. Für ein Sorbens mit hoher dynamischer Bindungskapazität sowie ein Sorbens mit niedriger dynamischer Bindungskapazität ist die Durchbruchkurve bei gegebenem Fluss in Abb. 2.4 dargestellt:

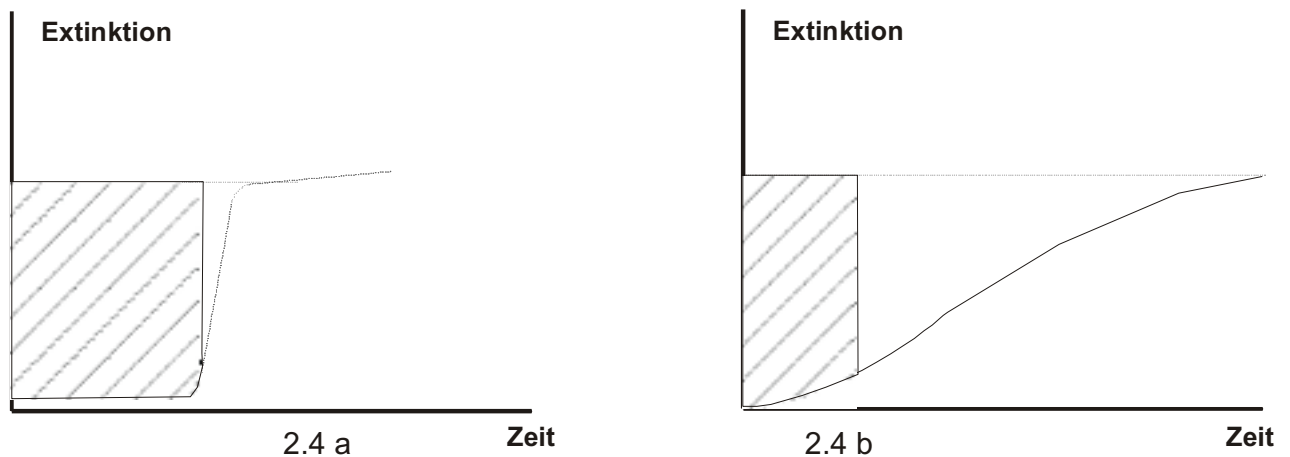


Abb. 2.4: *Dynamische Bindungskapazität von Trägermaterialien*
 2.4a : *Trägermaterial mit hoher dynamischer Bindungskapazität*
 2.4b : *Trägermaterial mit schlechter dynamischen Bindungskapazität*

Bei einem Trägermaterial mit hoher dynamischen Bindungskapazität sind die Form und Lage der Durchbruchkurve nahezu unabhängig von der linearen Fließgeschwindigkeit. Das bedeutet, die nutzbare Bindungskapazität bleibt konstant [48]. Es gilt:

$$Q_{\max} = Q_D \quad 2.4$$

mit
 $u_s > 0$

Bei vielen Trägermaterialien hat es sich jedoch gezeigt, dass die Bindungskapazität mit dem linearen Fluss abnimmt. Unter der Annahme einer irreversiblen Adsorption der Analytmoleküle und der Porendiffusion als bestimmenden Transportmechanismus kann folgende Beziehung abgeleitet werden¹ [49], [198]:

$$\frac{\partial \left(\frac{C}{C_0} \right)}{\partial T_r} = \frac{10 \cdot D \cdot \varepsilon \cdot L}{4 \cdot R_p^2 \cdot \tau \cdot u_s} \cdot \left(1 - \frac{1.8 \cdot \sqrt[3]{M_w}}{d_p} \right) \quad 2.5$$

Die Ableitung der reduzierten Konzentration nach der reduzierten Zeit T_r (oder dem dimensionslosen Durchsatz) charakterisiert den Anstieg der Durchbruchkurve (Anstieg 0 entspricht $Q_D = 0\%$, Anstieg ∞ entspricht $Q_D = 100\%$)

¹ Diese Gleichung kann durch Differentiation von Gleichung 6.42 nach T_r und einem funktionellen Zusammenhang für den effektiven Diffusionskoeffizienten als Funktion von Molekulargewicht und Porenradius abgeleitet werden [40].

Der dimensionslose Durchsatz ist definiert als:

$$T_r = \frac{C_0}{Q_{\max}} \frac{u_s}{L} \left(t - \frac{L\varepsilon}{u_s} \right) \quad 2.6$$

d_p	Porendurchmesser	[m]
D	Diffusionskoeffizient des Analyten in freier Lösung	[m ² /s]
ε	Bettporosität	[-]
L	Bettlänge	[m]
R_p	Partikelradius	[m]
M_w	Molekulargewicht des Analyten	[g/mol]
τ	Kanalfaktor (für viele Gele annähernd 2)	[-]
u_s	linearer Fluss	[m/s]

Entsprechend der obigen Beziehung ist, bei gegebenen anderen Werten, die mittlere Partikelgröße der bestimmende Parameter für eine steile Durchbruchkurve, weil er mit der 2. Potenz in die Berechnung eingeht. Hauptursache dafür ist der lange Diffusionsweg, welchen die Analytmoleküle in den chromatographischen Partikeln zurücklegen müssen. Die dynamische Bindungskapazität ist aber auch von dem Molekulargewicht des Analyten dem Diffusionskoeffizienten sowie der Größe der statischen Bindungskapazität abhängig.

Eine gute dynamische Bindungskapazität kann demzufolge für kleine Analytmoleküle mit einem hohen Diffusionskoeffizienten, kleinen Partikeln mit geringer Porosität, hoher statischer Bindungskapazität sowie mit langen Säulen erwartet werden.

Geeignete Trennmaterialien wären die sogenannten Monobeads oder Monosphers [50].

Dabei handelt es sich um 1–3 µm große, unporöse Partikel aus Kieselgel oder aus Polymeren. Diese Materialien haben sehr gute dynamische Bindungseigenschaften. Der Massenaustausch in diesen Partikelsystemen findet ausschließlich in den Zwischenräumen der Teilchen und an der Oberfläche und nicht in den Porensystemen des Gels statt. Es sind Hochleistungstrennungen möglich und die Durchbruchkurven sind sehr steil. Allerdings ist die maximale Bindungskapazität, aufgrund der kleinen spezifischen Oberfläche gering. Das generelle Problem bei der Verwendung solcher Materialien ist der hohe Druckabfall.

Entsprechend der Gleichung von Koczény-Karmann [51]¹ ist der Druckabfall in partikulären Schichten umgekehrt proportional dem Quadrat des Partikelradius.

¹ Die Koczeny-Karmann Gleichung lautet: $\Delta p = \frac{(1-\varepsilon)^2}{4 \cdot \varepsilon^2 \cdot R_p^2} \cdot c_f \cdot L \cdot u_s$, wobei c_f eine Hilfsvariable ist, die für

kugelförmige Partikel den Wert 150 annimmt.

Die Verwendung solcher Materialien ist deshalb mehr auf analytische Anwendungen eingeschränkt.

Um den Druckabfall so gering wie möglich zu halten, verwendet man in der präparativen Biochromatographie Trägermaterialien mit großen Poren. Das können zum einem Gele mit sehr großen Poren und andererseits Membranen oder monolithische Träger sein. Makroporöse Träger verhalten sich, bezüglich der Fluidynamik, ähnlich wie unporöse Trägermaterialien. Die sehr großen Poren im Partikel werden ebenso wie die Zwischenräume von unporösen Gelen durchströmt [52-54].

Durch die Verwendung von Basismaterialien mit großen Poren hat man jedoch das Problem der Abnahme der dynamischen Bindungskapazität mit zunehmenden linearen Fluss noch keineswegs gelöst. Die Form der Durchbruchkurve ist nämlich nicht nur von den Transporteigenschaften des Analyten im Gel, sondern auch von Zugänglichkeit zum gebundenen Liganden abhängig. Darauf wird im folgenden Kapitel näher eingegangen. Diese Fragestellung steht in engen Zusammenhang mit der möglichen, räumlichen Anpassung der Anordnung der Liganden an die Proteinfläche.

2.4 Anpassung der Adsorptionsfläche an die Proteinfläche

Ein schon früh beschriebenes Problem der Affinitätschromatographie und auch anderer Chromatographietechniken ist das Problem der Zugänglichkeit der bindenden Gruppe(n) auf dem Protein zu dem Liganden. Cuatrecasas zeigte [55], dass ein sogenannter Spacer (Abstandshalter) die Lösung für dieses Problem sein könnte. Die Meinungen in der Literatur sind aber nicht einheitlich. Manchmal erscheint ein Spacer nützlich, manchmal aber auch nicht [56]. Mögliche Ursachen sind:

1. Unspezifische Wechselwirkungen des Analyten mit dem Ligandenarm [57].
2. Eine unzureichende sterische Zugänglichkeit der Liganden zu den bindenden Gruppen (Abb. 2.5) [46]:

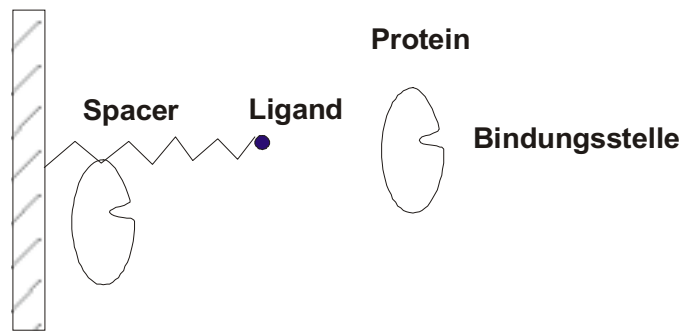


Abb. 2.5: Sterische Behinderungen bei der Wechselwirkung Ligand-Protein

Der Ligand kann zwar durch den Spacer die Bindungsstelle erreichen, jedoch ist der Analyt nicht in der richtigen Position und folglich bleibt die Bindungskapazität insgesamt gering (auf diese Problematik wird in Kapitel 4.4 eingegangen).

Die komplizierte Struktur der Proteine wird durch eine Trägeroberfläche häufig nicht richtig nachgebildet oder angepasst. Die dreidimensionale Struktur der Proteine wird in Wechselwirkung mit einer zweidimensionalen Fläche gebracht.

Es ist deshalb naheliegend auf einer beliebigen Trägeroberfläche ebenfalls eine dreidimensionale Struktur der Liganden aufzubauen. Als Bausteine für diese Struktur können Polymere verwendet werden. Das können sowohl natürliche Polymere (Kohlenhydrate) [58] als auch synthetische Polymere [59], [60] sein. Dabei können zwei verschiedene Wege der "Polymerarchitektur" verfolgt werden:

1. Eine starre Anordnung der Polymerketten mit einem hohen Grad an Quervernetzung welche die geometrische Form des Analyten abbildet (man nennt diese Technik Imprinting)
2. flexible Polymerketten, die nicht oder nur schwach quervernetzt sind und sich der Struktur des Liganden anpassen (sogenannte Tentakeltechnologie oder Grafting von Polymeren)

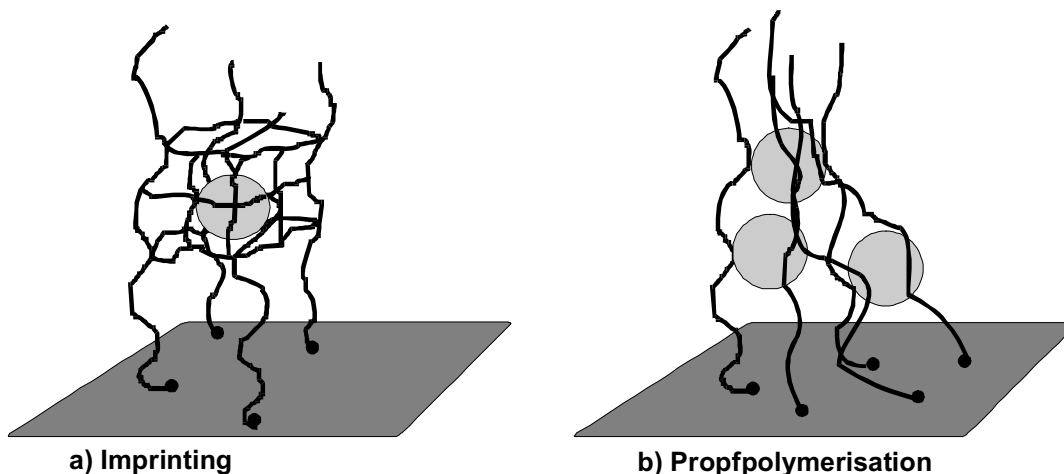


Abb. 2.6: *Anpassung von Polymeroberflächen an Analytenoberflächen*
 a) *Imprinting durch ein hochvernetztes, nicht funktionalisiertes Gel*
 b) *Funktionalisiertes, schwach vernetztes Gel*

Die Technologie der stark vernetzten Polymerketten entsprechend Abbildung 2.6 a) wird als Molecular Imprinting bezeichnet [61]. Die Grundidee dieser Technik ist, zu einem „Printmolekül“ eine Lösung zuzugeben welche spezifische, funktionelle Monomere enthält. Nach der Polymerisation und der Entfernung der Printmoleküle sind die Leerräume der Form des Moleküls angepasst und können das Printmolekül spezifisch binden. Wenn man Antikörper "abbildet" spricht man von "Plasticbodies" [62]. Problematisch bei dieser Technologie sind die langsamen Transportzeiten der Analyten zu den Hohlräumen da die Struktur zu starr ("Käfigeffekt") ist, sowie unspezifische Wechselwirkungen und "Ausbluten" von einpolymerisierten Printmolekülen [63]. Auch kann mittels dieser Technik bisher nur die Form der Moleküle angepasst werden und es sind keine speziellen Wechselwirkungen mit höheren Affinitätskonstanten für die Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase möglich.

Die Technologie der vernetzten oder freien Polymerketten auf der Oberfläche entsprechend Abb. 2.6 b) trägt den Namen "Tentakeltechnologie" [12]. Das Prinzip besteht darin flexible und schwach vernetzte Polymerketten mit aktiven Liganden in der Seitenkette auf beliebige Oberflächen zu binden. Die Seitengruppen der Polymere sollten prinzipiell besser in der Lage sein, mit Oberflächen von Biomolekülen in Wechselwirkung zu treten als dies mit den herkömmlichen Einpunktliganden möglich ist (Einpunktliganden sind Liganden welche mit einem Ende an einem Trägerpolymer befestigt sind und an dem anderen Ende eine aktive Gruppe tragen).

Im folgenden Kapitel wird gezeigt, dass die Anpassung der Trägeroberfläche an die Struktur der Liganden nicht benötigt wird, wenn niedermolekulare Analyten gereinigt werden. Für

niedermolekulare Liganden sind die Wechselwirkungen mit der Matrix nicht so komplex und das Ergebnis der Trennung kann sogar vorausberechnet werden.

2.5 Die chromatographische Trennung von niedermolekularen Substanzen im Vergleich zur Proteinreinigung

Zur Trennung von niedermolekularen Substanzen hat sich insbesondere Kieselgel als Trägermaterial bewährt. Die mittleren Teilchendurchmesser von partikulärem Kieselgel variieren zwischen 1 und 200 μm . Es kann sowohl poröses als auch unporöses Kieselgel hergestellt werden. Poröses Kieselgel hat spezifische Oberflächen bis zu 1000 m^2/g . Die Porengrößen können zwischen 6 nm und 400 nm variiert werden. Für die Hochleistungsflüssigchromatographie werden insbesondere Trägermaterialien mit 3–5 μm Partikelgrößen und mittleren Porengrößen von 10 nm verwendet. Die Einzigartigkeit von Kieselgel als Trägermaterial hat verschiedene Ursachen:

1. Nahezu unbegrenzte natürliche Ressourcen
2. Hohe mechanische Stabilität
3. Variabilität in der Partikel- und Porengröße
4. Gute Derivatisierbarkeit
5. Hydrophile Oberfläche (Kombination aus ionischen und Wasserstoffbrückenwechselwirkungen).

Zur Trennung von polaren Substanzen kann Kieselgel mit hydrophoben Silanen derivatisiert werden und wird zu einer sogenannten Umkehrphase (RP-Phase) [64]. Die Wechselwirkungen zwischen dieser fast perfekten hydrophoben Oberfläche und den Analyten kann sehr exakt vorausberechnet werden, was zur Entstehung von einer Art Computerchromatographie geführt hat [65].

Es hat immer wieder Versuche gegeben, Kieselgel zur Trennung von Biopolymeren einzusetzen. Das ist jedoch im wesentlichen daran gescheitert, dass Kieselgel nicht mit Natronlauge gereinigt werden kann, was ein essentieller Prozessschritt bei der Regenerierung von Gelen für die Biochromatographie ist (Natronlauge wird hauptsächlich zum Entfernen von adsorbierten Bakterien, Viren und Endotoxinen vom Gelbett verwendet). Die Natronlauge ist somit nicht ein Reinigungsschritt sondern eher eine Kaltsterilisierungsmaßnahme [200].

Mit der Zunahme der Molmasse der Analyten und Komplexität der Verbindungen ist eine exakte Beschreibung der Wechselwirkung Analyt-Träger nur noch eingeschränkt möglich. Es gibt auch kein „universelles Trägermaterial“ mehr so wie das oben beschriebene Umkehr

phasenkieselgel für die Trennung niedermolekulare Substanzen. Es muss häufig eine spezielle Abstimmung des Systems Protein-Ligand-Trägermaterial-Elutionsbedingungen erfolgen. Erste Ansätze zu systematischen Untersuchungen der chromatographischen Reinigung von Proteinen sind von Porath, Flodin [67] sowie von Peterson und Sober [68] die vernetztes Dextran und Cellulose zur Abtrennung von Proteinen verwendeten. Sephadex[®] als eines der ersten kommerziell erhältlichen Produkte für die Biochromatographie wird aus Dextran hergestellt. Dextran ist ein Abbauprodukt der Stärke. Es ist ein polymerer Zucker, der sehr viele Hydroxygruppen enthält. Aus diesem polymeren Kohlenhydrat kann durch Vernetzung mit den bifunktionellen Agenzien: Divinylsulfon oder Epichlorhydrin ein partikuläres Gel hergestellt werden. Solche „Soft-Gele“ wurden anfangs zur Gelfiltration verwendet, fanden dann aber rasch auch bei anderen Chromatographietechniken Verwendung. Weitere historisch relevante Ansätze zur Proteinchromatographie gab es insbesondere auf dem Gebiet der Ionenaustauschchromatographie. Erste Materialien waren hier die Cellulosegele. Es handelte sich um sehr drucklabile Trägermaterialien, welche mit den schwach basischen DEAE-Ionenaustauschergruppen derivatisiert waren. Weitere Trägermaterialien der ersten Generation waren die Sepharose[®] Gele von der Fa. Pharmacia [69]. Diese Trägermaterialien sind bis heute die am häufigsten verwendeten Gele. In vielen technischen Proteinreinigungsprozessen werden diese Gele verwendet und werden auch in Zukunft weiter Verwendung finden.

Diese Gele haben jedoch auch Nachteile. Ein ganz wesentliches Problem der beschriebenen Kohlenhydratträger ist ihre mangelnde mechanische Stabilität. Eine Steigerung der Flussrate ist nur bis zu einem gewissen Punkt möglich. Nach Überschreiten dieses Punktes kommt es zu einer Gelkompression, welche eine Weiterführung des Trennprozesses verhindert. Es bestand deshalb ein Bedarf an mehr druckstabilen Trägermaterialien.

Die Gele der neueren Generation sind synthetische organische Polymerträger insbesondere (Meth)acrylat- [70], Polyamid- [71] und Polystyrol-Divinylbenzolgele [72]. Diese Gele sind mechanisch stabiler. Jedoch konnte bei diesen Gelen anfangs nur eine geringere spezifische Bindungskapazität für Proteine als bei den vergleichbaren Kohlenhydratträger realisiert werden, da die Derivatisierungschemie nicht in derselben Weise mitentwickelt wurde wie die Basisträgermaterialentwicklung [73]. Es erwies sich folglich als notwendig, Derivatisierungsmethoden zu entwickeln welche eine wesentliche Steigerung der Ligandendichten ermöglichten. Das konnte erst durch die Einführung von polymeren Beschichtungsmethoden erzielt werden. Gegenwärtig sind die Trägermaterialien der 1. Generation und Gele mit Polymerbeschichtung nebeneinander kommerziell erhältlich. Die Auswahl von einem Trägermaterial für einen präparativen Reinigungsprozeß wird durch viele verschiedene Faktoren bestimmt, so dass auch Trägermaterialien mit niedrigen dynamischen Bindungskapazitäten sinnvoll sein können. Der ökonomische Druck zur Verkürzung der

Prozesszeit erfordert aber Trägermaterialien mit hoher Bindungskapazität und ausreichender mechanischer Stabilität.

Nicht nur die Oberflächenanpassung des Trägermaterials an die Proteinfläche ist wichtig, sondern auch die chemische Struktur einer Oberfläche, da Proteine bei Kontakt mit stark hydrophoben Oberflächen denaturiert werden können. Es war also entscheidend, dass zusätzlich zu der hohen Kapazität die Polymerbeschichtungen auch biokompatibel sein mussten [74].

Untersuchungen der letzten Jahre hatten außerdem gezeigt, dass für die adsorptive Trennung von Proteinen Trägermaterialien mit großen Poren (> 100 nm) verwendet werden sollten, da dadurch eine mehr ungehinderte Diffusion zu den aktiven Zentren im Inneren des Trägermaterials möglich ist. Es wurden Gele mit sehr großen Poren (> 300 nm) hergestellt, die eine schnelle Trennung von Proteinen erlauben. Das Basismaterial der Wahl für diese Trägermaterialien sind Polystyrol-Divinylbenzolpolymerisate [75], welche aber schwierig zu derivatisieren sind [76]. Der Transport in den Poren von partikulären Trägermaterialien wird aber immer zu einem gewissen Anteil durch Diffusion bestimmt. Das hat negative Konsequenzen für den Massentransfer. Es ist deshalb ein Bedarf vorhanden Trägermaterialien mit besseren Transporteigenschaften für Proteine in der porösen Struktur zu entwickeln.

Solche Trennmaterialien der "2. Generation" sind poröse Formkörper. Poröse Formkörper können Polymerklötze [77], [201] oder Membranen [78] sein. Poröse Formkörper sind zusammenhängende Gebilde, die als eine Einheit ("Megapartikel") für einen Trennprozess eingesetzt werden können. Die intrapartikulären Zwischenräume der Gelteilchen werden durch große Transportporen ersetzt, welche einen mehr konvektiven Transport zu den Liganden ermöglichen. Diese Trennmaterialien haben häufig einen geringeren Druckabfall als vergleichbare partikuläre Gele aber auch bessere Peakkapazitäten wenn keramische Träger, wie Kieselgel, benutzt werden [79]. Sie sind jedoch nicht frei von Nachteilen: Schwierig ist beispielweise die Regenerierung. Durch die zusammenhängende Struktur sammeln sich Kontaminationen wie in einem Tiefenfilter an und sind nur noch schwer zu entfernen. Ein weiteres Problem ist die Herstellung von großen Trenneinheiten. Diese Probleme scheinen jedoch lösbar zu sein.

Geeignete Trägermaterialien zur Trennung von Proteinen können nur hergestellt werden, wenn man Erkenntnisse zur Proteinstabilität in Lösung und an Oberflächen berücksichtigt. Im folgenden wird deshalb das Stabilitätsverhalten von Proteinen in Lösung und an Oberflächen kurz diskutiert.

2.6 Stabilitätsverhalten von Proteinen an Grenzflächen

Biopolymere sind sehr komplexe und empfindliche Verbindungen [80]. Unter Biopolymeren versteht man im wesentlichen folgende Verbindungsklassen:

Polynucleotide (Nukleinsäuren)

Polypeptide (Proteine)

Polysacharide

Lignin, Polyisoprene

Hiervon stellen die Polyisoprene im allgemeinen Homopolymere dar. Ebenso sind auch die mengenmäßig sehr bedeutenden Polysacharide Cellulose und Stärke im wesentlichen nur aus einem Grundbaustein, der D-Glucose, aufgebaut (β - bzw. α -Glucane).

Polypeptide und Proteine bestehen aus 20 verschiedenen Grundbausteinen, den L-Aminosäuren, während die Nukleinsäuren aus mehreren Strukturelementen, den Nukleotiden zusammengesetzt sind. Bei Makromolekülen, die aus mehreren Grundbausteinen bestehen, sind die Eigenschaftenzusätzlich noch von der Reihenfolge, der Sequenz, der Monomereinheiten abhängig. Daraus folgt, dass man bei den Proteinen mit der größten Zahl verschiedener Grundbausteine auch die größten Variationsmöglichkeiten findet und dass diese Verbindungsklasse die wohl größte Vielfalt aufweist. Da eine enge Beziehung zwischen Struktur und Eigenschaften von Molekülen besteht, sind diese aus mehreren Monomereinheiten aufgebauten Biopolymere für die vielfältigsten Aufgaben geeignet.

Proteine besitzen eine komplizierte Faltungsstruktur. Diese Faltung ist die Voraussetzung für die biologische Aktivität der Proteine welche bei einem chromatographischen Trennprozess unbedingt erhalten bleiben sollte.

Aufgrund der Komplexität der Proteine ist die Reinigung von Proteinen nicht wie bei den niedermolekularen Verbindungen vorausberechenbar, sondern muss durch empirische Untersuchungen ermittelt werden.

Die entscheidenden Wechselwirkungen der Proteine untereinander und mit der Lösung sind entsprechend ihrer Bedeutung und Stärke folgende [81]:

1. Hydrophobe Wechselwirkung
2. Coulomb Wechselwirkungen
3. Dipol- und Dipol-Dipol Wechselwirkungen
4. Dispersions Wechselwirkungen

Die meisten Proteine besitzen hydrophobe Innenbereiche und hydrophile Gruppen im Außenbereich.

Die Stabilität von Proteinen in Lösung ist gering, die Energie des Übergangs vom gefalteten aktiven Zustand in den Knäuelzustand beträgt nur 30-60 KJ/mol [82]. Der Prozess der Denaturierung folgt einem kooperativen Mechanismus der einem Phasenübergang 1.

Ordnung ähnelt und mit einem Ising-Modell beschrieben werden kann [83]. Der Übergang vom nativen in den Knäuelzustand durchläuft verschiedene Zwischenzustände sogenannte „molten states“ [84]. Die Kinetik des Gesamtmechanismus ist 1. Ordnung und somit unabhängig von der Proteinausgangskonzentration. Nach der Knäuelbildung oder schon über die Zwischenzustände aggregieren die Proteinmoleküle und präzipitieren in Lösung. Diese Aggregation ist von der Konzentration der Proteine abhängig und folgt einer Reaktion 2. Ordnung [85].

Aufgrund der komplexen Zusammenhänge sind somit optimale Stabilitätsbedingungen für Proteinlösungen schwierig zu definieren. Die Stabilität von Proteinen in Lösung wird durch Lösungsmittel, pH-Wert, Redoxpotential, Temperatur, Proteinkonzentration und proteolytischen Abbau bestimmt. Diese Bedingungen sind individuell von der Proteinspezies abhängig. Viele Proteine sind stabil unter physiologischen pH und Salzwerten sowie bei Raumtemperatur. Es gibt jedoch auch Ausnahmen wie die Membranproteine die nur in Gegenwart von Detergentien stabil sind [86] und Pepsin welches nur bei stark sauren Bedingungen aktiv bleibt [87].

Auf viele Proteine wirken Polyalkohole (Glyzerin, Sucrose und Polyethylenglykol) stabilisierend [88]. Polyalkohole haben eine geordnete Hydroxylgruppenstruktur und sind damit der Wasserstruktur im Außenbereich des Proteins ähnlich. Die Addition von Polyalkoholen soll zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Wasser führen und somit die Aktivität des Wassers vermindern und damit die hydrophobe Struktur des Proteins stabilisieren [89], [90]. Der Zusatz von Polyethylenglykol zu Proteinlösungen ist ebenfalls stabilisierend, wobei jedoch festgehalten werden muss, dass die Kettenlänge des Polyethylenglykols von Bedeutung ist, so dass der Stabilisierungsmechanismus von Polyolen und Polyethylenglykol offenbar verschieden ist. Bekannt ist ebenfalls, dass Polyacrylamide die Proteinstruktur stabilisieren, dass ist wahrscheinlich jedoch darauf zurückzuführen, dass die Amidbindung selbst ein Strukturelement der Polypeptidkette ist [91].

Die Untersuchung der Proteinadsorption an Oberflächen ist ein bedeutendes Entwicklungsbereich [92], [93]. Proteinadsorption an Oberflächen sind, neben der Adsorption an Chromatographiegel, auch für solche verschiedene Gebiete wie: Wachstum von Zellen und Bakterien an Oberflächen, Implantaten und medizinischen Sensoren wichtig. Die Problematik ist in der ganzen Komplexität bisher nicht verstanden. Einige zu untersuchende Probleme der Adsorption sind: Weitreichende van der Waals Kräfte der Oberfläche mit den Proteinen, das Zusammenspiel der Wechselwirkungen von Wasser-Protein sowie Wasser-Luft.

Biokompatible Sorbentien für die Biochromatographie sollten den Prozess der Denaturierung vermeiden und die vollständige Desorption der Proteine ermöglichen.

Die Adsorption von Proteinen an Oberflächen wird durch folgende Faktoren beeinflusst: Adsorptionseigenschaften des Trägermaterials (hydrophil/hydrophob, ionisch), der

Transportweise zur Oberfläche aber auch durch die Aufenthaltszeit an der Oberfläche [94]. Von Bedeutung für die Adsorption ist auch die individuelle Struktur des zu untersuchenden Proteins. Nach Andrade [95] kann ein Protein als ein Objekt mit 4 räumlich getrennten Bereichen betrachtet werden:

1. kationische Bereiche
2. anionische Bereiche
3. neutrale Bereiche
4. hydrophobe Bereiche

Je nach den Wechselwirkungsmöglichkeiten mit der Oberfläche erfolgt die Adsorption über die entsprechenden Subdomänen. Ein einfaches Protein wie Rinderserumalbumin (BSA) besteht aus 3 etwa $2 \cdot 10^4$ g/mol schweren Unterdomänen, die hydrophoben Charakter haben. Die Adsorption an einfache Oberflächen kann für dieses Protein durch ein Modell beschrieben werden [95]. Für komplizierte Proteine ist eine Beschreibung des Adsorptionsvorganges nicht mehr möglich und man ist gezwungen, auf empirische Modelle zurückzugreifen. Die Komplexität der Proteine und die Vielfalt der Wechselwirkungsmöglichkeiten mit Oberflächen erschweren eine exakte Vorhersage des Verteilungskoeffizienten von Proteinen im chromatographischen Trennprozess. Aus den obigen Erkenntnissen zur Stabilität von Proteinen in Lösung und an Oberflächen können Schlussfolgerungen zum Aufbau von chromatographischen Trägermaterialien gezogen werden.

Trägermaterialien für die Adsorption von Proteinen sollten frei von unspezifischer Adsorption sein. Experimentell kann dies durch Adsorptionsexperimente von underivatisierten Gelen mit Proteinlösungen untersucht werden. Entsprechend den Ergebnissen der Stabilitäts ergebnisse von Proteinen in Lösung ist es somit nicht überraschend, dass Proteine auf hydroxygruppenhaltigen Oberflächen wenig denaturiert werden. Die Gele der ersten Generation waren folglich auch polymere Kohlenhydrate (Agarose, Cellulose und Sepharose) und somit aufgrund der vielen Hydroxygruppen sehr hydrophil. Eine sehr große Zahl von Trägermaterialien für die Proteintrennung ist hydroxygruppenhaltig. Es gibt jedoch auch Polymere der neueren Generation, die durch nachfolgende Modifikationen in eine hydrophile Form überführt werden müssen. Polystyrol-Divinylbenzol und Polyamid 6 sind Beispiele für solche Polymere.

Strukturerhaltend auf Proteine ist folglich eine hydroxygruppenhaltige oder amidgruppen haltige Umgebung und Vermeidung von Oberflächenkontakten. Ein wichtiger Aspekt zur Strukturerhaltung von Proteinen an chromatographischen Oberflächen ist auch die Zeitdauer der Adsorption und Desorption [96]. Wie schon erwähnt folgt der Übergang von der nativen Struktur in die Übergangsformen bei Proteinen einem Zeitgesetz erster Ordnung und hat

Halbwertszeiten von 0,1–100 s. Nach dem Modell von Soderquist [97] ist die Kinetik der Proteinadsorption dreistufig. In der 1. Stufe finden keine Denaturierungsprozesse statt. Die Stufenlänge wird auf wenige Minuten geschätzt. Es ist deshalb von Bedeutung die gesamte Adsorptionszeit möglichst klein zu halten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Proteine sowohl in Lösung als auch an Oberflächen durch hydrophobe Wechselwirkungen denaturiert werden können. Diese hydrophoben Wechselwirkungen können durch Hydroxylgruppen oder Amidgruppen in einer wasserhaltigen Umgebung unterdrückt werden. Es ist folglich wichtig, die "Architektur" eines Sorbens für die Biochromatographie folgendermaßen zu gestalten :

1. Vermeidung des Oberflächenkontaktes mit dem Sorbens
2. Adsorption an die Liganden wie in Lösung
3. Die Proteine auf Abstand voneinander halten
4. Hydrophile, wasserhaltige Umgebung erzeugen
5. Schnelle Adsorptions und Desorptionsschritte

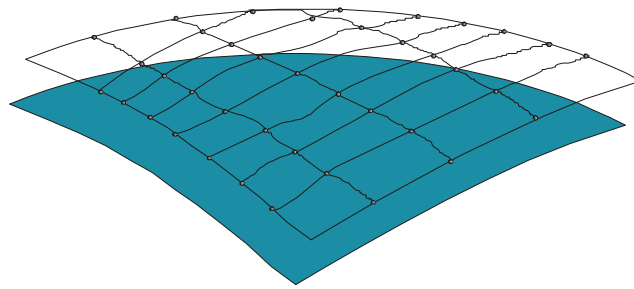
3 Polymere Oberflächenmodifikationen von Gelen

3.1 Die verschiedenen Methoden der Oberflächenmodifikation

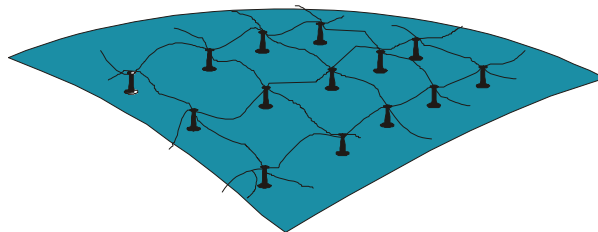
Die Derivatisierung von Trägeroberflächen kann entweder mit niedermolekularen Liganden oder mit hochmolekularen Liganden (Polymeren) modifiziert werden [98]. Mit beiden Verfahren erhält man geeignete Trägermaterialien für die Biochromatographie mit ähnlichen Adsorptionseigenschaften. Es soll hier kurz die prinzipielle Vorgehensweise der „klassischen“ Modifizierung von Gelen mit niedermolekularen Liganden dargestellt werden: Auf eine poröse oder flache Trägeroberfläche werden Liganden an schon vorhandene funktionelle Gruppen kovalent oder adsorptiv gebunden. Die funktionellen Gruppen auf der Oberfläche sind häufig aber nicht notwendig Hydroxygruppen. Bei der konventionellen Beschichtung von Trägermaterialien wird, in Abhängigkeit von der Chromatographiemethode für die das Trägermaterial bestimmt ist, ein geeignetes Molekül mit der Hydroxygruppe auf der Oberfläche zur Reaktion gebracht. Man erhält entweder eine sogenannte aktivierte Gruppe, die mit weiteren Liganden umgesetzt werden kann oder der Ligand ist schon in der geeigneten Endform. Diese Art der Derivatisierung ist nicht Gegenstand der Arbeit und wurde ausschließlich zur Herstellung von Vergleichsmaterialien angewendet. Sie wird hier nicht weiter diskutiert, ist aber umfangreich in der Literatur beschrieben (z.B. [9]).

Bei polymeren Beschichtungen unterscheidet man folgende Derivatisierungsmethoden (Abb. 3.1):

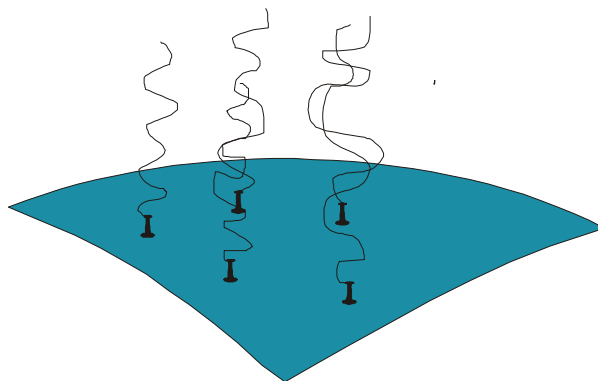
1. Physikalische Adsorption von vorgefertigten Polymeren an die Trägeroberfläche und Quervernetzung [99].
2. Reaktion von aktiven Gruppen an der Oberfläche mit vorgefertigten Polymeren [100]
3. Pfropf- und Blockpolymerisationen [101], [102]



Physikalische Adsorption von Polymeren an Geloberflächen und Quervernetzung



Kovalente Bindung von Polymeren an reaktive Gruppen auf der Geloberfläche



Pfropf - und Blockpolymerisationen

Abb. 3.1: Darstellung von verschiedenen Varianten der polymeren Beschichtung von Trägeroberflächen

Die Derivatisierung von Trägeroberflächen ist eine spezielle Variante der sogenannten Festphasensynthesemethoden. Ein bekanntes Beispiel dieser Verfahren ist die Synthese von Peptiden nach Merrifield an Polystyrol-Divinylbenzolgelen [103]. In neuerer Zeit wurden diese Erkenntnisse auf die Herstellung von niedermolekulare Komponenten übertragen mit dem Ziel kombinatorische Bibliotheken aufzubauen[104].

Ein ganz entscheidender Vorteil der Synthese an der festen Phase ist, dass die Reaktionsprodukte nicht aus der Reaktionslösung isoliert und aufgearbeitet werden müssen. Das vereinfacht die Reaktionsführung erheblich. Ein Nachteil der Synthese an der festen Phase ist allerdings die analytische Charakterisierung der gebundenen Reaktionsprodukte. Bei der Peptid- oder Oligonukleotidsynthese werden die Endprodukte vom Gel abgelöst und können anschließend in Lösung untersucht werden. Auf chromatographischen Trägermaterialien bleiben die Liganden immobilisiert. Die Charakterisierung der Gele muss an der festen Phase erfolgen. Die analytischen Methoden der Chemie in Lösung können hier nur begrenzt angewendet werden, da das Trägermaterial immer eine Störkomponente ist. Eine gute Untersuchungsmethode ist die Festkörper-NMR [198]. Die Vorteile der Festphasensynthese, für niedermolekulare Komponenten lassen sich auch auf polymere Beschichtungen übertragen. Das wurde in den siebziger Jahren erkannt und zur Herstellung von neuen Trägermaterialien benutzt.

Polymerbeschichtung von Trägermaterialien für die Proteintrennung wurden erstmalig von Regnier und Alpert beschrieben [105]. Polyethylenimin wurde adsorptiv auf Kieselgelpartikel aufgebracht und anschließend mit Bisepoxiden quervernetzt. Ein Partikel wird dadurch ähnlich einem Fußball in einem Netz aus Polymer gefangen gehalten. Das Ergebnis ist ein schwach basischer Ionenaustauscher. Dieser Austauscher ist jedoch nicht lösungsmittel stabil und „blutet“ häufig aus, da die gebundenen Polymere nicht vollständig quervernetzt sind und somit unter den Elutions- und Waschbedingungen (insbesondere mit organischen Lösungsmitteln) nicht stabil gebunden bleiben.

Eine weitere Beschichtungsmöglichkeit ist die Anbindung von vorgefertigten Polymeren an reaktive Oberflächengruppen auf Gelen. Hier ist insbesondere die Immobilisierung mit Polyethylenglykol oder Polyethylenglykolderivaten hervorzuheben [106]. Polyethylenglykol ist mit verschiedener Molmassenverteilung erhältlich und ist ein hydrophiler, beweglicher Spacer. Die gebundenen Polymere sind kovalent befestigt und somit stabil. Nachteile dieser Methode sind die langen Diffusionszeiten der Polymere in die Gelporen (bei der Synthese) und aufgrund der sterischen Hinderung bei der Reaktion die geringen Ausbeuten der Beschichtungsreaktionen. Die Ausbeuten einer Beschichtungsmethode mit vorgefertigten Polymeren können durch die Verwendung von kurzkettigen sehr gut wasserlöslichen Polymeren gesteigert werden. Beispiele sind Beschichtungen mit Dextran, DEADextran und Hydroxyethylcellulose [107], [108].

Die Methoden mit den höchsten Beschichtungsausbeuten sind radikalisch initiierte Pfropf- und Blockpolymerisationen [109], [110]. In der Literatur werden noch eine ganze Reihe weiterer Initiierungsmethoden (anionisch, Koordinationskatalyse) beschrieben, jedoch werden diese kaum zur Herstellung von polymer modifizierten Bioseparationsträgern genutzt, da sie für den Produktionsmaßstab bisher zu aufwendig sind [111].

3.2 Beschichtungsgrad

Das Resultat einer polymeren Beschichtung von Trägermaterialien kann durch folgende Größen charakterisiert werden [112]:

1. Beschichtungsgrad

$$BG = 100 (M_P - M_A)/M_A \quad 3.1$$

BG	Beschichtungsgrad [%]
M_P	Masse des wasserfreien Reaktionsproduktes (beschichtetes Gel) [kg]
M_A	Masse des wasserfreien Ausgangsmaterials [kg]

2. Pfpfoeffizienz oder Beschichtungseffizienz

$$PE = 100 M_M/(M_P - M_A) \quad 3.2$$

PE	Pfpfoeffizienz [%]
M_M	Gesamtmasse des eingesetzten Monomers [kg]

3. Stabilität der Beschichtung

$$S = (M_R/M_P) 100 \quad 3.3$$

S	Stabilität [%]
M_R	Masse des Polymerrückstandes nach der Extraktion [kg]

Der Pfpfgrad gibt an welche Menge Polymer bezüglich einer eingesetzten Menge Basis material gebunden werden kann. Die Pfpfoeffizienz gibt an, wie viel von einer eingesetzten Monomermenge auf der Oberfläche von Basismaterialien gebunden wird. Die Pfpfoeffizienz ist eine Maßzahl für die Menge des entstehenden Homopolymers und sollt so hoch wie möglich sein.

Der Stabilitätsgrad charakterisiert die Stabilität der polymeren Beschichtung unter dem Einfluss von chemischen Stressbedingungen (Lösungsmittel, pH, Salzkonzentration). Bei denen in dieser Arbeit hergestellten Polymeren wurden grundsätzlich Stabilitätsgrade von mehr als 95 % gemessen. Die angeführten Größen gelten nicht nur für polymermodifizierte

Gele, sondern sind auch auf Gele die mit vorgefertigten Polymeren beschichtet wurden übertragbar.

3.3 Beschichtungsgrad und spezifische Oberfläche

Trägermaterialien mit großen Porendurchmessern haben eine kleine Oberfläche. Unter der Annahme, dass die Poren Zylinderporen sind [64], kann folgende Näherungsformel für den Zusammenhang zwischen spezifischer Oberfläche A und Porendurchmesser d_p abgeleitet werden [114]:

$$A = \frac{2 \cdot V_p}{d_p} \quad 3.4$$

A	spezifische Oberfläche	[m ² /g]
V _p	spezifisches Porenvolumen	[m ³ /g]
d _p	mittlerer Porendurchmesser	[m]

Entsprechend dieser Beziehung ist die zur Verfügung stehende Oberfläche umgekehrt proportional zum mittleren Porendurchmesser. Da die Größe der Oberfläche, bei konventionellen Beschichtungsmethoden, der erreichbaren Ligandendichte proportional ist sollte die mittlere Porengröße erfahrungsgemäß Werte von 30 nm nicht unterschreiten. Im Gegensatz dazu können durch polymere Beschichtungsmethoden auf kleinsten Oberflächen noch ausreichende Bindungskapazitäten realisiert werden. Geeignete Basismaterialien für die Biochromatographie sollten Poren von mehr als 100 nm aufweisen [115], da Proteine niedrige molekulare Diffusionskoeffizienten besitzen. Noch größere Poren sind zu bevorzugen, jedoch nimmt die mechanische Stabilität von Trägermaterialien mit einem mittleren Porendurchmesser größer als 1000 nm stark ab. Typische spezifische Oberflächen bei einem Trägermaterial mit 100 nm sind ca. 10 m²/g. Auf diesen verhältnismäßig kleinen Oberflächen können nur durch polymere Beschichtungen hohe Ligandendichten erzielt werden.

Maximal mögliche Beschichtungsgrade für verschiedene Modifizierungsmethoden sind in der nachfolgenden Tabelle 3.1 aufgeführt. Die Werte sind von Faktoren wie der Konzentration, der chemischen Struktur des Basismaterials und der Porengröße des Basismaterials abhängig.

Tabelle 3.1: Maximale Beschichtungsgrade für verschiedene Arten der polymeren Abdeckung von chromatographischen Oberflächen [24], [105], [107]

Methode	Maximaler Beschichtungsgrad BG [%]
Adsorptive Bindung von Polymeren mit anschließender Quervernetzung	10
Bindung von Polyethylenglykol	15
Bindung von Dextran oder Hydroxyethylcellulose	40–60
Pfropf- und Blockpolymerisationen	bis 300

Meist nutzt man die möglichen hohen Beschichtungen bei den Polymerisationsmethoden nicht voll aus, da dadurch die Permeabilitäten der Materialien so verschlechtert werden, dass sie nicht mehr für Durchflussexperimente in einer chromatographischen Säule verwendet werden können. Es lässt sich für jedes Trägermaterial ein optimaler Wert für eine polymere Beschichtung finden. Eine Steigerung über diesen Wert hinaus führt immer zu einer Verschlechterung der Druck- Fluss Eigenschaften und zu keiner weiteren Steigerung der Bindungskapazität. Es ist also letztendlich ein Kompromiss zwischen Bindungskapazität und mechanischer Stabilität einzugehen.

Hohe Beschichtungsgrade können offensichtlich auch mit anderen Methoden als Pfropf und Blockpolymerisation erreicht werden (siehe Tabelle 3.1). Ein ganz entscheidender Vorteil von polymeren Verfahren ist jedoch die Tatsache, dass der Beschichtungsgrad nahezu unabhängig von der zur Verfügung stehenden Oberfläche des Sorbens ist, was in der nächsten Darstellung gezeigt ist (Abb. 3.2). Ein konstanter Beschichtungsgrad erfordert eine Optimierung der Polymerisationsbedingungen. Ursache der geänderten Polymerisationsbedingungen ist nach der Erfahrung des Autors die Anzahl der Polymeranknüpfungspunkte, welche bei einer Verringerung der Oberfläche absolut abnimmt und dies nur durch eine höhere Kettenlänge der gebundenen Polymere kompensiert werden kann.

BG in % mit 2,3 Epoxypropylmethacrylat

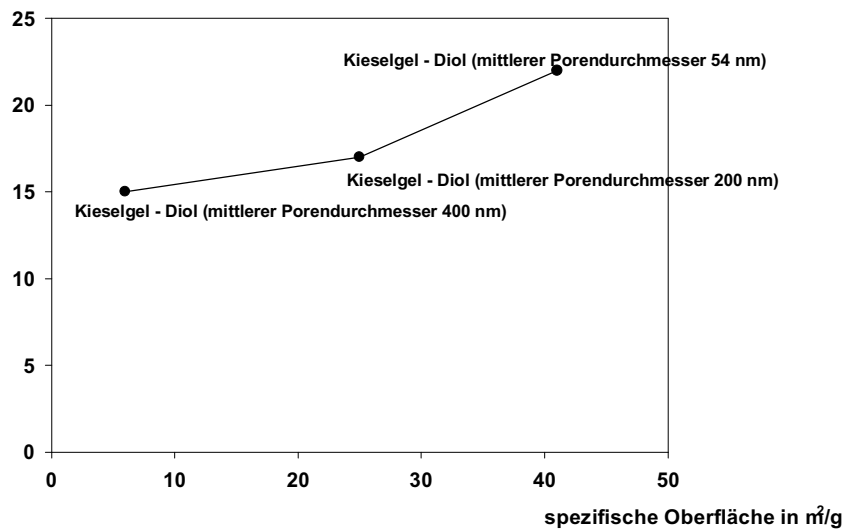


Abb. 3.2: Abhängigkeit des Beschichtungsgrades mit 2,3 Epoxypropylmethacrylat auf Kieselgel-Diol Trägern von der spezifischen Oberfläche (die Herstellung der Gele wurde nach Vorschrift 8.1.1 im Methodenteil durchgeführt)

Bei einer nichtpolymeren Beschichtung mit einem Polyethylenglykol nimmt der Beschichtungsgrad weitaus stärker als Funktion der Sorbensoberfläche ab, wie in Abb. 3.3 dargestellt ist:

:

BG in % mit Polyethylenglykoll

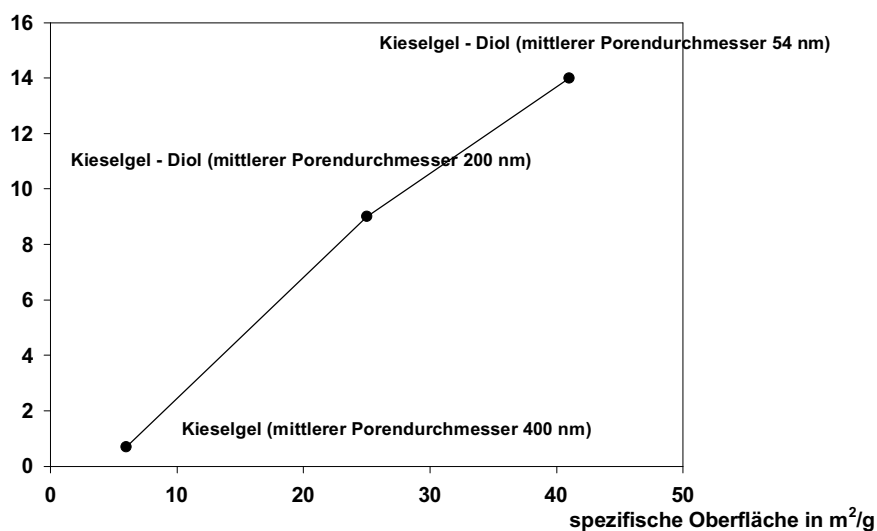


Abb. 3.3: Beschichtung derselben Trägermaterialien wie in Abb. 3.2 mit Polyethylenglykol (Carbowax 400)¹

Die Herstellung der mit Polyethylenglykol beschichteten Kieselgele wurde entsprechend einer Vorschrift von Chang, El Rassi und Horvath [113] durchgeführt. Die Menge der gebundenen Liganden, bei nichtpolymeren Beschichtungsmethoden, nimmt proportional mit der zur Verfügung stehenden Größe der spezifischen Oberfläche ab.

Durch eine Pfropfpolymerisation ist es im Gegensatz dazu möglich, eine ausreichende Menge von Polymer auf einer sehr kleinen Oberfläche zu binden. Die fehlende Oberfläche des Trägermaterials wird durch eine gebundene Polymerschicht kompensiert.

3.4 Radikalisch initiierte Beschichtungsreaktionen

Radikalische Polymerisationen werden durch die Bildung eines Radikals gestartet. Ziel einer radikalisch gestarteten polymeren Beschichtung eines Gels ist die kovalente Anbindung von Polymerketten mit hoher Ausbeute. Das kann in ausreichendem Maß nur erreicht werden, wenn man entweder die Startreaktion auf die Oberfläche verlagert [116] oder zu aktiven Gruppen an die Oberfläche eine Übertragungsreaktion durchführt [117]. Es sollte jedoch eine Homopolymerisation im Porensystem nach Möglichkeit vermieden werden, da nicht gebundenes Polymer nur schwer aus dem Trägermaterial entfernt werden kann. Die verschiedenen Möglichkeiten von radikalischen initiierten Polymerisationen in einem porösen Trägermaterial sind schematisch im nachfolgenden Bild dargestellt:

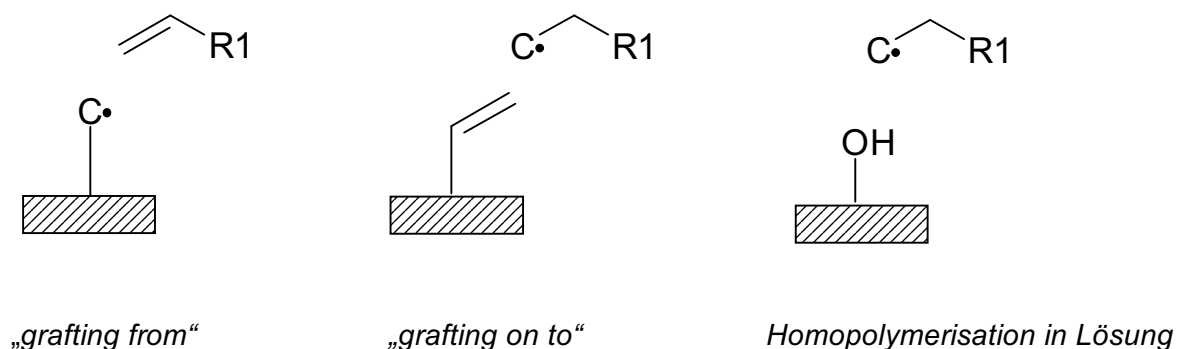


Abb. 3.4: Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten eine Polymerisation von einer Trägeroberfläche zu starten

Bei einer „grafting from“ Technik werden Radikale auf der Geloberfläche gebildet und die Polymerketten wachsen von der Geloberfläche weg. Bei einer „grafting to“ Technik werden Radikale auf die Geloberfläche übertragen und entweder Polymere durch Abbruchreaktionen

gebunden oder eine neue Polymerkette von der Geloberfläche wachsend gebildet. Bei einer Homopolymerisation werden die Polymere nicht kovalent gebunden und werden nur sterisch oder adsorptiv in den Porenraum eingeschlossen. Definierte und kovalent befestigte Polymere können nur durch die „grafting from“ und „grafting to“ Techniken erhalten werden [118].

Die Adsorption von Polymeren an Kieselgel ist für Polybutadien, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenimin und andere Polymere beschrieben [119], [120]. Die Immobilisierung der Polymere erfolgt hier durch eine irreversible Adsorption auf der Kieselgeloberfläche. Die Benutzung von Methacryloxy-silanen zum „grafting to“ ist ebenfalls eine häufig benutzte Technik zum Verkapseln von Kieselgelen [117]. Jedoch besteht bei den Gelen mit adsorptiv gebundenem Monomer immer die latente Gefahr, dass es bei einem Lösungsmittelwechsel zu einer Desorption der gebundenen Polymere kommt.

Im Zusammenhang mit den gestiegenen Anforderungen bei der chromatographischen Reinigung von rekombinanten, therapeutischen Proteinen war die Entwicklung von ausblutungs-freien Sorbentien notwendig [121]. Diese Forderung kann durch Gele mit rein adsorptiv gebundenen Polymeren nicht erfüllt werden.

Gele für die Biochromatographie müssen, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, zusätzlich hydrophil und alkalistabil sein. Eine irreversible Adsorption von hydrophilen Polymeren auf einer hydrophilen synthetischen Polymeroberfläche entsprechend einer Homopolymerisation ist somit nicht möglich, da das Pfropfpolymer hier nicht bindet. Zur Herstellung von polymeren Beschichtungen auf hydrophilen polymeren Trägermaterialien sind deshalb nur die „grafting to“ und „grafting from“ Methoden geeignet.

Radikalische Initiatorsysteme für eine direkt von der Oberfläche gestartete Radikalkettenreaktion sind

1. Die Oxidation von oberflächenständigen Hydroxygruppen unter Radikalbildung mit Metallionen [122], [123], [124] und Wasserstoffperoxyd [125].
2. Die Immobilisierung von thermisch labilen Radikalbildnern [116].
3. Übertragungsreaktionen zur Oberfläche durch immobilisierte Doppelbindungen (Methacryloylverbindungen, Acrylamide, Allylether) [117].

Als Modellsysteme zur Untersuchung und Übertragung von radikalisch initiierten Oberflächenpolymerisationen für Biochromatographieträger konnten die Erkenntnisse genutzt werden, welche in den 50iger bis 70iger Jahren bei der Modifikation von Cellulose und Stärke gesammelt wurden [126]. Für Pfropfpolymerisationen auf Cellulose und Stärke wurden verschiedene Redoxinitiatorsysteme mit Metallionen als Oxidationsmittel beschrieben. Auf Cellulose wurde bevorzugt Acrylnitril gepfropft um Textilfasern mit vorteilhaften

Benetzungseigenschaften zu erhalten. Es wurden Co^{3+} , Mn^{3+} , Mn^{7+} , V^{5+} und Fe^{2+} - H_2O_2 Redoxsysteme untersucht. Das höchste Redoxpotential hat Co^{3+} mit 1,8 V gefolgt vom Ce^{4+} -Redoxsystem mit einem Oxydationspotential von 1,55 V [122].

Eine gut charakterisierte Oxidationsreaktion mit Radikalbildung ist die Reaktion von Ce^{4+} -Ionen mit Hydroxy- oder Diolgruppen [122]. Ein Vorteil dieser Reaktion ist die Tatsache, dass fast alle Basismaterialien für die Chromatographie eine große Zahl von Hydroxygruppen auf einer hydrophilen Oberfläche tragen und somit das Reduktionsmittel schon enthalten. Ein weiterer Vorteil dieser Anregungsreaktion ist die Durchführung der Polymerisation in wässriger Lösung, es können wasserlösliche, hydrophile Monomere verwendet werden. Die Kinetik der Initialisierungsreaktion mit Ce^{4+} -Ionen in Lösung zur Reaktion von Acrylamid mit Alkoholen wurde von G. Mino und S. Kaizermann folgendermaßen beschrieben [122] :



X ist ein Wassermolekül oder Nitration

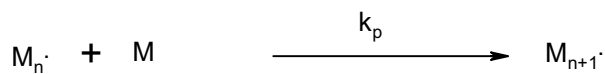
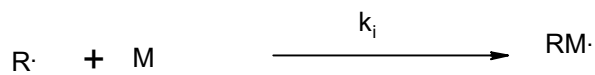
A Alkoholmolekül

B Alkohol-Cer Komplex

R· gebildetes Kohlenstoffradikal

In einer salpetersauren Lösung (Konzentration H^+ ca. 1 M) bildet sich in einer vorgelagerten Gleichgewichtsreaktion ein Komplex aus dem Alkohol und dem Ce^{4+} -Ion. Dieser Komplex reagiert in einer Folgereaktion zu einem oberflächenständigen Radikal, Ce^{3+} und Formaldehyd (nur bei einer endständigen Diol oder Hydroxygruppe möglich). Es bildet sich ein „Makroradikal“ aus dem vorher hydroxygruppenhaltigen Gel. Die Radikale werden auf der gesamten Geloberfläche und im Porensystem der Partikel gebildet. In Gegenwart eines geeigneten Monomers findet dann eine radikalische Polymerisationsreaktion nach folgendem Schema statt:

Kettenfortpflanzung



Kettenabbruch

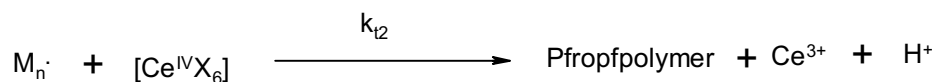
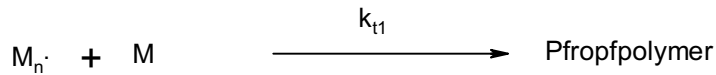


Abb. 3.5: Schema der Radikalkettenreaktion mit Redoxinitiierung

k_i Geschwindigkeitskonstante für die Initiierungsreaktion

k_p Polymerisationsreaktion

k_t Abbruchreaktionen

M_n Polymerradikale

Der Reaktionsverlauf, in Lösung, wurde von Mino und Kaizermann [122] für die Modellsysteme 2,3 Butandiol-Acrylamid und Ethanol-Acrylamid untersucht. Typische Reaktionsbedingungen waren: 0,7 M Acrylamid, 10^{-3} M Ce^{4+} , 0,05 M H^+ -Ionenkonzentration, 0,3 M Alkohol, Reaktionsmedium Wasser, Raumtemperatur.

Es wurde folgende Beziehung für das Zahlenmittel \bar{M}_n des Polyacrylamides abgeleitet:

$$\bar{M}_n = 71.08 \frac{M_0}{Ce_0^{4+}} \frac{x}{1 - (1-x)^{4.3}} \quad 3.6$$

M_0 Anfangskonzentration des Acrylamids [mol/l]

Ce_0^{4+} Anfangskonzentration des Initiators [mol/l]

x Umsatz des Monomers [-]

Die Molmasse des Polymers ist somit proportional der Startmonomerkonzentration und umgekehrt proportional zur Initiatorkonzentration. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch für die Molmasse von gepfropftem Polyacrylnitril auf Cellulose von Rogovin gefunden [126]. Die Proportionalität der mittleren Molmasse bei einer radikalischen Polymerisation zur Monomerkonzentration kann bei einem Abbruch durch Rekombination theoretisch hergeleitet

werde. Die Initiatorkonzentration der Ce^{4+} -initiierten Polymerisationsreaktion beeinflusst die Molmasse des Pfropfpolymeres mehr als dies gewöhnlich bei radikalischen Reaktionen der Fall ist. Für die meisten radikalisch initiierten Reaktionen gilt: $M_n \sim 1/\sqrt{\text{Initiatorkonzentration}}$. Möglicherweise ist die Redoxpolymerisation mit Ce^{4+} nicht rein radikalisch. (Die abgeleitete Beziehung 3.6 gilt für eine Reaktion in Lösung. Nach eigenen Erfahrungen bei der Pfropfpolymerisation an der festen Phase beeinflusst die Initiatorkonzentration die Pfropfausbeute weitaus weniger).

Aus der Gleichung 3.6 und den oben angegebenen Werten folgt auch, dass das Zahlenmittel der Polymere verhältnismäßig klein sein sollte (im Beispiel bei vollständigem Umsatz ca. 50000 Da, bei geringerem Umsatz erhält man entsprechend kleinere Werte). Gemessen wurden von Mino und Kaisermann mittlere Werte von 3500-5000 [122]. Ein Ce^{4+} -Initiatorsystem erzeugt somit in Lösung relativ kurzkettige Polymere. Das muss jedoch auf eine Oberflächenpolymerisation nicht uneingeschränkt übertragbar sein, da an der Geloberfläche andere Abbruchbedingungen gelten, als dies in Lösung der Fall ist [118]. Die Werte der Molmassen wurden für Acrylamid als Monomer bestimmt. Bei anderen Monomeren können wesentlich verschiedene Molmassen gefunden werden.

Die Pfropfeffizienz von einem Ce^{4+} -Redoxsystem kann nach Ergebnissen von Rogovin 80-90 % betragen [126]. Das bedeutet, dass bis zu 90 % des eingesetzten Monomers kovalent auf die Geloberfläche gebunden werden können. Das ist ein Vorteil von diesem Startsystem, es wird wenig Homopolymer gebildet welches schwierig zu entfernen ist. Sehr wichtig bei einer Pfropfreaktion ist auch die Auswahl des geeigneten Monomers.

Bei Pfropfreaktionen zur Funktionalisierung von Polymeroberflächen für die Chromatographie kann zwischen „Direktsynthesen“ das sind Polymerisationen mit Monomeren die schon funktionelle Gruppen tragen, sowie „Prägel-synthesen“ unterschieden werden.



Abb. 3.6 a) Ionenaustauscherpolymer aus einer Direktbeschichtung

b) Epoxygel als "Prägel" für nachfolgende Derivatisierungen

Bei den „Prägel-synthesen“ enthalten die Monomere aktive Gruppen, welche durch polymer analoge Reaktionen weiter umgesetzt werden können. Es können dadurch z.B. Affinitätsgele und Trägermaterialien für die hydrophobe Chromatographie hergestellt werden. Die

"Prägele" werden auch als aktivierte Träger bezeichnet. In den Tabellen 3.3 und 3.4 sind die von uns verwendeten Monomere für Oberflächenpolymerisationen aufgeführt :

Tabelle 3.2 Monomere mit funktionellen Gruppen für die direkte Herstellung von adsorptiven Oberflächenbeschichtungen

Monomer	Verwendung
2–Acrylamido-2-methyl-1-propansulfonsäure	Kationenaustauscher
Acrylamido-ethyl-2-sulfonsäure	Kationenaustauscher
Acrylamido N,N'-diethylaminoethylendiamin	Anionenaustauscher
Acrylamido N, N'-dimethylaminoethylendiamin	Anionenaustauscher
Methoxyacrylamid	Gelfiltration
Acrylamid	Flüssig–Flüssig Verteilungs- chromatographie [196]
Acrylsäure	Kationenaustauscher

Tabelle 3.3: Monomere für Prägelsynthesen (aktivierte Träger)

Monomer	Verwendung
Acrylamido N, N'-dimethylethylendiamin	Herstellung eines quarternären Anionenaustauscher durch Alkylierung mit Dimethylsulfat
2,3-Epoxypropylmethacrylat	„Universelles“ Monomer für eine Vielzahl von Liganden: Ionenaustausch-, Affinitätschromatographie und hydrophobe Chromatographie

Die ionischen Acrylamidderivate wurden durch Reaktion der Ethylendiamine (allgemein Diamine) oder Aminoethanol in wässriger, alkalischer Lösung mit Acrylsäurechlorid hergestellt (Reaktionsmechanismus nach Schotten-Baumann [129]).

Das Ce^{4+} -Initiationssystem ist jedoch nicht universell für alle Arten von Monomeren anwendbar. Es ist generell auf wässrige Systeme eingeschränkt, außerdem gibt es Schwierigkeiten bei der Pfropfpolymerisation von Acrylamidderivaten von Aminosäuren und

anderen mit Cer-bindenden Substanzen (z.B. Sulfonsäuregruppen)[130]. Diese Verbindungen werden zusammen mit den oberflächenständigen Hydroxygruppen oxidiert und bilden weitere Startradikale in Lösung, was eine starke Vernetzungstendenz zur Folge hat und zum „Verklumpen“ des Gels führt.

Mit den entwickelten Pfropfpolymerisationssystemen konnten zwei strukturell verschiedene Polymerstrukturen auf Chromatographiegele aufgebaut werden:

1. Pfropfpolymerer mit Amidstruktur
2. Pfropfpolymerer mit Methacrylatstruktur

Die mit amidischen Pfropfpolymeren modifizierte Trägermaterialien werden für die Ionenaustauschchromatographie und die Gelfiltration eingesetzt und die Pfropfpolymergele mit Methacrylatstruktur für die Hydrophobe Chromatographie und die Affinitätschromatographie. Der Markenname der Produkte ist Fractogel[®] EMD. Eine Übersicht über die einzelnen Produkte ist im Katalog der Fa. Merck zu finden [131].

Die Herstellungsmethode der amidischen Trägermaterialien wird hier nicht weiter diskutiert, da keine polymeranalogen Folgereaktionen möglich sind. Sie wurden jedoch in den Vergleich der Gele bezüglich der Massentransporteigenschaften mit einbezogen (siehe Kapitel 8).

3.5 Analytische Charakterisierung von oberflächengebundenen Polymeren

Die Charakterisierung von Pfropfpolymeren, welche auf porösen Trägermaterialien gebunden sind ist schwierig. Zentralproblem ist die Ablösung der gebundenen Polymere von der Oberfläche. Bei kovalent, gebundenen Polymeren ist eine Auflösung des Basismaterials notwendig. Das ist bei synthetischen polymeren Basismaterialien nicht möglich. Ausnahmen sind Sepharose[®], die mit Perjodsäure [127] und Kieselgel, das mit Fluorwasserstoffsäure zerstört werden kann.

Eine weitere Möglichkeit ist die Herstellung eines "Modellsystems" bei dem das Pfropfpolymer über einen hydrolyselabilen Anker an die Geloberfläche geknüpft ist (z.B. ein leicht hydrolysierbarer Ester [118]). Nach der Abtrennung des Polymers kann die Bestimmung der mittleren Molmasse durchgeführt werden. Bei einer Vernetzung des gebundenen Polymers auf der Geloberfläche ist eine Bestimmung der Molmasse jedoch nicht mehr möglich, da die Polymere im Allgemeinen nicht mehr löslich sind.

Die Vernetzungstendenz der von uns verwendeten Monomere (siehe Tabelle 3.2 und 3.3) wurde durch Stehen lassen der Reaktionslösungen in Gegenwart des Ce^{4+} Initiators (unter Inertgas) überprüft. Wurde nach 24 Stunden ein Polymerniederschlag erhalten, war eine

Vernetzungstendenz des Monomers nicht auszuschließen. Eine auffällige Neigung zur Quervernetzung bei der Ce^{4+} -angeregten Polymerisation wurde bei 2,3-Epoxypropylglycidylmethacrylat beobachtet. Die Ursache ist die Bildung von Diolgruppen durch Öffnung des Oxiranringes in der sauren Starterlösung (Siehe Kapitel 4) und ein der eigentlichen Oberflächchenpolymerisation nachfolgender Polymerisationsstart an den Diolgruppen unter Quervernetzung der Polymerketten.

Es wurden Untersuchungen zur Kettenlänge sowohl von Polyglycidylmethacrylatpolymeren als auch von ionischen Polyamiden durchgeführt. Die Polymere wurden für diese Untersuchungen anstelle auf Fractogel[®]-Partikel auf Kieselgel-Diol Partikel gepfropft. Anschließend wurde das Kieselgel mit wässriger Flusssäure hydrolysiert und das Restpolymer mit MALDI-MS untersucht. Dabei konnten keine freien Polymere nachgewiesen werden, was auf einen nicht zu vernachlässigenden Quervernetzungsgrad bei allen von uns untersuchten Polymeren hinwies.

Ähnliche Beobachtungen wurden schon von Regnier [128] gemacht. Von ihm wurde 2 Acrylamido-2-methyl-1-propylsulfonsäure mittels Ce^{4+} -Katalyse auf Kieselgel-Diol aufgebracht und das Polymer nach Zerstörung des Kieselgels ebenfalls mit MALDI-MS charakterisiert. Es wurden keine auswertbaren Molmassen gefunden woraus geschlossen wurde, dass das Polymer auf der Geloberfläche quervernetzt ist. Die Charakterisierung von Pfropfpolymeren auf der Oberfläche von Trägermaterialien kann deshalb bisher nur indirekt durch die Eigenschaften der erhaltenen Trägermaterialien mittels chromatographischer Methoden erfolgen.

4 Herstellung und Diskussion von polymermodifizierten Trägermaterialien

4.1 Einführung

Für die Durchführung von Ionenaustauschprozessen muss der Ligand eine immobilisierte basische oder saure ionische Gruppe enthalten. Für den Aufbau von Affinitätsgelen kann der Ligand aus einer Vielzahl von verschiedenen affinen Verbindungen ausgewählt werden (Beispiele sind Triazinfarbstoffe [132], Protein A [133] und Metallkomplexbildner [134]). Bei Materialien für die hydrophobe Interaktionschromatographie werden Alkyl- oder Arylverbindungen auf die Oberfläche von Trägermaterialien (bevorzugt Phenyl und Butylgruppen) gebunden [135].

Die erforderlichen Ligandendichten für eine praktisch nutzbare Bindungskapazität von Ionenaustauschermaterialien und Affinitätsträgern sind unterschiedlich. Eine Ursache ist, dass die Gleichgewichtskonstanten bei Affinitätsträgern im Allgemeinen 10¹⁰⁰ mal höher sind als die von Ionenaustauschern [136]. Bei Affinitätsträgern sind Ligandendichten von 4

20 $\mu\text{mol/ml}$ erforderlich um ausreichende Bindungskapazitäten zu erzielen (120 mg/ml je nach Ligand), wohingegen die Ligandendichten bei Ionenaustauschern 100 $\mu\text{mol/ml}$ und größer sein müssen um eine ebenso hohe Bindungskapazität zu erzielen. Wenn man Ionenaustauschermaterialien oder Affinitätsträger mit hohen Ligandendichten aus Epoxygelen durch polymeranaloge Reaktionen herstellen will, muss durch eine entsprechende Herstellungsmethode sichergestellt werden, dass hohe Epoxygruppendichten erzielt werden können. Im Folgenden wird kurz auf die Chemie der Oxirane eingegangen um die Vielzahl der Reaktionsmöglichkeiten zur Herstellung von Chromatographiematerialien hervorzuheben.

4.1.1 Reaktionen von Epoxiden

Epoxyde oder Oxirane sind Dreiringe, die ein Sauerstoffatom enthalten. Die gespannten Dreiringe sind im Gegensatz zu dem indifferenten Verhalten gewöhnlicher aliphatischer Ether sehr reaktiv und können mit verschiedenen elektrophilen und nukleophilen Verbindungen reagieren [137]. Den vermutlichen Reaktionsmechanismus für die Reaktion der Oxirane mit einigen elektrophilen und nucleophilen Reagenzien zeigt Abbildung 4.1:

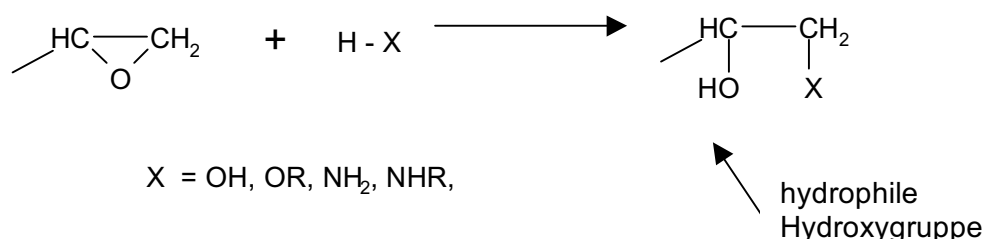


Abb. 4.1: Reaktionen von elektrophilen und nucleophilen Reagenzien mit einer Oxirangruppe. Bei der Ringöffnung wird eine hydrophile Hydroxygruppe gebildet.

Bei der Reaktion mit Nucleophilen verläuft die Reaktion nach einem $\text{S}_{\text{N}}2$ Mechanismus und das Nucleophil bindet an dem am wenigsten abgeschirmten Kohlenstoffatom. In diesem Fall das α -Kohlenstoffatom. Da die meisten Reaktionen zur Herstellung von Affinitätsträgern mit nucleophilen Verbindungen durchgeführt werden, sind die Liganden häufig endständig. Bei Reaktionen mit elektrophilen Verbindungen verläuft die Reaktion nach einem $\text{S}_{\text{N}}1$ Mechanismus und es entsteht das Produkt, das aus dem stabileren Carbokation hervorgeht. Das ist häufig das β -Kohlenstoffatom [138]. Die Möglichkeit, in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen sowohl mit Elektronendonatoren als auch mit Elektronenakzeptoren zu reagieren und nach der Reaktion hydrolysestabile und hydrophile Verbindungen zu

bilden, macht die Epoxide zu universellen Liganden. Es können auch Oberflächen ohne Hydroxygruppen beschichtet werden. Die hydrophilen Eigenschaften von Epoxiden sind zum Teil dadurch bedingt, dass durch die Ringöffnung eine zusätzliche Hydroxygruppe gebildet wird (siehe Markierung in Abbildung 4.1). Bei langkettigen, aliphatischen und nichtpolymeren Epoxiden besteht die Gefahr, dass das Alkylkettenrückgrat einen zu hydrophoben Charakter hat und Proteine unspezifisch bindet.

Die Verwendung der Epoxygruppe als aktive Gruppe in der Affinitätschromatographie wurde von Porath und Sundberg beschrieben. Als Aktivierungsreagenzien wurden von ihnen Epchlorhydrin und 1,4-Butandiol diglycidylether benutzt [139], [140] :

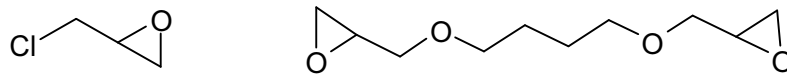


Abb. 4.2: Nichtpolymere epoxygruppenhaltige Aktivierungsreagenzien

Immobilisierungsreaktionen mit Epoxiden wurden insbesondere auf Sepharosegelen durchgeführt und dazu verwendet, Trägermaterialien für die Affinitätschromatographie herzustellen. Die Bedingungen dieser nichtpolymeren Immobilisierungsmethode wurden auf Fractogel[®] übertragen (Eigenschaften des Fractogels[®] im Anhang A1) und optimiert. Die Eigenschaften von daraus hergestellten Affinitätsträgern wurden mit denen von polymermodifizierten Trägermaterialien verglichen (siehe Kapitel 4.4).

4.2 Ergebnisse der polymeren Beschichtung mit Epoxygruppen

Die Eignung von anderen Metallkomplexsalzen (z.B. Ammoniummetavanadat und Dichromat) für die Initiierung der Pfropfpolymerisation von Glycidylmethacrylat getestet. Der Beschichtungsgrad mit Pfropfpolymer war jedoch insgesamt zu gering (< 5 %) im Vergleich zur Ce⁴⁺-Redoxsystemmethode, so dass diese Redoxsysteme nicht weiter betrachtet wurden.

Das Ce⁴⁺-Redoxsystem hat den Vorteil, dass auf allen hydroxygruppenhaltigen Trägermaterialien eine Pfropfung erzielt werden konnte. Der Beschichtungsgrad kann 100 % und höher sein und ist leicht steuerbar, so dass wir uns für dieses Initiatorsystem entschieden hatten.

Nach einer Reihe von Optimierungsversuchen zur Oberflächenbeschichtung von Fractogel[®] HW 650 (M) mit Glycidylmethacrylat wurde eine bestimmte Reaktionsvorschrift "eingefroren" und von diesem Punkt ausgehend die experimentellen Bedingungen systematisch variiert

um die Einflüsse der Reaktionsparameter abschätzen zu können (Methode 8.1.1). Es gibt bei der Herstellung eines polymer-beschichteten Gels für die Chromatographie nach unserer Erfahrung drei wichtige Zielgrößen:

1. Pfropfgrad (optimal)
2. Epoxygruppendichte und Bindungskapazität des zum Ionenaustauscher modifizierten Gels (maximal)
3. Permeabilität des Gels (möglichst unbeeinflusst)

Die wesentlichen Einflussgrößen auf den Pfropfgrad sind:

1. Die Reaktionszeit
2. Die Monomerkonzentration
3. Die Ce^{4+} -Konzentration

Die Ce^{4+} -Konzentration wurde aus ökonomischen Gründen und bedingt durch die Schwierigkeit der Entfernung des nicht umgesetzten Cer auf ein Minimum eingeschränkt und konstant gehalten. Der Einfluss der Reaktionszeit auf die Epoxygruppendichte bei einer Monomerkonzentration von 0,15 M zeigt die folgende Darstellung:

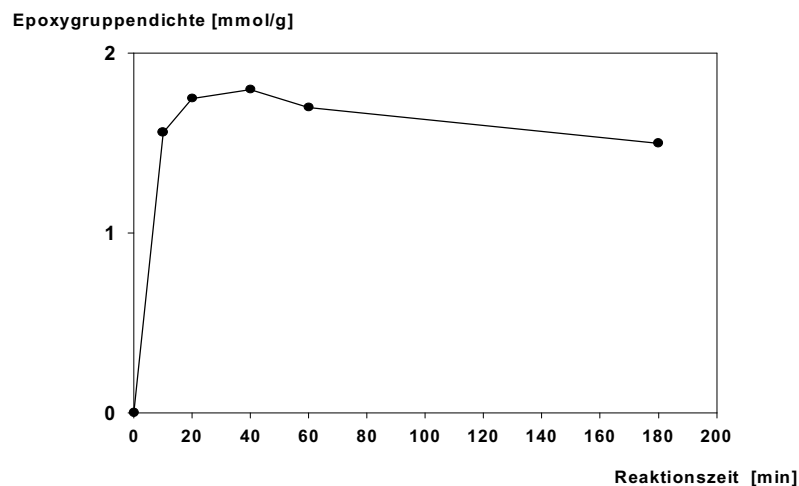


Abb. 4.3: Einfluss der Reaktionszeit auf den Epoxygruppengehalt von Polyglycidylmethacrylat (200 ml einer wässrigen Lösung aus 0.015 M Ce^{4+} , 0.08 M Salpetersäure und 0.15 M Glycidylmethacrylat sowie 100 ml feuchtes Fractogel® HW 650 (M))

Die Oberflächenpolymerisation verläuft schnell. Schon nach etwa 10 min ist eine hohe Epoxygruppendichte erreicht. Mit einer Molaren Masse von 142 g/mol für das Monomer 2,3 Epoxypropylmethacrylat entspricht der maximalen Epoxygruppendichte von 1,788 mmol/g einem Pfropfgrad von 25,4 %. Die höchsten Ausbeuten an Epoxygruppen erhält man bei Reaktionszeiten von 30 bis 60 min.

Die leichte Abnahme der Epoxygruppendichte nach ca. 50 min Reaktionszeit ist durch die Hydrolyse des gepfropften Glycidylmethacrylates zum Diol in der stark sauren Lösung bedingt. Die Hydrolyse erfolgt nach folgender Gleichung:

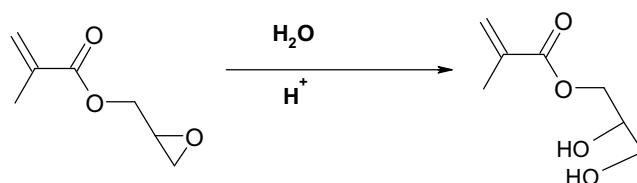


Abb. 4.4: Hydrolyse von Epoxygruppen in Gegenwart von verdünnten Mineralsäuren zum Diol

Diese Reaktion, ist wie schon erwähnt, die Ursache für die Vernetzung der Polymerketten auf der Geloberfläche. Der Einfluss der Monomerkonzentration auf den Pfropf oder Beschichtungsgrad ist in Abb. 4.5 gezeigt:

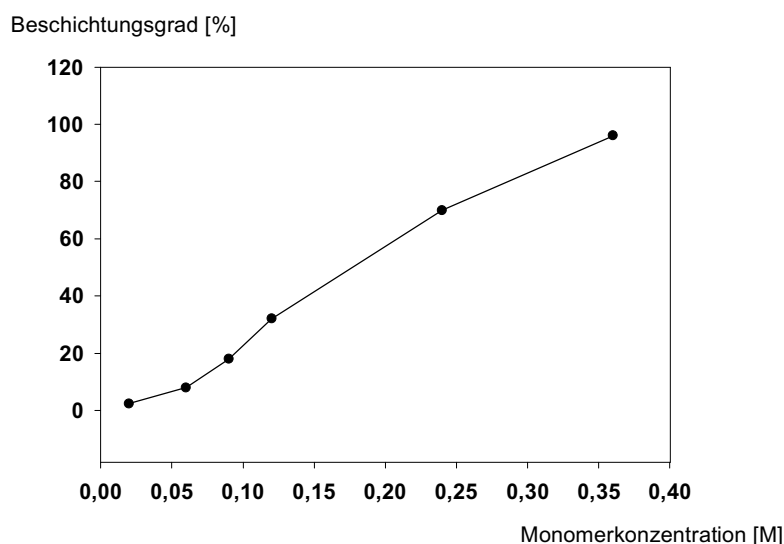


Abb. 4.5: Pfropfgrad für 2,3 Epoxypropylmethacrylat in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Monomers

Die Monomerkonzentration bei einem „optimierten“ Reaktionsansatz betrug 0,15 M. Der Beschichtungsgrad nahm bei Monomergehalten größer als 0,06 M stark zu. Gele mit höheren Polymergehalten als 50 % hatten einen zu hohen Druckabfall und wurden bei linearen Flüssen von > 1 cm/min irreversibel komprimiert. Die Pfropfeffizienz (Masse gebundenes Polymer/Masse eingesetztes Monomer) ist bei niedrigen Monomerkonzentrationen kleiner als bei höheren Konzentrationen wie in der folgenden Abbildung 4.6 gezeigt wird:

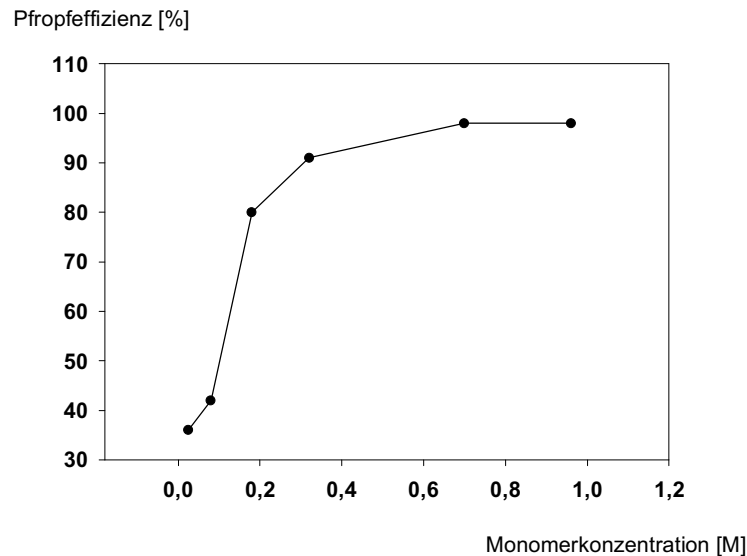


Abb. 4.6: Pfropfeffizienz als Funktion der Monomerkonzentration

Dieses Verhalten, der starke Anstieg der Pfropfeffizienz im Bereich von 0,2 und 0,4 M kann als ein Art Trommsdorffeffekt auf der Geloberfläche gedeutet werden [118]. Es werden bei höheren Anfangskonzentrationen längere Ketten gebildet. Der Abbruch der Polymerisation durch Rekombination ist dann stärker behindert, was den völligen Verbrauch des Monomers durch weiteres Kettenwachstum zur Folge hat.

Die Pfropfpolymerisation von Glycidylmethacrylat mit CefInitiierung ist auf allen Trägermaterialien mit Hydroxy- oder Diolgruppen möglich. Bei Trägermaterialien die keine Hydroxygruppen besitzen, kann diese Methode nicht benutzt werden. Ein Beispiel für ein hydroxygruppenfreies Trägermaterial ist Polyamid 6. Polyamid 6 wird durch Ringöffnungspolymerisation aus ϵ -Caprolactam hergestellt [142]. Es wird unter anderem zur Herstellung von Mikrofiltrationsmembranen benutzt. Man kann sowohl Flachmembranen als auch Hohlfasermembranen aus diesem Polymer fertigen [143].

Die chemische Derivatisierung von Polyamid 6 durch Endgruppenderivatisierung wurde erstmalig durch Inman und Hornby beschrieben [144]. Die bevorzugte Methode der Aktivierung ist die Kopplung über die Aminoendgruppe der Polyamid 6 Polymerkette [145].

Polyamid kann auch durch radikalische Anregung im Niederdruckplasma mit Polymer beschichtet werden [146]. Vom Autor wurde ein chemisches Verfahren entwickelt (siehe Methode 8.1.11.), bei dem die Endgruppen der Polyamidketten die Startgruppen für eine Blockpolymerisation sind. Die Polyamidketten enthalten Aminogruppen, an welche nach dem folgenden Reaktionsschema Polyglycidylmethacrylatketten aufpolymerisiert werden können [54]:

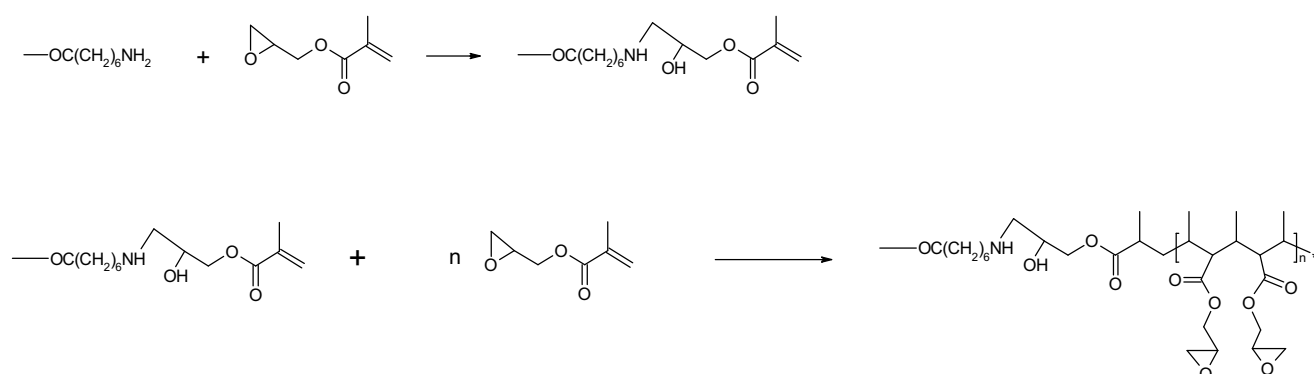


Abb. 4.7: Blockpolymerisation von 2,3-Epoxypropylmethacrylat auf Polyamid 6

Im ersten Reaktionsschritt reagiert Glycidylmethacrylat im stark alkalischen Medium mit den Aminoendgruppen. Die Endgruppe des Polyamidmoleküls enthält jetzt eine Doppelbindung des Methacrylatesters auf die eine Übertragungsreaktion von einem Radikal entsprechend einem "grafting to" Schritt erfolgen kann. Im nächsten Reaktionsschritt wird Polyglycidylmethacrylat als Blockpolymer an der Polyamidfaseroberfläche, durch eine Radikalische Polymerisation mit Azoisobutyronitril (AIBN) als Starter in Toluol, gebildet. Durch eine Farbreaktion mit Ninhydrin wurde die mittlere Ligandendichte der vor der Reaktion vorhandenen Aminogruppen auf dem Polyamid bestimmt. Sie liegt je nach dem Herstellungsverfahren bei ca. $15 \mu\text{mol/g}$. Bei einer spezifischen Oberfläche von $7 \text{ m}^2/\text{g}$ stehen somit für die Übertragungsreaktion $2,14 \mu\text{mol/m}^2$ Doppelbindungen zur Verfügung. Die Umsetzung der Aminoendgruppen mit Glycidylmethacrylat im stark alkalischen Medium betrug 90 % der Theorie (die Bilanzierung erfolgte über die Bestimmung des Gehaltes an Epoxygruppen nach der Pfropfpolymerisation durch Titration und des Blockpolymerisationsgrades). Eine längere Reaktionszeit führt zu einer Hydrolyse der Estergruppen des Glycidylmethacrylates und zur Abnahme der verfügbaren Doppelbindungen auf der Oberfläche.

Der Beschichtungsgrad der Polyamidhohlfasern mit Polyglycidylmethacrylat wurde in Abhängigkeit von der Anfangsmonomerkonzentration in der Lösung untersucht (Reaktionszeit 1 Stunde, Reaktionstemperatur $93 \text{ }^\circ\text{C}$):

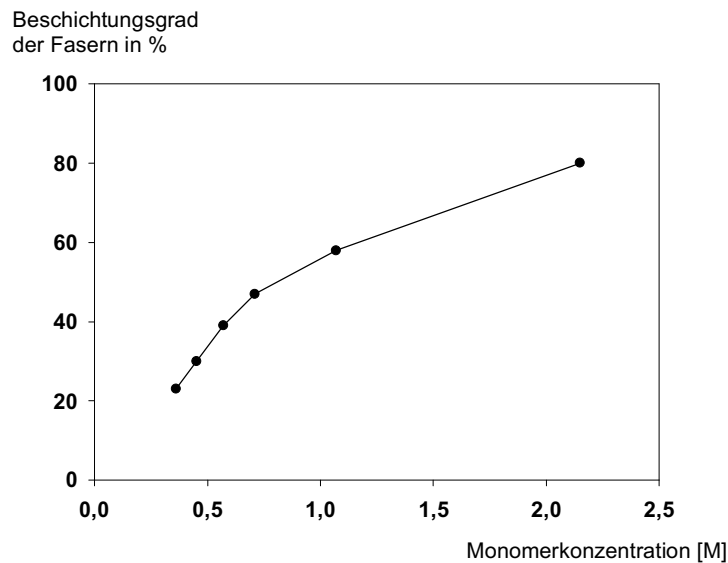


Abb. 4.8: Beschichtungsgrad von Polyamidhohlfasern in Abhängigkeit von der Monomerkonzentration in der Reaktionslösung bei einer radikalischen Polymerisation

Im Bereich von 0,35 bis 0,8 M der Monomerkonzentration beobachtet man einen nichtlinearen Anstieg des Beschichtungsgrades als Funktion der Monomerkonzentration. Dieser Zusammenhang wurde schon bei der Ce^{4+} -initiierten Polymerisation gefunden und ist ebenfalls auf den schon beschriebenen Oberflächen-Trommsdorf-Effekt zurückzuführen. Der Beschichtungsgrad kann mit Monomerkonzentrationen größer als 1,5 M nur noch wenig gesteigert werden. Der mittlere Epoxygruppengehalt der derivatisierten Membranen betrug ca. 1 mmol/g Membran.

Es wurden von uns nach diesem Verfahren Polyamidhohlfasern derivatisiert, die mit nachfolgenden Modifikationen zu Ionenaustauschern für die Membranchromatographie modifiziert wurden (Methode 12. und 14.). Die Daten des Basismaterials sind im Anhang A2 aufgeführt und die speziellen Eigenschaften der Membranadsorber werden im Kapitel 7 diskutiert.

4.3 Ergebnisse der polymeranalogen Umsetzungen an den Epoxygruppen

4.3.1 Diolgruppe

Die Herstellungsvorschriften der nachfolgend beschriebenen Reaktionen sind im Methodenteil (8.1.6., 8.1.7., 8.1.8., 8.1.9., 8.1.10.) detailliert beschrieben [1517], [23]. Die Addition von Wasser an die Epoxidgruppe kann sowohl säure- als auch basenkatalysiert erfolgen. Die Geschwindigkeitskonstante für die Hydrolyse von Glycidol mit Perchlorsäure ist

etwa 35 mal so hoch wie mit Kalilauge [147]. Die Epoxygruppe sollte deshalb säure katalysiert geöffnet werden. Es können verdünnte Perchlorsäure und Schwefelsäure für die Hydrolyse verwendet werden. Restepoxygruppen (nach nicht vollständigen Umsetzungen) wurden mit verdünnter Schwefelsäure hydrolysiert. Diese Bedingungen waren aber nur auf das Fractogel[®]-Polymer anwendbar, da dieses Material sehr säurestabil ist. Polyamid 6 ist nicht säurestabil. Die Restepoxygruppen auf diesem Material wurden durch Reaktion mit Ethanolamin geöffnet.

4.3.2 Anionenaustauscher

Durch Reaktion mit Aminen können verschiedene Ionenaustauscher hergestellt werden. Die einfachste Variante ist die Reaktion des Epoxypolymers mit Ammoniak. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist kleiner als die, welche mit sekundären oder tertiären Aminen erzielt wurde [148]. Der Aminoligand ist so schwach basisch, dass er nicht als Ionenaustauscherguppe verwendet werden kann. Bei der Reaktion mit Diethylamin wird eine schwach basische Anionenaustauscherguppe (N,N-Diethylamino-2-hydroxypropyl, $pK = 9.5$, DEA-Gruppe) und bei der Reaktion mit Trimethylamin wird eine stark basische Anionenaustauscherguppe (Trimethylammonium-2-hydroxypropyl, $pK > 13$, TMA-Gruppe) gebildet. Die DEA-Gruppe verhält sich chromatographisch vergleichbar zu der häufig beschriebenen DEAE (Diethyl aminoethyl)-Gruppe von schwach basischen Austauschern.

Die Addition von Diethylamin wird durch einen Wasseranteil begünstigt (in reinem Diethylamin konnte bei 50 °C nach 30 min kein Umsatz festgestellt werden), wohingegen bei einem Wasserzusatz von 50 % nach 24 Stunden bei Raumtemperatur ein Umsatz von größer 60 % erreicht werden konnte).

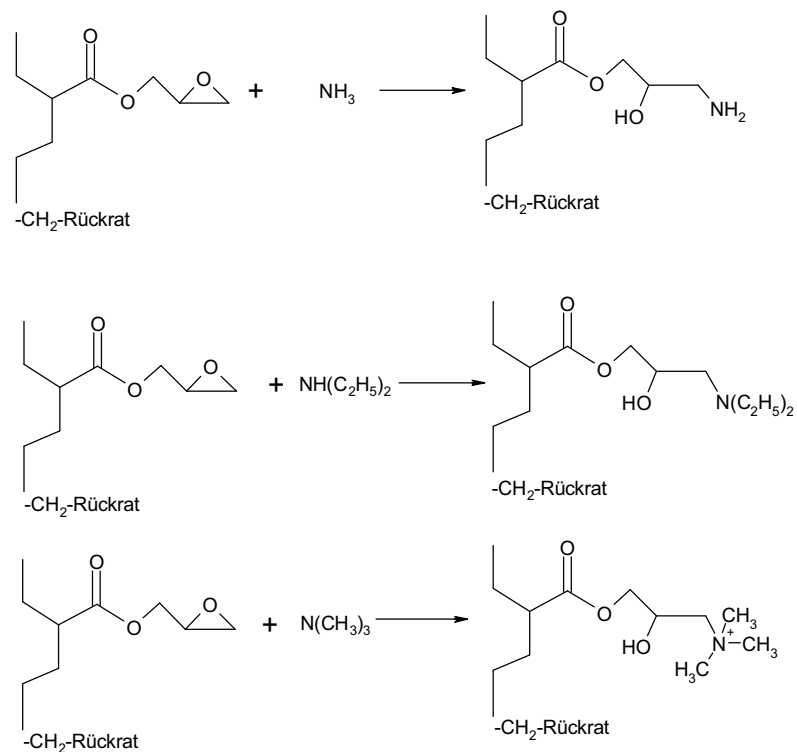


Abb. 4.9: Reaktionen der Epoxygruppe mit Aminen

Die folgende Tabelle zeigt die maximalen Ligandendichten, welche durch Reaktion von Aminen auf mit Polyglycidylmethacrylat beschichteten Trägermaterialien erreicht wurden:

Tabelle 4.1 Experimentell gefundene maximal mögliche ionische Ligandendichten von Aminderivaten

Material	Maximale ionische Ligandendichten [mmol/g]
Fractogel [®] EMD Amino ¹ (M)	0,1
Fractogel [®] EMD DEA ² (M)	1,1
Fractogel [®] EMD TMA ² (M)	1,3
Polyamid 6 Hohlfasermembran DEA ²	0,96
Polyamid 6 Hohlfasermembran TMA ²	0,87

¹Bestimmt durch Titration mit 3-(2-pyridylthio)propionsäure N-hydroxysuccinimidester durch photometrische Messung des freigesetzten Thiopyridins

² Bestimmt durch potentiometrische Titration mit 0,1 M HCl.

Die geringe Ligandendichte von freien Aminogruppen bei der Reaktion der Epoxygruppen mit Ammoniak ist auf die starke Quervernetzungstendenz von Aminen bei der Reaktion mit Epoxiden zurückzuführen. Die Umsetzungsgrade für Diethylamin und Trimethylamin mit dem Epoxigel betragen jeweils 60 % und 95 %. Diese Werte wurden durch Titration der Epoxigruppen vor und nach der Umsetzung ermittelt. Die Proteinbindungskapazität kann für die Anionenaustauscher durch Beladung mit Rinderserumalbumin (10 mg/ml Rinderserumalbumin in 20 mM Tris-Puffer, pH 8) bestimmt werden (Vorschrift 8.1.6. und 8.1.11. im Methodenteil.). Für experimentelle Anionenaustauschermaterialien wurden folgende durchschnittliche Bindungskapazitäten gefunden:

Tabelle 4.2 Bindungskapazitäten für Rinderserumalbumin von Anionenaustauschern

Material	Bindungskapazität für Rinderserumalbumin [mg/ml]
Fractogel® EMD DEA (M)	160
Fractogel® EMD TMA (M)	140
Polyamid 6 Hohlfasermembran DEA	62
Polyamid 6 Hohlfasermembran TMA	70

4.3.3 Kationenaustauscher

Hier unterscheidet man ebenfalls zwischen schwachen und starken Kationenaustauschern. Von den mit Polyglycidylmethacrylat derivatisierten Trägermaterialien wurden nur starke Kationenaustauscher (Sulfoaustauscher) hergestellt. Der ionische Ligand ist hier eine Sulfonsäuregruppe, die durch Reaktion des Epoxygels mit Hydrogensulfit (oder Sulfit) hergestellt werden kann.

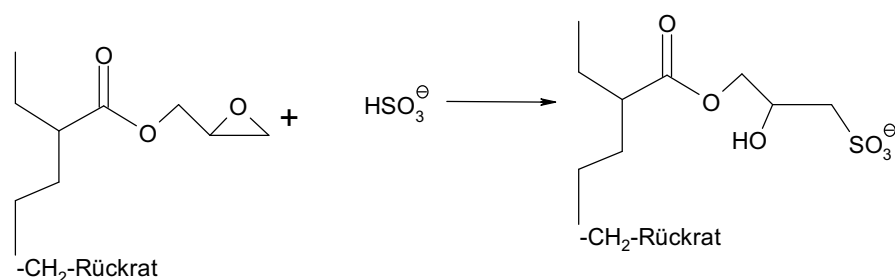


Abb. 4.10: Herstellung eines Sulfoaustauschers durch Reaktion einer Epoxygruppe mit Hydrogensulfit

Die Sulfonierungsgrade sind mit Phasentransferkatalyse unter Verwendung von Tetrabutylammoniumhydrogensulfat quantitativ [149]. Folgende maximale Proteinbindungskapazitäten (mit Lysozym) konnten auf verschiedenen Trägermaterialien erhalten werden (Vorschriften 8.1.7. und 8.1.15. im Methodenteil):

Tabelle 4.3 Proteinbindungskapazitäten für Lysozym von Kationenaustauschern

Material	Bindungskapazität für Lysozym [mg/ml]
Fractogel® EMD Sulfo (M)	100
Polyamid 6 Hohlfasermembran Sulfo	92

Durch die polymeren Beschichtungsverfahren können folglich sehr hohe Bindungskapazitäten für Ionenaustauscher erzielt werden. Bei der Übertragung dieser Beschichtungsverfahren auf Membranfasern können auf sehr kleinen Oberflächen (< 10 m²/g) ebenfalls hohe Bindungskapazitäten erreicht werden. Im nächsten Kapitel wird die Herstellung von Affinitätsmaterialien durch polymere Beschichtungsverfahren erläutert.

4.3.4 Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC)

Der Mechanismus der Wechselwirkung von, an chelatbildenden Substanzen, immobilisierten Metallionen für die Trennung von Proteinen (IMAC) ist gut untersucht und aufgeklärt. Das Prinzip der Adsorption ist in der Abbildung 5.2 dargestellt [151]:

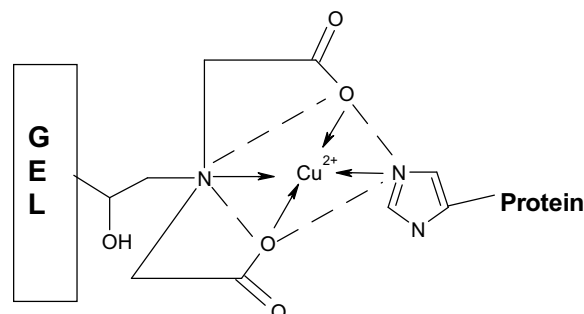


Abb. 4.11: Wechselwirkungsmechanismus eines mit Iminodiessigsäure komplexierten Cu²⁺-Ions auf einer Geloberfläche mit den Histidindgruppen eines Proteins

Ein Komplexbildner, hier Iminodiessigsäure, wird auf einem Epoxygel immobilisiert. Vor der Bindung von Proteinen wird das Gel mit Übergangsmetallionen beladen. Bevorzugt sind insbesondere Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} und Ni^{2+} . Die Proteinbindung erfolgt mittels Ligandenaustausch mit insbesondere oberflächenständigen Histidinresten auf Proteinen [152]. Durch gentechnische Methoden können natürliche Proteine so verändert werden, dass sie Histidinschwänzchen tragen (sogenannte Fusionsproteine). Dadurch bekommen sie eine sehr hohe Affinität zu einem Metallchelatgel und können mit guten Ausbeuten aus Proteinpräparationen isoliert werden [153]. Die Bindungsstärke hat in Bezug auf die Metallionen folgende Stärke: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Die gebundenen Proteine können durch Elution mit Imidazol oder durch einen pH-Gradienten eluiert werden. Zur Herstellung eines IMAC Trägers wurde das polymere Epoxygel mit Iminodiessigsäure (IDA) im stark alkalischen Medium nach folgendem Reaktionsmechanismus umgesetzt (Vorschrift 8.1.9. im Methodenteil):

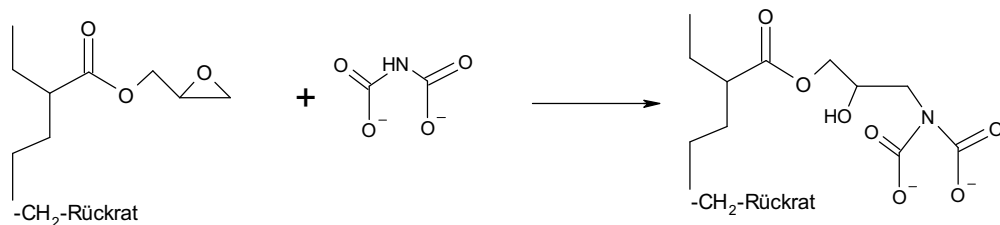


Abb. 4.12: Reaktion einer Epoxygruppe mit dem Natriumsalz der Iminodiessigsäure

Die nach Optimierung maximal erreichbaren Ligandendichten an gebundener Iminodiessigsäure betragen 0,4 mmol/g. Es wurden 30 % der nach der Polymerisation vorhandenen Epoxygruppen umgesetzt. Für die Reaktion wurde das Dinatriumsalz der IDA verwendet. Mit dem polymeren IMAC Trägermaterial (Fractogel[®] EMD Chelat (M)), konnten Proteinbindungskapazitäten von maximal 70 mg/ml Lysozym erzielt werden. Das war im Durchschnitt 2 mal höher als die Kapazitäten, welche auf nichtpolymer beschichteten Trägermaterialien erreicht wurden.

4.3.5 Thiophile Adsorption

Gele mit thiophilen Liganden sind geeignet, unter schwach hydrophoben Bedingungen Antikörper zu binden [150]. Diese Eigenschaft macht das Gel interessant für die Trennung von Albumin aus Antikörperpräparationen. Albumin tritt als Verunreinigung sowohl bei der Reinigung von polyklonalen Antikörpern als auch von monoklonalen Antikörpern auf. In Gegenwart von 0,5 M bis 0,8 M Ammonium- oder Kaliumsulfat werden Antikörper gebunden,

wohingegen Albumin keine Affinität zu dem Gel besitzt. Die Antikörper können danach bei geringer Ionenstärke (20-50 mM) und neutralem pH Wert eluiert werden.

Die wichtigste, etablierte Methode der Antikörperreinigung ist die Protein A Chromatographie [154]. Protein A besitzt eine hohe Spezifität für Antikörper. Wird dieses Protein auf Gelen immobilisiert können Antikörper sehr effizient abgetrennt werden. Albumin wird an diese Gele nicht gebunden. Die an diese Materialien gebundenen Antikörper müssen mit einem sehr niedrigen pH desorbiert werden, was teilweise eine Denaturierung der gebundenen Antikörper zur Folge hat. Die thiophile Adsorption ist eine Alternativmethode zur Protein A Affinitätschromatographie.

Der genaue Mechanismus der Wechselwirkung T-Gel und Protein ist nicht bekannt. Vermutlich gibt es Donator-Akzeptor Wechselwirkungen von aromatischen Aminosäuresequenzen (als Oligopeptide) und der T-Gel Gruppierung. Thiophile Gele enthalten im Allgemeinen folgende Struktur motive im Liganden:

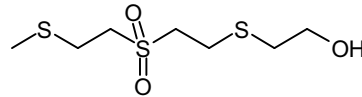
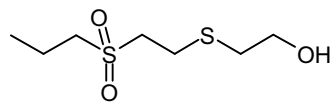


Abb. 4.13: "2S" T-Gel

"3S" T-Gel

Es wurde durch Untersuchungen nachgewiesen, dass die Sequenz: Sulfongruppe und Thioether (sogenanntes "2S" T- Gel) mit hoher Ausbeute Antikörper selektiv bindet [155]. Diese Wirkung kann durch eine zusätzliche Thioethergruppe noch verstärkt werden. Strukturell verschiedene Heteroaromaten können ebenfalls zur spezifischen Adsorption von Antikörpern benutzt werden (z.B. Mercaptopyridin). Eine solche Wechselwirkung wird als Aza-Arenophil Bindung bezeichnet [156].

Das 3S T-Gel konnte durch die Reaktionsfolge: 1. Umsetzung des polymer-modifizierten Epoxygels mit Natriumhydrogensulfid, 2. Reaktion mit Divinylsulfon und 3. Reaktion mit Mercaptoethanol aus einem Epoxygel hergestellt werden.

Die Umsetzung mit Hydrogensulfid war quantitativ. Die Reaktionen mit Divinylsulfon und Mercaptoethanol hatten Ausbeuten von etwa 80 % der Theorie. Die mit Polyglycidylmethacrylat hergestellten Gele (Fractogel® EMD TA) haben eine Bindungskapazität von ca. 40 mg/ml humanes Immunglobulin und sind damit vergleichbar den Bindungskapazitäten der Gele mit immobilisiertem Protein A oder Protein G welche etwa 50 mg/ml humanes Immunglobulin binden.

4.4 Polymere Liganden als Spacer

Im vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass polymere Modifizierungen es ermöglichen, Trägermaterialien mit sehr hohen Bindungskapazitäten herzustellen. Es wird im Folgenden auf die Problematik der besseren Zugänglichkeit der Analyten zu polymermodifizierten Liganden eingegangen.

Eine bis heute diskutierte Problematik in der Biochromatographie, insbesondere der Affinitätschromatographie, ist die Bedeutung eines Spacers oder Abstandshalters für die Ausbeuten bei einem chromatographischen Reinigungsprozess. Auf diese Problematik wurde schon in Kapitel 2.2. hingewiesen. Ein Spacer sollte die Zugänglichkeit zu einem Liganden verbessern. Ein mögliches Szenario der sterischen Verhältnisse bei Bindung von Proteinen an Geloberflächen zeigt Abbildung 4.14:

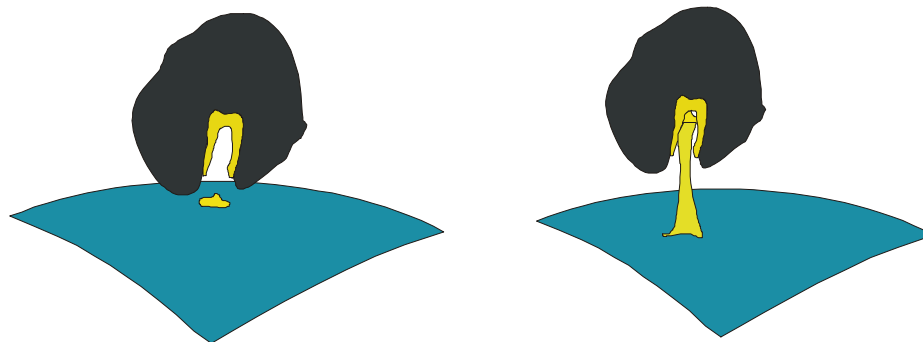


Abb. 4.14: *Immobilisierung von Liganden ohne Spacer*

Immobilisierung von Liganden mit Spacer

Ist der Spacer zu kurz, sind die Liganden für das Protein nicht mehr zugänglich. Als Spacer können verschiedene Verbindungen benutzt werden. Bevorzugt sind Diamine (z.B. Hexamethyldiamin, Ethylendiamin, Dicarbonsäuren (Adipinsäure), Polyethylenglykol oder Aminosäuren [157]). Es wurden im Rahmen dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen durchgeführt, inwieweit immobilisiertes Polyglycidylmethacrylat, mit Liganden in den Seitenketten, als Abstandshalter (Spacer) verwendet werden kann. Es wurden deshalb folgende drei Immobilisierungsmethoden miteinander verglichen:

1. Immobilisierung von Liganden ohne Spacer (Aktivierung mit Epichlorhydrin)
2. Immobilisierung von Liganden unter Verwendung eines "Einpunktspace" (Aktivierung mit Butandiolglycidether)
3. Polymerer Spacer (Immobilisierung von Liganden auf einer Polyglycidylmethacrylat beschichtung)

Der Vergleich gewinnt an Plausibilität wenn für alle drei Methoden dasselbe Basismaterial eingesetzt wird: Fractogel® HW 650 (M). Das ist bei vergleichenden Untersuchungen in der Literatur häufig nicht gegeben. Es werden häufig die Eigenschaften von Trägermaterialien mit demselben Liganden, jedoch unterschiedlichen Basismaterialien verglichen [199]. Das Basismaterial hat jedoch einen bedeutenden Einfluss auf die Bindungseigenschaften, was im Kapitel 5.1 noch eingehender diskutiert wird. Durch die Verwendung eines einheitlichen Basismaterials sind die unspezifischen Wechselwirkungen des Proteins mit der Oberfläche bei den verschiedenen Spacertechnologien gleich. Die Reaktionsbedingungen wurden so angepasst, dass die erhaltenen Epoxygruppensdichten aller drei Aktivierungsmethoden in einem vergleichbaren Größenordnungsbereich lagen. Für den Vergleich wurden für jede Spacer-Technologie jeweils ein Anionenaustauscher vom DEATyp und ein IMAC-Affinitätsgel hergestellt (siehe Tabelle 4.5).

Die Ausgangsligandensdichten der Epoxygele sind in Tabelle 4.4 gezeigt (Die Aktivierung der Fractogel® Materialien mit Epichlorhydrin und Bisglycidylether erfolgte nach den Methoden von Sundberg, Porath [139] und Porath, Fornstedt [140]). Die polymeranalogen Reaktionen mit Diethylamin und Iminodiessigsäure wurden entsprechend den im Methodenteil beschriebenen Vorschriften (8.6 und 8.9) durchgeführt:

Tabelle 4.4 Epoxygruppensdichten von verschiedenen Aktivierungsmethoden auf Fractogel® HW 650 (M)

Methode	Ligandendichte [mmol/g]
Aktivierung mit Epichlorhydrin	0,9
Aktivierung mit Butandiol(bis)diglycidylether	0,5
Aktivierung mit Polyglycidylmethacrylat	1,3

Bei der Aktivierung mit Bisglycidylether konnte auch durch Optimierung keine Steigerung der Ligandendichte größer als 0,5 mmol/g erzielt werden.

Aus diesen Gelen wurden durch Reaktion mit Diethylamin schwach basische Austauscher und durch Reaktion mit Iminodiessigsäure metallionenkomplexierende Gele für die IMAC hergestellt. Die erhaltenen Ligandensdichten sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst:

Tabelle 4.5 DEA-Ligandendichten und Iminodiessigsäureligandendichten der Epoxy - Aktivierungsmethoden

Methode	Ligandendichte DEA – Gruppen [mg/ml] ¹	Ligandendichte Iminodiessigsäure [mg/ml] ²
Aktivierung mit Epichlorhydrin (Fractogel [®] DEA (M), Fractogel [®] IDA (M))	9,7	4,4
Aktivierung mit Butandiol(bis)diglycidylether (Fractogel [®] Spacer DEA (M), Fractogel [®] Spacer IDA (M))	6,9	7,8
Aktivierung mit Polyglycidylmethacrylat (Fractogel [®] EMD DEA (M), Fractogel [®] EMD Chelat (M))	10,1	5,2

¹Titration mit 0,1 M HCl

²Bestimmt durch Titration mit Cu²⁺ - Ionen

Die Reaktionsausbeuten sind für den Butandiol(bis)diglycidylether höher als bei den beiden anderen Immobilisierungsmethoden, was vermutlich durch die mehr hydrophile Struktur des Ethers bedingt ist. Es wurden folgende Lysozymbindungskapazitäten für die Gele ermittelt:

Tabelle 4.6 Proteinbindungskapazitäten von DEA-Austauschern und IMAC-Gelen

Methode	BSA-Bindungskapazität für einen DEA–Anionenaustauscher [mg/ml]	Lysozymbindungskapazität für ein Cu ²⁺ -Chelatgel [mg/ml]
Aktivierung mit Epichlorhydrin (Fractogel [®] IDA (M), Fractogel [®] DEA (M))	15	0
Aktivierung mit Butandiol(bis)diglycidylether (Fractogel [®] Spacer IDA (M), Fractogel [®] Spacer DEA (M))	33	35
Aktivierung mit Polyglycidylmethacrylat (Fractogel [®] EMD Chelat (M), Fractogel [®] EMD DEA (M))	80	42

Definiert man einen dimensionslosen Index E_F zur Charakterisierung der Effektivität der Ligandennutzung für die Proteinbindung durch:

$$E_F = \frac{Q_{\max}}{c_{\text{ligand}}} \quad 4.1$$

Q_{\max} Gleichgewichtsbindungskapazität [mg/ml]

c_{ligand} Ligandendichte [mg/ml]

so erhält man folgende Darstellung für die Effektivität von verschiedenen Immobilisierungsmethoden (Abb. 4.15):

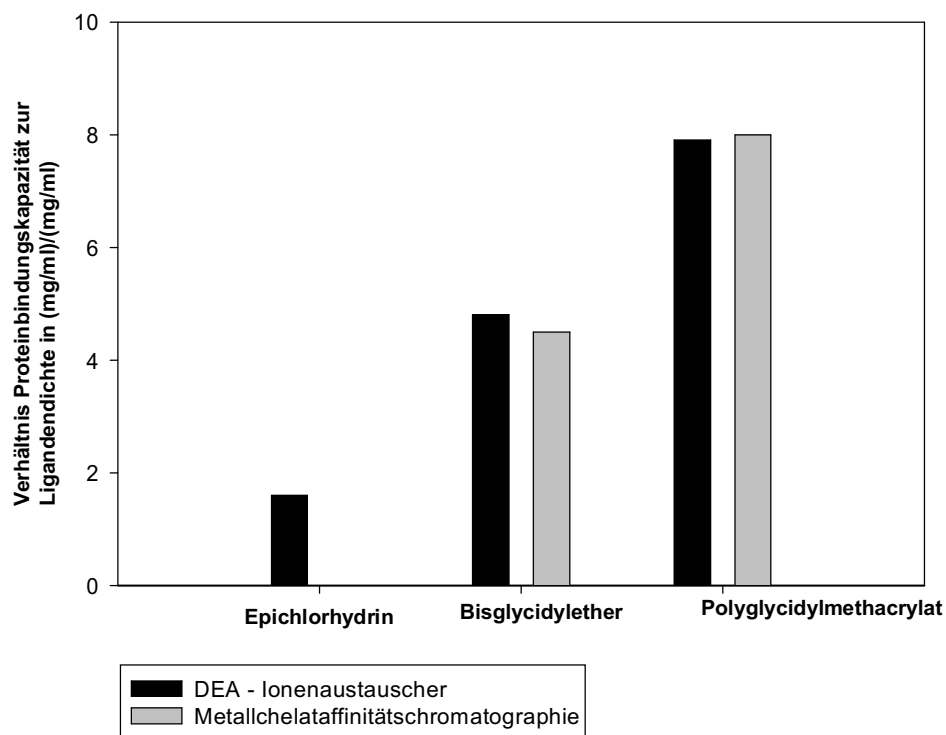


Abb. 4.15: Bedeutung eines Spacers für die Proteinbindungskapazität von immobilisierten Liganden bei Anionenaustauscher- und IMAC Gelen

Es wird hier ersichtlich, dass ein Spacer grundsätzlich eine Erhöhung der Proteinbindungskapazität zur Folge hat. Polymere Spacer aus Polyglycidylmethacrylat haben strukturell Vorteile, da sie in jeder Seitenkette Liganden tragen und somit eine bessere Ausnutzung der Liganden ermöglichen sollten. Der Effekt des Spacers wird bei höher affinen Liganden wie den IMAC Liganden, noch grösser. So konnte bei einem mit Epichlorhydrin aktivierten Gel

(ohne Spacer) konnte für das daraus hergestellte Metalchelatatgel keine Bindungskapazität nachgewiesen werden.

Die höhere Proteinbindungskapazität der polymerbeschichteten Gele wurde nicht durch eine gesteigerte Ligandendichte erreicht, sondern ist ausschließlich ein Resultat der besseren räumlichen Zugänglichkeit zu den Liganden. Ähnliche Ergebnisse wurden von Boschetti [158] beim Vergleich von verschiedenen Ionenaustauschergelen beschrieben.

Der hier aufgeführte Vergleich der "Spacermethoden" ist eingeschränkt auf die Interaktion von gebundenen niedermolekularen Liganden mit Makromolekülen. Ein Spacer hat jedoch möglicherweise einen eher geringen Einfluss auf die Zugänglichkeit bei der Wechselwirkung eines gebundenen Protein mit einem anderen Protein (z.B. in der Immunoaffinitätschromatographie). Bei der Wechselwirkung eines gebundenen Protein A (durchschnittliche Größe 4 nm) mit einem Antikörper der durchschnittlichen Größe 8 nm kann ein Spacer von 0,75 nm (entspricht der Länge eines optimalen 6-C Spacers) kaum die geeigneten sterischen Verhältnisse für eine ungehinderte Interaktion schaffen. Dies war jedoch nicht Gegenstand der Arbeit und wurde nicht weiter untersucht.

In der Literatur werden die Gele und modifizierten Membranen, die mittels der oben beschriebenen Polymerbeschichtungsmethoden hergestellt wurden als Tentakelträgermaterialien[®] bezeichnet [9]. Die Vorstellung in welcher Anordnung Proteine in einem Tentakelgel[®] mit Ionenaustauschergruppen vorliegen sollten, ist in Abbildung 4.16 gezeigt (nach Janzen und Unger [28]):

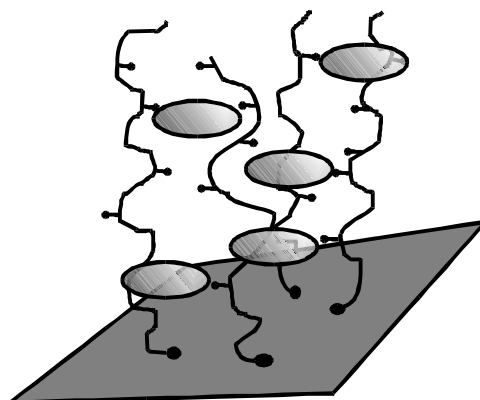


Abb. 4.16: Struktur der Tentakelgele[®] nach Janzen und Unger [28], lange Polymerketten sind kovalent auf dem Basisgel befestigt in dem die Proteine in Multischichtanordnung gebunden sind

Dieser Darstellung folgend, könnten die Proteine in der Polymerschicht in Multischichten angeordnet sein, was im Vergleich zu einer Monoschicht den Kapazitätzugewinn erbringen

sollte. Eine Abschätzung der Kapazität für eine monomolekulare Bedeckung mit BSA für eine Geloberfläche Fractogel® HW 650 (M) soll zeigen, welche Bindungskapazitäten theoretisch möglich sind.

Folgende Annahmen sind zu treffen:

Die innere Oberfläche eines Geles werde lückenlos mit BSAMolekülen belegt. Die "Foot printfläche" eines BSA-Moleküls sei 9 nm^2 und die mittlere Molmasse $6,6 \cdot 10^4$ Dalton [159]. Die spezifischen Oberflächen von Biochromatographiegelen sind häufig im Bereich von 2-50 m^2/g . (Fractogel® HW 650 (M) hat eine spezifische Oberfläche von $20 \text{ m}^2/\text{g}$, die nachfolgend im Kapitel 9 diskutierten Hohlfasermembranen haben spezifische Oberflächen von $5 \text{ m}^2/\text{g}$). Bei Fractogel® HW 650 (M) muss zusätzlich der Quellfaktor von 1: 4 berücksichtigt werden (aus 1 g Gel erhält man 5 ml wasserfeuchtes Gel). Man erhält folgende Beziehung zur Berechnung der theoretischen maximalen Bindungskapazität:

$$q_{2D} = \frac{M_{\text{BSA}} \cdot A_{\text{Sorbens}}}{A_{\text{V}} \cdot A_{\text{BSA}} \cdot 5} \quad 4.2$$

q_{2D} theoretische Bindungskapazität bei Annahme einer Monoschichtbedeckung [g/ml]

A_{V} Avogadrokonstante [mol^{-1}]

M_{BSA} Molekulargewicht BSA [g/mol]

A_{Sorb} Fläche des Sorbens [m^2]

A_{BSA} Fläche eines BSA Moleküls [m^2]

Für Sorbentien mit Oberflächen von 2 und 20 m^2 erhält man folgende Bindungskapazitäten (Siehe Tabelle 4.7):

Tabelle 4.7 Bindungskapazitäten von Chromatographiegelen für BSA unter der Annahme einer monomolekularen Bedeckung der spezifischen Oberfläche

Fläche [m^2]	q_{2D} [mg/ml]
2	4.8
20	48

Diese Werte stimmen mit den Angaben von anderen Autoren überein [28].

Im Gegensatz zu den obigen Werten wurden auf polymer beschichteten Fractogelen BSA Kapazitäten im Bereich von 150 mg/ml und höher gemessen. Folglich dreimal höher als der theoretische Wert für die monomolekulare Bedeckung. Die Proteine müssen in mindestens 3 Schichten übereinander liegen, um diese hohe Bindungskapazität zu realisieren. Bei Hohlfasermembranen beträgt die theoretische Bindungskapazität etwa 5 mg/ml bei einer Monoschichtanordnung der Proteine. Hier ist die Annahme einer Multischichtanordnung noch zwingender da die Bindungskapazitäten im Bereich von ca. 60 mg/ml sind (siehe dazu Kapitel 9).

Der Aufbau einer bindenden Polymerschicht muss folglich so sein, dass eine Multischichtanordnung der Proteine möglich wird. Die monomolekulare Bedeckung der Trägersoberfläche stellt den einen Grenzfall der Proteinbindungskapazität dar. Der zweite Grenzfall ist eine vollständige dreidimensionale Anordnung der Proteine in den Poren. Im folgenden wird die Bindungskapazität für BSA errechnet, welche sich durch die Annahme einer dichtesten Kugelpackung der Proteinmoleküle in den Poren ergibt. Wir betrachten dazu eine geometrische Auffüllung des Porenvolumens mit BSA-Molekülen.

Folgende Annahmen werden gemacht:

Fractogel® ist aus Zylinderporen mit einer mittleren Länge L_P von 30 μm und einem Durchmesser d von 65 nm aufgebaut (siehe Anhang A1). Das mittlere Porenvolumen V_P betrage 0,5 ml/ml gepacktes Gel (siehe Kapitel 7). Rinderserumalbumin wird als Kugel mit einer mittleren Molmasse von 66000 g/mol mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $d_{BSA}=3$ nm betrachtet (das ist eine Näherung, da BSA eine elipsoidförmige Gestalt hat).

Das Volumen einer Zylinderpore ist:

$$V_{\text{Zylinderpore}} = L_P \cdot \pi \cdot \frac{d_P^2}{4} \quad 4.3$$

Die Anzahl der Poren erhält man als Verhältnis des Porenvolumens des Gels V_P zum Volumen einer Pore. Im konkreten Fall sind das 510^{12} Poren pro ml.

Unter Annahme einer dichtesten Kugelpackung der Moleküle (77,6 % Raumauffüllung) kann die Anzahl der Proteinmoleküle Z_{BSA} berechnet werden, welche maximal in einer Zylinderpore untergebracht werden können:

$$Z_{\text{BSA}} = \frac{0,776 \cdot L_P \cdot \pi \cdot d_P^2}{\frac{16}{3} \pi \cdot \left(\frac{d_{\text{BSA}}}{2}\right)^3} \quad 4.4$$

Das sind hier $4,9 \cdot 10^7$ BSA Moleküle.

Die theoretische maximale Bindungskapazität q_D eines Gels erhält man als Produkt der Anzahl der Einzelmoleküle in der Pore und der Anzahl der Poren:

$$q_{3D} = \frac{0,75 \cdot V_P}{\frac{4}{3} \pi \cdot \left(\frac{d_{\text{BSA}}}{2}\right)^3} \cdot \frac{M_{\text{BSA}}}{A_V} \quad 4.5$$

Die maximal mögliche Bindungskapazität für Fractogel® HW 65 beträgt 1,57 g/ml (gepacktes Gel). Mit ca. 150 mg/ml BSA Kapazität (Maximalwerte) der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tentakelgele wurde somit nur 10 % der theoretisch möglichen Bindungskapazität erreicht. Was sind die Ursachen? Die getroffene Annahme einer dichtesten Kugelpackung ist nicht realistisch. Es ist anzunehmen, dass die Proteine einen größeren Abstand voneinander einnehmen.

In Formel 4.5 ist als einzige Größe das Porenvolumen frei variierbar. Nur durch Vergrößerung des Porenvolumens kann folglich eine weitere Steigerung der Bindungskapazität erzielt werden. (Fractogel® HW 650 (M) hat ein Porenvolumen von 0,5 ml pro ml gepacktes Gel). Das Porenvolumen kann jedoch nicht vergrößert werden, da die mechanische Stabilität des Gels ab einem bestimmten Porenvolumen abnimmt.

Die Bindungskapazität von Fractogel® Ionenaustauschern für BSA liegt bei dicht gepackter zweidimensionaler oder dreidimensionaler Anordnung der BSA Moleküle zwischen dem Grenzwert der monomolekularen Schicht und der dichtesten Kugelpackung in den Poren:

$$48 \text{ mg/ml} \leq Q_G \leq 1570 \text{ mg/ml}$$

Diese Grenzen zeigen die signifikanten Unterschiede von einer zweidimensionalen oder dreidimensionalen Ligandenanordnung. Es wird im Folgenden abgeschätzt welche Polymerisationsgrade von gepfropften Polymerketten zur Adsorption von 150 mg/ml Protein nötig sind.

Da die Konturlänge (L_{Cont} , gestreckte Polymerkette) einer Pfropfpolymerkette mindestens

9 nm betragen muss, um 150 mg/ml Bindungskapazität zu erreichen (entspricht drei Lagen BSA übereinander), ergibt sich eine mittlere Kettenlänge des Polymers (das Rückrat bei Vinylpolymeren $-CH_2-CHR-$ hat eine effektive Bindungslänge von 0,25nm) von 36 Einheiten [160]. Die Annahme einer dichtesten Kugelpackung ist nach den Ergebnissen des letzten Absatzes unrealistisch, da experimentell nur etwa 10 % dieses Grenzwertes erreicht wird. Unter Berücksichtigung der 10 % "Verdünnung" der Proteinmoleküle im Porenraum und geht von einer gleichmäßigen Verteilung aus, so müssten die Ketten folglich aus 360 Monomer einheiten bestehen um auch die Proteinmoleküle an den äußersten Enden der Poren zu erreichen.

Die gepfropften Polymermoleküle liegen jedoch nicht als gestreckte Kette sondern als Knäuelmolekül vor. Unter der Annahme, dass die wahre Länge der Knäuelmoleküle durch das Modell der ungestörte Kette beschrieben werden kann, gilt dann [160]:

$$L_w = \sqrt{L_{cont}} \quad 4.6$$

Daraus folgt, dass der mittlere Polymerisationsgrad des Polyglycidylmethacrylates ($M_w = 142 \text{ g/mol}$) 129600 ist was einer mittleren Molmasse von 18403200 g/mol entspricht. Dieses Ergebnis steht jedoch keinesfalls in Übereinstimmung mit den kleinen Molmassen (ca. 50000) welche von Mino und Kaizermann für Reaktionen in Lösung bestimmt wurden [161]. Entweder werden die Polymerketten durch Behinderung des Abbruchs der Radikal kettenreaktion an der Oberfläche sehr viel länger als in Lösung oder die Vorstellung von unvernetzten Polymerketten wie in Abb. 4.16 dargestellt, ist falsch und die hohe Proteinbindungskapazität von polymermodifizierten Gelen hat andere Ursachen, was in den folgenden Kapiteln noch ausführlicher diskutiert wird.

5 Veränderungen der Partikeleigenschaften durch Pfropfpolymerisationen

5.1 Thermodynamische Beschreibung von Pfropfpolymerisaten

Das Aufbringen von Pfropfpolymerisaten auf Partikeln hat weitreichende Konsequenzen bezüglich der chemisch-physikalischen Eigenschaften zur Folge. Diese Veränderungen sind wesentlich bestimmt durch die Art der Wechselwirkungen zwischen Basismaterial und Beschichtungspolymer und der Dicke der aufgetragenen Polymerschicht. Im folgenden Kapiteln wird deshalb zuerst der Einfluss der Polymer-Polymer Wechselwirkungen im Rahmen einer Flory-Huggins Analyse [199] diskutiert.

Entscheidend für die Biokompatibilität einer polymeren Schicht auf einem Trägermaterial ist die Benetzbarkeit mit Wasser oder wässrigen Salzlösungen. Das sind die am häufigsten verwendeten Lösungsmittel in der Proteindromatographie.

Grundsätzlich sind für das Lösungsverhalten von einer polymeren Schicht auf einem polymeren Basismaterial folgende Fälle zu unterscheiden:

1. Basispolymer und Beschichtungspolymer sind im Lösungsmittel Wasser gut benetzbar.
2. Das Basispolymer ist gut benetzbar jedoch nicht das Beschichtungspolymer.
3. Das Beschichtungspolymer ist gut durch Wasser benetzbar jedoch nicht das Basispolymer.

Wie schon in Kapitel 2 erläutert, verhindert ein hydrophiles Polymer die Denaturierung von Proteinen. Das Beschichtungspolymer muss folglich gut durch Wasser benetzbar sein. Fall 2 braucht deshalb hier nicht weiter betrachtet zu werden.

Bei der Untersuchung des Einflusses des Pfropfsubstrates auf die Proteinbindungskapazität kann angenommen werden, dass in dem ternären System: Basispolymer-Beschichtungspolymer-Salzlösung eine Abstoßung des Beschichtungspolymers vom Basismaterial die Schichtdicke der Polymerschicht vergrößert, was letztendlich eine Steigerung der Proteinbindungskapazität zur Folge hätte. Dieser Ansatz erfordert eine modellmäßige Beschreibung der Wechselwirkung. Für die nachfolgende Diskussion wird ein Modell von Brooks und Müller verwendet [13]. Unter Zuhilfenahme dieses Modells kann allerdings nur der Einfluss der Interaktion von gebundenen Neutralketten mit dem Basispolymer diskutiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymere tragen jedoch ionische Seitenketten. Die ionischen Wechselwirkungen können von den Polymer-Polymer Wechselwirkungen getrennt behandelt werden [163]. Für erste Abschätzungen wurde angenommen, dass die ionischen Wechselwirkungen der Polymerketten mit dem Basispolymer gering sind, da die Geloberfläche keine elektrischen Ladungen trägt. Es ist noch ein weiteres Problem zu behandeln: Da es sich bei den gepfropften Polymerketten um Polyelektrolyten handelt könnte die Länge der Polymere von der Salzkonzentration abhängig sein. Von Skolnick und Fixman [202] sowie Odijk [203] wurde gezeigt, daß die Gesamtlänge eines Polyelektrolyten die Summe aus der Knäueldimension (Persistenzlänge) und einer zusätzlichen Aufweitung durch einen elektrostatischen Beitrag ist. Der elektrostatische Beitrag hat die Form:

$$a_{el} = \frac{1}{4 \cdot \kappa^2 \cdot b_{ji}}. \text{ Hier ist } \kappa^2 = \frac{8 \cdot \pi \cdot e^2}{\epsilon_w \cdot k_B \cdot T} \cdot 0.5 \cdot \sum C_i \cdot z_i^2 \text{ die Debye-Hückel Länge und } b_i \text{ ist}$$

der mittlere Abstand der Ionen auf der Polyelektrolytkette. Unter Berücksichtigung dieser Beziehungen wurde von Hagenbeck [204] geschlossen, daß bei Salzkonzentrationen von 20-50 mM der elektrostatische Beitrag zur Gesamtlänge gering ist und die Polyelektrolytketten als Neutramoleküle behandelt werden können. Das berechtigt zu der Annahme, daß unter den gegebenen Bedingungen ein Gel mit gepfropften ionischen Polymerketten durch ein Modell der Polymerwechselwirkungen von Neutralpolymeren modellmäßig charakterisierbar sein sollte.

Das ternäre System (Lösungsmittel 1, Basispolymer 2 und Pfropfpolymerkette 3) kann im Rahmen der Flory-Huggins Theorie durch folgende Beziehung beschrieben werden:

$$\frac{\Delta G_m}{R \cdot T} = \sum_{i=1}^3 n_i \cdot \ln \phi_i + n_2 \cdot \phi_2 \cdot \chi_{12} + n_1 \cdot \phi_3 \cdot \chi_{13} + n_2 \cdot P_2 \cdot \phi_3 \cdot \chi_{23} \quad 5.1$$

wobei :

n_i = Zahl der Moleküle der Komponente i

ϕ_i = Volumenbruch der Komponente i

$$\phi_i \equiv \frac{n_i P_i}{\sum_{i=1}^3 n_i P_i} \quad 5.2$$

P_i = (Volumen des Polymermoleküls i)/(Volumen des Lösungsmittelmoleküls)

$P_1 = 1$

$\chi_{ij} = z_C \cdot \Delta \varepsilon_{ij} / kT$

z_C = Koordinationszahl der nächsten Nachbarn

$\Delta \varepsilon_{ij} = \varepsilon_{ij} - (\varepsilon_{ii} + \varepsilon_{jj})/2$

ε_{ij} = Wechselwirkungsenergie eines ij Paares [W·s]

kT = Boltzmannkonstante x absolute Temperatur [Ws]

Das chemische Potential für die Polymerkette in Lösung oder gebunden auf der Oberfläche erhält man durch Differentiation von Gleichung 5.1 (unter Berücksichtigung von 5.2 nach n_3 zu:

$$(\mu_3 - \mu_3^0) / kT = 1 + \ln \phi_3 + P_3 (-\phi_1 - \phi_2 / P_2 - \chi_{13}(\phi_1 \phi_2 - \phi_1) + \chi_{23} \phi_2) \quad 5.3$$

Für die Ableitung von Gleichung 5.3 wurde angenommen, dass ϕ_3 viel kleiner 1 ist und die Wechselwirkungsenergien zwischen Basispolymer und Lösungsmittel sowie zwischen gebundenem Polymer und Lösungsmittel gleich sind ($\chi_{12} = \chi_{13}$). Der Verteilungskoeffizient K kann durch Gleichsetzen von 5.3 mit dem entsprechenden Ausdruck für das chemische Potential des Basispolymers abgeleitet werden. Unter Benutzung des Index g für die Gelphase (Basismaterial), m für die mobile Phase und $\phi_2 = 0$ in der mobilen Phase erhält man folgende Beziehung:

$$K = \phi_{3,g} / \phi_{3,m} = \exp P_3 ((\phi_{1,g} - \phi_{1,m})(1 - \chi_{13}) + \phi_{2,g}(1/P_2 - \chi_{23})) \quad 5.4$$

K charakterisiert das Verhältnis Polymerkette adsorbiert auf der Oberfläche ($K \rightarrow \infty$) und gestreckt in Lösung ($K = 0$)

Unter der Annahme, dass $1/P_2$ gegen Null geht (unendlich hoher Polymerisationsgrad des vernetzten Gels) und $\phi_{1,g} \approx 1 - \phi_{2,g}$ sowie $\phi_{1,m} \approx 1$ erhält man folgende Beziehung:

$$K = \exp(-P_3 \cdot \phi_{2,g} \cdot (1 - (\chi_{12} - \chi_{23}))) \quad 5.5$$

Der Verteilungskoeffizient der gebundenen Polymerketten ist exponentiell vom Polymerisationsgrad, dem Volumenbruch des Basispolymers und der Differenz der Wechselwirkung der solvatisierten Polymerkette mit dem Lösungsmittel und der Wechselwirkung Basispolymer Ppropfpolymer abhängig. Mit $P_3 = 1$ und $\phi_{2,g} = 1$ erhält man eine dem Boltzmannschen Energieverteilungssatz ähnliche Beziehung für die Verteilung der gebundenen Polymerketten zwischen Lösung und an der Oberfläche adsorbiert. Nach dieser Vorstellung liegen die Polymerketten entweder flach auf der Oberfläche oder sie sind stark abgespreizt.

Für die Realisierung eines kleinen Verteilungskoeffizienten (das entspricht einer großen Schichtdicke oder schlechten Kompatibilität von Basis und Beschichtungspolymer) können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Die Anknüpfung von Polymerketten mit hoher Molmasse P_3 vergrößert die Schichtdicke.
2. Basisgele mit hohem Vernetzungsgrad (Hartgele) oder Gele mit geringem Porenvolumen (Molenbruch der Gelphase $\phi_{2,g}$ sollte groß sein) verkleinern den Verteilungskoeffizienten ebenfalls und damit nimmt die Dicke der Polymerschicht zu. Das ist bedingt durch die größere Anzahl von Kontaktpunkten zwischen Basispolymer und der Polymerkette, was eine Einschränkung der statistischen Freiheitsgrade der Ketten zur Folge hat.
3. Unter der Annahme, dass Wasser ein gutes Lösungsmittel für die gepropfte, modifizierte, hydrophile Polymerkette ist gilt $\chi_{13} < 0$. Die Gesamtenergie der Adsorption wird somit bestimmt durch die Florywechselwirkung zwischen Basismaterial und Kette. Für eine anziehende Wechselwirkung gilt $\chi_{23} < 0$ und bei abstoßender Wechselwirkung gilt $\chi_{23} > 0$. Was entweder zu einer Anziehung der Kette oder zur Abstoßung der Polymerkette führt. Die Verteilung der Polymerketten erfolgt also entsprechend der Löslichkeit der beiden Polymertypen in Wasser und der Wechselwirkung untereinander.

Schlussfolgerungen für die Herstellung von chromatographischen Gelen:

- zu 1. Gepfropfte Polymerketten sollten hohe Molmassen haben. Zu lange Ketten an Oberflächen führen jedoch zu einem Aufweichen der Partikel und zu einem mechanischen Stabilitätsverlust. Es muss somit eine Balance zwischen Gelweichheit und Bindungskapazität gefunden werden.
- zu 2. Stark vernetzte ("harte") Gele oder nichtporöse Gele werden häufig als Trägermaterialien für die Biochromatographie verwendet. Diese Trägermaterialien haben hervorragende Massentransporteigenschaften, da keine zeitraubende Diffusion in die Poren erfolgt. Ihre Verwendung beschränkt sich jedoch bisher insbesondere auf analytische Anwendungen da die kommerziell erhältlichen Partikelgrößen $< 5 \mu\text{m}$ sind und somit der Druckabfall über solche Partikel zu hoch ist.
- zu 3. Die spezielle Wechselwirkung zwischen Trägermaterial und Beschichtungspolymer (χ_{23}) spielt eine wesentliche Rolle bezüglich der Dicke der Polymerschicht.

Dieser Einfluss wurde durch experimentelle Untersuchungen weiter charakterisiert. Dazu wurde mittels Ce- initierter Radikalreaktion auf eine Reihe von unterschiedlichen Trägermaterialien Glycidylmethacrylat aufgebracht. Die so erhaltenen aktivierten Gele wurden mit Diethylamin zu Anionenaustauschern modifiziert (Vorschrift im Methodenteil 8.6). Die Möglichkeiten bei der Variation der chemischen Struktur von Basismaterialien sind groß (Siehe Tabelle 5.1). Die Problematik beim Vergleich verschiedener Basismaterialien mit gleichem Beschichtungspolymer ist, dass die Reaktionsausbeuten der Pfropfpolymerisationen aufgrund der verschiedenen Anzahl der Startradikale sehr unterschiedlich sein können. Bei den nachfolgend dargestellten Untersuchungen von Trägermaterialien wurde trotz der angeführten Schwierigkeit eine einheitliche Polymerisationsvorschrift für alle Trägermaterialien benutzt. Es zeigte sich jedoch überraschenderweise, dass die Massenzunahmen pro g Gel nicht sehr unterschiedlich waren. Die Unterschiede in den spezifischen Ligandendichten waren überwiegend ein Resultat der verschiedenen Quellfaktoren der Basismaterialien. Folgende Trägermaterialien wurden für vergleichende Untersuchungen benutzt:

Tabelle 5.1 Ausgewählte Trägermaterialien für die Pfropfpolymerisation mit Polyglycidylmethacrylat und nachfolgender Reaktion mit Diethylamin

Basismaterial (Markenname)	Chemische Struktur
Accurell® (Polyamid 6) Fa. ACORDIS GmbH	Caprolactam
Hydroxyliertes Polystyrol – Divinylbenzolgel Fa. Polymerlabs	Polystyrol/Divinylbenzol
Bioran® Fa. Schott	poröses Glas (Dioltyp) ¹
Cellulose Fa. Whatmann	Glucose
Sepharose® Fa. Amersham Pharmacia	Galactopyranose
Eupergit® Fa. Röhm	Acrylamid, Allylglycidylether
Kieselgel-Monosphers Forschungsmuster Merck KGaA	Kieselgel (Dioltyp) ¹

¹ umgesetzt mit Glycidotrimethoxysilan

Die Proteinbindungskapazitäten aller Gele wurden im feuchten gequollenen Zustand bestimmt, da die Quellungsgrade der getrockneten Gele sehr unterschiedlich waren (Beispiel: 1 g Sepharose = 15 ml gequollenes Gel, 1 g Bioranglas = 1 ml Gel).

Tabelle 5.2 BSA-Kapazitäten und Gehalt an DEA Gruppen von verschiedenen Basis-materialien, die mit Polyglycidylmethacrylat beschichtet und anschließend mit Diethylamin zum Anionenaustauscher umgesetzt wurden

Material	BSA – Kapazität in mg/ml	DEA - Gruppen Gehalt in mg/ml (feuchtes Gel)
Accurell® DEA	62	36
Polymer-Labs Polystyrolgel DEA	24	100
Bioran® (poröses Glas) DEA	76	20,2
Cellulose (Whatmann) DEA	37 ¹	5.6
Sepharose® 2 B DEA	78 ¹	11,5
Eupergit®-DEA	100	80
Kiesel Monospher DEA	45	7.2

¹*Diese Gele waren sehr stark gequollen und konnten nicht mehr in eine Säule gepackt werden. Die Kapazität konnte nur statisch im Batch bestimmt werden. Für den Vergleich der Gele wurde der schon vorher definierte dimensionslose Effektivitätswert benutzt (Gleichung 4.1):*

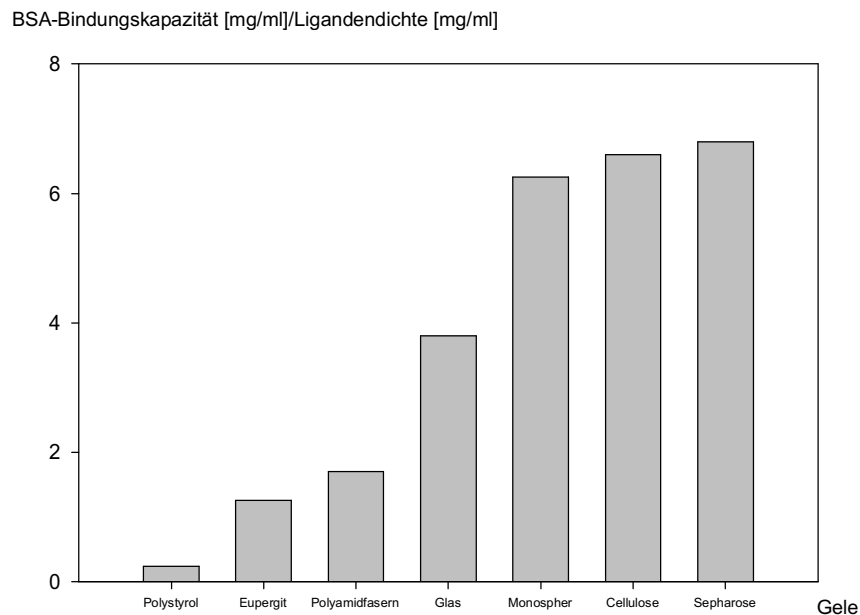


Abb.5.1: Einfluss der Art des Basismaterials auf die Effektivität einer modifizierten Polymerschicht Proteine zu binden

Die höchste Effektivität bezüglich der Ligandenausnutzung haben Gele welche aus polymeren Kohlenhydraten aufgebaut sind. Die starke Abstoßung der gebundenen Pfropfpolymeren vom hydrophilen Basismaterial bedingt jedoch eine so starke Quellung im wässrigen Medium, dass die Gele nicht mehr für die Säulenchromatographie verwendet werden können. Die hydrophilen Kohlenhydratgele als Basispolymer und die mehr hydrophoben Polyglycidylmethacrylatketten zeigen offenbar große Unterschiede im Flory Parameter χ_{23} . Gute Effektivitätswerte haben auch Kombinationen aus polymerer Beschichtung und anorganischen Trägern, wie Kieselgel und Bioran. Weniger geeignet sind poröses Polystyrol, Polyamid und Eupergit. Diese Trägermaterialien sind hydrophob und für die Proteinchromatographie, underivatisiert, nicht zu verwenden. Der geringe Effektivitätswert ist wahrscheinlich durch eine zusätzliche hydrophobe Wechselwirkung zwischen Polymerkette-Basispolymer bedingt. Das heißt jedoch nicht, dass diese Gele generell für die Proteinchromatographie nicht benutzt werden können. Es empfiehlt sich hier eine Vorbehandlung der Oberflächen mit dem Ziel eine hydrophile Schicht aufzubauen [76]. Aus diesen Untersuchungen kann abgeleitet werden, dass die Wechselwirkung zwischen Basispolymer und Beschichtungspolymer eine dominierende Rolle bei der Aufweitung einer gebundenen Polymerschicht hat. Die Kombination hydrophobes Basismaterial und hydrophiles Beschichtungspolymer oder hydrophiles Basismaterial und hydrophobe Beschichtung hat eine Abstoßung zur Folge und erhöht die spezifische Bindungskapazität.

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass die Wechselwirkung des Basismaterials mit dem Beschichtungspolymer einen bedeutenden Einfluss auf die Proteinbindungskapazität hat. In den folgenden Kapiteln wird die geometrische Veränderung der Partikelstruktur durch die Pfropfpolymerisation diskutiert.

5.2 Geometrische Veränderungen der Partikel

Die oben beschriebenen Pfropfpolymerisationen wurden überwiegend auf Methacrylatgelen durchgeführt. Diese Gele sind aber makroporös und elastisch und können deshalb, aufgrund der mangelnden Druckstabilität, nicht zur Untersuchung der Veränderung der Porengröße mittels Quecksilberporosimetrie verwendet werden. Es wurde deshalb ein makroporöses Kieselgel mit einem Porendurchmesser von 47 nm verwendet. Dieses ist druckstabil. Auf dieses Gel wurden nach der im Methodenteil beschriebenen Reaktionsweise durch Polymerisation mit Glycidymethacrylat bei unterschiedlichen Monomerkonzentrationen verschiedene Massenzunahmen erzeugt. Für jedes Gel wurde nach der Polymerisation die mittlere Porengröße mittels Quecksilberporosimetrie bestimmt.

Die Stoffdaten des verwendeten Si 60 Kieselgels waren:

Tabelle 5.3 Stoffdaten von Kieselgel Si 60

Mittlere Partikelgröße	60 μm
Mittleres Porenvolumen	47 nm
Mittlerer Porendurchmesser	1,3 ml/g
Oberfläche nach BET	36 m^2/g

Nach der polymeren Beschichtung wurden folgende Messdaten für die Porendurchmesser als Funktion der Massenzunahme erhalten:

Tabelle 5.4 Veränderungen des mittleren Porendurchmessers von Kieselgel Si 60 bei verschiedenen Beschichtungsgraden

Massenzunahme des Gels [%]	Mittlerer Porendurchmesser [nm]
8,4	43
13,2	41,5
17,6	40

Auffällig ist die geringe Abnahme des mittleren Porendurchmessers mit stark anwachsenden Massenzunahme. Die Abhängigkeit der Massenzunahme durch Polymerbeschichtung vom mittleren Porendurchmesser kann näherungsweise durch ein einfaches Modell beschrieben werden. Folgende Annahmen werden getroffen:

1. Die geometrische Außenfläche ist klein im Verhältnis zur spezifischen inneren Oberfläche
2. Die Poren werden als Zylinderporen mit einem einheitlichen mittleren Porendurchmesser und gleicher Länge betrachtet
3. Die Beschichtung der Poren erfolgt gleichmäßig über die gesamte Fläche

Aus einfachen geometrischen Überlegungen kam folgende Beziehung zwischen der Massenzunahme und der Dicke einer Zylinderpore abgeleitet werden:

$$\frac{\Delta m}{\rho} = \Delta V = N \cdot \pi \cdot L_P \cdot (R_{\text{außen}}^2 - R_{\text{innen}}^2) \quad 5.6$$

(ρ Dichte des Polymers [g/cm^3], Δm Massenzunahme des Trägermaterials [g], ΔV Veränderung des Porenvolumens [cm^3], $R_{\text{außen}}$ Radius der Pore vor der Beschichtung [cm], R_{innen} Radius nach der Beschichtung [cm], N Anzahl der Zylinderporen (die Summe ist das Porenvolumen))

mit den Definitionen der reduzierten Größen :

$$m_{\text{red}} = \frac{\Delta m}{\rho \cdot \pi \cdot L_P \cdot R_{\text{außen}}^2} \quad \text{und} \quad R_{\text{red}} = \frac{R_{\text{innen}}}{R_{\text{außen}}} \quad 5.7$$

erhält man:

$$R_{\text{red}} = \sqrt{1 - m_{\text{red}}}$$

5.8

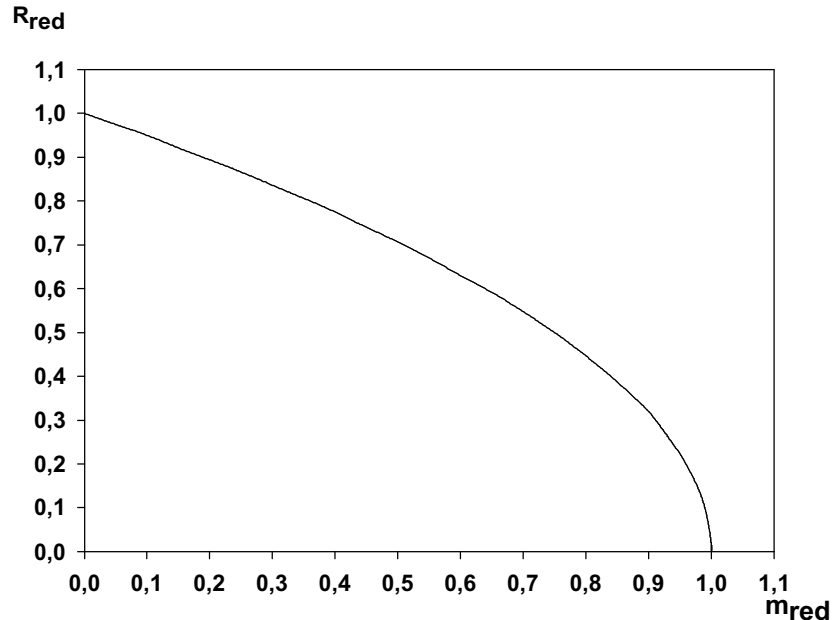


Abb.5.2: Zusammenhang zwischen der Massenzunahme und dem Durchmesser der Zylinderporen

Im Bereich bis zu 50 % Massenzunahme wird der Porendurchmesser nur um 30 % verkleinert. Das heißt man kann in einem porösen System eine relativ große Menge Pffropfpolymer aufbringen ohne den Durchmesser der Poren stark zu verändern.

Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen welche in Kapitel 6 vorgestellt werden. Nur Gele mit Beschichtungsgraden ≤ 50 % haben eine hohe Proteinbindungskapazität und gleichzeitig eine geeignete Permeabilität. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Bestimmung des Porendurchmessers im getrockneten Zustand durchgeführt wurde. Im wässrigen System kann das Polymer aufquellen. Die geometrischen Überlegungen des letzten Abschnittes haben gezeigt, dass die Pffropfpolymerisation mit 50 % Pffropfgrad eine Verringerung des mittleren Porendurchmessers von 30 % zur Folge hat. Die Pffropfpolymerisation findet aber auch auf der Außenhülle der Partikel statt. Es sollte folglich auch eine Veränderung des mittleren Partikeldurchmessers zu beobachten sein. Es wurde deshalb der D_{50} Wert (mittlere Partikelgröße unter Annahme einer Gaußverteilung) der Partikelverteilung der folgenden Gele bestimmt:

1. Fractogel® HW 650 (M) ohne Modifikation (Eigenschaften im Anhang A1)

2. Fractogel® EMD DEA (M) mit 50 % Glycidylmethacrylat beschichtet und mit Diethylamin zum Anionenaustauscher modifiziert.
3. Fractogel® EMD DEAE (M) mit ca. 10 % ionisches Amidpolymer als Pfropfpolymer

Die Partikelgröße wurde mit Coulter-Counter Messung (Fa. Merck KGaA, Beschreibung der methode in Kapitel 2.2.6) bestimmt. Da es sich um ionische Polyelektrolytgele handelte, welche salzabhängige Schrumpfung und Schwellungsprozesse zeigen könnten, wurden die Messungen sowohl in Wasser als auch in 1 M Kochsalz durchgeführt.

Folgende Partikelgrößen (D_{50} in μm) wurden gemessen (Tabelle 5.5):

Tabelle 5.5 Partikelgrößen von oberflächenmodifizierten Teilchen im Vergleich zu einem nichtmodifizierten Ausgangsmaterial

Bedingungen	Fractogel® HW 650 (M) ohne Modifikation	Fractogel® HW 650 (M) mit 50 % Polymer	Fractogel® EMD DEAE (M) mit 10 % Polymer
in Wasser	59,94	74,67	67,18
mit 1 M Natriumchlorid	60,27	73,31	64,97

Die Größenzunahmen der Partikel sind beträchtlich. Beim Fractogel® EMD DEAE (M) beobachtet man Größenzunahmen von etwa 10 % und beim Fractogel® HW 650 (M) mit einem Beschichtungsgrad von 50 % sind es etwa 20 %. Zur Untersuchung dieser Größenzunahme wird die Schichtdickenzunahme einer Vollkugel in Abhängigkeit vom Beschichtungsgrad berechnet.

Die Schichtdickenzunahme einer (unporösen) Kugel nach einer Pfropfpolymerisation kann unter der Voraussetzung, dass Basismaterial und Pfropfpolymer etwa die gleiche Dichte (1 g/cm^3) haben durch folgende kubische Gleichung beschrieben werden:

$$(R_p + \Delta x)^3 = \left(\frac{BG}{100} + 1 \right) \cdot R_p^3 \quad 5.9$$

R_p Radius des Partikels vor der Polymerisation [m]

Δx Zunahme des Radius nach der Polymerisation [m]

BG Beschichtungsgrad [%]

Für $r_1 = 30 \mu\text{m}$ und ein BG (Beschichtungsgrad) von 50 % erhält man eine Zunahme der Schichtdicke um $4,4 \mu\text{m}$. Für einen BG von 10 % ist die Vergrößerung der Schichtdicke als Lösung der Gleichung nur $0,95 \mu\text{m}$.

Die gemessenen Schichtdickenzunahmen (siehe Tabelle 5.5) sind jedoch wesentlich größer als die theoretisch vorausgerechneten. Bei der obigen Berechnung wurde angenommen, dass der gesamte Massenzuwachs nur im Außenbereich stattfindet, das ist jedoch keineswegs der Fall, da die Partikel sehr porös sind. Berücksichtigt man, dass die Schichtdickenzunahme nur entsprechend des prozentualen Anteils der Außenfläche realisiert werden kann, muss angenommen werden, dass das Polymer in einer stark aufgeweiteten Form vorliegt. Eine gequollene Polymerschicht auf der Oberfläche der Partikel sollte eine Einschränkung des Porenvolumens der Trägermaterialien zur Folge haben, das wurde durch Gelfiltrationsexperimente weiter charakterisiert.

5.3 Gelfiltrationsbestimmungen des Porenvolumens

5.3.1 Rinderserumalbumin

Es wurde unmodifiziertes Fractogel® HW 650 (M) und Fractogel® DEA (M) (50 % Beschichtungsgrad) auf Porenzugänglichkeit für Rinderserumalbumin untersucht. Das Gel mit 50 % Beschichtungsgrad sollte eine maximale Einschränkung des Porenvolumens gegenüber dem nichtmodifizierten Fractogel® HW 650 (M) aufweisen. Die chromatographische Methode ist im Anhang im Absatz 8.2.4 beschrieben. Die Bestimmung des zugänglichen Porenvolumens erfolgte in Gegenwart von 350 mM Kochsalz um die ionische Interaktion des Albumins mit den Anionenaustauscherguppen zu unterdrücken. Die ermittelten Retentionsvolumina sind in Tabelle 5.6 dargestellt:

Tabelle 5.6 Untersuchung der Porenzugänglichkeit von BSA für ein unmodifiziertes Fractogel® und ein Fractogel® mit 50 % Polymerbeschichtung (in 20 mM Phosphatpuffer und 350 mM Kochsalz pH 7)

Probemolekül	Fractogel 650 M unmodifiziert (Retentionsvolumen in ml)	Fractogel DEA M, modifiziert mit 50 % Beschichtungsgrad (Retentionsvolumen in ml)
Dextranblau	10,3	10,1
Rinderserumalbumin	15,6	15,3
Aceton	20,4	20,8

Das Gesamtporenvolumen ist die Differenz der Retentionsvolumina von Dextranblau (Zwischenkornvolumen) und Aceton (Zwischenkornvolumen plus Porenvolumen) und beträgt 10 ml oder ca. 50 % des gesamt zugänglichen Volumens. Zur Auswertung von Gelfiltrations experimenten verwendet man den Verteilungskoeffizienten K_G . Er ist folgendermaßen definiert [69]:

$$K_G = \frac{V_e - V_0}{V_R - V_0} \quad 5.10$$

V_0 Retentionsvolumen Dextranblau [ml]

V_R Retentionsvolumen Aceton [ml]

V_e Retentionsvolumen Protein [ml]

Damit folgt für die Verteilungskoeffizienten von BSA (Siehe Tabelle 5.7):

Tabelle 5.7 Verteilungskoeffizient von BSA in modifizierten und unmodifizierten Gelen

(Bedingungen wie in Tabelle 5.6)

Gel	Verteilungskoeffizient K_G
Fractogel 650 M, unmodifiziert	0,525
Fractogel DEA M, modifiziert mit 50 % Beschichtungsgrad	0,486

Wie man den Daten entnimmt hat der hohe Polymerbeschichtungsgrad keine signifikante Veränderung des Zugangs zum gesamten Porenvolumen für Rinderserumalbumin zur Folge. Rinderserumalbumin hat bei einem pH Wert von 7 eine negative Gesamtladung und liegt somit als Anion vor. Der isoelektrische Punkt (pI-Wert) für BSA ist kleiner 7. Eine ähnliche Untersuchung wurde auch mit einem anderem Protein (Lysozym) durchgeführt, welches bei pH 7 aber als Kation vorliegt.

5.3.2 Lysozym

Unter salzfreien Bedingungen können Kationen in einem Kationenaustauscher von dem Eintritt in die Gelporen ausgeschlossen werden. Bei Gelen mit kleineren Poren, als bei der Proteinchromatographie üblich (z.B. 10 nm) wird dieser Effekt zur Trennung von niedermolekularen Ionen benutzt. Diese Chromatographietechnik wird als Ionenausschlusschromatographie bezeichnet. Es wurde von uns untersucht, inwieweit dieser Ausschlusseffekt auch bei makromolekularen Ionen in ionischen Polymergelen auftritt. Es wurde deshalb auf den polymermodifizierten Anionenaustauschergelen, das stark basische Protein Lysozym (pI Wert > 13) isokratisch in 20 mM Phosphatpuffer pH 7 (ohne Salzzusatz) chromatographiert. Unter diesen Bedingungen sollte das Protein von den kationischen Ladungen auf dem Gel abgestoßen werden. Zur Ermittlung der Einschränkung des Porenraums wurden die Retentionszeiten von Aceton (Gesamtporenvolumen) bei jedem Gel als innerer Standard mitbestimmt. Außerdem wurde das Ausschlussvolumen der Gele durch Elution mit Dextranblau ermittelt. Die Bestimmung des Zwischenkornvolumens war jedoch nur für unmodifiziertes Fractogel® HW 650 (M) möglich, da an den modifizierten Gelen eine irreversible, unspezifische Adsorption des Acetons am Säulenkopf erfolgte. Das Zwischenkornvolumen dieser Gele wurde deshalb gleich dem Zwischenkornvolumen des Fractogels HW 650 (M) gesetzt. Es wurden folgende K_D -Werte bestimmt:

Tabelle 5.8 Gelfiltration auf Anionenaustauschergelen mit Lysozym (in 20 mM Phosphatpuffer pH 7)

Material	Lysozym K_D -Wert Gl. 5.10	Säulenvolumen [ml]
Fractogel® 650 M (nichtmodifiziert)	0,92	21,2
Fractogel® TSK DEAE (nichtpolymerer Ionenaustauscher)	0,86	20,8
Fractogel® EMD DEAE (M) ("amidisches Tentakelgel")	0,06	17,8
Fractogel® DEA (M) 50 % Polymer	0	20,8
Fractogel® DEA (M) 27% Polymer	0,25	20,1
Fractogel® DEA (M) 19 % Polymer	0,52	21,4
Fractogel® DEA (M) 11 % Polymer	0,78	21

Aceton zeigte eine leichte nichtspezifische Adsorption an der Fractogelmatrix oder konnte das gesamte Polymernetzwerk mittels Diffusion durchdringen, so dass die zwanzig Prozent Gerüstvolumen der Gelmatrix, welche durch Wägung des bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Gels bestimmt wurden, mittels Gelfiltration nicht exakt bestätigt werden konnten. Das Elutionsvolumen von Dextranblau betrug 10 ml, das Ausschlußvolumen der Gelmatrix ist folglich 10 ml.

Folgende Schlussfolgerungen sind aus diesen Ergebnissen zu ziehen:

1. Die Poren sind bei Gelen mit Pfropfpolymer auf der Oberfläche für ein basisches Protein nicht mehr vollständig zugänglich. Bei Beschichtungsgraden > 27 % wird das Protein zu 80 % ausgeschlossen.
2. Bei dem nicht-polymer beschichteten Ionenaustauschergel oder bei Gelen mit wenig Pfropfpolymer (Fractogel® TSK DEAE oder Fractogel® DEA mit 11 % Beschichtungsgrad) ist der Porenraum voll zugänglich.

Die Zugänglichkeit zum gesamten Porenvolumen [%] für Lysozym, für die unterschiedlichen Matrices zeigt zusammenfassend die folgende Darstellung (Abbildung 5.3):

Ausschluß vom Porenvolumen [%]

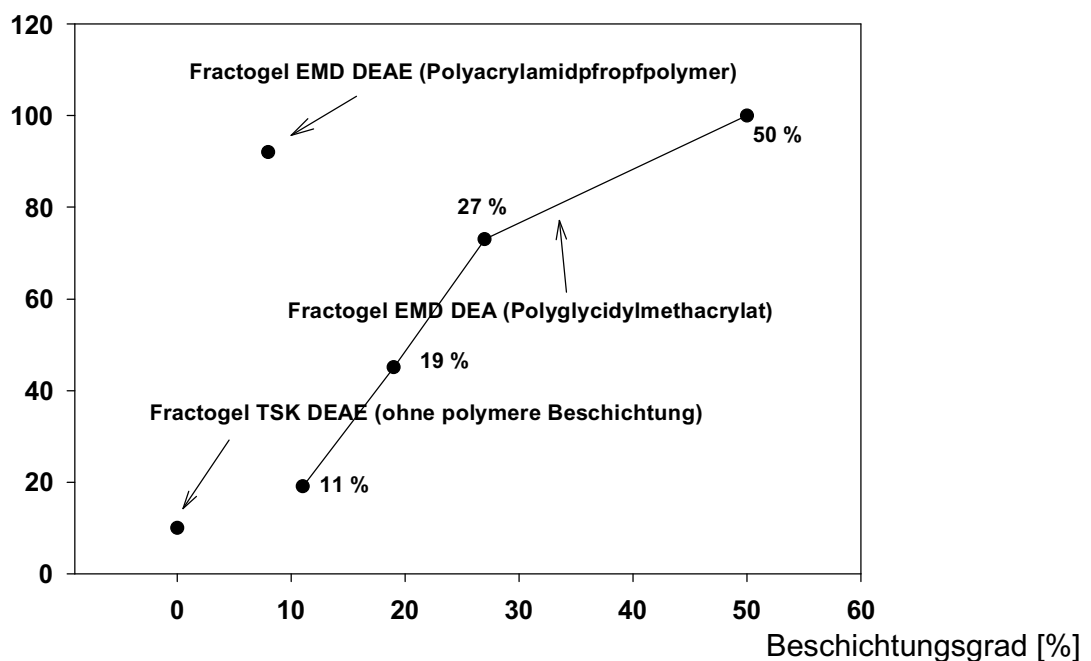


Abb. 5.3: Ionenausschluß von Lysozym (in %) vom Porenvolumen bei verschiedenen Anionenaustauschern auf Fractogel HW 650 (M)

Bei Fractogel® TSK DEAE (ohne polymere Beschichtung) ist der Porenraum etwa 10 %, bezogen auf das Gesamtporenvolumen, kleiner. Für Zylinderporen mit einem mittleren Porendurchmesser von 65 nm beträgt folglich die nichtzugängliche Schichtdicke 3,25 nm. Dieser Wert entspricht der Debey-Länge (κ) bei einem Salzgehalt von 0,02 M Natriumchlorid [197]. Somit ist bei einem nichtpolymermodifizierten makroporösen Ionenaustauscher das Porenvolumen unter salzfreien Bedingungen gut zugänglich. Es findet kein Ausschluss vom Porenvolumen statt.

Bei Trägermaterialien mit polymerer Beschichtung trifft das nicht zu. Die Struktur und die Masse des gepfropften Polymers sowie das Quellverhalten haben einen großen Einfluss auf das Ausschlussvolumen. Bei Pfropfpolymeren welche aus Polyglycidylmethacrylat bestehen gibt es einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen dem Ausschlussvolumen und Beschichtungsgrad (BG) bis zu einem Wert von 27 % Pfropfpolymer.

Für Fractogel® EMD DEAE (M) (Polyamidbeschichtung) reicht der BG von 10 % Pfropfpolymer aus, um einen vollständigen Ausschluss aus den Poren zu erzielen. Das kann zum einen durch einen geringeren Vernetzungsgrad des Polymers oder zum anderen durch die mehr hydrophile Struktur des Polymers bedingt sein.

Die obigen Untersuchungen wurden ohne Salzzusatz im Eluenten durchgeführt. Es ist bekannt, dass bei Ionenaustauscher salzabhängige Quellungs und Schrumpfungprozesse stattfinden [116]. In dem folgenden Experiment wurde deshalb der Einfluss der Salzkonzentration auf das Ausschlussvolumen untersucht. Das zu dieser Untersuchung verwendete Material war Fractogel® DEA mit einem 50 %igen Beschichtungsgrad. Dieses Material zeigte einen vollständigen Ausschluss vom Porenvolumen bei einem Kochsalzgehalt von 0% im Äquilibriumspuffer. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 5.8 dargestellt:

Tabelle 5.8 Ausschluss vom Porenvolumen in % für Lysozym in Abhängigkeit vom Salzgehalt des Elutionspuffers

Kochsalzgehalt [mM] in 20 mM Phosphatpuffer pH =7	Ausschluss vom Porenvolumen [%]
0	100
100	72,5
350	80
1000	55

Lysozym wird folglich auch bei Salzkonzentrationen größer als 0 vom Eindringen in das Porenvolumen ausgeschlossen. Das trifft auch für Konzentrationen an Kochsalz zu, bei

denen man eigentlich erwartet, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen vollständig unterdrückt sind (1M). Dieses Ergebnis ist zweifellos überraschend, wenn man bedenkt, dass der Transport in das Porenvolumen für BSA nicht behindert wird. Das Polymer in den Poren verhält sich folglich wie eine selektive Membran durch die Lysozym nicht in das gesamte Porenvolumen eindringen kann, was für Rinderserumalbumin jedoch ohne weiteres möglich ist. Dieses Verhalten könnte ein Vorteil gegenüber nicht polymermodifizierten Trägermaterialien sein, da durch diesen Effekt eine größere Reinheit der gebundenen Proteine zu erwarten ist. In der Literatur gibt es Hinweise, dass mit "Tentakelgelen" höhere Reinheiten bei Proteitrennungen erzielt werden können, jedoch ist dieses Verhalten bisher nicht systematisch untersucht worden. Im folgenden Kapitel wird die Modellvorstellung eines ionischen Hydrogels entwickelt, mit der die Ergebnisse der Gelfiltrationsexperimente erklärt werden können.

5.4 Das ionische Hydrogel

Man unterscheidet im wesentlichen drei Arten von Hydrogelen [164]:

1. Neutrale Hydrogele
2. Ionische Hydrogele
3. Interpenetrierende Netzwerke

Neutrale Hydrogele sind häufig durch Wasserstoffbrückenbindungen von Hydroxygruppen aufgebaut. Polymere Kohlenhydrate können Hydrogele bilden. Eine Vielzahl von Gelen für die Biochromatographie sind aus Polysacchariden aufgebaut und bilden neutrale Hydrogele (Beispiele sind Sepharose und Agarose). Werden diese ionisch modifiziert, können auch ionische Hydrogele gebildet werden. Wird ein getrocknetes ionisches Hydrogel in eine Lösung gebracht, die einen niedermolekularen Elektrolyten enthält, so wandern bis zur Einstellung des Gleichgewichtes die beweglichen Ionen und die Wassermoleküle in die Gelphase und umgekehrt. Die Gleichgewichtsbedingung des Wassers ist von entscheidender Bedeutung für den Quellungsgrad. Es können Quellungs-faktoren von bis zu 1000 bezüglich des Ausgangsvolumens beobachtet werden [165]. Die Hydrogelstruktur in den Poren der in dieser Arbeit beschriebenen Anionenaustauschermaterialien sind ionische Hydrogele [166].

Aufbauend auf diesen Resultaten kann eine schematische Modellvorstellung für die Porenstruktur von polymermodifizierten Gelen entwickelt werden. Diese ist in Abb. 5.4 dargestellt:

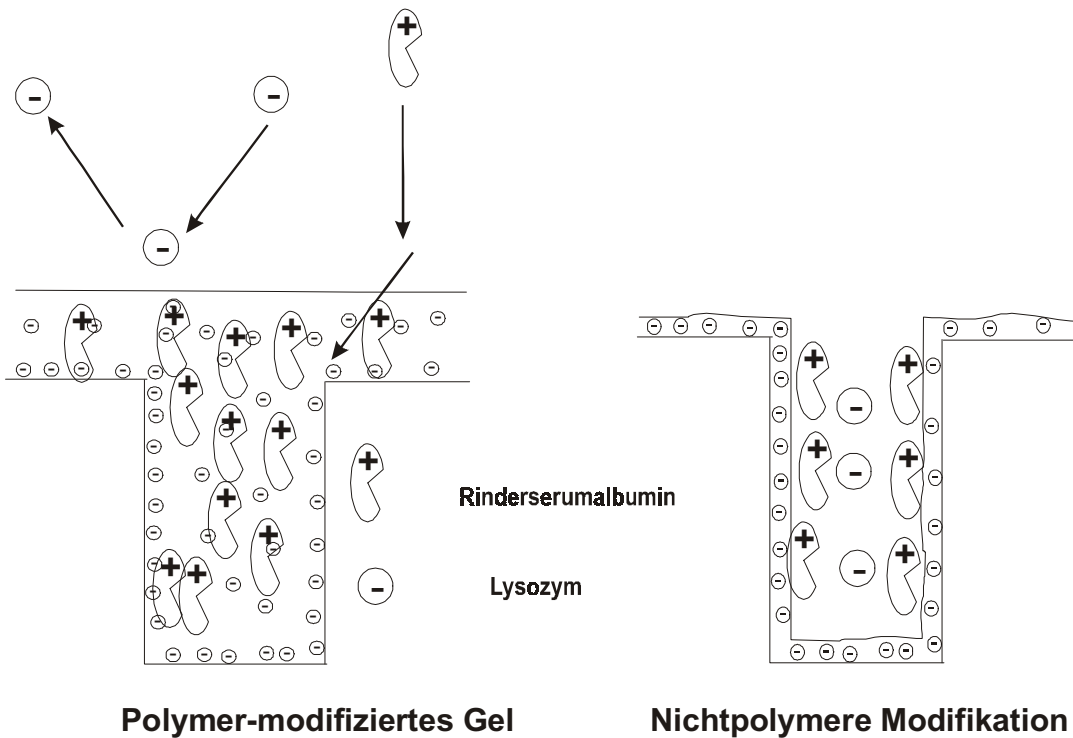


Abb. 5.4: Porenstruktur von polymermodifizierten Gelen und von Trägermaterialien ohne polymerer Oberflächenbeschichtung

Das gesamte Porensystem der Trägermaterialien, mit einem hohem Beschichtungsgrad an Pfropfpolymer, ist mit einer ionischen Matrix (Kationentyp) ausgefüllt, welche für Lysozym und allgemein Proteinen mit pI-Werten >7 nicht zugänglich ist. Rinderserumalbuminmoleküle können im Gegensatz dazu, wie oben gezeigt, bei 350 mM Kochsalz die gesamte Matrix durchdringen. Das Porensystem ist für diese Moleküle voll zugänglich. Beim Überschreiten einer bestimmten Liganden- und Polymerkonzentration (hier 19 % BG) dehnt sich das vernetzte Polymer aus und füllt die gesamte Pore. Dadurch kann die Pore mit BSA Molekülen aufgefüllt werden.

Die obigen Überlegungen haben gezeigt, daß die polymere Beschichtungen zu Veränderungen der Porenstruktur geführt hatten, welche für die Reinigung von Proteinen von Nutzen sind. Inwieweit die Hydrogelstruktur die Gleichgewichtsbindungskapazitäten der Ionenaustauscher beeinflusst, kann durch die Bestimmung von Adsorptionsisothermen abgeleitet werden.

5.5 Adsorptionsisothermen

Die Adsorptionsisothermen für alle Trägermaterialien wurden mittels Batchmessung ermittelt (siehe Methodenteil 8.2.1). Es wurden die Proteinkonzentrationen: 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml verwendet. Die Isothermen für die partikulären Fractogel® Anionenaustauscher mit unterschiedlichem Beschichtungsgrad zeigt Abb.5.5:

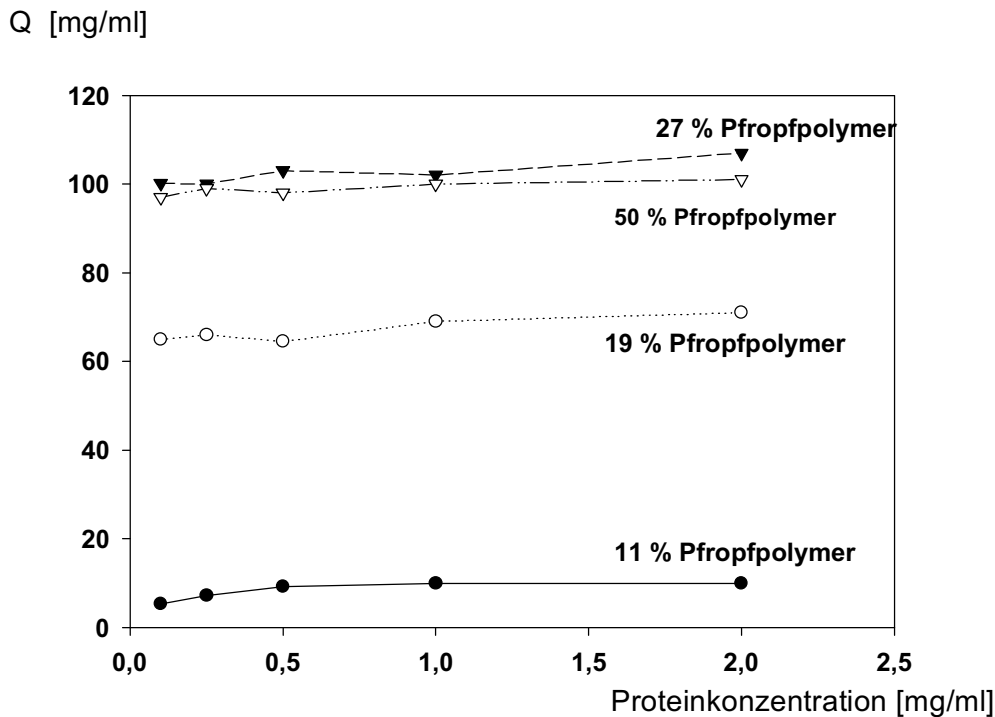


Abb. 5.5: Adsorptionsisothermen für Anionenaustauschergele auf Fractogel HW 650 (M). Die Anionenaustauscherpartikel haben unterschiedliche Mengen Pfpolymer auf der Geloberfläche.

Wie man diesen Daten entnimmt, ist die im Gleichgewicht adsorbierte Menge Protein über den betrachteten Bereich nahezu unabhängig von der Konzentration des angebotenen Proteins. ($Q=Q_{\max}$ für alle C_0). Man bezeichnet die charakteristische Form dieser Isothermen als Rechteckisotherme.

Nur bei dem Trägermaterial mit 11 % Pfpolymer kommt es bei den kleineren Konzentrationen zu einer Abweichung von der Rechteckform. Es ist wahrscheinlich, dass die Bindungskapazitäten aller Gele bei noch kleineren Startkonzentrationen (C_0) abnehmen. Im hier betrachteten Konzentrationsbereich ist die Bindungskapazität konstant. Bemerkenswert ist die sehr starke Zunahme bei einer nur geringfügigen Steigerung der Menge an Pfpolymer. Dieser Effekt ist im nächsten Bild (Abb. 5.6) noch einmal, unter Benutzung

der durch Titration mit 0,1 M Salzsäure ermittelten Ligandendichte an DEA-Gruppen, im Vergleich dargestellt:

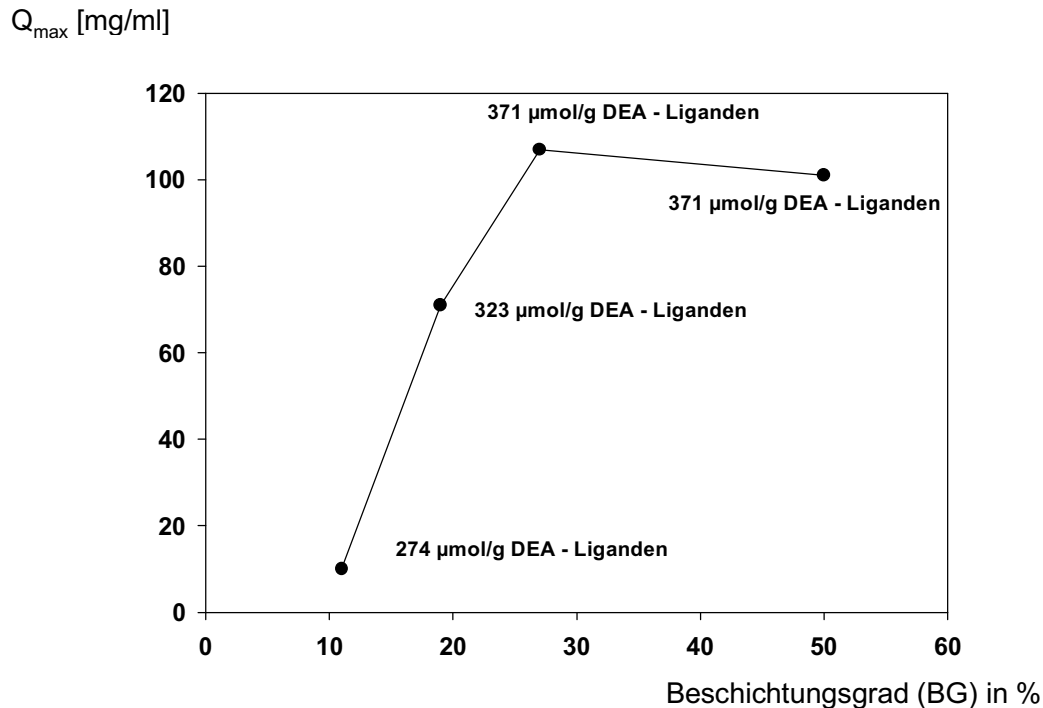


Abb. 5.6 Proteinbindungskapazität Q_{max} in Abhängigkeit vom Pfropfpolymerisationsgrad (mit Glycidylmethacrylat) und der Ligandendichte von Anionenaustauschern

Der sehr starke Anstieg der Proteinbindungskapazität im Bereich von 10-30 % Pfropfpolymer (Faktor 10!) kann nicht durch eine proportionale Zunahme der Ligandendichte erklärt werden. Die Ligandendichte ändert sich nur um 25 % wohingegen die Proteinbindungskapazität um mehr als das 10-fache ansteigt. Dieser Effekt ist ebenfalls durch die Ausbildung eines ionischen Hydrogels im Porensystem zu erklären. Die Volumenzunahme eines Hydrogels erfolgt bei dem Überschreiten eines bestimmten Parameters (Polymerkonzentration, Ligandendichte, Salzgehalt, pH Wert) entsprechend einem Phasenübergang. Diese Volumenzunahme ist die Ursache dafür, dass alle ionischen Liganden im Poreninneraum "verteilt" werden und für die Bindung von Protein voll zugänglich werden. Die Ligandendichte ist somit nicht der entscheidende Parameter zum Erzielen einer hohen Proteinbindungskapazität. Wichtiger ist die Zugänglichkeit der Analyten zu den Liganden. Es ist jedoch anzunehmen, dass durch die entwickelte Hydrogelstruktur im Vergleich zur Ausgangsstruktur weitaus mehr "passive" Liganden zur Bindung des Proteins bereit gestellt werden. Es handelt sich hier um eine Multizentrenwechselwirkung zwischen Protein und Liganden. Ähnliche Phänomere sind von Jennissen auch bei der hydrophoben

Interaktionschromatographie beschrieben worden. Beim Überschreiten einer bestimmten Ligandendichte an hydrophoben Gruppen kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Bindungskapazität. Dieses Phänomen wird als kritische Hydrophobizität bezeichnet [66].

Nach den vorgestellten Untersuchungen kann jedoch nicht unterschieden werden ob die Ausbildung der Hydrogelstruktur ausschließlich in den Poren stattfindet, es soll deshalb hier noch eine zweite Hypothese zum Aufbau Hydrogelstruktur vorgestellt werden:

Die ionische Hydrogelmatrix wird nicht nur im Porenraum des Gels sondern auch auf der geometrischen Außenhülle der Fractogelpartikel gebildet. Für diese Hypothese spricht die überproportionale Zunahme des Außendurchmessers der Partikel. Wie die Coulter-Counter Messungen gezeigt hatten (siehe Kapitel 5.5.), nimmt bei einem Beschichtungsgrad von 50 % der Partikeldurchmesser um 20 % zu. Aus der Bilanz erhält man eine 10 %ige Zunahme des Partikeldurchmessers. Noch größere Abweichungen gibt es bei dem Fractogel welches mit ionischem Polyamid beschichtet wurde, statt berechneter 1,9 μm erhält man 7 μm Schichtdickenzuwachs.

Aufgrund dieser Beobachtungen ist die Annahme gerechtfertigt, dass auf der Partikelaußenfläche eine sehr dicke Schicht gebildet wird. Allerdings handelt es sich bei einem Fractogelpartikel um keine Vollkugel, sondern eher um eine Kugel mit sehr vielen Löchern. Die Hydrogelschicht wird deshalb voraussichtlich nicht das gesamte Partikel umspannen. Unter dieser Annahme erscheint die Ausbildung eines Hydrogels noch plausibler. Bei der Massenbilanz wurde angenommen, dass die gesamte Massenzunahme im Außenbereich einer Vollkugel realisiert wurde. Geht man davon aus, dass die Massenzunahme auf der äußeren Kugelschale entsprechend dem Verhältnis von Partikelaußenfläche zur spezifischen inneren Oberfläche erfolgte (also etwa 1 %), so kann man den Schluss ziehen, dass das Hydrogel Quellfaktoren von 100 oder mehr besitzen muss.

Eine Überdehnung eines Polymernetzwerkes ist nur auf der Außenseite der Partikel möglich und kann nicht durch die einfache Entfaltung eines statistischen Polymerknäuels beschrieben werden. In den Poren ist eine Überdehnung nicht möglich, da es räumliche Einschränkungen gibt. Es entsteht somit eine zwei Phasen Struktur der folgenden Art:

1. Ein sehr "weiches" hoch aufgeweitetes Hydrogel im Außenbereich der Partikel
2. Ein Hydrogel mit größerer Dichte in den Poren

Welche Konsequenzen hätte die Annahme einer solchen Struktur:

1. Die Diffusion im Außenbereich ist weniger behindert als im Inneren des Partikels. Adsorptionsprozesse finden häufiger im Außenbereich des Partikels statt.

2. Die Diffusionsstrecken werden verkürzt, was eine Steigerung der Diffusionsgeschwindigkeit zur Folge hätte.
3. Die sehr offene Struktur erlaubt auch Moleküle zu binden, welche aufgrund ihrer Größe nicht in das Porensystem eindringen könnten. Die Richtigkeit dieser Annahme wurde vom Autor durch die Bestimmung der Bindungskapazität für PlasmidDNA und Viren für oberflächenmodifizierte Gele experimentell betätigt [200]. Diese ist um den Faktor 3 bis 5 höher als bei Trägermaterialien der herkömmlichen Art.

Unter der Voraussetzung der Annahme, dass die Bindung bei polymermodifizierten Teilchen mehr auf der Außenseite stattfindet richtig ist, sollte eine unporöse Partikelkugel (mit Beschichtung) eine wesentlich höhere Bindungskapazität besitzen als ihrer geometrischen Außenfläche entspricht. Das wurde schon von Janzen und Unger [28] für unporöse polymer beschichtete Kieselgelpartikel gezeigt. Die Bindungskapazität war nicht ganz so hoch wie für ein (vergleichbares) poröses Partikel sondern betrug nur etwa 15 %. Das war jedoch um den Faktor 100 größer als der Wert welcher bezüglich dem Verhältnis Außenfläche zu Innenfläche zu erwarten war.

Folglich kann ein beträchtlicher Teil der Bindungskapazität in einer äußeren Polymerschicht realisiert werden. Welches der beiden oben beschriebenen Modelle tatsächlich richtig ist, kann zur Zeit nicht entschieden werden. Man braucht dazu experimentelle Methoden, die bisher nicht verfügbar waren. Eine Methode die diese Untersuchungen in Zukunft ermöglichen könnten, ist die bifokale Fluoreszenzmikroskopie [167].

Entsprechend den obigen experimentellen Resultaten ist anzunehmen, dass eine hohe Bindungskapazität in einem makroporösem Trägermaterial mit Poren > 50 nm durch die Ausbildung eines ionischen Hydrogels bedingt ist.

Nachdem Aufbau des Polymers und die Anordnung der Liganden in polymermodifizierten Trägermaterialien in den vorherigen Kapiteln phänomenologisch untersucht wurden, wird nun auf die Transporteigenschaften von Proteinen in diesen Polymerschichten eingegangen.

6 Stofftransport in polymer-beschichteten Trägermaterialien

6.1 Stofftransportwiderstände in Ionenaustauschern

Durch experimentelle Untersuchungen wurde gezeigt, dass in makroporösen Ionenaustauscherpartikeln hauptsächlich folgende Widerstände den Transport von Molekülen behindern [34], [172]:

1. Die Geschwindigkeit der Reaktion
2. Der Filmwiderstand
3. Die Porendiffusion
4. Die Oberflächendiffusion
5. Die Axialdispersion (tritt in einer gepackten Säule auf)

Aus der Literatur ist bekannt, dass insbesondere die Filmdiffusion, die Poren und die Oberflächendiffusion als kinetische Widerstände bei Ionenaustauschern in Betracht gezogen werden müssen [34]. Die ionische Reaktion zwischen Ligand und Protein verläuft im allgemeinen sehr schnell und sollte daher im gewöhnlichen Arbeitsbereich von Ionenaustauschern für die Bioseparation (1 cm/min–100 cm/min) kein transportlimitierender Prozess sein. Für die in dieser Arbeit untersuchten Gele wurde alle oben aufgeführten Transportwiderstände in die Untersuchung mit einbezogen, da die polymeren Modifikationen beträchtliche Änderungen der Größe und der Eigenschaften der chromatographischen Partikel zur Folge haben (siehe Kapitel 5).

Für die funktionelle Beschreibung der Konzentrations-Zeit-Daten der Adsorption im Batch kann eine Vielzahl von Modellen verwendet werden. Bei der Auswahl der entsprechenden Modelle kann von folgenden Überlegungen ausgegangen werden:

1. Man verzichtet auf eine mechanistische Interpretation der einzelnen kinetischen Widerstände und fasst sie in einer effektiven Geschwindigkeitskonstante (Reaktionsgeschwindigkeitsmodell, Reaktion 1. oder 2. Ordnung) zusammen und berücksichtigt und charakterisiert somit die Gesamtgeschwindigkeit des Adsorptionsprozesses. Nachteil dieser Methode ist, dass der Gesamtprozess nur durch eine mathematisch nicht sehr flexible Modellgleichung, mit einem frei adjustierbaren Parameter, beschrieben wird und keine reale Modellvorstellung des Adsorptionsprozesses zugrunde gelegt wird. Die berechneten Geschwindig

keitskonstanten sind deshalb auch keine Geschwindigkeitskonstanten im kinetischen Sinn [168].

2. Es wird angenommen, dass der Gesamtvorgang nur durch einen einzelnen anderen Transportwiderstand bestimmt ist (Film-, Poren- oder Oberflächendiffusion). Das ist häufig eine zu grobe Näherung, ermöglicht aber grundlegende Informationen über den Ablauf der Adsorption zu bekommen. Die experimentellen Daten werden an die entsprechenden analytischen Lösungen der Bilanzgleichungen für Filmdiffusion, Oberflächendiffusion, Porendiffusion durch Fehlerquadratsummenminimierung angepasst [169]. Existiert keine analytische Lösung so ist eine numerische Integration der Bilanzgleichungen notwendig.
3. Man betrachtet die Proteinadsorption als einen durch mehrere gleichzeitig nebeneinander oder nacheinander stattfindende Mechanismen. Nachteil dieser Herangehensweise sind die häufig nicht vorhandenen Informationen zu den einzelnen Anteilen der entsprechenden Widerstände am Gesamtprozess. Die Auswertung der Konzentrations-Zeit Daten macht fast immer eine numerische Integration erforderlich [34].
4. Man nimmt an, dass ein Widerstand nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich dominierend ist, so dass für jeden Bereich ein anderes Modell benutzt werden muss. Der mathematische Aufwand ist hier beträchtlich und die Diskontinuität der Übergangsbereiche erschwert die Interpretation [36].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Vorgehensweise nach Punkt 2. bevorzugt. Aufgrund der Tatsache, dass es bisher keine Untersuchungen der Transportprozesse in oberflächenmodifizierten Gelen mit systematischer Variation des Polymerisationsgrades gibt, war es wichtig, den dominierenden Transportmechanismus in diesen Compositmaterialien zu identifizieren. Bei der Analyse der Konzentrations-Zeit Daten wurde deshalb von der vereinfachenden Annahme ausgegangen, dass nur ein Widerstand den Stofftransport bestimmt. Bei der Verwendung der ermittelten Koeffizienten zur Vorausberechnung der Durchbruchkurven zeigte es sich jedoch, dass offensichtlich mehr als ein Transportwiderstand einen Einfluss auf den Gesamtprozess hat (mehr dazu in Kapitel 6.5.6).

Die errechneten Modellparameter der Konzentrations-Zeit Daten der Batchversuche wurden nach dem Konzept der Übertragungseinheiten ausgewertet (siehe Kapitel 6.5.2). In den folgenden Kapiteln werden die Zusammenhänge zur modellmäßigen Beschreibung der Konzentrations-Zeit Daten der Batchadsorption sowie der Durchbruchkurve abgeleitet.

Für die Diskussion des Einflusses der chemischen Struktur des gebundenen Pfropfpolymeres wurden sowohl kommerziell erhältliche Ionenaustauschergelgele als auch experimentelle Gele in die Untersuchungen mit einbezogen. Die verwendeten Trägermaterialien sind in Tabelle 6.1 aufgeführt:

Tabelle 6.1 Trägermaterialien, die für die Untersuchung der Stofftransporteigenschaften verwendet wurden

Trägermaterial	Beschichtung
Fractogel® TSK DEAE (Hersteller ist die Fa. TOSOH)	keine polymere Beschichtung
Fractogel® EMD DEAE (M) (Produkt der Fa. Merck KGaA)	Acrylamido N,N'-diethylethylendiamin 10 % BG
Fractogel® EMD DEA (M) (Forschungsmuster)	Glycidylmethacrylat 50 % BG
Fractogel® EMD DEA (M) (Forschungsmuster)	Glycidylmethacrylat 27 % BG
Fractogel® EMD DEA (M) (Forschungsmuster)	Glycidylmethacrylat 18 % BG
Fractogel® EMD DEA (M) (Forschungsmuster)	Glycidylmethacrylat 11 % BG

Es wurden Gele mit Beschichtungsgraden bis maximal 50 % untersucht. Diese Gele waren noch ausreichend permeabel und konnten für Untersuchungen in einer Säule verwendet werden. Höhere Beschichtungsgrade führten im Elutionsbetrieb zu einer irreversiblen Kompression des Gelbettes.

6.1.1 Das Konzept der Rechteckisotherme

Alle im folgendem abgeleiteten Modelle beruhen auf der Annahme einer rechteckigen Form der Adsorptionsisotherme. Das ist gerechtfertigt durch den realen Verlauf der Isothermen im Konzentrationsbereich für C_0 von 0,1 mg/ml bis 2 mg/ml (siehe Abb 5.5). Durch diese Annahme können analytische Lösungen für die sonst nur numerisch löslichen partiellen Differentialgleichungen der Bilanzgleichungen abgeleitet werden [170].

Für alle $C_0 > 0,1$ gilt:

$Q=0$ für $C < C_0$

und

$Q=Q_{\max}$ für $C \geq C_0$ 6.1

Gleichung 6.1 ist die mathematische Bedingung für eine Rechteckisotherme.

6.2 Modellgleichungen zur Charakterisierung der Batchadsorption

Das Reaktionsmodell

Aus der Massenbilanz des Proteins in der Flüssigkeit und im Festenbett folgt [171]:

$$\varepsilon_{\text{ext}} \cdot C_0 = \varepsilon_{\text{ext}} \cdot C + (1 - \varepsilon_{\text{ext}}) \cdot \bar{Q} \quad 6.2$$

C ist die Flüssigphasenkonzentration des Proteins, \bar{Q} ist die mittlere Beladung der chromatographischen Partikel mit dem Protein.

Die externe Porosität einer Partikelsuspension ε_{ext} ist definiert als:

$$\varepsilon_{\text{ext}} = \frac{V_{\text{Fl}}}{V_{\text{Fl}} + V_{\text{G}}} \quad 6.3$$

V_{Fl} Volumen der Flüssigkeit [ml]

V_{G} Volumen des Gels [ml]

In Gleichung 6.3 wird das nicht gebundene Protein im Gleichgewicht der flüssigen Phase zugerechnet.

Gleichung 6.2 wird nach der Zeit differenziert:

$$-\varepsilon_{\text{ext}} \cdot \frac{dC}{dt} = (1 - \varepsilon_{\text{ext}}) \cdot \frac{d\bar{Q}}{dt} \quad 6.4$$

Für die Ableitung eines Zusammenhangs zwischen der absorbierten Proteinkonzentration und der Proteinkonzentration in der flüssigen Phase wird folgende Reaktionskinetik 2.Ordnung angenommen:

$$\frac{d\bar{Q}}{dt} = k_1 \cdot C \cdot (Q_{\max} - \bar{Q}) \quad 6.5$$

t Zeit [s]

k₁ Geschwindigkeitskonstante der Reaktion [ml/mgs]

Unter stationären Bedingungen ist:

$$\frac{d\bar{Q}}{dt} = 0 \quad 6.6$$

Aus Gl. 6.6 folgt damit, dass Gleichung 6.1:

$$\bar{Q} = Q_{\max} \quad 6.7$$

die Bedingung für die Rechteckisotherme erfüllt ist. Unter Benutzung der Bilanzgleichung 6.4 und der Anfangsbedingung kann durch Integration folgende Gleichung abgeleitet werden:

$$\frac{\bar{Q}}{Q_{\max}} = \frac{C_0 \cdot \left(1 - \exp\left\{ \left(C_0 - \frac{1 - \varepsilon_{\text{ext}}}{\varepsilon_{\text{ext}}} \cdot Q_{\max} \right) \cdot k_1 \cdot t \right\} \right)}{\frac{1 - \varepsilon_{\text{ext}}}{\varepsilon_{\text{ext}}} - \frac{C_0}{Q_{\max}} \exp\left\{ \left(C_0 - \frac{1 - \varepsilon_{\text{ext}}}{\varepsilon_{\text{ext}}} \cdot Q_{\max} \right) \cdot k_1 \cdot t \right\}} \quad 6.8$$

Gleichung 6.8 enthält eine frei variierbare Konstante k₁.

Oberflächendiffusion, Porendiffusion und Filmdiffusion

Eine allgemeine Behandlung dieser drei Transportwiderstände kann durch folgende Beziehungen (Glg. 6.9-6.12) erfolgen [172]. Zunächst wird die Stoffbilanz für ein Einzelpartikel in den Poren ausgeführt, die dann mithilfe der Beziehung 6.11 zur mittleren Beladung des Gesamtpartikles umgeformt werden kann.

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \cdot \left[r^2 \left((1 - \varepsilon) \cdot D_p \cdot \frac{\partial C}{\partial r} + \varepsilon \cdot D_o \cdot \frac{\partial Q}{\partial r} \right) \right] \quad 6.9$$

für t=0 gilt C=C₀ und Q=0

für r = 0 gilt $\frac{\partial C}{\partial r} = 0$ sowie $\frac{\partial Q}{\partial r} = 0$

$$r = R_p : D_p \cdot \frac{\partial C}{\partial r} + D_o \cdot \frac{\partial Q}{\partial r} = k_f \cdot (C - c|_{r=R_p}) \quad 6.10$$

Experimentell zugänglich ist lediglich die mittlere Beladung eines chromatographischen Partikels. Sie ist definiert als:

$$\bar{Q} = \frac{3}{R_p} \int_0^{R_p} r^2 Q(r) dr \quad 6.11$$

Dadurch ist eine Kopplung mit der Massenbilanz 6.2 möglich:

$$-\varepsilon_{\text{ext}} \cdot \frac{dC}{dt} = (1 - \varepsilon_{\text{ext}}) \cdot \frac{d}{dt} \left(\frac{3}{R_p} \int_0^{R_p} r^2 Q(r) dr \right) \quad 6.12$$

Im Modell Glg. 6.9-6.12 werden die Porendiffusion und die Oberflächendiffusion als parallel ablaufende Adsorptionsmechanismen betrachtet. Mit der Bedingung $D_b = 0$ erhält man das Porendiffusionsmodell und für $D_p = 0$ das Oberflächendiffusionsmodell sowie für $D_p = 0$ und $D_o = 0$ ist der Filmwiderstand mit dem Transportkoeffizienten k_f der geschwindigkeitsbestimmende Mechanismus.

Mit den Bedingungen für eine Rechteckisotherme:

$$\bar{Q} = Q_{\text{max}} \quad \text{für alle } C_0 > 0 \quad 6.13$$

erhält man mit $D_p = 0$ und $k_f = 0$ für die Oberflächendiffusion, nach Integration unter Verwendung einer Hilfsvariablen, folgende Lösung [173]:

$$\frac{\bar{Q}}{Q_{\text{max}}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cdot \exp\left(-n^2 \cdot \pi^2 \cdot \frac{D_o \cdot t}{R_p^2}\right) \quad 6.14$$

Für $D_o = 0$ und $k_f = 0$ kann durch Integration das Porendiffusionsmodell abgeleitet werden:

$$\frac{6 \cdot \varepsilon \cdot D_p \cdot C_0}{Q_{\text{max}} \cdot R_p^2} t = 1 + 2 \cdot \left(1 - \frac{\bar{Q}}{Q_{\text{max}}}\right) - 3 \cdot \left(1 - \frac{\bar{Q}}{Q_{\text{max}}}\right)^{2/3} \quad 6.15$$

Die entsprechende explizite Lösung für $\bar{Q} = Q_{\text{max}}$ lautet:

$$\frac{\bar{Q}}{Q_{\max}} = 1 - \left\{ 0,5 + \cos \left[\frac{\pi}{3} + \frac{1}{3} \arccos \left(1 - \frac{2 \cdot t}{\theta} \right) \right] \right\}^3 \quad 6.16$$

mit

$$\theta = \frac{1}{6} \frac{R_p^2}{D_p} \cdot \left(\frac{Q_{\max}}{C_0} \right) \quad 6.17$$

Unter den Bedingungen einer irreversiblen Adsorption dringt die Konzentrationsfront in Form einer Welle in das Partikel ein. Es bilden sich zwei Gebiete mit unterschiedlicher Konzentration aus: 1. Der noch nicht benetzte Bereich mit der Konzentration $C = 0$ und $Q=0$ sowie 2. Die bereits durchlaufene Kugelschale, in der die Beladung auf dem Sättigungsniveau $\bar{Q} = Q_{\max}$ ist. Der Verlauf der Adsorption ist für diesen Mechanismus schematisch in Abbildung 6.1 für \bar{Q}/Q_{\max} als Funktion der dimensionslosen Zeit dargestellt t/θ :

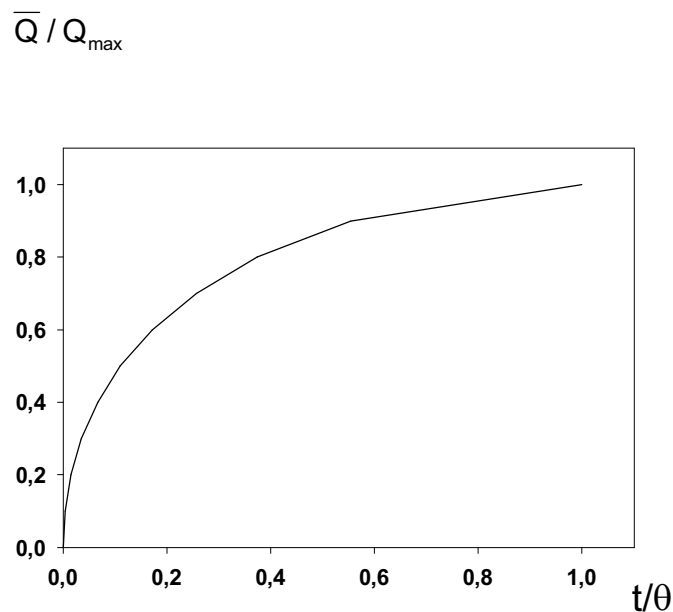


Abb. 6.1: Allgemeiner Konzentrations-Zeit Verlauf für das Porendiffusionsmodell

Die Adsorptiongeschwindigkeit im Anfangsbereich ist schnell. Etwa 70% der Gesamtmenge wird im ersten dimensionslosen Zeitdrittel adsorbiert. Der Rest wird in der verbleibenden Zeit gebunden.

Bei der Ableitung von den Gleichungen wurde angenommen, dass sich die Ausgangskonzentration C_0 nicht ändert. Das ist jedoch eine idealisierte Annahme, welche von der Voraussetzung ausgeht, dass die Adsorption in einem unendlich großen Volumen stattfindet.

Bei den von uns aufgenommen Konzentrations-Zeit-Kurven war die Konzentration in der flüssigen Phase nicht konstant. Die Endkonzentration betrug bei einigen Untersuchungen 50 % des Ausgangswertes. Dies muss bei der Integration berücksichtigt werden. Die Gleichungen für die Oberflächendiffusion und die Porendiffusion erhalten dann folgende Form:

Oberflächendiffusion mit zeitlich veränderlichem C_0

$$\frac{\bar{Q}}{Q_{\max}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp\left(-\frac{D_o \cdot p_n^2 \cdot t}{R_p^2}\right)}{9 \cdot \Lambda / ((1-\Lambda) + (1-\Lambda) \cdot p_n^2)} \quad 6.18$$

p_n sind die von Null verschiedenen Wurzeln der Gleichung:

$$\tan p_n = \frac{3 \cdot p_n}{3 + \left(\frac{1}{\Lambda} - 1\right) \cdot p_n} \quad 6.19$$

und für Λ gilt:

$$\Lambda = C_0 - \frac{(1 - \varepsilon_{\text{ext}}) \cdot Q_{\infty}}{\varepsilon_{\text{ext}}} \quad 6.20$$

Die Einzelheiten der Ableitung und eine Tabelle der Wurzeln der transzendenten Gleichung 6.19 können dem Buch von Crank entnommen werden [174].

Porendiffusion mit zeitlich veränderlichem C_0 [175]

$$t = \left(\frac{R_p^2 \cdot Q_{\max}}{D_p \cdot C_0} - \frac{Q_{\max} \cdot R_p}{C_0 \cdot k_f} \right) \cdot \frac{1}{3 \cdot H} \ln \left(\frac{\lambda^3 + \eta^3}{\lambda^3 + 1} \right) - \frac{R_p^2 \cdot Q_{\max}}{D_p \cdot C_0} \cdot \left[\frac{1}{6 \cdot \lambda \cdot H} \ln \left[\left(\frac{\lambda^3 + \eta^3}{\lambda^3 + 1} \right) \cdot \left(\frac{\lambda + 1}{\lambda + \eta} \right)^3 \right] + \frac{1}{\lambda \cdot H \cdot \sqrt{3}} \cdot \left[\arctan \left(\frac{2\eta - \lambda}{\lambda \sqrt{3}} \right) - \arctan \left(\frac{2 - \lambda}{\lambda \sqrt{3}} \right) \right] \right] \quad 6.21$$

mit:

$$\eta = \left(1 - \frac{\bar{Q}}{Q_{\max}}\right)^{1/3} \quad 6.22$$

und

$$H = (1 - \varepsilon_{\text{ext}}) \cdot \frac{Q_{\max}}{C_0} \quad 6.23$$

und

$$\lambda = \left(\frac{1}{H} - 1\right)^3 \quad 6.24$$

Für k_f wurde ein Wert von 0,0025 cm/s angenommen (siehe Carta [35]).

Da die experimentellen Daten mit veränderlicher Anfangskonzentration bestimmt wurden, wurden ausschließlich die Modellgleichungen 6.186.20 und 6.21-6.24 zur Berechnung der Transportkoeffizienten verwendet.

Filmdiffusion

Für $D_p = 0$ und $D_o = 0$ resultiert eine lineare homogene Differentialgleichung 1. Ordnung deren Integration folgenden Zusammenhang zwischen adsorbierter Proteinmenge und der Zeit ergibt [29]:

$$\frac{\bar{Q}}{Q_{\max}} = \frac{C_0 \cdot \varepsilon}{(1 - \varepsilon_{\text{ext}}) \cdot Q_{\max}} \left(1 - \exp\left(-\frac{3k_f}{R_p} \cdot \frac{(1 - \varepsilon_{\text{ext}})}{\varepsilon_{\text{ext}}} t\right)\right) \quad 6.25$$

Zur Anpassung der experimentellen Daten der Batchadsorption wurde somit der folgende Satz von Modellgleichungen verwendet:

Tabelle 6.2 Modellgleichungen zur Beschreibung der Batchadsorption

Modelltyp	Gleichung	freier Parameter
Reaktionsmodell	$\frac{\bar{Q}}{Q_{\max}} = \frac{\frac{C_0}{Q_{\max}} \cdot \left(1 - \exp\left\{ \left(C_0 - \frac{\varepsilon_{\text{ext}}}{(1 - \varepsilon_{\text{ext}})} Q_{\max} \right) \cdot k_1 \cdot t \right\} \right)}{\frac{\varepsilon_{\text{ext}}}{(1 - \varepsilon_{\text{ext}})} - \frac{C_0}{Q_{\max}} \cdot \exp\left\{ \left(C_0 - \frac{\varepsilon_{\text{ext}}}{(1 - \varepsilon_{\text{ext}})} Q_{\max} \right) \cdot k_1 \cdot t \right\}}$	k₁
Oberflächen- diffusion *	$\frac{\bar{Q}}{Q_{\max}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp\left(-\frac{D_o p_n^2 t}{R_p^2}\right)}{9\Lambda / (1 - \Lambda) + (1 - \Lambda) \cdot p_n^2}$	D_o
Porendiffusion	$t = \left(\frac{R_p^2 Q_{\max}}{D_p C_0} - \frac{Q_{\max} R_p}{C_0 k_f} \right) \cdot \frac{1}{3H} \ln \frac{\lambda^3 + \eta^3}{\lambda^3 + 1} - \frac{R_p^2 Q_{\max}}{D_p C_0} \left[\frac{1}{6HL} \ln \left[\frac{\lambda^3 + \eta^3}{\lambda^3 + 1} \left(\frac{\lambda + 1}{\lambda + \eta} \right)^3 \right] + \frac{1}{\lambda H \sqrt{3}} \left[\arctan\left(\frac{2\eta - \lambda}{\lambda \sqrt{3}}\right) - \arctan\left(\frac{2 - \lambda}{\lambda \sqrt{3}}\right) \right] \right]$	D_p
Filmdiffusion	$\frac{\bar{Q}}{Q_{\max}} = \frac{C_0 \cdot \varepsilon}{(1 - \varepsilon) \cdot Q_{\max}} \left(1 - \exp\left(-\frac{3k_f}{R_p} \cdot \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} t \right) \right)$	k_f

Die Anpassung der experimentellen Daten im Oberflächendiffusionsmodell (Glg. 6.186.20) wurde mit 6 Wurzeln der Gleichung 6.19 durchgeführt. Die Parameter wurden durch nichtlineare Regression an die experimentellen Daten adjustiert (LevenbergMarquardt Algorithmus, Programm SIGMA-PLOT 2000, Fa. Jandel Scientific). Die Regression wurde für die Konzentrations-Zeit Daten aller in Tabelle 6.1 aufgeführten partikulären Trägermaterialien durchgeführt. Bei der Regression wurde \bar{Q} / Q_{\max} als Funktion der Zeit berechnet. Bei dem Porendiffusionsmodell mit veränderlicher Ausgangskonzentration war die explizite Funktion nicht zugänglich. Es wurde deshalb t als Funktion von \bar{Q} / Q_{\max} an die experimentellen Daten angepasst. Für die Durchführung der Berechnungen sind weitere Werte erforderlich, z.B die Gleichgewichtsbindungskapazität Q_{\max} . Die Werte für die entsprechenden Gele sind in der folgenden Tabelle enthalten:

Tabelle 6.3 Gleichgewichtsbindungskapazitäten der modifizierten Ionenaustauschergel
 Q_{max}

Gel	Gleichgewichtsbindungskapazität Q_{max} in mg/ml für BSA
Fractogel® TSK DEAE (nichtpolymerer Ionenaustauscher)	23
Fractogel® EMD DEAE (M) Tentakelgel (Amid)	95
Fractogel® DEA (M) 50 % Beschichtungsgrad	92
Fractogel® DEA (M) 27% Beschichtungsgrad	97
Fractogel® DEA (M) 19 % Beschichtungsgrad	61
Fractogel® DEA (M) 11 % Beschichtungsgrad	9

Für den mittleren Porenradius R_p der Fractogelporen wurde der Wert 32,5 nm und für den mittleren Partikeldurchmesser 65 μ m verwendet.

6.3 Ergebnisse

Ergebnisse mit dem Reaktionsmodell

Mit dem Reaktionsmodell konnte eine gute Anpassung an die experimentellen Daten erzielt werden. Die Ergebnisse der Einzelwerte sind in Tabelle 6.4 aufgeführt.

Für jedes Gel wurden für die 4 Ausgangskonzentrationen $c_0 = 0,25, 0,5, 1$ und 2 mg/ml die Geschwindigkeitskonstanten ermittelt. Von diesen vier Geschwindigkeitskonstanten wurde anschließend der arithmetische Mittelwert gebildet.

Durch die Mittelwertbildung wird die Konzentrationsabhängigkeit der Transportkonstanten vorerst nicht berücksichtigt. Für die vergleichende Diskussion der Ergebnisse der einzelnen Modelle bezüglich des polymeren Beschichtungsgrades soll diese jedoch vorerst vernachlässigt werden. Die Konzentrationsabhängigkeiten der Geschwindigkeitskonstanten werden in Kapitel 6.4.5 diskutiert.

Die Werte in der Tabelle bedeuten:

Mittelwert der Geschwindigkeitskonstante \pm Fehler des Mittelwertes der Geschwindigkeitskonstante bei 95 % Konfidenz.

(Diese Darstellung der errechneten Transportkoeffizienten wurde auch für die Koeffizienten der anderen Modelle verwendet).

Tabelle 6.4 Ergebnisse der Ausgleichsrechnung mit dem Reaktionsmodell

Material	Mittelwert k_1 [ml/mg·s]
Fractogel® DEA (40-90 µm), 50 % Beschichtungsgrad	0,0056 ± 0,00187
Fractogel® DEA (40-90 µm), 27 % Beschichtungsgrad	0,00715 ± 0,0026
Fractogel® DEA (40-90 µm) 19 % Beschichtungsgrad	0,007 ± 0,0019
Fractogel® DEA (40-90 µm) 11 % Beschichtungsgrad	0,0135 ± 0,0025
Fractogel® EMD DEAE (40-90 µm) 10 % Beschichtungsgrad (Amid)	0,013 ± 0,0019
Fractogel® TSK DEAE (40-90 µm) ohne polymere Beschichtung	0,015 ± 0,002

Die gemittelte relative Abweichung aller Variationskoeffizienten beträgt 24 % (Der Variationskoeffizient ist das Verhältnis der Summe der Standardabweichungen aller Mittelwerte zu den errechneten Parameterwerten). Berücksichtigt man, dass Proteinbestimmungsmethoden relative Standardabweichungen von bis zu 10 % haben, dann kann die Anpassung der Modellgleichung an die experimentellen Daten als gut bezeichnet werden.

Die experimentellen Daten sowie die Anpassungen mit dem Reaktionsmodell sind in den Abbildungen 6.2-6.7 gezeigt:

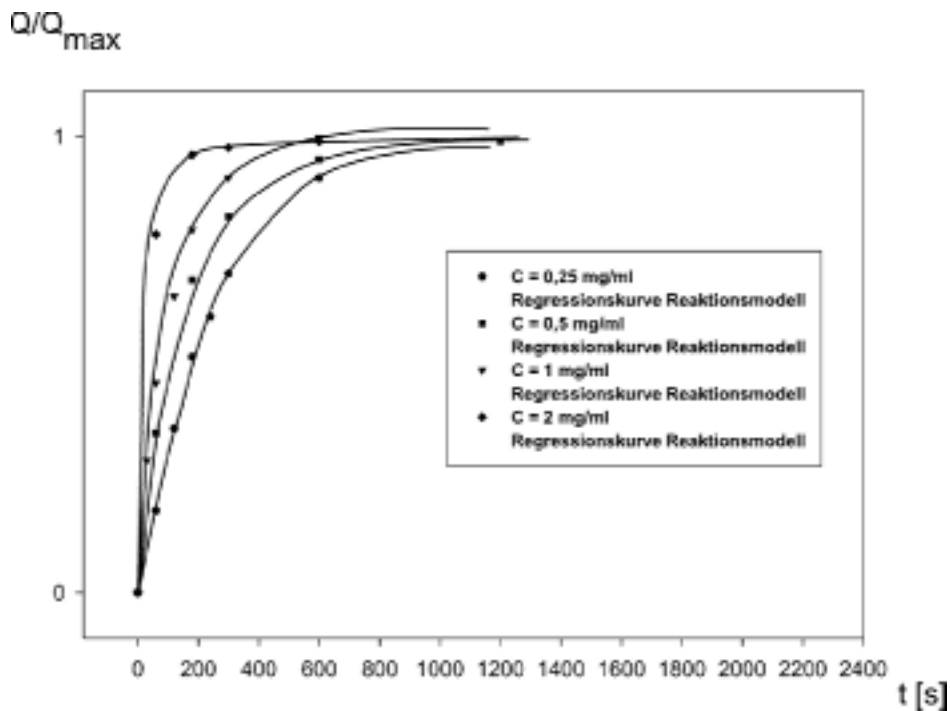


Abb. 6.2: Relative adsorbierte Proteinmenge als Funktion der Zeit für Fractogel® 650 (M) DEA (11% BG), die durchgezogenen Kurven sind die Regressionskurven des Reaktionsmodells GL. 6.8, ($k_1 = 0,0135$ ml/mg·s (Mittelwert))

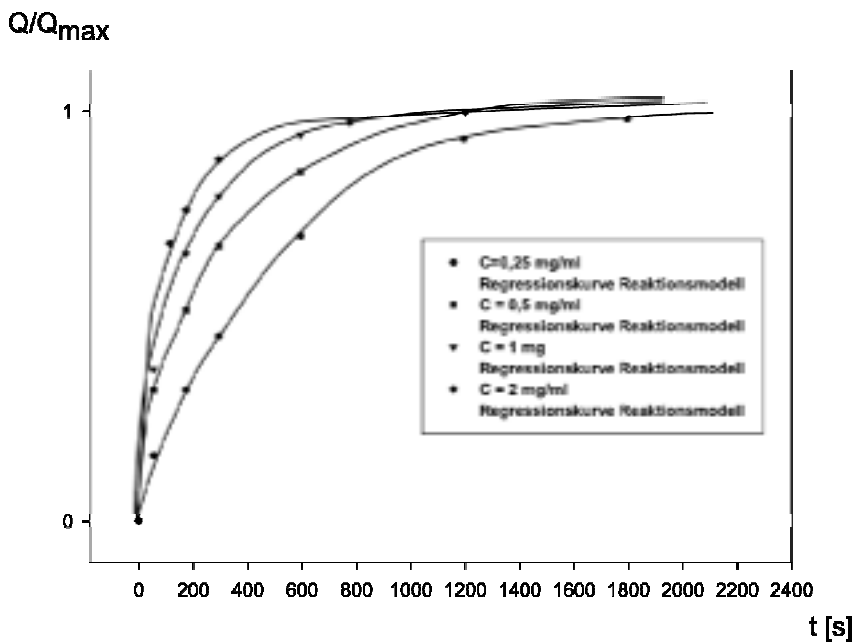


Abb. 6.3: Relative adsorbierte Proteinmenge als Funktion der Zeit für Fractogel® 650 (M) DEA (19 % BG), die durchgezogenen Kurven sind die Regressionskurven des Reaktionsmodells GL. 6.8 ($k_1 = 0,007$ ml/mg·s (Mittelwert))

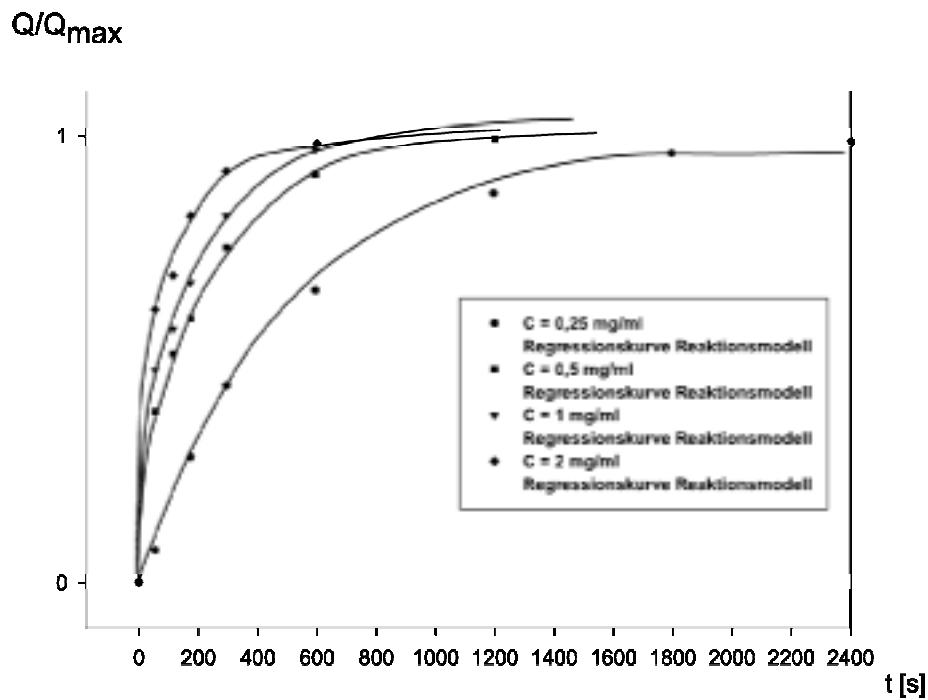


Abb. 6.4: Relative, adsorbierte Proteinmenge als Funktion der Zeit für Fractogel[®] 650 (M) DEA (27 % BG), die durchgezogenen Kurven sind die Regressionskurven des Reaktionsmodells GL. 6.8, ($k_1 = 0,00715$ ml/mgs (Mittelwert))

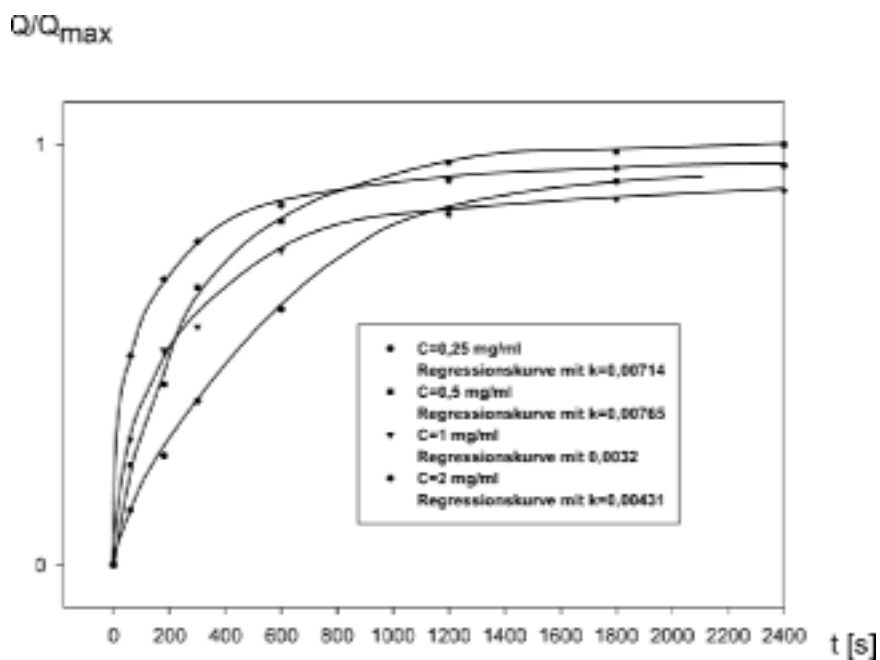


Abb. 6.5: Relative, adsorbierte Proteinmenge als Funktion der Zeit für Fractogel[®] 650 (M) DEA (50 % BG), die durchgezogenen Kurven sind die Regressionskurven des Reaktionsmodells GL. 6.8, ($k_1 = 0,0056$ ml/mg-s (Mittelwert))

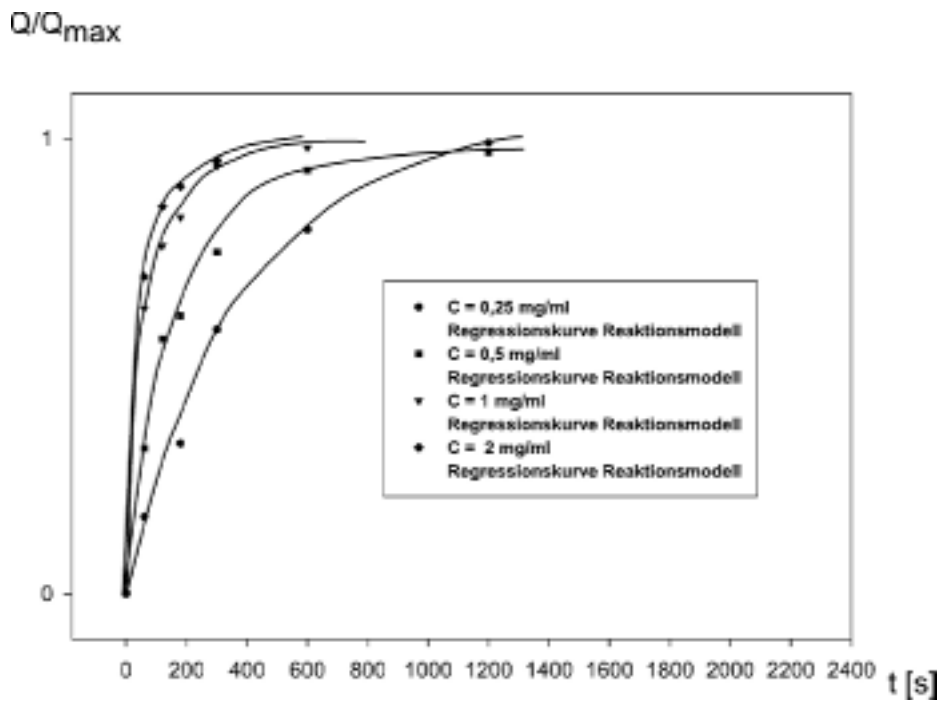


Abb. 6.6: Relative adsorbierte Proteinmenge als Funktion der Zeit für Fractogel[®] EMD 650(M) DEAE, die durchgezogenen Kurven sind die Regressionskurven des Reaktionsmodells GL. 6.8, ($k_1 = 0,013 \text{ ml/mg}\cdot\text{s}$ (Mittelwert))

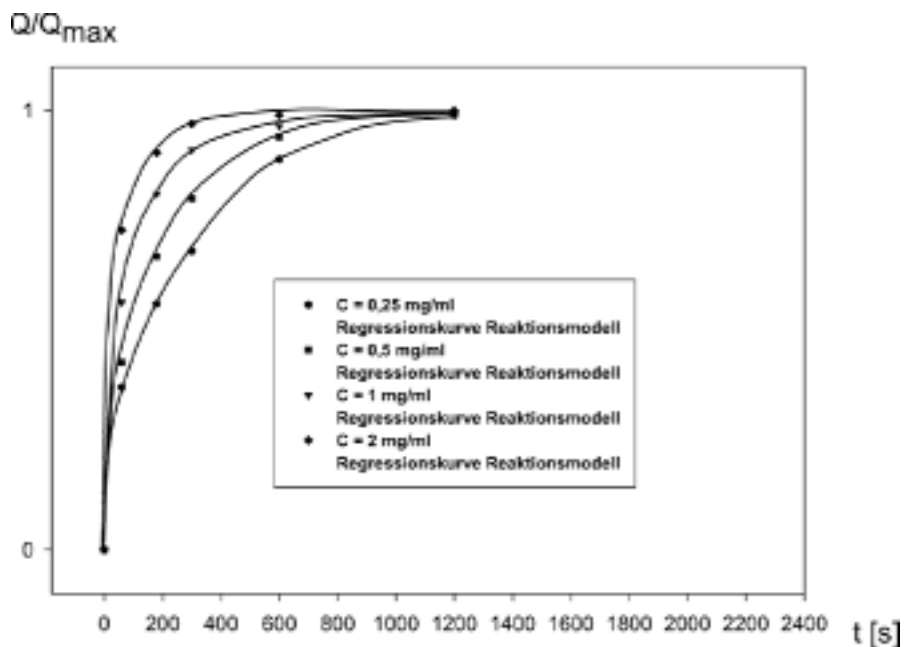


Abb. 6.7: Relative adsorbierte Proteinmenge als Funktion der Zeit für Fractogel[®] TSK 650 (M) DEAE (ohne polymere Beschichtung), die durchgezogenen Kurven sind die Regressionskurven des Reaktionsmodells GL. 6.8, ($k_1 = 0,015 \text{ ml/mg}\cdot\text{s}$ (Mittelwert))

Ergebnisse mit dem Oberflächendiffusionsmodell

Die Diffusionskoeffizienten der Gele, bestimmt bei unterschiedlichen Startkonzentrationen, wurden ebenfalls durch arithmetische Mittelwertbildung berechnet (Tabelle 6.5):

Tabelle 6.5 Ergebnisse der Ausgleichsrechnung mit dem Oberflächendiffusionsmodell

Material	Mittelwert von D_0 [m^2/s] (berechnet mit Gleichung 6.18-6.20)
Fractogel® DEA (40-90 μm), 50 % Beschichtungsgrad	$1 \cdot 10^{-13} \pm 1,8 \cdot 10^{-14}$
Fractogel® DEA (40-90 μm), 27 % Beschichtungsgrad	$2,1 \cdot 10^{-13} \pm 2,2 \cdot 10^{-14}$
Fractogel® DEA (40-90 μm) 19 % Beschichtungsgrad	$1,8 \cdot 10^{-13} \pm 3,8 \cdot 10^{-14}$
Fractogel® DEA (40-90 μm) 11 % Beschichtungsgrad	$1,8 \cdot 10^{-13} \pm 4,5 \cdot 10^{-14}$
Fractogel® EMD DEAE (40-90 μm) 10 % Beschichtungsgrad (Amid)	$4,3 \cdot 10^{-13} \pm 1 \cdot 10^{-14}$
Fractogel® TSK DEAE (40-90 μm) ohne polymere Beschichtung	$3,1 \cdot 10^{-13} \pm 8,5 \cdot 10^{-14}$

Die gemittelte Abweichung der Variationskoeffizienten beträgt 14,5 %. Die Anpassung der Modellgleichung an die experimentellen Daten ist besser als beim Reaktionsmodell. Offensichtlich beschreibt ein Diffusionsmodell den Adsorptionsprozess der Proteine adäquater als ein einfaches Reaktionsmodell 2.Ordnung.

Ein typisches Beispiel der Anpassung der experimentellen Daten mit dem Oberflächendiffusionsmodell zeigt die folgende Abbildung 6.8:

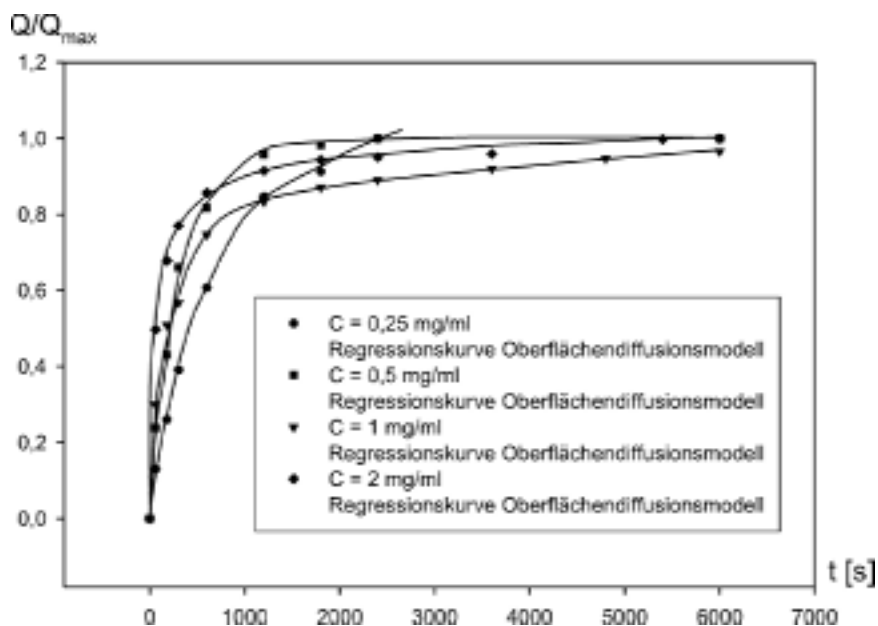


Abb. 6.8: Relative adsorbierte Proteinmenge als Funktion der Zeit für Fractogel® 650(M) DEA (50 % BG), die durchgezogene Kurven sind die Regressionskurven des Oberflächendiffusionsmodells (Gl 8.19-8.21) $D_o = 1 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ (Mittelwert)

Ergebnisse mit dem Porendiffusionsmodell:

Die numerische Auswertung der Daten mit dem Porendiffusionsmodell ist in Tabelle 6.6 aufgeführt:

Tabelle 6.6 Ergebnisse der Ausgleichsrechnung mit dem Porendiffusionsmodell

Material	Mittelwert von D_p [m^2/s] (berechnet mit Gleichung 6.21-6.24)
Fractogel® DEA (40-90 μm), 50 % Beschichtungsgrad	$9 \cdot 10^{-12} \pm 4,5 \cdot 10^{-13}$
Fractogel® DEA (40-90 μm), 27 % Beschichtungsgrad	$1,95 \cdot 10^{-11} \pm 1,1 \cdot 10^{-13}$
Fractogel® DEA (40-90 μm) 19 % Beschichtungsgrad	$1,2 \cdot 10^{-11} \pm 7 \cdot 10^{-13}$
Fractogel® DEA (40-90 μm) 11 % Beschichtungsgrad	$3,2 \cdot 10^{-12} \pm 2,5 \cdot 10^{-13}$
Fractogel® EMD DEAE (40-90 μm) 10 % Beschichtungsgrad (Amid)	$2,3 \cdot 10^{-11} \pm 2,8 \cdot 10^{-13}$
Fractogel® TSK DEAE (40-90 μm) ohne polymere Beschichtung	$6,7 \cdot 10^{-12} \pm 6,7 \cdot 10^{-13}$

Die gemittelte Abweichung der Variationskoeffizienten beträgt 8 %. Das ist die beste Modellanpassung. Es kann folglich angenommen werden, dass der transportbestimmende Mechanismus die Porendiffusion ist. Das wird in dem folgendem Kapitel noch weiter diskutiert.

Ein ausgewähltes Beispiel zeigt Abbildung 6.9:

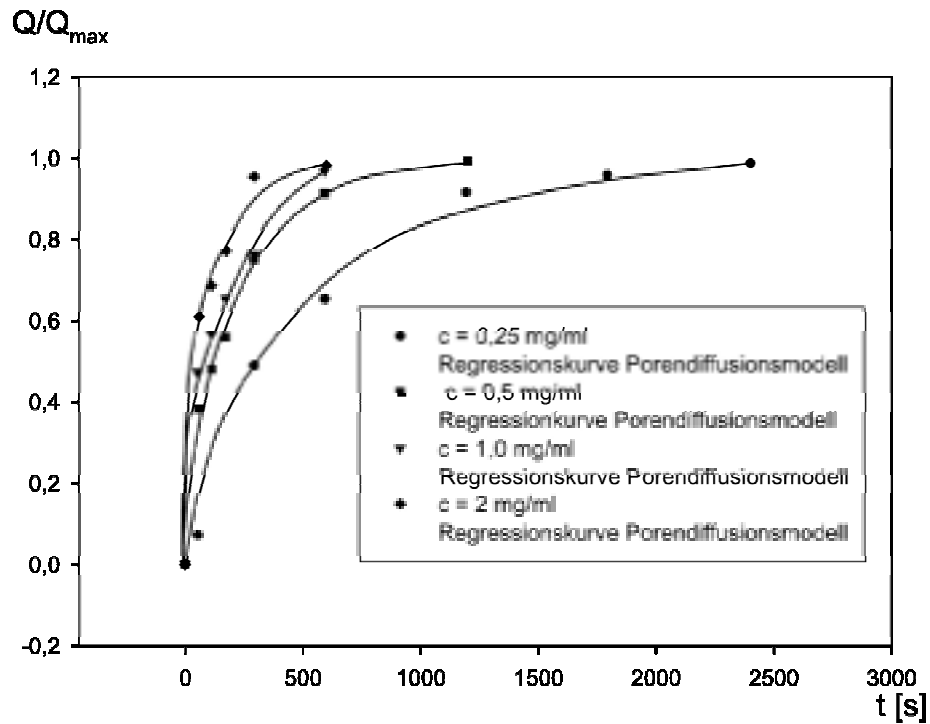


Abb. 6.9: *Relative adsorbierte Proteinmenge als Funktion der Zeit für Fractogel® 650(M) DEA (27% BG), die durchgezogenen Kurven sind die Regressionskurven des Oberflächendiffusionsmodells $D_P = 1,95 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ (Mittelwert)*

Ergebnisse mit dem Filmmodell:

Tabelle 6.7 Ergebnisse der Ausgleichsrechnung mit dem Filmmodell

Material	Mittelwert von $k_f \pm$ Abweichung vom Mittelwert (Variationskoeffizient) [cm/s]
Fractogel® DEA (40-90 μm), 50 % Beschichtungsgrad	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 1,3 \cdot 10^{-4}$
Fractogel® DEA (40-90 μm), 27 % Beschichtungsgrad	$2,3 \cdot 10^{-4} \pm 6,5 \cdot 10^{-5}$
Fractogel® DEA (40-90 μm) 19 % Beschichtungsgrad	$1,65 \cdot 10^{-4} \pm 9,8 \cdot 10^{-5}$
Fractogel® DEA (40-90 μm) 11 % Beschichtungsgrad	$4,5 \cdot 10^{-5} \pm 3,8 \cdot 10^{-5}$
Fractogel® EMD DEAE (40-90 μm) 10 % Beschichtungsgrad (Amid)	$5,2 \cdot 10^{-4} \pm 1,63 \cdot 10^{-4}$
Fractogel® TSK DEAE (40-90 μm) ohne polymere Beschichtung	$1,2 \cdot 10^{-4} \pm 3,9 \cdot 10^{-5}$

Der mittlere Variationskoeffizient beträgt hier 56 %. Das Filmmodell zeigt die schlechteste Anpassung an die experimentellen Daten. Es ist folglich allein nicht zur Beschreibung des Adsorptionsprozesses von Proteinen an Ionenaustauschergelen geeignet.

Den Ergebnissen kann man entnehmen, dass die Anpassung der experimentellen Daten an die einzelnen Modellgleichungen nicht immer zufriedenstellend gelingt. Die Ursachen sind die getroffenen starken Vereinfachungen: 1. Die Annahme eines irreversibles Gleichgewicht und 2. die Annahme, dass jeweils nur ein Transportwiderstand die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses bestimmt.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Anpassung der Modellgleichungen an die experimentellen Daten im Einzelnen betrachtet.

6.4 Diskussion

6.4.1 Das Reaktionsmodell

Eine gute Anpassung an die experimentellen Daten wurde mit dem Reaktionsmodell erzielt. Dieses Modell wird häufig zur numerischen Bearbeitung von experimentellen Adsorptions Zeit-Daten verwendet. Das Reaktionsmodell ist sehr flexibel [168]. Ein Vorteil dieses Modells ist die Anpassung der experimentellen Daten an eine Modellgleichung mit nur einer Konstante (k_1). Leider sind Ionenaustauscherreaktionen meist schnell, so dass sie nicht die Gesamtgeschwindigkeit einer Proteinadsorption bestimmen.

Die gemittelte Geschwindigkeitskonstante unserer polymeroberflächenmodifizierten Gele wurde mit den Literaturwerten, erhalten von Chase [176], für verschiedene Ionenaustauscher-Sepharosen[®] (siehe Tabelle 6.8) verglichen:

Tabelle 6.8 Vergleich von Geschwindigkeitskonstanten der Hinreaktion von BSA an Anionenaustauschergelen von verschiedenen Herstellern

Material	Geschwindigkeitskonstante [ml/mg·s]
Fractogel [®] (DEAE-Modifikationen)	0.01
DEAE Sepharose [®] CL-6 B	0.0065
DEAE Sepharose [®] FF	0.006

Berücksichtigt man die unterschiedliche Größe der Sepharose[®]- und Fractogel[®]-Partikel (60 μm und 100 μm) so kann ist anzunehmen, dass die Geschwindigkeitskonstanten der ionischen Adsorption bei Ionenaustauschergelen mit unterschiedlicher chemischer Struktur des Basismaterials und der Liganden nicht grundsätzlich verschieden sind.

Alle Adsorptions-Zeit Kurven, der mit wachsenden Mengen Polymer beschichteten Fractogel[®] DEA Teilchen zeigen eine deutlich langsamere Adsorption bei 0,25 mg/ml Ausgangskonzentration im Vergleich zu den anderen Startkonzentrationen. Die Adsorption verläuft dann sehr steil bis zur Sättigung mit Q_{max} . Dieser allgemeine Trend hält bis zu einem Beschichtungsgrad von 27 % Polymergehalt an. Bei dem Gel mit dem BG von 50 % zeigen

alle Adsorptions-Zeit Kurven, unabhängig von der Anfangskonzentration, einen ähnlichen Verlauf. Die Adsorption erfolgt bis zu einem Grenzwert von 70 % Q/Q_{\max} vergleichbar schnell wie bei den anderen Gelen jedoch dauert die Adsorption der letzten 30 % von Q_{\max} wesentlich länger.

Von einigen Autoren insbesondere von Chase [47] wurde das Reaktionsmodell zur Beschreibung des Gesamtadsorptionsprozesses von Proteinen an Ionenaustauschergelen verwendet. Obwohl von der Annahme ausgegangen werden kann, dass die Ionenaustauschreaktion nicht der geschwindigkeitsbestimmende Transportschritt ist, kann das Modell jedoch zur Charakterisierung der Gesamtgeschwindigkeit des Adsorptionsmechanismus verwendet werden.

Im folgenden Kapitel wird deshalb die Geschwindigkeit der Adsorption in Abhängigkeit vom polymeren Beschichtungsgrad untersucht.

6.4.2 Anfangsgeschwindigkeiten der Proteinadsorption

Es ist von Interesse zu klären, ob sich die Geschwindigkeit der Adsorption in Abhängigkeit vom Beschichtungsgrad mit Pfropfpolymer ändert. Diese Fragestellung ist insofern von Bedeutung, als bisher nicht bekannt ist, welche Folge eine polymere Beschichtung für die Geschwindigkeit der Proteinadsorption hat.

Zur Auswertung wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Adsorption $\frac{d\bar{Q}}{dt}_{t=0}$ mit Gleichung 6.5 und den Werten aus Tabelle 6.4 für $t = 0$ und $\bar{Q} = 0$ für die verschiedenen Gele berechnet. Man erhält folgenden Zusammenhang:

$$\frac{d\bar{Q}}{dt}_{t=0} = k_1 \cdot C_0 \cdot Q_{\max} \quad 6.26$$

Die errechneten Werte für $C_0 = 2 \text{ mg/ml}$ sind in Abbildung 6.10 dargestellt:

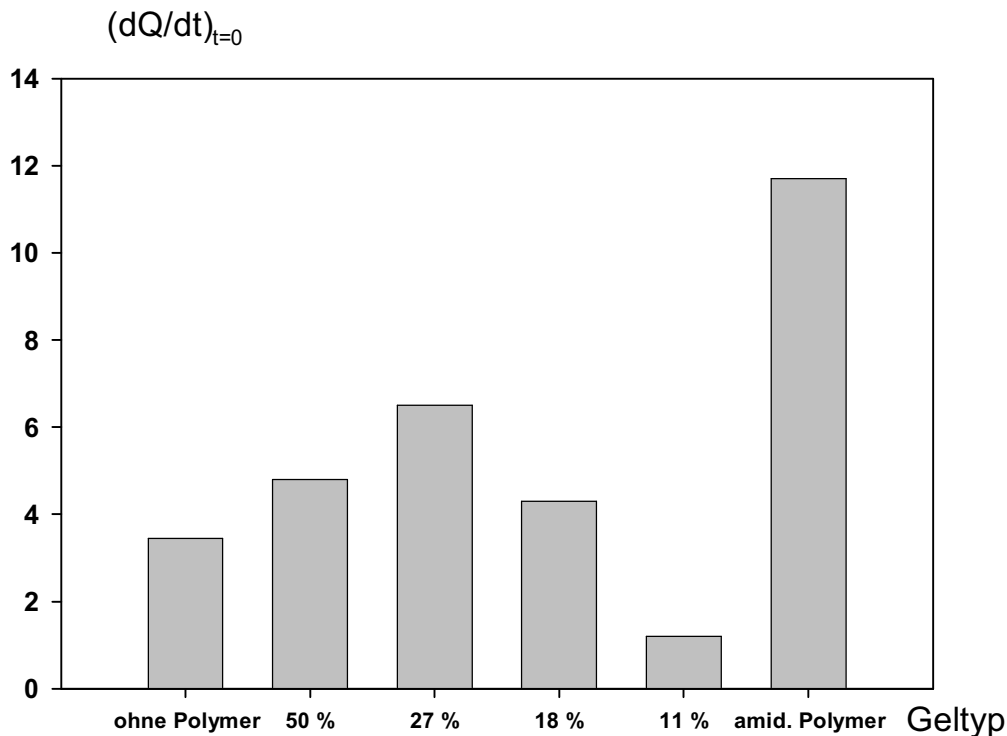


Abb. 6.10: Anfangsgeschwindigkeiten der Proteinadsorption für verschiedene Gele

Die schnellsten Anfangsgeschwindigkeiten beobachtet man für folgende Gele: 1. Fractogel[®] EMD DEA mit 27 % BG mit Glycidylmethacrylat und 2. das kommerziell erhältliche Fractogel[®] EMD DEAE (M) mit 10 % BG (Amid)). Sie sind 2-3 mal höher als die Geschwindigkeit der Adsorption an Fractogel[®] TSK DEAE (ohne Polymer). Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die ionische Hydrogelstruktur, die bei den beiden beschriebenen Gelen sehr stark ausgeprägt ist, auch die Ursache für die schnelle Adsorption von Proteinen darstellt. In der Literatur gibt es widersprüchliche Meinungen bei der Diskussion von hohen Geschwindigkeiten bei Bindungsprozessen in Ionenaustauschern [44]. Zum Teil wird dies auf hohe Ligandendichten oder auch auf Oberflächen diffusionsprozesse zurückgeführt. Bei den Untersuchungen wird grundsätzlich nicht die chemische Struktur des Adsorbens berücksichtigt und Ionenaustauscherprozesse bei verschiedenen Geltypen verglichen. Das erschwert die Interpretation der erhaltenen Daten oder macht diese unmöglich.

Nach den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen ist die Erhöhung der Geschwindigkeit der Proteinadsorption ausschließlich auf die Ausbildung der Hydrogelstruktur in den Poren zurückzuführen. Eine mögliche Modellvorstellung, der Transportbeschleunigung wird in Kapitel 6.4.7 entwickelt.

6.4.3 Oberflächendiffusion und Porendiffusion

Der gemittelte Oberflächendiffusionskoeffizient für alle untersuchten Gele beträgt $1,7 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ und der mittlere Porendiffusionskoeffizient hat den Wert: $1,1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ (berechnet mit den Werten der Tabellen 6.5 und 6.6). Der Diffusionskoeffizient, in Lösung, wird in der Literatur für Rinderserumalbumin mit $5,3 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ angegeben [159]. Folglich sind die Porendiffusionskoeffizienten im polymermodifizierten Gelen etwa 5 mal kleiner als der Diffusionskoeffizient in Lösung, was auch mit den experimentellen Resultaten übereinstimmt, welche für andere nicht- polymer beschichtete Gele ermittelt wurden [177]. Interessant ist, dass die Werte der Porendiffusionskoeffizienten der polymermodifizierten Gelen bis zu 50 % des Diffusionskoeffizienten von BSA in Lösung betragen. Die aufgebrauchte Polymerschicht hat somit eine scheinbare Beschleunigung der Porendiffusion zur Folge. Die Größe der Porendiffusionskoeffizienten ist von der Beladung mit Polymer und damit von der Dicke der Polymerschicht abhängig. Darauf wird in Kapitel 6.4.7 noch näher eingegangen.

Aus den berechneten Koeffizienten des Oberflächendiffusionsmodells kann man entnehmen, dass der Wert auch von der Art des Pfropfpolymers abhängig ist. Der Diffusionskoeffizient des amidischen Pfropfpolymers (Fractogel® EMD DEAE) ist am größten. Die Oberflächendiffusionskoeffizienten der verschiedenen Methacrylatpfropfpolymere sind durchweg alle kleiner. Die Ursache für dieses Ergebnis kann eine höhere Hydrophobizität der Methacrylatgele im Vergleich zu den Amidpolymeren sein, welche das laterale Verschieben der Proteinmoleküle erschwert. Zusammenfassend könnte angenommen werden, dass der Porendiffusionskoeffizient die Durchlässigkeit der Polymerschicht und der Oberflächendiffusionskoeffizient die Wechselwirkung des Analyten mit dem Pfropfpolymer charakterisiert. Tabelle 6.9 zeigt Literaturdaten von experimentell ermittelten Oberflächendiffusions- und Porendiffusionskoeffizienten für BSA von verschiedenen Anionenaustauschergelen für die Biochromatographie:

Tabelle 6.9 Literaturwerte für Diffusionskoeffizienten von BSA in verschiedenen Ionenaustauschermaterialien

Trägermaterial	Oberflächendiffusionskoeffizient [m ² /s]	Porendiffusionskoeffizient [m ² /s]
HyperD (Carta [35])	$7,5 \cdot 10^{-13}$	
POROS (Carta [35])		$1,1 \cdot 10^{-11}$
Chitosan (Yoshida [33])	$4,7 \cdot 10^{-14}$	$1 \cdot 10^{-11}$
Ressource - Q (Miayabe, Guichon [34])		$1,25 \cdot 10^{-11}$
TSK-Gel-DEAE-5PW (Miayabe, Guichon [34])		$1,23 \cdot 10^{-12}$
Q-Sepharose FF (Skidmore [176])	$8,5 \cdot 10^{-12}$	
Fractogel [®] EMD DEAE (M) (diese Arbeit)	$4,3 \cdot 10^{-13}$	$2,3 \cdot 10^{-11}$
Fractogel [®] Glycidylmethacrylat DEA (diese Arbeit), Wert gemittelt	$1,7 \cdot 10^{-13}$	$1,1 \cdot 10^{-11}$

Die Koeffizienten wurden mit verschiedenen Modellen errechnet. Bezüglich der Größenordnung fällt auf, dass der Oberflächendiffusionskoeffizient immer kleiner ist als der Porendiffusionskoeffizient. Die experimentellen Werte der Oberflächendiffusionskoeffizienten variieren stark, wohingegen die ermittelten Porendiffusionskoeffizienten jedoch nicht sehr verschieden sind und alle im Bereich von 10^{-11} m²/s liegen. Alle Porendiffusionskoeffizienten, auch die Koeffizienten der polymer-modifizierten Trägermaterialien liegen beträchtlich unter dem Wert der ungehinderten Diffusion von $5,6 \cdot 10^{-11}$ von BSA. Die Oberflächendiffusionskoeffizienten im Hyper D Gel und in der Sepharose sind höher als in den anderen Materialien was ebenfalls die Vermutung bestätigt, dass die Hydrophobizität eines Polymers den Transport von Proteinen mittels Oberflächendiffusion beeinflusst, da die beiden Gele eine sehr hydrophile Struktur haben.

6.4.4 Das Filmdiffusionsmodell

Der Mittelwert für den Transportkoeffizienten des Filmwiderstandes berechnet mit den Werten aus Tabelle 6.7 beträgt $2,01 \cdot 10^{-4}$ cm/s: Dieser Wert wurde mit dem errechneten Wert von einer Modellgleichung nach Armenante und Kirwan verglichen [178]:

$$k_f = \frac{D}{2 \cdot R_p} \left(2 + 0,52 \cdot \left(\frac{\frac{1}{\bar{\varepsilon}^3} \cdot (2 \cdot R_p)^4}{\nu} \right)^{0,52} \left(\frac{\nu}{D} \right)^{\frac{1}{3}} \right)$$

6.27

R_p Partikelradius [m]

$\bar{\varepsilon}$ mittlerer Energieeintrag pro Einheitsmasse [m^2/s^3]

ν kinematische Viskosität [m^2/s]

D molekularer Diffusionskoeffizient [m^2/s]

Die einzige Unbekannte in dieser Gleichung ist der Energieeintrag $\bar{\varepsilon}$, da in der genannten Publikation der Energieeintrag nur bezüglich Rührens berechnet wurde und bei unseren Experimenten die Gele nicht gerührt sondern geschüttelt wurden. Der Wert von κ wird im Bereich von 50-1000 m^2/s^3 Energieeintrag nur wenig beeinflusst, so dass zur Berechnung ein niedriger Zahlenwert von 50 m^2/s^3 benutzt wurde.

Der Wert des Koeffizienten beträgt für das obige Modell unter den genannten Bedingungen: $2,5 \cdot 10^{-3}$ cm/s. Der Koeffizient des Filmwiderstandes berechnet mit Gleichung 6.27 und ermittelt aus den experimentellen Konzentrations-Zeit Werten nach Gleichung 6.25 unterscheiden sich um eine Größenordnung. Es ist folglich anzunehmen, dass der experimentell ermittelte Transportkoeffizient fehlerbehaftet ist.

Auffällig bei der Berechnung der Filmdiffusionskoeffizienten ist außerdem die schlechte Anpassung der Modellgleichung an die experimentellen Daten. Im Vergleich zu den anderen Modellen kommt es hier zu ziemlich deutlichen Abweichungen. Der Grund ist darin zu sehen, dass die Filmdiffusion nicht der bestimmende Transportmechanismus ist.

6.4.5 Konzentrationsabhängigkeit der Transportkoeffizienten

Von Carta [36] und Guiochon [34] sind Konzentrationsabhängigkeiten der Koeffizienten der Oberflächendiffusion und der Porendiffusion beschrieben worden.

Die in dieser Arbeit ermittelten Transportkoeffizienten sind auch von den Anfangskonzentrationen der Proteinlösungen abhängig. Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der ermittelten Diffusionskoeffizienten für die verschiedenen Ausgangskonzentrationen C_0 wurden das folgende Verhältnis gebildet:

$$K_{\max} = \frac{\text{maximaler Wert}(C_{i0})}{\text{minimaler Wert}(C_{i0})} \quad 6.28$$

Durch dieses Verhältnis wird der steilste Anstieg der Konzentrationsabhängigkeit der Transportkoeffizienten erfasst.

Die ermittelten Verhältnisse K_{\max} sind in Abbildung 6.11 dargestellt:

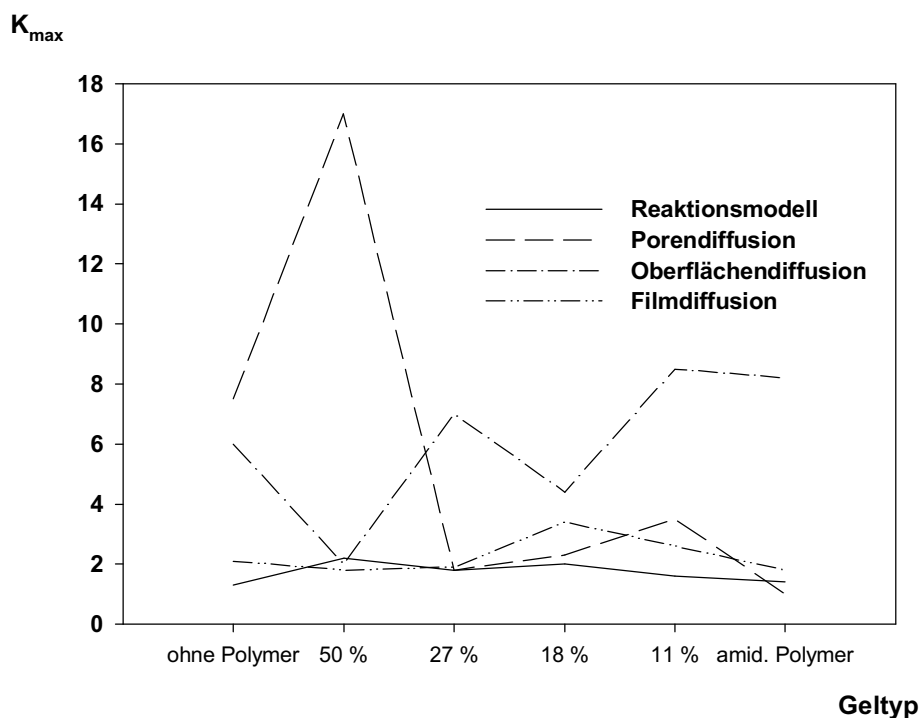


Abb.6.11: Konzentrationsabhängigkeit der Transportkoeffizienten

Der Transportkoeffizient der Filmdiffusion und die "Geschwindigkeitskonstante" des Reaktionsmodells haben jeweils eine gemittelte Konzentrationsabhängigkeit vom Faktor 1,7 und 2,3. Damit sind diese Transportwiderstände nur wenig von der Konzentration abhängig.

Poren- und Oberflächendiffusion sind stark von der Konzentration abhängig und haben mittlere Anstiege von 5,35 und 6.

Das hat seine Ursachen in den beträchtlichen Abweichungen der Werte Einzelkoeffizienten. Sehr auffällig ist der hohe Wert von 17 des Porendiffusionskoeffizienten für ein mit 50 % Polymer beschichtetes Fractoge[®]. Ursache dieser hohen Abweichung ist möglicherweise der Effekt, dass die Porendiffusion in diesem dichten Polymer stärker behindert wird als bei kleineren Beschichtungsgraden, was eine sehr starke Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten bedingt. Dieses Verhalten kann auch aus der Form der experimentell ermittelten Konzentrations-Zeit Kurven abgeleitet werden. Die schnelle Sättigung bei 70 % und das langsame Adsorbieren des Restes ist wahrscheinlich das Ergebnis einer verzögerten Zugänglichkeit der Proteine zu den Liganden innerhalb der aufgepfropften Polymerschichten. Betrachtet man diesen Messwert als einen "Ausreißer", so ist die Konzentrationsabhängigkeit der Porendiffusion sehr viel geringer. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass es bei Oberflächenbeschichtungen einen optimalen Beschichtungsgrad gibt über den hinaus eine vollständige Ausnutzung der Kapazität nur noch zeitverzögert erfolgen kann.

Die Abhängigkeit des Porendiffusionskoeffizienten vom Beschichtungsgrad wird im nächsten Kapitel gezeigt.

6.4.6 Porendiffusionskoeffizienten in Abhängigkeit von den Beschichtungsgraden

Die folgende Darstellung 6.12 zeigt die Abhängigkeit der Porendiffusionskoeffizienten vom Beschichtungsgrad von Fractoge[®]-Anionenaustauschern.

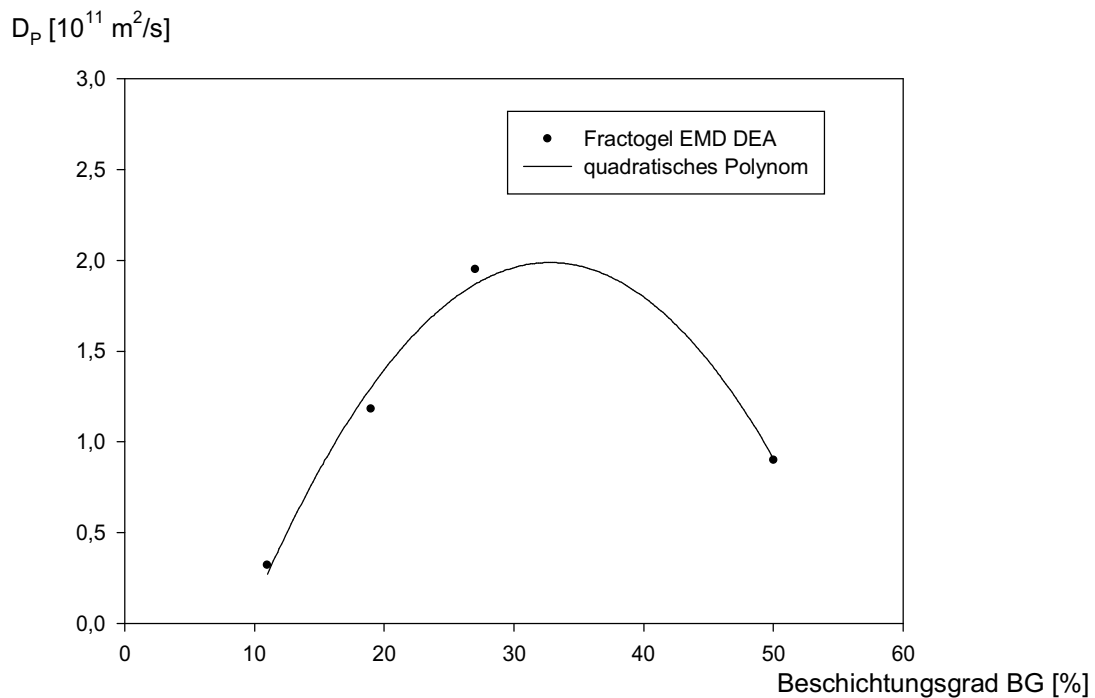


Abb.6.12: Die berechneten Porendiffusionskoeffizienten als Funktion vom Beschichtungsgrad bei dem mit Glycidylmethacrylat und Diethylamin modifizierten Fractogel® HW 650 (M)

Die Porendiffusionskoeffizienten durchlaufen ein Maximum in Abhängigkeit vom Beschichtungsgrad. Die experimentellen Daten der Diffusionskoeffizienten konnten mit einem quadratischen Polynom an die Beschichtungsgrade angepasst werden. Daraus können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Die Porendiffusion in, nicht mit ionischem Hydrogel, gefüllten Poren (11 % Polymer) ist scheinbar langsamer als die Diffusion in einem ionischen Hydrogel.
2. Die Beschleunigung der Porendiffusion ist unabhängig von der Art der Beschichtung, da dieser Effekt sowohl bei den mit Glycidylmethacrylat modifizierten Gelen als auch bei dem mit ionischem Acrylamid beschichteten Fractogel® EMD DEAE beobachtet wurde (siehe Tabelle 6.6).
3. Der "Beschleunigungseffekt" ist jedoch auf einen bestimmten Beschichtungsgrad eingeschränkt. Bei Überschreitung eines Grenzwertes (hier 27 %) kommt es wieder zu einer Verringerung der Geschwindigkeit der molekularen Porendiffusion aufgrund der stärkeren Behinderung der Proteinbewegung durch die zunehmende Polymerdichte.

Diese Überlegungen zur Geschwindigkeit der Porendiffusion sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, welche aus dem Reaktionsmodell abgeleitet wurden. Die Geschwindigkeit der Adsorption wird in ionischen Hydrogelen oder auf Hydrogeloberflächen beschleunigt. Folgende allgemeine Schlussfolgerungen können aus der Analyse der experimentellen Daten gezogen werden:

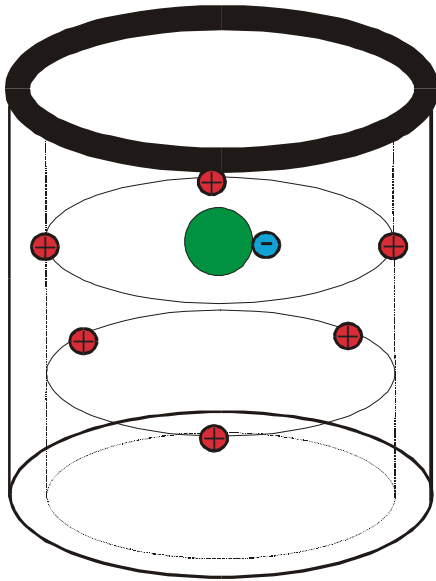
1. Die beste Anpassung der Modellgleichungen an die experimentellen Daten wurde mit dem Porendiffusionsmodell erzielt. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Diffusion in den Poren der geschwindigkeitsbestimmende Transportmechanismus in polymermodifizierten Gelen ist. Die Reihenfolge der Güte der Anpassung an die experimentellen Daten der einzelnen Modelle ist folgende: 1. Porendiffusionsmodell, 2. Oberflächendiffusionsmodell, 3. Reaktionsmodell und 4. reine Filmdiffusion.
2. Es zeigt sich bei der Analyse der Transportkoeffizienten, dass sowohl bei dem Reaktionsmodell als auch beim Porendiffusionsmodell, eine Polymerbeschichtung eine scheinbare Beschleunigung der Reaktions- und der Diffusionsprozesses zur Folge hat.

6.4.7 Die Beschleunigung der Diffusion als sterisches Phänomen

Die Analyse der Konzentrations-Zeit Daten sowohl mit dem Reaktionsmodell als auch mit dem Porendiffusionsmodell zeigten, dass es eine scheinbare Beschleunigung des Adsorptionsprozesses in polymermodifizierten Trägermaterialien gibt. Im folgenden wird im Rahmen eines einfachen Modells gezeigt, wie dieses Phänomen erklärt werden kann. Die Beschleunigung des Adsorptionsprozesses tritt ausschließlich in den Gelen auf bei denen die Poren mit einem ionischem Hydrogel gefüllt sind. Es ist deshalb naheliegend anzunehmen, dass diese Struktur die Ursache für die Erhöhung der Geschwindigkeit des Adsorptionsprozesses darstellt.

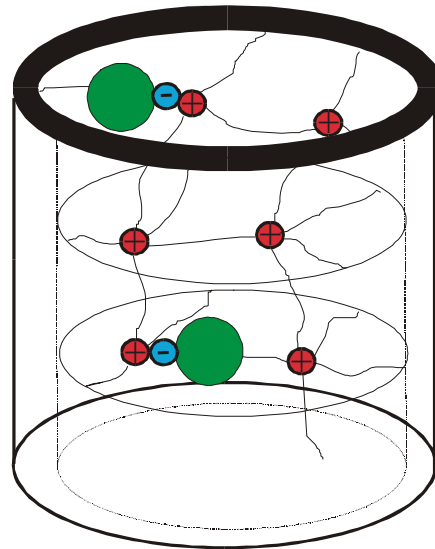
Die Unterschiede bei der Adsorption von Proteinen in einer Pore, welche die ionischen Gruppen ausschließlich an der Porenoberfläche trägt und einer Pore, welche mit ionischem Hydrogel gefüllt ist, zeigt Abb. 6.13

Zylinderpore in einem Ionenaustauscherpartikel ohne polymere Beschichtung



Der Fluß durch Diffusion ist der bestimmende Transportmechanismus

Zylinderpore in einem Ionenaustauscherpartikel gefüllt mit einem ionischen Hydrogel



Der Diffusionsfluß wird durch einen zusätzlichen Fluß bedingt durch einen Potentialgradienten überlagert

Abb. 6.13: Schematische Darstellung der Transportprozesse in einer Partikelpore ohne polymere Beschichtung und in einer Pore gefüllt mit ionischem Hydrogel

Eine Partikelpore ohne polymere Beschichtung mit einem mittleren Radius \varnothing von 50 nm trägt auf der inneren Oberfläche ionische Ladungen. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Ladungen auf der Proteinfläche und der Porenwand können nur innerhalb der Debye-Länge (κ) stattfinden. Wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben beträgt die Debye-Länge bei 0,02 M Salz (NaCl) 3,25 nm. Ein Protein (Albumin) hat eine mittlere Größe von 3 nm (BSA). Aufgrund dieser Größenverhältnisse ist die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen Protein und gebundener Ladung relativ klein.

Das trifft jedoch nicht für eine Pore zu welche mit einem sehr offenen ionischem Hydrogel gefüllt ist. Hier ist die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung Protein-Netzwerk-Ladung hoch, da das Protein schon am Eingang der Pore mit der Ladung in Wechselwirkung treten kann. Das Polymernetz behindert die Zugänglichkeit zu den Poren nicht, wie in Kapitel 5.3.1 für BSA gezeigt wurde. Der Porenraum ist für BSA voll zugänglich. Die Flussdichte von Ionen in einem porösen Netzwerk und unter dem Einfluss eines elektrischen Potentials (des ionischen Ladungen) kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$J_i = (J_i)_{\text{Diff}} + (J_i)_{\text{el}}$$

6.29

Die gesamte Flussdichte J_i ist die Summe eines Diffusionsanteils und eines auf den elektrischen Potentialgradienten zurückzuführenden Anteils.

Gleichung 6.29 kann in die Nernst-Planck Gleichung umgeformt werden [197]:

$$J_i = -D_i \cdot \left(\frac{dC_i}{dx} + z_i \cdot C_i \cdot \frac{F}{R \cdot T} \frac{d\phi}{dx} \right) \quad 6.30$$

Der Fluss von Ionen wird unter der Wirkung eines Potentialgradienten beschleunigt. Der Potentialgradient für ein Protein in einer mit ionischem Hydrogel gefüllten Pore ist steiler im Vergleich zu dem Gradienten in einer Pore mit wandständigen Liganden. Das äußert sich in einem beschleunigten Adsorptionsprozess wie das in Kapitel 6.4.6 gezeigt wurde.

Andere Trägermaterialien wie Hyper D Ionenaustauscher haben auch eine vergleichbar schnelle Adsorptionskinetik. Das wurde eingehend von Weaver und Carta untersucht [35]. Das Hyper D Gel enthält ebenfalls ionisches Polymer in den Poren welches jedoch nicht durch Pfropfpolymerisation aufgebracht wurde.

Die Ursache für die beschleunigte Adsorption von Proteinen im Batchverfahren für polymermodifizierte Trägermaterialien ist folglich die räumliche Anordnung der Liganden. Die aus den Batchexperimenten abgeleiteten Ergebnisse wurden bei der Analyse von Durchbruchkurven verwendet. Es stellt sich die Frage, ob die schnelle Adsorption im Batch auch auf die Adsorption in Säulen übertragen werden kann. In den nächsten Kapiteln wird deshalb die Aufnahme und die Modellierung von Durchbruchkurven diskutiert.

6.5 Analyse der Durchbruchkurven

6.5.1 Ergebnisse

Die Durchbruchkurven der mit ionischem Glycidylmethacrylatpolymer beschichteten Gele bei gleichen Elutionsbedingungen zeigt Abb.6.14:

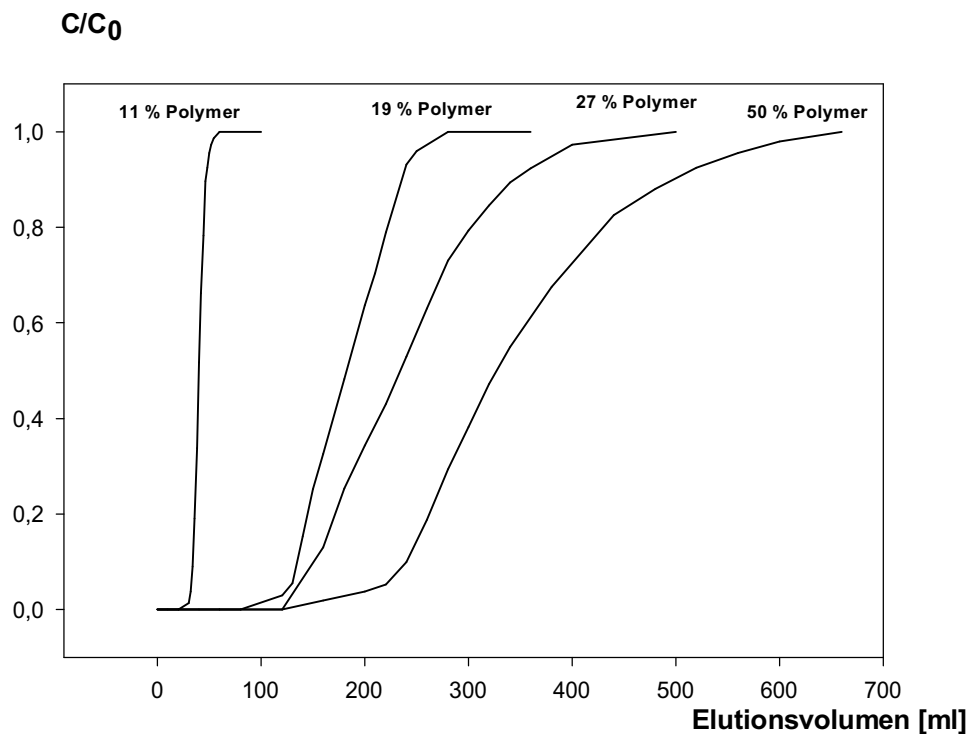


Abb. 6.14: Durchbruchkurven von Fractogel[®] HW 650 (M) DEA Anionenaustauschern mit unterschiedlichen Beschichtungsgraden an Pfropfpolymer (Bedingungen: Superformancesäule 5 ml Bettvolumen, 2 mg/ml BSA in 20 mM Tris Puffer pH = 8, Fluss: 2 ml/min)

Die Formen der Durchbruchkurven sind deutlich unterschiedlich, die Anstiege werden mit wachsender Polymerbeschichtung flacher. Der Vergleich mit berechneten Modellkurven im folgenden Kapitel zeigt, dass als wahrscheinliche, geschwindigkeitsbestimmende Transportmechanismen in den Polymergelen die Filmdiffusion, Poren- und Oberflächendiffusion oder Kombinationen in Betracht zu ziehen sind.

Zur weiteren Charakterisierung der Gele wurden die aus den Durchbruchkurven bei $C/C_0 = 0,5$ bestimmten Beladungskapazitäten Q_{\max} (Durchbruch) mit den Gleichgewichtskapazitäten

aus den Batchexperimenten Q_{\max} aus Tabelle 6.3 verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.10 aufgeführt:

Tabelle 6.10 Vergleich der Gleichgewichtsbindungskapazitäten mit den Durchbruchkapazitäten von verschiedenen modifizierten Gelen (ohne Nachwaschen mit Beladungspuffer)

Gel	Q_{\max} (Durchbruchkapazität) [mg/ml]	Q_{\max} (Gleichgewichtskapazität) [mg/ml]
Fractogel® DEA (40-90 μm), 50 % Beschichtungsgrad	132	92
Fractogel® DEA (40-90 μm), 27 % Beschichtungsgrad	104	97
Fractogel® DEA (40-90 μm) 19 % Beschichtungsgrad	76	61
Fractogel® DEA (40-90 μm) 11 % Beschichtungsgrad	16	9

Die Durchbruchbindungskapazitäten sind grundsätzlich größer als die Gleichgewichtsbindungskapazitäten. Auffällig war insbesondere die große Abweichung von mehr als 53 % für das Gel mit dem Beschichtungsgrad von 50%. Bei der Bestimmung der Durchbruchkapazität ist nicht die Proteinmenge berücksichtigt, welche im Porenraum ungebunden vorliegt. Bei einem Gesamtflüssigvolumen von 80 % im gepackten Gel beträgt die nichtgebundene Proteinmasse in der flüssigen Phase 8 mg. Bezogen auf 5 ml Gelvolumen erhält man eine Abweichung der Gesamtbindungskapazität von 1,6 mg/ml welche gegenüber 100 mg/ml zu vernachlässigen sind. Das freie Protein ist somit nicht die Ursache für die hohe Differenz der Bindungskapazitäten.

Zur weiteren Untersuchung wurde das Gel nach dem Durchbruch mit 10 Bettvolumina 20 mM Tris Puffer pH 8 gewaschen. Das gebundene Protein wurde anschließend mit 1 M Kochsalz in 20 mM Tris Puffer pH 8 desorbiert, aufgefangen und photometrisch bestimmt. Hier ergab sich jetzt ein verändertes Bild (siehe Tabelle 6.11):

Tabelle 6.11 Vergleich der Gleichgewichtsbindungskapazitäten mit den Durchbruchkapazitäten von verschiedenen modifizierten Gelen (nach Waschen mit 10 Bettvolumina Beladungspuffer und photometrischer Bestimmung des eluierten Proteins)

Gel	Q _{max} (Durchbruchkapazität) [mg/ml]	Q _{max} (Gleichgewichtskapazität) [mg/ml]
Fractogel® DEA (40-90 µm), 50 % Beschichtungsgrad	93	92
Fractogel® DEA (40-90 µm), 27 % Beschichtungsgrad	95	97
Fractogel® DEA (40-90 µm) 19 % Beschichtungsgrad	70	61
Fractogel® DEA (40-90 µm) 11 % Beschichtungsgrad	11	9

Die Durchbruchkapazitäten unterscheiden sich jetzt nur noch wenig von den Gleichgewichtskapazitäten. Die hohe Bindungskapazität des Gels mit dem höchsten Beschichtungsgrad (50 %) war somit bedingt durch Protein welches durch nichtionische Wechselwirkungen gebunden war. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen aus der Batchadsorption. Die Geschwindigkeit der Proteinadsorption war für das Gel mit 50 % Beschichtungsgrad am kleinsten ($k = 0,0056 \text{ mg/ml s}$). Die Ursache dieses Unterschieds ist somit nicht nur auf eingeschränkte Zugänglichkeit zu den Liganden zurückzuführen sondern auf zusätzliche, nichtionische Wechselwirkungen mit (vermutlich) längeren Adsorptionszeiten. Die Ergebnisse sind noch einmal in Abbildung 6.15 zusammengefasst:

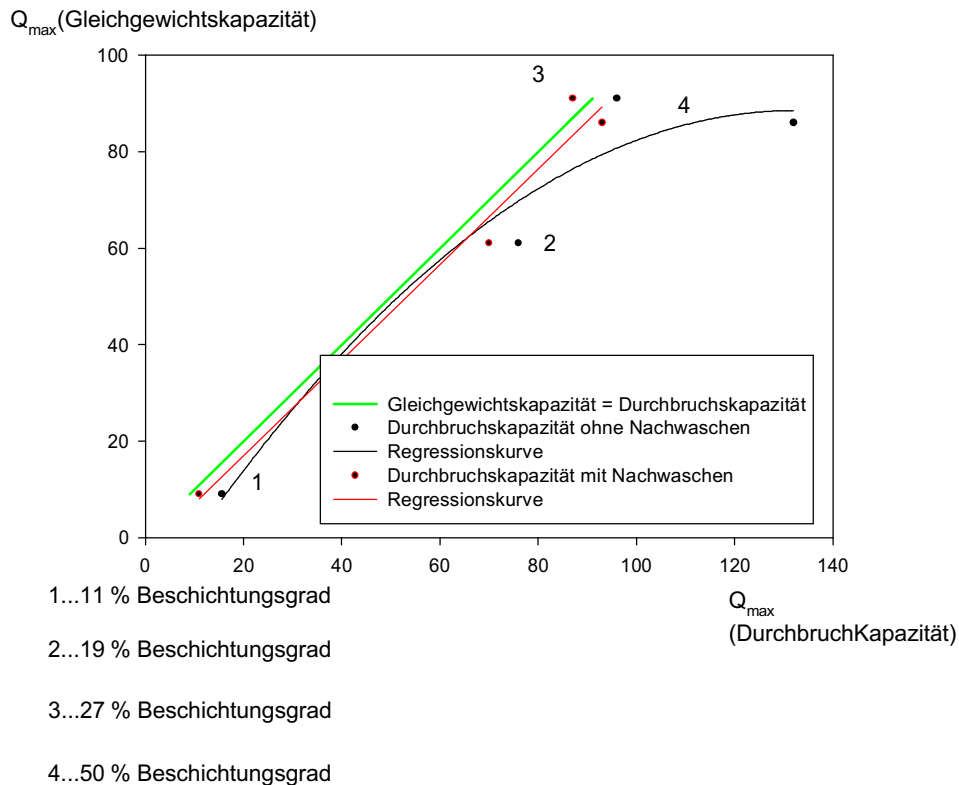


Abb 6.15: Vergleich der Durchbruchkapazitäten und Gleichgewichtsbindungsapazitäten von verschiedenen modifizierten Gelen (ohne Nachwaschen und mit photometrischer Bestimmung des gebundenen Proteins)

Als Ergebnis dieser Untersuchung kann abgeleitet werden, dass die Form der Durchbruchkurve von der aufgetragenen Polymermenge bestimmt wird. Wie schon in Kapitel 5 gezeigt, gibt es einen optimalen Beschichtungsgrad über den hinaus eine Steigerung der Bindungskapazität nicht möglich ist. Beim Überschreiten dieser Grenze sind neben der ionischen Wechselwirkung andere Wechselwirkungen in Betracht zu ziehen, welche die Steilheit der Durchbruchkurve und somit auch die dynamische Kapazität verringern.

In der Darstellung 6.14 der Durchbruchkurven, sind die unterschiedlichen Bindungskapazitäten (Q_{max}) der Gele nicht berücksichtigt. Deshalb empfiehlt sich für den Vergleich von Durchbruchkurven die Verwendung des dimensionslosen Durchsatz T_r als x-Koordinate (Gleichung 2.6).

Die Durchbruchkurven der Abbildung 6.14, in dimensionslosen Koordinaten, sehen dann folgendermaßen aus (Abbildung 6.16):

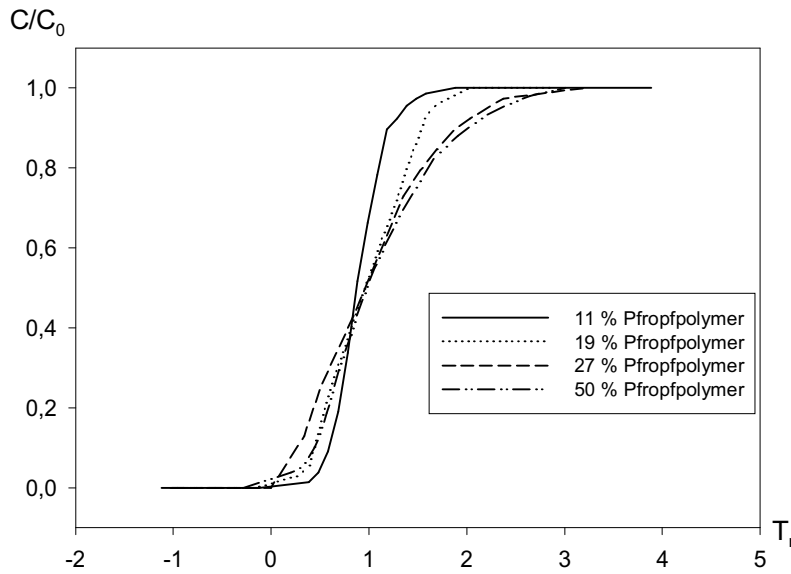


Abb. 6.16: Form der Durchbruchkurven in Abhängigkeit vom Beschichtungsgrad für Fractogel® HW 650 (M) -DEA Gele in dimensionslosen Koordinaten

Das Gel mit dem geringstem Beschichtungsgrad hat die steilste Durchbruchkurve. Mit zunehmenden Beschichtungsgrad wird die Durchbruchkurve flacher. Vergleicht man die Durchbruchkurven des nicht-polymer modifizierten Ionenaustauschergels Fractogel® TSK DEAE 650 (M) mit dem "Tentakelgel" Fractogel® EMD DEAE (Amid) erhält man ein ähnliches Bild. In dimensionslosen Koordinaten haben die Durchbruchkurven der beiden Gele folgende Form (Abb 6.17):

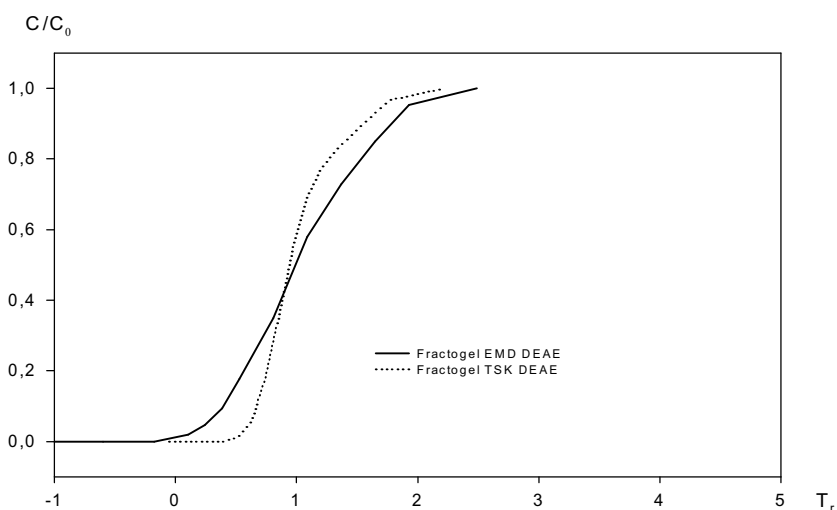


Abb. 6.17 Durchbruchkurven für Fractogel® TSK DEAE und Fractogel® EMD DEAE

Die Durchbruchkurve der nicht-polymer modifizierten Trägermaterials ist auch in dieser Darstellung steiler. Das heißt: Die dynamische Kapazität von polymerbeschichteten Trägermaterialien ist schlechter schlechter als diejenige der nichtpolymer modifizierten Trägermaterialien.

Dieses Ergebnis steht überraschenderweise im Gegensatz zu den Resultaten, die im Kapitel 6.4.6 bei der Batchadsorption abgeleitet wurden. Dort waren die Adsorptionsgeschwindigkeiten der polymermodifizierten Trägermaterialien höher. Offensichtlich kommt es durch die Beschichtung der äußeren Geloberfläche zu einer Verschlechterung des Massentransfers wenn die Gelpartikel in eine Säule gepackt werden. Zur weiteren Untersuchung dieser Eigenschaften müssen Modellgleichungen für den Massentransfer in einer Säule hergeleitet werden.

Die Durchbruchkurven von Partikelsäulen können durch folgende allgemeine Bilanzgleichung beschrieben werden [179]:

$$\varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} + \varepsilon D_{ax} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + (1 - \varepsilon) \frac{\partial \bar{Q}}{\partial t} + u_s \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad 6.31$$

mit den Anfangs- und Randbedingungen:

$$C(z, t = 0) = 0$$

$$C(z = 0, t) = C_0 \text{ für } t > 0 \quad 6.32$$

Unter Vernachlässigung der axialen Dispersion erhält man folgenden Ausdruck

$$\varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} + (1 - \varepsilon) \frac{\partial \bar{Q}}{\partial t} + u_s \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad 6.33$$

u_s lineare Flußrate [m/s]

ε Bettporosität [-]

Die Gesamtporosität der chromatographischen Säule ist die Summe aus der externen Porosität (zwischen den Partikeln) und der internen Porosität (Porenvolumen).

Die Bilanzgleichungen können durch die Benutzung von dimensionslosen Koordinaten vereinfacht werden. Diese Koordinaten werden als dimensionsloser Durchsatz \bar{T} und als Übertragungseinheit N bezeichnet.

6.5.2 Das Konzept der Übertragungseinheiten

Die Formen von Durchbruchkurven können durch eine Transformation der Daten auf den dimensionslosen Durchsatz T_r (Gleichung 2.6) und die dimensionslose Übertragungseinheit N besser ausgewertet werden. N ist definiert als [170]:

$$N = \kappa \frac{L}{u_s} \quad 6.34$$

κ ist ein Parameter, der entsprechend dem Transportmechanismus definiert wird [170]. Durch die Verwendung von N und T werden die Geschwindigkeitsgleichungen in eine dimensionslose Form überführt.

Die entsprechenden Definitionen der einzelnen kinetischen Widerstände sind [170]:

1. Reaktion

$$N_r = k_1 \cdot Q_{\max} \cdot \frac{L}{u_s} \quad 6.35$$

2. Filmwiderstand

$$N_F = k_f \cdot A \cdot \frac{L}{u_s} \quad 6.36$$

3. Porendiffusion

$$N_p = \frac{15 \cdot (1 - \varepsilon) \cdot D_p}{R_p^2} \cdot \frac{L}{u_s} \quad 6.37$$

4. Oberflächendiffusion

$$N_s = \frac{15 \cdot D_o}{R_p^2} \cdot \frac{Q_{\max}}{C_0} \cdot \frac{L}{u_s} \quad 6.38$$

5. Axiale Dispersion

$$N_D = \frac{h}{4 \cdot R_p + \frac{D_{ax}}{2 \cdot u_s}} \quad 6.39$$

Die Werte der Übertragungseinheiten ermöglichen folgende Abschätzung der Bedeutung eines Massentransferwiderstandes eines Transportmechanismus:

1. Für einen N-Wert von Null ist der entsprechende Mechanismus dominierend. Es findet kein Transport statt.
2. Für einen großen N-Wert ($N \rightarrow \infty$) erfolgt der Massentransfer sehr schnell und der Mechanismus hat keine Bedeutung.

Im nächsten Kapitel werden Gleichungen für die jeweiligen Transportmechanismen in reduzierten Koordinaten abgeleitet.

6.5.3 Modellgleichungen der Durchbruchkurve

Für die Form der Durchbruchkurven, welche jeweils durch einen entsprechenden Mechanismus bestimmt sind, können analytische Beziehungen, unter der Annahme einer irreversiblen Adsorption, abgeleitet werden. Durch die Annahme der Irreversibilität der Isotherme vereinfacht sich die Auswertung der Daten erheblich und es ist keine numerische Betrachtung nötig.

1. Reaktion [180]

$$\frac{C}{C_0} = \frac{e^{N_R \cdot (T_r - 1)}}{1 + e^{N_R \cdot (T_r - 1)}} \quad 6.40$$

2. Filmwiderstand [181]

$$\frac{C}{C_0} = e^{[N_F \cdot (T_r - 1) - 1]} \quad 6.41$$

3. Porendiffusion [182]

$$\frac{C}{C_0} = 1 - \left(\frac{1}{3.59} \right)^2 \cdot [2.39 - N_P \cdot (T_r - 1)]^2 \quad 6.42$$

4. Oberflächendiffusion [183]

$$\frac{C}{C_0} = 1 - \exp[-0,89 \cdot N_0 \cdot (T_r - 1) - 1] \quad 6.43$$

Die Gleichungen für den Reaktions- und Filmwiderstand erhält man durch Lösen der Massenbilanzen unter der Annahme einer Rechtecksisotherme. Für das Porendiffusionsmodell und das Oberflächendiffusionsmodell wurden Approximationsfunktionen der analytischen Lösung verwendet [182].

Die schematische Darstellungen der Durchbruchkurven für die Adsorption, den Filmwiderstand, die Porendiffusion und die Oberflächendiffusion sind in den folgenden Abb. 6.18 und 6.19 gezeigt. Für die Kurven wurden folgende Werte der Parameter angenommen:

$N_F = 1$, $N_P = 1$, $N_r = 1$ und $N_S = 1$ in Abb.6.17

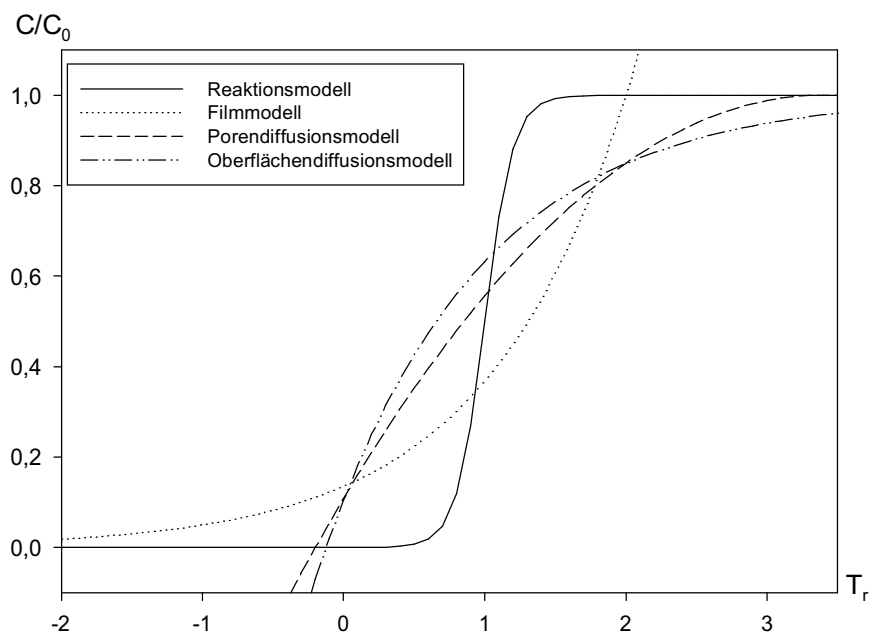


Abb. 6.18: Schematische Darstellung der Form von Durchbruchkurven, welche durch verschiedene Transportmechanismen bestimmt werden. Die Adsorption ist irreversibel. Die Transportkoeffizienten N haben den Wert 1.

Der Verlauf der Kurven wird wesentlich steiler für folgenden Parametersatz: $N_F = 10$, $N_P = 10$, $N_r = 10$ und $N_S = 10$, dargestellt in Abb.6.18. Die Gleichungen von einigen Modellen

beschreiben nur den unmittelbaren Bereich der Durchbruchkurve und verlaufen außerhalb im Negativen oder besitzen Werte größer als 1 für C/C_0 .

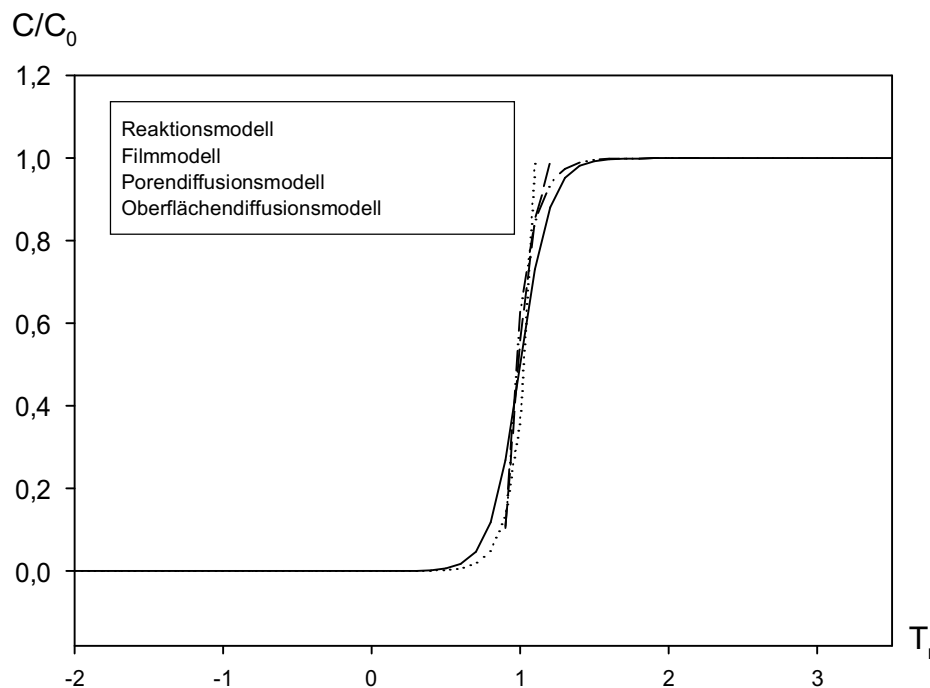


Abb. 6.19: Schematische Darstellung der Form von Durchbruchkurven, welche durch unterschiedliche Transportmechanismen bestimmt werden. Die Adsorption ist irreversibel. Die Transportkoeffizienten N haben den Wert 10.

Unter der Annahme, dass die Filmdiffusion der dominierende Mechanismus ist, hat die Durchbruchkurve eine konkave Krümmung am Beginn und kann von den anderen kinetischen Widerständen klar unterschieden werden. Die Durchbruchkurve für eine reine Reaktionskinetik ist sigmoidal gekrümmt.

Die Durchbruchkurven der Oberflächendiffusion und der Porendiffusion haben eine ähnliche, mehr konvexe Form. Sie können jedoch durch das Krümmungsverhalten in den Randbereichen unterschieden werden. Nach Vermeulen [182] ist die Krümmung der Kurve bei reiner Oberflächendiffusion für niedrige C/C_0 -Werte steiler und weniger steil bei hohen C/C_0 Werten als dies bei der Porendiffusion der Fall ist. Das hat folgende Ursachen: Bei niedrigen Anfangskonzentrationen können sich die gebundenen Moleküle schneller durch Oberflächendiffusion zu Ligandenbindungsstellen bewegen. Bei hohen Konzentrationen ist die laterale Diffusion eingeschränkt und die Porendiffusion ist der schnellere Transportmechanismus. Ein Nachteil der einfachen Modellgleichungen Glg. 6.406.43 ist sicher ihr eingeschränkter Wertebereich für T_r . Der Wertebereich ist von N abhängig wie die folgende Tabelle 6.12 zeigt:

Tabelle 6.12 Wertebereiche der Modelle für einen Stofftransportwiderstand
(Rechteckisotherme)

Modell	N=1	N=10
Reaktion	$-\infty \leq T_r \leq \infty$	$-\infty \leq T_r \leq \infty$
Filmdiffusion	$-\infty \leq T_r \leq 2$	$-\infty \leq T_r \leq 1,1$
Porendiffusion	$-0,2 \leq T_r \leq 3,4$	$0,88 \leq T_r \leq 1,2$
Oberflächendiffusion	$-0,1 \leq T_r \leq 5$	$0,9 \leq T_r \leq 2,2$

Der Wertebereich wird mit zunehmenden N für das Filmdiffusions-, Porendiffusions- und das Oberflächendiffusionsmodell kleiner. Nur das Reaktionsmodell ermöglicht die Berechnung einer vollständigen Durchbruchkurve unabhängig von N. Die anderen Modelle sind nur im Bereich von $0,3 < C/C_0 < 0,7$ zu verwenden. Ein Vergleich der Formen der experimentellen Durchbruchkurven von Abb. 6.13 mit den Kurven aus Abbildung 6.17 zeigt, dass nur das Poren- sowie das Oberflächendiffusionsmodell zur Modellierung der Form der Durchbruchkurve im Bereich $C/C_0 = 0,5$ geeignet sein sollten. Die Durchbruchkurven für diese beiden Modelle (Gleichung 6.42 und Gleichung 6.43) wurden für verschiedene Parameter N von 1-10 berechnet und sind in den Abbildungen 6.20 und 6.21 dargestellt:

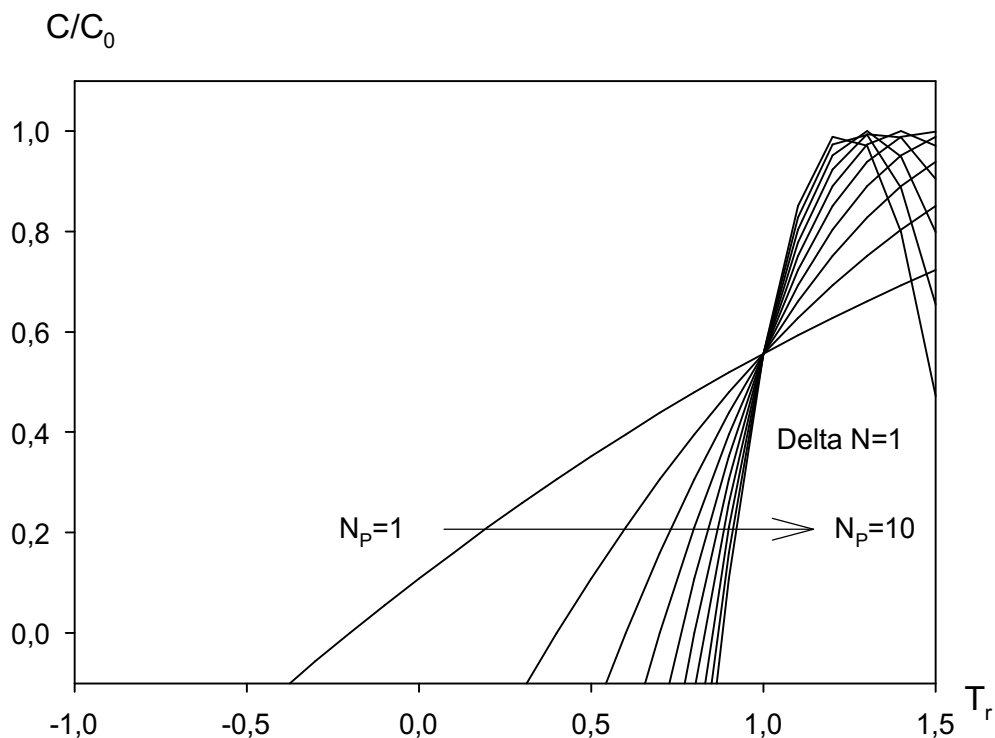


Abb. 6.20: Form der Durchbruchkurven berechnet mit dem Porendiffusionsmodell (Gleichung 6.42) von $N_p=1$ bis $N_p=10$ mit $\Delta N = 1$.

Die Kurven des Porendiffusionsmodells durchlaufen Maxima an den Nullstellen der Ableitung von Gleichung. 6.42 nach T_r . Für diese gilt:

$$N_p \cdot (T_r - 1) = 2,39 \quad 6.44$$

für $N_p = 10$ gilt $T_r = 1,239$

Dieser Verlauf entspricht nicht einer reinen Form einer experimentell ermittelten Durchbruchkurve und zeigt die Einschränkung dieses einfachen Modells.

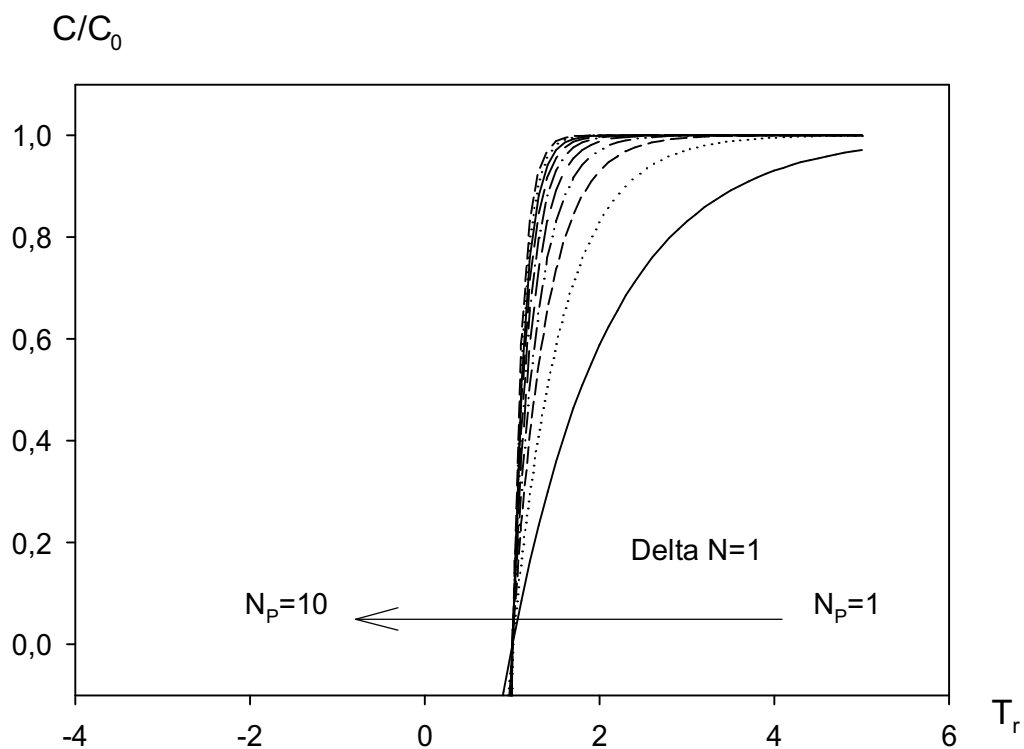


Abb. 6.21: Form der Durchbruchkurven berechnet mit dem Oberflächendiffusionsmodell (Gleichung 6.43) von $N_F=1$ bis $N_F=10$ mit $\Delta N = 1$.

Die Durchbruchkurven des Oberflächendiffusionsmodells sind in dem Parameterbereich von 1 bis 10 steiler als beim Porendiffusionsmodell.

Der eingeschränkte Wertebereich der einfachen Modelle der Porendiffusion sowie der Oberflächendiffusion ermöglichen nicht die Modellierung einer Durchbruchkurve für Werte von $C/C_0 < 0,3$ sowie $C/C_0 > 0,7$.

Es erweist sich somit als notwendig eine weitere flexible Funktion zur Modellierung der Durchbruchkurve bereitzustellen. Entsprechend der Abbildung 6.18 sollte eine Funktion, die

sich entweder als Summe der Terme des Filmwiderstandes und der Porendiffusion sowie des Filmwiderstandes und der Oberflächendiffusion ergibt, eine sehr gute Anpassungsfunktion sein. Der Vergleich mit den realen Durchbruchkurven (Abb. 6.13) zeigt, dass in den Randbereichen der Durchbruchkurven die Funktion der Filmdiffusion diesen Verlauf sehr gut beschreiben kann. Im Bereich $0,3 < C_0$ Ein entsprechender Zusammenhang für die Kombination von Filmwiderstand und Porendiffusion wurde von Vermeulen beschrieben [182]:

$$N_p(T_r - 1) = \frac{N_p}{N_F} \cdot (\ln(C/C_0) + 1) + 2,39 - 3,59 \cdot (1 - (C/C_0))^{\frac{1}{2}} \quad 6.45$$

Diese Funktion hat eine höhere Flexibilität als die Modelle welche nur für einen Transportwiderstand abgeleitet wurden. In den Abbildungen 6.22 und 6.23 sind die Verläufe der Durchbruchkurven für verschiedene Verhältnisse der Übertragungseinheiten der Porendiffusion und den Filmtransport dargestellt. In Abbildung 6.22 wurde N_p gleich 1 gesetzt und die Übertragungseinheit N_F mit den Werten 0,1; 0,5; 1 und 10 variiert. In Abbildung 6.23 wurde $N_F=1$ gesetzt und N_p variiert:

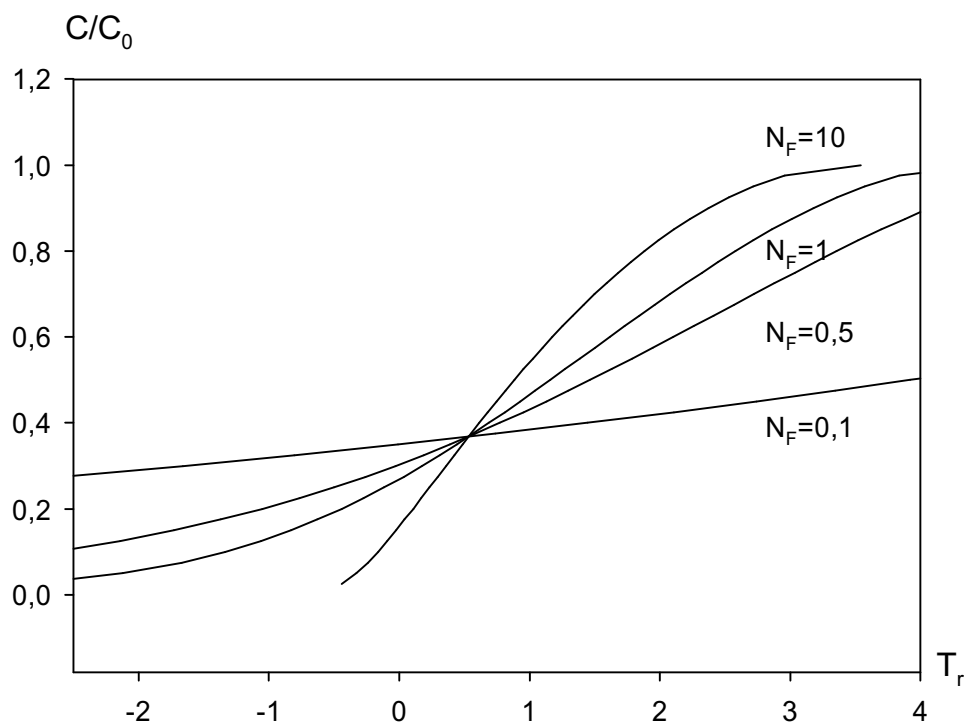


Abb.6.22: Verlauf der Durchbruchkurven berechnet mit Gleichung 6.45 als Kombination von Porendiffusion und Filmtransport. ($N_F=1$ und N_P variabel)

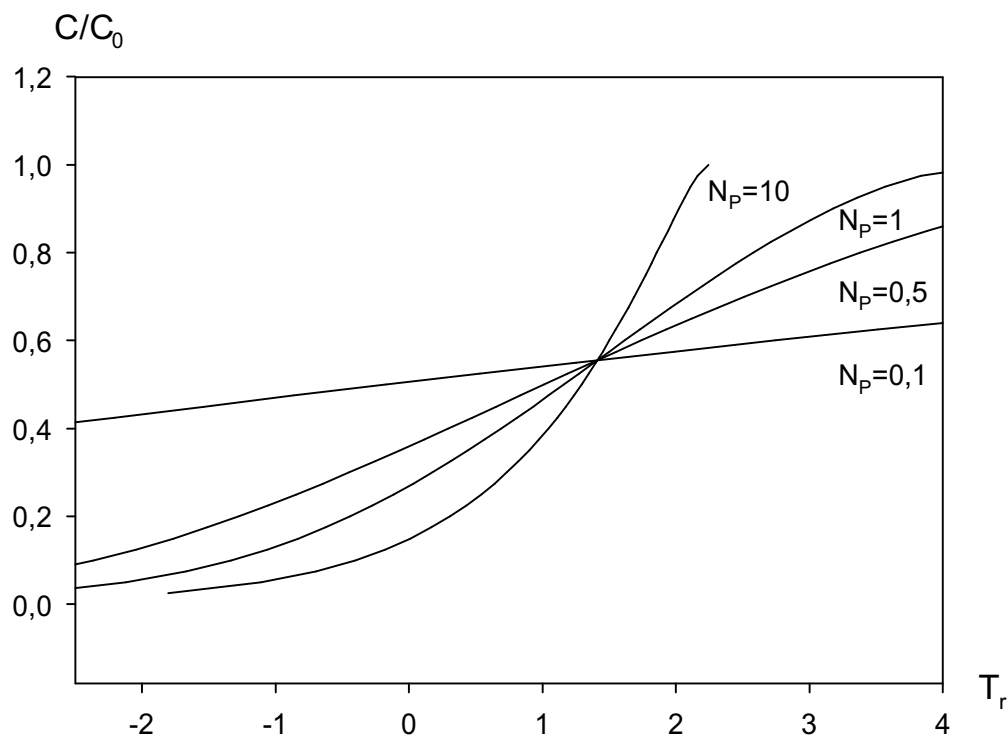


Abb.6.23: Verlauf der Durchbruchkurven berechnet mit Gleichung 6.45 als Kombination von Porendiffusion und Filmtransport. ($N_F=1$ und N_P variabel)

Eine geeignete Beschreibung einer Durchbruchkurve gelingt mit diesem Modell insbesondere bei vergleichbaren Größenverhältnissen der Übertragungseinheiten (z.B. $N_F=1$ und $N_P=1$ oder $N_F=0,5$). Für den Parametersatz $N_F=10$ und $N_P=1$ nähert sich die funktionelle Beschreibung durch Gleichung 6.45 der des Filmdiffusionsmodells an (Glg. 6.41). Für $N_F=10$ und N_P geht Glg.6.45 in das Modell 6.42 der Porendiffusion (Glg.6.42) über. Im folgenden Kapitel werden nun für einige Modelle die Übertragungseinheiten berechnet.

6.5.4 Berechnung der Übertragungseinheiten

Die Anpassung der einzelnen Modellgleichungen an die experimentellen Konzentrations-Zeit-Daten hatten gezeigt, dass die besten Resultate mit dem Poren- sowie dem Oberflächendiffusionsmodell erzielt werden konnten. Für diese beiden Modelle werden im Folgenden die Übertragungseinheiten berechnet um ihren Einfluss auf die Form der Durchbruchkurve von einem in eine Säule gepackten Ionenaustauscher zu untersuchen. Um den Einfluss der axialen Dispersion auf die Form der Durchbruchkurve abzuschätzen, wird

zusätzlich die Übertragungseinheit der axialen Dispersion berechnet. Zur Berechnung dieser Werte sind folgende Daten erforderlich:

1. Die maximale Länge der Diffusionsstrecke innerhalb des Gelpartikels wurde gleich dem Partikelradius gesetzt, Partikelradius für Fractogel® HW 650 (M) ist $d_p/2 = 32,5 \mu\text{m}$
2. ε Die Porosität der Packung (0,8 [-])
 d_p Der mittlere Partikeldurchmesser (65 μm),
3. Der lineare Fluss u_s war 1 cm/min und die Bettlänge L der Säulen variierte zwischen 2 und 3 cm.
 Unter Verwendung der in Kapitel 6.3 berechneten Transportkoeffizienten aus den Batchversuchen wurden Werte der Übertragungseinheiten der Porendiffusion und der Oberflächendiffusion für die untersuchten Geltypen errechnet (Gleichung 6.37 und Gleichung 6.38). Sie sind in Tabelle 6.13 dargestellt:

Tabelle 6.13 Werte der Übertragungseinheiten für die Porendiffusion und die Oberflächendiffusion der verschiedene modifizierte Gele

Gel	Porendiffusion N_p	Oberflächendiffusion N_o
Fractogel® DEA (40-90 μm), 50 % Beschichtungsgrad	3,7	9,2
Fractogel® DEA (40-90 μm), 27 % Beschichtungsgrad	8	23
Fractogel® DEA (40-90 μm) 19 % Beschichtungsgrad	4,8	19,5
Fractogel® DEA (40-90 μm) 11 % Beschichtungsgrad	1,3	0,92
Fractogel® TSK DEAE (40-90 μm) ohne polymere Beschichtung	2,7	14,6
Fractogel® EMD DEAE (40-90 μm) 10 % Beschichtungsgrad (Amid)	9,3	24

Die Porendiffusion ist nach den Resultaten der Tabelle 6.13 der geschwindigkeitsbestimmende Mechanismus, da die Werte der Übertragungseinheiten der Oberflächendiffusion etwas größer sind.

Zur Abschätzung des Einflusses der Dispersion wurde unter Benutzung von Gleichung 6.39 die Übertragungseinheit der axialen Dispersion berechnet:

$L = 3 \text{ cm}$, $D = 5,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ [159], $d_p = 60 \text{ }\mu\text{m}$, $u_s = 1 \text{ cm}/\text{min}$

Man erhält:

$$N_D = 250$$

Die Axialdispersion stellt folglich für den Massentransfer keinen Widerstand dar.

Im folgenden Kapitel wird versucht mittels der Übertragungseinheit der Porendiffusion eine Durchbruchkurve vorauszuberechnen.

6.5.5 Vorausberechnung von Durchbruchkurven mit berechneten Transportkoeffizienten der Batchadsorption

Nach der Analyse der Übertragungseinheiten sollte die Porendiffusion der geschwindigkeitsbestimmende Mechanismus sein, der maßgeblich die Form der Durchbruchkurve beeinflusst. Es wurden mit Verwendung der Gleichung 6.42 und den Daten aus der Tabelle 6.6 der Porendiffusionskoeffizienten die Durchbruchkurven berechnet.

Abbildung 6.24 zeigt als Beispiel die Vorausberechnung der Durchbruchkurve für einen Fractogel® DEA Ionenaustauscher mit einem Beschichtungsgrad von 27 %. Die Anpassung der Durchbruchkurve durch die einfache quadratische Gleichung (Glg. 6.42) ist nicht zufriedenstellend.

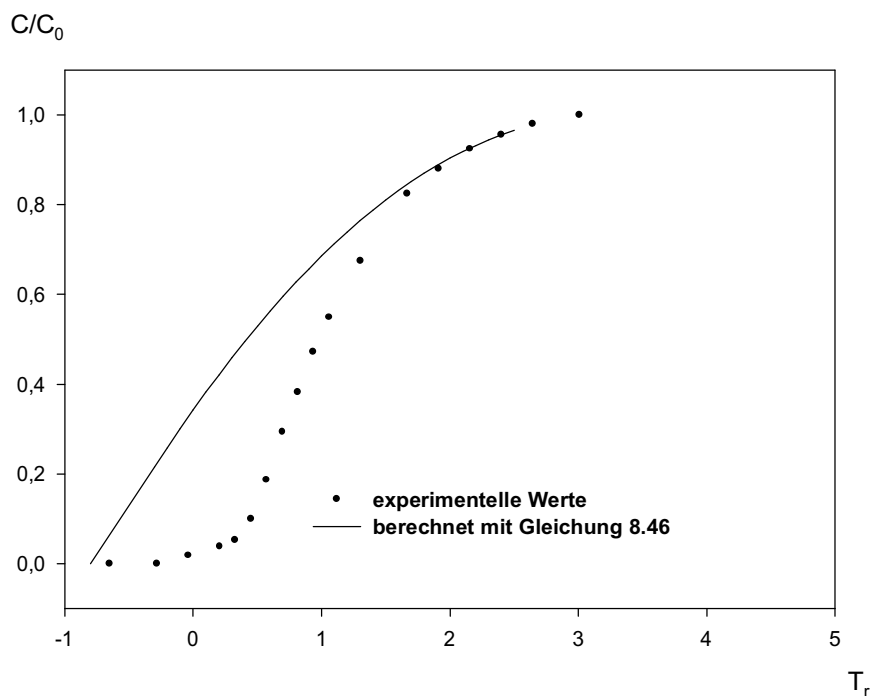


Abb.6.24: Experimentelle Durchbruchkurve und mit dem Porendiffusionsmodell (Gleichung 6.42) vorausberechnete Durchbruchkurve für Fractogel® EMD DEA mit 27 % Beschichtungsgrad

Obwohl die experimentellen Daten des Batchmodells unter der Annahme nur eines bestimmenden Transportmechanismus durch verschiedene Modelle (insbesondere das Porendiffusionsmodell) befriedigend wiedergegeben werden können, gelingt die Vorausberechnung der Durchbruchkurven nicht. Es ist deshalb anzunehmen, dass ein weiterer Widerstand die Form der Durchbruchkurve wesentlich mit beeinflusst. Es wurden deshalb die Durchbruchkurven an ein Modell angepasst, das sowohl den Filmwiderstand als auch die Porendiffusion berücksichtigt.

Entsprechend der Untersuchungen von Mollerup [201] spielt der Filmwiderstand im gepackten Bett neben der Porendiffusion eine bedeutendere Rolle als bei der Batchadsorption.

Das wird im folgenden Kapitel weiter diskutiert.

6.5.6 Modellierung der Durchbruchkurven unter Berücksichtigung eines zusätzlichen Filmwiderstandes

Die Parameter N_P und N_F der Gleichung 6.45 wurden an die experimentell ermittelten Daten C/C_0 als Funktion von T_r angepasst. Die Regression wurde mit dem Programm SIGMAPLOT von der Fa. Jandel durchgeführt. Im Unterschied zu den vorher beschriebenen Einparametermodellen (Gleichungen 6.40 bis 6.43) ist eine Auflösung nach C/Q hier nicht möglich. Es wurde deshalb T_r als Funktion von C/C_0 angepasst. Die Ergebnisse der Berechnung von N_P und N_F der verschiedenen Gele zeigt die folgende Tabelle:

Tabelle 6.14 Dimensionslose Übertragungseinheiten für den Filmwiderstand und die Porendiffusion (berechnet mit Gleichung 6.45)

Gel	Filmwiderstand N_F	Porendiffusion N_P
Fractogel® DEA (40-90 μm), 50 % Beschichtungsgrad	$2.5 \cdot 10^{-6}$	0.74
Fractogel® DEA (40-90 μm), 27 % Beschichtungsgrad	0.0377	0.68
Fractogel® DEA (40-90 μm) 19 % Beschichtungsgrad	0.11	0.37
Fractogel® DEA (40-90 μm) 11 % Beschichtungsgrad	0.109	0.19
Fractogel® TSK DEAE (40-90 μm) ohne polymere Beschichtung	0.12	0.05
Fractogel® EMD DEAE (40- 90 μm) 10 % Beschichtungsgrad (Amid)	0.104	0.49

Der Filmwiderstand wird nach diesem Modell mit zunehmenden Beschichtungsgrad größer und ist bei 27 % Polymerschichtungsgrad der bestimmende Transportwiderstand in einem Bett aus gepackten Partikeln. Entsprechend diesen Ergebnissen ist im gepackten Bett der polymermodifizierten Partikel der Filmwiderstand die bestimmende Komponente.

Die Vorausberechnung der Durchbruchkurven gelingt mit der Modell Gleichung. 6.45 sehr gut wie die Abbildung 6.25 als Beispiel zeigt:

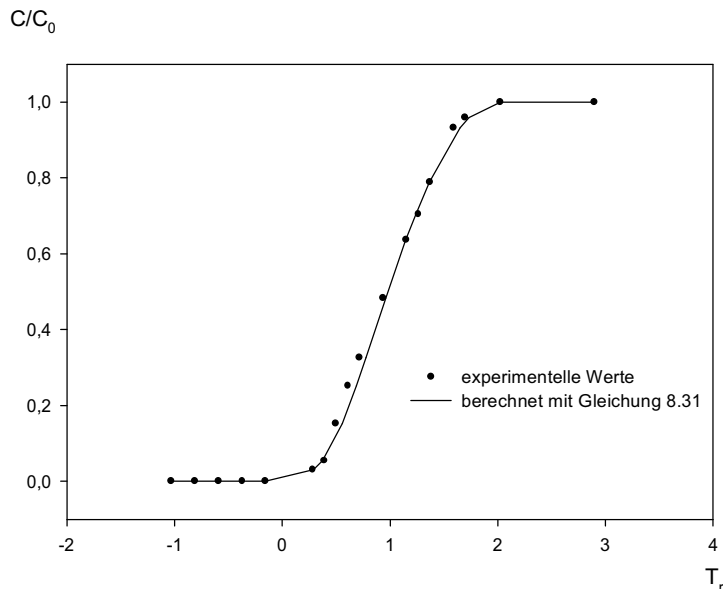


Abb. 6.25: Experimentelle Durchbruchkurve und mit dem Porendiffusions-Filmmodell (Gleichung 6.45) vorausberechnete Durchbruchkurve für Fractogel® EMD DEA mit 27 % Beschichtungsgrad

Es ist zu berücksichtigen, dass das obige Modell zwei adjustierbare Parameter enthält und deshalb flexibler als die Modellgleichung 6.42 (die nur einen adjustierbaren Parameter enthält) an die experimentellen Daten angepasst werden kann.

Interessant ist die Tatsache, dass es offensichtlich Unterschiede beim Einfluss des Filmwiderstands für polymermodifizierte Gele im Batchversuch und im gepackten Bett gibt. Während der Filmwiderstand im Batch gering ist, steigt der Filmwiderstand in einem gepackten Bett an. Diese Diskrepanz tritt bei nichtpolymer modifizierten Trägermaterialien nicht auf (siehe Tabelle 6.14).

Durch die polymere Modifizierung erzielt man somit eine Beschleunigung der Porendiffusion im Batchverfahren. Die Polymerschicht auf der Außenseite der Partikel hat jedoch eine Erhöhung des Filmwiderstandes im gepackten Bett zur Folge, was letztendlich zu einer Verschlechterung der Form der Durchbruchkurve führt und folglich auch die dynamische Bindungskapazität negativ beeinflusst. Es muss jedoch festgestellt werden, dass es sich hier um qualitative Feststellungen handelt. Eine genaue Quantifizierung dieses Verhaltens steht noch aus.

6.6 Zusammenstellung der Ergebnisse

1. Der Porenraum von polymer modifizierten Partikeln wird ab einem bestimmten Beschichtungsgrad voll mit dem ionischen Polymer ausgefüllt. An diesem Punkt steigt die spezifische Proteinbindungskapazität um mehr als das 10fache an, obwohl die Ligandendichte nur um das 1,2fache zunimmt.
2. Experimentell kann die Existenz eines ionischen Hydrogels in den Poren für einen Anionenaustauscher durch Ionenausschlußchromatographie mit einem basischen Protein charakterisiert werden.
3. Die Adsorptionsisothermen der untersuchten polymer modifizierten Gelen haben "Rechteckform".
4. Die Charakterisierung der experimentell Daten wurde mit Modellen für jeweils einen Transportmechanismus (Reaktionskinetik, Porendiffusion, Oberflächendiffusion und Filmtransport) unter der Annahme einer irreversiblen Adsorption durchgeführt.
3. Die Konzentrations-Zeit Kurven der Proteinadsorption im Batchverfahren, in polymermodifizierten Gelen, können am besten mit einem Porendiffusionsmodell beschrieben werden.
4. Durch eine polymere Modifikation erhöht sich die Geschwindigkeit des Gesamtadsorptionsprozesses im Batchverfahren.
5. Die Vorausberechnung der Durchbruchkurven, mit den ermittelten Transportkoeffizienten aus den Batchuntersuchungen mit Modellen die nur einen Transportwiderstand beinhalten, ist nicht möglich. Die Anpassung der experimentellen Daten der Durchbruchkurve gelingt nur unter Benutzung einer Beziehung, welche sowohl einen Filmwiderstand als auch die Porendiffusion berücksichtigt.
6. Die Geschwindigkeit der Proteinadsorption an polymermodifizierten Partikel ist im Batchverfahren höher als in einer chromatographischen Säule.

Die Herstellung der Compositpartikel hat also eine Reihe von Vorteilen im Vergleich zur herkömmlichen Derivatisierungsstrategie. Bei allen Bemühungen gelingt es jedoch nicht, einen konvektiven Fluss in den Poren der Partikel zu erzeugen, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den Massentransport in den Gelpartikeln die Diffusion zu den Liganden ist.

Es ist jedoch bekannt, dass der Transport in Membranadsorbern überwiegend durch Konvektion erfolgt [184]. Die hier beschriebenen Beschichtungsverfahren wurden deshalb auf Membranen übertragen. Die wesentlichen Eigenschaften dieser vom Autor entwickelten Trennsysteme werden im folgenden Kapitel näher erläutert.

7 Modifizierte Membranen für die Biochromatographie

7.1 Vorteile von Membranadsorbern

Wie schon in der Einführung beschrieben, ist eine kurze Kontaktzeit von Proteinen mit einer Oberfläche günstig für die Stabilität, da die Denaturierung an Oberflächen einem Zeitgesetz erster Ordnung folgt. Ein schneller Transport zu den Liganden in einem Trägermaterial für die Adsorption und Desorption kann durch eine Verkürzung der Diffusionswege erreicht werden. Das soll im Rahmen einer Pecletanalyse kurz diskutiert werden [185]:

Die Peclet-Zahl Pe ist definiert als das Verhältnis von Diffusionszeit zur Aufenthaltszeit in der Trenneinheit:

$$Pe = \frac{t_D}{t_C} < Pe_{cr} \quad (7.1)$$

t_D Diffusionszeit zum Liganden [s]

t_C Aufenthaltszeit in der Säule [s]

dabei ist Pe_{cr} die kritische Peclet-Zahl, ein Grenzwert, bei deren Überschreitung die dynamische Kapazität nicht mehr genutzt werden kann.

Die Peclet-Zahl kann mit Struktur- und Flussparametern des Trägermaterials weiter charakterisiert werden:

$$Pe = \frac{R_p^2}{\frac{D}{\frac{\varepsilon_{ext}}{Q_v}}} \quad (7.2)$$

R_p	Partikelradius [m]
D	Diffusionskoeffizient des Probemoleküls in [m^2/s] (für viele biologische Makromoleküle in der Größe $10^{12} m^2/s$)
ϵ_{ext}	externe Porosität oder das Zwischenkornvolumen in [m^3]
Q_v	volumetrischer Fluß in [m^3/s]

Bei partikulären Trägermaterialien ist die Länge der Diffusionsstrecke durch die Partikelgröße bestimmt. Durch eine Verringerung des Partikeldurchmessers kann die Geschwindigkeit des Massentransportes verbessert werden. Der Nachteil ist jedoch ein hoher Druckanstieg, da gilt $\Delta p \sim \frac{1}{R_p^2}$. Teilchen mit Durchmessern kleiner als 2 μm können deshalb in der Praxis nicht verwendet werden.

Bei Membranen findet man eine andere Situation vor: Mikrofiltrationsmembranen haben häufig Schichtdicken von 100 μm und mittlere Porengrößen von 0,2–5 μm [186]. Diffusionsprozesse finden überwiegend innerhalb der Membranpore in radialer Richtung zur Porenwand statt. Da der Porendurchmesser einer Membran kleiner als ein "durchschnittlicher" Partikeldurchmesser ist, sind die Diffusionsstrecken für Membransysteme kürzer.

Für ein „durchschnittliches“ Prozesspartikel mit einem mittleren Durchmesser von 50 μm beträgt die maximale Diffusionslänge 25 μm . Bei einer Membran mit einem mittleren Porendurchmesser mit 0,2 μm liegt sie bei 0,1 μm . Bei sonst vergleichbaren Parametern erhält man ein Verhältnis der kritischen Peclet-Zahlen für Partikel zu Membranen von etwa 7000. Das bedeutet: Man könnte Membranen etwa 7000 mal schneller betreiben, wenn der Transport nur allein durch Diffusion zu den Liganden erfolgen würde. In der Literatur findet man häufig Hinweise auf den konvektiven Transportcharakter in Membransystemen. Das ist nur bedingt richtig. Der eigentliche konvektive Transport findet nur in axialer Richtung statt. Der Transport zu den Liganden an der Membranwand erfolgt durch molekulare Diffusion. Die Proteine diffundieren jedoch hier in eine Polymerschicht von weniger als 2 μm Dicke und nicht, wie in einem porösen Partikel, in eine Pore mit Längen von bis zu 50 μm . Der Adsorptionsprozess in einer Membran ist somit einem Trennprozess an einem nichtporösen Teilchen vergleichbar.

Die vorteilhaften Eigenschaften von modifizierten Membranen für die Biochromatographie wurden schon häufig beschrieben. Alle chromatographischen Techniken der Bioseparation können mit Mikrofiltrationsmembranen realisiert werden.

Es wurden Ionenaustausch-[101],[102], hydrophobe Interaktionschromatographie[187], Farbstoff-[188], Metallchelatsaffinitätschromatographie[107], Thiophile Adsorptions-[189]

und Protein A - [190] Membranen hergestellt und charakterisiert. Es stellt sich die Frage, weshalb sich Membranadsorber bisher nicht gegenüber partikulären Systemen haben durchsetzen können. Hauptsächlich sind es die fehlenden Möglichkeiten der Herstellung von preparativen Systemen als auch der (bisher) weitaus höhere Preis für die entsprechenden Trenneinheiten welche die Anwendungsbreite einschränken.

Es werden im folgenden einige Ergebnisse der Untersuchungen der chemischphysikalischen Eigenschaften von Hohlfaseradsorbermodulen zur Ionenaustauschmembranchromatographie vorgestellt.

Membranen werden in der Bioverfahrenstechnik für viele Verwendungszwecke eingesetzt. Für den Biotechnologen sind Membranmodule deshalb nichts völlig Neues.

Ausgewählte Verfahren sind: Zellernte, Zellbruchentfernung, Ankonzentrierung und Entsalzung [186]. Man unterscheidet bei den Filtrationstechniken je nach der Porengröße der Filter zwischen Mikrofiltration mit symmetrischer Porenstruktur, Porengröße (0,4-10 µm) und Ultrafiltration mit asymmetrischer Porenstruktur, Porengröße der Trennschicht (1-20 nm) [186]. Mit Membranen können sowohl Suspensionen als auch klare Lösungen aufgearbeitet werden. Bei einer sogenannten Dead-End Filtration hat das Modul einen Eingang und einen Ausgang. Die zu filtrierende Lösung muss aber in jedem Fall die Membranwand passieren. Bei einer Cross-Flow Filtration hat der Modul mindestens drei Anschlüsse [191]. Einen Eingang, einen Ausgang für das Retentat und einen für das Filtrat. In diesem Fall muss die Lösung nicht die Wand der Membran passieren.

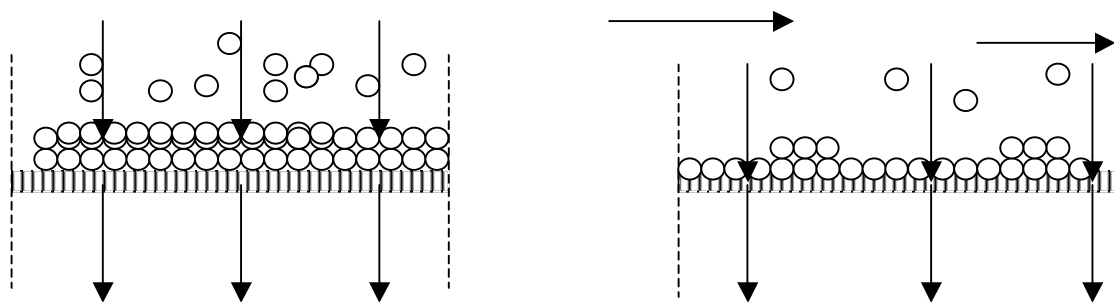


Abb. 7.1: statische Filtration (dead-end)

–

dynamische Filtration (Crossflow Filtration)

Die Anzahl der Filtermaterialien ist groß. Besonders bevorzugt sind regenerierte Cellulose, Polypropylen, Polyamidmembranen (Polyamid 6, Nylon 6,6) und Polyethersulfonmembranen [186]. Bei der geometrischen Form hat man die Möglichkeit, zwischen Flachmembranen und Hohlfasermembranen zu wählen.

Angepasst an die Filterform ist das Modulgehäuse. Für Flachmembranen kann man einen einfachen Modul verwenden, in den die Membranscheiben nur eingelegt werden [192]. Mehrere Flachmembranscheiben werden unter Verwendung von Spacern übereinandergelegt. Die Flachmembranmodule zeigen jedoch Nachteile bei der effektiven Volumenausnutzung und der Verteilung der zu filtrierenden Lösung. Eine Steigerung der Raumausnutzung bei Flachmembranen erzielt man mit plissierten oder Spiralmembranen [186]. Die effektivste Ausnutzung des Modulvolumens erhält man jedoch bei der Verwendung von Hohlfasermembranen [186].

Tabelle 7.1 Verhältnis von Membranfläche zu dem Membranvolumen für verschiedene Modulkonstruktionen

Modultyp	Membranfläche pro Bauvolumen [m ² /m ³]
Plattenmodul (Flachmembranen)	200–800
Wickelmodul (Flachmembranen)	600–1000
Modul mit plissierten Membranen (Flachmembranen)	400-1400
Rohrmodule ($d_i > 4$ mm, Hohlfasermodule)	80–500
Kapillarmodul ($d_i = 0,5$ bis 4 mm, Hohlfasermodule)	500–4000
Hohlfasermodule ($d_i < 0,5$ mm)	> 4000

Für den nachfolgend beschriebenen Hohlfasermodule (Abb. 7.3) mit einer inneren Gesamtfläche von 86 cm² und einer äußeren Fläche von 144 cm² (pro Modul) erhält man die Verhältniswerte: 2047 und 3380 (Fläche pro Bauvolumen, erster Wert - Lumenfläche, zweiter Wert - Shellfläche). Aufgrund dieser günstigen Platzausnutzung erwies es sich als vorteilhaft Hohlfasermodule als Chromatographieeinheiten zu verwenden.

7.2 Hohlfasermembranadsorber für die Biochromatographie

Hohlfasermembranen werden gewöhnlich beidseitig eingebettet

Bei der von uns verwendeten Konstruktion wurden die Fasern haarnadelförmig gekrümmt in ein Gehäuse eingebracht und beide offenen Enden einseitig eingebettet. Man bezeichnet das als einseitige Dead-End Anordnung [192]. Eine schematische Darstellung der Strömung in einer solchen Dead-End Anordnung ist in Abb. 7.2 gezeigt:

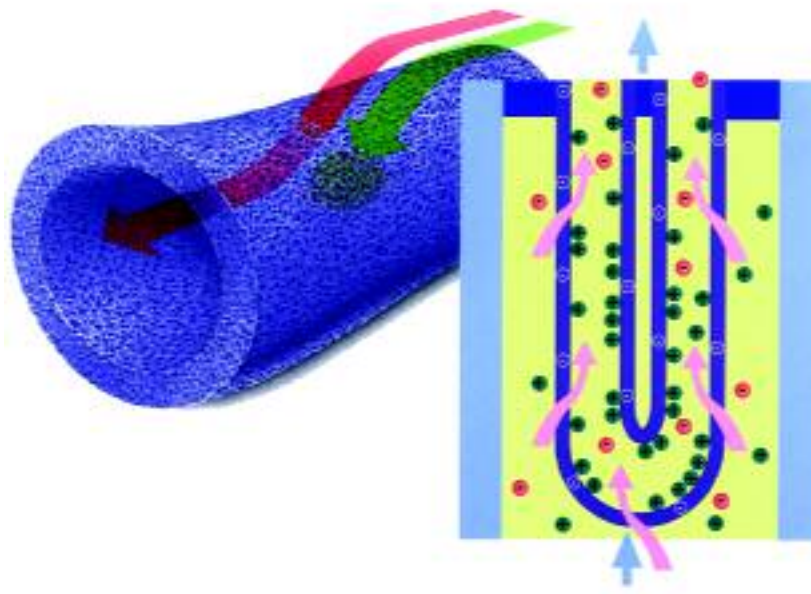


Abb. 7.2: Schematische Darstellung der Flussverhältnisse in einem Dead-End Hohlfasermodul

Die Lösung läuft entweder vom Lumen (Innenraum der Faser) nach der sogenannten Shellseite, oder von der Shellseite ins Lumen. Beide Richtungen sind nicht identisch, da die geometrische Außenfläche etwa 60 % größer als die Lumenfläche ist.

Der Hohlfasermembranadsorber hat mit 10 einen wesentlich höheren Schlankheitsgrad als übliche Gehäuse der Flachbettmembranadsorber (gewöhnlich 1-2). Er hat zwei Lock-Luer Anschlüsse und wird in ähnlicher Weise wie eine chromatographische Säule, gefüllt mit Partikeln, betrieben. Ein Bild eines solchen Adsorbers zeigt Abbildung 7.3:



Abb. 7.3: Hohlfasermodule für die Chromatographie mit einer Länge von 80 mm und einem Innendurchmesser von 8 mm

Die Hohlfasermembranen mit einem Außendurchmesser von 0,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,3 mm aus Polyamid 6 wurden nach dem im Kapitel 4 beschriebenen Verfahren mit Polyglycidymethacrylat beschichtet und durch nachfolgende Reaktionen mit a) Diethylamin und b) Hydrogensulfit zu Anionen und Kationenaustauschern modifiziert (Vorschriften im Methodenteil 8.128.15). Ein optimaler Wert des Beschichtungsgrades mit Polymer auf die Hohlfasermembran wurde hier mit 42 % erreicht. Bei höheren Werten kam es zu einer starken Abnahme der Permeabilität. Durch Optimierung des Herstellungsverfahrens konnten vergleichbare Bindungskapazitäten wie bei partikulären Trägermaterialien erreicht werden. Wichtige Eigenschaften der Hohlfasermembranadsorber werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

7.2.1 Proteinbindungskapazitäten und Geschwindigkeit der Adsorption von Membranadsorbentien

Die maximalen Proteinbindungskapazitäten der Ionenaustauscher sind in der folgenden Tabelle 7.2 aufgeführt:

Tabelle 7.2 Maximale Proteinbindungskapazitäten von Ionenaustauschermembranen der Dimension 80-8 mm (Länge-Durchmesser)

Ionenaustauschertyp (Ligand)	maximale Proteinbindungskapazität [mg/ml] (bezogen auf das Membranvolumen)	maximale Proteinbindungskapazität [mg/ml] (bezogen auf das Gehäusevolumen)
DEA (Diethylaminohydroxypropyl)	62 mg (Rinderserumalbumin)	27 mg (Rinderserumalbumin)
Sulfo(Sulfohydroxypropyl)	92 mg (Lysozym)	40 mg (Lysozym)

Die Angabe der Bindungskapazität eines Membranadsorbers ist im Vergleich zu einem partikulären Trägermaterialien in der Literatur häufig nicht einheitlich. Das erschwert den Vergleich der beiden Trennsysteme. Bei partikulären Trägermaterialien wird die dynamische Bindungskapazität als mg Protein pro ml gepacktes Gel angegeben. Man hat entsprechend einer vorgegebenen Dimension einer chromatographischen Säule eine bestimmte Gesamtkapazität einer Trenneinheit zur Verfügung. Bei Membrandasorbern gibt man die Bindungskapazität häufig in mg Protein pro Flächeneinheit der geometrischen Anströmfläche des Adsorbers an. Günstiger ist es die Gesamtkapazität einer pro Volumen von einer Trenneinheit anzugeben. Membranen sind nicht so dicht gepackt sind wie partikuläre Säulenpackungen. Deshalb haben die Bindungskapazitäten pro Einheit Gehäusevolumen nicht die Größenordnung der polymermodifizierten Partikel. Das kann jedoch durch eine sehr kurze Zykluszeit und eine sehr schnelle Adsorptionsdynamik wieder mehr als ausgeglichen werden [193]. Durch die beschriebenen Beschichtungstechniken konnten vergleichbare Bindungskapazitäten wie auf partikulären Trägermaterialien erzielt werden (siehe Tabelle 4.3 und Tabelle 5.1).

Die dynamische Bindungskapazität

Die Proteinbindungskapazität eines Membrantrennmodus wird durch den linearen Fluss nicht beeinträchtigt. In der Abb.7.4 ist die Abhängigkeit der Proteinbindungskapazität vom linearen Fluss für eine Sulfoaustauschermembran dargestellt:

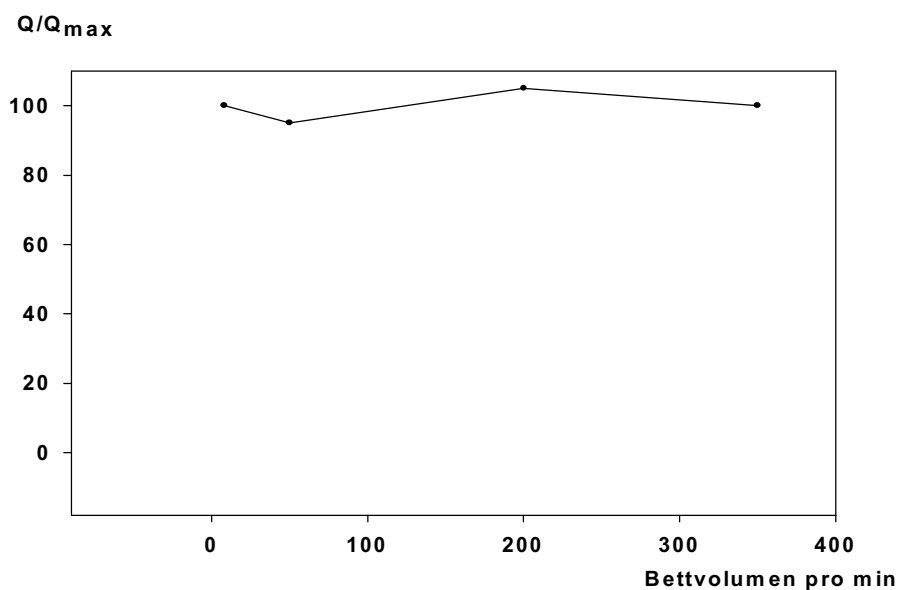


Abb. 7.4: Maximal mögliche relative Proteinbindungskapazität (Lysozym) für einen Sulfo-Kationenaustauschermodule der Dimension 80-6 mm in Abhängigkeit vom Fluss in Bettvolumen pro ml

Die Bindungskapazität ist nahezu unabhängig vom Fluss. Die Geschwindigkeit kann noch weiter gesteigert werden, jedoch ist dies limitiert durch den Berstdruck der Hohlfasermembranen, der bei etwa 6 bar erreicht wird. Wenn man berücksichtigt, dass die maximale Durchflussgeschwindigkeit in Partikelsäulen bei 30 Säulenvolumen pro min erreicht wird, so ist die Flussgeschwindigkeit in einem Hohlfasermodule deutlich höher (ca.10 mal schneller). Die Druck-Fluss-Kurve von verschiedenen Membranmodulen zeigt Abbildung 7.5:

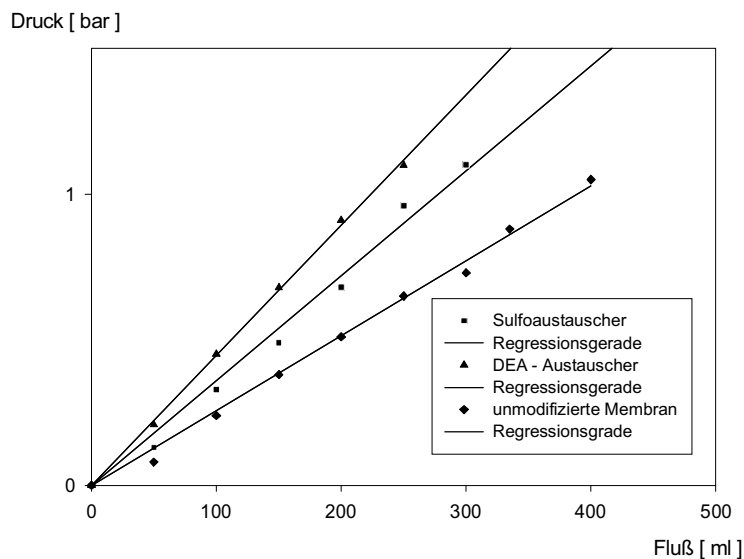


Abb. 7.5: Druck-Flusskurven in Wasser bei 25 °C für Hohlfasermembranmodule der Dimension 80-8 mm (Länge-Durchmesser)

Die Druck-Fluss-Kurven sind linear und können durch das Gesetz von Darcy beschrieben werden. Die Sulfoaustauscher und der DEA-Adsorber wurden mit jeweils 42 % Blockpolymer modifiziert. Bei einem Druckabfall von 1 bar wurde eine Flussreduktion von 25 % für den Sulfoaustauscher und 40 % für den schwachen Anionenaustauscher, im Vergleich zu einem nicht-modifizierten Membranmodul gemessen. Die Permeabilität ist somit nicht nur von der Größe des Polymerbeschichtungsgrades sondern auch von der Art des gebundenen Ions abhängig. Die polymere Beschichtung hat somit nur eine zu vernachlässigende Bedeutung für die Flussleistung der Membranadsorber.

Mit den oben beschriebenen Membranadsorbern können lineare Flüsse im Modulrohr von 500 cm/min erreicht werden. Ein vergleichbares partikuläres Prozeßgel in einer chromatographischen Säule mit 1 cm Durchmesser kann nur mit einem linearen Fluss von 45 cm/min

betrieben werden [194]. Folglich kann mit einem Membranadsorber 100 mal mehr Volumen pro Zeiteinheit aufgearbeitet werden als mit einem Gelbett.

Die lineare Geschwindigkeit der Lösung in der Membranpore ist jedoch vergleichbar zum linearen Fluss in den Zwischenräumen einer Partikelpackung, da die angeströmte Membranfläche mit etwa 100 cm^2 um ein Vielfaches größer als der Säulenquerschnitt ist. Ein entscheidender Vorteil eines Membranadsorbers ist somit die Vergrößerung des anzuströmenden Säulenquerschnitts. Anhand einer einfachen Bilanz der Zykluszeiten kann gezeigt werden weshalb Membranadsorber Vorteile im Vergleich zu Partikelsäulen besitzen.

7.3 Schnellere Zykluszeiten mit Membranadsorbern

Die oben beschriebenen Membransäulen haben "Betriebsvorteile" gegenüber Säulen derselben Dimension welche mit Partikeln gepackt sind [185]. Aufgrund des geringen Druckabfalls können Membranadsorber sowohl mit einer Spritze als auch mit einer Pumpe betrieben werden. Es wird im Folgenden ein Vergleich von mittleren Trennzeiten einer hypothetischen Proteinreinigung mit einem Minimodul und einer partikulären Säule durchgeführt:

Angenommene Zykluszeiten:

Es soll die Zeit für einen Trennzyklus einer Membransäule mit dem einer partikulären Säule vergleichbarer Dimension ermittelt werden. Der Trennzyklus bestand aus den folgenden Einzelschritten:

1. Äquilibrieren mit 10 Bettvolumina
2. Probenaufgabe 50 Bettvolumina
3. Nachwaschen mit 10 Bettvolumina
4. Elution mit 10 Bettvolumina
5. Reinigung mit 10 Bettvolumina einer 1 M Natronlauge

Säulen:

1. Hohlfasermembranmodul der Dimension 80x8 mm (Betlänge-Innendurchmesser) mit einem Gehäusevolumen von 4,2 ml
2. Superformance[®] Glassäule der Dimension 50x10 mm (Betlänge-Innendurchmesser) gepackt mit Fractogel[®] EMD HW 650 (M) Teilchen, Säulenvolumen 4,2 ml

Die Fractogelsäule wurde konstant mit einer Flussrate von 2 cm/min betrieben. Man erreicht eine Volumengeschwindigkeit von 0,37 Bettvolumina pro min. Der Zyklus für den Partikelaustauscher dauert damit insgesamt 270 min.

Für den Membranionenaustauscher wurden die Geschwindigkeiten den einzelnen Stufen angepasst. Für den eigentlichen Elutionsschritt wurde eine vergleichbare Volumengeschwindigkeit wie bei der Partikelsäule benutzt (0,5 Bettvolumina pro min). Für alle anderen Schritte wurde der Modul mit 30 ml/min betrieben (7,2 Bettvolumina pro min).

Die Gesamtzykluszeit beträgt für den Modul 32 min.

Die Zyklusgeschwindigkeit ist für einen Membranadsorber um den Faktor 8,4 höher als für eine partikuläre Säule. Die große Zeiteinsparung erzielt man aber nicht bei der eigentlichen Trennung, sondern bei den häufig zeitraubenden Äquilibrierungs- und Waschvorgängen sowie bei der Probenaufgabe von Lösungen mit geringen Proteinkonzentrationen.

Diese obigen Ergebnisse zeigen auch, dass die Kontaktzeit eines Proteins mit der Membranoberfläche kleiner als bei partikulären Trägern gehalten werden kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Übertragung der polymeren Oberflächenbeschichtungstechnik auf Membranen vergleichbare Bindungskapazitäten wie bei partikulären Trägermaterialien erreicht werden können. Ein wesentlicher Vorteil der Membranadsorber ist ihre nahezu flußunabhängige Kapazität. Die beschränkten Möglichkeiten bei der Maßstabsvergrößerung der Herstellung von Modulen mit modifizierten Membranen und deren schlechte Regenerierbarkeit erschweren jedoch die Anwendung dieser geeigneten Adsorptionssysteme in der Produktion.

8 Methoden

8.1 Methoden der chemischen Modifizierung und Charakterisierung

1. Pfropfpolymerisation von 2,3 Epoxypropylmethacrylat auf Fractogel® HW 650 (M)

Diese Reaktion ist die Schlüsselsynthese zur Herstellung aller in dieser Arbeit beschriebenen partikulären, polymermodifizierten Trägermaterialien.

100 ml wasserfeuchtes, abgenutztes Gel wurden in 200 ml VEWasser gelöst. In Reihenfolge wurden 6 g 2,3 - Epoxypropylmethacrylat und 3 g Ammoniumcer(IV)-nitrat und 3g Salpetersäure (65%) in 50 ml Wasser als Starter zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nach sorgfältiger Entgasung unter Inertgas 1 Stunde mit einem Flügelrührer gerührt. (Die Konzentrationsverhältnisse waren wie folgt: 34,4 Masse % wasserfeuchtes Fractogel

HW 650 (S) (80 Masse % Wasser und 20 Masse % Polymer), einer wässrigen Lösung aus 0.015 M Ce^{4+} , 0.08 M Salpetersäure und 0.15 M Glycidylmethacrylat als Monomer).

Nach der Reaktion wird das Gel mit einer Fritte der Porengröße 3 abgesaugt und mit Wasser, 1 M Schwefelsäure, Wasser, Natronlauge, Phosphatpuffer (0,5 M, pH 7) und Wasser gewaschen.

2. Aktivierung von Fractogel HW 650[®] (M) mit Epichlorhydrin

Diese Methode wurde zur Herstellung von Trägermaterialien mit einem sehr kurzen Spacer (3 Atome) verwendet (siehe Kapitel 4.4).

100 ml wasserfeuchtes, abgenutztes Gel wurden in 80 ml einer Lösung aus 1 M Natronlauge und 1,4 M Epichlorhydrin suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Stunden bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde das Gel mit einer Fritte der Porengröße 3 abgesaugt und mit Wasser, Phosphatpuffer (0,5 M, pH 7) und Wasser gewaschen.

3. Aktivierung von Fractogel[®] HW 650 (M) mit 1,4 Butandioldiglycidylether

Diese Methode wurde zur Herstellung von Trägermaterialien mit einem langen Spacer (9 Atome) verwendet (siehe Kapitel 4.4).

100 ml wasserfeuchtes, abgenutztes Gel wurden in 80 ml einer Lösung aus 1 M Natronlauge und 1 M 1,4 Butandioldiglycidylether suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gel mit einer Fritte der Porengröße 3 abgesaugt und mit Wasser, Phosphatpuffer (0,5 M, pH 7) und Wasser gewaschen.

4. Bestimmung der Ligandendichten von epoxygruppenhaltigen Trägermaterialien

Für die quantitative Bestimmung von Epoxygruppen wird in der Literatur eine Reihe von Methoden beschrieben. Eine häufig benutzte Methode ist die Reaktion der Epoxygruppe mit Thiosulfat und anschließender jodometrischer Rücktitration [139]. Diese Reaktion versagt jedoch bei Polyglycidylmethacrylat, was vermutlich auf den Einfluss der hydrophoben Rückkette zurückgeführt werden kann, welche eine gute Benetzung verhindert.

Die Titration von Epoxygruppen erfolgte deshalb nach einer Vorschrift von M. Pribl [41]. Das Reaktionsprinzip beruht auf der Addition von Bromid aus Tetraethylammoniumbromid an

den Epoxyring und anschließende Titration des Tetrabutylammoniumhydroxids in wasserfreien Eisessig mit Perchlorsäure.

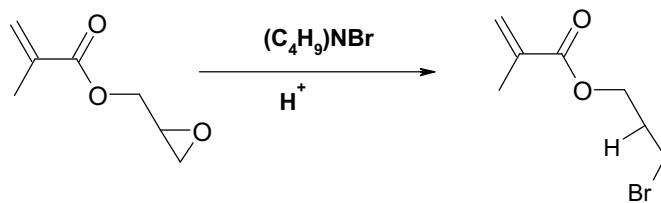


Abb. 8.1 Bestimmungsreaktion für polymere Epoxygruppen

5. Variation des Beschichtungsgrades mit Polyglycidylmethacrylat

Eine systematische Veränderung des Beschichtungsgrades mit Polyglycidylmethacrylat konnte durch Variation der Monomerkonzentration in Beispiel 1 erreicht werden. Alle anderen Reaktionsbedingungen wurden konstant gehalten. Die Abhängigkeit des Beschichtungsgrades von der Monomerkonzentration zeigt die folgende Tabelle:

Tabelle 8.1 Variation des Beschichtungsgrades

Monomergehalt [mol/l] in der Reaktionslösung	0,05	0,1	0,15	0,2
Beschichtungsgrad [%]	11	19	27	50

6. Synthese und Kapazitätsbestimmung eines schwachen Anionenaustauschers (DEA-Typ)

100 g abfiltriertes Gel, hergestellt nach Beispiel, 1 wurden in 100 ml Wasser suspendiert und 100 ml Diethylamin zugegeben. Anschließend wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Reaktionsprodukt zweimal mit Wasser gewaschen. Das gewaschene Reaktionsprodukt wurde in 100 ml einer 0,5 M Schwefelsäurelösung suspendiert und zwei Stunden bei 40 °C mit einem Flügelrührer langsam gerührt. Danach wurde mit 0,25 M Phosphatpuffer (pH 7) bis zum Neutralpunkt und anschließend mit Wasser auf einer Fritte der Porengröße 3 gewaschen. Stickstoffgehalt: nach Elementaranalyse: 1,8 %.

Zur Bestimmung der Bindungskapazität wurde das Trägermaterial in eine Superperformancesäule® (Dimension: 50 mm Länge und 10 mm Innendurchmesser) gepackt und

mit einer Lösung von 10 mg/ml Rinderserumalbumin in 20 mM TrisHCl Puffer pH 8 bis zum Durchbruch beladen.

7. Herstellung und Kapazitätsbestimmung eines starken Kationenaustauscher (Sulfo-Typ)

100 g abfiltriertes Gel, hergestellt nach Beispiel 1, wurden in 200 ml einer Lösung von 0,8 M Na_2SO_3 in 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 8 eingebracht. Die Suspension wurde bei 60°C drei Stunden mit einem Flügelrührer gerührt. Danach wurde das Reaktionsprodukt zweimal mit ca. 500 ml Wasser auf einer Fritte der Porengröße 3 gewaschen. Schwefelgehalt nach Elementaranalyse: 2,5 %.

Zur Bestimmung der Bindungskapazität wurde das Trägermaterial in eine Superperformancesäule[®] (Dimension: 50 mm Länge und 10 mm Innendurchmesser) gepackt und mit einer Lösung von 10 mg/ml Lysozym (Hühnereiweiß) in 20 mM Phosphatpuffer bis zum Durchbruch beladen.

8. Herstellung eines Aminogels

100 g abfiltriertes Gel, hergestellt nach Beispiel 1, wurden 200 ml konzentrierter Ammoniaklösung eingebracht. Die Suspension wurde bei 40°C sechs Stunden mit einem Flügelrührer gerührt. Danach wurde das Reaktionsprodukt zweimal mit ca. 500 ml Wasser auf einer Fritte der Porengröße 3 gewaschen. Stickstoffgehalt nach Elementaranalyse: 1,2 %.

9. Herstellung und Kapazitätsbestimmung eines IMAC Trägers

Zu 100 ml abgesaugtem oxiran-aktiviertem Trägers, hergestellt nach Beispiel 1, wurden 200 ml einer 0,4 M Lösung des Dinatriumsalzes der Iminodiessigsäure in 0,4 M Na_2CO_3 (pH 11) gegeben. Die Lösung wird bei 45 °C 24 Stunden gerührt. Das Reaktionsprodukt wurde mit einer Fritte der Porengröße 3 abgesaugt und mit 500 ml Wasser gewaschen. Stickstoffgehalt nach Elementaranalyse: 1,2 %

Zur Bestimmung der Bindungskapazität wurde das Trägermaterial in eine Superperformancesäule[®] (Dimension: 50 mm Länge und 10 mm Innendurchmesser) gepackt und mit einer Lösung von 10 mg/ml Lysozym (Hühnereiweiß) in 20 mM Phosphatpuffer + 0,5 M Natriumchlorid bis zum Durchbruch beladen.

10. Herstellung und Kapazitätsbestimmung eines Trägermaterials für die Thiophile Adsorption

Stufe 1:

100 ml abgesaugtes oxiran-aktiviertes Trägermaterial, hergestellt nach Beispiel 1, wurden in 200 ml einer 4 M Natriumhydrogensulfidlösung (pH 11) suspendiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit 500 ml Wasser auf einer Fritte der Porengröße 3 gewaschen.

Stufe 2:

Das in Stufe 1 erhaltene Material wurde mit 200 ml einer 0,4 M Divinylsulfonlösung (gelöst in einer 0,5 M N Na_2CO_3 ; pH 11) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit 500 ml Wasser auf einer Fritte der Porengröße 3 gewaschen.

Stufe 3:

Das aus Stufe 2 erhaltene Material wurde 45 min in 200 ml einer 2,3 M Mercaptoethanolösung in 0,5 M Puffer (pH 11) gerührt. Anschließend wurde je zweimal mit je 200 ml Natriumsulfidlösung (pH 1), 1 M Salpetersäure, 0,05 M Natronlauge sowie 0,1 M Phosphatpuffer und Wasser gewaschen.

Zur Bestimmung der Bindungskapazität wurde das Trägermaterial in eine Superperformancesäule[®] (Dimension: 50 mm Länge und 10 mm Innendurchmesser) gepackt und mit einer Lösung von 5 mg/ml gamma-Globulin (human) in 20 mM Phosphatpuffer + 0,8 M Ammoniumsulfat bis zum Durchbruch beladen.

11. Herstellung von Anionen- und Kationenaustauschermembranen für die Chromatographie

11.1 Blockpolymerisation

Stufe-Einführung von C=C Doppelbindungen in ein Polyamid

Zur Durchführung der Synthese wurde ein Polyamidfaserbündel aus Nylon (Faserbündel aus 64 Fasern, 32 cm lang, die Einzelfaser hatte folgende charakteristischen Daten: etwa 300 μm innerer Durchmesser, etwa 500 μm äußerer Durchmesser, mittlere Porengröße 0,4.) auf 30 cm gekürzt und in eine 300-10 mm (Länge-Innendurchmesser) Chromatographiesäule gepackt. An diese Säule wurde eine inerte Pumpe angeschlossen. Die Apparatur wurde zunächst mit Wasser gespült. Für die Umsetzung wurden 20 g Glycidylmethacrylat in 200 ml 1 M Natronlauge gelöst und mit hoher Geschwindigkeit (10 ml/min) bei 40 °C zwei Stunden im Kreislauf gepumpt. Anschließend wurde die derivatisierte Membran mit Wasser gespült.

11.2 Stufe-Blockpolymerisation mit 2,3 Epoxypropylmethacrylat

Das nach Beispiel 11.1 derivatisierte Hohlfasermembranbündel wurde in der dort beschriebenen Apparatur mit zunächst Aceton, dann mit Toluol (jeweils 200 ml) gespült. Anschließend wurde eine Lösung von 20 g 2,3 Epoxypropylmethacrylat (0,7 M) und 1 g Azoisobutyronitril (30 mM) in 200 ml Toluol bei 80 °C eine Stunde mit einem Fluss von 7 ml/min durch die Apparatur gepumpt. Das derivatisierte Hohlfasermembranbündel wurde anschließend mit Toluol und Aceton gespült.

12. Modifizierung einer Epoxy-Hohlfasermembran zu einem schwach basischen Anionenaustauscher

Die nach Beispiel 11.2 derivatisierte Membran wurde in der in 11.1 beschriebenen Apparatur zunächst mit Wasser gespült. Anschließend wurden 200 ml einer wässrigen Diethylaminlösung (50 Vol %) 6 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Fluss von 7 ml/min durch die Apparatur gepumpt. Schließlich wurde die erhaltene Ionenaustauschermembran mit 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7) und Wasser gewaschen bis das Eluat neutral war.

13. Kapazitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Bindungskapazität wurde ein fertiger Hohlfasermembranmodul (siehe Kapitel 7) der Dimension 80-8 mm (Länge-Durchmesser) verwendet. Der Modul wurde mit einer Lösung von 10 mg/ml Rinderserumalbumin in 20 mM TrisHCl Puffer pH 8 bis zum Durchbruch beladen.

14. Modifizierung einer Epoxy-Hohlfasermembran zu einem Kationenaustauscher

Die nach Beispiel 2.1 derivatisierte Membran wurde in der in 11.1 beschriebenen Apparatur zunächst mit Wasser gespült. 200 ml einer Lösung aus 0,42 M Natriumdihydrogenphosphat, 1,4 M Natriumsulfit und 0,15 M Tetrabutylammoniumhydrogensulfat wurde auf pH 8 eingestellt. Diese Lösung wurde auf 95 °C erwärmt und 2,5 Stunden mit einem Fluss von 7 ml/min durch die Apparatur gepumpt. Die Membran wurde mit je 200 ml Wasser, 1 M Natronlauge, Wasser, 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7), Wasser und Aceton gespült.

15. Kapazitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Bindungskapazität wurde ein fertiger Hohlfasermodule (siehe Kapitel 7) der Dimension 80x8 mm (Länge-Durchmesser) verwendet. Der Modul wurde mit einer Lösung von 10 mg/ml Rinderserumalbumin in 20 mM TrisHCl Puffer pH 8 bis zum Durchbruch beladen.

8.2 Methoden zur Untersuchung der Massentransfereigenschaften

1. Aufnahme von Adsorptionsisothermen

Die Gleichgewichtsbindungskapazitäten (Q_{max}) der partikulären Trägermaterialien wurden wie folgt bestimmt:

Eine definierte Menge getrocknetes Gel (für Gele mit hoher Kapazität ca. 0,2 g und für Gele mit geringer Kapazität ca. 1 g) wurde in einem Rundkolben mit Flügelrührer gegeben. Das Gel wurde in einer Proteinlösung suspendiert und im Thermostaten bei 20 °C mit ca. 60 U/min gerührt. Es wurden die Bindungskapazitäten nach 3 Stunden und nach 24 Stunden bestimmt (nachfolgend beschrieben). Da nach 3 Stunden keine weitere Zunahme der Bindungskapazität zu beobachten war, wurde dieser Wert für die weitere Auswertung verwendet.

Ausgangskonzentrationen (C_0) der Proteine waren: 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml.

Für Anionenaustauscher wurde eine Lösung aus: 20 mM TrisHCl Puffer pH 8 mit Rinderserumalbumin und für Kationenaustauscher eine Lösung aus: 20 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer pH 7 mit Lysozym (Hühnereiweiß) verwendet.

Zur Bestimmung der Gleichgewichtsbindungskapazität gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

1. Bestimmung des Proteingehaltes im Überstand (Photometrisch Messung oder Methode nach Bradford [43])
2. Absaugen des Gels und Elution des gebundenen Proteins mit Kochsalz und Bestimmung des Gehaltes photometrisch bei 280 nm, im Vergleich zu einer Standardlösung, oder wie oben beschrieben nach der Methode von Bradford.

Wir hatten uns für Methode zwei entschieden, da es 1. Nicht zu einer Veränderung der Messwerte durch ausblutende Gelbestandteile kommt und 2. Das nichtgebundene Protein im Porenraum des Gels bereits entfernt ist.

Nach der Gleichgewichtseinstellung wurde das Gel entweder mit 20 mM TrisHCl Puffer pH 8 oder 20 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer pH 7 auf einer keramischen Fritte gewaschen und das Protein mit dem Grundpuffer unter Zugabe von 1 M Kochsalz desorbiert.

Die Bindungskapazität [mg/ml] bezüglich des feuchten Gels wurde nach folgender Beziehung ermittelt:

$$Q_{\max} = \frac{C_{\text{EI}} \cdot V_{\text{EI}}}{3 \cdot m_{\text{Gel}}}$$

C_{EI} Konzentration des desorbierten Proteins [mg/ml]

V_{EI} Elutionsvolumen [ml]

m_{Ge} Einwaage des getrockneten Gels

3 Quellfaktor des getrockneten Fractogels

2. Die Bestimmung von Konzentrations-Zeit-Kurven

Die Untersuchung der Batch-Bindungskapazität erfolgte diskontinuierlich nach einer Methode von Tsou und Graham [31]. Die Trägermaterialien wurden in einer Proteinlösung entsprechender Konzentration auf einer Tischschüttelmaschine geschwenkt (Umdrehung ca. 60 U/min um Aufschäumen zu vermeiden). Als Pufferlösung wurde 20 mM Tris HCl pH 8 verwendet. Typische Volumenverhältnisse von Gel zu Lösung waren 2,5 ml auf 500 ml, die Entnahme von 1 ml Volumenaliquoten für die Aufnahme der Konzentrations-Zeit Kurven führte somit zu keiner Verfälschung der Konzentrationsverhältnisse. In Abhängigkeit von der Zeit wurden Proben vom Überstand gezogen welche photometrisch gegen eine BSA Standardlösung bei 280 nm gemessen wurden. Bei den Gelen wurde der Konzentrations Zeit Verlauf für folgende Ausgangskonzentrationen untersucht: $C_0 = 0,25$ mg/ml, $C_0 = 0,5$ mg/ml, $C_0 = 1$ mg/ml, $C_0 = 2$ mg/ml. Die Gleichgewichtsbindungskapazitäten Q_{\max} der in Tabelle 8.1 angeführten Gele wurde als Grenzwert der ($t \rightarrow \infty$) für $C_0 = 2$ mg/ml ermittelt. Die Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung wurde auf 3 Stunden festgelegt. Dieser Wert war ausreichend, da bei allen Fractogel[®]-Ionenaustauschern nach ca. 15 min 99 % von Q_{\max} erreicht waren.

3. Die Aufnahme von Durchbruchkurven

Für die Aufnahme einer Durchbruchkurve wurde das jeweilige Gel in eine 50– 16 mm Superformance Glassäule gepackt (Volumen ca. 5ml) und kontinuierlich mit einer Proteinlösung mit einem linearen Fluß von 2 cm/min beladen. Die Konzentration der Proteinlösung betrug 2 mg/ml. Die Proteinlösungen wurden bis zur vollständigen Sättigung $C/C_0 > 99 \%$ über den Adsorber gepumpt. Als Durchbruchwert wurde $C/C_0 = 0,1$ betrachtet. Zur Bestätigung der ermittelten Wertes wurde das gebundene Protein desorbiert.

Dazu wurde mit Grundpuffer nachgewaschen und das gebundene Protein mit einer Kochsalzlösung eluiert und photometrisch der Proteingehalt bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

Für die Untersuchungen wurden für die Beladung (A), das Nachwaschen (B) und die Elution des gebundenen Proteins (C) die folgenden wässrigen Salzlösungen verwendet.

Anionenaustauscher :

- Lösung A : 20 mM TrisHCl Puffer pH 8 + Rinderserumalbumin 2 mg/ml
- Lösung B : 20 mM TrisHCl Puffer pH 8
- Lösung C : 20 mM TrisHCl Puffer pH 8 und 1 M Kochsalz

Kationenaustauscher :

- Lösung A : 20 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer pH 7 + Lysozym
2 mg/ml
- Lösung B : 20 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer pH 7
- Lösung C : 20 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer pH 7 und 1 M Kochsalz

Folgender Ablauf der Beladung und Elution bei der Bestimmung von Bindungskapazitäten und der Aufnahme von Durchbruchkurven wurde bei allen Experimenten mit Ionenaustauschergelen eingehalten:

1. Äquilibrieren mit 10 Bettvolumina Puffer A
2. Beladung mit der Proteinlösung
3. Nachwaschen mit 10 Bettvolumina von Puffer B
4. Desorption des Proteins mit Puffer C und photometrische Bestimmung bei 280 nm.
5. Reinigen des Gels oder des Moduls mit 1 M Natronlauge (10 Bettvolumina)

Die Kapazität von Ionenaustauschern wird, wie in Kapitel 4 gezeigt, wesentlich vom Porenvolumen bestimmt. Es wurde deshalb das zugängliche Porenvolumen der polymermodifizierten Ionenaustauscher bestimmt und mit den Ionenaustauschern verglichen, welche nach konventionellen Verfahren hergestellt wurden.

4. Bestimmung des Porenvolumens mittels Gelfiltration

Es wurden Gelfiltrationstrennungen in einer Lösung aus 350 mM Kochsalz und 20 mM Phosphatpuffer pH 7 mit den Probensubstanzen : Dextranblau (Molmasse 210^6 Da), Rinderserumalbumin (Molmasse $6,6 \cdot 10^4$ Da), Lysozym aus dem Hühnerei (MW $1,4 \cdot 10^4$ Da) und Aceton durchgeführt (350 mM Kochsalz wurden zur Verhinderung der ionischen Adsorption von Rinderserumalbumin zugegeben).

Bedingungen:

Säule: 300-10 mm Superperformancesäule (Volumen etwa 22 ml)
Probe: 0,1 ml Probenvolumen (Konzentration ca. 1 mg/ml)
Fluss: 1 ml/min
Detektion: UV bei 280 nm
Anlage: Merck-Hitachi (Inertversion)

9 Literatur

- [1] Knorre W. A., "Gentechnische Herstellung von Arzneimitteln" 87, in Pharmazeutische Biotechnology, ed. Kayser O., Müller R. H., WVG Stuttgart, 369, 2000
- [2] Cohen S. A. et. al., Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. , USA, 70, 3240, 1973
- [3] in "The Biopharm Guide" Firmenschrift von BioPharm
- [4] Produktkatalog der Fa. TOSOH BIOSEP GmbH
- [5] Wheelwright S. M., Bio/Technology 5, 789, 1987
- [6] in "Separation Process in Biotechnology" ed. J. A. Asenjo, Marcel Dekker, 625, 1990

- [7] in "Handbook of Process Chromatography", ed. Sofer G., Hagel L, Academic Press, 53, 1997
- [8] in "protein liquid chromatography" Journal of Chromatography Library volume 61, ed. Kastner M., 2000
- [9] Leonhard M., New packing materials for protein chromatography, J. Chromatogr. B, 699, 3-27, 1997
- [10] Arshady R., Beaded polymer supports and gels; I. Manufacturing techniques, J. Chromatogr. A, 586, 181-197, 1991
- [11] Produktkatalog der Fa. Merck KGaA
- [12] Müller W., New ion exchangers for the chromatography of biopolymers, J. Chromatogr. A, 510, 133-140, 1990
- [13] Brooks D. E., Müller W., Size-Exclusion Phases and Repulsive Protein-polymer Interaction/recognition, J. Mol. Recogn., 9, 697-700, 1996
- [14] Müller E. "Coupling Reactions" in "protein liquid chromatography" Journal of Chromatography Library-volume 61, ed. Kastner M, 2000, 705-716
- [15] Müller E., et.al., "Aktivierte Trägermaterialien, ihre Herstellung und Verwendung", EP 0565 978, 1993
- [16] Müller E., " Trennmaterialien für die hydrophobe Chromatographie", WO 95/02820, 1993
- [17] Müller E., Gensert R, Poguntke P." Ionenaustauscher", EP 0722 360 B1, 1994
- [18] Müller E., "Verfahren und Träger für die Gelpermeationschromatographie", EP 0722 362,1993
- [19] Müller E., et. al., "Immobilisierte Enzyme", EP 0691 887 B1, 1993

- [20] Müller E., Morr M. "Nukleosidhaltiges Sorbens für die Affinitätschromatographie", EP 0721372 B1, 1996
- [21] Müller E., "Epoxy-Derivate von Polyacrylamiden", EP 0722361, 1994
- [22] Müller E., Morr M., "Immobilization of Nucleotides" in "protein liquid chromatography" Journal of Chromatography Library-volume 61, ed. M. Kastner, 2000, 705-716
- [23] Müller E., Gensert R., Seiler A., "Polymerisationsfähige Derivate von Polyamiden", WO 96/22316, 1996
- [24] Müller E., Seiler A., "Azlacton-Derivatisierte Polyamide", WO 98/01496, 1996
- [25] Müller E., "Beseitigung von Kontaminationen aus biologischen Produkten", WO 9947227, 1998
- [26] Müller E., Regner J., Wollbeck R. "Miniaturisierte Trennsäule", WO 99/60394, 1999
- [27] Donovan J., Rabel F., Zahran J., Protein separations on tentacle ion exchangers, Am. Biotechnol. Lab., 9, 20, 1991
- [28] Janzen R., Unger K. K., Müller W., Hearn M. T. W., Adsorption of proteins on porous and non-porous poly(ethyleneimine) and tentacle-type anion exchangers, J. Chromatogr. A, 522, 77-93, 1990
- [29] Chase H. A., Prediction of the performance of preparative affinity chromatography, J. Chromatogr. A, 297, 179-202, 1984
- [30] Arnold F. H., Blanch H. W., Wilke C. R., Analysis of Affinity Separations I. Predicting the Performance of Affinity Adsorbers, Chem. Eng. J., 30 B9B23, 1985
- [31] Tsou H.-S., Graham E. E., Prediction of Adsorption and Desorption of Protein on Dextran Based Ion-Exchange Resin, AIChE J., 31, 12, 1959-1966, 1985
- [32] Graham E. E., Fook C. F., Rate of Protein Absorption and Desorption on Cellulosic Ion Exchangers, AIChE J., 28, 2, 245-250, 1982

- [33] Yoshida H., Yoshikawa M., Kataoka T., Parallel Transport of BSA by Surface and Pore Diffusion in Strongly Basic Chitosan, *AIChE J.*, 40, 12, 2034 - 2044, 1994
- [34] Miyabe K., Guichon G., Kinetic study of the mass transfer of bovine serum albumin in anion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A*, 866, 147171, 2000
- [35] Weaver L. E. Jr., Carta G., Protein Adsorption on Cation Exchangers: Comparison of Macroporous and Gel-Composite Media, *Biotechn. Prog.*, 12, 342-355, 1996
- [36] Hunter A. K., Carta G., Protein adsorption on novel acrylamidebased polymeric ion exchangers; II. Adsorption rates and column behavior, *J. Chromatogr. A*, 897, 81-97, 2000
- [37] in "Expanded Bed Adsorption" Firmenschrift von Amersham Pharmacia Biotech, 40,2002
- [38] Internet homepage der FDA, Guidance for Industry, Drug Substance Purification 3.4.2 vol. 14.2.3.6,1987
- [39] Internet homepage der EMEA, Note for Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, 1999
- [40] in "Handbook of Process Chromatography", ed. Sofer G., Hagel L., Academic Press, 119, 1997
- [41] Bulk Biological Master File Nummer :3907, Fa. TOSOH, 1998
- [42] Deutsche chromatographische Grundbegriffe zur IUPAGNomenklatur, Herausgegeben vom Arbeitskreis Chromatographie der Fachgruppe Analytische Chemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Bearbeitet von H.Engelhardt und L.Rohrschneider, entsprechend der IUPAG-Empfehlung "Nomenclature for Chromatography" (*pure and Appl.Chem.*Vol.65, 819872,1993)
- [43] Bradford M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976

- [44] Anspach B., Gruppenselektive Sorbentien in der Feinreinigung von Proteinen, Habilitationsschrift, Universität Braunschweig, 1998
- [45] in "Numerische Methoden an Beispielen aus der Chemischen Verfahrenstechnik" Seidel-Morgenstern A., Schramm O., Otto-von-Guericke Universität, 58, Letzte geänderte Auflage 1998
- [46] O'Shannessy D. J., Hoffman W. L., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 9, 488, 1987
- [47] Chase H. A., Prediction of the performance of preparative affinity chromatography, *J. Chromatogr.*, 297, 179-202, 1984
- [48] Boschetti E. in "Bioseparation and Bioprocessing" Vol. 1, ed. Subramanian G., Wiley VCH, 1998
- [49] Müller, E., "The Design of Resins for Biochromatography", 10th Annual Meeting of the Recovery of Biological Products, Cancun, Juni 2001
- [50] Kato Y., Kitamura T., Mitsui A., Hashimoto T., High-performance ion-exchange chromatography of proteins on non-porous ion exchangers, *J. Chromatogr.*, 398, 327-334, 1987
- [51] Kozeny L., *Ber. Wien Akad.*, 136a, 271, 1927
- [52] Horvath J., Boschetti E., Guerrier L., Cooke N., High-performance protein separations with novel strong ion exchangers, *J. Chromatogr. A*, 679, 1122, 1994
- [53] Roper D. K., Lightfoot E. N., Separation of biomolecules using adsorptive membranes, *J. Chromatogr. A*, 702, 3, 1995
- [54] Müller E., Baurmeister U., Preparation of and optimal module housings for hollow fibre membrane ion exchange, *J. Mol. Recognition*, 11, 273-278, 1998
- [55] Cuatrecasas P., Agarose Derivates for Purification of Protein by Affinity Chromatography, *Nature* 228, 1327-1328, 1970
- [56] in : "Immobilized Affinity Ligand Techniques " ed. Hermanson G. T., Malia A. K., Smith P. K., Academic Press, San Diego, 67, 1992

- [57] in "Affinity Chromatography"
ed. Lowe C. R. L., Wiley, New York, 28, 1974
- [58] Kurganov A., Davankov V., Unger K., Ion-exchange high-performance liquid chromatography of nucleotides and polypeptides on new types of ionexchange sorbents, based on polystyrene-coated silicas, J. Chromatogr. A, 548, 207-214, 1991
- [59] Frere Y., Gramain P.
React. Polym. 16, 137, 1991
- [60] Ivanov A. E.; Zubov V., Adsorption and separation of proteins on composite anion exchangers with poly(N-diethylaminoethylacrylamide) bonded phases, J. Chromatogr. A, 673, 159-165, 1994
- [61] Kempe M., Mosbach K., Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases, J. Chromatogr. A, 691, 317323, 1995
- [62] Andersson L.I., Nicholls I.A.; Mosbach K., "Antibody mimics obtained by noncovalent molecular imprinting", in "Immunoanalysis of Agrochemicals", ed. Nelson J.O. et.al., Washington, American Chemical Society, 8996, 1995
- [63] Wulff G., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 34, 1812, 1995
- [64] In "Porous Silica" ,ed. K. K. Unger, Elsevier, 1979
- [65] Galushko S.V., kamenchuk A.A., LC GC Int., 8, 581587, 1995
- [66] Jennissen H., Hydrophobic interaction chromatography: the critical hydrophobicity approach, Int. J. Biochrom., 5, 131-163, 2000
- [67] Porath J., Flodin P., Nature, 183, 1657, 1959
- [68] Peterson E. A., Sober H. A., J. Am. Chem. Soc., 76, 1711-1712, 1954
- [69] In: " Gel Filtration" Theorie und Praxis, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, ISBN 94 97-0490-2-6, 1979

- [70] Heitz W., Ulliner H., Hoecker H., Gelchromatographie, Makromol.Chem., 98, 42, 1966
- [71] Boschetti E., Polyacrylamide derivates to the service of bioseparation, J. Biochem. Biophys. Methods 19, 21-36, 1989
- [72] Afeyan N. B. et. al., Flow-through particles for the high-performance liquid chromatographic separation of biomolecules: perfusion chromatography, J. Chromatogr. A, 519, 1, 1990
- [73] "Poros-Ionenaustauscher" Firmenschrift der Fa. Perseptive, 1994
- [74] Müller E., Britsch L., Immelmann A., Int. J. Biochrom., 5 (4), 267-281, 2000
- [75] Heeter G. A., Liapis A. I., Effects of structural and kinetic parameters on the performance of chromatographic columns packed with perfusive and purely diffusive adsorbent particles, J. Chromatogr. A, 743, 3-14, 1996
- [76] Varady L., Fimbriated stationary phases for proteins, J. Chromatogr. A, 631, 107-114, 1993
- [77] Wang Q. C., Svec F., Frechet J. M. Macroporous Polymeric Stationary Phase Rod as Continuous Separation Medium for Reversed-Phase Chromatography, J., Anal. Chem. 65, 2243-2248, 1993
- [78] Roper D. K., Lightfoot E. N., Separation of biomolecules using adsorptive membranes, J. Chromatogr. A, 702, 3-26, 1995
- [79] Ishizuka N. et.al., Designing monolithic double-pore silica for high speed liquid chromatography, J. Chrom. A, 797, 133-137, 1998
- [80] in "Biopolymere" ed. Ebert G., Verlag Teubner, 1, 1993
- [81] Norde W. "Advances in Colloid and Interface Science", 267-340, Elsevier 1986
- [82] Privalov P. L., Stability of Proteins, Adv. Protein Chem., 33, 167-241, 1979

- [83] Shirley B. A. et. al., Contribution of Hydrogen Bonding to the Conformational Stability of Ribonuclease T1, *Biochemistry*, 31, 725-732, 1992
- [84] Ptitsyn O. B., Uversky V. N., The molten globule is a third thermodynamical state of protein molecules, *FEBS Lett.*, 341, 15-18, 1994
- [85] Kiefhaber T. et. al., Protein Aggregation in vitro and in vivo: A Quantitative Model of the Kinetic Competition between Folding and Aggregation, *Biotechnology*, 9, 825-829, 1991
- [86] Welling G. W., Welling-Wester S., in "protein liquid chromatography" *Journal of Chromatography Library*-volume 61, ed. Kastner M., 527-549, 2000
- [87] Scopes R. K. in "Protein Purification-Principles and Practice", 41-47, Springer 1987
- [88] Timasheff S. N. in: "Stability of Protein Pharmaceuticals", Part B, 265-285, Plenum Press, 1992
- [89] Monsan P., Stabilization of Enzyme Activity, *World Biotech. Report*, 1, 379, 1984
- [90] Lee J. C., Timasheff S. N., The stabilization of Proteins by Sucrose, *J. Biol. Chem.*, 256, 7193-7201, 1981
- [91] Mozhaev V. V., Martinek K., Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes, *Enz. Microb. Technol.*, 6, 505-9, 1984
- [92] Brash J. L. , Horbett T. A. in : "Protein at Interfaces II ", ACS Symposium Series, No.602, ACS, Washington, 1995
- [93] Norde W., Adsorption of Proteins from Solution at the Solid-Liquid Interface, *Adv. Colloid Inter. Sci*, 25, 267-340, 1986
- [94] Andrade J. D. in "Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers" (Vol. 2), 47-75, Plenum Press, 1985
- [95] Andrade J. D, Hlady V., Wei A.P., Adsorption of complex proteins at interfaces, *J. Appl. Chem.*, 64 (11), 1777-1781, 1992

- [96] Oroszlan P., Blanco R., Lu X.-M., Yarmush D., Karger B. L., Intrinsic fluorescence studies of the kinetic mechanism of unfolding of lactalbumin on weakly hydrophobic chromatographic surfaces, *J. Chromatogr. A*, 500, 481-502, 1990
- [97] Soderquist M. E., Walton A. G., *J. Colloid Interface Sci.*, 75, 386-392, 1980
- [98] Hansen E., Mollerup J., Application of the two-film theory to the determination of mass transfer coefficients for bovine serum albumin on anion-exchange columns, *J. Chrom. A*, 827, 259-267, 1998
- [99] Henis J. M. S., Tripodi M. K., Stinson D. I., EP 0221046 B1, 1986
- [100] Barnes R.G., Chu C., Emond G.T., US Patent 4473475, 1984
- [101] Müller E., Baurmeister U, Abstracts, 11th Meeting of ISPPP, Luxembourg, 1996
- [102] Kobayashi K. et.al., Preparation of microfiltration membranes containing anion exchange groups, *J. Membr. Sci.*, 76, 209-218, 1993
- [103] in "Solid phase peptide synthesis-a practical approach", IRL Press Oxford, 1989
- [104] Kassel D. B., *Chem. Rev.*, Combinatorial Chemistry and Mass Spectrometry in the 21st Century Drug Discovery Laboratory 101, 255-267, 2001
- [105] Alpert A. J., Regnier F. E. , Preparation of a porous microparticulate anion-exchange chromatography support for proteins, *J. Chromatogr. A* 185, 375, 1979
- [106] Meiller F., Bonnebat C., Deleuil M., US Patent 3984349, 1984
- [107] Beskow T. C., Kusharyoto W., Anspach F. B., Kroner K. H., Decker W. D., Surface modification of microporous polyamide membranes with hydroxyethyl cellulose and their application as affinity membranes, *J. Chromatogr. A.*, 715, 49- 65, 1995
- [108] Tayot J.-L., Tardy m., Gattel P., Plan R., Rouminantzeff M. in "Hydrophobic Ion Exchange and Affinity Methods" Epton R. ed., Ellis Horwood, Chichester, 95, 1978

- [109] Yamagishi H. et. al., Molecular weight distribution of methyl methacrylate grafted onto a microfiltration membrane by radiation-induced graft polymerisation, *J. Mem. Sci.*, 85, 71-80, 1993
- [110] Kosaka Y., Uemura M., Hashimoto T., Fukano K., US Patent 4045353, 1992
- [111] Buchmeiser M. R., Seeber G., Mupa M., Bonn G. K., Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases, *Chem. Mater.*, 11, 1533 - 1540, 1999
- [112] Tsuneda S. et.al., Water/Acetone permeability of porous hollowfiber membrane containing diethylamino groups on the grafted polymer branches, *J. Mem. Sci.*, 58, 221-234, 1991
- [113] Chang J. E., El Rassi Z., Horvath C., *J. Chromatogr.*, 316, 513, 1984
- [114] Brunauer S., Mikhail R. Sh., Bodor E. E., *J. Colloid Interface Sci.*, 24, 451, 1967
- [115] Coffman J. L., PhD Thesis, University of Wisconsin, 1994
- [116] Prucker O., Rhe J., Synthesis of Poly(styrene) Monolayers Attached to High Surface Area Silica Gels through SelfAssembled Monolayers of Azo Initiators, *Macromolecules*, 31, 592-601, 1998
- [117] Engelhardt h., Lw H., Eberhardt W., Mauss M., Polymer Encapsulated stationary Phases, Advantages, Properties and Selctivities, *Chromatographia*, 27, 535, 1989
- [118] Rhe J., Mageschneiderte Oberflchen durch molekular dnne Filme aus terminal gebundenen Polymeren, *Habilitationsschrift*, Universitt Bayreuth, 1995
- [119] Hanson M., Unger K. K., Schomburg G., Non-porous polybutadiene-coated silicas as stationary phases in reversed-phase chromatography, *J. Chromatogr. A*, 517, 269, 1990
- [120] Kou C. R. et. al., Reversed phase and normal phase liquid chromatography on poly(1-vinyl-2-pyrrolidone) or poly(1-vinylimidazole) bonded silica using γ -

- methacryloxypropyltrimethoxysilane as coupling agent stationary phases 23*,
Fresenius J. Anal. Chem., 336, 409, 1990
- [121] Jungbauer A., Boschetti E., Manufacture of recombinant proteins with safe and validated chromatographic sorbents, J. Chromatogr. B, 662, 143-179, 1994
- [122] Mino G., Kaizermann S., A new Method for the Preparation of Graft Copolymers. Polymerisation Initiated by Ceric Ion Redox Systems, J. Polym. Sci., 31, 242, 1958
- [123] Lenka M., Nayak P. L., Munmaya M. K., Grafting Vinyl Monomers onto Cellulose. I Graft Copolymerisation of Methyl Methacrylate onto Cellulose using Quinquevalent Vanadium Ion, J. Appl. Polym. Sci., 25, 1323-1333, 1980
- [124] Samal R. K., Satrusallya S. C., Sahoo P. K., Hexavalent Chromium-Initiated Graft Copolymerization of Methyl Methacrylate onto Cellulose, J. Appl. Polym. Sci., 29, 319-327, 1984
- [125] Brockway C. E., Estes R. R., Smith D. R., US Patent 3095391
- [126] Morin B. P., Breusova I. P., Rogovin Z. A. in Advances in Polymer Science 42, 140-164, Springer 1982
- [127] Müller E., experimentelle Ergebnisse, Merck KGaA
- [128] Ratanayke C. K., Regnier F. E., Study of protein binding to a silica support with a polymeric cation-exchange coating, J. Chromatogr. A, 743, 15-23, 1996
- [129] in "Lehrbuch der Organischen Chemie" ed. Walter W., Beyer H., Hirzel Verlag, 500, 1988
- [130] Bayülken S., Sarac A. S., Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Some Amino Acids with Cerium (IV), Zeitschrift Phys. Chemie, 205, 181-192, 1998
- [131] Produktkatalog der Fa. Merck KGaA, Bioprocessing, Fractogel® EMD Process Media, 2001-2002
- [132] Scopes R. K., Strategies for enzyme isolation using dyeligan and related adsorbents, J. Chromatogr. B 376, 121-130, 1986

- [133] Langone J. J., Applications of Immobilized Protein A in Immunochemical Techniques, J. Immunol. Meth., 55, 277-296, 1982
- [134] Porath J., Carlsson J., Olsson I., Metal chelate affinity chromatography, a new approach of protein fractionation, Nature 258, 598-599, 1975
- [135] Porath J., Sundberg L., Fornstedt L., Olsson I., Salting-out in Amphiphilic Gels as a New Approach to Hydrophobic Adsorption, Nature 245, 465-466, 1973
- [136] in "Protein Purification"
ed. Janson J.- C., Ryden, L. VCH Weinheim 1992, S. 117
- [137] in "Organikum" ed. Becker H. G. O., Verlag für Grundstoffindustrie, 1976
- [138] in „ Das Basiswissen der organischen Chemie“ ed. J. Bülle, A. Hüttermann, Thieme, 17, 2000.
- [139] Sundberg L., Porath J., Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography ; I. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes, J. Chromatogr., 90, 87-98, 1974
- [140] Porath J., Fornstedt N., Group fractionation of plasma proteins on dipolar ion exchangers, J. Chromatogr. 51, 479-489, 1970
- [141] Pribl M., Fresenius Z. Anal. Chem., 303, 113-116, 1980
- [142] in "Ring Opening Polymerization", Ivin K.J., Saegusa T., ed., 3 Volumes, Elsevier Science, London, New York, 1984
- [143] Diamantoglou M., Vienken J., Macromol. Symp. 103, 31-42, 1996
- [144] Inman D. J., Hornby W. E., The immobilization of enzymes on nylon structures and their use in automated analysis, Biochem. J., 129, 255-259, 1972
- [145] Klein E., Eichholz E., Yeager D. H., Affinity membranes prepared from hydrophilic coatings on microporous polysulfone hollow fibres, J. Membrane Sci. 90, 69-80, 1994

- [146] Kobayashi K. et. al., Preparation of microfiltration membranes containing anion exchange groups, *J. Membrane Sci.* 76, 209-218, 1993
- [147] Lebedev N. N., Shvets V., Kondratev L.T., *Tr.Mosk. Khim.-Tekhnolog. Inst.*, 54, 126, 1968
- [148] Hall H. K. Jr., Correlation of the Nucleophilic Reactivity of Aliphatic Amine, *J. Org. Chem.* 29, 3539-3544, 1964
- [149] Paul S. Randby B., Methyl Methacrylate (MMA) Glycidyl Methacrylate (GMA) Copolymers. A novel Method to Introduce Sulfonic Acid Groups on the Polymeric Chains, *Macrom.* 9, 337-340, 1976
- [150] Porath J., Maisano F., Belew M, *FEBS Lett*, Thiophilic adsorption-a new method for protein fractionation, 185, 306-310, 1985
- [151] Sulkowski E., Vastola K., Oleszek D Muenchhausen W. von in "Affinity Chromatography and related techniques" , Gribnau T. C. J. eds., Elsevier, 313, 1982
- [152] Staby A., Jensen I H., Comparison of chromatographic ion-exchange resins; II. More strong anion-exchange resins , *J. Chrom. A*, 908, 149-161, 2001
- [153] Hochuli E. et. al., Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent, *Biotechnology*, 1321, 1988
- [154] in „High Resolution NMR Spectroscopy in Solids“, ed.Mehring, M., 2.Auflage, Springer Verlag, 1983
- [155] Hutchens T. W., Porath J., Thiophilic Adsorption of Immunoglobulins Analysis of 00 Conditions Optimal for Selective Immobilization and Purification, *Anal. Biochem.*, 149, 217-226, 1986
- [156] Ngo T. T., Rapid purification of immunoglobulin G using aza-arenophilic chromatography: novel mode of protein-solid phase interactions, *J. Chromatogr. B*, 662, 351-356, 1994
- [157] in : "Immobilized Affinity Ligand Techniques " ed. Hermanson G. T., Malia A. K., Smith P. K., Academic Press, San Diego, 1992

- [158] Boschetti E., Advanced sorbents for preparative protein separation purposes, J. Chromatogr. A, 658, 207-236, 1994
- [159] Tyn M. J., Gusek T. W., Prediction of Diffusion Coefficient, Biotechnol. Bioeng. 35, 327 - 338, 1990
- [160] in "Makromoleküle" ed. Elias H. G., Hüthig Verlag, 618, 1990
- [161] Mino G., Kaizermann S., Rasmussen E., The Polymerization of Acrylamide initiated by Ceric Nitrate-3-Chloro-1-Propanol Redox Systems, J. Polym. Science 38, 393 - 401, 1959
- [162] in „Biophysikalische Chemie“ ed. Ackermann T., Springer Verlag, 60, 1992
- [163] Fler G. J., Lyklema J., Forces and Mechanism in the Adsorption of Uncharged and Ionizable Macromolecules and Proteins, Makromol. Chem., Macromol. Symp., 17, 39-56, 1988
- [164] in "Makromoleküle" ed. Elias H. G., Hüthig Verlag, 681, 1990
- [165] Kuhn W., Hargitay B, Katchalsky A., Eisenberg H., Reversible Dilation and Contraction by Changing the State of ionization of High Polymer acid method, Nature, 165, 514-516, 1950
- [166] Katchalsky A., Lifson S., Eisenberg H., J. Polymer Sci., VII, 571-574, 1951
- [167] de Boer M., et.al., Direct observation of intraparticle equilibration in adsorbents with CLSM, Poster, ISPPP 2002
- [168] Ho Y. S., Ng J. C. Y., McKay G., Kinetics of Pollutant Sorption by Biosorbents: Review, Sep. Purif. Meth., 29 (2), 189- 232, 2000
- [169] Chang C., Lenhoff A. M., Comparison of protein adsorption isotherms and uptake rates in preparative cation-exchange materials, J. Chromatogr. A, 827, 1998, 281-293
- [170] Gebauer K. H., Thömmes J., Kula M. R., in " Chemical Engineering Science " , 52, 405-419, Elsevier, 1996

- [171] Hashim M. a., Chu K. H., Tsan P. S., Determination of Lumped Rate Coefficients of Proteins: Effect of Adsorption, Chem. Eng. Technol., 19, 137142, 1996
- [172] in "Perry's Chemical Engineers Handbook" Green D. W. ed., 16, McGrawHill, New York, 1997
- [173] in "Conduction of Heat in Solid" Carslaw H. S., Jaeger J. C., Oxford University Press, 1959
- [174] in "The Mathematics of Diffusion" Crank J., ClarendonPress, Oxford, 94, 1976
- [175] Teo N. K., Ruthven D.M., Adsorption of Water from Aqueous Ethanol using 3 Å Molecular Sieves, Ind.Eng.Chem.Process Des Dev., 25, 1721, 1986
- [176] Skidmore G., Horstmann B. J., Chase H.A., Modelling singlecomponent protein adsorption to the cation exchanger s sepharose® FF, J. Chromatogr. A, 498, 113 128, 1990
- [177] Boschetti E., Guerrier L., Girot P., Horvath J., Preparative highperformance liquid chromatographic separation of proteins with HyperD ionexchange supports, J. Chromatogr. B., 664, 225-231, 1995
- [178] Armenante P., KirwanD. K., Mass transfer to microparticles in agitated systems, Chem. Eng. Sci., 49, 3277-3290, 1989
- [179] in Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography" Guichon G., Golshan - Shirazi S., Katti A. M. ed., Academic Press, Boston, 1994
- [180] Bohart G. S., Adams E. Q., Some Aspects of the Behavior of Charcoal with Respect to Chlorine, J. Am. Chem. Soc., 42, 523, 1920
- [181] Michaels A. S., Simplified Method of Interpreting Kinetic Data in Fixed-Bed Ion Exchange, Ind. Eng. Chem., 44, 1922, 1952
- [182] Hall K. R., Eagleton L. C., Acrivos A., Vermeulen T., Pore and Solid Diffusion kinetics in Fixed-Bed Adsorption under Constant Pattern Conditions, I&EC Fundamentals 5, 2, 212, 1966

- [183] Wicke E., Empirische und theoretische Untersuchungen der Sorptionsgeschwindigkeit von Gasen an porösen Stoffen I., *Kolloid-Z.*, 86, 167-186, 1939
- [184] Stimpson D. J., The Effect of Hollow Fiber Morphology on Affinity Membrane Performance, *Polym. Prep. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.*, 27, 424, 1986
- [185] in "Affinity Membranes" Klein E. ed., Wiley, New York, 131, 1991
- [186] in "Mikrofiltration mit Membranen" Rippberger S. ed., VCH, Weinheim, 38, 1992
- [187] Kubota N. et. al., Preparation of a hydrophobic porous membrane containing phenyl groups and its protein adsorption performance, *J. Chromatogr. A*, 718, 2734, 1995
- [188] Champluvier B., Kula M.-R., Microfiltration membranes as pseudo-affinity adsorbents: modification and comparison with gel beads, *J. Chromatogr. A*, 539 (2), 315-325, 1991
- [189] Finger U. B., Thömmes J., Kinzelt D., Kula M.-R., Application of thiophilic membranes for the purification of monoclonal antibodies from cell culture media, *J. Chromatogr. B*, 664, 69-78, 1994
- [190] Charcosset C. et. al., Protein A Immunoaffinity Hollow Fiber Membranes for Immunoglobulin G Purification: Experimental Charakterization, *Biotech. Bioeng.* 48, 415-427, 1995
- [191] Belfort G., Heath C. A., "Biotechnology processes : Membrane materials, modules and process design" in "Membrane Processes in Separation and Purification", Crespo J. G., Boddecker K. W. eds., Kluwer Academic, Boston, 926, 1994
- [192] Müller E., Klein E., "Membranes Modified for Biochromatography" in "Bioseparation and Bioprocessing" Vol. I, Subramanian G. ed., Wiley, Weinheim, 305, 1998
- [193] Briefs K. G. in "Proteinchromatographie mit modifizierten Membranen", VDI Verlag Reihe 17, Düsseldorf, 23, 1991
- [194] Brandt S., Membrane-based Affinity Technology for commercial scale purification, *Biotechnology*, 6, 779-782, 1988

- [195] in "Instrumentelle pharmazeutische Analytik" ed. Rücker G., Neugebauer M., Willems G.G., Stuttgart, Wiss. Verl. Ges. 2001
- [196] in „Liquid–Liquid Partition Chromatography of Biopolymers“ ed.Müller W., GIT Verlag Darmstadt, 1988
- [197] Scouten W.H. "Affinity Chromatography", John Wiley & Sons, New York,1981
- [198] Hiester K.N., Radding S.B., Nelson JR. R. L., Vermeulen T., Interpretation and Correlation of Ion Exchange Column Performance Under Nonlinear Equilibria, A.I.Ch.E. Journal, 1956,vol.2, 3, 404
- [199] in "Principles of Polymer Chemistry", Flory P.J., Cornell University Press, Ithaca, NY 1953
- [200] Berglof J.H., Adner N.P., Doversten S.Y., Inactivation of microbial contamination in chromatographic separation media using sodium hydroxide. XX Congress of the International Society of Blood Transfusion, London, July 10-15, 1988, Oral presentation.
- [201] Müller E., Schäfer C., Lubda D., "Poröse organische Polymerformkörper, WO 01/23083 A1, 2000
- [202] Skolnick J., Fixman M., Electrostatic persistence length of a wormlike polyelectrolyte, Macromolecules, 10, 944, 1977
- [203] Odijk T., Polyelectrolytes near the rod limit, J. Polym.Sci. Polym. Phys. Ed. 15, 477, 1977
- [204] Hagermann P.J., Electrostatic contribution to the stiffness of DNA molecules of finite length, Biopolymers, 22, 811, 1983

10 Symbole, Abkürzungen, Griechische Symbole

Symbole

a	spezifische Oberfläche (für kugelförmige Partikel $3/R_p$)
a_A	Gleichgewichtsaktivität des Analyten [mg/l]
a_{A-L}	Gleichgewichtsaktivität eines Analyten-Liganden Komplexes [mg/l]
a_{el}	elektrostatische Persistenzlänge [m]
a_L	Gleichgewichtskonzentration des Liganden [mg/ml]
A	experimentell bestimmte spezifische Oberfläche [m^2/g]
A_{BSA}	Fläche eines BSA Moleküls [m^2]
A_{Sorb}	gemessenen spezifische Oberfläche eines Sorbens [m^2]
A_v	Avogadrokonstante [mol^{-1}]
b_i	mittlerer Ladungsabstand auf einer Polyelektrolykette
BG	Beschichtungsgrad [%]
C_{Ligand}	spezifische Konzentration von Liganden [mg/ml]
C_f	dimensionslose Hilfsvariable in der Koczény-Karmann Gleichung (Siehe Abschnitt 2.3)
C	Gleichgewichtskonzentration in Lösung [mg/l]
C_i	Konzentration der Komponente i [mol/l]
C_0	Anfangskonzentration [mg/l]
d_{BSA}	hydrodynamischer Durchmesser eines BSA Moleküls [nm]
d_p	mittlerer Durchmesser der Poren [nm]
D	molekularer Diffusionskoeffizient in Lösung [m^2/s]
D_{ax}	axialer Dispersionskoeffizient [m^2/s]
D_O	Oberflächendiffusionskoeffizient [m^2/s]
D_P	effektiver Porendiffusionskoeffizient [m^2/s]
E_f	dimensionsloser Effektivitätsindex
ΔG_m	molare freie Enthalpie

H	Hilfsvariable, Def.Glg.6.23
j_i	Flussdichte der Komponente i pro Einheitsfläche [mol/m ² s]
k_B	Boltzmannkonstante [Ws]
k_f	Transportkoeffizient des Filmwiderstandes[cm/s]
k_i, k_p, k_t	Geschwindigkeitskonstanten der Polymerisationsreaktion
k_1	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante einer bimolekularen Reaktion [l/mol ² s]
K	Nernst'scher Verteilungskoeffizient [-]
K_A	Assoziationskonstante [l/mol]
K_D	Dissoziationskonstante [mol/l]
K_G	Verteilungskoeffizient von Substanzen bei der Gelfiltration [-]
K_{max}	maximaler linearer Anstieg der Konzentrationsabhängigkeit von Transportkoeffizienten (siehe Glg.6.28)
L	Säulenlänge [cm]
L_{cont}	Konturlänge einer Polymerkette: das Produkt aus Monomereinheitslänge und Anzahl der Monomere [nm]
L_W	wahre Länge eines ungestörten Polymerknäules
L_{Pore}	mittlere Länge einer Zylinderpore [µm]
Δm	Massenzunahme eines Trägermaterials nach einer Polymerisation [g]
m_{Gel}	Masse eines getrockneten Ionenaustauschergels [g]
m_{red}	dimensionslose Massenzunahme
M_A	Masse eines wasserfreien unmodifizierten Fractogel® [g]
M_{BSA}	Molekulargewicht von BSA [g/mol]
M_M	Gesamtmasse des eingesetzten Monomers in einer Polymerisationsreaktion [g]
M_n	Zahlenmittel eines Polymers[-]
M_P	Masse des wasserfreien Reaktionsproduktes (beschichtetes Gel) [g]
M_W	Molmassenmittel eines Polymers [g/mol]
n_i	Stoffmenge der Moleküle der Komponente i [mol]
N	Anzahl der Übertragungseinheiten

N_B	Anzahl der theoretischen Böden
N_F	Übertragungseinheit der Filmdiffusion
N_o	Übertragungseinheit der Oberflächendiffusion
N_P	Übertragungseinheit für die Porendiffusion
N_R	Übertragungseinheit der Reaktion
N_Z	Anzahl der Zylinderporen
Δp	Druckänderung [bar]
p_n	transzendente Wurzeln von Gleichung 8.20
P_e	Pecletzahl
$P_{e(cr)}$	kritische Pecletzahl (Glg.7.1)
PE	Pfropfeffizienz [%]
P_i	Polymerisationsgrad von Komponente i
q_{2D}	hypothetische maximale Bindungskapazität [g/ml] eines Proteins auf einer Geloberfläche in Monolayeranordnung
q_{3D}	hypothetische maximale Bindungskapazität [g/ml] eines Proteins im Porenraum eines Gels (dichteste Kugelpackung)
Q	molare Konzentration im Gleichgewicht in der Festphase [mg/ml]
Q_D	dynamische Bindungskapazität [mg/ml]
Q_G	Grenzbindungskapazität [mg/ml]
Q_{max}	maximale statische Bindungskapazität [mg/ml]
Q_V	Volumetrische Flussrate [cm ³ /ml]
r	Radiuskoordinate im Polarkoordinatensystem [m]
R	universelle Gaskonstante [Ws/mol \cdot grad]
$R_{au\ddot{u}sen}$	Radius einer Zylinderpore vor der Beschichtung [nm]
R_{innen}	Radius einer Zylinderpore nach der Beschichtung [nm]
R_P	Partikelradius [μ m]
R_{red}	dimensionsloser Radius einer Zylinderpore []
S	Stabilität einer polymeren Beschichtung [%]
t_c	mittlere Aufenthaltszeit einer Substanz in einer Säule [s]

$t_{D\#}$	mittlere Diffusionszeit einer Substanz [s],
T	absolute Temperatur [K]
T	Zeit [s]
T_r	dimensionsloser Durchsatz (Definition Glg.: 2.6)
u_s	linearer Fluß [m/s]
V_0	Retentionsvolumen von Dextranblau
V_e	Retentionsvolumen eines Proteins [ml]
V_{El}	Elutionsvolumen des gebundenen Proteins [ml]
$V_{E,0.5}$	Elutionsvolumen in halber Peakhöhe [ml]
V_{Fl}	Flüssigphasenvolumen [ml]
V_G	Gelvolumen [ml]
V_R	Elutionsvolumen von Aceton [ml]
V_P	Porenvolumen [ml]
$V_{Zylinderpore}$	Volumen einer Zylinderpore [ml]
V_Z	Zwischenkornvolumen [ml]
ΔV	Vergrößerung des Porenvolumens [cm ³]
Δx	Zunahme des Partikelradius [μ m] nach einer Pfropfpolymerisation
x	Monomerumsatz [mol/l]
z	Ortskoordinate im kartesischen Koordinatensystem
z_C	Koordinationszahl der nächsten Nachbarn im Flory-Huggins- Gittermodell
Z_{BSA}	Anzahl der BSA Moleküle in einer Zylinderpore in einer dichtesten Kugelpackung
z_i	Anzahl der elektrischen Einheitsladungen

Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
DEA	Diethylamino-
DEAE	Diethylaminoethyl-
EMD	Emanuel Merck Darmstadt
M_n	Polymerradikal
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
T-Gel	Gel für die thiophile Adsorption
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSK	Toyo Soda Kogyu bedeutet: Produziert von der Firma Toyo Soda

Griechische Symbole

ε	Gesamtporosität einer chromatographischen Säule[]
$\bar{\varepsilon}$	Leistungsaufnahme pro Einheitsmasse [cm^2/s^3]
ε_{ij}	Wechselwirkungsenergie eines ij Paares [Ws]
θ	Hilfsvariable, Def. Glg.6.17
κ	Übertragungskoeffizient
κ^2	Debye-Hückel Parameter [m^{-2}] (Siehe Abschnitt 5.1)
λ	Hilfsvariable, Def.Glg. 6.24
Λ	Hilfsvariable Def. Glg. 6.20
$\mu_i - \mu_{i0}$	chemisches Potential der i. Komponente bezogen auf den Standardzustand
ν	kinematische Viskosität [cm^2/s]
ρ	Dichte einer Polymerbeschichtung [g/cm^3]
τ	dimensionsloser Kanalfaktor
ϕ_i	Volumenbruch der Komponente i

φ_i elektrisches Potential der Komponente i [Volt/m]

χ_{ij} Flory-Wechselwirkungsparameter

11 Übersicht der verwendeten Trägermaterialien

Für die experimentelle Charakterisierung von polymer-beschichteten Trägermaterialien wurde eine Auswahl von Forschungsmustern hergestellt. Die Eigenschaften dieser Gele wurden mit kommerziell erhältlichen Trägermaterialien verglichen. Alle synthetisierten oder käuflich erworbenen Gele sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 14.1 : Übersicht über die verwendeten Trägermaterialien

Trägermaterial	Beschichtungsmethode und polymeranaloge Reaktionen	Experimentelle Charakterisierung
Fractogel® EMD DEA (M) ¹ , Forschungsmuster, Anionenaustauscher	verschiedene Pfropfgrade von Polyglycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktion mit Diethylamin	Untersuchung der Massentransfereigenschaften in Kapitel 6.3 (Siehe Tabelle 6.1)
Fractogel® EMD TMA (M), Forschungsmuster, Anionenaustauscher	Pfropfpolymerisation mit Glycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktion mit Trimethylamin	Vergleichsmuster, Bindungskapazität in Tabelle 4.1 und 4.2.
Fractogel® EMD Sulfo (M), Forschungsmuster, Kationenaustauscher	Pfropfpolymerisation mit Glycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktion mit Hydrogensulfit	Vergleichsmuster, Bindungskapazität in Tabelle 4.3
Fractogel® EMD DEAE (M), kommerziell erhältliches Gel der Fa. Merck KGaA,	hergestellt durch Pfropfpolymerisation von Acrylamido N,N – Diethylaminoethylendiamin	Untersuchung der Massentransfereigenschaften in Kapitel 6.3 (Siehe Tabelle 6.1)
Toyopearl® TSK DEAE(M), kommerziell erhältliches Gel von der Fa. TOSOH Biosep GmbH	nichtpolymerer Anionenaustauscher	Untersuchung der Massentransfereigenschaften in Kapitel 6.3 (Siehe Tabelle 6.1)
Fractogel® EMD Chelat (M), kommerziell erhältliches Gel der Fa. Merck KGaA,	Pfropfpolymerisation mit Glycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktion mit Iminodiessigsäure	Siehe Kapitel 4.3.4, Metallchelataffinitätschromatographie

Fractogel®-IDA (M), Forschungsmuster	Reaktion von Fractogel® mit Epichlorhydrin und nachfolgende Reaktion mit Iminodiessigsäure	Charakterisierung der Spacereigenschaften (Siehe Kapitel 4.4)
Fractogel® Spacer IDA (M) Forschungsmuster	Reaktion von Fractogel mit 1,4 Butandiol diglycidether und nachfolgende Reaktion mit Iminodiessigsäure	Charakterisierung der Spacereigenschaften (Siehe Kapitel 4.4)
Fractogel®-DEA (M), Forschungsmuster	Reaktion von Fractogel® mit Epichlorhydrin und nachfolgende Reaktion mit Diethylamin	Charakterisierung der Spacereigenschaften (Siehe Kapitel 4.4)
Fractogel® Spacer DEA (M) Forschungsmuster	Reaktion von Fractogel mit 1,4 Butandiol diglycidether und nachfolgende Reaktion mit Diethylamin	Charakterisierung der Spacereigenschaften (Siehe Kapitel 4.4)
Fractogel® EMD TA kommerziell erhältliches Gel der Fa. Merck KGaA,	Pfropfpolymerisation mit Glycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktionen mit Hydrogensulfid, Divinylsulfon und Mercaptoethanol	Siehe Kapitel 4.3.5, Thiophile Adsorption
Fractogel® EMD Amino (M) kommerziell erhältliches Gel der Fa. Merck KGaA,	Pfropfpolymerisation mit Glycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktion mit Ammoniak	Ligandendichte in Tabelle 4.1
Polyamid 6 Hohlfasermembran DEA, Forschungsmuster ²	Blockpolymerisation mit Polyglycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktion mit Diethylamin	Bindungskapazität und Ligandendichte in Tabelle 4.1 und 4.2
Polyamid 6 Hohlfasermembran TMA, Forschungsmuster	Blockpolymerisation mit Polyglycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktion mit Trimethylamin	Bindungskapazität und Ligandendichte in Tabelle 4.1 und 4.2
Polyamid 6 Hohlfasermembran Sulfo, Forschungsmuster	Blockpolymerisation mit Polyglycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktion mit Hydrogensulfit	Bindungskapazität in Tabelle 4.3
DEA Ionenaustauscher auf verschiedenen Basismaterialien : Accurell, Polystyrolgel von Polymer Labs, Bioran, Cellulose, Sepharose 2B, Eupergit, Kieselgel Monospher	Pfropfpolymerisation mit Glycidylmethacrylat und nachfolgende Reaktion mit Diethylamin	Charakterisierung der Wechselwirkung : Pfropfsubstrat und Polymerkette (Tabelle 5.1 und 5.2)

¹ Partikelgröße 40 – 90 µm

² Daten der Hohlfasermembranen im Anhang A2

12 Physikalisch-Chemische Eigenschaften des Basismaterials Fractogel® HW 650 (M)

Da Fractogel HW 650 (M) sehr häufig in der Arbeit als Basimaterial verwendet wird, sind die wesentlichen Eigenschaften in der folgenden Tabelle aufgeführt :

Tabelle A1 : Wesentliche Parameter von Fractogel® HW 650 (M), Merck KGaA

Name	Fractogel® HW 650 (M), Merck KGaA Toyopearl® HW 650 (M), TOSOH GmbH
Struktur	Ethylenglykoldimethacrylat und 2,3 Epoxypropylmethacrylat
Partikelgröße ¹	40-90 µm
Porosität ²	80 %
mittlere Porengröße ³	65 nm

¹ bestimmt mit Coulter Counter Methode

² mit Gelfiltration

³ mit Gelfiltration und Quecksilberintrusion

Ein Elektronenmikroskopisches Bild der Fractogelpartikel zeigt Abbildung 10

Die Aufnahme zeigt die gleichmäßige Form der Partikel. Die Partikel haben eine bidisperse Porenstruktur. Das bedeutet, größere Gelpartikel sind aus wesentlich kleineren Mikropartikel aufgebaut.

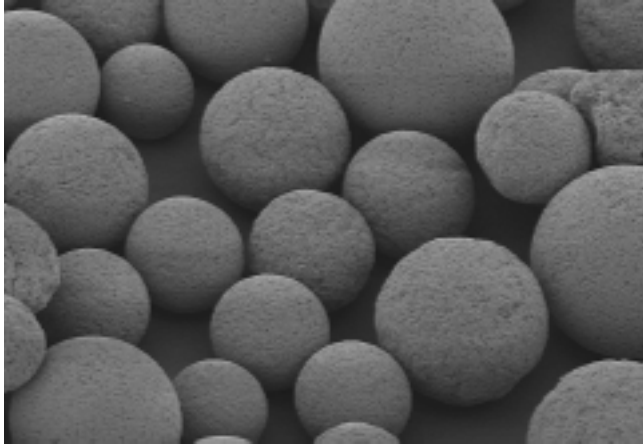


Abb. A1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Fractogelpartikeln

13 Datenblatt eines Anionenaustauscher-Hohlfasermoduls

Membranmaterial	Polyamid 6 beschichtet mit Polyglycidylmethacrylat (42 % Pfüpfgrad) und umgesetzt zum Ionenaustauscher
Konfiguration	72 einseitig eingebettete Hohlfasern, haar-nadelförmige Anordnung
Faser Dimensionen :	
Innendurchmesser [μm]	300
Aussendurchmesser [μm]	500
Wanddicke [μm]	100
effektive Gehäuselänge [cm]	8
Gehäusevolumen [ml]	4,2
Porosität der Faser [%]	60
Membranvolumen [ml]	1,3
Membranfläche innen [cm^2]	86
Membranfläche aussen [cm^2]	149
Porendurchmesser [μm] ^P (Mittelwert)	0,2

Ligandendichte von
DEA Gruppen [mM]^a

00,57

^a Säure-Base Titration mit 0,1 M HCl (Membranvolumen)

14 Ableitung des Verteilungskoeffizienten von Pflropfpolymeren zwischen Trägeroberfläche und Lösung (modifizierte Flory-Huggins Beziehung Glg. 5.4)

Ausgangsbeziehung ist:

$$\frac{\Delta G_m}{RT} = n_1 \cdot \ln \phi_1 + n_2 \cdot \ln \phi_2 + n_3 \cdot \ln \phi_3 + n_1 \cdot \phi_1 \cdot \chi_{13} + n_1 \cdot \phi_3 \cdot \chi_{13} + n_2 \cdot P_2 \cdot \phi_3 \cdot \chi_{23} \quad (1)$$

dabei ist:

$$\phi_1 = \frac{n_1}{n_1 + P_2 \cdot n_2 + P_3 \cdot n_3} \quad (2)$$

$$\phi_2 = \frac{n_2 \cdot P_2}{n_1 + P_2 \cdot n_2 + P_3 \cdot n_3} \quad (3)$$

$$\frac{n_1}{n_1 + P_2 \cdot n_2 + P_3 \cdot n_3} \quad (4)$$

Es gilt:

$$\frac{\partial \left(\frac{\Delta G_m}{RT} \right)}{\partial n_3} = \frac{(\mu_3 - \mu_3^0)}{RT} = \frac{\Delta \mu_3}{RT} \quad (5)$$

Ableitung von (1) nach n_3 ergibt:

$$\frac{\partial \left(\frac{\Delta G_m}{RT} \right)}{\partial n_3} = \frac{n_1}{\phi_1} \cdot \frac{\partial \phi_1}{\partial n_3} + \frac{n_2}{\phi_2} \cdot \frac{\partial \phi_2}{\partial n_3} + \frac{n_3}{\phi_3} \cdot \frac{\partial \phi_3}{\partial n_3} + n_1 \cdot \chi_{12} \cdot \frac{\partial \phi_1}{\partial n_3} + n_1 \cdot \chi_{13} \cdot \frac{\partial \phi_3}{\partial n_3} + n_2 \cdot P_2 \cdot \chi_{23} \cdot \frac{\partial \phi_3}{\partial n_3} \quad (6)$$

die Ableitungen der Volumenbrüche nach n_3 sind :

$$\frac{\partial \phi_1}{\partial n_3} = -\frac{P_3 \cdot n_1}{(n_1 + n_2 \cdot P_2 + n_3 \cdot P_3)^2} = -\frac{P_3 \cdot \phi_1^2}{n_1} \quad (7)$$

$$\frac{\partial \phi_2}{\partial n_3} = -\frac{P_3 \cdot P_2 \cdot n_2}{(n_1 + n_2 \cdot P_2 + n_3 \cdot P_3)^2} = -\frac{P_3 \cdot \phi_2^2}{P_2 \cdot n_2} \quad (8)$$

$$\frac{\partial \phi_3}{\partial n_3} = \frac{P_3 \cdot (n_1 + n_2 \cdot P_2 + n_3 \cdot P_3) - P_3^2 \cdot n_3}{(n_1 + n_2 \cdot P_2 + n_3 \cdot P_3)^2} = \frac{\phi_3}{n_3} - \frac{\phi_3^2}{n_3} \quad (9)$$

Einsetzen von (7), (8) und (9) in (6) ergibt nach einigen Umformungen und unter Vernachlässigung der Terme die ϕ_3^3 enthalten Gleichung 5.3.

Der Verteilungskoeffizient kann durch Gleichsetzen der chemischen Potentiale von μ_3 in der Gelphase sowie in Lösung. Der Volumenbruch des Basispolymers in der mobilen Phase ist $\phi_{2l} = 0$.

Man erhält folgende Beziehung:

$$1 + \ln \phi_{3g} + P_3 \cdot \left(-\phi_{1g} - \frac{\phi_{2g}}{P_2} - \chi_{13} \cdot (\phi_{1g} \cdot \phi_{2g} - \phi_{1g}) + \chi_{13} \cdot \phi_{2g} \right) = 1 + \ln \phi_{3l} + P_3 \cdot (-\phi_{1l} + \phi_{1l} \cdot \chi_{13})$$

mit $\phi_{1g} \cong 1 - \phi_{2g}$ und $\phi_{1l} \cong 1$ erhält man Gleichung 5.4.