

HOCHVERZWEIGTE POLYMERE ALS CHROMATOGRAPHISCHE SELEKTOREN

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-NanoSc. Sandra Tripp

geboren am 26.02.1986 in Volkmarsen

Die Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2011 bis August 2014 am Leibniz-Institut für
Polymerforschung Dresden e.V. angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Brigitte Voit
Prof. Dr. Eike Brunner

Tag der Verteidigung: 25. November 2014

Letztlich liegt die große Herausforderung des Lebens darin, die Grenzen in dir selbst zu überwinden und so weit zu gehen, wie du dir niemals hättest träumen lassen.

Sergio Bambaren

Danksagung

Jede Danksagung signalisiert das Ende eines langen Weges. Ohne die Hilfe und Unterstützung vieler wunderbarer Menschen hätte ich diese Reise nicht durchführen können. Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Brigitte Voit und Dr. Dietmar Appelhans für die Bereitstellung dieses interessanten Themas danken. Sie ermöglichten mir in eine Richtung zu gehen, von der ich immer träumte. Für die Hilfe und Unterstützung bin ich ihnen sehr dankbar.

Für die vielen hilfreichen Diskussionen und die umfangreichen NMR-Messungen danke ich besonders Herrn Dr. Hartmut Komber. Andreas Korwitz danke ich für seine Ausdauer bei den zahlreichen Titrationsen. Anja Caspari gilt mein Dank für die DLS- und Zetapotential-Messungen der vielen Polymere. Herrn Roland Schulze danke ich für die Elementaranalysen und die Hilfe bei Ellipsometrie-Fragen. Für die Hilfe bei UV/Vis-Fragen danke ich Herrn Dr. Ulrich Oertel. Weiterhin möchte ich mich auch bei Dr. Manuela Herklotz (Fluoreszenzmikroskopie), Andreas Janke (AFM), Dr. Petr Formanek (TEM) und Dr. Michael Malani (IR) bedanken. Mein herzlicher Dank gilt Carmen Krause und Beate Marchlewski, die den Laden am Laufen halten.

Für die gute und freundliche Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung in Leipzig möchte ich mich bei Frau Dr. Monika Möder und ihren Mitarbeiter/innen bedanken.

Was wäre eine Reise ohne die Menschen, die man dabei trifft. Viele haben mich von Anfang an begleitet, mit einigen bin ich ein Stück gegangen und andere hat man am Wegesrand getroffen. Keinen dieser Menschen möchte ich missen und ich danke ihnen allen. Die Sonnenstunden, die wir gemeinsam erlebt haben, werden mir immer im Gedächtnis bleiben und ich werde mich immer mit einem Lächeln an meine Zeit als Doktorandin und vor allem an meine Zeit in Dresden erinnern. Die gemeinsamen Unternehmungen mit euch allen ließen die Zeit wie im Flug vergehen. In diesem Sinne: "Freunde sind wie Laternen am Weg. Sie machen ihn zwar nicht kürzer, aber umso heller!" (*J. Mariss*)

Ich danke Maria und Christin, dass sie mich in Dresden willkommen hießen und mir die Anfangszeit in dieser fremden, neuen Stadt erleichterten. Maria gilt natürlich mein besonderer Dank, da sie mir die Welt des Geocachings zeigte und ich nun diesem Hobby erliege. Sven und meine Familie dankt dir ebenfalls, da sie nun immer hören "Oh, da ist noch eine Dose!" und sich dabei stets unermesslich freuen ;-). Und natürlich danke ich dir für die unermüdliche Korrektur meiner Arbeit und für das Wegstreichen aller "mittels". Dank dir habe ich jetzt immer einen blöden Stein vor meinen Augen, den ich schleife und poliere!

In meiner Zeit am IPF lernte ich so viele interessante Menschen kennen, dass ich kaum alle nennen kann, vergessen werde ich sie aber nicht. Unsere internationale Mittagsrunde mit manchmal mehr als 10 verschiedenen Nationen ergab Freundschaften in die ganze Welt. Bahar, Banu, Gözde, Miriam, Francesco, Marco, Damien, Hendrik, Emrah, Burak und allen anderen möchte ich meinen Dank aussprechen für die interessanten Einblicke in andere Kulturen. Besonders Mohamed möchte ich für seine Freundschaft danken und natürlich dafür, dass er mich mit meinem Lieblings-Ölessenzen versorgt hat (Achie Shukran!).

Und nun zu meinen vielen besonderen Kollegen, mit denen Arbeit nicht nur Arbeit war, sondern Spaß: Banu, Ulli, Maria H., Jörg, Mohamed, Franka, Hannes, Nicole, David S., Johannes, Chrissi, Robert, Jens, Nikita, Samaa, Anne, Monika, Tim, David G., Markus, Haiping, Guping und die "polymer separation group" um Albena, Susi, Damaris, Josef, Jessica und Mahbuba. Wenn ich hier aufzählen sollte, was wir alles gemacht haben, würden die Leser ja denken, dass wir gar nicht gearbeitet haben :-D.

An meine Zeit in Russland denke ich immer gerne zurück. Ich kam als Fremde in eine ungewohnte, unbekannte Welt und ich ging schweren Herzens als Freundin. Für meine Zeit in Russland danke ich besonders Vera. Ohne sie wäre die Zeit niemals so schön geworden. Danke, meine Schwester! Für die Offenheit und die Herzlichkeit mit der ich empfangen und aufgenommen wurde, schulde ich der Arbeitsgruppe von Prof. Anna Kartsova tiefen Dank. Lena, Kate I und II sowie Dasha danke ich für ihre Hilfe und Freundschaft.

Abschließend möchte ich noch der lieben Watzke-Gruppe danken. All die tollen Abende, die Unternehmungen, die "Dates" und der viele Spaß können kaum mit Worten beschrieben werden. Mit euch können die Wochen verfliegen wie im Flug! Euch kann ich nicht genug danken und ich hoffe, dass wir noch viele lustige Stunden zusammen verbringen werden. Ihr werdet mir alle sehr fehlen! Chrissi, dir gilt mein besonderer Dank. Unsere spontanen Ideen oder lange geplanten Abendprogramme werden mir immer in Erinnerung bleiben und mir den Abschied so schwer machen.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Freunden in Kassel bedanken. Durch euch bin ich auf andere Gedanken gekommen, wenn ich es nötig hatte. Danke Betti, dass du mir die bunte Welt des Naumburger Karnevals gezeigt hat. Hahl Dunne trifft nicht nur in der Karnevalszeit zu, sondern besonders auch für eine Doktorarbeit!

Bevor ich es vergesse! Vielen lieben Dank auch an meinen Computer, der mich mit seiner langsamen und ruhigen Art diverse Male auf die Palme brachte und der öfters kurz vor einen kleinen Ausflug aus dem Fenster stand. Nicht unschuldig daran war L^AT_EX, dem ich auch danken möchte.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei einigen besonderen Menschen bedanken. Mein Dank gilt vor allem meiner Familie, ohne die ich nicht der Mensch wäre, der ich heute bin. Ich danke euch, dass ihr mir stets die Freiheit gegeben habt, meinen eigenen Weg zu gehen. Mit Wort kann ich euch niemals genug danken! Danke, dass ihr mich in dieser Zeit immer unterstützt habt. Ihr habt mich aufgebaut und ermutigt und ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Ich liebe Euch! Die im Hier und die, die schon voraus gegangen sind!

Zuletzt möchte ich mich bei Sven bedanken. Danke, dass du für mich da bist, mich unterstützt und mich so sein lässt, wie ich bin. Ich liebe Dich!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XI
1 Motivation und Zielstellung	1
2 Grundlagen und Stand der Forschung	3
2.1 Einführung von Kern-Schale-Architekturen in Bezug auf Glykopolymere . . .	3
2.1.1 Kern-Schale-Architekturen	3
2.1.1.1 Dendrimer/Gast-Komplexe	6
2.1.1.2 Dendrimer/Gast-Konjugate	7
2.1.1.3 Kern-Schale-Architekturen basierend auf hochverzweigten Polymeren	8
2.1.2 Glykopolymere und Glykodendrimere	9
2.1.3 Glykopolymere basierend auf einem hochverzweigten Poly(ethylenimin) Kern	11
2.2 Polymere als Selektoren	15
2.2.1 Dünnschicht-Chromatographie (TLC)	15
2.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	18
2.2.3 Kapillarelektrophorese (CE)	21
2.2.4 Polymerunterstützte Ultrafiltration (PEUF)	24
3 Verwendete Methoden	26
3.1 UV/Vis-Spektroskopie	26
3.2 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Diffusions-NMR-Spektroskopie (DOSY)	27
3.3 Ellipsometrie	29
4 Ergebnisse und Diskussion	31
4.1 Vorstellung der verwendeten Polymer-Architekturen	31
4.1.1 Einleitung und Übersicht der verwendeten Kern-Schale-Architekturen	31
4.1.2 Poly(ethylenimin)-Oligosaccharid-Architekturen (PEI-OS)	32
4.1.2.1 Charakterisierung der PEI-OS-Architekturen	34
4.1.3 PEI-Spacer-Architekturen	36
4.1.3.1 Charakterisierung der PEI-Spacer-Architekturen	36
4.1.4 PEI-FA-Architekturen	39
4.1.4.1 Charakterisierung der PEI-FA-Architekturen	40
4.2 Interaktionsstudien mit Beispielanalyten	42
4.2.1 Ultrafiltrationsexperimente mit wasserlöslichen Vitaminen	43

4.2.1.1	Voruntersuchungen	44
4.2.1.2	Untersuchung der Ladungszustände der PEI-OS-Architekturen und Analyten	46
4.2.1.3	Interaktion des PEI-WFs mit Analyten	48
4.2.1.4	Interaktion der PEI-OS-Architekturen mit Analyten	50
4.2.1.5	Zusammenfassung der Interaktionsuntersuchungen mit Hilfe der Ultrafiltration	54
4.2.2	NMR-Interaktionsuntersuchungen mit ausgewählten Beispielanalyten .	56
4.3	Untersuchung der Kern-Schale-Architekturen in dünnen Schichten	62
4.3.1	Dünne Schichten mit Kern-Schale-Architekturen und deren Quellver- halten in wässrigen Lösungen	63
4.3.2	Quellverhalten in Analytlösungen	65
4.3.3	Interaktion der Polymerschichten mit Analytlösungen	68
4.3.3.1	Interaktionsuntersuchungen mit PEI-25k-Mal B Schichten und wasserlöslichen Analyten	69
4.3.3.2	Interaktionsuntersuchungen mit Schichten der PEI-Spacer-Archi- tekturen	72
4.3.4	Untersuchungen der Interaktionen der Polymerfilme mit fluoreszieren- den Analyten mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie	75
4.3.5	Zusammenfassung der Experimente mit Kern-Schale-Architekturen in dünnen Schichten	77
4.4	Anwendung der Kern-Schale-Architekturen in der Chromatographie	79
4.4.1	Anwendung von Kern-Schale-Architekturen in der Dünnschicht-Chromatographie	79
4.4.1.1	Modifizierung der stationären Phase mit PEI-OS-Architekturen	81
4.4.1.2	Modifizierung von TLC-Platten mit PEI-Spacer-Architekturen	85
4.4.1.3	TLC-Experimente mit lipophilen Vitaminen	88
4.4.1.4	Zusammenfassung der TLC-Experimente mit Kern-Schale-Architekturen	91
4.4.2	Anwendung von PEI-OS-Architekturen in der HPLC	92
4.4.3	Addition von PEI-OS-Architekturen in der CE	98
4.4.3.1	CE Untersuchungen mit hydrophilen Vitaminen	98
4.4.3.2	CE Untersuchungen mit Adenosin-Derivaten	103
4.5	Modifizierung von Silika-Partikeln mit PEI-OS-Architekturen	106
4.5.1	Synthese und Charakterisierung modifizierter Silika-Partikel	106
4.5.1.1	Synthese und Charakterisierung von PEI-Spacer-modifizierten Partikeln	107
4.5.1.2	Modifizierung der Partikeloberfläche mit PEI-OS-Architekturen	112
4.5.2	Untersuchungen zum Interaktionsverhalten von modifizierten Silika- Partikeln	118
4.5.3	Einsatz von modifizierten Silika-Partikeln in der TLC	121
4.5.4	Modifizierte Silika-Partikel in der Festphasenextraktion	126

5 Zusammenfassung und Ausblick	132
5.1 Interaktionsuntersuchung der PEI-OS-Architekturen mit Hilfe von Ultrafiltrationsexperimenten	133
5.2 NMR-Untersuchungen der Interaktionen von B ₆ mit den PEI-OS-Architekturen	135
5.3 Interaktionsuntersuchungen an dünnen Schichten	137
5.4 Anwendung der PEI-OS-Architekturen in der Chromatographie	138
5.4.1 Ergebnisse der Dünnschicht-Chromatographie-Experimente	138
5.4.2 Ergebnisse der HPLC-Experimente	138
5.4.3 Ergebnisse der Kapillarelektrophorese-Experimente	138
5.5 Synthese und Charakterisierung von modifizierten Nanopartikeln	140
5.5.1 Interaktionsuntersuchungen der modifizierten Partikel mit Beispielanalyten	140
5.5.2 Anwendung der modifizierten Partikel in der Dünnschicht-Chromatographie	141
5.5.3 Untersuchung der modifizierten Partikel in der Festphasenextraktion	141
5.6 Abschließendes Resümee	142
6 Methoden und Experimentalteil	145
6.1 Methoden	145
6.2 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel	152
6.3 Experimentalteil	153
6.3.1 Synthese der PEI-OS-Architekturen	153
6.3.2 Synthese PEI-Spacer-Architekturen	154
6.3.2.1 Synthese von PEI-5k/25k-CO(CH ₂) ₁₀ NHBoc	154
6.3.2.2 Synthese der PEI-C11-Mal-Architekturen	155
6.3.2.3 Synthese der PEI-25k-(C11-NH ₂)-Mal Architekturen	156
6.3.3 Synthese PEI-25k-FA Architekturen	156
6.3.3.1 Synthese der PEI-25k-FA Strukturen	156
6.3.3.2 Synthese PEI-25k-FA-Mal Architekturen	157
6.3.4 Synthese der modifizierten Nanopartikel	158
6.3.4.1 Synthese der Nanopartikel	158
6.3.4.2 Silanisierung der Nanopartikeln	158
6.3.4.3 Synthese der mit PEI-Spacer-modifizierten Nanopartikel	158
6.3.4.4 Synthese der mit PEI-OS-modifizierten Nanopartikel	159
7 Anhang	160
Literaturverzeichnis	178

Abbildungsverzeichnis

1	Vergleich von Dendrimeren und hochverzweigten Polymeren	3
2	Überblick wichtiger dendritischer Kerne	4
3	Anwendungen von polymeren Strukturen	5
4	Verdeutlichung der dendritischen Box und der unimolekularen Mizelle	6
5	Verdeutlichung von Dendrimer/Gast-Konjugaten	7
6	Unterschiedliche Glykodendrimer-Strukturen	10
7	Anwendungsbeispiele von Glykodendrimeren	11
8	Reaktionsschema der reduktiven Aminierung	12
9	Glykopolymere, die von <i>Appelhans et al.</i> hergestellt und untersucht wurden	12
10	Prinzip der Dünnschicht-Chromatographie	16
11	Prinzip des molekularen Prägens	17
12	Aufbau einer HPLC-Anlage	18
13	Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Apparatur	21
14	Verdeutlichung des elektroosmotischen Druckes	22
15	Aufbau und Separationsprozess bei der Polymer unterstützten Ultrafiltration	25
16	Beispiel eines DOSY-Spektrums	28
17	Aufbau und Prinzip bei der Ellipsometrie	29
18	Übersicht der verwendeten Kern-Schale-Architekturen	31
19	Überblick der PEI-OS-Architekturen	33
20	NMR-Spektren von drei verschiedenen PEI-OS-Strukturen	34
21	Übersicht der PEI-Spacer-Architekturen	37
22	Protonen-NMR der PEI-Spacer-Architekturen	38
23	Übersicht der PEI-FA-Architekturen	40
24	Übersicht der PEI-OS-Architekturen	42
25	UV/Vis-Spektren der Analyten	44
26	pH-Titrationen der PEI-OS-Architekturen	47
27	Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente mit B ₁ und B ₂	50
28	Ergebnisse der Ultrafiltrationsuntersuchungen mit B ₆	51
29	Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente mit B ₃	52
30	Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente mit dem Estradiol-Derivat	53
31	Interaktion der negativ geladenen Analyten mit unmodifizierten PEI und den PEI-OS-Architekturen	54
32	Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente mit B ₁₂	54
33	Interaktionen der Analyten mit PEI-OS	55
34	DOSY-Spektren PEI-5k-Mal C, PEI-25k-Mal C und B ₆	56
35	DOSY-Spektren der interagierenden PEI-OS-Architekturen mit B ₆	56
36	Zusätzliche Signale für B ₆ durch Interaktion mit PEI-OS	57
37	Übersicht der NMR-Titrations-Versuche	58
38	NMR-Spektren von Lupasol G100 und B ₆	60
39	NMR-Spektren von Glykogen und B ₆	60

40	Verwendete Strukturen für die dünnen Schichten	62
41	Übersicht der verwendeten Analyten	63
42	Quellverhalten der Polymerschichten in H ₂ O	64
43	Untersuchung des Quellverhaltens in Analytlösungen	67
44	Schematischer Ablauf der Interaktionsuntersuchungen	68
45	Interaktionsstudien der PEI-OS-Schicht mit diversen Analyten	71
46	Interaktionsstudien der PEI-Spacer-Schichten mit ATP	73
47	Interaktionsstudien der PEI-Spacer-Schichten mit Vitamin C	74
48	Interaktionsstudien der PEI-25k-(C11-NH ₂)-Mal Schicht mit Tocopherol	75
49	Übersicht der Fluoreszenzmessungen der Polymerschichten mit Analyten	76
50	Schema der auftretenden Wechselwirkungen mit der Polymerschicht	78
51	Übersicht der verwendeten Kern-Schale-Architekturen	79
52	Verdeutlichung des R _f -Wertes	80
53	Veranschaulichung der Interaktionen in Relation zur Trennleistung N	81
54	TLC-Experimente mit PEI-5k-Mal A, B und C	81
55	TLC-Experimente mit PEI-25k-Mal A, B und C	83
56	TLC-Experimente mit PEI-25k-Mal-III A, B und C	83
57	Übersicht der für die TLC verwendeten PEI-Spacer-Architekturen	85
58	TLC-Experimente mit PEI-5k-C11-Mal	86
59	TLC-Experimente mit PEI-25k-C11-Mal	87
60	TLC-Experimente mit PEI-5k-C11 (ohne Maltoseschale)	87
61	Übersicht der verwendeten lipophilen Vitamine	88
62	TLC-Experimente mit PEI-C11-Mal und lipophilen Vitaminen	89
63	Überblick der PEI-FA-Architekturen, die in der TLC verwendet wurden	89
64	TLC-Experimente mit PEI-FA (ohne Maltoseschale) und lipophilen Vitaminen	90
65	TLC-Experimente mit PEI-FA-Architekturen	90
66	Auftragung der HPLC-Ergebnisse mit PEI-5k-Mal als Additiv	93
67	Auftragung der HPLC-Ergebnisse mit PEI-5k-Mal als Additiv	94
68	Ergebnisse der HPLC-Auftrennung mit und ohne PEI-5k/ 25k-Lac	95
69	Gegenüberstellung der HPLC-Ergebnisse mit und ohne PEI-25k-Mal-III	96
70	Elektropherogramm von hydrophilen Vitaminen in PBS-Puffer	99
71	Elektropherogramm der hydrophilen Vitamine mit PEI-25k-Mal A	100
72	Elektropherogramm der hydrophilen Vitamine mit PEI-25k-Mal C	100
73	Elektropherogramm der hydrophilen Vitamine mit PEI-25k-Mal-III A	101
74	Elektropherogramm der hydrophilen Vitamine mit PEI-25k-Mal-III C	102
75	Übersicht der verwendeten Adenosin-Derivate	103
76	Effizienz der Auftrennung von Adenosin-Derivate mit PEI-OS-Architekturen in der CE	105
77	Übersicht der Synthese von PEI-Spacer-modifizierten Partikeln	108
78	REM-Aufnahmen der unmodifizierten Partikel	108
79	REM-Aufnahmen der GPS und PEI-Spacer-modifizierten Partikel	109
80	TEM Aufnahmen der un- und modifizierten Silika-Partikel	110
81	Ergebnis der XPS-Untersuchung von GPS- und Polymer-funktionalisierten Partikeln	111
82	Übersicht der Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit PEI-OS-Architekturen	112
83	REM-Untersuchungen der PEI-OS-funktionalisierten Partikel	113
84	TEM-Aufnahmen PEI-OS-modifizierter Partikel	114
85	Vergleich von TEM-EDX-Aufnahmen von un- und modifizierten Partikeln	114
86	AFM-Aufnahmen der Partikeloberflächen	115
87	Ergebnisse der XPS-Untersuchungen der modifizierten Partikel	116
88	TGA-Untersuchung der un- und modifizierten Partikel	117

89	Aufnahmeeffizienz der modifizierten Partikel gegenüber wasserlöslichen Vitaminen . .	119
90	Schematischer Prozessablauf bei der SPE	126
91	Übersicht der PEI-OS-Architekturen	132
92	Übersicht der Kern-Schale-Architekturen mit einem höheren hydrophoben Anteil . . .	133
93	Überblick der auftretenden Interaktionen mit PEI-OS-Architekturen	134
94	Zusätzliche Signale für B ₆ durch Interaktion mit PEI-OS	136
95	Dynamische Prozesse während der Interaktion von Analyten mit unmodifizierten PEI und PEI-OS-Architekturen	136
96	Schema der auftretenden Wechselwirkungen mit der Polymerschicht	137
97	Veranschaulichung der CE-Ergebnisse mit Adenosin-Derivaten	140
98	¹³ C-NMR-Spektren der gealterten PEI-5k- und PEI-25k-Mal C Architekturen	160
99	IR-Spektren der gealterten PEI-5k-Mal Struktur A-C	161
100	Beladungskapazität von PEI-5k/25k-Mal B mit B ₃	166
101	NMR-Untersuchung mit unmodifiziertem PEI	166
102	Psi- und Delta-Werte bei PEI-OS Schichten	167
103	Interaktion der PEI-OS-Schicht mit Tocopherol	168
104	Psi- und Delta-Werte bei PEI-25k-(C11-NH ₂)-Mal-Schichten	169
105	Psi- und Delta-Werte bei PEI-5k-C11-Mal-Schichten	170
106	REM-Aufnahmen der PEI-5k-C11-Mal B modifizierten Partikeln	176
107	TEM-Aufnahmen der un- und modifizierten Silika-Partikel	176
108	TGA-Untersuchung der un- und modifizierten Partikel	176

Abkürzungsverzeichnis

α	Einfallswinkel
α_1 bzw. α_2	Reflexionen bzw. Brechungen des Einfallswinkels
a	Angebundene Oligosaccharid-Einheiten
a_M	angebundene Maltose-Einheiten
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)
AMP	Adenosinmonophosphat
APBS	3-Aminophenylboronsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATRP	Radikalische Polymerisation unter Atomtransfer (<i>atom transfer radical polymerisation</i>)
b	Anzahl der angebundenen Spacer-Einheiten
B ₁	Thiamin (Thiamin Hydrochlorid)
B ₂	Riboflavin
B ₂ -P	phosphoryliertes B ₂
B ₃	Nikotinsäure (Niacin)
B ₆	Pyridoxin
B ₁₂	Cyanocobalamin
BGE	Hintergrundelektrolyt/ Tennelektrolyt (<i>background electrolyte buffer</i>)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl (Schutzgruppe)
BuOH	Butanol
¹³ C-NMR	Kohlenstoff-NMR-Spektroskopie
°C	Grad Celsius
c	Konzentration [mol/L]
C11	Alkylketten (Spacer)
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CEC	Kapillarelektrochromatographie (<i>capillary electrochromatography</i>)
CEUF	Ultrafiltration unterstützt durch Komplexbildung (<i>complexation enhanced ultrafiltration</i>)
cm	Zentimeter
CPS	Zählrate (<i>count per second</i>)
CSP	Chirale stationäre Phase (<i>chiral stationary phase</i>)
CZE	Kapillarzonenelektrophorese (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
δ	chemische Verschiebung
Δ	Delta; Winkel bei der Ellipsometrie
D	Diffusionskoeffizienten
d	Schichtdicke
d_k	Schichtdicke [cm]; hier 1 cm
DF	Funktionalisierungsgrad $DF = a / (2 \cdot \text{terminale Gruppen} + \text{lineare Gruppen})$
DLS	Dynamische Lichtstreuung (<i>dynamic light scattering</i>)

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOSY	Diffusions-NMR-Spektroskopie
DP	Polymerisierungsgrad $DP = M_n / M(CH_2CH_2NH) = M_n / 43$ [g/mol]
DRIFTS	Diffuse Reflexions-Fouriertransformationsinfrarotspektroskopie (<i>diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy</i>)
ε_λ	Wellenlängenabhängiger molarer Absorptionskoeffizient (früher Extinktionskoeffizient)
η	Viskosität
E	Extinktion (auch Absorbanz oder optische Dichte)
EA	Elementaranalyse
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EKC	Elektrokinetische Kapillarchromatographie (<i>electrokinetic chromatography</i>)
EOF	Elektroosmotischer Fluss (<i>electroosmotic flow</i>)
eq.	Equivalent
Et ₃ N	Triethylamin
eV	Elektronenvolt
FA	Fettsäure, Alkylkette
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie
FWHM	Halbwertsbreite zur Basisbreite (<i>full width at half maximum</i>)
g	Gramm
G	Gauß
G100	Poly(ethylenimin) mit $M_w = 5$ kDa und $M_n = 3\,600$ g/mol
GPS	3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan
¹ H-NMR	Protonen-NMR-Spektroskopie
h	Stunde
HILIC	Hydrophile Interaktionsflüssigkeitschromatographie (<i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (<i>high-performance thin layer chromatography</i>)
I	Intensität eines transmittierten Lichtstrahls
I_0	Ausgangsintensität eines Lichtstrahls
IEP	Isoelektrischer Punkt
J	Joule
K	Kelvin
k	Kilo (1000)
K ₁	Phyllochinon
k_b	Boltzmann-Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K)

kDa	Kilo Dalton, 1000 Da
kV	Kilo Volt
L	Säulenlänge; hier 250 mm
Lac	Lactose
M	Molar
m	Meter
M_w	Molekulargewicht
Mal	Maltose
Mal-1	Höherer Funktionalisierungsgrad mit Maltose (dichte Schale)
Mal-2	Niedrigerer Funktionalisierungsgrad mit Maltose (moderate bis offene Schale)
Mal-III	Maltotriose
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie (<i>micellar electrokinetic chromatography</i>)
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
MIP	Molekular geprägte Polymere (<i>molecular imprinted polymers</i>)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
Mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	mol
mW	Milliwatt
MWCO	Molmassenabtrennung (<i>molecular weight cut-off</i>)
n	Brechungsindex
N	Trennleistung/ Effizienz (<i>number of theoretical plates</i>)
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMP	Nitroxid-vermittelte Polymerisation (<i>nitroxide-mediated Polymerisation</i>)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
OS	Oligosaccharide (hier: Maltose, Lactose, Maltotriose)
Ψ	Psi; Winkel bei der Ellipsometrie
p	Lineare Polarisationssebene parallel zur Einfallsebene
PAMAM	Poly(amidoamin)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEI	Poly(ethylenimin)
PEI-OS	Poly(ethylenimin)-Oligosaccharid
PEI-WF	Poly(ethylenimin) mit $M_w = 25$ kDa; $M_n = 9\,600$ g/mol

PEUF	Polymerunterstützte Ultrafiltration (<i>polymer enhanced ultrafiltration</i>)
POPAM	Poly(propylenamine)
PPI	Poly(propylenimin) auch Poly(propylenamine) bezeichnet
ppm	Einheit der chemischen Verschiebung (<i>parts per million</i>)
Pyrolyse-GC-MS	Massenspektrometrie-Pyrolyse-Gaschromatographie (<i>pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry</i>)
R	chromatographische Auflösung
R_a	Rauigkeit
r_h	(hydrodynamische) Radius eines Moleküls
R_p	Reflexionskoeffizient in paralleler Richtung des reflektierten Strahls (relativ zur Einfallsebene)
R_s	Reflexionskoeffizient in senkrechter Richtung des reflektierten Strahls (relativ zur Einfallsebene)
RAFT	Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation (<i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskopie (<i>scanning electron microscopy</i>)
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
ROMP	Ring-öffnende Metathese (<i>ring-opening metathesis polymerisation</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
σ_s	Standardabweichung
s	lineare Polarisationssebene senkrecht zur Einfallsebene
SLS	Statische Lichtstreuung (<i>static light scattering</i>)
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
Struktur A	Dichte Oligosaccharidschale
Struktur B	Offene bis moderate Oligosaccharidschale
Struktur C	Offene Oligosaccharidschale
Sulfo-NHS	<i>N</i> -hydroxysulfosuccinimid
T	Transmission
T	Temperatur
t_R	Retentionszeit in der HPLC
TDF	Totaler Funktionalisierungsgrad $TDF = a / (2 \cdot \text{terminale Gruppen} + \text{lineare Gruppen} + \text{dendritische Gruppen})$
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie (<i>transmission electron microscopy</i>)
TFA	Trifluoressigsäure
TGA	thermogravimetrischer Analyse (<i>thermogravimetric analysis</i>) Pyrolyse-GC-MS)
TLC	Dünnschicht-Chromatographie (<i>thin layer chromatography</i>)
μm	Mikrometer

UF	Ultrafiltration (<i>ultrafiltration</i>)
UV/Vis	ultraviolettes (<i>UV</i>) und sichtbares (<i>visible</i> , <i>VIS</i>) Licht
w %	Gewichtsprozent
w_B	Peakbreite an der Basis
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)
z_s	zurückgelegten Laufstrecke des Analyten in der TLC
z_0	Startlinie bei der TLC
z_f	Laufstrecke der Lösungsmittelfront

1 Motivation und Zielstellung

Moderne analytische Verfahren ermöglichen eine höchst effiziente Auftrennung und eine selektive Detektion von Zielanalyten. Dies ist vor allem in der Medizin von Bedeutung, da eine frühzeitige Diagnose von Krankheiten in den meisten Fällen zu einer wesentlich erfolgreicherer Behandlung beiträgt. In unserer heutigen Industriegesellschaft werden daher hochsensitive und effiziente Analysemethoden stärker benötigt als je zuvor. Diverse Umweltgifte oder gesundheitliche Schadstoffe gelangen vermehrt in Grundwasser und Umwelt. Eine Analyse ist aufgrund der oft nur geringen Konzentrationen und der Komplexität diverser Proben häufig mit großen Schwierigkeiten verbunden. Obwohl die Sensitivität und Effizienz zur Bestimmung von Krankheitsmarkern (*biomarker*) und Schadstoffen immer weiter zunimmt, stoßen selbst höchst sensitive Analysemethoden an ihre Grenzen. Gerade bei kleinsten Konzentrationen an Zielanalyten oder bei komplexen Gemischen ist eine direkte Detektion ohne weitere Vorbehandlung, wie Aufkonzentrierungen oder Markierungen, äußerst schwierig oder nicht möglich. Eine Optimierung dieser Methoden, deren Automatisierung sowie sensitivere Detektorsysteme werden benötigt. Darüber hinaus ist die Entwicklung von neuartigen, selektiveren mobilen und stationären Phasen ein hochinteressantes und umfangreich untersuchtes Forschungsgebiet.

Die Verwendung von hochselektiven Additiven, wie Cyclodextrinen, Kronenethern, Mizellen und andere chirale Selektoren in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Kapillarelektrophorese (CE)^[1, 2] oder in der Dünnschicht-Chromatographie (TLC)^[3] wurde bereits umfangreich untersucht und etabliert. Hochfunktionalisierte Polymere als äußerst spezifische Selektoren mit hoher Selektivität stellen vielversprechende Materialien dar, die ebenfalls eine Optimierung in der HPLC und CE erzielen.^[4–9] Der Einsatz von Polymeren in molekular geprägten Matrizen (*molecular imprinted polymers*, MIP) oder in monolithischen Trennsäulen wird bereits äußerst erfolgreich in der TLC, HPLC und CE genutzt.^[7–11] Eine solch hochselektive Säulenmodifizierung bietet eine sehr gute Performance und hervorragende Trennleistungen. Ein Nachteil dieser hochselektiven Modifizierung ist jedoch die Spezialisierung nur auf das jeweilige Problem. Eine universelle Verwendung für komplexe Gemische und eine Fülle von Analyten ist limitiert. Ein sehr vielversprechender Aspekt ist der Einsatz von Polymeren als chirale Selektoren in der stationären wie auch in der mobilen Phase. Die große Anzahl an kommerziell erhältlichen Trennsäulen mit einer Polymermodifizierung und das ständig umfangreichere Angebot solcher Säulen^[12] verdeutlichen diesen Trend und zeigen, dass die Nutzung von polymeren Architekturen für eine weitere Optimierung diverse Möglichkeiten bietet.

Hochverzweigte Polymere stellen unter den Polymeren vielversprechende Materialien dar, die aufgrund ihrer Vorteile zu einer effektiven Optimierung beitragen können.^[12] Die hohe Anzahl an terminalen Gruppen ermöglichen es, gut zugängliche anwendungsorientierte Modifizierungen durchzuführen, um gewünschte Eigenschaften zu generieren. Durch die hohe

Variabilität der Polymere selbst und der diversen Modifizierungsmöglichkeiten zeigen maßgeschneiderte Polymere ein enormes Potential und die Möglichkeit hochselektive Wechselwirkungen mit Zielanalyten zu etablieren. Die Modifizierung mit einer Schale um den polymeren Kern ermöglicht weitere Optimierungen für den Einsatz von Kern-Schale-Architekturen. Beispiele hierfür sind unter anderem die Vermittlung höherer Löslichkeit durch eine Modifizierung des hydrophilen/hydrophoben polymeren Kerns zur Etablierung einer äußeren Schale. Ebenso können durch die Modifizierung gezielte Eigenschaften generiert werden, die eine spezifische Interaktion mit Oberflächen oder Wirkstoffen ermöglichen. Kern-Schale-Architekturen werden bereits intensiv für medizinische Anwendungen als Therapeutika und in der Diagnostik untersucht^[13] und stellen hochgradig interessante Systeme dar. Aufgrund von definierten Eigenschaften der Kern-Schale-Architekturen können äußerst selektive Wechselwirkungen generiert werden, wodurch sie auch als chromatographische Selektoren hochrangig interessant erscheinen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Synthese und die Untersuchung von Kern-Schale-Architekturen als chromatographische Selektoren. Als polymerer Kern wird hochverzweigtes Poly(ethylenimin) (PEI) verwendet, das mit einer Oligosaccharidschale modifiziert wird. Das PEI wird mit den Kerngrößen 5 und 25 kDa verwendet, wodurch eine Untersuchung des Kerneinflusses möglich ist. Weiterhin wird die Dichte der Oligosaccharidschale eingestellt. Dafür wird eine dichte, moderate bis offene und eine sehr offene Oligosaccharidschale um den polymeren Kern generiert. Infolge dessen kann der Einfluss der Schalendichte auf die Interaktion mit Beispielanalyten evaluiert werden. Für die Oligosaccharidschale (OS) werden darüber hinaus drei verschiedene Oligosaccharide (Maltose, Lactose und Maltotriose) verwendet, um den Einfluss der Art der Schale zu prüfen. Durch diese Variationen können 15 unterschiedliche PEI-OS Kern-Schale-Architekturen synthetisiert und untersucht werden. Weiterhin soll der hydrophobe Anteil der Kern-Schale-Architekturen durch die Anbindung von unpolaren Seitenketten an einen PEI-Kern erhöht werden. Auf diese Art und Weise können nicht-kovalente Wechselwirkungen mit lipophilen Systemen untersucht werden.

Um polymere Kern-Schale-Architekturen möglichst effizient in der TLC, HPLC und CE einsetzen zu können, ist es essentiell, ihre Eigenschaften und die Art und Weise der Wechselwirkungen zu kennen, die sie mit möglichen Gastmolekülen eingehen. Durch die Untersuchung dieser Wechselwirkungen können Informationen über deren Interaktionen und eine mögliche Manipulation bzw. Optimierung dieser erhalten werden. Ein zielgerichteter und effektiver Einsatz mit diesen Kern-Schale Architekturen kann so vorbereitet werden.

2 Grundlagen und Stand der Forschung

2.1 Einführung von Kern-Schale-Architekturen in Bezug auf Glykopolymere

2.1.1 Kern-Schale-Architekturen

Während des letzten Jahrhunderts gewannen Polymere für unser alltägliches Leben eine immer wichtigere Rolle. Durch die Nutzung von polymeren Werk- und Hilfsstoffen wurde eine Vielzahl von Anwendungen ermöglicht und vereinfacht. Heutzutage ist die Polymerforschung ein sehr gut etabliertes Forschungsgebiet, mit dem sich eine Vielzahl an Arbeitsgruppen in den unterschiedlichsten Spezialgebieten befassen. Neben den linearen gewinnen die stark verzweigten Polymere nach den Pionierarbeiten von Vögtle *et al.*,^[14] Tomalia *et al.*^[15] und Newkome *et al.*^[16] eine immer größere Bedeutung. Eine Unterklasse der stark verzweigten Polymere sind die Dendrimere und die hochverzweigten Polymere. Eine schematische Darstellung des prinzipiellen Aufbaus der perfekt verzweigten Dendrimere und der stärker unregelmäßig hochverzweigten Polymeren ist in **Abbildung 1** veranschaulicht.

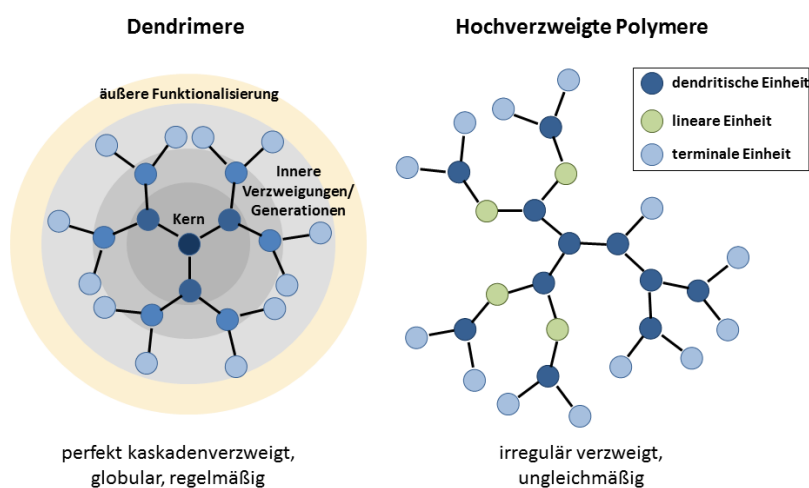


Abbildung 1: Links ist die perfekte Kaskadenstruktur eines Dendrimers gezeigt, wohingegen rechts die irreguläre Struktur eines hochverzweigten Polymers verdeutlicht wird.

Dendrimere als perfekt kaskadenverzweigte Makromoleküle mit einer hohen Endgruppenfunktionalität stellen eine vielseitige Strukturklasse dar. Größe, Architektur, Dichte, Anzahl und Modifizierung der Endgruppen führen zu hochspezialisierten Polymeren.^[13] Die Anzahl der Verzweigungspunkte, die vom zentralen Kern abgehen, werden Generationen eines Dendrimers genannt.^[17] Hochverzweigte Polymere weisen im Gegensatz zu den Dendrimern keine perfekte Verzweigung auf. Sie besitzen aber ebenfalls eine kompakte, globuläre Struktur, eine

große Anzahl an Endgruppen, unterschiedliche Dichteverteilungen in der verzweigten Polymerstruktur und die Fähigkeit zur Komplexbildung.^[18]

Generell können sowohl in den Dendrimern wie auch in den hochverzweigten Polymeren drei Domänen unterschieden werden: der zentrale Kern, die von diesem abgehenden inneren Verzweigungen und eine Funktionalisierung der Endgruppen.

Durch die Art und Weise der Funktionalisierung der Endgruppen können die Polyeigenschaften hoch effektiv auf ihre Anwendungen maßgeschneidert werden. Eine Möglichkeit äußerst zielgerichtete Polymere zu erhalten, ist der Aufbau sogenannter Kern-Schale-Architekturen, bei denen der zentrale polymere Kern mit äußeren funktionalen Gruppen modifiziert wird. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Kern-Schale-Architekturen in Hinblick auf ihr Potential als Wirkstofftransportsysteme bzw. als Wirt-Gast-Systeme synthetisiert und umfangreich untersucht.^[18–21] Die Synthese von Kern-Schale-Architekturen kann durch eine kaskadenartige Polymerisation hin zu höheren Generationen mit definierten Eigenschaften durchgeführt werden. Dabei kann in einem finalen Schritt die äußere Generation mit der gewünschten Funktionalität oder komplett funktionalisierte Polymerabschnitte angebunden werden. Da mit steigender Generation eine komplette Umsetzung aller terminalen Gruppen aufgrund von sterischen Hinderungen nicht mehr möglich ist und fehlerhaftes Wachstum auftritt (Starburst-Limit-Effekt^[22]), ging man zu einer gezielten Modifizierung über. Bei dieser Methode kann ein Kern mit spezifischen Eigenschaften aus einem großen Spektrum an möglichen Polymeren gewählt werden. Zusätzlich kann eine Funktionalisierung der äußeren Sphäre in Hinblick auf die gewünschte Anwendung äußerst gezielt durchgeführt werden. Auf diese Art und Weise entstehen hochfunktionalisierte und maßgeschneiderte Kern-Schale-Architekturen. Als Kernpolymere dienen sehr häufig Poly(amidoamin) Dendrimere (PAMAM), Poly(propylenamin) (POPAM oder auch systematisch korrekt Poly(propylenimin), PPI), sowie das hochverzweigte Poly(ethylenimin) (*hb* PEI) (siehe **Abbildung 2**).

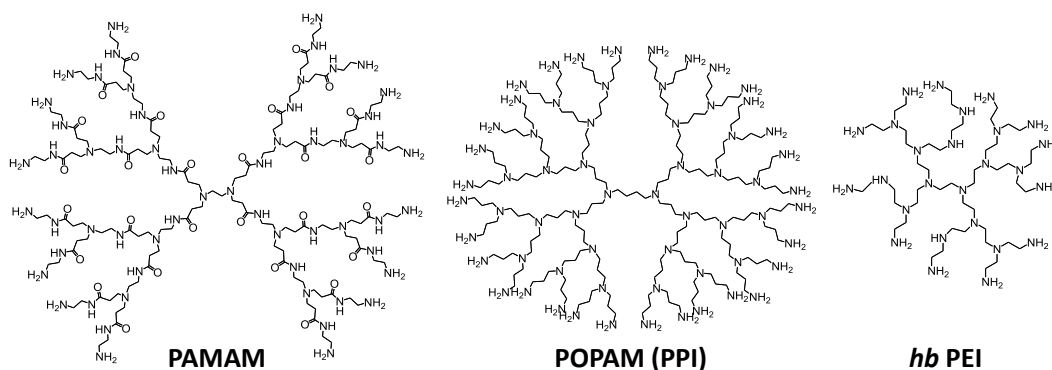


Abbildung 2: Überblick einiger wichtiger Dendrimere, wie PAMAM oder POPAM, sowie dem hochverzweigten PEI, die häufig als polymere Kerne in Kern-Schale-Architekturen verwendet werden.

Für eine biomedizinische Anwendung eignen sich diese Polymere aufgrund ihrer relativ hohen Toxizität nur bedingt.^[23, 24] In Folge von Protonierungen der Aminogruppen kommt es in Abhängigkeit des pH-Wertes zumeist zu positiven Ladungen unter physiologischen Bedingungen. Diese zumeist positiv geladenen Polymere können mit den negativ geladenen Zelloberflächen interagieren und Zellschäden verursachen.^[25] Durch eine weitere Modifizierung der Oberfläche kann die toxische Ionenladung des Polymerkerns abgeschirmt und eine

höhere Biokompatibilität erzielt werden. Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten einer spezifischen Modifizierung ist eine Anwendung dieser hochfunktionalisierten Strukturklasse unter anderem in der Biomedizin ebenfalls sehr gut möglich.^[19] Unter anderem können die so aufgebauten Kern-Schale-Architekturen für den gezielten Wirkstofftransport,^[21, 25–27] DNA/RNA Transport^[28] oder in der Diagnostik^[13] eingesetzt werden. Weiterhin können auch direkt spezielle Liganden angebunden werden, wodurch neuartige, sterisch anspruchsvolle Katalysatoren generiert werden können.^[29] Auch in elektronischen Anwendungen finden Kern-Schale-Architekturen Verwendung. Beispielsweise als Licht-emittierende Systeme, optische Sensoren oder Displays.^[30, 31] Gezielte Proteinwechselwirkungen ermöglichen weiterhin den Einsatz von Kern-Schale-Architekturen in der Zellerkennung oder als Modellsysteme für Zellinteraktionen.^[32] Anhand einiger Beispiele soll das enorme Potential und die vielfältigen Verwendungen von spezialisierten Kern-Schale-Architekturen in **Abbildung 3** verdeutlicht werden.^[18–21, 32–35]

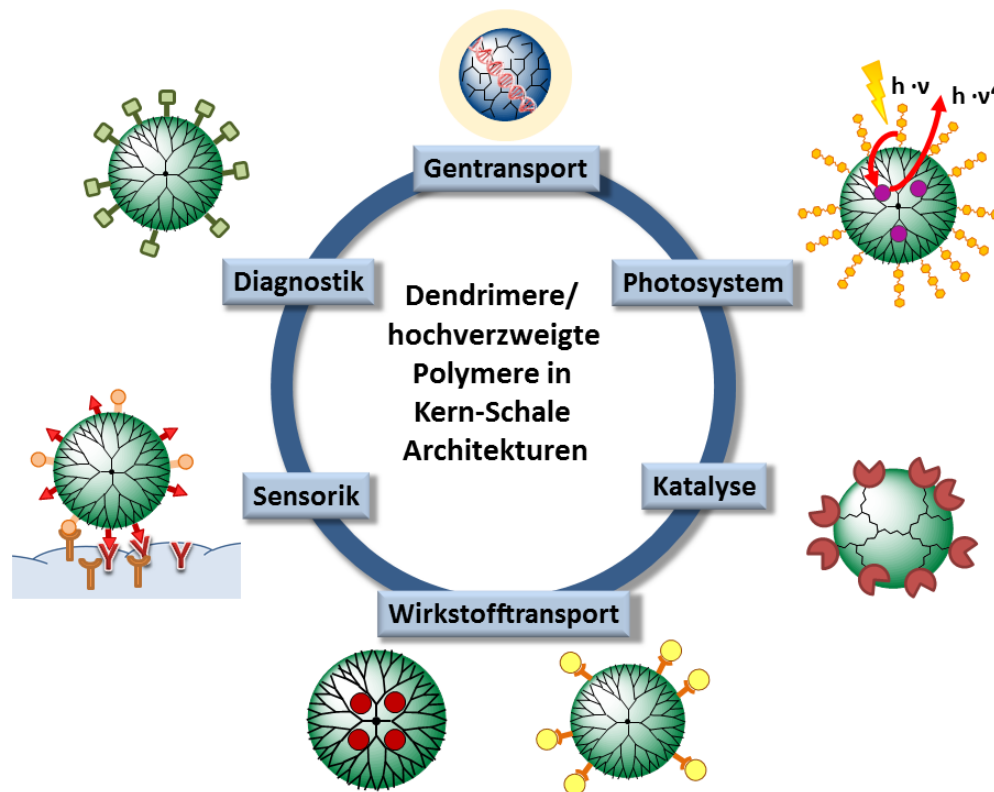


Abbildung 3: Verdeutlichung einiger Beispiele der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von hochverzweigten Polymeren bzw. Dendrimeren und deren Kern-Schale-Architekturen.

Neben diesen vielfältigen Einsatzmöglichkeiten ist die Nutzung von Kern-Schale-Architekturen in der Biomedizin ein umfassendes Forschungsgebiet.^[13, 24] Von großem Interesse sind die Komplexierung von Gastmolekülen, deren gezielter Transport und Freisetzung sowie die Nutzung von spezifischen Wechselwirkungen zwischen Kern-Schale-Architekturen und Gastmolekülen.^[21, 25–27] Derartige Wirkstofftransportsysteme sollten eine hohe Beladungskapazität, geringe Toxizität, hohe Biokompatibilität und die Möglichkeit für einen zielgerichteten Transport und Freisetzung des Wirkstoffes aufweisen.^[26] Die definierte, globuläre Struktur, die Monodispersität und die Möglichkeit für diverse Modifizierungen der äußeren Sphäre

lassen Dendrimere und hochverzweigte Polymere als Wirkstofftransportsysteme äußerst attraktiv erscheinen. Wirkstoffe können dabei entweder mit dem Inneren oder mit der äußeren Sphäre der Kern-Schale-Architekturen über nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie elektrostatische oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen, interagieren.^[26, 36] Eine kovalente Anbindung von spezifischen Rezeptormolekülen ist ebenfalls denkbar.^[37] Mit Hilfe dieser umfangreichen Variationen sind eine Vielzahl an zielgerichteten und spezifischen Wirkstofftransporten möglich.^[20, 25–27, 37]

2.1.1.1 Dendrimer/Gast-Komplexe

Interagieren die Wirkstoffe bzw. Gastmoleküle mit dem Inneren der Kern-Schale-Architekturen wird im Allgemeinen von Dendrimer/Gast-Komplexen gesprochen (**Abbildung 4**). Diese Komplexe treten beispielsweise bei der Interaktion von hydrophoben Gastmolekülen mit hydrophoben Polymerkernen auf. Hydrophile Gastmoleküle können über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der äußeren Sphäre interagieren und auf diese Weise komplexiert werden.

Die von *Fréchet* beschriebenen unimolekulare Mizellen^[16] finden unter diesem Aspekt eine häufige Verwendung. Unimolekulare Mizellen bestehen aus einem amphiphilen Kern-Schale-System, bei dem ein hydrophober dendritischer Kern mit einer hydrophilen äußeren Schale funktionalisiert wird.^[16, 38] Unimolekulare Mizellen, die nach der Methode von *Fréchet* synthetisiert wurden, bestehen aus einem Poly(arylether) Dendrimer und einer äußeren Sphäre von Carboxylfunktionalitäten.^[39] Die Interaktion mit polaren Gastmolekülen wie Pyren über π - π -Wechselwirkungen ist mit diesen Kern-Schale-Architekturen sehr gut möglich und erhöht die Löslichkeit des Pyrens deutlich.^[39] Ein Transport hydrophober, bioaktiver Gastmoleküle, wie Steroide, ist mit diesen Dendrimer/Gast-Komplexen ebenfalls gut möglich.^[36] Weitere interessante Systeme basierend auf unimolekulare Mizellen nutzen beispielsweise einen Poly(amidoamin)-Kern modifiziert mit hydrophilen Poly(ethylenglycol)-Ketten (PEG) als äußere Sphäre. Eine Funktionalisierung der Kernoberfläche mit PEG-Ketten erhöht die Wasserlöslichkeit und die Biokompatibilität^[18] und führt zu einer höheren Stabilität und Komplexierungsfähigkeit.^[20] Die Interaktion derartiger unimolekularer Mizellen wurden unter anderem mit Antitumormedikamenten, wie 5-Fluorouracil,^[40] Methotrexat^[41, 42] und Doxorubicin^[41] erfolgreich getestet. Der Einfluss der unterschiedlichen Faktoren, wie die Größe des Polymerkerns oder die Größe und Eigenschaften der angebundenen äußeren Schale, wurde in dieser Hinsicht umfangreich auf ihre Wechselwirkungen mit Gastmolekülen untersucht.^[13, 18–21, 43]

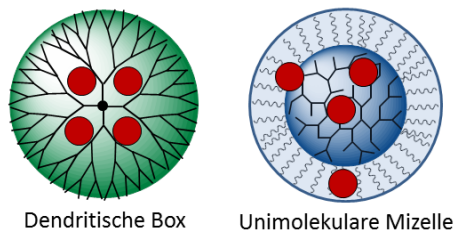


Abbildung 4: Verdeutlichung der dendritischen Box (links) und der unimolekularen Mizelle (rechts).

Ein weiteres sehr bekanntes Beispiel für Dendrimer/Gast-Komplexe ist die von *Meijer et*

al. beschriebene dendritische Box^[44]. Hierbei handelt es sich um ein Poly(propylenimin)-Dendrimer als Kernmoleküle, das mit Boc-geschützten Phenylalanin-Einheiten modifiziert wurde. Durch diese Modifizierung konnte eine dichte, sterisch anspruchsvolle, äußere Sphäre generiert werden. Die Diffusion der Gastmoleküle aus dem Polymerkern kann durch die Modifizierung der Endgruppen des PPI-Kerns mit Aminosäurederivaten deutlich gehindert werden.^[44–46] In Abhängigkeit der Größe der Gastmoleküle konnten bis zu vier Moleküle des Farbstoffes Bengalrot und acht bis zehn kleinere Gastmoleküle (4-Nitrobenzoesäure) eingeschlossen werden.^[46] Die Molekülgröße des Gastes sowie die Größe des Polymerkerns und dessen Komplexierungsfähigkeit beeinflussen somit maßgeblich die Effizienz der Interaktion.^[36]

Bei Dendrimer/Gast-Komplexen kann mit Hilfe von Ladungs- oder Größenänderungen sowie durch eine teilweise oder komplette Entfernung der äußeren Sphäre eine Freisetzung der Gastmoleküle erzielt werden.^[26] Dendrimer/Gast-Komplexe weisen die Vorteile auf, dass sie die therapeutische Wirkung der Gastmoleküle erhalten und schützen, eine gute Verweilzeit im Blutkreislauf aufweisen und relativ einfach durch Mischung der jeweiligen Komponenten gebildet werden können.^[26] Die Beladungseffizienz ist allerdings von diversen Parametern, wie der Struktur, Größe und Oberflächenfunktionalisierung der Dendrimere sowie dem molekularen Gewicht der Gastmoleküle, abhängig. Weiterhin übt der pH-Wert, das Lösungsmittel und die Temperatur einen Einfluss auf die Interaktion aus.^[26] Eine Kontrolle der Interaktionen ist somit nicht trivial.

2.1.1.2 Dendrimer/Gast-Konjugate

Bei sogenannten Dendrimer/Gast-Konjugaten (**Abbildung 5**) werden Gastmoleküle entweder direkt an die äußere Sphäre von Kern-Schale-Architekturen kovalent angebunden^[37, 47] oder interagieren über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Oberflächenfunktionalitäten, wie beispielsweise Rezeptor-Molekülen.^[48, 49] Bei dieser Art der Interaktion resultiert eine wesentlich höhere Kontrolle der Beladung und Freisetzung im Vergleich zu den Dendrimer/Gast-Komplexen.^[26] Aufgrund der hohen Modifizierungsmöglichkeiten der Dendrimere mit spezifischen Rezeptoren kann eine selektive Interaktion gewährleistet und eine gezielte Freisetzung erhalten werden.

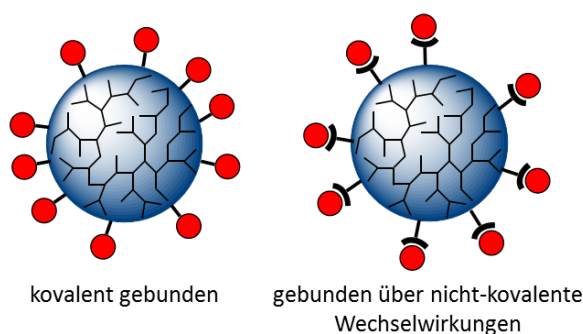


Abbildung 5: Verdeutlichung von Dendrimer/Gast-Konjugaten mit kovalent angebundenen Gastmolekülen (links) oder mit Gastmolekülen, die über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Oberflächenfunktionalitäten der Kern-Schale-Architekturen interagieren (rechts).

Für die Generierung von Dendrimer/Gast-Konjugaten wird ein Dendrimer oder hochverzweigtes Polymer in mehreren Syntheseschritten modifiziert, wodurch die Ausbeute niedrig ausfällt und die Kosten ansteigen. Für die Anbindung der Gastmoleküle werden häufig Ester-, Amid-, Imin-, Carbamat- oder Peptid-Bindungen genutzt, bei denen eine selektive Spaltung möglich ist. Nachteilig wirkt sich die gezielte Freisetzung durch Änderung von bestimmten Einflüssen (pH-Wert, Temperatur, Hydrolyse, Enzyme) aus. Sie ist in den meisten Fällen problematisch und *in vivo* nach Transport in Blutkreislauf und Internalisierung in Organen und Zellen nicht überall kontrollierbar durchführbar.

2.1.1.3 Kern-Schale-Architekturen basierend auf hochverzweigten Polymeren

Neben den perfekt verzweigten PAMAM und PPI Dendrimeren finden ebenso hochverzweigte Polymere mit einem irregulären Aufbau Anwendung in Kern-Schale-Architekturen und Transportsystemen.^[50] Sie bieten den Vorteil, dass die Synthese von Kern-Schale-Architekturen aufgrund der einfacheren Zugänglichkeit von hochverzweigten Polymeren kostengünstiger ist als die von dendritischen Systemen. Die Synthese von Kern-Schale-Architekturen mit hochverzweigten Polymeren und deren Anwendung als potentielle Transportsysteme ist ein umfangreiches und bereits gut untersuchtes Thema.^[47, 50–54]

Das hochverzweigte Poly(ethylenimin) (PEI) wird vielfach als Polymerkern in Kern-Schale-Architekturen genutzt. Dieses kationische Polymer besitzt eine sehr hohe positive Ladungsdichte und weist neben linearen und terminalen auch dendritische Aminogruppen auf. Die hohe Anzahl an terminalen Aminogruppen kann eine sehr gute Pufferkapazität und eine gute Interaktion mit DNA ermöglicht werden.^[50] Vor allem unter biologischen Aspekten, wie der Gentherapie, ist der Einsatz von PEI als Transportsystem für RNA und DNA geläufig.^[55, 56] Die hohe kationische Ladungsdichte aufgrund der Vielzahl an protonierbaren Amino-Stickstoffen bewirkt bei unmodifizierten PEI jedoch eine hohe Cytotoxizität und lässt es als Wirkstofftransportsystem ungeeignet erscheinen.^[23, 24]

In Kern-Schale-Architekturen wird Poly(ethylenimin) häufig als polarer Kern genutzt, der mit hydrophilen Gastmolekülen wechselwirken kann. Die Modifizierung mit einer hydrophoben Schale erhöht die Löslichkeit in apolaren Solventien. Als Beispiel hierfür wurde 2009 ein PEI-Kern mit PEG-Ketten von der Arbeitsgruppe um *Haag et al.* modifiziert.^[43] Dieses Kern-Schale-System wurde benutzt, um den Wirkstofftransport von verschiedenen Antitumormedikamenten wie Doxorubicin und Methotrexat zu untersuchen.^[43] Das Interaktionsverhalten von hochverzweigten PEI, modifiziert mit 2-Dodecyloxymethyloxiranen, wurde mit verschiedenen Beispielmolekülen, wie Methylorange, Bengalrot oder Kongorot, von *Wan et al.* untersucht.^[57]

Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass eine Modifizierung der terminalen Polymergruppen mit einer äußeren Schale die Eigenschaften maßgeblich verändern kann. Die Synthese von maßgeschneiderten dendritischen Polymeren mit spezifischen Eigenschaften und der Möglichkeit, selektiv Gastmoleküle zu komplexieren, zeigt das enorme Potential und die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von dendritischen Polymeren, sowohl von perfekt als auch hochverzweigten Polymeren.

2.1.2 Glykopolymere und Glykodendrimere

Eine weitere Methode zur Modifizierung der Polymeroberfläche ist die Anbindung von biologisch bedeutsamen Kohlenhydrateinheiten. Kohlenhydrate übernehmen essentielle Funktionen bei einer Vielzahl an relevanten Prozessen, wie beispielsweise bei Zell-Zell-Interaktionen, bei krankheitsbedingten Prozessen wie Entzündungen, Signalübertragungen und bei der Interaktion mit Proteinen.^[58, 59] Die Modifizierung von polymeren Strukturen mit Kohlenhydraten und die daraus resultierende Generierung von Glykopolymeren ist ein vielversprechendes Forschungsgebiet, das in den letzten Jahren rapide weiterentwickelt wurde.^[60, 61] Aufgrund der hohen Biokompatibilität, der höheren Wasserlöslichkeit und der möglichen spezifischen Interaktionen mit Kohlenhydrat-Rezeptoren eignen sich Kohlenhydrat-modifizierte Polymere für eine große Spannbreite an biomedizinischen Anwendungen.^[60, 62–64] In der biomedizinischen Forschung können diese interessanten Kern-Schale-Architekturen sowohl in der therapeutischen Forschung, in Kombination mit Medikamenten^[62, 63, 65] oder als Wirkstofftransportsysteme^[19, 60, 62, 63, 65, 66] eingesetzt werden. Darüber hinaus ist eine Verwendung von Glykopolymeren in der Biosensorik^[62] sehr gut möglich. Hierfür kann die selektive Interaktion von Kohlenhydraten mit Rezeptoren genutzt werden, um spezifische Wechselwirkungsreaktionen zu beobachten. Weiterhin können Glykopolymere als Matrices für Zellwachstum und Gewebezüchtung (*tissue engineering*)^[67, 68] oder als Modellsysteme für Glykoproteine, Zellreaktionen oder Glykolipide eingesetzt werden.^[60, 69] Die umfangreichen Synthesemöglichkeiten von linearen und dendritischen Glykopolymeren^[59, 70] eröffnet eine große Vielfalt an hochspezialisierten und zielgerichteten Verbindungen. Diese können mit Hilfe von diversen Polymerisationsmöglichkeiten mit milden Reaktionsbedingungen und einer schonenden Aufreinigung mit dem gewünschten Molekulargewicht und Struktur hergestellt werden, ohne dass die biologische Funktion des Kohlenhydrates verändert wird.^[62, 70]

Generell kann zwischen einer Pre-Polymerisations- und Post-Polymerisations-Modifizierung unterschieden werden. Bei der erstgenannten findet die Modifizierung mit Kohlenhydraten schrittweise und selektiv mit Hilfe von weiterentwickelten kontrollierten radikalischen Polymerisationsreaktionen, wie der radikalischen Polymerisation unter Atomtransfer (ATRP), reversiblen Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation (RAFT), Nitroxid-vermittelte Polymerisation (NMP) und der Ringöffnungsmetathese (ROMP), statt.^[59, 62, 70–73] Für die Herstellung von Glykopolymeren können neben den radikalischen Polymerisationen auch enzymatische Reaktionen genutzt werden. Diese sind äußerst spezifisch mit einer hohen Regio-, Chemo- und Stereoselektivität.^[72]

Bei der Post-Polymerisations-Modifizierung findet die Generierung glykopolymerer Strukturen in einem finalen Syntheseschritt statt, bei dem die Zuckerfunktionalitäten an bereits vorliegende polymere Kerne angebunden werden.^[60, 62] Hierfür werden zumeist einfache polymeranaloge Kupplungsreaktionen genutzt, bei denen die Saccharide in einer aktivierten Form eingesetzt werden.^[70]

Als weitere Spezifizierung der Glykopolymere finden häufig Glykodendrimere mit ihrer hochverzweigten Struktur Anwendung in der biomedizinischen Forschung.^[19]

Neben der globulären Struktur der Glykodendrimere weisen sie gegenüber Glykopolymeren den Vorteil auf, dass sie eine hohe Anzahl an terminalen Gruppen aufweisen, die für eine Modi-

fizierung genutzt werden können. Weiterhin ist die finale Modifizierung eines bereits vorliegenden Dendrimers oder hochverzweigten Polymers oft kostengünstiger und einfacher als die schrittweise und mitunter teure Modifizierung von Glykopolymeren.^[74] Grundsätzlich können Glykodendrimere in drei Klassen (**Abbildung 6**) unterteilt werden: 1.) Glykodendrimere mit der Modifizierung der terminalen Funktionalitäten des Dendrimers und somit einer äußeren Kohlenhydratschale, 2.) Glykodendrimere mit einem Kohlenhydrat als zentralen Kern und 3.) vollständig auf Kohlenhydrat basierende Dendrimere. Für die vorliegende Arbeit ist die Klasse der Glykodendrimere mit einer äußeren Kohlenhydrathülle von besonderem Interesse, weshalb im Folgenden nur diese Klasse näher betrachtet wird.

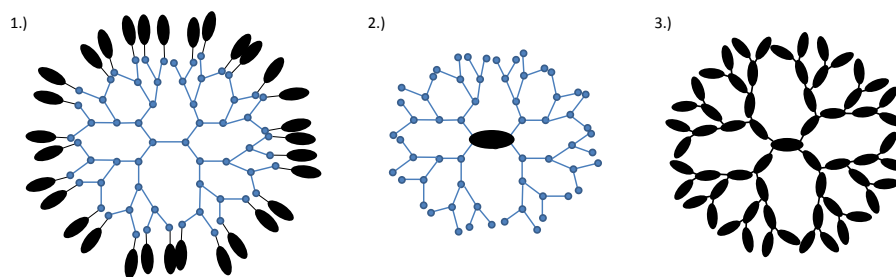


Abbildung 6: Verdeutlichung der unterschiedlichen Strukturformen von Glykodendrimeren mit 1.) der Modifizierung der terminalen Funktionalitäten des Dendrimers, 2.) einem Kohlenhydrat als zentralen Kern und 3.) vollständig auf Kohlenhydrat basierende Glykodendrimere.

Für die Synthese von definierten Glykodendrimeren aus kommerziell erhältlichen Polymeren werden häufig PAMAM oder PPI genutzt.^[52, 64, 75, 76] Diese Dendrimere weisen Amin-basierte Polymerkerne auf, bei denen eine Modifizierung mit Kohlenhydraten sehr gut über Harnstoff-, Thioharnstoff- oder Amidbindungen mit den primären Aminogruppen durchgeführt werden kann.^[74] Okada *et al.* beschrieben die Synthese und Eigenschaften sogenannter *sugar balls*, bei denen es sich um Poly(amidoamin)-Dendrimere modifiziert mit 48 Kohlenhydratfunktionalitäten handelt.^[77] Die Kupplung der Kohlenhydrate erfolgte durch eine Reaktion der terminalen Aminogruppen mit Lacton-Derivaten der Lactose und Maltose. Ihre Interaktionen mit Concanavalin A, das spezifisch mit Glykosyl- bzw. Mannosyl-Funktionalitäten reagiert, wurden untersucht. Eine starke Wechselwirkung mit dem tetrameren Concanavalin A konnte mit Hilfe einer Vernetzungsreaktion und der daraus resultierenden Ausfällung des reagierenden Concanavalins A mit den Glykopolymeren nachgewiesen werden.^[77]

Beispiele für Glykodendrimere auf PPI-Basis und deren Nutzung in diversen Applikationen wurden von Appelhans *et al.* veröffentlicht.^[78–81] Unter anderem wurden Maltose modifizierte Glykodendrimere für die Komplexierung, Stabilisierung und den Transport von Rhenium-Komplexen genutzt.^[82] Weiterhin wurden diese Glykodendrimere für die kontrollierte Herstellung von Gold-Nanopartikeln eingesetzt, bei denen das Metallion durch das Glykodendrimer komplexiert und entweder chemisch oder durch das Glykopolymer selbst reduziert wurde. Auf diese Art und Weise fungiert das Glykopolymer sowohl als Reduktionsmittel als auch als Stabilisator.^[78] Ein weiteres Beispiel für die stabilisierende Wirkung dieser Glykodendrimere wurde bei der Synthese von CdSe-Partikeln nachgewiesen.^[79] Darüber hinaus wurde eine medizinische Verwendung von dendritischen PPI-Kernen modifiziert mit Maltose oder Maltotriose erfolgreich als anti-Prion-Wirkstoff getestet.^[80]

Neben diesen exemplarischen Anwendungsmöglichkeiten konnten Glykodendrimere im Allgemeinen bereits in der Sensorik,^[83, 84] in Kombination mit Medikamenten,^[64, 85] als Wirkstofftransportsysteme,^[19, 74, 86] oder als Matrices für Zellwachstum und Gewebezüchtung (*tissue engineering*),^[87] genutzt werden. In **Abbildung 7** sind einige Beispiele für die Verwendung von unterschiedlichsten Glykodendrimeren verdeutlicht.

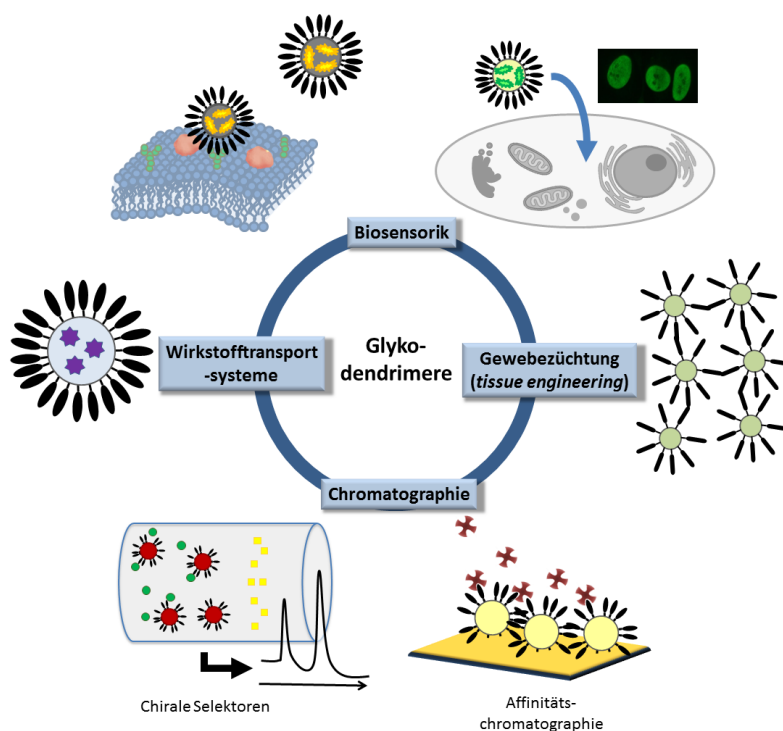


Abbildung 7: Verdeutlichung der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von Glykodendrimeren.

Analog zu diesen viel genutzten Dendrimeren, können auch hochverzweigte Polymere als Kernelement zum Aufbau von dendritischen Glykopolymeren genutzt werden.

2.1.3 Glykopolymere basierend auf einem hochverzweigten Poly(ethylenimin) Kern

Im Gegensatz zu PAMAM- und PPI-Kernen eröffnet ein hochverzweigter Poly(ethylenimin) Kern die Möglichkeit, dass neben den terminalen, primären Aminogruppen auch sekundäre Aminogruppen reagieren und funktionalisiert werden können. Durch die Modifizierung des PEI-Kerns mit Kohlenhydratfunktionalitäten kann die Biokompatibilität sowie die Löslichkeit deutlich erhöht werden. Beispiele für die erfolgreiche Anwendung von kohlenhydratmodifizierten PEI-Glykopolymeren in der Gentherapie sind bereits gut untersucht und literaturbekannt.^[88–90] Wie bereits von *Okada et al.*^[77] bei der Synthese der sogenannten *sugar balls* gezeigt, stellt die Anbindung von Zuckereinheiten mittels reduktiver Aminierung (**Abbildung 8**) eine einfache und in Wasser durchführbare Möglichkeit zur Synthese dar.^[52]

Mit Hilfe eines Boran-Pyridin-Komplexes als starkes Reduktionsmittel gelang es *Appelhans et al.* die Generierung von hochverzweigten Glykopolymeren. Es konnten nicht nur ein Oligosaccharid (OS) an die primären und sekundären Aminogruppen des PEIs angebunden werden,

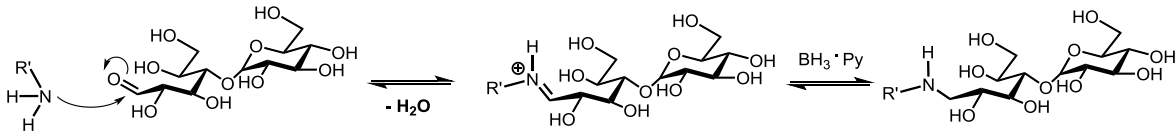


Abbildung 8: Reaktionsschema der reduktiven Aminierung mit Maltose als Beispiel-saccharid und Boran-Pyridin-Komplex als Reduktionsmittel.

sondern es gelang eine zweifache Umsetzung der primären Aminogruppen hin zu funktionalisierten dendritischen Einheiten.^[52] Somit ist die Einstellung definierter Funktionalisierungsgrade mit unterschiedlichen Dichten der Oligosaccharidschale möglich. Das Verhältnis von aktiviertem Oligosaccharid zu reagierender Aminogruppe entscheidet zwischen einer nahezu vollständigen Umsetzung aller reaktiven Aminogruppen oder nur einer teilweisen Umsetzung (**Abbildung 9**).^[52] Drei verschiedene Dichten der Oligosaccharidschale können unterschieden werden. Reagieren nahezu alle terminalen und ein großer Anteil der linearen Einheiten mit einem Kohlehydrat kann eine sehr dichte Oligosaccharidschale generiert werden. Sie weist einen Funktionalisierungsgrad von 75-95 % auf und hat hauptsächlich dendritische Einheiten in ihrer Peripherie. Bei einer moderaten Oligosaccharidschalendichte reagieren die terminalen Einheiten größtenteils nur einmal. Es befinden sich überwiegend lineare Einheiten und geringfügig auch dendritische Einheiten in der Peripherie. Der Funktionalisierungsgrad liegt bei 32 bis 48 %. Eine offene Oligosaccharidschale wird erhalten, wenn die Funktionalisierung nur unvollständig abläuft. Sie besteht aus einer Mischung von terminalen und linearen Einheiten mit einem Funktionalisierungsgrad von 16 bis 30 %.^[52]

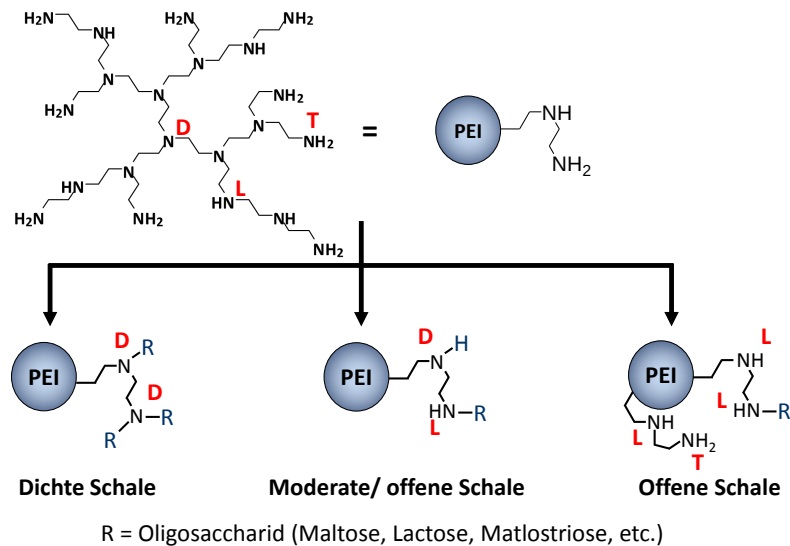


Abbildung 9: Glykopolymerstrukturen, die von *Appelhans et al.* hergestellt und untersucht wurden.^[52, 91] R stellt dabei die Funktionalisierung mit einem Oligosaccharid dar (R= Maltose, Lactose, Maltotriose).

Verschiedene Glykopolymere mit unterschiedlichen PEI-Kerngrößen und diversen Oligosacchariden konnten hergestellt und umfangreich untersucht werden.^[52, 76, 92, 93] PEI-OS Kern-Schale-Architekturen liegen in Lösung separiert als Einzelmoleküle vor und wurden umfangreich von *Appelhans et al.* mittels verschiedener Analysemethoden, wie NMR- und FTIR-Spektroskopie, Elementaranalyse und Lichtstreuversuchen charakterisiert.^[52]

Als Beispiel kann die Untersuchung der Biokompatibilität und Wirksamkeit von PEI-DNA oder PEI-siRNA Komplexen von *Aigner et al.* genannt werden.^[94] PEI wurde mit Maltose oder Maltotriose modifiziert und die DNA-/ siRNA-Komplexe *in vivo* getestet. Komplexe von PEI mit einem höheren Kohlenhydratanteil zeigten dabei eine hohe Effizienz für den Gentransport.^[94] Ebenso wurde die stabilisierende Wirkung von hochverzweigten PEI-Glykopolymeren bei der Synthese von Metallnanopartikeln in Wasser getestet.^[95] Hochverzweigtes PEI modifiziert mit Maltose oder Maltotriose wurde weiterhin bei der Synthese von Goldnanopartikeln genutzt, um diese bei der Synthese zum einen zu stabilisieren und zum anderen zu reduzieren.^[78, 96] Es konnte festgestellt werden, dass die sekundären Aminogruppen des PEI-Kerns für die Reduzierung der Metallionen verantwortlich sind, wohingegen die primären Aminogruppen eine stabilisierende Funktion ausüben. Die Oligosaccharidschale beeinflusst die finale Größe und Form der Goldnanopartikel.^[78, 96]

Weiterhin können dendritische Glykopolymere basierend auf einem PEI-Kern für einen gezielten Transport eingesetzt werden.^[88, 89] Die Interaktion von auf Zelloberflächen gebundenen Rezeptoren mit den Zuckerfunktionalitäten der Glykopolymere kann hierfür genutzt werden.

Sie sind durch ihre Kohlenhydrathülle und den in Lösung kationisch geladenen Polymerkern in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen und über diese mit Gastmolekülen zu interagieren. Die Beispielmoleküle Adenosintriphosphat (ATP)^[52] und der Farbstoff Bengalrot^[97] wurden mit diesen hochverzweigten Glykopolymeren auf ihre Komplexierungseigenschaften untersucht. Eine gute Aufnahme dieser Testanalyten in die Kern-Schale-Architekturen wurde nachgewiesen.^[52] Die Ergebnisse für ATP zeigten, dass die Komplexierungseigenschaften bei einem pH-Wert von 7 überwiegend durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen ATP und dem positiv geladenen Polymerkern dominiert werden. Diese Wechselwirkungen können zusätzlich durch weitere schwache, nicht-kovalente Wechselwirkungen (z.B. hydrophobe, π - π - oder π -OH-Wechselwirkungen) verstärkt werden.^[52] Wie bereits bei ATP beobachtet wurde, fand die Interaktion mit dem anionischen Bengalrot ebenfalls über elektrostatische Interaktionen mit dem kationischen Polymerkern statt.^[97]

Ausgehend von diesen spezifischen Interaktionen, die diese PEI-OS-Architekturen mit Gastmolekülen eingehen können, wäre ein Einsatz in chromatographischen Applikationen äußerst interessant. Die Verwendung von Dendrimeren oder hochverzweigten Polymeren als Additive in chromatographischen Applikationen wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[98–100]

Ein Beispiel hierfür ist die Ausnutzung der Interaktion von Proteinen, wie beispielsweise Lektinen, mit Glykoproteinen. Die Anbindung von Lektin an Polymerbürsten und deren Interaktion mit Glykoproteinen wurde bereits von *Qian et al.* untersucht. Eine effektive Anreicherung von Glykoproteinen mit Hilfe der modifizierten Polymer-Lectin-Bürsten konnte festgestellt werden.^[101] Ebenso wurde von *Haddleton et al.* die Interaktion von linearen Mannose-modifizierten Glykopolymeren mit Glykoproteinen erfolgreich getestet.^[102]

Die Verwendung von Glykopolymeren könnte somit eine weitere interessante Optimierung der Trennleistung und Sensitivität von chromatographischer Applikationen darstellen. Glyko-

polymere sowie Glykodendrimere könnten eine effiziente Möglichkeit zur optimierten Auftrennung darstellen und eine frühzeitige Detektion von Krankheiten ermöglichen.

Für die vorliegende Arbeit sind die hochverzweigten Glykopolymere mit einem PEI-Kern und unterschiedlichen Oligosaccharidschalen von großem Interesse. Aufgrund der bereits mehrfach nachgewiesenen selektiven Interaktionen von Glykopolymeren mit unterschiedlichen Analyten,^[52, 97] könnte die Ausnutzung dieser Wechselwirkungen in chromatographischen Anwendungen zu einer verbesserten Auftrennung beitragen. Die Interaktion über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem kationischen Polymerkern sowie die Interaktion über nicht-kovalente Wechselwirkungen in Verbindung mit der hohen Löslichkeit dieser Kern-Schale-Architekturen lassen sie als Additive in der mobilen oder als Modifizierung der stationären Phase attraktiv erscheinen. Obwohl bereits erste Interaktionsstudien dieser Kern-Schale-Architekturen mit kleineren Analyten durchgeführt wurden,^[52, 97] fehlen Untersuchungen über deren Potential als chromatographische Selektoren. Erste Erkenntnisse über Optimierungsmöglichkeiten von Dendrimeren und hochverzweigte Polymere in chromatographischen Anwendungsbereichen konnten in Voruntersuchungen untersucht werden.^[98–100]

Untersuchungen zum Einsatz von PEI-OS Kern-Schale-Architekturen als chromatographische Selektoren fehlen jedoch und sollen im Zuge dieser Arbeit näher untersucht werden.

2.2 Polymere als Selektoren

2.2.1 Dünnschicht-Chromatographie (TLC)

Die Dünnschicht-Chromatographie (*thin layer chromatography*, TLC) ist eine gut untersuchte und lang etablierte Analysemethode zur Auftrennung von Stoffgemischen. Durch die Pionierarbeiten von *Kirchner* ^[103] und *Stahl* ^[104] gegen Ende der 1950iger Jahre konnte die Dünnschicht-Chromatographie als angesehene Analysemethode etabliert werden. Sie löste die zuvor genutzte, vergleichsweise einfache Papier-Chromatographie als Routineanalysemethode ab. Aufgrund der von *Kirchner* und *Stahl* durchgeführten Verbesserungen konnte die Methode standardisiert und zu einer reproduzierbaren Methode entwickelt werden. Seit Beginn der Dünnschicht-Chromatographie durchläuft diese Methode eine stetige Optimierung.^[105–108] Die Nutzung von verbesserten stationären Phasen, effektive Additive, die optimierte Instrumentalisierung und die somit einhergehende Automatisierung, als auch immer bessere Detektoren ermöglichen eine Etablierung der TLC als eine einfache, schnelle und kostengünstige Analysemethode, die nahezu überall Anwendung findet. Die Möglichkeit einer parallelen Probenuntersuchung macht die TLC in vielen unterschiedlichen Anwendungen zu einer effektiven und viel genutzten Methode der Wahl. Wichtige Einsatzgebiete der TLC beispielsweise die Qualitätskontrolle oder Identitäts- und Reinheitsprüfungen in der Pharmaindustrie. Auch in klinischen Anwendungen, wie Metabolismusstudien, Drogenscreenings oder in Dopingnachweisen, wird die TLC eingesetzt. Neben der klinischen wird die TLC weiterhin in industriellen Anwendungen verwendet, um beispielsweise Prozessentwicklungen und -optimierungen zu kontrollieren. Ebenso spielt sie in der Lebensmittel- und Futtermittelchemie somit in der Kosmetik und Naturheilkunde eine wichtige Rolle.

Bei der Dünnschicht-Chromatographie findet eine Auftrennung aufgrund von physikochemischen Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der mobilen und stationären Phase statt. Die stationäre Phase ist eine auf ein Trägermaterial aufgebrachte poröse Schicht, die fest an ihrer Position verbleibt, wohingegen die mobile Phase aus einem Lösungsmittel bzw. einem Lösungsmittelgemisch oder Gas besteht, das aufgrund von Kapillarkräften entlang der stationären Phase entlangläuft. Aufgrund von unterschiedlich stark ausgeprägten Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase werden einzelne Analyten unterschiedlich stark zurückgehalten. Analyten, die kaum Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen, werden kaum zurückgehalten und laufen mit der mobilen Phase. Andersherum laufen Analyten mit starken Wechselwirkungen mit der stationären Phase nur gering oder gar nicht mit der mobilen Phase. Man kann somit anhand der unterschiedlichen Wechselwirkungen einzelne Komponenten eines Stoffgemisches aufgrund unterschiedlicher Laufhöhen auftrennen. Ein Faktor, der dieses Verhalten in Bezug auf die Laufhöhe der mobilen Phase beschreibt, ist der Retentionsfaktor R_f . Bei Komponenten, die nicht mit der mobilen Phase mitlaufen beträgt er Null, bei Komponenten, die nur mit der mobilen Phase interagieren und mit dieser mitlaufen, beträgt er Eins. Das Prinzip und die Definition des R_f -Wertes ist in **Abbildung 10** verdeutlicht.

Als mobile Phasen werden polare und unpolare Lösungsmittel genutzt. Diese können durch den Zusatz von weiteren Additiven (z.B. Ionenpaar- oder Ionenaustausch-Reagenzien, chirale Selektoren usw.) optimiert und auf das jeweilige Problem angepasst werden.

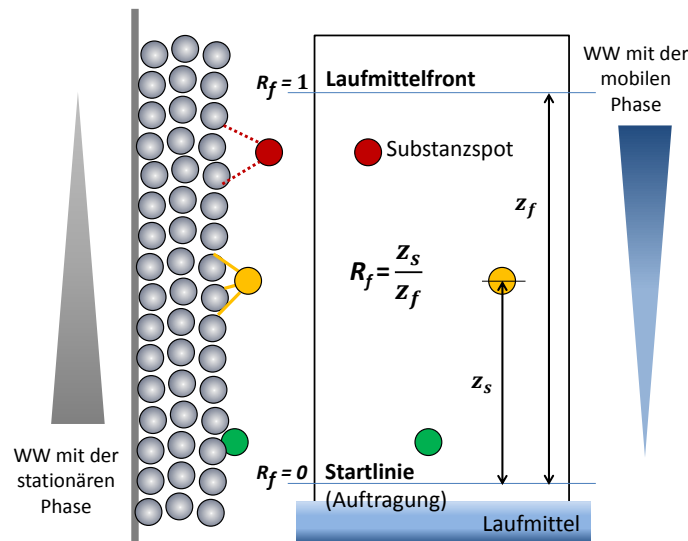


Abbildung 10: Prinzip der Dünnschicht-Chromatographie mit Definition des R_f -Wertes (z_s = Laufstrecke des Substratspots; z_f = Laufstrecke des Laufmittels).

Stationäre Phasen bestehen aus genau-definierten anorganischen oder organischen Materialien. Üblicherweise werden Kieselgel bzw. Kieselgur, Aluminium, Zellulose oder deren Kombinationen als Standard verwendet (Normalphase TLC). Bei diesen polaren stationären Phasen werden häufig unpolare Lösungsmittel verwendet. Die Wechselwirkungen der Analyten mit diesen unpolaren Lösungsmittel bestimmen die Laufhöhe der einzelnen Komponenten. Eine Variation dieser Normalphasen-Chromatographie ist die hydrophile Interaktionsflüssigkeitschromatographie (*hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC), bei der polare Lösungsmittel verwendet werden.^[109] In den letzten Jahrzehnten wurden vermehrt unpolare Modifizierung der stationären Phase untersucht. Hierfür werden stationäre Phasen mit hydrophoben Alkylketten oder Aromaten modifiziert. Polare Lösungsmittel werden als mobile Phasen verwendet. Bei dieser sogenannten Umkehr-Phasen TLC wird eine apolare bzw. hydrophobe stationäre Phase genutzt und die Analyten aufgrund ihrer Polarität bzw. Hydrophobizität aufgetrennt.

Weiterhin wurden seit der Kommerzialisierung der TLC kleinere Partikelgrößen, dünnere Schichten und feinere Poren für die stationäre Phase verwendet. In den letzten Jahren entwickelte sich zudem die Hochleistungs-TLC (*high-performance TLC*, HPTLC), bei der Partikelgrößen von 5 bis 12 μm genutzt werden. Durch die Nutzung kleinerer Partikel ist weniger Probenvolumen erforderlich, die Auftrennung und Sensitivität wird verbessert und die Analysenzeit kann verkürzt werden.^[110, 111]

Vorhandenen Kieselgelpartikel-Phasen können darüber hinaus weiter mit gewünschten Eigenschaften funktionalisiert werden. Somit werden stationäre Phase erhalten, bei denen die Interaktion und Auftrennung nicht an der Oberfläche des Kieselgels stattfindet, sondern auf den auf das Kieselgel chemisch angebondenen Modifizierungen. Beispiele hierfür sind unter anderem die Anbindung von komplexierenden oder chiralen Selektoren (Komplexierungschromatographie bzw. chirale Chromatographie), die sich besonders zur Auftrennung von biologischen Stoffgemischen eignen.^[3, 105, 112] Häufig finden Cyclodextrine und Kronenether Verwendung als Modifizierung des Kieselgels zur Generierung von chiralen Phasen.^[113]

Für diese äußerst selektiven chiralen Selektoren müssen die Analyten allerdings bestimmte Anforderungen erfüllen, wie beispielsweise eine passende Größe und Geometrie, sodass ein Einschluss in das Innere eines Cyclodextrins oder Kronenethers stattfinden kann und nicht aus sterischen Gründen verhindert wird. Faktoren wie der pH-Wert, die Temperatur oder die Zusammensetzung der mobilen Phase beeinflussen darüber hinaus die effektive Auftrennung mit diesen chiralen Phasen.^[3, 114–116]

Polymere werden in der Dünnschicht-Chromatographie als Ersatz für Kieselgel für die stationäre Phase verwendet. Sie tragen häufig zur Verbesserung der Selektivität einer stationären Phase bei. Sie werden in Form von natürlichen Polymeren, wie beispielsweise Zellulose, häufig verwendet und eignen sich für die Auftrennung von Racematen. Aufgrund der hohen Anzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren besteht eine gute Selektivität gegenüber verschiedenen Analyten.^[117]

Häufig werden stationäre Phasen aus molekular geprägten Polymeren (*molecular imprinted polymer*, MIP) genutzt. Hierbei wird nicht die Oberfläche von Kieselgelpartikeln modifiziert, sondern ein Polymer in Gegenwart eines Templat-Moleküls, wie beispielsweise L-Phenylalaninamid oder D-Phenylalaninamid, aufgebaut und vernetzt. Nach vollendeter Polymerisation und Vernetzung ist ein dreidimensionales Netzwerk aufgebaut. Das Templat wird entfernt und hinterlässt äußerst selektive Bindungsstellen in der polymeren Matrix, wie in **Abbildung 11** verdeutlicht wird. Eine hochselektive Auftrennung von Gemischen ist mit dieser äußerst spezifischen stationären Phase möglich. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die genutzten Template spezifisch auf das jeweilige Problem bzw. das jeweilige Racemat angepasst sind und eine universelle Nutzung eingeschränkt ist.^[118, 119]

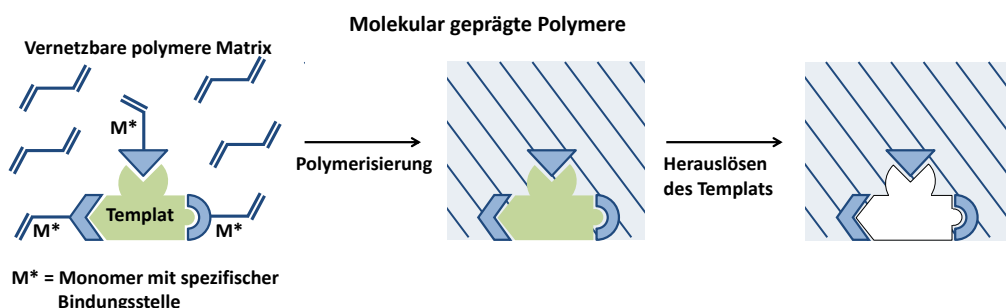


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips des molekularen Prägens einer Polymermatrix.

Eine Verwendung von neuartigen Polymeren, die eine hohe Selektivität aufweisen und dennoch universell einsetzbar sind, kann eine weitere Optimierung der Dünnschicht-Chromatographie gewährleisten. Eine Modifizierung der stationären Phase mit beispielsweise Kern-Schale Polymeren stellt eine kostengünstige, einfache und effektive Alternative dar. Aufgrund der vielfältigen Kern-Schale Polymere kann eine höchst effektive und zielgerichtete Optimierung bewirkt werden, die einen wesentlich größeren Einsatzbereich als beispielsweise molekular geprägte Polymere aufweisen. Ein Aufsprühen der polymeren Kern-Schale-Architekturen oder ein Eintauchen der stationären Phase in eine Polymerlösung kann eine effektive Modifizierung der Oberfläche erzielen und stellt somit eine einfache Optimierungsmethode dar. Glykopolymere als Kern-Schale-Architekturen eignen sich aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit und vielfältigen Möglichkeiten zur Interaktion mit Analyten sehr gut für einen

Einsatz als chromatographische Selektoren in der Dünnschicht-Chromatographie. Während der Einsatz von sowohl molekular geprägten Polymeren^[2, 119] als auch monolithisch, poröser Polymere^[120] als stationäre Phasen in der Dünnschicht-Chromatographie gut untersucht ist,^[118] fehlt eine umfangreiche Untersuchung von Glykopolymeren als chromatographische Selektoren.

2.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Eine effiziente Weiterentwicklung der Dünnschicht-Chromatographie stellt die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) dar. Diese kontinuierlich optimierte Methode weist eine hohe Vielseitigkeit sowie hohe und schnelle Trennleistungen auf. Die diversen Automatisierungsmöglichkeiten, wie beispielsweise die Probeninjektion mit Hilfe von Probensamplern oder komplette Auftrennungsprogramme, ermöglichen eine einfache und hoch reproduzierbare Messmethode. Sie wird als eine der am meist genutzten Routinemethoden zur Analyse von komplexen Gemischen verwendet und findet Anwendung sowohl in der Pharma- und klinischen Chemie als auch in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

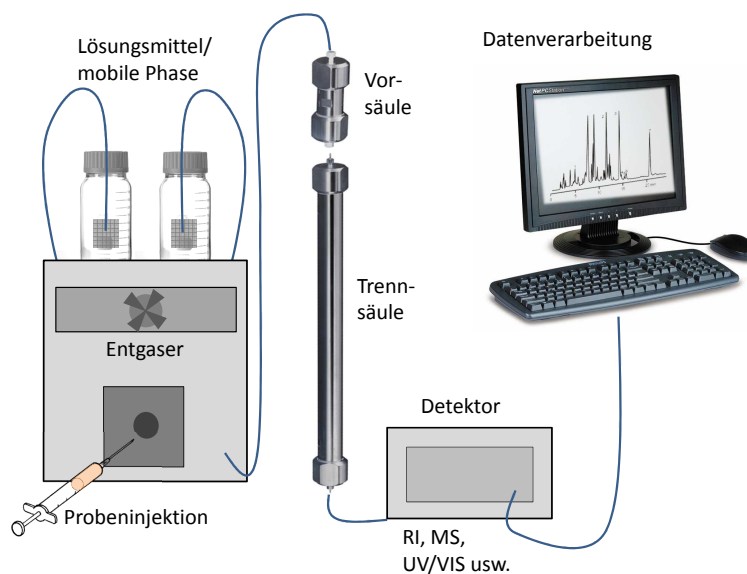


Abbildung 12: Aufbau einer HPLC-Anlage mit einzelnen Modulen wie der Aufbereitung der mobilen Phase, der Probeninjektion, der Vor- und Hauptsäule, dem Detektor und der Computer.

Abbildung 12 zeigt die einzelnen Hauptkomponenten einer HPLC-Anlage. Die wichtigsten Module stellen die Pumpe (Förderung der Eluenten durch die Anlage), der Injektor, die Trennsäule, der Detektor und ein Computer (Steuerung der Anlage und Datenverarbeitung) dar. Eine mobile Phase transportiert die Analyten nach der Injektion der Probe durch die Trennsäule hin zum Detektor. In der Trennsäule findet die Auftrennung durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase statt. In Abhängigkeit des zu untersuchenden Stoffgemisches kommen Wechselwirkungen wie beispielsweise elektrostatische Interaktionen bzw. Ionenaustausch, Adsorption durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen oder

Komplexbildung mit der stationären Phase in der Trennsäule vor. Eine fortlaufende Optimierung der Methode ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. Die Weiterentwicklung der Automatisierung, mit beispielsweise besseren Pumpensystemen, genauerer Probeninjektion, empfindlicheren Detektoren oder einer effektiveren Datenverarbeitung, steht dabei an erster Stelle. Die Verbesserung der mobilen Phase mit Nutzung von Gradienten der Eluenten, Additiven, unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen sowie ein angepasster Druck werden intensiv untersucht. Weiterhin kann die Optimierung der Trennleistung der stationären Phase verbessert werden.^[121, 122] Die Untersuchung von effektiveren Säulenmaterialien ist ein umfangreiches Thema. Einige ausgewählte Beispiele sollen im Folgenden kurz erläutert werden. Bei der Nutzung der Normalphasenchromatographie besteht die stationäre Phase aus polaren Partikeln, wie beispielsweise Kieselgel modifiziert mit polaren, nichtionischen funktionellen Gruppen. Die mobile Phase besteht aus einem apolaren Solvens, wie Hexan, zu dem ein polarer Vermittler, wie Methylenchlorid, zugegeben wird, um die Auftrennung und Selektivität besser einstellen zu können. Da die Oberfläche einheitlich ist, werden mit dieser Methode gute und definierte Peaksignale erhalten. Weitaus häufiger wird die Umkehrphasenchromatographie (*reversed-phase*) genutzt, bei der eine unpolare stationäre Phase und eine polare mobile Phase genutzt werden. Hierbei wird Kieselgel an der Trennsäulenoberfläche in der Regel mit Alkylkettensubstituenten modifiziert und so eine unpolare Säulenoberfläche generiert. Eine Auftrennung des Stoffgemisches erfolgt aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen mit der unpolaren Säulenoberfläche. Als mobile Phase dienen Gemische von Wasser und Methanol, Acetonitril oder Tetrahydrofuran (THF). Je höher der Wasseranteil der mobilen Phase, desto langsamer werden die Analyten eluiert. Mit zunehmendem Anteil an Methanol, Acetonitril oder THF wird die Retentionszeit verringert und die Analyten eluiert. Das Säulenmaterial, das die Trennleistung einer Säule maßgeblich bestimmt, muss für eine effiziente Nutzung sowohl eine gute chemische Stabilität (pH und Temperatur stabil) als auch mechanische Stabilität gegenüber hohen Drücken aufweisen und die Partikel sollten eine einheitliche Größe besitzen.^[122] Silika-Partikel erfüllen diese Kriterien sehr gut und ihre Herstellung mit definierten und einheitlichen Partikelgrößen ist gut etabliert und kostengünstig. Um eine Optimierung der Trennleistung zu erzielen, wurden in den letzten Jahrzehnten immer kleinere Partikel genutzt. Aus den anfänglichen Partikelgrößen von ca. 10 μm in den 70iger Jahren entwickelten sich stationäre Phasen mit Partikelgrößen unter 2 μm .^[121] Die Nutzung von immer kleineren Partikeln ermöglicht eine schnellere und effizientere Auftrennung. Jedoch werden bei kleineren Partikeln höhere Drücke benötigt, um die mobile Phase durch die Trennsäule zu pressen. Da eine weitere Verringerung der Partikelgrößen keine weitere Optimierung bringt,^[122] ist eine Modifizierung dieser dringend erforderlich. Die vielfältigen Modifizierungsmöglichkeiten sind in Übersichtartikeln zusammengefasst^[12, 121, 123] und nur ausgewählte Beispiele mit Polymermodifizierungen werden im Folgenden kurz erwähnt.

Polymere können auf unterschiedliche Art und Weise auf den jeweiligen Säulenmaterialien gebunden werden.^[118] Sie verbinden die Stabilität der Partikel als anorganische Matrix mit der erhöhten Selektivität und chemischen Stabilität von organischen Schichten. Die Selektivität solcher Hybridmaterialien mit anorganischem Kern und polymerer Schale kann optimiert und gegebenenfalls auf das jeweilige Stoffgemisch angepasst werden.^[124, 125] Die vielfältigen Möglichkeiten durch zum Beispiel unterschiedliche Polymerkerne, spezifische Wechselwir-

kungen oder die Generierung von gezielten Eigenschaften ermöglichen die Herstellung von maßgeschneiderten stationären Phasen mit verbesserter Sensitivität und Selektivität. Für die Herstellung solcher Hybridmaterialien kann zwischen einer direkten Modifizierung der Partikeloberfläche oder einer Nutzung der Poren der Silika-Partikel unterschieden werden, von denen jedoch nur die direkte Modifizierung für diese Arbeit relevant ist. Bei der direkten Modifizierung der Partikeloberfläche kann ein polymerer Film mit Hilfe von diversen Adsorptionsprozessen immobilisiert werden. Durch die Nutzung von unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften können beispielsweise unpolare Polymere auf der Oberfläche von Kieselgel adsorbiert werden. Hierfür wird das Polymer in einem unpolaren Lösungsmittel gelöst und kann auf dem Kieselgel adsorbieren. Durch Verdampfen des Lösungsmittels wird das Polymer auf der Partikeloberfläche fixiert. Da es in den genutzten polaren Lösungsmitteln nicht löslich ist, wird es bei der Auftrennung nicht abgelöst.^[118] Eine weitaus stabilere Modifizierung stellt die kovalente Anbindung von Polymeren über die Silanolgruppen des Kieselgels dar. Da die Trennungsleistung und die Durchflussrate einer Säule im Allgemeinen maßgeblich durch die Eigenschaften der Partikel definiert werden, sollten bei der Modifizierung mit Polymeren Faktoren wie Partikelgröße und Geometrie sowie Homogenität beachtet werden.

Wie bereits in den **Kapitel 2.1** beschrieben, besitzen polymere Kern-Schale-Architekturen einige Vorteile, die sie gerade in der Chromatographie interessant erscheinen lassen. Ihre hohe Anzahl an funktionellen terminalen Gruppen sowie ihre möglichen Einschlusseigenschaften ermöglichen Wechselwirkungen, die über die Interaktionen bei unmodifizierten Kieselgelpartikeln mit Analyten hinausgehen. Eine höhere Selektivität ist somit möglich und kann anhand der vielfältigen kommerziell erhältlichen HPLC-Säulen auf Polymerbasis verdeutlicht werden. Ein weiterer Vorteil von HPLC-Säulen mit Polymer-Modifizierung ist die Möglichkeit einer Vernetzung, wodurch sehr stabile Säulenoberflächen generiert werden, die dennoch die gewünschte Selektivität aufweisen.

Die Anwendung von Polymer-modifizierten stationären Phasen in der HPLC ist umfangreich untersucht. Ausführlichere Informationen über die vielfältigen Modifizierungsmöglichkeiten hin zu chiralen stationären Phasen sind in diversen guten Übersichtartikeln zusammengefasst.^[118, 123, 125, 126]

Eine weitere Anwendung von Polymeren in der HPLC findet durch molekular geprägte Polymere (*molecular imprinting*) statt. Es handelt sich wie bereits im Kapitel **2.2.1** über die TLC beschrieben, um stationäre Phasen, die einen Templat-Effekt aufweisen. Auf diese Art und Weise können hoch effektive stationäre Phasen generiert werden, die eine hervorragende Selektivität aufweisen. In den Übersichtartikeln von *Cheong et al.* ^[2, 127] werden sowohl das Prinzip als auch einige Beispiele beschrieben und kommentiert.

Anhand vieler Beispiele kommerziell erhältlicher Trennsäulen (beispielsweise von Hamilton, Shodex, Vydac und anderen) mit einer Polymermodifizierung kann verdeutlicht werden, welches Potential derartige Trennsäulen aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften aufweisen. Der universelle Einsatz für die Auftrennung verschiedenster Analyten und die Stabilität in einem breiten pH-Bereich sowie hohen Temperaturen und Drücken lassen Polymermodifizierte Trennsäulen sehr attraktiv erscheinen. Weiterhin weisen sie hohe Selektivitäten und Sensitivitäten auf. Die somit hohe Trennleistung und Stabilität lassen Polymere für weitere Optimierung in der HPLC sehr interessant erscheinen.

2.2.3 Kapillarelektrophorese (CE)

Die Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) ist neben der HPLC eine weitere sehr effektive und häufig verwendete Analysemethode. Das Grundprinzip der Auftrennung in der CE basiert auf dem Gesetz von *Kohlrausch*, nach dem geladene Teilchen in Lösung in Abhängigkeit von ihrer Art und Anzahl der Ladung und ihrer räumlichen Größe unter Einfluss eines elektrischen Feldes mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten wandern. In den letzten Jahrzehnten wurde die CE konsequent weiterentwickelt und erreicht heute sehr gute Auftrennungen von geladenen Analyten. Vor allem die Vielseitigkeit der unterschiedlichen Auftrennungsmöglichkeiten macht diese Methode bei einer Fülle von Anwendungen attraktiv.^[128–130] Als Beispiele für diese Anwendungsgebiete können die Isolierung und Aufreinigung von DNA, RNA oder Proteine in der Molekularbiologie genannt werden.^[128] Weiterhin findet die Kapillarelektrophorese häufig Anwendung zur Kontrolle von Gehalt und Reinheit von Arzneistoffen und Pflanzenextrakten.^[128] Durch die Nutzung verschiedener physikalisch-chemischer Prinzipien ermöglicht diese Methode nicht nur die Analyse von geladenen Molekülen, sondern auch ungeladene Komponenten können mit Hilfe von Additiven aufgetrennt werden. Durch die Variation der Separationskraft bzw. des Trennmediums kann die Kapillarelektrophorese modifiziert und auf unterschiedliche Probleme angepasst werden.^[130] Die meist genutzten Varianten der Kapillarelektrophorese stellen die Kapillarzonenlektrophorese (*capillary zone electrophoresis*, CZE), elektrokinetische Kapillarchromatographie (*electrokinetic chromatography*, EKC) und Kapillarelektrochromatographie (*capillary electrochromatography*, CEC) dar.

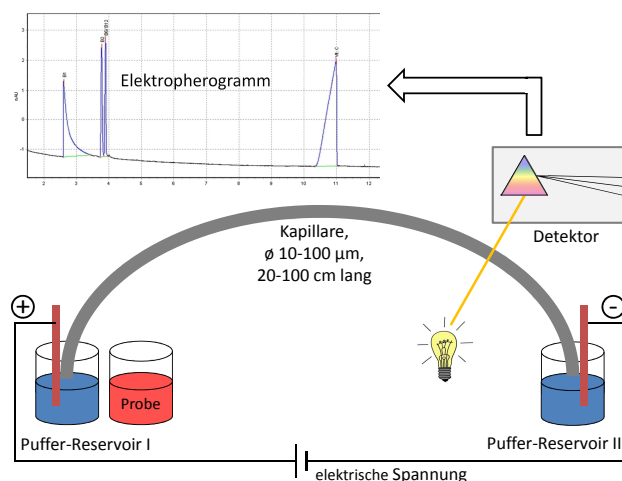


Abbildung 13: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Apparatur mit einem UV/Vis Detektor als Beispiel. Zur Auftrennung wird in diesem Beispiel eine elektrische Spannung genutzt.

Obwohl sich die einzelnen Sonderformen der Kapillarelektrophorese klar von einander differenzieren, liegt den unterschiedlichen Methoden ein genereller apparativer Aufbau zugrunde, der in **Abbildung 13** verdeutlicht wird. Eine dünne Quarzkapillare verbindet zwei Pufferreservoirs, die mit dem Trennelektrolyten gefüllt sind. Die Migration der Probe durch die Kapillare findet aufgrund der elektrophoretischen Wanderung der einzelnen Komponenten mit dem Trennelektrolyten statt. Dieser elektrophoretischen Wanderung wird von einem elektroosmo-

tischen Fluss (*electroosmotic flow*, EOF) des Puffers überlagert, der aktiv an dem Transport der Probe durch die Kapillare beteiligt ist. Die Auftrennung erfolgt allerdings auf dem bereits erwähnten Kohlrauschschen Gesetz für geladene Moleküle und ihren unterschiedlichen Mobilitäten. Der elektroosmotische Fluss entsteht durch die Wechselwirkung des Puffers mit den Kapillarinnenwänden. Die Kapillaren, die zumeist aus Quarzglas bestehen, weisen Silanolgruppen an der Kapillaroberfläche auf, die bei einem pH-Wert größer zwei deprotoniert sind und elektrostatisch mit den Pufferkationen wechselwirken können. Als Resultat entsteht eine Schicht aus stärker und einigen leicht interagierenden Pufferkationen an der Kapillarinnenwand. Durch eine anliegende Spannung werden die schwächer gebundenen Pufferkationen von der Kapillarwand abgelöst und zur Kathode transportiert. Aufgrund dieser Bewegung wird das Lösungsmittel ebenfalls in Richtung der Elektrode transportiert und es entsteht ein elektroosmotischer Fluss, dessen Prinzip in **Abbildung 14** verdeutlicht ist.^[131]

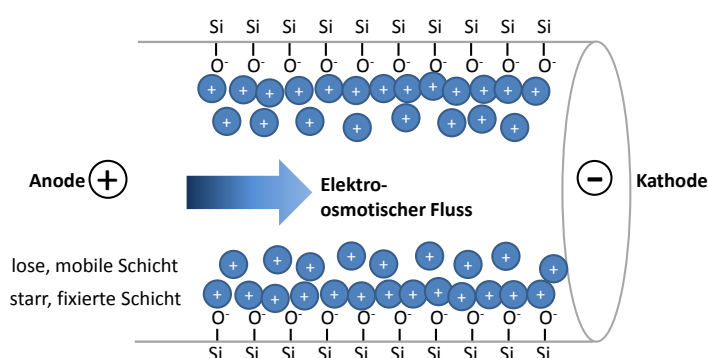


Abbildung 14: Schematische Verdeutlichung des elektroosmotischen Fluss im Inneren einer Kapillare.

Die Detektion der Probenmoleküle erfolgt in den meisten Fällen direkt in der Trennkapillare UV/Vis spektroskopisch oder über ihre Fluoreszenz. Kapillaren sollten chemisch und mechanisch stabil und die Oberfläche im Inneren der Kapillare homogen sein. Sie besitzen einen schmalen Innendurchmesser von circa 20-100 μm . Synthetisch hergestellte Quarzglas-kapillaren (*fused silica*), außen modifiziert mit einer Polyimidschicht, sind die am meisten genutzten Kapillaren. Sie haben jedoch den Nachteil, dass sich Analyten häufig auf den Kapillarinnenwänden ablagern und so die Kapillare verstopfen. Als Optimierung wurden Kapillaren auf Polymerbasis hergestellt oder die Kapillarinnenwände modifiziert.^[131, 132]

Die einfachste Form der Kapillarelektrophorese ist die Kapillarzonenelektrophorese, die 1979 von *Mikkers*^[133] eingeführt und 1981 von *Jorgenson* und *Lucas* optimiert wurde.^[134] Bei dieser Sonderform werden die Analyten nur aufgrund ihrer elektrophoretischen Eigenschaften aufgetrennt. Die Kapillare ist mit einem Trennelektrolyten gefüllt, der die gleiche Ladung wie die aufzutrennenden Komponenten besitzt.^[133] In Abhängigkeit von der Ladung und Größe der Analyten wandern die einzelnen Komponenten aufgrund einer angelegten elektrischen Spannung durch die Kapillare. Die Auftrennung erfolgt in Abhängigkeit vom elektroosmotischen Verhalten des Trennelektrolyten zur angelegten Spannung. Ungeladene Komponenten wandern mit dem elektroosmotischen Fluss und werden nicht aufgetrennt. Diese Trennmethode eignet sich somit ausschließlich für geladene Analyten, die in der jeweiligen Pufferlösung dissoziiert vorliegen.^[131–133] Die Auftrennung von ungeladenen Analyten stellt

in der elektrophoretisch genutzten Kapillarelektrophorese ein großes Problem dar. Damit dennoch eine effektive Auftrennung erzielt werden kann, wurden Additive eingesetzt, die mit den Probenmolekülen unterschiedlich wechselwirken. Diese Sonderform der CE wird elektrokinetische Kapillarchromatographie (*elektrokinetic chromatography*, EKC) bzw. als Sonderform mit Mizellen als Additive mizellare elektrokinetische Chromatographie (*micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) genannt.^[135–139] Die Probenkomponenten, die mit den Additiven wechselwirken, wandern entsprechend der Mobilität der Additive. Die Probenkomponenten, die nicht mit den Additiven wechselwirken, wandern mit dem EOF. Bei der EKC erfolgt eine Auftrennung folglich nicht nur aufgrund von Elektrophorese der freien, nicht wechselwirkenden Komponenten, sondern ebenfalls durch Elektroosmose derjenigen Komponenten, die mit den Additiven wechselwirken, und der jeweiligen Verteilung zwischen diesen Phasen. Die Additive bilden in dieser Sonderform der CE eine sogenannte pseudostationäre Phase, die nicht fixiert ist wie herkömmliche stationäre Phasen, sondern durch die Kapillare migriert. Probenmoleküle werden in Abhängigkeit der vorliegenden Wechselwirkungen mit den Additiven unterschiedlich stark in der pseudostationären und der mobilen Phase verteilt. Die Wanderung der Probenmoleküle ist abhängig von dieser Verteilungskonstante, die definiert ist als der Quotient aus Konzentration des Analyten in der pseudostationären Phase durch Konzentration des Analyten in der mobilen Phase in einem differentiellen Volumensegment. Die Auftrennung findet bei keiner elektrophoretischen Mobilität der Analyten ausschließlich in Abhängigkeit der Verteilungskonstanten der einzelnen Komponenten statt. Bei einer elektrophoretischen Beweglichkeit werden die Analyten zusätzlich durch Elektrophorese getrennt, wobei hier der Übergang von der MEKC zur CE fließend ist.

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Additiven in der CE bzw. in der EKC eingesetzt und ihr Potential in Bezug auf eine erhöhte Selektivität und Sensitivität hin untersucht.^[129, 135–143]

Der Einsatz von Mizellen als pseudostationäre Phase wurde erstmals von *Terabe et al.* 1984 beschrieben.^[144] Der elektroosmotische Fluss wirkt bei dieser Sonderform der CE als eine Art mobile Phase, der die Analyten durch die Kapillare transportiert. Nachteil bei der Verwendung von Mizellen besteht in der Notwendigkeit, oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration zu arbeiten, wodurch höhere Drücke benötigt werden und die Kapillare verstopfen kann. Neben Mizellen können ebenso Cyclodextrine,^[143] Kronenether, Polysaccharide, Proteine oder Polymere als Additive hinzugegeben werden.^[129] Hochspezifische Interaktionen der Analyten mit diesen chiralen Selektoren ermöglichen höchst effiziente und äußerst sensitive Trennergebnisse.

So kann beispielsweise eine sehr hohe Selektivität mit Proteinen als Additiven erzielt werden. Aufgrund von Affinitäten zwischen Proteinen und Liganden kommt es zu einer äußerst effektiven Auftrennung von Probengemischen. Ein Nachteil beim Einsatz von Proteinen als Additive ist jedoch deren hohe Affinität gegenüber der Kapillarwand, wodurch es zu Adsorptionen und Verstopfungen kommen kann. Weiterhin weisen Proteine eine hohe UV-Absorption auf, wodurch die Detektion erheblich erschwert werden kann.^[129, 145, 146]

Als weitere Optimierung können auch Polymere als Additive eingesetzt werden.^[130] Sie bieten gegenüber Mizellen den Vorteil, dass sie keine kritische Konzentration zur Aggregatbildung benötigen und somit in unterschiedlichsten Konzentrationen eingesetzt werden können.

Darüber hinaus sind die Bindungen zwischen den Monomereinheiten des Polymers kovalent und somit stabiler gegenüber herkömmlich zusammengelagerten Mizellen.^[130] Signale von einzelnen Monomeren können ebenfalls ausgeschlossen werden.^[129] Polymere bieten aufgrund ihrer vielseitigen Eigenschaften und Modifizierungsmöglichkeiten viele Vorteile gegenüber den herkömmlich eingesetzten Mizellen in der elektrokinetischen Chromatographie. Der Einsatz von Polymeren als pseudostationäre Phase ist ein interessanter und vielversprechender Ansatz zur weiteren Optimierung der Kapillarelektrophorese.^[130] Ebenso werden auch dendritische Polymerstrukturen untersucht und in der Kapillarelektrophorese als chirale, selektive stationäre Phase eingesetzt, wobei sie eine hohe Effizienz und Selektivität aufweisen.^[130, 147] Obwohl Polymere wie auch Dendrimere eine Vielzahl an Vorteilen aufweisen und effektiv zu einer Optimierung beitragen könnten, findet sich nur schwer eine kommerzielle Anwendung als stationäre Phase in der Kapillarelektrophorese.^[130, 148]

2.2.4 Polymerunterstützte Ultrafiltration (PEUF)

Die standardisierten Flüssigchromatographie-Methoden wie die HPLC oder die Kapillarelektrophorese erzielen effektive und sehr genaue Analyseergebnisse. Nachteile dieser Methoden sind allerdings ihre relativ hohen Anschaffungskosten und geringen Analysevolumina. Neben diesen Methoden werden vor allem auch in der Schmutzwasserbehandlung einige membranbasierte Filtermethoden als Alternative genutzt. Unter diesen Membranfiltrations-Techniken eignet sich die Filtration mit Hilfe von Komplexierungsmitteln (*complexation enhanced ultrafiltration*, CEUF), wie beispielsweise Mizellen,^[149, 150] Enzymen^[151] oder Polymeren^[152–157] bzw. Dendrimeren,^[158, 159] besonders gut. Bei dieser Sonderform wird zunächst die zielgerichtete Bindung der aufzutrennenden Komponente an das Komplexierungsmittel genutzt und *in-situ* eine Ultrafiltration zur Abtrennung durchgeführt. Die Ultrafiltration ist eine Filtrationsmethode, bei der die Ausschlussgrenze in einem Bereich zwischen 2 und 10 nm liegt.

Obwohl die Ultrafiltration prinzipiell eine Auftrennung aufgrund der Größe bewirkt, kann die Filtration durch chemische, molekulare oder elektrostatische Eigenschaften der aufzutrennenden Komponenten beeinflusst werden. Wechselwirkungen mit der Membran bzw. Bildung eines Filterkuchens erschweren die Filtration und verschlechtern eine selektive Auftrennung. Die Nutzung von Membranen mit auf das jeweilige Problem geeigneten Porengrößen ist essentiell für eine effektive Auftrennung. Obwohl viele verschiedene Filtrationsmembranen kommerziell erhältlich sind, stellen Polyethersulfon und regenerierte Zellulose die meist genutzten Membranmaterialien dar. Regenerierte Zellulose zeichnet sich vor allem durch ihre hohe Beständigkeit und geringen Wechselwirkungen mit diversen Analyten (insbesondere von Proteinen) aus.^[160] Die Größenseparierung findet aufgrund der Porengröße innerhalb der Membran statt. Die Molmassenabtrennung (*molecular weight cut-off*, MWCO) gibt an, bis zu welcher Molmasse 90% von sphärischen, ungeladenen Analyten zurückgehalten werden.^[157] Aufgrund von Alterungsprozessen, Wechselwirkungen des Analyten mit der Membran oder Bildung eines Filterkuchens (Konzentrations-Polarisation) kann es zu fehlerhaften Größenauftrennungen während der Filtration kommen. Um der Bildung von Filterkuchen vorzubeugen, wird die aufzutrennende Lösung zumeist gerührt oder ein tangentialer Fluss über die Membran genutzt. Man unterscheidet die Tangential-Fluss-Filtration, bei der die aufzutrennende Lösung tangential über die Membranoberfläche gepumpt wird, oder die Normal-Fluss-Filtration,

bei der die Filtrationslösung vertikal zur Membran aufgetrennt wird. Diese Methode wird auch Dead-End Methode genannt. Nachteil dieser Methode ist allerdings die unzureichende Auftrennung von Analyten gleicher Größe. Mit Hilfe von Komplexierungsmitteln können spezifische Wechselwirkungen genutzt und eine selektive Auftrennung erzielt werden.

Die Polymerunterstützte Ultrafiltration (*polymer enhanced ultrafiltration*, PEUF) bietet aufgrund der Vielfältigkeit an Polymeren bzw. Dendrimeren und deren spezifischen Modifizierungsmöglichkeiten das Potential für eine selektive und hoch effiziente Filtrierung, was vor allem für Metallionen bereits umfangreich untersucht wurde.^[152, 154, 156, 158] Bei dieser Filtrationsmethode werden Stoffgemische durch eine semipermeable Membran mit definierter Porengröße gepresst. Als Separationskraft wird ein Vakuum oder Gasdruck verwendet. Größere Komponenten, wie Polymere, werden zurückgehalten. Kleine Komponenten, wie freie, nicht wechselwirkende Analyten können die Membran allerdings passieren. Analyten, die mit den Polymeren wechselwirken, werden von der Membran jedoch zurückgehalten und können diese solange sie interagieren nicht passieren. Im Eluat befinden sich somit nur freie, nicht wechselwirkende Analyten, die mit Hilfe von spektroskopischen Untersuchungen (UV/Vis- oder Fluoreszenzspektroskopie) detektiert werden können. In **Abbildung 15** ist das Prinzip der Trennung schematisch verdeutlicht.

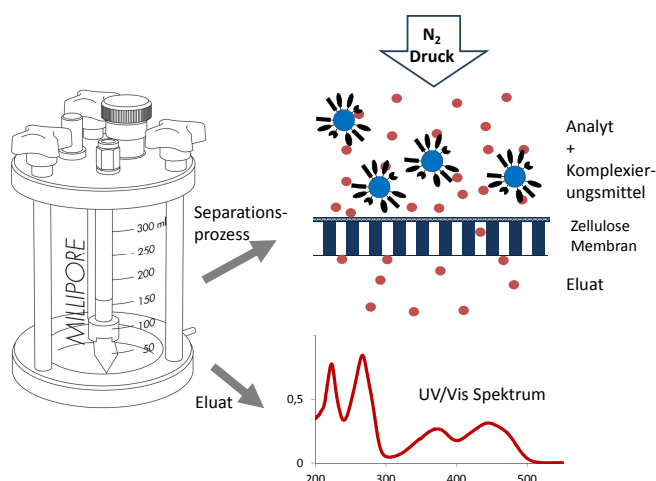


Abbildung 15: Verdeutlichung der Polymer unterstützten Ultrafiltration.

Idealerweise sollte das genutzte Polymer eine hohe Löslichkeit, selektive Wechselwirkungen mit den gewünschten Analyten und keine Wechselwirkungen mit der Filtrationsmembran aufweisen.^[158] Verzweigte Polymere weisen eine geringe Tendenz zur Bildung eines Filterkuchens und Verengung der Poren (*fouling*) auf. Weiterhin besitzen gegenüber vergleichbaren linearen Polymeren eine hohe Bindungskapazität zu Analyten.^[158]

Die Polymerunterstützte Ultrafiltration stellt eine effektive und kostengünstige Analyse-methode zur Aufkonzentrierung bzw. Auftrennung von Analytgemischen dar.^[152, 154, 156, 158, 159] Vor allem in der Abtrennung von Schwermetallionen^[152, 156] oder Farbstoffen^[159] aus beispielsweise Abwässern findet sie häufig Verwendung.

3 Verwendete Methoden

3.1 UV/Vis-Spektroskopie

Bei der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Festkörpern, Flüssigkeiten oder Gasen treten verschiedene Effekte auf, wie beispielsweise Absorption, Reflexion oder Streuung. Die UV/Vis-Spektroskopie befasst sich mit den Wechselwirkungen von Strahlung im ultravioletten und sichtbaren Bereich. Dabei werden Valenzelektronen von einem Grundzustand in einen energetisch angeregten Zustand versetzt, wodurch Energie einer bestimmten Frequenz absorbiert wird.^[161] Der restliche Teil der Strahlung wird von einem Detektor aufgefangen. Durchdringt folglich ein Lichtstrahl mit der Ausgangsintensität I_0 ein absorbierendes Medium mit einer definierten Schichtdicke der Küvette d_k , wird der Lichtstrahl durch Absorptionseigenschaften der Probe abgeschwächt und der Detektor fängt die Intensität I des Lichtstrahles als Transmission T der Probe auf.^[161]

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

Die Extinktion (auch Absorbanz oder optische Dichte) einer Probe ist definiert als:

$$E = -\log_{10} T = \lg \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

Je stärker eine Probe somit mit dem Lichtstrahl interagiert, desto geringer wird die Intensität des Lichtstrahls I und desto größer wird die Absorption. Diese Abschwächung ist proportional zum durchlaufenden Weg des Lichtstrahls durch die Probe d_k (Einheit cm) und zu der Konzentration c_s [mol/L]. Dieser Zusammenhang wird im Lambert-Beer'schen Gesetz beschrieben:

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot c_s \cdot d_k \quad (3)$$

Der wellenlängenabhängige molare Absorptionskoeffizient ε_λ (früher Extinktionskoeffizient) dient als Proportionalitätsfaktor als Ausdruck für die Intensität einer Bande.^[161] Die Messung von UV/Vis-Spektren kann für eine qualitative als auch für eine quantitative Analyse verwendet werden. Die qualitative Analyse wertet die Lage der Maxima, deren Intensität und Form hinsichtlich der möglichen Struktur der Probe aus. Eine eindeutige Identifizierung von unbekannten Substanzen vor allem in Gemischen ist allerdings nicht möglich. Für die Detektion von einzelnen Fraktionen beispielsweise in der HPLC oder CE kann ein UV/Vis-Spektrum mit einem Literaturspektrum verglichen und somit die einzelnen Fraktionen zugeordnet werden.^[161] Quantitative Bestimmungen werden zumeist bei festen Wellenlängen und durch Nutzung des Lambert-Beer'schen Gesetzes durchgeführt. In Abhängigkeit von der Probe muss das Lambert-Beer'sche Gesetz auf seine Gültigkeit hin mittels Kalibrierungsmessungen überprüft werden. Bei diesen Kalibrierungsversuchen werden Proben mit bekannter

Konzentration vermessen. Die Extinktionswerte werden als Ordinate gegen die zugehörige Konzentration auf der Abszisse aufgetragen, wobei die Kalibrationskurve durch den Koordinatenursprung verläuft. Im linearen Bereich der Kalibrationskurve ist das Lambert-Beer'sche Gesetz gültig. Mit Hilfe dieser Kalibrationskurven können Konzentration von Proben mit unbekannter Konzentration aufgrund ihrer Extinktion berechnet werden, wie beispielsweise bei Meijer et al. zur Berechnung der eingeschlossenen Bengalrot Moleküle.^[45]

3.2 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Diffusions-NMR-Spektroskopie (DOSY)

Die Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) ist eine der meist genutzten und wichtigsten Analysemethoden in der heutigen Forschung. Aufgrund von magnetischen Kernresonanz-Effekten kann die elektrische Umgebung einzelner Atome und deren Wechselwirkungen mit deren Nachbaratomen untersucht werden. Die resonanten Wechselwirkungen zwischen den magnetischen Momenten der Atomkerne der Probe in Bezug auf ein hochfrequentes magnetisches Wechselfeld geben einen detaillierten Aufschluss über die Struktur von Analyten. Die Informationen, die aus homo- oder heteronuklearen ein- oder zwei-dimensionalen Experimenten gewonnen werden, tragen essentiell zur strukturellen Aufschlüsselung bei.

In den letzten Jahren gewann eine Sonderform der NMR-Spektroskopie zunehmend an Bedeutung, da mit ihrer Hilfe die Untersuchung von intermolekularen Wechselwirkungen ermöglicht wurde. Bei der Diffusions-NMR-Spektroskopie (*diffusion ordered spectroscopy*, DOSY) können Diffusionskoeffizienten verschiedener Moleküle in einem Mehrkomponentensystem bestimmt werden, wodurch Aussagen über intermolekulare Wechselwirkungen, Aggregationsverhalten, Einschluss von Analyten (Komplexierungen) und weitere Effekte von verschiedenen Komponenten in Lösung getroffen werden können.^[162] Der Diffusionskoeffizient ist unter gegebenen Bedingungen (Lösungsmittel, Druck, Temperatur) nur von dem effektiven Molekulargewicht, der Größe und der Form der jeweiligen Komponenten abhängig. Intermolekulare Wechselwirkungen haben einen direkten Einfluss auf diese Größen, wodurch sich der Diffusionskoeffizient ändert.^[162] Bei dieser nicht invasiven Methode können mittels einer 2D-Kopplung die chemischen Verschiebungen gegen die Diffusionskoeffizienten aufgetragen werden (**Abbildung 16**).

In einem Mehrkomponentensystem, beispielsweise bei einem Polymer mit einem Analyten, können im Idealfall die chemischen Verschiebungen der einzelnen Komponenten und die einzelnen Diffusionskoeffizienten unterschieden werden. Bei Nutzung der Diffusions-NMR-Spektroskopie auf diese Weise werden die einzelnen Komponenten spektroskopisch getrennt, wodurch sie auch NMR-Chromatographie genannt wird. Bei sphärischen Molekülen ist der Diffusionskoeffizient durch die Stokes-Einstein Gleichung gegeben als:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_h} \quad (4)$$

k_b ist die Boltzmann-Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$), T die Temperatur, η definiert die Viskosität und r_h ist der (hydrodynamische) Radius des Moleküls. Die Wechselwirkung

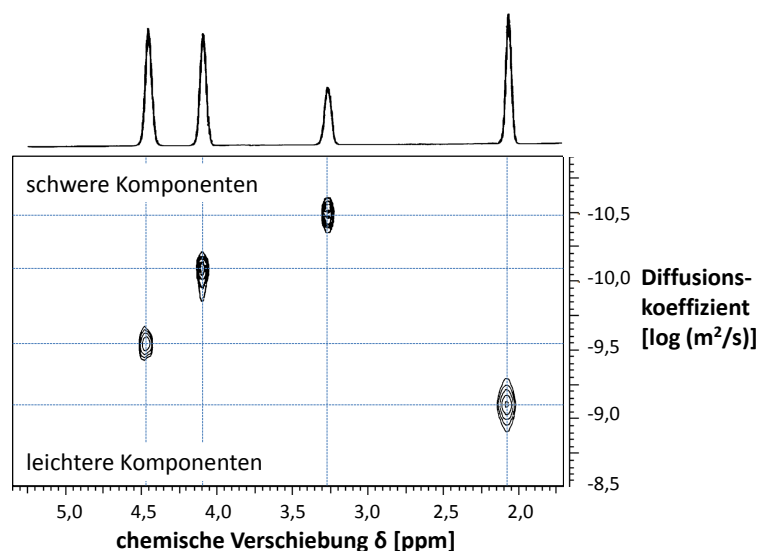


Abbildung 16: Beispiel eines DOSY-Spektrums mit vier exemplarischen Signalen mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen δ [ppm] und variierenden Diffusionskoeffizienten D [$\log(\text{m}^2/\text{s})$].

von Wirt-Gast-Komplexen kann mit Hilfe von Diffusions-NMR-Messungen gut untersucht werden.^[162] Unabhängig von der Größe und weiteren strukturellen Eigenschaften der einzelnen Komponenten weisen diese im ungebundenen Zustand charakteristische Diffusionskoeffizienten auf. Kommt es zur Bildung des Wirt-Gast-Komplexes, ändern sich die Diffusionskoeffizienten und ergeben im Idealfall nur einen resultierenden Diffusionskoeffizienten. Kommt es zu einer unvollständigen Komplexbildung des Gastes durch den Wirt, ändern sich die jeweiligen Diffusionskoeffizienten kaum. Bei Gastmolekülen mit einem sehr kleinen Molekulargewicht und Wirt-Molekülen mit einem hohen Molekulargewicht passt sich der Diffusionskoeffizient des Gastmoleküls dem des Wirt-Moleküls an. Die Diffusions-NMR-Spektroskopie bietet verschiedene Vorteile zur Untersuchung von Wirt-Gast-Wechselwirkungen.^[162–164] Unter anderem wird sie weniger von Verunreinigungen beeinträchtigt als vergleichbare Absorptionsuntersuchungen im UV- oder Fluoreszenzbereich. Komplexbildungs-Reaktionen werden häufig anhand von veränderten chemischen Verschiebungen zwischen gebundenen und ungebundenen Gastmolekül untersucht. Diese Methode ist allerdings sehr anfällig für Fehlinterpretationen wenn Protonentransfer-Reaktionen, wie bei Säure-Base-Reaktionen, auftreten. Diffusionskoeffizienten werden von diesen Protonentransfer-Reaktionen deutlich weniger beeinflusst und eignen sich somit hervorragend zur Untersuchung von Wirt-Gast-Komplexen, bei den Protonentransfer-Reaktionen auftreten.^[162–164] Auch Wechselwirkungen von Gastmolekülen mit sogenannten molekularen Kapseln, bei denen diese in Hohlräume eingekapselt werden, können gut mit Diffusions-NMR-Experimenten untersucht werden. Da die Molekülgrößen der freien Gastmoleküle sehr viel kleiner sind als die der molekularen Kapseln, kommt es zu einem deutlichen Unterschied zwischen den Diffusionskoeffizienten der freien und den der eingeschlossenen Gastmoleküle. Die Diffusionskoeffizienten der eingeschlossenen Gastmoleküle passen sich denen des Wirt-Moleküls an und diffundieren aufgrund eines langsamen Austauschs praktisch als ein Molekül.^[162] Durch die Nutzung der Diffusions-NMR-Spektroskopie kann somit das Komplexbildungsverhalten und die Wechselwirkungen von Poly-

meren bzw. Dendrimeren mit Analyten sehr effizient untersucht werden.

3.3 Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist eine effiziente Analysemethode zur Bestimmung von Schichtdicken und Brechungsindizes dünner Schichten. Diese nicht invasive Methode nutzt die Änderung der Polarisation von eingestrahlttem Licht durch Reflexion an einer Probe (**Abbildung 17**). Hierzu wird ein linear polarisierter Laserstrahl, der unter einem bestimmten Winkel auf die Oberfläche des Materials fällt, genutzt. Durch Reflexionseffekte kommt es zu einer Änderung der Polarisation in der Amplitude und der Phase.^[165, 166]

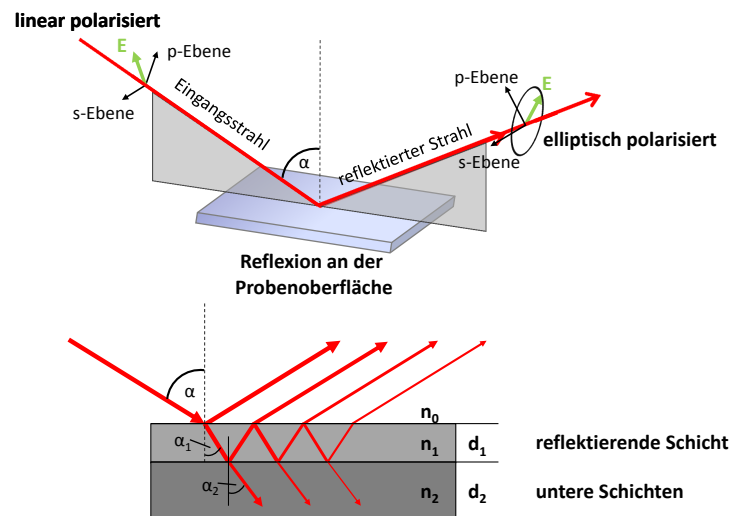


Abbildung 17: Der einfallende, linear polarisierte Eingangsstrahl wird durch Interaktion an der Oberfläche der Probe reflektiert, wobei eine elliptische Polarisation resultiert. Mit s und p sind die linearen Polarisationsebenen senkrecht bzw. parallel zur Einfallsebene verdeutlicht. Der Einfallswinkel α und dessen Reflexionen bzw. Brechungen α_1 und α_2 sind im unteren Bild verdeutlicht. Die Probe weist die Brechungsindizes n_0 , n_1 und n_2 auf, wobei die einzelnen Schichten eine Dicke von d_1 und d_2 besitzen.

Änderungen des reflektierten Strahls werden durch die Schichtdicke und den Brechungsindex des Materials bestimmt. Sie können aus dem Winkel Psi (Ψ) und Delta (Δ) berechnet werden. Diese sind für jedes Material bzw. dessen Oberflächenstruktur charakteristisch, wodurch mit Hilfe von Ellipsometrie-Messungen Informationen über die Filmdicke und den Brechungsindex gewonnen werden.^[165, 166] Der Winkel Ψ beschreibt die Änderung der Amplitude und Δ die Phasenverschiebung des reflektierten Strahls in Bezug auf den eingestrahltten Lichtstrahl. Sie sind definiert als:

$$\tan(\psi) \cdot e^{-i\Delta} = \frac{R_p}{R_s} \quad (5)$$

R_s und R_p beschreiben die Reflexionskoeffizienten in paralleler und senkrechter Richtung des reflektierten Strahls relativ zur Einfallsebene. Bei gegebenem Einfallswinkel und Wellenlänge des eingestrahltten Lichtstrahls kann für jedes System ein Modell zur Berechnung der Schichtdicke und Brechungsindex erstellt werden. Mit Hilfe eines solchen Modells

werden die Effekte durch Dispersion elektromagnetischer Wellen in Festkörpern über einen bestimmten Wellenlängenbereich berücksichtigt. Mit Hilfe eines geeigneten Modells für das jeweilige System können strukturelle Eigenschaften wie die Schichtdicke oder Brechungsindex berechnet werden. Durch spezielle Sonderformen können auch dynamische Prozesse detektiert und untersucht werden.^[165, 166] Mittels Ellipsometrie ist das Schwellverhalten von dünnen Schichten ebenfalls messbar und kann in Zusammenhang mit verschiedenen Analyten untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Vorstellung der verwendeten Polymer-Architekturen

4.1.1 Einleitung und Übersicht der verwendeten Kern-Schale-Architekturen

Für die Synthese von Kern-Schale-Architekturen wurde als Polymerkern hochverzweigtes Poly(ethylenimin) (PEI) verwendet, das in verschiedenen Syntheseschritten weiter mit Oligosacchariden modifiziert wurde (**Abbildung 18**). Aufgrund von unterschiedlichen Kerngrößen, Funktionalisierungsdichten und diversen Oligosacchariden (OS) konnten unterschiedliche Polymer-Architekturen hergestellt werden. Der Einfluss der einzelnen Faktoren auf die Interaktionen mit bioaktiven Analyten konnte somit untersucht werden. Darüber hinaus wurden weitergehende Modifizierungen durch die Anbindung von Alkylketten durchgeführt. Auf diese Art und Weise wurde der hydrophobe Anteil erhöht und Interaktionen mit lipophilen Analyten konnten untersucht werden.

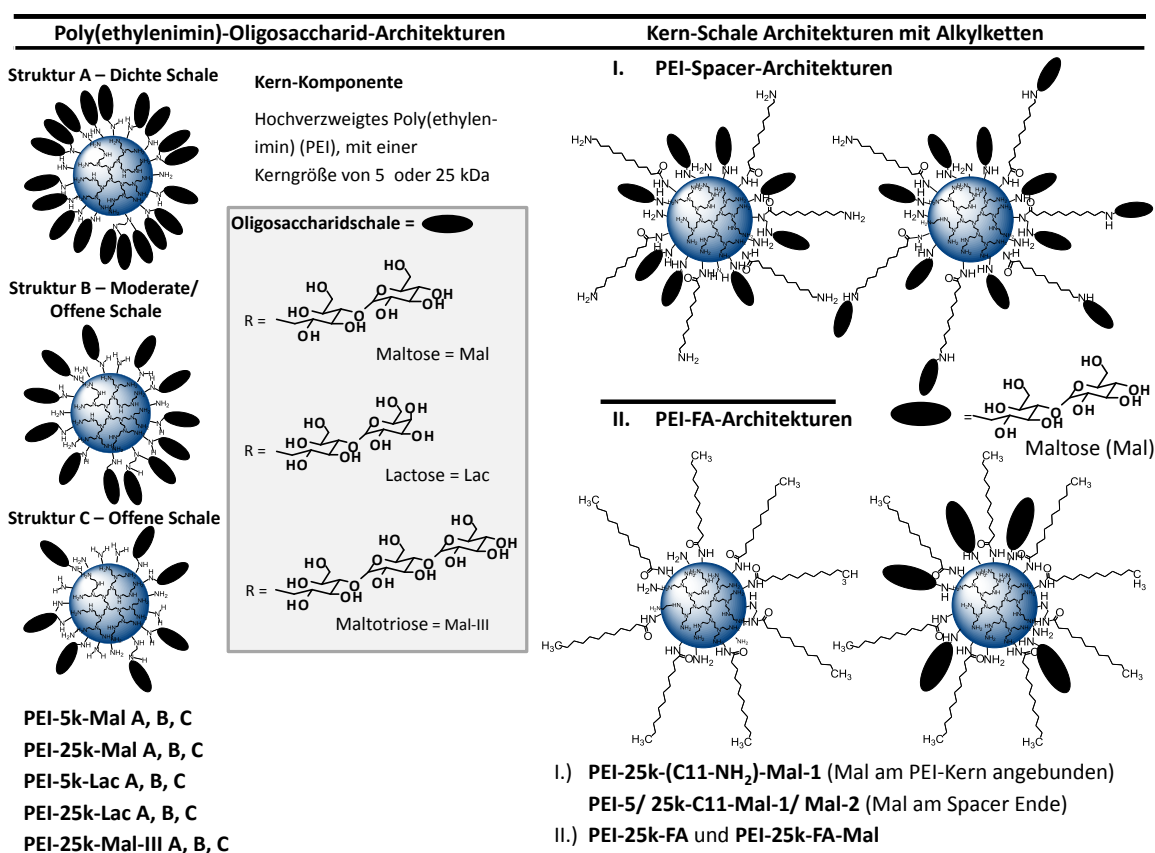


Abbildung 18: links: Übersicht der PEI-OS-Architekturen; rechts: Übersicht der hydrophoben Kern-Schale-Architekturen mit I. PEI-Spacer-Architekturen und II. PEI-FA-Architekturen.

Insgesamt wurden 15 verschiedene Poly(ethylenimin)-Oligosaccharid-Architekturen hergestellt (**Abbildung 18**), die sich in ihrer Kerngröße, dem Funktionalisierungsgrad und der Oligosaccharidschale unterscheiden. Es wurde Poly(ethylenimin) mit 5 und 25 kDa verwendet. Drei verschiedene Dichten der Oligosaccharidschale wurden generiert. Es kann zwischen einer dichten (Struktur A), moderaten/ offenen (Struktur B) und offenen Schale (Struktur C) unterschieden werden. Weiterhin wurden als Oligosaccharide drei verschiedene Kohlenhydrate verwendet. Maltose und Lactose wurden als Disaccharide eingesetzt und Maltotriose als Trisaccharid. Diese Architekturen werden im Folgenden zusammenfassend als **PEI-OS-Architekturen** (**Abbildung 18 links**) bezeichnet.

Neben diesen hydrophilen PEI-OS-Architekturen wurden Strukturen hergestellt, die einen höheren hydrophoben Anteil aufweisen. Hierfür wurden PEI-5kDa und PEI-25 kDa Polymerkerne genutzt, die mit C11-Alkylketten (Spacer) modifiziert und anschließend maltosyliert wurden. In Abhängigkeit des Zeitpunktes der Entschüttung konnten zwei verschiedene Architekturtypen hergestellt werden, die sich aufgrund des Ortes der Maltosylierung unterscheiden. Erfolgt die Entschüttung der Spacer-Enden vor der Maltosylierung, bindet die Maltose hauptsächlich an den Spacer-Enden und in geringen Maße auch am Polymerkern (**Abbildung 18 I. rechts**). Diese Architekturen wurden mit 5 und 25 kDa Poly(ethylenimin) und mit zwei unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden der Oligosaccharidschale hergestellt. Mit Mal-1 wird ein höherer Funktionalisierungsgrad abgekürzt, wohingegen Mal-2 für einen niedrigeren Funktionalisierungsgrad steht. Diese Architekturen werden im Folgenden mit PEI-5k/ 25k-C11-Mal-1/ Mal-2 bezeichnet. Weiterhin wurde die Maltose nur an den Polymerkern gebunden (**Abbildung 18 I. links**). Architekturen mit dieser Modifizierung wurden nur mit dem PEI 25 kDa Kern hergestellt. Sie werden im Folgenden als PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal bezeichnet. Allgemein wird diese Gruppe mit **PEI-Spacer-Architekturen** zusammengefasst. Um den Einfluss der Maltoseschale näher zu untersuchen, wurden ebenfalls PEI-5k/ 25k-C11 Architekturen ohne Maltoseschale hergestellt und untersucht.

Um den hydrophoben Anteil weiter zu erhöhen wurden Fettsäuren (FA) mit einem höheren Funktionalisierungsgrad an einen 25 kDa Polymerkern angebunden. Der Kern wurde mit 20, 35 oder 50 Fettsäure-Einheiten (FA-Einheiten) modifiziert und somit deutlich hydrophobe Architekturen generiert (**Abbildung 18 II.**). Diese wurde zum einen mit und zum anderen ohne Maltoseschale hergestellt und untersucht. Sie werden im Folgenden als **PEI-FA-Architekturen** bezeichnet.

4.1.2 Poly(ethylenimin)-Oligosaccharid-Architekturen (PEI-OS)

Die Modifizierung des hochverzweigten Poly(ethylenimin)-Kerns mit einer Oligosaccharidschale ermöglicht die Bildung von Kern-Schale-Architekturen, wodurch die Wasserlöslichkeit erhöht und die Toxizität der Polymer-Struktur gegenüber Zellen erheblich verringert wird. Weiterhin werden durch die Anbindung von Zucker-Einheiten die Anzahl an Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und -Donoren deutlich erhöht. Für die Modifizierung wurden Maltose, Lactose und Maltotriose genutzt. Die Synthese dieser PEI-Oligosaccharid Architekturen (**Abbildung 19**) erfolgte analog zu der bereits in der Literatur beschriebenen reduktiven Aminie-

rung von *Appelhans et al.*^[52] Dafür wurde das jeweilige Oligosaccharid im alkalischen Milieu (Natriumboratspuffer) mit Poly(ethylenimin) in Lösung gebracht. Als Reduktionsmittel wird ein Boran-Pyridin Komplex eingesetzt, der mit bis zu drei Imin- bzw. Enamingruppen reagieren kann. Eine Temperatur von 50 °C und eine Reaktionsdauer von 7 Tagen begünstigen neben dem Arbeiten bei einem pH von 9,0 die Bildung der PEI-OS-Architekturen.

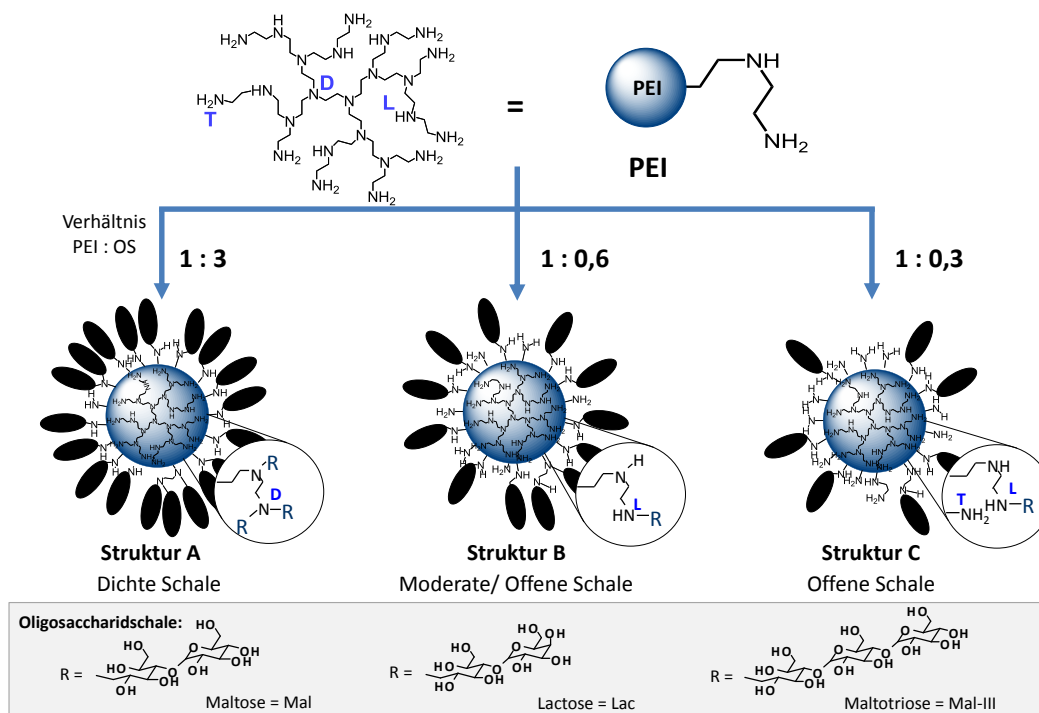


Abbildung 19: Übersicht von den hergestellten PEI-OS-Architekturen mit unterschiedlichen Dichten der Oligosaccharidschale.

Durch unterschiedliche Verhältnisse der reaktiven Gruppen des Polymers zu denen des Oligosaccharids ist es möglich, verschiedene Substitutionsgrade zu erzielen (**Abbildung 19**). Bei Struktur A wurde ein großer Überschuss an Oligosaccharid (PEI:OS = 1:3) zu den reaktiven Aminogruppen des PEIs eingesetzt, um eine annähernd vollständige Umsetzung aller primären (terminale Einheiten) und sekundären Aminogruppen (lineare Einheiten) zu erhalten. Es wird eine sehr dichte OS-Schale mit überwiegend dendritischen Einheiten erhalten (Struktur A). Bei Struktur B resultiert aus dem Unterschuss an Oligosaccharid (PEI:OS = 1:0,6) im Verhältnis zu den reaktiven Aminogruppen im PEI eine moderate/ offene Schalendichte mit hauptsächlich linearen peripheren Gruppen. Auch bei dieser Struktur sind nahezu alle terminalen Einheiten wenigstens einmal mit Maltose funktionalisiert. Im Fall von Struktur C (PEI:OS = 1:0,3) wurde eine Mischung von primären und sekundären Aminogruppen an der Polymer-Zucker Grenzphase festgestellt. Es resultiert eine sehr offene Oligosaccharidschale.

Aufgrund unterschiedlicher Verhältnisse des jeweiligen Oligosaccharids zu den tertiären Aminogruppen des PEIs konnten unterschiedliche Dichten der Oligosaccharidschalen erhalten werden. Somit konnte der Einfluss der Schalendichte auf die Komplexierung verifiziert werden.

Um den Einfluss des Polymerkerns näher untersuchen zu können, wurden verschiedene Kerngrößen des Poly(ethylenimin)s verwendet. Hierfür wurde das PEI G100 ($M_w = 5$ kDa;

$M_n = 3\,600$ g/mol) und WF ($M_w = 25$ kDa; $M_n = 9\,600$ g/mol) von der Firma BASF (Ludwigshafen, Deutschland) verwendet.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen Oligosacchariden, wie Maltose, Lactose und Maltotriose, konnte deren Einfluss auf die Komplexfähigkeit der PEI-OS-Architektur untersucht werden. Es ergaben sich folglich drei Hauptfaktoren, die einen Einfluss auf eine Interaktion mit Beispielanalyten nehmen konnten: die Oligosaccharidschale (Maltose, Lactose oder Maltotriose), die Polymerkerngröße (5 oder 25 kDa) und die Oligosaccharidschalendichte (dichte, moderate/ offene oder sehr offene Schale).

4.1.2.1 Charakterisierung der PEI-OS-Architekturen

Die PEI-OS-Architekturen wurden umfangreich mittels NMR-Spektroskopie, Elementaranalyse, dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential Messungen charakterisiert. Mit Hilfe von Protonen-NMR-Untersuchungen konnte zum einen die Anbindung des Oligosaccharids an den polymeren Kern bestätigt und zum anderen die Anwesenheit von nicht angebondenen Oligosaccharid ausgeschlossen werden. Die Signale des Protonen-NMRs der PEI-OS-Architekturen (**Abbildung 20**) kann in drei charakteristische Protonengruppen unterteilt werden: in einem Bereich von 2,4 bis 3,3 ppm werden die Signale der PEI Protonen und des Protons der reduktiven Gruppe des Oligosaccharids gemessen. Von 3,3 bis 4,4 ppm treten die Signale des Oligosaccharids auf. Das Signal des Protons des anomeren Kohlenstoffs der glykosidischen Bindung erscheint bei 4,9 bis 5,3 ppm (im Beispiel Maltose mit 1'' (**Abbildung 20**)).

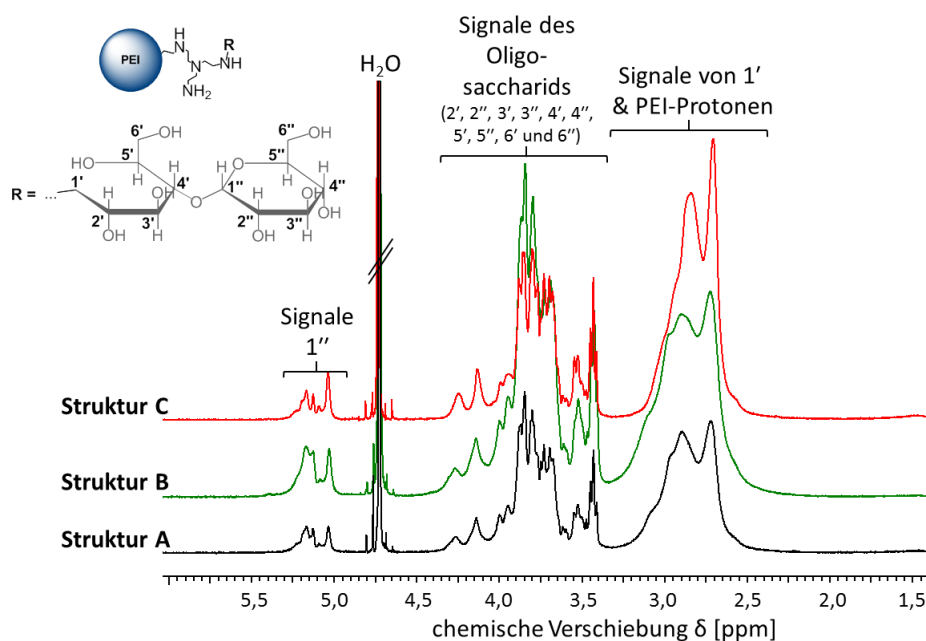


Abbildung 20: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von drei verschiedenen PEI-OS-Strukturen mit unterschiedlicher Schalendichte.

Aufgrund der starken Verbreiterung und Überlagerung der Protonensignale des PEI-Kerns und der Oligosaccharid-Einheiten ist eine genauere Zuordnung nicht möglich. Dennoch können bei einem Vergleich der abgebildeten Spektren Unterschiede aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Oligosaccharidschale festgestellt werden. Der markanteste Unterschied findet sich

bei den Protonen des PEI-Kerns und des Protons der reduktiven Einheit des Oligosaccharids (2,4 - 3,3 ppm).

Genauere Erkenntnisse über das Molekulargewicht und die Anzahl an angebundenen Oligosaccharid-Einheiten liefert eine Auswertung der Elementaranalyse (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Übersicht der angebundenen Oligosaccharid-Einheiten a, dem Molekulargewicht M_w und dem totalen Funktionalisierungsgrad (TDF) der PEI-OS-Architekturen.

PEI-OS	Struktur	a	M_w [g/mol]	TDF [%]
PEI-5k-Mal	A	75	28130	67
	B	37	15550	33
	C	22	10760	20
PEI-25k-Mal	A	177	67540	61
	B	90	39130	31
	C	61	29610	21
PEI-5k-Lac	A	73	27560	66
	B	37	15750	33
	C	21	10320	18
PEI-25k-Lac	A	180	68510	62
	B	100	42440	34
	C	33	20240	11
PEI-25k-Mal-III	A	176	95830	60
	B	86	51780	30
	C	48	33130	16

Anmerkung: TDF basiert auf der Umsetzung aller Aminogruppen im PEI; folglich können zwei terminale, eine lineare und eine dendritische Einheit umgesetzt werden.

Der Anteil an terminalen, linearen und dendritischen Einheiten wurde mit Hilfe von NMR-Untersuchungen bestimmt: 5 kDa: 27,2 T, 31,4 L, 25,4 D (Verzweigungsgrad (DP)= 83); 25 kDa: 68,8 T, 91,1 L, 63,1 D (Verzweigungsgrad (DP)= 223); $DP = (T + D) / (T + L + D)$

Bei Struktur A findet bei einem Polymerkern von 5 kDa eine Anbindung von 73 bzw. 75 Zuckereinheiten statt. Bei dem größeren PEI-Kern werden bei Struktur A zwischen 176 und 180 Oligosaccharid-Einheiten angebunden. Alle Strukturen A weisen unabhängig von der Kerngröße und des verwendeten Oligosaccharids einen totalen Funktionalisierungsgrad zwischen 60 und 70 % auf. Für die moderate/ offene Struktur B werden im Mittel 37 Zuckereinheiten bei einem 5 kDa Kern und 86-100 Einheiten bei einem 25 kDa PEI-Kern angebunden. Hierbei schwankt der Funktionalisierungsgrad zwischen 30 und 35 %. Bei Struktur C werden 21 bzw. 22 Oligosaccharid-Einheiten bei einem kleinen Polymerkern und 33 bis 61 Einheiten bei einem großem Polymerkern. Der Funktionalisierungsgrad liegt zwischen 11 und 22 %.

Die PEI-OS-Architekturen wurden ebenfalls auf ihr Aggregationsverhalten hin untersucht. Hierfür wurden die hydrodynamischen Radien und die Verteilung der Architekturen in wässrigen Lösungen mit Hilfe der dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass die Polymer-Architekturen als isolierte, einzelne Moleküle vorliegen und es zu keiner Aggregatbildung bei den verwendeten Konzentrationen kommt.

4.1.3 PEI-Spacer-Architekturen

Neben den bereits beschriebenen hydrophilen Kern-Schale-Architekturen wurden ebenfalls Architekturen mit einem höheren hydrophoben Anteil hergestellt und untersucht. Die Erhöhung des hydrophoben Anteils wurde durch die Anbindung von Alkylketten (Spacern) ermöglicht. Deren Enden liegen zum einen maltosyliert vor oder tragen zum anderen eine freie Aminogruppe und ragen aus der Maltoseschale heraus. Mit Hilfe dieser Architekturen können zusätzlich hydrophobe Interaktionen mit lipophilen Analyten untersucht werden.

Als Kern wurde ebenfalls hochverzweigtes Poly(ethylenimin) benutzt und mit N-Boc-11-aminoundecansäure modifiziert. Hierbei reagiert EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide) mit der Carboxyl-Gruppe des geschützten Spacers unter Bildung einer Aminreaktiven O-Acylisoharnstoff-Zwischenstufe, die sehr schnell mit einer Amino-Gruppe reagieren kann. Bei diesem nukleophilen Angriff wird eine Amidbindung gebildet und ein Isoharnstoff als Nebenprodukt erhalten. Da die Zwischenstufe äußerst reaktiv ist und bereits mit kleinen Wasserverunreinigungen reagieren kann, wird *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) bzw. das wasserlösliche *N*-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) zur Stabilisierung hinzugegeben. Mit NHS bildet sich ein aktivierter Ester, der wesentlich stabiler als der O-Acylisoharnstoff ist und eine effiziente Kupplung ermöglicht. Dieser sogenannte Aktivester reagiert nukleophil mit den primären und sekundären Aminogruppen des PEI-Kerns unter Ausbildung einer Peptidbindung und Rückbildung des Sulfo-NHS.

In Abhängigkeit des Zeitpunktes der Entschützung konnten unterschiedliche Modifizierungen mit Maltose erhalten werden (**Abbildung 21**).

Im Fall der PEI-5k-C11-Mal/ PEI-25k-C11-Mal Architekturen erfolgt nach der Anbindung der Spacer-Einheiten an den PEI-Kern deren Entschützung mit Hilfe von Trifluoressigsäure (TFA). Im Anschluss wird eine reduktive Aminierung mit Maltose durchgeführt. Es werden Architekturen erhalten, bei denen alle Spacer-Einheiten und auch teilweise der PEI-Kern maltosyliert werden (**Abbildung 21 links**). Erfolgt nach der Anbindung der Spacer-Einheiten die reduktive Aminierung und im Anschluss eine Entschützung der Spacer-Enden, liegen die Spacer unmodifiziert vor. Die Maltose ist nur am PEI-Kern angebunden (**Abbildung 21 rechts**).

4.1.3.1 Charakterisierung der PEI-Spacer-Architekturen

Die PEI-Spacer-Architekturen wurden mittels ^1H -NMR auf ihre Reinheit untersucht (**Abbildung 22**). Aufgrund der unterschiedlichen Syntheseschritte liegen die PEI-Spacer-Architekturen in unterschiedlichen Ladungszuständen vor. Durch die spätere Entschützung mit TFA befinden sich im Fall der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Architekturen Anionen der Säure im positiv geladenen Polymerkern. Da diese Gegenionen eine elektrostatische Interaktion mit Analyten behindern könnten bzw. mit diesen in einer Konkurrenzreaktion stehen, müssen sie entfernt werden. Dies gelang mittels Lösen in Puffer und anschließender Dialyse. Bei der Syntheseroute der PEI-5k/ 25k-C11-Mal Architekturen werden die Anionen durch die später durchgeführte reduktive Aminierung verdrängt und entfernt. Mit Hilfe der Verbreiterung einiger Signale in den Protonenspektren der jeweiligen Verbindungen kann auf die unterschiedlichen Ladungen der Strukturen geschlossen werden. Befinden sich keine anionischen

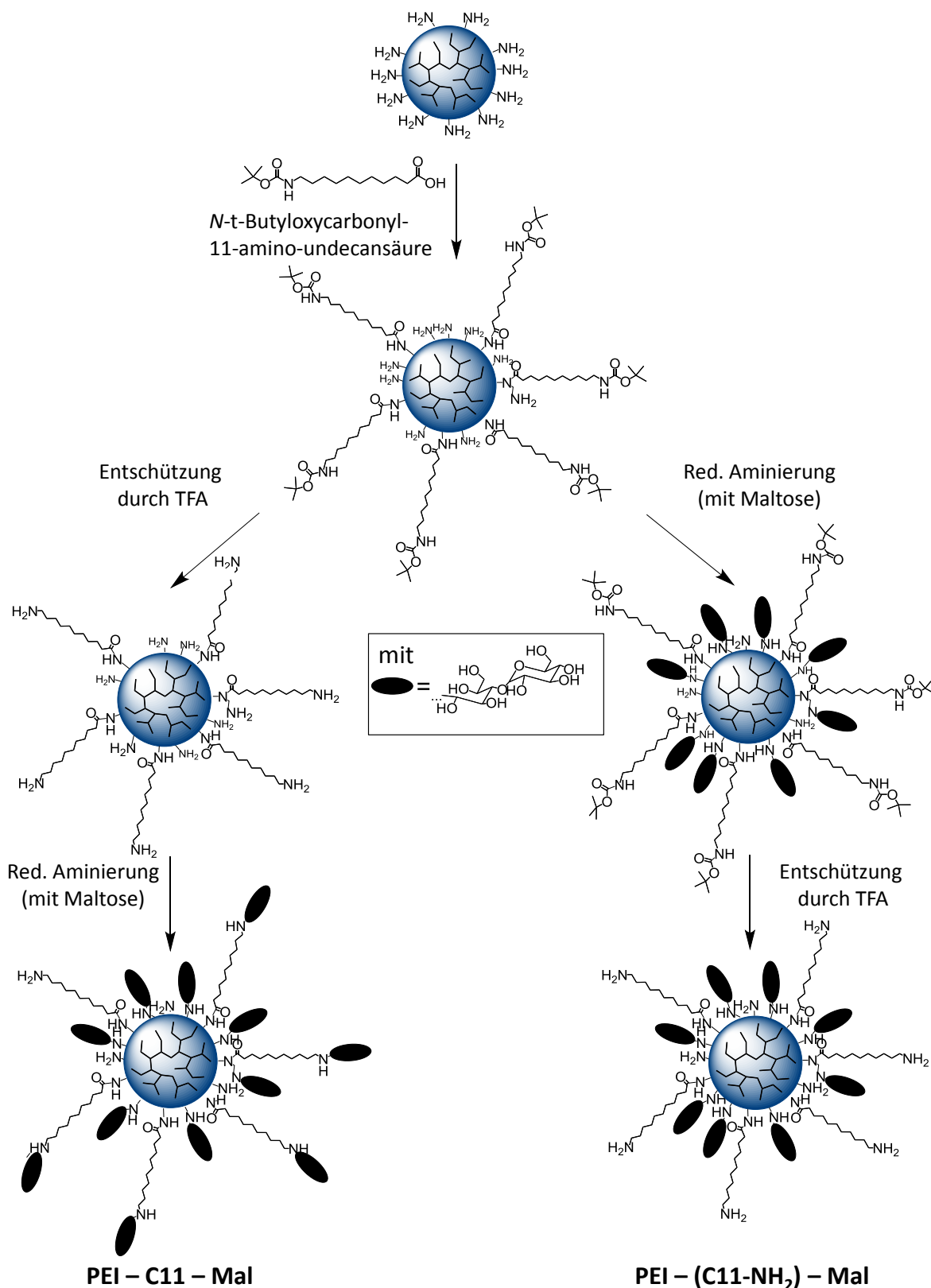


Abbildung 21: Übersicht der verschiedenen PEI-Spacer-Architekturen. Links: Vor der Maltosylierung erfolgt die Entschützung, daher befinden sich die Maltose-Einheiten hauptsächlich an den Spacer-Enden und teilweise am PEI-Kern. Rechts: Zunächst erfolgt die reduktive Aminierung, sodass die Maltose nur an den PEI-Kern gebunden ist, dann die Entschützung der Spacer.

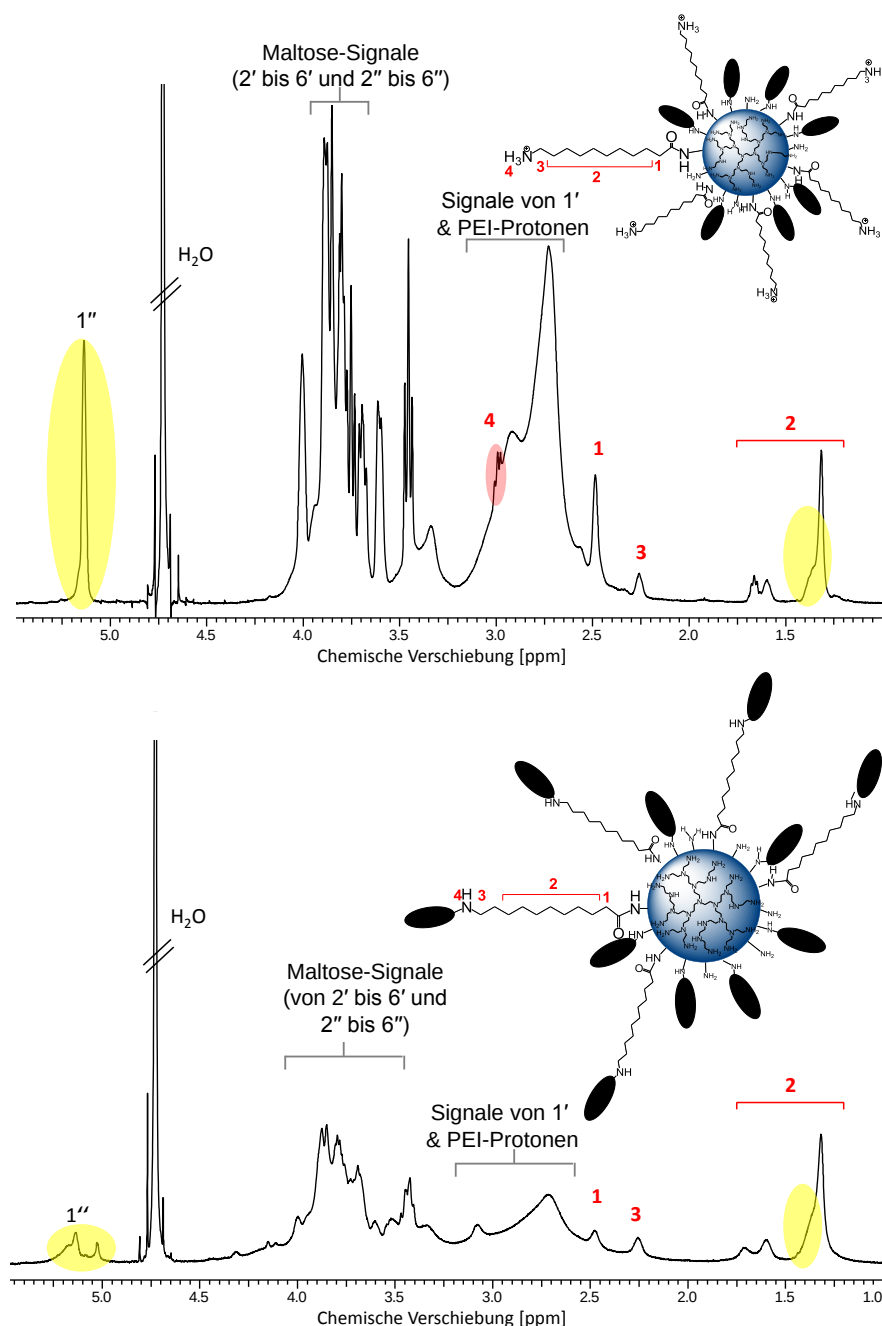


Abbildung 22: Protonen-NMR der PEI-Spacer-Architekturen mit unterschiedlichen Ladungszuständen des Polymerkerns. Oben befinden sich keine TFA-Anionen im Polymerkern. Unten befinden sich nach der Entschüttung TFA-Anionen im positiv geladenen Polymerkern.

Gegenionen in dem Polymerkern, kommt es zu leichten geringfügigen Änderungen der Signale bei 1,7 bzw. 5,2 ppm (**Abbildung 22** gelb markierten Bereiche). Die Protonensignale der unmodifizierten Spacer-Endgruppe (**Abbildung 22** rot markierter Bereich) kann im Protonenspektrum zeigen, dass die Spacer-Endgruppen nicht maltosyliert vorliegen. Weiterhin kann die Anwesenheit von TFA Anionen eindeutig durch ^{19}F -NMR-Untersuchungen nachgewiesen werden.

Genauere Erkenntnisse über die Anzahl an angebotenen Maltose-Einheiten a_M , sowie Spacer-Einheiten b , das Molekulargewicht M_w und den totalen Funktionalisierungsgrad liefert eine

Untersuchung mit Elementaranalyse (**Tabelle 3**). Bei einem kleinen PEI-Kern konnten 7 Spacer-Einheiten und bei dem 25 kDa Polymerkern 21 Spacer-Einheiten angebunden werden. Die PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Struktur wies 26 Spacer-Einheiten auf.

Tabelle 3: Übersicht der angebundenen Maltose-Einheiten a_M , der Anzahl der angebundenen Spacer-Einheiten b , dem Molekulargewicht M_w und dem totalen Funktionalisierungsgrad (TDF) der PEI-Spacer-Architekturen.

PEI-Spacer	a_M	b	M_w [g/mol]	TDF [%]
PEI-5k-C11-Mal-1	55	7	23460	49
PEI-5k-C11-Mal-2	38	7	12580	35
PEI-25k-C11-Mal-1	150	21	58470	52
PEI-25k-C11-Mal-2	114	21	37410	40
PEI-25k-(C11-NH ₂)-Mal	93	26	44850	41

Anmerkung: TDF basiert auf der Umsetzung aller Aminogruppen im PEI; folglich können zwei terminale, eine lineare und eine dendritische Einheit umgesetzt werden.

Der Anteil an terminalen, linearen und dendritischen Einheiten wurde mit Hilfe von NMR-Untersuchungen bestimmt: 5 kDa: 27,2 T, 31,4 L, 25,4 D (Verzweigungsgrad (DP)= 83); 25 kDa: 68,8 T, 91,1 L, 63,1 D (Verzweigungsgrad (DP)= 223); $DP = (T + D) / (T + L + D)$

Bei der Untersuchung des Lösungsverhaltens der PEI-Spacer-Architekturen konnte beobachtet werden, dass sich bereits bei geringen Konzentrationen Aggregate bilden. Aufgrund der Modifizierung mit Spacer-Einheiten entstehen hydrophobe Systeme. Wegen der Maltosylierung wird der hydrophile Anteil erhöht. Es entstehen amphiphile Systeme, die schwer löslich sind. Bei ähnlichen Systemen wurde bei höheren Konzentrationen ebenfalls ein solches Aggregations-Verhalten beobachtet.^[54, 167] Dieses Verhalten könnte für eine Anwendung dieser Architekturen als pseudostationäre Phase bzw. nicht-kovalente Modifizierung der stationären Phase interessant sein. Analytmoleküle könnten mit den PEI-Spacer-Architekturen interagieren und durch die Bildung von Aggregaten ein anders, besseres Auftrennungsverhalten zeigen. Darüber hinaus wäre die Verwendung dieser PEI-Spacer-Architekturen als unpolare Modifizierung einer Säulenoberfläche interessant. Diese könnte aufgrund der Kern-Schale-Architektur selektivere Interaktionen mit hydrophoberen Analyten ermöglichen.

4.1.4 PEI-FA-Architekturen

Deutlich hydrophobere Systeme wurden mit einer Modifizierung mit Fettsäuren erhalten. Diese sehr lipophilen PEI-FA-Architekturen sollten auf die Interaktion mit lipophilen Vitaminen getestet werden. Die Art und Weise der Interaktionen mit Analyten sollte analog zu einer Modifizierung von kommerziell erhältlichen Trennsäulen mit Alkylketten sein. Bei den PEI-FA-Architekturen kommt jedoch der Einfluss des PEI-Kerns hinzu, wodurch eventuell weitere Interaktionen mit hydrophileren Analytkomponenten erhalten werden könnten. Um den Einfluss des hydrophoben Anteil besser untersuchen zu können, wurden Strukturen mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden hergestellt. Es wurde hochverzweigtes Poly(ethylenimin) mit einer Kerngröße von 25 kDa genutzt. Dieser Kern wurde im Mittel mit 20, 35 oder 50 Fettsäure-Einheiten modifiziert. Die PEI-FA-Architekturen (**Abbildung 23**)

wurden zum einen nicht weiter funktionalisiert eingesetzt und zum anderen wurden die PEI-FA-Architekturen weiter maltosyliert. Auf diese Art und Weise konnte der hydrophile Anteil erhöht werden und der Einfluss auf die Interaktionen untersucht werden. Die Untersuchung der Wechselwirkungen der PEI-FA mit und ohne Maltoseschale mit lipophilen Vitaminen stand im Vordergrund der Untersuchungen.

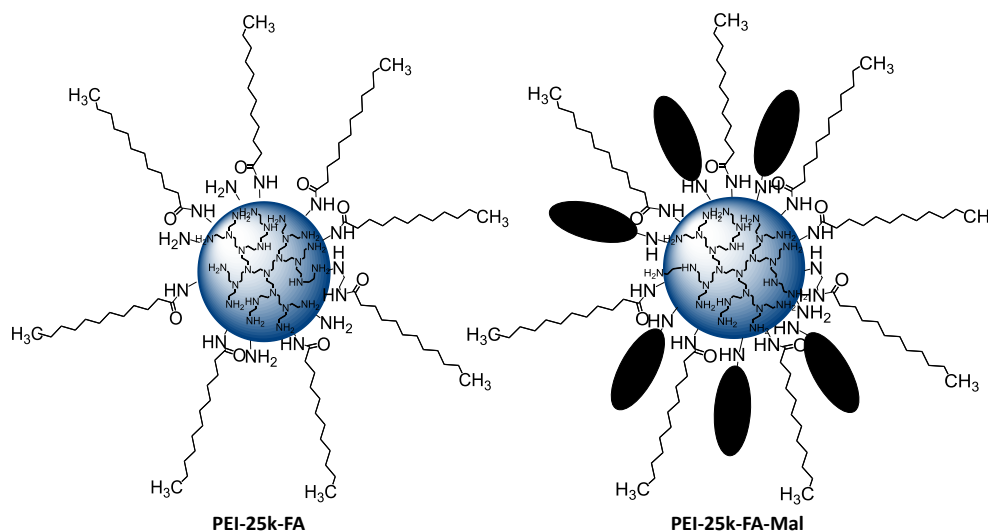


Abbildung 23: Schematische Übersicht der PEI-FA-Architekturen ohne (links) und mit (rechts) Maltoseschale.

Für die Modifizierung des PEI-25k-Kerns wurde Laurinsäure ($C_{11}H_{23}COOH$) genutzt. Die Anbindung an den Polymerkern erfolgt analog zu der Synthese mit den Spacer-Einheiten. EDC reagiert mit der Carboxyl-Gruppe der Laurinsäure und bildet eine reaktive Zwischenstufe, die mit einer Amino-Gruppe reagieren kann. Zur Stabilisierung wird Sulfo-NHS hinzugegeben, wodurch die reaktive Zwischenstufe stabilisiert wird und eine effektivere Kupplung möglich ist. Unter Ausbildung einer Peptidbindung und Rückbildung des Sulfo-NHS erfolgt die kovalente Anbindung der Laurinsäure an den Polymerkern.

4.1.4.1 Charakterisierung der PEI-FA-Architekturen

Aufgrund der hohen Anzahl an unpolen Seitenketten wurde der hydrophobe Anteil deutlich erhöht im Vergleich zu den PEI-OS- und PEI-Spacer-Architekturen. Eine Untersuchung mit Hilfe von NMR-Spektroskopie konnte wegen einer unzulänglichen Löslichkeit nicht durchgeführt werden.

Mit Hilfe von Elementaranalyse-Ergebnissen kann die Anzahl an angebundener Maltose- a bzw. Fettsäure-Einheiten b, sowie das Molekulargewicht M_w und der Funktionalisierungsgrad berechnet werden (**Tabelle 4**).

Die PEI-FA-Architekturen neigen aufgrund des hohen hydrophoben Anteils sehr stark zu Aggregatbildung. Die kommerziell erhältlichen Säulen mit C18-Ketten-Modifizierung sind in der Chromatographie weit verbreitet und in der Umkehrphasen-Chromatographie sehr gut etabliert. Ein Vergleich der PEI-FA-Architekturen in Bezug auf diese Standard-Säulen könnte sehr interessant sein. Aufgrund des Polymerkerns und der Kern-Schale-Architekturen könnten weitere Interaktionen auftreten, die eine bessere Auftrennung ermöglichen.

Tabelle 4: Ergebnisse der Berechnungen der angebundenen Maltose a, der Fettsäure-Einheiten pro PEI-Kern b, des Molekulargewichts M_w und des totalen Funktionalisierungsgrades (TDF).

PEI-FA	a	b	M_w [g/mol]	TDF [%]
PEI-25k-FA	-	20	13620	8
	-	35	16190	13
	-	50	18950	18
PEI-25k-FA-Mal	125	20	54680	44
	98	35	48180	34
	75	50	43650	26

Anmerkung: TDF basiert auf der Umsetzung aller Aminogruppen im PEI; folglich können zwei terminale, eine lineare und eine dendritische Einheit umgesetzt werden.

Der Anteil an terminalen, linearen und dendritischen Einheiten wurde mit Hilfe von NMR-Untersuchungen bestimmt: 5 kDa: 27,2 T, 31,4 L, 25,4 D (Verzweigungsgrad (DP)= 83); 25 kDa: 68,8 T, 91,1 L, 63,1 D (Verzweigungsgrad (DP)= 223); $DP = (T + D) / (T + L + D)$

4.2 Interaktionsstudien mit Beispielanalyten

Unterschiedliche Faktoren können die Art und die Stärke der auftretenden Wechselwirkungen zwischen den vorgestellten Kern-Schale-Architekturen und bioaktiven Molekülen beeinflussen. Um diese untersuchen zu können, wurden Architekturen mit verschiedenen Eigenschaften hergestellt und deren Interaktion mit Gastmolekülen untersucht. Als Kern-Schale-Architekturen wurden die zuvor beschriebenen (**Kapitel 4.1.2**) PEI-OS-Architekturen mit einem PEI-Kern von 5 und 25 kDa genutzt. Für die Untersuchung der Interaktion mit diversen Gastmolekülen wurden mit PEI-OS-Architekturen mit Oligosaccharidschalen aus Maltose, Lactose und Maltotriose mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden genutzt (**Abbildung 24**).

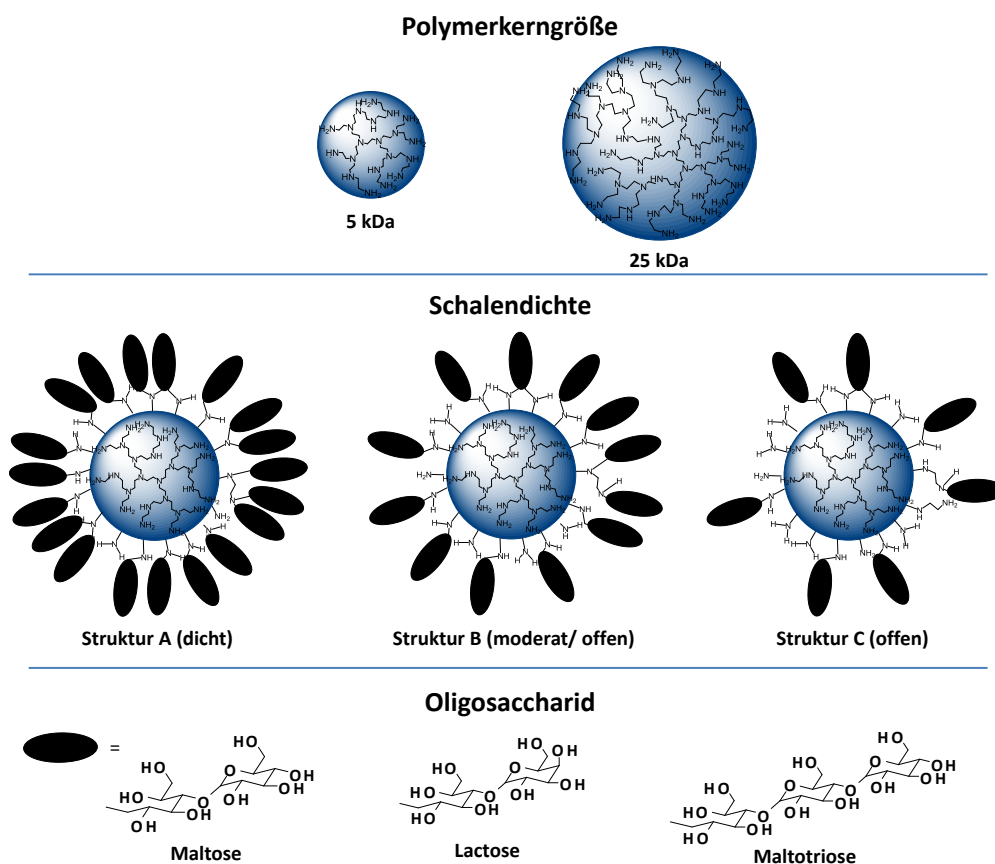
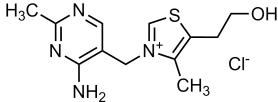
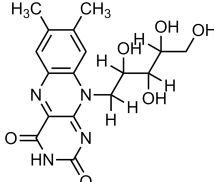
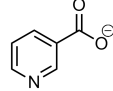
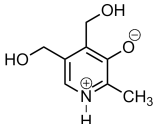
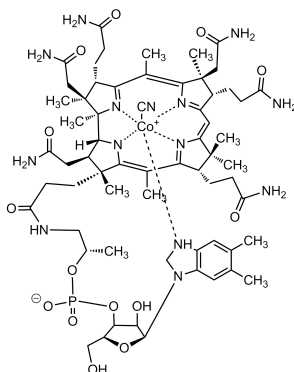
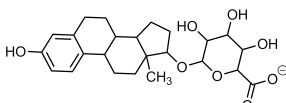


Abbildung 24: Übersicht der verwendeten PEI-OS-Architekturen, die für die Interaktionsstudien genutzt wurden. Es wurden unterschiedliche Kerngrößen, Funktionalisierungsgrade und Oligosaccharide getestet.

Als Gastmoleküle dienten wasserlösliche Vitamine der B-Gruppe, wie Thiamin (Thiamin Hydrochlorid, B₁), Riboflavin (B₂), Nikotinsäure (Niacin, B₃), Pyridoxin (B₆) und Cyanocobalamin (B₁₂), und ein Derivat eines Estradiol-Steroids (Estradiol Glucuronid). Diese wasserlöslichen Gastmoleküle wurden ausgewählt, da sie biologisch relevant sind und unterschiedliche Wechselwirkungen in wässrigen Lösungen ermöglichen. Thiamin weist in Lösung beispielsweise eine leicht positive Ladung auf, wohin gegen Niacin, sowie das Estradiol-Derivat unter den genutzten Versuchsbedingungen eine negative Ladung tragen. Pyridoxin liegt in wässrigen Lösungen überwiegend in einem zwitterionischen Zustand vor. Bei Riboflavin ist eine hohe Anzahl an Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und -Donoren gegeben und eine Interak-

tion über nicht-kovalente, vergleichsweise schwache Wasserstoffbrücken denkbar. Das Vitamin B₁₂ weist im Vergleich zu den anderen genutzten Analyten eine große Struktur auf, wodurch auch Unterschiede der Analytgröße untersucht werden können. Ein Überblick der verwendeten Analyten und deren Ladungszustände in wässrigen Lösungen ist in **Tabelle 5** dargestellt. Mit

Tabelle 5: Verwendete wasserlösliche Vitamine und ihr in wässrigen Lösungen vorliegender Protonierungszustand.

Analyt	pK _s Werte	Dominante Spezies in Lösung
Thiamin (B ₁)	4,8; 12,7 ^[168]	
Riboflavin (B ₂)	0,4; 9,8 ^[169]	
Niacin (B ₃)	2,1; 4,8 ^[170]	
Pyridoxin (B ₆)	5,0; 9,0 ^[171, 172]	
Cyanocobalamin (B ₁₂)	3,3 ^[173]	
Estradiol-Derivat	10,7 ^[174]	

Ausnahme von Thiamin wurden alle Analyten in Millipore-Wasser gelöst. Für eine bessere Stabilisierung des Thiamins wurde eine Phosphat-Pufferlösung mit pH 7,4 genutzt. Aufgrund der diversen Eigenschaften der Analyten und den PEI-OS-Architekturen mit unterschiedlichen Funktionalisierungen, Kerngrößen und Oligosaccharidschalen, ist eine umfangreiche Untersuchung der Wechselwirkungen möglich.

4.2.1 Ultrafiltrationsexperimente mit wasserlöslichen Vitaminen

Die Interaktionen wurden mit Hilfe von Ultrafiltrationsexperimenten untersucht. Die Ultrafiltration (UF) ist eine Filtermethode, bei der durch Druck eine Lösung durch eine semi-permeable Membran gedrückt wird. Diese Membran hält größere Moleküle oberhalb einer

bestimmten Größe (MWCO) zurück und kleinere Moleküle werden eluiert. Somit ist es möglich, die PEI-OS-Architekturen in der Rührzelle zurückzuhalten und freie, nicht wechselwirkende Analyten mit dem Eluat abzutrennen. Als Separierungskraft wurde ein Stickstoffstrom mit einem Druck von 5 bar genutzt. Die genutzte Ultrafiltrationszelle besaß ein Gesamtvolumen von 75 mL und eine Filtrationsfläche von 15 cm². Für die Filtration wurden Zellulosemembranen mit einem MWCO von 1 kDa genutzt, deren Porengröße eine effektive Abtrennung der freien Analyten von den Polymeren gewährleisten sollte.

Das Filtrat wurde UV/Vis-spektroskopisch untersucht. Eine Übersicht der UV/Vis-Spektren der Analyten ist in **Abbildung 25** gezeigt.

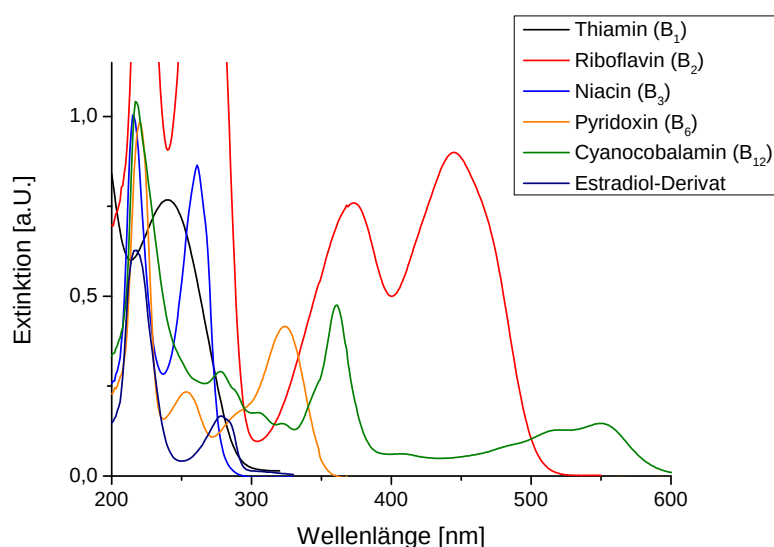


Abbildung 25: UV/Vis-Spektren der verwendeten wasserlöslichen Vitamine und des Estradiol-Derivats.

4.2.1.1 Voruntersuchungen

Jeder Analyt wurde zunächst auf mögliche Wechselwirkungen mit der Zellulosemembran getestet. Dafür wurde eine Analytlösung ultrafiltriert und das Eluat mittels UV/Vis untersucht. Die wässrigen Lösungen der Analyten sollten möglichst eine konstante Konzentration im Eluat aufweisen, die der Ausgangskonzentration entsprach. Somit sollte sichergestellt werden, dass die Konzentration im Eluat nur durch mögliche Wechselwirkungen mit den Polymeren vermindert ist und nicht durch ein Zurückhalten des Analyten durch die Membran. Im UV/Vis-Spektrum zeigte sich eine konstante Konzentration nach einer Filtration von 10-15 mL. Da in diesem Bereich eine Änderung nur auf eine Wechselwirkung mit den Polymer Architekturen zurückzuführen ist, wurden alle folgenden UV/Vis-Proben nach 10-15 mL entnommen.

Aufgrund von Säure-Base-Wechselwirkungen der Analyten in Wasser wurden deren Lösungen mindestens 20 Stunden vor Beginn der Wechselwirkungsuntersuchung präpariert. Anhand eines stabilen pH-Wertes der Analytlösung konnte daraus geschlossen werden, dass sich das Gleichgewicht innerhalb dieser Zeit einstellt und die Lösung für die Experimente

verwendet werden kann. Die Vitamin-Stammlösungen wurden unter Lichtausschluss im Kühlschrank gelagert, um möglichen Zersetzungsreaktionen vorzubeugen. Ein Zerfall der Analyten wurde mittels UV/Vis-Untersuchungen geprüft.

Um die Konzentration des Analyten mittels UV/Vis bestimmen zu können, waren Kalibrierungsmessungen notwendig. Für die Berechnungen wurde jeweils ein Maximum der Extinktion des jeweiligen Analyten genutzt. Dieses sollte während der Ultrafiltration stabil sein und keinen Shift zeigen. Hierfür wurden Verdünnungsreihen mit 10 bis 15 Verdünnungsschritten angefertigt und zu jeder Konzentration die entsprechende Extinktion gemessen. Diese Werte wurden extrapoliert und eine Kalibrierungsgerade aufgestellt.

In der **Tabelle 6** sind die Konzentrationen der Analytstammlösungen und optischen Eigenschaften der genutzten Analyten, wie beispielsweise das für die Auswertung genutzte Maximum und die Kalibrierungsgerade, zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht der Konzentrationen der verwendeten wasserlöslichen Vitamine, sowie deren Extinktionsmaxima und die zur Berechnung der Analytkonzentration (c) verwendete Kalibrierungsgeraden mit Bestimmungsmaß.

Vitamin	Konzentration der Stammlösung	Extinktions- maximum λ_{Maximum} [nm]	Kalibrierungs- gerade	Bestimmtheitsmaß
Thiamin (B_1)	8,3 mg/L ($1,1 \cdot 10^{-4}$ mol/L)	267	$c = \frac{\text{Extinktion}}{6674,4}$	$R^2 = 0,994$
Riboflavin (B_2)	14,3 mg/L ($7,6 \cdot 10^{-5}$ mol/L)	445	$c = \frac{\text{Extinktion}}{11906,3}$	$R^2 = 1,000$
Niacin (B_3)	9,5 mg/L ($3,1 \cdot 10^{-4}$ mol/L)	261	$c = \frac{\text{Extinktion}}{4445,3}$	$R^2 = 0,996$
Pyridoxin (B_6)	11,7 mg/L ($2,8 \cdot 10^{-4}$ mol/L)	325	$c = \frac{\text{Extinktion}}{7185,6}$	$R^2 = 0,997$
Cyanocobalamin (B_{12})	13,1 mg/L ($3,8 \cdot 10^{-5}$ mol/L)	361	$c = \frac{\text{Extinktion}}{24406,1}$	$R^2 = 1,000$
Estradiol- Derivat	11,0 mg/L ($9,3 \cdot 10^{-4}$ mol/L)	278	$c = \frac{\text{Extinktion}}{1813,8}$	$R^2 = 0,981$

Mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden und der bekannten Ausgangskonzentration der Analytlösung konnte durch die UV/Vis-Messung des Filtrats die Konzentration an Analyt bestimmt werden. Somit konnte die Effizienz untersucht und die Menge an wechselwirkenden Analyten berechnet werden.

Bei den Ultrafiltrationsexperimenten musste berücksichtigt werden, dass die Interaktionen der Analyten mit den PEI-OS-Architekturen unter Scherkräften untersucht werden. Unter

diesen Bedingungen sollten nur stabile Interaktionen beobachtbar sein. Schwache Wechselwirkungen sollten zu labil sein, um unter Scherkräften festgestellt zu werden. Analyten, die nur schwache Interaktionen eingehen sollten somit überwiegend eluiert werden und im Filtrat detektiert werden. Diese Bedingungen wurden gewählt, da bei chromatographischen Auftrennungen ebenfalls hohe Drücke vorliegen.

Um die Stabilität der Wechselwirkungen untersuchen zu können, wurden Filtrationen nach 0, 3 und 20 Stunden durchgeführt. Hierfür wurde insgesamt ein Volumen von 120 mL eines PEI-OS- und Analyt-Gemisches hergestellt. Nach 0, 3 und 20 Stunden wurden je 40 mL entnommen und ultrafiltriert. Die restliche Lösung wurde in der Zwischenzeit lichtgeschützt gerührt. Für die Interaktionsstudien wurde ein molares Verhältnis von PEI-OS zu Analyt von 1:10 gewählt. Dieses Verhältnis wurde nicht für die Untersuchung einer maximalen Beladungskapazität gewählt, sondern für eine generelle Untersuchung der auftretenden Interaktionen.

4.2.1.2 Untersuchung der Ladungszustände der PEI-OS-Architekturen und Analyten

Da vermutet werden kann, dass die Ladungszustände der einzelnen interagierenden Komponenten eine essentielle Rolle für die Ausbildung stabiler Wechselwirkungen spielen, wurden diese für die einzelnen Analyten und die PEI-OS-Architekturen untersucht. Die pK_s -Werte der Analyten sind literaturbekannt und bereits in **Tabelle 5** genannt. Für die PEI-OS-Architekturen wurden pH-Titrations durchgeführt (**Abbildung 26**). Mit Hilfe dieser pH-abhängigen Zetapotential-Messungen wurde der Ladungszustand der PEI-OS-Architekturen untersucht und ihre isoelektrischen Punkte bestimmt (siehe Anhang **Tabelle 30**). Für die meisten PEI-OS-Architekturen befindet sich der Polymerkern in einem protonierten Zustand und trägt positive Ladungen. Diese Ladungen könnten über elektrostatische Interaktionen mit den negativ geladenen Analyten wechselwirken. Es fällt weiterhin auf, dass eine dichte Oligosaccharidschale den isoelektrischen Punkt der PEI-OS-Architekturen zu niedrigeren pH-Werten verschiebt. Dies bedeutet, dass eine effektive Abschirmung des Polymerkerns bei den Strukturen A vorliegt. Die auftretenden Unterschiede der jeweiligen isoelektrischen Punkte sind auf die verschiedenen Verhältnisse an terminalen, linearen oder dendritischen Aminogruppen in den unterschiedlichen PEI-OS-Architekturen zurückzuführen. Struktur A mit einer dichten Oligosaccharidschale trägt überwiegend dendritische Aminogruppen, wohingegen Struktur B hauptsächlich lineare Aminogruppen in der Peripherie trägt. Die sehr offene Struktur C weist vorwiegend terminale und lineare Aminogruppen in der Peripherie auf.^[52] Aufgrund der unterschiedlichen Protonierbarkeit der terminalen, dendritischen und linearen Aminogruppen^[175] zeigen die PEI-OS-Architekturen mit Struktur A bis C verschiedene Protonierungseigenschaften. Struktur A wird somit zum einen besser durch die dichte Oligosaccharidschale abgeschirmt und zum anderen wird ein niedrigerer pH-Wert benötigt, um eine Protonierung der tertiären Amine zu erreichen. Der isoelektrische Punkt der Strukturen A liegt aus diesem Grunde am Niedrigsten.

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Untersuchungen und der Messung der vorliegenden pH-Werte während der Interaktionsstudien (**Tabelle 7**) können die auftretenden Interaktionen besser erklärt werden.

Die hydrophilen Vitamine wurden in wässrigen Lösungen ohne Pufferung gelöst. Eine Ausnahme stellt das Vitamin B₁ dar, das aufgrund einer geringen Stabilität in reinen wässrigen

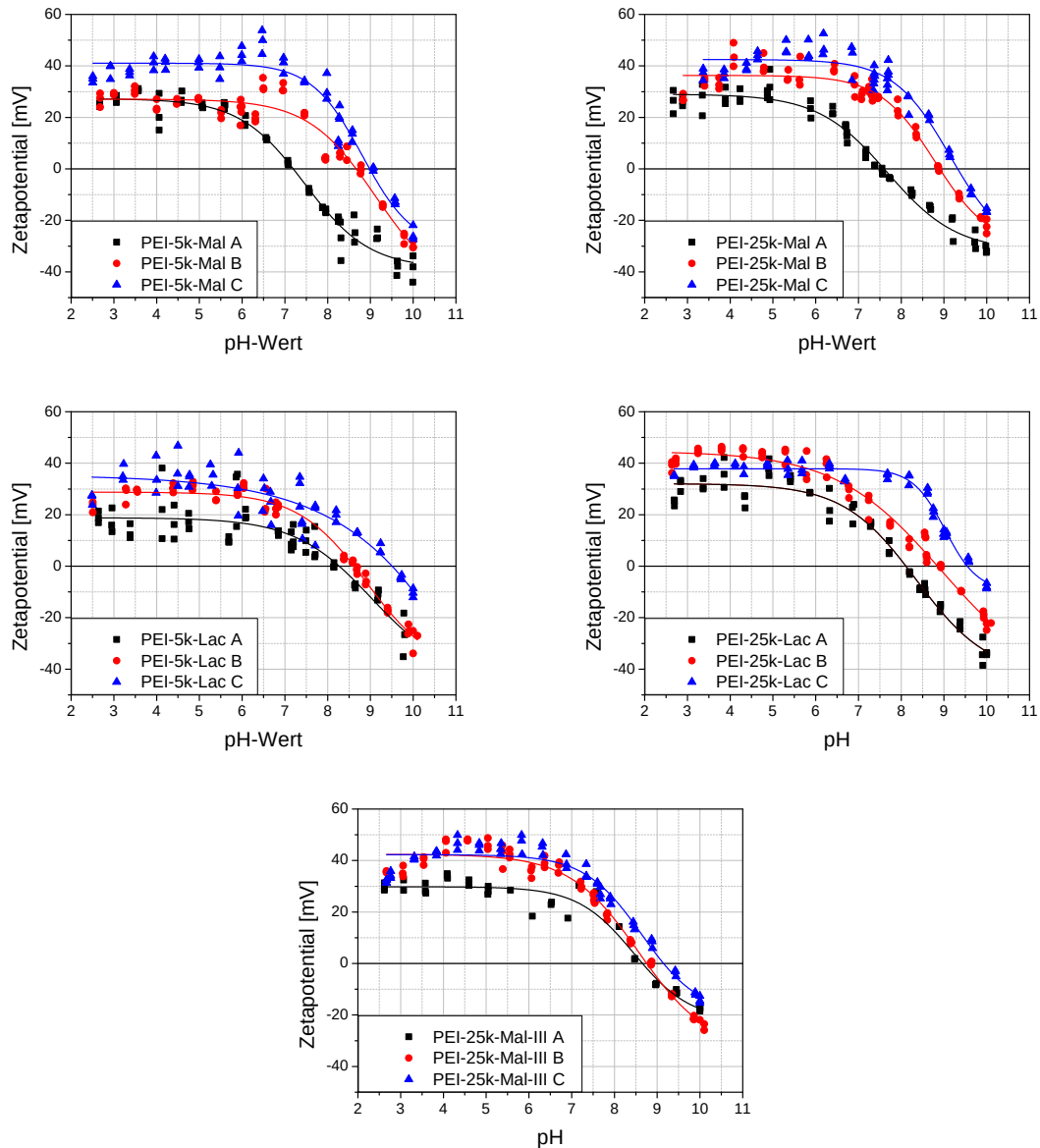


Abbildung 26: pH-Titrations der PEI-OS-Architekturen mit Zetapotential-Messungen.

Lösungen in einem Phosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 verwendet wurde. Aus den pH-Messungen der Ultrafiltrationsexperimente kann geschlossen werden, dass B₁ (pK_s 4,8; 12,7)^[168] leicht positiv geladen vorliegt. B₂ (pK_s 0,4; 9,8)^[169] ist unter den genutzten Filtrationsbedingungen neutral bis leicht negativ. Die Vitamine B₃ (pK_s 2,1; 4,8)^[170] und B₁₂ (pK_s 3,3)^[173], sowie das Estradiol-Derivat (pK_s ca. 10,7)^[174] liegen negativ geladen vor. Vitamin B₆ (pK_s 5,0; 9,0)^[171, 172] liegt in wässrigen Lösungen in einer zwitterionischen Form vor. Während der Ultrafiltrationsexperimente liegen die PEI-OS-Architekturen in den meisten Fällen positiv geladen vor, sodass stabile Interaktionen mit negativ geladenen Analyten auftreten können. Beispiele sind die Vitamine B₃, B₁₂ und das Estradiol-Derivat, bei denen hohe Aufnahmeraten festgestellt werden konnten. Bei den nur wenig geladenen bzw. nicht geladenen Vitaminen B₁ und B₂ kann eine Interaktion nur über schwache nicht-kovalente Interaktionen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals- oder Dispersionswechselwirkungen und andere stattfinden. Die Aufnahmeraten sind gering. Es finden keine stabilen

Tabelle 7: Übersicht der pH-Werte der einzelnen PEI-OS- und Vitamin-Lösungen sowie der jeweiligen Ultrafiltrationsexperimente.

Polymer	Struktur		B ₁	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂	Estra
			7,4	6,1	4,6	4,4	7,6	8,1
PEI-WF		10,5	7,4	7,1	7,1	7,2	6,7	10,5
PEI-5k-Mal	A	8,0	7,4	7,3	8,3	8,6	7,6	8,5
	B	8,5	7,4	7,6	8,0	8,4	8,5	8,8
	C	8,7	7,4	8,2	8,9	8,2	7,7	8,4
PEI-25k-Mal	A	6,5	7,4	7,2	7,5	8,3	7,3	8,8
	B	7,2	7,4	7,5	7,7	7,9	7,6	8,4
	C	7,4	7,4	8,0	7,8	7,9	7,8	8,2
PEI-5k-Lac	A	7,2	7,4	7,8	8,0	8,1	8,1	8,6
	B	8,8	7,4	8,2	8,5	8,3	8,4	8,2
	C	7,0	7,4	8,0	6,9	7,9	8,2	8,1
PEI-25k-Lac	A	8,4	7,4	8,0	7,1	8,6	8,4	8,6
	B	8,7	7,4	7,7	8,1	8,7	8,3	8,6
	C	9,2	7,4	8,0	8,4	8,9	8,3	8,7
PEI-25k-Mal-III	A	6,8	7,4	7,8	8,1	8,2	7,9	8,1
	B	7,6	7,4	7,5	8,1	8,2	7,9	8,0
	C	7,5	7,4	7,7	8,3	8,5	7,8	8,5

Interaktionen statt. Das zwitterionische B₆ kann sowohl über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Polymerkern, als auch über Wasserstoffbrückenbindungen interagieren. Dennoch kommt es nur zu geringen bis moderaten Aufnahmezeiten. Es kann vermutet werden, dass bei einem Separationsdruck von 5 bar nur die stärksten Wechselwirkungen Bestand haben. Alle anderen Interaktionen sind zu schwach und die Vitamine werden eluiert. Es resultieren niedrige Aufnahmezeiten. Weiterhin wurden die Ultrafiltrationsexperimente zu drei Zeitpunkten durchgeführt, um eine kinetische Untersuchung der Interaktionen zu ermöglichen. Zum einen wurde direkt nach Zugabe der PEI-OS- und der Vitamin-Lösung filtriert, zum anderen nach 3 und 20 Stunden. Die Interaktionen der PEI-OS-Architekturen mit den Vitaminen war in den meisten Fällen äußerst stabil und änderte sich nur geringfügig. Einzig das Vitamin B₁₂ zeigte während der Filtration eine deutliche Schwankung. Zu Beginn der Filtration konnte eine sehr hohe Aufnahmezeit festgestellt werden, die gegen Ende der Filtration deutlich abnahm. Aufgrund der höheren Scherkräfte gegen Ende der Filtration kann vermutet werden, dass im Fall von B₁₂ eine Interaktion an der Oberfläche der PEI-OS-Architekturen stattfindet. Diese ist während der Filtration zunächst stabil. Bei Erhöhung der Scherkräfte aufgrund von geringeren Lösungsmittelmengen wird das B₁₂ jedoch eluiert.

4.2.1.3 Interaktion des PEI-WFs mit Analyten

Zunächst wurden Vergleichsuntersuchungen mit dem unmodifizierten Poly(ethylenimin) (PEI-WF) in wässrigen Lösungen durchgeführt. Bei der Verwendung von wässrigen Lösungen des PEI-WFs ohne Einstellung eines spezifischen pH-Wertes konnte festgestellt werden, dass

aufgrund von Säure-Base-Wechselwirkungen zwischen den PEI-WF und den Analyten kein stabiler Zustand erhalten wird. Dies wird an den stark schwankenden pH-Werten während der Untersuchung deutlich (**Tabelle 8**). Der pH-Wert der PEI-WF-B₂ Lösung sinkt beispielsweise während des UF-Experimentes von pH 9,4 auf pH 7,1 nach 20 Stunden. Die prozentualen Aufnahmen sowie die Ergebnisse der Ultrafiltration nach 0 und 3 Stunden können im Anhang (**Tabelle 31 bis 36**) nachgelesen werden.

Tabelle 8: Übersicht der pH-Werte der einzelnen Vitamin-Stammlösungen und der Vitamin-PEI-WF Lösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

	[h]	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂
Vitamin-Lösungen [aq]	20	6,1	4,6	4,4	7,6
PEI-WF-Analyt Lösungen	0	9,36	8,02	8,02	8,78
	0,5	9,10	7,87	7,95	8,05
	1	7,88	7,25	7,44	6,95
	2	7,87	7,51	7,86	7,22
	3	7,52	7,22	7,40	6,82
	20	7,12	7,09	7,19	6,71

Aufgrund des stark schwankenden pH-Wertes innerhalb der ersten Stunden, wird die Aufnahmekapazität bei 20 Stunden ausgewertet und diskutiert (**Tabelle 9**).

Tabelle 9: Übersicht der aufgenommenen Analytmoleküle pro einem Molekül PEI-WF. Ultrafiltriert wurde nach 0, 3 und 20 Stunden. Molares Verhältnis PEI-WF zu Analyt betrug 1:10.

Zeit [h]	B ₁	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂	Estradiol-Derivat
0	1 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	0 ± 0	5 ± 0	8 ± 0
3	1 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	1 ± 0	6 ± 0	8 ± 1
20	1 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	1 ± 0	6 ± 0	5 ± 1

Die Vitamine B₁ und B₆ interagieren nur geringfügig mit den PEI-WF und der Hauptteil der Analyten wird bei der Filtration eluiert. Bei den Vitaminen B₂ und B₃ findet eine schwache bis moderate Interaktion statt, bei der bis zu drei Analytmoleküle pro PEI-Molekül zurückgehalten werden. Bei dem sterisch sehr anspruchsvollen Vitamin B₁₂ werden knapp mehr als die Hälfte der 10 möglichen Moleküle aufgenommen. Dies bedeutet, dass stabile Interaktionen zwischen dem unmodifizierten PEI und dem Vitamin B₁₂ auftreten, die auch unter Scherkräften eine hohe Stabilität zeigen. Bei dem Estradiol-Derivat treten ebenfalls hohe Aufnahme-Raten auf. Diese fallen jedoch während der Messzeit von 8 aufgenommen Molekülen (pro einem Molekül PEI) bei 0 Stunden, auf 5 bei 20 Stunden ab. Das Estradiol-Derivat scheint gut mit dem PEI wechselwirken zu können. Allerdings sind diese Interaktionen zeitlich nicht stabil und nehmen bei höheren Reaktionszeiten deutlich ab.

4.2.1.4 Interaktion der PEI-OS-Architekturen mit Analyten

Bei der Nutzung von PEI-OS-Glykopolymeren ergeben sich unterschiedliche Trends mit nur wenig aufgenommenen Gastmolekülen bzw. mit zum Teil einer hohen Anzahl an aufgenommenen Analytmolekülen. Die Interaktionsstudien wurden ebenfalls nach 0, 3 und 20 Stunden durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse nach 20 Stunden gezeigt und diskutiert. Die Ergebnisse der Aufnahmeeffizienzen sowie die Ergebnisse nach 0 und 3 Stunden können im Anhang nachgelesen werden.

Die Vitamine Thiamin und Riboflavin, die unter den genutzten Versuchsbedingungen positiv (B_1) bzw. neutral bis leicht negativ geladenen (B_2) vorliegen, interagieren nur geringfügig mit den PEI-OS-Architekturen (**Abbildung 27**). Mit diesen Analyten werden nur verhältnismäßig schwache Wechselwirkungen generiert.

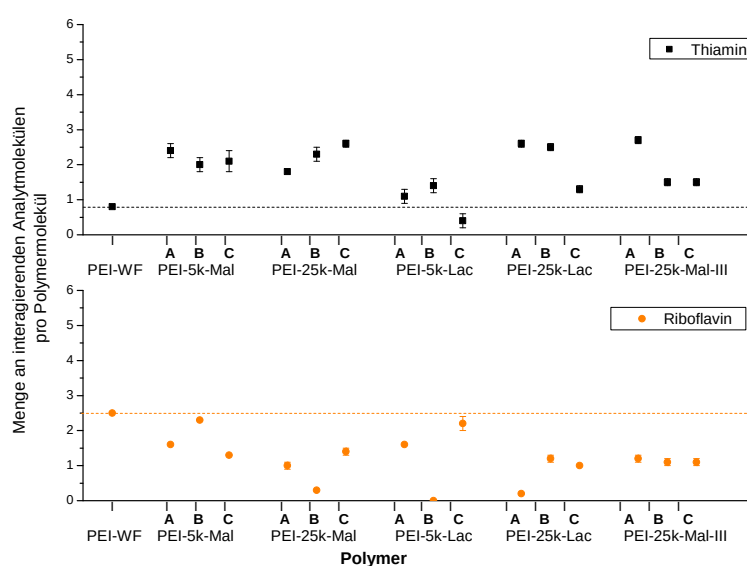


Abbildung 27: Zusammenfassung der Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente mit B_1 und B_2 und dem unmodifizierten Polymer PEI-WF sowie mit den PEI-OS-Architekturen.

Im Fall des leicht positiv geladenen Thiamins tritt eine repulsive Abstoßung aufgrund der den genutzten Versuchsbedingungen positiv geladenen Aminogruppen des Poly(ethylenimin) Kerns auf. Im Vergleich zu dem unmodifizierten PEI-WF findet bei den PEI-OS-Architekturen eine geringfügig bessere Interaktion statt. Aufgrund der Modifizierung mit einer Zuckerschale kommt es zu einer Änderung der vorliegenden Verhältnisse an primären, sekundären und tertiären Aminen in der äußeren Peripherie der Kern-Schale-Architekturen. Diese Änderung der Ladungszustände begünstigt geringfügig die Interaktion mit B_1 . Weiterhin ist eine Wechselwirkung über schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals oder Dispersions-Wechselwirkungen, mit der Zuckerschale möglich. Durch diese zusätzlichen Interaktionen findet eine Steigerung der Aufnahme bei den PEI-OS-Architekturen im Gegensatz zu dem unmodifizierten PEI-WF statt. Weiterhin kann kein einheitlicher Trend bezüglich des Einflusses der Kerngröße, der jeweiligen Oligosaccharide oder der Dichte der Zuckerschale für Thiamin festgestellt werden.

Bei Riboflavin kommt es durch die Modifizierung mit einer Zuckerschale und den Aufbau

von Kern-Schale-Architekturen zu einer Verschlechterung der Aufnahmeeffizienz (**Abbildung 27 unten**). Wurden im Mittel 2-3 Moleküle B₂ pro PEI-WF aufgenommen, interagieren mit den PEI-OS-Architekturen nur 1-2 Moleküle. Obwohl das Riboflavin eine deutlich erhöhte Anzahl an Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und -Donoren aufweist, findet nach der Modifizierung mit einer Oligosaccharidschale eine schlechtere Aufnahme statt. Dies überrascht, da durch die Maltosylierung eine hohe Anzahl an Interaktionsmöglichkeiten über Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung stehen. Die dennoch niedrigeren Aufnahmeraten legen den Schluss nahe, dass Wasserstoffbrückenbindungen für die Interaktion nur eine untergeordnete Rolle spielen und nicht an der Ausbildung stabiler Wechselwirkungen beteiligt sind. Es kann vermutet werden, dass der Separationsdruck von 5 bar bereits ausreicht, um in diesem Fall die schwachen Interaktionen zu eliminieren.

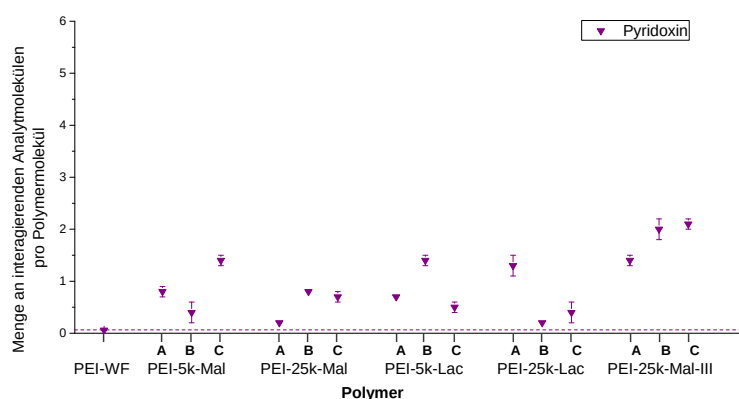


Abbildung 28: Zusammenfassung der Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente mit B₆ und dem unmodifizierten Polymer PEI-WF sowie mit den PEI-OS-Architekturen.

Im Fall des zwitterionischen Vitamin B₆ werden niedrige Aufnahmeraten erzielt (**Abbildung 28**). Die Interaktion durch die Generierung einer Kern-Schale-Architektur nimmt geringfügig zu. Aufgrund nahezu keiner Interaktion des B₆ mit dem unmodifizierten PEI-WF scheint die Modifizierung mit einer Oligosaccharidschale bei diesem Vitamin essentiell für die Ausbildung von Wechselwirkungen zu sein. Die Aufnahmeraten bei der größeren Maltotrioseschale sind höher als für die Maltose- oder Lactosemodifizierung. Darüber hinaus hat die Dichte der Zuckerschale und die Kerngröße kaum einen Einfluss auf die Aufnahmeeffizienz.

Die wasserlöslichen Vitamine B₁, B₂ und B₆ scheinen nur sehr schwache Interaktionen mit den PEI-OS-Architekturen einzugehen. Dies äußert sich in geringen Aufnahmeeffizienzen. Bei dem negativ geladenen Vitamin B₃ und dem Estradiol-Derivat werden hingegen nahezu alle eingesetzten Analytmoleküle komplexiert.

Das negativ geladene Niacin interagiert bereits mit dem unmodifizierten Polymerkern deutlich besser als die nur leicht geladenen Vitamine B₁, B₂ oder B₆. Bei einer Modifizierung mit einer Oligosaccharidschale kommt es zu einer Zunahme der Aufnahmeeffizienz im Vergleich zum unmodifizierten Polymer (**Abbildung 29**). Dies kann durch eine bessere Zugänglichkeit der positiven Ladungen der protonierten Aminogruppen begründet werden. Der unmodifi-

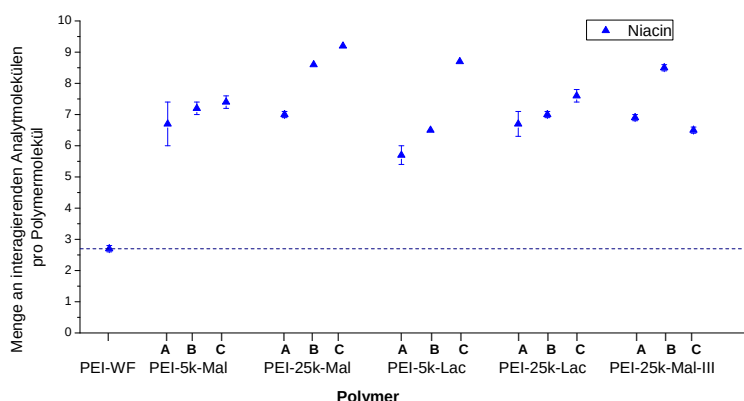


Abbildung 29: Zusammenfassung der Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente mit B_3 und dem unmodifizierten Polymer PEI-WF sowie mit den PEI-OS-Architekturen.

zierte PEI-Kern liegt in einem kollabierten Zustand vor, der für die Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen nur bedingt fähig ist. Durch die Modifizierung mit einer Oligosaccharidschale findet eine Aufspannung der polymeren Struktur statt, wodurch die Kernladung besser zugänglich ist. Negativ geladene Analyten können somit besser mit der Kernladung interagieren und eine höhere Interaktionsrate resultiert.

Mit Ausnahme der Modifizierung mit Maltotriose zeigt sich eine Zunahme der aufgenommenen Vitamine von Struktur A hin zu Struktur C. Die sehr dichte Oligosaccharidschale könnte die positive Ladung des PEI-Kerns zu stark abschirmen, wobei auch die geringere kationische Ladung bei Struktur A dazu beiträgt, dass bei diesen dichten Strukturen nur niedrigere Aufnahmezeiten gefunden werden. Bei einer offenen Oligosaccharidschale wie bei den Strukturen C können elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Niacin und den positiv geladenen Aminogruppen des PEI-Kerns verstärkt auftreten, wodurch höhere Aufnahmezeiten erzielt werden können. Ein Einfluss der Kerngröße auf das Interaktionsverhalten kann bei B_3 nicht festgestellt werden. Die Interaktion findet für die PEI-OS-Architekturen mit einem kleiner Polymerkern auf einem gleich Niveau wie bei dem größeren PEI-Kern statt. Die niedrigere Aufnahme bei Struktur C mit einer Maltotrioseschale zeigt eine deutliche Ausnahme der zuvor beobachteten Effekte. Mögliche Rückfaltungseffekte (*back-folding properties*) der Maltotriose könnten für diese deutlich niedrigere Aufnahme verantwortlich sein. Als Folge könnte die Kernladung des Polymers zu stark abgeschirmt werden, wodurch elektrostatische Wechselwirkungen deutlich abgeschwächt werden.

Obwohl das Estradiol-Derivat einen höheren hydrophoben Anteil als das Niacin aufweist und sterisch anspruchsvoller ist, kann eine erneute Zunahme der Aufnahmezeiten festgestellt werden (**Abbildung 30**). Grundsätzlich können ähnliche Beobachtungen wie mit B_3 gemacht werden. Der Einfluss der Zuckerschale ist auch für das Estradiol-Derivat vorhanden und kann die Interaktion begünstigen. Bei Struktur A werden stabile, elektrostatische Interaktionen gehemmt. Dies kommt zum einen aufgrund der Abschirmung der kationischen Kernladung durch die dichte Oligosaccharidschale. Zum anderen ist die positive Ladung dieser Strukturen bei den verwendeten pH-Bereich niedriger als bei den offeneren Strukturen B und C (siehe

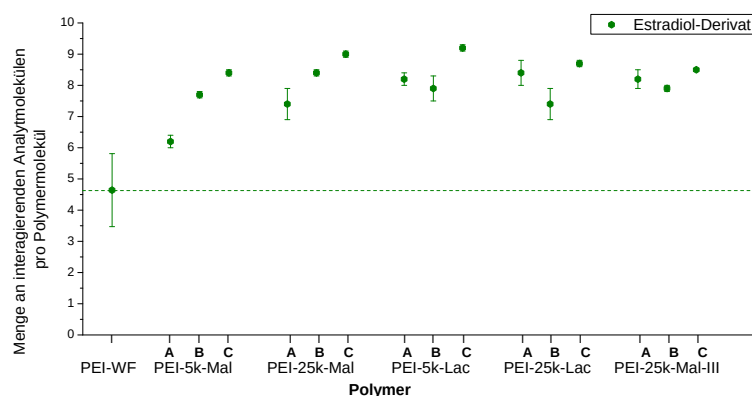


Abbildung 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente mit dem Estradiol-Derivat und den unmodifizierten Polymer, sowie mit den PEI-OS-Architekturen.

IEP in **Abbildung 26**). Als Folge wird eine verringerte Aufnahme beobachtet. Bei dem Estradiol-Derivat kann ein minimaler Unterschied der Interaktion von Maltose- zu Lactose-modifizierten Polymeren erkannt werden. Besonders bei einer Maltosemodifizierung können deutlich bessere Aufnahmeraten mit der offenen Oligosaccharidschale (Struktur C) erzielt werden. Aus den Interaktionen mit den Strukturen C resultiert somit die höchste Aufnahme-rate für eine Maltosemodifizierung. Bei der Lactose- und ebenso bei der Maltotriosemodifizierung kommt es zu einem Abfall der Aufnahmeeffizienz bei Struktur B, obwohl bei diesen moderaten Schalendichten höhere Aufnahmeraten als bei Struktur A erwartet werden würden. Dieses Absinken könnte auf eine Rückfaltung der Oligosaccharid-Einheiten hindeuten. Dies kann vor allem für die Lactosemodifizierung beobachtet werden. Wie bei Niacin scheint die Kerngröße nur eine untergeordnete Rolle bei der Generierung stabiler Wechselwirkungen mit dem Estradiol-Derivat zu spielen. Obwohl die Aufnahmeraten mit dem unmodifizierten PEI-WF bereits in einem moderaten Bereich liegen, kann eine Abnahme der Aufnahmerate mit der Zeit festgestellt werden. Die Aufnahme erscheint somit zunächst sehr hoch, fällt jedoch bei den Messungen nach 20 Stunden deutlich ab. Es kann vermutet werden, dass die Prozesse und Interaktionen dynamische Gleichgewichtsreaktionen sind. Der hohe Separationsdruck von 5 bar muss unter diesem Aspekt ebenfalls berücksichtigt werden. Weiterhin liegt das unmodifizierte PEI in einem kollabierten Zustand vor, der eine Interaktion über elektrostatische Wechselwirkungen erschwert. Die Funktionalisierung mit einer Oligosaccharidschale bewirkt eine Aufspannung der Polymers, wodurch die kationische Kernladung besser zugänglich ist. Als Folge können elektrostatische Interaktionen besser ausgebildet werden und weisen eine höhere Stabilität auf (**Abbildung 31**). Als Resultat können bei den PEI-OS-Architekturen höhere Aufnahmeraten detektiert werden, die auch zeitlich stabil sind.

Das Cyanocobalamin interagiert bereits mit dem unmodifizierten Polymer in einer moderaten Art und Weise (**Abbildung 32**). Es wird eine Aufnahme von bis zu 5 B₁₂-Molekülen pro PEI-WF erzielt. Mit einer Zuckermodifizierung konnte die Aufnahme weiter erhöht und bis zu 9 interagierende Moleküle B₁₂ pro einem Molekül PEI-OS festgestellt werden. Zwar wurden während der Ultrafiltrationsexperimente mit PEI-OS gute Aufnahmeraten erzielt, was auf

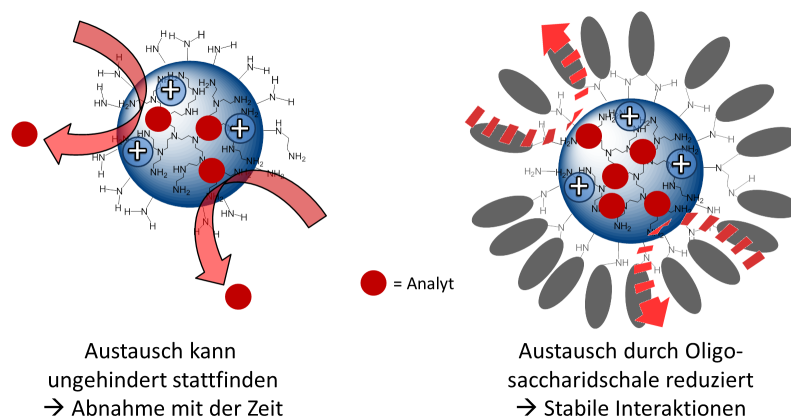


Abbildung 31: Verdeutlichung des Einflusses, der durch die Modifizierung mit einer Oligosaccharidschale generiert wird. Links: unmodifiziertes PEI-WF ohne Oligosaccharidschale, bei dem die Analytmoleküle mit dem positiv geladenen Kern interagieren können, aber wieder freigesetzt werden (Interaktion zeitlich instabil). Rechts: Kern-Schale-Architekturen mit interagierenden Analytmolekülen, bei denen die Interaktion durch die Oligosaccharidschale stabilisiert wird.

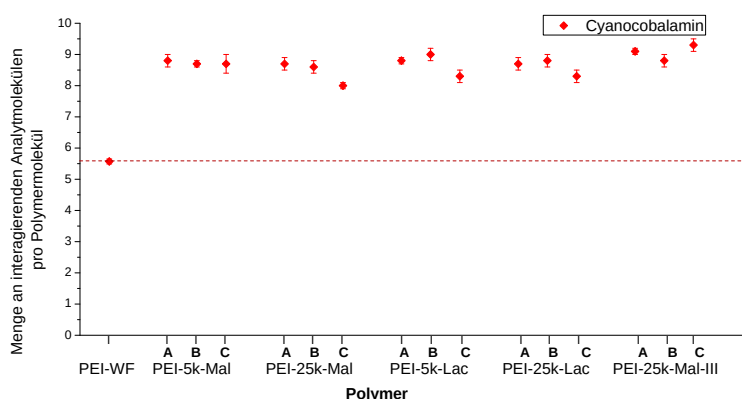


Abbildung 32: Zusammenfassung der Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente mit B₁₂ und den unmodifizierten Polymer sowie mit den PEI-OS-Architekturen.

eine gute Wechselwirkung hindeutet, jedoch war diese Interaktion nicht stabil. Aufgrund der zunehmenden Scherkräfte gegen Ende der Filtration wurde das Cyanocobalamin wieder ausgespült. Ein stabiler Einschluss beispielsweise in den Polymerkern wie er bei Niacin zu beobachten ist, kann somit nicht angenommen werden. Stattdessen liegt vermutlich eine oberflächliche Interaktion des B₁₂ mit den Polymer Architekturen vor, bei dem das B₁₂ mit steigender Einengung und erhöhten Scherkräften wieder ausgespült wird. Ein zumeist sehr geringer Abfall der Aufnahmeraten hin zu Struktur C verdeutlicht diese Vermutung.

4.2.1.5 Zusammenfassung der Interaktionsuntersuchungen mit Hilfe der Ultrafiltration

Mit Hilfe der Ergebnisse der Ultrafiltrationsuntersuchungen können unterschiedliche Interaktionsmechanismen der Analyten mit den PEI-OS-Architekturen angenommen werden. Die

Wechselwirkungen werden von dem jeweiligen Analyten bzw. dessen Eigenschaften maßgeblich bestimmt. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass für stabile und starke Wechselwirkungen mit den PEI-OS-Architekturen negativ geladene Analyten besonders geeignet sind. Bei den negativ geladenen Analyten erzielt die dichteste Zuckerschale mit Struktur A häufig die niedrigsten Aufnahmezeiten. Von Struktur A hin zur offenen Zuckerschale bei Struktur C ist eine Zunahme der Aufnahmezeiten zu erkennen. Da bei Struktur A die positive Kernladung durch die sehr dichte Oligosaccharidschale abgeschirmt ist, findet eine geringe Interaktion mit den negativ geladenen Analyten statt. Bei einer offenen Oligosaccharidschale, wie bei Struktur C, kann ein negativ geladener Analyt sehr gut mit dem positiv geladenen Polymerkern interagieren, da nur eine geringe Abschirmung vorliegt. Die Ladungszustände der Analyten und der PEI-OS-Architekturen sind essentiell für die Ausbildung stabiler Interaktionen. Zusammenfassend können die Analyten gemäß ihren Eigenschaften und ihrem Komplexierungsverhalten in verschiedene Gruppen aufgeteilt werden (**Abbildung 33**).

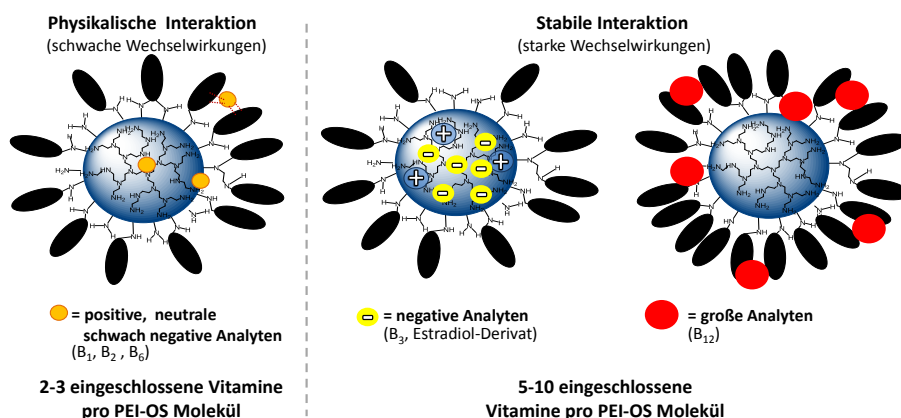


Abbildung 33: Übersicht der auftretenden Interaktionen der Analyten mit den PEI-OS-Architekturen. Links sind schwache Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol- oder hydrophil/hydrophobe Wechselwirkungen, dargestellt. Mittig sind elektrostatische Interaktionen der negativ geladenen Analyten mit dem positiv geladenen Polymerkern verdeutlicht. Rechts ist das sterisch sehr anspruchsvolle B₁₂ als Sonderform illustriert, bei dem die Interaktion überwiegend an der Oberfläche der PEI-OS-Architekturen stattfindet.

Die Vitamine B₁, B₂ und B₆ können als schwach-interagierende Analyten beschrieben werden, die hauptsächlich über schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals- oder Dispersionswechselwirkungen, gebunden werden. Im Fall des zwitterionischen B₆ scheinen nur schwache elektrostatische Interaktionen ausgebildet zu werden, die bei den genutzten Separationsbedingungen nicht stabil sind. Das Vitamin B₃ und das Estradiol-Derivat mit ausgeprägtem negativen Charakter, können sehr gut mit dem positiv geladenen Polymerkern interagieren und stabile elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden. Vitamin B₁₂ nimmt eine Sonderstellung ein. Es ist sterisch sehr anspruchsvoll und interagiert hauptsächlich an der Oberfläche der PEI-OS-Architekturen. Diese Oberflächeninteraktion ist weniger stark ausgeprägt, als eine Interaktion mit dem polymeren Kern und ist unter Scherkräften und höherem Druck reversibel.

4.2.2 NMR-Interaktionsuntersuchungen mit ausgewählten Beispielanalyten

Neben den Ultrafiltrationsuntersuchungen wurden zusätzlich DOSY-Experimente durchgeführt. Das Diffusionsverhalten von B₆ wurde mit und ohne Interaktion mit den Polymeren PEI-5k-Mal C und PEI-25k-Mal C untersucht. Das Vitamin lag in einem molaren Verhältnis von 10:1 gegenüber dem Polymer vor. Als Referenz wurde deuteriertes Wasser genutzt. Alle Experimente wurden bei 298 K und ohne Rotation durchgeführt. Aufgrund von Überlagerungen war eine Berechnung der Diffusionskoeffizienten erschwert. Es wird daher auf eine Bestimmung dieser verzichtet und nur das reine Diffusionsverhalten betrachtet und diskutiert. Zunächst wurde das Diffusionsverhalten der separaten Komponenten untersucht (**Abbildung 34**).

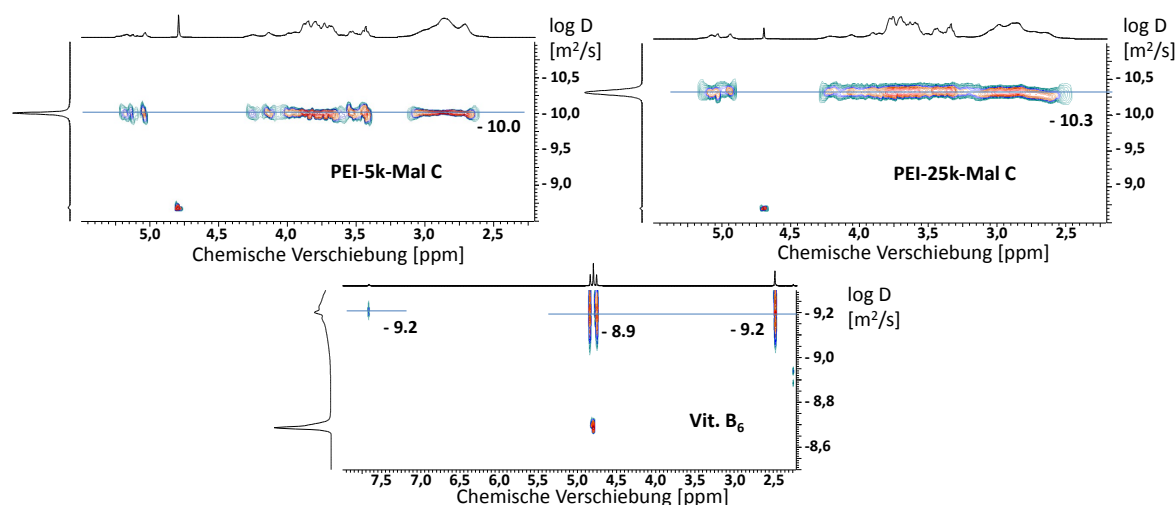


Abbildung 34: DOSY-Spektren (Ausschnitte) der einzelnen, separaten Polymere (PEI-5k-Mal C, PEI-25k-Mal C) und von Vitamin B₆.

In den DOSY-Spektren werden die chemischen Verschiebungen [ppm] auf der Abzisse und der logarithmische Diffusionskoeffizient $[\log(\text{m}^2/\text{s})]$ auf der Ordinate gezeigt. Diese 2D-Spektren bzw. eine Überlagerung der Spektren der reinen, nicht interagierenden Komponenten (**Abbildung 35 rot**) mit denen der interagierenden Komponenten (**Abbildung 35 blau**), soll die Änderungen des Diffusionsverhaltens aufgrund von Interaktionen verdeutlichen.

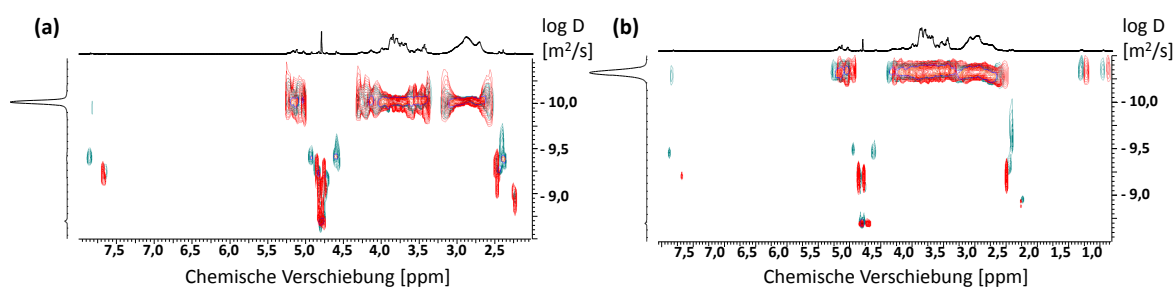


Abbildung 35: Veranschaulichung der DOSY-Untersuchungen anhand von Überlagerungen der 2D-Spektren der reinen, nicht interagierenden (rot) und der interagierenden Komponenten (blau). Die Änderungen des Diffusionsverhalten aufgrund von Interaktion von PEI-5k-Mal C mit B₆ (a) bzw. von PEI-25k-Mal C mit B₆ (b).

Anhand der Überlagerung der 2D-Spektren wird deutlich, dass sich das Diffusionsverhalten von B₆ aufgrund der Interaktion mit den PEI-OS-Architekturen ändert und kleinere Diffusionskoeffizienten gemessen werden können. Aufgrund der dynamischen Interaktionsprozesse der PEI-OS-Architekturen mit den Analyten können nur gemittelte Diffusionskoeffizienten beobachtet werden. Diese liegen zwischen denen der freien Analyten und der PEI-OS-Architekturen. Bei der Interaktion von B₆ mit den Polymeren tritt ein interessanter Effekt auf. In Folge der Wechselwirkung des B₆ mit den PEI-OS-Architekturen ergeben die Protonen 1-4 des B₆ (Abbildung 36) nicht nur ein Signal, wie das freie, nicht interagierende B₆, sondern pro Proton werden drei unterscheidbare Signale beobachtet (Abbildung 36 oben blau).

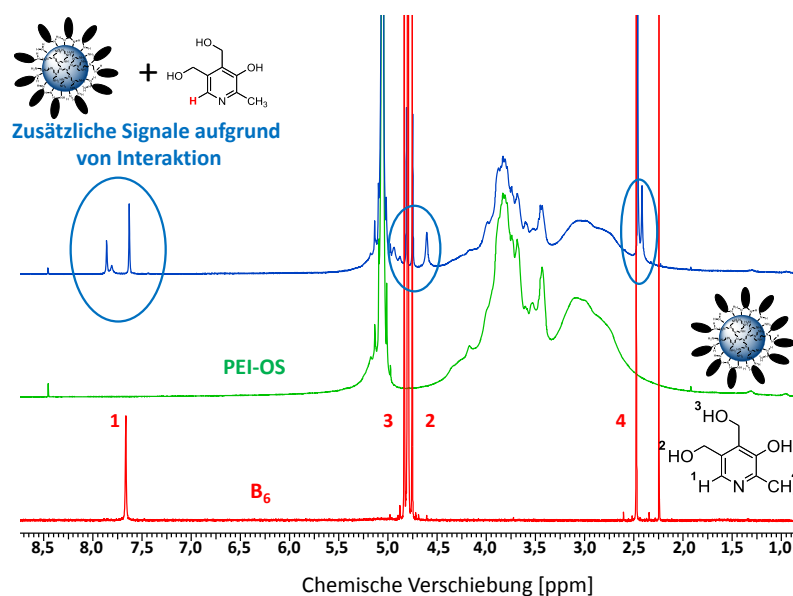


Abbildung 36: Übersicht der ¹H-NMR-Spektren des freien, nicht interagierenden B₆ (rot), des freien, nicht interagierenden PEI-OS (grün) und B₆ in Interaktion mit PEI-OS (blau). Aufgrund der Interaktion mit PEI-OS ergeben sich für B₆ drei Signale je Proton. Freies B₆ weist hingegen nur ein Signal pro Proton auf.

Insbesondere die Signale ab 7,50 ppm sind interessant. Da hier keine Signale des PEI-OS überlagern, können diese gut ausgewertet und integriert werden. Das Signal bei 7,65 ppm wird durch freies B₆ verursacht, das nicht mit den PEI-OS-Architekturen interagiert. Das nicht veränderte Diffusionsverhalten bei den DOSY-Untersuchungen belegt diese Annahme. Das Diffusionsverhalten der Signale mit einer chemischen Verschiebung über 7,70 ppm ändert sich während der DOSY-Messungen deutlich. Das Signal mit der höchsten chemischen Verschiebung zeigt sogar ein vergleichbares Diffusionsverhalten wie das PEI-OS. Diese Signale werden folglich durch die Interaktion mit dem Polymer verursacht. Aufgrund dieser unterscheidbaren Signale ergibt sich die Möglichkeit, die Menge an interagierenden Vitamin mit Hilfe von ¹H-NMR-Titrations-Untersuchungen zu berechnen (Abbildung 37).

Für die Bestimmung der Menge an B₆, das mit den PEI-OS interagiert, wurde zu einer PEI-OS-Lösung B₆ zugegeben, sodass ein molares Verhältnis von 1:10 (PEI-OS:Vitamin) vorlag. Die Signale ab 7,50 ppm wurden integriert. Da die Signale ab 7,50 ppm nur einem Proton

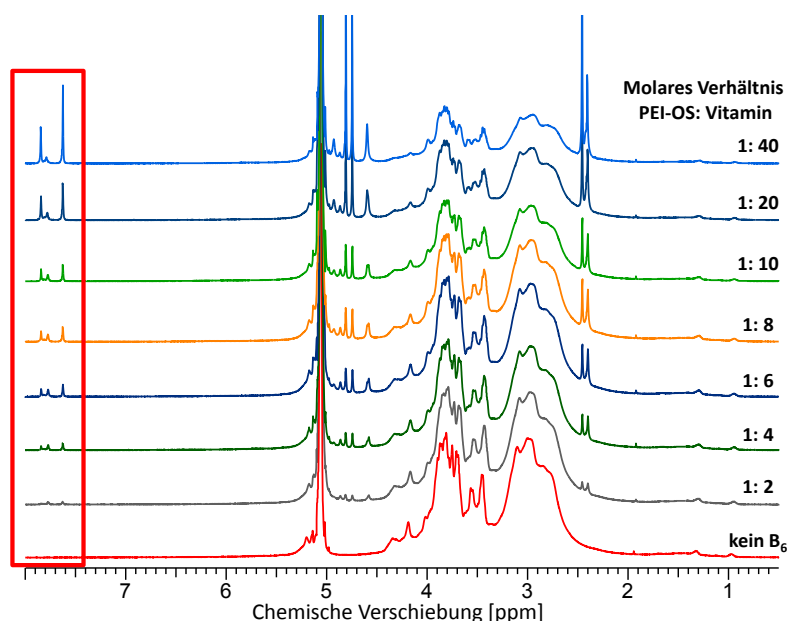


Abbildung 37: Übersicht der NMR-Titrations-Versuche mit ansteigendem B₆-Gehalt am Beispiel der Interaktion von PEI-25k-Mal C mit B₆.

zugeordnet werden können, wird die Summe aller Signale ab diesem Bereich eins gesetzt. Die Anteile an freien und interagierenden B₆ können durch diese Vorgehensweise berechnet werden und mit den Ultrafiltrationsergebnissen verglichen werden (**Tabelle 10**).

Im Gegensatz zu den Ultrafiltrationen können bei den ¹H-NMR-Messungen wesentlich größere Mengen an interagierenden B₆ festgestellt werden. Bei den Blindversuchen mit unmodifizierten PEI zeigten sich bei den Ultrafiltrationsexperimenten geringe Wechselwirkungen mit B₆. Bei den NMR-Untersuchungen konnte jedoch nur das Signal des freien, nicht interagierenden B₆ nachgewiesen werden. Eine Interaktion kann nicht ausgeschlossen werden. Der Austausch zwischen interagierenden und freien B₆ ist allerdings derart schnell (auf der NMR-Zeit-Skala), dass nur ein Signal beobachtet werden kann. Da es sich um sehr dynamische Prozesse handelt, könnten schnelle Austauschprozesse nur bedingt mittels NMR beobachtet werden. Weiterhin scheint die Modifizierung mit einer Oligosaccharidschale essentiell für beobachtbare Interaktionen mit B₆ zu sein. Mit einer Oligosaccharidschale könnte eine Diffusionsbarriere aufgebaut werden, wodurch Austauschprozesse verlangsamt werden. Die Möglichkeit Interaktionen beobachten zu können, wäre somit begünstigt und höhere Mengen an interagierenden Analyten könnten beobachtet werden. Während bei den Ultrafiltrationsexperimenten maximal 2 Moleküle B₆ pro einem Molekül PEI zurückgehalten werden und auf Interaktion hindeuten, wechselwirken laut NMR bis zu 6 Moleküle B₆ pro PEI-OS. Diese deutlichen Unterschiede könnten auf die relativ großen Unterschiede zwischen beiden Messmethoden sowie den Messbedingungen zurückzuführen sein. Während bei der Ultrafiltration die Separation einen Druck von 5 bar benötigt, ist eine Separation bei der NMR-Messung nicht notwendig. Aufgrund der unterscheidbaren Signale von interagierenden und freiem B₆ muss keine Filtration durchgeführt werden. Somit liegt ein ungestörtes Gleichgewicht vor. Für einen direkten Vergleich der Menge an aufgenommen Analyten eignen sich die Ultrafiltration und die NMR-Messungen nur bedingt. Die Versuchsbedingungen sollten für beide Untersuchungen nicht außer Acht gelassen werden.

Tabelle 10: Vergleich der Menge an interagierenden Molekülen bestimmt mittels Ultrafiltration- bzw. NMR-Experimente bei einem molaren Verhältnis von 1:10.

		Ultrafiltration	NMR
PEI-WF		0,2	0,0
PEI-5k-Mal	A	0,8	2,6
	B	0,4	5,7
	C	1,4	5,7
PEI-25k-Mal	A	0,2	2,6
	B	0,8	5,7
	C	0,7	6,0
PEI-5k-Lac	A	0,7	2,4
	B	1,4	7,0
	C	0,5	2
PEI-25k-Lac	A	1,3	5,9
	B	0,2	7,6
	C	0,4	7,9
PEI-25k-Mal-III	A	1,4	2,5
	B	2,0	5,8
	C	2,1	6,4

Mit Hilfe von umfangreichen NMR-Untersuchungen (DOSY, Austauschuntersuchungen mit Temperatureinfluss) können weitere Erkenntnisse über die Wechselwirkungen und die Interaktionsorte des B₆ mit den PEI-OS-Architekturen gewonnen werden. So kann vermutet werden, dass das Signal des B₆ mit der höchsten chemischen Verschiebung bei 7,9 ppm durch die Interaktion mit dem Polymerkern verursacht wird. Zum einen wird dies durch die DOSY-Experimente (**Abbildung 35**) belegt. Hier zeigt dieses Signal des interagierenden Vitamins B₆ ein ähnliches Diffusionsverhalten wie die PEI-OS-Architektur. Weiterhin wurde bei Austauschexperimenten festgestellt, dass der Austausch nur langsam und bei hohen Temperaturen stattfindet. Der Austausch des Signals bei 7,7 ppm tauscht im Vergleich bereits bei Temperaturen von 70 °C aus mit freiem, nicht interagierenden B₆ aus. Das Diffusionsverhalten dieses Signals ändert sich während der DOSY-Messungen nicht. Es kann somit angenommen werden, dass dieses Signal von B₆ verursacht wird, das schwach mit dem PEI-OS-Architekturen interagiert.

Im Zuge einer genaueren Untersuchung dieser Vermutungen wurde unmodifiziertes PEI-WF und ein vergleichbares Polysaccharid als Vergleichskomponenten ausgewählt, um zu untersuchen, ob die Interaktion mit dem Polymerkern oder mit der Oligosaccharidschale stattfindet. Hierfür wurde unmodifiziertes PEI (Lupasol G100) unter gleichen Bedingungen mit B₆ untersucht (**Abbildung 38**). Es kann vermutet werden, dass aufgrund von Säure-Base-Reaktionen und den somit vorliegenden Ladungen des Polymerkerns stabile Interaktionen mit dem zwitterionischen B₆ auftreten sollten.

Bei der Interaktion von unmodifiziertem PEI mit B₆ kann lediglich ein Signal für das freie B₆ beobachtet werden. Es kann vermutet werden, dass die Wechselwirkung mit dem Polymerkern ohne Oligosaccharidschale einen äußerst dynamischen Prozess darstellt, bei dem mittels NMR-Untersuchungen keine Einzelzustände des B₆-Moleküls detektiert werden können. Angesichts der pH- und temperatursensitiven Interaktionen von B₆ wurden weitere

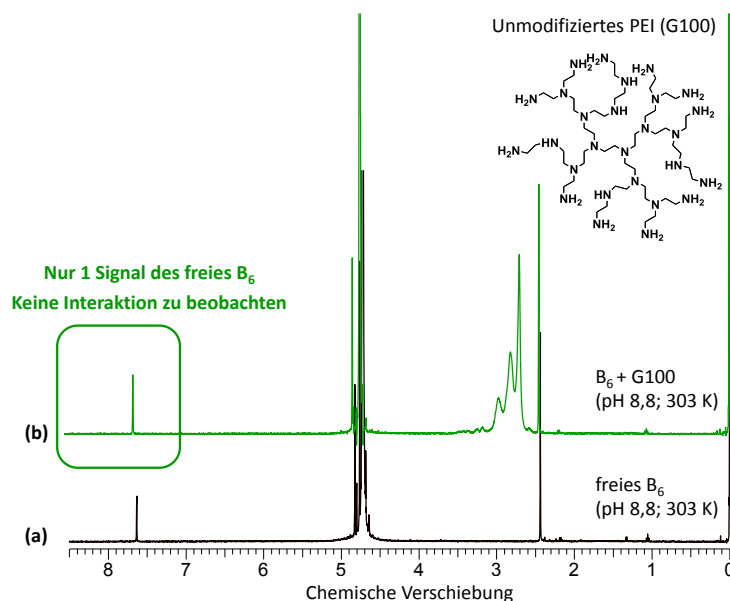


Abbildung 38: NMR-Untersuchungen der Interaktion von unmodifiziertem PEI (G100) und B_6 (b) im Vergleich zu dem Protonenspektrum von freiem B_6 (a).

Studien in verschiedenen pH- und Temperatur-Bereichen durchgeführt (siehe Anhang **Abbildung 101**). Auch unter anderen Bedingungen können keine Signale für das unmodifizierte PEI gefunden werden, die auf eine Interaktion schließen lassen. Um zu untersuchen, ob die Interaktion des B_6 über beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen mit der Oligosaccharidschale stattfindet, wurde ein Polysaccharid genutzt. Glykogen weist eine hochverzweigte Struktur auf, die mit einem Polymer vergleichbar ist. Unter analogen Messbedingungen wurde dieses Polysaccharid mit B_6 umgesetzt und mittels NMR-Messungen untersucht (**Abbildung 39**).

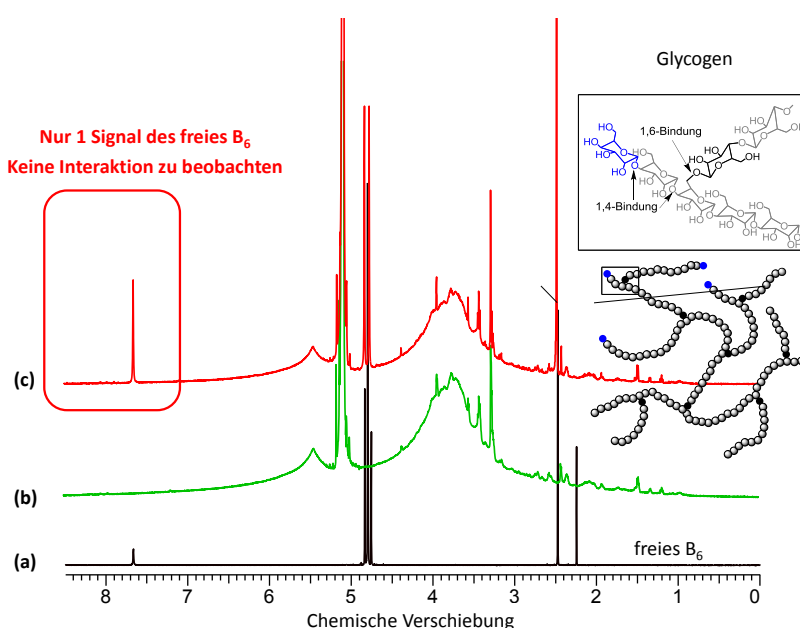


Abbildung 39: NMR-Untersuchungen der Interaktion (c) von Glykogen als ein hochverzweigtes Polysaccharid (b) und B_6 (a).

Auch mit dem hochverzweigten Polysaccharid können keine zusätzlichen Signale gefunden werden, die auf eine Interaktion hindeuten und die zuvor bei den PEI-OS-Architekturen gefunden wurden. Wie bereits bei dem unmodifizierten Polymerkern beobachtet werden konnte, ist der Austausch zwischen interagierenden und freiem B_6 derart schnell, dass eine Beobachtung mittels NMR nicht möglich ist. Für Wechselwirkungen, die mit NMR-Messungen nachgewiesen werden können, scheint ein Zusammenspiel von geladenem Polymerkern und einer Oligosaccharidschale als Diffusionsbarriere essentiell zu sein.

4.3 Untersuchung der Kern-Schale-Architekturen in dünnen Schichten

Um weitere Optimierung bei der chromatographischen Auftrennung zu erhalten, müssen die Prozesse innerhalb einer modifizierten Säule verstanden und entsprechend eingesetzt werden können. Da eine *in-situ*-Untersuchung der Prozesse innerhalb einer Chromatographie-Säule nur schwer möglich ist, wurden Silizium-Wafer (mit einer Oxidschicht von im Mittel 30 nm) mit Kern-Schale Polymeren beschichtet und mittels Ellipsometrie untersucht. Auf diese Art und Weise können Rückschlüsse auf die Stabilität der Polymermodifikationen gezogen werden. Mit Analyten kann das Interaktionsverhalten der Polymerschichten ebenfalls untersucht werden. Für die Herstellung von stabilen, dünnen Schichten müssen die Polymere vernetzt werden. Hierfür wurde Citronensäure ausgewählt, die als Vernetzer in den Arbeiten von Warena *et al.*^[92] umfangreich an vergleichbaren PEI-OS-Systemen getestet wurde. Citronensäure bietet die Vorteile, dass eine Vernetzung mittels thermisch induzierter Kondensation mit der Maltoseschale einfach zu erreichen ist und die Eigenschaften der PEI-OS-Architekturen nicht wesentlich verändert werden.

Abbildung 40 stellt eine Übersicht der verwendeten Polymer-Architekturen dar. Aufgrund des marginalen Einflusses der Polymerkerngröße und der Dichte der Oligosaccharidschale bei den Interaktionsuntersuchungen (**Kapitel 4.2**) wurde nur eine PEI-OS-Struktur (PEI-25k-Mal B) als Beispielverbindung getestet. Viele kommerziell erhältliche Trennsäulen werden mit unpolaren Alkylketten modifiziert und in der Umkehrphasen-Chromatographie erfolgreich verwendet. Die Verwendung der PEI-Spacer-Architekturen mit hydrophilen Polymerkern und hydrophoben Spacer-Einheiten sowie Maltosemodifizierung stellen interessante Alternativen zu einer Verwendung von einfachen unpolaren Ketten dar.

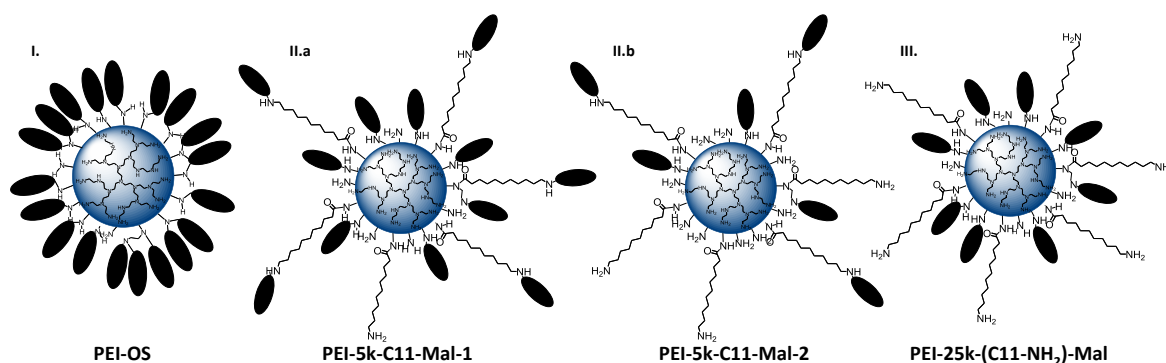


Abbildung 40: Übersicht der verwendeten Strukturen für die Bildung von dünnen Schichten mit I.) PEI-OS, II.) PEI-Spacer (II.a PEI-5k-C11-Mal-1 und II.b PEI-5k-C11-Mal-2) und III.) PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal.

Als Trägermaterial wurden gereinigte und aktivierte Silizium-Wafer (Si-Wafer) verwendet. Um optimale Bedingungen für die Herstellung homogener Filme zu finden, wurden zunächst unterschiedliche Konzentration der Polymerlösung mit 0,5 - 1,5 w%ige Lösung, verschiedene Rotationsgeschwindigkeiten und ein- bzw. mehrmaliges *Spin-Coaten* getestet. Die Polymerlösungen wurden mittels *Spin-Coating* auf die Si-Wafer aufgebracht. Für eine optimale Vernetzung der Polymere und für die Herstellung von stabilen Schichten wurde Citronensäure in einer Konzentration von 25 w% in Bezug auf das eingesetzte Polymer hinzugegeben. In

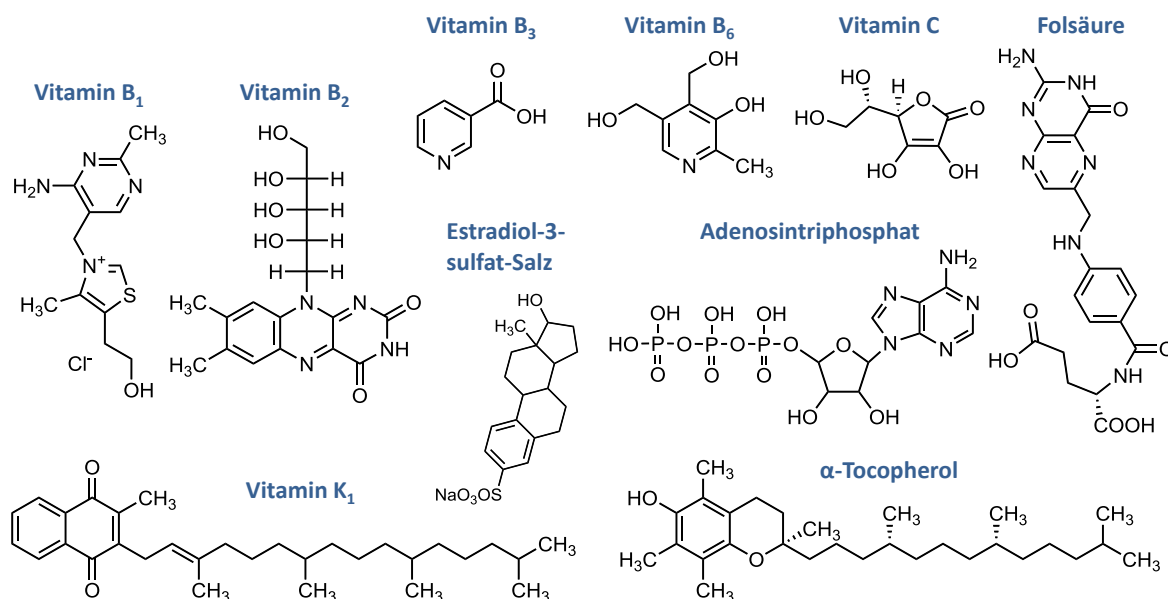


Abbildung 41: Übersicht der verwendeten Analyten bei den Dünnschicht-Experimenten wie die hydrophilen Vitamine B₁, B₂, B₃, B₆, Vitamin C und Folsäure sowie Adenosintriphosphat (ATP) und Estradiol-3-Sulfat. Als lipophile Vitamine dienten Vitamin K₁ und α-Tocopherol.

Voruntersuchungen konnten die optimalen Bedingungen (1,5 w% Polymer, 3500 rpm und zweimaliges Auftragen und spin-coaten) für stabile Schichten mit einer Dicke von 10-20 nm gefunden werden. Die Interaktion der hergestellten Polymerschichten wurde anhand von geänderten Schichtcharakteristika untersucht. Änderungen der Schichtdicke und des Brechungsindex wurden näher untersucht und werden im Folgenden diskutiert. Die gemessenen Delta- und Psi-Werte sind im Anhang dargestellt (**Abbildung 102, 104, 105**)

Als Analyten dienten fluoreszierende, bioaktive Analyten, wie hydrophile Vitamine (B₁, B₂, B₃, B₆, Vitamin C und Folsäure), Adenosintriphosphat (ATP) oder Estradiol-3-Sulfat sowie 2 lipophile Vitamine (Vitamin K₁ und Tocopherol) (**Abbildung 41**).

Aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften der Analyten kann eine mögliche Interaktion mit der Polymeroberfläche zusätzlich mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert und nachgewiesen werden.

4.3.1 Dünne Schichten mit Kern-Schale-Architekturen und deren Quellverhalten in wässrigen Lösungen

Bei den Schichten, die mit der PEI-OS-Struktur (PEI-25k-Mal B) hergestellt worden sind, konnten Schichtdicken mit einem Mittelwert von 17 nm erhalten werden. Durch mehrmaliges, mehrstündiges Extrahieren konnte nachgewiesen werden, dass die Polymerschicht stabil auf der Si-Waferoberfläche aufgebracht ist und es nur zu minimalen Änderungen der Schichtdicke kommt. Neben der Untersuchung der PEI-OS-Struktur waren hauptsächlich die PEI-Spacer-Architekturen interessant.

Die Schichten mit PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal wurden unter den bereits genannten Bedingungen hergestellt (**Kapitel 4.3**). Es konnten stabile Schichten mit Dicken von 17 bis 23 nm erhalten werden. Mit den Spacer-Architekturen, bei denen die Maltose zumeist an den Poly-

merkern gebunden ist (PEI-5k-C11-Mal-1 und PEI-5k-C11-Mal-2), konnten ebenfalls stabile Schichten erhalten werden. Auch nach mehrstündiger Extraktion in Millipore-Wasser konnte kein Ablösen von der Si-Waferoberfläche beobachtet werden. Die Schichtdicken für PEI-5k-C11-Mal-1 liegen zwischen 10 und 18 nm und für PEI-5k-C11-Mal-2 zwischen 16 bis 21 nm. Es konnten somit mit allen Kern-Schale-Architekturen Polymerschichten auf die Si-Waferoberfläche aufgebracht werden, die auch nach mehrstündiger Extraktion stabil sind.

Bei einer möglichen Modifizierung einer Trennsäule mit einem Kern-Schale-Polymer sollte die Polymerschicht zum einen stabil sein und zum anderen kein extremes Quellverhalten aufweisen, da es sonst zu Verstopfungen der Trennsäule kommt. Hierfür wurde das Quellverhalten der Polymerschichten in wässrigen Lösungen untersucht (**Abbildung 42**).

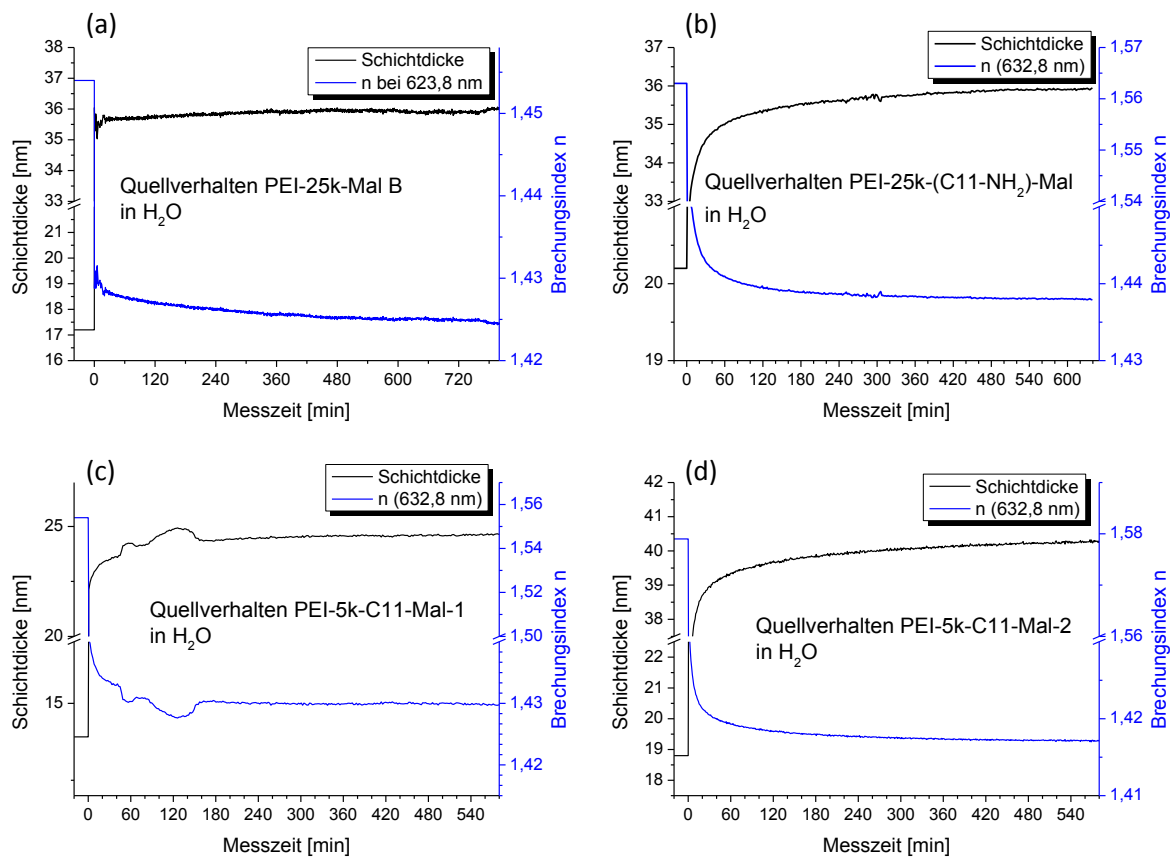


Abbildung 42: Quellverhalten der dünnen Schichten bestehend aus (a) PEI-OS (PEI-25k-Mal B), (b) PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal, (c) PEI-5k-C11-Mal-1 und (d) PEI-5k-C11-Mal-2 in Millipore-Wasser als Lösungsmittel.

Bei dieser Messung weist der modifizierte Si-Wafer eine PEI-25k-Mal B Polymerschichtdicke von 17,2 nm im trockenen Zustand auf. Die Polymerschicht quillt in wässriger Lösung (Millipore-Wasser) auf eine Schichtdicke von 36,2 nm (**Abbildung 42 (a)**). Es zeigt sich eine äußerst schnelle Quellreaktion auf Wasser, bei der die Polymerschichtdicke bereits innerhalb von Sekunden auf einen Wert von 35,0 nm ansteigt. Die weitere Zunahme der Schichtdicke ist im Verlauf der nächsten 10 Stunden im Vergleich zu dem Anstieg innerhalb der ersten Sekunden nur minimal. Das Quellverhalten der PEI-25k-Mal B Schicht kann als äußerst schnell und stabil betrachtet werden. Die Zunahme der Schichtdicke ist relativ groß.

Das Quellverhalten zeigt für die PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal-Schicht eine schnelle Reaktion (**Abbildung 42 (b)**). Von einer Schichtdicke im trockenen Zustand von 18,7 nm, quillt diese auf fast 36,0 nm an. Der Quellprozess ist zu Beginn vergleichsweise schnell. Dieses Verhalten flacht nach drei Stunden allerdings stark ab und ein langsames weiteres Quellen folgt, das nach 11 Stunden noch nicht auf einem konstanten Niveau angelangt ist. Im Vergleich zu der sehr viel hydrophileren PEI-OS-Schicht kommt es zu einem langsameren Quellprozess.

Ein ähnliches Verhalten kann für die Polymerschichten aus PEI-5k-C11-Mal-1 und PEI-5k-C11-Mal-2 gefunden werden (**Abbildung 42 (c) und (d)**). Bei diesen Kern-Schale-Architekturen ist die Maltose nicht direkt an den Polymerkern angebunden, sondern die Aminogruppen der Spacer-Enden wurden hauptsächlich maltosyliert. Es wurden zwei unterschiedliche Architekturen hergestellt, die sich in der Modifizierungen mit Maltose unterscheiden. Bei PEI-5k-C11-Mal-1 wurde bei der Maltosylierung ein hoher Überschuss an Maltose zugegeben, sodass nahezu jede Spacer-Einheit maltosyliert wurde und teilweise der PEI-Kern. Bei PEI-5k-C11-Mal-2 wurde bei der Maltosylierung weniger Maltose an die Spacer-Enden und den PEI-Kern angebunden (55 Mal-Einheiten bei Mal-1 und 38 Mal-Einheiten bei Mal-2). Bei einem Vergleich der Schichteigenschaften zeigt die Polymerschicht mit PEI-5k-C11-Mal-2 eine größere Schichtdicke von 18,8 nm in trockenem Zustand im Vergleich zu 13,9 nm bei der PEI-5k-C11-Mal-1-Schicht. Weiterhin findet bei der PEI-5k-C11-Mal-2-Schicht ein stärkeres Quellverhalten auf 40,4 nm als bei der PEI-5k-C11-Mal-1-Schicht statt, bei der die Schichtdicke der gequollen Polymerschicht bei 24,5 nm liegt. Aufgrund des stattfindenden Quellprozesses in wässriger Lösung kann vermutet werden, dass der Einfluss der hydrophoben Spacer-Einheiten gering ist. Eine Rückfaltung der Spacer-Einheiten im hydrophilen genutzten Medium könnte stattfinden, zeigt jedoch nur einen marginalen Einfluss.

4.3.2 Quellverhalten in Analytlösungen

Neben der Untersuchung des Quellverhaltens in wässrigen Lösungen wurde ebenfalls das Quellverhalten in Analytlösungen untersucht. Hierfür wurden PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Schichten exemplarisch auf ihre Stabilität gegenüber den jeweiligen Analytlösungen untersucht. Nach einer Quellung in Millipore-Wasser wird dieses entnommen, die Analytlösung zugegeben und die *in-situ*-Messung gestartet. Eine Messung des Quellverhaltens mit Analyt findet über einen längeren Zeitraum bei 25 °C statt. Zum Abschluss wird der Si-Wafer mit der Polymerschicht mit Wasser extrahiert und erneut vermessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in **Tabelle 11** zusammengefasst.

Bei der Wechselwirkungsuntersuchung mit B₂ kann eine deutliche Zunahme der Polymerschichtdicke von 17,8 nm auf durchschnittlich 55,6 nm beobachtet werden (**Abbildung 43 (a)**). Im Vergleich zu dem Quellverhalten in reinem Wasser (von 18,7 nm auf 36,0 nm), scheint die Polymerschicht in Vitaminlösung stärker zu quellen. Nach mehrmaliger Extraktion in Millipore-Wasser wird die trockene Polymerschicht erneut vermessen und es kann eine Schichtdicke von 17,2 nm ermittelt werden. Diese Dicke entspricht nahezu der ursprünglichen Schichtdicke wie vor der Interaktion mit der Vitaminlösung.

Bei der Interaktionsstudie mit ATP kann durch die Zugabe von ATP zu einer vorgequollenen PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal-Schicht eine weitere Quellung beobachtet werden (**Ab-**

Tabelle 11: Übersicht der Schichtdicken der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal-Schichten in trockenem Zustand, bei Interaktion mit Analytlösung und erneut in einem trockenem Zustand nach der Interaktion und Extraktion.

Analyt	Schichtdicke (trocken) [nm]	Schichtdicke in Analyt- lösung [nm]	Schichtdicke nach der Interaktion (trocken) [nm]
Ohne Analyt	18,7	36,0	18,6
B ₂	17,8	55,6	17,2
ATP	20,5	42,8	19,1
Vitamin C	18,5	41,0	7,0
Folsäure	21,0	60,0	< 60,0*
Tocopherol	17,4	19,0	17,0
K ₁	12,4	17,5	16,0

* inhomogene Schicht

bildung 43 (b)), wodurch die Polymerschichtdicke auf im Mittel 42,8 nm ansteigt. Die Quellung in ATP-Lösung läuft sehr schnell und stabil ab.

Die Quellung der Polymerschicht in einer Lösung von Vitamin C (**Abbildung 43 (c)**) zeigt zunächst ein ähnliches Verhalten wie in reinem Millipore-Wasser. Die Polymerschicht erreicht eine Maximaldicke von 41,0 nm. Ab 300 Minuten ist ein erneuter Anstieg der Schichtdicke zu erkennen. Eine längere Interaktion mit Vitamin C scheint somit zu einer Destabilisierung der Polymerschicht zu führen. Nach dem Trocknen des Wafers wurde die Schichtdicke des Polymerfilms erneut bestimmt. Diese hat einen Mittelwert von nur noch 7,0 nm im Vergleich zu 18,5 nm vor der Interaktion mit Vitamin C. Nach einer erneuten Extraktion wird eine weitere Abnahme der Polymerschichtdicke auf 4,6 nm gemessen. Diese deutliche Verringerung der Schichtdicke zeigt, dass die Ascorbinsäure die Polymerschicht destabilisiert. Dieser Effekt könnte durch die Acidität der Ascorbinsäure zurückzuführen sein, die in den verwendeten wässrigen Lösungen einen pH-Wert von 3,5 aufweist. Dieser pH-Bereich scheint ausreichend zu sein, um eine Esterspaltung zu bewirken. Die Vernetzung wird somit destabilisiert, was einen Abbau der Polymerschicht zur Folge hat.

Bei der Interaktion mit Folsäure nimmt die Oberflächenrauigkeit deutlich zu, wobei es zu einer Ablagerung der Folsäure auf dem Polymerfilm kommt. Die Polymerschicht weist im trockenen Zustand eine Dicke von 21,0 nm auf und steigt in Folsäure-Lösung auf über 60,0 nm an (**Abbildung 43 (d)**). In Folge der Ablagerung der Folsäure erhöht sich die Inhomogenität der Schicht signifikant. Kurze Extraktionen mit Millipore-Wasser und Ethanol verändern diese Schichtdicke nicht und die Folsäure kann nicht abgewaschen werden. Es können weiterhin Schichtdicken von über 60,0 nm bei der trockenen Polymerschichten gemessen werden. Erst eine längere Extraktion in Millipore-Wasser (< 20 Stunden) löst sich die Folsäure-Schicht vollständig von der Polymerschicht ab.

Vorhergehende Versuche die Wechselwirkungen der Kern-Schale-Architekturen mit hydrophoben Vitaminen zu untersuchen, erwiesen sich als äußerst schwierig. Mittels Ultrafiltration konnten die Wechselwirkungen nicht untersucht werden, da bei der UV/Vis-Detektion eine Änderung der Maxima zu erkennen war (*Shift* der Maxima). Die Versuchsbedingungen der

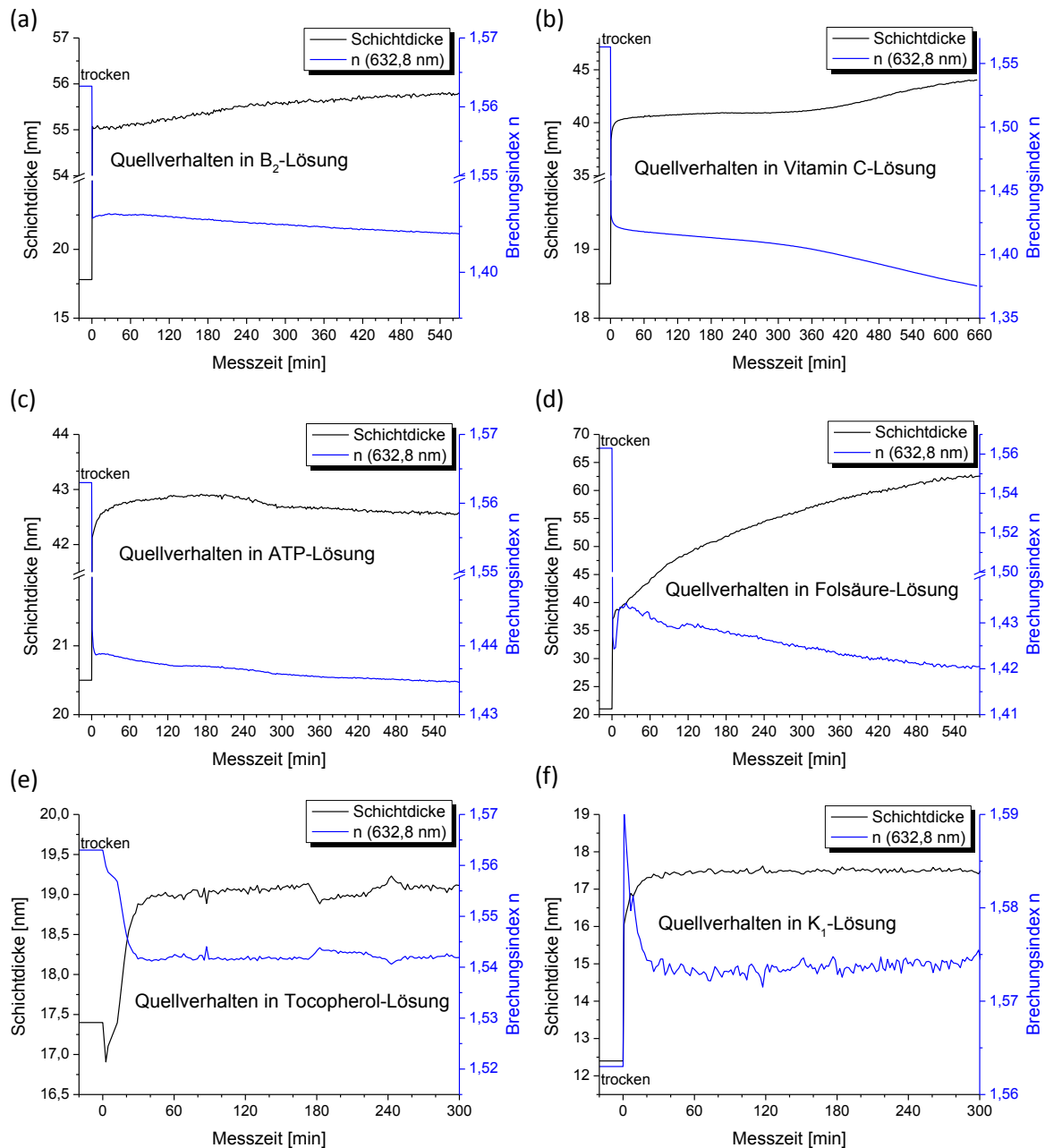


Abbildung 43: Untersuchung des Quellverhaltens der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal-Schicht in wässrigen Lösungen von B₂ (a), ATP (b), Vitamin C (c) und Folsäure (d). Das Quellverhalten in Tocopherol- und K₁-Lösung mit Butanol als Lösungsmittel ist in (e) und (f) gezeigt.

Ultrafiltration mit einem Separationsdruck von 5 bar könnten zu einem Zerfall der Vitamine führen. Eine Auswertung und Bestimmung der Konzentration im Filtrat mittels UV/Vis-Spektroskopie ist aufgrund dieses Verhaltens nicht möglich. Das Interaktionsverhalten einiger ausgewählter Beispiele mit den Polymerschichten soll jedoch im Folgenden mit Hilfe der Ellipsometrie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

Wird Butanol als Lösungsmittel eingesetzt, findet eine geringere Quellung als in wässrigen Lösungen statt (Quellung in: Wasser = 35–40 nm; Butanol = 20 nm). Diese Quellung ist schnell und reversibel. Eine Quellung mit Vitamin-Lösung zeigt eine geringere Quellung der Polymerschicht im Vergleich zu reinem Butanol. Diese Quellung ist schnell auf einem konstanten

Niveau. Als Analyten wurden Tocopherol und K_1 verwendet (siehe **Abbildung 41**).

Sowohl für Tocopherol als auch für K_1 findet eine geringe Quellung statt (**Abbildung 43 (e) und (f)**). Für Tocopherol steigt die Schichtdicke von 17,4 nm auf maximal 19,0 nm an. Nach der Interaktion mit der Tocopherol-Lösung besitzt die trockene Polymerschicht eine Dicke von 17,0 nm. Bei Quellung in einer K_1 -Lösung steigt die Schichtdicke von 12,4 nm in einem trockenen Zustand auf 17,5 nm. Die extrahierte, trockene Schichtdicke beträgt nach der Interaktion mit K_1 16,0 nm. Dies deutet auf stabilere Interaktionen hin, die durch die Extraktion nicht vollständig gelöst wurden.

4.3.3 Interaktion der Polymerschichten mit Analytlösungen

Nachdem überprüft wurde, wie sich die Polymerschichten in reinem Millipore-Wasser und in Analytlösungen verhalten, wurden Interaktionsuntersuchungen der Wechselwirkungen und deren Einfluss auf die Schichtcharakteristika durchgeführt.

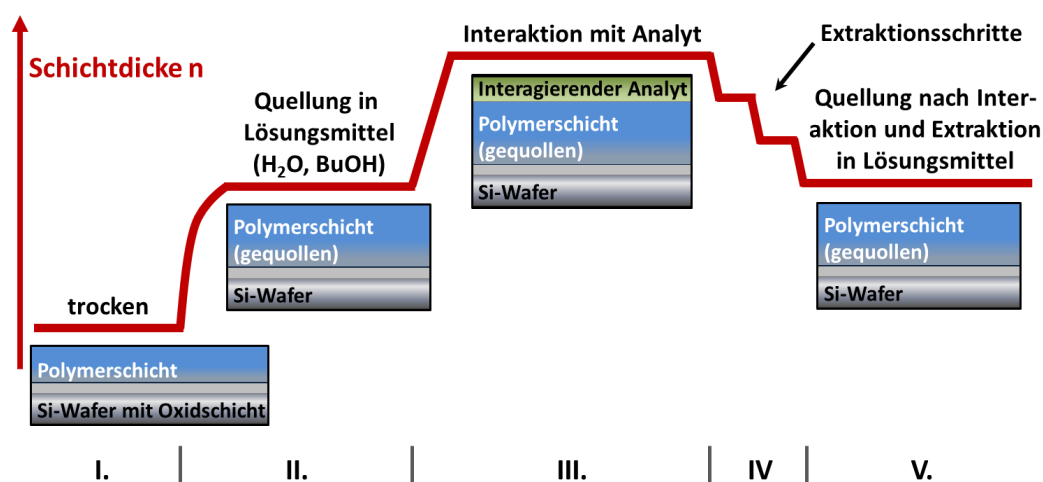


Abbildung 44: Schematischer Ablauf der Interaktionsuntersuchungen in Abhängigkeit von der Schichtdickenänderung vor (I.), während der Quellung im Lösungsmittel (II.), bei Zugabe des Analyten (III.), während der Extraktion (IV.) und nach der Untersuchung in einem trockenen Zustand (V.).

Hierfür werden die Schichtcharakteristika mit denen in einem trockenem Zustand (**Abbildung 44 I.**) und während einer Quellung in Millipore-Wasser untersucht (**Abbildung 44 II.**). Anschließend wird eine definierte Konzentration an Analytlösung in der Messzelle eingestellt und das Verhalten der Polymerschicht *in-situ* gemessen (**Abbildung 44 III.**). Nach Einstellung stabiler Schichtcharakteristika (Delta- und Psi-Werte), wurde der Wafer mit Wasser mehrmals gespült (**Abbildung 44 IV.**). Damit sollte untersucht werden, ob der Analyt eine permanente Änderung der Schichteigenschaften bewirkt oder die Interaktionen reversibel sind. Im Vergleich zu den vorhergehenden Untersuchungen bietet diese Vorgehensweise den Vorteil immer exakt den gleichen Messpunkt zu haben. Einflüsse durch Inhomogenitäten innerhalb einer Schicht oder durch die Interaktion mit den Analyten können somit ausgeschlossen werden. In **Tabelle 12** ist eine Übersicht der Änderungen der Schichtdicken gegeben.

Tabelle 12: Übersicht der Schichtdickenänderungen der Polymerschichten vor, während und nach der *in-situ*-Messung mit Analytlösungen.

Polymermodifizierung des Si-Wafers	Analyt	trockene Polymerschichtdicke [nm]	Schichtdicke in H ₂ O [nm]	Schichtdicke in Analytlösung [nm]	Schichtdicke nach Extraktion (in H ₂ O) [nm]
PEI-25k-Mal B	B ₁	20,2	41,6	48,0	43,5
	B ₂	18,6	43,8	43,9	42,2
	B ₃	18,2	35,0	38,2	35,9
	B ₆	18,3	38,2	43,6	41,0
	Estradiol*	17,4	36,8	39,6	36,8
	Vit. C	18,8	40,4	44,7	39,9
	ATP	17,8	40,0	39,8	38,5
PEI-25k-(C11-NH ₂)-Mal B	ATP	20,5	29,6	31,3	30,2
	Vit. C	18,5	30,8	34,5	31,0
	Tocopherol**	17,4	30,8	35,6	31,0
PEI-5k-C11-Mal-1	ATP	19,8	35,0	35,6	35,8
	Vit. C	13,2	19,6	20,5	20,4
PEI-5k-C11-Mal-2	ATP	15,3	44,2	43,4	44,1
	Vit. C	16,6	45,8	46,4	45,5

* Estradiol-3-Sulfat-Salz

** Butanol als Lösungsmittel

4.3.3.1 Interaktionsuntersuchungen mit PEI-25k-Mal B Schichten und wasserlöslichen Analyten

Die Änderung der Schichtdicke von 41,6 nm in wässriger Lösung auf 48,0 nm nach Zugabe des Thiamins zeigt eine Reaktion auf den Analyten (**Abbildung 45 (a)**). Die Interaktion der Polymerschicht mit dem Thiamin bewirkt eine zeitlich konstante Änderung der Schichtdicke, die nach 5-maliger Extraktion mit Wasser nicht auf den Ursprungswert zurückfällt. Die Wechselwirkung der Schicht mit Thiamin ist somit auch nach mehrmaliger Extraktion vorhanden, was auf stärkere Interaktionen schließen lässt. Warenda *et al.*^[92] haben Zeta-Potential Untersuchungen sowie XPS-Messungen von PEI-5k-Mal A Schichten durchgeführt, bei denen im neutralen pH-Bereich eine negative Oberflächenladungen festgestellt werden konnte. Diese durch die Citronensäure verursachte negative Ladung kann bei den genutzten Versuchsbedingungen mit dem positiv geladenen Thiamin über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren und die Änderung der Schichtcharakteristika verursachen.

Bei dem Vitamin Riboflavin, das in wässriger Lösung neutral bis schwach negativ geladen vorliegt, konnte keine signifikante Reaktion der Polymerschicht auf die Zugabe des Analyten festgestellt werden (**Abbildung 45 (b)**). Weder die Schichtdicke noch der Brechungsindex ändern sich bedeutsam. Die Polymerschicht scheint somit keinerlei bzw. nur geringe Wechselwirkungen mit dem Vitamin einzugehen.

Durch Zugabe der Säure Niacin wird der pH-Wert der wässrigen Lösung erniedrigt, wodurch die Oberflächenladung der Polymerschicht leicht positiv wird. Das negativ geladene Niacin sollte somit elektrostatisch mit der Polymerschicht interagieren können und zu einer Änderung der Schichtdicke sowie des Brechungsindex führen. Bei der Messung der Schichtcharakteristika (**Abbildung 45 (c)**) kann eine solche Änderung schwach beobachtet werden. Durch

die Zugabe von Niacin konnte eine geringfügige Zunahme der mittleren Schichtdicke von 3 nm festgestellt werden. Die Werte für die Schichtdicke sowie für den Brechungsindex sind während der Messung nicht konstant und variieren zum Teil stark. Dies konnte auf dynamische Oberflächeninteraktionen hindeuten, bei denen eine Interaktion mit der Polymerschicht stattfindet und unmittelbar wieder gelöst wird. Nach mehrmaliger Extraktion konnte die Ausgangsschichtdicke in wässriger Lösung wieder erhalten werden. Dies zeigt, dass die Interaktion mit Niacin reversibel ist.

Die Untersuchung der PEI-25k-Mal B Schicht mit dem Vitamin B₆, zeigt ein ähnliches Verhalten wie bereits bei B₃ beobachtet wurde. Durch Zugabe des Pyridoxins kann eine weitere durchschnittliche Schichtdickenzunahme um 5 nm beobachtet werden (**Abbildung 45 (d)**). Die Reaktion der Polymerschicht auf das Vitamin ist erneut sehr schnell und konstant. Nach mehrmaliger Extraktion kann die Anfangsschichtdicke in wässriger Lösung nicht erreicht werden. Die Interaktion mit dem zwitterionischen B₆ scheint in diesem Fall stärker zu sein als die mit B₃. Das Zusammenspiel von negativer und positiver Ladungen im Analyten scheinen hier eine Interaktion zu begünstigen, wodurch stärkere Wechselwirkungen resultieren.

Zusätzlich wurde ein weiteres Estradiol-Derivat getestet. Im Gegensatz zu dem sonst verwendeten Estradiol Glucuronid mit einer Carboxyl-Funktionalität, wurde für die Schichtversuche das Estradiol-3-Sulfat-Salz genutzt (**Abbildung 45 e**). Aufgrund der Zugabe des Estradiol-Derivates wird der pH-Wert herabgesetzt und die Polymerschicht trägt eine positive Ladung. Mit dieser sollte die negative Ladung des Derivates gut interagieren können. Bei der Messung der Schichtdicke kann jedoch nur eine geringe Zunahme der Schichtdicke um im Mittel 3 nm festgestellt werden (**Abbildung 45 e**). Durch Extraktion kann eine Verringerung der Schichtdicke beobachtet werden. Ein Teil des interagierenden Estradiol-Derivats wird somit wieder abgelöst. Nach erneuter Extraktion kann eine weitere Verringerung der Schichtdicke festgestellt werden, allerdings ist dieses nicht so ausgeprägt, wie das Erste. Nach kurzer Zeit kommt es zu einer erneuten Zunahme der Schichtdicke, was vermutlich durch erneut interagierendes Estradiol resultiert. Eine Oberflächen-induzierte Interaktion des Estradiol-Derivates mit der Polymerschicht kann vermutet werden.

Als weiterer Beispielanalyt wurde Vitamin C getestet, das in wässrigen Lösungen und unter den gegebenen Bedingungen als Ascorbat-Anion vorliegt. Bei der *in-situ*-Untersuchung der Schichtdicke und des Brechungsindex kann eine Reaktion der Polymerschicht auf die Zugabe der Ascorbinsäure beobachtet werden (**Abbildung 45 (f)**). Nach Zugabe der Ascorbinsäure findet eine Zunahme der vorgequollenen Schichtdicke um 4 nm statt. Durch mehrmalige Extraktion kann der ursprüngliche Zustand der Polymerschicht in Millipore-Wasser wieder erhalten werden. Die Interaktion mit der Ascorbinsäure ist somit schnell und reversibel.

Das unter den genutzten Bedingungen negativ geladene Adenosintriphosphat (ATP) sollte ebenfalls über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Polymerschicht interagieren. Nach Zugabe des ATPs kommt es jedoch zu keiner signifikanten Änderung der Schichtdicke (**Abbildung 45 (g)**). Ein geringer Abfall der Schichtdicke kann auf eine Interaktion des ATP mit der Polymerschicht deuten. Diese Interaktion mit ATP fällt jedoch wesentlich geringer aus wie die literaturbekannte Interaktion einer ähnlichen PEI-OS-Schicht, die jedoch mit Poly(ethen-alt-maleinsäureanhydrid) (PEMA) vernetzt wurde und eine höhere Schichtdicke aufweist.^[176] Bei dieser PEI-OS-PEMA-Schicht findet eine Reduzierung der Schichtdicke von

20 bis 40 nm nach Zugabe von ATP statt,^[176] wohingegen bei der PEI-OS-Schicht vernetzt mit Citronensäure nur eine Reduzierung der Schichtdicke von ca. 1 nm zu beobachten ist.

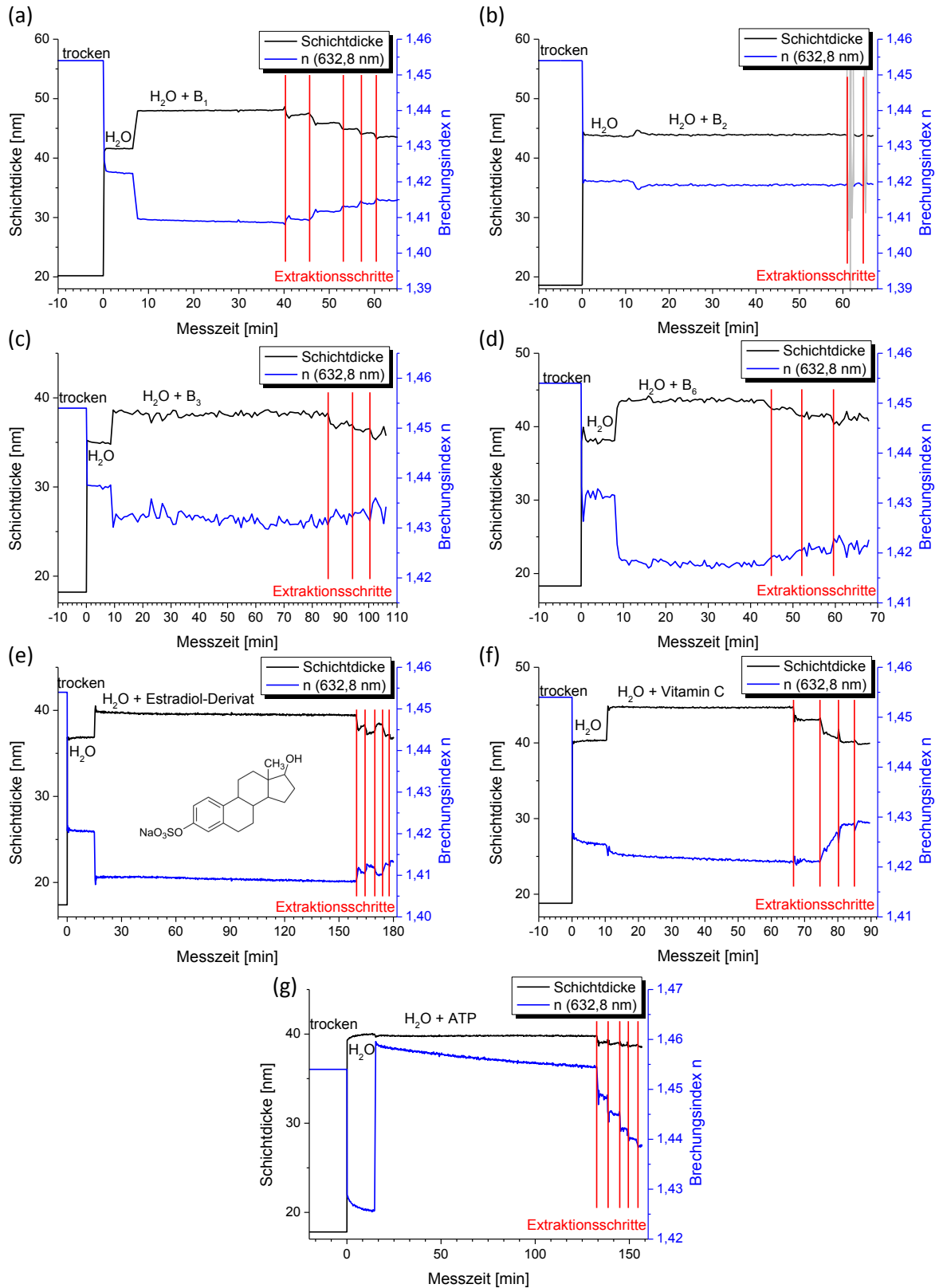


Abbildung 45: *In-situ*-Messungen der PEI-25k-Mal B Schicht mit B₁ (a), B₂ (b), B₃ (c), B₆ (d), einem Estradiol-Derivat (e), Vitamin C (f) und ATP (g) in Wasser mit Änderung der Schichtdicke und des Brechungsindex.

Zusammenfassend kann eine äußerst schnelle Reaktion der PEI-25k-Mal B Polymerfilme auf wässrige Lösungen mit und ohne Analyten festgestellt werden. Es liegt zumeist eine Oberflächen-induzierte Wechselwirkung mit wasserlöslichen Analyten vor, bei der in den meisten Fällen eine Zunahme der Schichtdicke um einige Nanometer verzeichnet werden kann. Diese Interaktion ist bei mehrmaliger Extraktion reversibel. Die Interaktionen mit der Polymerschicht werden überwiegend durch die vorliegenden Ladungsverhältnisse bestimmt. Die durch den Vernetzer verursachte leicht anionische Ladung der Schicht führt im Fall von kationisch geladenen Analyten wie Thiamin zu einer guten Interaktion. Bei den verwendeten negativ geladenen Analyten, wie B₃ oder Vitamin C, wird die Polymerschicht zum Teil durch die Zugabe der Analytlösungen protoniert. Eine starke Interaktion mit einer großen Änderung der Schichtcharakteristika ist jedoch nicht zu beobachten. Die Interaktionen und die damit verbundenen Änderungen der Schichtcharakteristika werden somit durch die Analyten und die Ladungen der Polymerschicht maßgeblich beeinflusst. Dennoch zeigt die PEI-25k-Mal B Schicht in den *in-situ*-Versuchen Eigenschaften, die es als Oberflächenmodifikation in einer Trennsäule attraktiv erscheinen lassen. Die schnelle Reaktion der Schicht auf Analyten könnten Vorteile für den Einsatz als Oberflächenmodifizierung in Trennsäulen bieten. Dennoch sind die durchgeführten Experimente ohne äußere Drücke durchgeführt worden. Die Stabilität der Interaktionen in Anwesenheit von auch in Trennsäulen üblichen Drücken und Scherkräften sollte in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden. Die Änderung der Brechungsindices der Polymerschichten durch Interaktion mit Analyten könnte darüber hinaus für eine zusätzliche *in-situ*-Detektion während der Trennung genutzt werden.

4.3.3.2 Interaktionsuntersuchungen mit Schichten der PEI-Spacer-Architekturen

Die Vorgehensweise bei den *in-situ*-Messungen ist analog zu den Messungen bei den PEI-OS-Schichten. Bei den hydrophoberen Kern-Schale-Architekturen mit zum einen einer direkten Maltosylierung des Polymerkerns PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal und zum anderen einer hauptsächlichen Maltosylierung der Aminogruppen der Spacer-Enden (PEI-5k-C11-Mal-1 und PEI-5k-C11-Mal-2) sollte der Einfluss der hydrophoben Alkylketten auf das Interaktionsverhalten näher untersucht werden. Die Strukturen PEI-5k-C11-Mal-1 und PEI-5k-C11-Mal-2 unterscheiden sich darüber hinaus im Grad ihrer Maltosylierung. Bei PEI-5k-C11-Mal-1 liegt ein höherer Gehalt von Maltose als bei PEI-5k-C11-Mal-2 vor. Somit konnte der Einfluss der Maltose näher untersucht werden.

Im Vergleich zu der *in-situ*-Messung mit den Si-Wafern mit einer PEI-25k-Mal B Schicht, bei der die Schichtdicke nach Zugabe von ATP geringfügig abnahm, kann bei der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Schicht eine Zunahme der Schichtdicke beobachtet werden (**Abbildung 46 (a)**). Diese fällt geringfügig ab und erreicht einen stabilen Wert bei 31,0 nm. Durch mehrmalige Extraktion mit Millipore-Wasser kann die Ausgangsschichtdicke der gequollenen Schicht nahezu wieder erreicht werden. Die Interaktion von ATP mit der Polymeroberfläche ist somit nicht sehr stark ausgeprägt.

Die Polymerfilme der Strukturen PEI-5k-C11-Mal-1 und PEI-5k-C11-Mal-2 wurden ebenfalls mit ATP auf Interaktionen hin untersucht (**Abbildung 46 (b) und (c)**). Mit der Polymerschicht aus PEI-5k-C11-Mal-1 können ähnliche Beobachtungen gemacht werden, wie

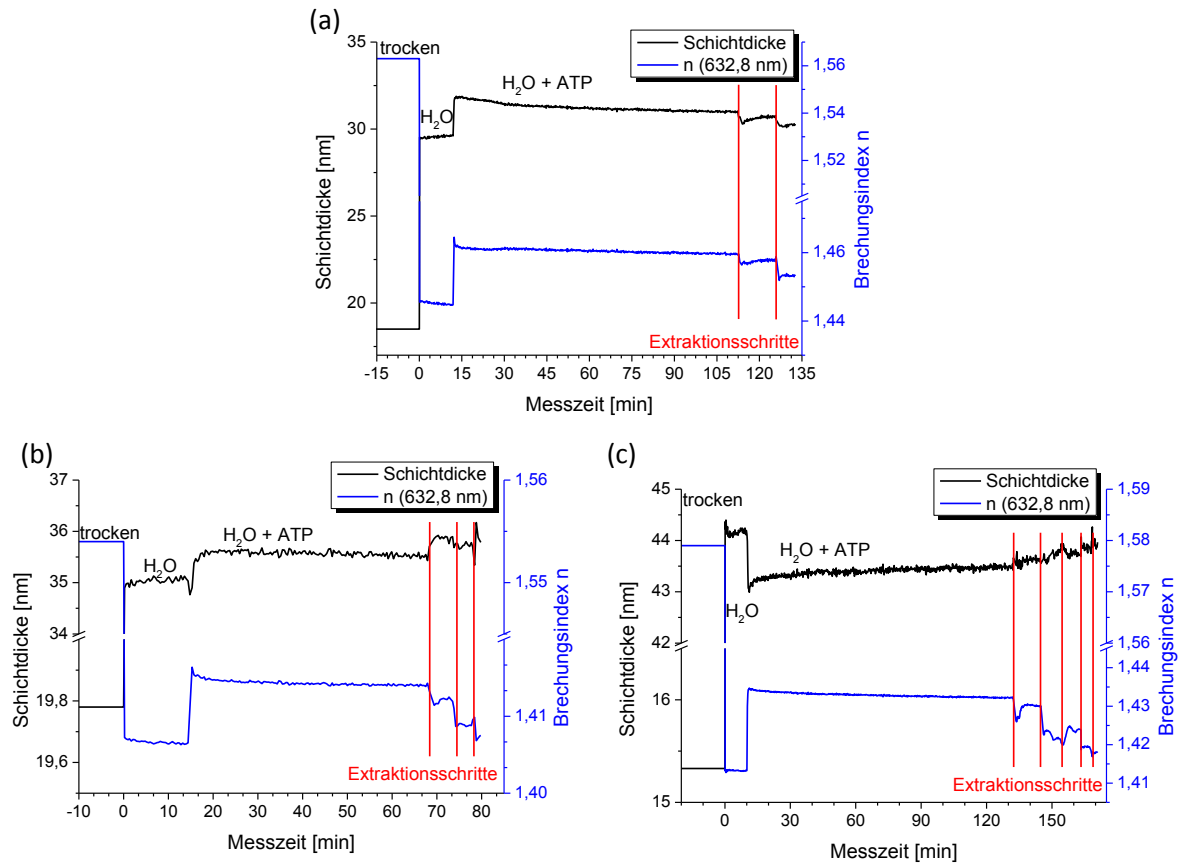


Abbildung 46: *In-situ*-Messungen der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Schicht (a), PEI-5k-C11-Mal-1 Schicht (b) und PEI-5k-C11-Mal-2 Schicht (c) mit ATP mit Änderung der Schichtdicke und des Brechungsindex.

bereits bei der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Schicht erläutert wurden. Die Zunahme der Polymerschichtdicke durch die Zugabe von ATP ist jedoch nur sehr gering. Bei der Polymerschicht mit PEI-5k-C11-Mal-2 findet nach Addition von ATP eine Abnahme der Schichtdicke statt (**Abbildung 46 (c)**). Dieses Verhalten erinnert an die Beobachtungen bei der PEI-OS-Schicht bei Interaktion mit ATP, bei der ebenfalls eine geringe Abnahme der Schichtdicke gemessen werden konnte. Aufgrund von inter- und intramolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen des negativ geladenen ATPs mit der Polymerschicht scheint es zu einer Kompensierung von Ladungen zu kommen, wodurch ein geringfügiges Schrumpfen bzw. Verringerung der Schichtdicke zu beobachten ist. Interessant ist das unterschiedliche Quellverhalten der Strukturen. Bei der Struktur mit einem höheren Maltosegehalt (PEI-5k-C11-Mal-1) führt die Interaktion mit ATP zu einer Zunahme der Schichtdicke. Bei der Struktur mit einem niedrigeren Maltosegehalt (PEI-5k-C11-Mal-2) kann eine Abnahme der Schichtdicke durch die Zugabe von ATP festgestellt werden. Ein Einfluss der Maltoseschalendichte kann somit festgestellt werden. Es kann vermutet werden, dass die offenere Maltoseschale bei der PEI-5k-C11-Mal-2 Schicht eine geringfügig bessere Interaktion zulässt. Bei der dichten Maltoseschale der PEI-5k-C11-Mal-1 Schicht kann keine Interaktion mit dem Inneren der Schicht stattfinden und nur eine Oberflächen-induzierte Wechselwirkung findet statt. Als Folge kann eine minimale Zunahme der Schichtdicke festgestellt werden.

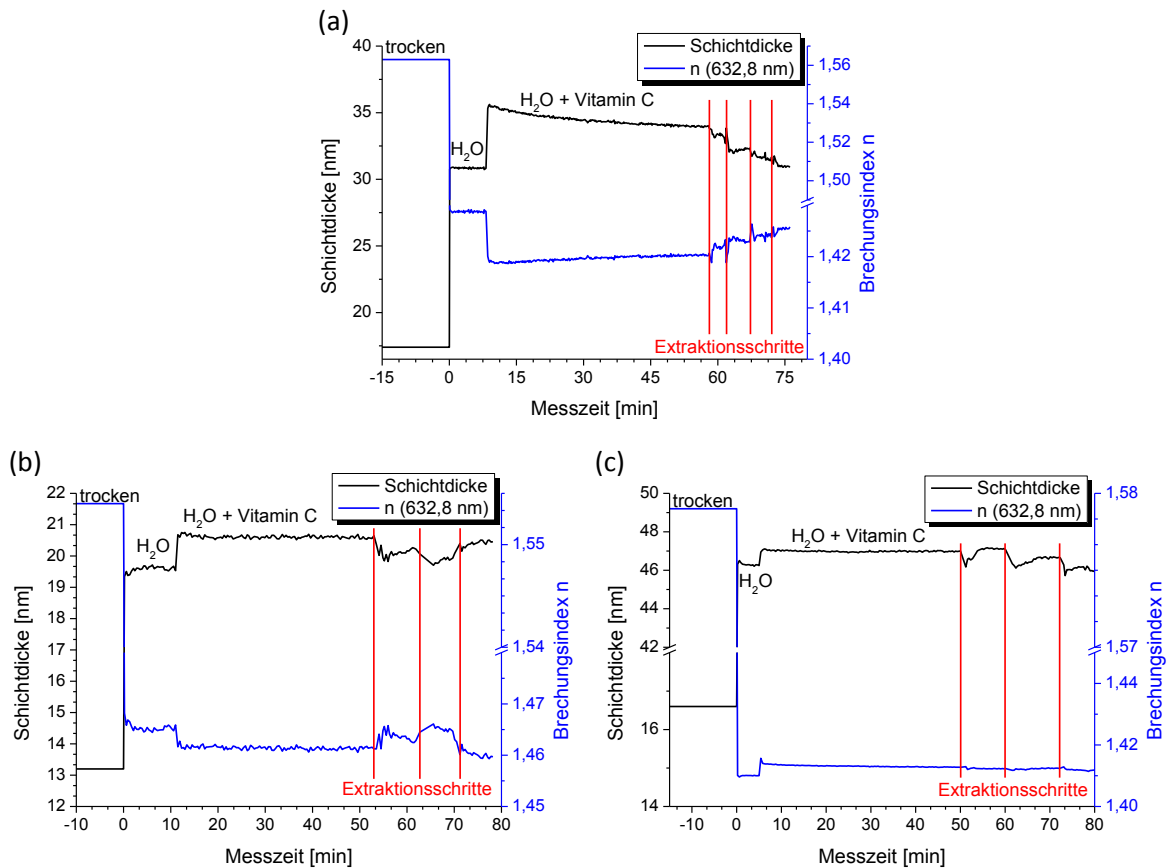


Abbildung 47: *In-situ*-Messungen der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Schicht (a), PEI-5k-C11-Mal-1 Schicht (b) und PEI-5k-C11-Mal-2 Schicht (c) mit Vitamin C mit Änderung der Schichtdicke und des Brechungsindexes.

Vergleichbare Interaktionsstudien wurden ebenfalls mit Vitamin C durchgeführt. Bei den zuvor durchgeführten Quellversuchen in einer Lösung von Vitamin C (**Abbildung 43 (b)**) konnte ein destabilisierender Effekt des Ascorbat-Anions beobachtet werden. Um einen Abbau der Polymerschicht zu verhindern, wird für die *in-situ*-Messung der Interaktion der Polymerschichten mit Vitamin C eine kurzzeitig Exposition gewählt. Die Zunahme der Schichtdicke durch Zugabe von Vitamin C zu den verschiedenen Schichten der PEI-Spacer-Architekturen ist vergleichbar, wie bereits bei der PEI-25k-Mal B Schicht zu beobachten war (**Abbildung 45 (f)**). Ein Ablösen kann während der vergleichsweise kurzen Messzeit nicht festgestellt werden. Die Interaktion scheint mit den Polymerfilmen aus PEI-5k-C11-Mal-1 (**Abbildung 47 (b)**) und PEI-5k-C11-Mal-2 (**Abbildung 47 (c)**) geringfügig stabiler zu sein, da nur bei der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Schicht eine kontinuierliche Abnahme der Schichtdicke zu beobachten ist (**Abbildung 47 (a)**). Durch mehrmalige Extraktion mit Millipore-Wasser kann die ursprüngliche Schichtdicke in reinem Wasser wieder erhalten werden.

Bei der Zugabe von Tocopherol zu einer in Butanol vorgequollenen Polymerschicht kann zunächst eine Zunahme der Schichtdicke um 5 nm gemessen werden (**Abbildung 48**). Diese Zunahme ist jedoch nicht zeitlich stabil und fällt kurzer Zeit wieder auf eine vergleichbare Schichtdicke wie in reinem Butanol. Die Polymerschicht interagiert somit nur schwach und Oberflächen-induziert mit dem lipophilen Vitamin. Aufgrund der kaum stattfindenden Interaktion der PEI-OS-Schicht mit Tocopherol (siehe Anhang **Abbildung 103**) zeigt die Modifi-

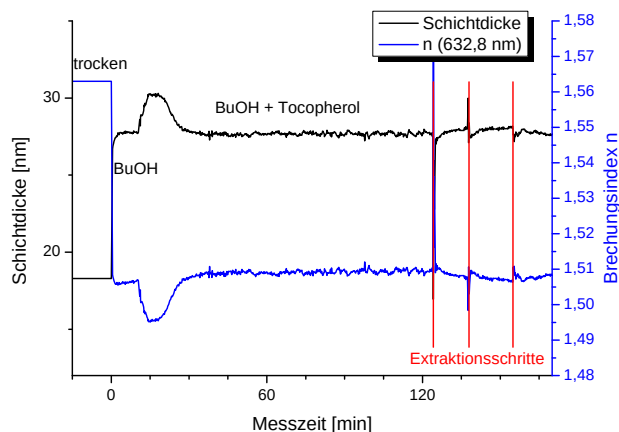


Abbildung 48: *In-situ*-Messungen der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Schicht mit Tocopherol mit Änderung der Schichtdicke und des Brechungsindexes.

zierung mit Spacer-Einheiten die Wechselwirkung mit Tocopherol kurzzeitig zu begünstigen. Hydrophobe Interaktionen zwischen den Alkylketten der Spacer-Einheiten und den lipophilen Tocopherol stellen somit nur schwache, instabile Wechselwirkungen dar. Mehrmaliges Waschen mit Butanol ergibt eine vergleichbare Schichtdicke wie die vorgequollene Polymerschicht.

4.3.4 Untersuchungen der Interaktionen der Polymerfilme mit fluoreszierenden Analyten mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie

Eine weitere Möglichkeit die Interaktion der Analyten mit der Polymeroberfläche zu untersuchen, stellt die konfokale Fluoreszenzmikroskopie dar. Zusätzlich zu den Ellipsometrie-Untersuchungen wurden Fluoreszenzmessungen der Analyten auf der Oberfläche durchgeführt. Aufgrund der Eigenfluoreszenz der Analyten konnten die Interaktionen der Analyten mit der Polymerschicht visualisiert werden. Es wurde ein Vergleich zwischen der Eigenfluoreszenz der Polymerschicht und der Fluoreszenz der Polymerschicht nach Interaktion mit den einzelnen Analyten angestellt. Je stärker die Fluoreszenz der Polymer beschichteten Si-Wafer, die mit Analyten interagiert haben, zunimmt, desto höher sollte die Wechselwirkung sein. Interagiert die Polymerschicht nicht mit dem jeweiligen Analyten sollte die Fluoreszenz unverändert zur reinen Polymerschicht sein. Die modifizierten Si-Wafer wurden für die Untersuchungen für 20 Stunden in die Analytenlösung gelegt. Dies stellt eine längere Exposition dar, als bei den Ellipsometrie-Untersuchungen, bei denen die Interaktionen zumeist über wenige Stunden beobachtet wurden. Anschließend wurden sie gespült und getrocknet, um nicht-spezifische Bindungen ausschließen zu können. Für die Analyten B₁, B₃, B₆, das Estradiol-Derivat und ATP wurden mit einer Konzentration von 3 mg/mL eingesetzt und B₂ sowie Folsäure mit 1,5 mg/mL genutzt. Mit der Software LAS AF Lite ist eine Messung der Fluoreszenz anhand der sogenannten *gray values* möglich. Diese Messung wurde immer in Bezug auf die jeweilige Polymerschicht durchgeführt. Für die Berechnung der *gray values* als Indikator für die Fluoreszenz wurde immer eine einheitliche Messfläche gewählt. Eine quantitative Bestimmung der Interaktion ist mit dieser Methode nicht möglich. Die Fluoreszenzmessungen stellen lediglich

eine weitere Methode dar, die auftretenden Interaktionen optisch zu visualisieren.

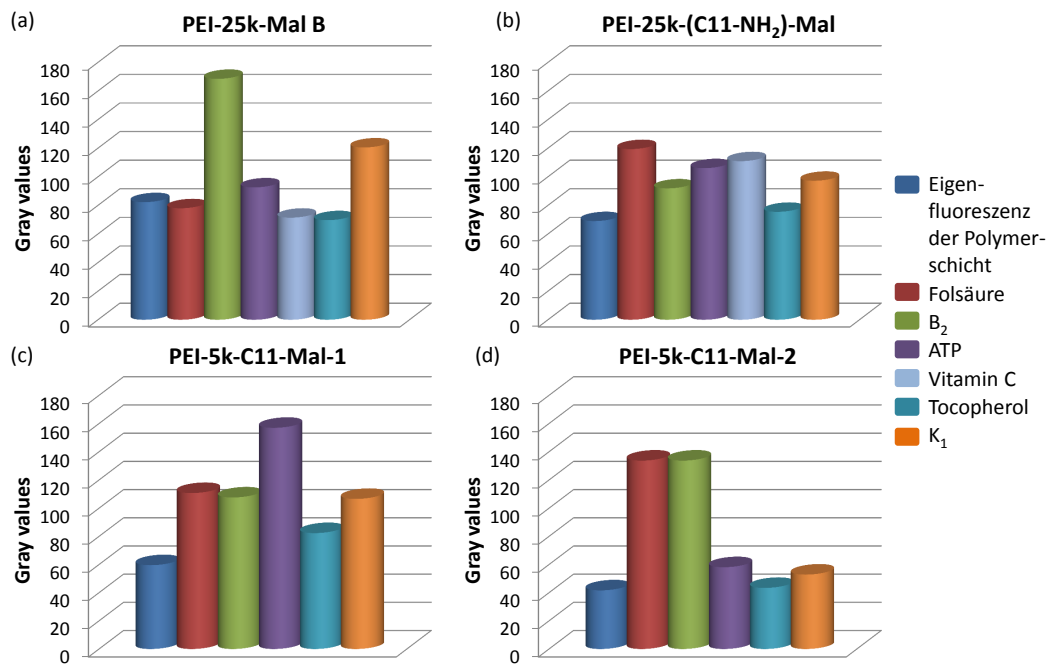


Abbildung 49: Übersicht der Fluoreszenzmessungen der Polymerschichten (PEI-25k-Mal B (a), PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal (b), PEI-5k-C11-Mal-1 (c) und PEI-5k-C11-Mal-2 (d)) mit fluoreszierenden Analyten.

Die Polymerschichten weisen bereits ohne Analyten eine geringe Eigenfluoreszenz auf. Unter Berücksichtigung dieser kann eine Interaktion mit der Polymerschicht mit den verschiedenen Analyten verglichen werden. Im Vergleich zu der Eigenfluoreszenz der PEI-Spacer-Schichten zeigt die PEI-25k-Mal B Schicht die stärkste Eigenfluoreszenz.

Die Eigenfluoreszenz der Folsäure und des Vitamins B₂ ist die stärkste unter den verwendeten Analyten. Eine Zunahme durch Interaktion mit diesen beiden Analyten sollte zu einer gut sichtbaren Erhöhung der Fluoreszenz führen. Für die Folsäure kann bereits optisch eine starke Änderung der Oberfläche beobachtet werden. Dementsprechend kann eine starke Oberflächen-induzierte Interaktion vermutet werden, die auch die Fluoreszenz deutlich erhöht. Mit Ausnahme der PEI-25k-Mal B Schicht kann eine solche Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden. Im Vergleich scheinen die Schichten der hydrophoberen PEI-Spacer-Architekturen allerdings besser mit der Folsäure zu interagieren und eine stärkere Zunahme der Fluoreszenz kann beobachtet werden. Das Vitamin B₂ interagiert mit allen Polymerschichten und es kann eine Erhöhung der Fluoreszenz detektiert werden. Ebenso ist die Fluoreszenz für Vitamin K₁ mit den meisten Polymerflächen erhöht. Da die Eigenfluoreszenz des B₂ und auch des K₁ stärker ist im Vergleich zu den weiteren genutzten Analyten, bedeutet die hohe Fluoreszenz nicht zwangsläufig eine starke Interaktion mit den Polymerschichten. Dennoch kann anhand dieser Messungen eine Interaktion visualisiert werden, die auch nach mehrfacher Extraktion anhält.

Für ATP, Vitamin C und Tocopherol kann bei der PEI-25k-Mal B Schicht keine signifikante Änderung der Fluoreszenz festgestellt werden. Die Eigenfluoreszenz dieser Analyten ist jedoch gering. Die gewählte Methode ist demzufolge für diese Analyten nicht optimal und eine deutliche Änderung kann aufgrund der nur schwachen Fluoreszenz nicht beobachtet werden.

Die Zunahme der Fluoreszenz durch die Interaktion mit ATP ist vor allem bei den PEI-Spacer-Architekturen deutlich. Mit Ausnahme der PEI-5k-C11-Mal-2 Schicht kann eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz detektiert werden. Es kann vermutet werden, dass die ATP-Lösung den pH-Wert soweit erniedrigt, dass die durch den Vernetzer hervorgerufene leicht negative Ladung der Polymerschicht kompensiert wird. Als Folge kann das negativ geladene ATP mit der Oberfläche der Polymerschichten über elektrostatische Interaktionen wechselwirken.

Weiterhin scheint die Interaktion von Vitamin C mit der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Schicht ausgeprägter zu sein, als die Wechselwirkung mit der PEI-25k-Mal B Schicht. Die Erhöhung des hydrophoben Anteils durch die Anbindung von Spacer-Einheiten scheint die Interaktion mit Vitamin C zu begünstigen.

Die Interaktion der lipophilen Vitamine Tocopherol und K₁ kann bei den hydrophoberen Polymerschichten nicht verstärkt nachgewiesen werden. Die Interaktion mit Tocopherol ist für die PEI-Spacer-Architekturen nur gering. Bei der PEI-5k-C11-Mal-2 Schicht mit dem stärksten hydrophoben Charakter nimmt die Fluoreszenz kaum zu. Die Interaktion über nicht-kovalente, schwache Wechselwirkungen, wie hydrophob/ hydrophobe Wechselwirkungen, erscheint somit nicht sehr ausgeprägt.

Zusammenfassend kann durch die Fluoreszenzmessungen eine Interaktion der Analyten mit den Polymerschichten in fast allen Fällen beobachtet werden. Dennoch ist kein einheitlicher Trend zu erkennen und es können sehr unterschiedliche Beobachtungen gemacht werden, die überwiegend durch die Eigenschaften der Analyten und die Ladung der Polymerschicht bestimmt werden. Die zuvor in den Ultrafiltrationsergebnissen festgestellten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Analyten und den Kern-Schale-Architekturen können in den Schichtexperimenten nur bedingt nachgewiesen werden. Die durch den Vernetzer hervorgerufene Ladungsänderung erschwert die Ausbildung stabiler, elektrostatischer Interaktionen somit deutlich.

4.3.5 Zusammenfassung der Experimente mit Kern-Schale-Architekturen in dünnen Schichten

Die Untersuchung der Polymere mit Analyten in dünnen Schichten zeigt zwar keine stark ausgeprägten Änderungen der Schichteigenschaften, dennoch kann ein Einfluss der Analyten auf die Polymerschichteigenschaften mittels Ellipsometrie- und Fluoreszenzmessungen nachgewiesen werden. Die meisten Interaktionen sind innerhalb der ersten Minuten etabliert. Darüber hinaus sind diese Interaktionen größtenteils reversibel. Die Schichten zeigen ein schnelles und deutliches Quellverhalten in wässriger Lösung, das bei einer möglichen Modifizierung einer Trennsäule berücksichtigt werden sollte, um ein Verstopfen zu verhindern.

Die auftretenden Interaktionen finden überwiegend an der Oberfläche der Polymerschicht statt (**Abbildung 50 (a)**). Eine Interaktion, bei der die Analyten in der Polymerschicht eindringen und im Inneren der Polymerschicht interagieren, konnte nicht explizit nachgewiesen werden (**Abbildung 50 (b)**).

Bei Vitamin C, Folsäure und ATP sollten weitere Experimente ihre destabilisierende Wirkung auf die Polymerschicht abklären, um einen ungewollten Abbau in einer Trennsäule zu

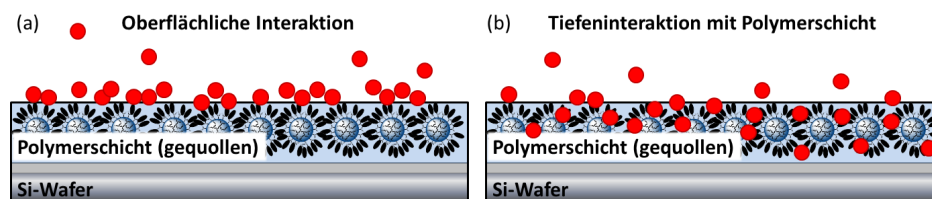


Abbildung 50: Verdeutlichung der auftretenden Wechselwirkungen mit der Polymerschicht, die entweder mit der Oberfläche der Polymerschicht (a) oder in der Polymerschicht (b) stattfinden.

verhindern. Dieses Verhalten tritt jedoch meist erst nach mehreren Stunden auf, sodass es bei kurzen Messzeiten nur einen marginalen Einfluss hat. Untersuchungen mit vielen Wiederholungen mit kurzzeitiger Exposition, wie sie bei einer Auftrennung von Analytgemischen auftritt, sollten näher getestet werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die untersuchten Polymerschichten interessante Eigenschaften, wie eine sehr schnelle Quellung bei Interaktion mit diversen bioaktiven Analyten, zeigen. Weitere Untersuchungen in Puffer und in anderen pH-Bereichen sollten folgen, um zum einen die Stabilität der Polymerschichten abzuklären und die auftretenden Wechselwirkungen optimal nutzen zu können.

Weiterhin sollte der Einfluss des Vernetzers (Citronensäure) bzw. der durch diesen hervorgerufenen Ladungszustand der Polymerschicht näher untersucht werden. Da die stabilsten Interaktionen aufgrund auf elektrostatischen Interaktionen gebildet werden, sollte die Ladung der Polymerschicht eindeutig geklärt werden. Mit diesem Wissen können Polymerfilme effektiver eingesetzt und die Ausbildung von elektrostatische Wechselwirkungen besser ausgenutzt werden.

4.4 Anwendung der Kern-Schale-Architekturen in der Chromatographie

4.4.1 Anwendung von Kern-Schale-Architekturen in der Dünnschicht-Chromatographie

Aufgrund der simplen und kostengünstigen Anwendung der Dünnschicht-Chromatographie wurden die diversen PEI-OS-, PEI-Spacer- und PEI-FA-Architekturen (**Abbildung 51**) für eine Modifizierung der stationären Phase in der Dünnschicht-Chromatographie eingesetzt.

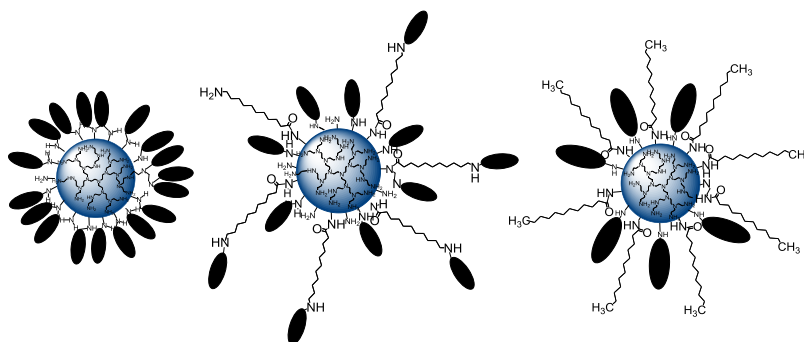


Abbildung 51: Übersicht der verwendeten Kern-Schale-Architekturen mit denen TLC-Platten modifiziert wurden. Abgebildet sind PEI-OS-, PEI-Spacer- und PEI-FA-Architekturen (von links).

Als Analyten wurden zunächst wasserlösliche Vitamine in wässrigen Lösungen mit Konzentrationen verwendet, in denen die mobile Phase nicht überladen ist und eine effektive Trennung stattfinden kann (**Tabelle 13**). Weiterhin wurden die Konzentrationen so gewählt, dass nahezu ideale Spots für die Analyten auftreten und Peakverbreiterung (*tailing*) minimiert wird. Zudem wurden Konzentrationen verwendet, bei denen eine gute UV-Detektion der Vitamine ermöglicht wurde.

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Konzentration der Vitaminproben.

Einwaagen Analyten [mg/mL]					
B ₁	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂	Vit. C
5,0	0,2	3,0	8,0	1,0	5,0

In späteren Versuchen wurden zusätzlich lipophile Vitamine getestet (vgl. Kapitel 4.4.1.3). Als Referenzwert wurde eine unmodifizierte, vergleichbare TLC-Platte unter gleichen Bedingungen entwickelt und ausgewertet. Die Auswertung des R_f -Wertes und der Effizienz in Form der Anzahl an theoretischen Böden N für alle Analyten dienten als Vergleichsparameter. Ausgewertet wurden die getrockneten Platten mittels einer Videodensitometer-Software der Firma Sorbfil.

In der Säulenchromatographie müssen alle Komponenten unabhängig von ihren Retentionszeiten die gleiche Distanz durch die Säule zurücklegen. Im Gegensatz dazu treten in der TLC unterschiedliche Laufhöhen auf. Die Trennleistung wird daher in Abhängigkeit zu der verwendeten mobilen Phase und deren Laufeigenschaften berechnet. Für einen symmetrischen, idealen Gauss-Peak kann die Trennleistung N (Anzahl der theoretischen Böden) mit

der Formel 7 berechnet werden. Dieser Wert gibt einen theoretischen Schätzwert an, da die Separation nicht an der Laufmittelfront des Lösungsmittels stattfindet.

Für die Berechnung des R_f -Wertes und der Effizienz werden die **Formeln 6 und 7** genutzt. Die Verdeutlichung der jeweiligen Parameter ist in **Abbildung 52** erklärt.

$$R_f = \frac{z_s}{(z_f - z_0)} \quad (6)$$

$$N = \frac{1}{R_f} \cdot \left(\frac{z_s}{\sigma_s}\right)^2 = 16z_s \cdot \frac{z_f - z_0}{(w_B)^2} \quad (7)$$

σ_s beschreibt die Standardabweichung der einzelnen Signale, die mit der Densitometer-Software vermessen wurde. Sie ist von der zurückgelegten Laufstrecke z_s abhängig. Je weiter eine Komponente läuft und je größer somit z_s ist, desto größer ist σ_s . Der Wert w_B gibt die Peakbreite an der Basis an und ist definiert als $4\sigma_s$.

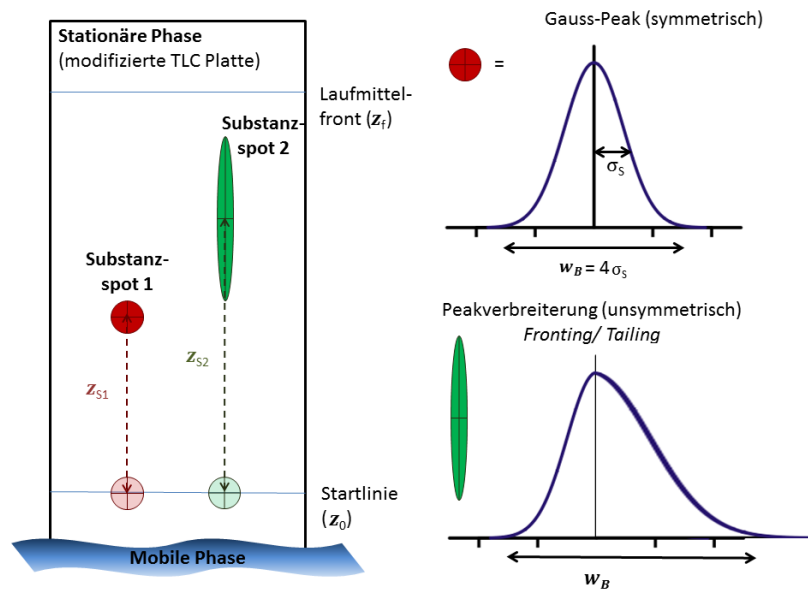


Abbildung 52: Verdeutlichung des R_f -Wertes mit den Laufstrecken der Substanzen mit z_s und der Laufmittelfront z_f . Links ist ein idealer Spot abgebildet. Rechts ist ein verbreiteter Spot gezeigt, der deutliches *tailing* aufweist.

Wie anhand von **Formel 7** deutlich wird, hat die Laufstrecke des Analyten z_s den größten Einfluss auf die Trennleistung (auch Anzahl an theoretischen Böden oder Trennleistung). Je höher dieser Wert ist, desto mehr Wechselwirkungen geht der Analyt mit der mobilen Phase ein und wird weit transportiert. Je kleiner z_s ist, desto stärker interagiert er mit der stationären Phase und wird von dieser zurückgehalten. Bei geringerer Effizienz N im Vergleich zum Referenzwert der unmodifizierten Platte, findet eine stärkere Wechselwirkung mit dem Polymer statt (siehe **Abbildung 53**).

Darüber hinaus hat die Substanzspot-Symmetrie einen erheblichen Einfluss auf die Trennleistung N . Da die Berechnung der Effizienz definierte, kreisförmige Spots voraussetzt, führt jede Abweichung dieser idealen Form zu einer Verbreiterung des w_B -Wertes und somit zu einer niedrigeren Effizienz. Spotverbreiterungen bzw. *tailing*-Effekte verschlechtern die Trennleistung rapide.

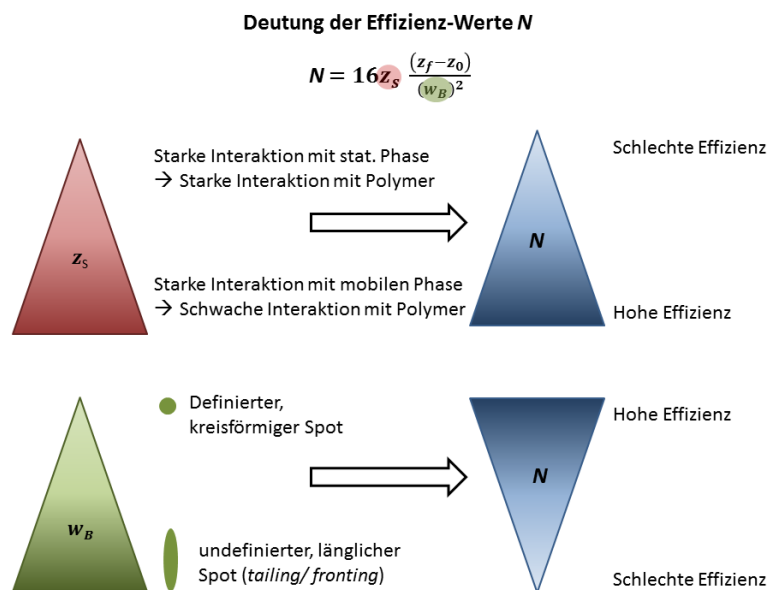


Abbildung 53: Veranschaulichung der Interaktionen in Relation zur Trennleistung N .

Bei der Probenauftragung wurde für jeden Analyten ein Volumen von 10 μl verwendet. Für die Detektion wurde eine UV-Lampe mit 265 und 364 nm benutzt.

4.4.1.1 Modifizierung der stationären Phase mit PEI-OS-Architekturen

Kommerziell erhältliche Sorbfil TLC-Platten (8-12 μm Partikelgröße, 90-100 μm Schichtdicke) wurden durch Aufsprühen der wässrigen Lösungen der PEI-OS-Architekturen modifiziert. Die Polymere lagen in einer Konzentration von 1 mg/mL vor. Im Mittel wurde jede Platte mit 3 mg Polymer modifiziert. Um ein Abwaschen zu minimieren und einen Gleichgewichtszustand zu erhalten, wurden die PEI-OS Architekturen ebenfalls in geringer Konzentration in die mobile Phase gegeben (0,2 mg/mL). Die Ergebnisse der Experimente mit wasserlöslichen Vitaminen mit unmodifizierten und PEI-OS-modifizierten TLC-Platten sind im Anhang (**Tabelle 41-49**) zusammengefasst. Zur Verdeutlichung werden die Ergebnisse mit PEI-5k-Mal A, B und C in **Abbildung 54** graphisch dargestellt.

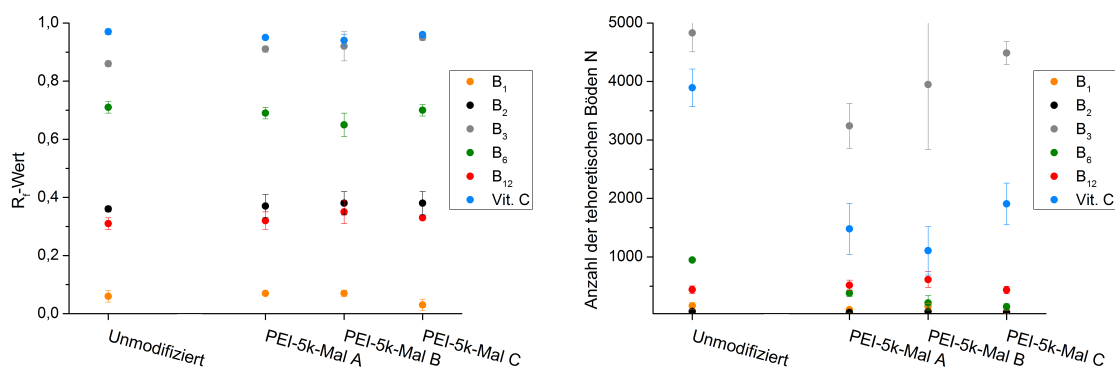


Abbildung 54: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-5k-Mal A, B und C modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

Es fällt auf, dass durch die Modifizierung der stationären Phase mit PEI-OS-Architekturen

mit einem PEI 5 kDa-Kern keine signifikanten Unterschiede zu einer unmodifizierten, kommerziell erhältlichen TLC-Platte auftreten. Zusammenfassend können nur geringfügige Effekte durch die Modifizierung beobachtet werden.

Vitamin B₁ zeigt eine geringfügige Verschlechterung der Effizienz bei Modifizierung mit den PEI-5k-Mal Strukturen. Da sich die R_f -Werte nicht wesentlich unterscheiden, kann diese Verschlechterung hauptsächlich durch eine Verbreiterung der Substanzspots (*tailing*) erklärt werden. Eine Wechselwirkung zwischen der polymer-modifizierten stationären Phase und dem Vitamin B₁ könnte eine mögliche Erklärung für diese Spotverbreiterung sein. Da die Effekte allerdings minimal sind, sollte dieser Effekt mit Vorsicht gedeutet werden. Bei der Auftrennung des Vitamins B₂ zeigt sich keine Änderung bei der Nutzung von modifizierten Platten im Vergleich zu unmodifizierten Platten. Mit dem negativ geladenen Vitamin B₃ kommt es zu einer minimalen Erhöhung der R_f -Werte und einem Abfall der Effizienz. Aufgrund der höheren R_f -Werte scheint eine Interaktion mit der mobilen Phase bevorzugt zu werden, obwohl B₃ in den Voruntersuchungen starke elektrostatische Wechselwirkungen mit den positiv geladenen PEI-OS eingegangen ist. Trotz der Steigerung des R_f -Wertes, sinkt die Effizienz bei den modifizierten Platten deutlich. Dies kann mit einer Substanzspot-Verbreiterung erklärt werden. Durch diese Verbreiterung kann dennoch auf Interaktionen des Niacins mit den stationären Phasen geschlossen werden. Die Steigerung der Trennleistung von Struktur A, mit einer sehr dichten Maltoseschale, hin zu Struktur C, mit einer offenen Schale, könnte für elektrostatische Interaktionen des Niacins mit den behandelten Platten sprechen. Dabei wechselwirkt das negativ geladene Niacin mit der positiven Ladung des PEI-Kerns. Wird diese jedoch von einer dichten Maltoseschale, wie bei Struktur A, abgeschirmt, treten elektrostatische Effekte auf, die Interaktion mit der mobilen Phase und deren Transport überwiegt jedoch. Es resultieren breite Substanzspots und größere w_B -Werte. Bei der offenen Struktur C kann das Niacin besser mit dem polymeren Kern interagieren und es werden bessere Substanzspots erhalten. Diese Versuche zeigen deutlich, dass die Wechselwirkungen unter diesen Analysebedingungen nicht sehr stark sind. Es kommt zu einem sehr dynamischen Prozess, bei dem das Niacin zum Teil mit der stationären Phase interagiert, aber dennoch gut von der mobilen Phase transportiert wird. Für die Vitamine C und B₆ können ähnliche Rückschlüsse gezogen werden. Allerdings ändern sich die R_f -Werte für diese Vitamine nicht wesentlich und ergeben gleiche Werte wie bei der Referenz-Auftrennung. Eine Verschlechterung der Effizienz ist allerdings auch bei diesen Vitaminen zu beobachten, die ebenfalls durch eine Verschlechterung des w_B -Wertes begründet werden kann. Bei dem Vitamin B₆ kann ein Abfall der Effizienz von Struktur A hin zu Struktur C beobachtet werden. Dies zeigt, dass mit Struktur A definierte Spots erhalten werden, während mit Struktur C eine höhere Substanzspot-Verbreiterung auftritt. Bei dem Vitamin B₁₂ findet eine minimale Verbesserung der Effizienz statt, die durch die geringfügig besseren w_B -Werte und geringere Spotverbreiterungen bei den behandelten Platten erklärt werden kann.

Um Rückschlüsse auf den Einfluss der Polymerkerngröße zu erhalten, wurden analoge Versuche ebenfalls mit den PEI-OS-Architekturen mit einem 25k-PEI-Kern durchgeführt. Die Ergebnisse der TLC-Experimente sind in **Abbildung 55** zusammengefasst.

Auch bei den mit PEI-25k-Mal A bis C modifizierten Platten wird kein starker Effekt auf die Trennleistung deutlich. Für die Vitamine B₁ und B₂ zeigt sich kaum ein Unterschied

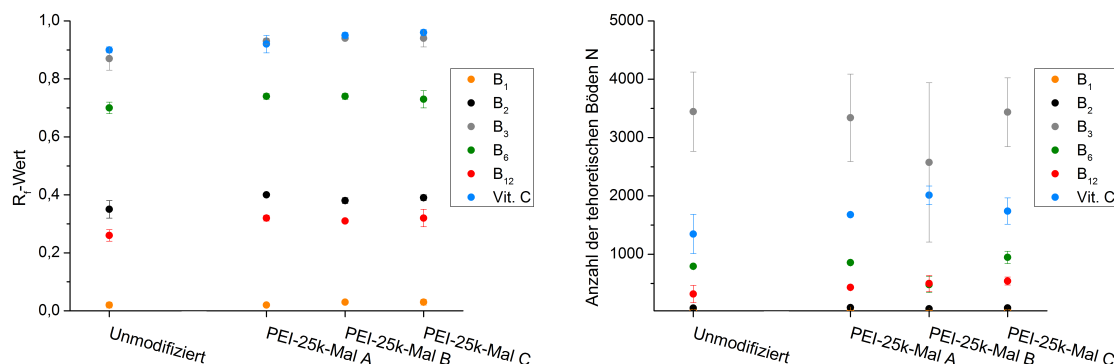


Abbildung 55: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-25k-Mal A, B und C modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

zwischen den Werten der Referenz-Analyse und denen der behandelten Platten. Wie bereits zuvor zu beobachten war, kommt es auch mit dem größeren PEI-Kern zu einer Erhöhung der R_f -Werte von B_3 . Eine Verschlechterung der Effizienz ist jedoch nicht zu detektieren und nur eine geringfügige Spotverbreiterung. Das gleiche Ergebnis erzielten die behandelten Platten für das Vitamin B_6 . Es hier kommt es zu einer geringfügigen Erhöhung der R_f -Werte, jedoch zu keiner Verbesserung der Effizienz. Für die Vitamine B_{12} und C findet eine Erhöhung der R_f -Werte und eine Verbesserung der Trennleistung statt. Geringere *tailing*-Effekte hin zu definierten Spots üben sich in diesen Fällen positiv auf die Trennleistung aus.

Der Einfluss der Kerngröße scheint, anhand eines Vergleiches der Resultate der mit PEI-5k-Mal und PEI-25k-Mal modifizierten Platten, nur einen geringen Einfluss auszuüben. Die beobachteten Effekte erscheinen jedoch bei den PEI-25k-Mal modifizierten Platten geringfügig schwächer aufzutreten als bei den PEI-5k-Mal behandelten Platten. Eine Untersuchung des Einflusses der Zuckerschale hinsichtlich ihrer Dichte, zeigt keine ausgeprägten Effekte auf die Trennleistung.

Neben diesen Parametern kann ebenfalls die Art und Größe der Oligosaccharidschale untersucht werden. Hierfür werden die PEI-OS-Architekturen mit einer Maltotriose-Schale näher untersucht und Platten, analog wie bereits beschrieben, modifiziert (**Abbildung 56**).

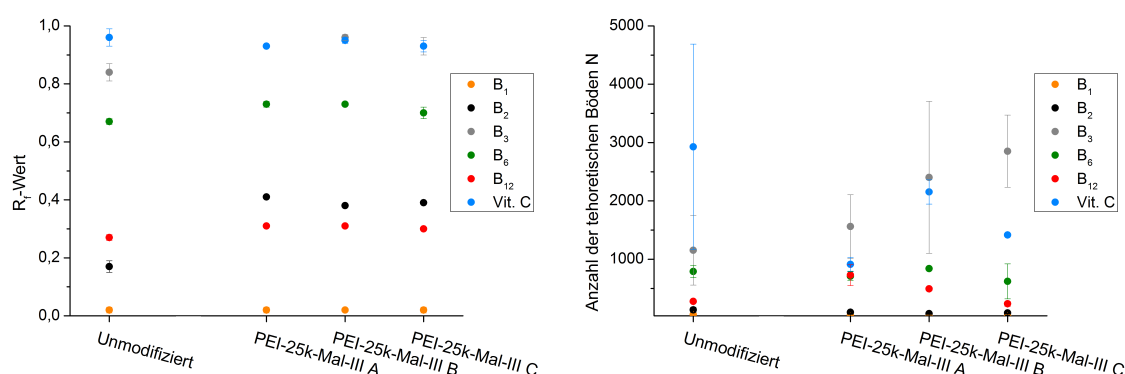


Abbildung 56: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-25k-Mal-III A, B und C modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

Bei der Verwendung der PEI-OS-Architekturen mit einem größeren Zucker, zeigen sich

deutlichere Effekte auf die Auftrennung der einzelnen Vitamine. Bei dem Vitamin B₁ treten mit den modifizierten Platten die gleichen Änderungen bei der Auftrennungsleistung und den R_f -Werten auf wie bereits bei den Strukturen mit Maltoseschale beobachtet werden konnten. Bei Riboflavin werden deutlich höhere R_f -Werte bei den modifizierten Platten gefunden. Dennoch sinkt die Effizienz deutlich. Bei der Entwicklung der Platten findet für den Substanzspot von B₂ bei den modifizierten Platten eine starke Spotverbreiterung statt. Die Auftrennungsleistung nimmt somit stark ab. Da dies mit den anderen PEI-OS-Architekturen nicht aufgetreten ist, liegt der Schluss nahe, dass dieses Vitamin stärker mit Maltotriose als mit Maltose interagiert. Die Interaktion des Riboflavins mit der Zuckerschale erscheint anhand dieser Ergebnisse einen Einfluss auf die Stärke der Wechselwirkungen zu haben. Jedoch führt diese Interaktion nicht zu einer Verbesserung der Trennleistung, sondern durch Verbreiterung der Spots zu einer Verschlechterung der Effizienz.

Bei dem Vitamin B₃ kann sowohl eine Erhöhung der R_f -Werte, als auch eine verbesserte Trennleistung für die modifizierten Platten festgestellt werden. Die Steigerung der Trennleistung von Struktur A hin zu C konnte bereits bei den mit PEI-5k-Mal A-C behandelten Platten beobachtet werden. Die auftretenden elektrostatischen Wechselwirkungen des Niacins mit den behandelten Platten treten besonders stark bei der offenen Struktur C auf. Sie nehmen mit zunehmender Dichte der Zuckerschale und somit mit steigender Abschirmung der positiven Kernladung hin ab. Dennoch werden erneut höhere R_f -Werte als bei den unmodifizierten Platten gefunden, was auf äußerst dynamische Effekte zwischen der stationären und mobilen Phase schließen lässt. Bei B₆ findet eine minimale Erhöhung der R_f -Werte statt, wodurch die Trennleistung jedoch nicht verbessert wird.

Interessante Effekte treten bei der Verwendung der modifizierten Platten für die Auftrennung von B₁₂ auf. Hier zeigen sich bei den behandelten Platten erhöhte R_f -Werte und auch höhere Trennleistungen. Interessanterweise nehmen die Trennleistungen der behandelten Platten von Struktur A hin zu Struktur C ab. Bereits aus den Voruntersuchungen wurde eine Interaktion des B₁₂ mit den PEI-OS-Architekturen auf eine Wechselwirkung an der Oberfläche angenommen. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für derartige Interaktionen des B₁₂ mit der Oberfläche bzw. mit der Zuckerschale. Je dichter diese ist und je größer das Zuckermolekül, desto stärker tritt dieser Effekt auf.

Bei Vitamin C kommt es zu nahezu gleichen R_f -Werten, jedoch zu schlechteren Trennleistungen. Aufgrund der negativen Ladung des Vitamins C sollte eine elektrostatische Interaktion analog wie bei Vitamin B₃ auftreten. Diese kann jedoch kaum beobachtet werden. Vermutlich findet hier ebenfalls keine starke Interaktion mit der stationären Phase statt. Durch dynamische Prozesse wechselwirkt das Vitamin C zwar mit der stationären Phase, wird von der mobilen Phase jedoch stetig weitertransportiert. Als Resultat werden stark verbreiterte Substanzspots erhalten, wodurch die Trennleistung minimiert wird.

Bei den Untersuchungen mit den hydrophilen Vitaminen mit den mit PEI-OS-Architekturen behandelten TLC-Platten fällt eine häufige Erhöhung der R_f -Werte auf. Aus den Voruntersuchungen mit den Vitaminen und den PEI-OS-Architekturen konnten für die negativ geladenen Analyten und auch B₁₂ moderate bis gute Wechselwirkung festgestellt werden. Aufgrund der negativen Ladungen sollten diese Vitamine auch in den TLC-Experimenten über elektrosta-

tischen Wechselwirkungen mit den Platten interagieren. Aufgrund dieser Wechselwirkungen mit den PEI-OS-modifizierten Platten sollten somit theoretisch niedrigere R_f -Werte resultieren. Dennoch werden höhere R_f -Werte beobachtet. Wegen der nicht-kovalenten Anbindung der PEI-OS-Architekturen an die TLC-Platten könnten sich die polymeren Strukturen ablösen und mit der wässrigen Phase transportiert werden. Durch die Addition der PEI-OS-Architekturen in die mobile Phase soll ein Gleichgewichts-Zustand erzielt werden. Ein Ablösen der polymeren Strukturen kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Die Vitamine könnten somit vermehrt mit den PEI-OS-Architekturen in der mobilen Phase interagieren und somit weiter transportiert werden. Weiterhin ist denkbar, dass die positive Ladung der Polymerkerne mit den Silanolgruppen des Kieselgels an der Plattenoberfläche interagieren. Die für die elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Analyten erforderliche positive Ladung der Polymere könnte somit abgeschwächt sein.

4.4.1.2 Modifizierung von TLC-Platten mit PEI-Spacer-Architekturen

Neben den PEI-OS-Architekturen wurden ebenfalls die Polymer-Architekturen mit Spacern in der TLC getestet (**Abbildung 57**).

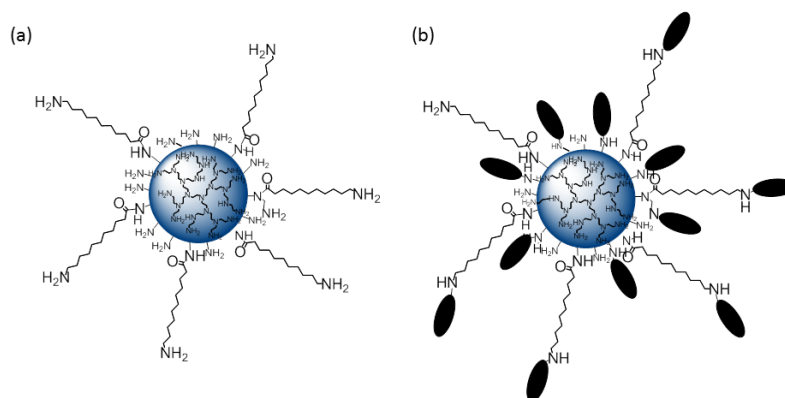


Abbildung 57: Übersicht der für die TLC verwendeten PEI-Spacer-Architekturen ohne ((a) PEI-5/25k-C11-NH₂) und mit Maltoseschale ((b) PEI-5/25k-C11-Mal-1/-2).

Durch die Anbindung der Spacer an den Polymerkern und der anschließenden Modifizierung der Spacer-Enden mit Maltose wurden Systeme generiert, die aus einem geladenen Polymerkern, hydrophoben, gut zugänglichen Spacern und hydrophilen Zuckerfunktionalitäten bestehen. Diese amphilen Architekturen wurden mit einem 5 und 25 kDa großen Polymerkern generiert. Die Modifizierung der Platten fand analog zu der bereits beschriebenen Prozedur statt. Jede Platte wurde mit 3 mg Polymer modifiziert. Die Untersuchungen mit den wasserlöslichen Vitaminen wurden mit einer wässrigen mobilen Phase durchgeführt, in der ebenfalls die PEI-Spacer-Architekturen gelöst waren (0,2 mg/mL). Zusätzlich zu den sonst bereits verwendeten hydrophilen Vitaminen wurde das phosphorylierte B₂ (B₂-P), als weiterer negativ geladener Analyt getestet.

Mit allen wasserlöslichen Vitaminen kann eine Verschlechterung der Trennleistung bei den modifizierten Platten festgestellt werden (**Abbildung 58**).

Im Fall von B₁ findet kaum eine Änderung der R_f -Werte oder Trennleistungen statt. Bei

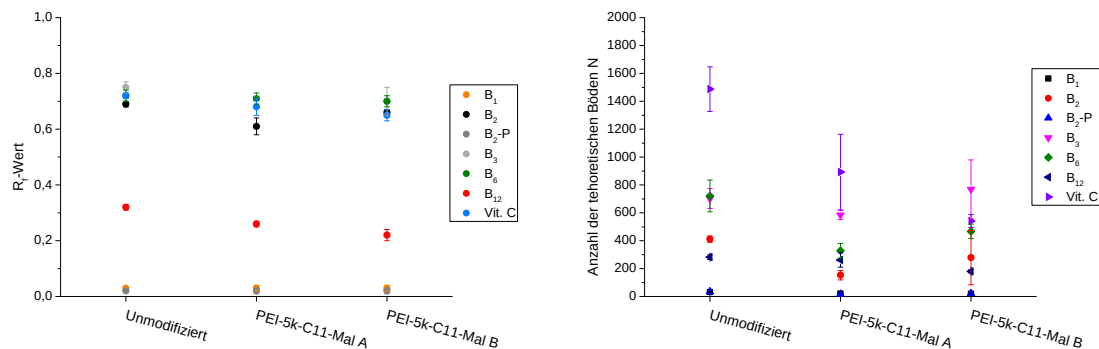


Abbildung 58: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-5k-C11-Mal modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

Riboflavin können bei den modifizierten Platten geringfügig kleinere R_f -Werte vermessen werden. Die Trennleistung sinkt jedoch stark. Diese Effekte und die Spotverbreiterungen lassen auf eine Wechselwirkung des Riboflavins mit der stationären Phase schließen. Aufgrund der höheren hydrophoben Anteile des Riboflavins könnten diese zum Teil mit den unpolaren Spacern sowie über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Maltose interagieren. Bei dem negativ geladenen Vitamin B_2 -P ändern sich die R_f -Werte nicht. Bei B_3 kann ein geringfügiger Abfall bei den R_f -Werten der behandelten Platten beobachtet werden. Wie bei B_2 -P führt auch bei B_3 eine Spotverbreiterung zu einem Abfall der Effizienz. Da der Polymerkern nur mit einer geringen Dichte an Spacer-Molekülen funktionalisiert wurde, kann es unter Umständen zu einer geringen elektrostatischen Wechselwirkung der PEI-Kerne mit den negativ geladenen Analyten kommen. Aufgrund von Abstoßungseffekten kommt es jedoch zu keiner starken Interaktion, sodass lediglich eine Spotverbreiterung auftritt. Bei dem zwitterionischen B_6 kommt es zu einer deutlichen Reduzierung der Effizienz. Aufgrund der geringen Änderung bei den R_f -Werten für B_6 kann angenommen werden, dass auch B_6 analog zu den negativ geladenen Vitaminen schwach ausgeprägte Interaktionen mit der stationären Phase eingeht. Die resultierende Verbreiterung der Substanzspot führt jedoch zu einer Verschlechterung der Trennleistung. Bei Vitamin B_{12} kann eine deutliche Änderung der R_f -Werte bei den modifizierten Platten beobachtet werden. Dies bedeutet, dass mit den PEI-Spacer-Architekturen eine stärkere Interaktion festgestellt werden kann, als mit unbehandelten Platten. Aufgrund dieser Wechselwirkungen wird B_{12} stärker von der modifizierten stationären Phase zurückgehalten. Diese Interaktion führt jedoch nicht zu einer Verbesserung der Effizienz, sondern zu Spotverbreiterungen. Für Vitamin C kann eine ähnliche Beobachtung gemacht werden. Neben den R_f -Werten sinkt auch die Trennleistung. Mit Vitamin C könnten elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen mit den PEI-Spacer-Architekturen auftreten, wodurch diese stärker mit Vitamin C interagieren als eine unbehandelte SiO_2 -Oberfläche. Da jedoch nur nicht-kovalente Wechselwirkungen auftreten, scheint ein dynamisches Gleichgewicht aus Interaktion und Ablösen vorzuliegen, das zu einer Spotverbreiterung führt und somit die Effizienz deutlich herabsetzt.

Um den Einfluss des Polymerkernes näher zu untersuchen, wurden als Vergleich auch TLC-Experimente mit PEI-25k-Spacer-Architekturen durchgeführt. Diese Ergebnisse mit einem

großem Polymerkern sind in **Abbildung 59** zusammengefasst.

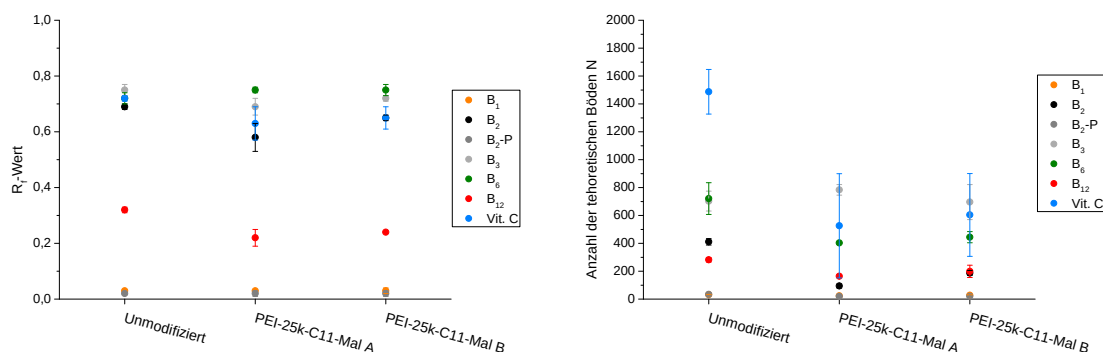


Abbildung 59: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-25k-C11-Mal modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

Für die PEI-Spacer-Architekturen mit einem größeren 25 kDa Polymerkern können die gleichen Effekte festgestellt werden, wie mit den PEI-5k-Spacer Architekturen. Es kommt ebenfalls zu einer allgemeinen Verschlechterung der Trennleistung. Der Einfluss des Polymerkerns scheint bei der Auftrennung der wasserlöslichen Vitamine nur eine untergeordnete Relevanz zu besitzen. Einzig Vitamin B₃ scheint mit dem größeren PEI-Kern besser interagieren zu können. Im Gegensatz zu allen vorhergehenden Untersuchungen mit den PEI-Spacer-Architekturen kommt es zu keinem Abfall der Effizienz im Vergleich zur unbehandelten Platte. Der größere PEI-Kern mit einer höheren Ladungsdichte könnte für diesen Effekt verantwortlich sein.

Um den Einfluss der Zuckerschale zu untersuchen, wurden vergleichbare Experimente mit nicht maltosylierten PEI-Spacer-Architekturen angefertigt. Die Ergebnisse mit kleinem und großen Polymerkern sind in **Abbildung 60** zusammengefasst.

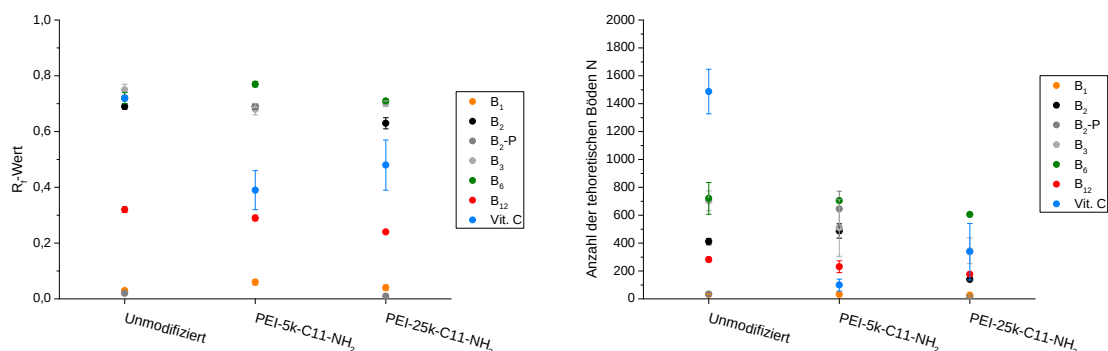


Abbildung 60: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-5k-C11 (ohne Maltoseschale) modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

Die PEI-Spacer-Architekturen ohne Maltoseschale zeigen gleiche Auftrennungsergebnisse wie zuvor die maltosylierten PEI-Spacer-Architekturen. Die Ergebnisse des phosphorylierten Riboflavins und von Vitamin C fallen allerdings auf. Bei dem phosphorylierten B₂ kommt es mit dem kleineren Polymer-Kern zu einer deutlichen Steigerung des R_f -Wertes und der Trennleistung. Die Wechselwirkung mit der stationären Phase nimmt deutlich ab, wodurch auch die Spotverbreiterung reduziert wird. Eine wesentlich bessere Trennleistung resultiert hieraus.

Bei Vitamin C wird analog zu den maltosylierten Architekturen ein Abfall der Trennleistung verzeichnet. Mit keiner anderen Struktur waren der R_f -Wert und die Trennleistung jedoch so niedrig, wie mit PEI-5k-C11-NH₂. Eine signifikant stärkere Wechselwirkung des Vitamin Cs mit der stationären Phase kann beobachtet werden. Da die Funktionalisierung bei dem kleineren PEI-Kern mit nur 8 Spacer-Einheiten niedrig ist, kann eine gute elektrostatische Wechselwirkung mit den Polymerkern auftreten. Bei der Struktur PEI-25k-C11-NH₂ liegt eine Funktionalisierung von im Mittel 21 Spacern pro PEI-Kern vor. Diese könnte eine effektive Wechselwirkung des Vitamin Cs mit dem positiv geladenen PEI-Kern erschweren. Als Resultat treten bei der geringeren Funktionalisierung eine deutlich stärkere Wechselwirkung auf, die sich in Form eines deutlich niedrigeren R_f -Wertes, verstärkter Spotverbreiterung und einem Abfall der Trennleistung äußert. Zusätzlich zu diesen Beobachtungen kommt es bei B₂ und B₆ bei den kleineren PEI-5k-C11-NH₂ Strukturen zu vergleichbaren R_f -Werten und Auftrennungsraten wie bei den unmodifizierten Platten. Bei keiner anderen Modifizierung konnten diese Effekte beobachtet werden. Es kann vermutet werden, dass die geringere Funktionalisierung mit nur 8 Spacer-Einheiten geringfügig »bessere« Auftrennungsleistungen erzielt. Eventuell tritt bei einer Modifizierung mit mehr Spacer-Einheiten sterische Hinderungen auf, die eine Interaktion erschweren.

4.4.1.3 TLC-Experimente mit lipophilen Vitaminen

Neben den wasserlöslichen Vitaminen wurden ebenfalls ausgewählte, lipophile Vitamine (**Abbildung 61**) als Analyten für TLC-Experimente genutzt.

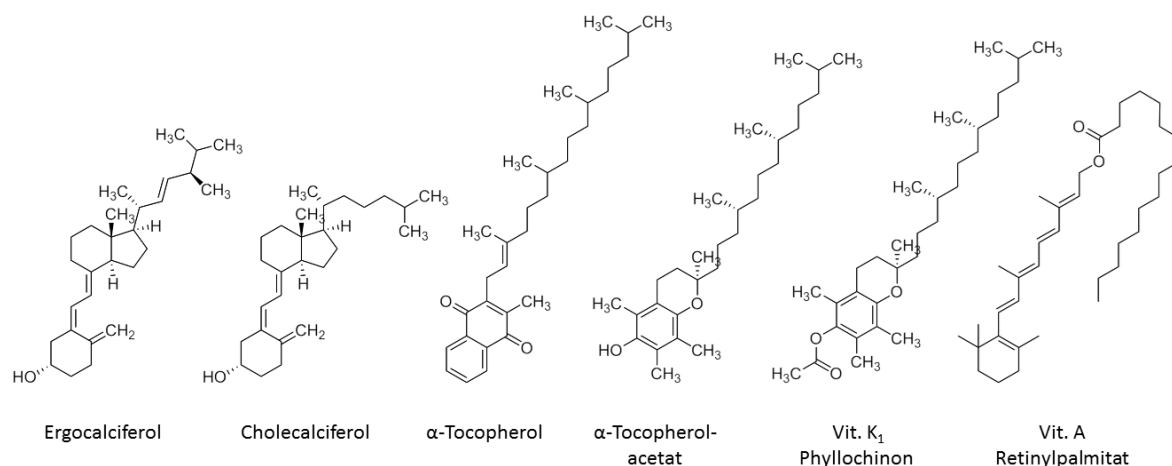


Abbildung 61: Übersicht der lipophilen Vitamine, die als Testanalyten für die behandelten TLC-Platten verwendet wurden.

Als mobile Phase wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Benzol/ Hexan im Verhältnis 9:1 genutzt. Die lipophilen Vitamine wurden in Hexan gelöst und in einem Probenvolumen von 0,2 μ l auf die Platten aufgetragen. Als Modifikation der stationären Phase dienten die PEI-Spacer-Architekturen und die stark lipophilen PEI-FA-Architekturen mit Fettsäuren-Funktionalisierung. Die Modifizierung fand ebenfalls durch Aufsprühen einer Polymerlösung statt, bei der jede Platte im Mittel mit 3 mg Polymer modifiziert wurde. Die PEI-FA-Architekturen wurden in Hexan gelöst und auf die Platten gesprüht.

Die Ergebnisse der Modifizierung mit PEI-Spacer-Architekturen ist in **Abbildung 62** zusammengefasst. Bei diesen Untersuchungen wurden nur Einfachmessungen durchgeführt, wodurch keine Fehlerangabe gemacht werden können.

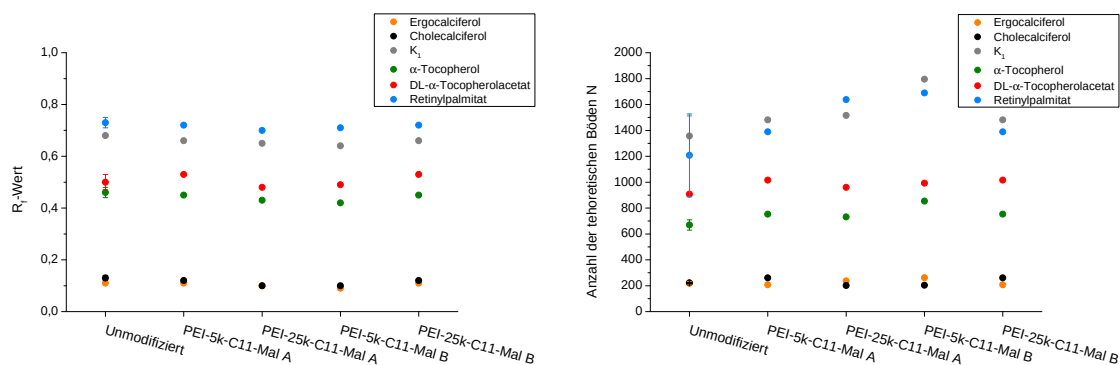


Abbildung 62: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-C11-Mal modifizierten TLC-Platten mit lipophilen Vitaminen.

Während die sterisch anspruchsvolleren Vitamine wie Ergocalciferol und Cholecalciferol kaum eine Änderung bei der Auftrennung mit modifizierten Platten zeigen, nehmen bei den restlichen Vitaminen die Trennleistungen geringfügig zu. Obwohl bei keinem Vitamin eine signifikante Änderung der R_f -Werte festgestellt werden kann, kommt es bei Retinylpalmitat und K_1 zu einer Verbesserung der Effizienz. Es wird vermutet, dass diese effektivere Trennleistung durch hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommen. Im Fall von Retinylpalmitat und Cholecalciferol sind die aliphatischen Seitenketten besser zugänglich, wodurch eine effektivere Interaktion resultiert. Diese verbesserte Zugänglichkeit und die daraus resultierenden hydrophoben Interaktionen tragen somit zu einer Verbesserung der Effizienz bei, da sie ein *Tailing* minimieren.

Die lipophilen Vitamine wurden ebenfalls mit den deutlich hydrophoberen PEI-FA-Architekturen untersucht. Um den Einfluss des hydrophoben Anteils zu untersuchen, wurden

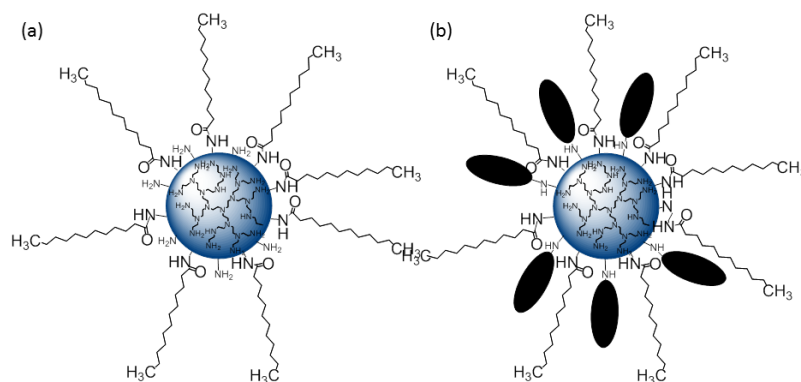


Abbildung 63: Überblick der PEI-FA-Architekturen (PEI-25k-FA 20, 35 und 50), mit denen TLC-Platten modifiziert wurden.

unterschiedliche Funktionalisierungsgrade getestet. Es wurden Strukturen mit im Mittel 20, 35 und 50 Fettsäuren pro PEI-Kern mit (**Abbildung 63 (b)**) und ohne Maltoseschale (**Abbildung 63 (a)**) getestet. Die Versuchsdurchführung war analog zu den Bedingungen wie

bei den PEI-Spacer-Architekturen mit den lipophilen Vitaminen. Für die PEI-FA-Architekturen ohne eine Maltoseschale wurden die in **Abbildung 64** gezeigten Trennergebnisse erzielt.

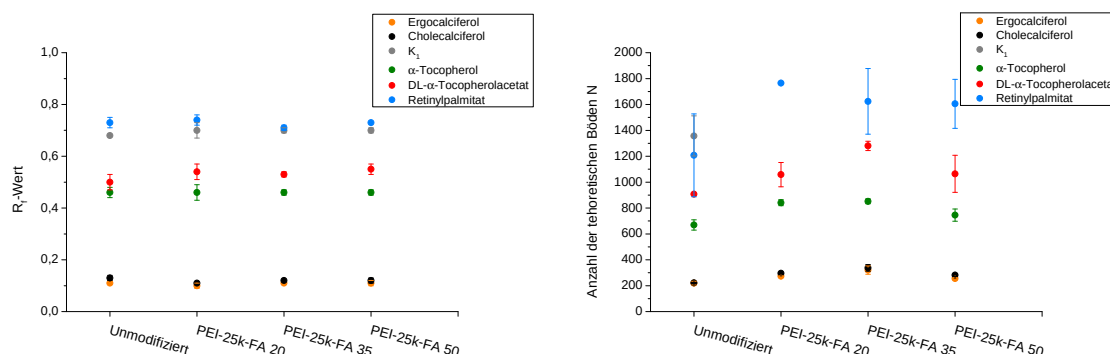


Abbildung 64: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-FA (ohne Maltoseschale) modifizierten TLC-Platten mit lipophilen Vitaminen.

Die Modifizierung der TLC-Platten mit den PEI-FA-Architekturen ohne Maltoseschale, zeigt im Vergleich zu den Trennergebnissen der PEI-Spacer-Architekturen eine minimal bessere Trennleistung für Retinylpalmitat. Die einzelnen PEI-FA Strukturen zeigen hinsichtlich des Funktionalisierungsgrades mit 20, 35 und 50 Fettsäuren keine signifikanten Unterschiede. Obwohl sich auch bei diesen PEI-FA-Architekturen die R_f -Werte nicht wesentlich ändern, kann eine bessere Trennleistung vor allem für Retinylpalmitat erzielt werden. Die Modifizierung mit PEI-FA-Architekturen verbessert somit die Substanzspot-Symmetrie dieses hydrophoben Vitamins, das eine gut zugängliche aliphatische Seitenkette trägt. Eine Verbreiterung (*tailing*) der Spots kann minimiert werden, wodurch eine effektivere Auftrennung gelingt. Eine Verbesserung der Trennleistung kann ebenfalls für die anderen lipophilen Vitamine festgestellt werden. Diese Verbesserung ist allerdings geringer wie die bei Retinylpalmitat. Im Vergleich zu diesen Versuchen wurden ebenfalls unter vergleichbaren Bedingungen PEI-FA-Architekturen mit einer Maltoseschale untersucht (**Abbildung 65**).

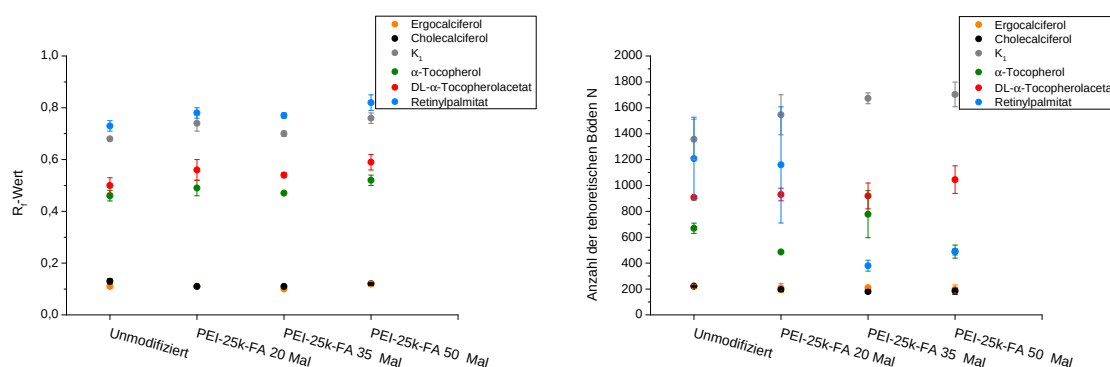


Abbildung 65: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-FA-Architekturen mit Maltoseschale modifizierten TLC-Platten mit lipophilen Vitaminen.

Im Vergleich zu den nicht maltosylierten, stark hydrophoben PEI-FA-Architekturen zeigen diese amphiphilen Architekturen schlechtere Trennleistungen bei den lipophilen Vitaminen. Für die Vitamine Ergocalciferol, Cholecalciferol und Tocopherol tritt keine signifikante Änderung im Vergleich zu den unmodifizierten Platten auf. Im Vergleich zu den PEI-FA-Architekturen ohne Maltoseschale kann jedoch ein deutlicher Abfall der Effizienz festgestellt werden.

Die Maltoseschale ist somit hinderlich für eine bessere Auftrennung dieser Vitamine. Für das Vitamin K₁ und das Tocopherolacetat findet nur eine geringe Verbesserung der Trennleistung statt, die nicht mehr die Trennleistungen der vergleichbaren unmaltosylierten Architekturen erreicht. Darüber hinaus ist bei diesen Vitaminen eine leichte Zunahme der R_f-Werte erkennbar. Dies deutet auf eine verringerte Wechselwirkung mit der stationären Phase hin. Somit ist die Funktionalisierung mit Maltose bei Interaktionen dieser Vitamine eher hinderlich. Die Auftrennung von Retinylpalmitat zeigt eine leichte Zunahme der R_f-Werte für die modifizierten Platten und eine deutlich schlechtere Trennleistung. Auch für dieses Vitamin wirkt sich eine Maltosefunktionalisierung somit negativ aus. Die hydrophoben Wechselwirkungen der lipophilen Vitamine werden von der Maltosefunktionalisierung verhindert bzw. erschwert, wodurch die Trennergebnisse für die PEI-FA-Architekturen mit Maltoseschale abfallen. Die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen der lipophilen Vitamine mit den Fettsäuren bzw. Spacern ist somit die Triebkraft der Interaktion dieser Vitamine mit den Polymer-Architekturen.

4.4.1.4 Zusammenfassung der TLC-Experimente mit Kern-Schale-Architekturen

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Modifizierung von TLC-Platten mit PEI-OS-, PEI-Spacer- und PEI-FA-Architekturen teils nur geringe Effekte bewirkt. Eine generelle Optimierung kann nicht erzielt werden. Dennoch sind eindeutig Effekte durch eine Modifizierung sichtbar. Die Interaktion der einzelnen Analyten ist äußerst komplex und führt in vielen Fällen zu Spotverbreiterungen und somit zu einem Abfall der Effizienz. Die Interaktion einer behandelten Platte mit den Analyten ist von den Eigenschaften und den funktionellen Gruppe des jeweiligen Analyten abhängig. Weitere Experimente in anderen pH-Bereichen, bei denen stärkere Ladungen vorliegen, erscheinen interessant und sollten getestet werden. Die Modifizierung der TLC-Platten durch Aufsprühen einer Polymerlösung erscheint nicht eine optimale und homogene Modifizierung zu erzielen. Es kommt zu Inhomogenitäten und Ablösen der Polymerschicht. Eine kovalente Modifizierung der stationären Phase wäre interessant. Die Herstellung von Silika-Partikeln mit polymeren Kern-Schale-Architekturen auf der Oberfläche könnte eine Optimierung bringen. Die Bildung von stationären Phasen aus diesen funktionalisierten Partikeln könnte die genannten Probleme beheben und sollte in zukünftigen Versuchen näher untersucht werden.

4.4.2 Anwendung von PEI-OS-Architekturen in der HPLC

Hinsichtlich der unterschiedlichen Interaktionen der PEI-OS-Architekturen von nahezu keinen Wechselwirkungen bis hin zu starken Wechselwirkungen mit den diversen Analyten sollte ein unterschiedliches Retentionsverhalten erwartet werden. Aufgrund der Voruntersuchungen der PEI-OS-Architekturen mit bioaktiven Analyten und deren Interaktionsverhalten wurden diese als Additive in der HPLC getestet. Die Auftrennung von Analytgemischen bestehend aus wasserlöslichen Analyten wurde mit Hilfe von HPLC-Anlagen der Firma Shimadzu untersucht. Die Versuche fanden im Rahmen eines Kooperationsaufenthaltes an der Staatlichen Universität Sankt Petersburg in der Arbeitsgruppe von *Prof. A. Kartsova* statt. Die PEI-OS-Architekturen wurden in einem Natriumphosphatpuffer (pH 2,7; 30 mM) gelöst und als Additive der mobilen Phase beigemischt. Als stationäre Phase diente eine kommerziell erhältliche Superlco Discovery C18 Säule (250 mm, $\varnothing$ 4 mm; 5 μ m Partikelgröße) in einem Umkehrphasen Modus.

Für eine bessere Vergleichbarkeit, auch bei unterschiedlichen Säulenlängen, wird zumeist die theoretische Bodenhöhe als Maß für die Trennleistung einer Säule angegeben.

$$H = \frac{L}{N} \quad (8)$$

Aufgrund der Verwendung von nur einer Säulenlänge (250 mm) wird in dieser Arbeit darauf verzichtet die theoretische Bodenhöhe H anzugeben. Als Vergleichswerte wird die Anzahl der theoretischen Böden sowie die Retentionszeiten der einzelnen Vitamine genutzt. Für ein besseres Verständnis wird der gesamte Trennprozess in einzelne Segmente, sogenannte theoretische Böden (*number of theoretical plates*, N) eingeteilt. Ein Boden ist ein hypothetischer Teil einer Säule, in dem ein Verteilungsgleichgewicht zwischen der mobilen und der stationären Phase vorliegt. Eine effiziente Auftrennung kann maßgeblich von der Anzahl dieser theoretischen Abschnitte abhängen und kann durch eine Erhöhung der theoretischen Bodenzahl optimiert werden. Eine hohe theoretische Bodenzahl erhöht somit die Effizienz des Separationsprozesses. Die Bodenzahl ist definiert als:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{FWHM} \right)^2 \quad (9)$$

Die Bodenzahl ist somit von der Retentionszeit t_R und von der Halbwertsbreite zur Basisbreite ($FWHM$) abhängig. Aufgrund des Einflusses der Halbwertsbreite spielen die Peaksymmetrie und somit *tailing*-Effekte eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Anzahl der theoretischen Böden. Weiterhin ist die chromatographische Auflösung R für eine Beurteilung der Auftrennungsergebnisse von Interesse. Die Auflösung zweier Peaks beschreibt das Verhältnis zweier Peaks in Abhängigkeit zu ihren Retentionszeiten und Halbwertsbreiten zur Basisbreite ($FWHM$). Für einen Gaußschen Peak ist die chromatographische Auflösung R definiert als:

$$R = 1,18 \cdot \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{FWHM_1 + FWHM_2} \right) \quad (10)$$

Vor jeder Testreihe wurde ein Blind-Versuch durchgeführt, der kein Polymer in der mobilen Phase enthielt und als Vergleichswert diente. Jede PEI-OS-Architektur wurde in verschiedenen Konzentrationen getestet. Eine Beispielmessung ist anhand der Addition von PEI-5k-

Mal A als Additiv in **Abbildung 66** gegeben.

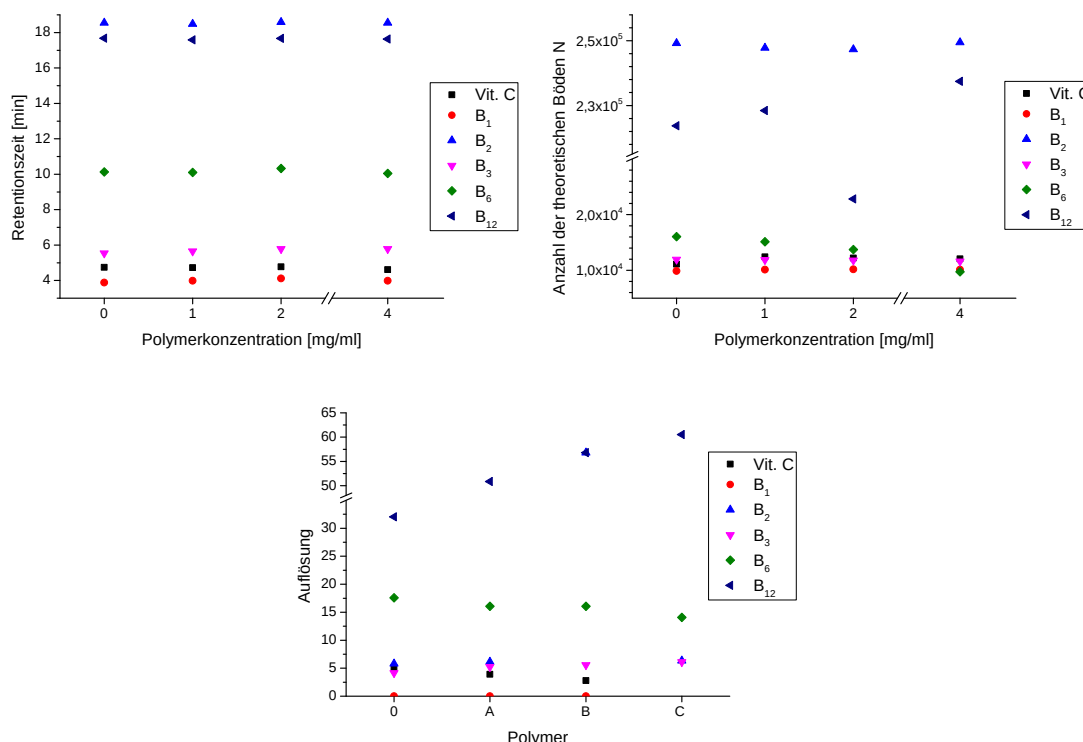


Abbildung 66: Auftragung der HPLC-Ergebnisse mit unterschiedlichen Konzentrationen an PEI-5k-Mal A als Additiv in der mobilen Phase im Vergleich zu Ergebnissen einer mobilen Phase ohne Polymer.

Die Vitamine B₂ und B₁₂ weisen die höchsten Retentionszeiten auf. Der hydrophobe Anteil des Vitamins B₂ könnte mit den unpolaren Seitenketten der Säulenoberfläche interagieren, wodurch die verzögerte Elution zu erklären wäre. Vitamin B₁₂ ist der größte Analyt und aufgrund des sterischen Anspruches wird dieses Vitamin verzögert eluiert werden. Das Vitamin B₆ zeigt eine moderate Retentionszeit. Alle weiteren Analyten werden innerhalb sehr kurzer Zeit eluiert und weisen kleine Retentionszeiten auf. Bei der Addition von PEI-5k-Mal A zeigt sich für nahezu alle Vitamine kein Effekt auf die Trenneffizienz. Ein Abfall der theoretischen Böden bei höheren Polymerkonzentration, wie er beispielsweise bei B₆ beobachtet werden kann, ist aufgrund der nahezu konstanten Retentionszeiten auf eine Peakverbreiterung (*tailing*) zurückzuführen. Das Cyanocobalamin stellt eine Ausnahme dar. Bei diesem Vitamin nimmt die Auflösung durch Zugabe an Polymer deutlich zu. Mit steigender Konzentration an Polymer nimmt die Auflösung allerdings ab und sinkt bei einer Konzentration von 4 mg/mL unter den Vergleichswert ohne Polymer. Bei der Verwendung von PEI-5k-Mal B mit einer moderaten/ offenen Maltoseschale und Struktur C mit einer offenen Maltoseschale können ähnliche Beobachtungen wie bei Struktur A gemacht werden (siehe Anhang). Bei einer Polymerkonzentration von 2 mg/mL mit PEI-5k-Mal C ist jedoch eine Auftrennung der Peaks für B₁ und Vitamin C nicht mehr möglich. Für Vitamin C findet eine deutliche Verschlechterung der Auflösung mit zunehmender Polymerkonzentration statt (siehe Anhang). Für das Cyanocobalamin wird eine verbesserte Auflösung gefunden, was bei konstanter Retentionszeit auf eine verkleinerte Halbwertsbreite zur Basisbreite deuten lässt. Darüber hinaus ändern

sich die Retentionszeiten für alle Vitamine kaum und bleiben auch bei einer Erhöhung der Polymerkonzentration nahezu konstant. Da bei der Zugabe von PEI-5k-Mal A, B und C als Additiv zu der mobilen Phase auch mit steigender Konzentration an Polymer keine signifikante Änderung der Parameter zu erkennen ist, werden im Folgenden nur Ergebnisse einer Konzentration gezeigt.

In **Abbildung 67** ist ein Vergleich der unterschiedlichen PEI-5k-Mal Strukturen A bis C bei einer Konzentration von 4 mg/mL gegenüber einer mobilen Phase ohne Polymer gegeben. Als Vergleichsparameter werden die Retentionszeiten, die Trennleistungen und die chromatographische Auflösung für die wasserlöslichen Analyten genutzt.

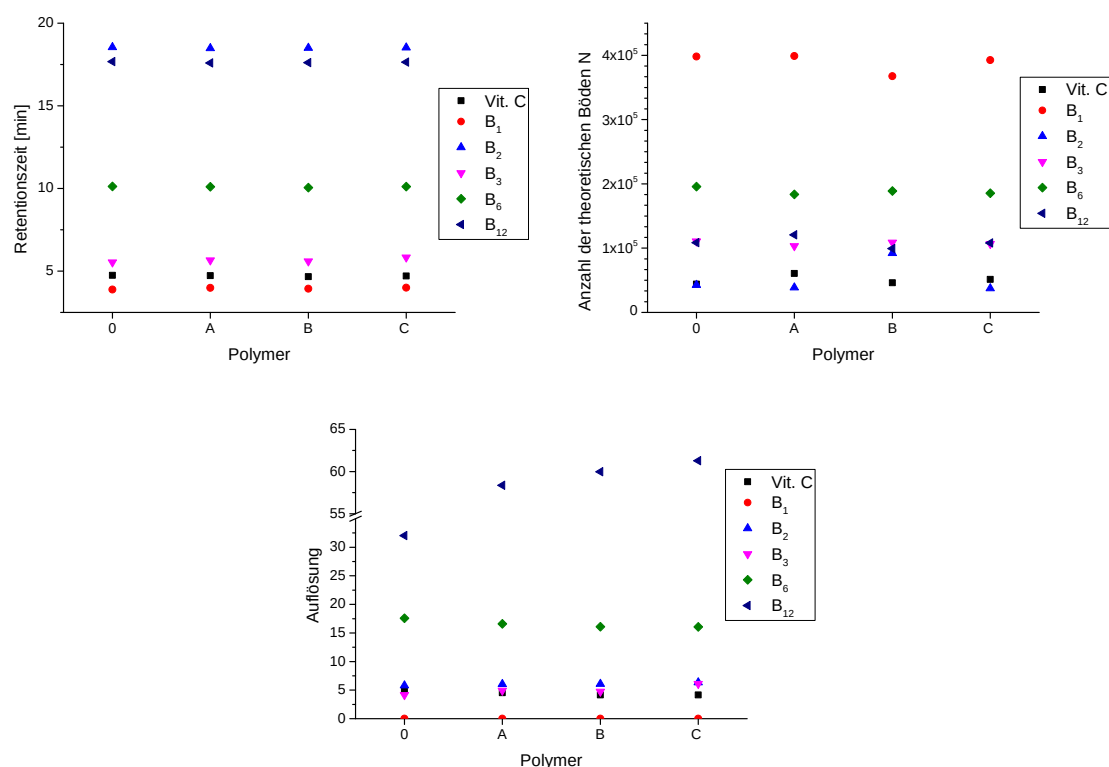


Abbildung 67: Auftragung der HPLC-Ergebnisse mit PEI-5k-Mal als Additiv in der mobilen Phase (4 mg/mL) im Vergleich zu Ergebnissen einer mobilen Phase ohne Polymer.

Ein Vergleich der Effizienz der mobilen Phase mit und ohne Polymer zeigt keinen signifikanten Einfluss durch die Polymerzugabe. Die Retentionszeit bleibt für alle wasserlöslichen Vitamine konstant und ändert sich durch die Zugabe an Polymer nicht. Weiterhin kann kein Unterschied der einzelnen Strukturen untereinander festgestellt werden. Bei den Vitaminen B₂ und B₁₂ kann ein geringer Einfluss der Schalendichte beobachtet werden. Im Fall von B₂ kann ein geringer Anstieg der Anzahl der theoretischen Böden bei der Struktur B beobachtet werden. Aufgrund der nahezu konstanten Retentionszeiten kann dieser Effekt jedoch auf die Peak-Symmetrie zurückzuführen sein. Die Struktur B verbesserte diese im Fall von B₂ somit und führt zu einer geringfügig höheren Anzahl der theoretischen Böden. Für das Vitamin B₁₂ liegt der umgekehrte Fall vor. Es kommt zu einem Abfall der Anzahl der theoretischen Böden bei Struktur B. Die Peak-Symmetrie scheint somit bei Struktur B verbreitert. Generell

bewirkt eine Zugabe der Polymere zur mobilen Phase nur geringe Änderungen der Anzahl der theoretischen Böden. Allerdings zeigt die Zugabe des Polymers einen deutlichen Effekt auf die chromatographische Auflösung von Vitamin B₁₂, wodurch der anfängliche Wert ohne Polymer von 32,0 auf 58,4 mit Polymer ansteigt.

Vergleichbare Versuche wurden ebenfalls für alle anderen PEI-OS-Architekturen durchgeführt. Aufgrund der nur geringen Effekte durch die Addition der PEI-OS-Architekturen in die mobilen Phasen wird auf eine detaillierte Ausführung verzichtet.

Von Interesse war jedoch der Einfluss der Kerngröße bei den PEI-OS-Architekturen. Dieser soll anhand eines Vergleiches von PEI-5k und 25k-Lac B näher untersucht werden (**Abbildung 68**). Bei einem Vergleich der Retentionszeiten treten keine signifikanten Änderungen

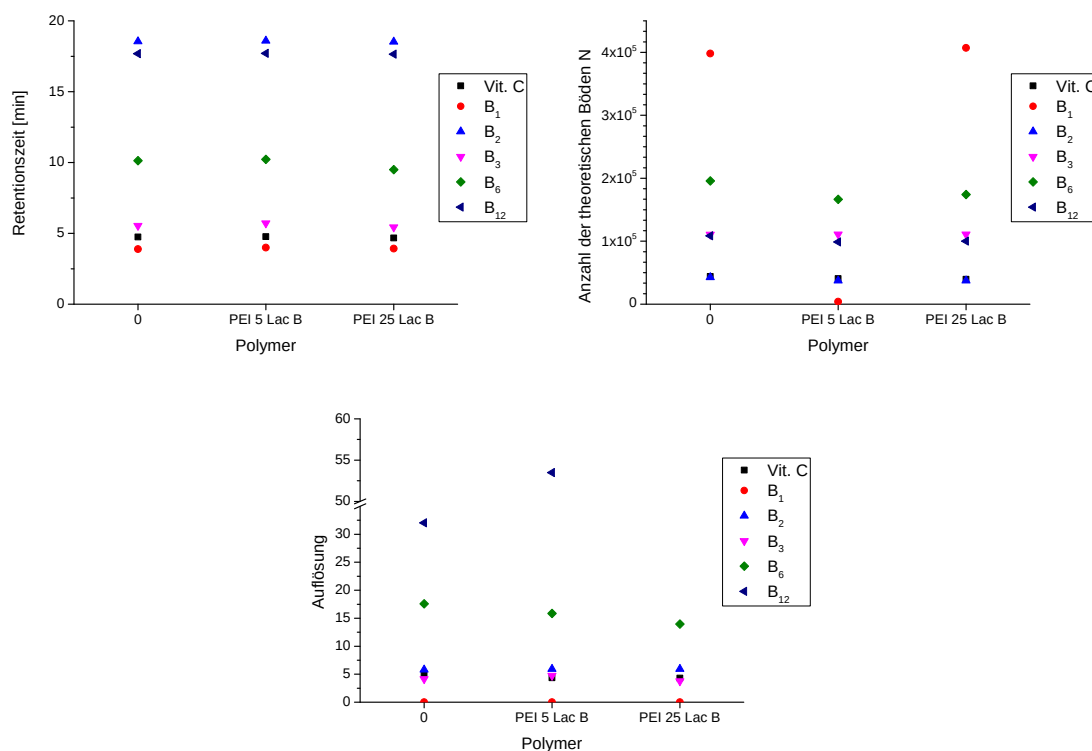


Abbildung 68: Übersicht der Ergebnisse der HPLC-Auftrennung mit und ohne PEI-5k-Lac bzw. PEI-25k-Lac (Konzentration mg/mL), um den Einfluss des Polymerkerns zu untersuchen.

durch die Zugabe des Polymers im Vergleich zur mobilen Phase ohne Polymer auf. Einzig bei Vitamin B₆ kann eine minimal reduzierte Retentionszeit bei PEI-25k-Lac B festgestellt werden. Es kann angenommen werden, dass die Interaktion mit der mobilen Phase und somit mit den Polymer in diesem Fall geringfügig stärker ist als bei dem reinen PBS-Puffer. Bei der Anzahl der theoretischen Böden führt die Addition von PEI-OS zur mobilen Phase für das Vitamin B₁ zu einer deutlichen Verschlechterung bei dem kleineren Polymerkern (N=4041) im Vergleich zu dem größeren Polymerkern (N=406928). Für alle anderen Analyten kann kein signifikanter Unterschied zwischen dem kleineren und größeren PEI-Kern festgestellt werden. Bei der chromatographischen Auflösung kann für das Vitamin B₁₂ eine Verbes-

serung für die Struktur mit dem kleineren Polymerkern festgestellt werden ($R = 53$). Bei der Struktur PEI-25k-Lac B fällt die Auflösung deutlich ab ($R = 35$) und liegt noch unter der Auflösung bei Verwendung des reinen PBS-Puffers als mobile Phase. Der Einfluss der Polymerkerngröße scheint nur einen marginalen Effekt auf die Trennleistung bei hydrophilen Vitaminen auszuüben.

Neben der Polymerkerngröße kann auch die Schalendichte einen Einfluss auf die Trennleistung haben. Die Effekte aufgrund von unterschiedlichen Schalendichten könnten daher von Interesse sein. Eine Untersuchung der Schalendichte mit den unterschiedlichen Strukturen A bis C, mit der sehr dichten Schale bei Struktur A und der offenen Schale bei Struktur C, soll anhand von PEI-25k-Mal-III A bis C verdeutlicht werden (**Abbildung 69**).

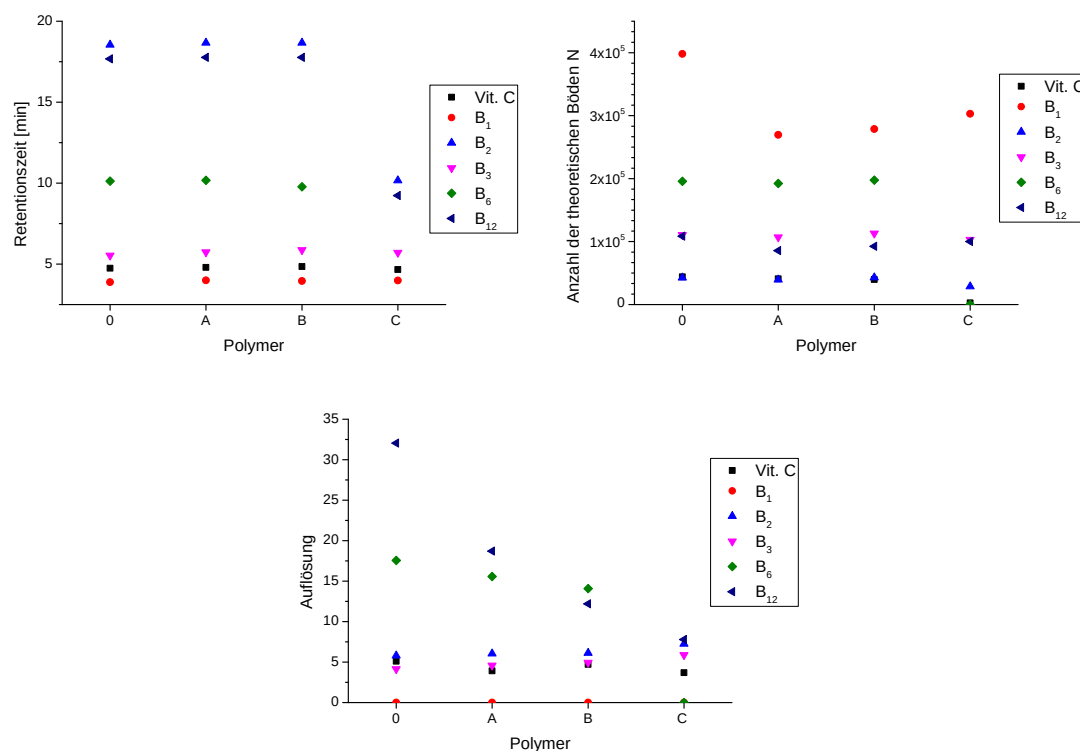


Abbildung 69: Gegenüberstellung der HPLC-Ergebnisse mit und ohne PEI-25k-Mal-III in der mobilen Phase. Bei einer Polymerkonzentration von 1 mg/mL.

Die Retentionszeiten für B₂, B₆ und B₁₂ sind für Struktur C minimiert. Diese Analyten scheinen Interaktionen mit der offenen mit dem zugesetzten Polymer einzugehen. Eine Änderung der Retentionszeiten für die negativ geladenen Analyten wie B₃ oder das Vitamin C, kann nicht festgestellt werden. Für die Vitamine B₆ und B₁₂ sinkt die Auflösung von Struktur A nach C. In den vorhergehenden Untersuchungen konnte stets ein Anstieg der Auflösung mit Vitamin B₁₂ durch die Addition von Polymer erreicht werden. Die Addition der Strukturen mit einer Maltotriosemodifizierung wirkt sich negativ auf die Auflösung von Vitamin B₁₂ aus. Darüber hinaus kann eine schmale Peakbreite für diese Vitamine festgestellt werden. In Kombination mit den verkürzten Retentionszeiten resultiert ein Abfall der theoretischen Böden für B₂, B₆ und B₁₂. Für die Vitamine C und B₃ kommt es von Struktur A hin zur offenen Struktur C zu einem geringen Abfall der Trennleistung, was durch verschlechterte Peak-Symmetrie verursacht wird.

Für das Vitamin B₁ kann ein Anstieg der theoretischen Böden von Struktur A hin zu C festgestellt werden. Jedoch liegen die Trennleistungen nach der Addition der Polymere unterhalb derer ohne Polymerzugabe.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Addition von PEI-OS-Architekturen zu der mobilen Phase in der HPLC kaum eine signifikante Änderung der Trenneffizienz bringt. Die Verwendung der PEI-OS-Architekturen als Zusatz zu der mobilen Phase bringt somit unter den genutzten Bedingungen keine signifikante Optimierung. Weitere Experimente in anderen pH-Bereichen könnten interessant sein und bessere Ergebnisse erzielen. Aufgrund der bereits guten Auftrennung von Vitamingemischen, sollten weitere Analyten getestet werden, bei denen eine Auftrennung problematischer ist. Hier wären beispielsweise Steroid-Derivate interessant. Das getestete Estradiol-Derivat zeigte bereits in den Ultrafiltrationsexperimenten elektrostatische Interaktionen mit den Kern-Schale-Polymeren. In Anbetracht der zunehmenden Umweltbelastung durch Steroide könnte eine gezielte und effektive Detektion dieser aus komplexen Gemischen äußerst interessant sein. Weitere HPLC-Experimente sind daher interessant. Für zukünftige Versuche sollte eine kovalente Modifizierung der HPLC-Säulenoberfläche durchgeführt und getestet werden. Hier könnten vor allem die PEI-Spacer-Architekturen interessant sein. Diese könnten analog zu den häufig verwendeten HPLC-Säulen mit unpolaren Seitenketten in einem Umkehrphasen-Modus getestet werden.

4.4.3 Addition von PEI-OS-Architekturen in der CE

4.4.3.1 CE Untersuchungen mit hydrophilen Vitaminen

Neben der TLC und HPLC wurden die PEI-OS-Architekturen als Additive zur mobilen Phase in der Kapillarelektrophorese getestet. Für die Kapillarelektrophorese wurde das Capel-105M System der Firma Lumex (Sankt Petersburg, Russland) mit einem UV/Vis Detektor genutzt. Die Probeninjektion fand mittels einer Druckänderung statt, wohingegen die Auftrennung mit Hilfe einer elektrischen Spannung von ± 20 kV erzielt wurde. Die Analyse fand bei einer Temperatur von 20 °C statt. Nach der Probeninjektion wurde die Probe im Kapillar-Einlass gesammelt und die Elektrode wieder in die Pufferlösung getaucht. Als Kapillare wurde eine aktivierte 50 cm lange kommerziell erhältliche *Fused Silika* Kapillare mit einer Polyimidbeschichtung verwendet. Nach 45 cm wurde ein Sichtfenster für den Detektor gebrannt, um die Analyten zu detektieren. Für die Auswertung der Elektropherogramme wurde die Software Elforun der Firma Lumix genutzt. Die PEI-OS-Architekturen wurden in den Elektrolyten (*background electrolyte buffer*, BGE), in diesem Fall ein PBS-Puffer mit pH-Wert 7,0 (20 mM), hinzugegeben. Als interner Standard für den elektroosmotischen Fluss wurde DMSO genutzt. Vor jeder Messung wurde dieser in einem separaten Versuch bestimmt. Durch die Vorbehandlung der Kapillare lagen die Hydroxid-Gruppen an den Kapillarwänden deprotoniert vor. Als PEI-OS-Architekturen wurden die Strukturen PEI-25k-Mal A und C, sowie PEI-25k-Mal-III A und C ausgewählt. Die bei pH 7,0 positiv geladenen Kern-Schale-Architekturen interagieren mit den negativ geladenen Kapillarwänden über elektrostatische Wechselwirkungen und lagern sich an den Kapillarwänden ab. Sie bilden eine nicht-kovalente, dynamische Modifizierung der Kapillare. Eine Ausnahme stellt das PEI-25k-Mal A dar, das bei einem pH-Wert von 7,0 neutral bis nur schwach kationisch geladen vorliegt. Unter diesen Bedingungen liegt diese Struktur folglich als eine pseudostationäre Phase in dem BGE vor. Eine Adsorption an den Kapillarwänden kann nicht ausgeschlossen werden. Dennoch ist die Modifizierung aufgrund der nur geringen bis keiner Ladung äußerst schwach. Auf diese Art und Weise ist es möglich, Unterschiede zwischen einer kationisch, dynamischen Modifizierung der Kapillarwände und der Addition einer pseudostationären Phase zu untersuchen. Als Analyten dienen wasserlöslichen Vitamine sowie Adenosin-Derivate, die aufgrund ihrer Ladung entsprechend mit dem elektroosmotischen Fluss (*electroosmotic flow*, EOF) bzw. mit den Kern-Schale-Architekturen interagieren und entweder mit oder gegen den EOF wandern. Für die Detektion wird eine Wellenlänge von 220 nm für die wasserlöslichen Vitamine und 260 nm für die Adenosin-Derivate genutzt.

Als Vergleichsmessung werden wasserlöslichen Vitamine in reinem PBS-Puffer aufgetrennt. Das Elektropherogramm (**Abbildung 70**) zeigt fünf Signale für sechs wasserlösliche Vitamine bei einer angelegten Spannung von +25 kV. Die Vitamine B₆ und B₁₂ ergeben ein gemeinsames Signal, das nicht weiter aufgetrennt werden kann.

Die Vitamine werden in Abhängigkeit ihrer Ladung mit dem BGE transportiert. Das Vitamin B₁ wird als leicht positiv geladener Analyt zuerst detektiert (2,7 Minuten). Es zeigt einen deutlichen *tailing*-Effekt. B₂, als neutraler bis leicht negativ geladener Analyt, folgt kurz darauf bei 3,9 Minuten und kann nahezu mit dem Signal des EOFs (3,7 Minuten) detektiert werden. Nach dem Signal des EOFs wird zunächst das gemeinsame Signal von B₆ und

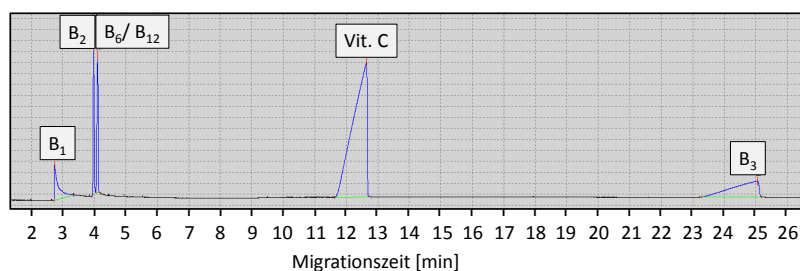


Abbildung 70: Elektropherogramm von hydrophilen Vitaminen in PBS-Puffer bei angelegter Spannung von +25 kV.

B₁₂ gemessen (4,1 Minuten). Nach einiger Zeit kann bei 12,7 Minuten das stärker negativ geladene Vitamin C detektiert werden. Zuletzt wird das ebenfalls negativ geladene Vitamin B₃ nach einer Migrationszeit von 25,1 Minuten detektiert. Bei einer inversen Spannung von -25 kV können keine Signale der Vitamine innerhalb einer Messzeit von 40 Minuten gemessen werden.

Durch die Addition des Polymers PEI-25k-Mal A konnten nicht alle Vitamine mit einer positiven Spannung von +25 kV durch die Kapillare transportiert werden (**Abbildung 71**). Die Vitamine zeigen deutlich veränderte Migrationszeiten im Vergleich zu reinem PBS-Puffer. Es können lediglich die Signale für B₁ nach 4,7 Minuten, B₂ nach 10,6 Minuten und ein gemeinsames Signal für B₆/ B₁₂ nach 11,9 Minuten detektiert werden. Die Signale für B₁ und B₆/ B₁₂ sind verbreitert und zeigen einen *tailing*-Effekt. Der zuvor separat bestimmte EOF ist ebenfalls deutlich verändert und von 3,7 Minuten in PBS hin zu 11,1 Minuten nach Polymerzusatz verschoben. Es können somit deutliche Effekte durch die Addition des Polymers als pseudostationäre Phase bzw. als schwache Modifizierung der Kapillärwände festgestellt werden. Die Änderung der Migrationszeit ist für die Vitamine B₂ und B₆/ B₁₂ besonders deutlich. Es findet eine gut messbare Erhöhung der Migrationszeiten durch eine Interaktion mit dem PEI-25k-Mal A statt. In negativer Richtung können die Signale des Vitamins B₃ und C gemessen werden, die in reinem PBS-Puffer nur bei einer positiven Spannung detektiert werden können. Der EOF liegt bei einer Migrationszeit von 6,5 Minuten. Das Signal für B₃ kann nach einer Migrationszeit von 7,8 Minuten und das Signal für das Vitamin C nach 11,8 Minuten detektiert werden. Sie zeigen eine deutliche Verbreiterung (*tailing*). Der Einfluss auf die Migrationszeiten der Analyten ist somit nach der Addition des Polymers deutlich.

Bei der Verwendung von PEI-25k-Mal mit der offenen Struktur C kann nur B₁ bei positiver Spannung mit einer Migrationszeit von 10,0 Minuten detektiert werden (**Abbildung 72 oben**).

Durch die Addition des Polymers findet eine kationische, dynamische Modifizierung der Kapillärwand statt, wodurch ein deutlicher Einfluss auf das Migrationsverhalten der Analyten zu beobachten ist. Ohne Polymer können alle Analyten mit einer positiven Spannung durch die Kapillare transportiert werden. Nach der Addition des Polymers und somit der Modifizierung der Kapillärwände ist dies nicht mehr möglich. In positiver Richtung ergibt sich nur für B₁ ein verbreitertes Signal. Es findet somit eine noch spätere Detektion wie bei Struktur A statt. Im Vergleich zu reinem PBS-Puffer, in dem B₁ bei einer Migrationszeit von 2,7 Minuten detektiert werden konnte, ist mit PEI-25k-Mal eine deutliche Interaktion feststellbar.

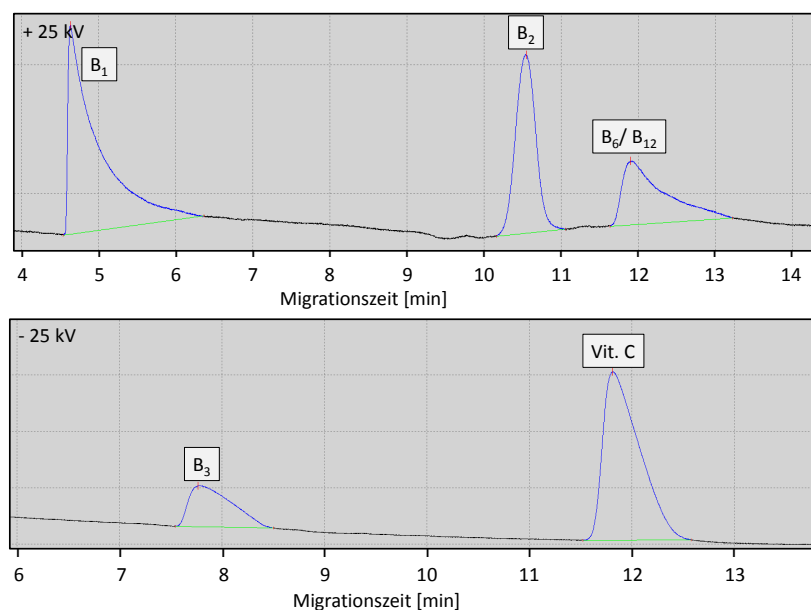


Abbildung 71: Elektropherogramm der hydrophilen Vitamine mit Addition von PEI-25k-Mal A in den Elektrolytpuffer.

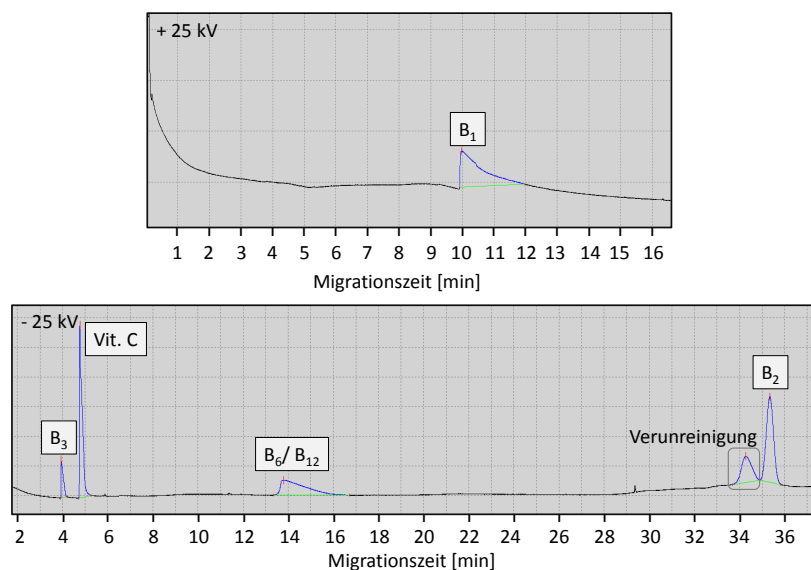


Abbildung 72: Elektropherogramm der hydrophilen Vitamine mit Addition von PEI-25k-Mal C in den Elektrolytpuffer.

Bei einer negativen Spannung ergeben die negativ geladenen Vitamine B₃ und C scharfe Signale bei einer Migrationszeit von 3,9 bzw. 4,7 Minuten. Die Auftrennung des gemeinsamen Signals von B₆/ B₁₂ gelingt auch mit diesem Polymer nicht. Ein gemeinsames Signal kann nach 13,7 Minuten nahe des EOFs gemessen werden. Das neutrale bis schwach negativ geladene Vitamin B₂ weist eine sehr langsame Migrationsgeschwindigkeit auf und wird in negativer Richtung erst nach 35,2 Minuten detektiert.

Zusammenfassend können deutliche Unterschiede zwischen einer Addition der Polymere PEI-25k-Mal A und C festgestellt werden. Bei der Addition von Struktur A findet aufgrund der nicht sehr stark ausgeprägten positiven Ladung des Polymerkerns keine Adsorption an

der Kapillarwand statt. Das PEI-25k-Mal A fungiert als ein Additiv bzw. als pseudostationäre Phase, die mit den BGE durch die Kapillare bewegt wird. Im Fall von PEI-25k-Mal C findet aufgrund der hohen positiven Ladung des Polymerkerns eine Adsorption an der Kapillarwand statt. Diese kationische, dynamische Modifizierung ergibt deutlichere Effekte auf das Migrationsverhalten der getesteten Analyten. Im Folgenden wird daher nur diese Art der Modifizierung verwendet.

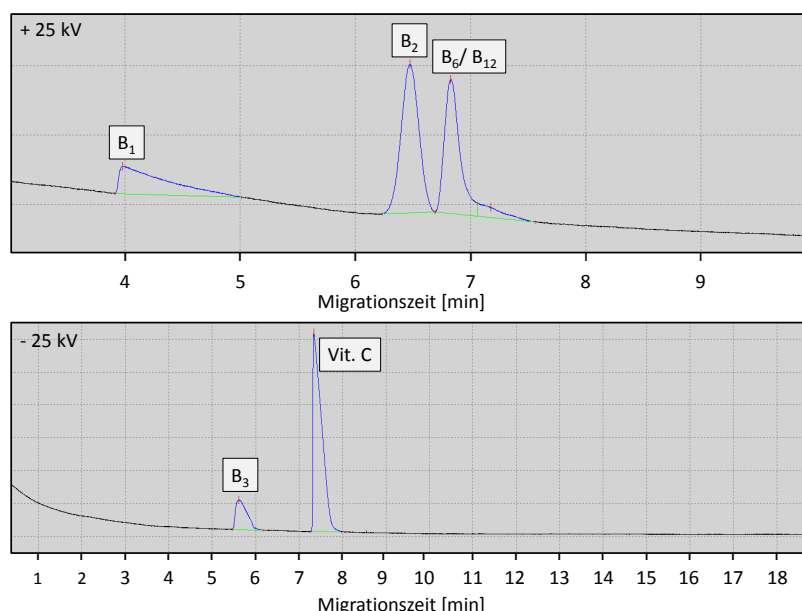


Abbildung 73: Elektropherogramm der hydrophilen Vitamine mit Addition von PEI-25k-Mal-III A in den Elektrolytpuffer.

Bei der Auftrennung der wasserlöslichen Vitamine können mit einer positiven Spannung und PEI-25k-Mal-III Struktur A als Additiv drei Signale detektiert werden (**Abbildung 73**). Das positiv geladene B₁ wird relativ schnell durch die Kapillare transportiert und weist eine Migrationszeit von 4,0 Minuten auf. Jedoch wird ein sehr breites Signal erhalten, mit einer geringen Effizienz. Das Signal des Vitamins B₂ kann vor dem gemeinsamen Signal von B₆/B₁₂ in positiver Richtung bei 6,5 Minuten gemessen werden. Das Signal von B₆/B₁₂ kann bei einer Migrationszeit von 6,8 Minuten detektiert werden. Es fällt auf, dass die Auftrennung ähnlich zu dem Ergebnis nach Addition von PEI-25k-Mal A ist, obwohl eine unterschiedliche Modifizierung der Kapillaren vorliegen sollte. Im Gegensatz zu PEI-25k-Mal A weist die Maltotriosemodifizierung PEI-25k-Mal-III A eine deutliche positive Kernladung auf und sollte mit den Kapillarwänden interagieren und eine dynamische Modifizierung bewirken. Die Restaurationszeiten sind in beiden Fällen deutlich unterschiedlich zu denen ohne Polymeraddition. Bei der Addition von PEI-25k-Mal-III A verringern sich die Migrationszeiten im Vergleich zu den Zeiten, die bei PEI-25k-Mal A erhalten wurden. Dennoch wäre ein größerer Unterschied zu erwarten gewesen.

In negativer Richtung können die Vitamine B₃ und C detektiert werden. Sie weisen Migrationszeiten von 5,6 und 7,3 Minuten auf.

Anhand der vorhergehenden Versuche kann geschlossen werden, dass die offenere Struktur C einen größeren Einfluss auf die Auftrennung ausübt als die geschlossene Oligosaccharid-Struktur. Die Größe des Oligosaccharids scheint eine marginale Rolle zu spielen. Um diese

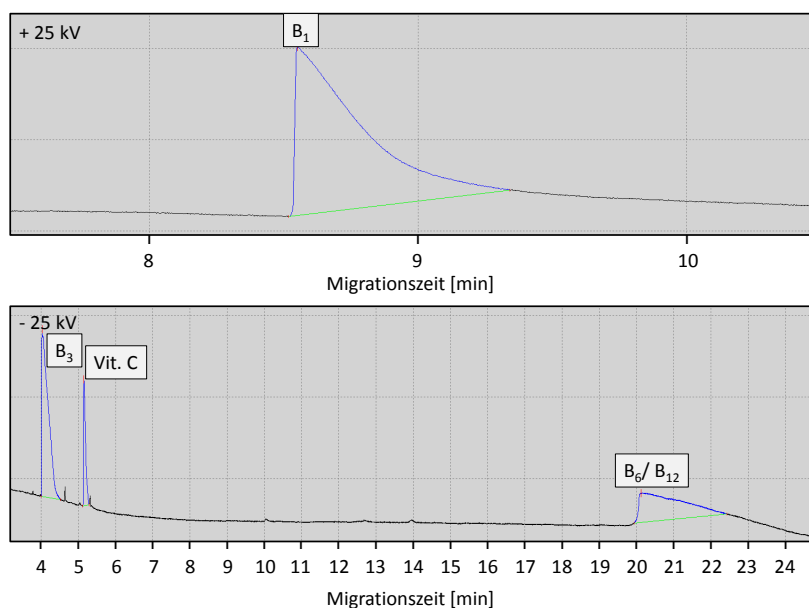


Abbildung 74: Elektropherogramm der hydrophilen Vitamine mit Addition von PEI-25k-Mal-III C in den Elektrolytpuffer.

Vermutung zu untersuchen, wurden Versuche mit PEI-25k-Mal-III C durchgeführt (**Abbildung 74**). Mit dieser offenen Maltotrioseschale können ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie bei PEI-25k-Mal C. Mit einer positiven Spannung kann erneut nur Vitamin B₁ mit einer Migrationszeit von 8,5 Minuten detektiert werden. Mit einer negativen Spannung wird zunächst das Vitamin B₃ bei 4,0 Minuten gemessen. Nach 5,1 Minuten kann das Vitamin C detektiert werden. Mit einer erhöhten Migrationszeit und einem deutlich verbreiterten Signal kann das gemeinsame Signal von B₆/ B₁₂ detektiert werden (20,1 Minuten). Auffällig ist, dass in negativer Richtung das Signal für B₂ nicht mehr innerhalb der Messzeit von 40 Minuten detektierbar ist. Die Mobilität dieses Vitamins wird vermutlich durch die Interaktion mit dem Polymer derart verlangsamt, dass eine Detektion innerhalb der Messzeit nicht möglich ist.

Die Effizienz der Auftrennung der einzelnen Analyten kann durch die Software Elforum berechnet werden. Da jedoch die Analyten bei unterschiedlichen Spannungen (positive bzw. negative Richtung) detektiert wurde, kann ein Vergleich nur mit Vorsicht und unter Berücksichtigung dieser Tatsache vorgenommen werden. Es werden daher die Migrationszeiten der einzelnen Vitamine näher betrachtet (**Tabelle 14**). Bei einem Vergleich der einzelnen Migrationszeiten fällt auf, dass durch die Addition an Polymer die Migration der Analyten verlangsamt wird. Dies lässt auf Interaktionen schließen. Diese sind umso stärker, je offener die Oligosaccharidschale vorliegt. Es wird deutlich, dass die Addition von PEI-OS-Architekturen deutliche Effekte auf die Auftrennung und das Migrationsverhalten der hydrophilen Vitamine ausübt. Eine weitere Optimierung der Auftrennung kann jedoch nicht erzielt werden.

Tabelle 14: Übersicht der Migrationszeiten [min] der einzelnen Vitamine mit und ohne Addition des jeweiligen Polymers zu der mobilen Phase (PBS-Puffer, pH 7,0). Positives Vorzeichen bedeutet eine Spannung von +25 kV und negatives Vorzeichen -25 kV.

Vitamin	PBS	Migrationszeiten [min]			
		PEI-25k-Mal		PEI-25k-Mal-III	
		A	C	A	C
B ₁	2,7	4,7	10,0	4,0	8,5
B ₂	3,9	10,6	-35,2	6,5	-
B ₃	25,1	-7,8	-3,9	-5,6	-4,0
B ₆ / B ₁₂	4,1	-13,8	-14,7	6,8	-20,1
Vit. C	12,7	-11,8	-4,7	-7,3	-5,1

4.4.3.2 CE Untersuchungen mit Adenosin-Derivaten

Neben den wasserlöslichen Vitaminen wurden Adenosin-Derivate als Analyten getestet (**Abbildung 75**).

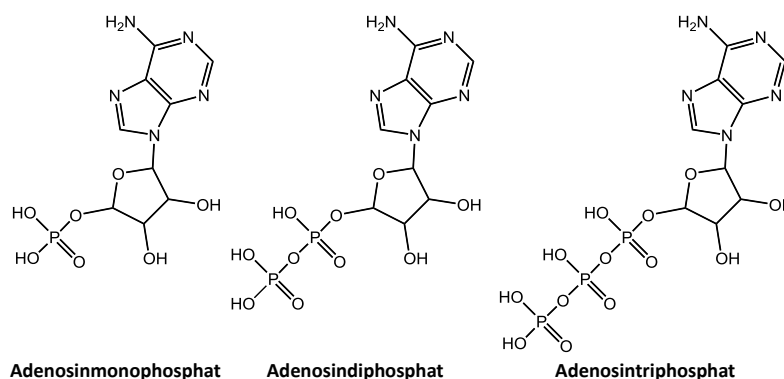


Abbildung 75: Übersicht der verwendeten Adenosin-Derivate mit Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP).

Mit reinem Phosphatpuffer als mobile Phase weisen die Adenosin-Derivate eine äußerst geringe Mobilität auf und können weder mit positiver noch negativer Spannung innerhalb der Messzeit von 40 Minuten detektiert werden.

Nach der Addition der Polymere können Signale für die Adenosin-Derivate innerhalb kurzer Messzeiten erhalten werden. Alle Adenosin-Derivate wurden mit den PEI-OS-Architekturen in negativer Richtung bei 260 nm gemessen. Ein Vergleich der einzelnen PEI-OS-Architekturen zeigt, dass die Addition von PEI-OS in den Elektrolytpuffer deutliche Auswirkungen auf die Mobilität der Adenosin-Derivate und deren Migrationszeiten hat. Ohne Polymer weisen die Adenosin-Derivate eine so geringe Mobilität auf, dass sie nicht detektiert werden können. Nach einer Addition der Kern-Schale-Architekturen können die Adenosin-Derivate innerhalb von 15 Minuten detektiert werden (**Tabelle 15**).

Bei einer negativ angelegten Spannung sollten die am stärksten negativ geladenen Analyten die höchste Migration aufweisen und somit zuerst detektiert werden. Die angenommene Reihenfolge der Migration der Adenosin-Derivate wäre: ATP, ADP und schließlich AMP. Bei den Strukturen mit einer sehr dichten Oligosaccharidschale kann dieses zu erwartende Migra-

Tabelle 15: Übersicht der Migrationszeiten [min] der einzelnen Adenosin-Derivate mit und ohne Addition des jeweiligen Polymer zu der mobilen Phase (PBS-Puffer, pH 7,0). Die Detektion der Signale fand bei Spannung von -25 kV statt (negatives Vorzeichen).

Vitamin	Migrationszeiten [min]				
	PBS	PEI-25k-Mal		PEI-25k-Mal-III	
		A	C	A	C
ATP	-	-4,8	-	-7,0	-5,0
ADP	-	-6,2	-9,6	-7,4	-7,6
AMP	-	-6,5	-4,4	-11,2	-4,5

tionsverhalten nachgewiesen werden. Überraschenderweise kann jedoch bei den offenen Strukturen C ein nahezu inverses Migrationsverhalten der Analyten festgestellt werden. Sowohl bei PEI-25k-Mal C als auch bei PEI-25k-Mal-III C wird das weniger stark geladene Adenosinmonophosphat (AMP) vor den Derivaten mit einer höheren Ladung detektiert. Im Fall von PEI-25k-Mal C ist eine Detektion des am stärksten negativ geladenen ATP sogar nicht mehr innerhalb der Messzeit von 40 Minuten möglich. Es können in diesem Fall deutliche elektrostatische Interaktionen der negativ geladenen Analyten mit den positiv geladenen Polymerkernen nachgewiesen werden. Da bei der offenen Struktur C die positive Kernladung weniger durch die Oligosaccharidschale abgeschwächt wird, können verstärkt elektrostatische Interaktionen beobachtet werden. Diese sind umso stärker, je stärker der Analyt geladen ist. In diesem Fall bedeutet dies, dass die Interaktion mit ATP die stärkste darstellt und somit der Analyt derart von den PEI-OS-Architekturen mit einer offenen Oligosaccharidschale zurückgehalten wird, dass er ein stark verlangsamtes Migrationsverhalten aufweist.

Wie bereits bei den wasserlöslichen Vitaminen ist der Einfluss der PEI-OS-Architekturen auf das Migrationsverhalten bei den offenen Strukturen C am größten. Der Einfluss der jeweiligen Oligosaccharide ist bei den durchgeführten Experimenten nur marginal und es können ähnliche Effekte für Maltose und Maltotriose gefunden werden. Der Einfluss der Oligosaccharidschale ist jedoch deutlich sichtbar.

Die Signale der Adenosin-Derivate weisen starke Verbreiterungen auf. Eine optimierte Auftrennung kann somit auch bei Zusatz der PEI-OS-Architekturen nur bedingt erhalten werden. Die auftretenden Interaktionen und die daraus resultierenden Migrationszeiten zeigen jedoch, dass die PEI-OS-Architekturen deutliche Effekte bewirken. Aufgrund der Möglichkeit alle Adenosin-Derivate bei einer negativen Spannung zu detektieren, können mit der Software Elforun die Effizienz der Auftrennung der einzelnen Analyten berechnet werden. Somit ist es möglich die Effizienz der Auftrennung der einzelnen PEI-OS-Architekturen untereinander vergleichen zu können (**Abbildung 76**).

Obwohl bereits positive Effekte durch die Addition von PEI-OS-Architekturen bei der Auftrennung von Proteinen erzielt worden sind,^[98] kann im Fall der hydrophilen Vitamine keine Verbesserung der Trennleistung erzielt werden. Aufgrund von deutlichen Änderungen des Migrationsverhaltens der Analyten ist ein Einfluss der PEI-OS-Architekturen jedoch sehr gut zu beobachten. Weitere Experimente in anderen pH-Bereichen, bei denen die Analyten stärker dissoziiert vorliegen, könnten interessant sein.

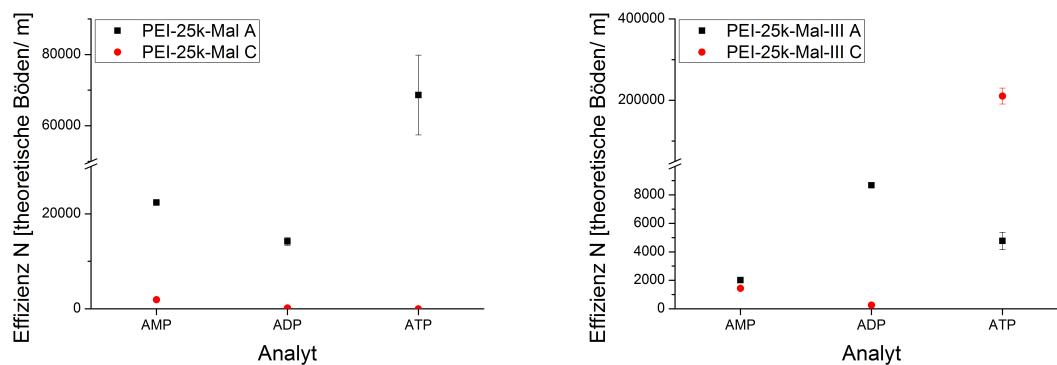


Abbildung 76: Vergleich der Effizienzen der Auftrennung der Adenosin-Derivate nach Addition der PEI-OS-Architekturen in den Elektrolytpuffer (PBS-Puffer, pH 7,0).

Bei der Auftrennung von Adenosin-Derivaten ist durch die Addition der PEI-OS-Architekturen eine Detektion möglich, die mit reinem Puffer als Elektrolyten nicht erzielt werden kann. Da die Signale jedoch starke Verbreiterungen aufweisen, sollten weitergehende Versuche bei zum Beispiel unterschiedlichen Polymerkonzentrationen oder pH-Werten durchgeführt werden, um bessere Auftrennungsbedingungen zu finden. Die starken Interaktionen, die deutlich veränderte Migrationszeiten der Analyten verursachen, erscheinen sehr interessant und könnten für weitere Optimierungen genutzt werden.

4.5 Modifizierung von Silika-Partikeln mit PEI-OS-Architekturen

4.5.1 Synthese und Charakterisierung modifizierter Silika-Partikel

Um eine effektivere Optimierung der Trennleistung für die TLC, HPLC und CE zu erzielen, sollten die polymeren Architekturen nicht nur als Additive hinzugegeben werden, sondern in Form von modifizierten Partikeln als neuartige stationäre bzw. pseudostationäre Phase genutzt werden. Hierfür wurden Silika-Nanopartikel ausgewählt, deren Synthese in der Literatur bereits gut etabliert und kostengünstig ist.^[177] Eine häufig genutzte *bottom-up* Synthese für Silika-Nanopartikel ist die Stöber-Methode.^[178] Bei dieser Methode werden Alkylsilikate in ammoniakhaltigen, alkoholischen Lösungen hydrolysiert. In saurem Milieu bilden sich während der Hydrolyse kettenförmige und verzweigte Silika-Oligomere, wohingegen im alkalischen Bereich kugelförmige Partikel gebildet werden. Die Synthese von Partikeln einheitlicher Größe und sphärischer Form ist somit möglich.^[178] Bei einer direkten Verwendung von unmodifizierten Silika-Partikeln als pseudostationäre Phasen in der Chromatographie können Schwierigkeiten aufgrund fehlender Oberflächenladungen auftreten. Weiterhin kann es in Folge von unzureichender Suspendierung der Partikel in der mobilen Phase zu einem Verstopfen der Säule bzw. Kapillare kommen. Um diese Probleme zu lösen und effektivere stationäre bzw. pseudostationäre Phasen generieren zu können, kann die Oberfläche der Partikel mit diversen Additiven modifiziert werden.^[179, 180] Beispiele hierfür sind Edelmetalle, Metalloxide und kohlenstoffbasierende Nanomaterialien, wie Fullerene oder Kohlenstoffnanoröhren oder auch Polymere. Die Anbindung der Polymere an die Oberfläche der Partikel kann zum einen durch Physisorption oder durch stärkere kovalente Bindungen erzielt werden. Es kann zwischen einer sogenannten *grafting-to* Methode und einer *grafting-from* Methode unterschieden werden. Bei der erst genannten wird ein bereits fertig vorliegendes Polymer auf die Oberfläche angebunden. Bei der *grafting-from* Methode findet eine Polymerisation direkt auf der Partikeloberfläche statt. Ein Problem bei der Anbindung von Polymeren auf die Partikeloberfläche stellt die sterische Hinderung und Abstoßung der Polymere untereinander dar, wodurch nur eine geringe Modifizierung der Oberfläche auftreten kann. Um diese Probleme zu umgehen, werden die Polymere häufig nicht direkt an die Partikeloberfläche angebunden, sondern über Abstandshalter bzw. Spacer kovalent gebunden. Zumeist werden Organosilane mit funktionellen Gruppen genutzt, an die das Polymer angebunden werden kann.

Die bereits vorgestellten PEI-OS-Kern-Schale-Architekturen sowie die PEI-Spacer-Architekturen bieten aufgrund ihrer Eigenschaften diverse Vorteile für die Modifizierung von Partikeloberflächen. Aufgrund der positiven Kernladung des PEIs in Lösung liegen keine neutralen stationären bzw. pseudostationären Phasen vor. Elektrostatische Wechselwirkungen mit den Analyten können generiert und für eine verbesserte Auftrennung genutzt werden. Weitere nicht-kovalente Wechselwirkungen können durch die Modifizierung mit Kern-Schale Architekturen ermöglicht und genutzt werden. Denkbar wären nicht-kovalente Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophil/hydrophobe-, Dispersions- oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Diese könnten maßgeblich die Selektivität durch ein unterschiedlich starkes Zurückhalten der Analyten erhöhen. Weiterhin sollten die modifizierten PEI-OS-Partikel aufgrund der Zuckerfunktionalitäten eine verbesserte Suspendierbarkeit als unmodifizierte Partikel aufweisen.

Die Synthese der funktionalisierten Nanopartikel wurde im Rahmen der Bachelor-Arbeit von *Florian Gruber* aus dem Arbeitskreis *Appelhans* durchgeführt. Die Synthese von nicht porösen Silika-Nanopartikel und deren Funktionalisierung mit (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan (GPS) wurden umfangreich und vollständig charakterisiert. Die erfolgreiche Synthese von monomodalen Silika-Partikeln und deren Funktionalisierung mit GPS konnte von *Florian Gruber* nachgewiesen werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten weitere Funktionalisierungen mit Kern-Schale-Architekturen durchgeführt werden. Die weitere Optimierung der Synthesen wurde im Zuge dieser Dissertation durchgeführt und die Charakterisierung vervollständigt.

Die finale Funktionalisierung der Nanopartikel mit Kern-Schale-Architekturen wurde mit Hilfe von dynamischer Lichtstreuung (DLS), Rasterelektronenmikroskopie (REM), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sowie gekoppelt mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (TEM-EDX), Rasterkraftmikroskopie (AFM), diffuser Reflexions-Fouriertransformationsinfrarotspektroskopie (DRIFTS), Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS), thermogravimetrischer Analyse (TGA) und Massenspektrometrie-Pyrolyse-Gaschromatographie (Pyrolyse-GC-MS) untersucht und deren Erfolg bestätigt.

Aufgrund von abweichenden Syntheseparametern (Temperatur und geringfügige Ungenauigkeit bei der Zugabe der Reaktanden), sind die Radien verschiedener Chargen bei der Synthese der unmodifizierten Silika-Partikel nicht einheitlich. Eine einheitliche Größenverteilung ist für eine Anwendung der Partikel in chromatographischen Apparaturen jedoch essentiell. Ohne eine einheitliche Größe der Partikel kommt es zu Peak-Verbreiterungen und somit zu einer Verschlechterung der Auflösung.^[181] Auch wenn unterschiedliche Chargen der unmodifizierten Silika-Partikel verschiedene Größen aufweisen, konnte innerhalb einer Charge eine einheitliche Größe festgestellt werden. Partikel einer Charge erfüllen somit die Voraussetzung einer monomodalen Verteilung.

4.5.1.1 Synthese und Charakterisierung von PEI-Spacer-modifizierten Partikeln

Da häufig eine Umkehrphasen-Modifizierung mit unpolaren Seitenketten in kommerziell erhältlichen Chromatographie-Säulen vorliegt, wurden zunächst Nanopartikel mit PEI-Spacer-Architekturen modifiziert und charakterisiert. Die PEI-Spacer-Architekturen wurden mittels einer *grafting-to*-Modifizierung auf die Partikeloberfläche aufgebracht. Ein schematischer Ablauf der Modifizierung ist in **Abbildung 77** gezeigt.

Die Silika-Partikel (I.) werden mittels GPS mit einer Epoxid-Gruppe funktionalisiert (II.). Die gut zugängliche Amino-Funktionalität der Spacer, die aus der Maltoseschale herausragt, reagiert mit der Epoxid-Gruppe unter Ringöffnung. Somit kann eine kovalente Anbindung der PEI-Spacer-Architekturen (PEI-5k-(C11-NH₂)-Mal und PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal) an Silika-Partikel mit Hilfe des GPS erhalten werden (III.).

Diese Partikel wurden umfangreich charakterisiert. Mit Hilfe von DLS-Messungen konnte im Mittel eine Größe von 450 nm für die PEI-Spacer-modifizierten Partikel festgestellt werden. Die Durchmesser der Partikel können ebenfalls anhand von TEM- bzw. REM-Aufnahmen vermessen werden. Hierbei ergeben sich wesentlich kleinere Radien als im Vergleich zu den hydrodynamischen Radien, die bei der DLS in Anwesenheit einer Solvathülle gemessen wurden.

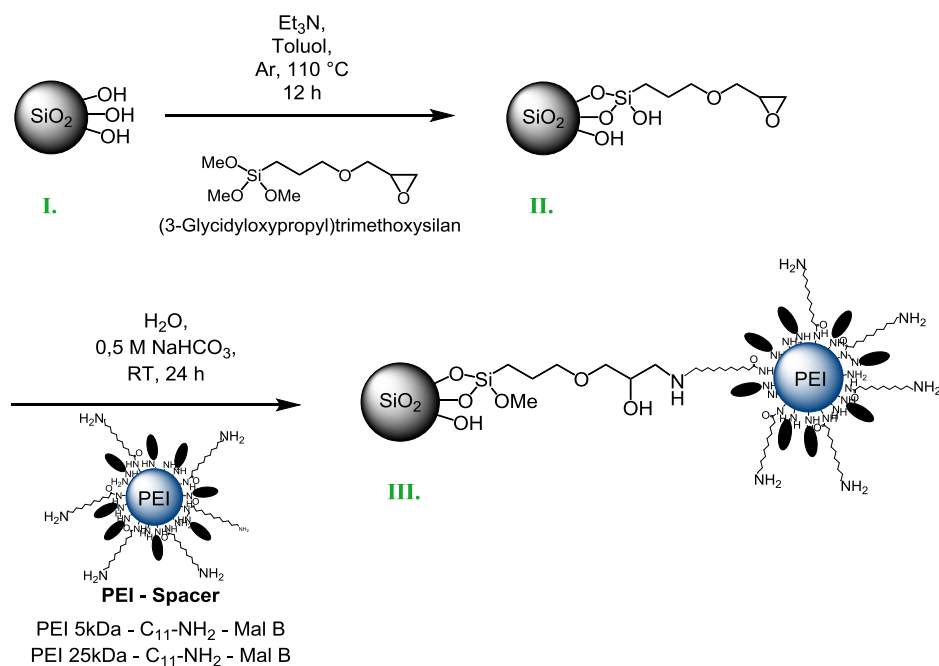


Abbildung 77: Übersicht der Modifizierung der Partikeloberfläche mit PEI-Spacer-Architekturen. Die SiO_2 -NP wurden mit (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan (GPS) modifiziert. Die Epoxid-funktionalisierten Nanopartikel wurden mit den PEI-Spacer-Architekturen mit einer mittleren Schalendichte und verschiedenen Kerngrößen funktionalisiert.

Die Modifizierung der Partikeloberfläche der SiO_2 -NP kann mit Rasterelektronenmikroskopie-Untersuchungen verdeutlicht werden. In **Abbildung 78** sind die unmodifizierten Silika-Partikel (SiO_2 -NP) zu sehen. Sie weisen eine homogene, glatte Oberfläche ohne Poren auf. Weiterhin wird eine einheitliche Größenverteilung ebenfalls deutlich.

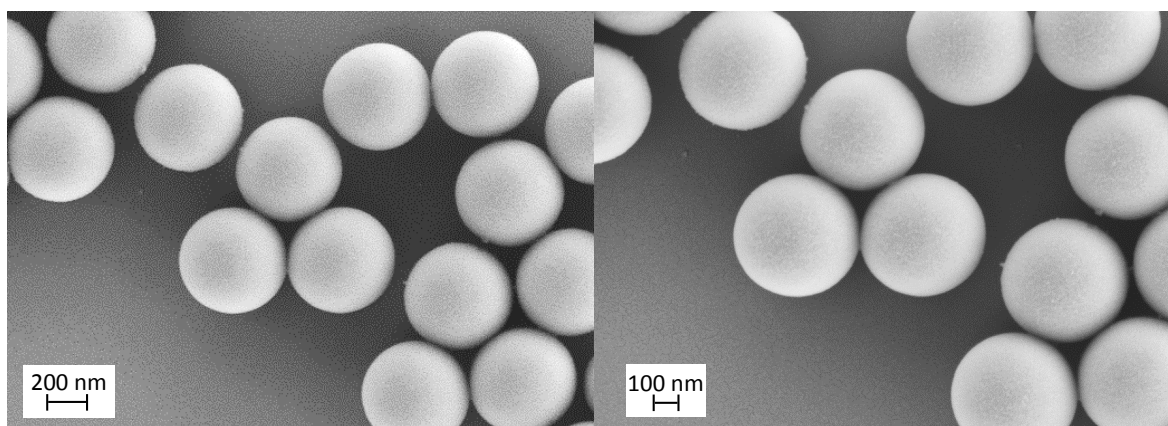


Abbildung 78: REM-Aufnahmen der unmodifizierten Silika-Partikel (SiO_2 -NP, I.).

Abbildung 79 (a) zeigt die silanisierten Silika-Nanopartikel mit der Epoxid-Funktionalität (Si-GPS (II.)). Im Vergleich zu den unmodifizierten Partikeln nimmt die Oberflächenrauigkeit zu (**Abbildung 79 (b)**). Die Modifizierung mit der PEI-25k-Spacer-Architekturen zeigt eine deutliche Änderung der Partikeloberfläche, sowohl in Bezug auf deren Rauigkeit als auch

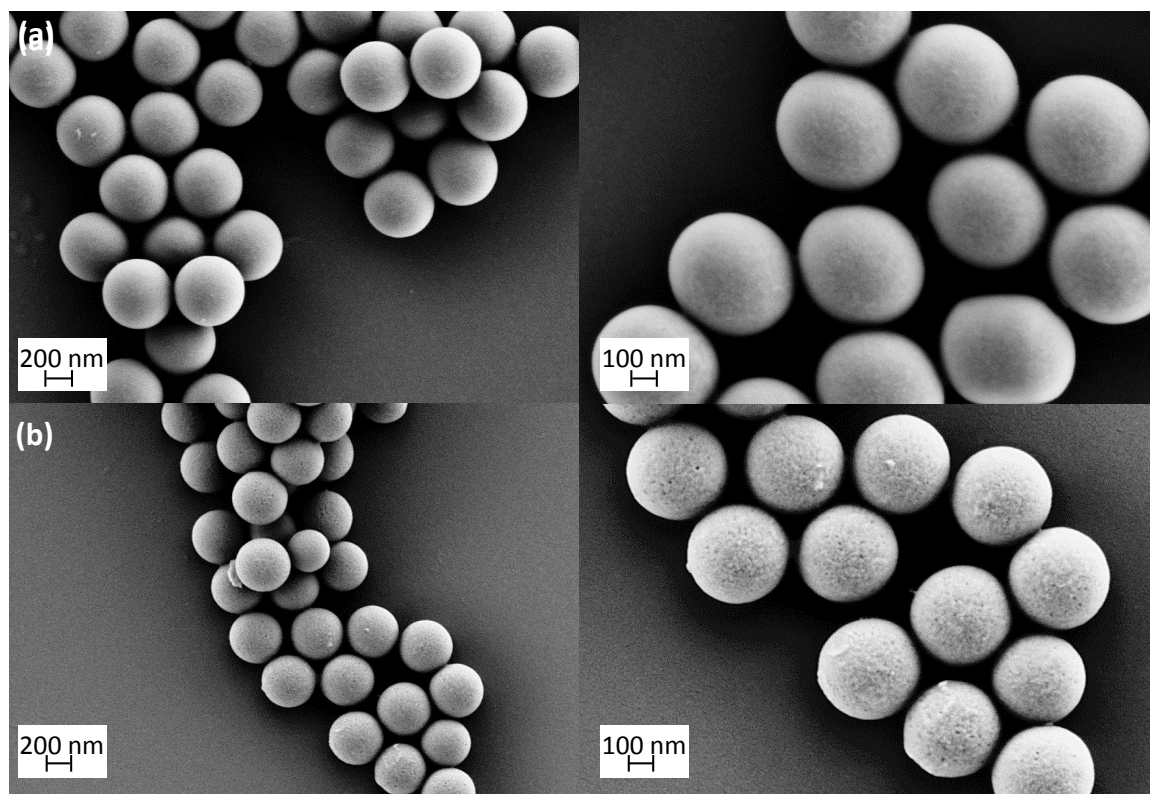


Abbildung 79: REM-Aufnahmen der GPS-modifizierten Silika-Partikel (a) und der mit PEI-25k-Spacer funktionalisierten Partikel (b) mit einer deutlichen Änderung der Oberfläche.

Struktur (Vergleich **Abbildung 78** mit **Abbildung 79 (b)**). REM-Untersuchungen der PEI-5k-Spacer (REM-Aufnahme siehe Anhang **Abbildung 106**) zeigen eine Aggregatbildung der modifizierten Partikel. Derart zusammen gelagerte Partikel wären für eine Anwendung als chromatographische Phase ungeeignet. Der Hauptfokus wurde daher auf die PEI-25k-Spacer modifizierten Silika-Partikel gelegt, bei denen isolierte Partikel beobachtet werden konnten.

Gleiche Beobachtungen in Bezug auf die PEI-Spacer-modifizierten Partikel können auch bei TEM-Untersuchungen gemacht werden (**Abbildung 80**). Auch mit dieser Methode wird eine Änderung der Oberflächenstruktur, insbesondere für die Modifizierung mit den PEI-25k-Spacer-Architekturen deutlich.

DRIFTS-Untersuchungen bestätigen ebenso eine erfolgreiche Modifizierung der Nanopartikel mit PEI-25k-Spacer-Architekturen. Eine Anbindung von PEI-25k-Spacer-Architekturen auf die Partikeloberfläche kann zusätzlich durch XPS-Untersuchungen unterstützt werden (**Abbildung 81 (a)-(d)**). Untersuchungen der GPS-funktionalisierten Partikel ((a) und (b)) und der Partikel mit angebundenen PEI-Spacer-Architekturen ((c) und (d)) zeigen einen deutlichen Anstieg der Intensität der Stickstoff- und Kohlenstoffpeaks bei den PEI-Spacer-modifizierten Partikeln.

Der Kohlenstoffpeak kann in fünf verschiedene Komponentenpeaks (A-E) unterteilt werden. Der größte Komponentenpeak A kann gesättigten Kohlenwasserstoffen (C_xH_y) zugeordnet werden. Der Komponentenpeak B zeigt bei den PEI-25k-Spacer-funktionalisierten Partikeln eine hohe Intensität und wird von vorzugsweise α -ständigen Kohlenstoffatomen von stark elektronegativen funktionellen Gruppen verursacht (Bsp.: $\underline{C}-C[O]O-R$, $\underline{C}-N$, usw.). Im Fall

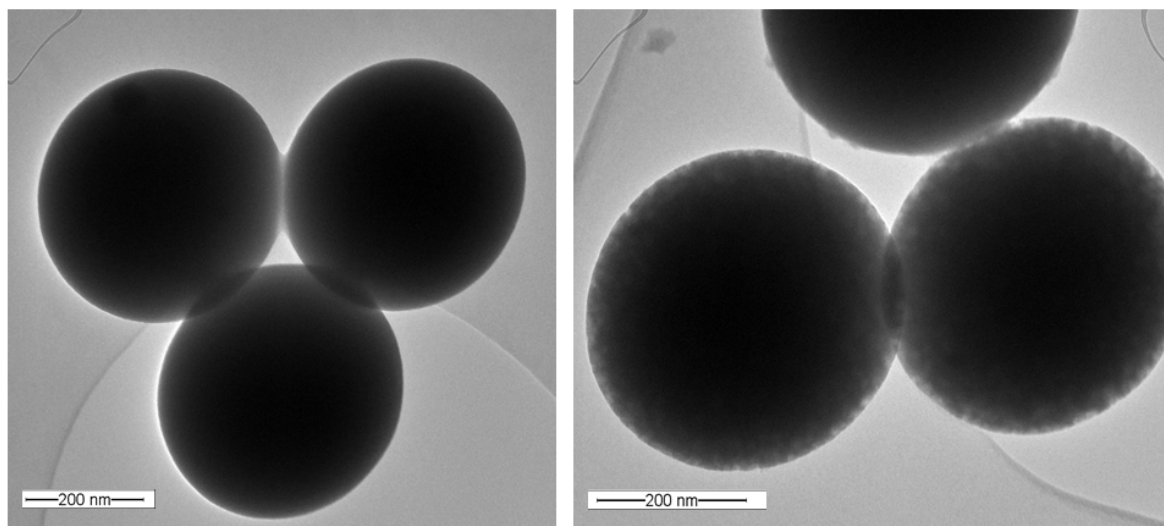


Abbildung 80: Vergleich der TEM Aufnahmen von unmodifizierten Silika-Partikeln (links) und mit PEI-25k-Spacer-Architekturen modifizierten Partikeln mit deutlicher Änderung der Oberfläche.

der GPS-funktionalisierten Partikel ist dieser Peak durch Verunreinigungen während der Synthese zu erklären. Der Komponentenpeak C wird von Kohlenstoffatomen in Alkohol- ($\text{C}-\text{OH}$) oder Ethergruppen ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) sowie alkoholeitigen Kohlenstoffatomen von Carbonsäureestergruppen ($\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{C}$) hervorgerufen. Bei den funktionalisierten Partikeln kann eine geringfügige Steigerung der Intensität des Komponentenpeaks C festgestellt werden. Dieser wird von den $\text{C}-\text{O}$ -Bindungen der Maltose verursacht. Der Komponentenpeak D ist für die GPS-funktionalisierten Partikel von besonderem Interesse, da er durch die Epoxidfunktionalität verursacht wird. Der Komponentenpeak D' bei den PEI-Spacer-funktionalisierten Partikeln zeigt im Vergleich zum Komponentenpeak D verringerte Bindungsenergien. Dieser Peak kann zum Teil den Kohlenstoffen der Halbacetalgruppen ($\text{O}-\text{C}-\text{O}$) der Maltose zugeordnet werden. Aufgrund der hohen Intensität haben jedoch auch Kohlenstoffatome von Verunreinigungen einen Anteil an diesem Peak. Der Komponentenpeak E wird von Kohlenstoffen in Carbonsäuren bzw. Carbonsäureestern hervorgerufen. Dieser Peak könnte durch eine Oxidation des GPS und einer Alterung der PEI-OS-Architekturen zu erklären sein. Da der Peak bereits bei den unmodifizierten Partikeln auftaucht, ist er vermutlich auf Verunreinigungen während der Synthese bzw. Aufreinigung zurückzuführen.

Im Vergleich zu dem XPS-Spektrum der GPS-modifizierten Partikel lässt sich nach der Reaktion mit der PEI-25k-Spacer Architektur eine deutliche Erhöhung der Intensität der Stickstoffpeaks N 1s erkennen (**Abbildung 81** (d)). Dieser muss aufgrund von *Tailing* auf der höher-energetischen Seite in drei separate Komponentenpeaks zerlegt werden. Die Komponentenpeaks K und K' zeigen C-N Bindungen des PEI-Kerns. Das Protonierungsgleichgewicht der Aminogruppen des PEIs ($\text{C}-\text{NR}_2 + \text{H}_3\text{O} \rightleftharpoons \text{C}-\text{NH}^+\text{R}_2$) verursacht den Komponentenpeak L und steht somit für die protonierte Spezies $\text{C}-\text{NH}^+\text{R}_2$.

Mit Hilfe dieser Charakterisierungsmethoden kann eine Anbindung der PEI-25k-Spacer-Architekturen an die Partikeloberfläche bestätigt werden.

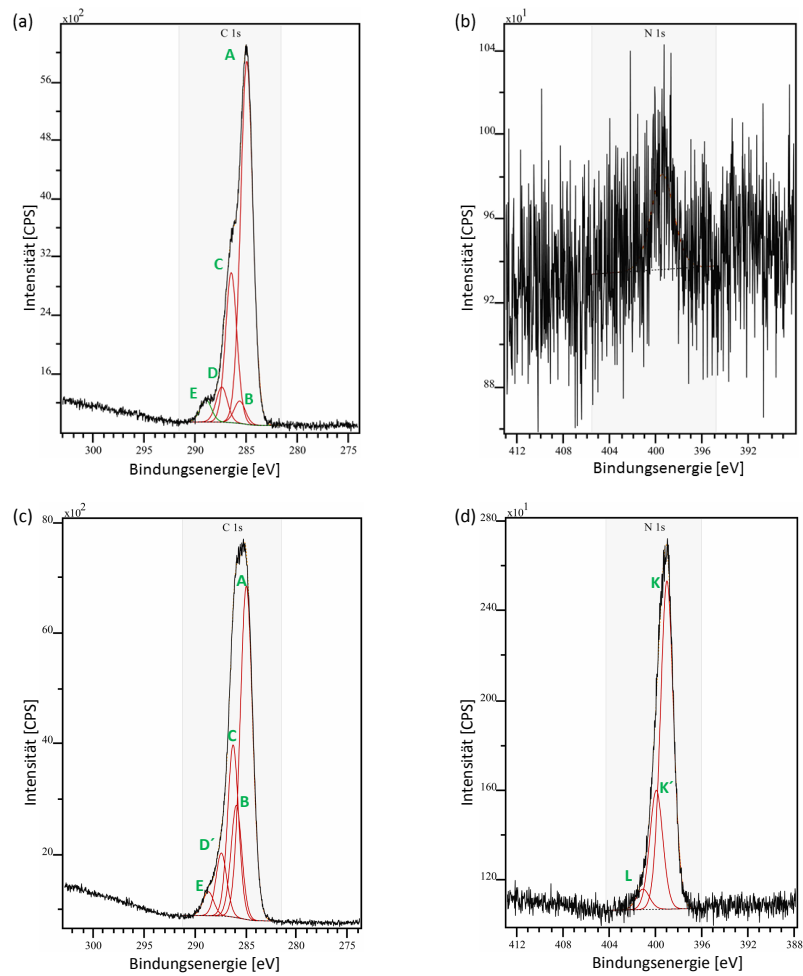


Abbildung 81: Vergleich der XPS-Spektren der GPS- ((a) und (b)) und der PEI-25k-Spacer-funktionalisierten Partikeln ((c) und (d)). Die Intensität der Komponentenpeaks B und C nimmt aufgrund von $\underline{\text{C}}\text{-N}$ Bindungen des PEI-Kerns und $\underline{\text{C}}\text{-O}$ Bindungen in der Maltose deutlich zu. In dem Stickstoffspektrum N 1s (d) kann eine deutliche Zunahme der Intensität des Stickstoffpeaks nach Modifizierung mit PEI-25k-Spacer festgestellt werden.

4.5.1.2 Modifizierung der Partikeloberfläche mit PEI-OS-Architekturen

Neben der Anbindung der PEI-Spacer-Architekturen wurden verschiedene PEI-OS-Architekturen für eine Modifizierung der Partikeloberfläche ausgewählt (**Abbildung 82**). Eine Anbindung von PEI-OS-Architekturen findet über eine weitere Funktionalisierung der Nanopartikel mit einem Boronsäure-Derivat statt (IV.). Die Nanopartikel werden hierfür mit 3-Aminophenylboronsäure im alkalischen Milieu funktionalisiert, wobei die Aminogruppe des Boronsäure-Derivats (3-Aminophenylboronsäure, APBS) mit der Epoxidgruppe reagiert. Mit Hilfe der Reaktion der Hydroxy-Funktionalitäten der Oligosaccharide zu Boronsäureesternern können die PEI-OS-Architekturen an die Nanopartikel angebunden werden (V.). Für die Modifizierung wurden insgesamt 6 verschiedene PEI-OS-Strukturen verwendet, die sich in der Größe des Polymerkerns (PEI-5k und PEI-25k), sowie in der Dichte der Maltoseschale (Struktur A, B und C mit dichter, moderater und offener Zuckerschale) unterscheiden.

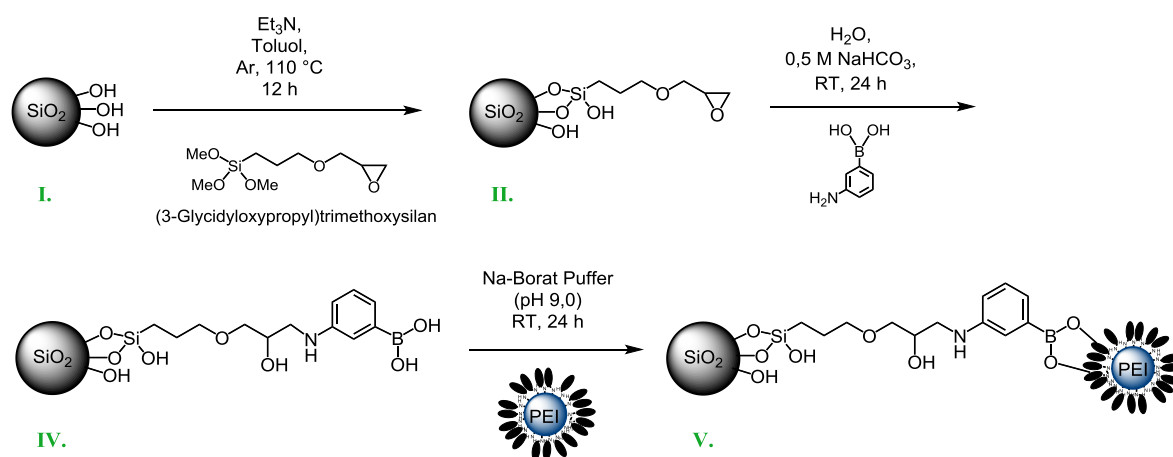


Abbildung 82: Übersicht der Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit PEI-OS-Architekturen. Die silanisierten Nanopartikel wurden mit 3-Aminophenylboronsäure (APBS) umgesetzt (IV.) und anschließend mit PEIOS Architekturen funktionalisiert (V.).

Die mit PEI-OS-Architekturen funktionalisierten Partikel wurden mit Hilfe von DRIFTS-, SEM-, TEM-, TEM-EDX, AFM-, XPS- und TGA-Untersuchungen charakterisiert.

Durch die weitere Modifizierung der GPS-funktionalisierten Partikel (II.) (**Abbildung 83 (a)**) mit einem Boronsäure-Derivat (IV.) (**Abbildung 83 (b)**) und anschließend mit den Polymeren (V.) kann eine Änderung der Oberflächenrauigkeit anhand von REM-Aufnahmen festgestellt werden. Durch die Anbindung von PEI-OS-Architekturen (in diesem Fall PEI-5k-Mal B) ist eine erneute Zunahme der Oberflächenrauigkeit in **Abbildung 83 (c)** zu sehen. Ebenso kann eine veränderte Oberflächenstruktur erkannt werden.

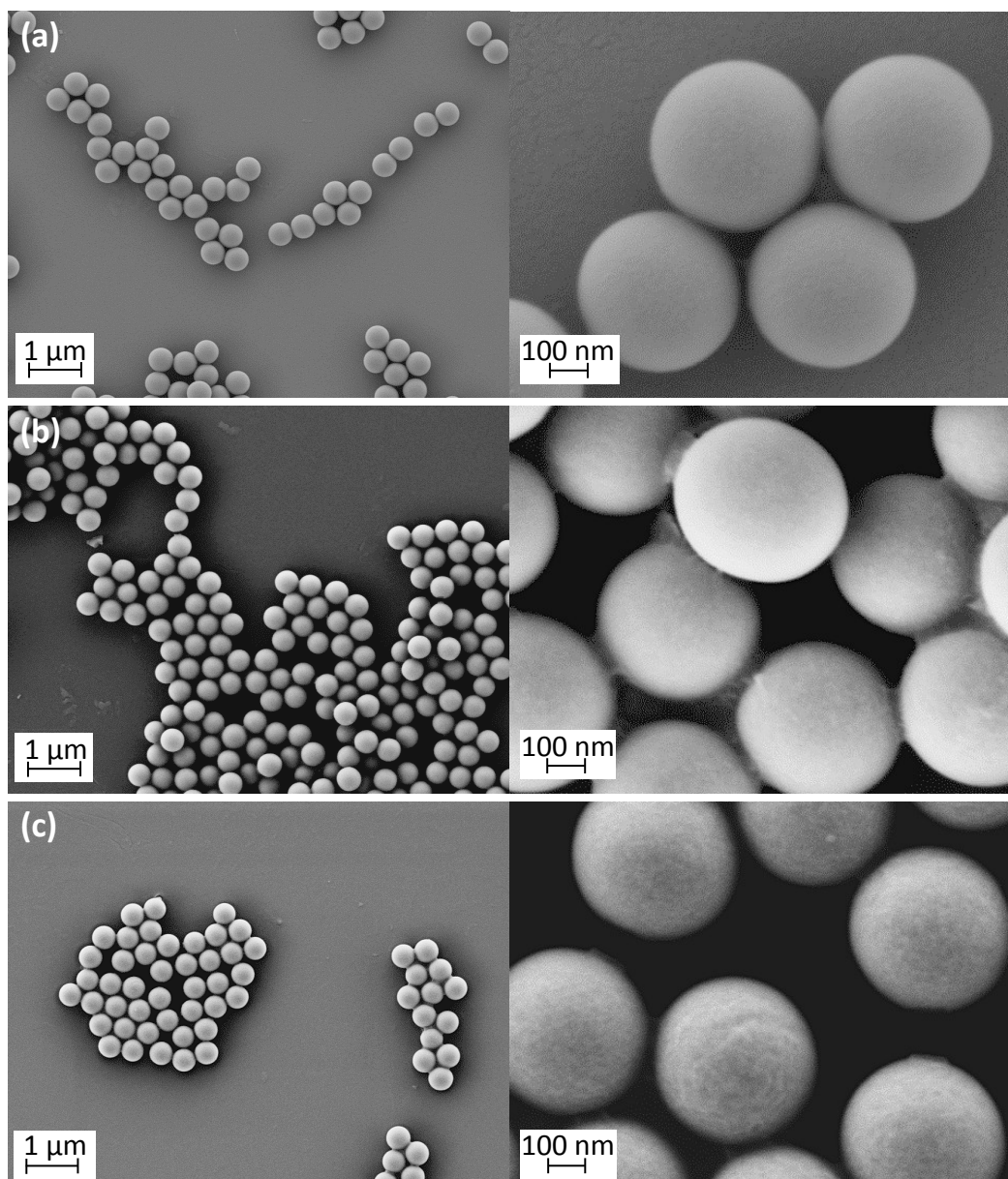


Abbildung 83: Übersicht von REM-Aufnahmen der GPS-funktionalisierten (a), APBS-funktionalisierten (b) und der mit PEI-5k-Mal B modifizierten Partikel (c).

Untersuchungen mittels TEM zeigen, dass die Modifizierung mit PEI-OS-Architekturen eine deutliche Änderung der Oberfläche bewirkt. Die zunächst glatte und einheitliche Oberfläche der reinen Silika-Partikel in **Abbildung 84** (oberste Reihe) wirkt nach der Polymermodifizierung (2. und 3. Reihe) rauer. Weitere Unterschiede zwischen den einzelnen funktionalisierten Partikeln mit einem Unterschied aufgrund der verschiedenen Kerngrößen und Schalendichten sind nicht zu erkennen.

Dennoch können bei den TEM-Untersuchungen auch Partikel ohne Polymer auf der Oberfläche festgestellt werden. Eine vollständige Modifizierung kann somit nicht bestätigt werden.

Bei TEM-Untersuchungen gekoppelt mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (*energy dispersive X-ray spectroscopy*, EDX), werden Atome in einer Probe durch Elektronenstrahlbombardement angeregt. Diese angeregten Atome senden Röntgenstrahlen aus, die für das jeweilige Atom charakteristisch sind. Mit Hilfe dieser Untersuchung kann die Oberfläche der

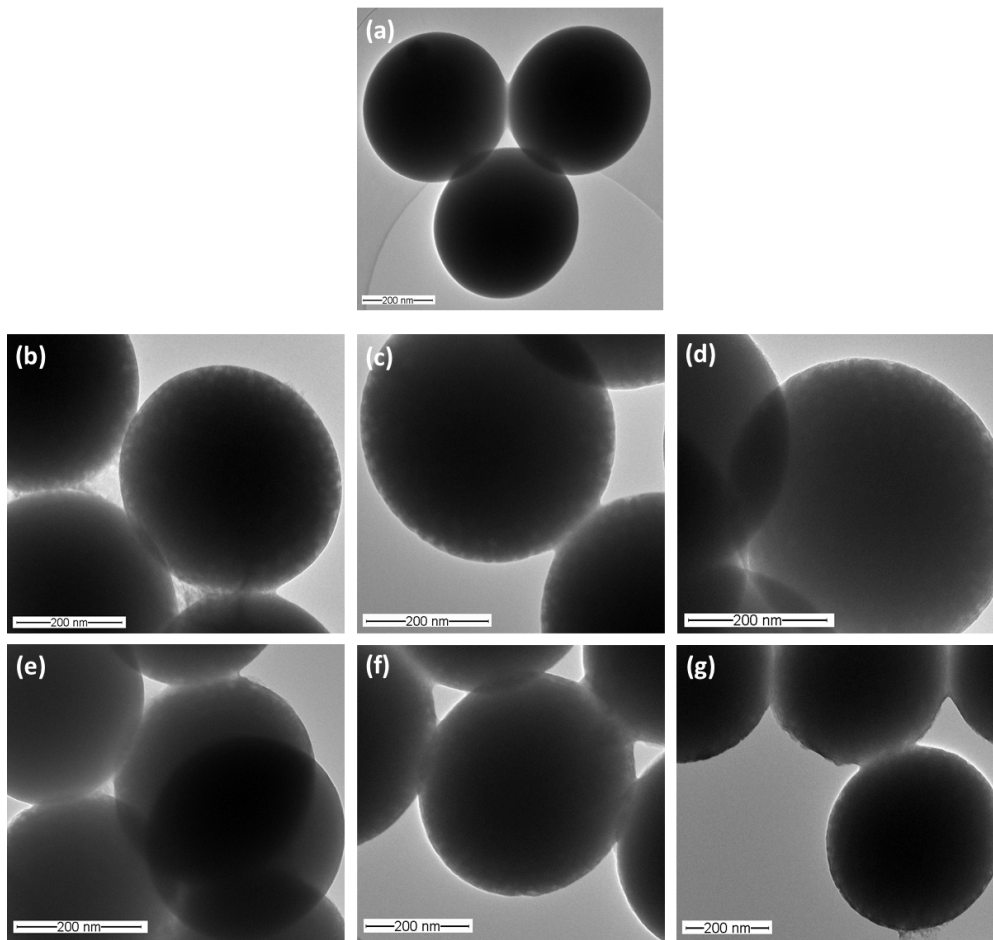


Abbildung 84: Übersicht der TEM-Aufnahmen von (a) unmodifizierten Partikeln und (b) bis (g) mit PEI-OS-modifizierten Partikeln ((b) PEI-5k-Mal A, (c) PEI-5k-Mal B, (d) PEI-5k-Mal C, (e) PEI-25k-Mal A, (f) PEI-25k-Mal B, (g) PEI-25k-Mal C).

modifizierten Partikel auf Kohlenstoff hin untersucht werden und ein Vergleich zwischen den reinen Silika-Partikeln (**Abbildung 85 links**) und der modifizierten Oberfläche (**Abbildung 85 rechts**) gezogen werden.

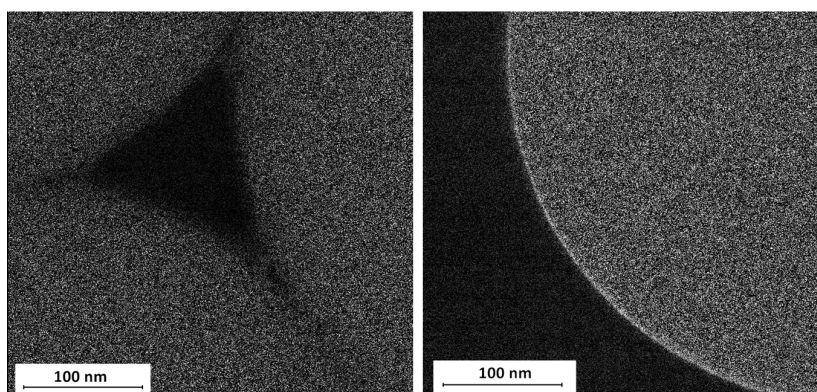


Abbildung 85: Vergleich von TEM-EDX-Aufnahmen von un- (links) und modifizierten Partikeln (rechts), bei denen die Kohlenstoffdichte insbesondere an den Rändern höher ist.

Aufgrund von Verunreinigungen während der Synthese kann Kohlenstoff auch auf den unmodifizierten Silika-Partikeln nachgewiesen werden. Ein Vergleich der beiden EDX-Aufnahmen zeigt bei den modifizierten Partikeln am Rand eine höhere Kohlenstoffdichte. Diese EDX-Untersuchungen mit Bestimmungen der Kohlenstoffdichte auf der Partikeloberfläche belegen die erfolgreiche Modifizierung der Partikel mit PEI-OS-Architekturen.

Ergänzend wurden ebenfalls AFM-Aufnahmen der Partikel angefertigt (**Abbildung 86**).

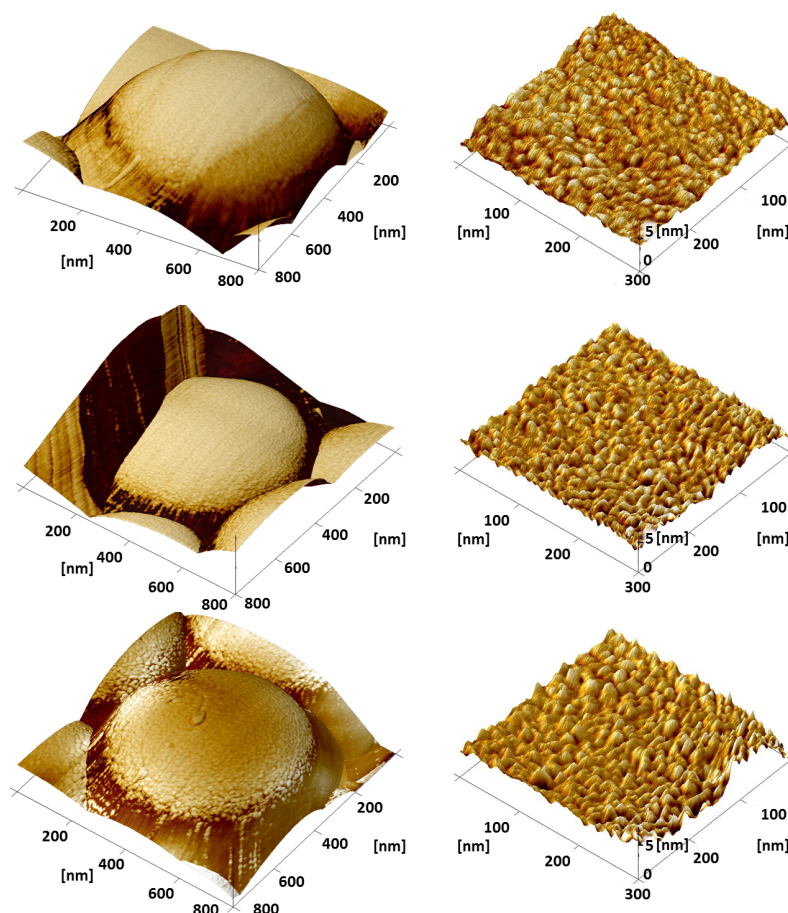


Abbildung 86: AFM-Aufnahmen der unmodifizierten Partikel (oberste Reihe), mit GPS-funktionalisierte Partikel (mittlere Reihe) und mit PEI-5k-Mal A modifizierte Partikel (unterste Reihe). Die 3D-Abbildungen setzen sich aus einer Höhenmessung und dem Phasenkontrast zusammen.

Eine Änderung der Oberflächenstruktur und eine Zunahme der Oberflächenrauigkeit kann deutlich erkannt werden. Im Höhenprofil (**Abbildung 86 rechts**) wird deutlich, wie sich die Oberflächenrauigkeit aufgrund der Modifizierung mit PEI-Mal deutlich verändert. Die unfunktionalisierten Silika-Partikel besitzen einen R_a -Wert von 0,39 nm. Für die GPS-funktionalisierten Partikel erhöht sich die Oberflächenrauigkeit auf $R_a = 0,41$ nm. Eine deutliche Zunahme der Rauigkeit kann schließlich durch die Modifizierung mit dem Kern-Schale Polymer erhalten werden, bei denen der R_a -Wert auf 0,60 nm ansteigt.

Berechnungen aufgrund von XPS-Untersuchungen (**Abbildung 87**) zeigen, dass keine vollständige Reaktion aller Epoxidgruppen mit dem Boronsäure-Derivat abgelaufen ist. Als Folge

kann nach der Kopplung des APBS ein intensiver Komponentenpeak D im C 1s Spektrum beobachtet werden (**Abbildung 87 (a)**). Nur etwa jede vierte Epoxidgruppe wurde mit einer Boronsäure modifiziert. Dennoch kann aufgrund der Intensitätszunahme des Stickstoffpeaks im N 1s und Änderungen im B 1s Spektrum, die zum Teil erfolgreiche Modifizierung mit der Boronsäure-Funktionalität nachgewiesen werden. Die Komponentenpeak-Zuordnung erfolgt analog wie für die PEI-Spacer-Architekturen.

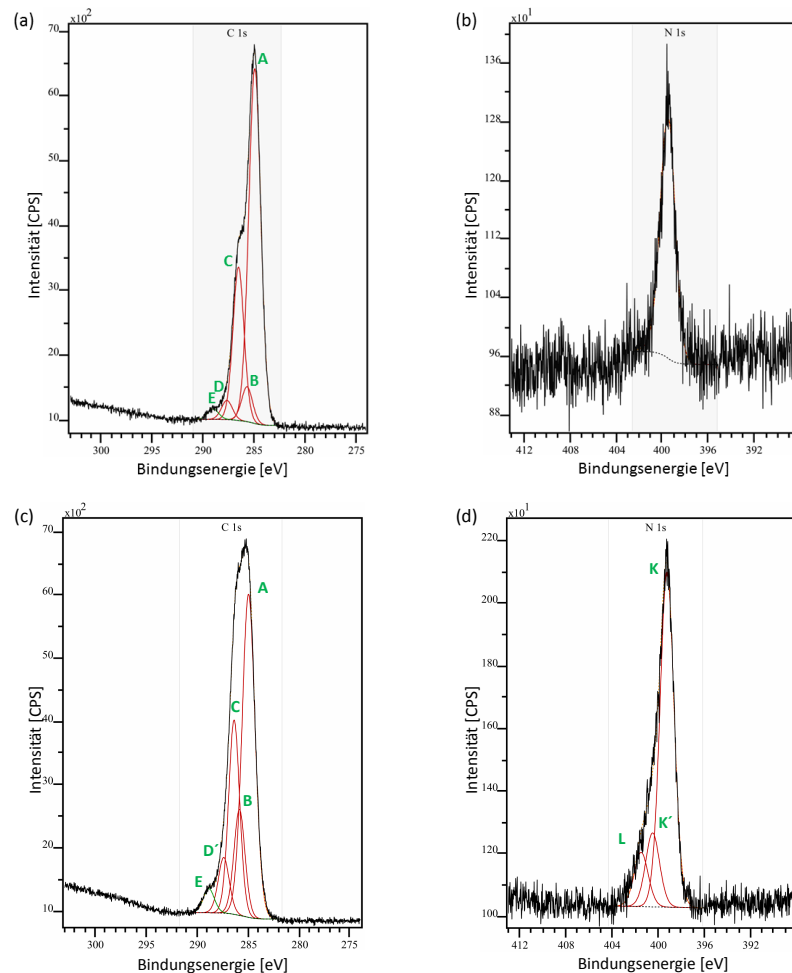


Abbildung 87: Vergleich der XPS-Spektren der APBS- (obere Reihe) und der PEI-OS- (PEI-25k-Mal A, untere Reihe) funktionalisierten Partikel. Die Intensität der Komponentenpeaks B und C nimmt zu. In den Stickstoffspektren N 1s (b) kann eine deutliche Zunahme der Intensität von Stickstoff nach Modifizierung mit PEI-OS festgestellt werden.

Eine deutliche Zunahme der Intensitäten der Kohlenstoff-Komponentenpeaks B und C ist in dem C 1s Spektrum der PEI-OS-modifizierten Partikeln zu erkennen (**Abbildung 87 (c)**). Diese Intensitätszunahme wird durch die Einbringung von erheblichen Anteilen an C–N Bindungen durch den PEI-Kern (Komponentenpeak B) und C–O Bindungen durch die Maltose (Komponentenpeak C) verursacht. Die Zuordnung der Komponentenpeaks D' (Halbacetalgruppen (O–C–O) der Maltose) und E (Kohlenstoffen in Carbonsäuren bzw. Carbonsäureestern) ist analog wie bei den PEI-25k-Spacer-funktionalisierten Partikeln.

Wie bereits bei den Partikeln mit PEI-Spacer-Modifizierung ist auch bei den PEI-OS-funktionalisierten Partikeln ein deutlicher Anstieg der Intensität der Stickstoff-Komponenten-

peaks zu erkennen (**Abbildung 87 (d)**). Die Zuordnung erfolgt analog der Auswertung bei den PEI-Spacer-modifizierten Partikeln. Die Untersuchung des Borpeaks zeigt zum einen eine Intensitätsabnahme und zum anderen eine Verschiebung der Bindungsenergie zu höheren Energien. Dies wird durch die chemische Veränderung der Boronsäure hin zu Boronsäureester verursacht.

Thermogravimetrische Analysen der Partikel ohne und mit PEI-OS-Architekturen zeigen im Vergleich zu den nur mit dem Boronsäure-Derivat funktionalisierten Partikeln einen zusätzlichen Masseverlust (**Abbildung 88** für PEI-5k-Mal A-C; **Abbildung 108** für PEI-25k-Mal A-C) in einem Bereich zwischen 200 und 400 °C. Dieser liegt in einem Temperaturbereich, in dem die Zersetzung der reinen PEI-OS-Architekturen stattfindet. Die Anbindung kann somit auch mit dieser Methode bestätigt werden. Anhand der TGA-Untersuchungen kann die angebundene Stoffmenge der PEI-OS-Architekturen auf der Partikeloberfläche berechnet werden. Es kann festgestellt werden, dass die modifizierte Partikeloberfläche eine Stoffmenge von 0,3 $\mu\text{mol/g}$ von PEI-5k-Mal A, 0,8 $\mu\text{mol/g}$ von PEI-5k-Mal B und 0,9 $\mu\text{mol/g}$ von PEI-5k-Mal C aufweist. Die Anbindung mit der offenen Struktur C ist somit effizienter als die mit der sterisch sehr anspruchsvollen dichten Struktur A.

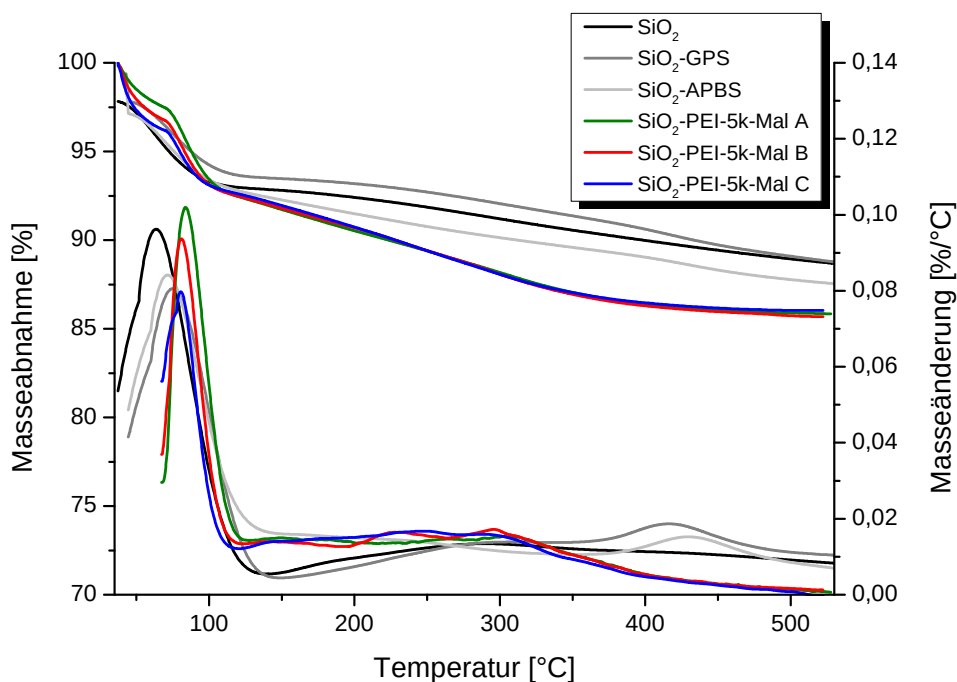


Abbildung 88: Auswertung der TGA-Untersuchung der un- und modifizierten Partikel. Im Fall der PEI-OS-modifizierten Partikel (PEI-5k-Mal A-C) kann ein zusätzlicher Massenverlust zwischen 230 - 450 °C gemessen werden. Der absolute Masseverlust ist bei den PEI-OS-modifizierten Partikeln deutlich höher, wie anhand der Masseabnahme [%] gesehen werden kann.

Zusammenfassend kann anhand der vielfältigen Charakterisierungsuntersuchungen eine erfolgreiche Modifizierung der Partikeloberfläche mit Kern-Schale-Architekturen nachgewiesen werden.

4.5.2 Untersuchungen zum Interaktionsverhalten von modifizierten Silika-Partikeln

Vor einer möglichen Verwendung der modifizierten PEI-OS-Partikel unter chromatographischen Aspekten wurde das Interaktionsverhalten der modifizierten Partikel untersucht. Ultrafiltrationsexperimente wurden mit den Beispielvitaminen B₃ und B₆ direkt nach Zugabe der Partikelsuspension mit der Vitaminlösung durchgeführt. Für die Experimente wurden Partikel-Suspensionen mit einer Konzentration von 1 mg/mL verwendet. Eine genaue Berechnung des molaren Verhältnisses von PEI-OS zu eingesetzten Vitamin ist bei den modifizierten Partikeln nicht möglich, da nicht genau bestimmt werden kann, wie viel und in welchem Umfang PEI-OS auf der Oberfläche der Partikel gebunden ist. Für die Experimente wurden 25 mL der Partikel-Suspension mit 75 mL Vitamin-Stammlösung vermischt. Diese Suspension wurde direkt im Anschluss ultrafiltriert. Die Ergebnisse der Aufnahmeeffizienz der einzelnen Partikel mit PEI-OS-Modifizierung ist in **Tabelle 16** zusammengefasst.

Tabelle 16: Übersicht der Ultrafiltrationsergebnisse der modifizierten Partikel mit den Vitaminen B₃ und B₆. Angegeben ist die Aufnahmeeffizienz in [%].

	Aufnahmeeffizienz [%]	
	B ₃	B ₆
NP-PEI-5k-Mal A	25,6	5,7
NP-PEI-25k-Mal A	19,7	2,0

Obwohl diese Methode in Bezug auf die Partikel mit einem hohen Fehler behaftet ist, kann festgestellt werden, dass die Wechselwirkungen mit den negativ geladenen B₃ stärker sind als die Interaktionen zu B₆. Weiterhin kann aufgrund der auftretenden Wechselwirkungen mit B₃ geschlossen werden, dass eine Modifizierung erfolgreich war. Anderenfalls würde es zu Repulsion zwischen der negativ geladenen Partikeloberfläche und dem negativ geladenen Niacin kommen. Aufgrund der deutlich abgeschwächten Aufnahme im Vergleich zu reinem PEI-Mal A mit B₃ (Vergleichswert 56 % (5 kDa) und 62 % (25 kDa)) kann vermutet werden, dass ein erheblicher Anteil der vorliegenden Kernladung durch die Oberflächenladung der Partikel kompensiert ist. Auf der anderen Seite kann diese niedrige Aufnahme auch auf eine unvollständige Modifizierung der Partikeloberfläche hindeuten. Diese kann aufgrund von TEM-Untersuchungen belegt werden, bei denen auch nicht bzw. kaum modifizierte Partikel gefunden werden konnten. Im Vergleich zu Niacin wechselwirkt das zwitterionische Pyridoxin nur in einem sehr geringen Ausmaß mit den Partikeln. Dies kann durch die generell schwachen Wechselwirkungen des Pyridoxins mit den PEI-OS-Architekturen erklärt werden. Obwohl die Suspensionen während der Ultrafiltration permanent gerührt wurden, könnte sich ein Filterkuchen bilden. Darüber hinaus können die Partikel die Membranporen verstopfen und so eine effektive Separation behindern. Aufgrund dieser Nachteile der Ultrafiltration wurden keine weiteren Experimente mit dieser Methode durchgeführt.

Stattdessen wurden Batchversuche mit den Partikeln durchgeführt, die mittels Zentrifuge und anschließender Filtration abgetrennt wurden. Das Filtrat ohne modifizierte Partikel konnte UV/Vis-spektroskopisch untersucht werden und die Konzentration mit Hilfe von Kalibrierungsgeraden berechnet werden. Somit war eine Rückrechnung auf die Konzentration des interagierenden Anteils möglich und eine Aufnahme konnte ermittelt werden. Für

die Experimente wurden 5 mg/mL der Partikel in Millipore-Wasser gelöst. Zu 6 mL der Vitamin-Stammlösung wurde 1 mL der Partikelsuspension gegeben. Diese Suspension wurde direkt nach Zusammengabe, nach 3 und 20 Stunden abgetrennt und das Filtrat UV/Vispektroskopisch untersucht.

Anhand der Aufnahmen [%] kann gesehen werden, dass eine Wechselwirkung aller Analyten mit den mit PEI-OS-modifizierten Partikeln zeitlich nicht stabil ist (**Abbildung 89**).

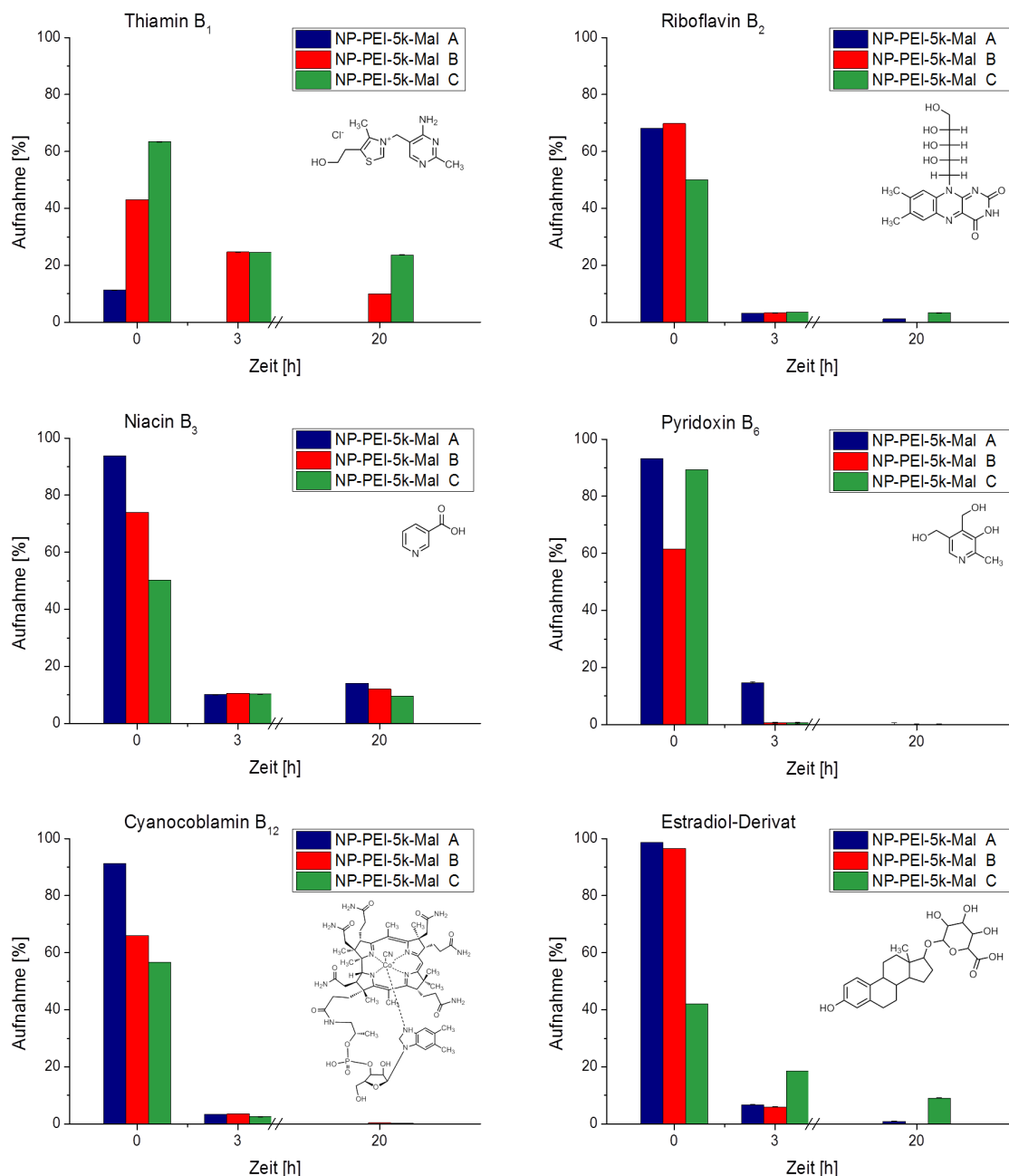


Abbildung 89: Übersicht der Aufnahmeeffizienz der modifizierten Partikel gegenüber wasserlöslichen Vitaminen. Zeitabhängige Untersuchungen zeigen instabile Wechselwirkungen, die nur für kurze Zeit stabil sind.

Direkt nach Zusammengabe der Partikelsuspension und der Vitaminlösung liegt für alle Analyten eine hohe Aufnahme der Vitamine bzw. des Estradiol-Derivates vor. Nach 3 bzw. 20 Stunden ist bei den meisten Analyten keinerlei Aufnahme mehr erkennbar. Als mögliche

stationäre Phase würde sich dieses Verhalten positiv auswirken. Die Analyten wechselwirken zunächst sehr gut mit den modifizierten Partikeln und eine effektive Auftrennung resultiert. Im Anschluss kann bereits nach kurzer Zeit keine bzw. nur geringe Wechselwirkung der Analyten mit der stationären Phase festgestellt werden, wodurch diese auch nicht durch nicht eluierte Analyten verstopfen kann. Eine sehr effektive und schnelle Regenerierung der stationären Phase mit gereinigtem Wasser wäre somit sehr gut denkbar. Falls dieser Waschprozess nicht ausreichen sollte, kann mit Puffer gespült werden, wodurch noch nicht eluierte Analyten ausgelöst und die Säule wieder regeneriert werden sollte. Weiterhin ist ein Einfluss der Maltoseschalendichte deutlich. Bei negativ geladenen Analyten, wie Niacin, Cyanocobalamin und dem Estradiol-Derivat (Estradiol Glucuronid), ist ein Abfall der Aufnahmeeffizienz von Struktur A zu Struktur C zu erkennen. Aufgrund der geringeren Abschirmung der Kernladung durch eine offenere Maltoseschale wie bei Struktur C, sollte theoretisch eine höhere Aufnahmeeffizienz bei Struktur C gefunden werden. Dieser Trend ist unerwartet. Aufgrund der Abschirmung und der geringeren Ladung der PEI-OS Struktur A kann eine schwächere Wechselwirkung vermutet werden. Ähnlich wie bei den Ultrafiltrationsergebnissen sollten die negativ geladenen Analyten besser mit der offenen deutlich kationisch geladenen Struktur C interagieren. Der jedoch beobachtete Trend und die Ergebnisse der TGA-Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die Anbindung an die Partikeloberfläche mit Struktur A wesentlich besser abläuft, als mit Struktur C. Bei Struktur C sind somit weniger PEI-OS-Moleküle auf der Partikeloberfläche angebunden. Es kommt zu deutlich weniger Interaktionen und somit geringeren Aufnahmezeiten. Weiterhin können aufgrund der unvollständigen Modifizierung der Partikeloberfläche Repulsionskräfte zwischen den Partikeln und den Analyten auftreten. Im Fall des leicht positiv geladenen Thiamins ist eine umgekehrte Aufnahmeeffizienz zu erkennen. Bei Struktur A, mit einer sehr dichten Zuckerschale, wird weit weniger Thiamin aufgenommen als mit der offeneren Zuckerschale von Struktur C. Dieses Verhalten kann aufgrund der positiven Ladung des Thiamin und elektrostatischer Interaktion mit der negativ geladenen Partikeloberfläche erklärt werden. Darüber hinaus ist die Aufnahmeeffizienz für Thiamin nach 3 und 20 Stunden weiterhin in einem moderaten Verhältnis stabil. Für Riboflavin wird nach der Vermischung der NP-PEI-OS-Suspension mit der Vitaminlösung eine moderate Aufnahmekapazität gefunden. Diese Aufnahmekapazität ist jedoch für alle Schalendichten relativ gleich und nimmt nur im Fall von Struktur C geringfügig ab. Da Riboflavin nicht geladen vorliegt und darüber hinaus einen höheren sterischen Anspruch hat, kann eine Wechselwirkung mit dem PEI-OS auf der Partikeloberfläche gehemmt sein. Der Abfall bei Struktur C kann auch in diesem Fall mit der geringen Modifizierung der Partikel und der auftretenden Repulsion erklärt werden. Für das Vitamin Pyridoxin, das in wässrigen Lösungen zumeist in einer zwitterionischen Form vorliegt, kann für Struktur A und C eine hohe Aufnahme bzw. eine starke Wechselwirkung detektiert werden. Es kann vermutet werden, dass im Fall von Struktur A eine gute Wechselwirkung mit dem auf der Partikeloberfläche angebundenen PEI-OS stattfindet, wohingegen bei Struktur C der Einfluss der Partikeloberfläche selbst entscheidend ist. Da sich dieser Trend jedoch nicht bei den Folgemessungen bei 3 und 20 Stunden wiederholt, wird davon ausgegangen, dass die hohe Aufnahme bei Struktur C vernachlässigt werden kann.

4.5.3 Einsatz von modifizierten Silika-Partikeln in der TLC

Angeichts der interessanten und vielversprechenden Ergebnisse der Voruntersuchungen der Wechselwirkungen der modifizierten Partikel mit wasserlöslichen Analyten, wurden die modifizierten Partikel als neuartige stationäre Phase in der Dünnschicht-Chromatographie getestet. Hierfür wurde eine konzentrierte Suspension der modifizierten Partikel hergestellt und auf Glasobjektträger aufgebracht. Diese Vorgehensweise wurde bereits von *Stahl et al.* etabliert^[104] und wird auch in dem Übersichtsartikel von *Gocan et al.* kurz erläutert.^[182] Die Herstellung von TLC-Platten ist jedoch nicht trivial. Aufgrund von Inhomogenität kann es zu starken Schwankungen innerhalb der Schicht und somit zu großen Fehlern kommen. Die Herstellung von TLC-Platten ist aufgrund dieser und diverser anderer Probleme nicht ohne spezielle Vorkenntnisse und Apparaturen möglich. Bei der Herstellung von dünnen Schichten der modifizierten Nanopartikel auf einen Glaträger, wurde ein Abstandshalter verwendet, um eine homogene Schichthöhe zu erhalten. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde eine TLC-Platte erhalten, deren Schichtdicke oberhalb der herkömmlichen Schichtdicken einer TLC-Platte lagen. Das Aufbringen einer Probe auf dieser selbst hergestellten Platte gestaltete sich als äußerst schwierig, da die Schicht sehr weich war. Da die Probenauftragung für den Erfolg der Auftrennung essentiell ist und diese nur unzureichend bewältigt werden konnte, können die Nanopartikel nicht auf diese Art und Weise untersucht werden. Weiterhin ergab sich ein Problem mit der Stabilität der stationären Phase und es fand bei der Entwicklung der Platten mit dem Laufmittel (Millipore-Wasser) ein teilweises Ablösen der stationären Phase von dem Trägermaterial statt.

Aufgrund dieser Probleme wurden im Folgenden kommerziell erhältliche TLC-Platten genutzt und mit einer Partikel-PEI-OS-Lösung mehrmals besprüht und die stationäre Phase somit modifiziert. Die Modifizierung der Platten fand analog zu der Modifizierung mit den PEI-OS-Architekturen wie in Kapitel 4.4.1 statt. Als Analyten wurden wasserlösliche Vitamine genutzt und die Effizienz der Auftrennung an diesen Beispiel-Analyten getestet. Die Konzentrationen der Stammlösungen der Analyten entsprechen den Konzentrationen, die bereits zuvor verwendet wurden. Als mobile Phase wurde Millipore-Wasser genutzt. Um ein Gleichgewicht zwischen Ablösung und wieder Abscheidung herzustellen, wurde in die mobile Phase ebenfalls ein geringer Anteil an Nanopartikel hinzugefügt. Bei den Experimenten der modifizierten Partikel mit PEI-5k und Maltoseschale, konnte im Vergleich zu einer unmodifizierten TLC-Platte teilweise nur ein geringer Einfluss durch die Partikel festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der **Tabelle 17** zusammengefasst.

Für die Vitamin B₁, B₂ und B₆, die mit den PEI-OS nur über schwache Wechselwirkungen interagieren, kommt es zu kaum einer Änderung der R_f-Werte bzw. bei der Trenneffizienz/ Trennleistung N. Für das phosphorylierte Riboflavin, das in Lösung eine negative Ladung trägt, kann mit den modifizierten Platten eine wesentlich bessere Trenneffizienz erzielt werden. Dabei verringert sich der R_f-Wert für Struktur A und B nur minimal, für Struktur C jedoch deutlich. Dies bedeutet, dass die Wechselwirkungen mit der mobilen Phase von Struktur A zu C schwächer werden und dass das phosphorylierte Riboflavin von Struktur C am stärksten zurückgehalten wird. Für andere negativ geladene Analyten, wie Vitamin B₃ und C, kommt es zu keiner signifikanten Änderung des Laufverhaltens. Dieses Verhalten überrascht, da zum einen diese Vitamine starke elektrostatische Wechselwirkungen mit den

Tabelle 17: Übersicht der R_f -Werte und Trenneffizienz N der wasserlöslichen Vitamine bei unmodifizierten und mit NP-PEI-5k-OS modifizierten TLC-Platten.

	B ₁		B ₂		B ₂ -P		B ₃	
	R_f	N	R_f	N	R_f	N	R_f	N
Un-modifiziert	0,02 ± 0,01	33 ± 19	0,35 ± 0,00	79 ± 1	0,89 ± 0,09	170 ± 65	0,84 ± 0,03	2853 ± 619
PEI-5k-Mal A	0,03 ± 0,01	27 ± 2	0,33 ± 0,01	80 ± 15	0,84 ± 0,00	1589 ± 362	0,88 ± 0,01	2226 ± 66
PEI-5k-Mal B	0,02 ± 0,01	28 ± 9	0,35 ± 0,01	83 ± 0	0,82 ± 0,00	2342 ± 120	0,92 ± 0,02	2382 ± 314
PEI-5k-Mal C	0,03 ± 0,00	38 ± 4	0,34 ± 0,01	70 ± 2	0,58 ± 0,03	997 ± 398	0,89 ± 0,01	1829 ± 16
	→	→	→	→	↓	↑	↑	↓

	B ₆		B ₁₂		Vit. C	
	R_f	N	R_f	N	R_f	N
Un-modifiziert	0,70 ± 0,03	622 ± 299	0,26 ± 0,03	236 ± 42	0,90 ± 0,01	1416 ± 22
PEI-5k-Mal A	0,66 ± 0,01	648 ± 85	0,23 ± 0,01	309 ± 29	0,93 ± 0,00	776 ± 64
PEI-5k-Mal B	0,70 ± 0,02	546 ± 31	0,25 ± 0,01	291 ± 61	0,96 ± 0,02	1421 ± 420
PEI-5k-Mal C	0,67 ± 0,01	602 ± 84	0,23 ± 0,00	355 ± 25	0,95 ± 0,01	1815 ± 928
	↓	→	↓	↑	↑	↑

PEI-OS-Architekturen eingehen und zum anderen durch die Batch-Versuche gezeigt wurde, dass eine höhere Wechselwirkung stattfindet. Obwohl angenommen werden sollte, dass diese Analyten stärker mit der stationären Phase bzw. den positiv geladenen Polymerkernen wechselwirken sollten, erhöhen sich die R_f -Werte für B₃ und Vitamin C minimal. Die Trenneffizienz nimmt bei beiden Vitaminen jedoch ab. Dies bedeutet, dass die Wechselwirkungen mit der stationären Phase schwächer werden und die Interaktion mit der mobilen Phase zunimmt. Im Fall von Vitamin C ist die Auftrennung mit Struktur C wesentlich effizienter als mit Struktur A. Die Modifizierung der Partikeloberfläche mit PEI-5k-Mal A führt in diesem Fall zu einer Verschlechterung der Peaksymmetrie und es treten *tailing*-Effekte auf. Diese verschlechtern das Auftrennungsergebnis. Aufgrund der großen Standardabweichung, kann keine genaue Auswertung vorgenommen werden. Die Werte werden als Richtwerte gedeutet, die einen Trend anzeigen können.

Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die Partikel, die mit den PEI-25k-Mal Strukturen modifiziert wurden (**Tabelle 18**).

Die Vitamine B₁, B₂ und B₆ zeigen erneut kaum eine Änderung durch die Modifizierung der stationären Phase. B₃ und Vitamin C zeigen minimal höhere R_f -Werte bei den behandelten TLC-Platten. Bei B₃ findet eine Verschlechterung der Trenneffizienz aufgrund einer Verschlechterung der Peaksymmetrie und *tailing*-Effekte statt. Für Vitamin C kann eine geringe Besserung der Auftrennung bei den Strukturen B und C beobachtet werden. Da bei

Tabelle 18: Übersicht der R_f -Werte und Trennleistungen N der wasserlöslichen Vitamine bei unmodifizierten und mit NP-PEI-25k-OS modifizierten TLC-Platten.

	B ₁		B ₂		B ₂ -P		B ₃	
	R_f	N	R_f	N	R_f	N	R_f	N
Un-modifiziert	0,02 ± 0,01	33 ± 19	0,35 ± 0,00	79 ± 1	0,89 ± 0,09	170 ± 65	0,84 ± 0,03	2853 ± 619
PEI-25k-Mal A	0,02 ± 0,00	41 ± 0	0,34 ± 0,03	77 ± 1	0,86 ± 0,02	1876 ± 75	0,93 ± 0,00	2600 ± 496
PEI-25k-Mal B	0,01 ± 0,00	18 ± 0	0,32 ± 0,03	65 ± 9	0,90 ± 0,01	1384 ± 493	0,90 ± 0,01	1704 ± 137
PEI-25k-Mal C	0,02 ± 0,00	29 ± 3	0,36 ± 0,00	78 ± 1	0,73 ± 0,00	1548 ± 7	0,93 ± 0,01	2368 ± 5
	→	→	→	→	↓	↑	↑	↓

	B ₆		B ₁₂		Vit C	
	R_f	N	R_f	N	R_f	N
Un-modifiziert	0,70 ± 0,03	622 ± 299	0,26 ± 0,03	236 ± 42	0,90 ± 0,01	1416 ± 22
PEI-25k-Mal A	0,71 ± 0,01	648 ± 5	0,24 ± 0,00	240 ± 1	0,92 ± 0,02	1126 ± 83
PEI-25k-Mal B	0,63 ± 0,00	649 ± 2	0,19 ± 0,00	166 ± 10	0,93 ± 0,00	1915 ± 4
PEI-25k-Mal C	0,70 ± 0,01	795 ± 9	0,25 ± 0,01	264 ± 6	0,95 ± 0,01	1703 ± 346
	→	→	↓	→	↑	↑

diesen Strukturen die Maltoseschalendichte geringer ist, könnte das negativ geladene Vitamin C somit besser mit dem positiv geladenen PEI-Kern wechselwirken. Da jedoch der R_f -Wert für Struktur B und insbesondere für Struktur C leicht erhöht ist, sollte dieser Einfluss nur gering ausfallen und auf eine verbesserte Peaksymmetrie zurückzuführen sein.

Neben den wasserlöslichen Vitaminen wurden ebenfalls lipophile Vitamine als Analyten getestet. Die Modifizierung der TLC-Platten fand ebenfalls durch Aufsprühen der Partikelsuspension statt. Anstelle einer wässrigen mobilen Phase wurde ein Lösungsmittelgemisch von Benzol: Hexan (9:1) genutzt. Die Ergebnisse der Dünnschicht-Chromatographie Versuche sind in **Tabelle 19** und **20** zusammengefasst.

Die sehr hydrophoben Analyten Ergocalciferol, Cholecalciferol, α -Tocopherol und das Tocopherolacetat zeigen bei den modifizierten Platten geringfügig verringerte R_f -Werte. Obwohl diese Analyten sehr hydrophob sind, scheinen sie mit den modifizierten TLC-Platten geringfügig stärker wechselzuwirken als mit den herkömmlich, unmodifizierten Platten. Schwache Wechselwirkungen wie hydrophobe-hydrophobe oder andere nicht-kovalente Wechselwirkungen könnten dieses Verhalten erklären. Auf die Auftrennung hat dies jedoch einen negativen Effekt und es kommt für diese Analyten zu einem Abfall in der Trenneffizienz. Im Fall des Tocopherolacetats könnten auch weitere Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Die geringfügig bessere Auftrennung für Retinolpalmitat überrascht, da gerade bei diesem Analyt der hydro-

Tabelle 19: Übersicht der R_f -Werte und Trennleistungen N der lipophilen Vitamine bei unmodifizierten und modifizierten TLC-Platten

	Ergo- calciferol		Chole- calciferol		K1	
	R_f	N	R_f	N	R_f	N
Unmodifiziert	0,11 $\pm 0,00$	220 ± 14	0,13 $\pm 0,01$	222 ± 1	0,68 $\pm 0,00$	1357 ± 155
PEI-5k-Mal A	0,10 $\pm 0,01$	155 ± 5	0,10 $\pm 0,00$	167 ± 1	0,71 $\pm 0,02$	1333 ± 128
PEI-5k-Mal B	0,09 $\pm 0,01$	135 ± 5	0,09 $\pm 0,01$	126 ± 5	0,68 $\pm 0,01$	1246 ± 8
PEI-5k-Mal C	0,09 $\pm 0,00$	159 ± 43	0,09 $\pm 0,01$	144 ± 10	0,67 $\pm 0,01$	1334 ± 114
	↓	↓	↓	↓	→	→

	α -Tocopherol		α -Tocopherol- acetat		Retinyl- palmitat	
	R_f	N	R_f	N	R_f	N
Unmodifiziert	0,46 $\pm 0,02$	669 ± 40	0,50 $\pm 0,03$	907 ± 6	0,73 $\pm 0,02$	1207 ± 320
PEI-5k-Mal A	0,46 $\pm 0,02$	642 ± 24	0,53 $\pm 0,02$	696 ± 24	0,74 $\pm 0,01$	1402 ± 129
PEI-5k-Mal B	0,43 $\pm 0,00$	548 ± 127	0,48 $\pm 0,00$	773 ± 102	0,74 $\pm 0,02$	1374 ± 199
PEI-5k-Mal C	0,42 $\pm 0,01$	470 ± 181	0,48 $\pm 0,01$	744 ± 0	0,73 $\pm 0,01$	1145 ± 6
	↓	↓	↓	↓	→	↑

phobe Anteil überwiegt. Dieser Effekt ist bei Struktur A am deutlichsten erkennbar, wodurch vermutet werden kann, dass das Retinolpalmitat mit der Zuckerschale interagiert. Aufgrund der kaum geänderten R_f -Werte für diesen Analyten ist eine Verbesserung der Auftrennung jedoch nur minimal. Die Auftrennung des Vitamins K_1 zeigt kaum einen Unterschied zwischen einer unmodifizierten und einer modifizierten TLC-Platte.

Wie bereits bei den wasserlöslichen Analyten zeigen die Partikel, die mit den PEI-OS-Architekturen mit dem größeren Kern modifiziert wurden, ein ähnliches Verhalten wie die PEI-OS-Architekturen mit kleinerem PEI-Kern. Lediglich bei K_1 findet eine geringfügige Erhöhung der Trennleistung statt.

Tabelle 20: Übersicht der R_f -Werte und Trennleistungen N der lipophilen Vitamine bei unmodifizierten und mit PEI-25k-OS funktionalisierten Partikeln modifizierten TLC-Platten.

	Ergo- calciferol		Chole- calciferol		K_1	
	R_f	N	R_f	N	R_f	N
Unmodifiziert	0,11 $\pm 0,00$	220 ± 14	0,13 $\pm 0,01$	222 ± 1	0,68 $\pm 0,00$	1357 ± 155
PEI-25k-Mal A	0,09 $\pm 0,01$	128 ± 9	0,90 $\pm 0,01$	145 ± 20	0,71 $\pm 0,01$	1478 ± 18
PEI-25k-Mal B	0,10 $\pm 0,01$	191 ± 9	0,10 $\pm 0,01$	166 ± 7	0,66 $\pm 0,01$	1666 ± 8
PEI-25k-Mal C	0,09 $\pm 0,00$	165 ± 23	0,09 $\pm 0,01$	144 ± 20	0,65 $\pm 0,02$	1525 ± 233
	$\rightarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$

	α -Tocopherol		α -Tocopherol- acetat		Retinyl- palmitat	
	R_f	N	R_f	N	R_f	N
Unmodifiziert	0,46 $\pm 0,02$	669 ± 40	0,50 $\pm 0,03$	907 ± 6	0,73 $\pm 0,02$	1207 ± 320
PEI-25k-Mal A	0,43 $\pm 0,00$	485 ± 40	0,50 $\pm 0,01$	633 ± 64	0,74 $\pm 0,01$	792 ± 217
PEI-25k-Mal B	0,41 $\pm 0,02$	464 ± 36	0,48 $\pm 0,01$	655 ± 70	0,73 $\pm 0,01$	1475 ± 208
PEI-25k-Mal C	0,41 $\pm 0,02$	576 ± 43	0,43 $\pm 0,02$	629 ± 133	0,72 $\pm 0,02$	1572 ± 216
	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\rightarrow$	$\uparrow$

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der modifizierten Partikel in der TLC eher ernüchternd. Die verwendete Methode bzw. die Modifizierung der stationären Phase erzielte keine signifikante Verbesserung bei der Auftrennung. Bei der Modifizierung durch Aufsprühen treten gerade bei Suspensionen Inhomogenitäten, wie Inselbildung oder auch Bereiche geringer oder keiner Modifizierung, auf. Dies kann zu Fehlern und einer Verschlechterung der Auftrennung führen. Weitere Experimente zur Optimierung der Aufbringung und der Herstellung kompletter neuartiger stationärer Phasen wären ratsam. Auf diese Art und Weise könnten die modifizierten Partikel besser untersucht und Fehler durch Inhomogenitäten ausgeschlossen werden.

4.5.4 Verwendung von modifizierten Silika-Partikel in der Festphasenextraktion

Weitere Untersuchungen der Partikel in der TLC wurden aufgrund der beschriebenen Probleme nicht durchgeführt. Stattdessen wurden die modifizierten Partikel in der Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Monika Möder am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung in Leipzig im Rahmen einer Kooperation getestet.

Im Gegensatz zu klassischen Flüssig-Flüssig Extraktionen bietet die Festphasenextraktion den Vorteil einfach durchführbar zu sein. Der Lösungsmittelverbrauch sowie die Analysenzeit sind deutlich verringert im Vergleich zu anderen Flüssig-Analysemethoden. Weiterhin besteht die Möglichkeit zur Automatisierung. Aufgrund der Vielfältigkeit an verschiedenen Adsorbentmaterialien können spezifische Wechselwirkungen ausgenutzt werden und eine äußerst effektive Auftrennung erhalten werden. Adsorbentmaterialien mit hydrophilen oder hydrophoben Eigenschaften können hierfür eingesetzt werden. Darüber hinaus können ebenfalls spezifische Wechselwirkungen für eine effektive Auftrennung ausgenutzt werden, wie beispielsweise Affinitäten oder ionische Wechselwirkungen. Komponenten eines Gemisches können spezifisch mit der Adsorberphase interagieren und zurückgehalten werden, während andere Komponenten eluiert werden. Durch Änderung des Lösungsmittels können die zurückgehaltenen Komponenten ausgewaschen werden. Die Methode lässt sich somit schnell auf das jeweilige Problem anpassen und bietet unter minimalen Aufwand gute Ergebnisse.

Die Auftrennung von Analyten mit Hilfe von Festphasenextraktion findet zwischen einer festen Adsorberphase und einer flüssigen Phase der Analyten statt. Als Adsorbentmaterialien kommen häufig die aus der HPLC bekannten stationären Phasen zum Einsatz. Diese Adsorbentmaterialien befinden sich zwischen zwei Fritten in einer Kartusche (**Abbildung 90**).

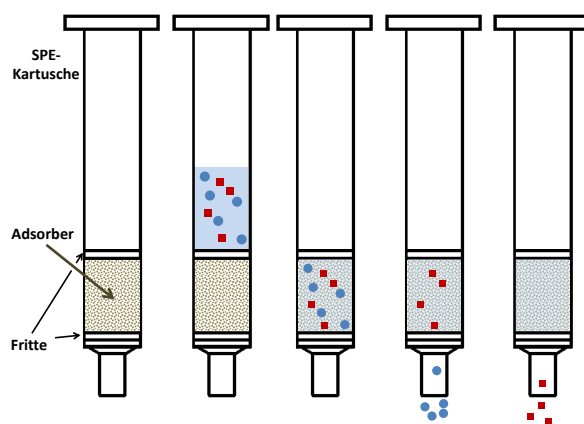


Abbildung 90: Schematischer Prozessablauf bei der Festphasenextraktion.

Für die Versuche wurden SPE-Säulen zum einen nur mit den modifizierten Partikeln (PEI-25k-Mal A-C) und zum andern mit gemischten Phasen aus kommerziell erhältlichen Probenextraktionsmaterialien und den modifizierten Partikeln gefüllt. Hierfür wurden als Materialien Oasis HLB und Chromabond HR-X verwendet. Oasis HLB ist ein Umkehrphasenmaterial mit hydrophiler-lipophiler Balance. Bei diesem Material wird ein Polymer mit einem hydrophilen und lipophilen Bereich genutzt. Somit ist dieser Adsorber auf eine Vielzahl von Anwendungen optimiert und weist hervorragende Eigenschaften in Bezug auf Reproduzierbarkeit, Stabilität und Retentionsfähigkeit auf. Chromabond HR-X ist ein hydrophobes Polystyren-

Divinylbenzol-Copolymer mit sphärischen Partikeln. Es weist ebenfalls eine hohe Reproduzierbarkeit auf und eignet sich für die Aufkonzentrierung von pharmazeutisch, aktiven Verbindungen.

Die Nanopartikel wurden für die Untersuchungen bei gemischten Extraktionsphasen in einem 1:10 (mit Oasis HLB) bzw. 1:20 (bei Gemischen mit beiden Adsorbermaterialien) genutzt. Für die Versuche wurden Analytgemische mit unterschiedlichen umweltrelevanten Verbindungen verwendet, die in wässriger Phase bei einem pH-Wert von 7,0 vorlagen. Als Elutionsmittel wurde Methanol verwendet. Das Eluat wurde im Anschluss eingeeengt und mit Hilfe von HPLC-MS-MS analysiert. Als Vergleichswert dienen analog durchgeführte Untersuchungen mit einer reinen Oasis HLB Extraktionsphase. Die Ergebnisse sind in Form der Wiederfindungsraten [%] der einzelnen Analyten in **Tabelle 21** zusammengefasst. Die Wiederfindungsrate gibt an, wie gut der Analyt eluiert werden konnte. Sie bezieht sich auf die Menge des Analyten, die zur Probe genutzt wurde, im Vergleich zu der Menge, die im Eluat detektiert werden konnte.

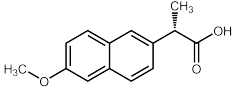
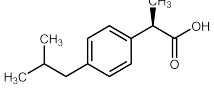
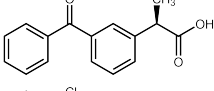
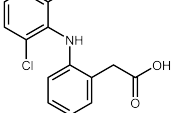
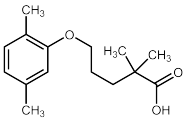
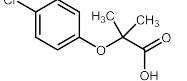
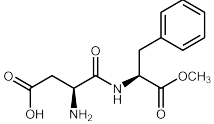
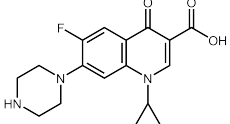
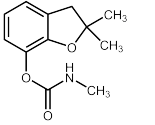
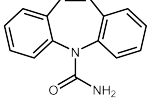
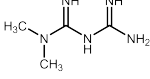
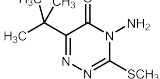
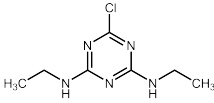
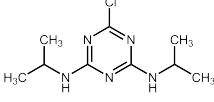
Die Anzahl der Analyten ist mit den reinen modifizierten Nanopartikelphasen sowie bei den gemischten Adsorbergemischen im Vergleich zu der Referenzmessung mit einer kommerziellen Adsorberphase deutlich erhöht. Das Standard-Adsorbermaterial Oasis HLB erreicht hier nur eine geringe Wiederfindungsrate, wohingegen die mit Nanopartikeln modifizierten Adsorberphasen die getesteten Verbindungen mit hohen Wiederfindungsraten extrahiert.

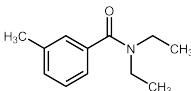
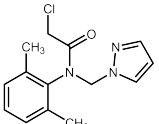
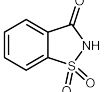
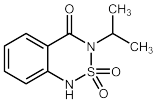
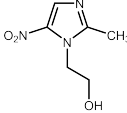
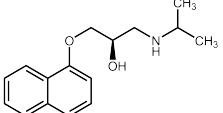
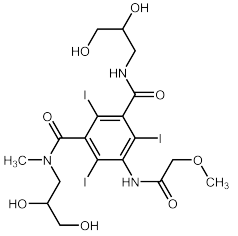
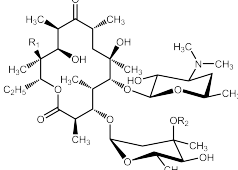
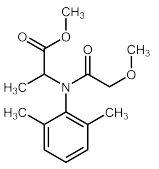
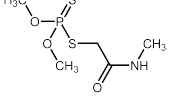
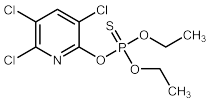
Die einzelnen Analyten können aufgrund ihrer funktionellen Gruppen unterteilt werden. Diese Einteilung kann eine grobe Einschätzung der Interaktion der Analyten mit der Adsorberphase geben.

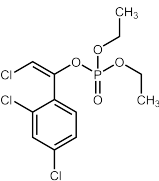
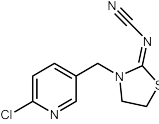
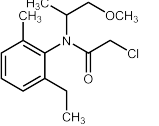
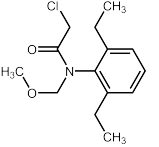
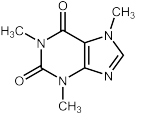
Wie anhand der Ergebnisse zu erkennen ist, liegen die Wiederfindungsraten bei den SPE-Untersuchungen mit den modifizierten Nanopartikel im Durchschnitt geringfügig hinter denen der kommerziell erhältlichen Oasis HLB Phase. Bei den kommerziellen Kartuschen wurden jedoch größere Sorbentsmengen von 200 mg genutzt im Vergleich zu lediglich 20 mg der modifizierten Nanopartikel. Trotz der geringeren Sorbentmenge bei den Partikelphasen kann der sehr gut wasserlösliche, stickstoffreiche antidiabetische Arzneistoff Metformin etwas extrahiert werden (7 %), was mit Oasis HLB kaum möglich war (0-2 % Wiederfindung). Bei den Analyten Saccharin und Bentazon mit einer Sulfongruppe fällt eine deutliche Abnahme der Wiederfindung bei den modifizierten Partikeln auf. Beide Analyten weisen einen höheren sterischen Anspruch und einen hohen lipophilen Anteil auf. Bei den weiteren Pflanzenschutzmitteln mit Phosphatfunktionalität und Chlorsubstituenten kann in den meisten Fällen keine verbesserte Wiederfindung erhalten werden. Einzig bei Chlorphenvinphos, Thiacloprid und Alachlor kann eine verbesserte Wiederfindung gefunden werden.

Allgemein zeigen die Adsorberphasen aus modifizierten Nanopartikeln dennoch eine gute Selektivität bei der Extraktion. Amide wie Carbofuran, Metazachlor oder DEET werden mit Wiederfindungen von je 57 %, und 58 % extrahiert. Die Extraktion von N-Heterozyklen wie Triazin-basierende Pflanzenschutzmittel (Simazin und Atrazin mit 44 % und 52 %) und Koffein (54 %) erfolgt ähnlich effektiv. Diese Analyten können über Wasserstoffbrückenbindungen und andere nicht-kovalente Wechselwirkungen gut mit dem polymeren Kern sowie mit der Zuckerschale wechselwirken. Diese Wechselwirkungen sind reversibel und die Analyten werden gut eluiert. Eine erhöhte Selektivität wird erreicht. Weitere Analyten mit einem

Tabelle 21: Übersicht der Wiederfindungsraten [%] ausgewählter Substanzen, die in den SPE-Untersuchungen eingesetzt wurden.

		verwendet als	funkt. Gruppen	NP-PEI-25k-Mal			Gemischte Phasen		Referenz ****
				A	B	C	Schicht ***	Mix ***	
Analyten gesamt*				21	38	38	27	37	8
Naproxen		SM	COOH	41	n.d.	n.d.	23	14	72
Ibuprofen		SM	COOH	42	n.d.	n.d.	24	19	64
Ketoprofen		SM	COOH	209**	2	2	43	26	80
Diclofenac		SM	COOH	50	n.d.	n.d.	23	11	75
Gemfibrozil		LR	COOH	65	1	1	14	9	74
Clofibrinsäure		LR	COOH	15	n.d.	n.d.	23	27	75
Aspartam		S	COOH	17	n.d.	n.d.	43	22	66
Ciprofloxacin		AB	NH, COOH	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Carbofuran		PSM	Amid	57	n.d.	n.d.	43	35	57
Carbamazepin		AE	Amid	51	2	2	58	29	122
Metformin		AB	NH ₂	7	2	n.d.	3	12	2
Metribuzin		PSM	NH ₂	53	n.d.	n.d.	53	31	61
Simazin		PSM	Triazin	44	1	1	42	21	61
Atrazin		PSM	Triazin	52	1	2	54	27	63

		verwendet als	funkt. Gruppen	NP-PEI-25k-Mal			Gemischte Phasen		Referenz
				A	B	C	Schicht ***	Mix ***	****
DEET		I	Alkyl- amid	58	6	6	62	26	67
Metaza- chlor		PSM	Chlor- alkyl- amid	57	2	2	46	25	72
Saccharin		S	SO ₂ , NH	2	n.d.	n.d.	8	23	12
Bentazon		PSM	SO ₂ , NH	9	n.d.	n.d.	22	23	80
Metronidazol		AB	NO ₂ , OH	4	n.d.	n.d.	44	24	62
Propranolol		BB	OH	63	9	6	n.d.	27	40
Iopromid		KM	OH	40	n.d.	n.d.	61	40	52
Erythromycin		AB	OH	91	19	15	5	14	1
Metalaxyl		PSM	Ester	49	3	2	40	26	81
Dimethoat		PSM	Thio- phosphat- COO-R	40	1	1	31	16	78
Chlor- pyrifos		PSM	Cl, Alkyl- phosphat	46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	59

		verwendet als	funkt. Gruppen	NP-PEI-25k-Mal			Gemischte Phasen		Referenz ****
				A	B	C	Schicht ***	Mix ***	
Chlorfenvinphos		PSM	Cl, Alkyl- phosphat	89	n.d.	n.d.	16	13	74
Thiacloprid		PSM	Cl, CN	88	n.d.	n.d.	57	44	75
Metolachlor		PSM	Cl, OMe	53	n.d.	n.d.	35	20	62
Alachlor		PSM	Cl, OMe	72	n.d.	n.d.	27	17	58
Koffein			N- hetero- zyklus	54	13	13	87	54	85
LR	Lipidregulator		* Anzahl der Analyten < 50 % Wiederfindung (max. 38)						
AB	Antibiotikum		** hoher blank						
S	Süßstoff		*** NP-PEI-25k-Mal A/HR-X/HLB						
AE	Antiepileptikum		**** Oasis HLB, pH 7,0						
BB	Betablocker								
KM	Kontrastmittel								
I	Insektizid								
PSM	Pflanzenschutzmittel								

erhöhten Wasserstoffbrückenakzeptoren- und -donorenanteil, wie Iopromid oder Erythromycin, zeigen zum Teil deutliche Verbesserungen der Wiederfindung im Vergleich zu der kommerziellen Adsorberphase. Besonders bei Erythromycin kann mit den Nanopartikeln eine hohe Wiederfindungsrate von 91 % erzielt werden. Diese Optimierung ist bei den modifizierten Partikeln mit Struktur A besonders stark und zeigt in diesem Fall, dass die erhöhte Oligosaccharidschalendichte einen positiven Einfluss auf die Auftrennung besitzt. Das kommerzielle Oasis HLB konnte eine Anreicherung dieses zyklischen Antibiotikums kaum erzielen.

Einige Analyten liegen bei den genutzten Extraktionsbedingungen (pH-Wert 7,0) teilweise dissoziiert vor und können über starke elektrostatische Wechselwirkungen interagieren. Beispiele solcher Analyten sind die Pharmaka Ibuprofen (pK_s 4,5-4,6)^[183], Ketoprofen (pK_s 4,2)^[184] und Diclofenac (pK_s 4,1)^[185]. Als Folge können bei diesen Analyten erhöhte Wiederfindungen von 42 %, 63 % und 50 % erhalten werden. Verbindungen mit COOH-, OH- und NH-Funktionalitäten scheinen somit effektiv mit den modifizierten Partikel interagieren zu können, wobei neben COOH- bzw. OH-OH-Wechselwirkungen vor allem OH-NH-Interaktionen die Extraktionsausbeute beeinflussen. Besonders deutlich ist eine Verbesserung bei der Extraktion von Propranolol mit den modifizierten Partikeln. Im Vergleich dazu wird dieser Analyt mit dem Oasis HLB Standardkartuschen signifikant schlechter extrahiert (40 % Wieder-

findung). Im Fall des Süßstoffs Aspartam und des Lipidregulators Clofibrinsäure, fällt eine deutliche Abnahme der Wiederfindung im Vergleich zu den Oasis HLB Werten auf. Aufgrund der eher kleineren Molekülgröße und der im Vergleich zu den anderen benutzten Analyten mit Carboxylfunktionalität, weisen beide Analyten einen geringeren hydrophoberen Anteil auf. Aufgrund dieser beiden Eigenschaften scheinen diese beiden Analyten stärker mit der Adsorberphase wechselzuwirken, wodurch jedoch die Wiederfindung verschlechtert wird.

Bei den Adsorbergemischen fällt auf, dass bei den gemischten Phasen im Mix deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden als bei der Verwendung von separaten Schichten. Ausnahmen stellen die Analyten Metronidazol, Metformin, Saccharin und Bentazon dar. Hier kann bei der Verwendung von Adsorbergemischen eine Verbesserung der Wiederfindung im Vergleich zu den Adsorberphasen aus ausschließlich modifizierten Partikeln festgestellt werden. Diese erhöhten Wiederfindungsraten sind zum Teil auf die Addition der kommerziell erhältlichen Adsorberphasen zurückzuführen, die bereits in der Referenzmessung hohe Raten aufweisen.

Zusammenfassend kann für die Festphasenextraktion festgehalten werden, dass die Adsorberphasen aus Nanopartikeln zum Teil gute Ergebnisse für nahezu alle Analyten erzielen. Die Wiederfindung der einzelnen Analyten ist stark von dem jeweiligen Analyten abhängig. Zum Teil kann durch die Nutzung oder den Zusatz von modifizierten Partikeln eine höhere Wiederfindung erhalten werden. Dies gilt vor allem für zum Teil dissoziierte Analyten und solche mit einem erhöhten Stickstoffgehalt. Für eine gute Extraktion sind somit Ladungen sowie die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen essentiell. Die Performance des hochentwickelten kommerziell erhältlichen Oasis HLB Adsorbers können die Partikel nur bedingt erreichen. Dennoch wird deutlich, dass die modifizierten Partikel bzw. die Polymere an deren Oberfläche großes Potential aufweisen. Weitere Untersuchungen in anderen pH-Bereichen, bei denen deutlich mehr Analyten dissoziiert vorliegen, könnten weitere Optimierungen bringen.

Die Partikel mit der PEI-OS-Modifizierung mit einer sehr dichten Maltoseschale erzielen bessere Ergebnisse als die vergleichbaren Partikel mit den Strukturen B und C auf der Oberfläche. Der höhere Oligosaccharidschalen-Anteil scheint somit eine positive Wirkung auf die Auftrennung zu haben. Allerdings war die Anbindung der Struktur A geringfügig besser als die Anbindung der anderen Strukturen. Der höhere Modifizierungsgrad der Partikeloberfläche könnte somit ebenfalls zu einer besseren Interaktion mit den Analyten führen und die Optimierungen für Struktur A bewirken.

Obwohl bei der Herstellung der Partikel eine erfolgreiche Modifizierung nachgewiesen werden konnte, ist diese zum Teil nicht vollständig. Durch eine Verbesserung der Präparation der Partikel und einer erhöhten Anbindung der polymeren Kern-Schale-Architekturen könnten weitere Optimierungen vorgenommen werden. Weiterhin werden sowohl in der HPLC als auch in SPE häufig unpolare Alkylketten für einen Umkehrmodus verwendet. Eine Untersuchung der Partikel mit den PEI-Spacer-Architekturen auf der Oberfläche wäre somit hoch interessant. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die mit PEI-OS-Architekturen modifizierten Partikel Potential als Adsorberphase in der Festphasenextraktion aufweisen. Weiterführende Untersuchungen und Optimierungen sind allerdings notwendig, um hochselektive und sensitive Adsorber bzw. chromatographische Selektoren zu erhalten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Verwendung von Kern-Schale-Architekturen als chromatographische Selektoren in modernen Trennmethode ist ein Verständnis der auftretenden Wechselwirkungen mit möglichen Analyten essentiell für einen zielgerichteten und effektiven Einsatz. Hoch spezifische und sensitive Analytikmethoden sind in der heutigen Zeit mit Volkskrankheiten wie Krebs oder Autoimmunerkrankungen wichtiger denn je. Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Kern-Schale-Architekturen hergestellt und charakterisiert. Die Wechselwirkungen mit biologisch relevanten Beispielmolekülen wurden umfangreich mit Hilfe verschiedenster Techniken untersucht und evaluiert. Hierfür wurden Kern-Schale-Architekturen hergestellt, die als zentralen polymeren Kern das hochverzweigte Poly(ethylenimin) aufweisen.

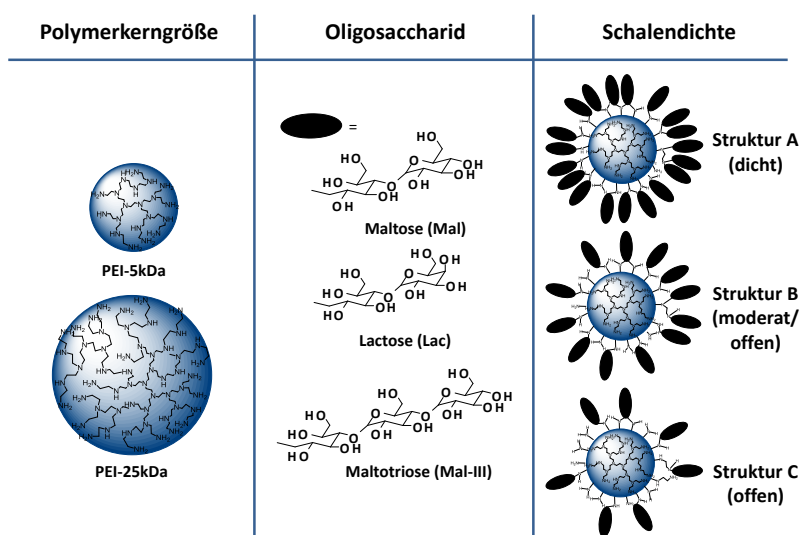


Abbildung 91: Übersicht der einzelnen Einflussfaktoren wie Kerngröße, Oligosaccharid oder Schalendichte bei den PEI-OS-Architekturen.

Dieser Kern wurde mit Oligosacchariden modifiziert. Um Einflussfaktoren auf die Interaktionen ermitteln zu können, wurden unterschiedliche Parameter und somit die Eigenschaften der Kern-Schale-Architekturen (**Abbildung 91**) geändert. Infolgedessen wurden zwei Polymerkerngrößen verwendet (Poly(ethylenimin) mit 5 und 25 kDa), sodass der Kerneinfluss untersucht werden konnte. Weiterhin konnte der Funktionalisierungsgrad des Oligosaccharids durch variierende Synthesebedingungen eingestellt werden. Es wurden drei unterscheidbare Oligosaccharidschalendichten erhalten: eine sehr dichte Schale (Struktur A), eine moderate bis offene Schale (Struktur B) und eine offene Schale (Struktur C). Als Oligosaccharide wurden drei verschiedene Kohlenhydrate verwendet. Maltose und Lactose wurden als Disaccharide eingesetzt und Maltotriose als Trisaccharid.

Neben diesen hydrophilen Poly(ethylenimin)-Oligosaccharid-Architekturen (PEI-OS-Architekturen) wurden Strukturen hergestellt, die einen höheren hydrophoben Anteil aufweisen

(Abbildung 92). Hierfür wurden PEI-5 kDa und PEI-25 kDa Polymerkerne genutzt, die

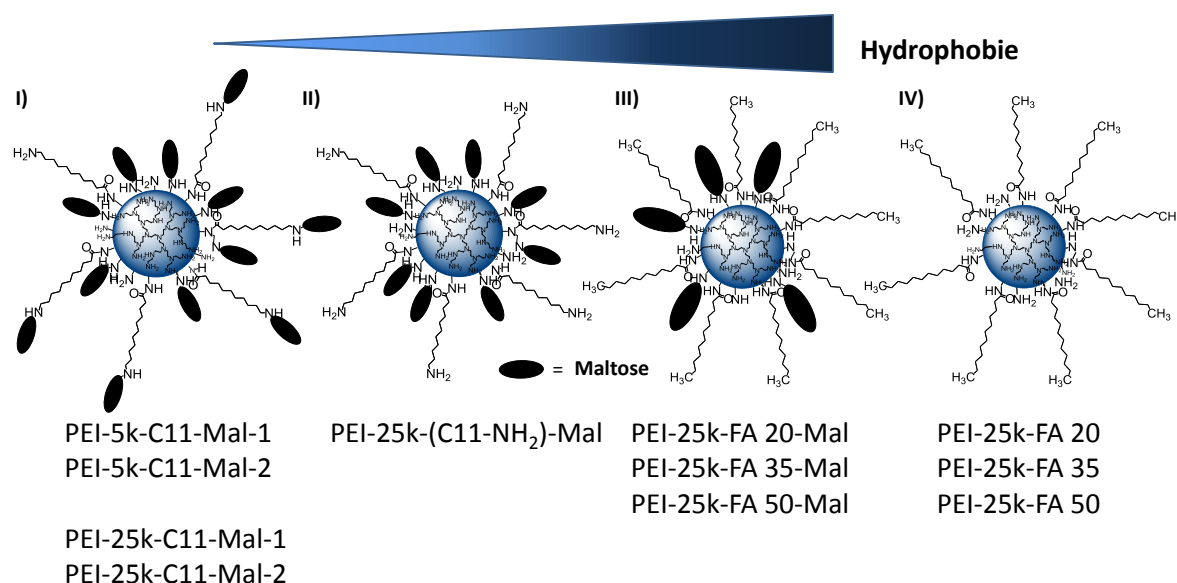


Abbildung 92: Übersicht der Kern-Schale-Architekturen mit einem höheren hydrophoben Anteil mit den PEI-Spacer-Architekturen (I und II) und den PEI-FA-Architekturen (III und IV).

mit C11-Alkylketten (Spacer) modifiziert und anschließend maltosyliert wurden (PEI-Spacer-Architekturen; PEI-5k/ 25k-C11-Mal-1/ Mal-2). In Abhängigkeit des Zeitpunktes der Entschüttung konnten 2 verschiedene Architekturtypen hergestellt werden, die sich aufgrund des Ortes der Maltosylierung unterscheiden. Bei den PEI-C11-Mal-Architekturen bindet die Maltose hauptsächlich an den Spacer-Enden und in geringen Maße auch am Polymerkern (Abbildung 91 I)). Diese Architekturen wurden mit 5 und 25 kDa Poly(ethylenimin) und mit zwei unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden der Oligosaccharidschale hergestellt. Mit Mal-1 wird ein höherer Funktionalisierungsgrad abgekürzt, wohingegen Mal-2 für einen niedrigeren Funktionalisierungsgrad steht. Weiterhin wurde die Maltose nur an den Polymerkern gebunden (Abbildung 91 II)). Architekturen mit dieser Modifizierung wurden nur mit dem PEI 25 kDa Kern hergestellt (PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal). Um den hydrophoben Anteil weiter zu erhöhen, wurden Fettsäuren (FA) mit einem höheren Funktionalisierungsgrad an einen 25 kDa Polymerkern angebunden (PEI-FA-Architekturen). Der Kern wurde mit 20, 35 oder 50 Fettsäure-Einheiten (FA-Einheiten) modifiziert und somit deutlich hydrophobe Architekturen generiert. Diese wurde zum einen mit (Abbildung 91 III)) und zum anderen ohne Maltoseschale (Abbildung 91 IV)) hergestellt und untersucht. Sie werden im Folgenden als **PEI-FA-Architekturen** bezeichnet.

5.1 Interaktionsuntersuchung der PEI-OS-Architekturen mit Hilfe von Ultrafiltrationsexperimenten

Mit Hilfe von Ultrafiltrationsuntersuchungen konnten unterschiedliche Interaktionsmechanismen der Analyten mit den PEI-OS-Architekturen festgestellt werden. Unterschiedliche Faktoren können die Art und die Stärke der auftretenden Wechselwirkungen zwischen den

vorgestellten Kern-Schale-Architekturen und bioaktiven Molekülen beeinflussen. Als Gastmoleküle dienten wasserlösliche Vitamine der B-Gruppe und ein Steroid-Derivat. Diese Gastmoleküle wurden ausgewählt, da sie biologisch relevant sind und unterschiedliche Wechselwirkungen ermöglichen. Thiamin (B_1) weist in Lösung eine leicht positive Ladung auf, wohingegen Niacin (B_3) sowie ein Estradiol-Derivat (Estradiol Glucuronid) unter den genutzten Versuchsbedingungen eine negative Ladung tragen. Pyridoxin (B_6) liegt in wässrigen Lösungen überwiegend in einem zwitterionischen Zustand vor. Bei Riboflavin (B_2) ist eine hohe Anzahl an Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und -Donoren gegeben und eine Interaktion über nicht-kovalente, vergleichsweise schwache Wasserstoffbrücken denkbar. Cyanocobalamin (B_{12}) weist im Vergleich zu den anderen Analyten eine große Struktur auf, wodurch auch Unterschiede der Analytgröße untersucht werden können. Diese Analyten können gemäß ihren Eigenschaften und ihrem Komplexierungsverhalten in verschiedene Gruppen aufgeteilt werden (Abbildung 93).

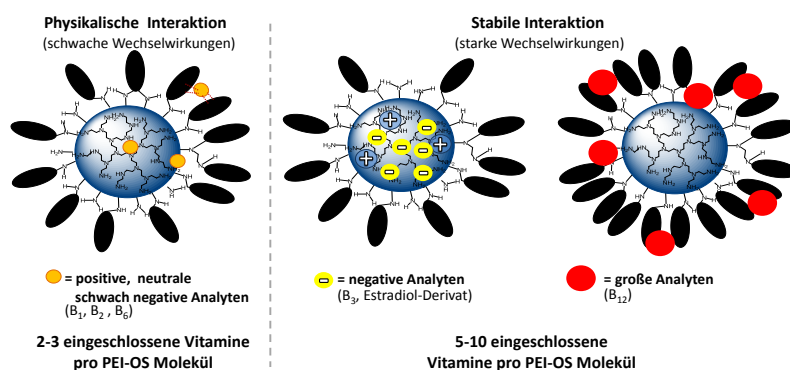


Abbildung 93: Übersicht der auftretenden Interaktionen der Analyten mit den PEI-OS-Architekturen. Links: schwache Wechselwirkungen; mittig: starke elektrostatische Interaktionen der negativ geladenen Analyten mit dem positiv geladenen Polymerkern; rechts: Oberflächen-induzierte Interaktion mit sterisch sehr anspruchsvollen Analyten.

Die Vitamine B_1 , B_2 und B_6 können als leicht-interagierende Analyten beschrieben werden, die hauptsächlich über schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals- oder Dispersionswechselwirkungen, gebunden werden. Im Fall des zwitterionischen B_6 scheinen nur schwache elektrostatische Interaktionen ausgebildet zu werden, die bei den genutzten Separationsbedingungen nicht stabil sind. Das Vitamin B_3 und das Estradiol-Derivat mit ausgeprägtem negativem Charakter, interagieren sehr gut mit dem positiv geladenen Polymerkern und stabile elektrostatische Wechselwirkungen werden ausgebildet. Das sterisch sehr anspruchsvolle Vitamin B_{12} interagiert hauptsächlich an der Oberfläche der PEI-OS-Architekturen. Diese Wechselwirkung ist weniger stark ausgeprägt, als eine Interaktion mit dem polymeren Kern und ist unter Scherkräften und höherem Druck reversibel. Dies konnte anhand einer zunehmenden Konzentration an B_{12} im Eluat gegen Ende einer Ultrafiltration bei erhöhten Scherkräften beobachtet werden. Anhand der Ergebnisse der Ultrafiltrationsexperimente kann geschlussfolgert werden, dass die Wechselwirkungen von dem jeweiligen Analyten bzw. dessen Eigenschaften maßgeblich bestimmt werden. Für stabile und starke Wechselwirkungen mit den PEI-OS-Architekturen sind negativ geladene Analyten besonders geeignet, da diese über elektrostatische Wechselwirkungen mit der posi-

tiven Ladung des Polymerkerns interagieren können. Bei den negativ geladenen Analyten erzielte die dichteste Zuckerschale mit Struktur A häufig die niedrigsten Aufnahmezeiten. Von Struktur A hin zur offenen Zuckerschale war eine Zunahme der Aufnahmezeiten zu erkennen. Hierbei spielen die unterschiedlichen Verhältnisse an terminalen, linearen oder dendritischen Aminogruppen in den PEI-OS-Architekturen eine wesentliche Rolle und beeinflussen maßgeblich deren Protonierung und Ladungszustand. Struktur A mit einer dichten Oligosaccharidschale trägt überwiegend dendritische Aminogruppen, wohingegen Struktur B hauptsächlich lineare Aminogruppen in der Peripherie trägt. Die sehr offene Struktur C weist vorwiegend terminale und lineare Aminogruppen in der Peripherie auf.^[52] Struktur A wird somit zum einen besser durch die dichte Oligosaccharidschale abgeschirmt und zum anderen wird ein niedrigerer pH-Wert benötigt, um eine Protonierung der tertiären Amine zu erreichen. Der isoelektrische Punkt der Strukturen A liegt aus diesem Grunde am Niedrigsten. Bei den Versuchsbedingungen der Ultrafiltrationsexperimenten mit einem pH-Wert zwischen 8 und 9, liegt die Struktur A zumeist in einem leicht negativ geladenen Zustand vor. Eine Interaktion mit negativ geladenen Analyten ist somit deutlich erschwert im Vergleich zu den positiv geladenen Polymerkernen bei den Strukturen B und C. Bei einer offenen Oligosaccharidschale wie bei Struktur C, kann ein negativ geladener Analyt sehr gut mit dem positiv geladenen Polymerkern interagieren, da weiterhin nur eine geringe Abschirmung vorliegt. Für die Ausbildung von stabilen Wechselwirkungen sind Ladungen folglich äußerst wichtig. Die Ladungszustände der Analyten und der PEI-OS-Architekturen sind somit essentiell.

5.2 NMR-Untersuchungen der Interaktionen von B₆ mit den PEI-OS-Architekturen

Neben den Ultrafiltrationsuntersuchungen wurden NMR-Messungen durchgeführt, die weitere Einblicke in die Interaktion der PEI-OS-Architekturen speziell mit Vitamin B₆ ermöglichen. Dies wurde durch zusätzliche Signale des B₆ in Folge der Wechselwirkung mit den PEI-OS-Architekturen ermöglicht. Tritt B₆ in Wechselwirkung mit den Polymeren können für die Protonen 1-4 nicht nur ein Signal, sondern pro Proton drei unterscheidbare Signale beobachtet werden (**Abbildung 94**). Insbesondere die Signale ab 7,50 ppm sind interessant. Da hier keine Signale des PEI-OS überlagern, können diese gut ausgewertet und integriert werden.

Mit Hilfe von DOSY-Untersuchungen konnte das Signal bei 7,65 ppm dem freiem B₆ zugeordnet werden, das nicht mit den PEI-OS-Architekturen interagiert. Das Diffusionsverhalten der Signale mit einer chemischen Verschiebung über 7,70 ppm ändert sich während der DOSY-Messungen deutlich. Das Signal mit der höchsten chemischen Verschiebung zeigt sogar ein vergleichbares Diffusionsverhalten wie das PEI-OS. Diese Signale werden folglich durch die Interaktion mit dem Polymer verursacht. Bei der Interaktion von unmodifiziertem PEI ohne eine Oligosaccharidschale mit B₆ kann lediglich ein Signal für das freie B₆ beobachtet werden. Es kann vermutet werden, dass die Wechselwirkung mit dem Polymerkern ohne Oligosaccharidschale einen äußerst dynamischen Prozess darstellt, der mit NMR-Untersuchungen nicht beobachtbar ist. Auch unter anderen Bedingungen können keine Signale für eine Interaktion des unmodifizierten PEIs mit B₆ gefunden werden. Um zu untersuchen, ob die Interaktion des B₆ über beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen mit der Oligosaccharidschale statt-

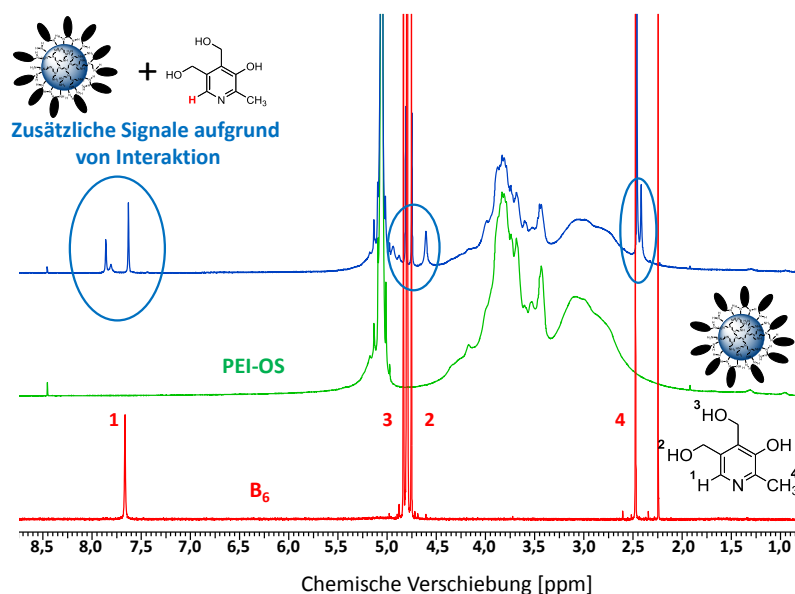


Abbildung 94: Übersicht der ^1H -NMR-Spektren des freien, nicht interagierenden B_6 (rot), des freien, nicht interagierenden PEI-OS (grün) und B_6 in Interaktion mit PEI-OS (blau). Aufgrund der Interaktion mit PEI-OS ergeben sich für B_6 3 Signale je Proton. Freies B_6 weist hingegen nur 1 Signal pro Proton auf.

findet, wurde ein Polysaccharid genutzt. Glykogen weist eine hochverzweigte Struktur auf, die mit einem Polymer vergleichbar ist. Unter analogen Messbedingungen wurde die Interaktion dieses Polysaccharids mit B_6 mittels NMR-Messungen untersucht. Auch mit dem hochverzweigten Polysaccharid können keine Signale gefunden werden, die auf eine Interaktion hindeuten. Für stabile Interaktionen, die mit NMR-Messungen nachgewiesen werden können, scheint ein Zusammenspiel von geladenem Polymerkern und einer Oligosaccharidschale als Diffusionsbarriere (**Abbildung 95**) essentiell zu sein.

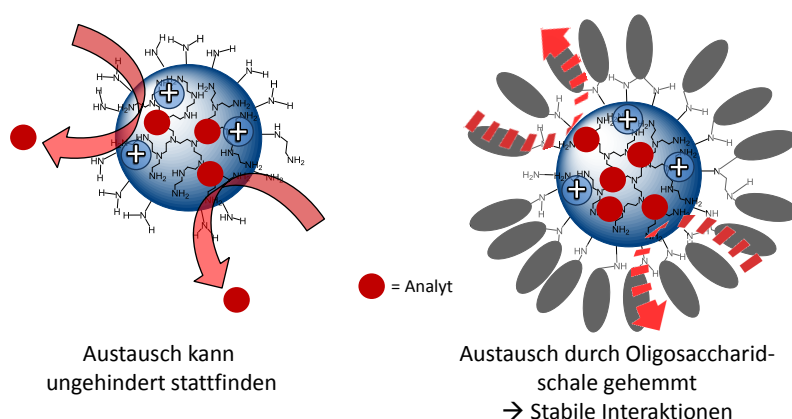


Abbildung 95: Verdeutlichung der dynamischen Prozesse während der Interaktion der Analyten mit den Polymeren. Links: unmodifiziertes PEI-WF ohne Oligosaccharidschale. Analytmoleküle können mit dem positiv geladenen Kern interagieren, werden aber wieder freigesetzt. Rechts: Kern-Schale-Architekturen mit interagierenden Analytmolekülen. Diese sind durch die Oligosaccharidschale gehemmt. Die Interaktionen erscheinen zeitlich stabiler.

5.3 Interaktionsuntersuchungen an dünnen Schichten

Neben den auftretenden Interaktionen müssen ebenfalls die Prozesse innerhalb einer modifizierten Säule verstanden und entsprechend eingesetzt werden können. Da *in-situ*-Untersuchungen innerhalb einer Chromatographie-Säule nur schwer möglich sind, wurden Silizium-Wafer mit Kern-Schale Polymeren beschichtet und mittels Ellipsometrie- und Fluoreszenz-Messungen untersucht. Auf diese Art und Weise konnten Rückschlüsse auf die Stabilität der Polymermodifikationen gezogen werden und das Interaktionsverhalten der Polymerschichten mit Analyten untersucht werden. Als Polymere diente eine Beispielstruktur der PEI-OS-Architekturen (PEI-25k-Mal B). Angesichts der sehr häufig verwendeten Umkehrphasen-Chromatographie mit unpolaren Seitenketten als Oberflächenmodifizierung wurden ebenfalls PEI-Spacer-Architekturen getestet. Für die Herstellung von stabilen, dünnen Schichten wurden die Polymere thermisch mit Citronensäure vernetzt. Die Schichten zeigen ein schnelles und deutliches Quellverhalten in wässriger Lösung. Dieses ausgeprägte Quellverhalten sollte bei einer möglichen Modifizierung einer Trennsäule berücksichtigt werden, um mögliche Engpässe oder Verstopfungen einer Säule zu vermeiden. Die Untersuchung der Polymere mit Analyten in dünnen Schichten zeigt zwar keine stark ausgeprägten Änderungen der Schichteigenschaften, dennoch kann ein Einfluss der Analyten auf die Polymerschichteigenschaften mittels Ellipsometrie- und Fluoreszenzmessungen nachgewiesen werden. Die meisten Interaktionen mit der Polymerschicht fanden innerhalb der ersten Minuten statt und veränderten die Schichtcharakteristika. Darüber hinaus waren diese Interaktionen größtenteils reversibel und die ursprünglichen Schichtcharakteristika konnten zurückerhalten werden. Die auftretenden Interaktionen finden überwiegend an der Oberfläche der Polymerschicht statt (**Abbildung 96 (a)**). Eine Interaktion, bei der die Analyten in der Polymerschicht eindringen und im Inneren der Polymerschicht interagieren, konnte nicht explizit nachgewiesen werden (**Abbildung 96 (b)**).

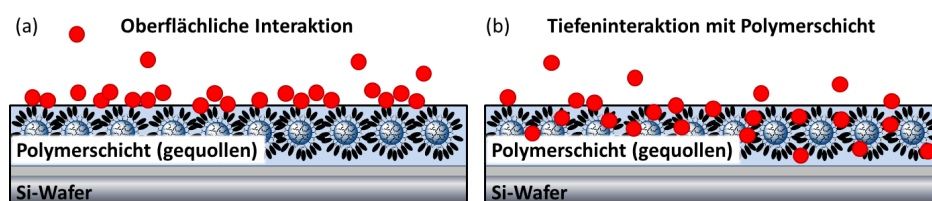


Abbildung 96: Verdeutlichung der auftretenden Wechselwirkungen mit der Polymerschicht, die entweder mit der Oberfläche der Polymerschicht (a) oder in der Polymerschicht (b) stattfinden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die untersuchten Polymerschichten interessante Eigenschaften, wie eine sehr schnelle Quellung bei Interaktion mit diversen bioaktiven Analyten, zeigen. Weitere Untersuchungen in Puffer und in anderen pH-Bereichen sollten folgen, um zum einen die Stabilität der Polymerschichten abzuklären und die auftretenden Wechselwirkungen optimal nutzen zu können.

Bei Vitamin C, Folsäure und ATP sollten weitere Experimente ihre destabilisierende Wirkung auf die Polymerschicht abklären, um einen ungewollten Abbau in einer Trennsäule zu verhindern. Dieses Verhalten tritt jedoch meist erst nach mehreren Stunden auf, sodass es bei kurzen Messzeiten nur einen marginalen Einfluss hat. Untersuchungen mit vielen Wieder-

holungen mit kurzzeitiger Exposition, wie sie bei einer Auftrennung von Analytgemischen auftritt, sollten näher getestet werden. Weiterhin sollte der Einfluss des Vernetzers bzw. der durch diesen hervorgerufenen Ladungszustand der Polymerschicht näher untersucht werden. Da die stabilsten Interaktionen aufgrund auf elektrostatischen Interaktionen gebildet werden, sollte die Ladung der Polymerschicht eindeutig geklärt werden. Mit diesem Wissen können Polymerfilme effektiver eingesetzt und die Ausbildung von elektrostatische Wechselwirkungen besser ausgenutzt werden.

5.4 Anwendung der PEI-OS-Architekturen in der Chromatographie

5.4.1 Ergebnisse der Dünnschicht-Chromatographie-Experimente

Die Modifizierung von TLC-Platten mit PEI-OS-, PEI-Spacer- und PEI-FA-Architekturen bewirkte teils nur geringe Effekte. Eine generelle Optimierung konnte nicht erzielt werden. Die Interaktion der einzelnen Analyten war äußerst komplex und führte in vielen Fällen zu Spotverbreiterungen und somit zu einem Abfall der Effizienz. Die Interaktion einer mit Polymeren behandelten Platte mit Analyten ist von den Eigenschaften und den funktionellen Gruppe des jeweiligen Analyten abhängig. Während der Entwicklung der TLC-Platte kam es zu Inhomogenitäten und zum Ablösen der Polymerschicht. Die Modifizierung der TLC-Platten durch Aufsprühen einer Polymerlösung erscheint somit nicht eine optimale und homogene Modifizierung zu erzielen. Eine kovalente Modifizierung der stationären Phase wäre interessant. Die Herstellung von Silika-Partikeln mit polymeren Kern-Schale-Architekturen auf der Oberfläche könnte eine Optimierung bringen. Die Bildung von stationären Phasen aus diesen funktionalisierten Partikeln könnte die genannten Probleme beheben und sollte in zukünftigen Versuchen näher untersucht werden.

5.4.2 Ergebnisse der HPLC-Experimente

Die Addition von PEI-OS-Architekturen zu der mobilen Phase in der HPLC hatte kaum einen signifikanten Effekt auf die Trenneffizienz von wasserlöslichen Vitaminen. Die Verwendung der PEI-OS-Architekturen als pseudostationäre Phase bringt somit keine relevante Optimierung. Für zukünftige Versuche sollte eine kovalente Modifizierung der HPLC-Säulenoberfläche durchgeführt und getestet werden. Hier könnten vor allem die PEI-Spacer-Architekturen interessant sein. Diese könnten analog zu den häufig verwendeten HPLC-Säulen mit unpolaren Seitenketten in einem Umkehrphasen-Modus getestet werden.

5.4.3 Ergebnisse der Kapillarelektrophorese-Experimente

In der Kapillarelektrophorese wurden PEI-OS-Architekturen als Additive zu einem Phosphat-Puffer als Trennelektrolyten (pH 7,0, 20 mM) hinzugegeben und die Auftrennung von wasserlöslichen Vitaminen und Adenosin-Derivaten untersucht. Als PEI-OS-Architekturen wurden die Strukturen PEI-25k-Mal A und C, sowie PEI-25k-Mal-III A und C ausgewählt. Die bei pH 7,0 positiv geladenen Kern-Schale-Architekturen interagierten mit den negativ geladenen

Kapillarwänden über elektrostatische Wechselwirkungen und lagerten sich an den Kapillarwänden ab. Sie bildeten eine nicht-kovalente, dynamische Modifizierung der Kapillare. Eine Ausnahme stellte das PEI-25k-Mal A dar, das bei einem pH-Wert von 7,0 neutral bis nur schwach anionisch geladene vorlag. Unter diesen Bedingungen lag diese Struktur aufgrund von repulsiven Kräften mit der negativ geladenen Kapillaroberfläche folglich als eine pseudostationäre Phase in dem Trennelektrolyten vor. Aufgrund dieser Unterschiede in der Polymerladung war es möglich Unterschiede zwischen einer kationisch, dynamischen Modifizierung der Kapillarwände und der Addition einer pseudostationären Phase zu untersuchen. Bei der Auftrennung von wasserlöslichen Vitaminen (B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂ und Vitamin C) konnte eine deutliche Änderung des Migrationsverhalten durch die Addition der Kern-Schale-Polymere beobachtet werden. Ohne Polymeraddition und mit dem PBS-Puffer als Trennelektrolyt migrierten alle Vitamine bei einer positiven Spannung durch die Kapillare. Nach der Addition der Polymere konnten nicht alle Vitamine mit einer positiven Spannung transportiert werden. Vor allem die negativ geladenen Analyten, wie B₃ und Vitamin C, migrierten überwiegend nur mit einer negativen Trennungsspannung. Darüber hinaus konnten deutliche Unterschiede zwischen einer Addition der Polymere PEI-25k-Mal A und C festgestellt werden. Bei dem nur schwach geladenen PEI-25k-Mal A findet im Gegensatz zu PEI-25k-Mal C nur eine äußerst geringe bis keine Adsorption an der Kapillarwand statt. Die Effekte auf das Migrationsverhalten der getesteten Analyten bei einer pseudostationären Phase bzw. bei nur einer geringen Modifizierung der Kapillarwände waren geringer als die bei einer kationischen, dynamischen Modifizierung. Für die Untersuchungen mit Adenosin-Derivaten (Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP)) wurde daher nur eine dynamische Modifizierung genutzt. Das Migrationsverhalten der Adenosin-Derivate ändert sich nach Addition der Polymere drastisch. Während ohne Polymerzusatz eine Detektion aufgrund von zu geringer Migration nicht möglich war, konnten die Adenosin-Derivate nach Polymeraddition mit einer kurzen Messzeit detektiert werden. Auch bei diesen Analyten konnten deutliche Unterschiede zwischen den Strukturen mit einer dichten und einer offenen Oligosaccharidschale festgestellt werden. Bei den Strukturen mit einer sehr dichten Oligosaccharidschale konnte das zu erwartende Migrationsverhalten (bei negativer Spannung zuerst die Analyten mit der höchsten negativen Ladung: ATP, ADP, AMP) nachgewiesen werden. Überraschenderweise konnte bei den offenen Strukturen C ein nahezu inverses Migrationsverhalten der Analyten erhalten werden. Sowohl bei PEI-25k-Mal C als auch bei PEI-25k-Mal-III C wird das weniger stark geladene AMP vor den Derivaten mit einer höheren Ladung detektiert (**Abbildung 97**).

Im Fall von PEI-25k-Mal C ist eine Detektion des am stärksten negativ geladenen ATP sogar nicht mehr innerhalb der Messzeit von 40 Minuten möglich. Aufgrund der geringeren Abschirmung der positiven Kernladung bei der offenen Struktur C konnten verstärkt elektrostatische Interaktionen auftreten. Diese sind umso stärker, je stärker der Analyt geladen ist. In diesem Fall bedeutet dies, dass die Interaktion mit ATP die stärkste ist. Der Analyt wurde derart von den PEI-OS-Architekturen mit einer offenen Oligosaccharidschale zurückgehalten, dass er ein stark verlangsamtes Migrationsverhalten aufwies. Starke elektrostatische Interaktionen der negativ geladenen Analyten mit den positiv geladenen Polymerkernen konnten somit nachgewiesen werden. Diese starken Interaktionen, die deutlich veränderte Migrati-

onszeiten der Analyten verursachen, erscheinen sehr interessant und könnten für weitere Optimierungen genutzt werden.

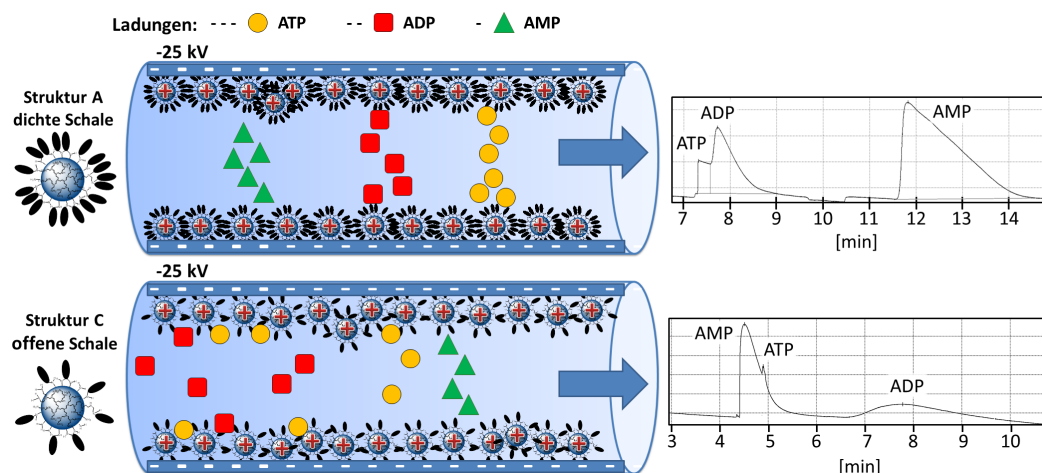


Abbildung 97: Veranschaulichung der CE-Ergebnisse mit den Adenosin-Derivaten und unterschiedlichen PEI-OS-Strukturen. Oben: Modifizierung mit einer Struktur mit sehr dichter Oligosaccharidschale (Struktur A). Unten: Modifizierung mit einer Struktur mit offener Oligosaccharidschale (Struktur C).

5.5 Synthese und Charakterisierung von modifizierten Nanopartikeln

Um eine effektivere Optimierung der Trennleistung für die TLC, HPLC und CE zu erzielen, sollten die polymeren Architekturen nicht nur als Additive hinzugegeben werden, sondern in Form von modifizierten Partikel als neuartige stationäre Phase bzw. pseudostationäre Phase genutzt werden. Bei einer direkten Verwendung von unmodifizierten Silika-Partikeln als stationäre oder pseudostationäre Phasen in der Chromatographie treten Schwierigkeiten aufgrund fehlender Oberflächenladungen auf. Weiterhin kann es in Folge von unzureichender Suspendierung der Partikel in der mobilen Phase zu einem Verstopfen der Säule bzw. Kapillare kommen. Um diese Probleme zu beheben, wurden Silika-Partikel mit PEI-OS-Kern-Schale-Architekturen sowie mit PEI-Spacer-Architekturen modifiziert. Eine erfolgreiche Anbindung der Kern-Schale-Architekturen auf die Partikeloberfläche konnte mit Hilfe diverser Analysen nachgewiesen werden.

5.5.1 Interaktionsuntersuchungen der modifizierten Partikel mit Beispielanalyten

Interaktionsuntersuchungen der modifizierten Partikel mit wasserlöslichen Vitaminen und einem Estradiol-Derivat (Estradiol Glucuronid) zeigten für alle Analyten eine hohe Aufnahme und eine gute Wechselwirkung in Batch-Versuchen. Nach einer Interaktionszeit von 3 bzw. 20 Stunden war bei den meisten Analyten keinerlei Aufnahme mehr erkennbar. Als mögliche stationäre Phase würde sich dieses Verhalten positiv auswirken. Die Analyten wechselwirkten zunächst sehr gut mit den modifizierten Partikeln und eine effektive Auftrennung resultierte. Im Anschluss konnte bereits nach kurzer Zeit keine bzw. nur geringe Wechselwirkung der

Analyten mit der stationären Phase festgestellt werden. Dies bedeutet, dass eine derart modifizierte Trennsäule nicht durch zu stark interagierende und nicht eluierte Analyten verstopfen sollte. Eine sehr effektive und schnelle Regenerierung der stationären Phase mit gereinigtem Wasser wäre somit sehr gut denkbar. Weiterhin war ein Einfluss der Maltoseschalendichte deutlich. Bei negativ geladenen Analyten, wie Niacin, Cyanocobalamin und dem Estradiol-Derivat, war ein Abfall der Aufnahmeeffizienz von Struktur A zu Struktur C zu erkennen. Aufgrund der geringeren Abschirmung der Kernladung durch eine offenere Maltoseschale wie bei Struktur C, sollte theoretisch eine höhere Aufnahmeeffizienz bei Struktur C gefunden werden. Der nachgewiesene inverse Trend legt die Vermutung nahe, dass die Anbindung an die Partikeloberfläche mit Struktur A wesentlich besser ablief als mit Struktur C. Bei Struktur C waren somit weniger PEI-OS-Moleküle auf der Partikeloberfläche angebunden. Weiterhin konnten aufgrund der unvollständigen Modifizierung der Partikeloberfläche Repulsionskräfte zwischen den Partikeln und den Analyten auftreten. Im Fall des leicht positiv geladenen Thiamins war eine umgekehrte Aufnahmeeffizienz zu erkennen. Bei Struktur A, mit einer sehr dichten Zuckerschale, wurde weit weniger Thiamin aufgenommen als mit der offeneren Zuckerschale von Struktur C. Dieses Verhalten kann aufgrund der positiven Ladung des Thiamins und elektrostatischer Interaktion mit der negativ geladenen Partikeloberfläche erklärt werden, wofür die zeitlich stabile Aufnahmeeffizienz für Thiamin sprechen würde. Für Riboflavin wurde eine moderate Aufnahmekapazität gefunden. Diese Aufnahmekapazität war für alle Schalendichten relativ gleich. Da Riboflavin nicht geladen vorliegt und darüber hinaus einen höheren sterischen Anspruch hat, kann eine Wechselwirkung mit dem PEI-OS auf der Partikeloberfläche gehemmt sein. Für das zwitterionische Vitamin Pyridoxin konnte für Struktur A und C eine hohe Aufnahme bzw. eine starke Wechselwirkung detektiert werden. Es kann vermutet werden, dass im Fall von Struktur A eine gute Wechselwirkung mit dem auf der Partikeloberfläche angebundenen PEI-OS stattfand, wohingegen bei Struktur C der Einfluss der Partikeloberfläche selbst entscheidend war.

5.5.2 Anwendung der modifizierten Partikel in der Dünnschicht-Chromatographie

Für die Vitamine B₁, B₂ und B₆, die mit den PEI-OS nur über schwache Wechselwirkungen interagieren, trat kaum eine Änderung der R_f-Werte bzw. der Trenneffizienz auf. Zusammenfassend waren die Ergebnisse der modifizierten Partikel in der TLC eher ernüchternd. Die verwendete Methode bzw. die Modifizierung der stationären Phase erzielte keine signifikante Verbesserung bei der Auftrennung. Bei der Modifizierung durch Aufsprühen traten gerade bei Suspensionen Inhomogenitäten, wie Inselbildung oder auch Bereiche geringer oder keiner Modifizierung, auf. Dies führte zu Fehlern und zur Verschlechterung der Auftrennung. Weitere Experimente zur Optimierung der Aufbringung und der Herstellung kompletter neuartiger stationärer Phasen wären ratsam. Auf diese Art und Weise könnten die modifizierten Partikel besser untersucht und Fehler durch Inhomogenitäten ausgeschlossen werden.

5.5.3 Untersuchung der modifizierten Partikel in der Festphasenextraktion

Weiterhin wurden die modifizierten Partikel als Adsorber in der Festphasenextraktion getestet. Hierfür wurden zum einen reine Phasen der Partikel genutzt und zum anderen gemischte

Phasen mit kommerziell erhältlichen Adsorberphasen. Für die Versuche wurden Analytgemische mit unterschiedlichen umweltrelevanten Verbindungen, wie beispielsweise Schmerzmittel, Pflanzenschutzmittel, Insektizide und andere verwendet.

Zum Teil kann durch die Nutzung oder den Zusatz von modifizierten Partikeln eine höhere Wiederfindung erhalten werden. Dies gilt vor allem für zum Teil dissoziierte Analyten und solche mit einem erhöhten Stickstoffgehalt. Für eine gute Extraktion waren somit Ladungen sowie die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen essentiell. Die Wiederfindung der einzelnen Analyten ist stark von dem jeweiligen Analyten abhängig. Die Partikel mit der PEI-OS-Modifizierung mit einer sehr dichten Maltoseschale erzielen bessere Ergebnisse als die vergleichbaren Partikel mit den Strukturen B und C auf der Oberfläche. Der höhere Oligosaccharidschalen-Anteil scheint somit eine positive Wirkung auf die Auftrennung zu erzielen. Allerdings war die Anbindung der Struktur A geringfügig besser als die Anbindung der anderen Strukturen. Der höhere Modifizierungsgrad der Partikeloberfläche und eine dichtere Oligosaccharidschale führen somit zu besseren Interaktionen mit den Analyten. Die Performance des hochentwickelten kommerziell erhältlichen Oasis HLB Adsorbers können die Partikel nur bedingt erreichen. Dennoch wird deutlich, dass die modifizierten Partikel bzw. die Polymere an deren Oberfläche großes Potential aufweisen. Weitere Untersuchungen in anderen pH-Bereichen, bei denen deutlich mehr Analyten dissoziiert vorliegen, könnten weitere Optimierungen bringen. Obwohl bei der Herstellung der Partikel eine erfolgreiche Modifizierung nachgewiesen werden konnte, ist diese zum Teil nicht vollständig. Durch eine Optimierung der Präparation der Partikel und einer erhöhten Anbindung der polymeren Kern-Schale-Architekturen könnten weitere Optimierungen vorgenommen werden. Weiterhin werden sowohl in der HPLC als auch in SPE häufig unpolare Alkylketten für einen Umkehrmodus verwendet. Eine Untersuchung der Partikel mit den PEI-Spacer-Architekturen auf der Oberfläche wäre somit hoch interessant.

5.6 Abschließendes Resümee

Zusammenfassend konnte im Zuge dieser Arbeit ein selektives Interaktionsverhalten der hergestellten Kern-Schale-Architekturen mit unterschiedlichsten Analytmolekülen nachgewiesen werden. Die Voruntersuchungen zum generellen Verständnis der auftretenden Interaktionen der Kern-Schale-Architekturen mit biologisch relevanten Beispielanalyten sollten zunächst Einsicht in den Einfluss verschiedener Parameter geben. Der Einfluss der Polymerkerngröße, der Oligosaccharidschalendichte und des Oligosaccharids sowie der Ladungszustände wurde evaluiert. Es konnte festgestellt werden, dass für stabile Interaktionen die Möglichkeiten zur Ausbildung von elektrostatischen Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen essentiell sind. Unterschiedliche Interaktionen der untersuchten Kern-Schale-Architekturen mit bioaktiven Molekülen konnten beobachtet werden. Diverse Faktoren, wie pH-Wert, Ladungen, Temperatur etc., beeinflussen diese Interaktionen. Einige dieser Faktoren konnten untersucht werden. Für weitere Optimierungen sollten jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die speziell die essentielle Rolle der Ladungszustände näher abklären.

Anhand von NMR-Untersuchungen konnte die essentielle Rolle der Modifizierung des polymeren Kerns mit einer Oligosaccharidschale für die Ausbildung von nachweisbaren, stabilen

Interaktionen verifiziert werden. Die Oligosaccharidschale fungiert als eine Art Diffusionsbarriere, die die auftretenden dynamischen Interaktionsprozesse verlangsamt und einen schnellen Austausch hemmt. Dadurch wurden interessante Möglichkeiten zur Beobachtung der Interaktionen mit B_6 mit PEI-OS-Architekturen ermöglicht.

Der Anwendungsbereich dieser interessanten Kern-Schale-Polymere ist vielfältig und unter geeigneten Bedingungen vielversprechend. Dennoch konnte ein allgemeiner Einsatz dieser Kern-Schale-Architekturen in verschiedenen analytischen Methoden nicht in jedem Fall zu einer Optimierung beitragen.

Bei der Modifizierung von TLC-Platten durch Aufsprühen der Kern-Schale-Architekturen konnten nur minimale Effekte beobachtet werden. Die Art und Weise der Generierung neuartiger stationärer Phasen durch Aufsprühen einer Polymerlösung scheint keine stabile Modifizierung zu gewährleisten. Eine Modifizierung der stationären Phase mit einer kovalenten Anbindung der Kern-Schale-Architekturen könnte eine weitere Optimierung erlauben und sollte in weiterführenden Experimenten getestet werden.

Ebenso erzielte eine Nutzung von Kern-Schale-Architekturen als Additive in der mobilen Phase in der HPLC keine weitere Optimierung. Eine kovalente Modifizierung der Trennsäulenoberfläche wäre ein sehr interessanter Punkt, der sowohl für die PEI-OS- wie auch die PEI-Spacer-Architekturen interessant erscheint. In Folge der kovalenten Anbindung der Kern-Schale-Architekturen könnten die unterschiedlichen Interaktionen, die mit den Voruntersuchungen beobachtet werden konnten, effizienter ausgenutzt werden.

Bei der Nutzung der Kern-Schale-Architekturen in der Kapillarelektrophorese als nicht-kovalente Modifizierung der Kapillaroberfläche konnte mit wasserlöslichen Vitaminen keine Optimierung der Trennleistung erzielt werden. Bei der Nutzung einer derartigen Modifizierung zur Auftrennung von Adenosin-Derivaten konnte jedoch eine deutliche Verbesserung beobachtet werden. Ohne eine dynamische Modifizierung der Kapillaroberfläche mit PEI-OS-Architekturen ist eine Detektion der negativ geladenen Adenosin-Derivate nicht innerhalb einer Messzeit von 40 Minuten möglich. Mit der Modifizierung durch PEI-OS-Architekturen ist eine Detektion innerhalb weniger Minuten möglich. Weiterhin kann ein deutlicher Einfluss der Schalendichte bzw. des Protonierungszustandes der PEI-OS-Architekturen nachgewiesen werden.

Bei der Nutzung von PEI-OS modifizierten Partikeln als Adsorbermaterial in der Festphasenextraktion konnte ein positiver Effekt auf die Wiederfindungsraten einiger Analyten gefunden werden. Bei der Untersuchung mit diversen umweltrelevanten Analyten konnte für einige eine deutliche Verbesserung durch die Nutzung von PEI-OS-modifizierten Partikeln als Adsorberphase festgestellt werden. Bei Analyten mit einem größeren sterischen Anspruch und erhöhten lipophilen Anteil wurde bei der Nutzung von modifizierten Partikeln eine Verschlechterung gegenüber den hoch effektiven, kommerziellen Adsorberphasen gefunden. Analyten, die in der Lage sind Wasserstoffbrückenbindungen und/ oder elektrostatische Interaktionen auszubilden, interagieren mit den modifizierten Partikeln jedoch sehr gut und erhöhen die Wiederfindungsraten.

Da bereits bei den Ultrafiltrationsexperimenten und den NMR-Untersuchungen festge-

stellt werden konnte, dass Parameter, wie pH-Wert und somit der Ladungszustand sowie die Temperatur, einen Einfluss auf die Interaktionen der Kern-Schale-Architekturen mit Analyten besitzen, sollten weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden, um optimale Analysebedingungen für die jeweilige Trennmethode zu bestimmen. Obwohl die genutzten Versuchsbedingungen bereits teilweise zu einer Optimierung geführt haben, sollten weitere Untersuchungen bei variierenden pH-Werten, Temperaturen und Lösungsmitteln durchgeführt werden, um eine effektivere Trennleistung zu erhalten.

Zusammenfassend können somit unterschiedliche Interaktionen mit diversen biologisch- und umweltrelevanten Analyten festgestellt werden. Durch die Ausnutzung optimaler Versuchsbedingungen könnten die untersuchten Kern-Schale-Architekturen großes Potential als chromatographische Selektoren aufweisen. Aufgrund der besseren Ergebnisse bei Nutzung der Kern-Schale-Architekturen als stationäre Phasen (beispielsweise in der CE), wäre eine Nutzung als solche in der Diagnostik sehr interessant. Erste vielversprechende Untersuchungen mit vergleichbaren PEI-OS-Architekturen als Modifizierung in der CE konnten bei der Detektion und Aufkonzentrierung von Humanalbumin in verdünnten, humanen Proben erzielt werden.^[186] Weiterhin wäre eine Verwendung dieser Kern-Schale-Architekturen als Wirkstofftransportsysteme aufgrund der selektiven und stabilen Interaktionen vielversprechend.

6 Methoden und Experimentalteil

6.1 Methoden

Aufreinigung durch Dialyse

Für die Aufreinigung der hergestellten Kern-Schale-Architekturen wurde eine mehrtägige Dialyse durchgeführt. Als Dialysemembrane wurden regenerierte Zellulosemembrane Spectra/Por 7 (2000 MWCO; 45 mm) der Firma Spectrum Laboratories Inc. (Rancho Dominguez, USA) verwendet. Dialysiert wurde gegen destilliertes Wasser mit einem mehrmaligen Wasserwechsel täglich.

Dünnschicht-Chromatographie (TLC)

Für die Dünnschicht-Experimente wurden kommerziell erhältliche Sorbfil TLC-Platten (8-12 μm Partikelgröße, 90-100 μm Schichtdicke; OOO IMID, Krasnodar, Russland) verwendet. Eine Modifizierung der stationären Phase fand durch Aufsprühen der wässrigen Polymerlösungen statt. Die Polymere lagen in einer Konzentration von 1 mg/mL vor. Im Mittel wurde jede Platte mit 3 mg Polymer modifiziert. Um ein Abwaschen zu minimieren und einen Gleichgewichtszustand zu erhalten, wurden die Polymere ebenfalls in geringer Konzentration in die mobile Phase gegeben (0,2 mg/mL). Die getrockneten Platten wurden mittels einer Videodensitometer-Software der Firma Sorbfil (TLC Quantitative Evaluation, OOO IMID, Krasnodar, Russland; Version 2.3.0.2994) ausgewertet. Die Analyten wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm bzw. 365 nm detektiert. Für die Herstellung der wässrigen Lösungen der Polymere und Analyten wurde Millipore-Wasser verwendet.

Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential-Messung

Die Lichtstreuenspektren und Zetapotential-Messungen wurden an einem Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, England) aufgenommen. Für die Messungen wurde ein Helium-Neon-Laser (4 mW, 632,8 nm, bewegliches Objektiv) als Strahlungsquelle eingesetzt. Als Messtechnik wurde die NIBS-Methode (*Non-Invasive Back-scatter*) mit einem Rückstreuwinkel von 173° verwendet. Für die DLS Untersuchungen wurden Konzentrationen von 1 mg/mL genutzt. Vor jeder Messung wurde die Probe 20 s auf 25 °C temperiert und mit einem 0,45 μm Nylonfilter von Staubpartikeln und weiteren groben Verunreinigungen befreit. Für jede Probe wurden 20 Durchläufe zu je 20 s durchgeführt. Für die Zetapotential-Messungen wurde ein zusätzlicher Autotitrator von Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, England) verwendet. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde HCl und KOH genutzt.

Elementaranalyse (EA)

Die Messung der Elementarzusammensetzung wurde mit einem vario MICRO cube der Firma Elementar Analysensysteme GmbH (Hanau, Deutschland) durchgeführt. Für eine möglichst

genaue Bestimmung wurden die Proben über Nacht in einem Vakuumtrockenschrank bei 40 °C getrocknet. Die Messung erfolgte simultan mit dem CHNS-Modus, wodurch der Gehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und gegebenenfalls Schwefel ermittelt wurde.

Ellipsometrie

Für die Schichtmessungen wurden Silizium-Wafer mit einer Oxidschicht genutzt. Die Oxidschichtdicke wurde vor jeder weiteren Modifizierung mit der Polymerschicht vermessen und ein Mittelwert bestimmt. Im Mittel lag die Oxidschichtdicke bei 30 nm. Die Wafer wurden zunächst in Ethanol in einem Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurden sie mit Millipore-Wasser abgespült und in eine Lösung aus Ammoniak (konz.) : 30% H₂O₂ : Millipore-Wasser im Verhältnis 1:1:5 für 40 Minuten bei 65 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurden die Wafer mit Millipore-Wasser abgespült und in einem Stickstoffstrom getrocknet. Die gereinigten Wafer wurden umgehend mit den Polymerlösungen gespin-coatet.

Für alle Schichten wurden 300 mg (1,5 w%) des Polymers mit 75 mg Citronensäure (25 w%) in 25 mL Millipore-Wasser gelöst. Aufgrund des höheren hydrophoben Anteils bei den PEI-5k-C11-Mal-1 und -Mal-2 Architekturen wurde die Citronensäure mit 35 w% hinzugegeben. Alle Lösungen wurden vor dem *Spin-Coaten* mit einem 0,45 µm Nyonspritzenfilter von groben Verunreinigungen befreit. Da die PEI-Spacer- bzw. PEI-FA-Architekturen in wässrigen Lösungen zu Mizellenbildung neigen und größere Aggregate entstehen, soll eine vorhergehende Filtration auch die Homogenität der Polymerschicht verbessern. Nach einem zweimaligen Aufbringung von 150 µl Polymer-Crosslinker-Lösung wurde mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 3500 rpm für 30 Sekunden beschichtet. Anschließend wurden die Wafer für zwei Stunden bei 170 ° in einem Vakuum-Trockenschrank getrocknet und die Schichten thermisch vernetzt. Durch mehrmalige Extraktion in Millipore-Wasser wurde die Stabilität der Schichten überprüft.

Die Ellipsometrie-Messungen wurden an einem Alpha-SE der Firma J.A Woollam Co., Inc. (Lincoln, USA) durchgeführt. Für die Messungen wurde ein entsprechendes Cauchy-Modell verwendet. Die Schichtdicken wurden in einem spektralen Bereich von 380 bis 900 nm mit einem Einfallswinkel von 70° gemessen. Die Brechungsindices der jeweiligen Vitaminlösung wurde für die *in-situ*-Messungen bestimmt und im dem Modell berücksichtigt. Für die *in-situ*-Messungen wurden Quarzküvetten der Firma Hellma verwendet. Sie weisen einen Einfallswinkel von 70°, analog zu dem Einfallswinkel des Ellipsometers. Mit einem Teflon Abstandhalter wurden die Wafer für die Messungen fixiert. Für die *in-situ*-Messungen wurde die Schichtdicke der trockenen Polymerschicht in der Küvette gemessen. Anschließend wurden 2,5 mL Millipore-Wasser hinzugegeben und die *in-situ*-Messung gestartet. Nach einer Vorquellung im wässrigen Milieu wurde nach Erreichen einer stabilen Schichtdicke 0,5 mL des Analyten hinzugegeben. Nach Erreichen einer stabilen Schichtdicke in dem Analyt-Wasser Gemisch wurden 0,5 mL entnommen und mit Millipore-Wasser wieder aufgefüllt. Dieser Waschschrift wurde mehrfach wiederholt. Während der gesamten Messung wurden die Delta- und Psi-Werte bestimmt. Mit Hilfe des angepassten Cauchy-Modells mit den zuvor bestimmten jeweiligen Brechungsindices der Analytlösungen konnte die Schichtdicken und Brechungsindices der Polymerschichten bestimmt werden.

Festphasenextraktion (SPE)

Für die Präparation der SPE-Kartuschen mit den reinen PEI-25k-Mal A, B oder C modifizierten Partikeln als Adsorberphase wurde eine Glaskartusche mit einer Teflonfritte bestückt. Anschließend wurden 20 mg der Partikel in die Kartusche gegeben und abschließend eine weitere Teflonfritte. Bei den gemischten Adsorberphasen wurde eine kommerziell erhältliche Oasis HLB-Glaskartusche (200 mg Sorbens) genutzt. Bei der gemischten Adsorberphase mit einem Schichtaufbau wurde eine Teflonfritte genutzt und anschließend zunächst 200 mg Chromabond HR-X hinzugegeben. Diese Schicht wurde mit einer Teflonfritte und einem Glasfaserfilter von einer weiteren Schicht von 20 mg der PEI-25k-Mal A modifizierten Partikel abgetrennt. Bei der gemischten Phase in einem Mix-Verhältnis wurde eine Oasis HLB-Glaskartusche mit einer Teflonfritte und einem Glasfaserfilter genutzt. Anschließend wurde eine Schicht von 200 mg Chromabond HR-X mit 20 mg PEI-25k-Mal A modifizierten Partikeln vermischt und in die Kartusche gefüllt. Dies wurde mit einer Teflonfritte verschlossen. Für die Untersuchungen mit den Adsorberphasen mit ausschließlich PEI-OS-modifizierten Partikeln wurden 20 μL eines 38er Mixes (0,1 ng/ μL) mit 20 g Millipore-Wasser versetzen. Dies entspricht 2 ng jeder Substanz absolut. Für die gemischten Adsorberphasen wurden 20 μL eines 38er Mixes (0,1 ng/ μL) mit 100 g Millipore-Wasser versetzt. Dies entspricht 2 ng jeder Substanz absolut. Die Festphasenextraktion wurde mit einer Konditionierung begonnen. Dafür wurden 2-5 mL Methanol und anschließend 2-5 mL Millipore-Wasser genutzt. Anschließend wurde die Kartusche mit der Probe beladen und 5 Minuten getrocknet. Die Elution wurde mit ca. 4 mL bei den Adsorberphasen mit ausschließlich PEI-OS-modifizierten Partikeln und ca. 10 mL Methanol bei den gemischten Phasen erzielt. Das Filtrat wurde bei 30-40 °C unter Gasstrom auf ca. 200 μL eingengt und in ein LC-Vial überführt. Im Anschluss wurden die Proben mittels HPLC analysiert. Die Detektion fand an einem HPLC-QTrap AP 5500 Massenspektrometer (ABSciex) statt, der mit einer Elektrosprayionisation arbeitet. Als Trennsäule wurde eine Ascentis Express C18 Säule (10 cm x 3 mm, 2,7 μm Partikelgröße, SUPELCO) genutzt. Eluiert wurde mit einem Gradienten aus Millipore-Wasser und Methanol (je 0,1 % Essigsäure).

Fluoreszenz

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Laser Scanning Mikroskop TCS SP5 II von Leica durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit dem Objektiv HCX PL APO CS 10.0-0.40 IMM UV angefertigt. Für die Anregung wurde eine Laserwellenlänge von 405 nm genutzt.

Gefriertrocknung

Zur Entfernung des Lösungsmittels wurde die Gefriertrocknung genutzt. Hierfür wurde die dialysierte Reaktionslösung der Polymeransätze in Kolben zu je maximal 100 mL gefüllt, eingefroren und über 20 Stunden gefriergetrocknet. Für diesen Prozess wurde eine Alpha 1-2 LD plus der Firma Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland) mit einer RZ-6 Drehschieberpumpe der Firma Vacuubrand (Wertheim, Deutschland) genutzt. Bei einem Druck von 0,035 mbar und einer Temperatur von -52 °C wurden die Polymere als Feststoffe gewonnen.

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Analysen fanden auf einer HPLC LC-20 Prominence Anlage der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) statt. Für die Detektion der Analyten wurde ein UV/Vis Detektor (SPD-M20A Shimadzu, Japan) bei den Wellenlängen 260 und 280 nm genutzt. Als Trennsäule fungierte eine Supelco C18 Säule (Supelco, USA), mit einer Partikelgröße von 5 μm und einer Abmessung von 250 x 4,6 mm. Als Vorsäule diente eine Festphasenextraktionssäule mit XAD2 Amberlite (Supelco, USA) als Adsorber. Ausgewertet wurde mit der LCsolution Software der Firma Shimadzu. Für die Herstellung der wässrigen Lösungen wurde Millipore-Wasser genutzt. Als Lösungsmittel wurde Acetonitril mit hoher Reinheit (Kriokhrom, Russland) genutzt. Für die Herstellung des Phosphatpuffers wurde Natriumdihydrogenphosphat und Phosphorsäure von der Firma Vekton (Russland) verwendet. Die Auftrennung wurde mit Hilfe einer Gradiententrennungen optimiert. Die Durchflussrate betrug 1 mL/min. Eine Mischung der im Phosphatpuffer (pH 2,7; 30 mM) gelösten Vitamine mit Acetonitril wurden hierfür verwendet. Für die Gradiententrennung wurde folgendes Programm genutzt: In den ersten 15 Minuten wurde der reine Phosphatpuffer als mobile Phase genutzt. Ab der 15. Minuten wurde 25% Acetonitril zugegeben. Ab der 19. Minuten wurde erneut nur der reine Phosphapuffer als mobile Phase genutzt. Die PEI-OS-Architekturen wurden in einer Konzentration von 0,5 bis 4 mg/mL in den Phosphatpuffer gelöst. Jede Konzentration wurde separat untersucht. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung filtriert, um die mobile Phase von Verunreinigungen zu befreien. Die hydrophilen Vitamine wurden in Millipore-Wasser gelöst. Die Analytmischungen wurden täglich neu hergestellt. Für die Analytmischungen wurden Vitamin-Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Diese wurden lichtgeschützt und gekühlt gelagert. 10 μL der einzelnen Vitaminlösungen (B_2 , B_3 , B_6 , B_{12} und Vit. C) und 20 μL B_1 wurden mit 930 μL Millipore-Wasser aufgefüllt. Dieses Analytengemisch wurde für die HPLC Untersuchungen genutzt.

Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie)

Zur Aufnahme der IR-Spektren der Polymerproben wurden die Spektrometer des Typs 80v und Tensor27 der Firma Bruker Optics Inc. (Billerica, USA) mit einer Golden Gate Diamant ATR Einheit (SPECAC) und einem MCT-Detektor verwendet. Durchgeführt wurden 100 Scans pro Messung in einem Wellenlängenbereich von 4000 bis 600 cm^{-1} und bei einer Auflösung von 4 cm^{-1} . Die DRIFTS-Messungen der Partikel wurden mit einem Equinox 55 FTIR-Spektrometer mit MCT-Detektor der Firma Bruker (Fällanden, Schweiz) durchgeführt. Für jede Messung wurden 20 mg der Probe mit 500 mg Kaliumbromidpulver gemischt, dass als Referenz genutzt wurde. Dies wurde zu einem Pressling geformt. Es wurden 200 Scans im Bereich von 4000 bis 600 cm^{-1} mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} für jedes Spektrum durchgeführt. Alle Proben wurden vor der Messung für 20 h bei 50 °C im Vakuum getrocknet.

Kapillarelektrophorese (CE)

Die Kapillarelektrophorese wurde an einer Capel-105M der Firma Lumex (Sankt Petersburg, Russland) durchgeführt. Für die Detektion der Analyten wurde ein UV/Vis Detektor genutzt. Die wasserlöslichen Vitamine wurden bei einer Wellenlänge von 220 nm detektiert und die Adenosin-Derivate bei 260 nm. Als Kapillare wurden eine aktivierte 50 cm lange kommerziell erhältliche *Fused Silika* Kapillare mit einer Polyimidbeschichtung verwendet. Nach 45 cm

wurde ein Sichtfenster für den Detektor gebrannt. Als Elektrolyt (BGE) wurde ein Phosphatpuffer (PBS, pH 7,0, 20 mM) genutzt. Als interner Standard für den EOF wurde DMSO genutzt. Die Vitamine wurden in einer Konzentration von 1 mg/mL PBS-Puffer genutzt. Für die Auftrennung wurde eine Spannung von ± 20 kV genutzt. Die Analyse fand bei einer Temperatur von 20 °C statt. Nach der Probeninjektion wurde die Probe im Kapillar-Einlass gesammelt und die Elektrode wieder in die Pufferlösung getaucht. Für die Auswertung der Elektropherogramme wurde die Software Elforum der Firma Lumix genutzt.

Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Für die NMR-Messungen wurde ein Bruker DRX 500 Spektrometer (Billerica, USA) verwendet. Die ^1H -Spektren wurden bei einer Frequenz von 500,13 MHz und die ^{13}C -NMR-Spektren bei 125,75 MHz aufgenommen. Die Proben wurden in D_2O vermessen. Als interner Standard wurde das Natriumsalz der 2,2,3,3- d_4 -3-(Trimethylsilyl)propionsäure ($\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 0$ ppm) genutzt. Alle DOSY-Experimente wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer aufgenommen. Dieses ist ausgestattet mit einer gepulsten Feldgradienten-Einheit. Dieser generiert magnetische Felder in Z-Richtung (56 G/cm). Als interner Standard diente das Signal des D_2O . Die Messtemperatur wurde mittels eines Luftstroms von 535 L/h konstant bei 298 K (25 °C) gehalten. Mögliche Temperatureinflüsse hervorgerufen durch den magnetischen Feldgradienten können somit ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden alle Proben ohne Rotation gemessen. Die Fouriertransformation, Phasen- und Basislinienkorrektur sowie die Diffusionsdimension wurden mit der Software Bruker Topspin 2.1 durchgeführt.

Pyrolyse-GC-MS

Für die Pyrolyse-GC-MS-Messungen wurde ein Pyrolysator Pyroprobe 5000 von CDS Analytical Inc. (Oxford, USA) mit Platinfilament und einem CDS1500 Interface verwendet. Die Pyrolysetemperatur betrug 550 °C und die Pyrolysezeit 15 s. Als Gaschromatograph wurde ein GC7890A von Agilent Technologies eingesetzt. Die Inlet-Temperatur lag bei 280 °C und als Trägergas wurde Helium verwendet. Als Säule wurde eine unpolare HP-5MS Säule (30 m x 250 μm) mit 0,25 μm Schichtdicke gewählt. Das GC ist an einen massenselektiven Detektor (5975C inert XL EI/CI) gekoppelt. Die Ionisation erfolgte bei 70 eV.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die REM-Aufnahmen der Partikel wurden mit einem Zeiss Ultra 55 Gemini (Carl Zeiss NTS, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Die Partikel wurden mit einer Konzentration von 0,25 mg/mL in Millipore-Wasser gelöst und für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Von dieser Lösung wurde ein Tropfen auf einen gereinigten Siliziumwafer gegeben und im Stickstoffstrom getrocknet. Vor der Messung wurden die Proben mit 3 nm Platin besputtert. Die Aufnahmen wurden bei einer Spannung von 3 kV im Sekundärelektronen-Modus aufgenommen.

Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die AFM Untersuchungen wurden an einem Dimension ICON (Bruker-Nano, USA) in einem intermittierenden Modus (*tapping mode*) durchgeführt. Als Sensor (*Cantilever*) wurde ein Silizium-SPM-Sensor Multi 75 (BudgetSensors, Bulgaria) mit einer Federkonstante von ca.

4 N/m und einer Resonanzfrequenz von ca. 75 kHz verwendet. Der Spitzenradius betrug weniger als 10 nm. Höhenbilder (Topographie) wurden simultan mit den Phasenbildern aufgenommen. In Bezug auf *Magonov et al.*^[187] wurden die Scanbedingungen (freie Amplitude > 100 nm, Sollwert des Amplitudenverhältnisses 0,5) so gewählt, dass die Steifheit der Oberfläche bzw. deren Kontrast in den Phasenbildern erhalten werden kann. Dies bedeutet, dass die helleren Gebiete in den Phasenbildern härter sind als die dunkleren Gebiete.

Reinstwasserbereitstellung (Millipore-Wasser)

Für die Herstellung von Stammlösungen und im Falle von Wasser als Lösungsmittel wurde stets Reinstwasser (Millipore-Wasser) verwendet. Dieses wurde durch eine weitere Aufreinigung von destilliertem Wasser durch eine Simplicity 185 Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore Corporation (Billerica, USA) erhalten.

Röntgenphotonenspektroskopie (XPS)

Mit Hilfe von XPS-Untersuchungen wurde der Erfolg der Modifizierung der Nanopartikel kontrolliert. Die Messungen erfolgten mit dem Spektrometer AXIS ULTRA der Firma Kratos Analytical (Manchester, England). Dieses ist mit einer monochromatisierten $\text{Al K}\alpha_{1,2}$ Röntgenröhre, mit einer Aufnahmeleistung von 300 W bei 20 mA, ausgestattet. Die Bestimmung der kinetischen Energie der Photoelektronen erfolgte mit einem hemisphärischen Analysator, bei dem eine konstante Paßenergie von 160 eV für Übersichtsspektren bzw. 20 eV für aufgelöste Spektren vorgegeben wurde. Eine Überkompensation der positiven Aufladung der Probe erfolgte durch eine Niederenergie-Elektronenquelle (Filament) in Verbindung mit einer magnetischen Immersionslinse in der Extraktions-Elektronenoptik. Alle Bindungsenergien wurden auf den C1s Peak für gesättigte Kohlenwasserstoffe mit $\text{BE} = 285 \text{ eV}$ bezogen.^[188] Die Quantifizierung der Spektren erfolgte nach einem Untergrundabzug nach *Shirley et al.*^[189] durch Integration der Peakflächen (*Raw Area CPS*) typischer Elementpeaks. Aus den Peakflächen wurden unter Berücksichtigung der experimentell bestimmten Empfindlichkeitsfaktoren und der Spektrometer-Transmissionsfunktion die Atombrüche und die Massenbrüche berechnet. Die energieaufgelösten Spektren wurden mittels Software-Routinen (Kratos Analytical, England) in strukturtypische Komponentenpeaks zerlegt. Freie Parameter des Fittings waren die Bindungsenergie, die Höhe, die Halbwertsbreite und das Gauss-Lorentz-Verhältnis der Komponentenpeaks.

Thermogravimetrische Messung (TGA)

Die TGA-Messungen wurden mit einem Q5000IR-TGA-Gerät der Firma TA Instruments (New Castle, USA) durchgeführt. Die Proben wurden unter trockener Stickstoffatmosphäre von Raumtemperatur auf 800 °C erhitzt. Die Aufheizrate betrug 10 K/min. Vor der Messung wurden alle Proben für 20 h bei 50 °C im Vakuum getrocknet.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM-Aufnahmen wurden mit einem Elektronenmikroskop Libra 120 der Carl Zeiss Microscopy GmbH (Carl Zeiss NTS, Oberkochen, Germany) mit integrierten Omega-Typ Energiefilter aufgenommen. Die Proben wurden mit einer Konzentration von 0,25 mg/mL in Millipore-Wasser gelöst und für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Von dieser Lösung

wurden 3 μL auf ein amorphes Kohlenstoff beschichteten Kupfer-Grid (300 Mesh, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet. Die TEM-EDX Aufnahmen wurden mit der sogenannten *three-window power law*-Methode aufgenommen. Eine Energie-gefilterte Aufnahme wurde oberhalb der Elementabsorption aufgenommen und als elementspezifische Aufnahme und Referenzbild (Hintergrund) genutzt. Dieser Hintergrund wurde aus zwei Aufnahmen unterhalb der Absorptionsgrenze extrapoliert.

Ultrafiltration (UF)

Eine lösungsmittelresistente Rührzelle der Firma Millipore Corporation (Billerica, USA) mit einem Fassungsvermögen von 75 mL (Durchmesser 47 mm) wurde für Ultrafiltrationen bei 5 bar verwendet. Als Filtrationsmembrane wurden Ultracel Membrane aus regenerierter Zellulose (Ultracel, regenerierte Zellulose, PLAC; $\varnothing$ 47 mm; Millipore, USA) verwendet. Voruntersuchungen zeigten, dass die verwendeten Kern-Schale-Architekturen effektiv von den Membranen zurückgehalten werden. Vor jeder Filtration wurden die Membrane in wässriger Lösung vorgequollen. Die Membrane wurden für drei Filtrationen verwendet. Vor jeder Filtration wurden die Membrane mit Millipore-Wasser gespült, um abgelagerte Rückstände zu entfernen. Für jeden Analyten wurde eine mögliche Interaktion mit der Membran untersucht. Hierfür wurden Lösungen der reinen PEI-OS-Architekturen und der Analyten filtriert und die Konzentration im Filtrat bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Konzentration nach 10 bis 15 mL stabil ist. Infolge dessen wurden alle Proben für die UV/Vis Untersuchungen nach einem Durchlauf von 10-15 mL entnommen.

Für die Bestimmung der Konzentration wurden Kalibrierungsgeraden für jeden Analyten angefertigt. Dafür wurden Lösungen mit bekannter Konzentration vermessen. Es fanden Verdünnungsreihen mit bis zu 15 Schritten statt, bei denen das Extinktionsverhalten gemessen wurde. Mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden können anhand der Extinktion die Konzentration berechnet werden. Mit einer gegebenen Anfangskonzentration sind somit Rückschlüsse auf die aufgenommene Analytenkonzentration möglich.

UV/Vis-Spektroskopie (UV/Vis)

Im Rahmen der Aufnahme-Untersuchungen wurde die Konzentration des Analyten im Filtrat mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt. Es wurde ein Cary 100 der Firma Varian und ein Specord 210 Plus von Jena Analytik verwendet. Für die Messungen wurden UV-transparente Einmalküvetten der Firma Plastibrand mit einer Schichtdicke von 10 mm genutzt. In einem Wellenlängenscan von 220 bis 600 nm wurden die Maxima der jeweiligen Analyten bestimmt. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur mit einer Schrittweite von 0,5 nm statt.

6.2 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Tabelle 22: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Abkürzung	Reinheit	Lieferant
Lupasol G100	PEI-5 kDa		BASF
Lupasol WF	PEI-25 kDa		BASF
D(+)-Maltose-Monohydrat	Mal	> 99 %	Sigma Aldrich
D-Lactose Monohydrat	Lac	≥ 98 %	Sigma Aldrich
Maltotriose Hydrat	Mal-III	95%	Sigma Aldrich
Natriumtetraborat		≥ 99,5 %	Sigma Aldrich
Boran-Pyridin-Komplex	BH ₃ · Py	8M	Sigma Aldrich
<i>N</i> -(<i>t</i> -Butoxycarbonyl)-11-aminoundecansäure	Boc-11-Aun-OH	> 99 %	Iris Biotech
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid	EDC·HCl		Thermo Fisher
<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz	Sulfo-NHS	≥ 98,5 %	Sigma Aldrich
Laurinsäure	FA	> 99 %	Merck
Tetraethylorthosilicat	TEOS	≥ 99 %	Acros Organics
(3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilan	GPS	≥ 98 %	Sigma Aldrich
3-Aminophenylboronsäure	APBS	98%	Sigma Aldrich
Thiamin Hydrochlorid	B ₁	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Riboflavin	B ₂	≥ 98 %	Sigma Aldrich
Niacin	B ₃	≥ 98 %	Sigma Aldrich
Pyridoxin	B ₆	≥ 98 %	Sigma Aldrich
Cyanocobalamin	B ₁₂	≥ 98 %	Sigma Aldrich
Vitamin C	Vit. C	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Folsäure		97 %	Sigma Aldrich
Adenosintriphosphat	ATP	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Adenosindiphosphat	ADP	≥ 95 %	Sigma Aldrich
Adenosinmonophosphat	AMP	≥ 99 %	Sigma Aldrich
β -Estradiol 17-(β -D-glucuronid) Natriumsalz	Estradiol-Derivat		Sigma Aldrich
β -Estradiol 3-sulfat Natriumsalz		≥ 93 %	Sigma Aldrich
Ergocalciferol		≥ 98 %	Sigma Aldrich
Cholecalcoferol		≥ 98 %	Sigma Aldrich
Phyllochinon	K ₁	≥ 99 %	Sigma Aldrich
α -Tocopherol		≥ 96 %	Sigma Aldrich
DL- α -Tocopherolacetat		≥ 96 %	Sigma Aldrich
Retinylpalmitat		1,6-1,8 · 10 ⁶ USP Einheiten per g	Sigma Aldrich

Tabelle 23: Verwendete Lösungsmittel.

Substanz	Abkürzung	Reinheit	Lieferant
Tetrahydrofuran	THF	Absolut, 99,5 %	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid	DMSO	Absolut, 99,5 %	Sigma Aldrich
Ethanol	EtOH	Absolut, 100 %	VWR
1-Butanol	BuOH	≥98 %	Merck
Toluol		≥99,7 %	Sigma Aldrich
Iso-Propanol		≥99,5 %	Acros Organics
Acetonitril			Kriokhrom (Russland)
Natriumdihydrogenphosphat			Vekton (Russland)
Phosphorsäure			Vekton (Russland)
Natriumhydrogencarbonat		99,5 %	Acros Organics
Salzsäure	HCl	37-38 %	Merck
Natriumhydroxid-Lösung	NaOH	28-30 w%	Acros Organics
Ammoniumhydroxid-Lösung		28 %	Acros Organics
Triethylamin	Et ₃ N	99 %	Acros Organics
Trifluoressigsäure	TFA	≥ 99,5 %	Fluka

6.3 Experimentalteil

6.3.1 Synthese der PEI-OS-Architekturen

Die Synthese der PEI-OS-Architekturen wurde analog zu der literaturbekannten Vorschrift nach *Appelhans et al.*^[52] durchgeführt.

Für die Synthesen wird 1,0 g (23,3 mmol reaktive NH Gruppen) des jeweiligen Poly(ethylenimins) (PEI; Lupasol G100: M_w = 5 kDa bzw. Lupasol WF: M_w = 25 kDa) mit dem Oligosaccharid (Maltose, Lactose oder Maltotriose) in einen Natriumborat-Puffer bei pH 9,0 (0,1 M in Millipore-Wasser) für eine Stunde gerührt. Das Oligosaccharid wird entsprechend der gewünschten Struktur in einem molaren Verhältnis von 1:3 für Struktur A, 1:0,6 für Struktur B oder 1:0,3 für Struktur C in Bezug auf die reaktiven NH-Gruppen des PEIs eingesetzt. Mit Maltose würde dies für Struktur A 35,7 g (99,0 mmol), 4,2 g (11,7 mmol) für Struktur B oder 1,7 g (4,7 mmol) für Struktur C entsprechen. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wird der Boran-Pyridin-Komplex in dem gleichen molaren Verhältnis vorsichtig hinzugegeben. Dies entspricht für Struktur A 14,6 mL (99,03 mmol), 1,5 mL (11,7 mmol) für Struktur B oder 0,6 mL (4,67 mmol) für Struktur C. Die Reaktionslösung wird unter Rückfluss für 7 Tage bei einer Temperatur von 50°C gerührt.

Nach dieser Reaktionszeit werden nicht angebundenes Oligosaccharid sowie weitere nicht umgesetzte Edukte mit Hilfe einer fünftägigen Dialyse gegen destilliertes Wasser entfernt. Hierfür wird eine Dialysemembran aus regenerierter Zellulose mit *Cut-Off* von 2 kDa und einem Durchmesser von 45 mm genutzt. Ein Wasserwechsel findet innerhalb des ersten Tages stündlich statt und im Anschluss dreimal täglich. Die PEI-OS-Architekturen werden abschließend mittels Gefriertrocknung als weiße Feststoffe erhalten. Die Ausbeuten liegen bei

10,0 g (Struktur A) bzw. 6,5 g (Struktur B und C).

Die Zusammensetzungen konnte mit Hilfe der Elementaranalyse bestimmt werden zu (**Tabelle 24**):

Tabelle 24: Berechnungen der Zusammensetzungen der PEI-OS-Architekturen anhand von Elementaranalysen. *a* gibt die Anzahl an gebundenen Oligosacchariden an. Das Molekulargewicht berechnet sich nach: $M_w = (C_2H_5N) \cdot DP^* + a \cdot (C_{12}H_{23}O_{10})$. Der Funktionalisierungsgrad DF ist definiert als $DF = a / (2 \cdot \text{terminale Gruppen} + \text{lineare Gruppen})$. Der totale Funktionalisierungsgrad berechnet sich nach $TDF = a / (2 \cdot \text{terminale Gruppen} + \text{lineare Gruppen} + \text{dendritische Gruppen})$.

	Gehalt[%]				<i>a</i>	M_w	DF	TDF
	C	H	N	C/N				
PEI-5k-Mal A	42,8	7,1	3,9	10,9	75	28133	87,3	67,4
PEI-5k-Mal B	43,1	7,4	7,0	6,2	36	15552	42,5	32,8
PEI-5k-Mal C	44,5	7,8	10,1	4,4	22	10760	25,5	19,6
PEI-25k-Mal A	40,5	7,4	4,1	9,9	177	67542	77,4	60,7
PEI-25k-Mal B	42,6	7,7	7,3	5,9	90	39125	39,5	30,9
PEI-25k-Mal C	41,5	7,7	9,1	4,5	61	29610	26,8	21,0
PEI-5k-Lac A	42,5	6,8	4,0	10,7	73	27560	85,3	65,8
PEI-5k-Lac B	42,5	7,2	6,8	6,3	37	15746	43,2	33,3
PEI-5k-Lac C	41,7	8,2	9,9	4,2	20	10316	23,9	18,4
PEI-25k-Lac A	40,2	7,2	4,0	10,0	180	68514	78,7	61,7
PEI-25k-Lac B	43,5	7,3	6,8	6,3	100	42438	43,9	34,4
PEI-25k-Lac C	44,3	8,6	13,8	3,2	33	20236	14,2	11,2
PEI-25k-Mal-III A	41,9	6,6	3,0	13,9	176	95834	77,1	60,4
PEI-25k-Mal-III B	42,3	6,8	5,5	7,7	86	51782	37,7	29,5
PEI-25k-Mal-III C	43,8	7,3	8,7	5,0	48	33130	21,0	16,5

* DP= Polymerisierungsgrad mit $DP = M_n / M(CH_2CH_2NH) = M_n / 43 \text{ g/mol}$ entspricht für PEI 5kDa = 84 und PEI 25kDa = 223

6.3.2 Synthese PEI-Spacer-Architekturen

6.3.2.1 Synthese von PEI-5k-CO(CH₂)₁₀NHBoc und PEI-25k-CO(CH₂)₁₀NHBoc

Für die Herstellung der PEI-Spacer-Architekturen wird das jeweilige Poly(ethylenimin) (Lupasol G100: $M_w = 5 \text{ kDa}$ bzw. Lupasol WF: $M_w = 25 \text{ kDa}$) von Wasserverunreinigungen befreit und im Vakuum getrocknet. Unter Argon-Schutzgasatmosphäre werden *N*-(tert-Butoxycarbonyl)-11-aminoundecansäure (Boc-11-Aun-OH) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC; 120 mmol bzw. 8,4 mmol) in trockenem DMSO und trockenem THF gelöst. Bei dem kleineren Polymerkern sollen 10 Spacer-Einheiten pro PEI-Molekül angebunden werden. Entsprechend werden 3,6 g Boc-11-Aun-OH (120 mmol; 10 eq.) und 2,3 g EDC (120 mmol) gelöst. Bei dem größeren Polymerkern sollen 25 Spacer-Einheiten an einen PEI-Kern angebunden werden. Somit werden 2,5 g Boc-11-Aun-OH (8,4 mmol; 25 eq.) mit 1,6 g EDC (8,4 mmol) in Lösung gebracht. Bei Raumtemperatur wird diese Reaktionslösung unter Schutzgasatmosphäre eine Stunde gerührt. Im Anschluss wird 1,4 bzw. 1,0 g *N*-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) hinzugegeben und die Reaktionslösung für weitere zwei Stunden gerührt. 4,3 g PEI G100 (1,2 mmol) bzw. 3,2 g PEI WF (0,3 mmol) werden währenddessen in

einen separaten Schlenk-Kolben in 5 mL trockenem DMSO und 5 mL trockenen THF unter Schutzgas gelöst und mit 1 mL Triethylamin (Et_3N) versetzt. Diese Lösung wird zur aktivierten Carbonsäure gegeben und bei Raumtemperatur für 20 Stunden gerührt. Die Aufreinigung erfolgt durch dreitägige Dialyse mit einer Dialysmembran (MWCO 2 kDa, Durchmesser 45 mm) gegen destilliertes Wasser. Mittels Gefriertrocknung werden 5,6 g eines schwachgelben Feststoff erhalten.

6.3.2.2 Synthese der PEI-5k/25k-C11-Mal-1 und PEI-5k/25k-C11-Mal-2 Architekturen

Für die Synthese der PEI-5k/ 25k-C11-Mal-1/-2 Architekturen mit einer Maltosylierung der Spacer-Enden wird zunächst eine Entschützung der Spacer durchgeführt und anschließend eine reduktive Aminierung. Für die Entschützung der Spacer-Enden wird Trifluoressigsäure (TFA) genutzt. Hier werden das PEI-5k/25k- $\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{NHBoc}$ in TFA und Millipore-Wasser im Verhältnis 4:5 gelöst und für 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigungen finden durch viertägige Dialyse statt. Für eine Neutralisierung der TFA wird am ersten Tag gegen 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung dialysiert mit einem dreimaligen Wechsel am Tag. Ab dem zweiten Tag wird gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das Produkt PEI-5k/25k- $\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{NH}_2$ wird mit Hilfe der Gefriertrocknung als weißer Feststoff gewonnen.

Die Anzahl der angebundenen Spacer-Einheiten (b) kann mit Hilfe der Elementaranalyse berechnet werden (**Tabelle 25**).

Tabelle 25: Berechnungen der Zusammensetzungen von PEI-5k/25k- $\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{NH}_2$ anhand von Elementaranalysen. Die Anzahl der angebundenen Spacer-Einheiten ist mit b angegeben.

	Gehalt[%]				b	M_w	DF	TDF
	C	H	N	C/N				
PEI-5k- $\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{NH}_2$	45,7	7,8	17,3	2,6	7	5599	3,2	2,5
PEI-25k- $\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{NH}_2$	41,5	6,7	15,1	2,7	21	15510	9,5	7,2

Dieses Zwischenprodukt wird mit Maltose im entsprechenden Verhältnis maltosyliert. Die reduktive Aminierung findet analog zu der beschriebenen reduktiven Aminierung wie bei den PEI-OS-Architekturen statt. Es werden 2,0 g PEI-5k- $\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{NH}_2$ bzw. 1,5 g PEI-25k- $\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{NH}_2$ mit 25,1 bzw. 18,0 g Maltose umgesetzt (0,02 mmol; 2 eq.) um die Struktur Mal-1 zu erhalten. Für die Struktur Mal-2 werden 2,5 g PEI-5k- $\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{NH}_2$ bzw. 2,0 g PEI-25k- $\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{NH}_2$ mit 7,7 bzw. 6,0 g Maltose (0,02 mmol; 0,5 eq.) umgesetzt. Dies wird in einem Natriumborat-Puffer bei pH 9,0 (0,1 M) für eine Stunde gerührt. Anschließend werden für Struktur Mal-1 7,0 bzw. 5,0 mL des Boran-Pyridin Komplex hinzugegeben. Für Struktur Mal-2 wird entsprechend 2,1 bzw. 1,7 mL des Pyridin-Komplexes hinzugegeben. Diese Reaktionslösung wird 7 Tage bei 50°C unter Rückfluss gerührt. Die anschließende Aufreinigung findet durch Dialyse statt. Die Gewinnung des Produktes ist analog zu dem Vorgehen bei den PEI-OS-Architekturen. Das Produkt kann mit einer Ausbeute von bis zu 6,0 g gewonnen werden.

Mit Hilfe der Elementaranalyse werden die angegebenen Maltose-Einheiten (a) bestimmt (**Tabelle 26**).

Tabelle 26: Berechnungen der Zusammensetzungen von PEI-5k/25k-C11-Mal-1/ Mal-2 anhand von Elementaranalysen. Die Anzahl der angebundenen Spacer-Einheiten ist mit b angegeben, a gibt die Anzahl an gebundenen Oligosacchariden an.

	Gehalt[%]				a	b	M_w	DF	TDF
	C	H	N	C/N					
PEI-5k-C11-Mal-1	44,8	7,6	5,3	8,5	55	7	23456	63,6	49,1
PEI-5k-C11-Mal-2	45,1	7,7	6,8	6,7	38	7	12584	44,8	34,6
PEI-25k-C11-Mal-1	43,2	7,3	5,0	8,7	150	21	58467	67,8	51,9
PEI-25k-C11-Mal-2	44,4	7,6	6,2	7,2	114	21	37413	51,8	39,7

6.3.2.3 Synthese der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Architekturen

Bei der PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal Struktur findet eine Maltosylierung nicht an den Spacer-Enden statt, sondern am PEI-Kern. Die Spacer-Einheiten tragen somit eine Aminofunktionalität an ihren Enden. Die einzelnen Syntheseschritte entsprechen denen für die Synthese der PEI-25k-C11-Mal-1/ Mal-2 Architekturen. Jedoch unterscheidet sich die Reihenfolge. Zunächst wird eine reduktive Aminierung der PEI-25k- CO(CH₂)₁₀NHBoc Struktur durchgeführt und erst nach dieser die Entschützung der Spacer-Enden.

Die Strukturen wurden mittels Elementaranalyse charakterisiert (**Tabelle 27**).

Tabelle 27: Berechnungen der Zusammensetzungen der PEI-5k/25k- CO(CH₂)₁₀NHBoc und PEI-5k/ 25k-(C11-NH₂)-Mal anhand von Elementaranalysen. Die Anzahl der angebundenen Spacer-Einheiten ist mit b angegeben. a gibt die Anzahl an gebundenen Oligosacchariden an.

	Gehalt[%]				a	b	M_w	DF	TDF
	C	H	N	C/N					
PEI-5k- CO(CH ₂) ₁₀ NHBoc	56,4	10,0	20,2	2,8	-	8	5955	3,7	2,9
PEI-5k-(C11-NH ₂)-Mal	44,9	7,7	7,8	5,8	93	8	47428	42,3	32,4
PEI-25k- CO(CH ₂) ₁₀ NHBoc	57,8	10,1	19,5	3,0	-	26	16887	11,7	8,9
PEI-25k-(C11-NH ₂)-Mal	45,2	7,6	6,6	6,8	93	26	47428	42,3	32,4

6.3.3 Synthese PEI-25k-FA Architekturen

6.3.3.1 Synthese der PEI-25k-FA Strukturen

Die Synthese der PEI-FA-Architekturen ist vergleichbar mit der Synthese der PEI-5k/25k-C11-Mal-1/-2 Architekturen. In Abhängigkeit wie viele Alkylketten angebunden werden sollen, wird Laurinsäure in einem equimolaren Verhältnis von 1:30 (1,25 g; 6,3 mmol), 1:40 (1,7 g; 8,3 mmol) oder 1:60 (2,5 g; 12,5 mmol) eingesetzt. Im gleichen equimolaren Verhältnis zur Laurinsäure wird EDC (1:30= 1,2 g, 6,3 mmol; 1:40= 1,6 g, 8,3 mmol; 1:60= 2,4 g, 12,5 mmol) hinzugegeben. Beides wird unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 5 mL trockenem DMSO und 5 mL trockenem THF gelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird *N*-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) (1:30= 0,7 g, 6,3 mmol; 1:40= 1,0 g, 8,3 mmol;

1:60= 1,4 g, 12,5 mmol) hinzugegeben und die Reaktionslösung für weitere zwei Stunden gerührt. 2,0 g PEI WF (0,3 mmol) wird währenddessen in einen separaten Schlenk-Kolben in 5 mL trockenem DMSO und 5 mL trockenen THF unter Schutzgas gelöst und mit 1 mL Triethylamin (Et_3N) versetzt. Diese Lösung wird zur aktivierten Carbonsäure gegeben und bei Raumtemperatur für 20 Stunden gerührt.

Die anschließende Aufreinigung findet durch Dialyse statt. Die Gewinnung des Produktes ist analog zu dem Vorgehen bei den PEI-OS-Architekturen und wird mit Hilfe der Gefrier-trocknung durchgeführt. Das Produkt kann mit einer Ausbeute von 3,5 bis 4,0 g gewonnen werden.

Die Charakterisierung der PEI-FA-Architekturen mit Berechnung der angebundenen Alkylketten fand mittels Elementaranalyse statt (**Tabelle 28**).

Tabelle 28: Berechnungen der Zusammensetzungen von PEI-25k-FA Strukturen anhand von Elementaranalysen. Die Anzahl der angebundenen Alkylketten (FA) ist mit c angegeben.

	Gehalt[%]			C/N	c	M_w	DF	TDF
	C	H	N					
PEI-25k-FA 20	56,9	10,6	20,8	2,7	22	13618	10,0	7,6
PEI-25k-FA 35	59,8	10,0	17,7	3,4	36	16194	16,4	12,6
PEI-25k-FA 50	59,3	10,1	14,5	4,1	51	18955	23,3	17,8

Aufgrund von eventuellen Fehlern bei der Bestimmung der angebundenen FA-Einheiten mittels Elementaranalyse werden gemittelte Werte für die angebundenen FA-Einheiten genutzt.

6.3.3.2 Synthese PEI-25k-FA-Mal Architekturen

Die PEI-25k-FA Architekturen werden mittels reduktiver Aminierung, analog zu der beschriebenen reduktiven Aminierung bei den PEI-OS-Architekturen, funktionalisiert. Es werden 0,3 g PEI-25k-FA mit einem equimolaren Verhältnis 1:3 mit Maltose umgesetzt. Dies entspricht bei der PEI-FA 20 Struktur 36 g (0,1 mol), bei der PEI-FA 35 Struktur 5,5 g (0,1 mol) und der PEI-FA 50 Struktur 0,5 g (0,1 mol) an Maltose. Die PEI-FA Strukturen und die Maltose werden in einem Natriumborat-Puffer bei pH 9,0 (0,1 M) für eine Stunde gerührt. Anschließend werden zu PEI-25k-FA 20 10,0 mL (0,1 mol), bei PEI-25k-FA 35 1,2 mL (0,1 mol) und bei PEI-25k-FA 50 0,1 mL (0,1 mol) des Boran-Pyridin Komplexes hinzugegeben. Diese Reaktionslösung wird 7 Tage bei 50 °C unter Rückfluss gerührt. Durch fünftägige Dialyse findet die Aufreinigung statt. Für die Gewinnung des Produktes wird die Gefriertrocknung genutzt. Das jeweilige Produkt kann mit einer Ausbeute von 0,3 bis 1,0 g gewonnen werden.

Die Charakterisierung der PEI-FA-Architekturen mit Berechnung der angebundenen Alkylketten (b) und Maltose-Einheiten (a) fand mittels Elementaranalyse statt (**Tabelle 29**).

Tabelle 29: Berechnungen der Zusammensetzungen von PEI-25k-FA-Mal Strukturen anhand von Elementaranalysen. Die Anzahl der angebundenen Alkylketten (FA) ist mit c angegeben, a gibt die Anzahl an gebundenen Oligosacchariden an.

	Gehalt[%]				a	c	M_w	DF	TDF
	C	H	N	C/N					
PEI-25k-FA 20-Mal	41,7	6,9	4,9	8,5	125	22	54676	56,9	43,5
PEI-25k-FA 35-Mal	42,1	7,5	5,3	7,9	98	36	48182	44,3	33,9
PEI-25k-FA 50-Mal	42,0	7,3	5,5	7,6	75	51	43649	34,2	26,2

6.3.4 Synthese der modifizierten Nanopartikel

6.3.4.1 Synthese der Nanopartikel

Die Silika-Nanopartikel werden nach einer modifizierten Stöber-Methode hergestellt.^[178] Ein Lösungsmittelgemisch aus 156 mL iso-Propanol, 13,7 mL Ammoniumhydroxid (28%ige Lösung) und 13,2 mL Millipore-Wasser wird auf 40 °C erwärmt. Zu diesem Gemisch werden schnell 13 mL Tetraethylorthosilicat zugegeben und 90 Minuten bei 40 °C gerührt. Die Reaktion wird abgebrochen, indem die gebildeten Partikel durch fünfminütige Zentrifugation bei 6000 rpm abgetrennt werden. Die Aufreinigung der Nanopartikel erfolgt durch sechsmaliges Dispergieren (2 Minuten Ultraschallbad) und Abtrennen der Partikel in Millipore-Wasser. Die Partikel werden mittels Gefriertrocknung als weißes Pulver gewonnen. Die Durchschnittliche Produktmenge liegt bei 3,0 bis 3,3 g.

6.3.4.2 Silanisierung der Nanopartikeln

Die Silanisierung erfolgt nach der Versuchsvorschrift von *Ottenbrite et. al.*^[190] Die Partikel werden für 2 Stunden im Vakuumofen bei 60 °C von restlichen Wasserverunreinigungen befreit. Für die weiteren Schritte werden die Partikel ent- und mit Argon begast. 3 g der Partikel werden in 150 mL trockenem Toluol und 0,75 mL Triethylamin gelöst und 30 Minuten in einem Ultraschallbad dispergiert. Im Anschluss wird die Reaktionslösung auf 110 °C gebracht und unter Schutzgasatmosphäre werden 4,5 mL (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan (GPS) hinzugegeben. Die weiße Suspension wird unter Rückfluss 20 Stunden bei 110 °C gerührt. Nach dieser Reaktionszeit werden die silanisierten Partikel durch fünfminütige Zentrifugation (6000 rpm) abgetrennt. Die Aufreinigung erfolgt durch sechsmaliges Dispergieren (2 Minuten Ultraschallbad) in Toluol und erneuter Zentrifugation. Die Partikel werden anschließend für 20 Stunden im Vakuumtrockenschrank bei 50 °C getrocknet. Die silanisierten Partikel können als weißes Pulver mit einer Ausbeute von 2,5 bis 2,7 g gewonnen werden.

6.3.4.3 Synthese der mit PEI-Spacer-modifizierten Nanopartikel

Die Partikeloberfläche wurden mit PEI-5k/25k-(NH₂)-Mal Strukturen modifiziert. Hierfür werden 50 mg des PEI-5k/25k-(C11-NH₂)-Mal in 25 mL Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,5 M; pH 8,5) gelöst. Zu dieser Lösung werden 200 mg der silanisierten Partikel hinzugegeben und für 30 Minuten im Ultraschallbad dispergiert. Die Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur für weitere 20 Stunden gerührt. Nach dieser Reaktionszeit werden die funktiona-

lisierten Partikel durch fünfminütige Zentrifugation (6000 rpm) abgetrennt. Die Aufreinigung findet durch sechsmaliges Dispergieren (2 Minuten Ultraschallbad) in Millipore-Wasser und erneuter Abtrennung statt. Die funktionalisierten Partikel werden mittels Gefriertrocknung als weißes Pulver mit einer Ausbeute von 185 mg gewonnen.

6.3.4.4 Synthese der mit PEI-OS-modifizierten Nanopartikel

Die Anbindung der PEI-OS-Architekturen an die Partikeloberfläche erfolgt über die Bildung eines Boronsäureesters. Hierfür muss zunächst eine Boronsäure auf die Partikeloberfläche angebunden werden. Diese Aminierung erfolgt nach *Hansson et. al.*^[191]

300 mg der 3-Aminophenylboronsäure (1,9 mmol) werden in 25 mL Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,5 M; pH 8,5) gelöst und die Reaktionslösung 10 Minuten im Ultraschallbad dispergiert. Im Anschluss wird 1,0 g der silanisierten Partikel hinzugegeben und für weitere 30 Minuten dispergiert. Danach wird die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 20 Stunden gerührt. Nach dieser Reaktionszeit werden die funktionalisierten Partikel durch fünfminütige Zentrifugation (6000 rpm) abgetrennt. Die Aufreinigung findet durch sechsmaliges Dispergieren (2 Minuten Ultraschallbad) und erneuter Abtrennung statt. Die Partikel werden zunächst zweimal in Salzsäure (0,01 M) dispergiert und abgetrennt und anschließend viermal mit Millipore-Wasser gewaschen. Mit Hilfe der Gefriertrocknung werden die funktionalisierten Partikel als weißes Pulver mit einer Ausbeute von 0,8 bis 1,0 g gewonnen.

1,0 g dieser Boronsäure-funktionalisierten Partikel werden mit 250 mg der jeweiligen PEI-OS-Architektur in 250 mL Millipore-Wasser gelöst. Mit Natriumhydroxidlösung (0,1 M) wird die Lösung auf einen pH-Wert von 9,0 gebracht. Im Anschluss wird die Reaktionslösung für 30 Minuten im Ultraschallbad dispergiert und weiter 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die PEI-OS-funktionalisierten Partikel werden nach dieser Reaktionszeit durch Zentrifugation (5 Minuten bei 6000 rpm) abgetrennt. Die Aufreinigung findet durch sechsmaliges dispergieren und abtrennen mit Millipore-Wasser statt. Mit Hilfe der Gefriertrocknung werden die PEI-OS-funktionalisierten Partikel als weißes Pulver mit einer Ausbeute von 0,9 bis 1,2 g gewonnen.

7 Anhang

PEI-OS-Architekturen

Tabelle 30: Übersicht der isoelektrischen Punkte (IEP) der PEI-OS-Architekturen.

Polymer	Struktur	IEP	Polymer	Struktur	IEP
PEI-5k-Mal	A	7,2	PEI-25k-Mal	A	7,6
	B	8,6		B	8,9
	C	9,0		C	9,3
PEI-5k-Lac	A	8,3	PEI-25k-Lac	A	8,1
	B	8,6		B	8,8
	C	9,5		C	9,5
PEI-25k-Mal-III	A	8,7			
	B	8,8			
	C	9,1			

Die PEI-OS-Architekturen altern mit der Zeit. Sie sind bei lichtgeschützter, kühler Lagerung 10 bis 12 Monate stabil. Nach dieser Zeit findet eine Zersetzung der Maltose statt, in deren Folge es zu einer Bildung von Harnstoffgruppen kommt. Diese Harnstoffgruppen können mittel ^{13}C -NMR- (**Abbildung 98**) und IR-Spektroskopie (**Abbildung 99**) nachgewiesen werden.

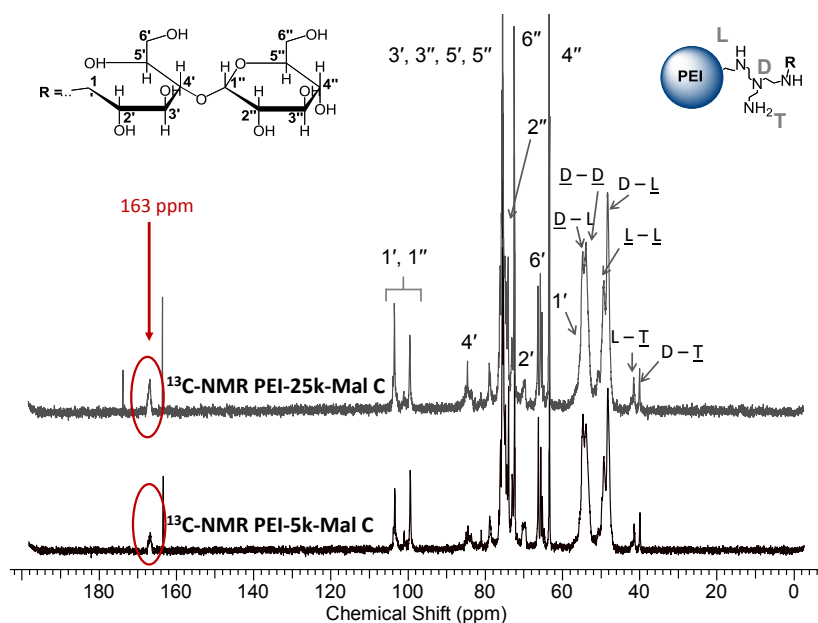


Abbildung 98: ^{13}C -NMR-Spektren der gealterten PEI-5k- und PEI-25k-Mal C Architekturen. Ein zusätzliches Signal bei 163 ppm tritt auf, das von einem Kohlenstoff einer Harnstoffgruppe verursacht wird.

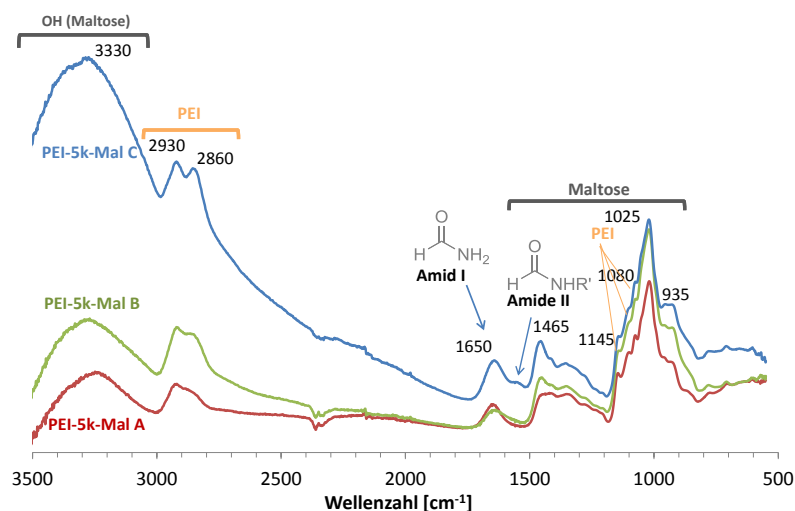


Abbildung 99: IR-Spektren der gealterten PEI-5k-Mal Struktur A-C. Für die Bildung einer Harnstoffgruppe sprechen die charakteristischen Valenzschwingungen der Amid I- und Amid II-Bindung.

Interaktionsstudien mit Beispielmolekülen

Tabelle 31: Aufnahmeeffizienz der PEI-OS-Architekturen [%] direkt nach Zusammengabe der PEI-OS- und der Analytlösung bei einem molaren Verhältnis von 1:10.

		B ₁ *	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂	Estradiol-Derivat
PEI WF		20,5 ± 0,1	31,5 ± 0,0	37,3 ± 1,6	0,0 ± 0,1	50,0 ± 2,8	82,7 ± 0,7
PEI-5k-Mal	A	23,6 ± 2,5	16,4 ± 2,5	55,8 ± 8,4	12,1 ± 0,3	87,6 ± 1,5	74,4 ± 2,4
	B	26,7 ± 4,0	23,6 ± 3,6	72,0 ± 5,4	1,0 ± 0,1	88,4 ± 1,1	74,5 ± 2,1
	C	22,5 ± 2,1	11,1 ± 2,1	83,3 ± 1,3	8,3 ± 2,6	88,5 ± 2,3	80,4 ± 2,3
PEI-25k-Mal	A	23,8 ± 3,5	13,4 ± 0,8	62,1 ± 7,5	4,1 ± 1,7	89,2 ± 1,8	79,1 ± 2,5
	B	23,2 ± 3,5	14,9 ± 0,7	83,8 ± 1,3	7,4 ± 0,4	85,0 ± 2,3	82,3 ± 2,1
	C	24,7 ± 0,2	8,0 ± 2,1	90,3 ± 0,2	10,1 ± 1,0	81,5 ± 0,9	90,6 ± 1,6
PEI-5k-Lac	A	10,8 ± 2,5	19,6 ± 2,2	84,3 ± 0,6	7,1 ± 1,7	89,3 ± 1,6	86,7 ± 2,1
	B	13,2 ± 3,3	19,1 ± 3,0	75,5 ± 3,6	19,9 ± 1,7	91,5 ± 2,0	88,7 ± 2,5
	C	10,9 ± 3,9	18,0 ± 3,7	90,1 ± 0,4	7,9 ± 1,1	84,9 ± 2,0	90,3 ± 1,4
PEI-25k-Lac	A	24,2 ± 0,9	13,6 ± 0,3	71,2 ± 3,3	17,3 ± 1,7	87,3 ± 1,2	88,4 ± 2,5
	B	21,3 ± 0,7	2,4 ± 0,5	78,3 ± 2,2	8,5 ± 2,2	87,0 ± 1,7	81,3 ± 3,8
	C	10,5 ± 0,4	1,0 ± 1,0	81,9 ± 2,3	10,6 ± 2,0	87,0 ± 1,7	77,0 ± 2,0
PEI-25k-Mal-III	A	26,9 ± 0,9	12,6 ± 0,5	78,2 ± 0,3	12,7 ± 0,5	87,7 ± 1,4	79,2 ± 3,1
	B	19,3 ± 0,8	9,7 ± 0,7	78,5 ± 0,8	19,8 ± 1,6	87,7 ± 1,9	77,6 ± 2,1
	C	17,0 ± 1,6	9,0 ± 1,2	86,9 ± 0,3	20,1 ± 1,1	90,6 ± 1,6	85,8 ± 1,3

* Phosphat-Puffer pH 7,4

Tabelle 32: Aufnahmeeffizienz der PEI-OS-Architekturen [%] 3 Stunden nach der Zusammengabe der PEI-OS-Lösung und der Analytlösung bei einem molaren Verhältnis von 1:10.

		B ₁ *	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂	Estradiol-Derivat
PEI WF**		23,5 ± 0,1	28,1 ± 0,0	38,6 ± 0,1	5,2 ± 0,8	60,3 ± 2,6	81,0 ± 9,0
PEI-5k-Mal	A	24,5 ± 3,5	14,4 ± 0,5	72,7 ± 6,2	13,1 ± 0,5	90,6 ± 1,4	73,0 ± 2,6
	B	24,0 ± 3,9	24,5 ± 3,5	73,5 ± 2,5	6,1 ± 2,4	88,2 ± 1,3	76,6 ± 1,4
	C	23,8 ± 3,5	9,2 ± 0,3	78,5 ± 1,5	14,3 ± 0,1	89,6 ± 1,6	82,5 ± 2,6
PEI-25k-Mal	A	27,7 ± 1,7	9,6 ± 1,7	75,0 ± 1,1	1,2 ± 2,0	88,4 ± 1,2	83,7 ± 2,9
	B	27,7 ± 2,2	15,9 ± 2,8	83,9 ± 1,5	7,5 ± 0,3	86,4 ± 0,7	88,2 ± 1,4
	C	29,4 ± 0,9	9,5 ± 0,4	86,1 ± 0,2	8,1 ± 0,8	82,2 ± 1,0	94,5 ± 0,5
PEI-5k-Lac	A	11,5 ± 3,5	18,7 ± 2,1	74,4 ± 2,6	7,8 ± 0,3	87,2 ± 2,2	90,9 ± 1,4
	B	12,5 ± 2,7	16,6 ± 2,7	80,6 ± 2,7	17,2 ± 1,3	88,9 ± 2,0	88,6 ± 1,6
	C	6,8 ± 2,0	21,2 ± 2,3	90,1 ± 0,9	5,1 ± 1,2	84,8 ± 1,7	90,4 ± 1,2
PEI-25k-Lac	A	32,0 ± 0,1	2,4 ± 1,1	72,5 ± 2,6	18,3 ± 1,4	88,1 ± 1,0	91,2 ± 3,5
	B	28,4 ± 0,8	13,6 ± 1,1	76,7 ± 1,3	7,5 ± 1,3	86,7 ± 1,4	82,3 ± 2,2
	C	24,3 ± 0,6	11,1 ± 1,4	85,8 ± 1,2	8,4 ± 1,4	85,9 ± 1,5	82,2 ± 1,7
PEI-25k-Mal-III	A	30,2 ± 0,8	11,6 ± 1,1	79,9 ± 0,7	15,6 ± 0,3	88,4 ± 1,4	85,2 ± 2,4
	B	23,9 ± 0,1	4,1 ± 0,5	92,0 ± 0,5	21,7 ± 1,3	88,7 ± 1,4	80,9 ± 2,9
	C	23,1 ± 0,4	7,6 ± 0,8	74,2 ± 1,3	21,5 ± 0,7	89,7 ± 1,7	95,7 ± 2,5

* Phosphat-Puffer pH 7,4

Tabelle 33: Aufnahmeeffizienz der PEI-OS-Architekturen [%] 20 Stunden nach der Zusammengabe der PEI-OS-Lösung und der Analytlösung bei einem molaren Verhältnis von 1:10.

		B ₁ *	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂	Estradiol-Derivat
PEI WF**		22,1 ± 0,0	25,6 ± 0,0	31,6 ± 0,7	6,6 ± 0,8	55,8 ± 2,7	46,8 ± 11,8
PEI-5k-Mal	A	24,1 ± 2,4	16,0 ± 0,3	63,4 ± 6,3	13,8 ± 1,6	88,6 ± 2,1	63,2 ± 1,5
	B	20,0 ± 1,9	23,1 ± 0,0	71,9 ± 2,2	6,2 ± 2,5	90,3 ± 1,5	74,2 ± 0,5
	C	21,1 ± 3,2	13,0 ± 0,5	75,9 ± 2,0	14,0 ± 1,2	87,7 ± 2,9	82,7 ± 1,1
PEI-25k-Mal	A	19,0 ± 0,1	9,9 ± 1,1	71,7 ± 0,7	1,7 ± 0,4	88,1 ± 2,0	73,9 ± 5,3
	B	22,4 ± 1,8	2,6 ± 0,1	88,8 ± 0,4	8,2 ± 0,5	85,1 ± 2,1	84,5 ± 1,2
	C	24,7 ± 0,7	13,0 ± 0,5	90,4 ± 0,3	7,6 ± 1,3	76,5 ± 1,3	91,9 ± 1,0
PEI-5k-Lac	A	11,1 ± 2,4	16,2 ± 0,0	58,1 ± 3,1	7,4 ± 0,5	88,4 ± 1,2	82,3 ± 2,3
	B	14,1 ± 2,4	0,2 ± 0,1	65,1 ± 0,4	13,7 ± 1,2	88,9 ± 2,2	82,6 ± 3,8
	C	3,7 ± 2,1	21,7 ± 2,3	86,6 ± 0,5	5,1 ± 1,2	85,0 ± 2,3	90,9 ± 1,2
PEI-25k-Lac	A	27,8 ± 1,2	2,5 ± 0,2	66,9 ± 4,0	11,9 ± 1,8	88,2 ± 1,6	84,1 ± 4,4
	B	24,8 ± 0,5	12,3 ± 1,5	72,9 ± 1,0	1,5 ± 0,3	89,7 ± 1,7	73,0 ± 5,1
	C	13,6 ± 0,9	10,0 ± 0,5	76,7 ± 2,0	4,1 ± 1,9	85,5 ± 2,2	85,8 ± 1,2
PEI-25k-Mal-III	A	28,3 ± 1,1	13,0 ± 1,5	70,1 ± 1,5	13,5 ± 1,0	88,3 ± 1,3	81,5 ± 3,2
	B	15,5 ± 1,2	11,3 ± 0,9	87,9 ± 0,6	19,7 ± 1,7	88,9 ± 1,9	81,9 ± 1,5
	C	14,7 ± 1,0	11,4 ± 1,1	65,7 ± 0,7	20,5 ± 1,2	89,7 ± 1,7	93,2 ± 0,5

* Phosphat-Puffer pH 7,4

Tabelle 34: Anzahl der aufgenommenen Moleküle des Analyten pro einem Molekül der PEI-OS-Architekturen direkt nach der Zusammengabe der PEI-OS-Lösung und der Analytlösung bei einem molaren Verhältnis von 1:10.

		B ₁ *	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂	Estradiol-Derivat
PEI WF**		0,7 ± 0,0	3,1 ± 0,0	3,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	8,2 ± 0,1
PEI-5k-Mal	A	2,3 ± 0,2	1,6 ± 0,3	5,9 ± 0,9	0,7 ± 0,0	8,7 ± 0,1	7,3 ± 0,2
	B	2,6 ± 0,4	2,3 ± 0,3	7,2 ± 0,5	0,1 ± 0,0	8,5 ± 0,1	7,7 ± 0,2
	C	2,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	8,2 ± 0,1	0,9 ± 0,3	8,8 ± 0,2	8,2 ± 0,2
PEI-25k-Mal	A	2,3 ± 0,4	1,3 ± 0,1	6,0 ± 0,7	0,4 ± 0,2	8,9 ± 0,2	7,9 ± 0,3
	B	2,4 ± 0,4	1,5 ± 0,1	8,1 ± 0,1	0,7 ± 0,0	8,6 ± 0,2	8,2 ± 0,2
	C	2,6 ± 0,0	0,8 ± 0,2	9,2 ± 0,0	1,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1	8,9 ± 0,2
PEI-5k-Lac	A	1,1 ± 0,2	1,9 ± 0,2	8,2 ± 0,1	0,7 ± 0,2	8,9 ± 0,2	8,6 ± 0,2
	B	1,3 ± 0,3	1,9 ± 0,3	7,5 ± 0,4	2,0 ± 0,2	9,2 ± 0,2	8,5 ± 0,2
	C	1,1 ± 0,4	1,8 ± 0,4	9,0 ± 0,0	0,8 ± 0,1	8,2 ± 0,2	9,1 ± 0,1
PEI-25k-Lac	A	2,3 ± 0,1	1,3 ± 0,0	7,1 ± 0,3	1,9 ± 0,2	8,6 ± 0,1	8,9 ± 0,3
	B	2,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	7,5 ± 0,2	0,9 ± 0,2	8,5 ± 0,2	8,3 ± 0,4
	C	1,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	8,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	8,5 ± 0,2	7,8 ± 0,2
PEI-25k-Mal-III	A	2,6 ± 0,1	1,2 ± 0,0	7,7 ± 0,0	1,3 ± 0,0	9,0 ± 0,1	7,9 ± 0,3
	B	1,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	7,6 ± 0,1	2,0 ± 0,2	8,7 ± 0,2	7,5 ± 0,2
	C	1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,1	8,7 ± 0,0	2,0 ± 0,1	9,4 ± 0,2	7,8 ± 0,1

* Phosphat-Puffer pH 7,4

Tabelle 35: Anzahl der aufgenommenen Moleküle des Analyten pro einem Molekül der PEI-OS-Architekturen 3 Stunden nach der Zusammengabe der PEI-OS-Lösung und der Analytlösung bei einem molaren Verhältnis von 1:10.

		B ₁ *	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂	Estradiol-Derivat
PEI WF**		0,9 ± 0,0	2,7 ± 0,0	3,2 ± 0,0	0,8 ± 0,1	6,0 ± 0,0	8,0 ± 0,9
PEI-5k-Mal	A	2,4 ± 0,3	1,4 ± 0,0	7,7 ± 0,7	0,8 ± 0,0	9,0 ± 0,1	7,2 ± 0,3
	B	2,3 ± 0,4	2,4 ± 0,3	7,4 ± 0,3	0,4 ± 0,2	8,5 ± 0,1	7,9 ± 0,1
	C	2,3 ± 0,3	0,9 ± 0,0	7,7 ± 0,1	1,5 ± 0,0	8,9 ± 0,2	8,4 ± 0,3
PEI-25k-Mal	A	2,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	7,3 ± 0,1	0,1 ± 0,2	8,8 ± 0,1	8,4 ± 0,3
	B	2,9 ± 0,2	1,6 ± 0,3	8,1 ± 0,1	0,8 ± 0,0	8,8 ± 0,1	8,8 ± 0,1
	C	3,1 ± 0,1	1,0 ± 0,0	8,8 ± 0,0	0,8 ± 0,1	8,1 ± 0,1	9,3 ± 0,0
PEI-5k-Lac	A	1,1 ± 0,3	1,9 ± 0,2	7,3 ± 0,3	0,8 ± 0,0	8,7 ± 0,2	9,0 ± 0,1
	B	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,3	8,0 ± 0,3	1,7 ± 0,1	9,0 ± 0,2	8,5 ± 0,2
	C	0,7 ± 0,2	2,1 ± 0,2	9,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	8,2 ± 0,2	9,1 ± 0,1
PEI-25k-Lac	A	3,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	7,3 ± 0,3	2,0 ± 0,2	8,7 ± 0,1	9,2 ± 0,3
	B	2,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,4 ± 0,2
	C	2,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	8,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	8,3 ± 0,1	8,3 ± 0,2
PEI-25k-Mal-III	A	2,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	7,9 ± 0,1	1,6 ± 0,0	9,1 ± 0,1	8,5 ± 0,2
	B	2,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	8,9 ± 0,0	2,2 ± 0,1	8,8 ± 0,1	7,8 ± 0,3
	C	2,3 ± 0,0	0,8 ± 0,1	7,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	9,3 ± 0,2	8,7 ± 0,2

* Phosphat-Puffer pH 7,4

Tabelle 36: Anzahl der aufgenommenen Moleküle des Analyten pro einem Molekül der PEI-OS-Architekturen 20 Stunden nach der Zusammengabe der PEI-OS-Lösung und der Analytlösung bei einem molaren Verhältnis von 1:10.

		B₁ *	B₂	B₃	B₆	B₁₂	Estradiol-Derivat
PEI WF**		0,8 ± 0,0	2,5 ± 0,0	2,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	5,6 ± 0,0	4,6 ± 1,2
PEI-5k-Mal	A	2,4 ± 0,2	1,6 ± 0,0	6,7 ± 0,7	0,8 ± 0,1	8,8 ± 0,2	6,2 ± 0,2
	B	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,0	7,2 ± 0,2	0,4 ± 0,2	8,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1
	C	2,1 ± 0,3	1,3 ± 0,0	7,4 ± 0,2	1,4 ± 0	8,7 ± 0,3	8,4 ± 0,1
PEI-25k-Mal	A	1,8 ± 0,0	1,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1	0,2 ± 0,0	8,7 ± 0,2	7,4 ± 0,5
	B	2,3 ± 0,2	0,3 ± 0,0	8,6 ± 0,0	0,8 ± 0,0	8,6 ± 0,2	8,4 ± 0,1
	C	2,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	9,2 ± 0,0	0,7 ± 0,1	7,5 ± 0,1	9,0 ± 0,1
PEI-5k-Lac	A	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,0	5,7 ± 0,3	0,7 ± 0,0	8,8 ± 0,1	8,2 ± 0,2
	B	1,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	6,5 ± 0,0	1,4 ± 0,1	9,0 ± 0,2	7,9 ± 0,4
	C	0,4 ± 0,2	2,2 ± 0,2	8,7 ± 0,0	0,5 ± 0,1	8,3 ± 0,2	9,2 ± 0,1
PEI-25k-Lac	A	2,6 ± 0,1	0,2 ± 0,0	6,7 ± 0,4	1,3 ± 0,2	8,7 ± 0,2	8,4 ± 0,4
	B	2,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	7,0 ± 0,1	0,2 ± 0,0	8,8 ± 0,2	7,4 ± 0,5
	C	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,0	7,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2	8,3 ± 0,2	8,7 ± 0,1
PEI-25k-Mal-III	A	2,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	6,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	9,1 ± 0,1	8,2 ± 0,3
	B	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	8,5 ± 0,1	2,0 ± 0,2	8,8 ± 0,2	7,9 ± 0,1
	C	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	6,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	9,3 ± 0,2	8,5 ± 0,0

* Phosphat-Puffer pH 7,4

Der Einfluss des pH-Wertes wurde mit Hilfe von analogen Ultrafiltrationsexperimenten untersucht. Der pH-Wert wurde mittels Säure (HCl) bzw. Base (NaOH) eingestellt oder es wurden Ultrafiltrationsexperimente mit Puffer als Lösungsmittel durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den **Tabellen 37, 38, 39** und **40** zusammengefasst.

Tabelle 37: Aufnahmeeffizienz der PEI-OS-Architekturen [%] für die jeweiligen wasserlöslichen Analyten bei einem molaren Verhältnis von 1:10. Die wässrigen Lösungen wurden mit HCl bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 gebracht.

	Zeit [h]	B₂	B₃	B₆	B₁₂
PEI WF	0	-	11,1 ± 0,8	85,1 ± 1,3	87,4 ± 0,4
	3	-	33,4 ± 0,6	84,3 ± 3,8	88,2 ± 0,4
	20	-	30,9 ± 2,4	85,0 ± 0,5	zersetzt
PEI-25k-Mal A	0	10,3 ± 0,8	6,3 ± 1,0	83,2 ± 2,0	33,8 ± 1,4
	3	13,5 ± 0,9	13,0 ± 0,9	83,6 ± 2,4	33,7 ± 3,2
	20	8,5 ± 2,5	6,4 ± 1,1	83,3 ± 2,7	zersetzt
PEI-25k-Mal B	0	6,8 ± 0,8	7,9 ± 1,0	83,6 ± 2,0	82,8 ± 1,8
	3	8,9 ± 1,0	13,5 ± 1,2	85,3 ± 1,0	83,9 ± 1,7
	20	6,1 ± 1,0	5,7 ± 1,5	85,4 ± 2,4	zersetzt
PEI-25k-Mal C	0	6,4 ± 0,8	7,3 ± 1,4	85,0 ± 1,9	83,3 ± 1,6
	3	9,2 ± 0,9	9,8 ± 1,0	86,0 ± 2,5	84,3 ± 1,5
	20	4,6 ± 1,6	6,9 ± 1,4	84,0 ± 2,1	zersetzt

Tabelle 38: Anzahl der aufgenommenen Moleküle des Analyten pro einem Molekül der PEI-OS-Architekturen bei einem molaren Verhältnis von 1:10. Die wässrigen Lösungen wurden mit HCl bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 gebracht.

	Zeit [h]	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂
PEI WF	0	-	1,1 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,7 ± 0,0
	3	-	3,3 ± 0,1	8,4 ± 0,4	8,8 ± 0,0
	20	-	3,1 ± 0,2	8,5 ± 0,1	zersetzt
PEI-25k-Mal A	0	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1	8,3 ± 0,2	3,4 ± 0,1
	3	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	8,4 ± 0,2	3,4 ± 0,3
	20	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,1	8,3 ± 0,3	zersetzt
PEI-25k-Mal B	0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	8,4 ± 0,2	8,3 ± 0,2
	3	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,4 ± 0,2
	20	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	8,5 ± 0,2	zersetzt
PEI-25k-Mal C	0	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	8,5 ± 0,2	8,3 ± 0,2
	3	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	8,6 ± 0,2	8,4 ± 0,1
	20	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	8,4 ± 0,2	zersetzt

Tabelle 39: Aufnahmeeffizienz der PEI-OS-Architekturen [%] (a) und Anzahl der aufgenommenen Moleküle von B₆ pro einem Molekül der PEI-OS-Architekturen (b) bei einem molaren Verhältnis von 1:10. Als Lösungsmittel wurde ein Phosphatpuffer mit pH 3,8 genutzt.

(a)				
Zeit [h]	PEI-5k-Mal A	PEI-5k-Mal B	PEI-25k-Mal A	PEI-25k-Mal B
0	2,7 ± 0,6	5,3 ± 0,5	0,0 ± 0,2	0,0 ± 0,3
3	6,4 ± 0,3	7,0 ± 0,4	0,8 ± 0,7	0,0 ± 0,4
20	2,1 ± 1,2	5,5 ± 0,6	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,3

(b)				
Zeit [h]	PEI-5k-Mal A	PEI-5k-Mal B	PEI-25k-Mal A	PEI-25k-Mal B
0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
3	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0
20	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0

Tabelle 40: Aufnahmeeffizienz der PEI-OS-Architekturen [%] (a) und Anzahl der aufgenommenen Moleküle von B₃ pro einem Molekül der PEI-OS-Architekturen (b) bei einem molaren Verhältnis von 1:10. Als Lösungsmittel wurde ein Phosphatpuffer mit pH 3,0 genutzt.

(a)				
Zeit [h]	PEI-5k-Mal A	PEI-5k-Mal B	PEI-25k-Mal-III A	PEI-25k-Mal-III B
0	0,0 ± 0,4	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,3	0,0 ± 0,8
3	0,0 ± 0,2	0,0 ± 0,2	0,0 ± 0,2	0,0 ± 0,3
20	0,9 ± 0,3	0,0 ± 0,1	1,4 ± 0,3	3,4 ± 0,2

(b)				
Zeit [h]	PEI-5k-Mal A	PEI-5k-Mal B	PEI-25k-Mal-III A	PEI-25k-Mal-III B
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
20	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Neben dem Puffereinfluss wurde ebenfalls die Beladungsgrenze getestet, um eine Übersättigung bei möglichen chromatographischen Anwendungen ausschließen zu können.

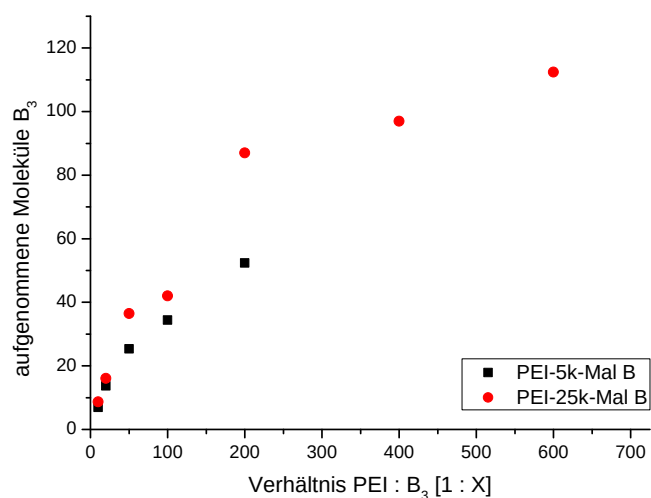


Abbildung 100: Beladungskapazität von PEI-5k-Mal B und PEI-25k-Mal B gegenüber B₃.

NMR-Untersuchungen mit unmodifiziertem PEI

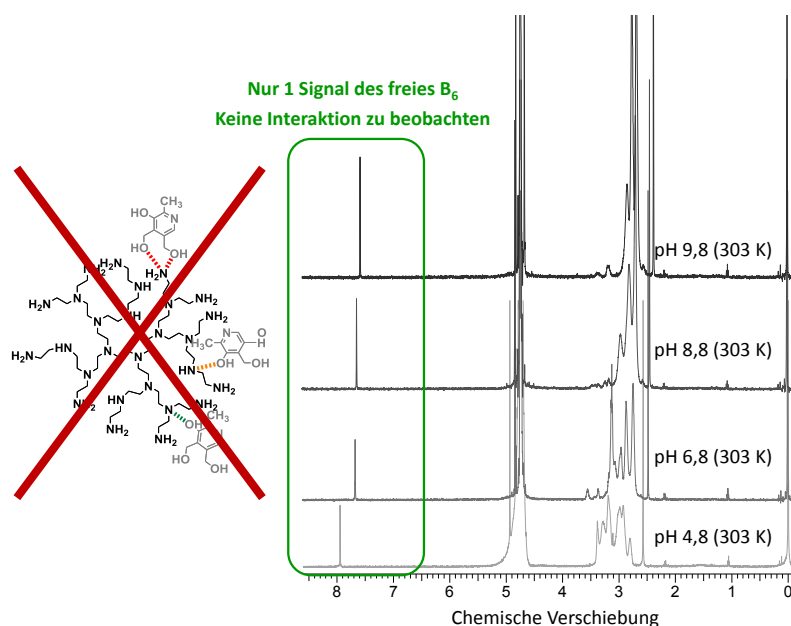


Abbildung 101: NMR-Untersuchung der Wechselwirkung von unmodifiziertem PEI (Lupasol G100) und B₆ bei verschiedenen pH-Werten.

Zusätzliche Informationen zu den Dünnschicht-Experimente

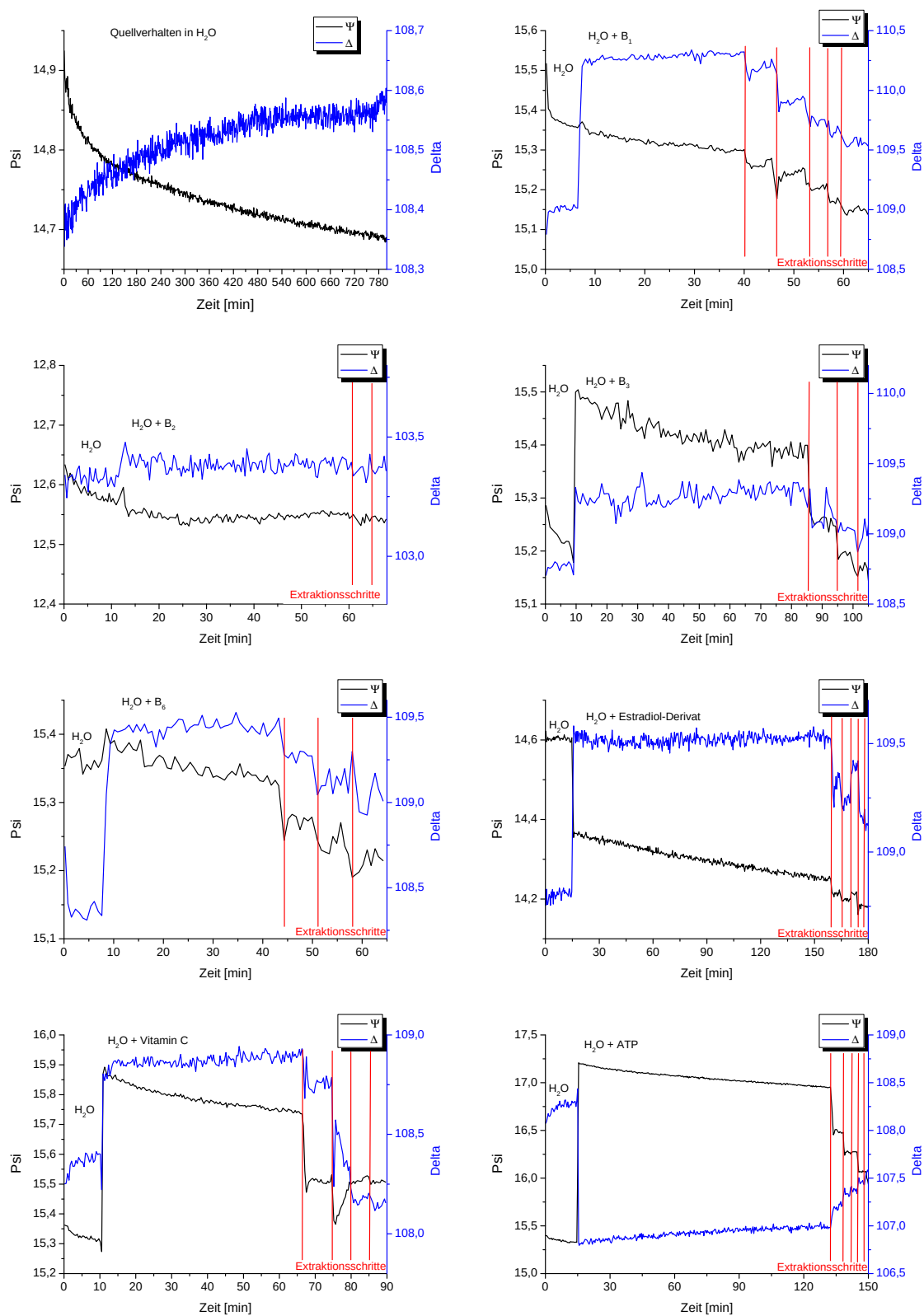


Abbildung 102: Psi- und Delta-Werte der Untersuchungen bei PEI-OS Schichten (PEI-25k-Mal B).

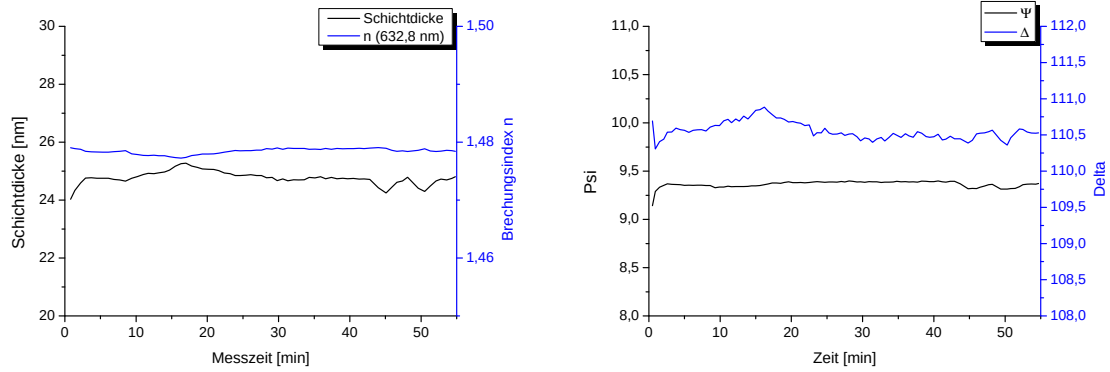
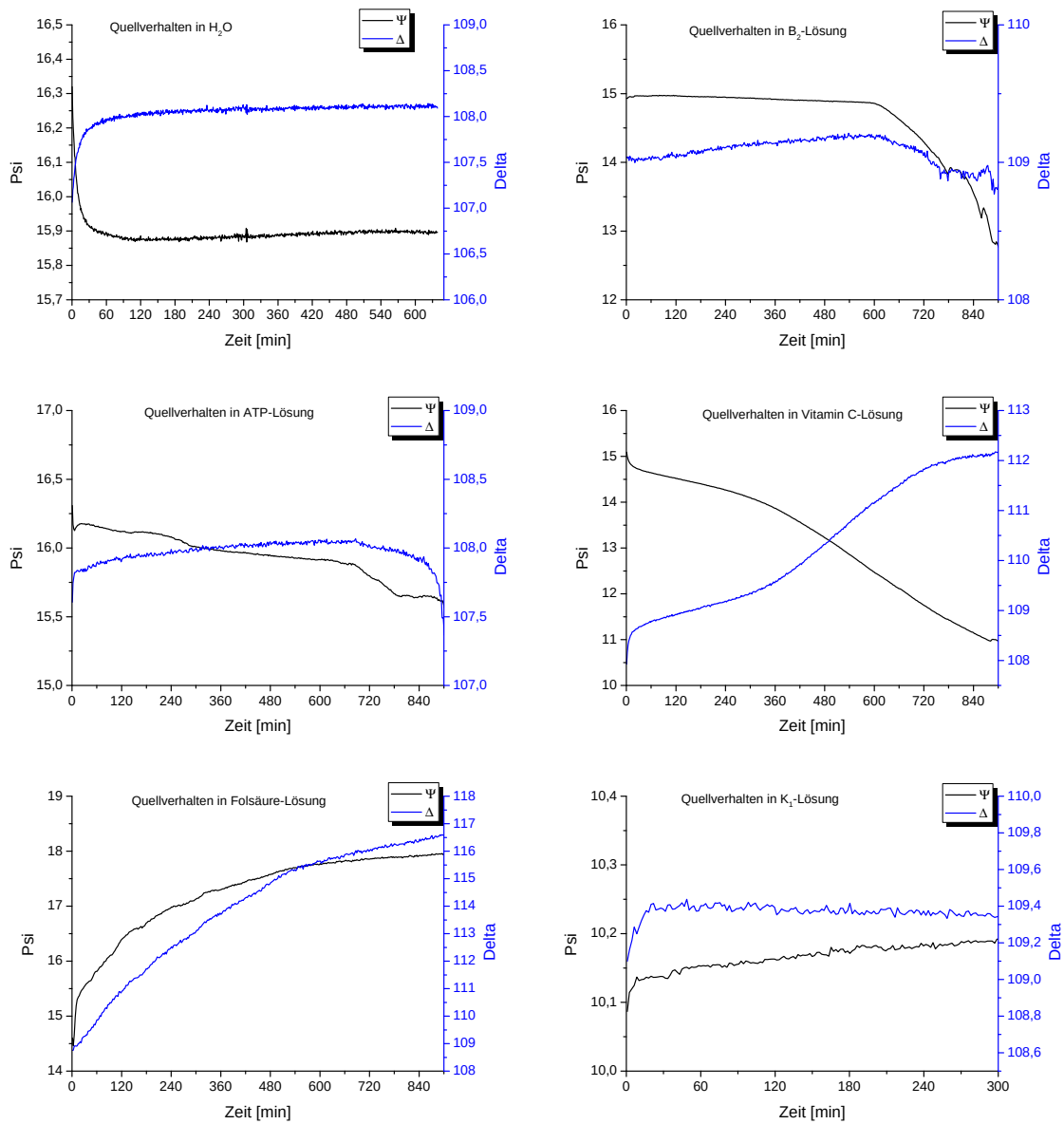


Abbildung 103: Interaktion der PEI-OS-Schicht (PEI-25k-Mal B) mit Tocopherol in Butanol.



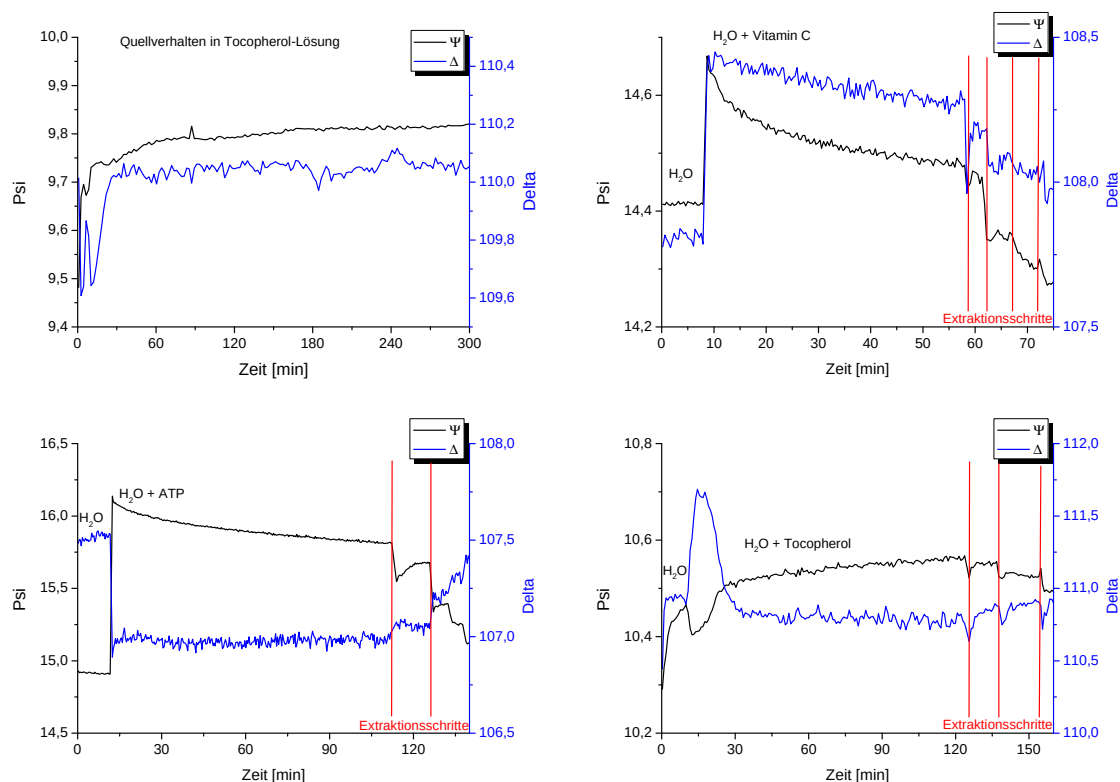
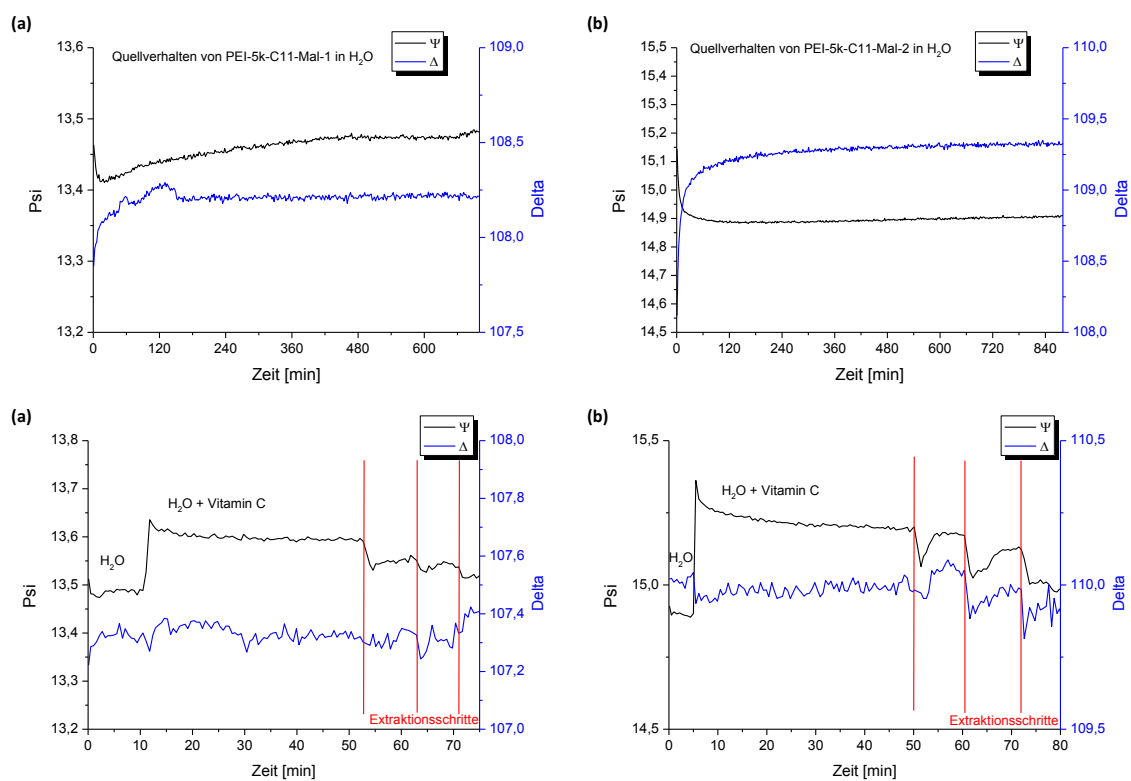


Abbildung 104: Psi- und Delta-Werte der Untersuchungen bei PEI-25k-(C11-NH₂)-Mal-Schichten.



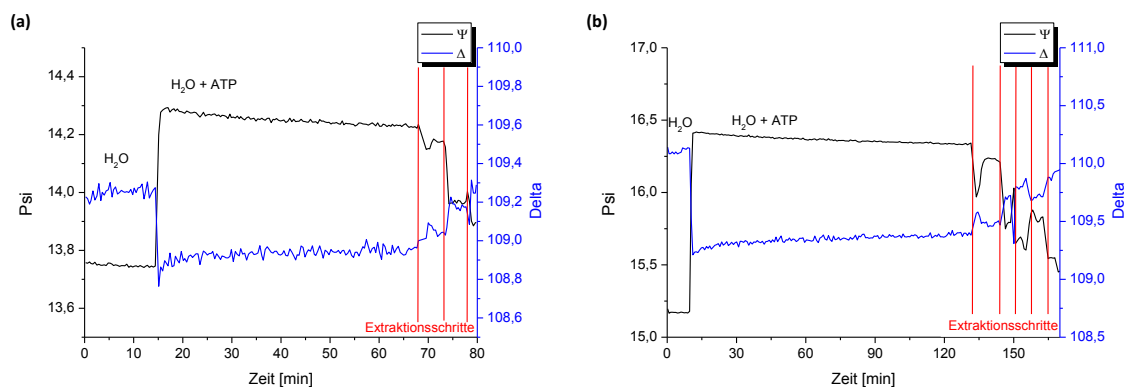


Abbildung 105: Psi- und Delta-Werte der Untersuchungen bei PEI-5k-C11-Mal-1 (a) und PEI-5k-C11-Mal-2 (b) Schichten.

Ergebnisse der TLC-Untersuchungen

Tabelle 41: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-5k-Mal A,B und C modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

	B ₁		B ₂		B ₃		B ₆		B ₁₂		Vit. C	
	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N
Un-modifiziert	0,06 ± 0,02	165 ± 55	0,36 ± 0,01	69 ± 10	0,86 ± 0,01	4830 ± 323	0,71 ± 0,02	947 ± 12	0,31 ± 0,02	440 ± 66	0,97 ± 0,01	3893 ± 322
PEI-5k-Mal A	0,07 ± 0,00	97 ± 41	0,37 ± 0,04	51 ± 8	0,91 ± 0,01	3242 ± 386	0,69 ± 0,02	380 ± 56	0,32 ± 0,03	517 ± 88	0,95 ± 0,00	1480 ± 433
PEI-5k-Mal B	0,07 ± 0,01	159 ± 50	0,38 ± 0,04	69 ± 1	0,92 ± 0,05	3950 ± 1110	0,65 ± 0,04	215 ± 123	0,35 ± 0,04	614 ± 135	0,94 ± 0,02	1107 ± 415
PEI-5k-Mal C	0,03 ± 0,02	64 ± 26	0,38 ± 0,04	57 ± 14	0,95 ± 0,01	4487 ± 197	0,7 ± 0,02	149 ± 50	0,33 ± 0,00	436 ± 64	0,96 ± 0,00	1907 ± 358
	→	↓	→	→	↑	↓	→	↓	→	↑	→	↓

Mittelwerte zweier Untersuchungen

Tabelle 42: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-25k-Mal A,B und C modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

	B₁		B₂		B₃		B₆		B₁₂		Vit. C	
	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N
Un-modifiziert	0,02 ± 0,01	37 ± 18	0,35 ± 0,03	77 ± 1	0,87 ± 0,04	3444 ± 679	0,70 ± 0,02	793 ± 24	0,26 ± 0,02	319 ± 148	0,90 ± 0,01	1347 ± 336
PEI-25k-Mal A	0,02 ± 0,00	34 ± 4	0,40 ± 0,00	87 ± 0	0,93 ± 0,01	3340 ± 749	0,74 ± 0,01	856 ± 19	0,32 ± 0,01	431 ± 15	0,92 ± 0,03	1679 ± 33
PEI-25k-Mal B	0,03 ± 0,00	40 ± 2	0,38 ± 0,01	67 ± 9	0,94 ± 0,00	2575 ± 1366	0,74 ± 0,01	489 ± 136	0,31 ± 0,00	489 ± 136	0,95 ± 0,01	2011 ± 161
PEI-25k-Mal C	0,03 ± 0,01	40 ± 13	0,39 ± 0,01	79 ± 6	0,94 ± 0,03	3436 ± 589	0,73 ± 0,03	946 ± 107	0,32 ± 0,03	541 ± 68	0,96 ± 0,01	1740 ± 226
	→	↓	↑	→	↑	→	↑	→	↑	↑	↑	↑

Mittelwerte zweier Untersuchungen

Tabelle 43: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-25k-Mal-III A,B und C modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

	B₁		B₂		B₃		B₆		B₁₂		Vit. C	
	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N
Un-modifiziert	0,02 ± 0,01	50 ± 15	0,17 ± 0,02	134 ± 45	0,84 ± 0,03	1154 ± 598	0,67 ± 0,01	791 ± 105	0,27 ± 0,01	277 ± 4	0,96 ± 0,03	2928 ± 1760
PEI-25k-Mal-III A	0,02 ± 0,01	41 ± 4	0,41 ± 0,00	93 ± 9	0,93 ± 0,00	1561 ± 543	0,73 ± 0,01	710 ± 78	0,31 ± 0,00	728 ± 179	0,93 ± 0,00	913 ± 116
PEI-25k-Mal-III B	0,02 ± 0,00	37 ± 9	0,38 ± 0,00	70 ± 2	0,96 ± 0,01	2405 ± 1302	0,73 ± 0,00	840 ± 12	0,31 ± 0,00	492 ± 33	0,95 ± 0,01	2154 ± 210
PEI-25k-Mal-III C	0,02 ± 0,01	33 ± 19	0,39 ± 0,00	79 ± 1	0,93 ± 0,03	2853 ± 619	0,7 ± 0,02	622 ± 299	0,3 ± 0,00	236 ± 42	0,93 ± 0,02	1416 ± 22
	→	↓	↑	↓	↑	↑	↑	→	↑	↑	→	↓

Mittelwerte zweier Untersuchungen

Tabelle 44: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-5k-C11-Mal modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

	B₁		B₂		B₂-P		B₃	
	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N
Un-modifiziert	0,03 ± 0,00	32 ± 3	0,69 ± 0,01	411 ± 23	0,02 ± 0,00	34 ± 9	0,75 ± 0,02	703 ± 71
PEI-5k-C11-Mal-1	0,03 ± 0,01	21 ± 5	0,61 ± 0,03	153 ± 34	0,02 ± 0,01	16 ± 3	0,71 ± 0,01	585 ± 33
	→	↓	↓	↓	→	↓	↓	↓
PEI-5k-C11-Mal-2	0,03 ± 0,01	20 ± 2	0,66 ± 0,01	279 ± 195	0,02 ± 0,01	22 ± 6	0,70 ± 0,05	769 ± 211
	→	↓	↓	↓	→	↓	↓	→

	B₆		B₁₂		Vit. C	
	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N
Un-modifiziert	0,72 ± 0,02	721 ± 114	0,32 ± 0,01	282 ± 16	0,72 ± 0,01	1487 ± 160
PEI-5k-C11-Mal-1	0,71 ± 0,02	328 ± 53	0,26 ± 0,01	262 ± 52	0,68 ± 0,03	892 ± 271
	→	↓	↓	→	↓	↓
PEI-5k-C11-Mal-2	0,70 ± 0,02	467 ± 52	0,22 ± 0,02	180 ± 12	0,65 ± 0,02	541 ± 47
	→	↓	↓	↓	↓	↓

Mittelwerte zweier Untersuchungen

Tabelle 45: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-25k-C11-Mal modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

	B₁		B₂		B₂-P		B₃	
	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N
Un-modifiziert	0,03 ± 0,00	32 ± 3	0,69 ± 0,01	411 ± 23	0,02 ± 0,00	34 ± 9	0,75 ± 0,02	703 ± 71
PEI-25k-C11-Mal-1	0,03 ± 0,00	24 ± 0	0,58 ± 0,05	94 ± 15	0,02 ± 0,01	19 ± 1	0,69 ± 0,03	784 ± 38
	→	↓	↓	↓	→	↓	↓	→
PEI-25k-C11-Mal-2	0,03 ± 0,01	28 ± 4	0,65 ± 0,01	187 ± 18	0,02 ± 0,01	21 ± 1	0,72 ± 0,01	696 ± 126
	→	↓	↓	↓	→	↓	→	→
	B₆		B₁₂		Vit. C			
	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N	<i>R_f</i>	N		
Un-modifiziert	0,72 ± 0,02	721 ± 114	0,32 ± 0,01	282 ± 16	0,72 ± 0,01	1487 ± 160		
PEI-25k-C11-Mal-1	0,75 ± 0,01	403 ± 1	0,22 ± 0,03	164 ± 9	0,63 ± 0,06	526 374		
	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
PEI-25k-C11-Mal-2	0,75 ± 0,02	444 ± 40	0,24 ± 0,00	199 ± 44	0,65 ± 0,04	604 ± 297		
	↑	↓	↓	↓	↓	↓		

Mittelwerte zweier Untersuchungen

Tabelle 46: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-5k-C11 (ohne Maltoseschale) modifizierten TLC-Platten mit hydrophilen Vitaminen.

	B ₁		B ₂		B ₂ -P		B ₃	
	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N
Un-modifiziert	0,03 ± 0,00	32 ± 3	0,69 ± 0,01	411 ± 23	0,02 ± 0,00	34 ± 9	0,75 ± 0,02	703 ± 71
PEI-5k-C11-NH ₂	0,06 ± 0,01	32 ± 6	0,69 ± 0,01	487 ± 51	0,69 ± 0,01	645 ± 127	0,68 ± 0,02	510 ± 204
	↑	→	→	→	↑	↑	↓	↓
PEI-25k-C11-NH ₂	0,04 ± 0,01	27 ± 7	0,63 ± 0,02	139 ± 5	0,01 ± 0,00	16 ± 0	0,70 ± 0,01	345 ± 93
	→	→	↓	↓	→	↓	↓	↓
	B ₆		B ₁₂		Vit. C			
	R _f	N	R _f	N	R _f	N		
Un-modifiziert	0,72 ± 0,02	721 ± 114	0,32 ± 0,01	282 ± 16	0,72 ± 0,01	1487 ± 160		
PEI-5k-C11-NH ₂	0,77 ± 0,01	705 ± 13	0,29 ± 0,01	231 ± 42	0,39 ± 0,07	99 ± 43		
	↑	→	→	→	↓	↓		
PEI-25k-C11-NH ₂	0,71 ± 0,00	605 ± 5	0,24 ± 0,00	176 ± 12	0,48 ± 0,09	338 ± 203		
	→	↓	↓	↓	↓	↓		

Mittelwerte zweier Untersuchungen

Tabelle 47: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-C11-Mal modifizierten TLC-Platten mit lipophilen Vitaminen.

	Ergo-calciferol		Chole-calciferol		K ₁		α-Tocopherol		α-Tocopherol-acetat		Retinyl-palmitat	
	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N
Un-modifiziert	0,11 ± 0,00	220 ± 14	0,13 ± 0,01	222 ± 1	0,68 ± 0,00	1357 ± 155	0,46 ± 0,02	669 ± 40	0,50 ± 0,03	907 ± 6	0,73 ± 0,02	1207 ± 320
PEI-5k-C11-Mal-1	0,11	207	0,12	261	0,66	1481	0,45	753	0,53	1016	0,72	1389
PEI-25k-C11-Mal-1	0,10	237	0,10	202	0,65	1515	0,43	731	0,48	960	0,70	1638
PEI-5k-C11-Mal-2	0,09	262	0,10	204	0,64	1795	0,42	854	0,49	992	0,71	1689
PEI-25k-C11-Mal-2	0,11	207	0,12	261	0,66	1481	0,45	753	0,53	1016	0,72	1389
	→		→		↑		↑		↑		↑	

Einfachmessungen, daher keine Angabe von Fehlerwerten

Tabelle 48: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-FA (ohne Maltoseschale) modifizierten TLC-Platten mit lipophilen Vitaminen.

	Ergo- calciferol		Chole- calciferol		K ₁		α -Tocopherol		α -Tocopherol- acetat		Retinyl- palmitat	
	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N
Un- modifiziert	0,11 ± 0,00	220 ± 14	0,13 ± 0,01	222 ± 1	0,68 ± 0,00	1357 ± 155	0,46 ± 0,02	669 ± 40	0,50 ± 0,03	907 ± 6	0,73 ± 0,02	1207 ± 320
PEI-25k- FA 20	0,10 ± 0,01	273 ± 4	0,11 ± 0,00	296 ± 1	0,70 ± 0,03	2117 ± 192	0,46 ± 0,03	841 ± 23	0,54 ± 0,03	1058 ± 94	0,74 ± 0,02	1765 ± 4
PEI-25k- FA 35	0,11 ± 0,00	321 ± 32	0,12 ± 0,00	338 ± 26	0,70 ± 0,01	2087 ± 51	0,46 ± 0,01	852 ± 19	0,53 ± 0,01	1280 ± 36	0,71 ± 0,01	1624 ± 254
PEI-25k- FA 50	0,11 ± 0,01	255 ± 8	0,12 ± 0,01	282 ± 10	0,70 ± 0,01	2364 ± 14	0,46 ± 0,01	745 ± 47	0,55 ± 0,02	1064 ± 143	0,73 ± 0,00	1605 ± 189
	→	↑	→	↑	↑	↑	→	↑	↑	↑	→	↑

Mittelwerte zweier Untersuchungen

Tabelle 49: Übersicht der TLC-Experimente mit PEI-FA-Architekturen mit Maltoseschale modifizierten TLC-Platten mit lipophilen Vitaminen.

	Ergo- calciferol		Chole- calciferol		K ₁		α -Tocopherol		α -Tocopherol- acetat		Retinyl- palmitat	
	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N	R _f	N
Un- modifiziert	0,11 ± 0,00	220 ± 14	0,13 ± 0,01	222 ± 1	0,68 ± 0,00	1357 ± 155	0,46 ± 0,02	669 ± 40	0,50 ± 0,03	907 ± 6	0,73 ± 0,02	1207 ± 320
PEI-25k- FA 20 Mal	0,11 ± 0,00	209 ± 34	0,11 ± 0,00	195 ± 14	0,74 ± 0,03	1546 ± 155	0,49 ± 0,03	486 ± 3	0,56 ± 0,04	930 ± 49	0,78 ± 0,02	1159 ± 449
PEI-25k- FA 35 Mal	0,10 ± 0,00	210 ± 6	0,11 ± 0,00	180 ± 11	0,70 ± 0,01	1673 ± 42	0,47 ± 0,00	778 ± 182	0,54 ± 0,01	919 ± 100	0,77 ± 0,01	380 ± 42
PEI-25k- FA 50 Mal	0,12 ± 0,01	196 ± 36	0,12 ± 0,00	183 ± 23	0,76 ± 0,02	1703 ± 95	0,52 ± 0,02	489 ± 50	0,59 ± 0,03	1045 ± 107	0,82 ± 0,03	488 ± 26
	→	→	→	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓

Mittelwerte zweier Untersuchungen

Nanopartikel modifiziert mit Kern-Schale-Architekturen

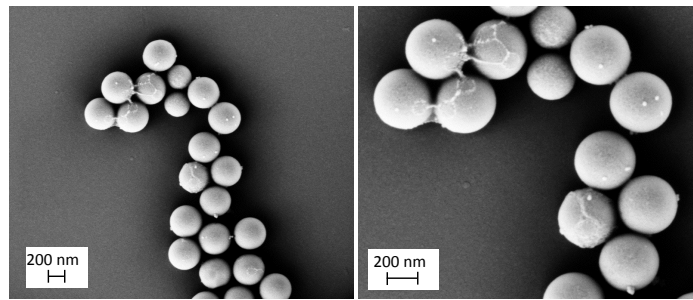


Abbildung 106: REM-Aufnahmen der PEI-5k-C11-Mal B modifizierten Silika-Partikeln.

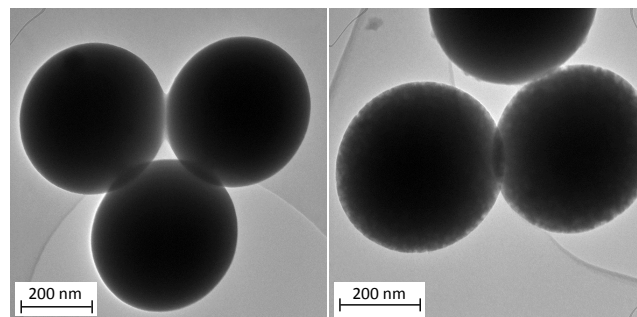


Abbildung 107: Vergleich der TEM-Aufnahmen von unmodifizierten Silika-Partikeln (links) und mit PEI-5k-C11 Mal B modifizierte Silika-Partikeln mit deutlicher Änderung der Oberfläche.

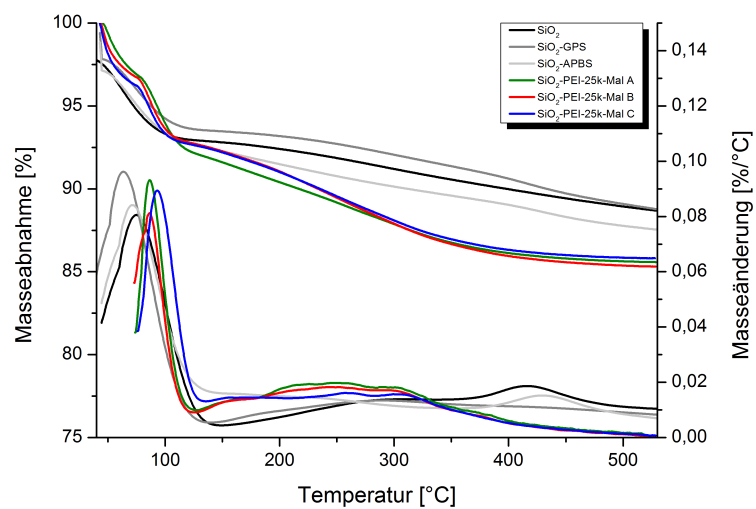


Abbildung 108: Auswertung der TGA-Untersuchung der un- und modifizierten Partikel. Im Fall der PEI-OS-modifizierten Partikel (PEI-25k-Mal A-C) kann ein zusätzlicher Massenverlust zwischen 230 - 450 °C gemessen werden. Der absolute Masseverlust ist bei den PEI-OS-modifizierten Partikeln deutlich höher, wie anhand der Masseabnahme [%] gesehen werden kann.

Tabelle 50: Übersicht der Ergebnisse der Batch-Versuche mit modifizierten Partikeln und wasserlöslichen Vitaminen.

NP-PEI-OS*	Zeit [h]	B ₁	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂	Estradiol Derivat
Struktur A	0	11,3 ± 0,1	68,2 ± 0,0	93,8 ± 0,0	93,2 ± 0,0	91,2 ± 0,0	98,6 ± 0,0
	3	0,0 ± 0,1	3,2 ± 0,0	10,1 ± 0,1	14,7 ± 0,3	3,3 ± 0,0	6,7 ± 0,1
	20	0,0 ± 0,1	1,2 ± 0,0	14,1 ± 0,1	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Struktur B	0	43,0 ± 0,0	69,8 ± 0,0	74,0 ± 0,0	61,5 ± 0,0	66,0 ± 0,0	96,6 ± 0,0
	3	24,7 ± 0,0	3,3 ± 0,0	10,6 ± 0,1	0,6 ± 0,3	3,6 ± 0,0	6,0 ± 0,1
	20	9,9 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,1 ± 0,1	0,0 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Struktur C	0	63,4 ± 0,1	50,1 ± 0,0	50,2 ± 0,0	89,4 ± 0,0	56,7 ± 0,0	42,1 ± 0,1
	3	24,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	10,3 ± 0,1	0,6 ± 0,4	2,5 ± 0,1	18,5 ± 0,0
	20	23,7 ± 0,1	3,3 ± 0,1	9,6 ± 0,0	0,0 ± 0,2	0,2 ± 0,0	9,1 ± 0,1

*5 kDa Kern und Maltose Schale

Literaturverzeichnis

- [1] T. J. Ward, K. D. Ward, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 626–35.
- [2] W. J. Cheong, S. H. Yang, F. Ali, *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 609–28.
- [3] M. D. Bubba, L. Checchini, L. Lepri, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 533–554.
- [4] M. Hanson, K. K. Unger, *Trends Anal. Chem.* **1992**, *11*, 368 –373.
- [5] J. Kirkland, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 9–21.
- [6] F. Gasparri, D. Misiti, R. Rompietti, C. Villani, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1064*, 25–38.
- [7] A. Martin-Esteban, *Trends Anal. Chem.* **2013**, *45*, 169 –181.
- [8] I. Nischang, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1287*, 39–58.
- [9] R. D. Arrua, M. Talebi, T. J. Causon, E. F. Hilder, *Anal. Chim. Acta* **2012**, *738*, 1–12.
- [10] P. Jandera, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1313*, 37 –53.
- [11] F. Svec, *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 1419–1430.
- [12] M. Tang, J. Zhang, S. Zhuang, W. Liu, *Trends Anal. Chem.* **2012**, *39*, 180 –194.
- [13] S. E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1329–1334.
- [14] E. Buhleier, W. Wehner, F. Voegtle, *Synthesis-Stuttgart* **1978**, 155–158.
- [15] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, *17*, 117–132.
- [16] G. R. Newkome, Z. Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003–2004.
- [17] C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. Frechet, F. C. Szoka, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1517–26.
- [18] A. D’Emanuele, D. Attwood, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2147–62.
- [19] K. Jain, P. Kesharwani, U. Gupta, N. K. Jain, *Biomaterials* **2012**, *33*, 4166–4186.
- [20] E. R. Gillies, J. M. J. Frechet, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 35–43.
- [21] A. K. Patri, I. J. Majoros, J. R. Baker Jr, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 466–471.
- [22] P. G. Degennes, H. Hervet, *J. Phys. Lett. - Paris* **1983**, *44*, 351–360.
- [23] N. Malik, R. Wiwattanapatapee, R. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus, R. Duncan, *J. Controlled Release* **2000**, *68*, 299–302.
- [24] K. Jain, P. Kesharwani, U. Gupta, N. K. Jain, *Int. J. Pharm.* **2010**, *394*, 122–142.
- [25] P. Kesharwani, K. Jain, N. K. Jain, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 268 –307.
- [26] J. Zhu, X. Shi, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4199–4211.
- [27] M. Liu, J. M. Frechet, *Pharm. Sci. Technol. To.* **1999**, *2*, 393 –401.
- [28] A. Aied, U. Greiser, A. Pandit, W. Wang, *Drug Discovery Today* **2013**, *18*, 1090–8.
- [29] D. Wang, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 2317–2334.
- [30] A. N. Alias, Z. M. Zabidi, A. Ali, M. K. Harun, *International Journal of Applied Science and Technology (IJAST)* **2013**, *3*, 11–38.
- [31] A. Adronov, J. M. J. Frechet, *Chem. Commun.* **2000**, 1701–1710.

- [32] S. Svenson, D. A. Tomalia, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2106–29.
- [33] L. Roeglin, E. H. M. Lempens, E. W. Meijer, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 106–117.
- [34] R. Hourani, A. Kakkar, *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 947–74.
- [35] A. W. Bosman, H. M. Janssen, E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665–1688.
- [36] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43–63.
- [37] A. K. Patri, J. F. Kukowska-Latallo, J. R. B. Jr., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, Dendrimers: a Versatile Targeting Platform, 2203–2214.
- [38] G. R. Newkome, C. N. Moorefield, G. R. Baker, M. J. Saunders, S. H. Grossman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 1178–1180.
- [39] C. J. Hawker, K. L. Wooley, J. M. J. Frechet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1287–1297.
- [40] D. Bhadra, S. Bhadra, S. Jain, N. K. Jain, *Int. J. Pharm.* **2003**, *257*, 111–124.
- [41] C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, T. Takagishi, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 910–917.
- [42] G. F. Pan, Y. Lemmouchi, E. O. Akala, O. Bakare, *J. Bioact. Compat. Polym.* **2005**, *20*, 113–128.
- [43] M. A. Quadir, M. R. Radowski, F. Kratz, K. Licha, P. Hauff, R. Haag, *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 289–94.
- [44] J. F. G. A. Jansen, E. M. M. Debrabandervandenberg, E. W. Meijer, *Science* **1994**, *266*, 1226–1229.
- [45] J. F. G. A. Jansen, E. W. Meijer, E. M. M. Debrabandervandenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4417–4418.
- [46] J. F. G. A. Jansen, E. W. Meijer, E. M. M. Debrabandervandenberg, *Macromol. Symp.* **1996**, *102*, 27–33.
- [47] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1198–1215.
- [48] A. R. Menjoge, R. Kannan, D. A. Tomalia, *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 171–185.
- [49] N. Hauptmann, M. Pion, M.-A. Munoz-Fernandez, H. Komber, C. Werner, B. Voit, D. Appelhans, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 531–538.
- [50] Y. Zhou, W. Huang, J. Liu, X. Zhu, D. Yan, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 4567–4590.
- [51] I. N. Kurniasih, H. Liang, S. Kumar, A. Mohr, S. K. Sharma, J. P. Rabe, R. Haag, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3569–3577.
- [52] D. Appelhans, H. Komber, M. A. Quadir, S. Richter, S. Schwarz, J. van der Vlist, A. Aigner, M. Mueller, K. Loos, J. Seidel, K. F. Arndt, R. Haag, B. Voit, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1114–1124.
- [53] P. Kolhe, J. Khandare, O. Pillai, S. Kannan, M. Lieh-Lai, R. Kannan, English, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 2185–2195.
- [54] M. Kraemer, J.-F. Stumbe, T. H. S. Krause, A. Komp, L. Delineau, S. Prokhorova, H. Kautz, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, *144*, 4426–4431.
- [55] S. Hoebel, A. Loos, D. Appelhans, S. Schwarz, J. Seidel, B. Voit, A. Aigner, *J. Controlled Release* **2011**, *149*, 146–158.
- [56] W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *J. Controlled Release* **1999**, *60*, 149–160.
- [57] D. Wan, J. Yuan, H. Pu, *Macromolecules* **2009**, *42*, 1533–1540.
- [58] N. Sharon, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2753–64.

- [59] S. G. Spain, M. I. Gibson, N. R. Cameron, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2007**, *45*, 2059–2072.
- [60] B. Voit, D. Appelhans, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 727–735.
- [61] R. Roy, M. Baek, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 291–309.
- [62] M. Ahmed, P. Wattanaarsakit, R. Narain, *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 3010–3033.
- [63] A. K. Bolsheborodova, Y. L. Sebyakin, *Macroheterocycles* **2012**, *5*, 203–211.
- [64] Y. M. Chabre, R. Roy, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1237–1285.
- [65] S. G. Spain, N. R. Cameron, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 60.
- [66] R. Sunasee, R. Narain, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 9–27.
- [67] C. S. Cho, S. J. Seo, I. K. Park, S. H. Kim, T. H. Kim, T. Hoshiba, I. Harada, T. Akaike, *Biomaterials* **2006**, *27*, 576–85.
- [68] B. Kim, I. Park, T. Hoshiba, H. Jiang, Y. Choi, T. Akaike, C. Cho, *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 238–268.
- [69] D. Rabuka, M. B. Forstner, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5947–53.
- [70] Y. M. Chabre, R. Roy, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1237–1285.
- [71] Y. Miura, *Polym. J.* **2012**, *44*, 679–689.
- [72] Y. Miura, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 5031–5036.
- [73] A. Narumi, T. Kakuchi, *Polymer Journal* **2008**, *40*, 383–397.
- [74] D. Bhadra, A. Yadav, S. Bhadra, N. Jain, *Int. J. Pharm.* **2005**, *295*, 221–233.
- [75] W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 231–255.
- [76] D. Appelhans, H. Komber, B. Voit, A. F. Thunemann, B. Brutschy, N. Morgner, S. Richter, R. Bienert, *Polymer Preprints* **2008**, *236*, 590–591.
- [77] K. Aoi, K. Itoh, M. Okada, *Macromolecules* **1995**, *28*, 5391–5393.
- [78] T. Pietsch, D. Appelhans, N. Gindy, B. Voit, A. Fahmi, *Colloids Surf. A* **2009**, *341*, 93–102.
- [79] A. Fahmi, T. Pietsch, D. Appelhans, N. Gindy, B. Voit, *New J. Chem.* **2009**, *33*, 703–706.
- [80] M. Fischer, D. Appelhans, S. Schwarz, B. Klajnert, M. Bryszewska, B. Voit, M. Rogers, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1314–1325.
- [81] B. Klajnert, D. Appelhans, H. Komber, N. Morgner, S. Schwarz, S. Richter, B. Brutschy, M. Ionov, A. Tonkikh, M. Bryszewska, B. Voit, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7030–7041.
- [82] M. Kubeil, H. Stephan, H. Pietzsch, G. Geipel, D. Appelhans, B. Voit, J. Hoffmann, B. Brutschy, Y. Mironov, K. Brylev, V. Fedorov, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 2507–2514.
- [83] N. Bogdan, R. Roy, M. Morin, *R. Soc. Chem. Adv.* **2012**, *2*, 985–991.
- [84] D. Appelhans, U. Oertel, R. Mazzeo, H. Komber, J. Hoffmann, S. Weidner, B. Brutschy, B. Voit, M. F. Ottaviani, *Proc. R. Soc. A* **2009**, *466*, 1489–1513.
- [85] S. M. Rele, W. Cui, L. Wang, S. Hou, G. Barr-Zarse, D. Tatton, Y. Gnanou, J. D. Esko, E. L. Chaikof, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10132–3.
- [86] O. Klementieva, N. Benseny-Cases, A. Gella, D. Appelhans, B. Voit, J. Cladera, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3903–9.
- [87] N. Hata, M. Kim, K. Isoda, M. Kino-Oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya, *J. Biosci. Bioeng.* **2004**, *97*, 233–238.

- [88] S. S. Diebold, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19087–19094.
- [89] K. Kunath, A. von Harpe, D. Fischer, T. Kissel, *J. Controlled Release* **2003**, *88*, 159–172.
- [90] S. Grosse, Y. Aron, I. Honore, G. Thevenot, C. Danel, A. Roche, M. Monsigny, I. Fajac, *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 345–356.
- [91] D. Appelhans, Y. Zhong, H. Komber, P. Friedel, U. Oertel, U. Scheler, N. Morgner, D. Kuckling, S. Richter, J. Seidel, B. Brutschy, B. Voit, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 373–83.
- [92] M. Warena, A. Richter, D. Schmidt, A. Janke, M. Muller, F. Simon, R. Zimmermann, K. J. Eichhorn, B. Voit, D. Appelhans, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 1466–1473.
- [93] A. F. Thunemann, R. Bienert, D. Appelhans, B. Voit, *Macromol. Chem. Phys.* **2012**, *213*, 2362–2369.
- [94] D. Gutsch, D. Appelhans, S. Hoebel, B. Voit, A. Aigner, *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 4666–4675.
- [95] M. Kraemer, N. Perignon, R. Haag, J. Marty, R. Thomann, N. Lauth-de Viguerie, C. Mingotaud, *Macromolecules* **2005**, *38*, 8308–8315.
- [96] A. Koeth, J. Koetz, D. Appelhans, B. Voit, *Colloid Polym. Sci.* **2008**, *286*, 1317–1327.
- [97] S. Boye, N. Polikarpov, D. Appelhans, A. Lederer, *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4841–9.
- [98] L. A. Kartsova, N. A. Polikarpov, *J. Anal. Chem.* **2012**, *67*, 190–197.
- [99] M. Castagnola, C. Zuppi, D. Rossetti, F. Vincenzoni, A. Lupi, A. Vitali, E. Meucci, I. Messana, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1769–1778.
- [100] P. Muijselaar, H. Claessens, C. Cramers, J. Jansen, E. W. Meijer, E. de Brabander-van den Berg, S. van der Wal, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1995**, *18*, 121–123.
- [101] Y. Pan, H. Bai, C. Ma, Y. Deng, W. Qin, X. Qian, *Talanta* **2013**, *115*, 842–848.
- [102] C. R. Becer, M. I. Gibson, J. Geng, R. Ilyas, R. Wallis, D. A. Mitchell, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15130–15132.
- [103] J. G. Kirchner, *J. Chromatogr. A* **1973**, *82*, 101–115.
- [104] E. Stahl, *J. Chromatogr.* **1979**, *165*, 59–73.
- [105] D. Shewiyo, E. Kaale, P. R., B. Dejaegher, J. Smeyers-Verbeke, Y. V. Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *66*, 11–23.
- [106] S. K. Poole, C. F. Poole, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2648–2660.
- [107] B. Renger, Z. Vegh, K. Ferenczi-Fodor, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2712–2721.
- [108] V. Srivastava, S. Dubey, S. B. Sharma, *World Journal of pharmacy and pharmaceutical science* **2012**, *1*, 525–531.
- [109] P. Jandera, *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1421–37.
- [110] A. J. Oko, S. R. Jim, M. T. Taschuk, M. J. Brett, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2661–7.
- [111] H. J. Issaq, *TrAC Trends Anal. Chem.* **1990**, *9*, 36–40.
- [112] A. Mohammad, A. Moheman, *TLC/HPTLC in Biomedical Applications*, English, (Hrsg.: M. Srivastava), Springer Berlin Heidelberg, **2011**, S. 151–178.
- [113] Z. Juvancz, J. Szejtli, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 379–388.
- [114] G. Oros, T. Cserhati, M. Szogyi, *Eur. Chem. Bull.* **2013**, *2*, 920–926.

- [115] S. Li, W. C. Purdy, *J. Chromatogr. A* **1992**, *625*, 109–120.
- [116] T. Shinbo, T. Yamaguchi, H. Yanagishita, D. Kitamoto, K. Sakaki, M. Sugiura, *J. Chromatogr. A* **1992**, *625*, 101–108.
- [117] M. Lederer, *J. Chromatogr. A* **1992**, *604*, 55–62.
- [118] M. Petro, D. Berek, *Chromatographia* **1993**, *37*, 549–561.
- [119] D. Kriz, C. Berggren Kriz, L. I. Andersson, K. H. Mosbach, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2636–2639.
- [120] R. Bakry, G. K. Bonn, D. Mair, F. Svec, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 486–93.
- [121] T. L. Chester, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 579–89.
- [122] B. L. Reuhs, M. Rounds, English in *Food Analysis*, (Hrsg.: S. S. Nielsen), Food Science Texts Series, Springer US, **2010**, S. 499–512.
- [123] A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 205–22.
- [124] H. Claessens, M. van Straten, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 23–41.
- [125] B. Mathews, A. Beezer, M. Snowden, M. Hardy, J. Mitchell, English, *Chromatographia* **2000**, *53*, 147–155.
- [126] S. Currivan, P. Jandera, *Chromatography* **2014**, *1*, 24–53.
- [127] W. J. Cheong, F. Ali, J. H. Choi, J. O. Lee, K. Y. Sung, *Talanta* **2013**, *106*, 45–59.
- [128] B. Sekhon, *J. Pharm. Educ. Res.* **2011**, *2*, 2–36.
- [129] P. Mikus, K. Marakova, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2773–802.
- [130] U. Pyell, *Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications*, (Hrsg.: U. Pyell), John Wiley & Sons, Ltd., **2007**, S. 552.
- [131] F. Tagliaro, G. Manetto, F. Crivellente, F. P. Smith, *Forensic Sci. Int.* **1998**, *92*, 75–88.
- [132] C. Schwer, E. Kenndler, English, *Chromatographia* **1990**, *30*, 546–554.
- [133] F. Mikkers, F. Everaerts, T. Verheggen, *J. Chromatogr. A* **1979**, *169*, 1–10.
- [134] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *J. Chromatogr. A* **1981**, *218*, 209–216.
- [135] S. El Deeb, M. A. Iriban, R. Gust, *Electrophoresis* **2011**, *32*, 166–83.
- [136] S. Rizvi, D. Dob, A. Saleh, *Eur. J. Chem.* **2011**, *2*, 276–281.
- [137] M. Silva, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 50–64.
- [138] M. Silva, *Electrophoresis* **2007**, *28*, 174–92.
- [139] S. Terabe, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 240a–246a.
- [140] C. P. Palmer, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 163–168.
- [141] C. P. Palmer, *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 783–793.
- [142] G. Guebitz, M. G. Schmid, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3981–96.
- [143] A. Amini, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3107–3130.
- [144] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111–113.
- [145] J. Haginaka, *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 12–19.
- [146] J. Haginaka, *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 235–254.
- [147] C. P. Palmer, *J. Chromatogr. A* **1997**, *780*, 75–92.

- [148] N. Tanaka, H. Iwasaki, T. Fukutome, K. Hosoya, T. Araki, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1997**, *20*, 529–538.
- [149] S. V. Jadhav, K. V. Marathe, *Can. J. Chem. Eng.* **2013**, *91*, 311–317.
- [150] R. Bade, S. Lee, *Journal of Water Sustainability* **2011**, *1*, 85–102.
- [151] O. A. Hande, P. C., L. Y., *J. Membr. Sci.* **2008**, *322*, 446–452.
- [152] M. A. Barakat, E. Schmidt, *Desalination* **2010**, *256*, 90–93.
- [153] S. Mimoune, R. E. Belazzougui, F. Amrani, *Desalination* **2007**, *217*, 251–259.
- [154] S. Islamoglu, L. Yilmaz, *Desalination* **2006**, *200*, 288–289.
- [155] C. O. Doganay, H. Oender Oezbelge, L. Yilmaz, N. Bicak, *Desalination* **2006**, *200*, 286–287.
- [156] P. Canizares, A. de Lucas, A. Perez, R. Camarillo, *J. Membr. Sci.* **2005**, *253*, 149–163.
- [157] B. Chaufer, A. Deratani, *Nucl. Chem. Waste Man.* **1988**, *8*, 175–187.
- [158] M. S. Diallo, S. Christie, P. Swaminathan, J. H. Johnson, W. A. Goddard, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1366–1377.
- [159] H. Ouni, M. Dhahbi, *Sep. Purif. Technol.* **2010**, *72*, 340–346.
- [160] R. Reis, A. Zydney, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 208–211.
- [161] H. Foerster, *UV/VIS Spectroscopy*, (Hrsg.: H. G. Karge, J. Weitkamp), Springer Berlin Heidelberg, **2004**, S. 337–426.
- [162] Y. Cohen, L. Avram, L. Frish, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 524–560.
- [163] C. S. Johnson, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 203–256.
- [164] J. S. Gounarides, A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1999**, *725*, 79–90.
- [165] H. Tompkins, E. Irene, *Handbook of Ellipsometry*, (Hrsg.: H. Tompkins, E. Irene), William Andrew, Inc. Springer-Verlag GmbH & Co. KG, **2005**.
- [166] R. M. . A. . Azzam in *Handbook of Optics - Volume II Devices , Measurements , and Properties*, (Hrsg.: M. Bass), McGraw-Hill , Inc., Second Edition, **1994**, Kap. 27, S. 27.1–27.27.
- [167] M. Kraemer, M. Kopaczynska, S. Krause, R. Haag, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 2287–2303.
- [168] R. F. W. Hopmann, G. P. Brugnoli, *Nature-New Biology* **1973**, *246*, 157–158.
- [169] P. Droessler, W. Holzer, A. Penzkofer, P. Hegemann, *Chem. Phys.* **2002**, *282*, 429–439.
- [170] R. W. Green, H. K. Tong, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4896–4900.
- [171] D. E. Metzler, E. E. Snell, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2431–2437.
- [172] A. K. Lunn, R. A. Morton, *The Analyst* **1952**, *77*, 718.
- [173] I. Ahmad, W. Hussain, A. A. Fareedi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1992**, *10*, 9–15.
- [174] K. Lewis, R. Archer, *Steroids* **1979**, *34*, 485–499.
- [175] H. K. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5441–5444.
- [176] A. Richter, A. Janke, S. Zschoche, R. Zimmermann, F. Simon, K. Eichhorn, B. Voit, D. Appelhans, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2105–2108.
- [177] B. Radhakrishnan, R. Ranjan, W. J. Brittain, *Soft Matter* **2006**, *2*, 386.
- [178] W. Stoeber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- [179] A. Duan, S. Xie, L. Yuan, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30*, 484–491.

- [180] Z. Zhang, Z. Wang, Y. Liao, H. Liu, *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1872–1878.
- [181] C. Nilsson, S. Birnbaum, S. Nilsson, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1168*, 212–224.
- [182] S. Gocan, *J. Chromatogr. Sci.* **2002**, *40*, 538–549.
- [183] J. D. Higgins, T. P. Gilmor, S. A. Martellucci, R. D. Bruce, H. G. Brittain in, (Hrsg.: H. G. Brittain), *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, Academic Press, **2001**, S. 265–300.
- [184] L. Geiser, Y. Henchoz, A. Galland, P. Carrupt, J. Veuthey, *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 2374–2380.
- [185] A. Llinas, J. C. Burley, K. J. Box, R. C. Glen, J. M. Goodman, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 979–83.
- [186] E. Bessonova, N. Polikarpov, V. Potolytsyna, S. Tripp, D. Appelhans, B. Voit, L. Kartsova, *J. Chromatogr. A* **2014**, *in submission*.
- [187] S. Magonov, V. Elings, M.-H. Whangbo, *Surf. Sci.* **1997**, *375*, L385–L391.
- [188] G. Beamson, D. Briggs, *High resolution XPS of organic polymers: The Scienta ESCA 300 database, Bd. 20*, (Hrsg.: J. F. Watts), John Wiley & Sons Ltd., **1993**, S. 267–267.
- [189] D. A. Shirley, *Phys. Rev. B* **1972**, *5*, 4709–4714.
- [190] J. Lin, J. A. Siddiqui, R. M. Ottenbrite, *Polym. Adv. Technol.* **2001**, *12*, 285–292.
- [191] L. Hansson, M. Glad, C. Hansson, *J. Chromatogr. A* **1983**, *265*, 37–44.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift