

**Herstellung eines Adsorbers für proteingebundene
Toxine durch Modifikation von
PA6-Mikrofiltrationsmembranen**

Vom Fachbereich 9 -Chemie-
der Bergischen Universität Wuppertal
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-
genehmigte Dissertation

von
Andreas Benfer
aus Sprockhövel

2003

für Bianka

meinen Eltern in Dankbarkeit

Eingereicht am:

02. Dezember 2003

Tag der mündlichen Prüfung:

23. Januar 2004

Referent:

Prof. Dr. H.-J. Altenbach

Korreferent:

Prof. Dr. M. Schneider

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2000 bis November 2003 am Lehrstuhl für Organische Chemie des Fachbereichs 9 - Chemie - der Bergischen Universität Wuppertal angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Altenbach gilt mein besonderer Dank für die interessante Aufgabenstellung, die gewährten wissenschaftlichen Freiräume sowie seiner Bereitschaft, mir jederzeit mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite zu stehen. Die freundliche Betreuung und zahlreiche anregende Diskussionen habe ich sehr zu schätzen gelernt.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch Aufzeichnung von Spektren oder Durchführung von Analysen zu dieser Arbeit beigetragen haben. Für die Unterstützung bei zahlreichen Messungen am Atomabsorptionsspektrometer danke ich Herrn A. Ligon. Frau I. Polanz danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren, Herrn R. Radon für die Elementaranalysen sowie Frau E. Smets für die Messung der Massenspektren. Für die Hilfe bei Farbstärkemessungen in Reflexion danke ich Herrn D.-W. Riegel.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die Unterstützung und die vielen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. In diesem Zusammenhang gilt meinen Laborkollegen Herrn A. Figge, Herrn A. Kotthaus und Herrn Dr. D. Merkel besonderer Dank.

Herrn A. Figge, Herrn A. Kotthaus und Frau A. Morcher danke ich für die schnelle Korrektur der Rohfassungen.

Für die angenehme Betreuung seitens der Fa. MAT GmbH & Co. KG, Obernburg möchte ich besonders Herrn Dr. U. Baurmeister, Herrn Dr. F. Bigos sowie Herrn S. Rasch danken.

Herrn Prof. Dr. M. Schneider danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Abstract

Novel affinity membranes were prepared by activation of nylon microfiltration membranes and subsequent ligand immobilisation.

Membrane activation was achieved by different methods. Conversion of terminal amino groups of nylon polymer with various diglycidyl ethers of OEGs led to epoxy activated membranes which were characterised by different spacer length between membrane surface and reactive anchor group.

Furthermore, epoxy groups were converted to terminal aldehydes via periodate oxidation and to primary amino groups by addition of diaminoethyl ethers of OEGs, respectively.

Activation was also achieved by building up dendritic structures on the membrane surface in order to amplify the number of anchor points for immobilisation of small ligands. Subsequent addition of acryloyl chloride and partial protected polyamines to the amino end groups led to four fold anchor group densities.

Ligand immobilisation was carried out by coupling serum albumin (BSA), glucose oxidase (GOx), several reactive dyes and β -cyclodextrin derivatives to different activated nylon membranes. Optimisation of coupling conditions led to high ligand densities related to available inner membrane surface for all investigated ligands.

Enzymatic activity of GOx immobilised membranes depended on type and density of anchor points. Highest enzymatic activities were found in case of coupling GOx to aldehyde activated membranes with low anchor point densities. Decreased activities resulted from multipoint binding to membranes with higher anchor point densities.

Obtained enzyme immobilised membranes disclose applications as membrane reactors for selective oxidation of sugars or pathogen substances in human blood.

Adsorption capacity for bilirubin was examined for BSA, reactive dye and β -cyclodextrin immobilised affinity membranes by recording equilibrium isotherms. Experimental data corresponded with calculated Langmuir isotherms.

Best adsorption capacities for bilirubin were observed for β -cyclodextrin immobilised affinity membranes which were prepared by coupling isothiocyanate derivatives of β -cyclodextrin to amino functional membranes. High potential for application within extracorporeal plasma treatment of patients suffer from hyperbilirubinemia can be expected for a derived membrane adsorber.

Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| AAS | Atomabsorptionsspektroskopie |
| Abb. | Abbildung |
| abs. | absolut |
| Ac | Acetyl |
| AH-Salz | adipinsaures Hexamethyldiamin |
| aq | wässrig |
| ASCl | Acrylsäurechlorid |
| β -CyD | β -Cyclodextrin |
| BCA | Bichinolindicarbonsäure |
| BDDGE | Butandioldiglycidylether |
| BOP | (Benzotriazol-1-yloxy)-tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat |
| BR | Bilirubin |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin) |
| <i>n</i> -BuOH | <i>n</i> -Butanol |
| CB F3G-A | Cibacron Blue F3G-A |
| CDI | 1,1'-Carbonyldiimidazol |
| CH | Cyclohexan |
| δ | chemische Verschiebung |
| d | Dublett |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DEAE | <i>N,N</i> -Diethylaminoethyl |
| dest. | destilliert |
| DGE | Diglycidylether |
| DiEGDGE | Diethylenglycoldiglycidylether |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DVB | Divinylbenzol |
| EDODEA | 2,2'-Ethyldioxydiethylamin |
| EDTA | Ethylendiaminotetraacetat |

| | |
|----------------|--|
| EGDGE | Ethylenglycoldiglycidylether |
| EGDMA | Ethylenglycoldimethacrylat |
| EI | Elektronenstoß (Electron Impact) |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| EtOAc | Essigsäureethylester |
| EtOH | Ethanol |
| EX 830 | DenacoI [®] EX 830 |
| EX 841 | DenacoI [®] EX 841 |
| EX 861 | DenacoI [®] EX 861 |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinucleotid |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl |
| FMP | 2-Fluor-1-methylpyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat |
| GC | Gaschromatogramm |
| ges. | gesättigt |
| GMA | Glycidylmethacrylat |
| GOx | Glucose-Oxidase |
| Hb | Hämoglobin |
| HDA | Hexandiamin |
| HEC | Hydroxyethylcellulose |
| HEMA | 2-Hydroxyethylmethacrylat |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| HSA | Humanserum-Albumin |
| IDA | Iminodiessigsäure |
| IgG | Immunglobulin G |
| IR | Infrarot |
| <i>J</i> | Kopplungskonstante |
| konz. | konzentriert |
| LAH | Lithiumaluminiumhydrid |
| m | Multipllett |
| <i>m</i> -CPBA | <i>m</i> -Chlorperbenzoesäure |
| MeOH | Methanol |
| min. | Minuten |
| MS | Massenspektroskopie |

| | |
|------------|--|
| MV | Membranvolumen |
| v | Valenzschwingung |
| NAD | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid |
| NaOAc | Natriumacetat |
| NHS | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |
| NMP | <i>N</i> -Methylpyrrolidin |
| NMR | Kernmagnetische Resonanz |
| OEG | Oligoethylenglycol |
| 2-PrOH | 2-Propanol |
| PA6 | Polyamid 6 (Nylon 6) |
| PA66 | Polyamid 66 (Nylon 66) |
| PAMAM | Polyamidoamin |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PETGE | Pentaerythrit-tetraglycidylether |
| PSu | Polysulfon |
| PTK | Phasentransferkatalysator |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| RF | Rückfluß |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| s | Singulett |
| SAM | selbstanordnende Monoschicht |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| t | Triplett |
| TAEA | Tris(aminoethyl)amin |
| TAMM | Tetrakis(aminomethyl)amin |
| TBAB | Tetrabutylammoniumhydrogensulfat |
| TEA | Triethylamin |
| TEPA | Tetraethylenpentamin |
| TetraEGDGE | Tetraethylenglycoldiglycidylether |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TriEGDGE | Triethylenglycoldiglycidylether |
| TRIS | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol |
| UV | Ultraviolett |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|------------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Membranen und Membranprozesse | 1 |
| 1.2 | Grundlagen der Affinitätschromatographie | 6 |
| 1.3 | Affinitätsmembranen | 13 |
| 1.4 | Zielsetzung | 25 |
| 2. | Durchführung | 29 |
| 2.1 | Aktivierung von Polyamidmembranen für die Ligandenimmobilisation | 29 |
| 2.1.1 | Bekannte Verfahren zur Funktionalisierung von PA6-Membranen | 29 |
| 2.1.2 | Aminoendgruppenaktivierung mit Diglycidylethern von OEGs und PEGs | 33 |
| 2.1.3 | Aufbau von dendritischen Strukturen | 45 |
| 2.2 | Ligandenimmobilisationen | 58 |
| 2.2.1 | Immobilisation von HSA und BSA | 58 |
| 2.2.2 | Immobilisation von Glucose-Oxidase (GOx) | 69 |
| 2.2.3 | Immobilisation von Reaktivfarbstoffen | 79 |
| 2.2.4 | Immobilisation von Cyclodextrinen | 89 |
| 2.2.5 | Zusammenfassung der ligandenimmobilisierten Membranen | 99 |
| 2.3 | Untersuchungen zur Adsorption proteingebundener Toxine | 100 |
| 2.3.1 | Bekannte Verfahren zu Entfernung proteingebundener Toxine | 100 |
| 2.3.2 | Adsorption von Bilirubin | 101 |
| 2.3.2.1 | Untersuchungen zur Bilirubinadsorption an ligandenimmobilisierten PA6-Membranen | 106 |
| 3. | Zusammenfassung und Ausblick | 119 |
| 4. | Experimenteller Teil | 127 |
| 4.1 | Allgemeine Angaben | 127 |
| 4.2 | Analytische Methoden | 132 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.3 | Synthesen der verwendeten Substanzen | 138 |
| 4.3.1 | Synthese von Diglycidylether (DGE) | 138 |
| 4.3.2 | Synthese von Ethylenglycoldiglycidylether (EGDGE) | 139 |
| 4.3.3 | Synthese der Diglycidylether von Oligoethylenglycolen | 140 |
| 4.3.4 | Diglycidylether von höheren OEGs und PEGs | 143 |
| 4.3.5 | Synthese von Pentaerythrit-tetraglycidylether (PETGE) | 143 |
| 4.3.6 | Synthese von Tetrakis(aminomethyl)methan (TAMM) | 144 |
| 4.3.7 | Synthese von trifluoracetylgeschützten Polyaminen | 147 |
| 4.3.8 | Synthese von 6 ^A -Desoxy-6 ^A -amino- β -cyclodextrin (NH ₂ - β -CyD) | 150 |
| 4.3.9 | Synthese von 6 ^A -Desoxy-6 ^A -isothiocyanato- β -cyclodextrin (NCS- β -CyD) | 153 |
| 4.3.10 | Synthese von fluoreszenzmarkiertem BSA | 155 |
| 4.4 | Aktivierung von PA6-Membranen für die Ligandenimmobilisation | 156 |
| 4.4.1 | Aminoendgruppenaktivierung mit Diglycidylethern von OEGs und PEGs | 156 |
| 4.4.2 | Überführung terminaler Epoxidgruppen in Aldehyde | 159 |
| 4.4.3 | Umsetzungen diglycidyletheraktivierter Membranen mit Diaminen | 160 |
| 4.4.4 | Aufbau von dendritischen Strukturen | 160 |
| 4.4.4.1 | Aminoendgruppenaktivierung mit Pentaerythrit-tetraglycidylether (PETGE) | 160 |
| 4.4.4.2 | Umsetzungen diglycidyletheraktivierter Membranen mit Polyaminen | 161 |
| 4.4.4.3 | Aminoendgruppenaktivierung mit Acrylsäurechlorid und Addition von Polyaminen | 162 |
| 4.5 | Ligandenimmobilisationen | 165 |
| 4.5.1 | Protein-Immobilisationen | 165 |
| 4.5.1.1 | Immobilisation von BSA | 165 |
| 4.5.1.2 | Immobilisation von Glucose-Oxidase (GOx) | 168 |
| 4.5.2 | Immobilisation von Reaktivfarbstoffen | 171 |
| 4.5.3 | Immobilisation von β -Cyclodextrin | 173 |
| 4.6 | Adsorption proteingebundener Toxine | 176 |
| 4.6.1 | Bestimmung der Bilirubin-Adsorptionsisothermen | 176 |
| 5. | Literaturverzeichnis | 181 |

1. Einleitung

1.1 Membranen und Membranprozesse

Allgemeine Einführung

Separationen von Stoffgemischen mit Membranen zeichnen sich im Vergleich mit vielen anderen Trennverfahren durch zahlreiche Vorteile aus und finden daher breite technische Anwendung. Die meisten Membranverfahren laufen ohne Phasenübergang bei Umgebungstemperatur ab und erlauben eine einfache, schonende und ökonomische Prozessierung großer Volumina.¹

Der Begriff Membran bezeichnet nach heute allgemein anerkannter Definition Trennmedien, die einen selektiven Transport zwischen zwei Phasen vermitteln², wobei dieser Transport durch zwei unterschiedliche Mechanismen beschrieben werden kann. Im ersten Fall erfolgt eine Stofftrennung nach geometrischer Größe der Komponenten entsprechend dem Porendurchmesser einer Membran (Siebeffekt), während im zweiten Fall eine Stofftrennung durch unterschiedliche Permeabilitäten der Komponenten, hervorgerufen durch unterschiedliche Löslichkeiten und Diffusionsgeschwindigkeiten in einer dichten Membran, erfolgt (Lösungs-Diffusions-Mechanismus).

Je nach Anwendung finden bei der Membranherstellung verschiedenste natürliche und synthetische, anorganische und organische, meist polymere Materialien wie z.B. Silikate, Cellulose und deren Derivate, Polyolefine, Polyamide oder Polysulfone Verwendung.

Neben dem zur Herstellung verwendeten Material kann eine Einteilung von Membranen nach unterschiedlichen Kriterien wie z.B. Porösität (porös/dicht), Querschnittstruktur (symmetrisch/asymmetrisch), Ladung (ungeladen/geladen) oder Homogenität erfolgen. Weiterhin besteht die Möglichkeit der in Tab. 1-1 dargestellten anwendungsbezogenen Einteilung nach unterschiedlichen Membrantrennverfahren.³

Zur Herstellung von Membranen stehen eine Vielzahl verschiedener Verfahren zur Verfügung, wobei die Auswahl des geeigneten Herstellungsprozesses durch das verwendete Material sowie die gewünschten Produkteigenschaften bestimmt wird. Die meisten kommerziell erhältlichen Membranen werden nach Trocken- oder Naßspinnverfahren hergestellt, wobei die Ausbildung einer porösen Struktur im letztgenannten Fall durch Austausch des Lösungsmittels einer Polymerlösung gegen ein Fällungsmittel (Sol-/Gelübergang) erfolgt. Die innere Strukturierung

und Symmetrie der erhaltenen Membranen werden durch viele Parameter wie z.B. Art und Temperatur von Lösungs- und Fällungsmittel, Viskosität der Lösung, Dicke des Solfilms sowie ggf. Zusatz von Additiven bestimmt.

Technische Anwendung finden Membranen in Form von flachen Scheiben, Schläuchen oder Hohlfasern, welche in unterschiedliche Gehäuseeinheiten eingebaut und so als Platten-, Wickel-, Rohr-, Kapillar- oder Hohlfasermodule angeboten werden.

| Membranverfahren | treibende Kraft | Trennmechanismus | bevorzugte Membranstruktur | Anwendung |
|---------------------------------|--|--|---|---|
| Mikrofiltration | hydrostatische Druckdifferenz (0.5 – 5)·10 ⁵ Pa | Siebeffekt | symmetrische Porenstruktur, Porengröße 0.02 – 10 µm | Abtrennung von suspendierten Stoffen |
| Ultrafiltration | hydrostatische Druckdifferenz (3 – 10)·10 ⁵ Pa | Siebeffekt | asymmetrische Porenstruktur, Porengröße der Trennschicht 1 – 20 nm | Konzentrieren u. Fraktionieren von Makromolekülen |
| Umkehrosiose | hydrostatische Druckdifferenz (10 – 100)·10 ⁵ Pa | molekularer Siebeffekt, unterschiedl. Löslichkeiten und Diffusion | asymmetrisch | Aufkonzentrieren von gelösten Stoffen |
| Dialyse | Konzentrationsdifferenz | unterschiedliche Löslichkeiten und Diffusion | homogen | selektiver Stoffaustausch |
| Elektrodialyse | elektrische Potentialdifferenz | unterschiedliche Löslichkeiten und Diffusion aufgrund unterschiedlicher Ladung | Polymermatrix mit positiven und negativen Ladungsträgern | Entsalzen von Lösungen, Abtrennen von Metallionen |
| Gastrennung | Partialdruckdifferenz (5 – 150)·10 ⁵ Pa | unterschiedliche Löslichkeiten und Diffusion | dünne, homogene Polymerschicht auf poröser Struktur | Trennen von Gasen und Dämpfen |
| Pervaporation | Partialdruckdifferenz bis 10 ⁵ Pa | unterschiedliche Löslichkeiten und Diffusion | dünne, homogene Polymerschicht auf poröser Struktur | Trennen von Lösungsmitteln und Azeotropen |
| Transmembrandestillation | Partialdruckdifferenz bis 10 ⁵ Pa | Phasentrennung durch hydrophobe Porenstruktur | mikroporöse Porenstruktur | Wasserentsalzung |

Tab. 1-1: Stofftrennverfahren mit Membranen

Mikrofiltration mit Membranen

Die Mikrofiltration ist das älteste Trennverfahren mit Membranen und geht auf Arbeiten von *Zsigmondy et al.* zurück, deren erste Publikation über Filter aus Cellulosenitrat bereits 1912 erschien.⁴

Bei dieser Art der Filtration werden Teilchen aus einer Flüssigkeit durch das Filtermedium abgetrennt, das unter Wirkung einer treibenden Druckdifferenz durchströmt wird. Mit einer Trenngrenze im Bereich von 0,02 bis 10 μm ist die Mikrofiltration zwischen der konventionellen Filtration und der Ultrafiltration einzuordnen. In Abb. 1-1 sind die Trenngrenzen gängiger Membranverfahren angegeben, um die Stellung der Mikrofiltration unter diesen zu verdeutlichen.

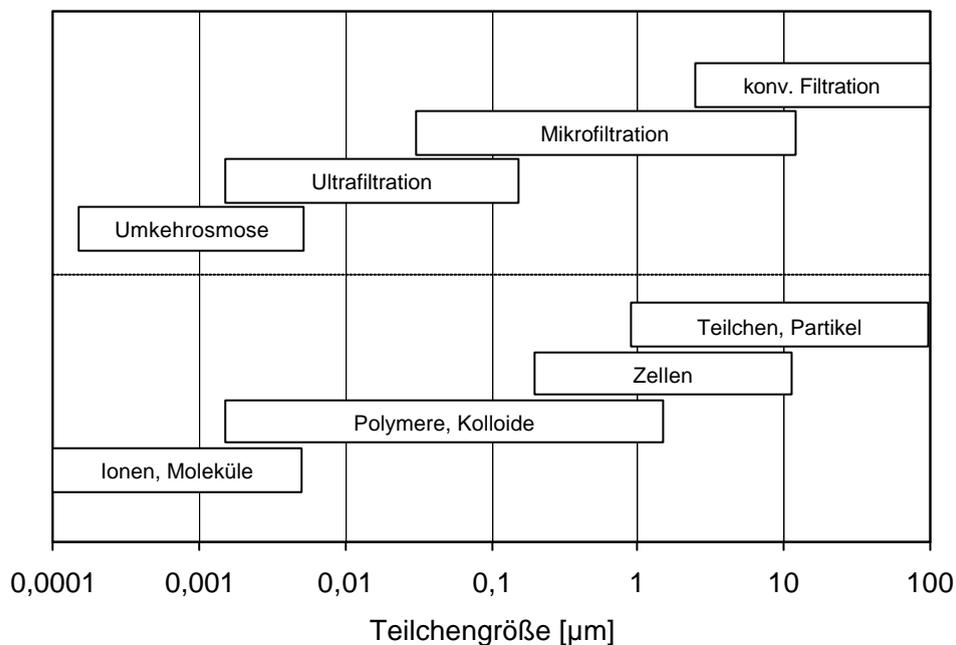


Abb. 1-1: Trenngrenzen von Filtrationsverfahren

Ursprünglich wurde die Mikrofiltration als reine Oberflächenfiltration entwickelt, wobei die abzutrennenden Stoffe die Membran nicht passieren, sondern auf der äußeren Membranoberfläche einen Filterkuchen bilden. Hierdurch steigt der hydraulische Widerstand und beeinflusst maßgeblich den erzielbaren Filtratfluß.

Man unterscheidet heute grundsätzlich die Verfahren der statischen (Dead-End-Filtration) und der dynamischen Mikrofiltration (Crossflow-Filtration). Bei der zuerst genannten Methode wächst die Dicke der Schicht aus abgetrennten Stoffen an der Membranoberfläche mit der Zeit

an, bis auch bei hohen Drücken nur noch eine geringe Flüssigkeitsmenge die Membran mit der Deckschicht durchströmt. Dann muß die Filtration unterbrochen und die Membran ausgetauscht werden. Bei der dynamischen Mikrofiltration wird der Deckschichtaufbau während der Filtration unterdrückt, indem durch die bei der Überströmung der Membranoberfläche auftretenden Scher- und Auftriebskräfte eine Abtrennung von Partikeln aus der Deckschicht und deren Rückführung in die Kernströmung erfolgt. In diesem Fall unterscheidet man zwei Hauptströmungen, deren Richtungen senkrecht zueinander angeordnet sind, nämlich den Filtratstrom durch das Filtermedium sowie die Überströmung parallel zum Filtermedium. In der Praxis werden hierdurch zeitlich konstante Filtratströme erzielt.^{1,3,5}

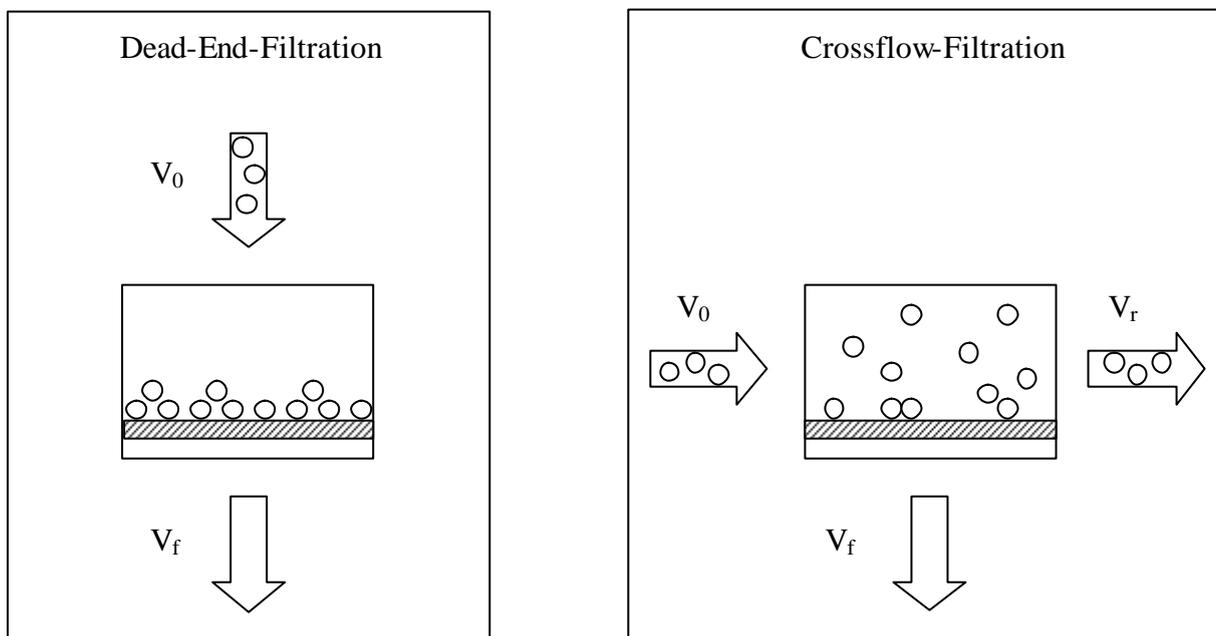


Abb. 1-2: Prinzipien der statischen und dynamischen Mikrofiltration; V_0 : Volumen des Zulaufs, V_r : Volumen des Konzentrats (Retentats), V_f : Volumen des Filtrats

Die beiden prinzipiell voneinander verschiedenen Mikrofiltrationsverfahren äußern sich im Aufbau der verwendeten Module. Abb. 1-3 zeigt beispielhaft im Fall a) ein Hohlfasermodul für die Dead-End-Filtration. Die Hohlfasern sind hier als Schlaufen eingebettet und nur an einem Ende des Moduls geöffnet, so daß eine eintretende Flüssigkeit dazu gezwungen ist, die Membran zu passieren. Im Gegensatz dazu sind die Hohlfasern in dem in Abb. 1-3 b) gezeigten Modul für die Crossflow-Filtration an beiden Enden geöffnet und erlauben dem Hauptstrom ein Verlassen des Moduls, ohne den Membranquerschnitt passieren zu haben.

a) Modul für die Dead-End-Filtration



b) Modul für die Crossflow-Filtration

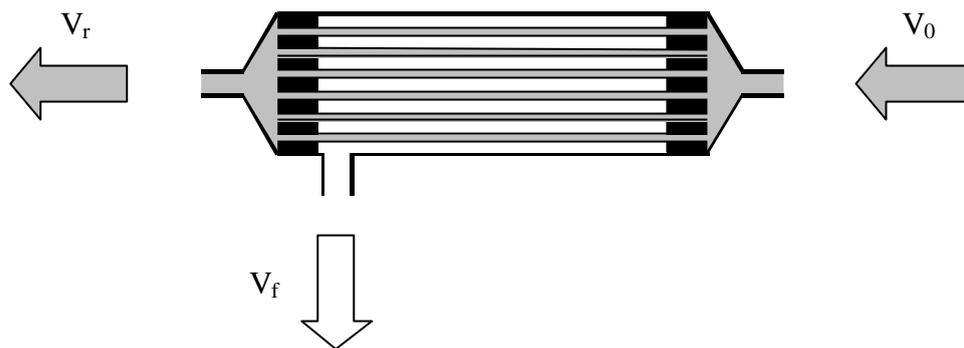


Abb. 1-3: Schematische Darstellung eines a) Dead-End-Hohlfasermoduls und b) Cross-Flow-Hohlfasermoduls; V_0 : Volumen des Zulaufs, V_r : Volumen des Konzentrats (Retentats), V_f : Volumen des Filtrats

Die Mikrofiltration wird dort angewendet, wo eine sichere Abtrennung von Teilchen einer bestimmten Größe notwendig ist, so z.B. zur mikrobiologischen Untersuchung von Trinkwasser und Oberflächenwasser⁶, zur Partikelanalyse, zur Erzeugung ultrareiner Flüssigkeiten (Elektronik-, Kosmetik-, pharmazeutische Industrie) und zur Sterilfiltration (Nahrungsmittel-, Getränke-, pharmazeutische Industrie).⁷

Eine ganz andere Anwendung von Mikrofiltrationsmembranen wurde Ende der 80er Jahre durch die Immobilisation von Affinitätsliganden an die innere Oberfläche von porösen Membranzmatrizes entwickelt.^{8,9} Die auf diese Weise erhaltenen Affinitätsmembranen sollten eine Alternative zu den klassischen chromatographischen Affinitätsträgern verfügbar machen und finden heute in Form zahlreicher kommerzieller Produkte Anwendung in der Isolierung und Reinigung von Biomolekülen.^{10,11,12}

Wegen der Bedeutung im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit soll das folgende Kapitel einen allgemeinen Überblick über die Affinitätschromatographie sowie über die Herstellung, Eigenschaften und Anwendungen von Affinitätsmembranen geben.

1.2 Grundlagen der Affinitätschromatographie

Die Isolierung einzelner Komponenten aus komplexen biologischen Systemen stellt besondere Anforderungen an ein chromatographisches Trennverfahren. Es ist beispielsweise aussichtslos, die Immunglobulinklasse G (IgG) des Humanserums mit Hilfe konventioneller flüssigchromatographischer Verfahren in die einzelnen antigenspezifischen Antikörperfraktionen aufzutrennen, da eine pauschale Differenzierung nach Molekülgröße, Ladung oder anderer physikalischer Parameter für dieses Trennproblem nicht ausreichend ist.

Zur Realisierung derartiger Trennungen hat sich vor mehr als 20 Jahren mit der Affinitätschromatographie eine geeignete präparative Methode etabliert, die für sich in Anspruch nehmen kann, beinahe jedes Biomolekül aufgrund seiner individuellen chemischen Struktur aus komplexen Gemischen isolieren zu können.¹³

Hierbei wird das Prinzip der wechselseitigen molekularen Erkennung zusammengehörender Partner genutzt, indem eine der beiden Komponenten eines Paares als Ligand auf einem geeigneten Träger fixiert wird. Das so erhaltene Affinitätssorbens wird in eine Trennsäule gegeben und das zu trennende Gemisch appliziert. Dabei erkennt und bindet der immobilisierte Affinitätsligand aus einem beliebig komplexen Gemisch nur die spezifisch zu ihm passende Komponente, die als Zielmolekül (Target) oder Ligat bezeichnet wird.

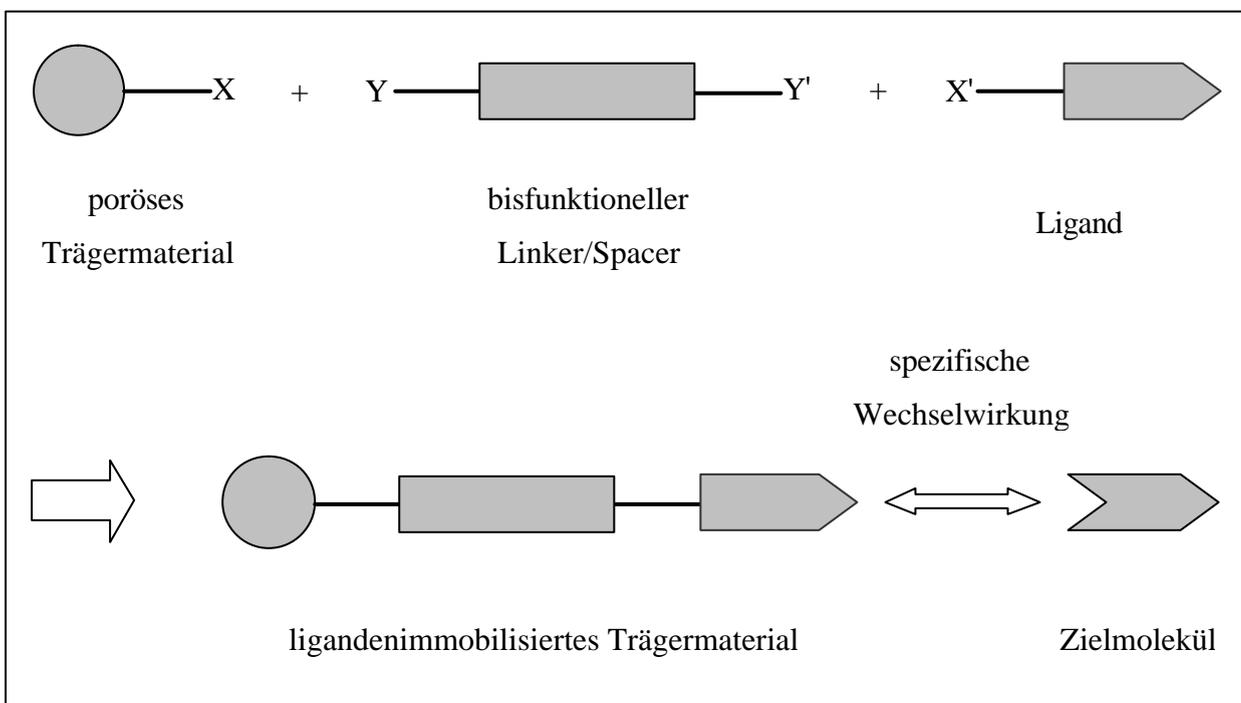


Abb. 1-4: Schematische Darstellung zur Herstellung ligandenimmobilisierter Träger

Die spezifische Erkennung und Bindung in molekularbiologischen Systemen soll anhand der nachfolgenden Beispiele aufgezeigt werden:

| | | |
|-----------------|---|---|
| Enzym | ↔ | Substrat, Cofaktor, Inhibitor |
| Antikörper | ↔ | Antigen, Virus, Zelle |
| Lectin | ↔ | Polysaccharid, Glycoprotein, Zelle |
| Nucleinsäure | ↔ | komplementäre Basensequenz, Polymerase, Protein |
| Hormon, Vitamin | ↔ | Rezeptor, Carrier |
| Zelle | ↔ | oberflächenspezifisches Protein, Lectin |

Voraussetzung für die Durchführung einer Affinitätschromatographie ist demnach die Existenz eines komplementären Partners für die zu isolierende oder zu entfernende Komponente, der zudem für diese spezifisch ist und sich an einer geeigneten Matrix immobilisieren läßt. Hierbei ist vor allen Dingen wichtig, daß dieser Ligand seine Eigenschaft als spezifischer Bindungspartner im fixierten Zustand beibehält. Tabelle 1-2 zeigt einige typische Liganden und die entsprechenden Zielmoleküle.

| Ligand | Zielmolekül |
|---|---|
| Protein A ¹⁴ | Antikörperfraktionen von IgG |
| Concanavalin A (Con A) ¹⁵ | Polysaccharide, Glycoproteine, Glycolipide |
| Lectin von <i>Lens culinaris</i> ¹⁶ | Moleküle mit α -D-Glucose- und α -D-Mannoseresten |
| Lysin ¹⁷ | Plasminogen, Plasminogen-Aktivator, ribosomale RNA |
| Adenosin-5'-monophosphat (5'-AMP) ¹⁸ | NAD ⁺ -abhängige Dehydrogenasen |

Tab. 1-2: Beispiele für Liganden in der Affinitätschromatographie

Als Trägermaterialien haben sich insbesondere Agarose und Dextran in Form kleiner Kügelchen - sogenannte Beads - etabliert. Diese bilden verhältnismäßig formstabile Hydrogele und zeigen nur geringe unspezifische Wechselwirkungen, wobei Agarose - ein Polysaccharid aus

alternierenden D-Galactose- und 3,6-Anhydro-L-galactoseeinheiten - besonders verbreitet und in unterschiedlich aktivierten Formen kommerziell erhältlich ist.¹⁹

Unter den verschiedenen Möglichkeiten zur Immobilisation von Affinitätsliganden hat sich die kovalente Verknüpfung mit dem Trägermaterial in den meisten Fällen als vorteilhafteste und vielseitigste Methode erwiesen, wobei sich prinzipiell alle aus der organischen Synthese bekannten Methoden anwenden lassen.

Diese Art der Kupplung ist besonders einfach zu realisieren, wenn auf der einen Seite elektrophile Gruppen und auf der anderen Seite nucleophile Gruppen für die Verknüpfung zur Verfügung stehen. Von den zuletzt genannten sind insbesondere Amino-, Hydroxyl- und Thiolgruppen erwähnenswert, da diese bei vielen Trägermaterialien sowie zahlreichen Liganden bereits in großer Zahl vorhanden sind. Unter den elektrophilen Gruppen sind Aldehyde und Ketone, Isocyanate und Isothiocyanate sowie Epoxide von Bedeutung. Weiterhin können Carboxylgruppen zur Ligandenimmobilisation herangezogen werden, wenn diese zuvor z.B. als Säurechlorid oder mit Carbodiimiden aktiviert werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele für typische Methoden zur Aktivierung der Hydroxylgruppen von Polysaccharidträgern (Abb. 1-5) sowie für die anschließende Ligandenimmobilisation (Abb. 1-6).

Die klassische Methode wurde 1967 von Axén *et al.* beschrieben.¹³ Sie besteht in der Aktivierung von Agarose mittels Bromcyan unter Bildung von Imidocarbonaten (i) und anschließender Immobilisation aminofunktioneller Liganden. Die resultierende Verknüpfung zum Liganden über Isoharnstoffgruppen (viii) ist bezüglich ihrer Stabilität als mäßig zu bezeichnen. Die Aktivierung von Polysaccharidbeads mittels Bromcyan stellt dennoch eine wertvolle Methode zur Immobilisation von Liganden mit nucleophilen Gruppen dar, da sie unter milden Bedingungen abläuft, die praktische Ausführung einfach ist und sich der Aktivierungsgrad leicht steuern läßt.²⁰

Darüber hinaus lassen sich bisfunktionelle Spacer wie 1,6-Hexandiamin (ii) oder 6-Aminocaprinsäure (iv) unter milden Reaktionsbedingungen aus wäßrigen Lösungen anbinden. Die Einführung solcher meist sechs bis zwölf Atome langer Brückenglieder findet häufig Anwendung, wenn sterisch anspruchsvolle Liganden gekuppelt werden sollen. Auf diese Weise kann eine Behinderung der Annäherung zwischen Ligand und Zielmolekül vermieden werden, die insbesondere dann auftreten kann, wenn ein niedermolekularer Ligand, der direkt an die Trägermatrix gebunden ist, mit einem hochmolekularen Target an dessen biospezifischem Zentrum in Wechselwirkung treten soll. In diesem Fall wirkt sich die höhere Beweglichkeit

eines spacergebundenen Liganden sehr günstig auf den Assoziationsprozeß zwischen Ligand und Target aus. Die optimale Spacerlänge hängt von dem jeweiligen Trennproblem ab und muß in jedem Fall durch systematische Variationen ermittelt werden. Ist der Spacerarm zu kurz, kann es zu einer sterischen Behinderung der gewünschten Wechselwirkung kommen, wohingegen unspezifische Wechselwirkungen bei zu langen Brückengliedern die Folge sein können.²¹

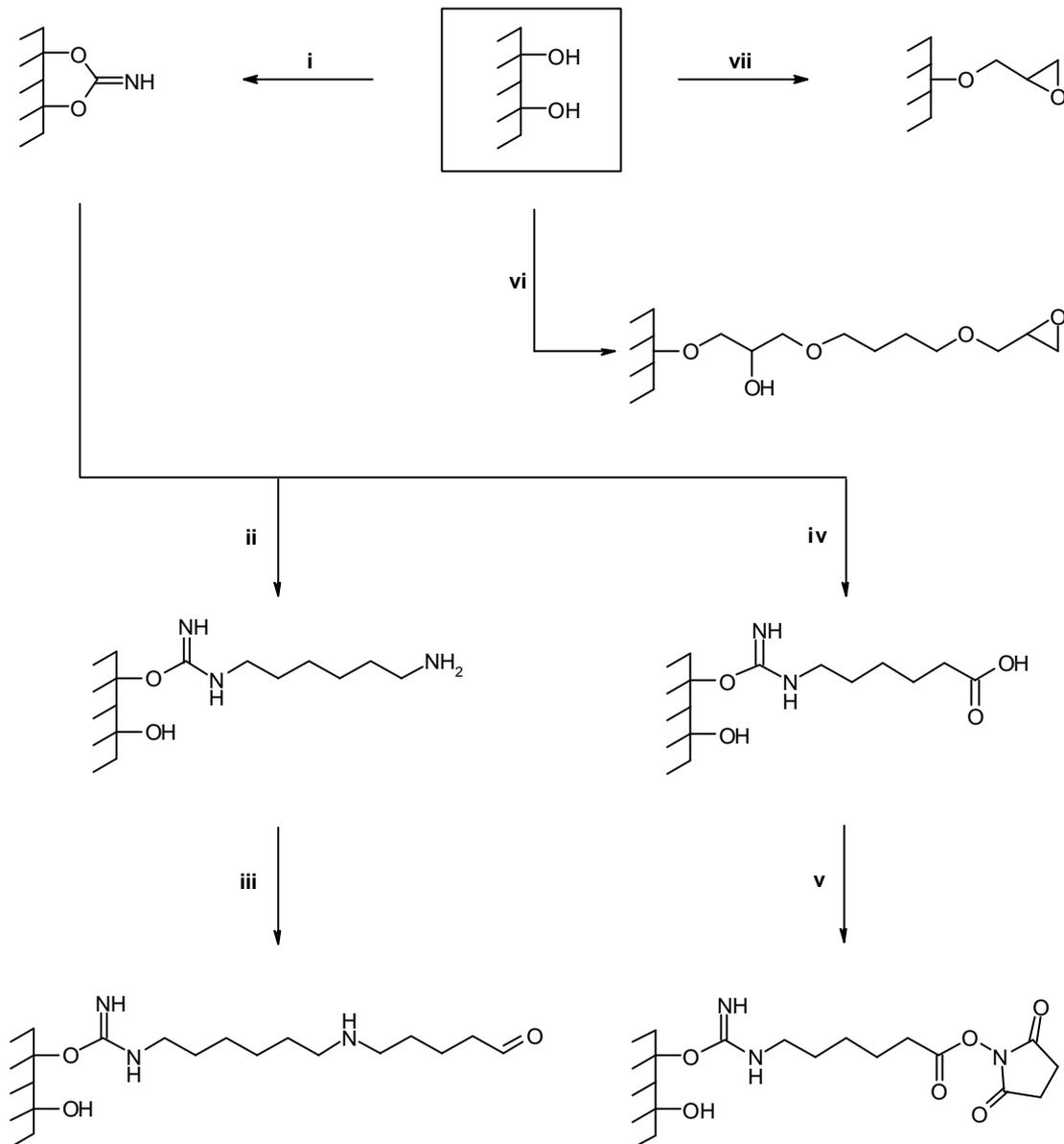


Abb. 1-5: Häufig angewandte Methoden zur Aktivierung von Polysaccharidbeads (die Beschreibung der einzelnen Reaktionsschritte erfolgt im fortlaufenden Text)

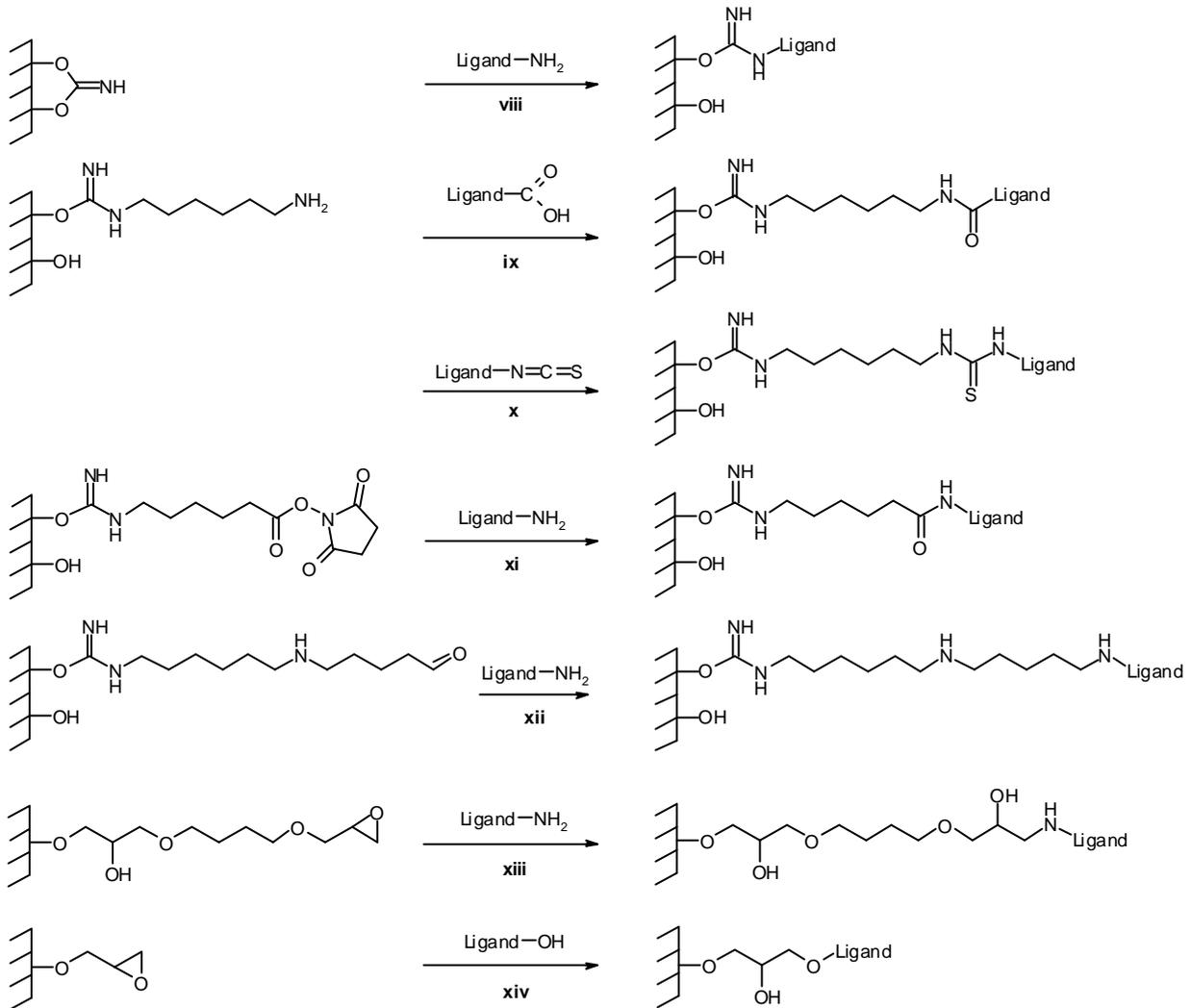


Abb. 1-6: Beispiele für Ligandenimmobilisationen an aktivierte Polysaccharidbeads

Weiterhin besteht durch die Anbindung von bifunktionellen Spacern die Möglichkeit der Einführung einer für die Ligandenimmobilisation geeigneten reaktiven Endgruppe. Im Fall von 1,6-Hexandiamin erlaubt die primäre Aminoendgruppe eine Anbindung von Liganden mit elektrophilen Gruppen, z.B. aktivierten Carboxylgruppen (ix) oder Isothiocyanaten (x). Im Vergleich zum Bromcyan-aktivierten System erfolgt eine Umkehrung der Reaktivität von elektrophil nach nucleophil.²² Umgekehrt können nucleophile Gruppen, insbesondere primäre Amine, mit Dialdehyden umgesetzt werden, wodurch eine Kettenverlängerung sowie die Einführung einer terminalen Carbonylgruppe erreicht wird. In den Abb. 1-5 und 1-6 ist die Anbindung von Glutardialdehyd an einen aminoterminierten Träger (iii) sowie die Immobilisation eines Liganden mit primären Aminogruppen (xi) gezeigt. Hierbei handelt es sich in beiden Fällen um reduktive Aminierungen, bei denen das intermediär gebildete Imin durch

ein geeignetes Reduktionsmittel, meist Natriumcyanoborhydrid, in ein sekundäres Amin überführt wird.

Durch Umsetzung von Bromcyan-aktivierten Polysacchariden mit 6-Aminocaprinsäure wird eine terminale Carboxylgruppe erhalten (iv). Zur anschließenden Anbindung von aminofunktionellen Liganden (xi) ist eine vorherige Aktivierung der Carboxylgruppe notwendig, wenn die Immobilisation unter milden Bedingungen und in wäßrigen Lösungen erfolgen soll. Hierzu sind verschiedene Methoden, z.B. die Aktivierung mit Carbodiimiden²³ oder mit *N*-Hydroxysuccinimid²⁴ (v) anwendbar.

Die Aktivierung von Trägermaterialien durch Einführung von Epoxidgruppen mittels Bisepoxiden (vi) oder Epihalogenhydrinen (vii) ist vielfach in der Literatur beschrieben.^{25,26,27}

In Abb. 1-5 ist beispielhaft die Aktivierung mit Butandioldiglycidylether (BDDGE) gezeigt, wobei eine terminale Epoxidgruppe über einen zwölffatomigen Spacerarm an den Polysaccharidträger gebunden wird. Die Anbindung von Liganden mit nucleophilen Gruppen erfolgt durch Öffnung des terminalen Epoxids, wobei im Falle von Liganden mit primären Aminogruppen sekundäre Amine (xiii) sowie im Fall von Liganden mit Hydroxylgruppen Etherbrücken entstehen (xiv). Letztere zeichnen sich durch eine ausgezeichnete Stabilität aus. Ein weiterer Aspekt bei der Aktivierung mit Bisepoxiden und anderen Biselektrophilen ist die Möglichkeit einer zusätzlichen räumlichen Vernetzung des Trägermaterials, wodurch eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften erzielt werden kann.²⁸

Prinzipiell ist es gleichgültig, ob Matrix oder Ligand für die Verknüpfung aktiviert werden, jedoch hat sich eine Matrixaktivierung unter anderem deshalb als günstiger erwiesen, da empfindliche Liganden unter den Bedingungen einer Aktivierung leicht geschädigt werden können. In einigen Fällen ist hingegen die Aktivierung des Liganden vorteilhaft, wie *Baumann et al.* bei der Immobilisation von Heparin an Cellulose zur Verbesserung der Biokompatibilität zeigen konnten.²⁹ Hierzu aktivierten sie carboxylierte Cellulose mit einem wasserlöslichen Carbodiimid, um anschließend mit Heparin umzusetzen bzw. Heparin mit dem gleichen Carbodiimid, um anschließend mit partiell substituierter Aminocellulose umzusetzen. Die angegebene Menge an kovalent gebundenem Heparin ist für den zuletzt genannten Fall der Ligandenaktivierung mit 0.5 µmol Heparin pro Gramm Cellulose mehr als doppelt so hoch wie bei entsprechender Aktivierung der carboxylierten Cellulose. Die Synthese von partiell carboxylgruppenhaltiger bzw. aminogruppenhaltiger Cellulose wurde durch Aktivierung mit Bromcyan und nachfolgende Umsetzung mit Ethylendiamin bzw. 6-Aminocaprinsäure realisiert

(vgl. Abb. 1-5). Andere Kupplungsmechanismen führten zu geringeren Ausbeuten, zeigten aber ebenfalls eine deutliche Überlegenheit der Ligandenaktivierung.

Im Zusammenhang mit den gezeigten Beispielen soll erwähnt werden, daß bei der Immobilisation hochmolekularer Liganden, welche über eine große Zahl reaktiver Gruppen verfügen, diese oft über mehrere Bindungsstellen gleichzeitig mit der Matrix verknüpft werden können (Mehrpunktanbindung). Dieses kann bis zu einem gewissen Grad erwünscht sein, da hierdurch z.B. die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen stabilisiert wird und somit eine deutlich bessere thermische und chemische Beständigkeit erzielt werden kann. Auf der anderen Seite ist es leicht einsehbar, daß die Blockierung einer zu großen Anzahl von funktionellen Gruppen des Liganden zum Verlust dessen biologischer Aktivität führen wird. Außerdem führt die eingeschränkte Beweglichkeit des an mehreren Stellen gebundenen Liganden dazu, daß dessen biologisch aktives Zentrum für ein Zielmolekül nur noch sehr schwer oder gar nicht mehr erreichbar ist.

1.3 Affinitätsmembranen

Alle für die klassische Affinitätschromatographie beschriebenen Prinzipien und Techniken treffen grundsätzlich auch auf Affinitätsmembranen zu, wobei die Ligandenimmobilisation nicht an die innere Oberfläche von Polymerbeads, sondern von mikroporösen Membranen erfolgt.

Der von der bestimmungsgemäßen Verwendung von Mikrofiltrationsmembranen bekannte Trennmechanismus spielt bei Affinitätsmembranen keine Rolle, da in nahezu allen Fällen partikelfreie Lösungen behandelt werden und die Trennung eines Biomoleküls aus der Lösung ausschließlich durch selektive Adsorption erfolgt. Prinzipiell ist aber auch eine Kombination beider Trennmechanismen (Siebeffekt und selektive Adsorption) nutzbar, wenn biologische Suspensionen behandelt werden. Unter den wenigen Publikationen sei in diesem Zusammenhang auf eine Arbeit von *Kroner et al.* hingewiesen, in der durch Integration der Abtrennung von Zelltrümmern mittels Mikrofiltration sowie der selektiven Adsorption von Malatdehydrogenase aus *E. coli*-Homogenaten eine Kombination beider Trennmechanismen realisiert wurde, ohne dabei eine Reduktion der Bindungskapazität der Affinitätsmembran zu beobachten.³⁰

Streng genommen bezieht sich der Begriff Affinitätschromatographie ausschließlich auf Stofftrennungen, welche auf selektive Adsorption und damit auf spezifische Wechselwirkungen zwischen einem biospezifischen Liganden mit dem aktiven Zentrum eines Biomoleküls beruhen. Dennoch werden auch ligandenimmobilisierte Membranen, die statt dessen über Ionenaustauschergruppen oder pseudobiospezifische Liganden (z.B. Reaktivfarbstoffe oder Metallchelate) verfügen unter dem Begriff Affinitätsmembranen zusammengefaßt. Diese sogenannten gruppenspezifischen Liganden können unterschiedliche Biomoleküle binden, die über bestimmte chemisch strukturelle Eigenschaften verfügen (z.B. geladene Gruppen, metallchelatisierende Gruppen, hydrophobe Bereiche) und sind nicht spezifisch für ein einziges Zielmolekül. Hieraus ergibt sich der Vorteil eines universellen Einsatzes.

Die Motivation zur Entwicklung von Affinitätsmembranen war die Überwindung der Nachteile von klassischen Gelmaterialien wie Kompressibilität, langsame Prozeßführung sowie hohe Prozeßdrücke.⁹

Abb. 1-7 veranschaulicht, daß der Stofftransport in den „Dead-End“-Poren von Polymerbeads durch Diffusion erfolgt, während er in den Durchflußporen von Mikrofiltrationsmembranen weitgehend durch Konvektion bewirkt wird. Der geringe Einfluß von Diffusionswiderständen führt insbesondere bei der Isolierung von großen Biopolymeren zu schnelleren Adsorptions-

kinetiken, wodurch die zur Adsorption benötigte Zeit des Zielmoleküls viel kleiner als dessen Verweilzeit in der Membran ist und die Flußgeschwindigkeit durch dünne Flachmembranen oder Hohlfasern im Gegensatz zu klassischen Beads nicht durch Druckabfall oder Diffusionswiderstände limitiert wird.^{31,32,33} Darüber hinaus sind eine höhere mechanische Stabilität, definierte Porenstrukturen und -verteilungen sowie die potentielle Nutzung des Siebeffektes von Mikrofiltrationsmembranen als weitere Vorteile gegenüber den konventionellen Materialien in der Affinitätschromatographie zu nennen.

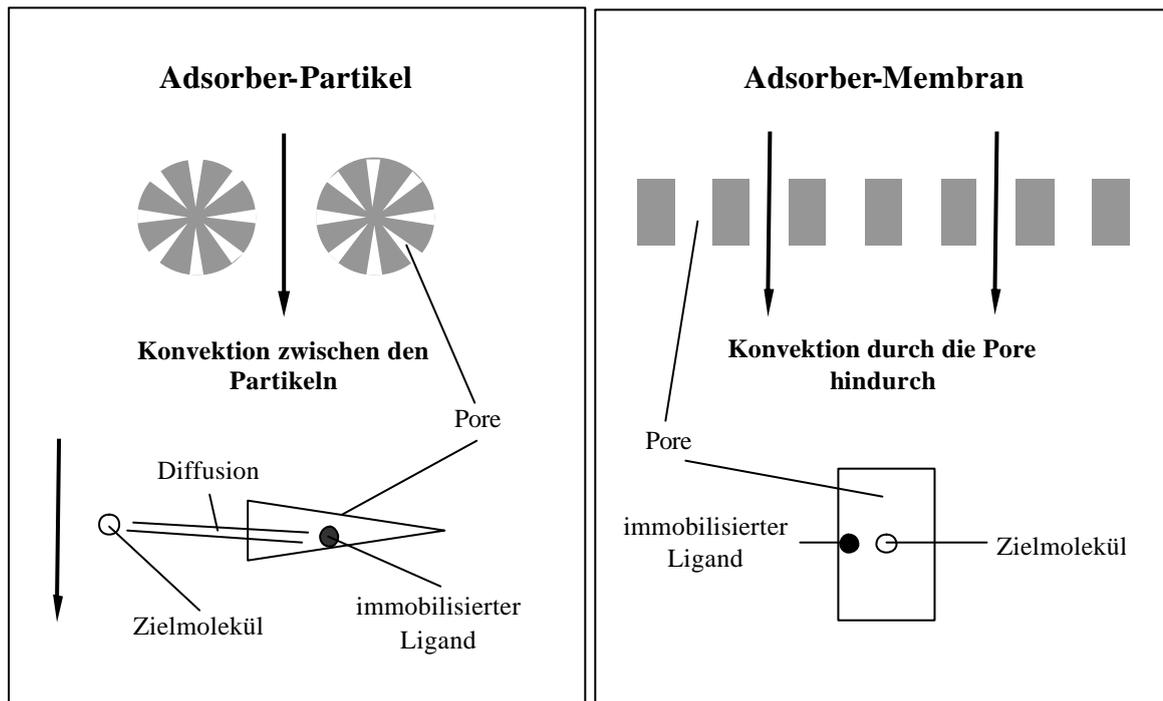


Abb. 1-7: Vergleich zwischen porösen Partikeln und Membranen

Die im Vergleich zu vielen partikulären Affinitätsträgern relativ kleinen inneren Oberflächen in einer Größenordnung von zehn Quadratmeter je Kubikzentimeter sind als Nachteil von mikroporösen Membranen zu nennen. Aus diesem Grund können häufig nur niedrige Ligandendichten und daraus resultierend niedrige Adsorptionskapazitäten realisiert werden.

Als Ausgangsmembranen finden grundsätzlich Mikrofiltrationsmembranen als Flach- oder Hohlfasermembranen Verwendung, die über Poren mit einem nominellen Durchmesser zwischen 0.1 und 3 μm verfügen. Hierdurch werden niedrige transmembrane Drücke

sichergestellt. Als Membrankonfigurationen sind vorwiegend Flachmembranen in Stapel- anordnung und als plissierte Membranen sowie verschiedene Hohlfasermodule verbreitet. Zur Herstellung der Ausgangsmembranen dienen insbesondere Cellulosederivate, aromatische Polysulfone und Polyethersulfone, aliphatische Polyamide sowie Polyethylen und Polypropylen. Da letztere keine Möglichkeit für eine kovalente Ligandenimmobilisation bieten, müssen diese zunächst durch geeignete Methoden, z.B. durch Erzeugung von Oberflächenradikalen mittels Elektronenbestrahlung und anschließende Pfropfpolymerisation von Vinylmonomeren mit funktionellen Gruppen, modifiziert werden. Abb. 1-8 zeigt beispielhaft die von *Kiyohara et al.* beschriebene Herstellung einer Ionentauschermembran durch Pfropfpolymerisation von Glycidylmethacrylat an eine mikroporöse Polyethylenmembran und anschließende Anbindung von Diethylamin.³⁴ Die Dichte an Diethylaminogruppen wird mit 2.0 mmol/g angegeben.

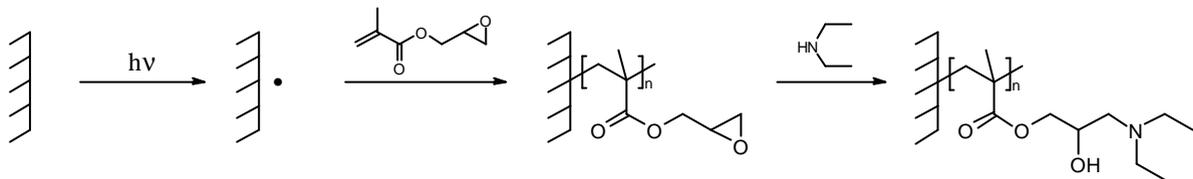


Abb. 1-8: Erzeugung von Oberflächenradikalen mittels Elektronenbestrahlung und anschließende Pfropfpolymerisation von Glycidylmethacrylat

Die Anbindung von Liganden erfolgt meistens durch Anwendung von Methoden, welche sich bei der Herstellung von ligandenimmobilisierten Beads etabliert haben. Im Fall von Cellulosemembranen erfolgen die Kupplungsreaktionen unter Nutzung der Hydroxylgruppen, weshalb die in Abb. 1-5 und 1-6 dargestellten Methoden adaptiert werden können. Die aromatischen Polysulfone und Polyethersulfone können durch Umsetzungen an den terminalen Hydroxylgruppen sowie durch Substitutionsreaktionen an den Phyleneinheiten für eine Ligandenimmobilisation genutzt werden. Polyamidmembranen erlauben Kupplungsreaktionen an den terminalen Amino- und Carboxylgruppen sowie an den Amidgruppen der Polymerkette (vgl. Kap. 2).

Während im Fall der klassischen Agarose- oder Dextranbeads Ligandendichten von über einem Millimol pro Gramm nicht ungewöhnlich sind, ergeben sich bei Affinitätsmembranen meist deutlich kleinere Werte. Dieses ist einerseits auf die verhältnismäßig kleinen inneren

Oberflächen von Mikrofiltrationsmembranen, andererseits auf die geringe Dichte von funktionellen Ankergruppen zurückzuführen. Der letztgenannte Einfluß einer niedrigen Ankergruppendichte kommt bei Ligandenimmobilisationen an Endgruppen von Polysulfon- und Polyamidmembranen besonders zum Tragen. Tab. 1-3 gibt einen Überblick für typische Ankergruppendichten von verbreiteten Mikrofiltrationsmembranen.

| Membranmaterial | Ankergruppe | Ankergruppendichte |
|---------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Cellulose | Hydroxylgruppe | > 1 mmol/g |
| Polyamid (Nylon 6, Nylon 66) | Carboxylgruppe (Endgruppe) | < 20 μ mol/g |
| | Aminogruppe (Endgruppe) | < 20 μ mol/g |
| | Amidgruppe | > 1 mmol/g |
| Polysulfon/Polyethersulfon | Hydroxylgruppe (Endgruppe) | < 20 μ mol/g |
| | Phenylgruppen | > 1 mmol/g |

Tab. 1-3: Typische Ankergruppendichten von Mikrofiltrationsmembranen

Immobilisationen von Liganden unter Einbeziehung der Phenylgruppen in aromatischen Polysulfonen oder der Amidgruppen in Polyamiden führen zu höheren Ligandendichten, erfordern allerdings oft weniger milde Reaktionsbedingungen als vergleichbare Endgruppenmodifikationen und finden daher nur selten Anwendung.

Bei der Herstellung von Affinitätsmembranen mit raumbeanspruchenden Liganden (z.B. Proteine) sind Ankergruppendichten im zweistelligen Mikromolbereich meist ausreichend. Sollen hingegen kleinere Liganden wie z.B. Ionenaustauschergruppen immobilisiert werden, muß eine Erhöhung der Ankergruppendichte durch geeignete Methoden erreicht werden, um akzeptable Kapazitäten sicherzustellen. In diesem Zusammenhang hat sich neben der Pfropfpolymerisation von Monomeren mit geeigneten funktionellen Gruppen (vgl. Abb. 1-8) das Coating mit Polysacchariden wie Dextran oder Hydroxyethylcellulose sowie mit Polyvinylalkohol bewährt. Von den zahlreichen Publikationen über das Coating von Mikrofiltrationsmembranen sei beispielhaft eine Arbeit von *Klein et al.* erwähnt, in der die Endgruppen einer Polysulfonmembran (PSu-Membran) mit Ethylenglycoldiglycidylether (EGDGE) aktiviert wurden, um anschließend Hydroxyethylcellulose (HEC) kovalent anzubinden.³⁵ Bezogen auf eine Konzentration von 16 μ mol(Epoxid)/g(Membran) nach der ersten Aktivierung konnte nach Anbindung von HEC, erneuter Aktivierung mit dem

Diglycidylether sowie Umsetzung mit Hexandiamin mit einer Konzentration von fast $60 \mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{g}(\text{Membran})$ eine Vervielfachung der Ankergruppendichte realisiert werden.

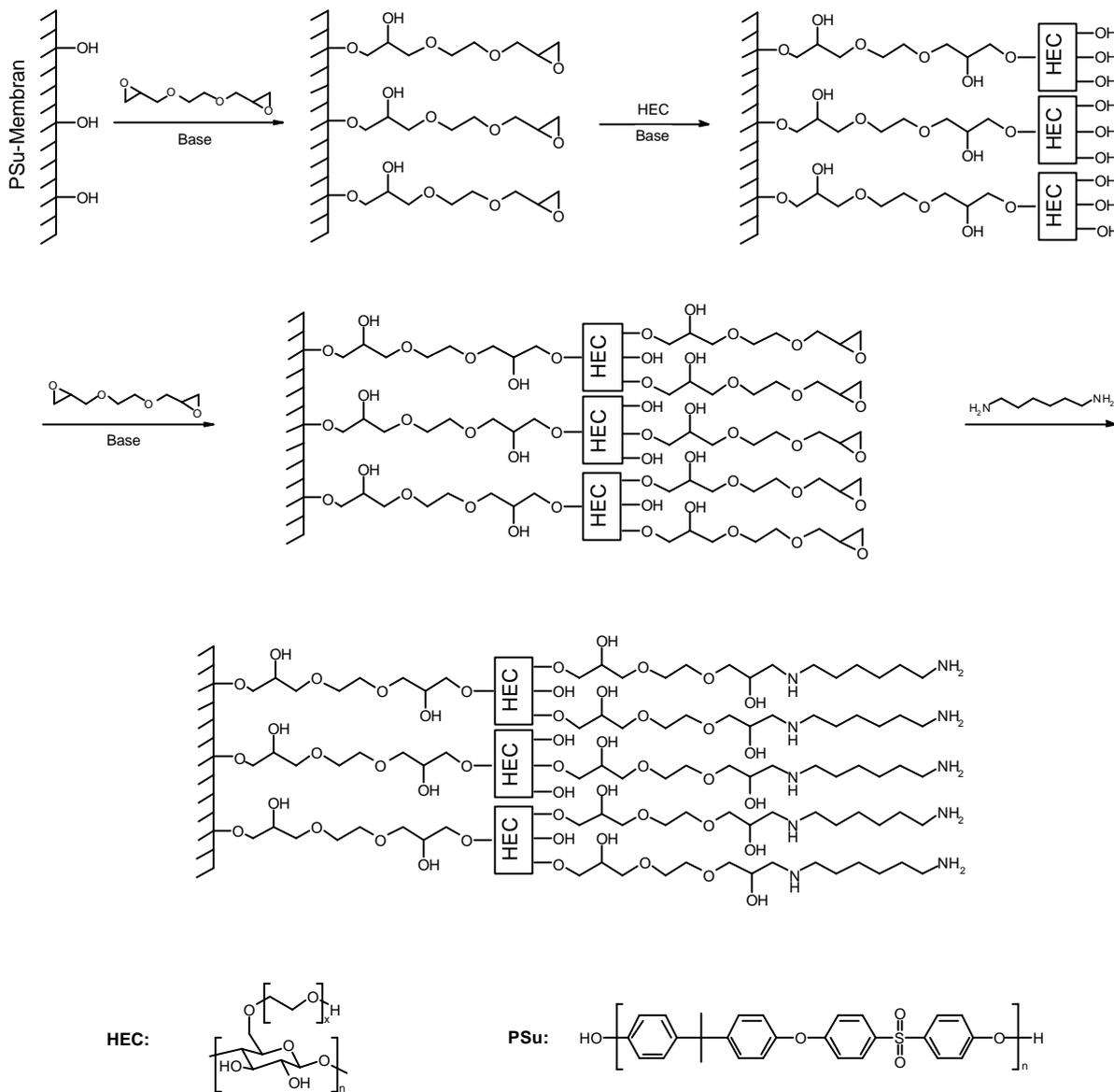


Abb. 1-9: Aktivierung einer Polysulfonmembran mit Ethylenglycoldiglycidylether und Coating mit Hydroxyethylcellulose

An die erhaltene Membran wurde schließlich rekombinantes Protein A (rPr A) mittels Carbo-diimid-Kupplung immobilisiert und somit eine Affinitätsmembran für IgG erhalten.

Das Membrancoating mit Polysacchariden oder Polyvinylalkohol bewirkt neben einer Erhöhung der Ankergruppendichte eine erwünschte Modifikation der Membranoberfläche von hydrophob nach hydrophil. Da viele der eingesetzten Ausgangsmembranen über hydrophobe Oberflächen

verfügen, resultieren oft Schwierigkeiten bei der Prozessierung proteinhaltiger Lösungen. In diesem Zusammenhang ist eine schlechte Benetzung der Oberfläche mit wäßrigen Lösungen sowie eine starke Neigung zur unspezifischen Adsorption zu nennen.^{36,37,38} Letztere ist dem Oberbegriff Fouling zuzuordnen, der alle Arten von unerwünschten Ablagerungen auf einer Membranoberfläche beschreibt. Die Verbesserung der Benetzbarkeit und eine Vermeidung von unspezifischer Adsorption ist der Hauptanwendungsbereich von Membrancoatingverfahren.

Die Anwendung von Affinitätsmembranen erfolgt in der sogenannten Affinitätsfiltration. Wie bei den konventionellen Verfahren mit partikulären Trägermaterialien erfolgt eine Trennung durch Anwendung der in Abb. 1-10 dargestellten vier Schritte.

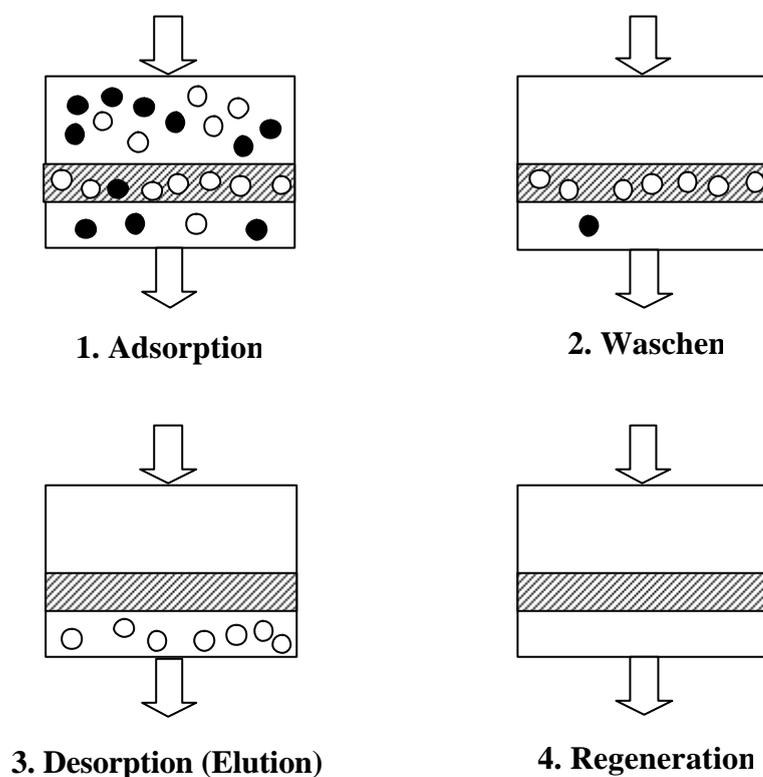
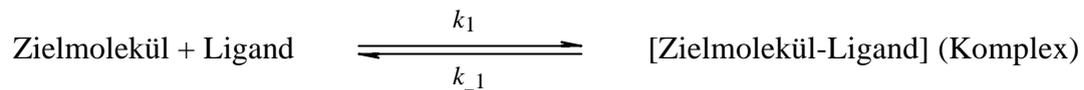


Abb. 1-10: Schematische Darstellung einer Affinitätsfiltration

Bei der Adsorption nach Probenaufgabe bildet sich im idealisierten Fall ausschließlich ein Komplex aus Zielmolekül und Affinitätsligand. Während des Waschprozesses werden Komponenten vom Träger eluiert, die nicht an den Liganden binden. Die Desorption des Zielmoleküls erfolgt dann durch Änderung der Pufferzusammensetzung (pH-Wert, Salzgehalt,

Zusatz von Chaotropen, etc.). Im Regenerationsschritt wird die Affinitätsmembran schließlich für die nächste Anwendung vorbereitet bzw. von etwaigen Verunreinigungen befreit.

Die reversible Bindung zwischen Affinitätsligand und Zielmolekül ist demnach Basis für dieses Trennverfahren. Unter der idealisierten Annahme, daß der Ligand jeweils nur mit einem Zielmolekül aus der Lösung wechselwirkt, gilt das folgende Gleichgewicht:



Die Dissoziationskonstante K_d ergibt sich somit zu:

$$K_d = \frac{c(\text{Zielmolekül}) \cdot c(\text{Ligand})}{c(\text{Komplex})} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \text{Gl. 1-1}$$

Der Adsorptionsvorgang eines Zielmoleküls kann unter folgenden Annahmen mit einer Gleichgewichts-Adsorptionsisotherme nach *Langmuir*³⁹ beschrieben werden:

- Die Matrix besteht aus energetisch gleichwertigen Adsorptionsplätzen
- Eine Bindungsstelle des Zielmoleküls wechselwirkt mit einem Liganden bzw. mit einem Adsorptionsplatz der Matrix
- Bereits adsorbierte Zielmoleküle wechselwirken nicht mit Zielmolekülen in Lösung (Monoschichtadsorption)
- Die Stärke der Wechselwirkung zwischen Zielmolekül und Ligand wird nicht vom Besetzungsgrad der Bindungsstellen beeinflusst

Aus der Ratengleichung

$$\frac{dq}{dt} = k_1 c (q_m - q) - k_{-1} q \quad \text{Gl. 1-2}$$

q : Menge an adsorbiertem Zielmolekül [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]

q_m : maximale Bindungskapazität (Monoschichtbelegung) [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]

c : Konzentration des Zielmoleküls in Lösung [$\mu\text{g}/\text{mL}$]

ergibt sich im Gleichgewicht ($dq/dt = 0$ und $k_1/k_{-1} = K_d$) die Adsorptionsisotherme nach *Langmuir*:

$$q^* = \frac{q_m c^*}{K_d + c^*} \quad \text{Gl. 1-3}$$

c^* : Gleichgewichtskonzentration des Zielmoleküls in Lösung [$\mu\text{g/mL}$]

q^* : Menge an adsorbiertem Zielmolekül im Gleichgewicht [$\mu\text{g/cm}^2$]

Vorteil dieser vereinfachten Form einer Beschreibung der Adsorption ist die Möglichkeit, Aussagen über die Stärke der Wechselwirkungen zwischen Affinitätsligand und Zielmolekül (K_d) machen zu können und die Kapazität einer Affinitätsmembran (q_m) unter den gewählten Bedingungen abschätzen zu können. Da die vereinfachenden Modellvoraussetzungen für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten in realen Systemen nicht zutreffen, wird häufig der Begriff einer scheinbaren Dissoziationskonstanten verwendet. Abweichungen des Isothermenverlaufs vom *Langmuir*-Verhalten zeigen eine fehlende Übereinstimmung der Meßergebnisse mit den Modellvoraussetzungen an. Meistens liegen dann unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Zielmolekül und Affinitätsmembran nebeneinander vor, die häufig auf Materialheterogenitäten (energetisch uneinheitliche Adsorptionsbereiche) zurückgeführt werden können. In diesem Fall führt die Beschreibung von Meßergebnissen mit einer *Freundlich*-Isotherme⁴⁰, welche energetisch heterogene Bindungsstellen berücksichtigt, in der Regel zu besseren Übereinstimmungen:

$$q^* = a c^{*\frac{1}{n}} \quad \text{Gl. 1-4}$$

c^* : Gleichgewichtskonzentration des Zielmoleküls in Lösung [$\mu\text{g/mL}$]

q^* : Menge an adsorbiertem Zielmolekül im Gleichgewicht [$\mu\text{g/cm}^2$]

a, n : Systemspezifische Konstanten

Anwendungen von Affinitätsmembranen

Seit ihrer Entwicklung erfahren Affinitätsmembranen eine stark zunehmende Aufmerksamkeit und finden heute vielfache Anwendung bei der Isolierung und Reinigung von Biopolymeren. An dieser Stelle sei auf die Übersichtsartikel von *Langlotz und Kroner*⁴¹, *Roper und Lightfoot*⁴², *Kula und Thömmes*⁴³ sowie *Klein*⁴⁴ hingewiesen, welche einen umfangreichen Überblick über zahlreiche Publikationen und technische Anwendungen von Membranadsorbern bieten. Daß Affinitätsmembranen, insbesondere bei technischen Prozessen in der Proteinherstellung, eine leistungsfähige Alternative zu partikulären Affinitätsträgern darstellen, äußert sich auch in der Vielzahl von kommerziell erhältlichen Produkten. Zahlreiche Hersteller wie Millipore, Pall, Sartorius und Sepracor bieten verschiedene Ionentauschermembranen, farbstoff- und metallchelatimmobilisierte Membranen sowie Membranadsorber mit biospezifischen Liganden in Form unterschiedlicher Module an.⁴⁵

Bei der Herstellung ligandenimmobilisierter Membranen steht eine nahezu unbegrenzte Vielfalt an Möglichkeiten zur Verfügung, da unterschiedliche Membranmaterialien und -geometrien mit einer Vielzahl biospezifischer und pseudobiospezifischer Liganden auf verschiedene Art und Weise miteinander verknüpft werden können. Wegen dieser Variationsbreite ist es nicht verwunderlich, daß ligandenimmobilisierte Membranen nicht mehr ausschließlich zur Isolation von Biomolekülen, sondern auch in anderen Bereichen genutzt werden. In diesem Zusammenhang sind Membranen zur Enantiomerentrennung von racemischen Aminosäuren³⁴, Biosensoren⁴⁶ (z.B. Immunoassays) sowie Membranreaktoren^{47,48} zu nennen. Bei diesen Beispielen handelt es sich nicht zwingend um Anwendungen, welche ausschließlich auf selektive Adsorption zurückzuführen sind, sondern auch um substratspezifische chemische Umwandlungen, die mittels membranimmobilisierter Reagenzien, Katalysatoren oder Enzyme durchgeführt werden.

Während es bei der Affinitätschromatographie und -filtration immer darum ging, Zielmoleküle aus einer Flüssigkeit (Blutplasma, Überstände von Zellkulturen, Homogenate) zu isolieren, gewinnen heute auch Prozesse an Bedeutung, die der Entfernung unerwünschter Substanzen aus Flüssigkeiten dienen. Besonders interessante Anwendungen ergeben sich hieraus, wenn es sich bei der zu reinigenden Flüssigkeit um menschliches Blut oder Blutplasma handelt. Diese Möglichkeit führte zur raschen Entwicklung neuer Behandlungsmethoden innerhalb der extrakorporalen Blut- und Plasmatherapie. Wie in der seit vielen Jahrzehnten zur Behandlung von Patienten mit Nierenversagen angewandten Hemodialyse⁴⁹ wird dabei das Blut eines

Patienten in einem außerhalb seines Körpers betriebenen Kreislauf von krankheitsverursachenden Substanzen befreit, wobei das Herzstück dieses extrakorporalen Kreislaufs ein spezifischer Adsorber für die zu entfernenden Substanzen ist. Abb. 1-11 zeigt den typischen Ablauf einer extrakorporalen Plasmabehandlung. Hierbei wird das Blut des Patienten aus der Armvene in einen Plasmaseparationskreislauf geführt, in dem es mittels einer Membran von seinen korpuskulären Bestandteilen getrennt wird.

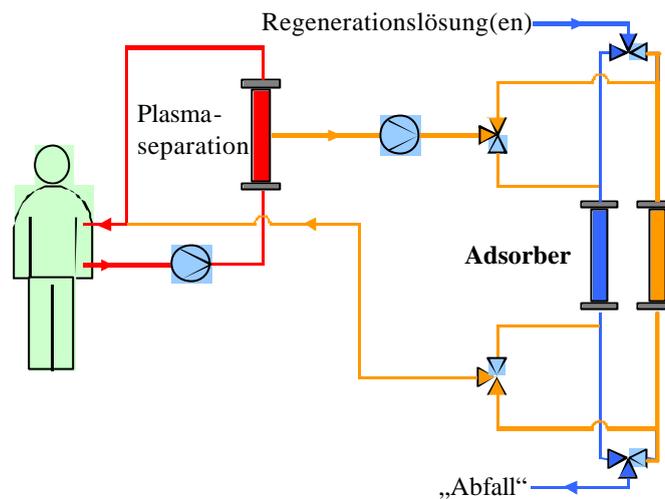


Abb. 1-11: Allgemeines Schema einer extrakorporalen Plasmatherapie

Das Blutplasma wird dann durch den Adsorber gepumpt und schließlich, gemeinsam mit den korpuskulären Bestandteilen, dem Patienten reinfundiert. Die obige Abbildung zeigt zwei Adsorbereinheiten, die abwechselnd betrieben werden können. Hierdurch ist eine Möglichkeit zur Regeneration der Adsorber während der Behandlung gegeben.

Wegen des hohen apparativen und personellen Aufwands finden extrakorporale Blut- und Plasmatherapien vorwiegend dort Einsatz, wo Krankheiten mit herkömmlichen Methoden nicht oder nur mit schlechter Prognose zu therapieren sind. Im Fall von chronischem Organversagen ist die Überbrückung von Wartezeiten auf Spenderorgane eine häufige Indikation. Das Verfahren ist schonend für den Patienten, da in der Regel keine systemisch wirkenden Medikamente verabreicht werden müssen.

Das erstaunliche Potential der extrakorporalen Blut- und Plasmatherapie mit spezifischen Adsorbentien wird durch zahlreiche Publikationen sowie viele bereits in der klinischen Anwendung befindliche Verfahren dokumentiert. Alleine in der Immunadsorption, also der selektiven

Entfernung von Immunoglobulinen und Immunkomplexen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (z.B. dilatative Kardiomyopathie), sind mindestens acht kommerzielle Produkte Gegenstand klinischer Studien oder bereits im klinischen Einsatz. Diesen Verfahren ist der Einsatz von ligandenimmobilisierten Trägern gemein, wobei als Affinitätsliganden Dextransulfat, aromatische Aminosäuren (Phenylalanin und Tryptophan), Protein A sowie polyklonale Anti-Ig-Antikörper aus sensibilisierten Schafen eingesetzt werden.

Die Vielfalt an therapierbaren Krankheiten soll anhand der in Tab. 1-4 dargestellten Beispiele von kommerziell erhältlichen Adsorbentien aufgezeigt werden.

| Erkrankung | Folgen/Risiken | Zu entfernende Substanz(en) | Ligand | Hersteller (Produktname) |
|---|---|--|---|--|
| Autoimmunerkrankungen (z.B. dilatative Kardiomyopathie) | z.B. Herzinsuffizienz | - Autoantikörper - Immunkomplexe | - Dextransulfat - Tryptophan/ - Phenylalanin - Protein A - Anti-Ig-Antikörper - synth. Oligopeptid | Kaneka (Selesorb®) Asahi-Medical (IM-TR/PH 350) Fresenius (Prosorba®) Plasmaselect (Ig-Therasorb®) Affina (Globaffin®) |
| Diabetes Mellitus | - Mikroangiopathie - diabet. Fußsyndrom - Arteriosklerose | - Fibrinogen | - synth. Oligopeptid | Plasmaselect (Rheosorb®) |
| Hypercholesterinämie, Hyperlipidämie | - Arteriosklerose, - koronare Herzerkrankungen - Herzinfarkt | - LDL (Low Density Lipoprotein) - Lp(a) (Lipoprotein a) | - Dextransulfat - Polyacrylsäure | Kaneka (Selesorb®) Fresenius (DALI®) |
| Akutes und chronisches Leberversagen | - Ikterus - hepatische Enzephalopathie - Hirnödem - Multiorganversagen | - proteingebundene, hydrophobe Toxine | - Albumin | Teraklin (MARS®) |
| Sepsis | - septischer Schock - Multiorganversagen | - Endotoxine | - Albumin | Fresenius (Matisse®) |

Tab. 1-4: Beispiele für angewandte extrakorporale Plasmatherapien

Bei allen genannten Beispielen finden analog zur klassischen Affinitätschromatographie partikuläre Trägermaterialien aus Polyvinylalkohol, Polyacrylaten und Agarose Verwendung. Trotz der vorteilhaften Eigenschaften von Membranadsorbentien findet man nur wenige Publikationen über deren Anwendung in der extrakorporalen Plasmatherapie.^{50,51,52}

Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Herstellung und Untersuchung von Affinitätsmembranen zur selektiven Entfernung von toxischen Substanzen aus dem Blutplasma.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Membranadsorber für proteingebundene Toxine durch entsprechende Modifikationen von PA6-Membranen entwickelt werden, der insbesondere bezüglich Selektivität, Kompatibilität und Kapazität über Eigenschaften verfügt, die einen Einsatz zur Behandlung von Blutplasma innerhalb einer extrakorporalen Plasmatherapie erlauben. Unter den Begriff „proteingebundene Toxine“ fallen im Zusammenhang mit dieser Arbeit toxische Stoffwechselprodukte sowie exogene Substanzen wie z.B. Medikamente. Diesen Stoffen ist gemein, daß es sich um kleine hydrophobe Moleküle handelt, die wegen ihrer ungenügenden Wasserlöslichkeit im Blut an Proteine (insbesondere Albumin) gebunden transportiert und vor ihrer Ausscheidung innerhalb der Leber umgewandelt werden. Nachfolgend sind einige Beispiele für solche Substanzen angegeben:

Toxine:

- aromatische Aminosäuren
- Bilirubin
- Gallensäuren
- Indol-/Phenolmetabolite
- Thiole
- toxische Fettsäuren

Medikamente:

- Aspirin®
- Diazepam
- Haloperidol
- Ibuprofen
- Naproxen
- Warfarin

Es besteht ein großer Bedarf an spezifischen Adsorbern für Patienten mit akuten oder chronischen Leberschäden, aber auch zur Behandlung von z.B. Medikamentenintoxikationen.

Im ersten Teil der Arbeit sollen geeignete Verfahren zur Aktivierung von PA6-Mikrofiltrationsmembranen für eine Ligandenimmobilisation erarbeitet werden. Im Vordergrund steht hierbei die Aktivierung der Aminoendgruppen des Polyamids mittels verschiedener Diglycidylether von (Oligo-) Ethylenglycolen.

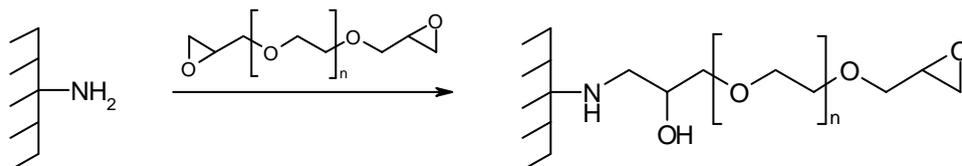


Abb. 1-12: Aktivierung von PA6-Membranen mit Diglycidylethern von (Oligo-)Ethylenglycolen

Die Verfügbarkeit einer homologen Reihe von Diglycidylethern gestattet spätere Untersuchungen zum Einfluß der Spacerlänge auf die Ligandenimmobilisation sowie auf die Adsorptionskapazität und -kinetik der herzustellenden Membranadsorber, da sich die einzelnen Glieder der Reihe zwar in ihrer Kettenlänge unterscheiden, aber weitgehend ähnliches chemisches und physikalisches Verhalten zeigen sollten.

Die Einführung von Oligoethylenglycolketten auf der hydrophoben Oberfläche der Polyamidmembran soll außerdem eine Verbesserung der Blutkompatibilität und Benetzbarkeit der herzustellenden Affinitätsmembranen bewirken.

Eine anschließende Umsetzung mit unterschiedlichen primären Diaminen soll die erhaltenen Membranen einer Immobilisation von Liganden mit elektrophilen Gruppen zugänglich machen. Außerdem sollen die Epoxidgruppen der diglycidyletheraktivierten Membranen durch hydrolytische Überführung in Diole sowie anschließende Periodatspaltung in Aldehyde überführt werden, wodurch eine weitere Reihe von aktivierten Membranen zur Immobilisation von Liganden mit nucleophilen Gruppen erhalten werden soll.

Um Polyamidmembranen für eine Immobilisation niedrigmolekularer Liganden zu aktivieren, ist eine hohe Ankergruppendichte notwendig, wenn die innere Membranoberfläche ökonomisch genutzt werden soll.

In Kap. 1.3 sind einige Maßnahmen aufgeführt, die ausgehend von einer Endgruppenaktivierung zu einer Erhöhung der Ankergruppendichte führen. In der vorliegenden Arbeit soll eine Vervielfachung der reaktiven Endgruppen durch Einführung dendritischer Strukturen realisiert werden. Hierzu sollen sukzessive kleine verzweigte Moleküle und flexible Spacer mit Ethylenglycoleinheiten eingeführt werden. Abb. 1-13 verdeutlicht diese Strategie anhand eines Beispiels, wobei sowohl verzweigte Moleküle mit elektrophilen Gruppen und Bisnucleophile als Spacer als auch verzweigte Moleküle mit nucleophilen Gruppen und Biselektrophile als Spacer kombiniert werden sollen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen Versuche zur Immobilisation verschiedener Liganden an die aktivierten Membranen durchgeführt werden, wobei einerseits hochmolekulare raumbesetzende Liganden (Serumalbumine und Glucose-Oxidase), andererseits niedrigmolekulare Liganden (Reaktivfarbstoffe und β -Cyclodextrinderivate) angebunden werden sollen.

Durch die Immobilisation von Rinderserumalbumin (BSA) an epoxyaktivierte Membranen wird neben der Einführung eines spezifischen Affinitätsliganden für proteingebundene Toxine eine Verbesserung der Blutkompatibilität angestrebt, da durch die kovalente und damit irreversible Anbindung von Serumalbuminen eine unspezifische Adsorption anderer Plasmaproteine wie

IgG oder Fibrinogen unterbunden werden sollte. Eine Adsorption der zuletzt genannten Proteine kann im Falle einer Vollblutbehandlung zu einer induzierten Adhäsion von Blutplättchen und damit zur Thrombenbildung führen.^{53,54}

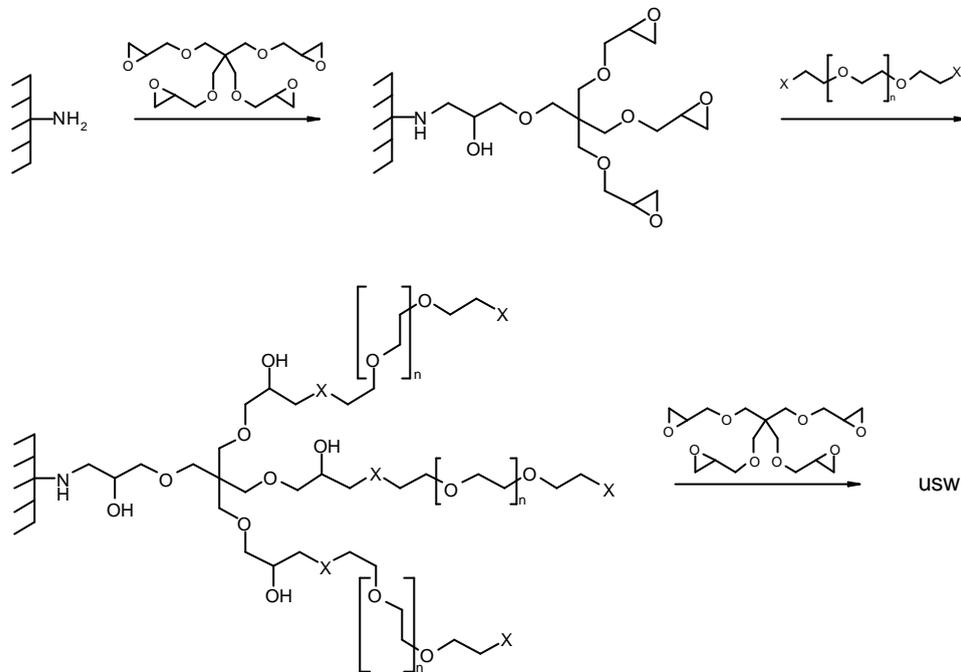


Abb. 1-13: Aufbau von dendritischen Strukturen an PA6-Membranen ($X = \text{OH}$ bzw. O , SH bzw. S oder NH_2 bzw. NH)

Die Immobilisation von Glucose-Oxidase (GOx) an epoxy- und aldehydaktivierte Membranen dient nicht der Herstellung eines Adsorbers, sondern eines „Membranreaktors“ zur selektiven Oxidation bestimmter Substrate. Hierbei gilt das Interesse einer Untersuchung der enzymatischen Aktivität des Immobilisates im Vergleich zum nativen Enzym, wobei der Einfluß einer möglichen Mehrpunktanbindung sowie der Spacerlänge verifiziert werden soll. Die Motivation zur Immobilisation von GOx resultiert aus der potentiellen Nutzbarkeit von GOx-immobilisierten Membranen zur Oxidation von Bilirubin. Das wasserunlösliche Bilirubin gehört als Stoffwechselmetabolit aus dem Hämabbau zur Gruppe der proteingebundenen Toxine und wird durch Oxidation in das wasserlösliche und nichttoxische Biliverdin überführt.⁵⁵

Aus der Gruppe der niedrigmolekularen Liganden sollen zunächst verschiedene Reaktivfarbstoffe (Cibacron Blue F3G-A, Procion Blue MX-R, Alkali Blue 6 B sowie Congo Red) an epoxy- und aminoaktivierte Membranen gebunden werden, wobei besonderes

Augenmerk auf die erzielbaren Ligandendichten an dendritisch aktivierten Membranen gerichtet wird.

Schließlich sollen Versuche zur Synthese von monosubstituierten β -Cyclodextrinderivaten und deren Immobilisation an unterschiedlich aktivierte Membranen durchgeführt werden. Hierdurch sollen „Breitbandadsorber“ für kleine hydrophobe Moleküle, die bekanntlich mit großen Bindungskonstanten Wirt/Gastkomplexe mit Cyclodextrinen bilden, erhalten werden.

Der dritte Teil der Arbeit dient der Untersuchung der hergestellten, ligandenimmobilisierten Membranen bezüglich der Adsorption von proteingebundenen Toxinen. Hierzu wird das bereits erwähnte Bilirubin als Modellverbindung gewählt. Bilirubin wird beim gesunden Menschen an Serumalbumin gebunden über den Blutkreislauf zur Leber transportiert, wo das wasserlösliche Diglucuronid gebildet wird. Letzteres wird mit der Galle ausgeschieden. Ist eine derartige Ausscheidung z.B. wegen einer chronischen Leberschädigung nicht mehr oder nur noch eingeschränkt möglich, reichert sich das toxische Bilirubin im Körpergewebe, insbesondere im Gehirn, an. Hieraus resultiert ein realer Bedarf nach einem spezifischen Adsorber für Bilirubin (vgl. Kap. 2.3).

Zur Beurteilung der Adsorptionskapazität der hergestellten Membranen werden Gleichgewichtsisothermen ermittelt und aus deren Verlauf Informationen über die Art und Stärke der auftretenden Wechselwirkungen abgeleitet.

2. Durchführung

2.1 Aktivierung von Polyamidmembranen für die Ligandenimmobilisation

2.1.1 Bekannte Verfahren zur Funktionalisierung von PA6-Membranen

Mikrofiltrationsmembranen aus Polyamiden zeichnen sich durch eine weite Verbreitung in technischen Prozessen aus und dienen häufig als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Membranadsorbentien.⁵ Als Beispiele für oft verwendete Polyamide seien an dieser Stelle Nylon 6 (PA6), ein durch ringöffnende Polymerisation von ϵ -Caprolactam erhältliches Polymer, sowie Nylon 66 (PA66), ein durch Polykondensation des AH-Salzes (Salz aus Adipinsäure und 1,6-Hexandiamin) erhältliches Produkt, genannt.⁵⁶

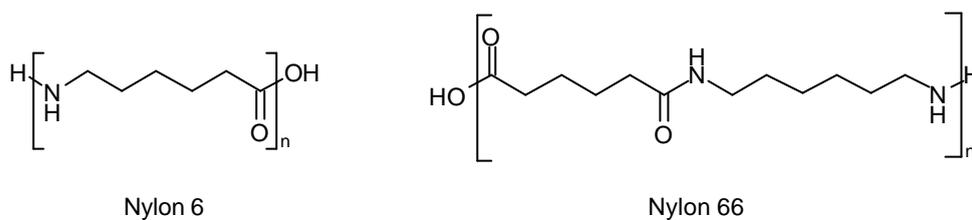


Abb. 2-1: Struktur von Nylon 6 und Nylon 66

Bei beiden genannten Polyamiden liegen Amino- und Carboxylendgruppen im Verhältnis 1:1 vor, sofern letzteres aus äquimolaren Mengen Diamin und Dicarbonsäure hergestellt wird, was durch den Einsatz des AH-Salzes sichergestellt und zur Realisierung hoher Molekulargewichte erforderlich ist.

Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Amidgruppen ist für den strukturellen Aufbau und somit für die physikalischen Eigenschaften der Polyamide von großer Bedeutung. Hierdurch resultieren Eigenschaften wie eine gute mechanische Festigkeit und Chemikalienbeständigkeit.⁵⁷

Nylonmembranen werden, wie die meisten kommerziell erhältlichen Membranen, nach Naßspinnverfahren (Phaseninversionsverfahren) hergestellt.⁵⁸ Hierbei wird die poröse Membranstruktur durch Fällung aus einer homogenen Polymerlösung erhalten. So entsteht nach Lösen eines Nylon-Granulates in Ameisensäure und anschließender Zugabe von Wasser eine hochviskose Polymerlösung, die z.B. in Form eines Films auf einen geeigneten Träger aufgebracht wird. Eine Änderung des Lösungszustandes kann dann beispielsweise durch

Verdampfen des Lösungsmittels oder Zugabe eines Fällungsmittels vollzogen werden. Es kommt zunächst zur Auftrennung in zwei Phasen, wobei eine Phase aus einer polymerreichen Lösung besteht, während die andere Phase an Polymer verarmt ist. Dieser Vorgang, der für die Ausbildung der Porenstruktur von entscheidender Bedeutung ist, wird als Phaseninversion bezeichnet. Schließlich erfolgt die Membranbildung durch weiteren Lösungsmittelentzug.

Die chemische Modifikation von PA6 und PA66 war Gegenstand zahlreicher Arbeiten, wobei die Entwicklung neuer Produkte mit bestimmten Eigenschaften, z.B. Benetzbarkeit mit wässrigen Medien⁵⁹ oder Schwerentflammbarkeit⁶⁰, angestrebt wurde. Zur Modifikation von PA6 durch polymeranaloge Reaktionen stehen, wie bereits in Kap. 1.3 erwähnt, neben den Amidgruppen der Polymerkette auch die Amino- und Carboxylendgruppen zur Verfügung. Gleiches gilt für die naturgemäß heterogene Aktivierung von PA6 oder PA66-Mikrofiltrationsmembranen für eine Ligandenimmobilisation.

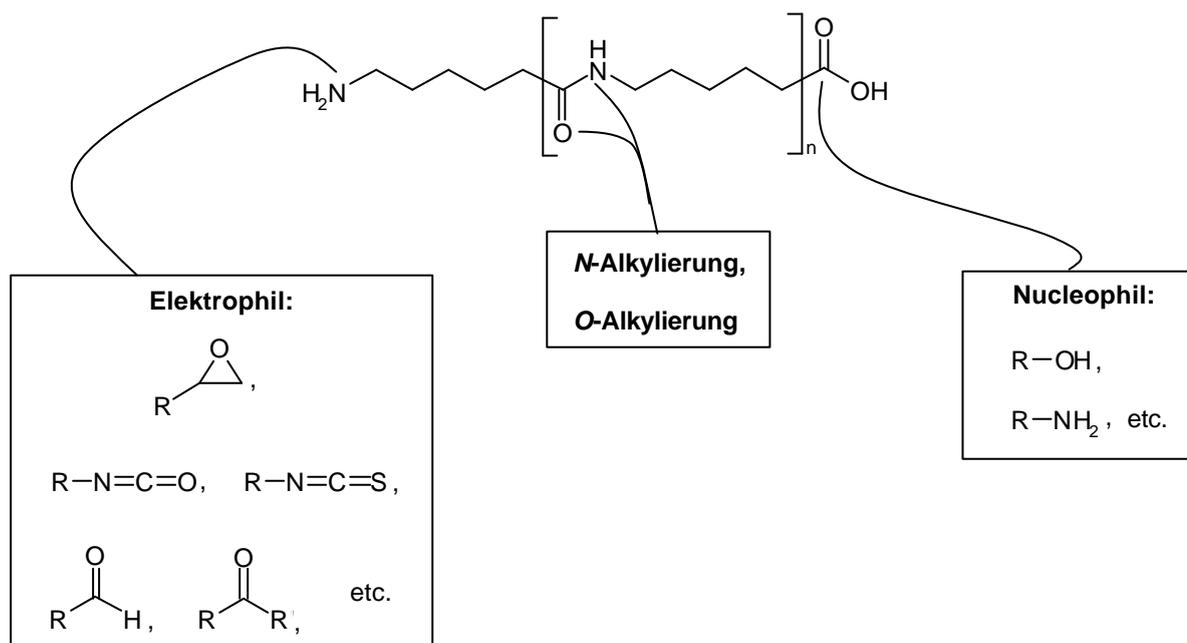


Abb. 2-2: Möglichkeiten zur Funktionalisierung von PA6

Aktivierungen der Amidgruppen von Nylonmembranen durch *N*- oder *O*-Alkylierungen sind selten zu finden. Der Grund hierfür liegt in den anzuwendenden Reaktionsbedingungen, die in der Regel drastischer als bei vergleichbaren Endgruppenaktivierungen sind und die Verwendung organischer Lösungsmittel erforderlich machen. Außerdem reichen die Endgruppendichten von

Nylon-Mikrofiltrationsmembranen (vgl. Tab. 1-3) für eine Immobilisation von großen Molekülen (z.B. Proteine) meistens aus, da eine Limitierung der realisierbaren Ligandendichten in diesem Fall durch die zur Verfügung stehende innere Oberfläche der Membran gegeben ist.

Andererseits findet man zahlreiche Publikationen über Endgruppenaktivierungen von Polyamidmembranen zur nachfolgenden Ligandenimmobilisation, wobei häufig bisfunktionelle Linker oder Spacer Verwendung finden. Je nach Funktionalität des zu kuppelnden Liganden werden dabei homobisfunktionelle (z.B. Bisepoxide) oder heterobisfunktionelle (z.B. Aminocarbonsäuren) Verbindungen verwendet. Heterobisfunktionelle Linker und Spacer lassen sich weiterhin in solche, die über zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen mit gleichartiger Reaktivität (z.B. Ketogruppe und Epoxid) verfügen, und in solche mit funktionellen Gruppen andersartiger Reaktivität (z.B. Amino- und Carboxylgruppe) unterteilen.

Typische Umsetzungen der Aminoendgruppen von Polyamidmembranen mit Glutardialdehyd oder Trichlor-s-triazin (trifunktioneller Linker) wurden von *Kula et al.* genutzt, um anschließend Enzymimmobilisationen durchzuführen.^{61,62} *Klein et al.* verwendeten unter anderem 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI), 2-Fluor-1-methylpyridinium-*p*-toluolsulfonat (FMP) sowie, nach Glutardialdehydaktivierung, Adipinsäuredihydrazid zur Aktivierung von PA6-Membranen.^{63,64} Die Einführung von Epoxiden durch Umsetzung der terminalen Aminogruppen mit Epihalogenhydrinen und Bisepoxiden ist von mehreren Autoren beschrieben worden.^{65,66} Über eine Aktivierung der Carboxylendgruppe durch Umsetzung mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wird von *Degen et al.* berichtet.⁶⁷ Abb. 2-3 gibt einen zusammenfassenden Überblick zu bekannten Beispielen von Endgruppenaktivierungen an Polyamidmembranen.

Entsprechend der Aufgabenstellung werden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Aktivierungen an den Aminoendgruppen von PA6-Membranen durchgeführt. Hierzu wurden Flachmembranen, Hohlfasermembranen sowie Kompletต์module mit Hohlfasermembranen von der Firma MAT GmbH & Co. KG, Obernburg zur Verfügung gestellt.

| | Flachmembran | Hohlfasermembran |
|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| (Wand-)Dicke | 110 µm | 110 µm |
| Innendurchmesser | - | 300 µm |
| kleinste Porenweite | 0.45 µm | k.A. |
| größte Porenweite | 0.80 µm | k.A. |
| Dichte | 0.6 - 0.7 g/cm ³ (MV) | 0.7 g/cm ³ (MV) |
| spez. Oberfläche (BET) ⁶⁸ | 12 - 13 m ² /g | 15 - 17 m ² /g |

Tab. 2-1: Herstellerdaten zu den verwendeten Membranen

Die Herstellerdaten zu den jeweiligen Membranen sind in Tab. 2-1 zusammengefasst. Weitere Informationen werden in Kap. 4.1 angegeben.

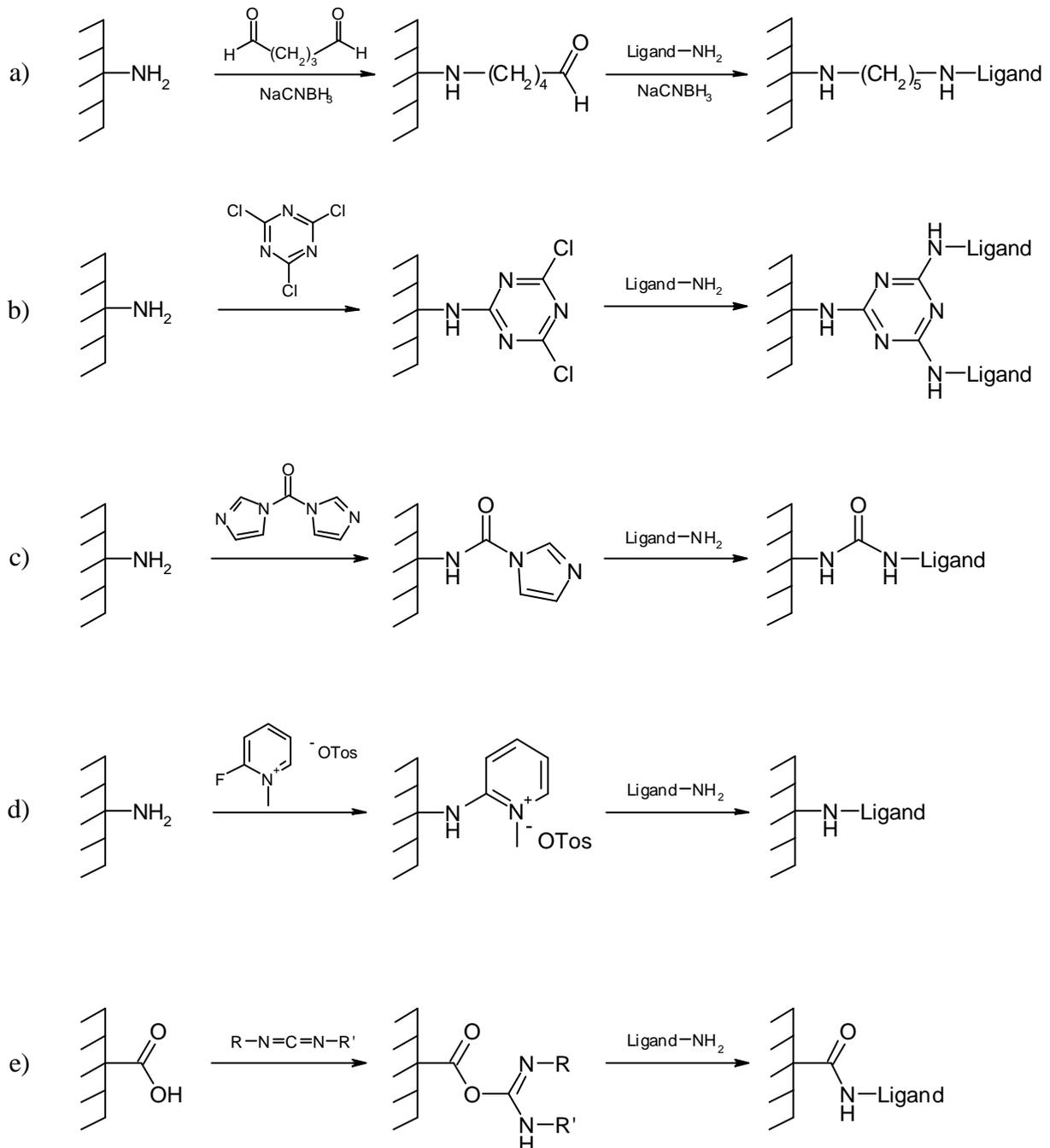
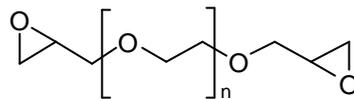


Abb. 2-3: Beispiele zur Aktivierung der Endgruppen von Polyamidmembranen und anschließenden Immobilisation aminofunktionaler Liganden; a): Aminoendgruppenaktivierung mit Glutardialdehyd, b): mit Trichlor-s-triazin, c): mit CDI, d): mit FMP, e): Aktivierung der Carboxylendgruppe mit Carbodiimiden

2.1.2 Aminoendgruppenaktivierung mit Diglycidylethern von OEGs und PEGs

Die Verwendung von Bisepoxiden als Kupplungsreagenzien zur Ligandenimmobilisation an Trägermaterialien mit Hydroxylgruppen führt zu besonders stabilen Etherbrücken (vgl. Abb. 1-6) und ist in der klassischen Affinitätschromatographie weit verbreitet. Die vorteilhaften Eigenschaften der Bisepoxide haben dazu geführt, daß in den letzten Jahren vielfach über die Aktivierung von Mikrofiltrationsmembranen mit diesen Verbindungen berichtet wurde.^{69,70,71} Erstaunlicherweise findet man trotz weiter Verbreitung dieser Methode lediglich zwei verschiedene Bisepoxide als verwendete Kupplungsreagenzien, nämlich Butandioldiglycidylether (BDDGE) und Ethylenglycoldiglycidylether (EGDGE), obwohl weit mehr Verbindungen dieses Typs bekannt und kommerziell erhältlich sind.

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode zur Aktivierung von PA6-Membranen mit verschiedenen Diglycidylethern von (Oligo-)Ethylenglycolen erarbeitet werden. Zuvor sollen möglichst viele Glieder der homologen Reihe



durch Synthese der entsprechenden Verbindungen zugänglich gemacht werden. Neben den bereits erwähnten Vorteilen einer Ligandenimmobilisation mit Bisepoxiden sollte sich aus dem Einsatz von (Oligo-)Ethylenglycolspacern eine Verbesserung der Biokompatibilität und Benetzbarkeit der erhaltenen Membranen, eine gute Wasserlöslichkeit der zur Membranaktivierung notwendigen Reagenzien sowie eine einfache Synthese der Diglycidylether aus käuflichen Edukten ergeben. Die Verbesserung der Biokompatibilität und eine gute Benetzbarkeit mit wäßrigen Medien kann von den bekannten Eigenschaften der Polyethylenglycole abgeleitet werden. Aus dem effektiven Ausschluß anderer Polymere in wäßriger Umgebung, bedingt durch die hohe Dynamik der PEG-Ketten bzw. die hohe konformative Entropie, folgen geringe Wechselwirkungen mit Proteinen^{72,73}, wodurch eine effektive Abschirmung der OEG-modifizierten Membranoberfläche gegen unspezifische Proteinadsorption resultieren sollte. Weiterhin führt das hohe Ausschlußvolumen der PEGs zu einem komplexen Lösungsverhalten in Wasser, einer Nicht-Toxizität gegenüber biologischen Materialien sowie einer stark verminderten Immunogenität.⁷² Aufgrund dieser Eigenschaften werden PEGs erfolgreich in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie eingesetzt und sind

attraktiv für die Immobilisation von biochemischen Komponenten. Erste Anwendungen von PEGs zur Immobilisation von Proteinen für ELISA haben sich als vielversprechend gezeigt.⁷⁴ Eine effektive Abschirmung gegen unspezifische Wechselwirkungen durch selbstanordnende Monoschichten (SAMs) aus PEG-terminierten, langkettigen Thiolen wird auch von *Whitesides et al.* sowie *Svensson et al.* beschrieben.^{75,76} Eine gute Benetzbarkeit sowie gutes Quellverhalten in Wasser und polaren Lösungsmitteln wird von *Bayer* und *Rapp* durch Pfropfpolymerisation von PEGs an Polystyrolbeads erreicht.^{77,78} Hieraus resultierten zahlreiche hochfunktionalisierte Produkte, die heute kommerziell unter dem Namen TentaGel[®] erhältlich sind.

Synthese der Diglycidylether von (Oligo-)Ethylenglycolen

Zur Synthese von Epoxiden haben sich u.a. die Cyclodehydrohalogenierung von Halogenhydrinen im Sinne einer intramolekularen S_N-Reaktion sowie die Epoxidation von Olefinen mit Persäuren etabliert. Die Synthese der Diglycidylether von (Oligo-)Ethylenglycolen (OEGs) konnte auf beide Weisen realisiert werden, wobei in allen Fällen die jeweiligen Glycole als Ausgangsverbindungen dienten. Letztere konnten durch Umsetzung mit Allylbromid unter basischen Bedingungen mit hoher Ausbeute in die entsprechenden Bisallylether überführt werden. Hierdurch eröffnete sich die Möglichkeit einer Addition von Hypohalogenigen Säuren mit anschließender Cyclodehydrohalogenierung (Abb. 2-4). Die über diesen Weg erzielbaren Ausbeuten waren jedoch nicht zufriedenstellend. Da geringe Ausbeuten dieses Syntheseweges auch in der Literatur⁷⁹ berichtet werden, erfolgte keine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen.

Außerdem wurden Epoxidationen der Bisallylether mit unterschiedlichen Persäuren durchgeführt. Die erhaltenen Ausbeuten betrugen im besten Fall 30 bis 40 % bei Verwendung von *m*-Chlorperbenzoesäure und müssen ebenfalls als unbefriedigend bezeichnet werden.

Durch Optimierung einer Methode von *Okahara et al.*⁸⁰ gelang die Synthese der Diglycidylether von OEGs mit zwei bis vier Ethylenglycoleinheiten schließlich in hohen Ausbeuten durch Umsetzung der jeweiligen Glycole mit einem Überschuß Epichlorhydrin unter basischen Bedingungen in Gegenwart eines Phasentransferkatalysators. Hierbei greifen die im alkalischen Medium partiell deprotonierten Hydroxylgruppen des OEGs in Form einer S_N2-Reaktion an die Epoxidgruppe des Epichlorhydrins unter intermediärer Bildung von Bischlorhydrinen an.

Letztere reagieren im alkalischen Milieu sofort in einer intramolekularen S_N -Reaktion zu den entsprechenden Diglycidylethern (Abb. 2-5).

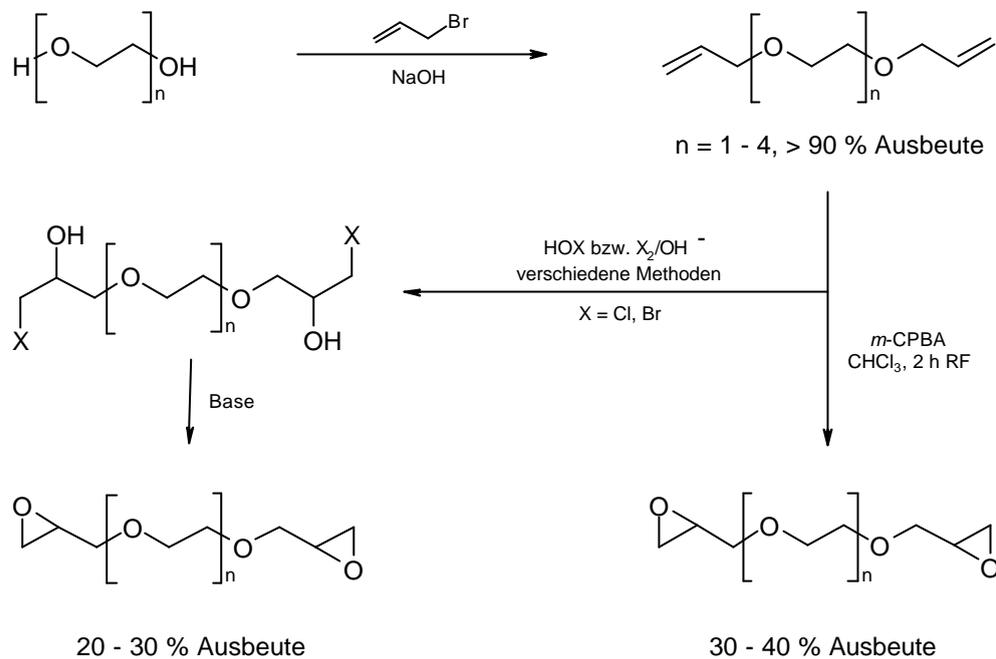


Abb. 2-4: Versuche zur Darstellung der Diglycidylether von (Oligo-)Ethylenglycolen

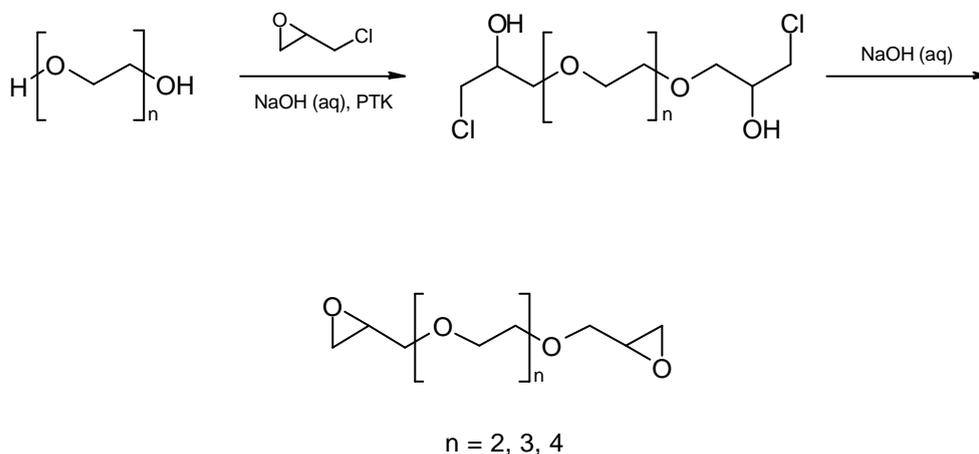


Abb. 2-5: Synthese der Diglycidylether von Oligoethylenglycolen nach *Okahara et al.*⁸⁰
(erhaltene Ausbeuten: $n = 2$: 58 %, $n = 3$: 93 %, $n = 4$: 85 %)

Die Optimierung der Originalvorschrift gelang durch Erhöhung der Reaktionszeit sowie durch Änderung der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches, wobei die angegebene Filtration durch

mehrfache Extraktion mit Diethylether ersetzt wurde. Die hierdurch erreichte Vermeidung von Verlusten führte z.B. im Falle der Synthese des Diglycidylethers von Triethylenglycol zu einer Gesamtausbeute von 93 % an reinem Produkt.

Der Diglycidylether von Ethylenglycol konnte nach der beschriebenen Weise nur in mangelhaften Ausbeuten erhalten werden, da in Übereinstimmung mit der Literatur⁸¹ vorwiegend nichtflüchtige Oligomere entstanden. Eine Erhöhung der Ausbeute auf 39 % konnte dadurch erzielt werden, daß Ethylenglycol mit einem Überschuß Epichlorhydrin in DMSO unter Verwendung von Kaliumhydroxid als Base umgesetzt wurde.

Die Darstellung von Diglycidylether wurde durch Epoxidation von Allylglycidylether mit *m*-Chlorperbenzoesäure in 59 %iger Ausbeute realisiert:

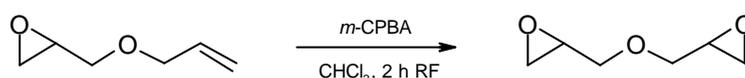


Abb. 2-6: Synthese von Diglycidylether

Prinzipiell ist die analoge Reaktion auch mit Bisallylether möglich (vgl. Abb. 2-4), doch ist dieser wesentlich teurer als das verwendete Edukt.

Nach fraktionierter Destillation fielen alle Diglycidylether in einer Reinheit von über 95 % (GC) an, wobei meistens noch geringe Mengen der jeweiligen Monoglycidylether zu finden waren.

Einige Diglycidylether von höheren Oligo- und Polyethylenglycolen wurden von der Fa. Nagase Chemicals Ltd., Japan als Muster zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um die kommerziell unter der Bezeichnung Denacol[®] erhältlichen Diglycidylether von OEGs/PEGs mit 9 (Denacol[®] EX 830), 13 (Denacol[®] EX 841) und 22 (Denacol[®] EX 861) Ethylenglycol-einheiten. Die Produkte zeigten in der gaschromatographischen Analyse einen Anteil von 30 bis 50 % Verunreinigungen. Es erfolgte eine Verwendung dieser Produkte ohne vorherige Aufreinigung.

Die folgende Tab. 2-2 gibt einen Überblick zu allen in dieser Arbeit verwendeten Diglycidylethern mit Verweis auf die jeweilige Synthese. Bei kommerziell erhältlichen Produkten ist an Stelle der Synthese die Bezugsquelle angegeben.

| Diglycidylether | Abkürzung | n ^a | M [g/mol] | Spacer [n Atome] | Synthese/ Bezugsquelle |
|--|------------|-----------------|----------------------|---------------------|---------------------------|
| Diglycidylether | DGE | 0 | 130.14 | 7 | Kap. 4.3.1 |
| Ethylenglycol- diglycidylether | EGDGE | 1 | 174.20 | 10 | Kap. 4.3.2 |
| Diethylenglycol- diglycidylether | DiEGDGE | 2 | 218.26 | 13 | Kap. 4.3.3 |
| Triethylenglycol- diglycidylether | TriEGDGE | 3 | 262.32 | 16 | Kap. 4.3.3 |
| Tetraethylenglycol- diglycidylether | TetraEGDGE | 4 | 306.38 | 19 | Kap. 4.3.3 |
| Denacol [®] EX 830 | EX 830 | 9 ^b | 526.68 ^b | 34 ^b | Nagase Chemicals |
| Denacol [®] EX 841 | EX 841 | 13 ^b | 702.92 ^b | 46 ^b | Nagase Chemicals |
| Denacol [®] EX 861 | EX 861 | 22 ^b | 1099.46 ^b | 73 ^b | Nagase Chemicals |
| Butandiol- diglycidylether | BDDGE | - | 202.25 | 12 | Fluka |

Tab. 2-2: Eigenschaften der verwendeten Diglycidylether; ^a: Anzahl an Ethylenglycoleinheiten; ^b: Mittelwerte

Aminoendgruppenaktivierungen mit Diglycidylethern von (Oligo-)Ethylenglycolen

Im Rahmen der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit⁸² konnte eine effiziente Methode zur Aminoendgruppenaktivierung von PA6-Membranen mit Diglycidylethern von OEGs erarbeitet werden. Als optimale Reaktionsbedingung wurde dort ein vierstündiges Schütteln der zu aktivierenden Membran in einer Lösung von 50 mmol des jeweiligen Diglycidylethers in 50 mL 0.025 M wässriger Natriumcarbonatlösung (pH 11) bei einer Temperatur von 80 °C ermittelt. Höhere pH-Werte, wie sie in der Literatur⁸³ häufig beschrieben werden, führten zu geringeren Ausbeuten, da parallel zur gewünschten Anbindung des Epoxides an die Aminoendgruppen der Membran eine Öffnung der Epoxidtermini bereits gebundener Diglycidylether zum Diol beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 2-7).

Die quantitative Bestimmung membrangebundener Epoxidgruppen konnte durch zwei unterschiedliche Methoden vollzogen werden. Die erste Methode stellt eine Modifikation der von *Staupe et al.* beschriebenen Bestimmung der Adsorptionskapazität von metallchelatisierenden Affinitätsmembranen auf Polysulfonbasis dar.⁸⁴ Hierbei wurde zunächst Iminodiessigsäure

(IDA) als Ligand an die diglycidyletheraktivierte Membran gebunden und diese anschließend mit Cu^{2+} -Ionen beladen (Abb. 2-8). Die Kupferionen wurden schließlich mit einer wässrigen Lösung von Dinatrium-EDTA, das eine deutlich höhere Komplexbildungskonstante als der Ligand aufweist, eluiert. Den Gehalt an Kupferionen in der Dinatrium-EDTA-Lösung ermittelte man zuletzt mittels AAS, wobei ein Additionsverfahren nach DIN 38 406, Teil 7 angewendet wurde, um Matrixeinflüsse weitestgehend zu kompensieren. Die so ermittelte Stoffmenge an Kupferionen entspricht der Stoffmenge an Epoxidgruppen der Membranprobe.

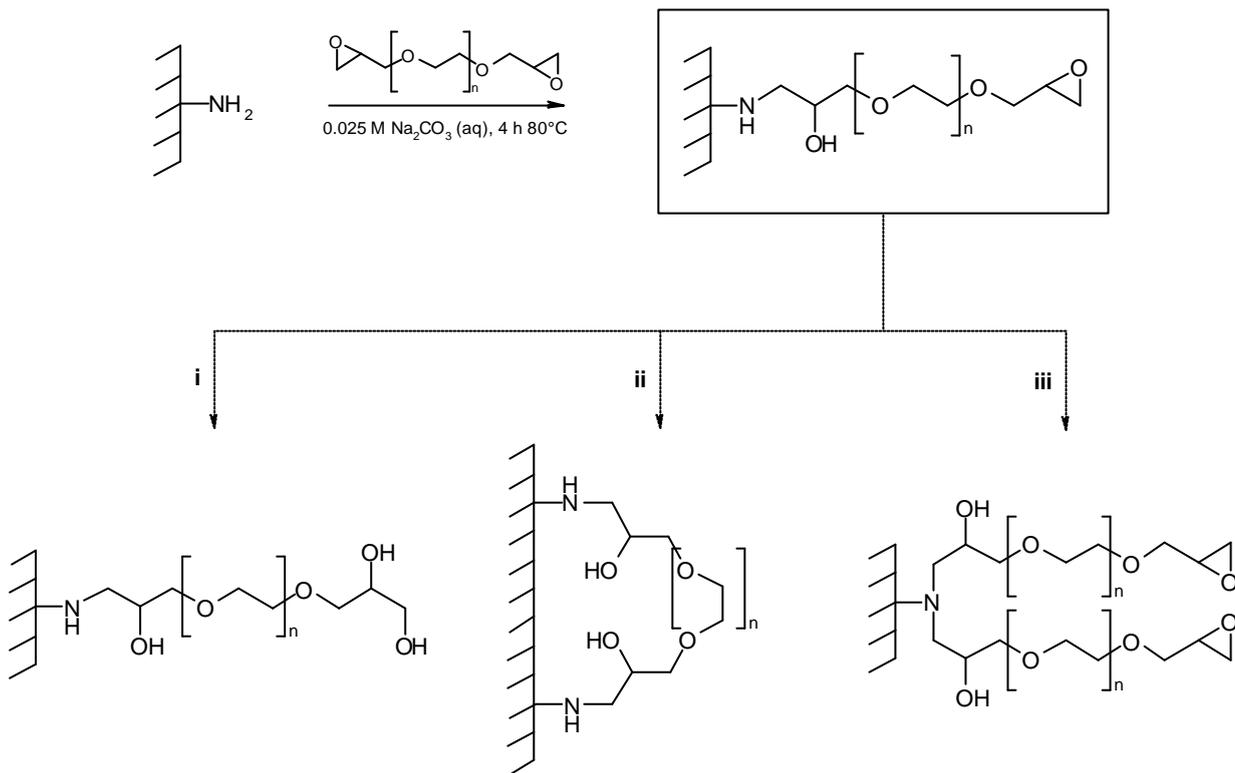


Abb. 2-7: Aktivierung der Aminoendgruppen von PA6-Membranen mit Diglycidylethern von OEGs; **i**: mögliche Öffnung des terminalen Epoxids zum Diol, **ii**: mögliche Brückenbildung zwischen zwei Aminoendgruppen, **iii**: Reaktion eines zweiten Äquivalentes Diglycidylether an einer Aminoendgruppe

Zur Anwendung der zweiten Methode wurde ein Teil der zu untersuchenden, diglycidylether-aktivierten Membranprobe mit einer fünfprozentigen Lösung von 1,6-Hexandiamin (HDA) in 0.025 M wässriger Natriumcarbonatlösung umgesetzt. Hierdurch wird bei vollständigem Umsatz gemäß Abb. 2-9 je Epoxidgruppe eine primäre Aminogruppe eingeführt. Anschließend wurden

die primären Aminoendgruppen der diglycidyletheraktivierten sowie der mit HDA umgesetzten Membranprobe mittels Ninhydrin-Assay quantifiziert. Die gesuchte Stoffmenge an Epoxid ergibt sich dann aus der Differenz dieser beiden Meßwerte. Die Bestimmung erfolgte durch Behandeln der Membranproben mit Ninhydrin-Reagenzlösung nach Moore⁸⁵, wobei die Konzentration des durch Reaktion der primären Aminogruppen mit 1,2,3-Triketohydrinden-Hydrat (Ninhydrin) entstehende Diketohydrindylidendiketohydrindamin als Blaufärbung der Lösung durch Messung der Extinktion bei 570 nm ermittelt werden konnte. Aus einer Eichgeraden, die durch analoge Vorgehensweise mit wäßrigen 6-Aminocapronsäurelösungen bekannter Konzentrationen ermittelt wurde, ergab sich direkt die Konzentration primärer Aminogruppen der Membranprobe.

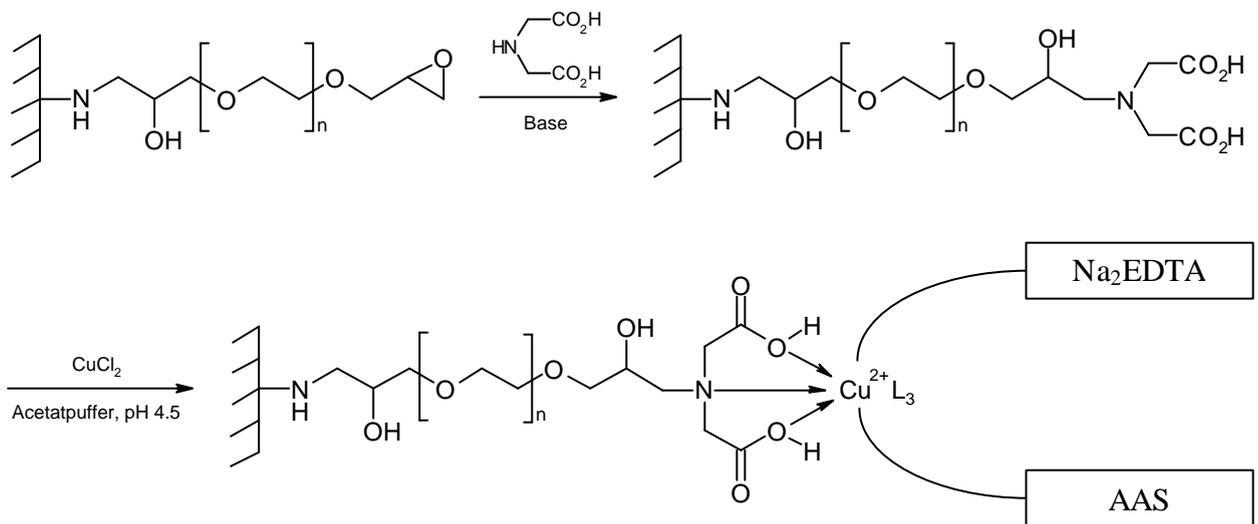


Abb. 2-8: Bestimmung membrangebundener Epoxidgruppen mittels AAS

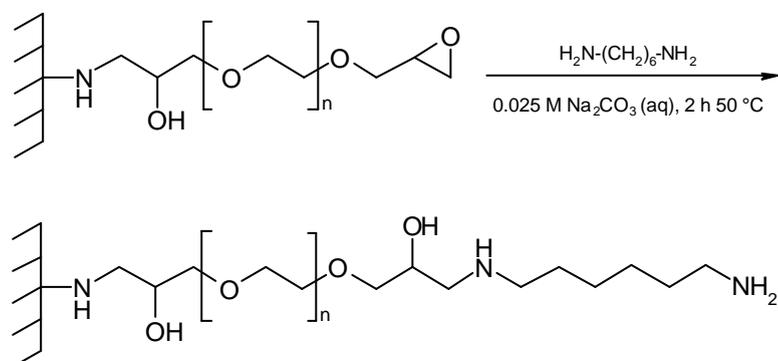


Abb. 2-9: Umsetzung diglycidyletheraktivierter Membranen mit HDA

Eine ausführliche Diskussion über Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der beiden Methoden ist der vorausgegangenen Diplomarbeit zu entnehmen.⁸²

Bei einem Vergleich der erhaltenen Meßwerte konnte in allen Fällen beobachtet werden, daß die ermittelten Mengen an membrangebundenem Epoxid bei Anwendung der ersten Methode (AAS) nur ca. 70 % bezüglich der mittels Ninhydrin-Assay erhaltenen Werte betragen. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte diese systematisch auftretende Differenz bestätigt werden. Der wahrscheinliche Grund hierfür ist in der Umsetzung der diglycidyletheraktivierten Membranproben einerseits mit IDA, andererseits mit HDA zu suchen. Während eine nahezu vollständige Umsetzung von festphasengebundenen Epoxiden mit HDA gemäß Abb. 2-9 in der Literatur häufig beschrieben wird, nennt *Klein* für die Reaktion mit IDA deutlich kleinere erzielbare Umsätze.⁴⁴ Demnach scheinen realistische Meßdaten nur mit Hilfe der „Ninhydrin-Methode“ erzielbar zu sein. Schließlich konnte durch Optimierung dieser Methode eine deutliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit realisiert werden, so daß alle in dieser Arbeit angegebenen Meßdaten, falls an der jeweiligen Stelle nicht anders angegeben, auf diese Weise ermittelt wurden.

Die Dichten an Aminoendgruppen der verwendeten Ausgangsmembranen wurden ebenfalls mittels Ninhydrin-Assay bestimmt, wobei sich folgende Werte ergaben:

| | |
|--------------------------|--|
| Flachmembran: | 8.5 ± 0.5 µmol(-NH₂)/cm³(MV) |
| | 13.1 ± 0.8 µmol(-NH ₂)/g(Membran) |
| Hohlfasermembran: | 10.3 ± 0.5 µmol(-NH₂)/cm³(MV) |
| | 14.7 ± 1.1 µmol(-NH ₂)/g(Membran) |

Die ermittelten Epoxidgruppensdichten für Flachmembranen, die nach dem beschriebenen Standardprotokoll aktiviert wurden, sind in Abb. 2-10 angegeben. Die dort eingezeichnete horizontale Linie gibt die ursprüngliche Aminoendgruppensdichte der unmodifizierten PA6-Flachmembran an.

Bei den kurzkettigen Diglycidylethern von Oligoethylenglycolen mit 0- 4 Ethylenglycoleinheiten konnte keine ausgeprägte Abhängigkeit der Epoxidgruppensdichte von der Kettenlänge beobachtet werden. Alle ermittelten Werte lagen geringfügig oberhalb der ursprünglichen Aminogruppendichte. Demnach kam es in einem untergeordneten Maße zu der in Abb. 2-7 dargestellten Reaktion eines nach Anbindung des Diglycidylethers entstandenen sekundären Amins mit einem weiteren Äquivalent Diglycidylether. Diese Beobachtung konnte insbesondere

nach Umsetzung mit BDDGE gemacht werden, wobei eine eineinhalbfache Epoxidgruppendichte bezüglich der ursprünglichen Dichte an primären Aminogruppen gefunden wurde. Reaktionen, die zu einer Verringerung der erzielbaren Epoxidgruppendichte führen (z.B. Brückenbildungen oder intramolekulare Cyclisierungen eines bereits gebundenen Diglycidylethers), konnten somit für die kurzkettigen Bisepoxide ausgeschlossen werden.

Bei den langkettigen Diglycidylethern beobachtete man eine deutliche Abnahme der gefundenen Epoxidgruppendichte mit Zunahme der Kettenlänge. Im Fall von Denacol[®] EX 861 konnten nur noch 2.8 $\mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{cm}^3(\text{MV})$ gefunden werden. Als Grund für diese Beobachtung sind sterische Effekte zu nennen. Da es sich bei Denacol[®] EX 841 und EX 861 um Polymere handelt, wurde die im Sinne der Reaktion erforderliche Annäherung der Epoxidgruppen an die in ihrer Beweglichkeit ebenfalls sehr eingeschränkten Aminoendgruppen des Polyamids zu stark behindert. Als weitere Ursache sind die bei höherer Kettenlänge wahrscheinlicher werdenden Brückenbildungen zwischen zwei Aminoendgruppen in Betracht zu ziehen. Eine Optimierung des Standardprotokolls bezüglich einer Aktivierung von PA6-Membranen mit Diglycidylethern von langkettigen Polyethylenglycolen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

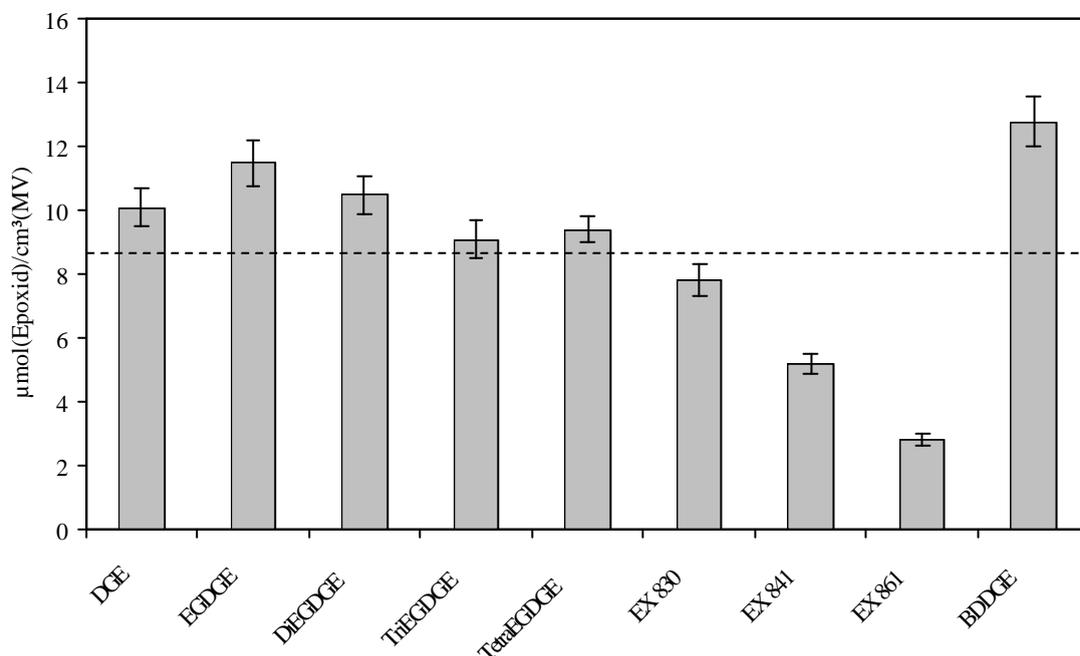


Abb. 2-10: Epoxidgruppendichten an diglycidyletheraktivierten PA6-Flachmembranen

Die nach der Aktivierung von losen Hohlfasermembranen ermittelten Epoxidgruppendichten deckten sich weitgehend mit den für Flachmembranen dargestellten Ergebnissen. Außerdem

wurden Aktivierungen an Hohlfasern in kompletten Dead-End-Modulen durchgeführt. Hierzu wurden die im Standardprotokoll angegebenen Spül- und Reagenzlösungen nach Konditionierung und Entlüftung des Moduls mittels einer peristaltischen Pumpe durch das Modul zirkuliert. Nach Optimierung der Aktivierungsbedingungen in Form einer Verringerung der Temperatur auf 65 °C sowie einer Verlängerung der Reaktionszeit auf acht Stunden konnten die für lose Hohlfasermembranen erhaltenen Ergebnisse innerhalb der angegebenen Fehlergrenzen gut reproduziert werden.

Alle Ergebnisse bezüglich der Aminoendgruppenaktivierung mit Diglycidylethern von OEGs und PEGs sind in Kap. 4.4.1 aufgeführt.

Überführung terminaler Epoxidgruppen in Aldehyde

Gemäß Aufgabenstellung dieser Arbeit sollte eine Methode zur Überführung der Epoxidgruppen von diglycidyletheraktivierten Membranen in Aldehyde erarbeitet werden. Eine auf diese Weise erhaltene Reihe von aldehydaktivierten Membranen gestattet spätere Vergleiche mit den entsprechenden diglycidyletheraktivierten Membranen bezüglich einer Immobilisation von Liganden mit nucleophilen Gruppen. In diesem Zusammenhang beschreibt *Rasch* eine Methode zur Hydrolyse der Epoxidgruppen einer EGDGE-aktivierten PA6-Membran und anschließenden Oxidation des vicinalen Diols mit Natriumperiodat.⁸³

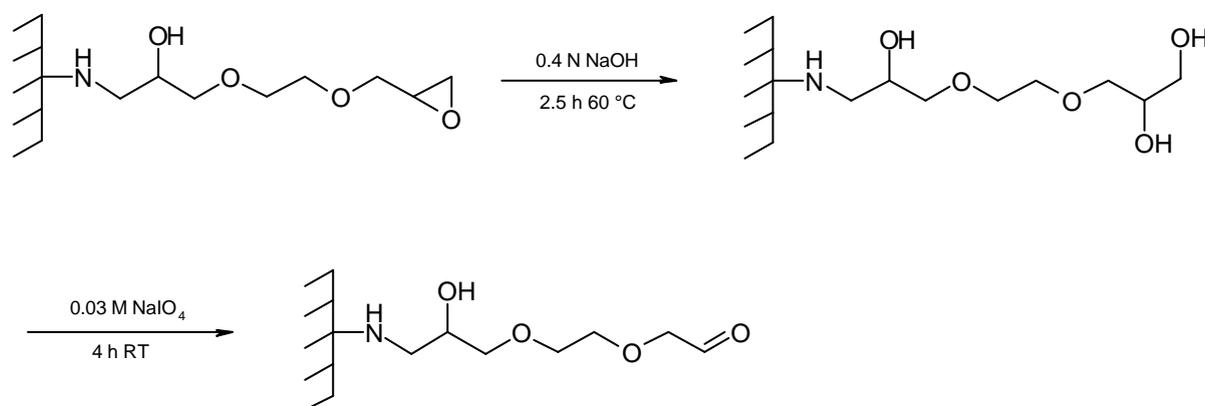


Abb. 2-11: Überführung membrangebundener Epoxide in Aldehyde nach *Rasch*⁸³

Eine Übertragung der dort angegebenen Reaktionsbedingungen sollte eine möglichst quantitative Überführung der Epoxidgruppen an den innerhalb der vorliegenden Arbeit hergestellten diglycidyletheraktivierten Membranen in Aldehyde ermöglichen. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde durch Anwendung der „Ninhydrin-Methode“ zur Bestimmung membrangebundener Epoxidgruppen überprüft. Die von *Rasch*⁸³ angegebene zweieinhalbstündige Behandlung einer EGDGE-aktivierten PA6-Flachmembran mit 0.4 N Natronlauge bei einer Temperatur von 60 °C führte bei den hier untersuchten Membranen zu Umsätzen von weniger als 40 %. Erst eine Verlängerung der Reaktionszeit auf acht Stunden bei sonst unveränderten Bedingungen führte zu einer Überführung von ca. 90 % der Epoxidgruppen in vicinale Diolen. Diese Beobachtung stimmt mit den Angaben der Fa. Pharmacia AB, Schweden überein. Dort wird über die ungewöhnlich hohe Stabilität der Epoxidgruppen von BDDGE-aktivierter Agarose bezüglich einer Hydrolyse im alkalischen Medium berichtet.¹⁹

Die Periodatspaltung erfolgte schließlich entsprechend der bei *Rasch* beschriebenen Bedingungen durch Behandlung der Membranen mit einer 0.03 M wässrigen Natriumperiodatlösung.

Zur Quantifizierung der nach Periodatspaltung erhaltenen Aldehydgruppen wurden die jeweiligen Membranproben mit einer fünfprozentigen HDA-Lösung behandelt. Eine anschließende Reduktion des dabei gebildeten Imins erfolgte durch Zugabe von Natriumcyano-borhydrid. Die zu bestimmenden Aldehydgruppensdichten ergaben sich nach Durchführung des Ninhydrin-Assays aus der ermittelten Konzentration primärer Aminogruppen.

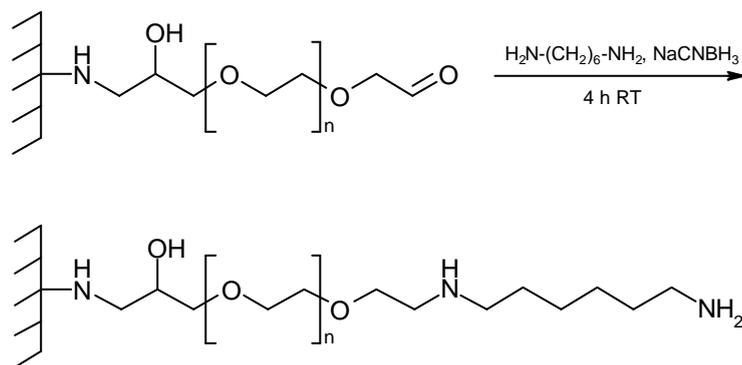


Abb. 2-12: Reduktive Aminierung aldehydaktivierter Membranen mit HDA

Die erzielten Aldehydgruppensdichten betragen nach Anwendung der bei *Rasch*⁸³ beschriebenen Reaktionsbedingungen in allen Fällen etwa 50 % der ursprünglichen Dichte an Epoxidgruppen.

Versuche zur Optimierung durch Verlängerung der Reaktionszeit und Erhöhung der Natriumperiodatkonzentration führten zu keiner signifikanten Verbesserung der Ausbeuten. Das beste Ergebnis konnte für BDDGE-aktivierte Membranen erhalten werden, wobei fast 70 % der Epoxidgruppen in Aldehyde überführt wurden. Abb. 2-13 gibt einen Überblick zu den erhaltenen Ausbeuten an Flachmembranen (vgl. Kap. 4.4.2). Zum Vergleich sind die Epoxidgruppensdichten der jeweiligen Ausgangsmembran angegeben.

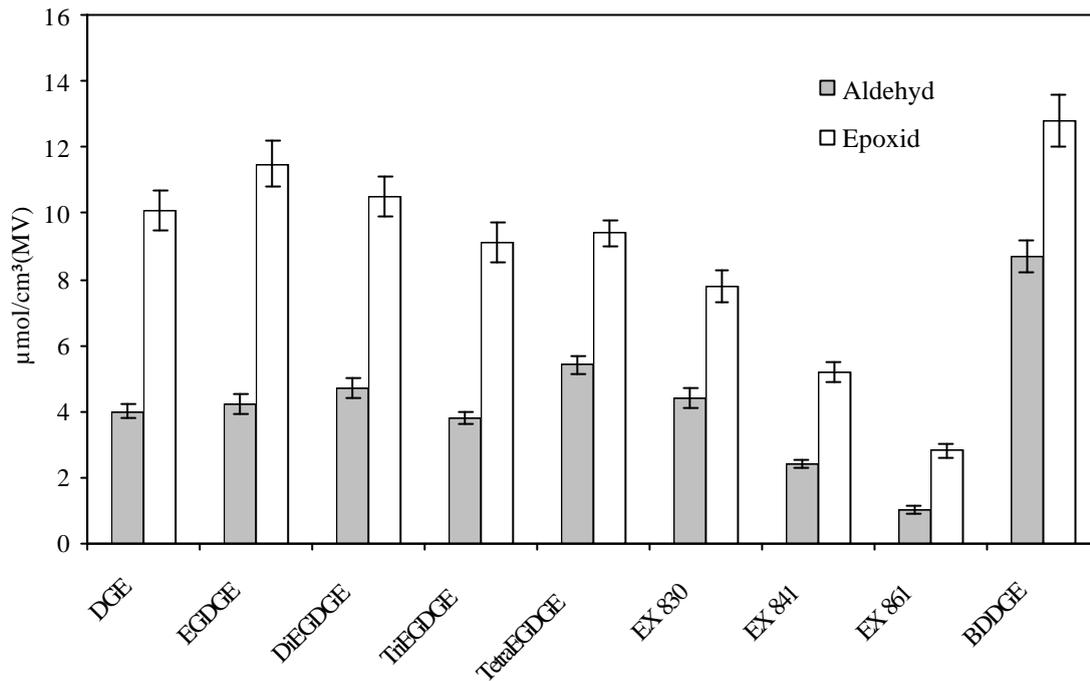


Abb. 2-13: Aldehydgruppensdichten nach Hydrolyse des Epoxids diglycidyletheraktivierter PA6-Flachmembranen und anschließender Periodatspaltung (zum Vergleich sind die ursprünglichen Dichten an Epoxidgruppen angegeben)

Umsetzungen diglycidyletheraktivierter Membranen mit Diaminen

Zur Immobilisation von Liganden mit elektrophilen Gruppen sollten Membranen mit primären Aminoendgruppen, die über OEG- bzw. PEG-Spacer angebunden sind, hergestellt werden. Hierzu wurden diglycidyletheraktivierte Flachmembranen analog der in Abb. 2-9 dargestellten Weise mit 2,2'-Ethylendioxydiethylamin (EDODEA, Bisaminoethylether von Ethylenglycol) umgesetzt und die erhaltenen Aminoendgruppen mittels Ninhydrin-Assay quantifiziert. Die erzielten Umsätze lagen bei allen untersuchten Membranen zwischen 80 und 90 % (vgl. Kap. 4.4.3). Eine prinzipiell mögliche Kettenverlängerung diglycidyletheraktivierter Membranen mit

verschiedenen Bisaminoethylethern von (Oligo-)Ethylenglycolen konnte so demonstriert werden. Die Verwendung derartiger Diamine, von denen einige kommerziell erhältlich sind⁸⁶, ermöglicht eine konsequente Fortführung des aus Ethylenglycoleinheiten aufgebauten Spacerarms.

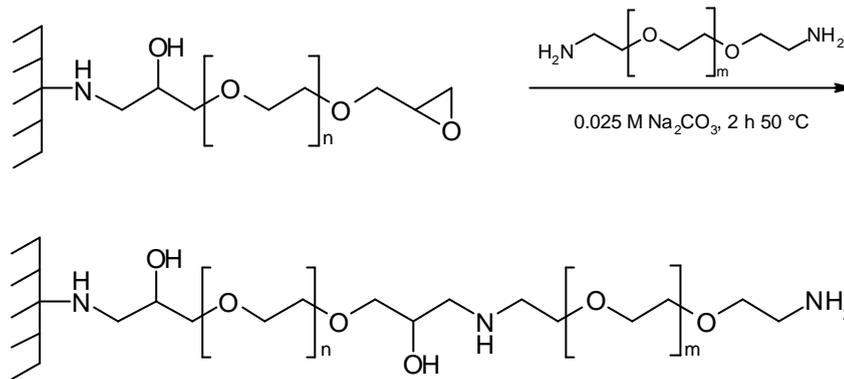


Abb. 2-14: Umsetzung diglycidyletheraktivierter PA6-Membranen mit Bisaminoethylethern von OEGs/PEGs

2.1.3 Aufbau von dendritischen Strukturen

Allgemeine Einführung zur Synthese dendritischer Strukturen an fester Phase

Alle bisher durchgeführten Aktivierungsmethoden für PA6-Membranen führten zu Ankergruppendichten in einer Größenordnung von zehn Mikromol je Kubikzentimeter Membranvolumen. Hieraus sollte sich eine gute Eignung zur Immobilisation von großen Liganden wie z.B. HSA/BSA oder GOx ergeben. Zur Anbindung kleiner und mittelgroßer Liganden, z.B. Reaktivfarbstoffe oder β -Cyclodextrin, ist eine höhere Ankergruppendichte notwendig, wenn die zur Verfügung stehende innere Membranoberfläche ökonomisch genutzt werden soll.

Verschiedene Methoden zur Erhöhung der Ankergruppendichte wurden bereits in Kap. 1.3 beschrieben. Im Zusammenhang mit PA6-Mikrofiltrationsmembranen werden in der Literatur Coatingverfahren mit Polysacchariden⁶³, Pfropfpolymerisationen von Monomeren mit

funktionellen Gruppen⁸⁷, Amidgruppenaktivierungen⁸⁸ sowie kontrollierte Membranhydrolysen⁸⁹ zur Erzeugung höherer Ankergruppendichten beschrieben.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit soll dieses Ziel durch Aufbau dendritischer Strukturen an der Membranoberfläche realisiert werden. Zunächst soll an dieser Stelle ein allgemeiner Überblick zur Synthese von verzweigten Strukturen an fester Phase gegeben werden.

Unter dem Begriff Dendrimere versteht man hochgeordnete und -verzweigte polyfunktionelle Makromoleküle.⁹⁰ Die Herstellung dieser Strukturen kann auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Bei der divergenten Methode, von der 1978 erstmals von *Vögtle et al.* berichtet wurde, erfolgt ein Aufbau ausgehend von einem Kernmolekül durch sukzessive Wiederholung einer Synthesesequenz.⁹¹ Mit jeder Sequenz wird dabei eine Verzweigungseinheit eingeführt und eine neue Generation erhalten. Die Anzahl funktioneller Gruppen an der Peripherie wächst exponentiell mit jeder Generation. Im Gegensatz dazu besteht der konvergente Zugang in der Synthese verzweigter Fragmente und deren schrittweiser Verknüpfung bis zu einem Kern.⁹² Statistisch folgeverzweigte Strukturen, die im Gegensatz zu Dendrimern über keine perfekte Ordnung verfügen, werden als hyperverzweigte Polymere bezeichnet. Beide Arten von verzweigten Strukturen werden unter dem Begriff dendritische Polymere zusammengefaßt.

Dendritische Polymere zeichnen sich durch ein weites Spektrum potentieller Anwendungen wie z.B. als Transportsystem für immobilisierte Pharmawirkstoffe oder als Träger für Reagenzien und Katalysatoren aus.⁹⁰

Die rapide Entwicklung von Festphasensynthesen und kombinatorischer Chemie führte in den letzten fünf Jahren zu zahlreichen Publikationen von Dendrimersynthesen an fester Phase. Die Motivation zu diesen Arbeiten ging vor allem von einer wünschenswerten Erhöhung der Beladungskapazitäten der Trägermaterialien aus. Als eine der ersten Arbeiten auf diesem Gebiet wurde 1997 von *Bradley et al.* eine Synthesemöglichkeit von PAMAM-Dendrimern an TentaGel[®]-Harzen und an Polystyrolbeads veröffentlicht.⁹³ Ausgehend von aminofunktionellen Beads wurden hierbei schrittweise Acrylsäuremethylester und 1,3-Diaminopropan angebunden, wobei ein Dendrimer der vierten Generation erhalten werden konnte. Die erhöhte Beladungskapazität konnte bei der Synthese einer Peptidbibliothek erfolgreich genutzt werden. Darüber hinaus zeichneten sich die erhaltenen Beads durch eine gute mechanische Stabilität sowie Beständigkeit gegenüber vielen Lösungsmitteln aus.

Synthesen von dendritischen Strukturen an Mikrofiltrationsmembranen sind bislang nur in einer einzigen Arbeit von *Kugel et al.* veröffentlicht worden.⁹⁴ Dort wird eine Erhöhung der

Aminoendgruppendichte von PA6-Hohlfasermembranen durch wiederholte Kupplung von Fmoc-geschütztem Lysin mit anschließender Entschützung beschrieben:

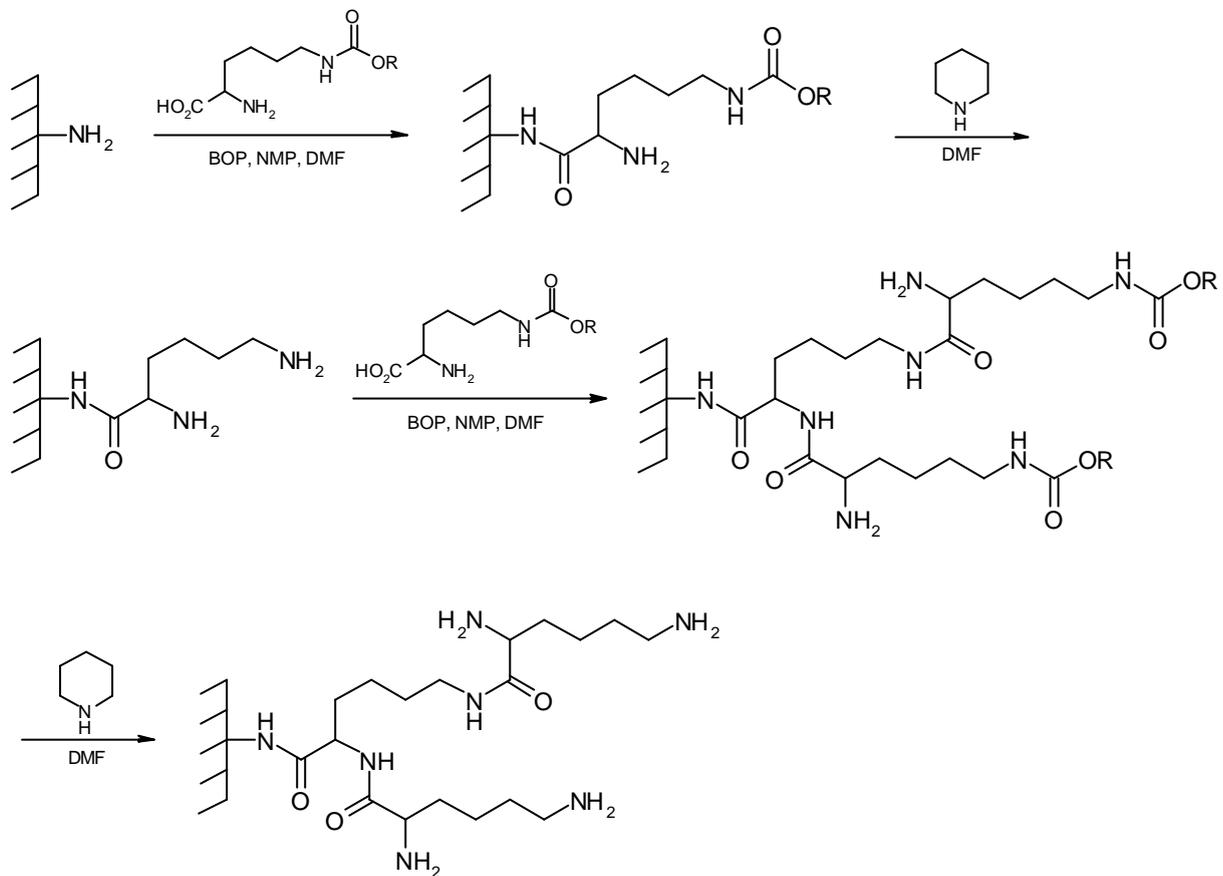


Abb. 2-15: Aufbau dendritischer Strukturen an PA6-Hohlfasermembranen nach *Kugel et al.*⁹⁴; R: 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, BOP: (Benzotriazol-1-yloxy)-tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat

Die nach dreimaliger Anwendung der Synthesesequenz zu erwartende Erhöhung der Aminoendgruppendichte auf das Achtfache des ursprünglichen Wertes konnte allerdings nicht realisiert werden. Vielmehr wurde hier lediglich eine Verdopplung beobachtet.

Der geringen Erfahrung bezüglich einer Synthese von dendritischen Strukturen an Mikrofiltrationsmembranen soll mit der vorliegenden Arbeit begegnet werden, indem Aminoendgruppenaktivierungen an PA6-Membranen zur Einführung unterschiedlicher Verzweigungseinheiten genutzt werden. Hierdurch sollen verzweigte Strukturen erhalten werden, die zumindest teilweise aus Ethylenglycoleinheiten aufgebaut sind und sich durch hohe Dichten an funktionellen Endgruppen auszeichnen.

Aminoendgruppenaktivierungen mit Pentaerythrit-tetraglycidylether (PETGE)

Die Einführung von Verzweigungsstellen sollte durch direkte Übertragung des in Kap. 2.1.2 angewendeten Konzeptes zur Aktivierung mit linearen homobisfunktionellen Spacern auf Verbindungen mit höherer Funktionalität erreicht werden. Hierzu wurde, in Analogie zu den dort eingesetzten Diglycidylethern, der Tetraglycidylether von Pentaerythrit (PETGE) durch eine Synthese nach *Nakatsuji et al.*⁹⁵ hergestellt, sowie Versuche zu dessen Anbindung an PA6-Membranen unternommen.

Die Synthese von PETGE erfolgte durch Umsetzung von Pentaerythrit mit einem Überschuß Epichlorhydrin in DMSO unter Verwendung von Kaliumhydroxid als Base. Nach säulen chromatographischer Aufreinigung konnte die gewünschte Verbindung in guter Ausbeute und Reinheit erhalten werden.

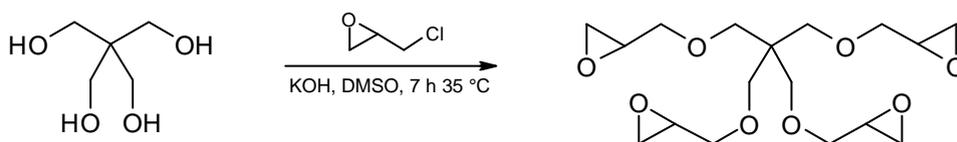


Abb. 2-16: Synthese von PETGE nach *Nakatsuji et al.*⁹⁵

Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit von PETGE wurden die Versuche zur Membranaktivierung in verschiedenen organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Hierzu behandelte man Flachmembranscheiben bei verschiedenen Temperaturen mit PETGE-Lösungen in DMF, Dioxan und DMSO. Bei einer Temperatur von 80 °C konnte ein nahezu vollständiger Umsatz der Aminoendgruppen an den verwendeten Membranen mittels Ninhydrin-Assay ermittelt werden. Eine Beschleunigung der Umsetzung konnte durch Zugabe von Hünig-Base erreicht werden. Die Umsetzung in DMSO führte zu einem Aufquellen der Membran, so daß dieses Lösungsmittel für Membranaktivierungen unter den gewählten Bedingungen ausscheidet. Die Bestimmung der Dichte an membrangebundenen Epoxidgruppen erfolgte schließlich an allen Proben durch Anwendung der „Ninhydrin-Methode“. Leider konnte in keinem Fall eine Erhöhung der Ankergruppendichte realisiert werden. Bezogen auf 8.5 µmol primärer Aminoendgruppen pro Kubikzentimeter Ausgangsmembran konnten im besten Fall 8.4 µmol Epoxid nach 16-stündigem Behandeln der Membran mit einer PETGE-Lösung in Dioxan bei 80 °C unter Zusatz von Hünig-Base bestimmt werden.

Eine mögliche Ursache für die geringen gefundenen Epoxidgruppendichten könnte in der Anwendung der „Ninhydrin-Methode“ zu suchen sein, da nach Umsetzung der epoxyaktivierten Membranprobe mit HDA eine Brückenbildung zwischen zwei Epoxidgruppen möglich ist. Um diese auszuschließen, wurden Kontrollbestimmungen mittels AAS durchgeführt, da bei dieser Methode eine Brückenbildung nicht möglich ist (vgl. Abb. 2-8). Allerdings bestätigten sich die bereits vorliegenden Meßergebnisse unter Berücksichtigung der bereits erwähnten systematischen Abweichung.

Demnach sind Brückenbildungen oder intramolekulare Cyclisierungen innerhalb eines bereits gebundenen PETGE-Moleküls ein wahrscheinlicher Grund für die geringen erzielten Epoxidgruppendichten. Abb. 2-17 zeigt verschiedene Anbindungsmöglichkeiten, die bei statistischem Auftreten zu dem beobachteten Verhältnis von einer Epoxidgruppe je Aminoendgruppe führen sollte.

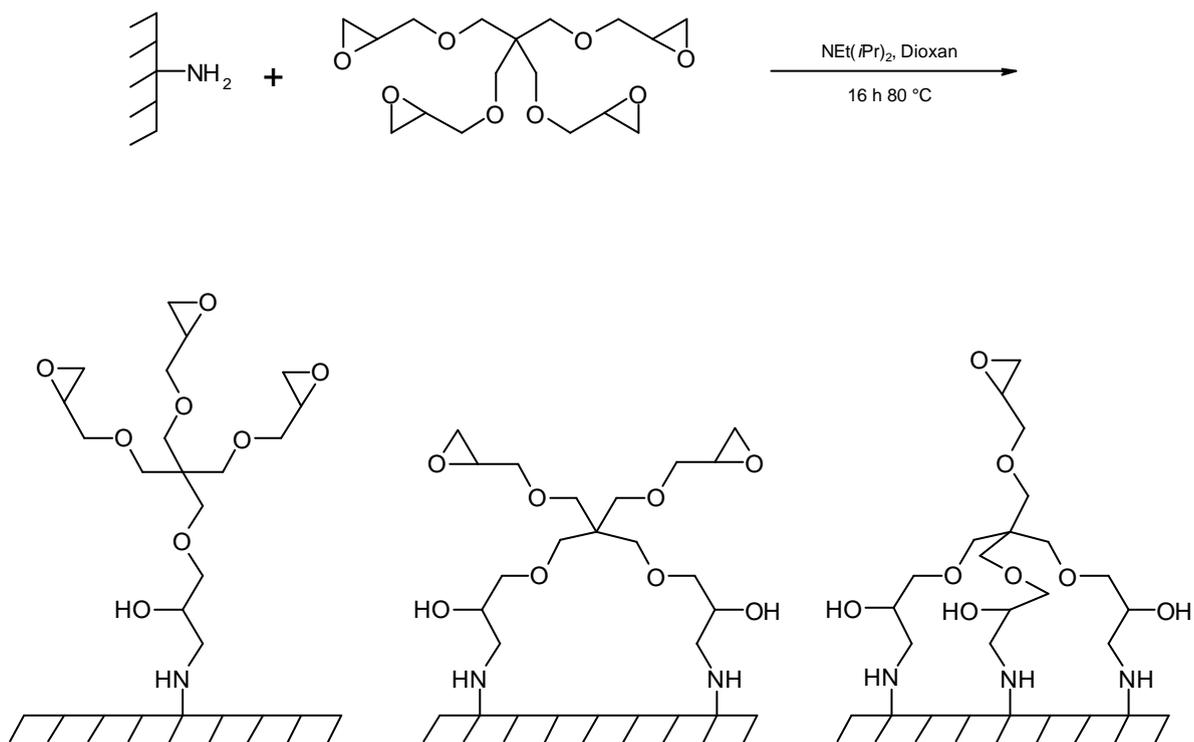


Abb. 2-17: Aktivierung der Aminoendgruppen von PA6-Membranen mit PETGE

Die hier dargestellte Möglichkeit von Brückenbildungen zwischen mehreren Aminoendgruppen und die erwähnte Möglichkeit einer intramolekularen Cyclisierung können allerdings kritisch betrachtet werden, wenn man bedenkt, daß diese auch bei der im vorhergehenden Kapitel

beschriebenen Aktivierung mit EGDGE oder BDDGE hätten beobachtet werden müssen. Brücken zwischen zwei Aminoendgruppen, die nach einer Aktivierung mit EGDGE oder BDDGE gebildet würden, unterschieden sich in ihrer Länge um lediglich eine Methylengruppe von den in Abb. 2-17 dargestellten. Die Wahrscheinlichkeit einer Brückenbildung sollte demnach ähnlich groß sein, wurde aber bei den letztgenannten Aktivierungen nicht beobachtet. Auf weitere Untersuchungen zu Aminoendgruppenaktivierungen mit Polyglycidylethern soll an dieser Stelle verzichtet werden.

Umsetzungen diglycidyletheraktivierter Membranen mit Polyaminen

Die Einführung von Verzweigungseinheiten sollte nun durch Addition von Polyaminen an diglycidyletheraktivierte Membranen analog der in Abb. 2-9 und 2-14 für lineare primäre Diamine dargestellten Weise vollzogen werden. Als Polyamine wurden Tris(aminoethyl)amin (TAEA) sowie Tetrakis(aminomethyl)methan (TAMM) eingesetzt. Letzteres wurde mittels einer Synthesemethode von *Fleischer et al.* aus Pentaerythrit durch schrittweise Überführung in dessen Tetra(phenylsulfonsäureester), das Tetraazid und schließlich durch LAH-Reduktion zum gewünschten Tetraamin in einer zufriedenstellenden Gesamtaubeute zugänglich gemacht.⁹⁶

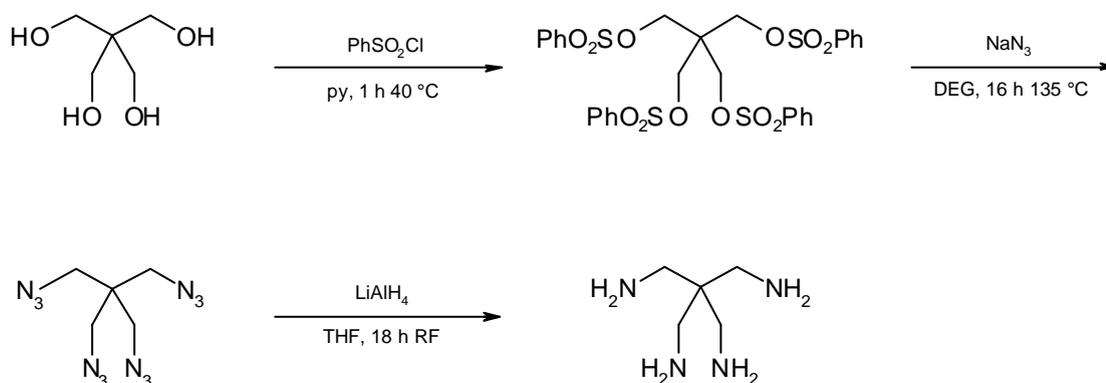
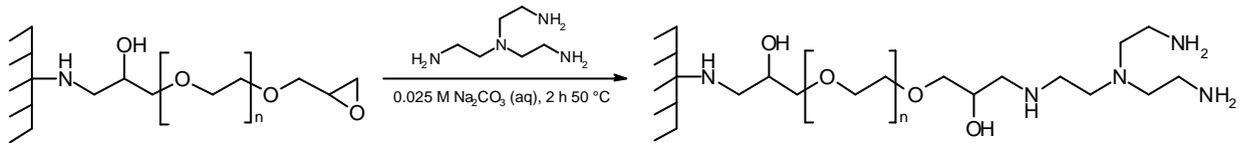


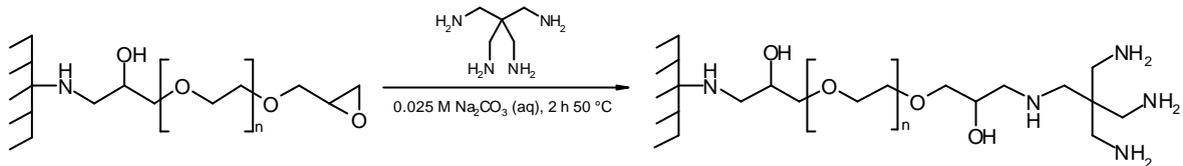
Abb. 2-18: Synthese von Tetrakis(aminomethyl)methan (TAMM) nach *Fleischer et al.*⁹⁶

Die Addition der Polyamine an verschiedene diglycidyletheraktivierte Membranen erfolgte durch zweistündiges Behandeln entsprechender Flachmembranscheiben mit einer Lösung des jeweiligen Polyamins in 0.025 M Natriumcarbonatlösung bei einer Temperatur von 50 °C. Die in Abb. 2-19 dargestellten Aminogruppendichten der erhaltenen Membranen wurden mittels Ninhydrin-Assay ermittelt.



| | |
|----------------|--|
| n = 1 (EGDGE): | 11.5 $\mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{cm}^3(\text{MV})$ |
| 3 (TriEGDGE): | 9.1 |
| 9 (EX 830): | 7.8 |
| (BDDGE): | 12.8 |

| | | |
|----------------|--|--------|
| n = 1 (EGDGE): | 11.3 $\mu\text{mol}(\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$ | (23.0) |
| 3 (TriEGDGE): | 9.5 | (18.2) |
| 9 (EX 830): | 9.4 | (15.6) |
| (BDDGE): | 13.4 | (25.6) |



| | | |
|----------------|---|--------|
| n = 1 (EGDGE): | 7.5 $\mu\text{mol}(\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$ | (34.5) |
| 3 (TriEGDGE): | 6.8 | (27.3) |
| 9 (EX 830): | 6.2 | (23.4) |
| (BDDGE): | 8.7 | (38.4) |

Abb. 2-19: Umsetzung diglycidyletheraktivierter Membranen mit Polyaminen; Die Werte in Klammern entsprechen den theoretisch erzielbaren Aminogruppendichten

Die Addition von Polyaminen führte demnach nicht zu einer Erhöhung der Aminogruppendichte in der gewünschten Weise. Nach Umsetzung mit TAMM wurden, bezogen auf die Epoxidgruppen der Ausgangsmembranen, sogar deutlich niedrigere Dichten an Aminogruppen ermittelt. Durch Variationen der Reaktionsbedingungen (Erhöhung der Polyaminkonzentration, Verlängerung der Reaktionszeiten) konnte keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden.

Als mögliche Ursache für diese Ergebnisse sind, wie auch bei der beschriebenen Aminoendgruppenaktivierung mit PETGE, Brückenbildungen zwischen den Epoxidgruppen der diglycidyletheraktivierten Membranen zu nennen. Auch an dieser Stelle soll auf weitere Untersuchungen verzichtet werden.

Vielversprechender erschien die Anwendung einer Methode zur Generation hoher Dichten von primären Aminogruppen an Glasoberflächen, über die *Beier et al.* zur Herstellung von DNA-Mikrochips berichteten.⁹⁷ Nach Aminierung einer Glasoberfläche durch Behandlung mit Aminopropyltrimethoxysilan erfolgte dort eine Aktivierung mit Acrylsäurechlorid (ASCl). Anschließende Umsetzungen mit verschiedenen Polyaminen, erneute ASCl-Aktivierung sowie

abschließende Addition eines linearen primären Diamins führten zu hochfunktionalisierten Oberflächen mit hohen Bindungskapazitäten.

Aminoendgruppenaktivierung mit Acrylsäurechlorid und Addition von Polyaminen

Eine Aktivierung der Aminoendgruppen von PA6-Flachmembranen sollte durch direkte Übertragung der bei *Beier et al.*⁹⁷ beschriebenen Reaktionsbedingungen vollzogen werden. Die Verwendung von Acrylsäurechlorid erschien besonders vorteilhaft, da es sich hierbei um einen heterobisfunktionellen Linker handelt. Beide Funktionalitäten - Säurechlorid und Michael-System - sind für eine Addition von Nucleophilen zugänglich, zeichnen sich aber durch deutlich verschieden starke Reaktivitäten aus. Diese Eigenschaft sollte einer potentiellen Brückenbildung oder Vernetzung, die bei der Verwendung von Biselektrophilen oder Bisnucleophilen sonst häufig beobachtet wird, entgegenwirken.

Die Aktivierung der Membranen erfolgte durch zweistündige Behandlung mit einer Lösung von ASCl in Dichlormethan bei Raumtemperatur, wobei Hünig-Base zugegeben wurde.

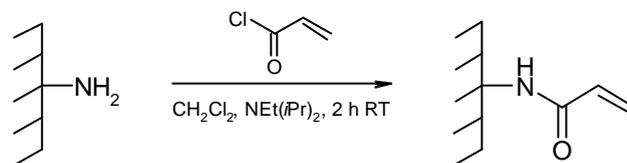


Abb. 2-20: Aminoendgruppenaktivierung von PA6-Membranen mit Acrylsäurechlorid

Mittels Ninhydrin-Assay konnte ein vollständiger Umsatz ermittelt werden. Eine anschließende Michael-Addition verschiedener Di- und Polyamine nach dem von *Beier et al.*⁹⁷ beschriebenen Protokoll (dreitägige Inkubation der Membran in einer Lösung des Polyamins in DMF bei Raumtemperatur) führte zu Aminogruppendichten, welche die theoretisch zu erwartenden Werte um Faktor zwei bis drei übertrafen. Als Grund hierfür konnten die Bedingungen der ASCl-Aktivierung identifiziert werden. Eine Behandlung der Membranen mit hohen Konzentrationen ASCl führte vermutlich zu einem Anlösen oder Quellen der Membranoberfläche, wodurch weitere Aminoendgruppen einer Aktivierung zugänglich gemacht wurden. Der gewünschten Erhöhung der Ankergruppendichte, die hier bereits durch die Aktivierung vollzogen wurde, steht also eine unerwünschte Schädigung der Membranstruktur gegenüber. Aus diesem Grund erfolgte eine Optimierung der Aktivierungsbedingungen bezüglich der ASCl-Konzentration und

Reaktionszeit. Hierzu wurde die in der Originalvorschrift angegebene Konzentration des Säurechlorids von etwa 50 mmol/L auf 5, 0.5 und 0.05 mmol/L reduziert und der Umsatz der Aminoendgruppen mit der Zeit verfolgt. Nachfolgend sind die ermittelten Umsatz-Zeit-abhängigkeiten graphisch dargestellt.

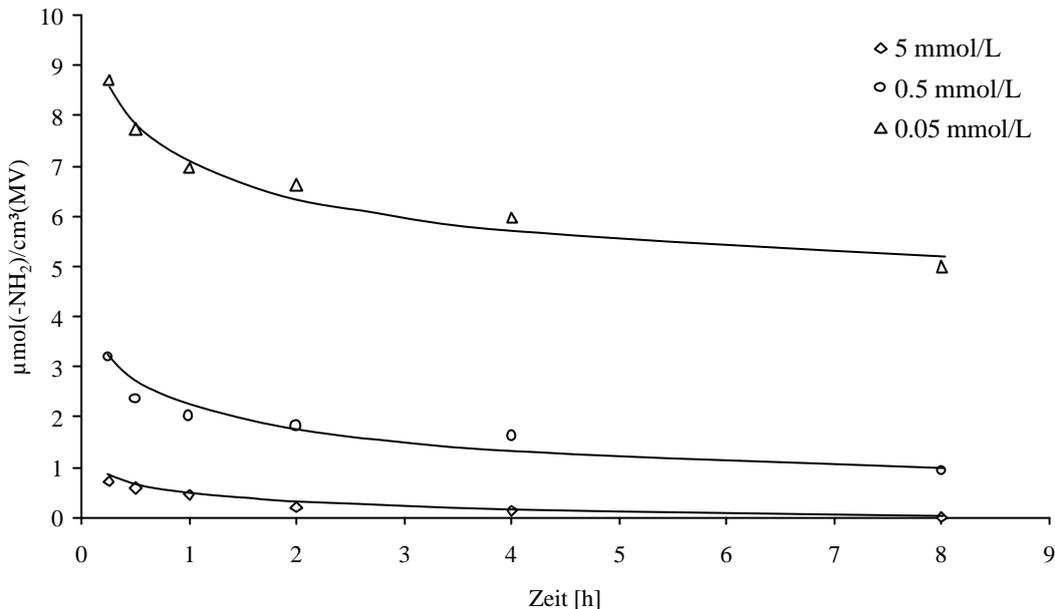


Abb. 2-21: Umsatz-Zeitabhängigkeit der Acrylsäurechloridaktivierung von Aminoendgruppen an PA6-Flachmembranen

Bei einer Konzentration von 5 mmol ASCl je Liter konnte nach vierstündiger Reaktionszeit eine nahezu vollständige Umsetzung der Aminogruppen beobachtet werden. Daher wurden diese Bedingungen als Standardprotokoll für weitere Versuche angewendet.

Eine erneute Addition verschiedener Di- und Polyamine führte dann zu den theoretisch erwarteten Umsätzen bei Verwendung von HDA, EDODEA sowie Tetraethylenpentamin (TEPA). Im Falle der verzweigten Verbindungen TAEA und TAMM konnten die theoretischen Aminogruppendichten jedoch nicht erreicht werden. Hier konnte eine Optimierung durch Erhöhung der Temperatur auf 75 °C bei sonst unveränderten Reaktionsbedingungen realisiert werden, so daß schließlich vollständige Umsetzungen bei allen untersuchten Polyaminen ermittelt wurden (vgl. Abb. 2-22).

Die terminalen primären sowie die aus der Michael-Addition hervorgegangenen sekundären Aminogruppen der erhaltenen Polyaminaddukte wurden dann einer erneuten ASCl-Aktivierung

unterzogen. Auch hier konnte eine vollständige Überführung bezüglich der primären Aminogruppen zu den entsprechenden Acrylamiden beobachtet werden.

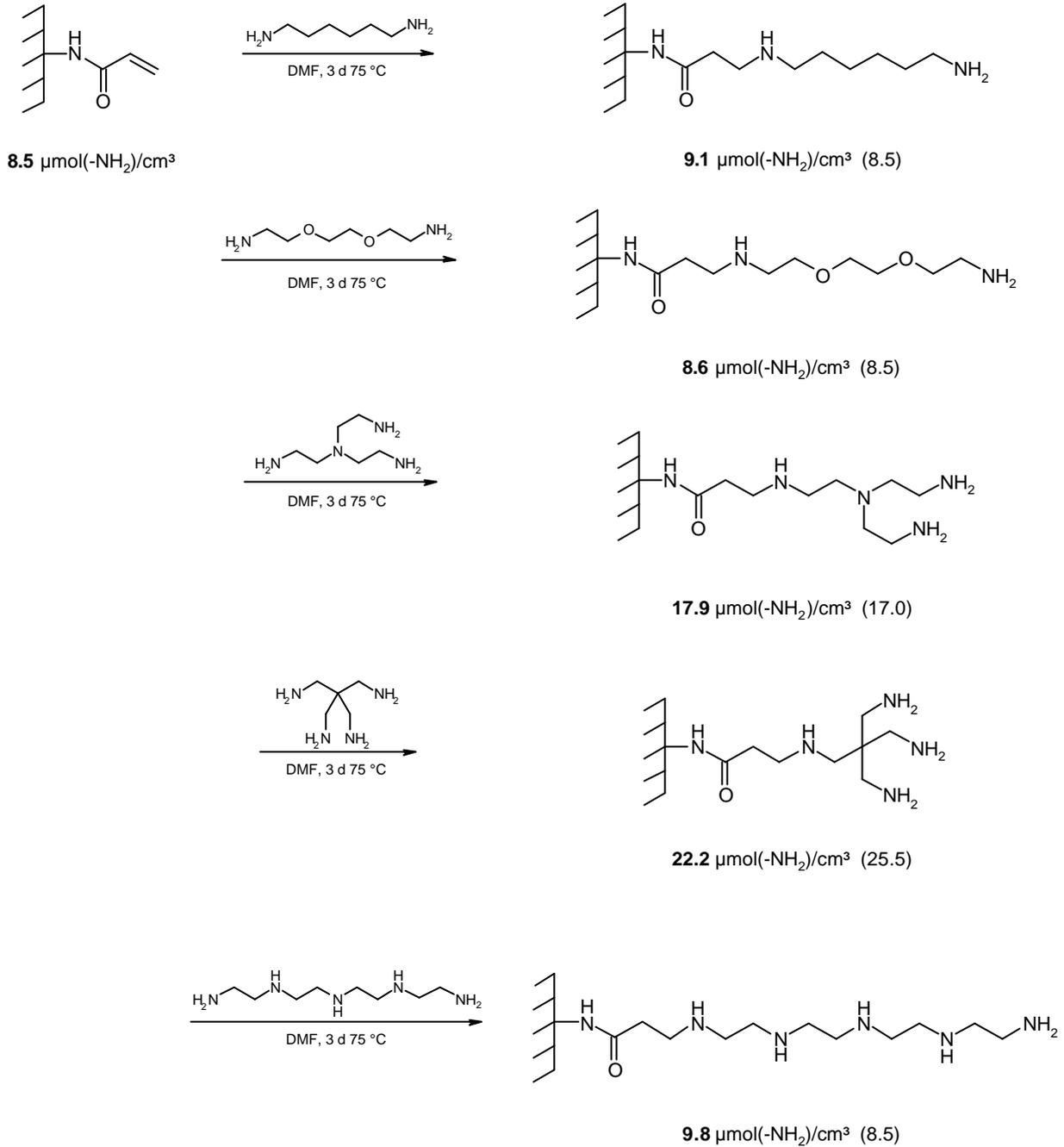


Abb. 2-22: Umsetzung acrylsäurechloridaktivierter PA6-Flachmembranen mit verschiedenen Polyaminen; Die Werte in Klammern entsprechen den theoretisch erzielbaren Aminoendgruppendichten

Eine weitere Michael-Addition verschiedener Polyamine an die so erhaltenen Systeme führte dann jedoch nicht zu den theoretisch möglichen Dichten an Aminoendgruppen. Als wahrscheinlicher Grund sind wiederum Brückenbildungen zwischen den Acrylamidgruppen zu nennen. Um diesen zu begegnen, sollten geschützte Derivate der verwendeten Polyamine mit nur einer freien Aminofunktion hergestellt und addiert werden, wobei die Verwendung trifluoracetylgeschützter Verbindungen geeignet erschien.

Hierzu wurden die jeweiligen trifluoracetylgeschützten Derivate von HDA, EDODEA sowie TAEA nach eine Methode von *Agrawal et al.*⁹⁸ durch Umsetzung mit Trifluoressigsäureethylester hergestellt. Trotz eines stöchiometrischen Einsatzes des Esters sowie dessen langsamer Zugabe fielen nach den Reaktionen Produktgemische aus ungeschützten sowie mono-, bis- und im Falle von TAEA trisgeschützten Verbindungen an. Durch säulenchromatographische Trennung konnten die gewünschten Verbindungen schließlich in befriedigenden Ausbeuten (30 - 40 %) erhalten werden.

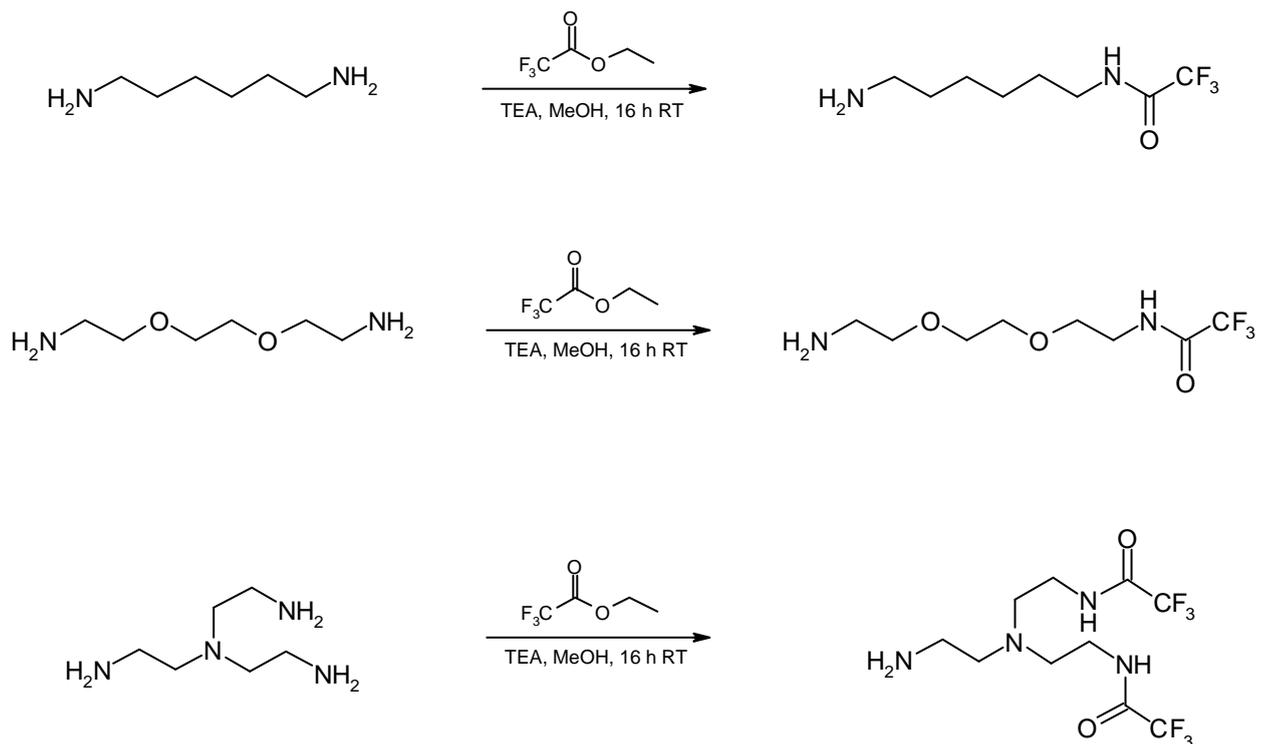
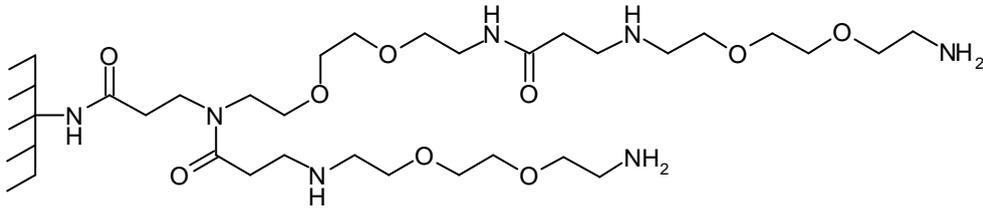


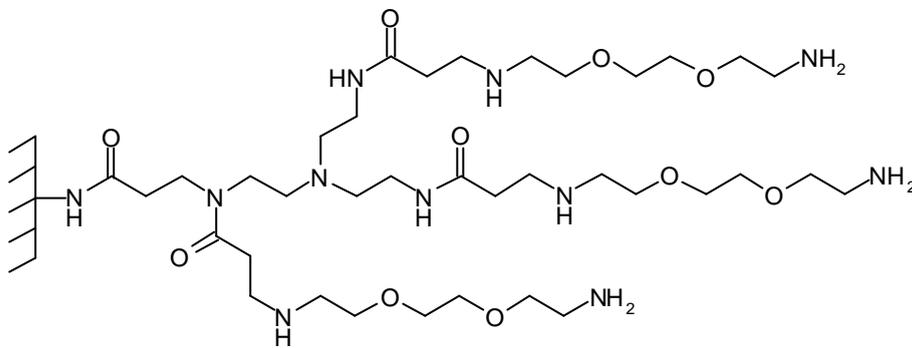
Abb. 2-23: Darstellung trifluoracetylgeschützter Polyamine

Eine Addition an die ASCI-aktivierten Membranen erfolgte schließlich analog den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen. Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurden die erhaltenen Membranen zwei Stunden in einer methanolischen Kaliumcarbonatlösung bei Rückfluß erhitzt.

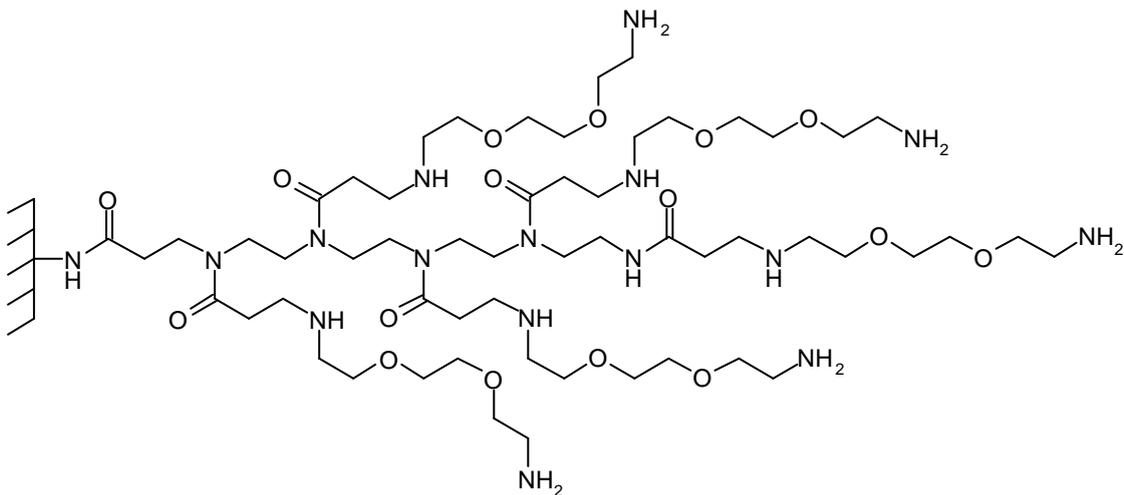
Abb. 2-24 zeigt Beispiele zu den erhaltenen Membranen. Die ermittelten Aminogruppendichten sind deutlich höher als bei Verwendung ungeschützter Di- und Polyamine.



12.3 $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3$, ohne Schutzgruppe: 7.1, theoret.: 17.0



18.6 $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3$, ohne Schutzgruppe: 8.7, theoret.: 25.5



27.4 $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3$, ohne Schutzgruppe: 12.2, theoret.: 42.5

Abb. 2-24: Beispiele für die erhaltenen dendritischen Strukturen nach wiederholter ASCI-Aktivierung und Polyaminaddition; Die zweite Addition erfolgte mit mono(trifluoracetylgeschütztem) EDODEA

Hieraus können Brückenbildungen zwischen den Acrylamidgruppen als Ursache für niedrige erzielbare Aminogruppendichten im Falle einer Addition ungeschützter Di- und Polyamine abgeleitet werden, die durch den Einsatz der Schutzgruppe deutlich reduziert wurden.

Die in Abb. 2-24 dargestellten theoretischen Dichten an Aminogruppen konnten allerdings nicht erreicht werden. Hierfür können mehrere Gründe verantwortlich sein. Zum einen ist eine unvollständige Umsetzung der sekundären Aminogruppen nach der zweiten ASCl-Aktivierung in Betracht zu ziehen, da eine Überprüfung des Umsatzes mittels Ninhydrin-Assay nur bezüglich der primären Aminogruppen möglich war. Als wahrscheinlichere Ursache sind allerdings Brücken zwischen den Acrylamidgruppen zu nennen, die trotz der Verwendung geschützter Polyamine gebildet wurden, da eine Spaltung des relativ labilen Trifluoressigsäureamids bereits unter Additionsbedingungen möglich ist.

Der Aufbau einer zweiten Generation der dendritischen Systeme sollte außerdem durch erneute Einführung einer Verzweigungsstelle mittels Addition von bis(trifluoracetylgeschütztem) TAEA erreicht werden. Die erzielten Ergebnisse lagen jedoch deutlich unterhalb der zu erwartenden Aminogruppendichten. Diese Beobachtung deutet ebenfalls auf die Ausbildung von Verbrückungen hin. Weitere Variationen der Versuchsbedingungen führten zu keiner Verbesserung der Ergebnisse.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die beabsichtigte Erhöhung der Aminogruppendichte durch den Aufbau dendritischer Strukturen in einem zufriedenstellenden Maß erreicht wurde. Die Aktivierung von Aminogruppen mit Acrylsäurechlorid als Biselektrophil scheint eine mögliche Brückenbildung effektiv zu verhindern. Gleiches gilt für den Einsatz geschützter Di- und Polyamine, wobei eine weitere Optimierung durch Verwendung einer stabileren Schutzgruppe möglich wäre.

Mit einer Aminogruppendichte von $27.4 \mu\text{mol}/\text{cm}^3(\text{MV})$ konnte im Falle einer ASCl-TEPA-ASCl-EDODEA-modifizierten Membran ein mehr als dreifacher Wert bezogen auf die Ausgangsmembran realisiert werden (vgl. Abb. 2-24, unten). Berücksichtigt man auch die in gleicher Anzahl vorliegenden sekundären Aminogruppen als mögliche Ankergruppen für eine Ligandenimmobilisation, wurde sogar eine Versechsfachung erreicht. Diese Ankergruppendichten sollten ausreichen, um auch kleinere Liganden flächennutzend zu immobilisieren. Außerdem konnten durch die Addition von EDODEA Ethylenglycoleinheiten in der gewünschten Weise auf der Membranoberfläche erhalten werden.

Alle Ergebnisse bezüglich dendritischer Aktivierungen von PA6-Membranen sind in Kap. 4.4.3 aufgeführt.

2.2 Ligandenimmobilisationen

2.2.1 Immobilisation von HSA und BSA

Eigenschaften von Serumalbuminen

Humanes Serumalbumin (HSA) stellt mit einer Serumkonzentration von 3.5 - 5 g/dL bei einem Gesamteiweißgehalt von 6 - 8.5 g/dL den größten Anteil der Plasmaproteine dar. Die Synthese von HSA findet in der Leber mit einer Rate von etwa 0.2 g pro kg Körpergewicht und Tag statt. Die Funktionen von Serumalbumin sind Volumenstabilisierung, Erhalt des kolloidosmotischen Druckes sowie der Transport von schwerlöslichen endo- und exogenen Substanzen einschließlich zahlreicher Pharmawirkstoffe und deren Metabolite im Blutkreislauf (vgl. mit den in Kap. 1.4 genannten proteingebundenen Substanzen).

Der isoelektrische Punkt von HSA liegt zwischen pH 4.4 und 5.4 während es unter physiologischen Bedingungen über zahlreiche negative Ladungen verfügt.

Die Aminosäuresequenz vieler Serumalbumine ist bekannt. HSA besteht aus insgesamt 585 Aminosäuren, die in einer einzigen Kette in neun Schleifen angeordnet vorliegen. Letztere sind zu drei semiautonomen, aber homologen Domänen organisiert (I - III), welche weiterhin in jeweils zwei Subdomänen unterteilt werden (A und B).⁹⁹

Albumine zeichnen sich durch einen geringen Gehalt an Tryptophan und Methionin sowie einen hohen Gehalt an Cystein, Asparagin- und Glutaminsäure, Lysin sowie Arginin aus. Der Gehalt an Glycin und Isoleucin ist niedriger als bei den meisten Proteinen. HSA verfügt im nativen Zustand nur über ein einziges reduziertes Cystein (Cystein 34).

Die Funktion als Transportprotein resultiert aus der Anwesenheit von sechs verschiedenen, lokal getrennten Bindungsstellen. Viele Liganden binden kompetitiv an demselben Ort, während andere mehrere Bindungsstellen des Moleküls besetzen können. Zwei wichtige Bindungsstellen für zahlreiche endogene Toxine und viele Pharmawirkstoffe (z.B. Ibuprofen, Diazepam und Warfarin) konnten von *Yamasaki et al.* mittels Röntgenstrukturuntersuchungen in den Subdomänen IIA und IIIA lokalisiert werden (vgl. Abb. 2-25).¹⁰⁰ *Dockal* berichtet im Zusammenhang mit der Bindung von Warfarin, daß für die strukturelle und funktionelle Integrität dieser beiden Bindungsstellen Teile der benachbarten Subdomänen essentiell sind.¹⁰¹

Aus der spezifischen und starken Affinität zu vielen Zielmolekülen resultieren zahlreiche Anwendungen von albuminimmobilisierten Festphasen. Nachfolgend sollen einige Beispiele hierzu angegeben werden. *Zou et al.* und *Domenici et al.* berichten in voneinander unabhängigen

Arbeiten von chiralen stationären Phasen für die HPLC, welche durch eine kovalente Anbindung von HSA bzw. BSA an Kieselgelmatrices erhalten wurden.^{102,103} Das Trennprinzip beruht hierbei auf der spezifischen Bindung eines Enantiomers aus racemischen Gemischen durch das festphasengebundene Albumin.

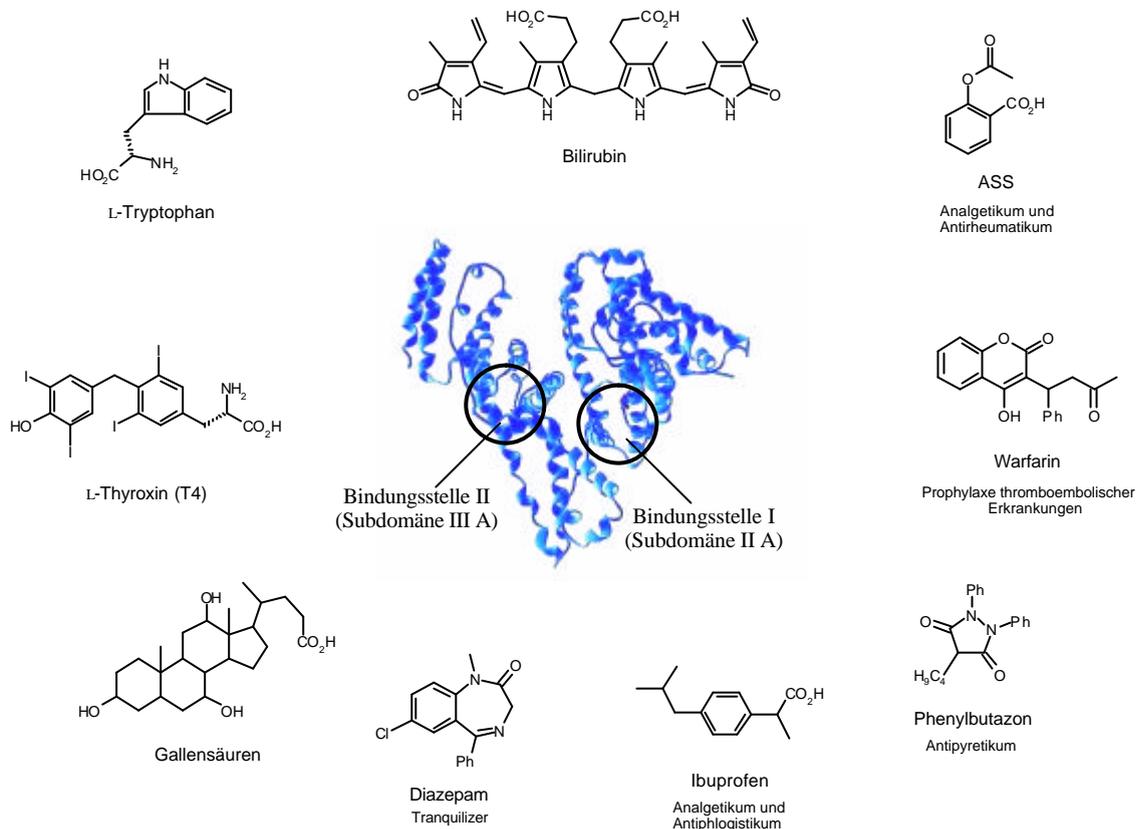


Abb. 2-25: Bindungsstellen I und II von HSA mit Beispielen von Molekülen, die mit hoher Affinität dort binden

Anwendungen in der extrakorporalen Plasmatherapie resultieren aus Arbeiten von *Zimmermann et al.*, die HSA an mikroporöse Poly(meth)acrylatbeads immobilisierten.¹⁰⁴ Die Anbindung erfolgte dabei durch Aktivierung der Carboxylgruppen des Albumins mit einem wasserlöslichen Carbodiimid und anschließender Umsetzung mit aminofunktionellen Beads bzw. Kupplung der Aminogruppen des Proteins mit epoxyaktivierten Beads. Die aus diesen Arbeiten hervorgegangenen Adsorber für Endotoxine (Lipopolysaccharide mit starker Pyrogenwirkung¹⁰⁵) befinden sich bereits in der klinischen Anwendung zur Behandlung lebensbedrohlicher bakterieller Infektionskrankheiten (Sepsis).¹⁰⁶

Es wurde bereits erwähnt, daß durch Immobilisationen von HSA oder BSA eine Verbesserung der Biokompatibilität von Oberflächen erreicht werden kann. In diesem Zusammenhang berichten *Park et al.* über BSA-immobilisierte Hohlfasern aus Polypropylen, Polycarbonat sowie Polyvinylchlorid. Hierzu wurde zunächst BSA durch Umsetzung mit Glycidylacrylat funktionalisiert. Die so eingeführten Doppelbindungen wurden schließlich einer strahlungsinduzierten Pfropfcopolymerisation auf den Polymeroberflächen unterzogen. Die Biokompatibilität der untersuchten Materialien konnte auf diese Weise erheblich verbessert werden.¹⁰⁷

Innerhalb der vorliegenden Arbeit soll eine kovalente Immobilisation von Serumalbumin an diglycidyletheraktivierte PA6-Membranen erfolgen. Neben der Einführung eines spezifischen Affinitätsliganden für proteingebundene Toxine sollte hierdurch eine Verbesserung der Blutkompatibilität erreicht werden. Es wurde ausschließlich BSA verwendet, da es wesentlich preiswerter als HSA erhältlich ist und sich strukturell sowie funktionell kaum von diesem unterscheidet.⁹⁹

Immobilisation von BSA an diglycidyletheraktivierte Membranen

Im Rahmen der vorausgegangenen Diplomarbeit⁸² konnte eine effiziente Methode zur Immobilisation von HSA an diglycidyletheraktivierte PA6-Flach- und Hohlfasermembranen durch Optimierung der Kupplungsbedingungen (pH-Wert und Art der Pufferlösung, Temperatur sowie Reaktionszeit) erarbeitet werden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode unverändert als Standardprotokoll angewendet.

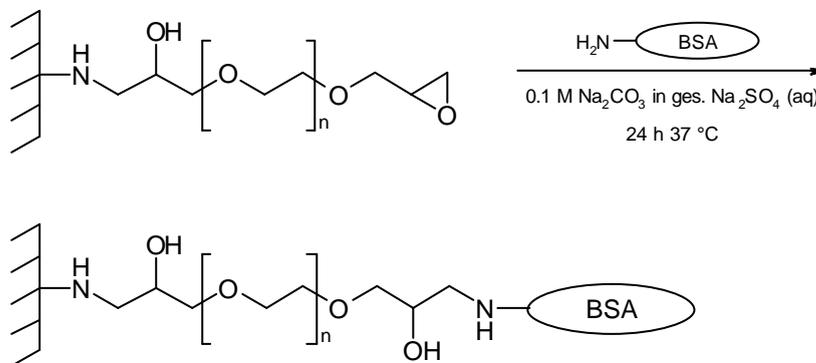


Abb. 2-26: Immobilisation von BSA an diglycidyletheraktivierte PA6-Membranen

So erfolgte die Anbindung von BSA durch 24-stündiges Schütteln der jeweiligen diglycidyl-etheraktivierten Membran in einer einprozentigen BSA-Lösung bei 37 °C. Letztere wurde mit einem 0.1 M Natriumcarbonatpuffer in gesättigter Natriumsulfatlösung hergestellt und der pH-Wert schließlich mit 0.1 N Natronlauge auf 11.5 eingestellt. Eine Entfernung von adsorptiv gebundenem BSA erfolgte durch sukzessives Waschen der erhaltenen Membranen mit wäßrigen Lösungen von Zitronensäure, SDS und Harnstoff.

Über die hier erzielte deutliche Erhöhung der immobilisierten Proteinmenge durch Zugabe von großen Mengen Natriumsulfat zur Pufferlösung wurde u.a. auch schon von *Rasch* berichtet.⁸³ In diesem Zusammenhang nennen *Wheatley* und *Schmidt* eine durch hohe Salzkonzentrationen verursachte Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkungen als wahrscheinlichste Ursache für den beobachteten Effekt.¹⁰⁸

Die quantitative Bestimmung von membrangebundenem Albumin erfolgte innerhalb der vorausgegangenen Diplomarbeit nach einer Methode von *Kroner et al.* durch vollständige Hydrolyse der zu untersuchenden Membran in 6 N Salzsäure und anschließendem Lowry-Assay des neutralisierten Hydrolysates.¹⁰⁹ Diese Methode bereitete jedoch große Probleme bezüglich der Reproduzierbarkeit.

Eine bessere Methode zur Quantifizierung membrangebundener Proteine sollte an dieser Stelle erarbeitet werden. Hierzu wurden zwei Standardassays (Lowry- und BCA-Assay) jeweils mit und ohne vorherige Membranhydrolyse bezüglich ihrer absoluten Genauigkeit und Reproduzierbarkeit überprüft.

Der Lowry-Assay beruht auf der Bildung von Protein-Cu(I)-Komplexen (Biuret-Reaktion), welche die Reduktion von Molybdat und Wolframat (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz) vornehmlich durch Tyrosin unterstützen.¹¹⁰ Die dabei auftretende tiefblaue Färbung kann als Extinktion bei 750 nm gemessen werden. Ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Extinktion sowie eine hohe Störanfälligkeit sind als Nachteile dieser Methode zu nennen.

Der BCA-Assay nutzt ebenfalls die im alkalischen Medium durch Proteine und Kohlenhydrate hervorgerufene Reduktion von Cu^{2+} nach Cu^+ . Letztere bilden mit Bichinolindicarbonsäure einen blaugefärbten Komplex, der durch Messung der Extinktion bei 562 nm quantifiziert wird.¹¹¹ Auch bei dieser Methode ist ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Extinktion zu beobachten, der jedoch weniger ausgeprägt ist. Vorteilhaft ist die geringe Störanfälligkeit des Tests. Als Nachteil muß erwähnt werden, daß es sich um keine echte Endpunktmethode handelt.

Um die absolute Genauigkeit der Methoden zu überprüfen, wurden Membranen vor der Proteinimmobilisation entsprechend dem Standardprotokoll gewaschen, bis zur Massenkonstanz getrocknet und gewogen. Nach erfolgter Immobilisation wurde erneut gewaschen, bis zur Massenkonstanz getrocknet und wiederum gewogen. Aus der Massendifferenz ergab sich direkt die Menge an gebundenem Albumin.

Das einzige Verfahren, das sowohl bezüglich absoluter Genauigkeit als auch bezüglich Reproduzierbarkeit gute Ergebnisse lieferte, ist der BCA-Assay ohne vorherige Membranhydrolyse. Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Meßdaten wurden ausschließlich auf diese Weise bestimmt.

Für die BSA-Immobilisation an diglycidyletheraktivierten PA6-Flachmembranen nach dem Standardprotokoll ergaben sich die in folgender Abb. 2-27 dargestellten Ergebnisse.

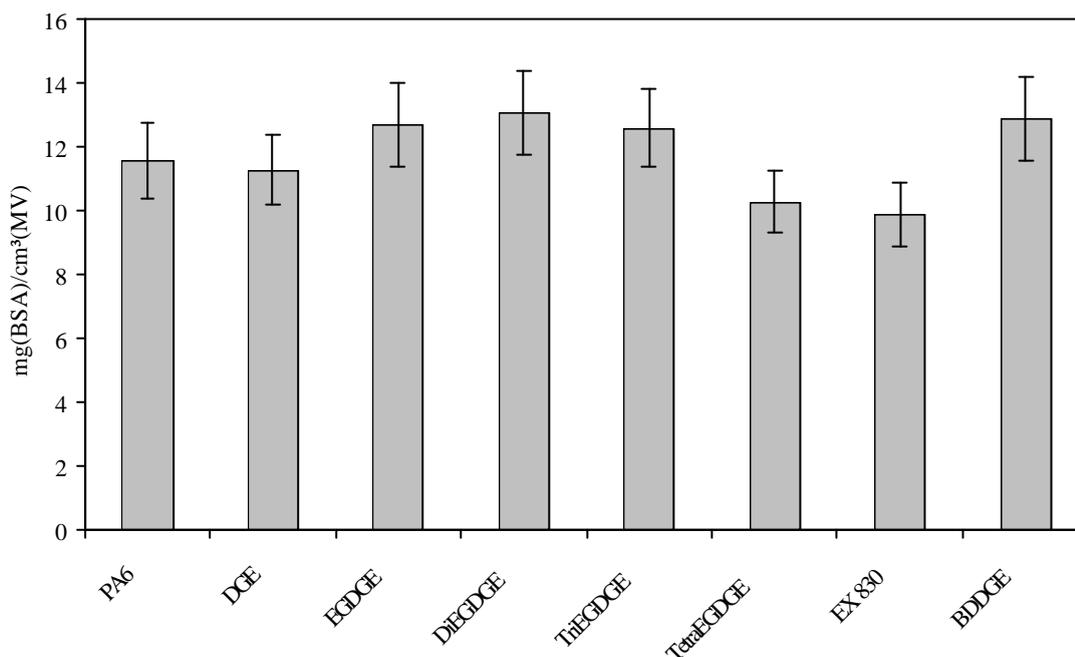


Abb. 2-27: Meßergebnisse zur BSA-Immobilisation an diglycidyletheraktivierten PA6-Flachmembranen

Alle erhaltenen Meßwerte lagen zwischen 10 und 14 mg(BSA)/cm³(MV). Eine Abhängigkeit der gebundenen Menge von der Spacerlänge des zur Membranaktivierung verwendeten Diglycidylethers konnte somit nicht beobachtet werden.

Für Hohlfasermembranen wurden erwartungsgemäß um ca. 20 % höhere Mengen an gebundenem Protein ermittelt, da die zur Verfügung stehende innere Membranoberfläche entsprechend größer ist als bei den verwendeten Flachmembranen.

Zuletzt wurden Immobilisationen an diglycidyletheraktivierten Hohlfasern in kompletten Dead-End-Modulen durchgeführt (vgl. Kap. 2.1.2). Die für „lose“ Hohlfasern ermittelten Meßwerte konnten hierbei gut reproduziert werden. Alle Ergebnisse zur BSA-Immobilisation sind in Kap. 4.5.1.1 aufgeführt.

Die Bestimmung der Blindwerte erfolgte durch Behandeln der jeweiligen nicht aktivierten PA6-Membranen gemäß Immobilisationsprotokoll. Alle hierfür ermittelten Meßwerte lagen in der gleichen Größenordnung wie bei den aktivierten Membranen (vgl. Abb. 2-27). An dieser Stelle kann demnach noch keine Aussage über die Art der Bindung zwischen aktivierter Membran und Protein gemacht werden.

Da entsprechend der angewendeten Immobilisationsbedingungen eine kovalente Bindung zwischen nicht aktivierten Membranen und dem Protein auszuschließen ist, muß es sich im Falle der Blindwerte um adsorptiv gebundenes BSA handeln, das durch Anwendung der Waschprozedur nicht entfernt werden konnte. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob eine Änderung der Waschprozedur eine Entfernung ermöglicht. Hierzu wurde die Wirkung verschiedener Chaotrope (Guanidiniumchlorid, Natriumthiocyanat und TRIS) anstelle von Harnstoff untersucht. Außerdem wurden die Membranen mit verschiedenen Ethanol/Wasser-Gemischen, DMF sowie DMSO gewaschen. Allerdings konnte keine vollständige Entfernung von adsorptiv gebundenem BSA erreicht werden. Vielmehr wurden in jedem Fall die bereits vorliegenden Blindwerte reproduziert.

Bei der BSA-Adsorption an unbehandelten Membranen unter Immobilisationsbedingungen handelt es sich demnach um keinen Vorgang, wie er in klassischen Theorien als durch zwei Geschwindigkeitskonstanten für Adsorption und Desorption bestimmter reversibler Gleichgewichtsprozeß beschrieben wird, sondern wahrscheinlich um einen durch Denaturierung auf der Membranoberfläche bestimmten Prozeß. Das in Abb. 2-28 dargestellte Modell von *Andrade et al.* beschreibt solche Strukturänderungen von Proteinen nach Adsorption an Oberflächen.¹¹²

Häufig werden in diesem Zusammenhang hystereseförmige Isothermen für Proteinadsorptionen an Oberflächen beobachtet, welche zudem auf irreversible Vorgänge hinweisen.¹¹³

Über Strukturänderungen von HSA wird auch von *Haynes* und *Norde* als Triebkraft für dessen verstärkte Anlagerung auf hydrophoben Oberflächen berichtet. Als Grund wird dort der durch

Zerstörung der Struktur resultierende Entropiegewinn, durch den die Rotationsmobilität entlang der Peptidketten vergrößert wird, genannt.¹¹⁴

Eine Irreversibilität der BSA-Adsorption an nicht aktivierten Membranen konnte in der vorliegenden Arbeit dadurch nachgewiesen werden, daß solche Membranen mit fluoreszenzmarkiertem BSA sowohl nach dem Immobilisationsprotokoll als auch durch 24-stündiges Schütteln in phosphatgepufferter Kochsalzlösung behandelt wurden.

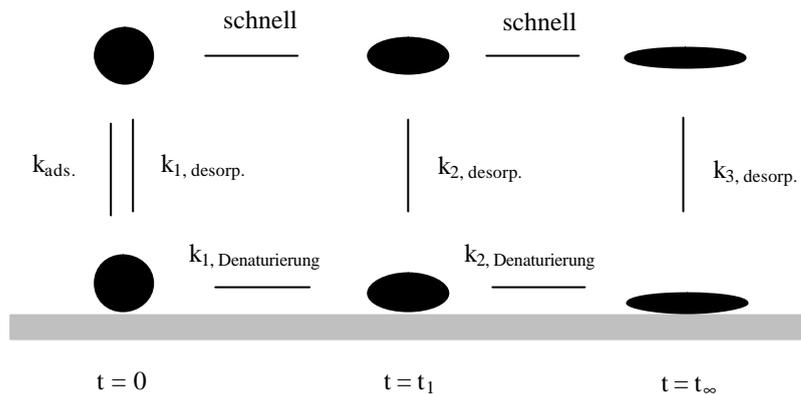


Abb. 2-28: Allgemeines Modell zur Adsorption von Proteinen an Festkörperoberflächen

Fluoreszenzmarkiertes BSA konnte erhalten werden, indem zunächst 5-(6)-Carboxyfluorescein als NHS-Ester aktiviert und dann mit dem Protein zu dem entsprechenden Konjugat umgesetzt wurde.

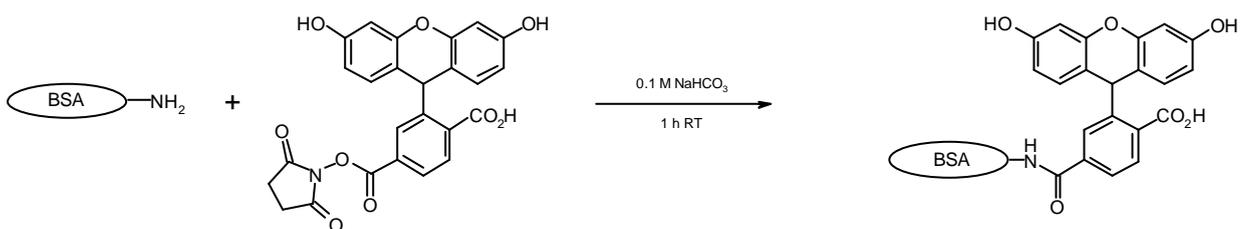


Abb. 2-29: Synthese von fluoreszenzmarkiertem BSA (Das Kupplungsverhältnis Fluoreszenzmarker zu BSA konnte mit 3:1 bestimmt werden)

Die auf beschriebene Weise präparierten Membranen wurden gemäß Standardprotokoll gewaschen und anschließend jeweils 16 Stunden in einer einprozentigen Lösung von nicht markiertem BSA in PBS bei 37 °C geschüttelt. Die Lösung wurde dabei kontinuierlich durch einen Fluoreszenzdetektor gepumpt und die Intensität der Fluoreszenz mit einem Schreiber

protokolliert ($\lambda_{\text{Excitation}} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 516 \text{ nm}$). Aus der Zunahme der Fluoreszenz wurde die Menge an adsorptiv an die jeweilige Membran gebundenem BSA ermittelt, welche an dynamischen Austauschprozessen teilnimmt. Die Menge an Membran und das Volumen an Lösung wurden so gewählt, daß es bei einer vollständig reversiblen Bindung des Proteins an die Membran zu einem Konzentrationsanstieg an markiertem Protein in der Lösung kommen mußte, der der ursprünglich membrangebundenen Menge entspricht.

Nach Beginn des Experimentes konnte in allen Fällen ein Anstieg der Fluoreszenzintensität in den Lösungen beobachtet werden. Nach etwa acht Stunden änderten sich die Meßwerte nicht mehr. Im Falle einer adsorptiven Bindung des Proteins aus einer BSA-Lösung in PBS konnte beobachtet werden, daß lediglich 20 % des gebundenen Albumins durch Austauschprozesse in Lösung gelangt war. Für den Fall einer BSA-Adsorption unter Immobilisationsbedingungen konnten sogar nur 10 % des ursprünglich gebundenen Albumins in der Lösung gefunden werden.

Demnach kann festgestellt werden, daß es sich bei der Adsorption von BSA an den hier untersuchten, nicht aktivierten PA6-Membranen um einen irreversiblen Vorgang handelt. Diese Beobachtung ist durch Strukturänderungen (Denaturierung) erklärbar, die dem Protein nach Kontakt mit der Membranoberfläche widerfahren.

Schließlich stellt sich die Frage, ob es sich bei den in Abb. 2-27 für diglycidyletheraktivierte Membranen dargestellten Mengen an gebundenem Protein ebenfalls um adsorptiv gebundenes oder aber um kovalent gebundenes BSA handelt.

Hierzu wurden die Epoxidgruppen von diglycidyletheraktivierten Flachmembranen vor der BSA-Immobilisation durch alkalische Hydrolyse in Diole überführt (vgl. Kap. 2.1.2). Die auf diese Weise erhaltenen Membranen sollten über ähnliche Oberflächeneigenschaften wie die jeweiligen diglycidyletheraktivierten Membranen verfügen, aber keine Möglichkeit zur kovalenten Anbindung bieten.

Nach Anwendung der Immobilisations- und Waschprozedur an diesen Membranen konnten durch Messung der membrangebundenen Proteinmengen realistische Blindwerte erhalten werden. Diese betragen im höchsten Fall $2.8 \text{ mg(BSA)/cm}^3(\text{MV})$ bei einer Membran, die durch Hydrolyse des Epoxids einer EGDGE-aktivierten Flachmembran erhalten wurde. Alle anderen Meßwerte lagen unterhalb von 2 mg/cm^3 .

Hierdurch konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei den für diglycidyletheraktivierte Membranen ermittelten Meßwerten tatsächlich um kovalent gebundenes BSA handelt und einer

irreversiblen Adsorption, wie sie an nicht aktivierten Membranen beobachtet wurde, höchstens eine untergeordnete Rolle zukommt.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine Oberflächenmodifikation von Polyamidmembranen mit OEG- bzw. PEG-Derivaten zu einer wirksamen Verminderung einer unspezifischen Proteinadsorption bzw. zumindest zu einer Verminderung unerwünschter Strukturänderungen bzw. Denaturierungsprozesse adsorbierter Proteine führt. Letztere würden mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Verlust der funktionellen Integrität eines Proteins führen.

Folgende Überlegungen sollen zeigen, ob die in Abb. 2-27 dargestellten Meßwerte an kovalent gebundenem BSA einer ökonomischen Nutzung der zur Verfügung stehenden inneren Membranoberfläche entsprechen. Diese sollte sich aus einer Monoschichtbelegung ergeben.

Für das näherungsweise elliptisch geformte BSA-Molekül findet man in der Literatur einen Durchmesser von 4.2 nm sowie eine Länge von 14.1 nm.¹¹⁰ Die Anzahl der Moleküle in einer monomolekularen Schicht hängt somit von der Orientierung des gebundenen Proteins auf der Membranoberfläche ab, wobei die orthogonale und parallele Ausrichtung (end-on und side-on Anordnung) der Längsachse zur Oberfläche die beiden Grenzfälle möglicher Anordnungen darstellen.

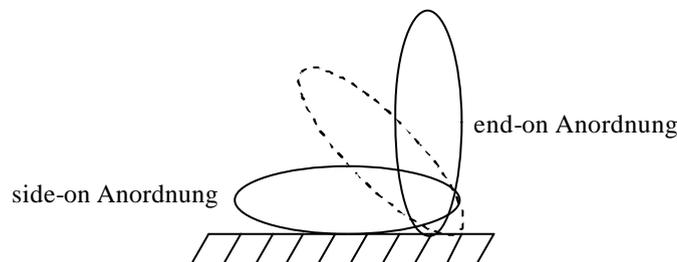


Abb. 2-30: Mögliche Orientierungen von BSA auf der Membranoberfläche

Für eine monomolekulare Schicht von BSA-Molekülen ergibt sich bei einer inneren Oberfläche von etwa acht Quadratmeter je Kubikzentimeter, die mittels BET-Methode¹¹⁵ für Flachmembranen ermittelt wurde¹¹⁶, eine Menge von $0.75 \mu\text{mol}/\text{cm}^3(\text{MV})$ im Falle einer end-on Anordnung aller Moleküle bzw. von $0.22 \mu\text{mol}/\text{cm}^3(\text{MV})$ im Fall einer side-on Anordnung. Mit einem Molekulargewicht von 66400 g/mol ¹¹⁷ ergeben sich dann folgende theoretische Mengen:

| | |
|---------------------------|--|
| side-on Anordnung: | $0.22 \mu\text{mol}(\text{BSA})/\text{cm}^3(\text{MV})$ entspr. 15 mg(BSA)/cm³(MV) |
| end-on Anordnung: | $0.75 \mu\text{mol}(\text{BSA})/\text{cm}^3(\text{MV})$ entspr. 50 mg(BSA)/cm³(MV) |

Bei der Interpretation dieser Werte ist zu berücksichtigen, daß die Bestimmung der inneren Oberfläche mittels BET-Methode durch Messung der Adsorption von elementarem Stickstoff erfolgte. Da es sich bei der inneren Membranstruktur um keine glatte Oberfläche handelt, steht für eine Monoschichtbelegung aus kleinen Stickstoffmolekülen eine größere innere Oberfläche zur Verfügung, als dies für BSA-Moleküle der Fall ist. Die real erzielbaren BSA-Monoschichten sollten demnach deutlich kleiner als die oben berechneten Werte sein.

Die experimentell erhaltenen Mengen an kovalent immobilisiertem BSA von 12 - 14 mg/cm³ entsprechen demnach - insbesondere wenn man von einer bevorzugten side-on Anordnung der BSA-Moleküle ausgeht - mindestens einer vollständigen Monobelegung der verfügbaren Oberfläche.

Aus den in Kap. 2.1.2 angegebenen Epoxidgruppendichten der verwendeten diglycidylether-aktivierten Flachmembranen folgt ein Verhältnis von Ankergruppen zu Ligand (BSA) von etwa 50:1. Eine in gewissem Maße erwünschte Mehrpunktanbindung des Albumins ist daher als wahrscheinlich anzusehen.

Schließlich stellte sich die Frage, ob nach der BSA-Immobilisation alle Epoxidgruppen mit dem Protein - oder anderweitig - abreagiert haben. Da eventuell anwesende Epoxidgruppen nach erfolgter Anbindung von BSA nicht mehr durch ein in Kap. 2.1.2 genanntes analytisches Verfahren zugänglich sind, wurden diglycidyletheraktivierte Membranen analog dem BSA-Immobilisationsprotokoll behandelt, wobei allerdings kein BSA zugegeben wurde. Nach jedem Schritt des Protokolls wurde die Epoxidgruppendichte mittels „Ninhydrin-Methode“ bestimmt. Die Anwendung des Immobilisationsprotokolls an einer TriEGDGE-aktivierten Membran mit 9.6 µmol(Epoxid)/cm³(MV) führte zu keiner Desaktivierung der Epoxidgruppen. Nach einstündigem Schütteln der Membran in 0.1 M Zitronensäure bei 37 °C konnte mit 8.2 µmol/cm³ eine geringfügig niedrigere Menge Epoxid als ursprünglich vorhanden war gefunden werden, die jedoch unter Berücksichtigung der Meßfehler nicht signifikant ist. Die weiteren Schritte der Waschprozedur führten hingegen zu keiner weiteren Desaktivierung (vgl. Abb. 2-31).

Reagieren demnach nicht alle membrangebundenen Epoxidgruppen mit dem Liganden, sollten nach Immobilisation und Waschen noch zahlreiche Epoxidgruppen auf der Membranoberfläche vorhanden sein. Ob sich diese bei der bestimmungsgemäßen Verwendung eines Membranadsorbens als störend erweisen würden, ist bislang nicht untersucht worden. In vielen

Fällen erfolgt daher eine abschließende Desaktivierung freier Epoxidgruppen mit kleinen primären Aminen wie z.B. Ethanolamin oder mit Thiolen wie z.B. Ethylthiol.³⁴ Hierauf wurde allerdings in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

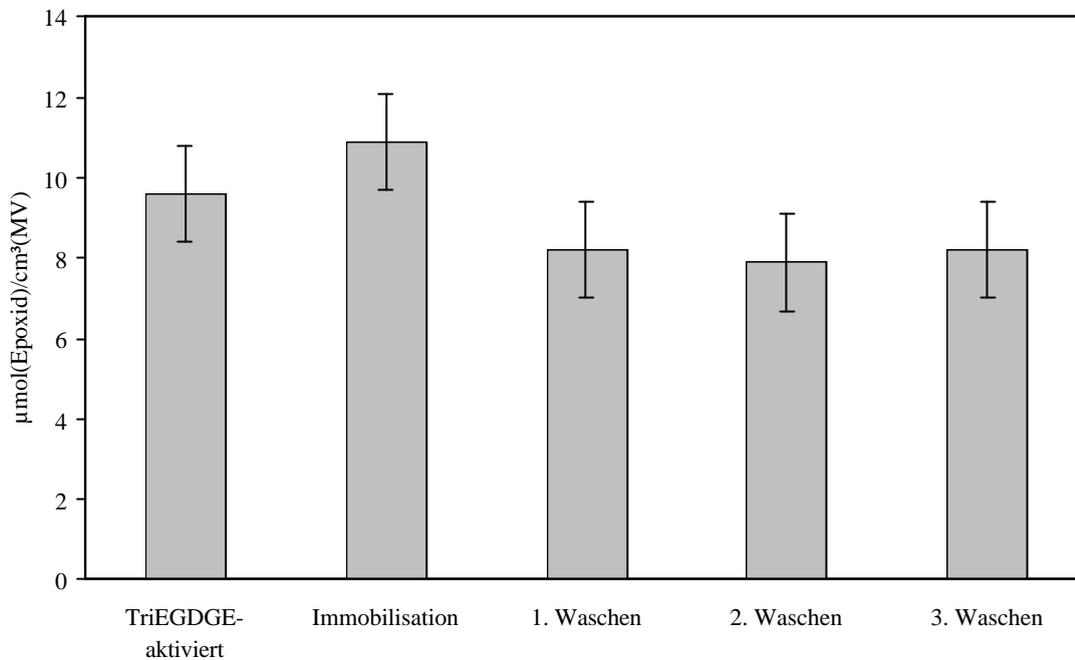


Abb. 2-31: Epoxidgruppensdichten nach Anwendung der Immobilisations- und Waschprozedur an TriEGDGE-aktivierten PA6-Flachmembranen (Immobilisation: 24-stündiges Schütteln bei 37 °C in 0.1 M Na_2CO_3 /ges. Na_2SO_4 , pH 11.5; 1. Waschen: einstündiges Schütteln bei 37 °C in 0.1 M Zitronensäure; 2. Waschen: einstündiges Schütteln bei 37 °C in 10 %iger SDS-Lösung; 3. Waschen: einstündiges Schütteln bei 37 °C in 6.0 M Harnstofflösung)

2.2.2 Immobilisation von Glucose-Oxidase (GOx)

Eigenschaften von Glucose-Oxidase

Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4) katalysiert als FAD-abhängiges Enzym die Oxidation von β -D-Glucose zu D-Glucono-1,5-lacton und Wasserstoffperoxid mittels molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor:¹¹⁸

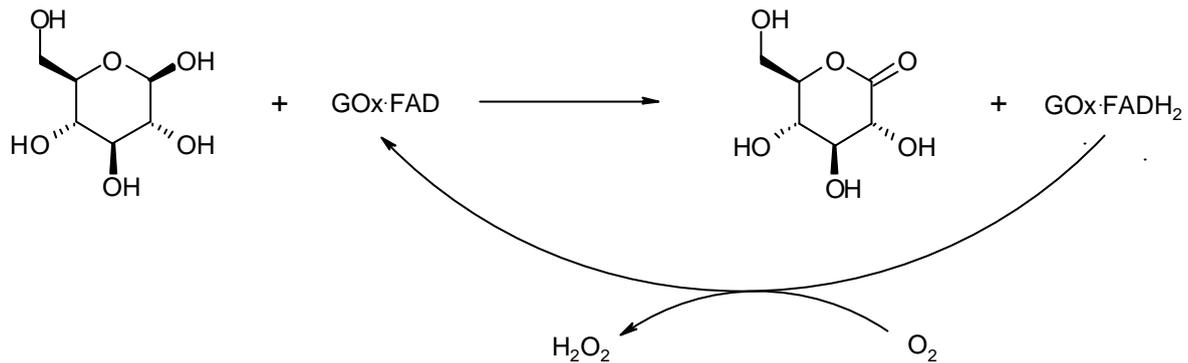


Abb. 2-32: GOx-katalysierte Oxidation von β -D-Glucose

GOx ist ein dimeres Protein aus zwei identischen Subeinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 160000 g/mol. Jede der beiden Untereinheiten verfügt über ein fest gebundenes Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) als Cofaktor. FAD ist nicht kovalent an das Holoenzym gebunden, so daß es z.B. infolge einer Denaturierung freigesetzt werden kann.¹¹⁹

Die Untereinheiten, die über eine lange schmale Kontaktfläche durch ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind, verfügen über jeweils eine Disulfidbrücke. Jede Einheit kann weiterhin in zwei strukturelle Domänen unterteilt werden, von denen eine das FAD und die andere das Substrat bindet.¹²⁰

Als Glycoprotein verfügt GOx über einen Zuckeranteil von ca. 16 Massenprozent, der vorwiegend aus Mannose aufgebaut wird. Letztere ist über glycosidische Bindungen an Asparagin, Threonin und Serin gebunden.¹²¹

Das Enzym zeichnet sich durch eine Dimension von 6.0 x 5.2 x 3.7 nm aus und verfügt über einen hohen Anteil an Sekundärstruktur (28 % Helix, 18 % Faltblatt). Die Tertiärstruktur ist durch zwei deutlich verschiedene β -Faltblattsysteme charakterisiert, wobei eines die FAD-Bindungsstelle formt. Das zweite wird aus einer großen sechs-strängigen antiparallelen

β -Faltblattstruktur gebildet, die ihrerseits aus vier α -Helices aufgebaut wird und die Hälfte des aktiven Zentrums bildet.¹¹⁹

GOx ist spezifisch für β -D-Glucose, jedoch werden auch andere Monosaccharide, allerdings mit deutlich kleineren Raten oxidiert.¹²²

Die Wasserlöslichkeit von GOx ist bei neutralem pH-Wert sehr gut, der isoelektrische Punkt liegt bei pH 4.2.

Technisch wird GOx vorwiegend aus dem Pilz *Aspergillus niger* gewonnen und findet heute breite Anwendung zur Bestimmung von Glucose in biologischen Flüssigkeiten sowie als Zusatz für Lebensmittel und Getränke.

Eine interessante Anwendung ergibt sich aus der Immobilisation von GOx an Elektrodenoberflächen. Bei den resultierenden amperometrischen Biosensoren für Glucose bildet das Enzym ein spezifisches Erkennungselement. Ein Stromfluß zur Elektrode wird nach Umsetzung des Analyten durch Elektronenübertragung auf frei diffundierende Redoxpaare, meist O_2/H_2O_2 , erzeugt. Dieses Verfahren zur Bestimmung von Glucose in Blut oder Lebensmitteln wurde 1962 erstmalig von *Clark et al.*¹²³ beschrieben und später von *Scheller et al.*¹²⁴ weiterentwickelt. Fast alle heute erhältlichen Blutzuckermeßgeräte basieren auf diesem Prinzip.¹²⁵

Das unverändert große Interesse an amperometrischen Glucosesensoren ist an der Vielzahl aktueller Publikationen zu erkennen. *Mita et al.* beschrieben letztes Jahr die Herstellung eines solchen Biosensors durch Immobilisation von GOx an mikroporöse Nylonmembranen.¹²⁶ Hierzu wurde zunächst eine chemisch induzierte Pfropfpolymerisation von Glycidylmethacrylat an der Membran durchgeführt (vgl. Abb. 1-8). Nach Umsetzung der Epoxidgruppen mit HDA und Aktivierung mit Glutardialdehyd erfolgte schließlich die Anbindung von GOx, wobei Ligandendichten von etwa 8 mg/cm³(MV) erzielt wurden. Die angegebenen relativen Aktivitäten lagen zwischen sieben und acht Prozent bezogen auf das native Enzym. Der Biosensor für Glucose wurde durch Kombination der Membran mit einer Platinanode sowie einer Silber/Silberchlorid-Gegenelektrode erhalten.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sind die von *Gil et al.* hergestellten optischen Biosensoren für Bilirubin von Interesse.¹²⁷ Hierbei wird die kontrollierte Oxidation von Bilirubin zu Biliverdin mittels Wasserstoffperoxid genutzt. Als Sensor dient eine GOx-immobilisierte Membran aus Polyvinylalkohol, die durch Kupplung und Vernetzung des Enzyms mittels Glutardialdehyd erhalten wird. Durch die GOx-vermittelte Oxidation der in einer Blutprobe enthaltenen Glucose erfolgt eine kontrollierte Freisetzung von

Wasserstoffperoxid, welches Bilirubin in Gegenwart von Hämoglobin (Hb) zu Biliverdin oxidiert. Die Quantifizierung des Analyten erfolgt durch Messung der Extinktionsabnahme der Absorptionsbande von Bilirubin (460 nm).

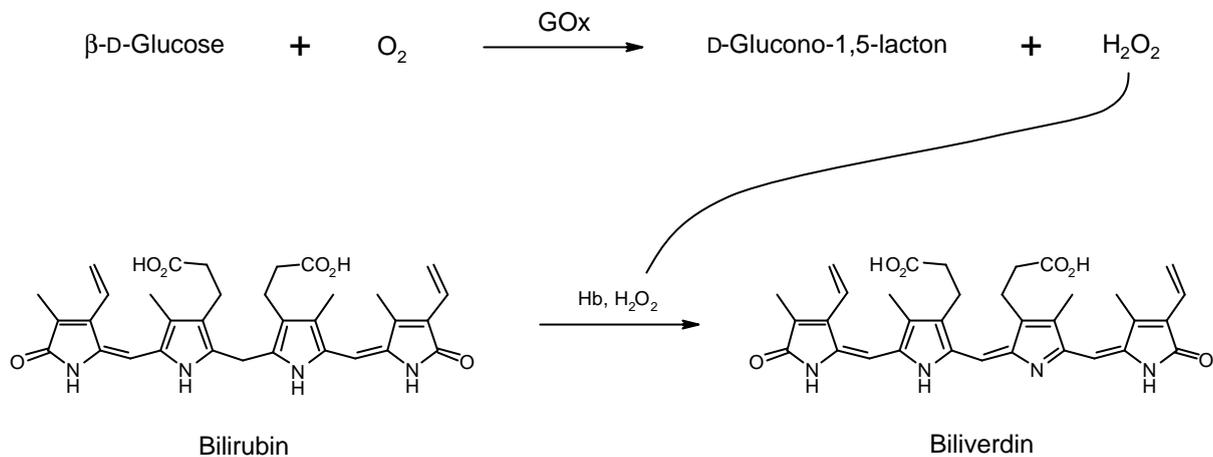


Abb. 2-33: Kontrollierte Oxidation von Bilirubin mittels GOx/Hb

Die gleichen Autoren beschreiben eine mögliche Anwendung ihres GOx-immobilisierten Membranreaktors zur pseudokatalytischen Oxidation von Bilirubin innerhalb einer extrakorporalen Blut- oder Plasmatherapie.¹²⁸ Biliverdin als Oxidationsprodukt zeichnet sich durch eine geringe Toxizität sowie gute Wasserlöslichkeit aus. Die Entfernung von Bilirubin aus Blut oder Blutplasma mittels Enzymreaktoren wurde bereits Ende der 80er von *Sung et al.* beschrieben.¹²⁹

Immobilisation von GOx an diglycidylether- und aldehydaktivierte PA6-Flachmembranen

Wegen ihrer Nutzbarkeit zur pseudoselektiven Oxidation von Bilirubin sollten GOx-immobilisierte Membranen im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt werden. Hierbei galt das Interesse der Untersuchung verschiedener Kupplungsbedingungen sowie einem Vergleich der enzymatischen Aktivitäten der Immobilisate bezogen auf das native Enzym. Auf Untersuchungen der hergestellten Enzymreaktoren bezüglich einer selektiven Oxidation von Bilirubin im Blutplasma sollte an dieser Stelle verzichtet werden.

Die Versuche zur Anbindung des Enzyms erfolgten an den in Kap. 2.1.2 beschriebenen diglycidylether- und aldehydaktivierten Flachmembranen.

Die Mehrzahl der literaturbekannten Methoden zur Immobilisation von GOx an epoxy- und aldehydfunktionalisierte Festphasen bestehen in einer Behandlung mit 0.1 bis 1.0 %igen GOx-Lösungen in 0.1 M Phosphatpuffer bei einer Temperatur von 4 °C.^{126,127,128,130}

Dementsprechend wurden einprozentige GOx-Lösungen in 0.1 M Phosphatpuffer hergestellt und die jeweiligen Membranen darin bei Temperaturen von 4 °C bzw. 25 °C geschüttelt. Als optimale Reaktionszeit konnten 48 Stunden ermittelt werden. Auf eine Zugabe hoher Salzkonzentrationen wurde verzichtet, da hierdurch keine Verbesserung der erzielbaren Ligandendichten beobachtet werden konnte.

Die Bindung zwischen Membran und Enzym erfolgte im Fall von diglycidyletheraktivierten Membranen durch Reaktion zwischen primären Aminogruppen des Liganden und den membrangebundenen Epoxidgruppen (vgl. Abb. 2-26). Im Fall von aldehydaktivierten Membranen erfolgte die Anbindung durch Bildung von Iminen. Eine anschließende Reduktion wurde nicht durchgeführt.

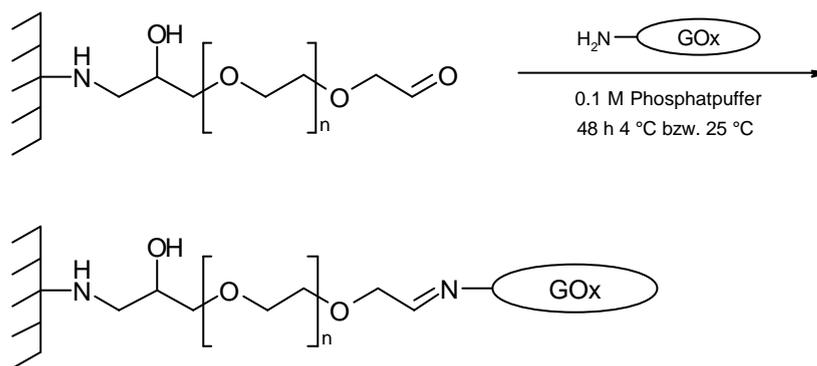


Abb. 2-34: Immobilisation von GOx an aldehydaktivierte Membranen

Im Gegensatz zur BSA-Immobilisation erwies sich die Entfernung von adsorptiv gebundenem Enzym als problemlos. Nach der GOx-Immobilisation wurden die erhaltenen Membranen zuerst mit Pufferlösung und anschließend mehrfach mit Wasser gewaschen. An nicht aktivierten Flachmembranen konnten so Blindwerte von unter 1 mg(GOx)/cm³(MV) ermittelt werden.

Die Quantifizierung des membrangebundenen Enzyms erfolgte analog der im vorherigen Kapitel beschriebenen Methode für BSA-Immobilisate durch Anwendung des BCA-Assays ohne vorherige Membranhydrolyse. Die erhaltenen Meßergebnisse zeichneten sich durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit aus.

In den folgenden Abb. 2-35 und 2-36 sind die an den jeweiligen Flachmembranen ermittelten Mengen an gebundenem Enzym dargestellt.

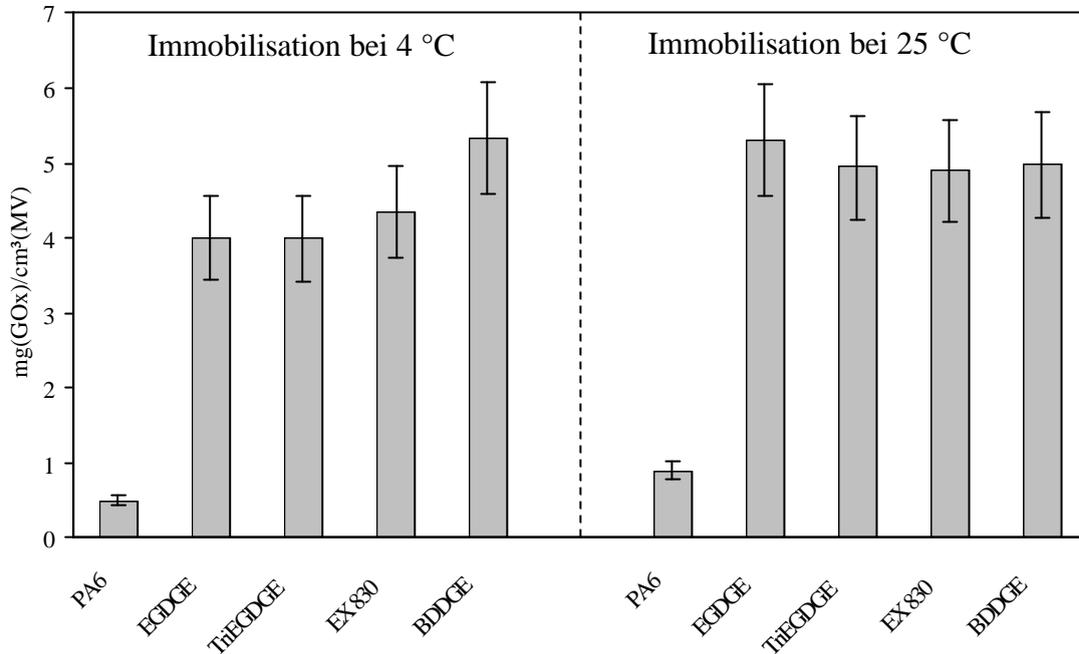


Abb. 2-35: Ergebnisse zur GOx-Immobilisation an diglycidyletheraktivierte Membranen

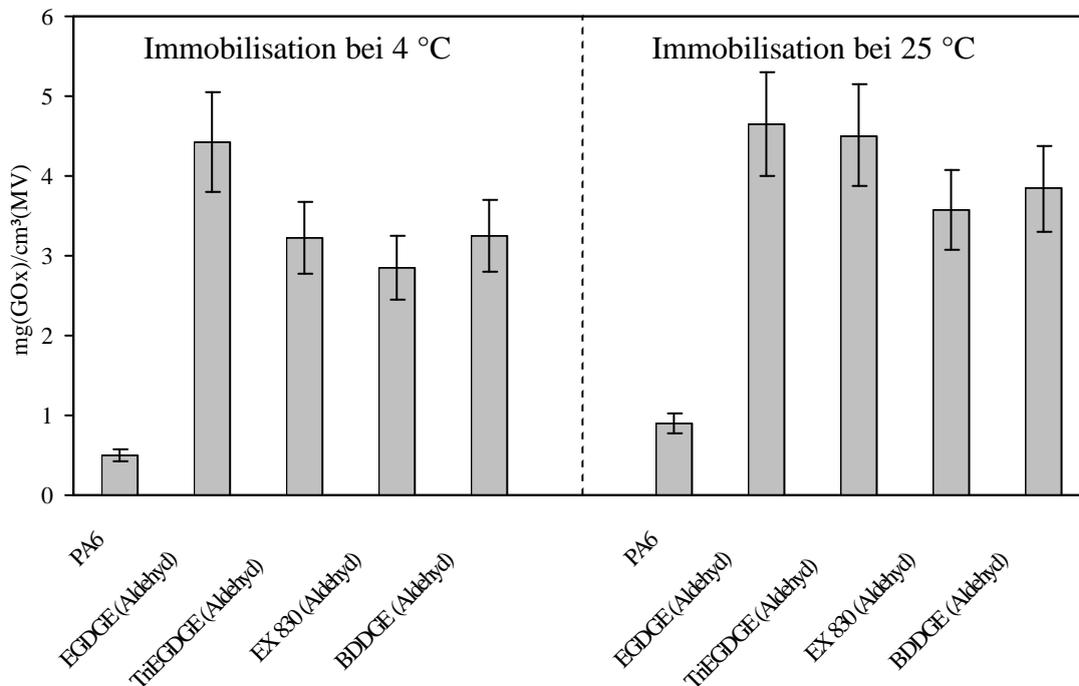


Abb. 2-36: Ergebnisse zur GOx-Immobilisation an aldehydaktivierte Membranen

Alle dargestellten Ergebnisse für diglycidyletheraktivierte Membranen lagen in einem Bereich zwischen 4 - 6 mg(GOx)/cm³(MV). Eine Abhängigkeit zwischen Spacerlänge und gebundener Menge Enzym konnte nicht beobachtet werden. Da die Reaktionszeit bei einer Temperatur von 4 °C optimiert wurde, waren die bei dieser Temperatur erreichten Ligandendichten nur geringfügig niedriger als nach einer Immobilisation bei 25 °C.

Die für aldehydaktivierte Membranen ermittelten Mengen an gebundenem Enzym lagen mit 3 - 5 mg(GOx)/cm³(MV) etwa 20 % unterhalb der entsprechenden Werte für diglycidyletheraktivierte Membranen. Eine Verbesserung der erzielbaren Ligandendichten durch Änderung der Reaktionszeit und -temperatur sowie der Pufferzusammensetzung konnte nicht realisiert werden.

Aus den erhaltenen Ergebnissen ergeben sich mit einem Molekulargewicht von 160000 g/mol Stoffmengen zwischen 20 und 30 nmol(GOx)/cm³(MV). Im Fall der BSA-immobilisierten Membranen (vgl. Kap. 2.2.1) konnten etwa zehnfache Stoffmengen an Protein gebunden werden, obwohl der Flächenbedarf auf der Membranoberfläche bei beiden Proteinen ähnlich groß ist.

Eine ökonomische Nutzung der zur Verfügung stehenden Membranoberfläche konnte demnach bei der GOx-Immobilisation nicht erreicht werden. Andererseits waren die hier erzielten Ligandendichten nur geringfügig kleiner als die bei *Mita et al.* beschriebenen, obwohl dort GMA-gepfropfte Nylonmembranen mit deutlich höherer Ankergruppendichte verwendet wurden.¹²⁶ Eine Vergleichbarkeit mit den dort verwendeten Nylonmembranen ist gegeben, da sich diese bezüglich Material, Dimension sowie nomineller Porengröße nur unwesentlich von den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Membranen unterscheiden. Somit kann festgestellt werden, daß eine Erhöhung der Ankergruppendichte im Fall einer Immobilisation von großen Liganden nicht notwendig sein muß, bzw. sich der damit verbundene Aufwand meistens nicht lohnt.

Bestimmung der Aktivität von GOx-immobilisierten Membranen

Die enzymatische Aktivität der hergestellten GOx-immobilisierten Membranen wurde durch Anwendung der bei *Bergmeyer et al.*¹³¹ beschriebenen Methode zur quantitativen Bestimmung von Glucose ermittelt. Hierbei erfolgte eine Konzentrationsbestimmung des bei der GOx-vermittelten Oxidation von Glucose entstehenden Wasserstoffperoxids in Abhängigkeit von der

Reaktionszeit. Letzteres reagiert in Gegenwart von Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit *o*-Dianisidin als Wasserstoffdonor, wobei der Farbstoff oxidiert wird. Durch Zugabe von 12 N Schwefelsäure wird die Oxidation der Glucose abgebrochen, und es bildet sich ein rotes Salz des oxidierten Farbstoffes, dessen Konzentration durch Messung der Extinktion bei 527 nm ermittelt werden kann.

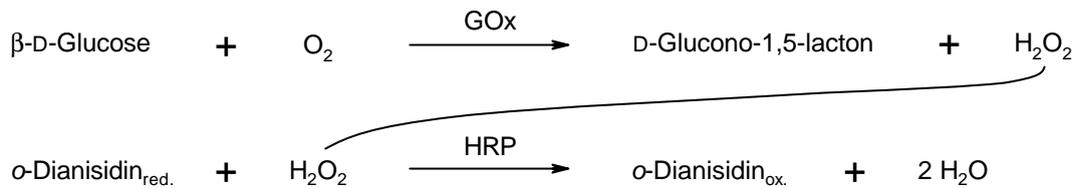


Abb. 2-37: Bestimmung der Aktivität von Glucose-Oxidase

Da alle Reaktionen stöchiometrisch ablaufen, ist die gemessene Farbstoffkonzentration der Menge an Wasserstoffperoxid sowie der Menge an umgesetzter Glucose proportional.

Experimentell wurden die benötigten Testlösungen nach Literaturvorschrift hergestellt, wobei an Stelle des nativen Enzyms entsprechende Mengen an GOx-immobilisierter Membran zu den Lösungen gegeben wurden. Für jeden Datenpunkt der Umsatz-Zeitabhängigkeit wurde ein Testansatz bei einer Temperatur von 37 °C und einer Frequenz von 120 min⁻¹ geschüttelt. Nach Ablauf eines Zeitintervalls wurde ein Abbruch der Umsetzung durch Zugabe von Schwefelsäure herbeigeführt und schließlich die Extinktion der erhaltenen Lösungen am Absorptionsmaximum ermittelt.

Obwohl die bei der Bestimmung durchlaufene Reaktionskette durch komplexe Geschwindigkeits-Zeitgesetze beschrieben werden muß, ergab sich experimentell ein exponentieller Abfall der Glucosekonzentration mit der Zeit. Abb. 2-38 zeigt beispielhaft die erhaltene Zeit-Umsatzkurve für das freie Enzym. Die Messungen erfolgten an 9.3 µM Glucoselösungen mit einer GOx-Konzentration von 4.1 U/mL¹³² und dienten als Referenz für die jeweiligen Messungen an enzymimmobilisierten Membranen. Die Geschwindigkeitskonstante *k* der Gleichung

$$c(\text{Glucose})_t = c(\text{Glucose})_0 \cdot e^{-kt} \quad \text{Gl. 2-1}$$

konnte aus den erhaltenen Meßwerten mittels linearer Regression der logarithmierten Form erhalten werden.

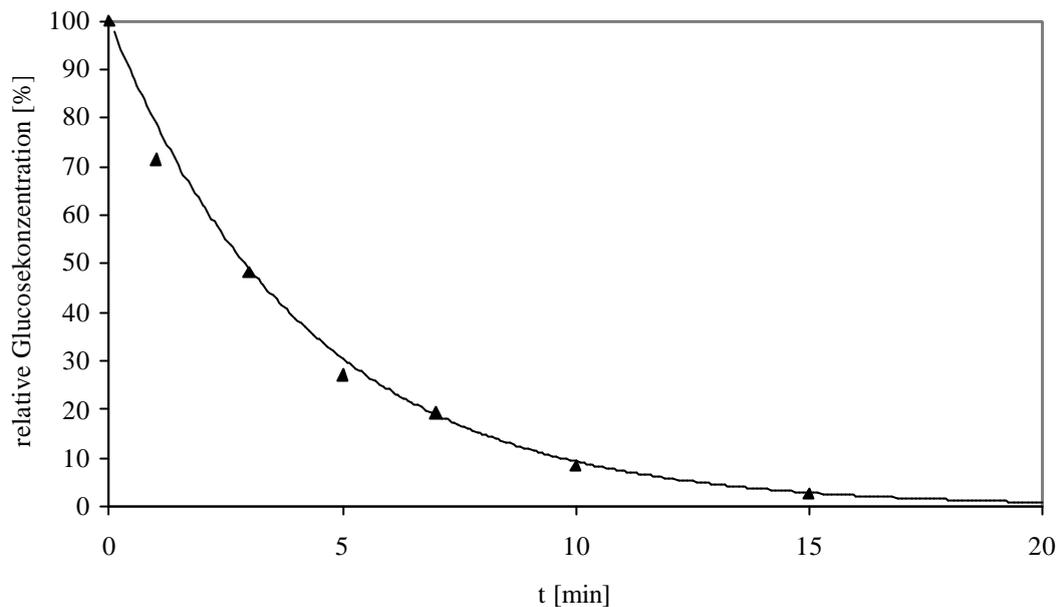


Abb. 2-38: Umsatz-Zeitabhängigkeit der GOx-vermittelten Oxidation von Glucose; Die Messungen erfolgten an 9.3 μM Glucoselösungen mit einer Konzentration an nativer GOx von 4.1 U/mL

In gleicher Weise konnten die Geschwindigkeitskonstanten für GOx-immobilisierte Membranen erhalten werden. Die Regressionsanalysen zeichneten sich hierbei durch sehr gute Korrelationskoeffizienten aus. Die relativen Aktivitäten ergaben sich schließlich aus dem Verhältnis der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die jeweilige Membran und das freie Enzym.

Die in den Abb. 2-39 und 2-40 wiedergegebenen relativen Aktivitäten müssen kritisch kommentiert werden, da der Stofftransport des Substrates zum aktiven Zentrum des Enzyms unter den gewählten Versuchsbedingungen ausschließlich durch Diffusion erfolgt. Das heterogene System aus GOx-immobilisierter Membran und Glucoselösung ist also naturgemäß benachteiligt. Die dargestellten Ergebnisse erlauben so nur einen Vergleich der untersuchten Membranen untereinander sowie mit den bei *Mita et al.*¹²⁶ angegebenen Ergebnissen, welche unter gleichen Bedingungen ermittelt wurden. Es ist davon auszugehen, daß bei der bestimmungsgemäßen Verwendung der enzymimmobilisierten Mikrofiltrationsmembran deutlich schnellere Umsetzungen erzielbar sind, da der Stofftransport dort weitgehend konvektiv erfolgt. Auf Aktivitätsbestimmungen an dynamisch betriebenen Membranreaktoren (Kreislaufapparatur)

wurde jedoch an dieser Stelle verzichtet, da sich eine Onlinebestimmung der Glucose bzw. des Wasserstoffperoxids schwierig gestaltete.

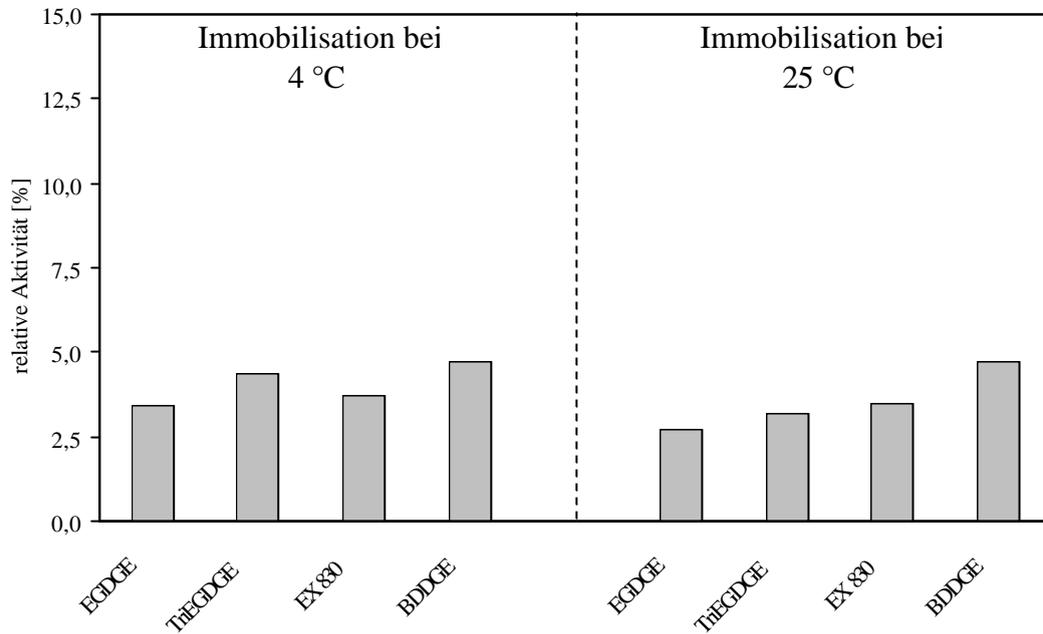


Abb. 2-39: Relative Aktivitäten der GOx-immobilisierten Membranen (diglycidylether-aktivierte PA6-Flachmembranen)

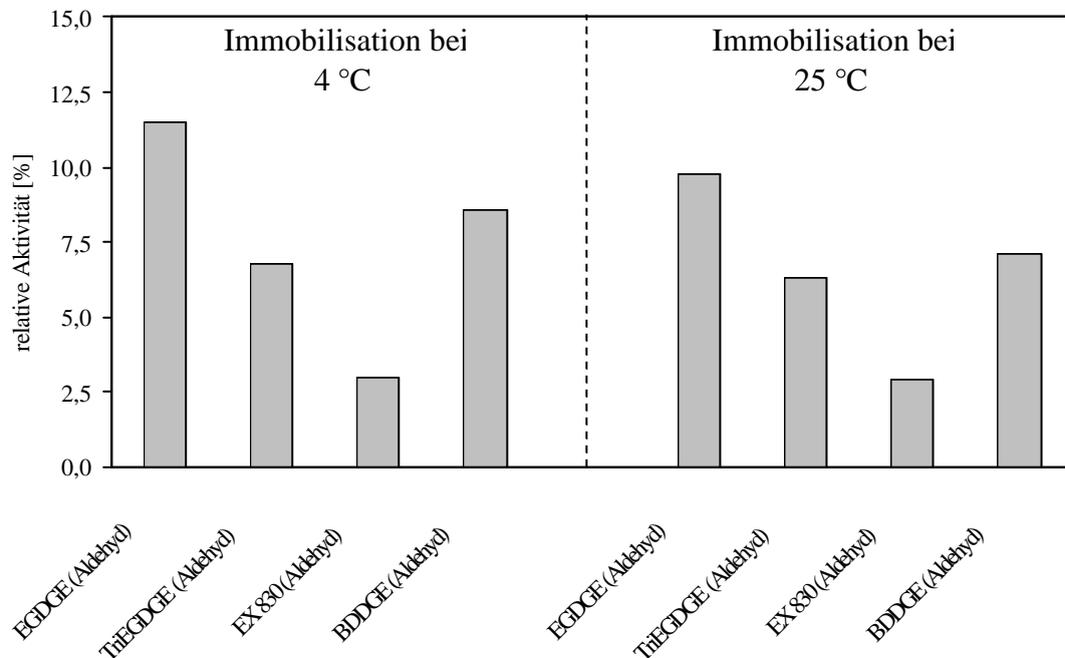


Abb. 2-40: Relative Aktivitäten der GOx-immobilisierten Membranen (aldehydaktivierte PA6-Flachmembranen)

Die für diglycidyletheraktivierte Membranen ermittelten relativen Aktivitäten lagen in einem Bereich zwischen drei und fünf Prozent, wobei weder eine Abhängigkeit von der Spacerlänge noch von den Immobilisationsbedingungen (Temperatur) beobachtet werden konnte.

Im Fall der aldehydaktivierten Membranen wurden deutlich höhere Aktivitäten ermittelt. Im besten Fall konnten hier Werte von 9.8 (Immobilisation bei 25 °C) bzw. 11.5 % (Immobilisation bei 4 °C) für Membranen, die durch Aktivierung mit EGDGE, Überführung der terminalen Epoxidgruppen in Aldehyde und anschließende GOx-Immobilisation erhalten wurden, ermittelt werden. Aldehydaktivierte Membranen mit längeren Spacern zeichneten sich durch geringere Aktivitäten aus, während im Fall einer BDDGE-Aktivierung ebenfalls Aktivitäten von knapp zehn Prozent beobachtet wurden. Die Bedingungen der Enzymimmobilisation zeigten auch hier nur geringen Einfluß auf die gemessenen Aktivitäten, wobei höhere Werte nach GOx-Immobilisationen bei 4 °C ermittelt werden konnten.

Die höheren Aktivitäten von aldehydaktivierten Membranen können dadurch erklärt werden, daß die für die Enzymimmobilisation verfügbare Ankergruppendichte deutlich kleiner war als bei den jeweiligen diglycidyletheraktivierten Membranen (vgl. Abb. 2-13). Hierdurch konnte der Grad einer Mehrpunktanbindung, welche zu einem Verlust der Aktivität führen kann, vermindert werden. Daß dieser Effekt insbesondere bei Membranen mit kurzen Spacern beobachtet werden konnte, bestätigt diese Annahme. Ankergruppen, die über kurze Spacerarme an die unebene Membranoberfläche gebunden sind, stehen bekanntlich zu einem Teil für eine Immobilisation von großen Liganden nicht zur Verfügung, so daß die effektive Ankergruppendichte für diesen Fall wesentlich kleiner als der jeweilige nominelle Wert ist. Hieraus resultieren auch die nach einer Aldehydaktivierung beobachteten, kleineren Ligandendichten.

Im Vergleich mit den bei *Mita et al.*¹²⁶ angegebenen relativen Aktivitäten von sieben bis acht Prozent konnten mit den hier beschriebenen, aldehydaktivierten Membranen mit kurzen Spacern um etwa 50 % höhere Werte erzielt werden. Diese Beobachtung bestätigt die These, daß eine hohe Ankergruppendichte für die Immobilisation großer Liganden nicht notwendig ist, sondern häufig zu einem Verlust der biologischen Aktivität führen kann.

Die innerhalb der vorliegenden Arbeit hergestellten GOx-immobilisierten Membranen sollten durch eine gute Eignung zur pseudoselektiven Oxidation von Bilirubin innerhalb einer Blut- oder Plasmabehandlung gekennzeichnet sein. Untersuchungen hierzu sollten demnach Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

2.2.3 Immobilisation von Reaktivfarbstoffen

Anwendungen von Reaktivfarbstoffen in der Affinitätschromatographie

Reaktivfarbstoffe bestehen aus einer chromophoren Komponente, welche mit einer reaktiven funktionellen Gruppe verknüpft ist. Der bekannteste dieser Farbstoffe Cibacron Blue F3G-A ist aus vier Strukturelementen aufgebaut, wobei ein sulfonierter Anthrachinonrest über eine verbrückende Diaminobenzolsulfonsäureeinheit mit einer reaktiven Chlortriazingruppe verbunden ist. Letztere ist weiterhin mit einer *m*-Aminobenzolsulfonsäuregruppe substituiert.

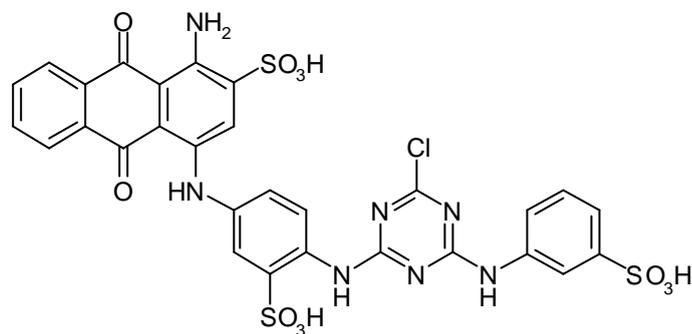


Abb. 2-41: Struktur von Cibacron F3G-A

Cibacron F3G-A ist wegen seiner reaktiven Gruppe, die eine Anbindung an Festphasen mit nucleophilen Ankergruppen unter milden Bedingungen erlaubt, in die Reihe der Triazinfarbstoffe einzuordnen.

Die Anwendung als gruppenspezifischer Ligand in der Affinitätschromatographie ergibt sich aus der hohen Affinität zu zahlreichen Proteinen. Als bekanntestes Beispiel sollen an dieser Stelle die NAD-abhängigen Dehydrogenasen erwähnt werden, wobei die beobachteten Wechselwirkungen auf Struktur- und Ladungsanalogien zu natürlichen Nucleotid-Co-Faktoren zurückzuführen sind. Eine hohe Affinität zu Proteinen, die keine Nucleotide binden, wird durch Kombination aus ionischen, hydrophoben und Charge-Transfer-Wechselwirkungen begründet.¹³³

Zahlreiche Anwendungen von kommerziell erhältlichen, Cibacron F3G-A-immobilisierten Agarose- und Dextranbeads zur Isolierung von NAD-abhängigen Enzymen sind in einem Review von *Easterday* zusammengefaßt.¹³⁴

Aus der breiten Anwendbarkeit von farbstoffimmobilisierten Trägermaterialien resultierten viele aktuelle Arbeiten zur Herstellung entsprechender Affinitätsmembranen.^{69,70,88,135} *Suen et al.* beschreiben in diesem Zusammenhang die Anbindung von Cibacron F3G-A an aktivierte Polyvinylidendifluorid-Membranen, wobei die Verwendung verschiedener Spacer untersucht wird.⁶⁹

Im Kontext der vorliegenden Arbeit sind die von *Denizli et al.* beschriebenen Bilirubinadsorber, die durch Immobilisation verschiedener Reaktivfarbstoffe (Cibacron F3G-A, Congo Red und Alkali Blue 6 B) an Poly(EGDMA-HEMA)-Mikrobeads erhalten wurden, von Interesse. In mehreren Publikationen wird die gute Eignung der verwendeten Reaktivfarbstoffe als spezifische Affinitätsliganden für Bilirubin beschrieben. Die dort untersuchten Adsorber zeichnen sich weiterhin durch hohe Kapazitäten bei Blutplasmabehandlungen aus.¹³⁶⁻¹⁴⁰

Entsprechend der Aufgabenstellung sollen an dieser Stelle verschiedene Reaktivfarbstoffe an epoxy- und aminofunktionelle PA6-Membranen gebunden werden, wobei besonderes Augenmerk auf die an dendritisch aktivierten Membranen erzielbaren Ligandendichten gerichtet wird.

Immobilisation von Cibacron F3G-A an diglycidyletheraktivierte Membranen

Zur Anbindung von Cibacron F3G-A konnte ein von *Kula et al.*¹⁴¹ erstelltes Immobilisationsprotokoll erfolgreich adaptiert werden. Der Vorteil dieser Methode ist eine allgemeine Anwendbarkeit zur Kupplung des Farbstoffes sowohl an Festphasen mit nucleophilen Gruppen (über die Chlortriazingruppe des Farbstoffes) als auch an solche mit elektrophilen Gruppen (über die primäre Aminofunktion des Farbstoffes).

Zur Farbstoffimmobilisation wurden diglycidyletheraktivierte Flachmembranen zunächst in einer Kochsalzhaltigen Lösung des Farbstoffes geschüttelt. Nach Zugabe von 1.0 M Natriumcarbonatlösung und Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C wurden die Membranen für weitere 20 Stunden geschüttelt. Die Entfernung von adsorptiv gebundenem Farbstoff erfolgte durch sukzessives Waschen mit kochendem Wasser, zehnpromzentiger SDS-Lösung und nochmals mit kochendem Wasser.

Die Bestimmung der Farbstoffbelegungsdichte erfolgte nach einer hierzu modifizierten Methode von *Burton et al.*¹⁴² durch 30-minütige Membranhydrolyse in konzentrierter Salzsäure bei einer

Temperatur von 60 °C. Die anschließende Neutralisation der erhaltenen Lösung, wie sie in der Originalliteratur für die Bestimmung der Farbstoffbelegungsdichte an Agarose-Partikeln beschrieben ist, bewirkte die Ausfällung des zuvor gelösten Polyamids. Daher wurde hierauf verzichtet und die Extinktion der rot gefärbten Lösung (510 nm) direkt gemessen. Die Belegungsdichte konnte schließlich aus einer Kalibriergeraden, die unter gleichen Bedingungen bestimmt wurde, ermittelt werden.

Die Farbstoffbelegungsdichte konnte alternativ durch Farbstärkemessungen in Reflexion mittels eines Zweistrahl-Spektralphotometers Spectraflash 600 der Fa. Datacolor bestimmt werden. Hierbei mußte die zu untersuchende Membranprobe nicht zerstört werden und es konnte ein größerer Meßbereich genutzt werden. Eine Kalibrierung erfolgte durch Messung der Farbstärke von Membranen, deren Farbstoffbelegungsdichten zuvor mittels dem oben beschriebenen Verfahren ermittelt wurden. Hierbei konnte eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Methoden beobachtet werden. Welche der beiden Methoden zur Bestimmung der nachfolgend angegebenen Meßdaten angewendet wurde, ist den jeweiligen Versuchsbeschreibungen in Kap. 4.5.2 zu entnehmen.

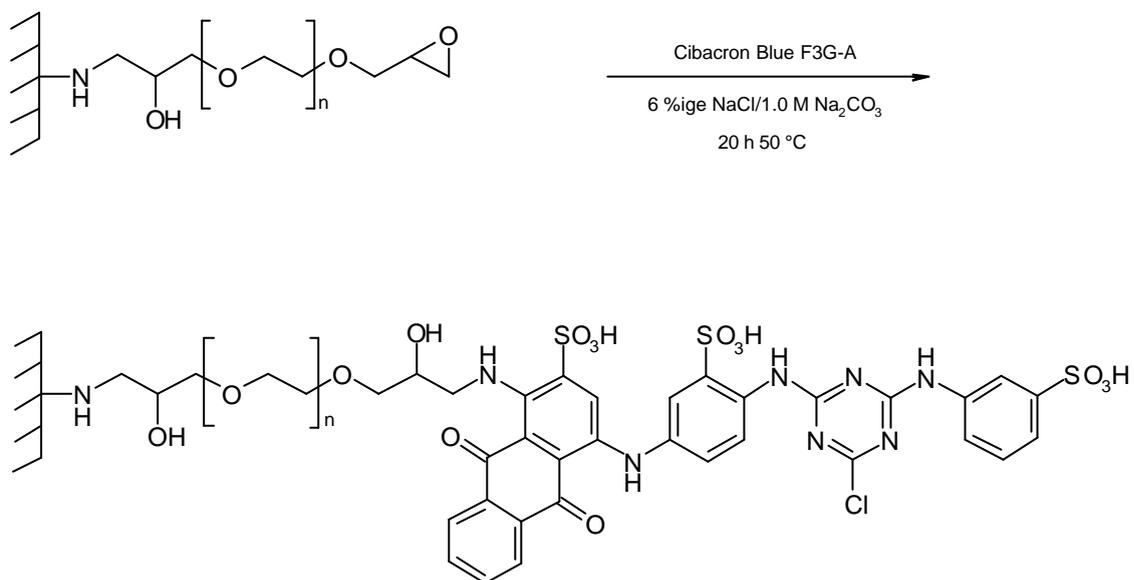


Abb. 2-42: Immobilisation von Cibacron F3G-A an diglycidyletheraktivierte PA6-Membranen

Ein Blindwert wurde durch Anwendung der Immobilisationsprozedur an einer PA6-Membran mit blockierten Aminoendgruppen ermittelt. Letztere konnte erhalten werden, indem eine nicht aktivierte Membran mit Hexansäurechlorid behandelt wurde. Mittels Ninhydrin-Assay konnte

an dieser Membran eine Aminogruppendichte von weniger als $0.5 \mu\text{mol}/\text{cm}^3(\text{MV})$ ermittelt werden, so daß während der Immobilisationsprozedur die Möglichkeit zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Membran und Farbstoff ausgeschlossen werden konnte.

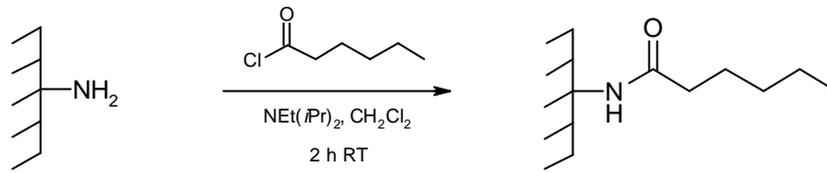


Abb. 2-43: Blockierung der Aminoendgruppen mit Hexansäurechlorid

Die gefundenen Blindwerte betragen in allen Fällen weniger als $2.0 \mu\text{mol}$ Cibacron F3G-A je Kubikzentimeter Membranvolumen. Für diglycidyletheraktivierte Flachmembranen ergaben sich die in folgender Abb. 2-44 angegebenen Farbstoffbelegungsdichten.

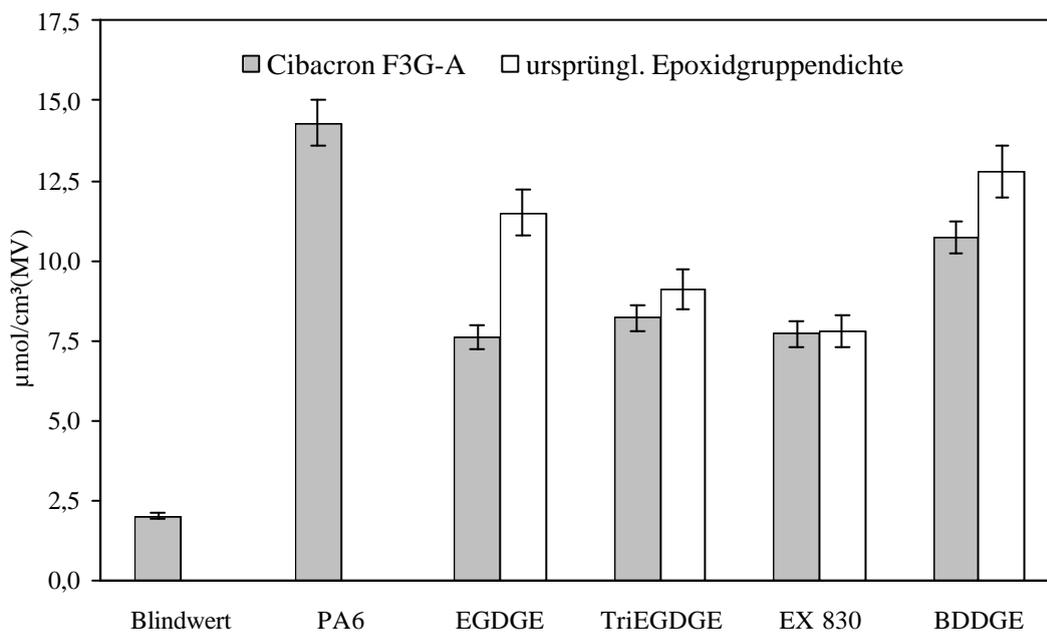


Abb. 2-44: Cibacron F3G-A-Belegungsdichten an diglycidyletheraktivierten Membranen

Die höchste Ligandendichte konnte demnach an einer nicht aktivierten Membran beobachtet werden, wobei die Anbindung dort über die Chlortriazingruppe des Farbstoffes erfolgte. Im Falle der diglycidyletheraktivierten Membranen wurde die Bindung zwischen Membran und Farbstoff durch Ringöffnung der Epoxidgruppen mittels der primären Aminogruppen des

Liganden erzeugt (vgl. Abb. 2-42). Die ermittelten Farbstoffbelegungsichten lagen bei Membranen, die mit kurzen Spacern aktiviert wurden, unterhalb der ursprünglichen Ankergruppendichte. Im Falle einer vorausgegangenen EGDGE-Aktivierung konnte hier ein Umsatz von nur etwa 70 % beobachtet werden. Nach einer Aktivierung mit Diglycidylethern der höheren OEGs erfolgte hingegen eine vollständige Nutzung der Ankergruppen zur Ligandenimmobilisation, da hier eine optimale Zugänglichkeit auf der Membranoberfläche möglich war. Absolut betrachtet unterscheiden sich die ermittelten Farbstoffbelegungsichten jedoch kaum. Mit 10.7 μmol Farbstoff je Kubikzentimeter Membranzvolumen konnte die höchste Ligandendichte an einer BDDGE-aktivierten Membran beobachtet werden.

Immobilisation von Cibacron F3G-A an aminofunktionelle Membranen

Die Anbindung von Cibacron F3G-A an aminofunktionelle Membranen wurde analog des oben beschriebenen Standardprotokolls durchgeführt. Hierbei wurden diglycidyletheraktivierte Flachmembranen, die in der in Kap. 2.1.2 beschriebenen Weise mit Diaminen (HDA und EDODEA) umgesetzt wurden, verwendet. Die Kupplung des Liganden erfolgte durch Substitution des Chlorids der Chlortriazineinheit durch die Aminoendgruppe der aktivierten Membran.

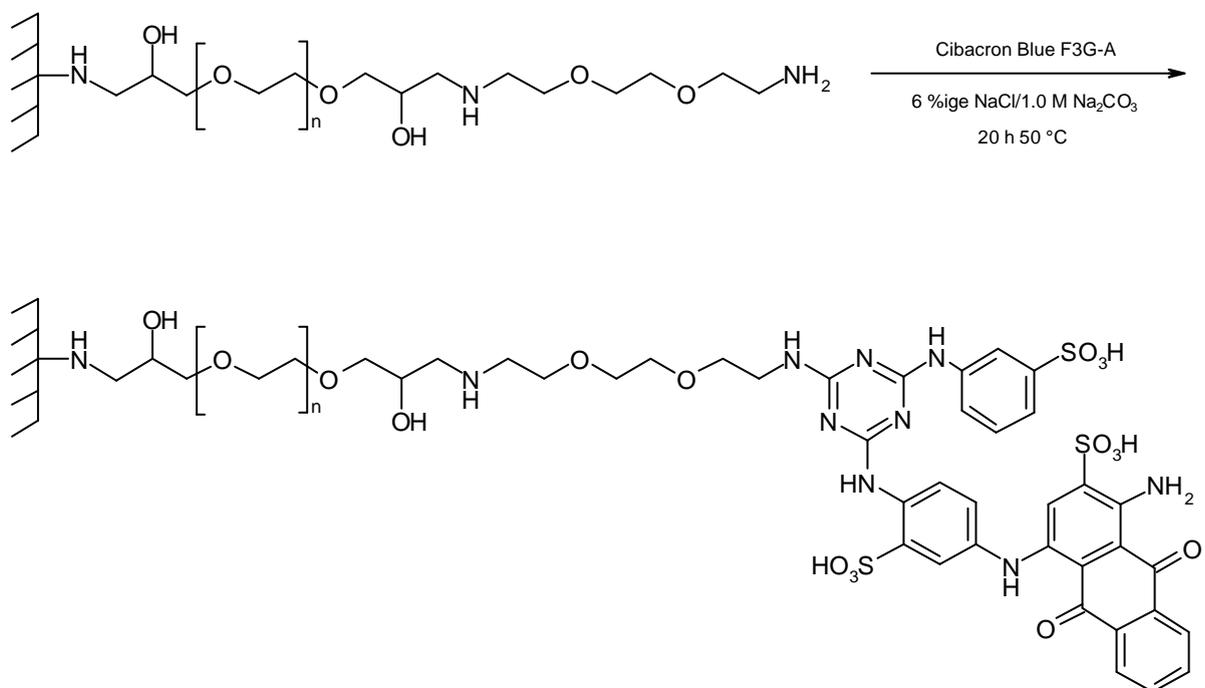


Abb. 2-45: Immobilisation von Cibacron F3G-A an EDODEA-aktivierte Membranen

Die gemessenen Ligandendichten sind in Abb. 2-46 dargestellt. Bezogen auf die ursprünglichen Ankergruppendichten (primäre Aminogruppen) konnte in allen Fällen eine etwa doppelte Stoffmenge an gebundenem Farbstoff ermittelt werden.

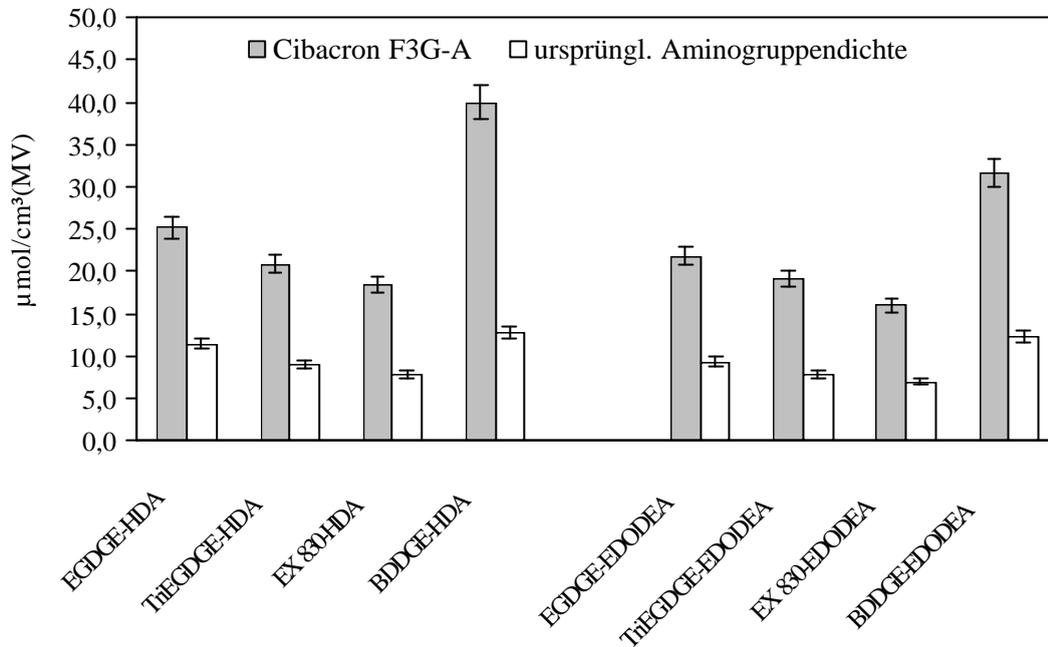


Abb. 2-46: Cibacron F3G-A-Belegdichten an aminofunktionellen Flachmembranen

Demnach erfolgte eine Farbstoffanbindung nicht ausschließlich an den primären Aminoendgruppen der aktivierten Membranen, sondern auch an den sekundären Aminogruppen, welche aus der Reaktion der jeweiligen diglycidyletheraktivierten Membran mit dem Diamin hervorgegangen sind:

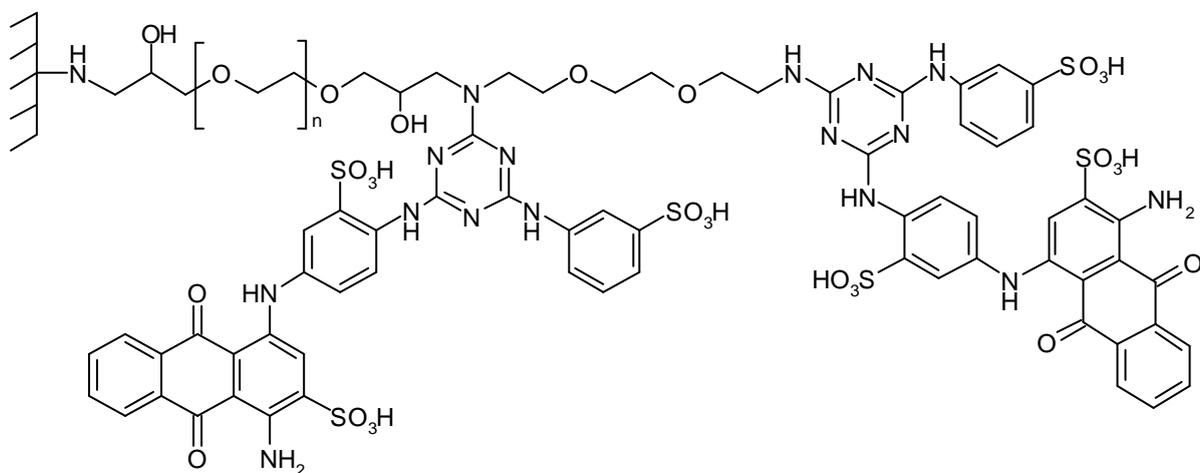


Abb. 2-47: EDODEA-aktivierte Membranen nach Cibacron F3G-A-Immobilisation

Die erzielten Ligandendichten lagen in einem Bereich zwischen 20 und 40 μmol je Kubikzentimeter Membranvolumen. Die höchsten Meßwerte konnten für BDDGE-aktivierte Membranen, die anschließend mit HDA umgesetzt wurden, ermittelt werden. Die an HDA-aktivierten Membranen ermittelten Ligandendichten waren grundsätzlich etwas höher als bei den jeweiligen EDODEA-aktivierten Membranen.

Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß die bei den bisher untersuchten Membranen zur Verfügung stehenden Ankergruppendichten vollständig für eine Immobilisation des Reaktivfarbstoffes genutzt werden konnten. Dieses wurde besonders im Fall von primären und sekundären Aminogruppen beobachtet. Eine Erhöhung der Ankergruppendichte, wie sie in Kap. 2.1.3 durch Aufbau von dendritischen Strukturen vollzogen wurde, sollte demnach zu einer weiteren Steigerung der erzielbaren Ligandendichten führen.

Immobilisation von Cibacron F3G-A an dendritisch aktivierte Membranen

Die Anbindung von Cibacron F3G-A an dendritisch aktivierte Membranen wurde analog des oben beschriebenen Standardprotokolls durchgeführt. Hierbei fanden die in Abb. 2-24 dargestellten Membranen Verwendung, die durch wiederholte ASCl -Aktivierung und Polyaminaddition erhalten wurden.

Die ermittelten Farbstoffbelegungsichten sind in Abb. 2-48 dargestellt. Zum Vergleich sind dort auch die ursprünglichen Aminogruppendichten (primäre Aminogruppen) angegeben.

Wie bereits nach einer Aktivierung mit Diaminen beobachtet werden konnte, sind die erzielten Ligandendichten deutlich höher als die verfügbare Dichte an primären Aminoendgruppen. Demnach erfolgte auch hier eine Farbstoffimmobilisation an den sekundären Aminogruppen, welche nach der zweiten Polyaminaddition eingeführt wurden. Im Falle einer ASCl -TEPA- ASCl -EDODEA-aktivierten Membran konnte so eine Farbstoffbelegungsichte von fast 50 μmol je Kubikzentimeter Membranvolumen realisiert werden. Bezogen auf die an einer nicht aktivierten Flachmembran verfügbaren Aminoendgruppendichte von 8.5 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3(\text{MV})$ konnte durch dendritische Aktivierung in der beschriebenen Weise eine Verfünffachung der erzielbaren Ligandendichte ermöglicht werden. Eine Erhöhung der Ankergruppendichte muß demnach als geeignete Maßnahme für eine Immobilisation von kleinen Liganden in Betracht gezogen werden, wenn die zur Verfügung stehende innere Membranoberfläche ökonomisch genutzt werden soll.

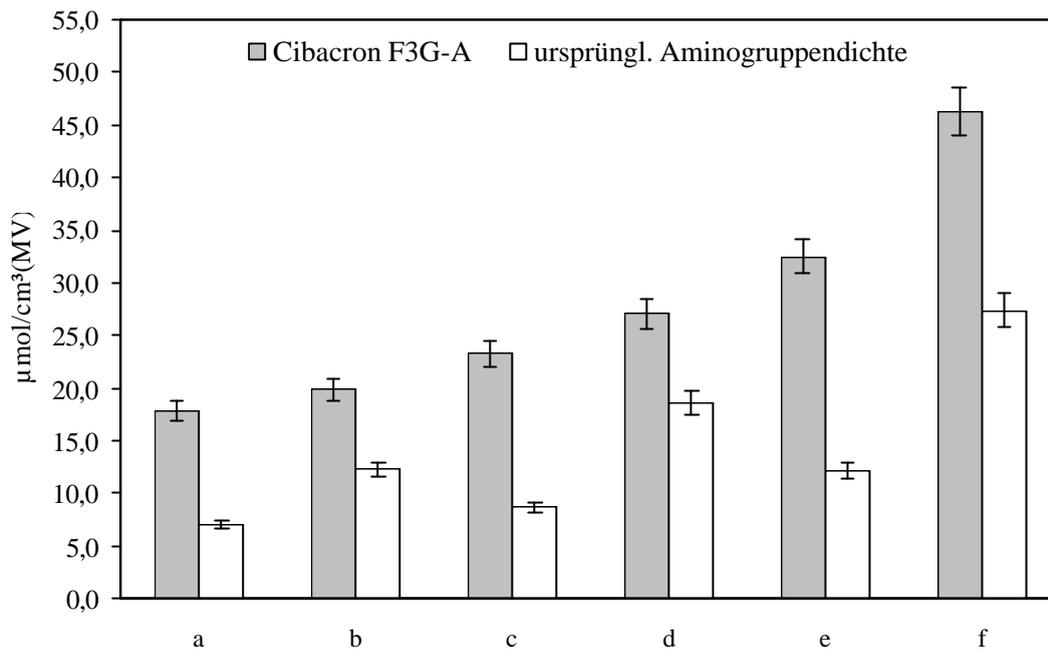


Abb. 2-48: Cibacron F3G-A-Immobilisation an dendritisch aktivierte Flachmembranen; a: PA6-EDODEA-EDODEA, b: dto. m. Trifluoracetyl-Schätzung bei 2. Polyaminaddition, c: PA6-TAEA-EDODEA, d: dto. m. Trifluoracetyl-Schätzung bei 2. Polyaminaddition, e: PA6-TEPA-EDODEA, f: dto. m. Trifluoracetyl-Schätzung bei 2. Polyaminaddition

Immobilisation verschiedener Reaktivfarbstoffe an BDDGE- und BDDGE-EDODEA-aktivierte Flachmembranen

Um einen Vergleich zwischen verschiedenen Reaktivfarbstoffen bezüglich ihrer Eignung als Affinitätsligand für eine spezifische Adsorption von Bilirubin ziehen zu können, wurden Versuche zur Immobilisation der Farbstoffe Procion Blue MX-R, Alkali Blue 6 B sowie Congo Red an BDDGE- und BDDGE-EDODEA-aktivierte Flachmembranen durchgeführt.

Das für die Anbindung von Cibacron F3G-A beschriebene Standardprotokoll konnte im Falle einer Immobilisation von Procion Blue MX-R sowie Congo Red erfolgreich adaptiert werden. Zur Kupplung von Alkali Blue 6 B an BDDGE-aktivierte Flachmembranen wurden diese mit einer einprozentigen Lösung des Farbstoffes in 1.0 N Natronlauge für 20 Stunden bei einer Temperatur von 50 °C geschüttelt.

Die Entfernung von adsorptiv gebundenem Farbstoff gelang in allen Fällen durch mehrfaches Waschen mit kochendem Wasser und zehnpromtger SDS-Lösung.

Die Bestimmung der Farbstoffbelegungsichten erfolgte schließlich durch 30-minütige Membranhydrolyse in konzentrierter Salzsäure bei einer Temperatur von 60 °C und anschließender Extinktionsmessung der erhaltenen Lösungen am Absorptionsmaximum.

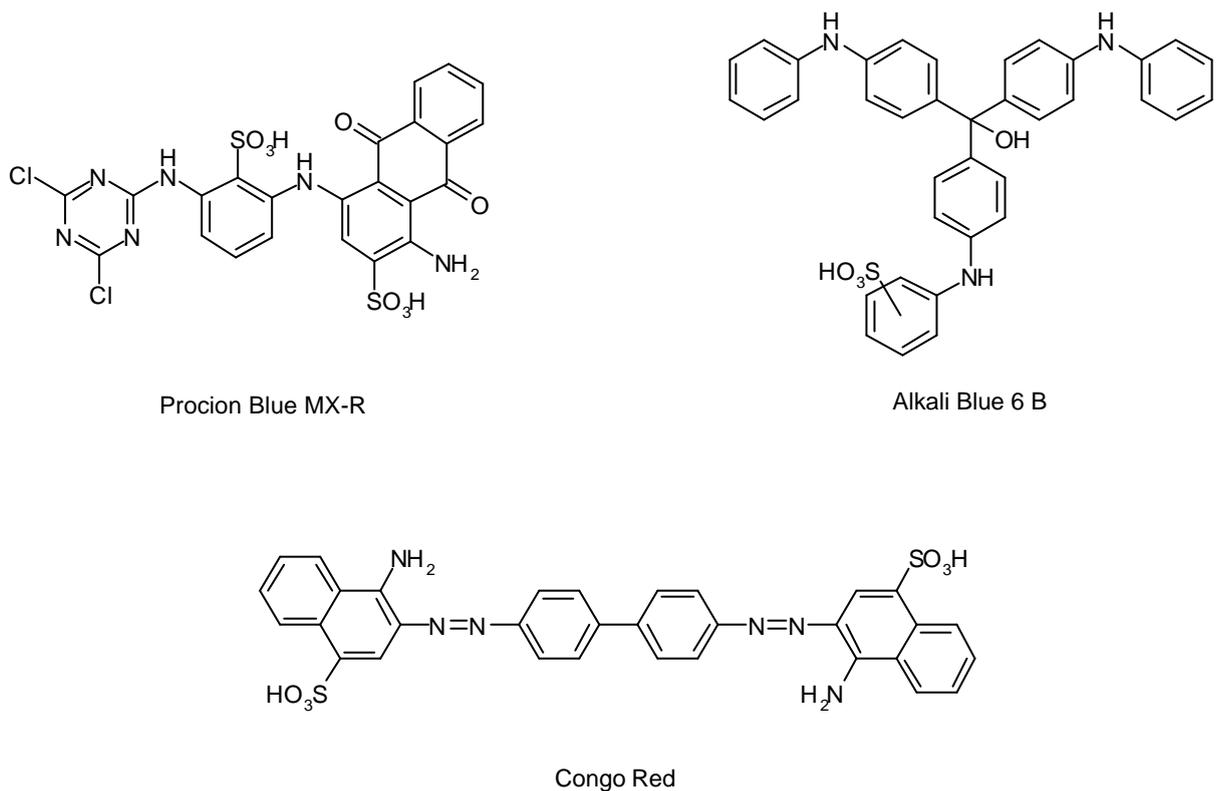


Abb. 2-49: Strukturen der verwendeten Reaktivfarbstoffe

Die Bindung zwischen BDDGE-aktivierter Membran und Farbstoff erfolgt im Fall von Procion Blue MX-R und Congo Red durch Epoxidöffnung mittels deren primärer Aminogruppen. Im Fall von Alkali Blue 6 B erfolgt die entsprechende Reaktion mittels der sekundären Aminogruppen. Eine Anbindung von Procion Blue MX-R an eine BDDGE-EDODEA-aktivierte Membran erfolgt analog der Cibacron F3G-A-Immobilisation durch Substitution des Chlorids der Chlortriazineinheit.

Die ermittelten Farbstoffbelegungsichten sind in Tab. 2-3 angegeben. Nach Farbstoffimmobilisation an BDDGE-aktivierte Flachmembranen konnten keine nennenswerten Unterschiede der realisierten Ligandendichten beobachtet werden. In allen Fällen erfolgte eine annähernd vollständige Nutzung der verfügbaren Epoxidgruppensichten für die Ligandenimmobilisation.

Im Fall einer Anbindung von Procion Blue MX-R an die BDDGE-EDODEA-aktivierte Membran wurde allerdings eine deutlich niedrigere Ligandendichte als bei der entsprechenden Cibacron F3G-A-Immobilisation beobachtet. Diese Beobachtung ist aus dem Umstand erklärbar, daß Procion Blue MX-R über zwei substituierbare Chloratome verfügt. Die gleichzeitige Kupplung eines Farbstoffmoleküls an zwei Aminoendgruppen der aktivierten Membran ist somit als wahrscheinlichste Ursache für die niedrigere Farbstoffbelegungsichte zu nennen.

| Reaktivfarbstoff | Membran | $\mu\text{mol(Farbstoff)/cm}^3(\text{MV})$ |
|-------------------------|------------------|--|
| Cibacron Blue F3G-A | PA6-BDDGE | 10.7 ± 0.5 |
| Procion Blue MX-R | PA6-BDDGE | 12.6 ± 0.6 |
| Alkali Blue 6 B | PA6-BDDGE | 9.4 ± 0.5 |
| Congo Red | PA6-BDDGE | 13.1 ± 0.7 |
| Cibacron Blue F3G-A | PA6-BDDGE-EDODEA | 31.6 ± 1.6 |
| Procion Blue MX-R | PA6-BDDGE-EDODEA | 22.9 ± 1.2 |

Tab. 2-3: Meßwerte zur Immobilisation verschiedener Reaktivfarbstoffe an BDDGE- und BDDGE-EDODEA-aktivierte Flachmembranen

2.2.4 Immobilisation von Cyclodextrinen

Eigenschaften der Cyclodextrine

Den von *Villiers*¹⁴³ 1891 isolierten und 1904 von *Schardinger*¹⁴⁴ identifizierten Cyclodextrinen kommt eine zunehmende Bedeutung in verschiedensten Disziplinen der Chemie zu.

Cyclodextrine werden aus Maltodextrinen, die durch Abbau von Stärke mit α -Amylase erhalten werden, mit Hilfe der Cyclomaltodextrin-glycanotransferase aus *Bacillus macerans* oder *Bacillus circulans* hergestellt. Hierbei überträgt das Enzym unter Spaltung einer α -1,4-Bindung Glucosylreste auf das nichtreduzierende Ende der Maltodextrine und bildet so cyclische Glycoside mit sechs bis zwölf Glucopyranoseeinheiten. Die dabei bevorzugt gebildeten Ringgrößen besitzen 6, 7 oder 8 D-Glucoseeinheiten (α -, β - oder γ -Cyclodextrine), wobei das eigentliche Hauptprodukt β -Cyclodextrin (β -CyD) ist.¹⁴⁵

Strukturell ähnelt β -CyD einem Torus mit annähernder C_7 -Symmetrie. Aus der kleineren Öffnung ragen die primären Hydroxylgruppen (an C-6 gebunden), aus der entgegengesetzten größeren Öffnung die an C-2 und C-3 gebundenen sekundären Hydroxylgruppen. Abb. 2-50 zeigt die molekulare Struktur und schematisch die dreidimensionale Anordnung der Glucoseeinheiten.

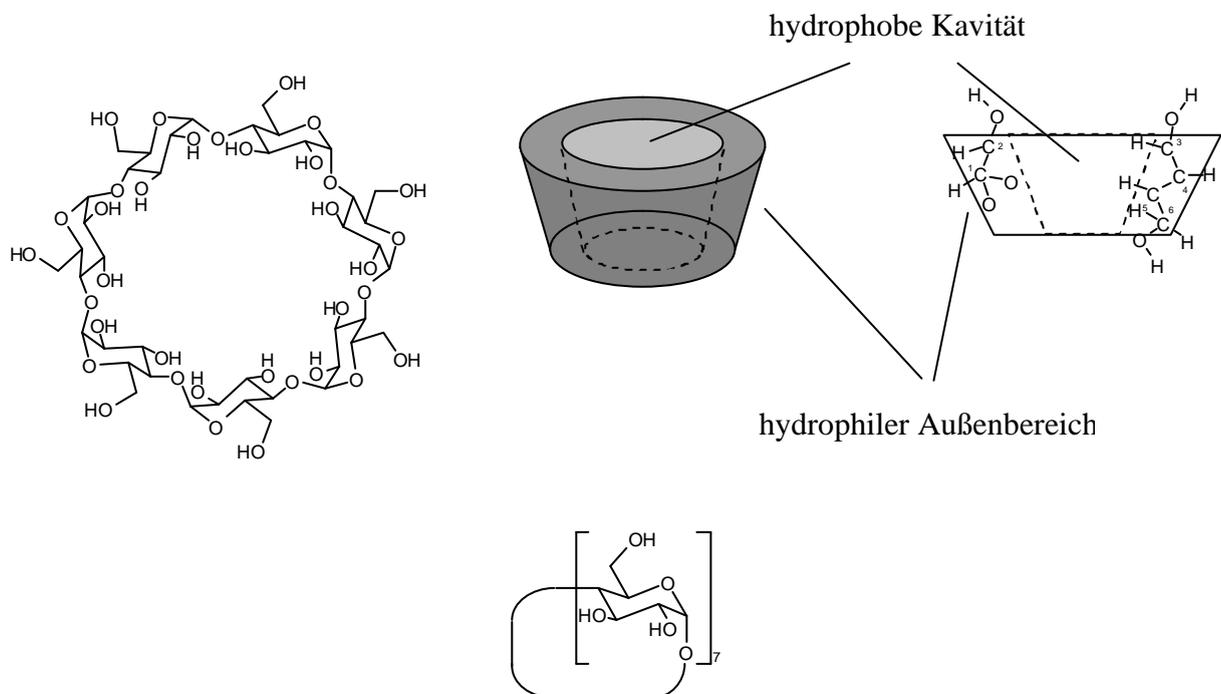


Abb. 2-50: Molekulare und dreidimensionale Struktur von β -Cyclodextrin

Die Hydroxylgruppen an C-2 bilden starke Wasserstoffbrückenbindungen mit C-3-Hydroxylgruppen der benachbarten Glucoseeinheiten, wodurch im Falle von β -CyD eine starre Struktur resultiert. Aus den Wasserstoffbrückenbindungen resultiert auch die schlechte Wasserlöslichkeit von β -CyD.

Die Torushöhe ist bei allen Cyclodextrinen mit 790 pm identisch. Der Durchmesser der Kavität hängt von der Anzahl der Glucoseeinheiten ab und steigt von 470 - 530 nm für α -CyD über 600 - 650 pm für β -CyD bis zu 750 - 830 pm für γ -CyD.¹⁴⁶

Die hydrophobe Kavität mit definierter Größe prädestiniert die Cyclodextrine für molekulare Rezeptoren zur Komplexierung geeigneter Substrate. Die hohe Stabilität der resultierenden Einschlußverbindungen, die häufig als Wirt-Gast-Komplexe bezeichnet werden, ist auf ein Zusammenwirken von van der Waals-Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen zurückzuführen. Wasserstoffbrückenbindungen und sterische Effekte sind ebenfalls von Bedeutung.^{147,148}

Die bekanntesten Gastmoleküle, die in wäßrigen Medien mit hohen Assoziationskonstanten an β -CyD binden, sind kleine aromatische Verbindungen wie u.a. *p*-Xylol, Phenole und deren Derivate sowie Benzoesäure.^{149,150} Hierbei werden die ursprünglich in den Kavitäten befindlichen Wassermoleküle durch die hydrophoben Moleküle substituiert. Die treibende Kraft ist der durch den Austausch der Wassermoleküle erreichte Enthalpiegewinn.¹⁵¹ Da im Mittel sieben Wassermoleküle durch das Gastmolekül ersetzt werden, resultiert auch eine entropische Bevorzugung der Komplexbildung.

Wie erstmals von *Cramer* und *Dietsche* im Zusammenhang mit der Trennung von racemischen Mandelsäurederivaten berichtet wurde, verfügen Cyclodextrine über Eigenschaften, die eine chirale Erkennung von Molekülen ermöglichen.¹⁵² Hieraus resultierten mit Cyclodextrinen gecoatete Trennsäulen für die Gaschromatographie und HPLC, welche heute in zahlreichen Formen kommerziell erhältlich sind und zur analytischen Bestimmung von Enantiomerenverhältnissen sowie zur präparativen Trennung von Enantiomeren genutzt werden.¹⁵³

Die Fähigkeit der Cyclodextrine zur Bildung von Wirt-Gast-Komplexen findet darüber hinaus breite Anwendung in der Lebensmittel- und der pharmazeutischen Industrie.^{154,155}

Eine mögliche Anwendung von β -CyD als Sorbens zur selektiven Entfernung von Substanzen aus wäßrigen Lösungen ist wegen der schlechten Wasserlöslichkeit nur begrenzt möglich. Für solche Anwendungen haben sich mittlerweile Cyclodextrin-immobilisierte Festphasen etabliert, welche beispielsweise von *Zhao* und *He* beschrieben wurden.¹⁵⁶ Eine Immobilisation von

β -CyD erfolgte dort durch partielle Deprotonierung der Hydroxylgruppen mit Natriumhydrid sowie anschließender Kupplung an chlormethylierte Polystyrolbeads.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sind die von denselben Autoren berichteten Adsorber zur selektiven Entfernung proteingebundener Toxine - insbesondere Bilirubin - aus Blutplasma von Interesse. Die nach verschiedenen Methoden erhaltenen β -CyD-immobilisierten Polystyrolbeads sollen sich nach dortigen Angaben zur Herstellung von Gelen mit sehr hohen Adsorptionskapazitäten für unkonjugiertes Bilirubin eignen.^{157,158}

Eine hohe Affinität von β -CyD zu den in Abb. 2-25 dargestellten, albumingebundenen Toxinen und Pharmawirkstoffen ist in zahlreichen Literaturstellen beschrieben^{159,160} und sollte zu einer potentiellen Eignung Cyclodextrin-immobilisierter Träger als „Breitbandadsorber“ für solche Verbindungen führen.

Die Herstellung eines solchen „Breitbandadsorbers“ für proteingebundene Toxine soll an dieser Stelle durch kovalente Anbindung von β -CyD bzw. β -CyD-Derivaten an aktivierte PA6-Membranen erfolgen.

Immobilisation von Cyclodextrin an aktivierte PA6-Membranen

Eine Kupplung von β -CyD an diglycidyletheraktivierte Membranen sollte durch Adaption einer von *Zhao* und *He* beschriebenen Methode zur Cyclodextrinimmobilisation an GMA-gepfropfte Polystyrolbeads vollzogen werden.¹⁶¹

Hierzu wurde wasserfreies β -CyD mit 1.2 Äquivalenten Natriumhydrid in abs. DMF umgesetzt. Zu der gebildeten Lösung des Alkoholates wurde dann die jeweilige diglycidyletheraktivierte Membran gegeben und 48 Stunden bei 80 °C geschüttelt. Adsorptiv gebundenes β -CyD wurde durch Waschen mit DMF und kochendem Wasser entfernt.

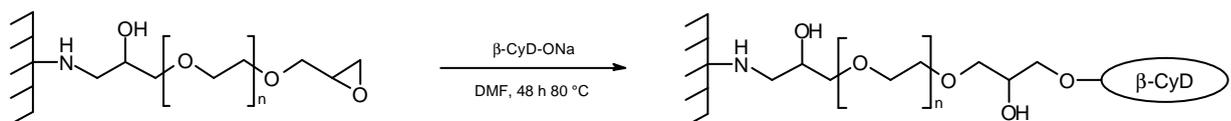


Abb. 2-51: Immobilisation von β -CyD an diglycidyletheraktivierte Membranen

Die Bestimmung der β -CyD-Belegungsdichte sollte analog einer von *Beeskow* beschriebenen Methode zur Quantifizierung von Dextran- und HEC-Belegungsdichten an gecoateten Polyamidmembranen erfolgen.⁸⁸ Die zu untersuchende Membranprobe wurde hierzu in 6.0 N Salzsäure bei einer Temperatur von 90 °C hydrolysiert. Hierdurch sollten die immobilisierten Cyclodextrinmoleküle vollständig in monomere Glucose zerlegt werden. Der Glucosegehalt in den nach Neutralisation mit Natronlauge erhaltenen Lösungen wurde schließlich durch Anwendung des BCA-Assays ermittelt. Eine Kalibriergerade konnte durch analoge Vorgehensweise an Cyclodextrinlösungen in 6.0 N Salzsäure, denen entsprechende Mengen nicht modifizierter Membran zugegeben wurden, erhalten werden.

Die auf diese Weise ermittelten Meßdaten mußten jedoch bezüglich absoluter Genauigkeit und Reproduzierbarkeit als unbefriedigend bezeichnet werden, da zum Teil Werte bestimmt wurden, die theoretisch nicht möglich waren. Diese bereits bei der Bestimmung der membran gebundenen Proteinmenge mittels Totalhydrolyse und anschließendem Lowry-Assay gemachte Erfahrung wurde somit an dieser Stelle bestätigt (vgl. Kap. 2.2.1).

Eine alternative Methode zur Quantifizierung der Dichte an gebundenem β -CyD sollte über die Abnahme der Ankergruppendichte erfolgen. Hierzu wurden die Epoxidgruppendichten vor und nach der β -CyD-Immobilisation mittels der „Ninhydrin-Methode“ bestimmt. Aus der gemessenen Differenz ergab sich dann die Stoffmenge an gebundenem β -CyD.

An BDDGE- und TriEGDGE-aktivierten Flachmembranen konnten so Umsätze von etwa 90 % ermittelt werden. Diese entsprachen Ligandendichten von 7.9 $\mu\text{mol}(\beta\text{-CyD})/\text{cm}^3(\text{MV})$ im Fall einer TriEGDGE-aktivierten Membran sowie 11.8 $\mu\text{mol}(\beta\text{-CyD})/\text{cm}^3(\text{MV})$ im Fall einer BDDGE-aktivierten Membran.

Diese Ergebnisse müssen allerdings kritisch interpretiert werden, da eine Öffnung der membran gebundenen Epoxidgruppen unter den angewendeten Immobilisationsbedingungen auch durch mögliche Nebenreaktionen erfolgen konnte.

Aus diesem Grund sollten β -CyD-Derivate hergestellt werden, die eine kontrollierte und definierte Anbindung an aktivierte PA6-Membranen und damit eine sichere Anwendbarkeit einer indirekten Bestimmung der Ligandendichte erlaubten.

In Arbeiten von *König et al.*¹⁵⁹ sowie *Zhang et al.*¹⁶² wurden in diesem Zusammenhang monosubstituierte Cyclodextrinderivate hergestellt und an aminierte Kieselgele immobilisiert. In der erstgenannten Arbeit wurden hierzu 6^A-O-Epoxyoctyl- β -cyclodextrinderivate, in der zweiten

Arbeit 6^A-Desoxy-6^A-azido-β-cyclodextrinderivate verwendet. Letztere wurden innerhalb einer Staudinger-Reaktion an eine aminopropylierte Kieselgeloberfläche gebunden.

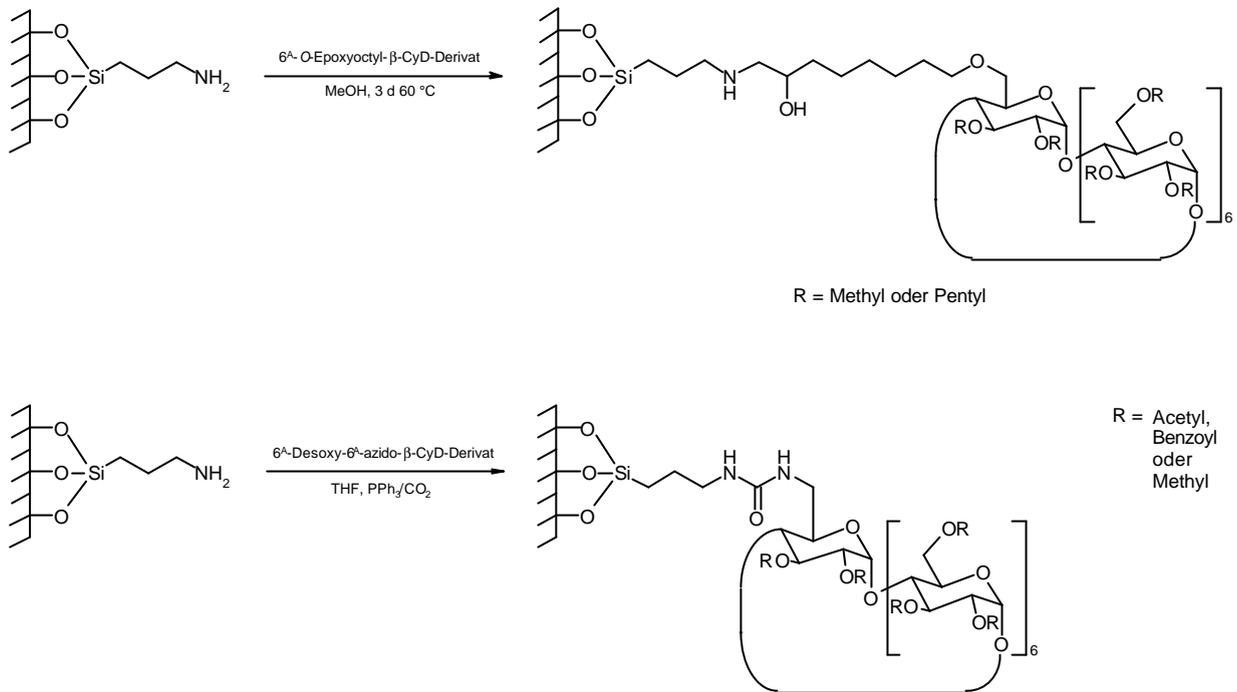


Abb. 2-52: Kupplung von monosubstituierten β-CyD-Derivaten an aminopropylierte Kieselgeloberflächen nach *König et al.*¹⁵⁹ bzw. *Zhang et al.*¹⁵⁸

Die aus den β-CyD-immobilisierten Kieselgelen hergestellten, chiralen stationären Phasen für die HPLC konnten zur Trennung zahlreicher Racemate genutzt werden. Als Hauptvorteil der definierten Kupplungschemie werden von beiden Autoren geringe Abweichungen der Produkteigenschaften einzelner Herstellungsladungen genannt.^{159,162}

Die Synthese von monosubstituierten β-Cyclodextrinderivaten gestaltet sich bezüglich der Selektivität als schwierig, wobei die Regioselektion im Fall einer Umsetzung der primären Hydroxylgruppen in C-6-Position wegen deren höherer Reaktivität beherrschbar ist. Deutlich schwieriger ist die Monosubstitution einer einzigen primären Hydroxylgruppe zu realisieren, da in der Regel Produktgemische aus nicht, mono-, di- und höhersubstituierten Produkten entstehen, welche schwierig zu trennen sind.

Die meisten literaturbekannten Methoden zur Monosubstitution einer primären Hydroxylgruppe von β-CyD gehen von einer Überführung in den entsprechenden *p*-Toluolsulfonsäureester

aus.¹⁶³ Hierbei wird entweder *p*-Toluolsulfonsäurechlorid oder das Anhydrid als Reagenz verwendet. Die angegebenen Produktausbeuten sind allerdings selten größer als 20 %, was auf die genannten Schwierigkeiten zurückzuführen ist. Diesem Problem begegnet eine neue Darstellungsmethode von *Byun, Zhong* und *Bittmann*, welche *p*-Toluolsulfonylimidazol als Sulfonierungsreagenz nutzt.¹⁶⁴ Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen konnten dort Ausbeuten von über 50 % realisiert werden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollen monosubstituierte β -Cyclodextrine ausgehend von dieser Methode hergestellt werden.

Die Synthese von 6^A-*O*-*p*-Toluolsulfonyl- β -CyD (TosO- β -CyD) verlief gemäß der Literaturvorschrift problemlos, so daß die gewünschte Verbindung in guter Ausbeute erhalten werden konnte.

Zur Darstellung der entsprechenden aminosubstituierten Verbindung, die eine spätere Kupplung an diglycidyletheraktivierte Membranen erlauben sollte, wurde der Sulfonsäureester zunächst in das Azid überführt. Hier führte die Anwendung einer von *Hamasaki et al.*¹⁶⁵ veröffentlichten Methode zu dem gewünschten Produkt in fast 90 %iger Ausbeute.

Die Reduktion des Azids konnte auf verschiedene Weisen vollzogen werden, wobei durch Modifikation einer bei *Borger et al.*¹⁶⁶ beschriebenen Methode gute Ausbeuten bei einfacher Durchführung erzielt werden konnten. Hierbei wurde das Azid im Sinne einer Staudinger-Reaktion mit Triphenylphosphan zu dem entsprechenden Phosphanimid umgesetzt und das gewünschte 6^A-Desoxy-6^A-amino- β -CyD (NH₂- β -CyD) durch anschließende Hydrolyse unter milden Bedingungen erhalten. Wegen der erwähnten Vorteile wurde diese Methode einer Palladium/Kohle katalysierten Hydrierung mit Wasserstoff, die ebenfalls zu guten Ausbeuten führte, vorgezogen.

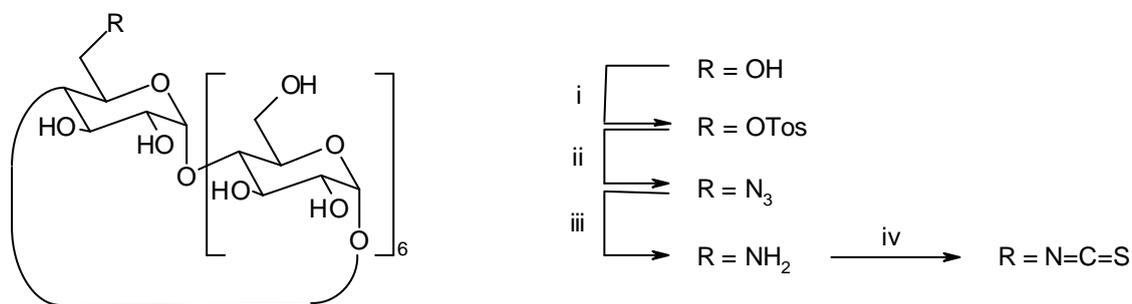


Abb. 2-53: Synthese von 6^A-substituierten Cyclodextrinen; i: 1-(*p*-Toluolsulfonyl)imidazol, H₂O, 2 h RT, ii: NaN₃, H₂O, 5 h 80 °C, iii: PPh₃, NH₃, DMF, 4 h RT, iv: CSCl₂, H₂O/Aceton, CaCO₃, 2 h RT

Die jeweiligen Reaktionsbedingungen der beschriebenen Synthesesequenzen sind in Abb. 2-53 angegeben. Dort ist auch eine Überführung des Amins in ein Isothiocyanat dargestellt. Isothiocyanatsubstituiertes β -CyD (NCS- β -CyD) sollte eine spätere Anbindung an aminofunktionelle Membranen unter milden Bedingungen erlauben und konnte durch Adaption einer von *Fernández et al.*¹⁶⁷ berichteten Synthesemethode durch Umsetzung des NH_2 - β -CyD mit Thiophosgen in befriedigender Ausbeute erhalten werden.

Immobilisation von TosO- β -CyD an aminofunktionelle Membranen

Zur Kupplung von TosO- β -CyD an aminofunktionelle Membranen wurden diglycidylether-aktivierte Flachmembranen, die in der in Kap. 2.1.2 beschriebenen Weise mit EDODEA umgesetzt wurden, mit Lösungen des Sulfonsäureesters in verschiedenen Lösungsmitteln (DMF, DMSO sowie 0.05 M Na_2CO_3 (aq)) behandelt. Die höchsten Ligandendichten konnten hierbei in einprozentigen Lösungen von TosO- β -CyD in 0.05 M Natriumcarbonatlösung erzielt werden. Als optimale Reaktionsbedingung wurde ein 72-stündiges Schütteln der jeweiligen Membran bei einer Temperatur von 80 °C ermittelt.

Adsorptiv gebundenes TosO- β -CyD wurde schließlich durch mehrfaches Waschen mit kochendem Wasser entfernt.

Die in Abb. 2-54 dargestellte Bindung zwischen Membran und Ligand erfolgt durch nucleophile Substitution des Tosylates mittels der membrangebundenen primären Aminoendgruppe.

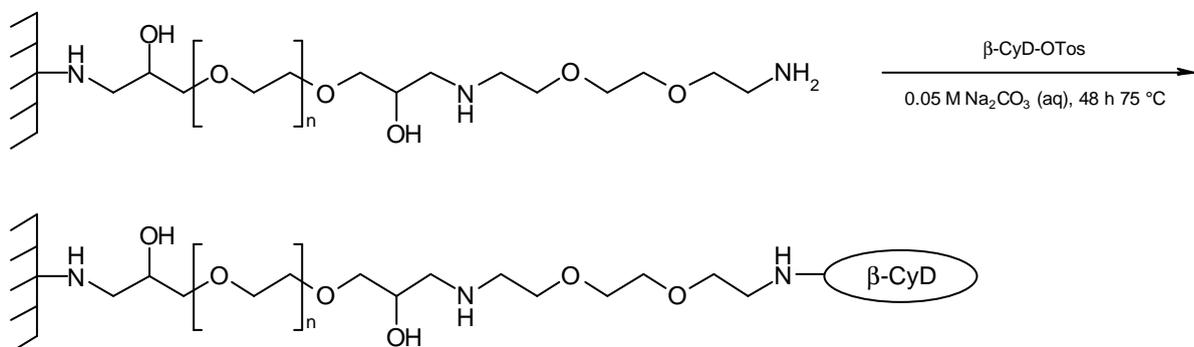


Abb. 2-54: Immobilisation von TosO- β -CyD an aminofunktionelle Membranen

Die Menge an gebundenem β -CyD wurde durch Bestimmung der Aminogruppendichten vor und nach der β -CyD-Immobilisation mittels Ninhydrin-Assay ermittelt. Durch Anwendung der Immobilisationsprozedur mit Lösungen, die statt des Sulfonsäureesters die entsprechende Menge an nicht substituiertem β -CyD enthielten, konnten die jeweiligen Blindwerte bestimmt werden. Die erhaltenen β -CyD-Belegungsdichten sind in der folgenden Tab. 2-4 angegeben.

| Membran | $\mu\text{mol}(\text{b-CyD})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(\text{b-CyD})/\text{g}$ |
|---------------------|--|--|
| PA6-EGDGE-EDODEA | 4.6 ± 0.3 | 7.1 ± 0.4 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA | 3.7 ± 0.2 | 5.7 ± 0.3 |
| PA6-EX 830-EDODEA | 3.0 ± 0.2 | 4.6 ± 0.3 |
| PA6-BDDGE-EDODEA | 4.7 ± 0.3 | 7.2 ± 0.4 |

Tab. 2-4: Ligandendichten nach Immobilisation von TosO- β -CyD an EDODEA-aktivierte Flachmembranen

Die ermittelten Ligandendichten lagen in einem Bereich zwischen 3.0 und 4.7 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$, was einem Umsatz der Aminoendgruppen von etwa 40 % entspricht. Durch weitere Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen konnten keine höheren Belegungsdichten realisiert werden.

Deutlich höhere Umsätze von über 80 % konnten nach Immobilisationen mit TosO- β -CyD-Lösungen in DMF ermittelt werden. Die jeweiligen Blindwerte lagen jedoch in der gleichen Größenordnung. Eine Reaktion der Aminoendgruppen mit dem Lösungsmittel ist als wahrscheinlicher Grund für diese Beobachtung zu nennen. Eine Aussage über die tatsächliche Ligandendichte kann also nur für den Fall einer Kupplung in 0.05 M Natriumcarbonatlösung gemacht werden.

Immobilisation von NH₂- β -CyD an diglycidyletheraktivierte Membranen

Die Anbindung von NH₂- β -CyD an diglycidyletheraktivierte Flachmembranen erfolgte durch Behandlung der jeweiligen Membranen mit einer fünfprozentigen Lösung des Aminocyclodextrins in 0.025 M Natriumcarbonatlösung. Nach Optimierung konnten die höchsten

Ligandendichten bei einer Temperatur von 80 °C und einer Reaktionszeit von acht Stunden erhalten werden.

Adsorptiv gebundenes NH₂-β-CyD wurde schließlich durch mehrfaches Waschen mit kochendem Wasser entfernt.

Die in Abb. 2-55 dargestellte Bindung zwischen Membran und Liganden erfolgte durch Ringöffnung der membrangebundenen Epoxidgruppen mittels der primären Aminogruppen des Cyclodextrinderivates.

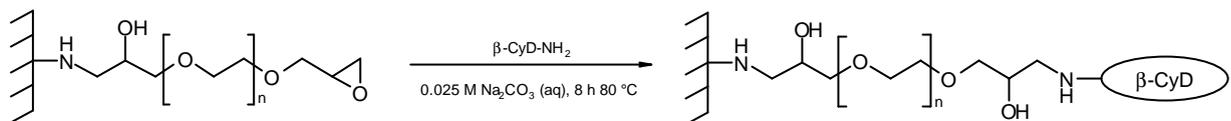


Abb. 2-55: Immobilisation von NH₂-β-CyD an diglycidyletheraktivierte Membranen

Die indirekte Bestimmung des gebundenen Cyclodextrins erfolgte, indem die Abnahme der Epoxidgruppendichte ermittelt wurde. Hierbei konnten in allen Fällen Umsätze von etwa 50 % bestimmt werden. Um Nebenreaktionen des Epoxids zu berücksichtigen, wurden Blindwerte durch Anwendung der Immobilisationsprozedur mit Lösungen, die kein NH₂-β-CyD enthielten, ermittelt. Nach Abzug dieser Werte ergaben sich effektive Umsätze zwischen 20 und 30 %, welche β-CyD-Belegungsdichten von 2 - 3 μmol je Kubikzentimeter entsprechen.

Durch weitere Optimierungsversuche zur Reaktionszeit, Temperatur und pH-Wert der NH₂-β-CyD-Lösung konnte keine Verbesserung der Ligandendichten erzielt werden.

| Membran | μmol(b-CyD)/cm ³ (MV) | μmol(b-CyD)/g |
|--------------|----------------------------------|---------------|
| PA6-EGDGE | 2.5 ± 0.1 | 3.9 ± 0.2 |
| PA6-TriEGDGE | 2.6 ± 0.1 | 4.0 ± 0.2 |
| PA6-EX 830 | 2.3 ± 0.1 | 3.5 ± 0.2 |
| PA6-BDDGE | 2.6 ± 0.1 | 4.0 ± 0.2 |

Tab. 2-5: Ligandendichten nach Immobilisation von NH₂-β-CyD an diglycidyletheraktivierte Flachmembranen

Immobilisation von NCS- β -CyD an aminofunktionelle Membranen

Die Kupplung von isothiocyanatsubstituiertem β -CyD an aminofunktionelle Membranen, welche zu einer Thioharnstoffbrücke zwischen Ligand und Membran führt, sollte sich unter milden Bedingungen durchführen lassen.

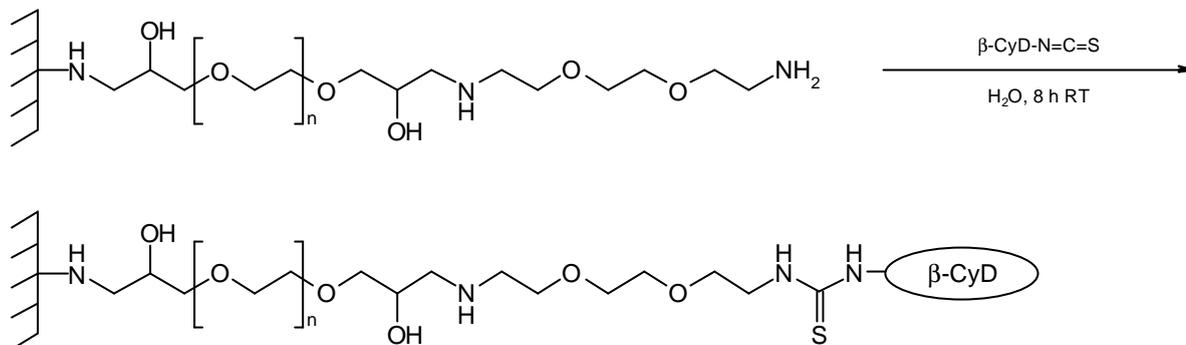


Abb. 2-56: Immobilisation von NCS- β -CyD an aminofunktionelle Membranen

Dementsprechend gelang die Immobilisation durch Behandlung von EDODEA-aktivierten Flachmembranen mit einprozentigen wässrigen NCS- β -CyD-Lösungen in hohen Ausbeuten. Als optimale Reaktionsbedingung wurde ein achtstündiges Schütteln der jeweiligen Membran in der angegebenen Lösung bei Raumtemperatur ermittelt.

Die erzielten Umsätze, die durch Messung der Abnahme der Aminogruppendichten verfolgt wurden, lagen in allen Fällen bei fast 90 %. Da Nebenreaktionen durch Blindwertmessungen ausgeschlossen werden konnten bzw. die durchzuführenden Korrekturen sehr niedrig waren, ergaben sich hieraus die entsprechenden Ligandendichten. Innerhalb der untersuchten Verfahren zur β -CyD-Immobilisation kann die Kupplung von isothiocyanatsubstituiertem β -CyD an aminofunktionelle Membranen als die am besten geeignete Methode betrachtet werden.

| Membran | $\mu\text{mol}(\beta\text{-CyD})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(\beta\text{-CyD})/\text{g}$ |
|---------------------|--|--|
| PA6-EGDGE-EDODEA | 8.2 ± 0.5 | 12.6 ± 0.8 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA | 6.8 ± 0.4 | 10.5 ± 0.6 |
| PA6-EX 830-EDODEA | 5.8 ± 0.4 | 8.9 ± 0.5 |
| PA6-BDDGE-EDODEA | 11.1 ± 0.7 | 17.1 ± 1.0 |

Tab. 2-6: Ligandendichten nach Immobilisation von NCS- β -CyD an EDODEA-aktivierte Flachmembranen

2.2.5 Zusammenfassung der ligandenimmobilisierten Membranen

Die in den Kapiteln 2.2.1 bis 2.2.4 beschriebenen Affinitätsmembranen sollen im folgenden Kap. 2.3 bezüglich der Adsorption von Bilirubin untersucht werden. Zuvor soll hier eine tabellarische Zusammenfassung der hergestellten Membranen angegeben werden:

| Membran | Ligand | Ligandendichte [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3$] |
|---|--------------------------------|--|
| PA6-DGE | BSA | 0.17 |
| PA6-EGDGE | BSA | 0.19 |
| PA6-DiEGDGE | BSA | 0.19 |
| PA6-TriEGDGE | BSA | 0.19 |
| PA6-TetraEGDGE | BSA | 0.15 |
| PA6-EX 830 | BSA | 0.15 |
| PA6-BDDGE | BSA | 0.19 |
| PA6-EGDGE | GOx ^a | 0.025 |
| PA6-TriEGDGE | GOx ^a | 0.025 |
| PA6-EX 830 | GOx ^a | 0.028 |
| PA6-BDDGE | GOx ^a | 0.033 |
| PA6-EGDGE (Aldehyd) | GOx ^a | 0.028 |
| PA6-TriEGDGE (Aldehyd) | GOx ^a | 0.020 |
| PA6-EX 830 (Aldehyd) | GOx ^a | 0.018 |
| PA6-BDDGE (Aldehyd) | GOx ^a | 0.020 |
| PA6-EGDGE | Cibacron F3G-A | 7.6 |
| PA6-TriEGDGE | Cibacron F3G-A | 8.2 |
| PA6-EX 830 | Cibacron F3G-A | 7.7 |
| PA6-BDDGE | Cibacron F3G-A | 10.7 |
| PA6-EGDGE-HDA | Cibacron F3G-A | 25.2 |
| PA6-TriEGDGE-HDA | Cibacron F3G-A | 20.9 |
| PA6-EX 830-HDA | Cibacron F3G-A | 18.5 |
| PA6-BDDGE-HDA | Cibacron F3G-A | 40.0 |
| PA6-EGDGE-EDODEA | Cibacron F3G-A | 21.8 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA | Cibacron F3G-A | 19.1 |
| PA6-EX 830-EDODEA | Cibacron F3G-A | 16.0 |
| PA6-BDDGE-EDODEA | Cibacron F3G-A | 31.6 |
| PA6-ASCI-EDODEA-ASCI-EDODEA(C(O)CF ₃) | Cibacron F3G-A | 19.9 |
| PA6-ASCI-TAEA-ASCI-EDODEA(C(O)CF ₃) | Cibacron F3G-A | 27.1 |
| PA6-ASCI-TEPA-ASCI-EDODEA(C(O)CF ₃) | Cibacron F3G-A | 46.3 |
| PA6-BDDGE | Procion Blue MX-R | 12.6 |
| PA6-BDDGE | Alkali Blue 6 B | 9.4 |
| PA6-BDDGE | Congo Red | 13.1 |
| PA6-BDDGE-EDODEA | Procion Blue MX-R | 22.9 |
| PA6-EGDGE-EDODEA | TosO- β -CyD | 4.6 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA | TosO- β -CyD | 3.7 |
| PA6-EX 830-EDODEA | TosO- β -CyD | 3.0 |
| PA6-BDDGE-EDODEA | TosO- β -CyD | 4.7 |
| PA6-EGDGE | NH ₂ - β -CyD | 2.5 |
| PA6-TriEGDGE | NH ₂ - β -CyD | 2.6 |
| PA6-EX 830 | NH ₂ - β -CyD | 2.3 |
| PA6-BDDGE | NH ₂ - β -CyD | 2.6 |
| PA6-EGDGE-EDODEA | NCS- β -CyD | 8.2 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA | NCS- β -CyD | 6.8 |
| PA6-EX 830-EDODEA | NCS- β -CyD | 5.8 |
| PA6-BDDGE-EDODEA | NCS- β -CyD | 11.1 |

Tab. 2-7: Zusammenfassung der hergestellten Affinitätsmembranen (Flachmembranen);

^a: Immobilisation bei 4 °C

2.3 Untersuchungen zur Adsorption proteingebundener Toxine

2.3.1 Bekannte Verfahren zu Entfernung proteingebundener Toxine

Die Behandlung von Patienten, die unter verschiedenen Formen des Leberversagens leiden (z.B. Hyperbilirubinämie, hepatische Enzephalopathie, fulminantes Leberversagen), gestaltet sich nach wie vor als schwierig. Eine Verbesserung der Überlebenschancen dieser Patienten ist bislang nur durch eine Organtransplantation gegeben.¹⁶⁸ Wegen der geringen Verfügbarkeit von Spenderorganen können jedoch z.B. im Fall von fulminantem Leberversagen nur zehn Prozent der Patienten einer Transplantation unterzogen werden.¹⁶⁹ Hieraus resultiert ein Bedarf nach leberunterstützenden Systemen, die eine Überbrückung der Wartezeiten auf Spenderorgane ermöglichen. Diese Systeme sollten eine effektive Detoxifikation des Blutes bezüglich der bereits in Kap. 1-4 genannten, albumingebundenen Toxine leisten.

Bisher angewandte Methoden wie ein vollständiger Blut- oder Plasmaaustausch waren nicht effektiv zur Senkung der Mortalität.^{170,171}

Eine Entfernung proteingebundener Substanzen innerhalb einer extrakorporalen Plasmatherapie scheiterte bislang an der Verfügbarkeit geeigneter Adsorber, da die in diesem Zusammenhang untersuchten Materialien wie z.B. Aktivkohle¹⁷² oder Ionentauscherharze¹⁷³ über eine ungenügende Kompatibilität und Selektivität verfügten.

Das einzige bereits im klinischen Routineeinsatz befindliche System wurde von *Mitzner* und *Stange* entwickelt und ist bei der Firma Teraklin unter der Bezeichnung MARS[®] (Molecular Adsorbent Recirculation System) kommerziell erhältlich.¹⁷⁴

Die Realisierung dieses Systems gelang durch eine Trennung des extrakorporalen Blutkreislaufes und den Adsorbereinheiten, die in einen zweiten Kreislauf integriert wurden. Da das Patientenblut zu keinem Zeitpunkt mit den Adsorbereinheiten in Kontakt steht, kann der Einsatz von unspezifischen Adsorbereinheiten (Aktivkohle sowie ein Anionentauscherharz) erfolgen.

Zur Behandlung wird das zu reinigende Blut durch das Lumen einer synthetischen Hohlfasermembran (handelsübliche Dialysemembran), welche mit HSA beschichtet ist, geleitet. In dem zweiten Kreislauf wird die Außenseite dieser Membran mit einer fünfprozentigen HSA-Lösung im Gegenstrom umspült. Die zu entfernenden Toxine gelangen entlang des Konzentrationsgradienten in diesen Albuminkreislauf, wo sie an der Membranaußenseite an das gelöste HSA gebunden und abtransportiert werden. Eine Regeneration der Albuminlösung erfolgt schließlich in den Adsorbereinheiten, so daß eine effektive Entfernung mit sehr hoher Kapazität möglich ist.¹⁷⁵

Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Entwicklung leberunterstützender Systeme, die auf der Immobilisation von Leberzellen an Festphasen basieren.¹⁷⁶ Bei der Anwendung solcher „Bioreaktoren“ sind jedoch zahlreiche Probleme zu überwinden, so daß ein möglicher Einsatz in Frage zu stellen ist oder erst in ferner Zukunft möglich sein wird.¹⁷⁷

Die mangelnde Verfügbarkeit spezifischer Adsorber für proteingebundene Toxine führte zur Motivation, entsprechende Affinitätsmembranen innerhalb der vorliegenden Arbeit zu entwickeln. Zur Überprüfung deren Adsorptionskapazitäten wurde Bilirubin als Modellverbindung ausgewählt. Da zahlreiche Erkrankungen mit einer erhöhten Plasmakonzentration des neurotoxischen Bilirubins einhergehen und sich dieses im Körpergewebe, insbesondere im Gehirn, anreichert, resultiert ein realer Bedarf nach einem spezifischen Adsorber. Aus diesem Grund soll die Einführung des folgenden Kapitels einen Überblick zum Bilirubinmetabolismus, dessen krankhafte Störungen und den Stand der Technik entsprechender Therapiemöglichkeiten geben.

2.3.2 Adsorption von Bilirubin

Allgemeine Vorbemerkungen zum Bilirubinstoffwechsel

Bilirubin wird vorwiegend aus dem Abbau des Hämoglobins von alternden Erythrozyten und anderer porphyrinhaltiger Proteine mit einer Rate von ca. 4 mg pro Kilogramm Körpergewicht und Tag gebildet. Im Falle des Hämoglobinabbaus wird das Häm im retikulo-endothelialen System in Knochenmark, Milz und Leber durch Hämoxigenase zu Biliverdin umgewandelt. Hierbei erfolgt eine Öffnung der α -Methylenbrücke zwischen den Pyrrol-Ringen I und IV des Häms unter Freisetzung von Fe^{2+} und Kohlenmonoxid. Biliverdin wird unmittelbar nach der Bildung durch Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert. Letzteres zeichnet sich im Gegensatz zu Biliverdin durch eine schlechte Wasserlöslichkeit sowie eine hohe Toxizität aus. Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit wird das unkonjugierte Bilirubin im Blutkreislauf an Albumin gebunden zur Leber transportiert. Dort wird es durch sogenannte Carrier (OATP = Organic Anion Transport Protein) über die sinusoidale Membran der Hepatocyten aufgenommen. Das hepatische Zellplasma wird vor hohen Bilirubinkonzentrationen durch Bindung an Glutathiontransferasen (z.B. Y-Protein) geschützt. Mittels mikrosomaler UDP-Glucuronyltransferase

erfolgt schließlich die Konjugation mit ein oder zwei Molekülen Glucuronsäure. Das als konjugiertes Bilirubin bezeichnete Mono- und Diglucuronid zeichnet sich durch eine gute Wasserlöslichkeit aus, so daß eine Ausscheidung in die Galle erfolgen kann. Im Darmlumen erfolgt vor der Exkretion eine weitere Umwandlung zu verschiedenen Tetra- und Dipyrrolen.^{55,178}

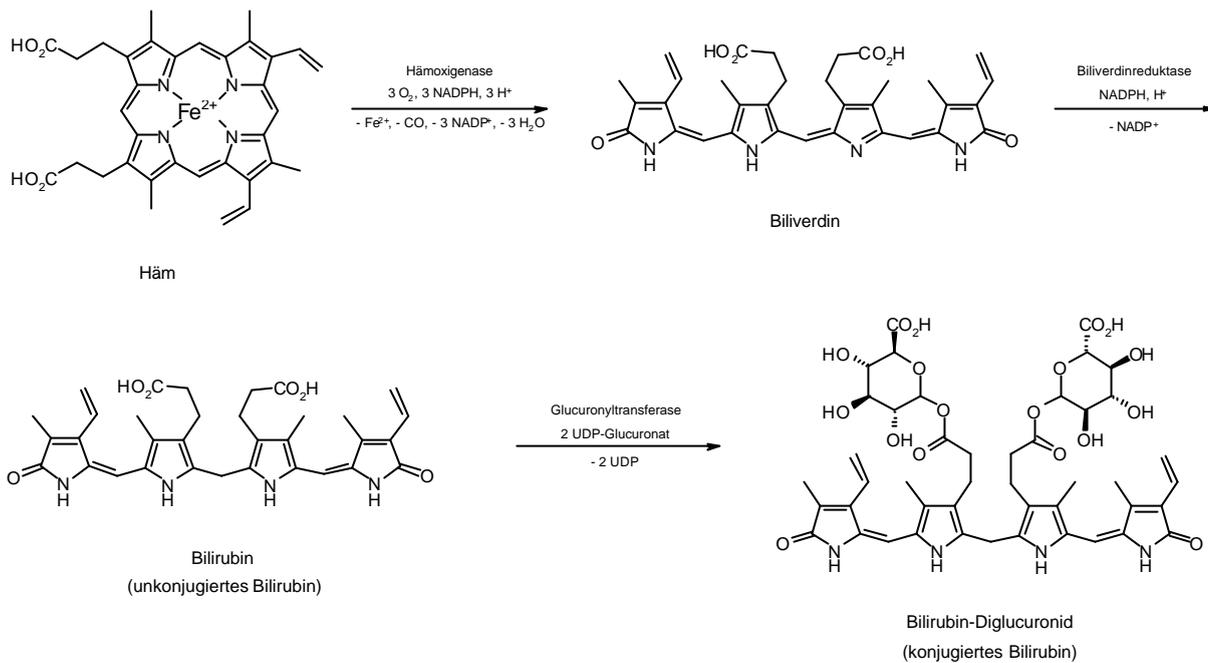


Abb. 2-57: Hämabbau zu Bilirubin und Bildung des Diglucuronids

Beim gesunden Menschen ist die Konzentration an unkonjugiertem Bilirubin im Blutplasma kleiner als 1.0 mg/dL (17 $\mu\text{mol/L}$). Zahlreiche Erkrankungen führen zu einer Erhöhung der Bilirubinkonzentration und damit zu einer Deposition der neurotoxischen Verbindung im Gewebe. Die neurotoxische Wirkung des Bilirubins beruht auf einer durch mitochondriale Schädigung induzierten Apoptose von Neuronen.⁵⁵

Neben einer Einteilung dieser Krankheiten in konjugierte und unkonjugierte Hyperbilirubinämien kann eine Einteilung nach dem Ort der Bilirubinstoffwechselstörung in prähepatische, hepatische und posthepatische Hyperbilirubinämien erfolgen. Prähepatische Hyperbilirubinämien sind meistens auf eine Überproduktion von Bilirubin infolge von Hämolyse, infektiöser Erythropoese oder Hämatomabbau zurückzuführen. Im Falle der hepatischen Hyperbilirubinämie kann eine weitere Einteilung in Aufnahme-, Konjugations- und Exkretionsstörungen

erfolgen. Posthepatische Hyperbilirubinämien betreffen das konjugierte Bilirubin und sind häufig auf Verschlüsse der Gallengänge (Obstruktion) zurückzuführen.¹⁷⁹

Die folgende Tabelle 2-8 gibt einen Überblick zu den wichtigsten Formen von Hyperbilirubinämien sowie den jeweils charakteristischen Plasmakonzentrationen an Bilirubin.

| Erkrankung: | Bemerkungen: | Bilirubinkonzentration im Plasma [mg/dL]¹⁸⁰ |
|---|--|---|
| Unkonjugierte Hyperbilirubinämien: | | |
| Hämolyse | prähepatisch (Überproduktion) | 2 - 6 |
| Medikamentenintoxikation | prähepatisch (kompetitive Bindung zu HSA), hepatisch (Aufnahmestörung) | 2 - 6 |
| Neugeborenen-Ikterus | hepatisch (ungenügende Leistung der Leber bei Neugeborenen) | bis 16 |
| Gilbert-Syndrom | hepatisch (gestörte Aufnahme und Konjugation) | 2 - 6 |
| Crigler-Najjar-Syndrom, Typ I | hepatisch (Störung der mikrosomalen Uridyl-Glucuronyltransferase) | 20 - 50 |
| Crigler-Najjar-Syndrom, Typ II | hepatisch (Störung der UDP-Glucuronyltransferase) | bis 20 |
| sonst. Lebererkrankungen | angeboren/erworben | je nach Erkrankung |
| Konjugierte Hyperbilirubinämien: | | |
| Dubin-Johnson-Syndrom | hepatisch (erniedrigte Exkretion) | bis 5 |
| Rotor-Syndrom | hepatisch (erniedrigte Exkretion) | bis 5 |
| Obstruktion | posthepatisch (Verschluß der Gallengänge) | k.A. |
| sonst. Lebererkrankungen | angeboren/erworben | bis 60 |

Tab. 2-8: Wichtige Formen von Hyperbilirubinämien und deren Ursachen

Die Vielfalt der unterschiedlichen Erkrankungen und deren Ursachen erfordert spezifische Therapieansätze für die jeweilige Form einer Hyperbilirubinämie. Während in einigen Fällen eine medikamentöse Behandlung der Krankheitsursache möglich ist (z.B. Crigler-Najjar-

Syndrom, Typ II), erfordern andere Erkrankungen eine Entfernung des Bilirubins aus dem Blut des Patienten. Letzteres ist insbesondere im Fall von Lebererkrankungen notwendig und dient in den meisten Fällen der Überbrückung des Zeitraums bis zur Transplantation.¹⁸¹

Zur Entfernung des Bilirubins bei neonataler Hyperbilirubinämie (Neugeborenen-Ikterus) hat sich die 1958 erstmals von *Cremer* berichtete Phototherapie etabliert. Hierbei erfolgt eine Bestrahlung des Säuglings mit Licht einer Wellenlänge von 460 nm, die eine photoinduzierte Oxidation des Bilirubins zu wasserlöslichen und damit ausscheidbaren Dipyrrolen bewirkt. Eine gute Zusammenfassung zur Phototherapie findet man in einem Übersichtsartikel von *Seligman*.¹⁷⁸

In anderen Fällen von Lebererkrankungen bleibt nur der Weg einer Austauschtransfusion. Der Einsatz einer extrakorporalen Plasmatherapie würde sich demnach anbieten, scheiterte jedoch auch in diesem Zusammenhang an der Verfügbarkeit geeigneter Adsorber. Die meisten der untersuchten Materialien wie z.B. Aktivkohle¹⁸² oder Anionentauscherharze¹⁸³ zeichneten sich zwar durch hohe Adsorptionskapazitäten aus, verfügten aber über eine mangelhafte Kompatibilität und Selektivität. Aus diesem Grund beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Entwicklung von biokompatiblen und spezifischen Bilirubinadsorbentien, was durch die hohe Anzahl aktueller Veröffentlichungen belegt wird.¹³⁹

Tab. 2-9 gibt einen Überblick zu verschiedenen Arbeiten, wobei in fast allen Fällen eine Ligandenimmobilisation an natürliche oder synthetische Polymerbeads erfolgt. Als Liganden finden dort HSA^{184,185,186}, Reaktivfarbstoffe¹³⁶⁻¹⁴⁰, β -CyD^{157,158}, Polylysin¹⁸⁷, verschiedene Polyamine¹⁸⁸ sowie synthetische Oligopeptide¹⁸⁹, welche die spezifische Bindungsstelle von HSA nachbilden, Verwendung. Die angegebenen Adsorptionskapazitäten sollen einen Vergleich mit den innerhalb der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte erlauben.

Hervorzuheben sind die bereits in Kap. 2.2.3 erwähnten, farbstoffimmobilisierten Poly(EGDME-HEMA)-Mikrobeads von *Denizli et al.* Diese verfügen über Ligandendichten von 15 bis 20 $\mu\text{mol/g}$ und hohe Adsorptionskapazitäten von bis zu 20 mg(BR)/g (34 $\mu\text{mol/g}$).¹³⁶⁻¹⁴⁰

Über noch höhere Adsorptionskapazitäten in einer Größenordnung von 100 mg(BR)/g (170 $\mu\text{mol/g}$) berichten *Zhao et al.* für β -CyD-immobilisierte, vernetzte Polystyrolbeads (vgl. Kap. 2.2.4).^{157,158}

Bei einem Vergleich der angegebenen Adsorptionskapazitäten ist die Art der verwendeten Bilirubinlösungen zu berücksichtigen. Um realistische Versuchsbedingungen bezüglich einer Plasmabehandlung zu gewährleisten, sollten die für Adsorptionsexperimente verwendeten

Bilirubinlösungen physiologische Konzentrationen an Albumin (3.5 - 5 g/dL) enthalten, da auf diese Weise die Bindungskonkurrenz zwischen Ligand und Albumin simuliert wird.

Bei den erwähnten Arbeiten von *Denizli et al.* sowie *Zhao et al.* sind diese Versuchsbedingungen gegeben.

| Festphase | Ankergruppe | Ligand | Ligandendichte | Adsorptionskapazität | Lit. |
|---|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|--|-------------------|
| Poly(GMA-DVB)-Beads | Epoxidgruppe | HSA | k.A. | 30 mg(BR)/g^a (51 μ mol/g) | 180 |
| Poly(EGDMA-HEMA)-Mikrobeads | Hydroxylgruppe | verschiedene Reaktivfarbstoffe | bis 20 μ mol/g | 20 mg(BR)/g^b (34 μ mol/g) | 136 bis 140 |
| Chitosanbeads, vernetzt mit Glutardialdehyd | - | - | - | 25 mg(BR)/g^c (43 μ mol/g) | 190 |
| vernetzte Polystyrolbeads, Poly-GMA gepfropft | Epoxidgruppe | β -CyD | bis 375 μ mol/g | 100 mg(BR)/g^a (171 μ mol/g) | 156 bis 157 |
| Chitosanbeads, vernetzt mit Glutardialdehyd, aktiviert mit Epichlorhydrin | Epoxidgruppe | verschiedene Polyamine | 3 - 3.5 mmol/g | > 585 mg(BR)/g^c (> 1 mmol/g) | 183 |
| Chitosanbeads, plasmaaktiviert (N ₂) | Aminogruppe, Carbodiimidkupplung | Polylysin | k.A. | ca. 1 mg(BR)/g^c (ca. 1.7 μ mol/g) | 182 |
| vernetzte Acrylamidbeads | Aminogruppe, Festphasenpeptidsynthese | synthetisches Oligopeptid | k.A. | k.A. | 184 |

Tab. 2-9: Vergleich unterschiedlicher Bilirubinadsorber aus der aktuellen Literatur; ^a: Adsorptionskapazität in albuminhaltiger Lösung gemessen, ^b: Adsorptionskapazität in albuminhaltiger Lösung bzw. in Blutplasma gemessen, ^c: Adsorptionskapazität in gepufferter Kochsalzlösung gemessen

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Affinitätsmembranen (vgl. Kap. 2.2) sollen im folgenden Kapitel bezüglich der Adsorption von Bilirubin untersucht werden. Hierzu wurden die entsprechenden Gleichgewichtsisothermen ermittelt und aus deren Verlauf Informationen über Art und Stärke der auftretenden Wechselwirkung sowie über die Adsorptionskapazität abgeleitet.

2.3.2.1 Untersuchungen zur Bilirubinadsorption an ligandenimmobilisierten PA6-Membranen

Herstellung von Bilirubinlösungen

Zur Durchführung der Adsorptionsexperimente wurden Bilirubinlösungen in phosphatpufferter Kochsalzlösung (PBS, pH = 7.2) mit einem Albumingehalt (BSA) von 4.5 % (w/w) hergestellt. Wegen der großen Lichtempfindlichkeit der Lösungen konnte deren Handhabung nur in abgedunkelten Gefäßen bzw. Räumen erfolgen, da ansonsten ein photoinduzierter Abbau des Bilirubins von bis zu 30 % je Stunde beobachtet werden konnte. Weiterhin führten Ausflockungen in den Lösungen zu Problemen.

Stabile Bilirubinlösungen konnten schließlich durch Modifikation einer Methode von *Doumas et al.* erhalten werden.¹⁹⁵ Hierzu wurde Bilirubin zunächst in DMSO gelöst, 0.4 N Natronlauge zugegeben und zuletzt mit einer 4.5 %igen BSA-Lösung in PBS („Pseudoserum“) auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Eine weitere Erhöhung der Stabilität konnte durch Zugabe von 0.1 % L-Ascorbinsäure erreicht werden, so daß die erhaltenen Lösungen bei entsprechendem Schutz gegen Lichteintritt für mehrere Tage haltbar waren.

Durch Verdünnung dieser Stammlösung mit „Pseudoserum“ wurden Bilirubinlösungen mit Konzentrationen von ca. 2, 4, 6, ... 20 mg/dL hergestellt. Um eine hohe Dosiergenauigkeit zu erzielen, wurden Bilirubin-Stammlösung und Pseudoserum über Autotitratoren dosiert.

Bestimmung der Bilirubin-Konzentration

Die Bestimmung der Bilirubinkonzentration erfolgte im einfachsten Fall durch direkte Extinktionsmessung der jeweiligen Lösungen am Absorptionsmaximum (für BR-Lösungen in „Pseudoserum“: 460 nm). Hierbei traten allerdings Probleme bei der Handhabung der zu messenden Proben bezüglich ihrer Lichtempfindlichkeit auf.

Diesen Problemen konnte durch Anwendung der von *Jendrassik und Gróf*¹⁹⁴ entwickelten und *Doumas et al.*¹⁹⁵ modifizierten Diazo-Methode begegnet werden. Dieser Assay beruht auf der Umsetzung des Bilirubins mit diazotierter Sulfanilsäure, wobei ein grünblauer Azofarbstoff gebildet wird. Dieser ist im Gegensatz zu Bilirubin lichtunempfindlich, so daß während der Extinktionsmessungen auf eine Abdunklung verzichtet werden konnte. Zur Spaltung der starken

Bindung zwischen Bilirubin und BSA wurde entsprechend der Literaturvorschrift ein Coffein-Reagenz zu den Testansätzen gegeben.

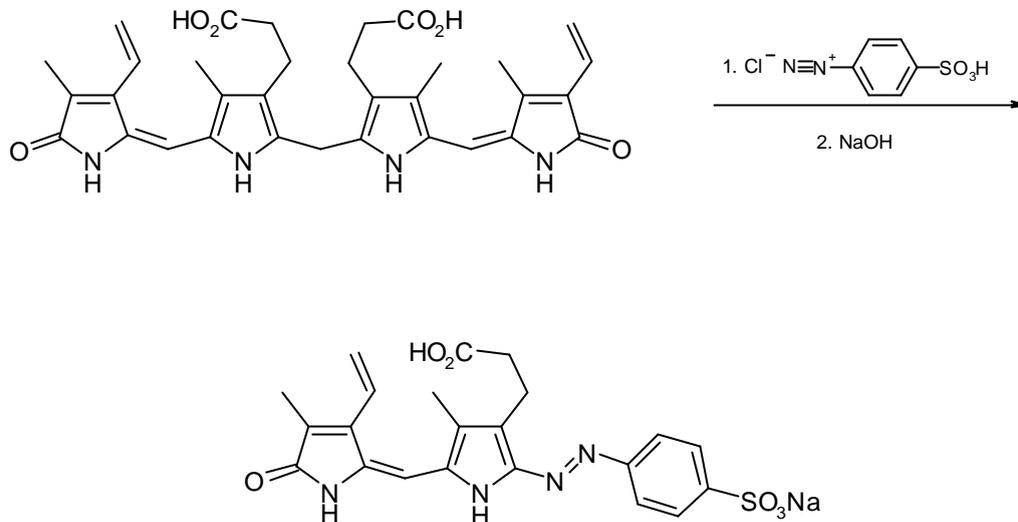


Abb. 2-58: Reaktionsschema zum Jendrassik-Gróf-Assay

Die mittels dieser Methode erhaltenen Bilirubinkonzentrationen zeichneten sich durch eine hohe Genauigkeit sowie gute Reproduzierbarkeit aus.

Innerhalb der klinischen Chemie wird der Jendrassik-Gróf-Assay zur Bestimmung des sogenannten „gesamten Bilirubins“ im Blutplasma angewendet. Konjugiertes Bilirubin ist einfacher zugänglich, da eine vorherige Spaltung der Bindung zu Albumin nicht erforderlich ist. Es wird daher auch als „direktes Bilirubin“ bezeichnet. Aus der Differenz zwischen den Meßwerten für „gesamtes“ und „direktes Bilirubin“ ergibt sich dann die Konzentration an unkonjugiertem (also albumingebundenem) Bilirubin, das somit als „indirektes Bilirubin“ bezeichnet wird.

Bestimmung der Adsorptionsisothermen

Die Bestimmung von Gleichgewichtsisothermen erfolgte durch Messung der Konzentrationsabnahmen von Bilirubinlösungen verschiedener Konzentrationen in Gegenwart der zu untersuchenden Membranprobe. Hierzu wurden jeweils 200 mg der Membranprobe in PE-Röhrchen gegeben und nach Zugabe von 2.5 mL PBS 24 Stunden geschüttelt. Dieser Vorgang diente einer

Vorbenetzung der Membranen. Anschließend wurden je 10 mL der Bilirubinlösungen unterschiedlicher Konzentrationen (ca. 2, 4, ... 20 mg/dL) zugegeben und bis zur Gleichgewichtseinstellung bei einer Temperatur von 37 °C geschüttelt. Die zur Einstellung des Gleichgewichtes benötigte Zeit wurde für jede Meßreihe durch einen Vorversuch ermittelt. Die Bestimmung der Bilirubinkonzentrationen erfolgte vor und nach dem Adsorptionsexperiment durch Anwendung des Jendrassik-Gróf-Assays. Die erhaltenen Meßdaten (Konzentrationsabnahmen und Gleichgewichtskonzentrationen) wurden schließlich bezüglich eines Isothermenverlaufs nach *Langmuir* und *Freundlich* mittels linearer Regression analysiert. Hierzu wurden entsprechend der linearisierten Formen von Gl. 1-3 und 1-4 die Kehrwerte bzw. natürlichen Logarithmen der Meßdaten ermittelt.

Linearisierte *Langmuir*-Isotherme:

$$\frac{1}{q^*} = \frac{K_D}{q_m} \cdot \frac{1}{c^*} + \frac{1}{q_m} \quad \text{Gl. 2-2}$$

Linearisierte *Freundlich*-Isotherme:

$$\ln q^* = \frac{1}{n} \cdot \ln c^* + \ln a \quad \text{Gl. 2-3}$$

Die Eignung des jeweiligen Modells zur Beschreibung der experimentellen Daten konnte anhand der Korrelationskoeffizienten beurteilt werden. Bei den nachfolgend dargestellten Versuchsergebnissen werden lediglich die aus dem jeweils besser geeigneten Modell abgeleiteten Ergebnisse angegeben. Im Falle von *Langmuir*-Isothermen werden dort Angaben zur maximalen Bindungskapazität gemacht, die den berechneten Werten für q_m entsprechen.

Unspezifische Bilirubinadsorption an unbehandelten PA6-Membranen

Zur Beurteilung der unspezifischen Bilirubinadsorption an unbehandelten Membranen wurden die entsprechenden Gleichgewichtsisothermen nach der beschriebenen Vorgehensweise ermittelt. Abb. 2-59 zeigt die erhaltenen Meßdaten und die berechneten Isothermen für drei verschiedene Bilirubinlösungen. Um den Einfluß des BSA-Gehaltes der Bilirubinlösung auf die Adsorptionskapazität zu untersuchen, wurde in einem Fall eine Lösung ohne Zugabe von BSA

verwendet. Die beiden anderen Bilirubinlösungen unterschieden sich in der zur Herstellung verwendeten BSA-Qualität.

Alle erhaltenen Meßwerte ließen sich sehr gut durch einen Isothermenverlauf nach *Langmuir* beschreiben (Abb. 2-59). Die mit Abstand größte Bindungskapazität ($q_m = 5.5 \text{ mg/cm}^3(\text{MV})$ bzw. $9.4 \text{ } \mu\text{mol/cm}^3$) konnte für Bilirubinlösungen ohne BSA ermittelt werden. Im Fall der Verwendung einer BSA-Qualität mit natürlichem Fettsäureprofil (ICN Nr. 103 703) wurde eine deutlich niedrigere Adsorptionskapazität beobachtet. Aus der berechneten Isotherme resultierte eine maximale Bindungskapazität q_m von $1.4 \text{ mg/cm}^3(\text{MV})$ bzw. $2.4 \text{ } \mu\text{mol/cm}^3$. Für die Bilirubinlösung, die mit einer reinen BSA-Qualität hergestellt wurde, ergab sich schließlich die mit Abstand geringste unspezifische Bindungskapazität bezüglich der hier untersuchten Lösungen ($q_m = 0.43 \text{ mg/cm}^3(\text{MV})$ bzw. $0.7 \text{ } \mu\text{mol/cm}^3$).

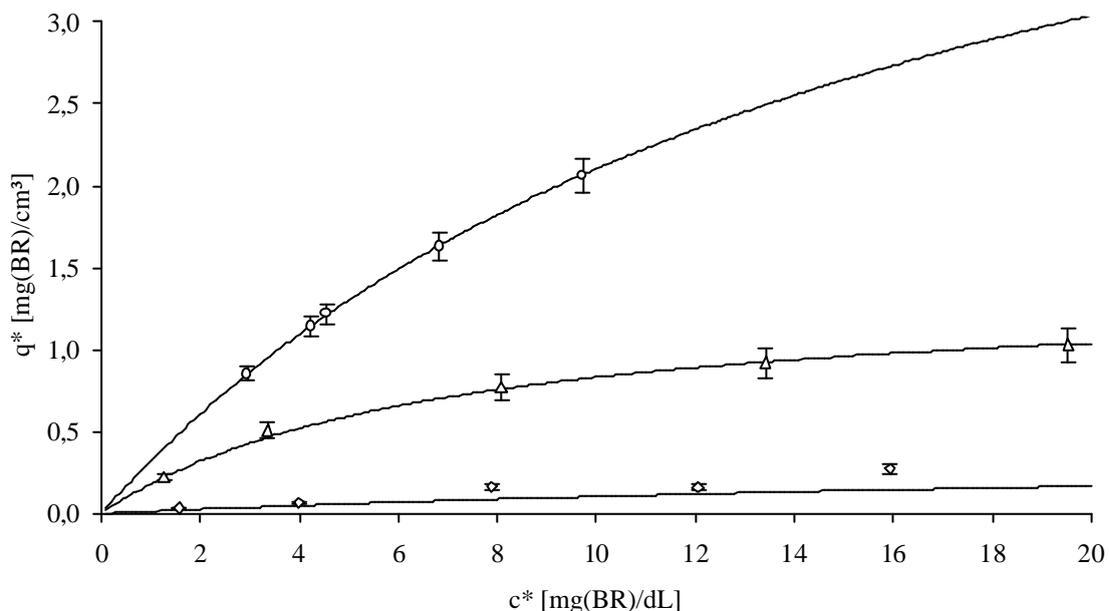


Abb. 2-59: *Langmuir*-Isothermen zur Bilirubinadsorption an einer unmodifizierten PA6-Flachmembran

○: ohne BSA

△: BSA mit natürlichem Fettsäureprofil (ICN Nr. 103 703)

◇: BSA, 98-99 %ig (ICN Nr. 105 033)

Es konnte demnach eine ausgeprägte Abhängigkeit der ermittelten Bindungskapazitäten von dem BSA-Gehalt der verwendeten Bilirubinlösungen beobachtet werden. Die starke Bindung zwischen Bilirubin und Albumin in den BSA-haltigen Lösungen (für die primäre Bindungsstelle

von HSA in der Subdomäne IIA beträgt die Assoziationskonstante $10^7 - 10^8 \text{ L/mol}$ ^{191,192} führt zu deutlich niedrigeren Adsorptionskapazitäten, da das Adsorptionsgleichgewicht in Konkurrenz zu dem entsprechenden Komplexbildungsgleichgewicht in der Lösung steht. Dieser Effekt konnte insbesondere dann beobachtet werden, wenn die Bilirubinlösung mit einer reinen BSA-Qualität hergestellt wurde, da hier alle Bindungsstellen verfügbar sind. Im Fall der verwendeten BSA-Qualität mit natürlichem Fettsäureprofil findet hingegen eine Bindungskonkurrenz zu kompetitiv bindenden Liganden (z.B. Fettsäuren) in der Lösung statt, so daß das Adsorptionsgleichgewicht begünstigt wird.

Bei allen nachfolgend dargestellten Meßergebnissen erfolgte ein Einsatz der letztgenannten BSA-Qualität, da hierdurch mit höchster Wahrscheinlichkeit realistische Informationen über das Adsorptionsverhalten von Bilirubin bezüglich einer potentiellen Behandlung von Blutplasma erhältlich sind. Wegen des großen Einflusses der verwendeten BSA-Qualität wurden alle Adsorptionsexperimente mit einer einzigen HerstellungschARGE durchgeführt.

Die auftretenden Interaktionen zwischen der unbehandelten Membran und Bilirubin können durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe Wechselwirkungen erklärt werden.

Bilirubinadsorption an BSA-immobilisierten Membranen

Die in Kap. 2.2.1 beschriebenen, BSA-immobilisierten Flachmembranen wurden nach dem oben angegebenen Verfahren bezüglich der Adsorption von Bilirubin untersucht. Die erhaltenen Meßwerte konnten auch hier sehr gut durch *Langmuir*-Isothermen beschrieben werden, während die Regressionsanalyse in Form einer linearisierten *Freundlich*-Isotherme zu schlechten Korrelationskoeffizienten führte.

Eine Abhängigkeit zwischen der Spacerlänge des zur Membranaktivierung verwendeten Diglycidylethers und ermittelter Bindungskapazität konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr wurden in allen Fällen ähnlich große Adsorptionskapazitäten ermittelt. Aus diesem Grund sind in Abb. 2-60 nur zwei Isothermen als Beispiele sowie - zum Vergleich - die für eine unmodifizierte Membran erhaltene Isotherme dargestellt. Die aus den Meßwerten berechneten, maximalen Bindungskapazitäten q_m und scheinbaren Dissoziationskonstanten K_d sind in Tab. 2-10 am Ende dieses Kapitels für alle untersuchten Membranen angegeben.

Die maximalen Adsorptionskapazitäten lagen für alle untersuchten BSA-immobilisierten Membranen in einem Bereich zwischen 0.8 und 0.9 mg/cm³(MV) bzw. 1.4 und 1.5 µmol/cm³. Im Vergleich zu einer unmodifizierten Membran konnte demnach eine Verschlechterung der Bindungskapazität beobachtet werden, die wahrscheinlich auf eine erschwerte Zugänglichkeit der Membranoberfläche für Bilirubinmoleküle zurückzuführen ist.

Die theoretisch zu erwartende, maximale Adsorptionskapazität, die durch Immobilisation von BSA als spezifischer Affinitätsligand zu erwarten war, ergibt sich aus der Stoffmenge an gebundenem BSA (0.15 - 0.19 µmol/cm³(MV), vgl. Tab. 2-7). Unter der Annahme, daß jedes membrangebundene BSA-Molekül ein Bilirubinmolekül spezifisch bindet, folgt eine maximale Kapazität von etwa 0.1 mg(BR)/cm³(MV). Da jedoch bereits für die unspezifische Bilirubinadsorption an einer unmodifizierten Membran eine um mehr als Faktor zehn höhere Kapazität ermittelt wurde, erlangt eine auf Wechselwirkungen mit membrangebundenem BSA zurückzuführende Adsorption kein Gewicht, und der beobachtete Effekt einer schlechteren Adsorptionskapazität, bedingt durch eine Behinderung der Zugänglichkeit der Membranoberfläche, dominiert.

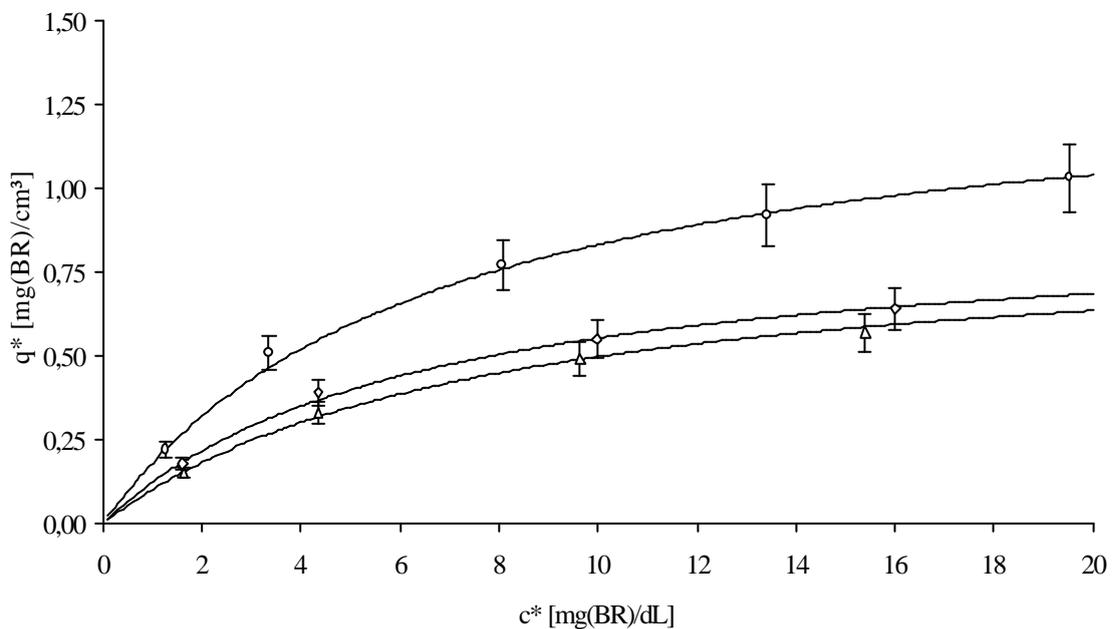


Abb. 2-60: Langmuir-Isothermen zur Bilirubinadsorption an BSA-immobilisierten PA6-Flachmembranen

○: unmodifizierte Membran

△: PA6-TriEGDGE-BSA

◇: PA6-EX 830-BSA

Der Einsatz von HSA oder BSA als spezifischer Affinitätsligand zur Bindung von Bilirubin und anderer hydrophober Toxine stellte sich demnach als ungeeignet zur Realisierung akzeptabler Bindungskapazitäten heraus, da die an den hier verwendeten Mikrofiltrationsmembranen erzielbaren Ligandendichten - bedingt durch die niedrige verfügbare Oberfläche - viel zu klein waren.

Als einziger Vorteil einer kovalenten Immobilisation von HSA oder BSA an PA6-Mikrofiltrationsmembranen kann demzufolge nur die Verbesserung der Oberflächeneigenschaften bezüglich unspezifischer Proteinadsorption und Biokompatibilität genannt werden.

Bilirubinadsorption an farbstoffimmobilisierten Membranen

Die an farbstoffimmobilisierten Membranen durchgeführten Adsorptionsmessungen führten zu Meßwerten, die sich ebenfalls gut durch entsprechende *Langmuir*-Isothermen beschreiben lassen.

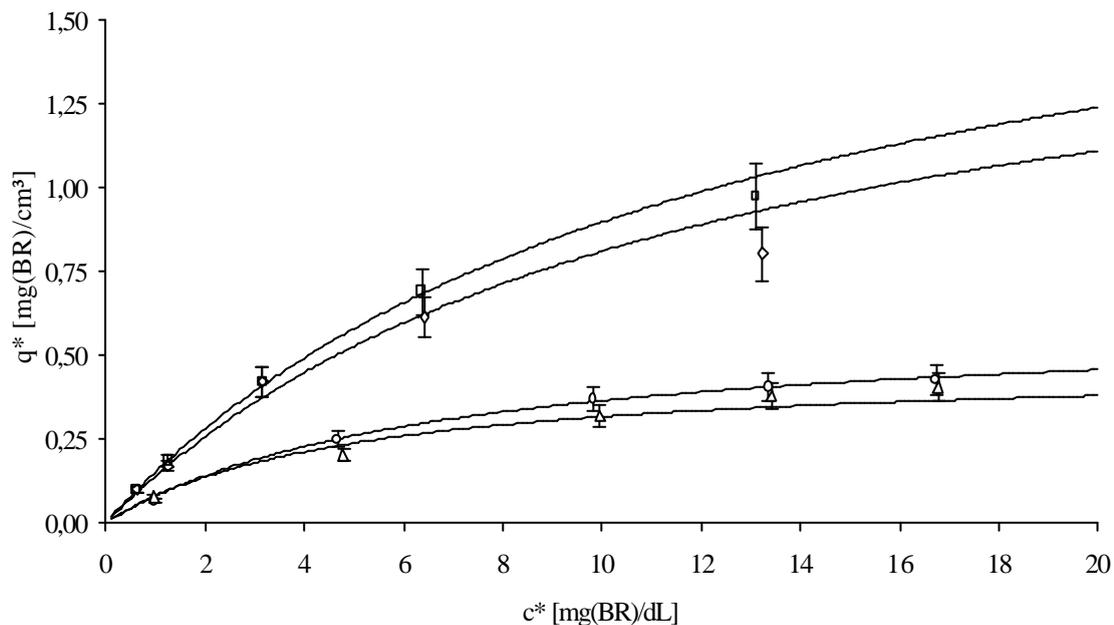


Abb. 2-61: *Langmuir*-Isothermen zur Bilirubinadsorption an Cibacron F3G-A-immobilisierten PA6-Flachmembranen

○: PA6-TriEGDGE-CB F3G-A

△: PA6-EX 830-CB F3G-A

◇: PA6-TriEGDGE-EDODEA-CB F3G-A

□: PA6-EX 830-EDODEA-CB F3G-A

In den Abb. 2-61 und 2-62 sind die ermittelten Meßdaten und berechneten *Langmuir*-Isothermen für beispielhaft ausgewählte Cibacron F3G-A-immobilisierte Flachmembranen angegeben. Weitere Daten sind in Tab. 2-10 aufgeführt.

Für Flachmembranen, die durch Immobilisation von Cibacron F3G-A an diglycidylether-aktivierte Membranen erhalten wurden (vgl. Kap. 2.2.3), konnten maximale Bindungskapazitäten von 0.5 bis 0.6 mg(BR)/cm³(MV) bzw. 0.8 bis 1.0 µmol/cm³ aus den Isothermen ermittelt werden. Diese Werte lagen demnach ebenfalls unterhalb der an einer unbehandelten Membran gemessenen Kapazität. Bei Ligandendichten von 7.6 bis 10.7 µmol/cm³ konnte also nur etwa zehn Prozent der theoretisch denkbaren Bindungskapazität für eine Bilirubinadsorption genutzt werden, wobei eine ausschließliche Wechselwirkung zwischen Bilirubin und dem membran-gebundenen Farbstoff angenommen und eine mögliche unspezifische Adsorption nicht berücksichtigt wird. Eine Abhängigkeit der ermittelten Adsorptionskapazitäten von der Länge des zur Membranaktivierung verwendeten Spacers konnte nicht festgestellt werden.

Im Fall der Cibacron F3G-A-immobilisierten Flachmembranen, die nach einer Aktivierung mit verschiedenen Diglycidylethern und EDODEA gemäß Abb. 2-45 erhalten wurden, konnten mit Bindungskapazitäten von 1.8 - 3.1 mg/cm³ bzw. 3.0 - 5.3 µmol/cm³ höhere Werte ermittelt werden. Die höchste Kapazität wurde für eine BDDGE-EDODEA-aktivierte Membran bestimmt. Da die Adsorptionskapazitäten signifikant größer als bei einer unbehandelten Membran sind, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Wechselwirkung zwischen membrangebundenem Farbstoff und dem Zielmolekül vor. Der genutzte Anteil an der theoretisch möglichen Adsorptionskapazität ergibt sich aus den jeweiligen Ligandendichten von 16.0 - 31.6 µmol/cm³ zu maximal 21 % für eine EX 830-EDODEA-aktivierte Membran. Für die anderen untersuchten Membranen beträgt dieser Anteil 14 - 17 %. Eine Korrelation zwischen der Länge des zur Membranaktivierung verwendeten Spacers und den ermittelten Kapazitäten konnte auch hier nicht festgestellt werden.

Für dendritisch aktivierte, Cibacron F3G-A-immobilisierte Flachmembranen konnten schließlich die höchsten Bindungskapazitäten unter den untersuchten, farbstoffimmobilisierten Membranen ermittelt werden. Die aus den Isothermen berechneten Kapazitäten korrelierten mit der Ligandendichte. Im Fall der ASCFTEPA-ASCFEDODEA(C(O)CF₃)-aktivierten Membran wurden 8.4 mg/cm³ bzw. 14.4 µmol/cm³ Bilirubin bei einer Ligandendichte von 46.3 µmol/cm³ gebunden. Die relativen Adsorptionskapazitäten, also der genutzte Anteil an der theoretisch möglichen Bindungskapazität, lagen zwischen 22 und 32 %.

Eine Untersuchung der Bindungskapazitäten von Membranen, die durch Immobilisation von Procion Blue MX-R, Alkali Blue 6 B und Congo Red an BDDGE- und BDDGE-EDODEA-aktivierte Flachmembranen erhalten wurden, führte zu ähnlichen Ergebnissen wie für die jeweiligen Cibacron F3G-A-immobilisierten Systeme (vgl. Tab. 2-10).

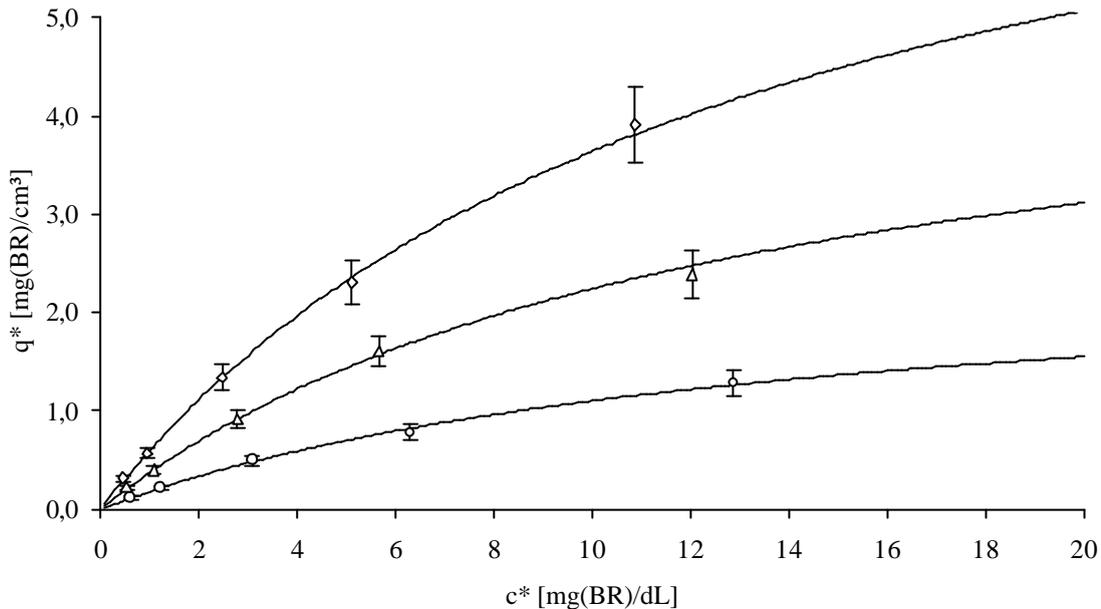


Abb. 2-62: *Langmuir*-Isothermen zur Bilirubinadsorption an Cibacron F3G-A-immobilisierten PA6-Flachmembranen

○: PA6-ASCf-EDODEA-ASCf-EDODEA(C(O)CF₃)-CB F3G-A

△: PA6-ASCf-TAEA-ASCf-EDODEA(C(O)CF₃)-CB F3G-A

◇: PA6-ASCf-TEPA-ASCf-EDODEA(C(O)CF₃)-CB F3G-A

Aus den erhaltenen Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß eine starke Wechselwirkung zwischen den immobilisierten Reaktivfarbstoffen und Bilirubin stattfindet. Da sich alle ermittelten Meßdaten sehr gut durch einen Isothermenverlauf nach *Langmuir* beschreiben lassen, kann von einer Monoschichtadsorption an Oberflächen mit energetisch gleichwertigen Adsorptionsplätzen, also einer spezifischen Wechselwirkung zwischen Affinitätsligand und Zielmolekül, ausgegangen werden. Die aus den erhaltenen Isothermen berechneten, scheinbaren Bindungskonstanten K_a ($K_a = 1/K_d$) liegen für alle untersuchten, farbstoffimmobilisierten Membranen in einer Größenordnung von 10^4 L/mol. Die ermittelte Bindungsstärke eines Komplexes aus membrangebundenem Reaktivfarbstoff und Bilirubin ist demnach um drei bis

vier Zehnerpotenzen niedriger als bei einem Bilirubin-HSA- bzw. BSA-Komplex in Lösung. Die beobachteten Adsorptionskapazitäten resultieren demnach aus der Tatsache, daß die Komplexbildung zwischen Bilirubin und Albumin in Lösung durch eine Konkurrenz mit kompetitiv bindenden Liganden gekennzeichnet ist. Die experimentell zugänglichen Daten sind demnach sehr stark abhängig von der Art der verwendeten Bilirubinlösung. Realistische Meßergebnisse zur Adsorptionskapazität der zu untersuchenden Membranen können demnach nur durch entsprechende Messungen in Blutplasma, das mit Bilirubin angereichert wird, erhalten werden. Da in der vorliegenden Arbeit hierauf verzichtet wurde, können die dargestellten Ergebnisse nur als Größenordnungen und Tendenzen interpretiert werden. Als weitere Fehlerquelle der hier durchgeführten Adsorptionsexperimente ist ein DMSO-Gehalt der verwendeten Bilirubinlösungen von zwei Volumenprozent zu nennen.

Bei einem Vergleich der ermittelten, relativen Bindungskapazitäten mit den bei *Denizli et al.*¹³⁶⁻¹⁴⁰ angegebenen Werten für farbstoffimmobilisierte Membranen fällt auf, daß dort Werte von über 100 % angegeben werden (vgl. Tab. 2-9), während bei den hier untersuchten Membranen maximal 32 % erreicht werden konnten. Als Grund für die hohen Literaturwerte ist sicherlich ein Anteil an unspezifischer Adsorption mit dem Trägermaterial zu nennen. Ein weiterer naheliegender Grund für die hohen Literaturwerte ist ein Matrixeinfluß auf die Wechselwirkung zwischen Ligand und Zielmolekül. Die dort verwendeten Poly(EGDMA-HEMA)-Mikrobeads scheinen sich sehr günstig auf den Assoziationsprozeß auszuwirken. Hierdurch können auch die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede der relativen Bindungskapazitäten in Abhängigkeit von der Membranaktivierung erklärt werden. Im Falle der dendritisch aktivierten Membranen ist eine zusätzliche Stabilisierung des Farbstoff-Bilirubin-Komplexes durch Amid- und sekundäre Aminogruppen, die bei der Aktivierung auf der Membranoberfläche erzeugt wurden, denkbar.

*Bilirubinadsorption an **b**-CyD-immobilisierten Membranen*

Auch die Untersuchung zur Bilirubinadsorption an TosO- β -CyD immobilisierten Membranen (vgl. Kap. 2.2.4) führte zu Meßwerten, die sehr gut durch entsprechende *Langmuir*-Isothermen dargestellt werden konnten (Abb. 2-63). Aus den Isothermen berechneten sich maximale Bindungskapazitäten von 1.7 - 2.6 mg/cm³(MV) bzw. 3.0 - 4.5 μ mol/cm³. Diese Werte korrelierten mit der jeweiligen Ligandendichte der untersuchten Membranen. Ein Einfluß des

zur Membranaktivierung verwendeten Spacers auf die Kapazität konnte nicht beobachtet werden. Für die relativen Adsorptionskapazitäten ergaben sich in allen Fällen Werte von über 95 %, was einer nahezu vollständigen Nutzung der verfügbaren Ligandendichte zur Bindung von Bilirubin entspricht. Die aus den Isothermen berechneten Assoziationskonstanten waren dementsprechend etwa doppelt so hoch wie bei den farbstoffimmobilisierten Membranen. Aus dem Verlauf der Isothermen und den relativen Bindungskapazitäten kann eine starke Wechselwirkung zwischen β -Cyclodextrin und Bilirubin abgeleitet werden.

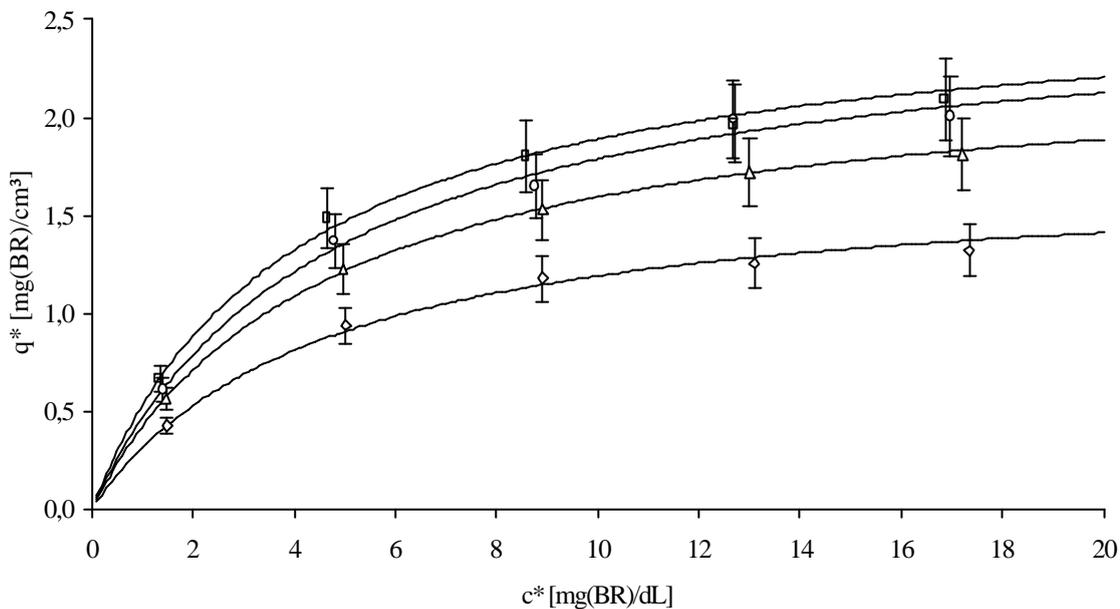


Abb. 2-63: *Langmuir*-Isothermen zur Bilirubinadsorption an TosO- β -CyD-immobilisierten PA6-Flachmembranen

- : PA6-EGDGE-EDODEA- β -CyD
- △: PA6-TriEGDGE-EDODEA- β -CyD
- ◇: PA6-EX 830-EDODEA- β -CyD
- : PA6-BDDGE-EDODEA- β -CyD

Durch einen Vergleich der untersuchten Affinitätsmembranen kann festgestellt werden, daß β -CyD-immobilisierte Systeme am besten geeignet sind, um einen Adsorber für Bilirubin herzustellen. Die geringen Kapazitäten der untersuchten β -CyD-immobilisierten Membranen sind auf niedrige Ligandendichten zurückzuführen. Eine Erhöhung der Ligandendichte, die durch Immobilisation von NCS- β -CyD realisierbar ist, sollte demnach insbesondere an

dendritisch aktivierten Membranen mit hoher Aminogruppendichte zu Adsorbieren mit akzeptablen Bindungskapazitäten führen. Die potentielle Nutzung β -CyD-immobilisierter Membranen zur Adsorption einer Vielzahl anderer proteingebundener Toxine muß als weiterer Vorteil dieser Systeme genannt werden.

| Membran | q_m [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3$] | K_a [L/mol] | R | rel. Kapazität [%] |
|---|--|------------------|--------|-----------------------|
| PA6, unbehandelte Membran | 2.4 | $0.9 \cdot 10^4$ | 0.9975 | - |
| PA6-EGDGE-BSA | 1.4 | $0.8 \cdot 10^4$ | 0.9868 | >> 100 |
| PA6-TriEGDGE-BSA | 1.5 | $0.9 \cdot 10^4$ | 0.9822 | >> 100 |
| PA6-EX 830-BSA | 1.5 | $0.8 \cdot 10^4$ | 0.9908 | >> 100 |
| PA6-BDDGE-BSA | 1.6 | $0.9 \cdot 10^4$ | 0.9946 | >> 100 |
| PA6-EGDGE-CB F3G-A | 0.8 | $1.2 \cdot 10^4$ | 0.9846 | 10.5 |
| PA6-TriEGDGE-CB F3G-A | 1.0 | $0.9 \cdot 10^4$ | 0.9971 | 12.2 |
| PA6-EX 830-CB F3G-A | 0.8 | $1.2 \cdot 10^4$ | 0.9928 | 10.4 |
| PA6-BDDGE-CB F3G-A | 1.0 | $0.7 \cdot 10^4$ | 0.9950 | 9.4 |
| PA6-EGDGE-EDODEA -CB F3G-A | 3.1 | $0.5 \cdot 10^4$ | 0.9980 | 14.2 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA -CB F3G-A | 3.0 | $0.5 \cdot 10^4$ | 0.9906 | 15.7 |
| PA6-EX 830-EDODEA -CB F3G-A | 3.4 | $0.5 \cdot 10^4$ | 0.9993 | 21.3 |
| PA6-BDDGE-EDODEA -CB F3G-A | 5.3 | $0.6 \cdot 10^4$ | 0.9989 | 16.8 |
| PA6-ASCI-EDODEA -ASCI-EDODEA(C(O)CF ₃)- CB F3G-A | 4.5 | $0.5 \cdot 10^4$ | 0.9988 | 22.6 |
| PA6-ASCI-TAEA -ASCI-EDODEA(C(O)CF ₃)- CB F3G-A | 8.7 | $0.5 \cdot 10^4$ | 0.9998 | 32.1 |
| PA6-ASCI-TEPA -ASCI-EDODEA(C(O)CF ₃)- CB F3G-A | 14.4 | $0.5 \cdot 10^4$ | 0.9998 | 31.1 |
| PA6-BDDGE-Procion Blue MX-R | 0.9 | $0.6 \cdot 10^4$ | 0.9894 | 7.1 |
| PA6-BDDGE-Alkali Blue 6 B | 0.8 | $0.5 \cdot 10^4$ | 0.9906 | 8.5 |
| PA6-BDDGE-Congo Red | 1.0 | $0.5 \cdot 10^4$ | 0.9982 | 7.6 |
| PA6-BDDGE-EDODEA -Procion Blue MX-R | 2.8 | $0.6 \cdot 10^4$ | 0.9887 | 12.2 |
| PA6-EGDGE-EDODEA -TosO- β -CyD | 4.5 | $1.3 \cdot 10^4$ | 0.9985 | 97.8 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA -TosO- β -CyD | 4.0 | $1.3 \cdot 10^4$ | 0.9998 | > 100 |
| PA6-EX 830-EDODEA -TosO- β -CyD | 3.0 | $1.3 \cdot 10^4$ | 0.9983 | 99.8 |
| PA6-BDDGE-EDODEA -TosO- β -CyD | 4.5 | $1.5 \cdot 10^4$ | 0.9985 | 95.7 |

Tab. 2-10: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bilirubinadsorption aus „Pseudoserum“; q_m : maximale Bindungskapazität, K_A : scheinbare Assoziationskonstante, R : Korrelationskoeffizient der linearen Regression

Die in Tab. 2-10 für alle untersuchten Membranen zusammengefaßten Bindungskapazitäten sind im Vergleich mit den meisten in Tab. 2-9 aufgeführten, literaturbekannten Adsorbentien als niedrig zu bezeichnen.

Bezüglich der absoluten Kapazität ist einzig das durch Immobilisation von Cibacron F3G-A an eine dendritisch aktivierte Flachmembran (PA6-ASC1-TEPA-ASC1-EDODEA(C(O)CF₃) erhaltene System (14.4 µmol(BR)/cm³(MV); 8.4 mg/cm³; 13.0 mg/g) konkurrenzfähig, wenn man dieses mit den von *Denizli et al.*^{136,138} veröffentlichten CB F3G-A-immobilisierten Beads vergleicht. Als Vorteil der hergestellten Affinitätsmembran soll an dieser Stelle nochmals auf die schnellere Adsorptionskinetik, die bei konvektivem Stofftransport durch die Membran genutzt werden kann, hingewiesen werden. Als Nachteil muß hingegen die aufwendige Herstellung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, dendritisch aktivierten Membranen genannt werden.

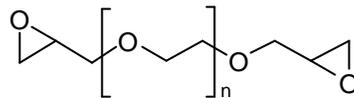
3. Zusammenfassung und Ausblick

Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte eine Vielzahl neuartiger Affinitätsmembranen durch kovalente Immobilisation unterschiedlicher Liganden an entsprechend aktivierte PA6-Mikrofiltrationsmembranen hergestellt werden.

Ausgangspunkt war die Erarbeitung verschiedener Methoden zur Funktionalisierung der Membranoberflächen, um geeignete Ankergruppen für eine Ligandenimmobilisation zu erzeugen.

Aktivierung von PA6-Membranen für die Ligandenimmobilisation

Die bereits innerhalb der vorausgegangenen Diplomarbeit⁸² etablierte Methode zur Aminoendgruppenaktivierung von PA6-Membranen mit Diglycidylethern von OEGs konnte weiter optimiert und auf eine Anbindung von höheren Homologen der Reihe



erweitert werden. Durch Anwendung des optimierten Aktivierungsprotokolls konnte für alle Diglycidylether von OEGs mit bis zu zehn Ethylenglycoleinheiten ein vollständiger Umsatz der Aminoendgruppen von Flach- und Hohlfasermembranen erzielt und somit eine Reihe von epoxyaktivierten Membranen mit unterschiedlich langen OEG-Spacern verfügbar gemacht werden. Die erzielten Epoxidgruppendichten lagen in einem Bereich zwischen 10 - 15 μmol je Kubikzentimeter Membranvolumen.

Die Epoxidgruppen der erhaltenen diglycidyletheraktivierten Membranen konnten durch hydrolytische Öffnung und anschließende Periodatspaltung in Aldehyde überführt werden. Die erzielten Ausbeuten betragen unabhängig von der Kettenlänge des OEG-Spacers etwa 50 %. Auf diese Weise konnte eine zweite Reihe aktivierter Membranen zur Immobilisation von Liganden mit nucleophilen Gruppen hergestellt werden.

Durch Umsetzung der diglycidyletheraktivierten Membranen mit dem Bisaminoethylether von Ethylenglycol (EDODEA) konnte eine Reihe von Membranen mit primären Aminoendgruppen, die eine Kupplung von Liganden mit elektrophilen Gruppen erlauben, erhalten werden. Bezogen auf die ursprüngliche Dichte an Epoxidgruppen wurden Umsätze zwischen 80 und 90 % beobachtet. Eine prinzipielle Kettenverlängerung diglycidyletheraktivierter Membranen mit

verschiedenen Bisaminoethylethern von OEGs, welche eine konsequente Fortführung des aus Ethylenglycoleinheiten aufgebauten Spacerarms ermöglicht, konnte auf diese Weise demonstriert werden.

Als Vorteil der bisher beschriebenen Aktivierungsmethoden von PA6-Membranen ist eine potentielle Verbesserung der Oberflächeneigenschaften zu nennen. Durch Einführung der OEG-Ketten auf der hydrophoben Membranoberfläche kann von einer Erhöhung der Blutkompatibilität und Benetzbarkeit der herzustellenden Affinitätsmembranen ausgegangen werden. Weitere Vorteile sind in der guten Wasserlöslichkeit der zur Membranaktivierung notwendigen Reagenzien sowie in der einfachen Synthese der verwendeten Diglycidylether aus käuflichen Edukten zu sehen.

Gemäß Aufgabenstellung sollte eine Erhöhung der Ankergruppendichte von PA6-Membranen durch Aufbau von dendritischen Strukturen vollzogen werden, um eine ökonomische Nutzung der inneren Membranoberfläche für den Fall einer Immobilisation von niedrigmolekularen Liganden sicherzustellen.

Die Aminoendgruppenaktivierung von PA6-Membranen mit dem Tetraglycidylether von Pentaerythrit (PETGE) sowie eine Addition verschiedener Polyamine an diglycidyletheraktivierte Membranen führten allerdings nicht zu der erwarteten Erhöhung der Ankergruppendichte. Als Ursache hierfür sind Brückenbildungen und intramolekulare Cyclisierungen zu nennen.

Eine Aminoendgruppenaktivierung mit Acrylsäurechlorid (ASCl) und anschließende Polyaminaddition führte schließlich zu der erwarteten Erhöhung der Aminogruppendichte. Der Aufbau einer „zweiten Dendrimergeneration“ durch erneute ASCl-Aktivierung und Polyaminaddition gelang zunächst nicht in befriedigender Weise, da die verwendeten Polyamine Brücken zwischen den Acrylamidgruppen bildeten. Durch Addition von partiell trifluoracetylgeschützten Polyaminen und anschließender Entschützung konnte die Tendenz zur Brückenbildung wirkungsvoll reduziert werden, so daß schließlich Membranen mit Aminogruppendichten von bis zu 30 μmol je Kubikzentimeter Membranvolumen erhalten wurden. Bezogen auf die Aminogruppendichte der verwendeten PA6-Membran von 8.5 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ wurde damit eine Erhöhung um einen Faktor drei bis vier erzielt. Hierdurch sollte die Möglichkeit einer flächennutzenden Immobilisation kleinerer Liganden gegeben sein.

Durch die Verwendung von EDODEA für die zweite Polyaminaddition konnten Ethylenglycoleinheiten in die dendritischen Strukturen eingebaut werden, so daß die bereits erwähnte

Verbesserung der Oberflächeneigenschaften von herzustellenden Affinitätsmembranen postuliert werden kann.

Der Vorteil des Einsatzes von ASCI als Biselektrophil besteht in den unterschiedlich starken Reaktivitäten beider Funktionalitäten (Säurechlorid und Michael-System). In Gegenwart primärer Amine wird zunächst das Säurechlorid vollständig zum Amid reagieren, bevor es in einem nennenswerten Maß zu einer Michael-Addition kommt. Aus diesem Grund konnte eine Brückenbildung während der ASCI-Aktivierung nicht beobachtet werden.

Ligandenimmobilisationen

Innerhalb der vorausgegangenen Diplomarbeit⁸² wurde eine effiziente Methode zu Immobilisation von Serumalbuminen an diglycidyletheraktivierte Membranen erarbeitet. Durch den Einsatz dieser Methode wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die entsprechenden BSA-immobilisierten Flach- und Hohlfasermembranen sowie Kompletmodule mit Hohlfasermembranen hergestellt. Weiterhin konnte durch Anwendung des BCA-Assays eine einfache Methode zur Bestimmung der membrangebundenen Proteinmenge etabliert werden, die sich durch eine sehr gute Eignung bezüglich absoluter Genauigkeit und Reproduzierbarkeit auszeichnete.

Bislang gestaltete sich ein eindeutiger Nachweis der kovalenten Bindung zwischen Membran und Protein als schwierig, da an nicht aktivierten Blindwertmembranen ähnlich hohe Proteinbelegungsdichten wie an den jeweiligen diglycidyletheraktivierten Membranen gefunden wurden. Durch Waschen der nicht aktivierten Membranen mit Lösungen verschiedener Detergenzien und Chaotrope konnte allerdings keine Entfernung des adsorptiv gebundenen Albumins erreicht werden. Untersuchungen zur Adsorption von fluoreszenzmarkiertem BSA legten den Schluß nahe, daß es sich bei der Adsorption an den hier untersuchten Membranoberflächen um einen irreversiblen Vorgang handelt, der durch Strukturänderungen (Denaturierung) des Proteins erklärbar ist.

Adsorptionsexperimente an diglycidyletheraktivierten Membranen, deren Epoxidgruppen durch hydrolytische Öffnung in Diole überführt wurden, um eine kovalente Bindung zwischen Membran und Protein auszuschließen, zeigten schließlich, daß dort eine fast vollständige Entfernung von adsorptiv gebundenem BSA durch Anwendung geeigneter Waschprozesse möglich war.

Hierdurch konnte einerseits der eindeutige Nachweis einer kovalenten Bindung im Falle der BSA-Immobilisation an diglycidyletheraktivierte Membranen erbracht werden, andererseits konnte gezeigt werden, daß die unerwünschte Neigung der hydrophoben Oberfläche von PA6-Membranen zur unspezifischen Adsorption von Proteinen durch eine Modifikation mit OEGs und PEGs positiv beeinflusst werden kann.

Die erhaltenen BSA-immobilisierten Membranen zeichneten sich durch Ligandendichten zwischen 10 und 16 mg(BSA) je Kubikzentimeter Membranvolumen ($0.15 - 0.24 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$) aus. Eine Abhängigkeit der Proteinbelegungsichten vom zur Membranaktivierung verwendeten Diglycidylether konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr lagen sämtliche ermittelten Meßwerte in der Größenordnung einer Monoschichtbelegung, wenn man von einer wahrscheinlicheren side-on Koordination des Proteins an der Membranoberfläche ausgeht. Das Verhältnis aus Ankergruppendichte und Proteinbelegungsichte ergibt sich zu ca. 50:1. Eine in gewissem Maße erwünschte Mehrpunktanbindung ist daher als wahrscheinlich anzusehen. Allerdings besteht hier die Gefahr eines Verlustes der biologischen Aktivität des Liganden.

Durch Immobilisation von Glucose-Oxidase (GOx) an epoxy- und aldehydaktivierte Membranen sollte ein „Membranreaktor“ zur selektiven Oxidation bestimmter Substrate erhalten werden. Eine kovalente Anbindung des Enzyms gelang durch Optimierung literaturbekannter Methoden^{126-128,130}, so daß GOx-immobilisierte Membranen mit Ligandendichten von 3- 6 mg(GOx) je Kubikzentimeter Membranvolumen ($18 - 33 \text{ nmol}/\text{cm}^3$) erhalten werden konnten. Im Falle einer Kupplung an aldehydaktivierte Membranen wurden geringfügig niedrigere Enzymbelegungsichten beobachtet als bei einer Anbindung an diglycidyletheraktivierte Membranen. Eine Abhängigkeit zwischen Spacerlänge und Ligandendichte wurde nicht beobachtet. Die realisierten Enzymbelegungsichten bewegten sich deutlich unterhalb einer theoretischen Monoschichtbelegung der verfügbaren Membranoberfläche, konnten allerdings im Rahmen weiterer Optimierungsversuche nicht erhöht werden.

Die enzymatischen Aktivitäten der erhaltenen GOx-immobilisierten Membranen wurden durch Umsatz-Zeitmessungen der Oxidation von Glucose ermittelt und bezogen auf das native Enzym angegeben. Durch die Art der Versuchsdurchführung wurde hierbei ein konvektiver Stofftransport, der bei einem bestimmungsgemäßen Einsatz des Membranreaktors für die Enzymkinetik bestimmend wäre, nicht berücksichtigt. Die hier ermittelten Aktivitäten müssen diesbezüglich kritisch interpretiert werden, erlauben jedoch den direkten Vergleich mit Literaturwerten, die auf ähnliche Weise erhalten wurden.¹²⁶ Mit Werten zwischen 2.7 und

11.5 % wurden ähnliche relative Aktivitäten ermittelt, wie in der Literatur für vergleichbare GOx-immobilisierte Membranen angegeben werden,¹²⁶ wobei eine ausgeprägte Korrelation zur Ankergruppendichte der verwendeten Membran und Spacerlänge beobachtet wurde. Die höchsten relativen Aktivitäten wurden für aldehydaktivierte Membranen mit relativ niedriger Ankergruppendichte (bez. auf vergleichbare diglycidyletheraktivierte Membranen) und kurzem Spacerarm (EGDGE-Aktivierung und anschl. Überführung der Epoxide in Aldehyde) ermittelt. Diese Abhängigkeit ist durch den geringeren Grad einer Mehrpunktanbindung, die zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führen kann, an aldehydaktivierten Membranen erklärbar. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten aldehydaktivierten Membranen stellen somit gut geeignete Trägermaterialien für Enzymimmobilisationen dar.

Die Immobilisation von Reaktivfarbstoffen an diglycidyletheraktivierte Membranen konnte mit hohen Kupplungsausbeuten von über 90 % realisiert werden, wobei eine Anbindung der primären Aminogruppen von Cibacron Blue F3G-A, Procion Blue MX-R und Congo Red sowie der sekundären Aminogruppen von Alkali Blue 6 B an die membrangebundenen Epoxidgruppen erfolgte.

Eine Kupplung an aminofunktionelle Membranen, welche durch Addition von primären Diaminen an diglycidyletheraktivierte Membranen erhalten wurden, erfolgte durch Substitution des Chlors der Chlortriazineinheiten von Cibacron F3G-A und Procion Blue MX-R. Bezogen auf die Dichte an primären Aminogruppen der verwendeten Membranen konnte hierbei in allen Fällen eine etwa doppelte Farbstoffbelegungsdichte bestimmt werden, so daß auch die nach der Diaminanbindung erzeugten sekundären Aminogruppen vollständig zur Ligandenimmobilisation genutzt wurden.

Die gleiche Beobachtung wurde für den Fall einer Cibacron F3G-A-Immobilisation an dendritisch aktivierten Membranen gemacht. Auf diese Weise konnten farbstoffimmobilisierte Affinitätsmembranen mit hohen Ligandendichten von bis zu 50 μmol je Kubikzentimeter Membranvolumen erhalten werden.

Zur Anbindung von β -Cyclodextrin (β -CyD) an epoxy- und aminofunktionelle Membranen wurden zunächst monosubstituierte β -CyD-Derivate mit geeigneter Funktionalität hergestellt. Hierzu erfolgte eine Überführung von β -CyD in den *p*-Toluolsulfonsäureester (TosO- β -CyD) und anschließende Substitution des Tosylates durch Azid. Die nachfolgende Reduktion mit Triphenylphosphan lieferte schließlich die entsprechende Aminoverbindung (NH_2 - β -CyD) in

befriedigender Gesamtausbeute. Letztere wurde mittels Thiophosgen in das Isothiocyanat (NCS- β -CyD) überführt.

Eine Anbindung von TosO- β -CyD an diaminaktivierte Membranen führte zu Ligandendichten von 3.0 - 4.7 μmol je Kubikzentimeter Membranvolumen. Bezogen auf die Aminogruppendichten der aktivierten Membranen ergeben sich daraus Umsätze von etwa 40 %. Die durch Kupplung von NH_2 - β -CyD an diglycidyletheraktivierte Membranen realisierbaren Ligandendichten waren mit 20 - 30 % deutlich niedriger.

Nahezu vollständige Umsätze der Aminoendgruppen von diaminaktivierten Membranen konnten hingegen im Fall einer Addition der Monoisothiocyanate von β -CyD unter Bildung von Thioharnstoffbrücken beobachtet werden. Dementsprechend resultierten Ligandendichten von 5.8 - 11.1 μmol je Kubikzentimeter Membranvolumen. Ein Einfluß der Kettenlänge der zur Membranaktivierung verwendeten Diglycidylether und Diamine auf die erzielten β -CyD-Belegungsdichten konnte nicht festgestellt werden. Neben den hohen Ligandendichten sind die milden Kupplungsbedingungen unter Verwendung wäßriger Lösungen des Cyclodextrinderivates als Vorteil dieser Methode zu nennen. Innerhalb der untersuchten Verfahren zur kovalenten β -CyD-Immobilisation muß die Kupplung von isothiocyanatsubstituiertem β -CyD als die am besten geeignete Methode betrachtet werden.

Untersuchungen zur Bilirubinadsorption an den hergestellten Affinitätsmembranen

Die Motivation zur Herstellung der beschriebenen Affinitätsmembranen ging auf deren Potential als spezifische Adsorber für proteingebundene Toxine - insbesondere Bilirubin - zurück. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Membranen bezüglich ihrer Bindungskapazität für Bilirubin untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Gleichgewichtsisothermen ermittelt und aus deren Verlauf Informationen über Art und Stärke der Wechselwirkung abgeleitet.

Für alle untersuchten Membranen konnten Meßwerte ermittelt werden, die sich sehr gut durch einen Isothermenverlauf nach *Langmuir* beschreiben ließen. Hierdurch konnten die maximalen Bindungskapazitäten für eine Monoschichtbelegung sowie die scheinbaren Bindungskonstanten ermittelt werden.

Die für eine Bilirubinadsorption an unbehandelten Membranen ermittelten Bindungskapazitäten (unspezifische Adsorption) hingen stark von der Zusammensetzung der verwendeten Bilirubinlösung ab. Für eine Bilirubinlösung mit physiologischem BSA-Gehalt („Pseudoserum“) wurde eine Adsorptionskapazität von 2.4 μmol je Kubikzentimeter Membranvolumen ermittelt. Die auftretenden Wechselwirkungen zwischen Bilirubin und der Oberfläche einer unbehandelten PA6-Membran sind durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen erklärbar.

Für BSA-immobilisierte Membranen wurden deutlich kleinere Bindungskapazitäten ermittelt, welche auf die geringen Stoffmengen an gebundenem Albumin pro Membranvolumen zurückzuführen sind. Die beobachteten Konzentrationsabnahmen der Bilirubinlösungen sind in diesem Fall vorwiegend auf unspezifische Wechselwirkungen mit der Membranoberfläche und weniger auf eine spezifische Interaktion mit dem Liganden zurückzuführen.

Die nach Diglycidyletheraktivierung und Cibacron F3G-A-Immobilisation erhaltenen Affinitätsmembranen zeichneten sich ebenfalls durch geringe Bindungskapazitäten aus. Der genutzte Anteil an der theoretisch möglichen Adsorptionskapazität ergibt sich für alle untersuchten Membranen aus den jeweiligen Ligandendichten zu ca. 10 %.

An Affinitätsmembranen, die nach Diglycidyletheraktivierung, EDODEA-Addition und Cibacron-F3G-A-Immobilisation erhalten wurden, konnten mit 3.0 - 5.3 μmol Bilirubin je Kubikzentimeter Membranvolumen höhere Bindungskapazitäten als bei unbehandelten Membranen beobachtet werden. Hieraus kann eine Wechselwirkung zwischen membrangebundenem Farbstoff und dem Zielmolekül abgeleitet werden. Allerdings betragen die genutzten Anteile an theoretisch möglicher Adsorptionskapazität (relative Bindungskapazitäten) nur 14.2 - 21.3 %.

Für dendritisch aktivierte, Cibacron F3G-A-immobilisierte Affinitätsmembranen ergaben sich relative Bindungskapazitäten von ca. 30 % bzw. absolute Kapazitäten von bis zu 14.4 μmol Bilirubin je Kubikzentimeter Membranvolumen. Vergleichbare literaturbekannte Bilirubinadsorber auf Basis von Beads zeichnen sich durch ähnliche absolute Bindungskapazitäten aus.¹³⁵⁻¹³⁹ Von einer potentiellen Eignung der hier hergestellten Affinitätsmembranen zur extrakorporalen Behandlung von Blutplasma ist daher auszugehen. Als Nachteil muß allerdings der hohe Aufwand der dendritischen Aktivierung genannt werden.

An β -CyD-immobilisierten Affinitätsmembranen (TosO- β -CyD an diaminaktivierte Membranen) konnten schließlich sehr hohe relative Bindungskapazitäten von fast 100 % beobachtet werden. Die aus den Isothermen berechneten scheinbaren Bindungskonstanten waren dementsprechend deutlich höher als bei allen anderen untersuchten Membranen. Es existiert also eine starke Wechselwirkung zwischen Ligand und Zielmolekül. Wegen der verhältnismäßig niedrigen Ligandendichten resultierten allerdings nur niedrige absolute Kapazitäten von 3.0 - 4.5 μmol Bilirubin je Kubikzentimeter Membranvolumen. Dennoch ist in den β -CyD-immobilisierten Membranen das höchste Potential unter den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Affinitätsmembranen bezüglich der angestrebten Anwendung zu sehen. Höhere Adsorptionskapazitäten sollten sich leicht an entsprechend aktivierten Membranen mit höheren Ankergruppendichten, z.B. dendritisch aktivierten Membranen, realisieren lassen. Hierzu könnten weiterhin die im Zusammenhang mit der Anbindung von isothiocyanatsubstituiertem β -CyD erwähnten Vorteile genutzt werden.

Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Cibacron F3G-A- und β -CyD-immobilisierten Affinitätsmembranen verfügen über Eigenschaften, die sie für einen Einsatz als Adsorber für proteingebundene Toxine prädestinieren. Besonders gute Eigenschaften bezüglich Adsorptionskapazität und Biokompatibilität sind im Fall einer Nutzung von β -CyD als Affinitätsligand zu erwarten. Hierzu sollte eine Erhöhung der Ligandendichte Gegenstand weiterführender Studien sein, wobei die bereits in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden genutzt werden können.

Darüber hinaus können die erarbeiteten Methoden zur Membranaktivierung und Ligandenimmobilisation bezüglich anderer Problemstellungen genutzt werden. Hierbei sind vielfältige Möglichkeiten zu sehen, da keine Beschränkung der Aktivierungsmethoden auf mikroporöse Membranen besteht, sondern eine Anwendung an beliebigen Trägermaterialien erfolgen kann. Außerdem können die in dieser Arbeit hergestellten bzw. durch Einsatz der beschriebenen Methoden herzustellenden Membranen anderen Anwendungen als den hier angegebenen zugänglich gemacht werden. Als Beispiele seien Anwendungen in der Isolation und Reinigung von Proteinen und die Herstellung von Membranreaktoren oder Biosensoren genannt.

4. Experimenteller Teil

4.1 Allgemeine Angaben

Materialien

Es wurden folgende Polyamidmembranen von der Fa. MAT GmbH & Co. KG, Obernburg zur Verfügung gestellt (Herstellerangaben):

Flachmembran:

| | |
|---|---|
| Material: | PA6 |
| Dicke: | 110 μm |
| kleinste Porenweite: | 0.45 μm |
| größte Porenweite: | 0.80 μm |
| Dichte: | 0.6 - 0.7 g/cm^3 Membranvolumen |
| spezifische Oberfläche (BET ¹¹⁵): | 12 - 13 m^2/g Membran |
| Aminoendgruppen: | 6 - 7 $\mu\text{mol/cm}^3$ Membranvolumen (entspr. ca. 10 $\mu\text{mol/g}$ Membran) |

Hohlfasermembran für Dead-End-Modul:

| | |
|---|--|
| Material: | PA6 |
| Wanddicke: | 110 μm |
| Innendurchmesser: | 300 μm |
| kleinste Porenweite: | k. A. |
| größte Porenweite: | k. A. |
| Volumenporosität: | 75 - 77 % |
| Dichte: | ca. 0.7 g/cm^3 Membranvolumen |
| spezifische Oberfläche (BET ¹¹⁵): | 15 - 17 m^2/g Membran |
| Aminoendgruppen: | 32 - 37 $\mu\text{mol/g}$ Membran |
| Carboxylendgruppen: | 33 - 42 $\mu\text{mol/g}$ Membran |

Komplettmodule mit Hohlfasermembranen:

| | |
|----------|---|
| Membran: | PA6-Hohlfasermembran für Dead-End-Modul (Daten wie oben angegeben) |
| Modul: | Polycarbonatrohr (10 x 94 mm), aufgeschraubte Endkappen mit Luer-Lock-Anschluß 180 Kapillaren (90 Schlaufen) an der geöffneten Seite in Epoxidharz eingebettet, entspricht ca. 0.6 g bzw. 0.9 cm ³ Membran |

Allgemeine Arbeitstechniken

Reaktionen an Membranen werden, sofern nicht anders angegeben, im Fall von Flachmembranen an ausgestanzten Scheiben ($\varnothing = 47$ mm, ca. 70 mg) und im Fall von Hohlfasermembranen an zerschnittenen Segmenten mit einer Länge von ca. 40 mm durchgeführt, wobei in jedem Fall eine vollständige Benetzung der Membranoberfläche ggf. durch Ultraschallbehandlung oder Anwendung von Vakuum sicherzustellen ist.

Für analytische Untersuchungen und Adsorptionsexperimente werden die zu untersuchenden Flachmembranen in quadratische Stücke mit einer Kantenlänge von ca. 5 mm, Hohlfasermembranen in Stücke mit einer Länge von ca. 5 mm zerschnitten.

Sämtliche Reaktionen an Membranen sowie Adsorptionsexperimente wurden unter kontinuierlichem Schütteln (120 min^{-1}) in einem Schüttelwasserbad Julabo SW 23 durchgeführt. Reaktionen mit feuchtigkeits- oder sauerstoffempfindlichen Substanzen wurden in inertisierten geschlossenen Systemen mit Druckausgleich unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Die Reinigung und Trocknung der verwendeten Lösungsmittel wurde nach Standardmethoden durchgeführt.¹⁹³ Alle wäßrigen Lösungen wurden mit tridestilliertem Wasser hergestellt.

Chromatographische Verfahren:

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfertigfolien der Fa. Merck verwendet. Die Detektion erfolgte durch Löschung der Fluoreszenz im UV-Licht (254 nm) oder durch Behandlung mit an entsprechenden Stellen angegebenen Sprühreagenzien und anschließende Behandlung mittels Heißluftfön.

Die präparative Säulenchromatographie wurde an Kieselgel 60 (Korngröße 40 - 63 μm) der Firma Merck durchgeführt. Das Massenverhältnis von zu trennendem Substanzgemisch zu Adsorptionsmittel betrug im allgemeinen 1:100. Die verwendeten Elutionsgemische werden an entsprechender Stelle angegeben.

Die gaschromatographische Charakterisierung der Präparate erfolgte mit einem Shimadzu Gaschromatographen GC-14 A an einer beschichteten Kapillarsäule des Typs SE-52 ($l = 25$ m). Die verwendeten Temperaturprogramme [Starttemperatur/Haltezeit/Aufheizrate/Endtemperatur] sind an entsprechender Stelle angegeben.

IR-Spektroskopie:

Die Infrarotspektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer Avatar 360 der Firma Nicolet aufgezeichnet. Die Intensitäten der angegebenen Absorptionsbanden werden durch die Buchstaben s (stark), m (mittel) und w (wenig intensiv) bezeichnet.

UV-/VIS-Spektroskopie:

UV-/VIS-Spektren wurden mit einem Shimadzu Zweistrahl-Spektrophotometer UV-160 A aufgezeichnet. Das Absorptionsmaß wird als Extinktion angegeben.

AAS:

Die Bestimmung von Kupfer wurde mit einem Atomabsorptionsspektrometer des Typs 1100 B der Fa. Perkin-Elmer bei einer Wellenlänge von 324.8 nm durchgeführt.

NMR-Spektroskopie:

Die Kernresonanzspektren wurden mit einem Spektrometer ARX 400 der Firma Bruker aufgezeichnet. Protonenspektren wurden bei einer Frequenz von 400.13 MHz, ^{13}C -Spektren bei 100.62 MHz gemessen. Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten [ppm] bezogen auf das verwendete Lösungsmittel als interner Standard angegeben.

Die Signalmultiplizitäten werden durch die Symbole s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett) und m (Multipllett) charakterisiert.

Massenspektroskopie:

Massenspektren wurden mit einem Varian MAT 311 A (EI) aufgenommen.

Elementaranalyse:

Elementaranalysen wurden mit einem Elementar CHNOS-Elementaranalysator Vario EL II durchgeführt.

Farbstärkemessungen in Reflexion:

Farbstärkemessungen an Flachmembranoberflächen wurden mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer Spectraflash 600 der Firma Datacolor durchgeführt.

Titrationen:

Alle Titrationen und pH-Wert-Messungen wurden mit einem Mettler Autotitrator DL 25 durchgeführt.

Fluoreszenzdetektion:

Die Fluoreszenzintensität von Lösungen wurde in einem Durchflußdetektor L 7485 der Firma Merck-Hitachi in Verbindung mit einem Merck-Hitachi Integrator D 7500 bestimmt.

4.2 Analytische Methoden

AM 1: Bestimmung primärer Aminogruppen mittels Ninhydrin-Assay

Man überführt jeweils etwa 10 mg der zu untersuchenden Membranprobe in Reagenzgläser mit Schliffstopfen, gibt 100 μL Wasser sowie 300 μL Ninhydrinlösung nach Moore (Sigma, Art.-Nr. 1632) hinzu und erhitzt die verschlossenen Reagenzgläser für 30 Minuten auf einem kochenden Wasserbad. Schließlich gibt man in jedes abgekühlte Reagenzglas 2.0 mL eines *n*-Propanol-Wasser-Gemisches (1:1), schüttelt bis die Lösung schlierenfrei ist und bestimmt die Extinktion bei 570 nm.

Eine Kalibriergerade erhält man durch analoges Verfahren mit je 100 μL wässriger 6-Aminocapronsäurelösung mit $c = 0.2 \dots 2.0 \text{ mmol/L}$.

Das angegebene Verfahren eignet sich für Membranproben mit einer Konzentration von maximal 15 $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$. Im Falle höherer Konzentrationen ist die Einwaage entsprechend zu reduzieren.

AM 2: Bestimmung membrangebundener Epoxidgruppen

Methode 1

Ein Teil der zu untersuchenden Membranprobe wird zwei Stunden in einer fünfprozentigen HDA-Lösung in 0.025 M Na_2CO_3 (aq) bei 50 °C geschüttelt und anschließend mehrfach mit kochendem Wasser gewaschen. Sobald kein Amin mehr im Waschwasser gefunden wird, trocknet man die erhaltenen Proben im Vakuumtrockenschrank.

Anschließend ermittelt man die Konzentrationen primärer Aminogruppen an der ursprünglichen Probe sowie an der mit HDA behandelten Membranprobe gemäß *AM 1*. Die Konzentration an membrangebundenem Epoxid ergibt sich aus der Differenz dieser beiden Meßwerte.

Methode 2

Die zu untersuchende Membranprobe wird 16 Stunden bei 50 °C in einer zehnprozentigen IDA-Lösung in 0.025 M Na_2CO_3 (aq), welche mit 6.0 N Natronlauge auf pH 12 eingestellt ist, geschüttelt. Anschließend wäscht man mehrfach mit kochendem Wasser. Man schüttelt die erhaltenen Membranproben eine Stunde in einer Lösung aus 1.7 g CuCl_2 in einem Liter 0.05 M

NaOAc-Lösung (aq) deren pH-Wert mit Essigsäure auf 4.5 eingestellt wird. Anschließend wäscht man mehrfach mit Wasser.

Die auf diese Weise mit Kupfer beladenen Membranproben werden schließlich eine Stunde in einer 0.02 M Na₂EDTA-Lösung geschüttelt.

Der Kupfergehalt dieser Lösung wird mittels Atomabsorptionsspektroskopie unter Anwendung des Additionsverfahrens gemäß DIN 38 406 ermittelt. Als Kupferstandard verwendet man eine Lösung mit 10 mg (Cu²⁺)/L, die durch entsprechende Verdünnung einer Fixanal[®]-Lösung mit Na₂EDTA-Lösung (aq) erhalten wird.

Die ermittelte Stoffmengenkonzentration an Cu²⁺-Ionen entspricht der Konzentration an membrangebundenem Epoxid der Probe.

Methode 3 (geeignet für Membranproben mit mehr als 1 mmol(Epoxid)/cm³(MV))

Ca. 500 mg der Membranprobe werden in kleine Stücke zerschnitten und zu 20.0 mL 0.2 N Salzsäure in Pyridin gegeben. Man kocht 20 Minuten unter Rückfluß, läßt abkühlen und gibt 50 mL Wasser hinzu. Anschließend titriert man mit 0.1 N methanolischer Natronlauge bis zum Äquivalenzpunkt.

Die Dichte an Epoxidgruppen in mmol/cm³ (MV) ergibt sich zu:

$$\text{Epoxidgrup pendichte} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{cm}^3} \right] = \frac{(\text{Blindverbr auch} - \text{Verbrauch}) [\text{mL}] \cdot c(\text{NaOH}) \cdot 0.65 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3 (\text{MV})}}{\text{Einwaage} [\text{g}]} \quad \text{Gl. 4-1}$$

AM 3: Bestimmung der membrangebundenen Proteinmenge

Membranhydrolyse (optional)

Die zu untersuchende Membranprobe wird in 1.0 mL 6 N Salzsäure 40 Stunden bei 40 °C hydrolysiert. Die hierbei einzuwiegende Probenmenge richtet sich nach der zu erwartenden Proteinmenge sowie nach der Art des später durchzuführenden Assays und beträgt im Fall von *Methode 1* (Lowry-Assay) etwa 70 mg bzw. im Fall von *Methode 2* (BCA-Assay) etwa 20 mg. Anschließend neutralisiert man mit 1.1 mL 6 N Natronlauge und stellt den pH-Wert gegebenenfalls durch weitere Zugabe von Natronlauge auf ≥ 7 ein. Der ausgefallene Feststoff wird schließlich durch Zentrifugieren abgetrennt.

Methode 1 (modifizierter Lowry Assay)

Die benötigten Arbeitslösungen A und B werden gemäß einer Vorschrift von *Peterson*¹¹⁰ hergestellt und entsprechen weitgehend den in kommerziell erhältlichen Protein-Kits (z.B. Sigma, Art.-Nr. TP 0300) enthaltenen Lösungen.

Zu 200 µL des Hydrolysates bzw. ca. 15 mg der zu untersuchenden Membranprobe in 200 µL Wasser gibt man 2.0 mL Lösung A und läßt 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Anschließend gibt man 1.0 mL Lösung B hinzu und schüttelt kräftig. Nach 30 Minuten ermittelt man die Extinktion bei 750 nm.

Eine Kalibriergerade wird erhalten, indem man jeweils 70 mg unmodifizierter Membran in Gegenwart einer bekannten Menge Protein (2 ... 10 mg) nach oben beschriebener Methode hydrolysiert und die Extinktion nach Anwendung des Assays bestimmt. Wenn keine Hydrolysate gemessen werden sollen, verwendet man wäßrige Eichlösungen des zu bestimmenden Proteins im gleichen Konzentrationsbereich.

Methode 2 (BCA-Assay)

Die benötigten Reagenzlösungen A und B werden gemäß einer Vorschrift von *Smith et al.*¹¹¹ hergestellt und entsprechen weitgehend den in kommerziell erhältlichen Protein-Kits (z.B. Sigma, Art.-Nr. BCA-1) enthaltenen Lösungen. Durch Mischen von 50 Teilen Lösung A mit einem Teil Lösung B erhält man die BCA-Arbeitslösung.

Zu 300 µL des Hydrolysates bzw. ca. 5 mg der zu untersuchenden Membranprobe in 300 µL Wasser gibt man 2.0 mL BCA-Arbeitslösung und schüttelt 45 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur ermittelt man die Extinktion bei 562 nm.

Eine Kalibriergerade wird erhalten, indem man jeweils 20 mg unmodifizierter Membran in Gegenwart einer bekannten Menge Protein (1 ... 5 mg) nach oben beschriebener Methode hydrolysiert und die Extinktion nach Anwendung des Assays bestimmt. Wenn keine Hydrolysate gemessen werden sollen, verwendet man wäßrige Eichlösungen des zu bestimmenden Proteins im gleichen Konzentrationsbereich.

AM 4: Bestimmung der Farbstoffbelegungsdichte

Etwa 10 mg der Membranprobe werden 30 Minuten in 2.0 mL 37 %iger Salzsäure bei einer Temperatur von 60 °C geschüttelt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Extinktion der

Lösung bei dem für den zu bestimmenden Farbstoff spezifischen Absorptionsmaximum ermittelt. Je nach Extinktionskoeffizient des Farbstoffes sind die erhaltenen Lösungen ggf. vor der Messung in geeigneter Weise zu verdünnen.

| Farbstoff | Absorptionsmaximum |
|---------------------|--------------------|
| Cibacron Blue F3G-A | 510 nm |
| Procion Blue MX-R | 498 nm |
| Alkali Blue 6 B | 475 nm |
| Congo Red | 710 nm |

Tab. 4-1: Absorptionsmaxima der zu messenden Farbstoffe

Eine Kalibriergerade wird unter gleichen Bedingungen an jeweils 10 mg unmodifizierter Membran in 2.0 mL Eichlösung (25 ... 250 mg Farbstoff je Liter 37 %ige Salzsäure) ermittelt. Das angegebene Verfahren eignet sich für Membranproben mit einer Farbstoffbelegungsdichte von maximal 30 $\mu\text{mol(Farbstoff)/cm}^3(\text{MV})$. Im Falle höherer Konzentrationen ist die Einwaage entsprechend zu reduzieren.

AM 5: Bestimmung der membrangebundenen Menge an β -Cyclodextrin

Method 1

Mittels dieser Methode erfolgt eine indirekte Bestimmung der membrangebundenen Menge an β -Cyclodextrin über die Abnahme der Ankergruppenkonzentration.

Im Falle einer Anbindung von β -CyD bzw. eines β -CyD-Derivates über membrangebundene Epoxidgruppen wird deren Konzentration vor und nach Anwendung der Immobilisationsprozedur mittels AM 2, Methode 1 ermittelt. Aus der Differenz ergibt sich dann die Stoffmenge an gebundenem β -CyD. Hierbei ist zu überprüfen, in welchem Maße die Konzentration an Epoxidgruppen unter Immobilisationsbedingungen abnimmt, wenn das β -CyD bzw. β -CyD-Derivat nicht zugegeben wird. Das erhaltene Ergebnis ist dann ggf. um die so erhaltenen Blindwerte zu korrigieren.

Im Falle einer Anbindung eines β -CyD-Derivates über membrangebundene primäre Aminogruppen wird deren Konzentration vor und nach Anwendung der Immobilisationsprozedur mittels *AM 1* ermittelt. Aus der Differenz ergibt sich dann die Stoffmenge an gebundenem β -Cyclodextrin. Hierbei ist zu überprüfen, in welchem Maße die Konzentration an primären Aminogruppen unter Immobilisationsbedingungen abnimmt, wenn das β -CyD-Derivat nicht zugegeben wird. Das erhaltene Ergebnis ist dann ggf. um den so erhaltenen Blindwert zu korrigieren.

Methode 2 (BCA-Assay am Hydrolysat)

Etwa 10 mg der zu untersuchenden Membranprobe werden vier Stunden in 5.0 mL 6.0 N Salzsäure bei einer Temperatur von 90 °C erhitzt. Anschließend gibt man zu 1.0 mL der erhaltenen Lösung 2.1 mL 3 N Natronlauge und trennt den ausgefallenen Feststoff durch Zentrifugieren ab. Zu jeweils 0.5 mL der erhaltenen Lösungen gibt man 2.0 mL BCA-Arbeitslösung (vgl. *AM 3*) und schüttelt 30 Minuten bei einer Temperatur von 60 °C. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Extinktion bei 562 nm ermittelt.

Die Menge an immobilisiertem β -CyD wird unter Nutzung einer Kalibriergeraden ermittelt, die durch entsprechende Vorgehensweise mit jeweils 10 mg unmodifizierter Membran in 5.0 mL β -CyD-Lösungen (20 ... 100 mg β -CyD je Liter 6 N Salzsäure) erhalten wird.

Das angegebene Verfahren eignet sich für Membranproben mit einer β -CyD-Belegungsichte von maximal 50 mg(β -CyD)/cm³(MV). Im Falle höherer Konzentrationen sind die Einwaagen entsprechend zu reduzieren.

AM 6: Bestimmung der Bilirubin-Konzentration in Lösung (Jendrassik-Gróf Assay)

Die benötigten Reagenzlösungen (Coffein-Reagenz, Diazo-Reagenz und Natriumtartratlösung) werden gemäß einer Vorschrift von *Jendrassik* und *Gróf*^{194,195} hergestellt und entsprechen weitgehend den in kommerziell erhältlichen Bilirubin-Kits (z.B. Sigma, Art.-Nr. 605-C) enthaltenen Lösungen. Der beschriebene Assay ist geeignet für eine quantitative Bestimmung von Bilirubin in Gegenwart von Serumalbumin. Wegen der Lichtempfindlichkeit von Bilirubin sind alle Proben durch geeignete Maßnahmen gegen Lichteintritt zu schützen.

Zu 4.0 mL Coffein-Reagenz gibt man 0.5 mL der Probenlösung sowie 1.0 mL Diazo-Reagenz. Man schüttelt die erhaltene Lösung direkt nach Zugabe des Diazo-Reagenzes und gibt nach zehn

Minuten 3.0 mL der Natriumtartratlösung hinzu. Es wird erneut geschüttelt und anschließend die Extinktion bei 600 nm ermittelt.

Eine Kalibriergerade wird durch analoge Vorgehensweise an Bilirubinlösungen in Pseudoserum (4.5 %ige BSA-Lösung in PBS) mit Konzentrationen von 10 bis 250 mg(BR)/L erhalten. Zur Herstellung dieser Lösungen vgl. Kap. 4.6.1.

AM 7: Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Glucose-Oxidase

Die Bestimmung der Aktivität immobilisierter GOx erfolgt durch indirekte Bestimmung von H₂O₂ mittels *o*-Dianisidin/HRP.

Die benötigten Reagenzlösungen (GOx/HRP-Lösung in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.2), *o*-Dianisidin- und D-Glucose-Lösung) werden entsprechend einer Vorschrift von *Bergmeyer et al.*¹³¹ hergestellt, wobei GOx nicht direkt in die Lösung gegeben, sondern später durch Zugabe der entsprechenden Menge immobilisierter Membran ersetzt wird. Vor Beginn einer Meßreihe stellt man eine Arbeitslösung durch Mischung von 0.8 mL *o*-Dianisidin- und 39.2 mL GOx/HRP-Lösung her.

Zu jeweils 2.0 mL dieser Arbeitslösung gibt man 18.3 U¹³² GOx in Form der zu untersuchenden, immobilisierten Membran.

Anschließend gibt man 1.0 mL der D-Glucose-Lösung (50 mg/L) hinzu und schüttelt bei einer Temperatur von 37 °C. Eine Meßreihe wird fortgeführt, bis sich die gemessene H₂O₂-Konzentration nicht mehr ändert wobei für jeden Datenpunkt der zu untersuchenden Umsatz-Zeitabhängigkeit ein eigener Testansatz benötigt wird. Die Reaktion wird nach Ablauf eines Zeitintervalls durch Zugabe von 2.0 mL 12 N Schwefelsäure abgebrochen. Schließlich ermittelt man die Konzentration des entstandenen oxidierten *o*-Dianisidins durch Messung der Extinktion bei 527 nm. Hieraus ergibt sich direkt die relative Konzentration an H₂O₂ bzw. an umgesetzter D-Glucose.

Aus den erhaltenen Daten wird die relative Aktivität der GOx-immobilisierten Membranen gemäß der in Kap. 4.5.1.2 beschriebenen Weise ermittelt.

4.3 Synthesen der verwendeten Substanzen

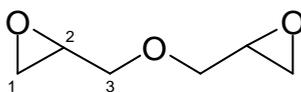
4.3.1 Synthese von Diglycidylether (DGE)

Eine Lösung aus 20.0 g (21.6 mL; 176 mmol) Allyl-2,3-epoxypropylether und 60.0 g (250 mmol) 70 %iger *m*-CPBA in 100 mL CHCl_3 wird zwei Stunden bei Rückfluß gekocht. Man läßt abkühlen und gibt nacheinander 150 mL EtOAc, 150 mL ges. NaHCO_3 -Lösung sowie festes $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hinzu. Anschließend wäscht man die organische Phase mit ges. NaHCO_3 -, ges. NH_4Cl - sowie ges. NaCl -Lösung und trocknet über Na_2SO_4 . Man engt ein und unterzieht den öligen Rückstand einer fraktionierten Destillation bei 0.05 mbar. Mit der zweiten Fraktion destillieren 13.5 g (59 %) Diglycidylether als klare farblose Flüssigkeit über.

Siedepunkt (0.05 mbar): 85 °C

DC [CH/EtOAc 1:1]: $R_f = 0.23$ (Vanillin-Schwefelsäure)

GC [60/0/10/300]: $R_t = 5.0$ min



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 2.60 (m, 2H, H-1), 2.78 (m, 2H, H-1), 3.14 (m, 2H, H-2), 3.43 (m, 2H, H-3), 3.76 (m, 2H, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 44.0 (C-1), 50.6 (C-2), 71.9 (C-3).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3060 (w, $\nu[\text{C-H}_{\text{Epoxyd}}]$), 3000 - 2925 (m, $\nu[\text{C-H}_{\text{aliph.}}]$), 1480, 1340 (w, $\delta_{\text{as}}[\text{C-H}]$), 1255 (w, $\nu[\text{C-O}_{\text{Epoxyd}}]$), 1100 (s, $\nu[\text{C-O}_{\text{Ether}}]$), 910 (m), 850 (m), 760 (w).

MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 73 (63, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2^+$), 57 (100, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$), 43 (59).

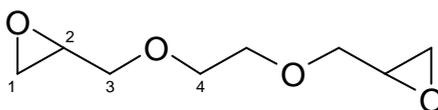
| | | | | |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------------|------------|-------------|
| Elementaranalyse: | $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$ | $M = 130.14$ g/mol | | |
| | berechnet: | C = 55.37 % | H = 7.74 % | O = 36.88 % |
| | gefunden: | C = 53.58 % | H = 9.33 % | O = 37.09 % |

4.3.2 Synthese von Ethylenglycoldiglycidylether (EGDGE)

Zu einem Gemisch aus 7.44 g (6.7 mL; 120 mmol) Ethylenglycol, 40.4 g (720 mmol) KOH sowie 120 mL abs. DMSO tropft man innerhalb einer Stunde 90.6 mL (100.0 g; 1.08 mol) Epichlorhydrin. Man rührt fünf Stunden bei Raumtemperatur weiter, gibt 200 mL Wasser hinzu und extrahiert mit Diethylether. Nach Trocknen über Natriumsulfat entfernt man den Ether sowie einen Teil des nicht umgesetzten Epichlorhydrins am Rotationsverdampfer. Den öligen Rückstand unterzieht man einer fraktionierten Vakuumdestillation bei 0.02 mbar. Mit der zweiten Fraktion destillieren 7.4 g (39 %) Ethylenglycoldiglycidylether als klare farblose Flüssigkeit über.

Siedepunkt (0.02 mbar): 90 °C

GC [100/0/10/300]: $R_t = 5.5$ min



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 2.53 (dd, 2H, $^2J = 4.58$ Hz, $^3J_{trans} = 2.55$ Hz, H-1), 2.70 (dd, 2H, $^2J = 4.58$ Hz, $^3J_{cis} = 0.51$ Hz, H-1), 3.06 (m, 2H, H-2), 3.36 (dd, 2H, $^2J = 11.70$ Hz, $^3J_{trans} = 5.84$ Hz, H-3), 3.62 (m, 4H, H-4), 3.71 (dd, 2H, $^2J = 11.70$ Hz, $^3J_{cis} = 2.46$ Hz, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 44.0 (C-1), 50.6 (C-2), 70.6 (C-4), 71.8 (C-3).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3050 (w, $\nu[\text{C-H}_{\text{Epoxid}}]$), 3000 - 2870 (m, $\nu[\text{C-H}_{\text{aliph.}}]$), 1460, 1335 (w, $\delta_{\text{as}}[\text{C-H}]$), 1255 (w, $\nu[\text{C-O}_{\text{Epoxid}}]$), 1105 (s, $\nu[\text{C-O}_{\text{Ether}}]$), 910 (m), 850 (m), 760 (w).

MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 174 (1.9, M^+), 100 (100, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2^+$), 87 (74, $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^+$), 73 (70, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2^+$), 57 (52, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$), 45 (100).

| | | |
|--------------------------|-------------------------------------|---|
| Elementaranalyse: | $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4$ | $M = 174.20$ g/mol |
| | berechnet: | C = 55.16 % H = 8.10 % O = 36.74 % |
| | gefunden: | C = 54.60 % H = 10.55 % O = 35.85 % |

4.3.3 Synthese der Diglycidylether von Oligoethylenglycolen

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Diglycidylether von Oligoethylenglycolen

Zu einem Gemisch aus 92.0 mL (108.0 g; 1.2 mol) Epichlorhydrin, 48.0 g (1.2 mol) NaOH, 4.8 mL Wasser sowie 1.33 g (4 mmol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAB) tropft man unter starkem Rühren 0.2 mol Oligoethylenglycol, wobei die Temperatur 45 °C nicht übersteigen darf. Nach beendeter Zugabe läßt man für eine Stunde bei 45 °C stark rühren. Anschließend gibt man 50 mL Wasser hinzu und extrahiert mit Diethylether. Nach Trocknen über Na₂SO₄ entfernt man den Ether sowie einen Teil des nicht umgesetzten Epichlorhydrins am Rotationsverdampfer. Den öligen Rückstand unterzieht man einer fraktionierten Vakuumdestillation.

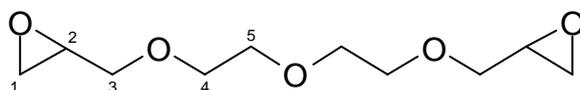
Synthese von Diethylenglycoldiglycidylether (DiEGDGE)

Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 92.0 mL (108.0 g; 1.2 mol) Epichlorhydrin mit 19.2 mL (21.2 g; 0.2 mol) Diethylenglycol umgesetzt.

Nach fraktionierter Destillation bei 0.02 mbar erhält man 25.3 g (58 %) Diethylenglycoldiglycidylether als klares farbloses Öl.

Siedepunkt (0.02 mbar): 135 °C

GC [100/0/10/300]: R_t = 9.1 min



¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 2.54 (dd, 2H, ²J = 5.09 Hz, ³J_{trans} = 2.54 Hz, H-1), 2.71 (dd, 2H, ²J = 5.09 Hz, ³J_{cis} = 1.01 Hz, H-1), 3.08 (m, 2H, H-2), 3.37 (dd, 2H, ²J = 11.69 Hz, ³J_{trans} = 5.59 Hz, H-3), 3.60 (m, 8H, H-4/H-5), 3.71 (dd, 2H, ²J = 11.69 Hz, ³J_{cis} = 3.06 Hz, H-3).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 44.1 (C-1), 50.6 (C-2), 70.5 (C-4), 70.6 (C-5), 71.8 (C-3).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3055 (w, $\nu[\text{C-H}_{\text{Epoxyd}}]$), 2995 - 2870 (m, $\nu[\text{C-H}_{\text{aliphatic}}]$), 1460, 1335 (w, $\delta_{\text{as}}[\text{C-H}]$), 1255 (w, $\nu[\text{C-O}_{\text{Epoxyd}}]$), 1105 (s, $\nu[\text{C-O}_{\text{Ether}}]$), 910 (m), 855 (m), 760 (w).

MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 218 (1.5, M^+), 100 (40, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2^+$), 87 (10, $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^+$), 73 (33, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2^+$), 57 (87, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$), 45 (100).

Elementaranalyse:

| | |
|--|---|
| $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_5$ | $M = 218.25 \text{ g/mol}$ |
| berechnet: | C = 55.02 % H = 8.31 % O = 36.65 % |
| gefunden: | C = 54.47 % H = 11.04 % O = 34.41 % |

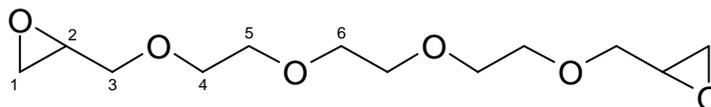
Synthese von Triethylenglycoldiglycidylether (TriEGDGE)

Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 92.0 mL (108.0 g; 1.2 mol) Epichlorhydrin mit 26.6 mL (30.0 g; 0.2 mol) Triethylenglycol umgesetzt.

Nach der fraktionierten Destillation bei 0.005 mbar erhält man 48.8 g (93 %) Triethylenglycoldiglycidylether als klares farbloses Öl.

Siedepunkt (0.005 mbar): 160 °C

GC [100/0/10/300]: $R_t = 12.3 \text{ min}$



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 2.56 (dd, 2H, $^2J = 5.09 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{trans}} = 2.54 \text{ Hz}$, H-1), 2.74 (dd, 2H, $^2J = 5.09 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{cis}} = 1.02 \text{ Hz}$, H-1), 3.11 (m, 2H, H-2), 3.39 (dd, 2H, $^2J = 11.66 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{trans}} = 5.60 \text{ Hz}$, H-3), 3.63 (m, 12H, H-4/H-5/H-6), 3.73 (dd, 2H, $^2J = 11.66 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{cis}} = 3.05 \text{ Hz}$, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 44.2 (C-1), 50.7 (C-2), 70.5 (C-4), 70.6 (C-5), 70.7 (C-6), 71.9 (C-3).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3055 (w, $\nu[\text{C-H}_{\text{Epoxyd}}]$), 2995 - 2870 (m, $\nu[\text{C-H}_{\text{aliphatic}}]$), 1460, 1350 (w, $\delta_{\text{as}}[\text{C-H}]$), 1255 (w, $\nu[\text{C-O}_{\text{Epoxyd}}]$), 1105 (s, $\nu[\text{C-O}_{\text{Ether}}]$), 910 (m), 855 (m), 760 (w).

MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 262 (0.5, M^+), 144 (5, $C_7H_{12}O_3^+$), 100 (45, $C_5H_8O_2^+$), 87 (35, $C_4H_7O_2^+$), 73 (36, $C_3H_5O_2^+$), 57 (73, $C_3H_5O^+$), 45 (100).

Elementaranalyse: $C_{12}H_{22}O_6$ $M = 262.31$ g/mol
 berechnet: C = 54.95 % H = 8.45 % O = 36.60 %
 gefunden: C = 54.54 % H = 10.31 % O = 35.15 %

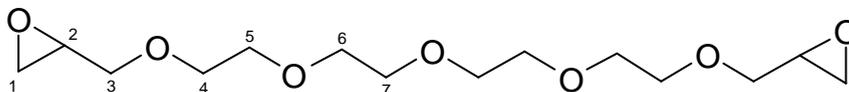
Synthese von Tetraethylenglycoldiglycidylether (TetraEGDGE)

Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 92.0 mL (108.0 g; 1.2 mol) Epichlorhydrin mit 34.7 mL (38.9 g; 0.2 mol) Tetraethylenglycol umgesetzt.

Nach der fraktionierten Destillation bei 0.0005 mbar erhält man 52.0 g (85 %) Tetraethylenglycoldiglycidylether als klares farbloses Öl.

Siedepunkt (0.0005 mbar): 170 °C

GC [100/0/10/300]: $R_t = 14.9$ min



1H -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] = 2.54 (dd, 2H, $^2J = 5.09$ Hz, $^3J_{trans} = 2.69$ Hz, H-1), 2.76 (dd, 2H, $^2J = 5.09$ Hz, $^3J_{cis} = 1.04$ Hz, H-1), 3.14 (m, 2H, H-2), 3.40 (dd, 2H, $^2J = 11.66$ Hz, $^3J_{trans} = 5.76$ Hz, H-3), 3.66 (m, 16H, H-4/H-5/H-6/H-7), 3.75 (dd, 2H, $^2J = 11.66$ Hz, $^3J_{cis} = 3.01$ Hz, H-3).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] = 43.0 (C-1), 50.5 (C-2), 70.6 (C-4), 70.8 (C-5), 70.9 (C-6), 71.0 (C-7), 73.4 (C-3).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3050 (w, $\nu[C-H_{Epoxyd}]$), 3000 - 2895 (m, $\nu[C-H_{aliphatic}]$), 1470, 1355 (w, $\delta_{as}[C-H]$), 1250 (w, $\nu[C-O_{Epoxyd}]$), 1105 (s, $\nu[C-O_{Ether}]$), 910 (m), 855 (m), 760 (w).

MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 306 (0.5, M^+), 100 (62, $C_5H_8O_2^+$), 73 (36, $C_3H_5O_2^+$), 57 (73, $C_3H_5O^+$), 45 (100).

| | | | | |
|--------------------------|-------------------|----------------------------|------------|-------------|
| Elementaranalyse: | $C_{14}H_{26}O_7$ | $M = 306,36 \text{ g/mol}$ | | |
| | berechnet: | C = 54,89 % | H = 8,55 % | O = 36,56 % |
| | gefunden: | C = 53,62 % | H = 9,71 % | O = 36,67 % |

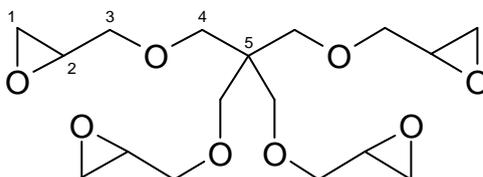
4.3.4 Diglycidylether von höheren OEGs und PEGs

Die Diglycidylether von höheren OEGs und PEGs wurden von der Fa. Nagase Chemicals Ltd., Japan als Muster zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um die kommerziell unter der Bezeichnung Denacol[®] erhältlichen Diglycidylether von OEGs/PEGs mit 9 (Denacol[®] EX 830), 13 (Denacol[®] EX 841) bzw. 22 (Denacol[®] EX 861) Ethylenglycoleinheiten. Die erhaltenen Produkte zeigten in der gaschromatographischen Analyse einen Anteil von 30 - 50 % Verunreinigungen. Es erfolgte eine Verwendung dieser Produkte ohne vorherige Aufreinigung.

4.3.5 Synthese von Pentaerythrit-tetraglycidylether (PETGE)

Zu einer Lösung aus 12.3 g (90 mmol) Pentaerythrit in 90 mL DMSO gibt man 40.5 g (0.72 mol) KOH und tropft anschließend innerhalb einer Stunde 85.0 mL (100.0 g; 1.08 mol) Epichlorhydrin so zu, daß die Temperatur 35 °C nicht übersteigt. Man rührt das Gemisch sieben Stunden bei einer Temperatur von 40 °C und saugt schließlich den ausgefallenen Feststoff ab. Nach Waschen mit CH_2Cl_2 wird das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird im zweiphasigen System ges. $NaHCO_3$ /Ether aufgenommen. Nach mehrfacher Extraktion mit Ether trocknet man die organische Phase über Na_2SO_4 und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Nach säulenchromatischer Aufreinigung des Rückstandes (Aceton/Hexan 3:7) erhält man 25.6 g (76 %) PETGE als klares farbloses Öl.

GC [100/0/10/300]: $R_t = 15.4 \text{ min}$



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 2.58 (dd, 4H, $^2J = 5.09$ Hz, $^3J_{trans} = 2.55$ Hz, H-1), 2.76 (dd, 4H, $^2J = 5.09$ Hz, $^3J_{cis} = 1.02$ Hz, H-1), 3.10 (m, 4H, H-2), 3.36 (dd, 4H, $^2J = 11.70$ Hz, $^3J_{trans} = 5.59$ Hz, H-3), 3.45 (m, 8H, H-4), 3.68 (dd, 4H, $^2J = 11.70$ Hz, $^3J_{cis} = 2.54$ Hz, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 44.1 (C-1), 45.7 (C-5), 50.8 (C-2), 69.9 (C-4), 72.0 (C-3).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2997 - 2875 (m, $\nu[\text{C-H}_{aliph.}]$), 1480, 1340 ($\delta_{as}[\text{C-H}]$), 1254 ($\nu[\text{C-O}_{Epoxid}]$), 1098 ($\nu[\text{C-O}_{Ether}]$), 908 (m), 850 (m), 760 (w).

MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 360 (1.0, M^+), 159 (98), 83 (30), 57 (100, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$).

| | | | | |
|--------------------------|--|--------------------|------------|-------------|
| Elementaranalyse: | $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_8$ | $M = 360.41$ g/mol | | |
| | berechnet: | C = 56.66 % | H = 7.83 % | O = 35.51 % |
| | gefunden: | C = 55.68 % | H = 8.18 % | O = 36.14 % |

4.3.6 Synthese von Tetrakis(aminomethyl)methan (TAMM)

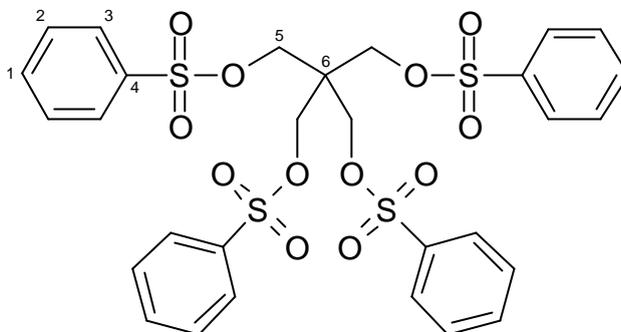
Synthese von Tetrakis(benzolsulfonylmethyl)methan

Zu einer Suspension aus 26.0 g (191 mmol) Pentaerythrit in 130 mL Pyridin tropft man 109.0 mL (150.0 g; 216 mmol) Benzolsulfonsäurechlorid so zu, daß die Temperatur 35 °C nicht übersteigt. Man rührt dann noch eine Stunde bei 40 °C und gibt anschließend die erhaltene Suspension in eine stark gerührte Mischung aus 160 mL konz. HCl, 200 mL Wasser und 400 mL MeOH. Schließlich gibt man 100 g Eis hinzu und saugt den Feststoff ab. Letzterer wird mit 1 L Wasser sowie zweimal mit je 100 mL kaltem MeOH gewaschen und aus MeOH/ CHCl_3 9:1 umkristallisiert. Man erhält auf diese Weise 113 g (85 %) eines weißen Feststoffes.

Schmelzpunkt: 103 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 3.91 (s, 8H, H-5), 7.58 (m, 8H, H-2), 7.70 (m, 4H, H-1), 7.78 (m, 8H, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 43.36 (C-6), 65.70 (C-5), 127.94 (C-3), 129.56 (C-2), 134.41 (C-1), 134.58 (C-4).



IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3071 (w, $\nu[\text{C-H}_{\text{aromat.}}]$), 2972 (w, $\nu[\text{C-H}_{\text{aliph.}}]$), 1475 (s), 1448 (s), 1366 (s, $\nu[\text{C}=\text{C}_{\text{aromat.}}]$), 1190 (s, $[-\text{O}-\text{SO}_2-]$), 1094 (m), 971 (s), 824 (s), 753 (m), 686 (m), 586 (s).

MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 555 (10, $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_{10}\text{S}_3^+$), 397 (86), 211 (66), 141 (100), 77 (86).

Elementaranalyse: $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_{12}\text{S}_4$ $M = 696.80$ g/mol

berechnet: C = 49.99 % H = 4.05 % O = 27.55 % S = 18.41 %

gefunden: C = 49.84 % H = 4.07 % O = 28.39 % S = 17.70 %

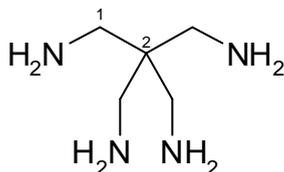
Synthese von Tetrakis(azidomethyl)methan

Eine Lösung aus 75.0 g (108 mmol) Tetrakis(benzoylsulfonylmethyl)methan sowie 35.1 g (541 mmol) Natriumazid in 250 mL Diethylenglycol wird 16 Stunden bei 135 °C unter Argon erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur gibt man das Reaktionsgemisch in 400 mL Wasser, trennt die ölige Phase ab und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit Ether. Die vereinigte organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum auf ein Volumen von etwa 100 mL eingengt. Die so erhaltene Lösung wird direkt in der nachfolgenden Reduktion eingesetzt.

Synthese von Tetrakis(aminomethyl)methan

Die Lösung des Tetrakis(azidomethyl)methans in 100 mL Ether tropft man innerhalb von zwei Stunden zu einer Suspension aus 22.6 g (595 mmol) LiAlH_4 in 500 mL abs. THF. Es wird 18 Stunden bei Rückfluß erhitzt und schließlich auf Raumtemperatur abgekühlt. Man gibt nacheinander langsam 25 mL Wasser, 25 mL 15 %ige Natronlauge und 75 mL Wasser hinzu. Anschließend saugt man den Feststoff ab und unterzieht diesen einer 24-stündigen Extraktion mit THF. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum erhält man 6.3 g (45 %) eines farblosen Öls.

GC [100/0/10/300]: $R_t = 6.4$



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1.44 (br s, 8H, [-NH₂]), 2.59 (s, 8H, H-1).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 43.19 (C-2), 43.69 (C-1).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3365 (s, ν [N-H_{Amin}]), 2931 (m, ν [C-H_{aliph.}]), 1600, 1481, 1324, 933, 669.

MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 132 (0.5, M^+), 98 (23, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2^+$), 85 (60), 81 (85, $\text{C}_5\text{H}_7\text{N}^+$), 69 (94), 56 (100).

| | | |
|--------------------------|--|---------------------------|
| Elementaranalyse: | $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_8$ | $M = 132.21$ g/mol |
| berechnet: | C = 45.42 % | H = 12.20 % N = 42.38 % |
| gefunden: | C = 44.89 % | H = 12.40 % N = 42.71 % |

4.3.7 Synthese von trifluoracetylgeschützten Polyaminen **n**

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Trifluoracetylschätzung von Polyaminen

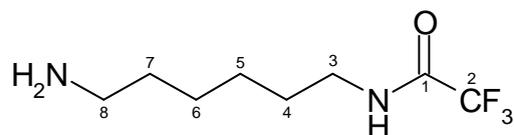
Zu einer Lösung aus 150 mmol eines Polyamins mit n zu schützenden Aminogruppen in 300 mL Methanol gibt man $n \cdot (15.0 \text{ mL}; 10.6 \text{ g}; 105 \text{ mmol})$ Triethylamin und tropft anschließend innerhalb einer Stunde $n \cdot (18.0 \text{ mL}; 21.8 \text{ g}; 150 \text{ mmol})$ Trifluoressigsäureethylester zu. Man rührt weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur und entfernt schließlich das Lösungsmittel im Vakuum. Die Aufreinigung des Rückstandes erfolgt säulenchromatographisch (MeOH/CH₂Cl₂ 2:8).

Synthese von mono(trifluoracetyl)geschütztem Hexandiamin (HDA(C(O)CF₃))

Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 17.4 g (150 mmol) HDA mit 18.0 mL (21.8 g; 150 mmol) Trifluoressigsäureethylester umgesetzt.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhält man 12.6 g (39 %) der mono(trifluoracetyl)geschützten Verbindung als farblosen Feststoff.

| | |
|--|--|
| Schmelzpunkt: | 52 °C |
| GC [80/0/10/300]: | R _t = 6.5 min |
| DC [MeOH/CH₂Cl₂ 2:8]: | R _f = 0.20 (Ninhydrin-Lösung) |



¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1.21 - 1.38 (m, 4H, H-5/H-6), 1.40 - 1.43 (m, 2H, H-4), 1.51 - 1.58 (m, 2H, H-7), 2.64 (t, 2H, ³J = 6.74 Hz, H-8), 3.29 (t, 2H, ³J = 6.93 Hz, H-3), 7.72 (s, 2H, -NH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 26.21, 26.36 (C-5/C-6), 28.60 (C-4), 33.24 (C-7), 39.66 (C-8), 41.80 (C-3), 115.95 (C-2), 157.31 (C-1).

^{19}F -NMR (CDCl_3): δ [ppm] = 76.26 ($-\text{CF}_3$).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3303 (s, $\nu[\text{N}-\text{H}_{\text{Amin}}]$), 2935, 2861 (m, $\nu[\text{C}-\text{H}_{\text{aliph.}}]$), 1709 (s, $\nu[\text{C}=\text{O}]$), 1563, 1188, 1154 (s, $\nu[\text{C}-\text{F}_{\text{aliph.}}]$), 759, 721.

MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 212 (9, M^+), 86 (100), 56 (45), 45 (91).

Elementaranalyse: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$ $M = 212.22$ g/mol

berechnet: C = 45.28 % H = 7.12 % F = 26.86 % N = 13.20 % O = 7.54 %

gefunden: C = 44.91 % H = 7.13 % N = 13.30 %

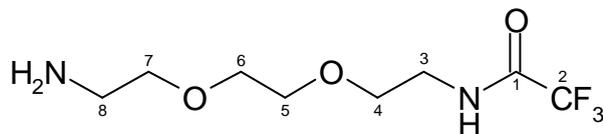
Synthese von mono(trifluoracetyl)geschütztem Ethylendioxydiethylamin (EDODEA($\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$))

Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 21.9 mL (22.2 g; 150 mmol) 2,2'-Ethylendioxydiethylamin mit 18.0 mL (21.8 g; 150 mmol) Trifluoressigsäureethylester umgesetzt.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhält man 12.4 g (34 %) der mono(trifluoracetyl)geschützten Verbindung als klares Öl.

GC [80/0/10/300]: $R_t = 6.9$ min

DC [$\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 2:8]: $R_f = 0.17$ (Ninhydrin-Lösung)



^1H -NMR (CDCl_3): δ [ppm] = 2.89 (t, 2H, $^3J = 5.08$ Hz, H-8), 3.52 (m, 4H, H-5/H-6), 3.62 (m, 6H, H-3/H-4/H-7), 7.27 (s, $[-\text{NH}_2]$).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ [ppm] = 39.65 (C-8), 41.31 (C-3), 68.70, 69.89, 70.18 (C-4/C-5/C-6), 72.72 (C-7), 117.35 (C-2), 157.24 (C-1).

^{19}F -NMR (CDCl_3): δ [ppm] = 76.14 ($-\text{CF}_3$).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3302 (s, $\nu[\text{N-H}_{\text{Amin}}]$), 2874 (m, $\nu[\text{C-H}_{\text{aliph.}}]$), 1716 (s, $\nu[\text{C=O}]$), 1567, 1352, 1189, 1154 (s, $\nu[\text{C-F}_{\text{aliph.}}]$), 873, 723.

MS (70 eV): m/z [%] = 244 (3, M^+), 140 (37), 119 (99), 87 (61), 61 (84), 44 (100).

Elementaranalyse: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$ $M = 244.22$ g/mol

berechnet: C = 39.35 % H = 6.19 % F = 23.34 % N = 11.47 % O = 19.65 %

gefunden: C = 39.01 % H = 5.73 % N = 10.76 %

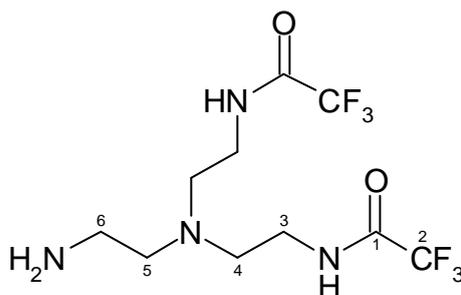
Synthese von bis(trifluoracetyl)geschütztem Tris(aminoethyl)amin (TAEA(C(O)CF₃)₂)

Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 11.3 mL (11.0 g; 75 mmol) Tris(aminoethyl)amin mit 18.0 mL (21.8 g; 150 mmol) Trifluoressigsäureethylester umgesetzt.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhält man 6.9 g (21 %) der bis(trifluoracetyl)-geschützten Verbindung als klares Öl.

GC [80/0/10/300]: $R_t = 11.5$ min

DC [MeOH/CH₂Cl₂ 2:8]: $R_f = 0.58$ (Ninhydrin-Lösung)



¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 2.58 (t, 2H, $^3J = 5.91$ Hz, H-5), 2.68 (t, 4H, $^3J = 5.51$ Hz, H-4), 2.79 (t, 2H, $^3J = 5.91$ Hz, H-6), 3.35 (t, 4H, $^3J = 5.52$ Hz, H-3), 7.27 (s, [-NH₂]).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 38.09 (C-3), 39.26 (C-6), 52.37 (C-4), 53.83 (C-5), 116.02 (C-2), 157.72 (C-1).

¹⁹F-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 76,26 (-CF₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3302 (s, $\nu[\text{N-H}_{\text{Amin}}]$), 2951, 2830 (m, $\nu[\text{C-H}_{\text{aliph.}}]$), 1708 (s, $\nu[\text{C=O}]$), 1560, 1459, 1189, 1154 (s, $\nu[\text{C-F}_{\text{aliph.}}]$), 865, 723.

MS (70 eV): m/z [%] = 338 (3, M^+), 308 (62), 212 (100), 194 (50), 169 (95), 140 (82), 44 (91).

Elementaranalyse: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_2\text{M}$ = 338.26 g/mol

berechnet: C = 35.51 % H = 4.77 % F = 33.70 % N = 16.56 % O = 9.46 %

gefunden: C = 36.62 % H = 4.53 % N = 15.94 %

4.3.8 Synthese von 6^A-Desoxy-6^A-amino-b-cyclodextrin ($\text{NH}_2\text{-b-CyD}$)

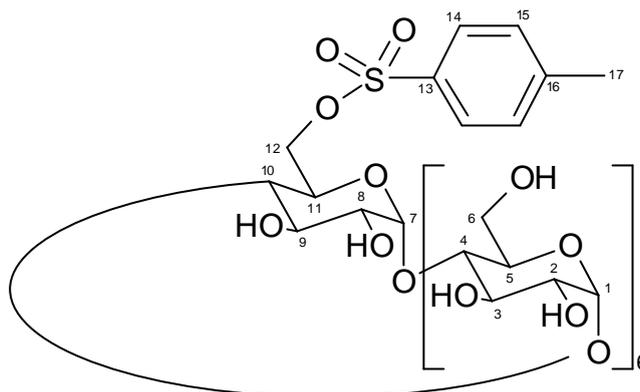
Synthese von 6^A-O-p-Toluolsulfonyl-b-cyclodextrin (TosO-b-CyD)

20.0 g (17.6 mmol) β -CyD werden durch Erwärmen auf eine Temperatur von 60 °C in 450 mL Wasser gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 15.7 g (70.5 mmol) fein pulverisiertes 1-(*p*-Toluolsulfonyl)imidazol unter starkem Rühren hinzugegeben. Nach zwei Stunden tropft man 25 mL einer 0.9 M Natronlauge innerhalb von 20 Minuten zum Reaktionsgemisch und läßt zehn Minuten weiterrühren. Anschließend wird überschüssiges 1-(*p*-Toluolsulfonyl)imidazol abgesaugt. Man gibt schließlich 24.1 g NH_4Cl in das Filtrat und rührt, bis dieses vollständig in Lösung gegangen ist. Die erhaltene Lösung wird auf die Hälfte des Ursprungsvolumens eingeeengt, wobei ein Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt und zweimal mit je 50 mL eiskaltem Wasser sowie mit 100 mL Aceton gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum erhält man 9.6 g (43 %) des Sulfonsäureesters als farblosen Feststoff, der aus Wasser umkristallisiert werden kann.

Schmelzpunkt: 183 °C

DC [*n*-BuOH/MeOH/ H_2O 5:4:3]: R_f = 0.51 (Vanillin/Schwefelsäure)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2.05 (s, 3H, H-17), 3.15 - 3.42 (m, 14H, H-2/H-4/H-8/H-10), 3.45 - 3.62 (m, 26H, H-3/H-5/H-6/H-9/H-11), 4.14 - 4.19 (m, 2H, H-12), 4.34 (br s, 6H, OH-6), 4.76 (s, 1H, H-7), 4.80 (s, 6H, H-1), 5.64 (br s, 14H, OH-2/OH-3/OH-8/OH-9), 7.38 - 7.72 (4H, H-14/H-15).



$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 21.16 (C-17), 59.56 (C-12), 59.92 (C-6), 71.67 - 73.04 (C-2/C-3/C-5/C-8/C-9/C-11), 81.20 (C-10), 81.53 (C-4), 101.58 (C-7), 101.92 (C-1), 127.18 - 129.85 (C-13/C-14/C-15/C-16).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3385 (s, ν [O-H]), 2927 (m, ν [C-H_{aliph.}]), 1636, 1365 (m, δ [O-H]), 1177 (s, [-O-SO₂-]), 1156, 1079, 1029 (s, ν [C-OH]), 946, 756, 705, 669, 579.

Elementaranalyse: C₄₉H₇₆O₃₇S M = 1289.19 g/mol

berechnet: C = 45.65 % H = 5.94 % O = 45.92 % S = 2.49 %

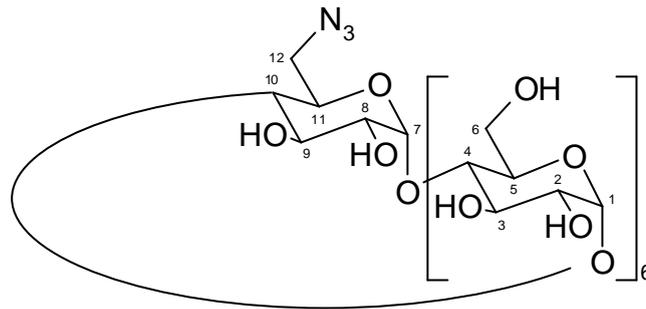
gefunden: C = 43.94 % H = 6.13 % O = 47.67 % S = 2.26 %

*Synthese von 6^A-Desoxy-6^A-azido-**b**-cyclodextrin (N₃-**b**-CyD)*

5.4 g (4.2 mmol) TosO- β -CyD werden bei einer Temperatur von 80 °C in 50 mL Wasser suspendiert. Man gibt 3.0 g (46.2 mmol) Natriumazid hinzu und rührt weitere fünf Stunden bei 80 °C. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch in 300 mL Aceton gegeben wobei ein Feststoff ausfällt, der schließlich abgesaugt wird. Nach Trocknung im Vakuum erhält man 4.6 g (88 %) des Azids als farblosen Feststoff, der aus Wasser umkristallisiert werden kann.

Schmelzpunkt: 206 °C (Zers.)

DC [*n*-BuOH/MeOH/H₂O 5:4:3]: R_f = 0.45 (Vanillin/Schwefelsäure)



$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.28 (m, 14H, H-2/H-4/H-8/H-10), 3.53 - 3.71 (m, 26H, H-3/H-5/H-6/H-9/H-11), 4.38 (br s, 6H, OH-6), 4.44 (m, 2H, H-12), 4.79 (s, 6H, H-1), 4.83 (s, 1H, H-7), 5.56 - 5.66 (m, 14H, OH-2/OH-3/OH-8/OH-9).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 59.93 (C-6/C-12), 72.02 - 73.04 (C-2/C-3/C-5/C-8/C-9/C-11), 81.58 (C-4/C-10), 101.89 (C-1/C-7).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3385 (s, $\nu[\text{O-H}]$), 2928 (m, $\nu[\text{C-H}_{\text{aliph.}}]$), 2106 (s, $\nu[-\text{N}_3]$), 1636, 1367 (m, $\delta[\text{O-H}]$), 1156, 1079, 1029 (s, $\nu[\text{C-OH}]$), 946, 756, 707, 669, 579.

Elementaranalyse: $\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_{34}$ $M = 1160.02$ g/mol

berechnet: C = 43.49 % H = 6.00 % N = 3.62 % O = 46.89 %

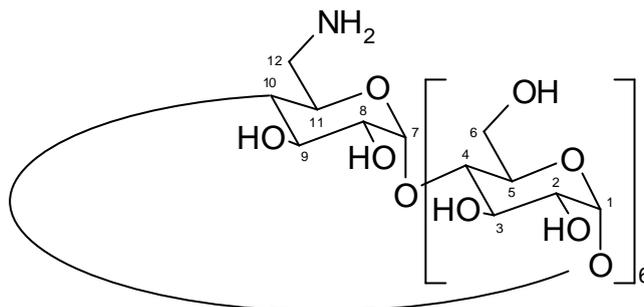
gefunden: C = 42.92 % H = 6.01 % N = 3.59 % O = 47.48 %

Synthese von 6^A-Desoxy-6^A-amino-**b**-cyclodextrin (NH_2 -**b**-CyD)

Zu einer Lösung aus 3.6 g (3.1 mmol) N_3 - β -CyD und 1.5 g (5.7 mmol) Triphenylphosphan in 50 mL DMF gibt man 10 mL konz. NH_3 . Man rührt vier Stunden bei Raumtemperatur und gibt das Gemisch schließlich in 300 mL Aceton, wobei ein Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Man erhält 3.0 g (84 %) des Amins als farblosen Feststoff, der aus Wasser umkristallisiert werden kann.

Schmelzpunkt: 203 °C (Zers.)

DC [n -BuOH/MeOH/ H_2O 5:4:3]: $R_f = 0.30$ (Ninhydrin-Lösung)



$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.28 - 3.62 (m, 14H, H-2/H-4/H-8/H-10), 3.52 - 3.62 (m, 28H, H-3/H-5/H-6/H-9/H-11/H-12), 4.38 (br s, 6H, OH-6), 4.79 (m, 6H, H1), 4.85 (m, 1H, H7), 5.56 - 5.65 (m, 14H, OH-2/OH-3/OH-8/OH-9).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 59.93 (C-6/C-12), 72.01 - 73.02 (C-2/C-3/C-5/C-8/C-9/C-11), 81.53 (C-4/C-10), 101.91 (C-1/C-7).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3383 (s, ν [O-H]), 2925 (m, ν [C-H_{aliph.}]), 1661, 1414, 1386 (m, δ [O-H]), 1156, 1080, 1029 (s, ν [C-OH]), 946, 756, 706, 579.

Elementaranalyse: $\text{C}_{42}\text{H}_{71}\text{NO}_{34}$ $M = 1134.02$ g/mol

berechnet: C = 44.48 % H = 6.31 % N = 1.24 % O = 47.97 %

gefunden: C = 43.20 % H = 6.45 % N = 1.15 % O = 49.20 %

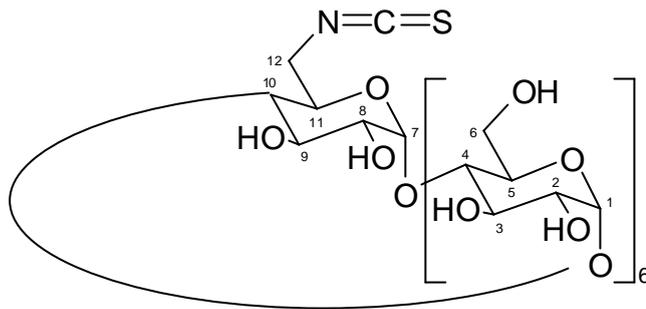
4.3.9 Synthese von 6^A-Desoxy-6^A-isothiocyanato- β -cyclodextrin (NCS- β -CyD)

Zu einer Suspension aus 1.28 g (1.1 mmol) NH_2 - β -CyD in 50 mL Aceton/Wasser (1:1) gibt man nacheinander 0.43 g CaCO_3 sowie 0.24 g (0.17 mL; 2.2 mmol) Thiophosgen. Man rührt vier Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend entfernt man das Aceton im Vakuum und gibt 75 mL Wasser zum Reaktionsgemisch. Die erhaltene Suspension wird mit 1 M und 0.1 M HCl auf einen pH-Wert von 4.0 eingestellt und weitere 30 Minuten gerührt. Zuletzt gibt man das Reaktionsgemisch in 500 mL Aceton, wobei ein Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, nacheinander mit kaltem Wasser, kaltem Ethanol und Ether gewaschen und schließlich im

Vakuum getrocknet. Man erhält 0.9 g (70 %) des Isothiocyanates als farblosen Feststoff, der aus Wasser umkristallisiert werden kann.

Schmelzpunkt: 228 °C (Zers.)

DC [*n*-BuOH/MeOH/H₂O 5:4:3]: $R_f = 0.48$ (Vanillin/Schwefelsäure)



¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.17 - 3.45 (m, 14H, H-2/H-4/H-8/H-10), 3.51 - 3.68 (m, 26H, H-3/H-5/H-6/H-9/H-11), 3.94 (br s, 6H, OH-6), 3.99 (m, 2H, H-12), 4.79 (s, 6H, H-1), 4.87 (s, 1H, H-7), 5.34 - 5.53 (m, 14H, OH-2/OH-3/OH-8/OH-9).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 59.94 (C-6/C-12), 72.04 - 73.05 (C-2/C-3/C-5/C-8/C-9/C-11), 81.56 (C-4/C-10), 101.93 (C-1/C-7).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3385 (s, ν [O-H]), 2926 (m, ν [C-H_{aliph.}]), 2099 (m, [N=C=S]), 1635, 1157, 1079, 1030 (s, ν [C-OH]), 947, 757, 706, 580, 531.

Elementaranalyse: C₄₃H₆₉NO₃₄S M = 1176.08 g/mol

berechnet: C = 43.92 % H = 5.91 % N = 1.19 % O = 46.25 % S = 2.73 %

gefunden: C = 42.30 % H = 6.63 % N = 0.61 % O = 48.92 % S = 1.54 %

4.3.10 Synthese von fluoreszenzmarkiertem BSA

50 mg (0.133 mmol) 5-(6-)Carboxyfluorescein werden unter Argonatmosphäre in 2.5 mL abs. DMF gelöst. Man gibt 26.5 mg (0.127 mmol) DCC sowie 16 mg (0.139 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid hinzu und läßt 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß rühren. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und es werden weitere 2.5 mL DMF hinzugegeben. Die erhaltene Lösung wird direkt zur weiteren Umsetzung mit BSA eingesetzt.

1.0 g BSA werden in 50 mL 0.1 M NaHCO₃ (aq) gelöst und 5.0 mL obiger NHS-aktivierter Carboxyfluoresceinlösung in DMF unter Rühren langsam hinzugegeben. Man rührt eine Stunde bei Raumtemperatur und gibt anschließend 5.0 mL frische 1.5 M Hydroxylaminlösung (pH = 8.5) hinzu.

Die Trennung des BSA-Fluorescein-Konjugates von nicht umgesetztem NHS-Fluorescein erfolgt mittels Gelfiltration über Sephadex G-25 Gel in einer 30 x 150 mm Säule. Die einzelnen Fraktionen werden in einer Durchflußküvette bei 280 nm detektiert.

Das erhaltene Konjugat wird mittels Gefriertrocknung isoliert. Man erhält 900 mg (90 %) fluoreszenzmarkiertes BSA. Das Kupplungsverhältnis wurde durch Messung der Extinktion bei 492 nm ($\epsilon = 68.000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ bei pH = 8.0) mit 3:1 (Fluoreszenzmarker:BSA) bestimmt.

4.4 Aktivierung von PA6-Membranen für die Ligandenimmobilisation

4.4.1 Aminoendgruppenaktivierung mit Diglycidylethern von OEGs und PEGs

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Aminoendgruppenaktivierung mit Diglycidylethern

Die zu aktivierende Membran wird 30 Minuten in einem 2-PrOH/Wassergemisch (1:1) geschüttelt, wobei eine vollständige Benetzung der Membranoberfläche ggf. durch Ultraschallbehandlung oder Anwendung von Vakuum sicherzustellen ist. Anschließend wäscht man mit Wasser und inkubiert für 30 Minuten in einer 0.025 M Na₂CO₃-Lösung.

Die Aktivierung erfolgt durch Schütteln von maximal 1.0 g der vorbehandelten Membranscheiben oder Hohlfasern in einer Lösung aus 50 mmol des entsprechenden Diglycidylethers (6.5 g DGE, 8.7 g EGDGE, 10.9 g DiEGDGE, 13.1 g TriEGDGE, 15.3 g TetraEGDGE, 26.3 g EX 830, 35.1 g EX 841, 55.0 g EX 861 bzw. 10.1 g BDDGE) in 50 mL 0.025 M Na₂CO₃ (aq) für vier Stunden bei einer Temperatur von 80 °C.

Nach beendeter Aktivierung wird zunächst mit 0.025 M Na₂CO₃ (aq) und anschließend mehrfach mit Wasser gewaschen. Die erhaltenen Membranen werden im Vakuumtrockenschrank getrocknet und im Exsikkator über Molsieb (4 Å) aufbewahrt.

Es werden folgende Konzentrationen an membrangebundenen Epoxidgruppen mittels *AM 2, Methode 1* ermittelt:

Ergebnisse für Flachmembranen:

| Diglycidylether | $\mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{g}$ |
|-----------------|---|---|
| DGE | 10.1 ± 0.6 | 15.6 ± 0.9 |
| EGDGE | 11.5 ± 0.7 | 17.8 ± 1.1 |
| DiEGDGE | 10.5 ± 0.6 | 16.2 ± 0.9 |
| TriEGDGE | 9.1 ± 0.6 | 14.1 ± 0.9 |
| TetraEGDGE | 9.4 ± 0.4 | 14.5 ± 0.6 |
| EX 830 | 7.8 ± 0.5 | 12.1 ± 0.8 |
| EX 841 | 5.2 ± 0.3 | 8.0 ± 0.5 |
| EX 861 | 2.8 ± 0.2 | 4.4 ± 0.3 |
| BDDGE | 12.8 ± 0.8 | 19.8 ± 1.2 |

Tab. 4-2: Aminoendgruppenaktivierung mit Bisepoxiden an PA6-Flachmembranen

Ergebnisse für Hohlfasermembranen:

| Diglycidylether | $\mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{g}$ |
|------------------------|---|---|
| DGE | 9.7 ± 0.6 | 14.9 ± 0.9 |
| EGDGE | 10.5 ± 0.6 | 16.2 ± 0.9 |
| DiEGDGE | 9.0 ± 0.5 | 13.8 ± 0.8 |
| TriEGDGE | 9.3 ± 0.6 | 14.3 ± 0.9 |
| TetraEGDGE | 9.4 ± 0.6 | 14.4 ± 0.9 |
| EX 830 | 6.1 ± 0.4 | 9.4 ± 0.6 |
| EX 841 | 5.0 ± 0.3 | 7.6 ± 0.5 |
| EX 851 | 3.1 ± 0.2 | 4.8 ± 0.3 |
| BDDGE | 11.6 ± 0.7 | 17.8 ± 1.1 |

Tab. 4-3: Aminoendgruppenaktivierung mit Bisepoxiden an PA6-Hohlfasermembranen

Zur Beurteilung des Umsatzes werden für unbehandelte Ausgangsmembranen folgende Konzentrationen an Aminoendgruppen mittels *AM 1* ermittelt:

| | | |
|--------------------------|---|----------------------------------|
| Flachmembran: | $8.5 \pm 0.5 \mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $(13.1 \pm 0.8 \mu\text{mol/g})$ |
| Hohlfasermembran: | $10.3 \pm 0.7 \mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $(14.7 \pm 1.1 \mu\text{mol/g})$ |

Aminoendgruppenaktivierung mit Diglycidylethern in Kompletmodulen

Die Konditionierung der Dead-End-Module erfolgt gemäß Abb. 4-1 mit einem 2-PrOH/Wassergemisch (1:1). Hierzu werden zwei 50 mL-Spritzen mit den beiden Enden des Moduls verbunden und das Alkohol/Wassergemisch zunächst an dem Ende in das Modul gedrückt, welches die geschlossenen Enden der Hohlfaserschlaufen beherbergt. Anschließend drückt man die Flüssigkeit mehrfach in abwechselnder Richtung durch das Modul, wobei sich die ausgetragene Luft in den Spritzen sammelt.

Das konditionierte Modul wird schließlich in eine Kreislaufapparatur eingebaut, welche ein beheizbares Vorratsgefäß mit dem Modul über eine peristaltische Pumpe verbindet. In das Vorratsgefäß gibt man 0.025 M Na_2CO_3 -Lösung und pumpt ca. 50 mL hiervon durch das

Modul. Daß bei diesem Vorgang keine Luft eintritt, vermeidet man durch einen vorgeschalteten Dreiwegehahn. Zuletzt wird eine Lösung aus 50 mmol des Diglycidylethers in 50 mL 0.025 Na_2CO_3 (aq) in das Vorratsgefäß gegeben, auf 80 °C erwärmt und über die Pumpe für acht Stunden mit 20 mL/min im Kreis gefahren. Die mittlere Temperatur im Modul beträgt hierbei ca. 65 °C. Schließlich spült man mit mindestens 500 mL Wasser und trocknet das Modul mit abgeschraubten Endkappen im Vakuumtrockenschrank.

Die Epoxidgruppendifferenz wird nach Zerstörung des Moduls und Entnahme der diglycidyletheraktivierten Hohlfasern mittels *AM 2, Methode 1* ermittelt. Die in Tab. 4-3 dargestellten Ergebnisse werden hierbei in allen Fällen unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen reproduziert.

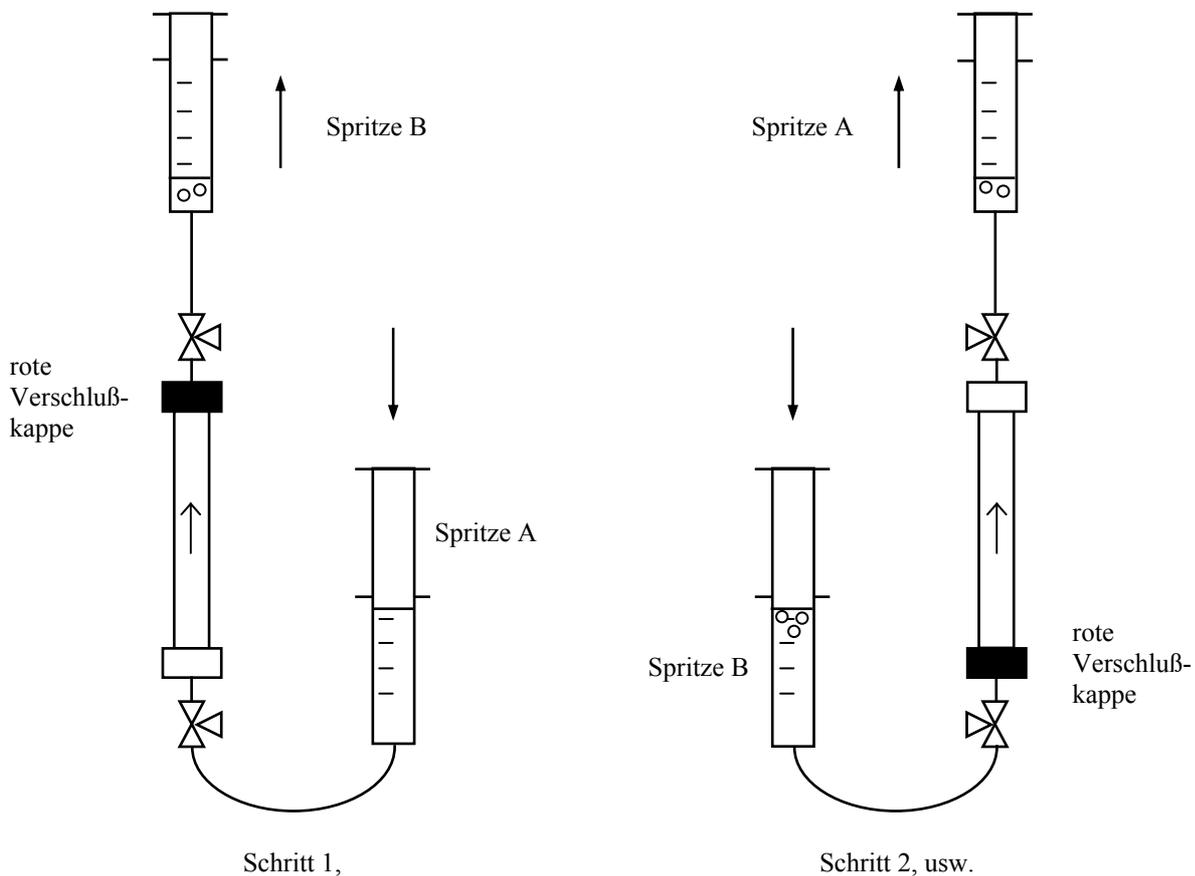


Abb. 4-1: Konditionierung der Module

4.4.2 Überführung terminaler Epoxidgruppen in Aldehyde

Maximal 1.0 g diglycidyletheraktivierter Membran werden acht Stunden in 0.4 N Natronlauge bei 60 °C geschüttelt. Anschließend wäscht man mehrfach mit Wasser und trocknet die Membran im Vakuumtrockenschrank. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wird mittels *AM 2, Methode 1* überprüft, wobei in allen Fällen weniger als 1.0 $\mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{cm}^3(\text{MV})$ gefunden werden. Die erhaltene Membran wird schließlich fünf Stunden in einer 0.03 M NaIO_4 -Lösung (aq) bei Raumtemperatur geschüttelt, mehrfach mit Wasser gewaschen und im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Die membrangebundenen Aldehydgruppen werden analog *AM 2, Methode 1* bestimmt, wobei die Umsetzung mit HDA durch Schütteln der Membran in einer Lösung aus 1.16 g (10 mmol) HDA und 0.31 g (5 mmol) NaCNBH_3 in 50 mL 3 mM Natronlauge für zwei Stunden bei Raumtemperatur erfolgt.

Ergebnisse für Flachmembranen:

| Aktivierung und anschl. Überführung in Aldehyde mit: | $\mu\text{mol}(\text{Aldehyd})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(\text{Aldehyd})/\text{g}$ |
|---|--|--|
| DGE | 4.0 ± 0.2 | 6.2 ± 0.3 |
| EGDGE | 4.2 ± 0.3 | 6.5 ± 0.5 |
| DiEGDGE | 4.7 ± 0.3 | 7.2 ± 0.5 |
| TriEGDGE | 3.8 ± 0.2 | 5.9 ± 0.3 |
| TetraEGDGE | 5.4 ± 0.3 | 8.3 ± 0.5 |
| EX 830 | 4.4 ± 0.3 | 6.8 ± 0.5 |
| EX 841 | 2.4 ± 0.1 | 3.7 ± 0.2 |
| EX 861 | 1.0 ± 0.1 | 1.5 ± 0.2 |
| BDDGE | 8.7 ± 0.5 | 13.4 ± 0.8 |

Tab. 4-4: Überführung terminaler Epoxidgruppen in Aldehyde

4.4.3 Umsetzungen diglycidyletheraktivierter Membranen mit Diaminen

Maximal 0.5 g einer gemäß Kap. 4.4.1 diglycidyletheraktivierten Membran werden zwei Stunden in einer Lösung aus 10 mmol des entsprechenden Diamins (1.16 g HDA bzw. 1.48 g EDODEA) in 50 mL 0.025 M Na₂CO₃ (aq) bei 50 °C geschüttelt und anschließend mehrfach mit kochendem Wasser gewaschen. Sobald kein Amin mehr im Waschwasser gefunden wird, trocknet man die erhaltene Membran im Vakuumtrockenschrank. Die erhaltenen Aminogruppendichten werden mittels *AM I* ermittelt.

Ergebnisse für Flachmembranen:

| Diglycidylether | Diamin | $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{g}$ |
|-----------------|--------|--|--|
| EGDGE | HDA | 11.5 ± 0.7 | 17.7 ± 1.1 |
| TriEGDGE | HDA | 9.1 ± 0.5 | 14.0 ± 0.8 |
| EX 830 | HDA | 7.8 ± 0.5 | 12.0 ± 0.8 |
| BDDGE | HDA | 12.8 ± 0.8 | 19.7 ± 1.2 |
| EGDGE | EDODEA | 9.4 ± 0.6 | 14.5 ± 0.9 |
| TriEGDGE | EDODEA | 7.8 ± 0.5 | 12.0 ± 0.8 |
| EX 830 | EDODEA | 7.0 ± 0.4 | 10.8 ± 0.6 |
| BDDGE | EDODEA | 12.4 ± 0.7 | 19.1 ± 1.1 |

Tab. 4-5: Umsetzung diglycidyletheraktivierter Flachmembranen mit Diaminen

4.4.4 Aufbau von dendritischen Strukturen

4.4.4.1 Aminoendgruppenaktivierung mit Pentaerythrit-tetraglycidylether (PETGE)

Zu einer Lösung aus 3.6 g (10 mmol) PETGE sowie 0.5 mL (0.37 g; 2.9 mmol) Ethyldiisopropylamin in 10 mL abs. Dioxan gibt man 200 mg der zu aktivierenden Membran und schüttelt 16 Stunden bei einer Temperatur von 80 °C.

Anschließend wäscht man nacheinander mit Dioxan, EtOH sowie mehrfach mit Wasser. Die erhaltene Membran wird im Vakuumtrockenschrank getrocknet und über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt.

Mittels *AM 2, Methode 1* werden für eine mit PETGE aktivierte Flachmembran $8.4 \pm 0.5 \mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{cm}^3(\text{MV})$ bzw. $12.9 \pm 0.8 \mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{g}$ bestimmt.

Mittels *AM 2, Methode 2* werden an derselben Membran $5.5 \pm 0.6 \mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{cm}^3(\text{MV})$ bzw. $8.5 \pm 0.9 \mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{g}$ bestimmt.

4.4.4.2 Umsetzungen diglycidyletheraktivierter Membranen mit Polyaminen

Maximal 0.5 g einer gemäß Kap. 4.4.1 diglycidyletheraktivierten Membran werden zwei Stunden in einer Lösung aus 10 mmol des entsprechenden Polyamins (1.46 g TAEA bzw. 1.32 g TAMM) in 50 mL 0.025 M Na_2CO_3 (aq) bei 50 °C geschüttelt und anschließend mehrfach mit kochendem Wasser gewaschen. Sobald kein Amin mehr im Waschwasser gefunden wird, trocknet man die erhaltene Membran im Vakuumtrockenschrank. Die erhaltenen Aminogruppendichten werden mittels *AM 1* ermittelt.

Ergebnisse für Flachmembranen:

| Diglycidylether | Polyamin | $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{g}$ |
|-----------------|----------|--|--|
| EGDGE | TAEA | 11.3 ± 0.7 | 17.3 ± 1.0 |
| TriEGDGE | TAEA | 9.5 ± 0.6 | 14.6 ± 0.9 |
| EX 830 | TAEA | 9.4 ± 0.6 | 14.4 ± 0.9 |
| BDDGE | TAEA | 13.4 ± 0.8 | 20.6 ± 1.2 |
| EGDGE | TAMM | 7.5 ± 0.5 | 11.5 ± 0.7 |
| TriEGDGE | TAMM | 6.8 ± 0.4 | 10.5 ± 0.6 |
| EX 830 | TAMM | 6.2 ± 0.4 | 9.6 ± 0.6 |
| BDDGE | TAMM | 8.7 ± 0.5 | 13.4 ± 0.8 |

Tab. 4-6: Umsetzung diglycidyletheraktivierter Flachmembranen mit Polyaminen

4.4.4.3 Aminoendgruppenaktivierung mit Acrylsäurechlorid und Addition von Polyaminen

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Aminoendgruppenaktivierung mit Acrylsäurechlorid

Entsprechend der Konzentration primärer und sekundärer Aminogruppen einer zu aktivierenden Membran n [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3$] wird eine Lösung mit $n \cdot (45.3 \text{ mg}; 40.6 \mu\text{L}; 0.5 \text{ mmol})$ Acrylsäurechlorid sowie $n \cdot (77.5 \text{ mg}; 104.5 \mu\text{L}; 0.6 \text{ mmol})$ Ethyldiisopropylamin je Liter abs. CH_2Cl_2 hergestellt. Zu 100 mL dieser Lösung gibt man 0.5 g der Membran und schüttelt vier Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wäscht man viermal mit CH_2Cl_2 und trocknet die acrylamidaktivierte Membran im Vakuumtrockenschrank. Die Vollständigkeit der Umsetzung wird mittels *AM I* überprüft.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Polyamin-Addition an acrylamidaktivierte Membranen

0.5 g acrylamidaktivierte Membran werden drei Tage bei einer Temperatur von $75 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Lösung aus 10 mmol des entsprechenden Polyamins (1.16 g HDA, 2.12 g $\text{HDA}(\text{C}(\text{O})\text{CF}_3)$, 1.48 g EDODEA, 2.44 g $\text{EDODEA}(\text{C}(\text{O})\text{CF}_3)$, 1.46 g TAEA, 3.38 g $\text{TAEA}(\text{C}(\text{O})\text{CF}_3)_2$, 1.32 g TAMM bzw. 1.89 g TEPA) in 30 mL abs. DMF geschüttelt. Anschließend wäscht man die erhaltene Membran nacheinander mit DMF, MeOH sowie mehrfach mit kochendem Wasser. Nachdem kein Amin mehr im Waschwasser gefunden wird, trocknet man die erhaltenen Proben im Vakuumtrockenschrank. Die Konzentrationen primärer Aminogruppen wird mittels *AM I* bestimmt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe

In 50 mL eines Gemisches aus 25 Teilen 0.5 M K_2CO_3 (aq) und 75 Teilen MeOH (v/v) werden 0.5 g mit trifluoracetylgeschütztem Polyamin aktivierte Membran zwei Stunden bei Rückfluß erhitzt. Man wäscht anschließend mehrfach mit kochendem Wasser und trocknet die erhaltenen Membranen im Vakuumtrockenschrank. Die Konzentrationen primärer Aminogruppen wird mittels *AM I* bestimmt.

Ergebnisse für Flachmembranen:

Die Umsetzung der PA6-Flachmembran mit Acrylsäurechlorid wird gemäß *AM 1* überprüft, wobei weniger als **0.5 $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$** gefunden werden.

Diese Membran wird mit verschiedenen Polyaminen umgesetzt, wobei sich folgende Konzentrationen an primären Aminogruppen ergeben:

| Polyamin | $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{g}$ |
|---|--|--|
| HDA | 9.1 ± 0.6 | 14.0 ± 0.8 |
| HDA(C(O)CF ₃) | 8.3 ± 0.5 | 12.8 ± 0.8 |
| EDODEA | 8.6 ± 0.5 | 13.2 ± 0.8 |
| EDODEA(C(O)CF ₃) | 7.5 ± 0.5 | 11.6 ± 0.7 |
| TAEA | 17.9 ± 0.9 | 27.5 ± 1.7 |
| TAEA(C(O)CF ₃) ₂ | 7.9 ± 0.4 | 12.2 ± 0.7 |
| TAMM | 22.2 ± 1.1 | 34.2 ± 2.1 |
| TEPA | 9.8 ± 0.6 | 15.0 ± 0.9 |

Tab. 4-7: Umsetzung acrylamidaktivierter Flachmembranen mit Polyaminen

Die so erhaltenen Membranen werden erneut mit Acrylsäurechlorid umgesetzt, wonach in allen Fällen Konzentrationen von weniger als **1.0 $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$** ermittelt werden.

Schließlich erfolgt eine zweite Addition verschiedener Polyamine an diese acrylamidaktivierten Membranen. Es ergeben sich hierbei folgende Meßwerte:

| Polyamin 1. Addition | Polyamin 2. Addition | $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{g}$ |
|--------------------------------|--------------------------------|--|--|
| EDODEA | HDA | 5.8 ± 0.4 | 8.9 ± 0.5 |
| EDODEA | HDA(C(O)CF ₃) | 11.2 ± 0.7 | 17.2 ± 1.0 |
| EDODEA | EDODEA | 7.1 ± 0.4 | 10.9 ± 0.7 |
| EDODEA | EDODEA(C(O)CF ₃) | 12.3 ± 0.7 | 18.9 ± 1.1 |
| TAEA | HDA | 9.3 ± 0.6 | 14.3 ± 0.9 |
| TAEA | HDA(C(O)CF ₃) | 12.5 ± 0.8 | 19.2 ± 1.2 |

Tab. 4-8: Umsetzung acrylamidaktivierter Flachmembranen mit Polyaminen (2. Addition)

| | | | |
|------|------------------------------|-------------------|------------|
| TAEA | EDODEA | 8.7 ± 0.5 | 13.3 ± 0.8 |
| TAEA | EDODEA(C(O)CF ₃) | 18.6 ± 1.1 | 28.6 ± 1.7 |
| TEPA | HDA | 9.5 ± 0.6 | 14.6 ± 0.9 |
| TEPA | HDA(C(O)CF ₃) | 18.6 ± 1.1 | 28.6 ± 1.7 |
| TEPA | EDODEA | 12.2 ± 0.7 | 18.8 ± 1.1 |
| TEPA | EDODEA(C(O)CF ₃) | 27.4 ± 1.6 | 42.2 ± 2.5 |

Tab. 4-8: Umsetzung acrylamidaktivierter Flachmembranen mit Polyaminen (2. Addition),
Fortsetzung

4.5 Ligandenimmobilisationen

4.5.1 Protein-Immobilisationen

4.5.1.1 Immobilisation von BSA

Herstellung der Pufferlösung

Für die Immobilisation von BSA wird eine Pufferlösung verwendet, die man durch Lösen von 177.6 g (1.25 mol) Na_2SO_4 und 10.6 g (0.1 mol) Na_2CO_3 in einem Liter Wasser sowie anschließende Einstellung des pH-Wertes auf 11.5 mittels 0.1 N Natronlauge und Filtration erhält.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Immobilisation von Serumalbumin (BSA/HSA)

Vor der BSA-Immobilisation wird eine nach Kap. 4.4.1 diglycidyletheraktivierte Membran für 30 Minuten in einem 2-PrOH/Wasser-Gemisch (1:1) geschüttelt. Anschließend wäscht man mehrfach mit Wasser und inkubiert für weitere 30 Minuten in der oben angegebenen Pufferlösung.

Die Immobilisation erfolgt dann durch 24-stündiges Schütteln von maximal 1 g der vorbehandelten Membran in 50 mL einer Lösung aus 10 g BSA in einem Liter der Pufferlösung bei einer Temperatur von 37 °C.

Nach beendeter Immobilisation wäscht man die Membran mit Pufferlösung sowie mehrfach mit Wasser. Anschließend schüttelt man die Membranen jeweils eine Stunde bei 37 °C mit 0.1 M wässriger Zitronensäure, 10 %iger wässriger SDS-Lösung und schließlich mit 6.0 M wässriger Harnstofflösung. Nach jedem Schüttelvorgang wird mehrfach mit Wasser gewaschen.

Die gewaschene BSA-immobilisierte Membran wird im Fall einer durchzuführenden Bestimmung von membrangebundenem Protein im Vakuumtrockenschrank getrocknet und über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt. In allen anderen Fällen erfolgt die Lagerung in PBS mit einem Zusatz von 0.05 % Natriumazid bei einer Temperatur von 4 °C.

Die Menge an membrangebundenem Protein wird gemäß *AM 3, Methode 2* ohne vorherige Hydrolyse ermittelt.

Ergebnisse für Flachmembranen:

| Aktivierung mit: | mg(BSA)/cm³ | μmol(BSA)/cm³ | mg(BSA)/g | μmol(BSA)/g |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------|--------------------|
| ohne Aktivierung | 11.6 ± 1.2 | 0.17 ± 0.02 | 17.9 ± 1.8 | 0.26 ± 0.03 |
| DGE | 9.7 ± 1.0 | 0.15 ± 0.02 | 14.9 ± 1.5 | 0.22 ± 0.03 |
| EGDGE | 9.9 ± 1.0 | 0.15 ± 0.02 | 15.2 ± 1.5 | 0.23 ± 0.03 |
| DiEGDGE | 11.2 ± 1.1 | 0.17 ± 0.02 | 17.2 ± 1.7 | 0.26 ± 0.03 |
| TriEGDGE | 10.9 ± 1.1 | 0.16 ± 0.02 | 16.8 ± 1.7 | 0.25 ± 0.03 |
| TetraEGDGE | 8.6 ± 0.9 | 0.13 ± 0.02 | 13.2 ± 1.4 | 0.20 ± 0.03 |
| Denacol EX 830 | 8.8 ± 0.9 | 0.13 ± 0.02 | 13.5 ± 1.4 | 0.20 ± 0.03 |
| BDDGE | 11.1 ± 1.1 | 0.17 ± 0.02 | 17.1 ± 1.7 | 0.26 ± 0.03 |

Tab. 4-9: BSA-Immobilisation an diglycidyletheraktivierte PA6-Flachmembranen*Ergebnisse für Hohlfasermembranen:*

| Aktivierung mit: | mg(BSA)/cm³ | μmol(BSA)/cm³ | mg(BSA)/g | μmol(BSA)/g |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------|--------------------|
| ohne Aktivierung | 14.0 ± 1.4 | 0.206 ± 0.02 | 21.5 ± 2.2 | 0.317 ± 0.03 |
| TriEGDGE | 16.1 ± 1.6 | 0.237 ± 0.02 | 24.8 ± 2.5 | 0.365 ± 0.03 |
| Denacol EX 830 | 11.3 ± 1.1 | 0.166 ± 0.02 | 17.3 ± 1.7 | 0.255 ± 0.03 |
| BDDGE | 14.0 ± 1.7 | 0.206 ± 0.02 | 21.5 ± 2.2 | 0.317 ± 0.03 |

Tab. 4-10: BSA-Immobilisation an diglycidyletheraktivierte PA6-Hohlfasermembranen*Blindwerte:*

Zum Nachweis einer kovalenten BSA-Immobilisation werden Blindwerte an diglycidylether-aktivierten Flachmembranen, deren Epoxidgruppen mittels der in Kap. 4.4.2 beschriebenen Weise zu Diolen überführt wurden, ermittelt. Nach Anwendung der BSA-Immobilisations- und Waschprozedur an diesen Membranen erhält man folgende Proteinbelegungsdichten: PA6-DGE: 1.6 mg/cm³, PA6-EGDGE: 2.8 mg/cm³, PA6-DiEGDGE: 1.9 mg/cm³, PA6-TriEGDGE: 1.7 mg/cm³, PA6-TetraEGDGE: 1.7 mg/cm³, PA6-EX 830: 1.1 mg/cm³, PA6-BDDGE: 1.8 mg/cm³. Die in der Tabelle 4-9 angegebenen Daten wurden um diese Werte korrigiert.

Komplettmodule

Die Immobilisation von BSA an Hohlfasermembranen in Komplettmodulen erfolgt analog der in Kap. 4.4.1 beschriebenen Methode für die Diglycidyletheraktivierung. Nach Konditionierung des Moduls mit 2-PrOH/Wassergemisch spült man nacheinander mit je 100 mL Wasser und Immobilisationspuffer. Anschließend fährt man 100 mL einer auf 37 °C erwärmten Lösung aus 10 g BSA je Liter Pufferlösung für 24 Stunden im Kreislauf. Zuletzt spült man das Modul nacheinander mit Pufferlösung, Wasser sowie mit jeweils 250 mL 0.1 M wässriger Zitronensäure, 10 %iger wässriger SDS-Lösung, 6.0 M wässriger Harnstofflösung und schließlich nochmals mit Wasser. Zur Aufbewahrung bei 4 °C wird das Modul mit PBS, welches 0.05 % Natriumazid enthält, befüllt. Zur Bestimmung von membrangebundenem Protein wird das Modul im Vakuumtrockenschrank bis zur Massenkonstanz getrocknet. Die Konzentrationen an membrangebundenem Protein wird nach Zerstörung des Moduls und Entnahme der BSA-immobilisierten Hohlfasern mittels *AM 3, Methode 2* ohne vorherige Hydrolyse ermittelt. Die in Tab. 4-10 dargestellten Ergebnisse für lose Hohlfasern werden hierbei in allen Fällen unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen reproduziert.

Bestimmung der Epoxidgruppendichte nach Anwendung der Immobilisationsprozedur

Um zu überprüfen, ob nach Durchführung der BSA-Immobilisations- und Waschprozedur noch Epoxidgruppen auf der Membranoberfläche vorhanden sind, wird eine TriEGDGE-aktivierte Flachmembran analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur BSA-Immobilisation behandelt, wobei jedoch kein Protein zugegeben wird. Nach jedem Schritt des angewendeten Protokolls bestimmt man die Konzentration an membrangebundenem Epoxid mittels *AM 2, Methode 1*, wobei sich folgende Meßwerte ergeben.

| durchgeführter Vorgang: | µmol(Epoxid)/cm³(MV) | µmol(Epoxid)/g |
|----------------------------------|--|-----------------------|
| Aktivierung mit TriEGDGE | 9.6 ± 1,2 | 14.8 ± 2.0 |
| Immobilisations-Protokoll | 10.9 ± 1.2 | 16.8 ± 1.9 |
| Schütteln in 0.1 M Zitronensäure | 8.2 ± 1.2 | 12.6 ± 1.9 |
| Schütteln in 10 %iger SDS-Lösung | 7.9 ± 1.2 | 12.2 ± 1.9 |
| Schütteln in 6 M Harnstofflösung | 8.2 ± 1.2 | 12.6 ± 1.9 |

Tab. 4-11: Membrangebundene Epoxidgruppen nach Anwendung der BSA-Immobilisations- und Waschprozedur

4.5.1.2 Immobilisation von Glucose-Oxidase (GOx)

Immobilisation von Glucose-Oxidase an diglycidyletheraktivierte Membranen

Vor der GOx-Immobilisation wird eine nach Kap. 4.4.1 diglycidyletheraktivierte Membran 30 Minuten in einem 2-PrOH/Wasser-Gemisch (1:1) geschüttelt. Anschließend wäscht man mehrfach mit Wasser und inkubiert weitere 30 Minuten in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.2).

Die Immobilisation erfolgt dann durch 48-stündiges Schütteln von maximal 0.5 g der vorbehandelten Membran in 50 mL einer Lösung aus 10 g GOx (*Aspergillus niger*, 166.500 U/g) in einem Liter 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.2) bei einer Temperatur von 4 °C bzw. 25 °C. Nach beendeter Immobilisation wäscht man die Membran mit Pufferlösung sowie mehrfach mit Wasser.

Die gewaschene GOx-immobilisierte Membran wird im Fall einer durchzuführenden Bestimmung von membrangebundenem Protein im Exsikkator getrocknet und über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt.

In allen anderen Fällen erfolgt die Lagerung in 0.1 M Phosphatpuffer mit einem Zusatz von 0.05 % Natriumazid bei einer Temperatur von 4 °C.

Die Menge an membrangebundenem Protein wird gemäß *AM 3, Methode 2* ohne vorherige Hydrolyse ermittelt.

Ergebnisse für Flachmembranen:

| Aktivierung mit: | mg(GOx)/cm ³ (MV) | mg(GOx)/cm ³ (MV) |
|------------------|------------------------------|------------------------------|
| | (Immobilisation bei 4 °C) | (Immobilisation bei 25 °C) |
| ohne Aktivierung | 0.5 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 |
| EGDGE | 4.0 ± 0.6 | 5.3 ± 0.7 |
| TriEGDGE | 4.0 ± 0.6 | 5.0 ± 0.7 |
| Denacol EX 830 | 4.4 ± 0.6 | 4.9 ± 0.7 |
| BDDGE | 5.3 ± 0.7 | 5.0 ± 0.7 |

Tab. 4-12: GOx-Immobilisation an diglycidyletheraktivierte PA6-Flachmembranen

Immobilisation von Glucose-Oxidase an aldehydaktivierte Membranen

Die Immobilisation von GOx an aldehydaktivierte (Überführung terminaler Epoxidgruppen in Aldehyde gemäß Kap. 4.4.1) Membranen erfolgt analog der für diglycidyletheraktivierte Membranen beschriebenen Vorgehensweise.

Die Menge an membrangebundenem Protein wird gemäß *AM 3, Methode 2* ohne vorherige Hydrolyse ermittelt.

Ergebnisse für Flachmembranen:

| Aktivierung und anschl. Überführung in Aldehyde mit: | mg(GOx)/cm³(MV) (Immobilisation bei 4 °C) | mg(GOx)/cm³(MV) (Immobilisation bei 25 °C) |
|---|--|---|
| EGDGE | 4.4 ± 0.6 | 4.7 ± 0.7 |
| TriEGDGE | 3.2 ± 0.5 | 4.5 ± 0.6 |
| Denacol EX 830 | 2.9 ± 0.4 | 3.6 ± 0.5 |
| BDDGE | 3.3 ± 0.5 | 3.8 ± 0.5 |

Tab. 4-13: GOx-Immobilisation an aldehydaktivierte PA6-Flachmembranen

Bestimmung der enzymatischen Aktivität der GOx-immobilisierten Membranen

Mittels *AM 7* wird die Umsatz-Zeitabhängigkeit der Glucose-Oxidation einer zu untersuchenden Membranprobe ermittelt, wobei der zeitliche Verlauf der Reaktion verfolgt wird, bis sich die gemessene Extinktion nicht mehr ändert. Für die letzte gemessene H₂O₂-Konzentration einer Meßreihe wird ein vollständiger Glucoseabbau angenommen, so daß sich alle anderen Glucosekonzentrationen aus den gemessenen H₂O₂-Konzentration ergeben.

Zu jeder Meßreihe wird eine Gesamtgeschwindigkeitskonstante k aus der Steigung folgender Geradengleichung ermittelt:

$$\ln\left(\frac{c_t(\text{Glucose})}{c_0(\text{Glucose})}\right) = -k \cdot t \quad \text{Gl. 4-2}$$

Die Angabe der enzymatischen Aktivität einer untersuchten Membranprobe wird dann in Form der relativen Geschwindigkeitskonstanten bezogen auf native GOx angegeben.

Für letztere ermittelt man die Umsatz-Zeitabhängigkeit entsprechend der für GOx-immobilisierte Membranproben beschriebenen Vorgehensweise.

Ergebnisse für die in Tab. 4-12 aufgeführten Flachmembranen:

| Aktivierung mit: | rel. Aktivität [%] (bez. auf native GOx, Immobilisation bei 4 °C) | rel. Aktivität [%] (bez. auf native GOx, Immobilisation bei 25 °C) |
|-------------------------|--|---|
| EGDGE | 3.4 | 2.7 |
| TriEGDGE | 4.4 | 3.2 |
| Denacol EX 830 | 3.7 | 3.5 |
| BDDGE | 4.7 | 4.7 |

Tab. 4-14: Relative enzymatische Aktivitäten der untersuchten GOx-immobilisierten Flachmembranen

Ergebnisse für die in Tab. 4-13 aufgeführten Flachmembranen:

| Aktivierung und anschl. Überführung in Aldehyde mit: | rel. Aktivität [%] (bez. auf native GOx, Immobilisation bei 4 °C) | rel. Aktivität [%] (bez. auf native GOx, Immobilisation bei 25 °C) |
|---|--|---|
| EGDGE | 11.5 | 9.8 |
| TriEGDGE | 6.8 | 6.3 |
| Denacol EX 830 | 3.0 | 2.9 |
| BDDGE | 8.6 | 7.1 |

Tab. 4-15: Relative enzymatische Aktivitäten der untersuchten GOx-immobilisierten Flachmembranen

4.5.2 Immobilisation von Reaktivfarbstoffen

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Immobilisation von Reaktivfarbstoffen (Standardprotokoll für amino- und epoxyfunktionelle Membranen)

Etwa 0.5 g Membran werden eine Stunde in 30 mL einer 1 %igen Lösung des Reaktivfarbstoffes in 6 %iger NaCl (aq) geschüttelt. Anschließend gibt man 15 mL 1.0 M Na₂CO₃ (aq) hinzu und schüttelt 20 Stunden bei einer Temperatur von 50 °C.¹⁹⁶

Die erhaltene Membran wird nacheinander mit kochendem Wasser, 10 %iger SDS-Lösung und wiederum mehrfach mit kochendem Wasser gewaschen, bis kein Farbstoff mehr im Waschwasser nachzuweisen ist. Schließlich trocknet man im Vakuumtrockenschrank und bewahrt die farbstoffimmobilisierte Membran im Exsikkator über Molekularsieb (4 Å) auf.

Die gebundene Farbstoffmenge wird gemäß *AM 4* ermittelt. Ein Blindwert wird durch Anwendung der Immobilisationsprozedur an einer Membran mit blockierten Aminoendgruppen ermittelt. Letztere wird erhalten, indem man 0.5 g einer unmodifizierten Membran zwei Stunden in einer Lösung aus 1.4 mL (1.4 g; 10 mmol) Hexansäurechlorid sowie 1.7 mL (1.3 g; 10 mmol) Ethyldiisopropylamin in 50 mL abs. CH₂Cl₂ bei Raumtemperatur schüttelt, mehrfach mit CH₂Cl₂ wäscht und schließlich im Vakuumtrockenschrank trocknet. Nach Umsetzung mit Hexansäurechlorid findet man mittels *AM 1* $< 0.5 \mu\text{mol}(-\text{NH}_2)/\text{cm}^3(\text{MV})$. Die an der blockierten Membran gefundenen Farbstoffbelegungsichten betragen in allen Fällen weniger als $2.0 \mu\text{mol}(\text{CB F3G-A})/\text{cm}^3(\text{MV})$.

Ergebnisse für diglycidyletheraktivierte Flachmembranen aus Kap. 4.4.1:

| Aktivierung mit: | $\mu\text{mol}(\text{CB F3G-A})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(\text{CB F3G-A})/\text{g}$ |
|------------------|---|---|
| Blindwert | $< 2.0 \pm 0.1$ | $< 3.1 \pm 0.2$ |
| ohne Aktivierung | 14.3 ± 0.7 | 22.1 ± 1.1 |
| EGDGE | 7.6 ± 0.4 | 11.7 ± 0.6 |
| TriEGDGE | 8.2 ± 0.4 | 12.6 ± 0.6 |
| EX 830 | 7.7 ± 0.4 | 11.8 ± 0.6 |
| BDDGE | 10.7 ± 0.5 | 16.4 ± 0.8 |

Tab. 4-16: Cibacron F3G-A-Immobilisation an diglycidyletheraktivierte PA6-Flachmembranen

Ergebnisse für diaminaktivierte Flachmembranen aus Kap. 4.4.2:

| Diglycidylether | Diamin | $\mu\text{mol}(\text{CB F3G-A})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(\text{CB F3G-A})/\text{g}$ |
|------------------------|---------------|---|---|
| EGDGE | HDA | 25.2 ± 1.3 | 38.7 ± 2.0 |
| TriEGDGE | HDA | 20.9 ± 1.1 | 32.2 ± 1.7 |
| EX 830 | HDA | 18.5 ± 0.9 | 28.5 ± 1.4 |
| BDDGE | HDA | 40.0 ± 2.0 | 61.5 ± 3.1 |
| EGDGE | EDODEA | 21.8 ± 1.1 | 33.5 ± 1.7 |
| TriEGDGE | EDODEA | 19.1 ± 1.0 | 29.3 ± 1.5 |
| EX 830 | EDODEA | 16.0 ± 0.8 | 24.6 ± 1.2 |
| BDDGE | EDODEA | 31.6 ± 1.6 | 48.6 ± 2.5 |

Tab. 4-17: Cibacron F3G-A-Immobilisation an diaminaktivierte PA6-Flachmembranen

Ergebnisse für dendritisch aktivierte Flachmembranen aus Kap. 4.4.3.3:

| Polyamin 1. Addition | Polyamin 2. Addition | $\mu\text{mol}(\text{CB F3G-A})/$ $\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(\text{CB F3G-A})/$ g |
|--------------------------------|--------------------------------|--|--|
| EDODEA | EDODEA | 17.9 ± 0.9 | 27.5 ± 1.4 |
| EDODEA | EDODEA(C(O)CF ₃) | 19.9 ± 1.0 | 30.6 ± 1.5 |
| TAEA | EDODEA | 23.3 ± 1.2 | 35.8 ± 1.9 |
| TAEA | EDODEA(C(O)CF ₃) | 27.1 ± 1.4 | 41.7 ± 2.2 |
| TEPA | EDODEA | 32.5 ± 1.6 | 50.0 ± 2.5 |
| TEPA | EDODEA(C(O)CF ₃) | 46.3 ± 2.3 | 71.2 ± 3.5 |

Tab. 4-18: Cibacron-F3G-A-Immobilisation an dendritisch aktivierte PA6-Flachmembranen

Ergebnisse zur Immobilisation von verschiedenen Reaktivfarbstoffen an BDDGE- und BDDGE-EDODEA-aktivierte Flachmembranen:

| Reaktivfarbstoff | Membran | $\mu\text{mol}(\text{Farbstoff})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | $\mu\text{mol}(\text{Farbstoff})/\text{g}$ |
|-------------------------|------------------|--|--|
| Cibacron Blue F3G-A | PA6-BDDGE | 10.7 ± 0.5 | 16.5 ± 0.8 |
| Procion Blue MX-R | PA6-BDDGE | 12.6 ± 0.6 | 19.4 ± 0.9 |
| Alkali Blue 6 B | PA6-BDDGE | 9.4 ± 0.5 | 14.5 ± 0.8 |
| Congo Red | PA6-BDDGE | 13.1 ± 0.7 | 20.2 ± 1.1 |
| Cibacron Blue F3G-A | PA6-BDDGE-EDODEA | 31.6 ± 1.6 | 48.6 ± 2.5 |
| Procion Blue MX-R | PA6-BDDGE-EDODEA | 22.9 ± 1.2 | 35.2 ± 1.9 |

Tab. 4-19: Vergleich zur Immobilisation unterschiedlicher Reaktivfarbstoffe an BDDGE- und BDDGE-EDODEA-aktivierte Flachmembranen

4.5.3 Immobilisation von β -Cyclodextrin

Immobilisation von β -Cyclodextrin an diglycidyletheraktivierte Membranen

1.14 g (1.0 mmol) wasserfreies β -Cyclodextrin werden unter Argonatmosphäre in 20 mL abs. DMF gelöst. Man gibt 48 mg (1.2 mmol) Natriumhydrid (60 %ige Suspension in Paraffin) hinzu und rührt 20 Stunden bei Raumtemperatur. Zu der klaren Lösung gibt man 0.5 g einer nach Kap. 4.4.1 diglycidyletheraktivierten Flachmembran und schüttelt 48 Stunden bei einer Temperatur von 80 °C. Zuletzt wäscht man die erhaltene Membran mit DMF sowie mehrfach mit kochendem Wasser und trocknet im Vakuumtrockenschrank.

Mittels *AM 5, Methode 1* wird ein Umsatz von 87 % für eine TriEGDGE-aktivierte Flachmembran bzw. von 92 % für eine BDDGE-aktivierte Flachmembran ermittelt. Aus diesen Werten ergeben sich folgende Stoffmengen an gebundenem β -Cyclodextrin:

TriEGDGE-aktiviert: $7.9 \pm 0.5 \mu\text{mol}(\beta\text{-CyD})/\text{cm}^3(\text{MV})$ ($12.2 \pm 0.7 \mu\text{mol}(\beta\text{-CyD})/\text{g}$)
BDDGE-aktiviert: $11.8 \pm 0.7 \mu\text{mol}(\beta\text{-CyD})/\text{cm}^3(\text{MV})$ ($18.2 \pm 1.1 \mu\text{mol}(\beta\text{-CyD})/\text{g}$)

*Immobilisation von TosO-**b**-CyD an diaminaktivierte Membranen aus Kap. 4.4.3*

Vor der Immobilisation wird eine nach Kap. 4.4.3 diaminaktivierte Membran 30 Minuten in einem 2-PrOH/Wasser-Gemisch (1:1) geschüttelt. Anschließend wäscht man mehrfach mit Wasser und inkubiert für weitere 30 Minuten in 0.05 M Na₂CO₃ (aq).

Zu 50 mL einer einprozentigen Lösung von TosO- β -CyD in 0.05 M Na₂CO₃ (aq) gibt man maximal 0.5 g der vorbehandelten Flachmembran. Man schüttelt 72 Stunden bei einer Temperatur von 80 °C und wäscht die erhaltene Membran schließlich mehrfach mit kochendem Wasser.

Die Menge an gebundenem β -CyD wird nach Trocknung im Vakuumtrockenschrank mittels AM 5, Methode 1 ermittelt.

Ergebnisse:

| Membran | $\mu\text{mol}(\text{Amin})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | | | $\mu\text{mol}(\text{b-CyD})/\text{cm}^3(\text{MV})$ |
|---------------------|---|-------------------------------------|---------------------|--|
| | vor Immobilisation | Blindwert (ohne TosO- β -CyD) | nach Immobilisation | |
| PA6-EGDGE-EDODEA | 9.4 ± 0.6 | 9.2 ± 0.6 | 4.6 ± 0.3 | 4.6 ± 0.3 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA | 7.8 ± 0.5 | 7.9 ± 0.5 | 4.2 ± 0.3 | 3.7 ± 0.2 |
| PA6-EX 830-EDODEA | 7.0 ± 0.4 | 7.3 ± 0.4 | 4.3 ± 0.3 | 3.0 ± 0.2 |
| PA6-BDDGE-EDODEA | 12.4 ± 0.7 | 12.0 ± 0.7 | 7.3 ± 0.5 | 4.7 ± 0.3 |

Tab. 4-20: TosO- β -CyD-Immobilisation an diaminaktivierte Flachmembranen

*Immobilisation von NH₂-**b**-CyD an diglycidyletheraktivierte Membranen*

Vor der Immobilisation wird eine nach Kap. 4.4.1 diglycidyletheraktivierte Membran 30 Minuten in einem 2-PrOH/Wasser-Gemisch (1:1) geschüttelt. Anschließend wäscht man mehrfach mit Wasser und inkubiert für weitere 30 Minuten in 0.025 M Na₂CO₃ (aq).

Die Anbindung erfolgt dann durch achtstündiges Schütteln von maximal 0.5 g der vorbehandelten Membran in 50 mL einer fünfprozentigen NH₂-**b**-CyD-Lösung in 0.025 M Na₂CO₃ (aq) bei einer Temperatur von 80 °C. Schließlich wäscht man die erhaltene Membran mehrfach mit kochendem Wasser und trocknet sie im Vakuumtrockenschrank.

Die Menge an gebundenem β -CyD wird mittels AM 5, Methode 1 ermittelt.

Ergebnisse:

| Membran | $\mu\text{mol}(\text{Epoxid})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | | | $\mu\text{mol}(\text{b-CyD})/\text{cm}^3(\text{MV})$ |
|--------------|---|--|---------------------|--|
| | vor Immobilisation | Blindwert (ohne $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CyD}$) | nach Immobilisation | |
| PA6-EGDGE | 11.5 ± 0.7 | 7.8 ± 0.5 | 5.3 ± 0.3 | 2.5 ± 0.1 |
| PA6-TriEGDGE | 9.1 ± 0.6 | 5.9 ± 0.3 | 3.4 ± 0.2 | 2.6 ± 0.1 |
| PA6-EX 830 | 7.8 ± 0.5 | 5.4 ± 0.3 | 3.1 ± 0.2 | 2.3 ± 0.1 |
| PA6-BDDGE | 12.8 ± 0.8 | 8.8 ± 0.5 | 6.2 ± 0.4 | 2.6 ± 0.1 |

Tab. 4-21: $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CyD}$ -Immobilisation an diglycidyletheraktivierte Flachmembranen

*Immobilisation von NCS-**b**-CyD an diaminaktivierte Membranen aus Kap. 4.4.3*

Vor der Immobilisation wird eine nach Kap. 4.4.3 diaminaktivierte Membran 30 min. in einem 2-PrOH/Wasser-Gemisch (1:1) geschüttelt. Anschließend wäscht man mehrfach mit Wasser. Maximal 0.5 g der auf diese Weise vorbehandelten Membran gibt man zu 50 mL einer einprozentigen wässrigen Lösung von NCS- $\beta\text{-CyD}$. Man schüttelt acht Stunden bei Raumtemperatur und wäscht die erhaltene Membran schließlich mehrfach mit kochendem Wasser. Die Menge an gebundenem $\beta\text{-CyD}$ wird nach Trocknung im Vakuumtrockenschrank mittels AM 5, Methode 1 ermittelt.

Ergebnisse:

| Membran | $\mu\text{mol}(\text{Amin})/\text{cm}^3(\text{MV})$ | | | $\mu\text{mol}(\text{b-CyD})/\text{cm}^3(\text{MV})$ |
|---------------------|---|--|---------------------|--|
| | vor Immobilisation | Blindwert (ohne NCS- $\beta\text{-CyD}$) | nach Immobilisation | |
| PA6-EGDGE-EDODEA | 9.4 ± 0.6 | 9.2 ± 0.6 | 1.0 ± 0.3 | 8.2 ± 0.5 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA | 7.8 ± 0.5 | 7.9 ± 0.5 | 1.1 ± 0.3 | 6.8 ± 0.4 |
| PA6-EX 830-EDODEA | 7.0 ± 0.4 | 7.3 ± 0.4 | 1.5 ± 0.3 | 5.8 ± 0.4 |
| PA6-BDDGE-EDODEA | 12.4 ± 0.7 | 12.0 ± 0.7 | 0.9 ± 0.5 | 11.1 ± 0.7 |

Tab. 4-22: NCS- $\beta\text{-CyD}$ -Immobilisation an diaminaktivierte Flachmembranen

4.6 Adsorption proteingebundener Toxine

4.6.1 Bestimmung der Bilirubin-Adsorptionsisothermen

Anmerkung: Wegen der Lichtempfindlichkeit von Bilirubin werden alle Versuche in einem abgedunkelten Raum mit schwacher Rotlichtquelle durchgeführt.

Herstellung der Bilirubinlösungen

Zu 20.0 mg (34.2 μmol) Bilirubin gibt man 2.0 mL DMSO und rührt bis zur vollständigen Auflösung. Man gibt 2.0 mL 0.4 N Natronlauge hinzu und rührt für weitere 30 Minuten. Anschließend werden 96 mL Pseudoserum (45 g BSA je Liter PBS) mit einem Zusatz von 0.1 g L-Ascorbinsäure je Liter zugegeben und der pH-Wert der erhaltenen Bilirubin-Stammlösung ggf. mit 0.1 N Natronlauge bzw. 0.1 N Salzsäure auf 7.4 ± 0.1 eingestellt.

Durch Verdünnung dieser Stammlösung mit einer Lösung aus 20 mL DMSO sowie 0.1 g L-Ascorbinsäure in einem Liter Pseudoserum werden Bilirubin-Lösungen mit Konzentrationen von ca. 2, 4, 6, ... 20 mg/dL hergestellt. Um eine hohe Dosiergenauigkeit zu erzielen, werden Bilirubin-Stammlösung und Pseudoserum über Autotitratoren dosiert.

Bestimmung der Isothermen

In PE-Röhrchen mit Schraubverschluß gibt man zu je 200 mg der zu untersuchenden Membran 2.5 mL PBS und schüttelt für 24 Stunden. Anschließend werden zu jeder Probe 10.0 mL der Bilirubinlösungen gegeben und bis zur Gleichgewichtseinstellung auf dem Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C geschüttelt. Die für die Gleichgewichtseinstellung benötigte Zeit wird für jedes zu untersuchende System in einem Vorversuch ermittelt.

Die Bilirubin-Gleichgewichtskonzentration wird durch Anwendung des Jendrassik-Gróf-Assays (AM 6) ermittelt.

Alternativ kann die Bilirubin-Gleichgewichtskonzentration durch direkte Messung der Extinktion bei 460 nm in einer 1 mm Küvette gemessen werden.

Die erhaltenen Meßwerte werden schließlich bezüglich eines Isothermenverlaufs nach *Langmuir* und *Freundlich* analysiert. Zu diesem Zweck berechnet man die Kehrwerte (*Langmuir*) bzw. natürlichen Logarithmen (*Freundlich*) der Gleichgewichtskonzentrationen sowie der adsorbierten Mengen Bilirubin pro Membranvolumen und überprüft mittels linearer Regression,

ob die Daten durch die jeweiligen Isothermen beschrieben werden können. Die Eignung des jeweiligen Modells wird durch Angabe des Korrelationskoeffizienten R der linearen Regression angezeigt, wobei nachfolgend jeweils die Ergebnisse aus dem besser geeigneten Modell angegeben werden.

Linearisierte Langmuir-Isotherme:

$$\frac{1}{q^*} = \frac{K_D}{q_m} \cdot \frac{1}{c^*} + \frac{1}{q_m}$$

Linearisierte Freundlich-Isotherme:

$$\ln q^* = \frac{1}{n} \cdot \ln c^* + \ln a$$

Gl. 4-3

Gl. 4-4

q^* : adsorbierte Menge Bilirubin [$\text{mg}/\text{cm}^3(\text{MV})$]

c^* : Bilirubin-Konzentration nach Einstellung eines Gleichgewichtes [mg/dL]

q_m : adsorbierte Menge Bilirubin [$\text{mg}/\text{cm}^3(\text{MV})$] für Monoschichtbelegung

K_d : scheinbare Dissoziationskonstante

a, n : systemspezifische Konstanten

Ergebnisse zur Bilirubin-Adsorption an BSA-immobilisierten Membranen:

Für BSA-immobilisierte Flachmembranen aus Kap. 4.5.1.1 werden folgende *Langmuir*-Isothermen erhalten. Die Messung der Gleichgewichtskonzentrationen erfolgt nach vier Stunden mittels AM 6.

| Membran: | q_m [mg/cm^3] | q_m [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3$] | K_d [mol/L] | R |
|------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------|
| PA6 | 1.4 | 2.4 | $1.1 \cdot 10^{-4}$ | 0.9975 |
| PA6-EGDGE-BSA | 0.8 | 1.4 | $1.3 \cdot 10^{-4}$ | 0.9868 |
| PA6-TriEGDGE-BSA | 0.9 | 1.5 | $1.1 \cdot 10^{-4}$ | 0.9822 |
| PA6-EX 830-BSA | 0.9 | 1.5 | $1.3 \cdot 10^{-4}$ | 0.9908 |
| PA6-BDDGE-BSA | 0.9 | 1.6 | $1.1 \cdot 10^{-4}$ | 0.9946 |

Tab. 4-23: Bilirubin-Adsorptionsisothermen für BSA-immobilisierten Flachmembranen

Ergebnisse zur Bilirubin-Adsorption an farbstoffimmobilisierten Membranen:

Für Cibacron F3G-A-immobilisierte Flachmembranen aus Kap. 4.5.2 werden folgende *Langmuir*-Isothermen erhalten. Die Messung der Gleichgewichtskonzentrationen erfolgt nach vier Stunden mittels *AM 6*.

| Membran: | q_m [mg/cm ³] | q_m [μmol/cm ³] | K_d [mol/L] | R |
|--|--------------------------------|----------------------------------|---------------------|--------|
| diglycidyletheraktivierte Membranen | | | | |
| PA6-EGDGE-CB F3G-A | 0.5 | 0.8 | $0.8 \cdot 10^{-4}$ | 0.9846 |
| PA6-TriEGDGE-CB F3G-A | 0.6 | 1.0 | $1.2 \cdot 10^{-4}$ | 0.9971 |
| PA6-EX 830-CB F3G-A | 0.5 | 0.8 | $0.8 \cdot 10^{-4}$ | 0.9928 |
| PA6-BDDGE-CB F3G-A | 0.6 | 1.0 | $1.3 \cdot 10^{-4}$ | 0.9950 |
| diaminaktivierte Membranen | | | | |
| PA6-EGDGE-EDODEA-CB F3G-A | 1.8 | 3.1 | $2.1 \cdot 10^{-4}$ | 0.9980 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA-CB F3G-A | 1.8 | 3.0 | $2.0 \cdot 10^{-4}$ | 0.9906 |
| PA6-EX 830-EDODEA-CB F3G-A | 2.0 | 3.4 | $2.1 \cdot 10^{-4}$ | 0.9993 |
| PA6-BDDGE-EDODEA-CB F3G-A | 3.1 | 5.3 | $1.7 \cdot 10^{-4}$ | 0.9989 |
| dendritisch aktivierte Membranen | | | | |
| PA6-ASCf-EDODEA-ASCf- EDODEA(C(O)CF ₃)-CB F3G-A | 2.6 | 4.5 | $2.3 \cdot 10^{-4}$ | 0.9988 |
| PA6-ASCf-TAEA-ASCf- EDODEA(C(O)CF ₃)-CB F3G-A | 5.1 | 8.7 | $2.2 \cdot 10^{-4}$ | 0.9998 |
| PA6-ASCf-TEPA-ASCf- EDODEA(C(O)CF ₃)-CB F3G-A | 8.4 | 14.4 | $2.2 \cdot 10^{-4}$ | 0.9998 |

Tab. 4-24: Bilirubin-Adsorptionsisothermen für Cibacron F3G-A-immobilisierte Flachmembranen

Für die weiteren farbstoffimmobilisierten Flachmembranen aus Kap. 4.5.2 werden folgende *Langmuir*-Isothermen erhalten. Die Messung der Gleichgewichtskonzentrationen erfolgt nach vier Stunden mittels *AM 6*:

| Membran: | q_m [mg/cm ³] | q_m [μmol/cm ³] | K_d [mol/L] | R |
|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------|--------|
| PA6-BDDGE-Procion Blue MX-R | 0.9 | 1.6 | $1.7 \cdot 10^{-4}$ | 0.9894 |
| PA6-BDDGE-Alkali Blue 6 B | 0.5 | 0.8 | $2.0 \cdot 10^{-4}$ | 0.9906 |
| PA6-BDDGE-Congo Red | 0.6 | 1.0 | $2.0 \cdot 10^{-4}$ | 0.9982 |
| PA6-BDDGE-EDODEA-Procion Blue MX-R | 1.6 | 2.8 | $1.7 \cdot 10^{-4}$ | 0.9887 |

Tab. 4-25: Bilirubin-Adsorptionsisothermen für weitere farbstoffimmobilisierte Flachmembranen

*Ergebnisse zur Bilirubin-Adsorption an **b**-Cyclodextrin-immobilisierten Membranen:*

Für TosO-β-CyD-immobilisierte Flachmembranen werden folgende *Langmuir*-Isothermen erhalten. Die Messung der Gleichgewichtskonzentrationen erfolgt nach vier Stunden mittels *AM 6*.

| Membran: | q_m [mg/cm ³] | q_m [μmol/cm ³] | K_d [mol/L] | R |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------|--------|
| PA6-EGDGE-EDODEA-TosO-β-CyD | 2.6 | 4.5 | $0.8 \cdot 10^{-4}$ | 0.9985 |
| PA6-TriEGDGE-EDODEA-TosO-β-CyD | 2.3 | 4.0 | $0.8 \cdot 10^{-4}$ | 0.9998 |
| PA6-EX 830-EDODEA-TosO-β-CyD | 1.7 | 3.0 | $0.8 \cdot 10^{-4}$ | 0.9983 |
| PA6-BDDGE-EDODEA-TosO-β-CyD | 2.6 | 4.5 | $0.7 \cdot 10^{-4}$ | 0.9985 |

Tab. 4-26: Bilirubin-Adsorptionsisothermen für **b**-CyD-immobilisierte Flachmembranen

5. Literaturverzeichnis

- ¹ E. Staude, *Membranen und Membranprozesse*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim **1992**, 2
- ² V. Gekas, *Desalination* **1988**, 68, 77
- ³ S. Ripperger, *Mikrofiltration mit Membranen*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim **1992**, 35
- ⁴ R. Zsigmondy, E. Wilke-Doerenfurt, A. v. Galecky, *Chem. Ber.* **1912**, 45, 579
- ⁵ E. Müller, E. Klein, *Membranes Modified for Biochromatography* In: G. Subramanian (ed.), *Bioseparation and Bioprocessing*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim **1998**, 305
- ⁶ D.A. Schiemann, *Advances in Membrane Filter Applications for Microbiology* In: B.J. Dudka (ed.) *Membrane Filtration*, M. Dekker Inc., New York **1981**, 537
- ⁷ C.F. Frith, jr., *Membrane Filters in Industry* In: B.J. Dudka (ed.), *Membrane Filtration*, M. Dekker Inc., New York **1981**, 567
- ⁸ J.M. Henis, M.K. Tripodi, D.I. Stimpson, *US Patent 4,794,002* **1988**
- ⁹ S. Brand, R.A. Goffe, S. Kessler, J.L. O'Conner, S. E. Zale, *Biotechnology* **1988**, 6, 779
- ¹⁰ B. Champluvier, M.-R. Kula, *Biotech. Bioeng.* **1992**, 40, 33
- ¹¹ O.-W. Reif, R. Freitag, *J. Chromatogr. A.* **1993**, 654, 29
- ¹² D. Josić, J. Reusch, K. Löster, O. Baum, W. Reutter, *J. Chromatogr.* **1992**, 590, 59
- ¹³ R. Axén, J. Porath, S. Ernback, *Nature* **1967**, 214, 1302
- ¹⁴ a) G. Kronvall, U.S. Seal, S. Finstad, *J. Immunol.* **1970**, 104, 140; b) J.J. Langone, *J. Immunol. Methods* **1978**, 24, 269; c) R.M. Mandaro, S. Roy, K.C. Hou, *Bio/Technology* **1987**, 5, 928
- ¹⁵ M. Lanner, R. Bergquist, J. Carlsson, *Purification of enzyme-labelled conjugate by affinity chromatography* In: O. Hoffman-Ostenhof (ed.), *Affinity Chromatography*, Pergamon Press **1978**, 237
- ¹⁶ M.J. Hayman, J.J. Skehel, M.J. Crumpton, *FEBS Lett.* **1973**, 29, 185
- ¹⁷ L. Summaria, F. Spitz, L. Arzadon, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 3693
- ¹⁸ P. Brodelius, K. Mosbach, *FEBS Lett.* **1973**, 35, 223
- ¹⁹ Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden, *Affinity Chromatography: Principles & Methods* **1988**
- ²⁰ H. Bende, *Chemie in unserer Zeit* **1974**, 8, 17
- ²¹ P. O'Carra, S. Barry, T. Griffin, *Biochem. Soc. Trans.* **1973**, 1, 289

- 22 D. Robinson, N.C. Phillips, B. Winchester, *FEBS Lett.* **1975**, 53, 110
- 23 P.J. Degen, J. Martin, J. Schriefer, B. Shirley, *US Patent* 4,693,985 **1987**
- 24 P. Izzo, R. Gantt, *Biochemistry* **1977**, 16, 1327
- 25 S.C. Burton, D.R.K. Harding, *J. Chromatogr. A* **1997**, 775, 29
- 26 L. Sundberg, J. Porath, *J. Chromatogr.* **1974**, 90, 87
- 27 I. Matsumoto, Y. Mizuno, N. Seno, *J. Biochem.* **1979**, 85, 1091
- 28 G.C. Spila Riera, H.F. Azurmendi, M.E. Ramia, H.E. Bertorello, C.A. Martin, *Polymer* **1998**, 39, 3515
- 29 H. Baumann, M. Linßen, R. Keller, *Das Papier* **1989**, 43, 674
- 30 S. Krause, K.H. Kroner, W.-H. Deckwer, *Biotechnology Techniques* **1991**, 5, 199
- 31 J.L. Coffman, D.K. Roper, E.N. Lightfoot, *Bioseparation* **1994**, 4, 183
- 32 M. Unarska, P.A. Davies, M.P. Esnouf, B.J. Bellhouse, *J. Chromatogr.* **1990**, 519, 53
- 33 M.-R. Kula, K.H. Gebauer, J. Thömmes, *Chimia* **1996**, 50, 422
- 34 S. Kiyohara, M. Nakamura, K. Saito, K. Sugita, T. Sugo, *J. Membrane Sci.* **1999**, 152, 143
- 35 E. Klein, E. Eichholz, D.H. Yeager, *J. Membrane Sci.* **1994**, 90, 69
- 36 C. Sarry, H. Sucker, *Pharmaceutical Technol.* **1992**, 10, 72
- 37 C. Sarry, H. Sucker, *Pharmaceutical Technol.* **1993**, 11, 60
- 38 A.M. Pitt, *J. Parenteral Sci. And Technol.* **1987**, 3, 110
- 39 I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, 40, 1361
- 40 E. Cremer, S. Flügge, *Z. physik. Chem. B* **1938**, 41
- 41 P. Langlotz, K.H. Kroner, *J. Chromatogr.* **1992**, 591, 107
- 42 D.K. Roper, E.N. Lightfoot, *J. Chromatogr. A* **1995**, 702, 3
- 43 M.-R. Kula, J. Thömmes, *Biotechnol. Prog.* **1995**, 11, 357
- 44 E. Klein, *J. Membrane Sci.* **2000**, 179, 1
- 45 N. Kubota, Y. Konno, K. Saito, K. Sugita, K. Watanabe, T. Sugo, *J. Chromatogr. A* **1997**, 782, 159
- 46 M. Portaccio, M. El-Masry, N.R. Diano, A. De Maio, V. Grano, M. Lepore, P. Travascio, U. Bencivenga, N. Pagliuca, D.G. Mita, *J. Molecular Catalysis B* **2002**, 18, 49
- 47 J.L. Lopez, S.L. Matson, *J. Membrane Sci.* **1997**, 125, 189
- 48 I.F.J. Vankelecom, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 3779
- 49 H. Klinkmann, J. Vienken, *Cas. Lék. ces.* **1994**, 133, 323

- 50 U. Baurmeister, E. Klein, G. Harding, B. Schmidt, *Proceedings of the 15th Annual Meeting of the International Society of Blood Purification*, Florenz **1997**
- 51 X. Ma, S.F. Mohammad, S.W. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, 40, 530
- 52 D. Petsch, W.-D. Deckwer, F.B. Anspach, C. Legallais, M. Vijayalakshmi, *J. Chromatogr. B* **1997**, 693, 9550
- 53 G. Evans, M.A. Packham, E.E. Hishizawa, J.F. Mustard, E.A. Murphy, *J. Exp. Med.* **1968**, 128, 877
- 54 J.F. Mustard, R.L. Kinlough-Rathbone, C.S. Jenkins, M.A. Packham, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1972**, 201, 343
- 55 J. Reichen, *Pathophysiologie der Leber*, Institut für Pharmakologie, Universität Bern **2000**
- 56 H.G. Elias, *Makromoleküle: Struktur, Eigenschaften, Synthesen, Stoffe*, Hüthig und Wepf, Heidelberg **1975**
- 57 A. El Sayed, *Kunststoffe* **1993**, 83, 213
- 58 R.E. Kesting, *Synthetic Polymer Membranes*, John Wiley & Sons, New York **1985**, 237
- 59 H.C. Haas, S.G. Cohen, A.C. Oglesby, E.R. Karlin, *J. Polym. Sci.* **1955**, 15, 427
- 60 F. Druschke, F. Haiber, B. Küster, H. Herlinger, *Chemiefasern/Textilindustrie* **1976**, 9, 769
- 61 K.-G. Briefs, M.-R. Kula, *Chem. Eng. Sci.* **1992**, 47, 141
- 62 B. Champluvier, M.-R. Kula, *Modification of microfiltration membranes as dye-ligand adsorbents for the isolation of enzymes from crude extracts* In: D.L. Pyle (ed.), *Separations for biotechnology*, Elsevier, London **1990**, 295
- 63 E. Klein, P.A. Feldhoff, *EP Patent 0 441 660 A1* **1991**
- 64 K. Kugel, A. Moseley, G.B. Harding, E. Klein, *J. Membrane Sci.* **1992**, 74, 115
- 65 E.A. Ostreicher, R.A. Knight, J.V. Fiore, G.T. Emond, K.C. Hou, *US Patent 4,673,504* **1987**
- 66 T.C. Beeskow, W. Kusharyoto, F.B. Anspach, K.H. Kroner, W.-D. Deckwer, *J. Chromatogr. A* **1995**, 715, 49
- 67 P.J. Degen, J. Martin, J. Schriefer, B. Shirley, *US Patent 4,693,985* **1987**
- 68 Methode zur Bestimmung der inneren Oberfläche von porösen Materialien nach Brunauer, Emmett und Teller
- 69 S.Y. Suen, Y.D. Tsai, *Separation Science Technology* **2000**, 35, 69

- 70 M. Weissenborn, B. Hutter, M. Singh, T.C. Beeskow, F.B. Anspach, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1997**, 25, 159
- 71 E. Klein, D.H. Yeager, R. Seshadri, U. Baurmeister, *J. Membrane Sci.* **1997**, 129, 31
- 72 C.-G. Gölander, J.N. Herron, K. Lim, P. Claesson, P. Stenius, J.D. Andrade, *Properties of immobilized PEG films and the interaction with proteins: Experiments and modelling* In: J.M. Harris (ed.), *Polyethyleneglycol chemistry: biotechnical and biomedical applications*, Plenum Press, New York **1992**
- 73 W.R. Gombotz, W. Guanghai, T.A. Horbett, A.S. Hoffman, *Protein adsorption to and elution from polyether surfaces* In: J.M. Harris (ed.), *Polyethyleneglycol chemistry: biotechnical and biomedical applications*, Plenum Press, New York **1992**
- 74 K. Holmberg, K. Bergström, M.-B. Stark, *Immobilization of proteins via PEG chains* In: J.M. Harris (ed.), *Polyethyleneglycol chemistry: biotechnical and biomedical applications*, Plenum Press, New York **1992**
- 75 J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, M. Whitesides, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 777
- 76 S. Svedhem, C.A. Hollander, J. Shi, P. Konradsson, B. Liedberg, S.C.T. Svensson, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4494
- 77 E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 117
- 78 G. Jung, W. Rapp, *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, VCH, Weinheim **1996**, 425
- 79 G.H. Segall, *US Patent 2,543,992* **1951**
- 80 X.-P. Gu, I. Ikeda, M. Okahara, *Synthesis (Communications)* **1985**, 649
- 81 E.M. Blyakhman, *Zh. Org. Khim.* **1967**, 3, 1423
- 82 A. Benfer, Diplomarbeit, Wuppertal **2000**
- 83 S. Rasch, Diplomarbeit, Münster **1998**
- 84 K. Rodemann, E. Staude, *J. Membrane Sci.* **1994**, 88, 271
- 85 S.J. Moore, *Biolog. Chem.* **1968**, 243, 6281
- 86 Aminoterminierte Polyethylenglycole sind u.a. bei Shearwater Polymers Inc., USA erhältlich
- 87 E. Müller, *WO Patent 96/31549* **1996**
- 88 T. Beeskow, Dissertation, Braunschweig **1996**
- 89 W.E. Hornby, H. Fillippusson, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, 220, 345
- 90 G.R. Newkome, C.N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendritic Molecules: Concepts, Synthesis, Perspectives*, VCH Publishers, Weinheim **1996**

- 91 E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis* **1978**, 155
- 92 C. Hawker, J.M.J. Fréchet, *Chem. Commun.* **1990**, 1010
- 93 V. Swali, N.J. Wells, G.J. Langley, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4902
- 94 K. Kugel, A. Moseley, G.B. Harding, E. Klein, *J. Membrane Sci.* **1992**, 74, 115
- 95 Y. Nakatsuji, M. Okahara, *Synthesis* **1993**, 487
- 96 E.B. Fleischer, A.E. Gebala, A. Levey, P.A. Tasker, *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 3042
- 97 M. Beier, J.D. Hoheisel, *Nucl. Acids Res.* **1999**, 27, 1970
- 98 S. Agrawal, J.-Y. Tang, *Tetrahedr. Lett.* **1990**, 31, 1543
- 99 T. Peters, *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 161
- 100 K. Yamasaki, M.H. Rahman, Y. Tsutsumi, T. Maruyama, A. Shamim, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2000**, 12
- 101 M. Dockal, Dissertation, Universität für Bodenkultur, Wien **2000**
- 102 Q. Zhang, H. Zou, H. Wang, J. Ni, *J. Chromatogr. A* **2000**, 866, 173
- 103 E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, G. Félix, I. Cahagne, S. Motellier, I.W. Wainer, *Chromatographia* **1990**, 29, 170
- 104 M. Zimmermann, K. Busch, S. Kuhn, M. Zeppezauer, *Clin. Chem. Lab. med.* **1999**, 37, 373
- 105 Das Europäische Arzneibuch definiert Pyrogene als „Stoffe, die in kleinsten Mengen verabreicht innerhalb einer begrenzten Einwirkungszeit beim Menschen und bestimmten Versuchstieren Fieber erzeugen“
- 106 H. Ullrich, W. Jakob, D. Fröhlich, G. Rothe, C. Prasser, W. Drobnik, K. Taeger, A. Meier-Hellmann, K. Reinhart, M. Zimmermann, G. Schmitz, *Ther. Apher.* **2001**, 5, 326
- 107 K.R. Kamath, K. Park, *Applied Biomat.* **1994**, 5, 163
- 108 J.B. Wheatley, D.E. Schmidt, *J. Chromatogr. A* **1999**, 849, 1
- 109 P. Langlotz, K.H. Kroner, *J. Chromatogr.* **1992**, 591, 107
- 110 G.L. Peterson, *Anal. Biochem.* **1977**, 83, 346
- 111 P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, 150, 76
- 112 J.D. Andrade, J. Herron, V. Hlady, D. Horsley, *Croat. Chem. Acta* **1987**, 60, 495
- 113 W. Norde, C.A. Haynes, *ACS Symp. Ser.* **1995**, 602, 26
- 114 C.A. Haynes, W. Norde, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **1994**, 2, 517
- 115 Methode zur Bestimmung der Oberfläche von porösem Material nach Brunauer, Emmett und Teller

- 116 Angaben der Fa. MAT, Obernburg
- 117 R.G. Reed, *Biochem. J.* **1980**, *191*, 867
- 118 A. Crueger, W. Crueger, *Glucose transforming enzymes* In: W.M. Forgarty, C.T. Kelly
(ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*, 2nd Ed., Elsevier, Amsterdam **1990**, 177
- 119 J.H. Pazur, K. Kleppe, *J. Biochem.* **1964**, *3*, 578
- 120 M.N. Jones, P. Manley, A. Wilkinson, *J. Biochem* **1982**, *203*, 285
- 121 S. Hayashi, S. Nakamura, *Biochem. Biophys. Acta* **1981**, *657*, 40
- 122 E.C.J. Adams, R.L. Mast, A.H. Free, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *91*, 230
- 123 L.C. Clark, C. Lyons, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29
- 124 F. Scheller, D. Peiffer, *Z. Chem.* **1978**, *18*, 50
- 125 L. Campanella, M. Tomasseffi, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 307
- 126 M. Portaccio, M. El-Masry, N. Rossi Diano, A. De Maio, V. Grano, M. Lepore, P.
Travascio, U. Bencivenga, N. Pagliuca, D.G. Mita, *J. Mol. Catalysis B* **2002**, *18*, 49
- 127 M.M. Vidal, I. Delgadillo, M.H. Gil, *Biosensors & Bioelectronics* **1996**, *11*, 347
- 128 M.M. Vidal, M.H. Gil, I. Delgadillo, J. Alonso, *Biomaterials* **1999**, *20*, 757
- 129 C. Sung, A. Lavin, A.M. Klibanov, R. Langer, *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, *28*, 1531
- 130 T. Godjevargova, V. Konsulov, A. Dimov, *J. Membrane Sci.* **1999**, *152*, 235
- 131 H.U. Bergmeyer, E. Bernt, In: H.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd
Ed., Academic Press, New York **1974**, 1205
- 132 1 U entspricht der Menge Enzym, die 1 μmol D-Glucose pro Minute oxidiert (pH 7.0,
25 °C)
- 133 C.V. Stead, *Bioseparation* **1991**, *2*, 1129
- 134 R.L. Easterday, I. Easterday, *Affinity chromatography of kinases and dehydrogenases on
Sephadex and Sepharose dye derivates* In: R.B. Dunlap (ed.), *Immobilized biochemicals
and affinity chromatography*, Plenum Press, New York **1974**, 123
- 135 T. Beeskow, K.H. Kroner, F.B. Anspach, *J. Coll. Interfac. Sci.* **1997**, *196*, 278
- 136 M. Kocakulak, A. Denizli, A.Y. Rad, E. Piskin, *J. Chromatogr. B* **1997**, *693*, 271
- 137 A. Denizli, M. Kocakulak, E. Piskin, *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *68*, 373
- 138 A. Denizli, M. Kocakulak, E. Piskin, *J. Chromatogr. B* **1998**, *707*, 25
- 139 A. Denizli, M. Kocakulak, E. Piskin, *J.M.S. Pure Appl. Chem.* **1998**, *A35*, 137
- 140 A. Denizli, G. Köktürk, H. Yavuz, E. Piskin, *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *74*, 2803
- 141 B. Champluvier, M.-R. Kula, *J. Chromatogr.* **1991**, *539*, 315
- 142 S.J. Burton, C.V. Stead, C.R. Lowe, *J. Chromatogr.* **1988**, *455*, 201

- 143 A. Villiers, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **1891**, 112, 536
- 144 F. Schardinger, *Z. Untersuch. Nahr. Genußm.* **1903**, 6, 865
- 145 H.-D. Belitz, W. Grosch, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 4. Auflage*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York **1992**
- 146 S. Li, W.C. Purdy, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1457
- 147 M.L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer Verlag, Berlin **1978**
- 148 M.V. Reharsky, M.P. Mayhew, R.N. Goldberg, P.D. Ross, Y. Yamashoji, Y. Inoue, *J. Phys. Chem.* **1997**, 101, 87
- 149 G. Wenz, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 803
- 150 G. Gattuso, S.A. Nepogodiev, J.F. Stoddart, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1919
- 151 J. Szejtli, *J. Mater. Chem.* **1997**, 7, 575
- 152 F. Cramer, W. Dietsche, *Chem. Ber.* **1959**, 92, 378
- 153 A. Berthod, W. Li, D.W. Armstrong, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 873
- 154 J. Szejtli, *Cyclodextrin Chemistry*, Kluwer, Boston **1988**
- 155 T.S. Jones, D.J.W. Grant, J. Hadgraft, G. Tarr, *Acta Pharm. Tech.* **1984**, 30, 263
- 156 B.-L. He, X.-B. Zhao, *Science in China (Series B)* **1993**, 36, 7
- 157 B.-L. He, X.-B. Zhao, P.-L. Ho, *Reactive Polym.* **1994**, 24, 1
- 158 H. Wang, J. Ma, Y. Zhang, B.-L. He, *Reactive & Functional Polym.* **1997**, 32, 1
- 159 H. Dittmann, W.A. König, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 583
- 160 M.L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, New York **1978**
- 161 X.-B. Zhao, B.-L. He, *Reactive Polym.* **1994**, 24, 9
- 162 L.F. Zhang, Y.-C. Wong, L. Chen, C.B. Ching, S.C. Ng, *Tetrahedr. Lett.* **1999**, 40, 1815
- 163 A.R. Kahn, P. Forgo, K.J. Stine, V.T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1977
- 164 H.S. Byun, N. Zhong, R. Bittmann, *Org. Synthesis* **2000**, 77, 225
- 165 K. Hamasaki, H. Ikeda, A. Nakamura, A. Ueno, F. Toda, I. Suzuki, T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5035
- 166 J. Borger, R.J. Corcoran, J.-M. Lehen, *Helv. Chem. Acta* **1978**, 61, 2190
- 167 J.M. Garcia Fernández, C.O. Mellet, J.L. Jiménez Blanco, J.F. Mota, A. Gadelle, A. Coste-Sarguet, J. Defaye, *Carbohydr. Res.* **1995**, 268, 57
- 168 S. Mitzner, J. Stange, *Cell-free artificial liver support - a critical review* In: M.M. Körner, R. Körfers (ed.), *Current Aspects and Concepts of Nursing, Coordinating, Bridging and Rehabilitation in Organ Transplantation*, Elsevier Science, Amsterdam **1995**

- 169 M.S. Cattral, G.A. Levy, *N. Engl. J. Med.* **1994**, 331, 268
- 170 G. Baltzer, W. Dölle, U. Bär, K. Becker, P.H. Clodi, *Dtsch. med. Wschr.* **1971**, 96, 1329
- 171 R. Bambauer, *Therapeutischer Plasmaaustausch und verwandte Plasmaseparationsverfahren*, Schattauer, Stuttgart, New York **1988**, 182
- 172 R.D. Hughes, P.G. Langley, R. Williams, *Int. J. Artif. Organs* **1980**, 3, 277
- 173 G. Wu, G.R. Brown, *React. Polym.* **1991**, 14, 49
- 174 S. Mitzner, J. Stange, G. Korten, H. Hickstein, J. Emmrich, S. Liebe, R. Schmidt, *Blood Purif.* **1994**, 12, 190
- 175 J. Stange, S. Mitzner, *DE Patent 43 09 410* **1993**
- 176 N.L. Sussman, G.T. Gislason, J.H. Kelly, *J. Clin. Gastroenterol.* **1994**, 18, 320
- 177 J. Stange, S. Mitzner, *Int. J. Artif. Organs* **1996**, 19, 677
- 178 J.W. Seligman, *Pediatr. Clin. North America* **1977**, 24, 1977
- 179 P.J. Bosma, *J. Hepatol.* **2003**, 38, 107
- 180 Laborinformationen des Institutes für klinische Chemie des Klinikums der Universität zu Köln
- 181 C. Tiribelli, J.D. Ostrow, *Hepatology* **1996**, 24, 1296
- 182 C.X. Xu, X.J. Tang, Z. Niu, Z.M. Li, *Int. J. Artif. Organs* **1981**, 4, 200
- 183 S. Sideman, L. Mor, M. Minich, D. Mordohovich, S. Lupovich, J.M. Brandes, M. Zeltzer, *Contr. Nephrol.* **1982**, 29, 90
- 184 H. Kuroda, T. Tanaka, Z. Osawa, *Angew. Makromol. Chem.* **1996**, 237, 143
- 185 P.H. Plotz, P.D. Berk, B.F. Scharschmidt, J.K. Gordon, J. Vergalla, *J. Clin. Invest.* **1974**, 53, 778
- 186 C. Alvarez, M. Strumia, H. Bertorello, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, 49, 649
- 187 T. Chandy, C.P. Sharma, *Artif. Organs* **1992**, 16, 568
- 188 Y. Yu, B. He, H. Gu, *Artif. Cells, Blood Subs. and immob. Biotech.* **2000**, 28, 307
- 189 M. Bouvier, G.R. Brown, L.E. St-Pierre, *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 1927
- 190 Y.-H. Yu, B.-L. He, *Reactive & Functional Polymers* **1996**, 31, 195
- 191 D.A. Lightner, W.M.D. Wijekoon, M.-H. Zhang, *J. Biolog. Chem.* **1988**, 263, 166669
- 192 C.E. Petersen, C.-E. Ha, K. Harohalli, J.B. Feix, N.V. Bhagavan, *J. Biolog. Chem.* **2000**, 275, 20985
- 193 Autorenkollektiv (ed.), *Organikum, 16. Aufl.*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin **1988**
- 194 L. Jendrassik, P. Gróf, *Biochem. Z.* **1938**, 297, 81

-
- ¹⁹⁵ B.T. Doumas, B.W. Perry, E.A. Sasse, J.V. Straumfjord, *Clin. Chem.* **1973**, *19*, 984
- ¹⁹⁶ Im Falle einer Anbindung von Alkali Blue 6 B erfolgt die Immobilisation durch 20-stündiges Schütteln von maximal 0.5 g Membran in 30 mL einer einprozentigen Farbstofflösung in 1.0 N Natronlauge bei einer Temperatur von 50 °C.