

Moderne Fraktioniermethoden zur Charakterisierung von verzweigten Polymeren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Ingenieurin (FH), Susanne Boye

geboren am 08.09.1983 in Staaken

Eingereicht am: 17.10.2012
Tag der Verteidigung: 09.01.2013

Gutachter:

Prof. Dr. Brigitte Voit

Prof. Dr. Kathrin Harre

*Meiner Familie
(Moritz, André und meinen Eltern)*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Symbolverzeichnis.....	3
1 Einleitung und Motivation	4
2 Stand der Technik.....	7
2.1 Verzweigte Polymere – Topologische Aspekte	7
2.2 Eigenschaften und Anwendungen von dendritischen Polymeren	8
2.3 Limitierungen in der Charakterisierung von verzweigten Polymeren.....	13
3 Separation von dendritischen, multifunktionellen Polymeren und Untersuchung zu nicht-kovalenten Wechselwirkungen mittels Feldflussfraktionierung	20
3.1 Grundlagen der Feldflussfraktionierung	20
3.2 Ergebnisse der Molmassenbestimmung eines hochverzweigten Polyesters	26
3.2.1 Aktuelle Problemstellungen bei der Molmassenbestimmung.....	26
3.2.2 Molmassenbestimmung der hvz, aPE.....	27
3.2.3 Konformationsuntersuchungen der hvz, aPE.....	33
3.3 Ergebnisse der Komplexierungsuntersuchungen von dendritischen Glykopolymeren	35
3.3.1 Beschreibung des Polymer-Farbstoff-Komplexes.....	35
3.3.2 Voruntersuchungen und Messmethodenoptimierung.....	38
3.3.3 Detektorkalibrierung und Durchführung von Reproduzierbarkeitstests	42
3.3.4 Stabilität der Lösungen und Einfluss eines nicht-komplexierten Polymers	43
3.3.5 Molmassenbestimmung der Glykopolymere	44
3.3.6 Komplexierungsstudien und Ergebnisverifizierung	48
3.4 Ergebnisse der Aggregationsstudien von dendronisierten Glykopolymeren	54
3.4.1 Notwendigkeit der Untersuchung des Aggregationsverhaltens.....	54
3.4.2 Synthese und NMR-Untersuchungen	56
3.4.3 Ergebnisse der SEC-Untersuchung der Prepolymere.....	59
3.4.4 Ergebnisse der AF4-Messmethodenentwicklung im Nitratpuffer	62

3.4.5	Verschiedene Einflussparameter auf die Molekülgröße	65
3.4.6	Betrachtung des Aggregationsverhaltens	71
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Feldflussfraktionierung	87
4	Phasendistributionschromatographie von verzweigten Polymeren.....	91
4.1	Grundlagen der Phasendistributionschromatographie	91
4.2	Ergebnisse der Auftrennung von sternförmigem und linearem Polystyren mittels Phasenverteilungschromatographie.....	93
4.2.1	Modifizierung und Charakterisierung der stationären Phase	93
4.2.2	Ergebnisse der manuellen PDC-Fraktionierung.....	99
4.2.3	Thermodynamische Untersuchung von Polystyren.....	102
4.2.4	Auftrennung von linearem und sternförmigem Polystyren	104
4.3	Zusammenfassung der Phasendistributionschromatographie	112
5	Fazit und Ausblick.....	114
6	Experimententeil	116
6.1	Materialien.....	116
6.2	Geräte und Methoden	119
A	Appendix.....	129
	Literaturverzeichnis	129
	Ergänzende Ergebnisse	136
	Danksagung	139
	Publikationsliste.....	140

Abkürzungsverzeichnis

AF4	asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>engl. Atomic Force Microscopy</i>)
a	voll-aromatisch
Boc	(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-Gruppe
BOP	Castros Reagenz (Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat)
CH	Cyclohexan
CRYSTAF	Kristallisationsfraktionierungsanalyse
D	dendritisch
DCM	Dichlormethan
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAc	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
F _f	Fokussierfluss
F _i	Injektionsfluss
F _k	Kanalfluss
F _x	Querfluss
FFF	Feldflussfraktionierung
FIB	fokussierter Ionenstrahl (<i>engl. Focused Ion Beam</i>)
G	Generation
HDC	Hydrodynamische Chromatographie
HDPE	Polyethylen mit hoher Dichte (<i>engl. High Density Polyethylene</i>)
hvz	hochverzweigt
ICPMS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasma (<i>engl. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
inj.	injiziert
L	linear
LDPE	Polyethylen mit niedriger Dichte (<i>engl. Low Density Polyethylene</i>)
LS	Lichtstreuung
IPS	lineares Polystyren
IPS _{fl}	lineares Polystyren mit Fluorescein-Markierung
M	Molmasse
Mal	maltosemodifiziert

MALLS	Vielwinkellichtstreuung (<i>engl. Multi Angle Laser Light Scattering</i>)
MD	molekulardynamisch
MI	Maleimid
N _{Agg}	Aggregationszahl
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>engl. Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PAMAM	Poly(amidoamin)
PDC	Phasendistributionschromatographie
PE	Polyester
PEEK	Poly(etheretherketon)
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEI	Poly(ethylenimin)
PES	Poly(ethersulfon)
PPI	Poly(propylenimin)
PS	Polystyren
Pt	Platin
R	Rest
RB	Rose Bengal
RI	Brechungsindex (<i>engl. Refractive Index</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SAXS	Kleinwinkelröntgenstreuung (<i>engl. Small Angle X-Ray Scattering</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>engl. Size Exclusion Chromatography</i>)
siRNS	kurze, interferierende Ribonukleinsäure (<i>engl. small interfering</i>)
SPLITT	Split Flow Thin Cell Fractionation
sPS	sternförmiges Polystyren
T	terminal
TEA	Triethylamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TFA	Trifluoressigsäure (<i>engl. trifluoroacetic acid</i>)
TGA	Thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
UHPS	ultrahochmolekulares Polystyren
UV	Ultraviolett
V _E	Elutionsvolumen
WW	Wechselwirkungen

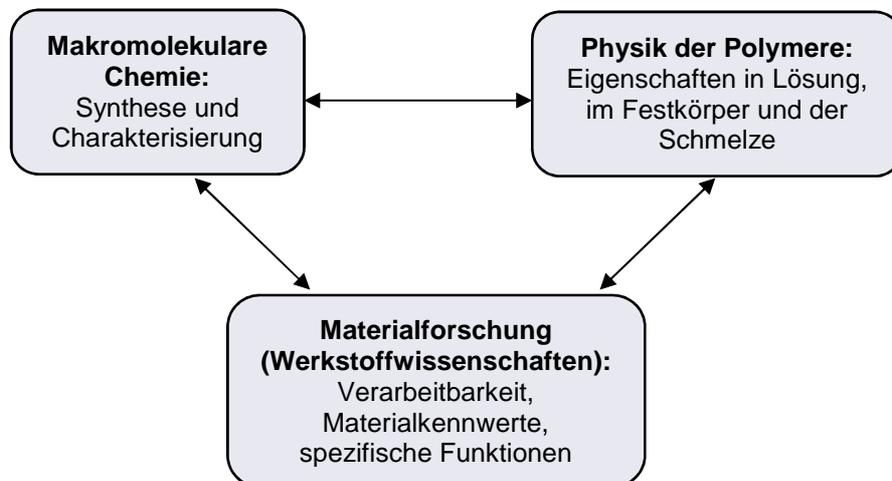
Symbolverzeichnis

c	Probenkonzentration
D	Diffusionskoeffizient
\bar{D}	Dispersität (M_w/M_n)
DB	Verzweigungsgrad (<i>engl. Degree of Branching</i>)
d_f	fraktale Dimension
D_h	Hydrodynamischer Durchmesser
dn/dc	Brechungsindexinkrement
g	Kontraktionsfaktor
η	dynamische Viskosität
$[\eta]$	intrinsische Viskosität, Grenzviskosität
h	Kanalhöhe
k_B	Boltzmann-Konstante
K	Detektorkonstante
λ	Wellenlänge
M_n	zahlenmittlere Molmasse
M_w	gewichtsmittlere Molmasse
ν	Scalingfaktor
n	Stoffmenge
n_0	Brechungsindex
N_A	Avogadro-Konstante
P_n	Polymerisationsgrad
ρ	rho-Parameter (R_g/R_h)
ρ_{app}	scheinbare Dichte (<i>engl. apparent density</i>)
R_θ	Rayleigh-Verhältnis bzw. Streuintensität
R_g	Trägheitsradius
R_h	hydrodynamischer Radius
θ	Theta
T	Temperatur
t_r	Retentionszeit
t_t	Totzeit
V_t	Totvolumen
V_h	hydrodynamisches Volumen

1 Einleitung und Motivation

In Zeiten der Verknappung natürlich vorkommender Rohstoffe stellen Polymere geeignete, alternative Ersatzstoffe dar. In ihrer Nutzung sind Sie schon heute allgegenwärtig und ihre Weiterentwicklung ist ein wichtiger Forschungsgegenstand. Ob in natürlichen Makromolekülen, wie z. B. in Form des menschlichen Erbgutes, oder in alltäglichen industriellen Produkten, wie Kunststoffen mit unzähligen und auf die jeweilige Nutzung optimierten Eigenschaften, kommen wir mit Polymeren immer wieder in Kontakt.

In der heutigen Zeit ist der sinnvolle Einsatz von Energieressourcen zur Herstellung und Verarbeitung von Polymeren ein wichtiges Thema. Um die Verarbeitungs- und Endeigenschaften zu verbessern und die Synthesen effizienter zu gestalten, ist die Polymeranalytik das wichtigste Werkzeug. Sie bildet dabei die Basis der Betrachtung der Wechselwirkungen von Struktur und Eigenschaften und beleuchtet diese komplexen Zusammenhänge von der Synthese über die Charakterisierung bis hin zur Verarbeitung (siehe Schema 1-1).



Schema 1-1: Struktur-Eigenschafts-Beziehung von Polymeren

Als repräsentatives Beispiel sei an dieser Stelle das Polyethylen aus der Klasse der Polyolefine genannt. Dieses ist mit einem Weltmarktanteil der gesamten Kunststoffproduktion von 29 % und 80 Millionen Tonnen pro Jahr das Material, welches am meisten produziert wird.¹ Durch Variation der Synthesebedingungen und Katalysatorauswahl kann im Fall des Polyethylens Einfluss auf die Verzweigungsstruktur genommen werden. Während HDPE (High Density Polyethylene) kaum oder nur

geringe Verzweigungen aufweist, ist die Struktur des LDPE (Low Density Polyethylene) durch eine hohe Anzahl an Verzweigungen charakterisiert.² Die Einführung von Verzweigungen führt immer zur Veränderung der rheologischen Eigenschaften. Im Fall von Polyethylen ändern sich die Material- und Verarbeitungseigenschaften mit zunehmender Verzweigungsstruktur von einer vorwiegend kristallinen, kompakten Struktur (HDPE) bis hin zu teilkristallinen Eigenschaften mit geringerer Dichte (LDPE) sowie einer verringerten Viskosität. Eine umfassende Charakterisierung ist daher von grundlegender Bedeutung. Aber nicht nur technische Produkte liefern die Notwendigkeit zur genauen Verzweigungscharakterisierung. So steht z. B. auch die Stärke als natürliches, verzweigtes Polymer durch ihre Bedeutung in der Ernährung im Fokus der Forschung. Hierbei spielt die Verzweigung eine große Rolle unter anderem beim Einfluss auf ernährungsbedingte Fehlregulationen wie Diabetes oder Übergewicht.³

Eigenschaftsverteilungen spielen bei Polymeren eine besondere Rolle. Speziell die Molmassenverteilung übt je nach Verteilungsbreite einen großen Einfluss auf die Polymereigenschaften, wie z. B. die Löslichkeit, die Viskosität als auch auf das Strukturverhalten in Lösung aus. Aufgrund der statistischen Natur der (Bio-)Synthese und der daraus resultierenden multidimensionalen Verteilungen ist die eingehende Molmassen- und Verzweigungscharakterisierung bzw. Auftrennung der erwähnten und anderer verzweigter, komplexer Makromoleküle auch heute noch eine große Herausforderung.⁴ Etablierte Methoden, wie die häufig angewandte Größenausschlusschromatographie (SEC, *engl. Size Exclusion Chromatography*) zur Bestimmung der Molmassen bzw. deren Verteilungen, geraten hierbei aufgrund der Verzweigungen der Polymere und der daraus resultierenden Eigenschaften an ihre Grenzen. Da die SEC hinsichtlich der Molekülgröße auftrennt, kann es hier zur Co-Elution von Polymeren mit multidimensionalen Verteilungen in beispielsweise Molmasse und Verzweigungsgrad kommen. Weiterhin ist mit enthalpischen Trenneffekten, wie z. B. Adsorption, zu rechnen, die durch die hohe Anzahl von funktionellen Gruppen hervorgerufen werden. Die Diskussion und Interpretation der erhaltenen Ergebnisse bereitet somit häufig Schwierigkeiten. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung bestehende Methoden weiterzuentwickeln oder zu adaptieren bzw. neue Methoden zu erforschen, mit denen eine genaue Auftrennung und Charakterisierung von verzweigten Polymeren möglich ist.

Die Motivation dieser Arbeit liegt darin, verzweigte, multifunktionelle Polymere zu charakterisieren, deren SEC-Untersuchungen und Molmassenbestimmung durch die

zunehmende Komplexität der Struktur, unterschiedliche Verzweigungsdichten sowie auftretende Aggregationen und Komplexbildungen erschwert wird. Für eine eingehende Charakterisierung sollen im Rahmen dieser Arbeit Alternativmethoden angewandt werden.

Die Probleme von verzögerter Elution aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial, von Konformationsunterschieden im Vergleich zu Standardpolymeren bzw. von Molmassenlimitierungen sollen anhand von systematischen Untersuchungen studiert werden. Dazu dient die Methode der Feldflussfraktionierung (FFF), bei der ohne eine stationäre Phase eine Auftrennung mit Hilfe eines externen Trennfeldes verursacht wird und somit enthalpische Trenneffekte ausgeschlossen werden können. Um die universelle Anwendbarkeit der asymmetrischen Flussfeldflussfraktionierung (AF4) zu evaluieren, werden dabei verschiedene Anwendungen näher betrachtet. Bei diesen Untersuchungen stehen besonders die Größenbestimmung von multifunktionellen, hochverzweigten Polyestern sowie dendritischen Glykopolymeren und deren Assoziationsverhalten in Folge von nichtkovalenten Wechselwirkungen im Vordergrund.

Um das Problem der Co-Elution von unterschiedlichen Verzweigungsgraden zu lösen, soll eine Weiterentwicklung bzw. Adaption der Phasendistributionschromatographie (PDC) dienen, bei der eine Trennung auf Unterschieden in thermodynamischen Eigenschaften, wie z. B. Löslichkeit, beruht. Hierbei soll erstmals mittels PDC sternförmiges und lineares Polystyren voneinander separiert und die Trennung in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern wie Temperatur, Molekülgröße sowie Armzahl der Sterne untersucht werden.

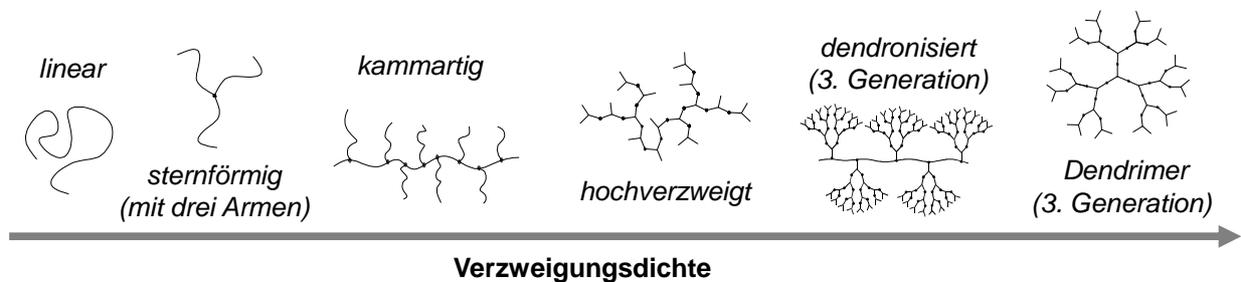
Die Zielstellung dieser Arbeit beinhaltet, die Größenbestimmung von verzweigten, multifunktionellen Polymeren mittels AF4 und PDC als Alternativen zur SEC zu untersuchen, darzustellen und zu erörtern. Der Hauptteil der Arbeit besteht hierbei aus Methodenentwicklung, bei der Zusammenhänge zwischen verschiedenen Faktoren und deren Einflüsse dargestellt werden. Die gewonnenen Ergebnisse sollen dabei durch weitere komplementäre, spektroskopische und mikroskopische sowie Lichtstreuungsmethoden gestützt und verifiziert werden.

2 Stand der Technik

2.1 Verzweigte Polymere – Topologische Aspekte

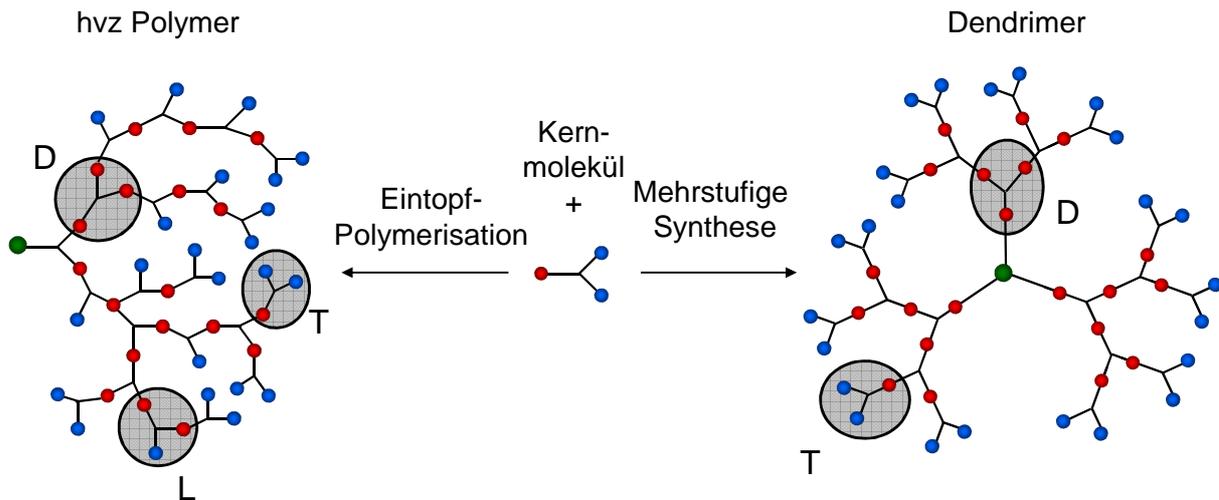
Generell können Polymere in vier verschiedene Strukturklassen eingeteilt werden. Neben dem Hauptanteil der linearen Polymere, bilden auch vernetzte und verzweigte sowie dendritische Makromoleküle wichtige Topologieklassen.

In Abhängigkeit der Verzweigungsdichte ist in Schema 2-1 ein Vergleich der verschiedenen Verzweigungstopologien abgebildet. Bei Polymeren mit einer geringeren Verzweigungsdichte, wie z. B. den sternförmigen oder kammartigen Polymeren, wird eine zusätzliche Unterscheidung zwischen Lang- und Kurzkettenverzweigung eingeführt, welche durch die jeweilige Dichte der Verzweigungspunkte definiert ist.⁵



Schema 2-1: Topologische Einteilung von Polymeren hinsichtlich der Verzweigungsdichte

Zur Klasse der dendritischen Polymere gehören sowohl hochverzweigte (hvz) und dendronisierte Polymere als auch Dendrimere. Während Dendrimere durch einen radialsymmetrischen, perfekten Strukturaufbau mit regelmäßiger Folgeverzweigung (Generationen) gekennzeichnet sind, bestehen hvz Polymere aufgrund der statistischen Natur ihrer Synthesereaktion aus einer baumartigen Struktur mit unregelmäßiger Verzweigung (Schema 2-2). Dendronisierte Polymere nehmen hierbei einen Sonderstatus ein. Sie bestehen aus einem linearen Rückgrat, an welches Dendrone mit perfekter Verzweigung in variabler Generationszahl angekoppelt sind.



Schema 2-2: Vergleich eines hochverzweigten Polymers und eines Dendrimers (3. Generation) aus struktureller und synthetischer Sicht mit Bezeichnung der funktionellen Einheiten

Erstmals von Flory 1952 beschrieben⁶ stellen die dendritisch aufgebauten Makromoleküle seit rund 30 Jahren eine wichtige Sparte in der Polymerforschung und Kunststoffindustrie dar und das Interesse steigt stetig an.^{4, 7-9} Der spezielle Aufbau von dendritischen Polymeren führt bei höheren Molmassen, im Vergleich zu linearen Polymeren, zu einer sehr kompakten Topologie und zu veränderten Eigenschaften. Sie bilden daher eine Brücke zwischen Polymeren und Kolloiden.¹⁰ Hinzu kommt die sehr hohe Anzahl von funktionellen Endgruppen.

2.2 Eigenschaften und Anwendungen von dendritischen Polymeren

Für die Verwendung von dendritischen Polymeren für industrielle Belange ist die Struktur-Eigenschafts-Beziehung von grundlegender Bedeutung. Hierbei spielen Monomerstruktur, Molmasse, Verzweigungsgrad und Art der funktionellen Endgruppen eine bedeutende Rolle, da durch diese Parameter die Eigenschaften gezielt verändert und optimiert werden können.

Die Betrachtung des Verzweigungsgrades, als einer der wichtigsten Eigenschaftsparameter für dendritische Polymere erfolgte erstmals 1953 in den theoretischen Betrachtungen von Flory¹¹ mit der Einführung des Verzweigungskoeffizienten, welcher die Wahrscheinlichkeit einer Verbindung von zwei Verzweigungseinheiten angibt. Mit den Definitionen von Fréchet¹² im Jahr 1991 bzw. 1992 von Kim und Webster¹³

(Gleichung 2-1) ist es möglich, die dendritischen Polymere hinsichtlich der Dichte und Anzahl der Verzweigungen zu charakterisieren und zu klassifizieren.

$$DB_{\text{Fréchet}} = \frac{D+T}{D+T+L} \quad \text{Gleichung 2-1}$$

Die Berechnung des Verzweigungsgrades (DB) basiert auf dem Verhältnis der Summen von dendritischen (D) und terminalen (T) Einheiten bzw. der Summe aller strukturellen Einheiten inklusive der linearen (L) Einheiten. Da diese Gleichung jedoch für geringe Molmassen zu einer Überschätzung der terminalen Einheiten und demzufolge zu einem verfälschten DB führt, schlug Frey¹⁴ folgende Gleichung vor:

$$DB_{\text{Frey}} = \frac{2D}{2D+L} \quad \text{Gleichung 2-2}$$

Hier wird der Einfluss der terminalen Gruppen korrigiert. Die Gleichung von Frey ist somit besser für ein breites Spektrum von Molmassen geeignet. Bei linearen Polymeren ist der Verzweigungsgrad folglich 0. Für Dendrimere nimmt er definitionsgemäß durch das charakteristische Fehlen der linearen Einheiten in jedem Fall den Wert 1 bzw. 100 % an. Im Fall von ideal statistischem Wachstum von hochverzweigten Polymeren vom Typ AB₂ liegt das Verhältnis von terminalen, linearen und dendritischen Einheiten bei 1:2:1 und der DB demnach bei 0,5 bzw. 50 %. Um den DB zu bestimmen, werden üblicherweise die Intensitäten der jeweiligen, strukturellen Einheiten aus den Signalen der Kernresonanzspektroskopie (NMR) verwendet. Jedoch ist es mit dieser Bestimmungsmethode nur möglich Mittelwerte des Verzweigungsgrades eines Polymers zu bestimmen.

Bei hochverzweigten Polymeren steht das Zusammenspiel von chemischer Struktur, Endgruppenfunktionalität und globularer, meist sehr kompakter Molekülform im Vordergrund. Daher sind sie sehr interessant für Anwendungen der Wirkstoffverkapslung (siehe Kapitel 3.2.1) und für therapeutische Zwecke.¹⁵⁻¹⁷ Der größte Vorteil dendritischer Makromoleküle liegt im Vergleich zu linearen Polymeren in der hohen Anzahl der funktionellen Gruppen und der damit verbundenen unzähligen Modifizierungsmöglichkeiten zur gezielten Veränderung der Eigenschaften. So ist es unter anderem möglich einen amphiphilen Charakter für die Verwendung als Nanokapseln gezielt einzustellen.^{18, 19} Ferner können hochverzweigte Polymere aufgrund der Multifunktionalität als Vernetzer oder Härter in Thermosets eingesetzt werden.^{20, 21}

Im Vergleich zu ihren linearen Analoga bilden dendritische Polymere keine intramolekularen Verschlaufungen und sind aus diesem Grund durch eine verringerte Schmelz- bzw. Lösungsviskosität charakterisiert. Aufgrund dessen sind sie im Bulkzustand zusätzlich mit einer hohen Sprödigkeit behaftet. Nur bedingt als Massenpolymere zur industriellen Verarbeitung geeignet, werden hochverzweigte Polymere demnach häufig als Additive z. B. in Coatings oder Harzen verwendet.^{22, 23}

Die Synthese der hvz Polymere^{12, 24} erfolgt in einem Einstufenprozess über Polyaddition, Polykondensation oder radikalische Polymerisation einer multifunktionellen AB_x -Monomereinheit ($x \geq 2$) oder Kombination von bi- und multifunktionellen Monomeren und ist somit in den meisten Fällen zeit- und kostensparend. Durch die Reaktion der funktionellen Gruppen mit weiteren AB_x -Monomeren entstehen statistisch verzweigte Polymere, die in ihrer komplexen Struktur auch lineare Einheiten aufweisen. Ebenso ist die statistische Synthesenatur dafür verantwortlich, dass hvz Polymere durch multidimensionale Verteilungen sowohl hinsichtlich der Molmassen als auch der Verzweigungen charakterisiert sind.^{25, 26}

Neben den erwähnten topologischen Eigenschaften unterscheiden sich hochverzweigte Polymere und Dendrimere hauptsächlich durch die Art und Komplexität der Synthese. Um Dendrimere darzustellen, gibt es verschiedene Synthesewege, die zu der regelmäßig verzweigten, symmetrischen Dendrimerstruktur führen. So bekanntermaßen:

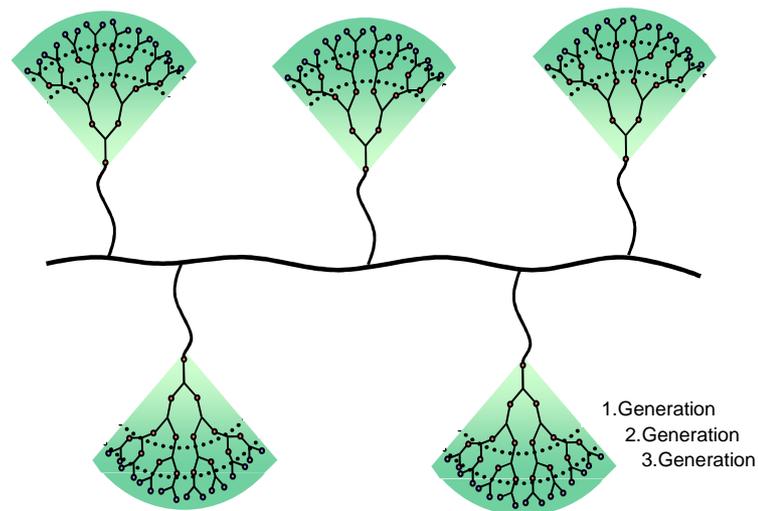
- die divergente Route²⁷⁻²⁹, bei der schrittweise nacheinander die Generationen vom Kernmolekül ausgehend, dargestellt werden oder
- die konvergente Route³⁰⁻³², bei der zuerst die einzelnen Verzweigungsarme (Dendrone) aufgebaut und anschließend an das multifunktionelle Kernmolekül gebunden werden.

Die zeitintensiven, aufwendigen Syntheseschritte führen dazu, dass die Kosten für Dendrimere im Vergleich zu hvz Polymeren sehr hoch sind. Nur sehr wenige Unternehmen vertreiben Dendrimere derzeit kommerziell, wie z. B. *Polymer Factory* (Schweden) oder *Dendritec* (USA). Trotzdem sind diese strukturell anspruchsvollen Polymere sehr interessant für eine Vielzahl von Spezialanwendungen. Die Areale mit geringerer Dichte (Kavitäten) innerhalb der globularen Dendrimerstruktur werden zur Verkapselung angewandt. Dabei geht es z. B. um die Verwendung als Katalysatorsysteme^{33, 34} durch die Verkapselung von Nanopartikeln oder um Applikationen als

„dendritische Boxen“^{35, 36} im biomedizinischen Bereich für die gezielte Freisetzung von Wirkstoffen.³⁷⁻³⁹ Weiterhin sind Dendrimere für den optoelektronischen^{40, 41} sowie biosensorischen Bereich z. B. für die Herstellung von Gassensoren^{42, 43} interessant. Für Anwendungen im Bereich der Gentherapie werden Dendrimere auch aufgrund ihrer Fähigkeit, Erbmaterial in Form von DNS zu binden und zu transportieren, eingesetzt.^{44, 45}

Ein entscheidender Nachteil neben den hohen Kosten bei der Synthese von Dendrimeren ist die Limitierung hinsichtlich der Molmasse aufgrund sterischer Beeinträchtigungen und Rückfaltungsphänomenen durch die sehr hohe Moleküldichte bei steigender Anzahl an Generationen (*engl. „starburst limiting generation“*). Theoretische Betrachtungen von De Gennes sagen eine maximale Generationenzahl von 12 voraus, bei der Verzweigungsvorgänge nicht mehr ideal ablaufen können und eine dichteste molekulare Packung („dichte Schale“-Modell, *engl. dense-shell*) erreicht sein soll.⁴⁶ Dem gegenüber stehen die Aussagen von Lescanec und Muthukumar, die den gegenteiligen Segmentdichteverlauf („dichter Kern“-Modell, *engl. dense-core*) postulierten,⁴⁷ welcher in Modellversuchen und an realen Dendrimeren mittels Kleinwinkelneutronenstreuexperimenten bestätigt wurde.¹⁰

In der Praxis ist es jedoch bisher nur gelungen, Poly(amidoamin)-(PAMAM)-Dendrimere mit einer maximalen Anzahl von 10 Generationen zu synthetisieren.⁴⁸ Bei anderen Dendrimerestrukturen treten Probleme wie Zyklisierungen, Fehlstellen und sehr geringe Ausbeuten schon bei niedrigeren Generationenzahlen auf, so z. B. bei Poly(propylenimin)-(PPI) Dendrimeren ab der fünften⁴⁹ und bei Poly(ethylenimin)-(PEI)-Dendrimeren sogar schon ab der dritten Generation.³² Um die Molmassenlimitierung zu umgehen und trotzdem die gewünschten Eigenschaften, wie z. B. die Multifunktionalität zu erhalten, bilden dendronisierte Polymere^{50, 51} eine Alternative, die formell gesehen eine Kombination aus Kamm- und dendritischen Polymeren darstellt. Die Idee hierbei beruht auf der Kombination von einem linearem Rückgrat und einzelner Dendrone, um die Dichte der funktionellen Gruppen zu erhöhen (siehe Schema 2-3).⁵²



Schema 2-3: Schematischer Aufbau eines dendronisierten Polymers mit drei Generationen gekoppelt an ein lineares Rückgrat

Es gibt verschiedene Möglichkeiten dendronisierte Polymere zu synthetisieren,⁵³ so z. B. mittels der *grafting-to* (konvergent)⁵⁴ oder *grafting-from* (divergent)⁵⁵ Strategie als auch über die Makromonomerroute mittels Kettenwachstums⁵⁶ oder Stufenpolymerisation⁵⁷. Durch das komplexe Zusammenspiel von Generationenzahl und Abstand der Dendrone bzw. Größe und Flexibilität des Rückgrates eröffnen sich unzählige Möglichkeiten, welche die dendronisierten Polymere für diverse Applikationen interessant machen. Ebenso wie bei den Dendrimeren liegt der Fokus der Forschung in der Anwendung für biomedizinische Fragen.³⁹ Weiterhin können dendronisierte Polymere beispielsweise dafür verwendet werden, um hierarchische Strukturen im Nanometer-Bereich („*nanoscopic building blocks*“) zu formieren. Als amphiphile Systeme sind sie unter anderem interessant für den Einsatz als Modellverbindungen z. B. für Proteine⁵⁸ sowie selbst-anordnende Aggregate für Untersuchungen an Grenzflächen.⁵⁹ Weiterhin können sie als optisch aktive Polymere zur Verwendung als chirale Katalysatoren angewandt werden.⁶⁰

Ein Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von dendritischen Glykopolymeren. Da Zuckerverbindungen eine Schlüsselrolle bei biologischen Prozessen z. B. als Vermittler in Zellwänden bei Entzündungen, Befruchtungen oder Immunabwehr⁶¹ zukommt, sind sie für eine Vielzahl von Anwendungen von großem Interesse. Der größte Vorteil gegenüber anderen synthetischen Polymeren liegt in ihrer Biokompatibilität und reduzierten Toxizität. Aus diesem Grund rücken pharmazeutische und (bio)-medizinische Applikationen von Glykopolymeren mit unterschiedlicher Topologie beispielsweise als Detergenzien, zur

gezielten Wirkstofffreisetzung bzw. -transport, als Impfstoffe auf der Basis von Kohlenhydraten, zur molekularen Wiedererkennung oder als Gerüstmaterialien für Gewebezüchtungen („tissue engineering“) sowie bei selektiven Zellanbindungen immer häufiger in den Vordergrund.⁶²⁻⁶⁵ Durch ihre Kern-Schale-Architektur mit dem hydrophoben Inneren und der hydrophilen äußeren Hülle ist es dendritischen Glykopolymeren möglich, in wässrigen Medien hydrophobe Bestandteile aufzulösen.⁶⁶ Weiterhin bilden sie durch ihren flexiblen Kern, die starre Schale und Hohlräume in der globulären Struktur beste Voraussetzungen für die Aufnahme von Gastmolekülen,^{35, 67} für die Bildung von Glykopolymer-DNS bzw. –siRNS-Komplexen⁶⁸ sowie Komplexen mit Metallionen⁶⁹. Diese Fähigkeit Gast-Wirt-Komplexe auszubilden wird infolgedessen für die gezielte Pharmakotherapie („drug-delivery“) bzw. Wirkstofffreisetzung am Zielort erforscht. Dabei soll gewährleistet sein, Wirkstoffe vor aggressiven Umgebungsmedien bzw. Organismen vor toxischen Wirkstoffen zu schützen. Gleichzeitig spielen Faktoren wie Stabilität des Gast-Wirt-Komplexes bzw. Freisetzung des Gastes, Biokompatibilität, zelluläre Aufnahme und Toxizität des Grundgerüsts eine wichtige Rolle.

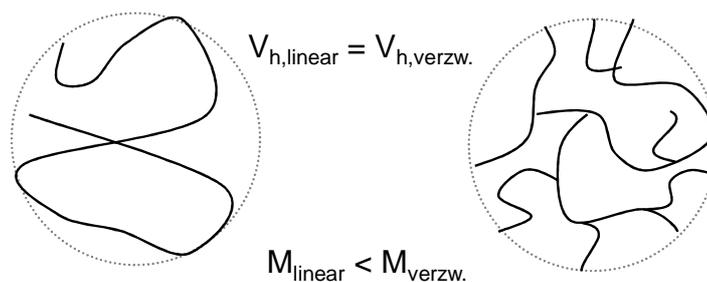
Das Design und die synthetische Herstellung von sehr großen Glykopolymerstrukturen (Molmasse > 1000 kDa) ist ein bisher kaum untersuchtes Forschungsgebiet mit vielversprechenden Möglichkeiten. Speziell dendronisierte Glykopolymere besitzen verschiedenste molekulare Formen, wie z. B. Knäuel-, Stäbchen-, wurmartige oder sphärische Strukturen. Über dendronisierte Strukturen, welche mit Polylysin als Rückgrat⁷⁰ bzw. als Dendrone⁷¹⁻⁷³ aufgebaut sind, gibt es bisher wenige Arbeiten. Trotzdem besteht großes Interesse an diesen Strukturen und deren Applikation unter anderem als Wirkstoffträger^{74, 75}, antimikrobielle Substanzen⁷⁶ oder Gentransfer-Agenzien.^{77, 78}

2.3 Limitierungen in der Charakterisierung von verzweigten Polymeren

Trotz des großen Interesses an verzweigten Polymeren, welche in den meisten Fällen multidimensionale Verteilungen aufweisen, sind die Charakterisierungsmethoden heutzutage noch unzureichend.

Zur Charakterisierung der Molmassenverteilung von Polymeren wird standardmäßig die Größenausschlusschromatographie eingesetzt. Die verwendeten Trennsäulen bestehen aus einem porösen Gel, wodurch die Auftrennung der Moleküle hinsichtlich des hydrodynamisch wirksamen Volumens in Lösung stattfindet. Je nach Molekülgröße

diffundieren die Polymere unterschiedlich oft in die Poren der stationären Phase und definieren somit das messbare Elutionsvolumen.⁵ Die Kalibrierung mit geeigneten Polymerstandards ermöglicht eine relative Korrelation von Molmasse und Elutionsvolumen bei Einsatz eines konzentrationssensitiven Detektors wie z. B. Brechungsindex(RI-) oder Ultraviolettabsorptions(UV-)-Detektoren. Mit Hilfe des Chromatogramms der unbekannt Probe und des Kalibrationsstandards können die Molmassenverteilungen und –mittelwerte von Polymeren ermittelt werden. Da die Trennung hinsichtlich des hydrodynamischen Volumens und nicht nach Molmasse stattfindet, tritt das Problem auf, dass die Kalibrierungen zum einen substanzspezifisch und zum anderen für verzweigte Polymere ungeeignet sind.⁷⁹ Da verzweigte Makromoleküle bei vergleichbarem hydrodynamischen Volumen (V_h) eine höhere molekulare Dichte aufweisen als lineare (siehe Schema 2-4), wird die Molmasse (M), welche durch die Standardkalibrierung erhalten wird, unterschätzt.



Schema 2-4: Strukturvergleich eines linearen und verzweigten Polymers mit gleichen hydrodynamischen Volumina jedoch unterschiedlichen Molmassen

Das Verhalten von verzweigten Polymeren wird häufig durch die Verringerung der Moleküldimensionen beschrieben. Hierbei wird die Abnahme des Trägheitsradius (R_g) oder der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ eines verzweigten Polymers relativ zum linearen Polymer gleicher Molmasse ermittelt (siehe Gleichung 2-3 und Gleichung 2-4).

$$g = \frac{R_{g,verz.}^2}{R_{g,linear}^2} \quad \text{Gleichung 2-3}$$

$$g' = \frac{[\eta]_{verz.}}{[\eta]_{linear}} \quad \text{Gleichung 2-4}$$

Da jedoch bisher keine geeigneten verzweigten Polymerstandards verfügbar sind, ist die Applikation der relativen Methode einer Standardkalibrierung für verzweigte Polymere ungeeignet.

Diese Probleme haben dazu geführt, dass sich in den letzten Jahren die SEC in Kombination mit Lichtstreu- und Viskositätsdetektion etabliert hat. Hierbei werden im Anschluss an die Auftrennung der Moleküle innerhalb der Säule, Fraktionen der Probe als monodispers angesehen und online mit dem Lichtstredetektor hinsichtlich der Molmasse und Trägheitsradius bzw. mit dem Viskositätsdetektor hinsichtlich der intrinsischen Viskosität charakterisiert.

Die Grundlage der Lichtstredetektion von Polymerlösungen bildet das Prinzip der statischen Lichtstreuung, bei der die Streuintensität in Form des Rayleigh-Verhältnis R_θ abhängig von der Probenkonzentration c , von der Molmasse M_w und dem Brechungsindexinkrement dn/dc ist (siehe Gleichung 2-5 und Gleichung 2-6).⁸⁰⁻⁸⁵

$$R_\theta = \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2 \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda_0^4 \cdot N_A} \cdot c \cdot M_w \quad \text{Gleichung 2-5}$$

$$R_\theta = K \cdot c \cdot M_w \quad \text{Gleichung 2-6}$$

Mit dieser absoluten Molmassenbestimmung lassen sich Polymere untersuchen, für die keine geeigneten Standards zur Verfügung stehen. Weiterhin können mit diesen Methoden Informationen über die Struktur der Moleküle in Lösung gewonnen werden, welche die Grundlage für das Verständnis der Struktur-Eigenschafts-Beziehungen bilden.

Mit der Kombination aus statischer und dynamischer Lichtstreuung ist es möglich Aussagen über das Verhältnis von:

$$R_g/R_h = \rho \quad \text{Gleichung 2-7}$$

zu treffen. Der ρ -Parameter ist abhängig von der Molekülstruktur in Lösung und ist demzufolge ein nützlicher Eigenschaftsparameter in der Polymercharakterisierung. Eine Auswahl von ρ -Parametern wurde von Burchard^{86, 87} zusammengestellt. Dabei gilt unter anderem für harte Kugeln $\rho = 0,778$, für statistische Knäuel in gutem Lösungsmittel $\rho = 2,05$ und für natürliche Polymere mit höheren ρ -Werten eine stäbchenartige Form.

Eine weitere Möglichkeit der LS-Detektion zur Konformationsaufklärung liegt in der Betrachtung des Scaling-Verhaltens und der fraktalen Dimensionen. Dazu werden die Molmassen in Abhängigkeit der Trägheitsradien im sogenannten Konformationsplot betrachtet. Ausgangspunkt ist dabei folgende Gleichung:

$$R_g = KM^\nu$$

Gleichung 2-8

Hierbei ist K der Schnittpunkt mit der Ordinate und der Scaling-Faktor ν wird charakterisiert durch den Anstieg der jeweiligen doppelt logarithmischen Auftragung der M_w vs. R_g –Beziehung, des Konformationsplots. Dieser gibt Informationen über die Polymerstruktur im jeweiligen Lösungsmittel. Der Scaling-Faktor kann dabei von $\nu = 0,33$ für harte Kugeln bis hin zu $\nu = 1,0$ für starre Stäbchen variieren. Lineare, kettenförmige Moleküle nehmen bei θ -Bedingungen den Wert $\nu = 0,5$ an und für gute Lösungsmittel gilt $\nu = 0,588$.^{5, 84, 87}

Um die geometrischen Eigenschaften der Moleküle mathematisch auszudrücken, wird zusätzlich die fraktale Dimension d_f zur Betrachtung herangezogen, welche wie folgt definiert ist:

$$d_f = 1/\nu$$

Gleichung 2-9

Mit dem Wert von d_f wird es ermöglicht, ein besseres Bild der Moleküle in Form eines mathematischen Faktors zu erhalten. So wird für kugelförmige Moleküle ein Wert von $d_f = 3$, für flache Scheiben $d_f = 2$ und demzufolge für Stäbchen $d_f = 1$ angegeben. Bei Makromolekülen gelten dabei besondere Regeln. Je besser das Lösungsmittel ist, desto besser durchspült bzw. desto ausgedehnter werden die Polymere. In diesem Fall jedoch wird d_f kleiner. Im Gegensatz dazu kommt es bei verzweigten Polymeren zu einer Erhöhung von d_f .⁸⁸ Für Dendrimere tritt sogar aufgrund der homogenen Verteilung der Segmentdichte der Fall der Dreidimensionalität ($d_f = 3$) ein.⁸⁹

Einen weiteren Parameter zur genauen Beschreibung von Molekülen stellt die scheinbare Dichte ρ_{app} (engl. apparent density) dar. Diese spiegelt wider, wie kompakt die Moleküle sind und welche Hohlräume innerhalb der Struktur vorhanden sind.^{90, 91} Die scheinbare Dichte kann aus der Molmassenverteilung und den hydrodynamischen Radien berechnet werden. Voraussetzung dafür ist jedoch die Annahme einer homogenen Massenverteilung in Form einer Kugel mit dem Volumen V und dem Radius R .

$$\rho_{app} = \frac{M_w}{V(R)}$$

Gleichung 2-10

Für verzweigte Polymere lassen sich Lichtstreuungsmethoden ebenfalls anwenden, um die Molmassenverteilungen zu bestimmen oder auch um aus der Molekülgröße Verzweigungsdichten zu ermitteln. Dabei wird davon ausgegangen, dass die eluierten

Fraktionen monodispers hinsichtlich Molmasse und Verzweigungsdichte sind. Die Verzweigungsdichte kann bestimmt werden, indem der Trägheitsradius oder die intrinsische Viskosität der eluierten Fraktion des verzweigten Polymers mit der entsprechenden Eigenschaft des linearen Analogons ins Verhältnis gesetzt wird.^{83, 87, 92} Eine Limitierung besteht bei diesem Verfahren jedoch darin, dass die Trennung bei der SEC hinsichtlich des hydrodynamischen Volumens stattfindet. Da verzweigte Polymere häufig bei gleichem V_h eine Verteilung in der Verzweigungsdichte aufweisen, ist eine Co-Elution von verschiedenen Verzweigungsgraden bei gleichem Elutionsvolumen möglich. Diese unterschiedlichen Verzweigungsgrade können jedoch im Chromatogramm nicht unterschieden werden und somit ist die Annahme monodisperser Fraktionen nicht mehr gewährleistet. Mit dieser Methode werden nur Mittelwerte der Fraktionen bestimmt.

Engverteilte Fraktionen eines breitverteilten Polymers zu erhalten, ist mit folgenden klassischen Fraktionierungsmethoden möglich:

- Fällungsfractionierung, wie z. B. die Sol-Gel-Fractionierung,
- Lösungsfractionierung, wie z. B. die Baker-Williams-analoge Elutionsfractionierung,
- Fractionierung an der Phasengrenze.

Hierbei spielen jedoch viele Faktoren, wie sehr hoher zeitlicher Aufwand und hoher Lösungsmittelsverbrauch in der Anwendbarkeit eine wichtige Rolle. Weiterhin ist es nicht gewährleistet, dass bei verzweigten Polymeren eine Auftrennung auch nach Verzweigungscharakter stattfindet, wie bereits bei einem h_{vz} Polyester durch Elutionsfractionierung nachgewiesen wurde.⁹³ Im Falle von Polyolefinen hat sich die Kristallisationsfractionierungsanalyse (CRYSTAF) als Methode zur Trennung unterschiedlich verzweigter Polymerer etabliert.⁹⁴ Neben der langen Analysenzeit der CRYSTAF hat sie die Einschränkung nur auf teilkristalline Polymere anwendbar zu sein. Eine weitere Limitierung in der Molmassenbestimmung verzweigter Polymere ergibt sich aus der Multifunktionalität durch die hohe Anzahl von Endgruppen. Mit steigender Verzweigungszahl erhöht sich die Anzahl der Endgruppen und damit auch das Risiko von enthalpischen Trenneffekten wie z. B. Adsorption. Theoretisch findet die Separation bei der SEC nur durch entropische Triebkräfte statt (siehe Abbildung 2-1a). Bei funktionellen Endgruppen kann es jedoch vorkommen, dass die Separation zusätzlich durch Wechselwirkungen (WW) mit der stationären Phase beeinflusst wird. Somit verweilen die Polymere länger in der Säule als im normalen SEC-Modus und es kommt

zu einer verzögerten Elution. Das Phänomen äußert sich durch untypisches Ansteigen der Molmassen bei höheren Elutionsvolumina, was häufig aufgrund der Kurvenform als „Smiley-Effekt“ beschrieben wird (siehe Abbildung 2-1b).^{95, 96} Unter Umständen können Teile der Proben sogar irreversibel auf der Säule adsorbieren ohne eluiert zu werden.

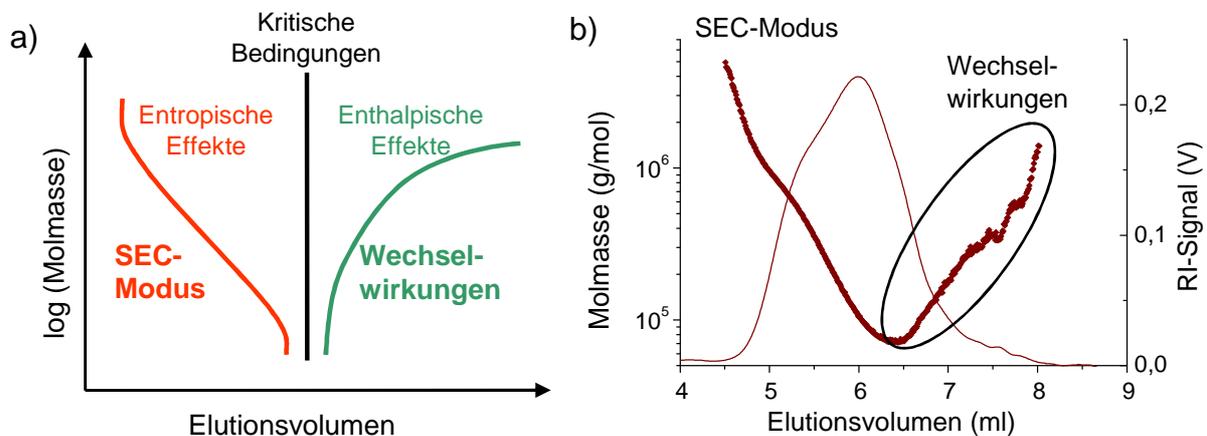


Abbildung 2-1: Kalibrierbeziehung bei unterschiedlichen Trenneffekten und b) beispielhafte Darstellung eines Chromatogramms mit RI-Signal und Molmasse in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen

Eine weitere Limitierung der SEC liegt in dem begrenzten Molmassenbereich (abhängig vom Säulentyp bis zu 10^6 g/mol), welcher zuverlässig aufgetrennt werden kann. Bei Molekülen mit höherer Molmasse kann es zum partiellen Abbau z. B. durch Scherdegradation kommen.^{97, 98} Bei extrem hohen Molmassen kann es sogar zur Co-Elution und vorgetäuschter Multimodalität kommen, da durch das Überschreiten der oberen Trenngrenze der Säule eine gleichzeitige Elution unterschiedlich großer Moleküle auftritt.⁵ Besonders nachteilig wirkt sich dies bei der Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Polymeren aus.

Um weitere Informationen über die Struktur und speziell den Verzweigungscharakter zu erhalten, können spektroskopische Methoden angewendet werden. Jedoch können auf diese Weise auch nur Mittelwerte ermittelt werden, was bei multimodal verteilten Polymeren von entscheidendem Nachteil ist.

Aufgrund der zahlreichen Limitierungen in der Auftrennung und Verzweigungsanalyse gibt es aktuell zahlreiche Bestrebungen, neue Methoden für die Charakterisierung von verzweigten Polymeren zu entwickeln. Die Anwendungen basieren dabei auf völlig unterschiedlichen Methoden bzw. Trennmechanismen. Es gibt Methoden, bei denen die Trennung aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial stattfindet. Zum einen ist es gelungen, mittels einer zweidimensionalen offline-Kombination aus Temperaturgradienten- und Größenausschlusschromatographie sternförmiges von

linearem Polystyren mit gleicher hydrodynamischer Größe zu trennen⁹⁹. Zum anderen wurden erstmalig maßgeschneiderte hochverzweigte Modellpolyester¹⁰⁰ hinsichtlich ihrer Verzweigungsgrade mittels Gradienten-Adsorptionschromatographie und Flüssigchromatographie bei kritischen Bedingungen voneinander separiert.¹⁰¹ Weiterhin konnten Polyolefine mittels Hochtemperatur-2D-Flüssigchromatographie charakterisiert werden.¹⁰² Mit einer offline-Kombination aus 2D-SEC und anschließender enzymatischer Behandlung wurden Informationen über Verzweigungslängen von verzweigten Glukosepolymeren erhalten.¹⁰³ Ein weiterer Ansatz zur Trennung nach topologischen Aspekten ist die "Molecular Topology Fractionation", bei der Moleküle unterschiedlicher Verzweigung in sehr schmalen Kanälen aufgetrennt werden.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Sterne mit unterschiedlicher Armzahl können durch eine Kombination aus Temperaturgradienten- und Wechselwirkungschromatographie voneinander separiert werden.^{107, 108} Auch die asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung wird immer häufiger angewandt, um verzweigte Polymere zu untersuchen. Auf der Basis unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten von verzweigten und linearen Polymeren ist es beispielsweise gelungen Glykogen¹⁰⁹ und verzweigte Polybutadiene¹¹⁰ zu charakterisieren bzw. verzweigte Polyolefine mittels Hochtemperatur-AF4 aufzutrennen.¹¹¹ Ebenfalls konnte native Stärke mit einer Kombination aus AF4 und hydrodynamischer Chromatographie und Größenausschlusschromatographie (HDC und SEC) eingehend hinsichtlich der Molmassenverteilung charakterisiert werden.¹¹² Derzeit gibt es zahlreiche Anstrengungen auf dem Gebiet der Separation von linearen und verzweigten Polymeren, jedoch blieb der Durchbruch in Form der Entwicklung einer Universal-methode bisher leider aus.

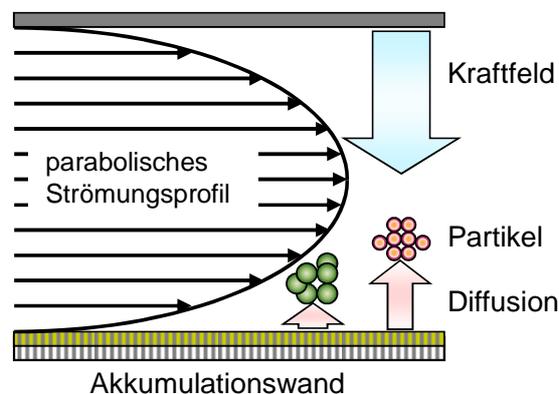
In der vorliegenden Arbeit werden zwei Methoden vorgestellt, die auf unterschiedlichen Trennprinzipien beruhen, und mit deren Anwendung es möglich ist, verzweigte Polymere besser zu separieren und zu charakterisieren. Die Methode der asymmetrischen Flussfeldflussfraktionierung beruht auf der Trennung hinsichtlich der Diffusionseigenschaften und mit ihrer Hilfe sollen dendritische Polymere untersucht werden. Die andere Methode, die Phasendistributionschromatographie, deren Triebkraft thermodynamische Eigenschaften sind, wird in dieser Arbeit angewendet, um Polymere mit verschiedenen Verzweigungscharakteren zu separieren.

3 Separation von dendritischen, multifunktionellen Polymeren und Untersuchung zu nicht-kovalenten Wechselwirkungen mittels Feldflussfraktionierung

Die Gruppe der synthetischen Kohlenhydratpolymere, welche als Glykopolymere bezeichnet werden, stellt ebenso wie die Gruppe der hvz Polyester die eingehende Molmassencharakterisierung mit der SEC vor große Probleme. Größtenteils werden diese durch Aggregation und adsorptive WW mit dem Säulenmaterial hervorgerufen. Wie auch bei anderen Polymergruppen ist die genaue Kenntnis der molekularen und strukturellen Parameter wie z. B. Molmasse, Dimensionen oder Molekülstruktur von grundlegender Bedeutung.

3.1 Grundlagen der Feldflussfraktionierung

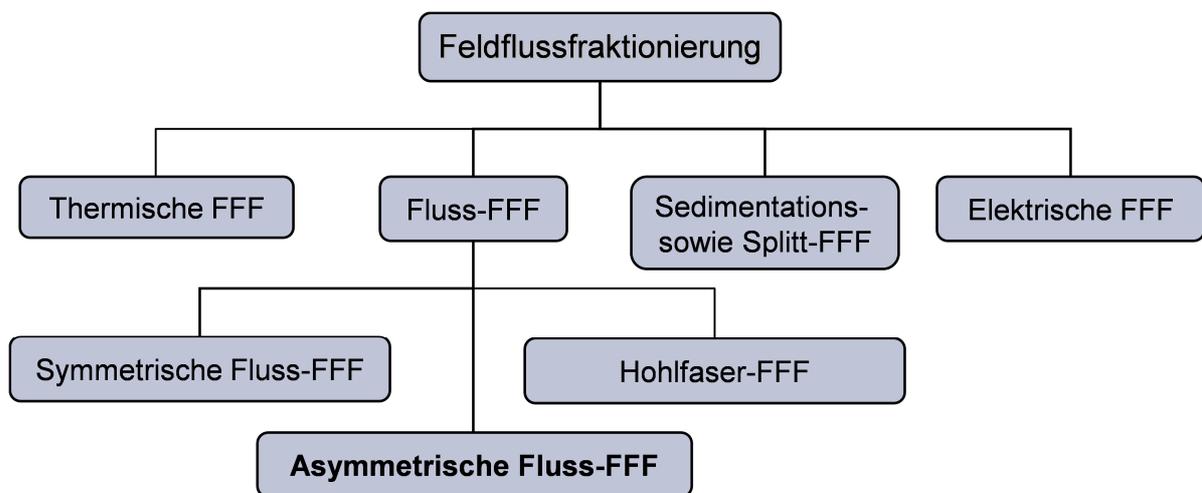
Aufgrund ihrer Universalität und vielseitigen Einsetzbarkeit trat die Separationsmethode der Feldflussfraktionierung (FFF) in den letzten 10 Jahren immer mehr in den Fokus der Größencharakterisierung und Auftrennung von Polymer- und Partikelgemischen. Die Separation erfolgt hierbei in einem dünnen, bandartigen Kanal, welcher von einem Eluenten durchflossen wird. Zu diesem Zweck wird senkrecht zur Hauptflussrichtung ein Kraftfeld angelegt, welches auf die zu trennenden Moleküle einwirkt. Dabei bildet sich im Kanalinneren ein laminarer Strom aus, der ein parabolisches Strömungsprofil aufweist. Hierbei erreicht die Fließgeschwindigkeit der Strömungsschichten in der Kanalmitte ihr Maximum, während sie, wie im Schema 3-1 abgebildet, an der oberen Begrenzung und an der Akkumulationswand nahezu null ist.



Schema 3-1: Schematische Darstellung eines Kanalquerschnitts mit den entgegengesetzt wirkenden Kräften während einer Separation eines Probengemisches

Durch das senkrecht wirkende Kraftfeld werden die zu trennenden Partikel gegen die Akkumulationswand gedrängt, während die entgegenwirkende Kraft der Diffusion die Moleküle in höhere Schichten des Strömungsprofils transportiert. Wenn ein stationäres Gleichgewicht zwischen Kraftfeld und Diffusion entstanden ist, bildet sich ein exponentielles Konzentrationsprofil aus. Befinden sich die zu trennenden Moleküle je nach Diffusionskoeffizienten in den verschiedenen Geschwindigkeitszonen, erfolgt anschließend die Elution bzw. Separation. Je kleiner der Diffusionskoeffizient der Moleküle, desto geringer ist deren Rückdiffusion und demzufolge steigt die Elutionszeit.^{113, 114}

Schon 1966 legte Giddings die Grundsteine für das allgemeine Konzept¹¹⁵ und die theoretischen Hintergründe¹¹⁶ der vielseitigen einphasigen Chromatographiemethode, bei der eine größenabhängige Auftrennung stattfindet. In den folgenden Jahrzehnten wurde die Technik dahingehend weiterentwickelt, dass heutzutage eine Trennung nach verschiedensten Trennkräften durch eine Vielzahl von Subvarianten durchgeführt werden kann (siehe Schema 3-2).¹¹⁴



Schema 3-2: Varianten der FFF-Familie mit den jeweiligen Trennkräften

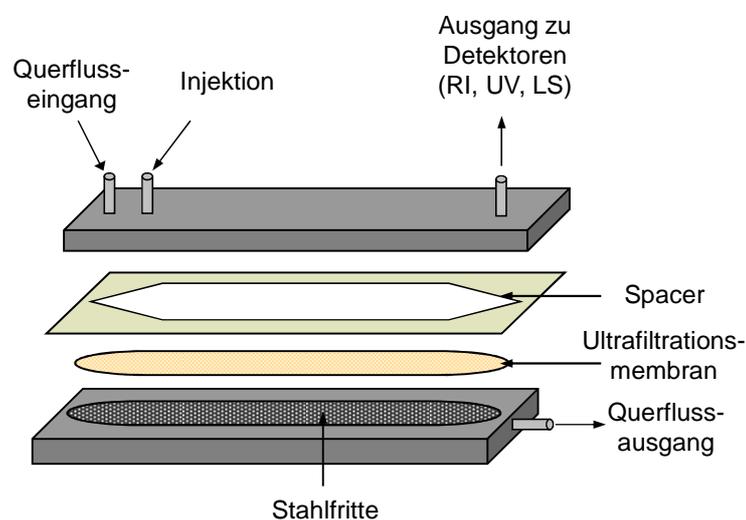
Die Separation bei der thermischen FFF beruht auf thermischer Diffusion, welche durch Temperaturunterschiede zwischen oberer und unterer Kanalbegrenzung und dem resultierenden Temperaturgradienten hervorgerufen wird.¹¹⁷⁻¹²⁰ Mittels der elektrischen FFF erfolgt eine Trennung nach Ladungseigenschaften und elektrophoretischer Mobilität der Moleküle, bei der ein elektrisches Kraftfeld angelegt wird.^{121, 122} Bei der Sedimentations-FFF wird die Trennung durch Rotation eines kreisförmigen Kanals erreicht, bei der das Trennfeld in Form eines Zentrifugalfeldes generiert wird und die Trennung aufgrund von Dichteunterschieden eintritt.^{123, 124} Eine technische Weiter-

entwicklung zur präparativen Trennung stellt die „split flow thin cell“-Fraktionierung (SPLITT-FFF) dar, bei der die Trennung durch unterschiedliche Sedimentation im Erdschwerkraftfeld bei einem kontinuierlichen Eluentenstrom hervorgerufen wird.^{125, 126}

Die Gruppe der Fluss-FFF ist die am weitesten entwickelte Separationsmethode der FFF-Familie und da insbesondere die asymmetrische Fluss-FFF einen Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit bildet, soll sie an dieser Stelle ausführlicher behandelt werden. Die Trennung wird hier durch einen zusätzlich wirkenden, senkrechten Lösungsmittelstrom hervorgerufen und beruht auf unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten der zu trennenden Moleküle. Dabei werden in Abhängigkeit der Kanalstruktur drei Arten unterschieden:

- die symmetrische Fluss-FFF, bei der obere und untere Kanalbegrenzung aus durchlässigen Fritten bestehen,^{127, 128}
- die asymmetrische Fluss-FFF (AF4), bei der nur die untere Begrenzung durchlässig ist¹²⁹⁻¹³¹ und
- die Hohlfaser-Fluss-FFF, bei der die Trennung in einer komplett semipermeablen Membranfaser stattfindet.^{132, 133}

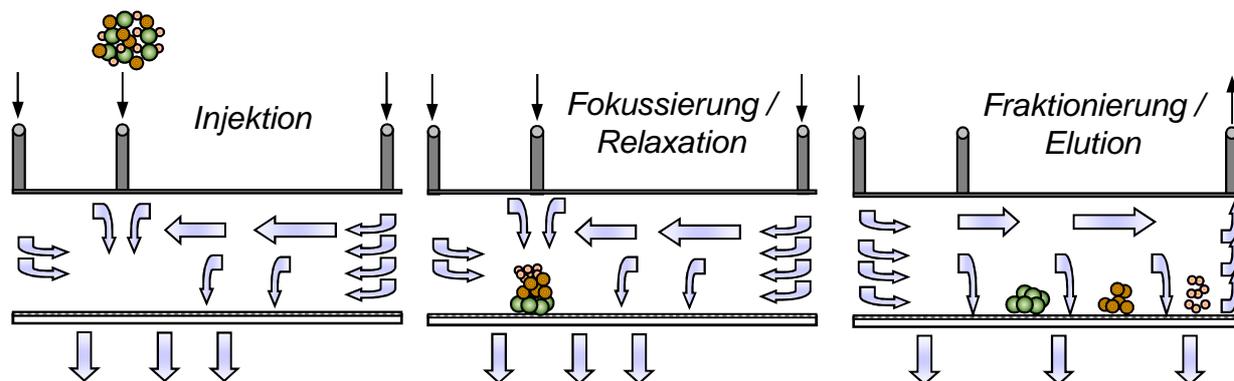
Der schematische Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten AF4-Trennkanales ist im folgenden Schema 3-3 dargestellt.



Schema 3-3: Apparativer Aufbau des verwendeten AF4-Trennkanales

Die Ultrafiltrationsmembran, vorhanden mit unterschiedlichen Materialien und Porenweiten (1.000 – 30.000 Da), wird dazu genutzt, den generierten Querfluss aus dem Kanal zu transportieren und gleichzeitig niedermolekulare Bestandteile aus dem Probengemisch abzutrennen.

Die Trennung bei der AF4 erfolgt generell in drei Schritten (siehe Schema 3-4): Injektion, Fokussierung/Relaxation und Fraktionierung/Elution.



Schema 3-4: Querschnitt des AF4-Trennkannels während der drei Trennschritte einer Separation eines Probengemisches

Während der Injektion wird das Probengemisch in den Trennkanal eingeleitet. Im anschließenden Fokussierungsschritt wird die Probe mit Hilfe des Fokussierstroms aufkonzentriert und zu einer schmalen Bande zusammengeschoben. Somit wird zum einen das Risiko zur Bandenverbreiterung verringert und zum anderen die Möglichkeit eröffnet, extrem verdünnte Lösungen mit ausreichend hohem Volumen zu injizieren. In diesem Fokussierschritt stellt sich ein stationärer Zustand ein, in welchem die Moleküle abhängig von ihrem Diffusionskoeffizienten den jeweiligen Abstand zur Akkumulationswand erreichen. Durch ventilgesteuertes Umschalten wird die Fraktionierung mit dem Zusammenwirken von Kanal- und Querfluss gestartet und die Moleküle werden in Abhängigkeit ihres Diffusionskoeffizienten bzw. ihrer Größe aus dem Kanal eluiert. Anschließend können sie mit einer Vielzahl von Detektionsmöglichkeiten charakterisiert werden. Vorwiegend werden Lichtstreu-¹³⁴ und Brechungsindex-/Infrarotdetektion¹³⁵ angewendet, jedoch wurde bereits auch über Untersuchungen mittels Viskositäts-¹³⁶, Gaschromatographie¹³⁷, SAXS (Kleinwinkelröntgenstreuung)-¹³⁸ und ICPMS- (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasma)¹³⁹ Detektoren berichtet.

Für die Fraktionierungsphase gibt es verschiedene Möglichkeiten, eine optimale Trennung für die verschiedensten Probensysteme zu erhalten. Dabei spielt die Variation des Querflusses (F_x) eine große Rolle. Für engverteilte Proben ist ein isokratischer F_x -Verlauf am günstigsten, während durch kontinuierliches Absenken von F_x (linear oder exponentiell) breitverteilte Systeme besser aufgetrennt werden können.

Wenn Moleküle untersucht werden, deren Dimensionen eine von der Kanalhöhe abhängige kritische Größe überschreiten, kann es zu zwei weiteren Trennmechanismen kommen. Zum einen ist in diesem Fall eine sterische Separation möglich, bei der die zu trennenden Moleküle sich aufgrund des Querflusses an der Akkumulationswand anreichern. Bei größeren Dimensionen ragen diese in die schnelleren Schichten des Flussprofils hinein und werden somit ungewöhnlich schnell eluiert. Die Elutionsfolge kehrt sich demzufolge wieder um, sodass die Elutionszeit mit steigendem Durchmesser abnimmt.¹⁴⁰ Der zweite, abweichende Trennmechanismus wird als Hyperlayer-Modus bezeichnet, bei welchem es aufgrund des Kanalfusses zum hydrodynamischen Auftrieb der Moleküle kommt und welcher mit zunehmenden Dimensionen anwächst. Ebenso wie bei dem sterischen Modus, kommt es auch hier zur Inversion der normalen Elutionsreihenfolge.¹⁴¹ Bei gleichzeitiger normaler und sterischer Separation kommt es zu einer Überlagerung der Elution und eine Unterscheidung ist nicht mehr möglich, da kleine und große Moleküle co-eluieren.

Grundsätzlich wird anhand der Gleichung 3-1 deutlich, dass die Separation mittels der Fluss-FFF bzw. der Diffusionskoeffizient D stark abhängig von dem jeweiligen Querfluss F_x , der Totzeit t_T sowie des Totvolumens V_T des Kanals, der Kanalhöhe h und der Retentionszeit t_R ist.

$$D = \frac{t_T \cdot F_x \cdot h^2}{6t_R \cdot V_T} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Über die Stokes-Einstein-Gleichung ist die Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers D_h unter Annahme einer sphärischen Molekülform in Abhängigkeit der Viskosität des Lösungsmittels η und der Temperatur T möglich:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D_h} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

Damit ergibt sich für den hydrodynamischen Durchmesser D_h folgende Gleichung:

$$D_h = \frac{2k_B \cdot T \cdot V_T \cdot t_R}{\pi \cdot \eta \cdot t_T \cdot F_x \cdot h^2} \quad \text{Gleichung 3-3}$$

Diese Umwandlung wird sogar benutzt, um mathematisch die Verteilung des hydrodynamischen Radius aus den Retentionszeiten zu bestimmen, wie in den Arbeiten von Wahlund und Nilsson aufgezeigt wird.^{91, 142}

Folgende Vorteile gegenüber der SEC machen die Feldflussfraktionierung zu einer vielseitigen Alternativmethode in der Größencharakterisierung:

- breiter Molmassenbereich (10^3 – 10^9 g/mol),
- reduziertes Risiko für Wechselwirkungen (z. B. Adsorption) und Scherdegradation durch Umgehen der stationären Phase,
- milde Messbedingungen und geringe Scherkräfte ermöglichen die Untersuchung von fragilen Probensystemen (z. B. Proteinaggregaten oder Zellen),
- simultane Untersuchung von löslichen und unlöslichen Anteilen möglich,
- schnelle Eluentenwechsel (organisch/wässrig/verschiedene pH-Werte) möglich, da kein Equilibrieren des Trennkanals notwendig,
- individuelle Anpassung der Separationsbedingungen an verschiedenste Probensysteme und
- Abtrennung von niedermolekularen Verbindungen (z. B. Katalysatoren) kann innerhalb des Kanals durch Abfiltration erfolgen.

Aufgrund dieser wichtigen Vorteile wurden Untersuchungen in diversen Arbeitsgruppen mit den verschiedensten Probensystemen durchgeführt. Dazu gehören unter anderem zahlreiche Studien zu Polymeren^{110, 111, 143-145}, Nanopartikeln¹⁴⁶⁻¹⁵⁰, Zellen¹⁵¹⁻¹⁵³, Proteinen^{137, 154}, Stärke¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ und virusähnlichen Partikeln¹⁵⁸⁻¹⁶¹.

Mit der in dieser Arbeit verwendeten asymmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierungsapparatur mit Lichtstredetektion ist es möglich, sowohl im organischen als auch wässrigen Medium zu arbeiten. Genauere Informationen befinden sich im Kapitel 6.2.

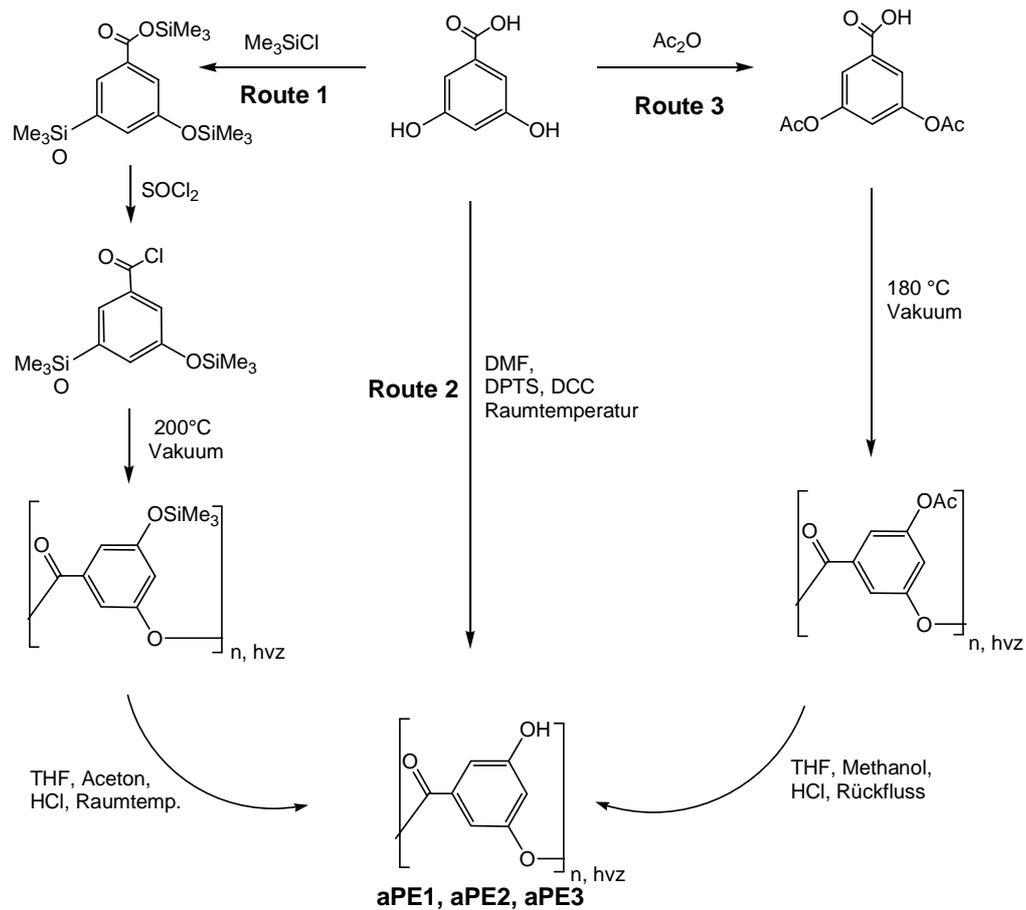
Im folgenden Ergebnis- und Diskussionsteil wird an erster Stelle die Molmassenuntersuchung eines hochverzweigten vollaromatischen Polyesters beschrieben und ausgewertet. Dabei steht der Vergleich von SEC- und AF4-Untersuchungen sowie die Diskussion und Bewertung der Ergebnisse im Vordergrund. An zweiter Stelle wird das Komplexierungsverhalten eines hochverzweigten Glykopolymers mit einer Kern-Schale- („core-shell“) Architektur näher betrachtet. Hierbei besteht der Kern aus hochverzweigten Poly(ethylenimin)-Einheiten (PEI) dessen funktionelle Gruppen mit Maltoseeinheiten dekoriert sind, die eine hydrophile Schale bilden. Speziell bei diesem System wird mittels der AF4-LS eine Molmassen-charakterisierung durchgeführt sowie erstmals eine Herangehensweise entwickelt, mit der die Fähigkeit zur Komplexbildung mit einer Modellsubstanz näher untersucht werden kann. An dritter Stelle der Ergebnisdarstellung folgen die Aggregationsuntersuchungen dendronisierter Glykopolymere, welche an ihrem linearen Maleimid-Copolymer-Rückgrat Lysindendrone mit verschiedenen Generationen besitzen. Hierbei wird mittels AF4-LS das

Aggregationsverhalten unter verschiedenen Gesichtspunkten umfassend betrachtet und mit komplementären Methoden verifiziert.

3.2 Ergebnisse der Molmassenbestimmung eines hochverzweigten Polyesters

3.2.1 Aktuelle Problemstellungen bei der Molmassenbestimmung

Die Molmassencharakterisierung mittels SEC von hochverzweigten Polymeren erwies sich, wie schon im Kapitel 2.3 erwähnt, bisher als schwierig, da zum einen keine geeigneten Kalibrationsstandards erhältlich sind und zum anderen durch die Vielzahl an funktionellen Endgruppen ein hohes Risiko für WW mit dem Säulenmaterial besteht. In der Vergangenheit wurden verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurden die zahlenmittleren Molmassen mittels NMR-Spektroskopie bestimmt, jedoch mit der Limitierung, dass die erhaltenen Werte ab einer Größe von 20.000 g/mol zu ungenau sind. Die ebenfalls oft angewandte SEC-Kalibrierung mit engverteilten Polymerstandards führte aus den schon erläuterten Gründen zu unterschätzten Molmassen, wie am Beispiel der Poly(etheramide) sehr deutlich gezeigt wurde.¹⁶² Daher rückte die SEC-LS-Kombination als Absolutmethode immer mehr in den Vordergrund, jedoch wurde das Problem der WW damit nicht gelöst. Insbesondere der hydroxylterminierte, vollaromatische, hochverzweigte Polyester (hvz, aPE) auf der Basis von dem AB₂-Monomer 3,5-Dihydroxybenzoesäure bereitet bei SEC-Untersuchungen in dem gängigen Lösungsmittel Tetrahydrofuran (THF) große Probleme aufgrund von Adsorptionseffekten mit dem Säulenmaterial. Hierzu wurden von Dr. M. Erber (IPF Dresden) drei Polyester mit verschiedenen Molmassen mittels unterschiedlicher Routen synthetisiert (siehe Schema 3-5) und freundlicherweise für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Durch die unterschiedlichen Syntheserouten, welche sowohl der Schmelzkondensation als auch der Polymerisation in Lösung folgen, kann die Molmasse beeinflusst werden.



Schema 3-5: Synthesestrategien zur Herstellung eines hochverzweigten, aromatischen Polyesters¹⁶³

Die Unterschiede der Synthesestrategien und deren Auswirkungen auf die Polymereigenschaften wurden in anderen Studien eingehend untersucht und diskutiert.¹⁶³ Die Bezeichnung der Polyester wurde in Abhängigkeit steigender Molmasse von **aPE1** bis **aPE3** gewählt. Die Verzweigungsgrade wurden mittels NMR-Spektroskopie bestimmt und liegen im Bereich von $\approx 60\%$.¹⁶³ Sie weisen damit typische Werte für hochverzweigte Polymere auf.

3.2.2 Molmassenbestimmung der hvz, aPE

In der folgenden Tabelle 3-1 sind die Ergebnisse der Molmassenbestimmung mit den unterschiedlichen Separationsmethoden aufgelistet.

Tabelle 3-1: Ergebnisse der Molmassenbestimmung von **aPE1-3** mit SEC in THF und sowie AF4 in THF

Methode	Polymer	M _n (g/mol)	M _w (g/mol)	M _w /M _n	Wiederfindung (%)
SEC in THF	aPE1	6.500	10.900	1,67	≈ 60
	aPE2	13.000-18.000	84.000-400.000	n.b. ¹	30-40
	aPE3	n.b. ¹	n.b. ¹	n.b. ¹	n.b. ¹
SEC in DMAc	aPE1	1.500	9.400	6,27	≈ 99
	aPE2	8.700	27.800	3,20	≈ 97
	aPE3	42.100	240.000	5,70	≈ 89
AF4 in THF	aPE1	11.200	16.800	1,50	≈ 40
	aPE2	16.000	25.600	1,60	≈ 75
	aPE3	52.900	254.000	4,80	≈ 98

¹ ... nicht bestimmbar

Im folgenden Abschnitt werden die Messungen der einzelnen Methoden diskutiert und die Vor- und Nachteile erläutert. Generell sind SEC-Untersuchungen in THF als häufig angewandte Standardmethode anzusehen, welche für eine Vielzahl von Proben-systemen gut geeignet ist. Bei den hochverzweigten Polyestern stößt diese jedoch an ihre Grenzen. In der folgenden Abbildung 3-1 sind die RI-Signale und dazugehörigen Molmassenkalibrierkurven von **aPE1** und **aPE2** zu sehen. Die dargestellten Ergebnisse der Messungen sind in diesem Fall nur „Momentaufnahmen“, da die Reproduzierbarkeit sehr schlecht war und die ermittelten Werte von Messung zu Messung abwichen. Im Fall von **aPE3** kam es sogar zur irreversiblen Adsorption innerhalb der Trennsäule. Aus diesem Grund existieren hierfür keine Kurven bzw. Ergebnisse.

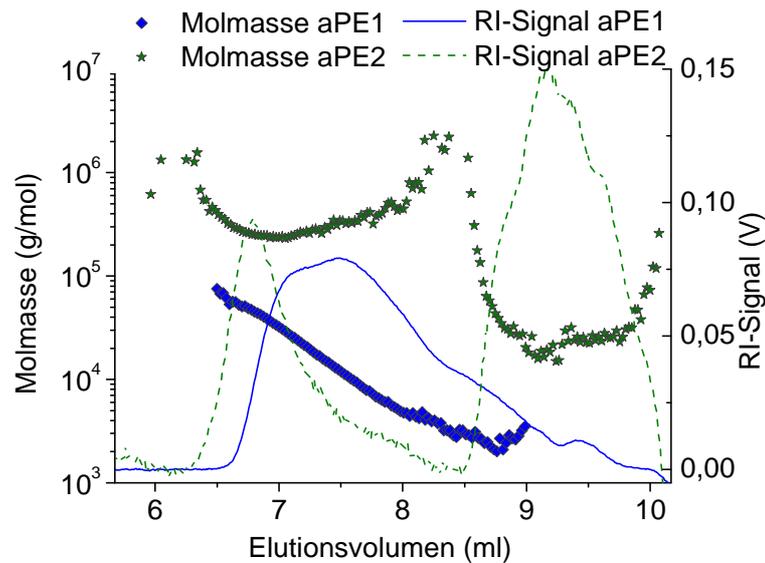


Abbildung 3-1: SEC-Chromatogramm von **aPE1** (blau) und **aPE2** (grün) mit RI-Signalen und Molmassen in Abhängigkeit des Elutionsvolumens in THF (SEC-System 1)

Für das Polymer **aPE1** scheint die Messung recht zuverlässige Ergebnisse zu liefern, einzig die Reproduzierbarkeit sowie die Wiederfindung (Verhältnis von injizierter und eluierter Masse, etwa 60 %) liefern einen Hinweis darauf, dass höhermolekulare Anteile in der Säule adsorbiert werden. Bei den Messungen von **aPE2** werden allerdings zu hohe Molmassen ermittelt. Gründe dafür sind zum einen intermolekulare Aggregation, welche zur Veränderung der Molmassenverteilungen führt. Zum anderen liegt ein für die SEC sehr untypischer Verlauf einer ineffektiven Größentrennung vor, da die Molmassen mit zunehmender Elutionszeit wieder ansteigen. Zusätzlich wird ein sehr geringes Wiederfindungsverhältnis (etwa 30 %) erzielt. Diese Fakten deuten darauf hin, dass aufgrund der hohen Anzahl an reaktiven Endgruppen eine Adsorption am Säulenmaterial stattfindet. Speziell bei hochverzweigten Polymeren ist zu beobachten, dass mit zunehmender Molmasse die absolute Anzahl der funktionellen Endgruppen ansteigt. Gleichzeitig wird damit auch das Risiko für WW mit dem Säulenmaterial größer.

Zur Vermeidung dieses Phänomens wurden in der Vergangenheit beispielsweise die polaren Hydroxylendgruppen silyliert, um die WW zu unterdrücken.^{164, 165} Da die Modifizierung direkt in der Messlösung unmittelbar vor der SEC-Messung stattfand, lag das Problem darin, dass der Modifizierungserfolg in diesem Fall nicht quantifizierbar war bzw. eine durchgehende, vollständige Modifizierung nicht sicher erhalten wurde. Somit kann eine Rückrechnung auf die korrekte Molmasse nicht gewährleistet werden. Außerdem sind Veränderungen des Säulenmaterials durch eine chemische Reaktion

möglich, da das Modifizierungsreagenz im Überschuss hinzugegeben wurde. Weiterhin führt die Modifizierung der Endgruppen zu Änderungen in der Solvation der verschiedenen Modifizierungsstufen mit dem Lösungsmittel und somit zu veränderten Lösungsstrukturen, welche das Elutionsverhalten erheblich beeinflussen. Der Einfluss der Modifizierung auf die Struktur und die Änderung des Lösungsverhaltens wurde ausführlich am Beispiel eines selektiv modifizierten, hvz aliphatischen Polyesters studiert und nachgewiesen.⁹³

Die Absolutbestimmung mittels SEC-MALLS ist dahingehend limitiert, dass die statische Lichtstreuung abhängig vom dn/dc normalerweise unter 5.000 g/mol keine auswertbaren Ergebnisse mehr liefert, da die Streuintensität zu gering ist. Einzige Ausnahme bilden hierbei Polymere mit einem sehr hohen Brechungsindexinkrement dn/dc (Kontrast zum Lösungsmittel). Im Fall des hvz-aPE liegt dieses für THF bei 0,25 ml/g und damit sind sogar Molmassen bis zu einer unteren Grenze von 1.000 g/mol detektierbar. Da jedoch die erhaltenen Resultate wenig aussagekräftig sind, ist dieses chromatographische System ungeeignet. Um die erläuterten WW zu unterbinden, gibt es die Möglichkeit zum einen die mobile zum anderen die stationäre Phase zu variieren. Da das Polymer in THF zur Aggregation neigt, wurde in diesem Fall die Polarität des Eluenten verändert und mit Dimethylacetamid (DMAc) ein Lösungsmittel eingesetzt, welches deutlich polarer ist. Durch den Zusatz von Lithiumchlorid wird außerdem die Aggregatbildung (durch H-Brücken) sowie Adsorption am Säulenmaterial durch Veränderung der Dielektrizitätskonstante und der Ladungseigenschaften unterdrückt. Weiterhin wurde mit der PolarGel (Agilent Technologies) eine Säule verwendet, die speziell für diesen Zweck entwickelt wurde, um enthalpische Effekte in polarem Lösungsmittel zu minimieren. Diese Säule besteht aus gering quellenden, makroporösen Co-Polymerperlen, welche hydrophobe und hydrophile Oberflächenkomponenten aufweisen.¹⁶⁶ Dahingegen kommt es bei einer herkömmlichen Säule mit Styrol/Divinylbenzol-Füllung zu WW, welche längere Elutionszeiten und dementsprechend (scheinbar) niedrigere Molmassen und engere Verteilungen zur Folge haben.

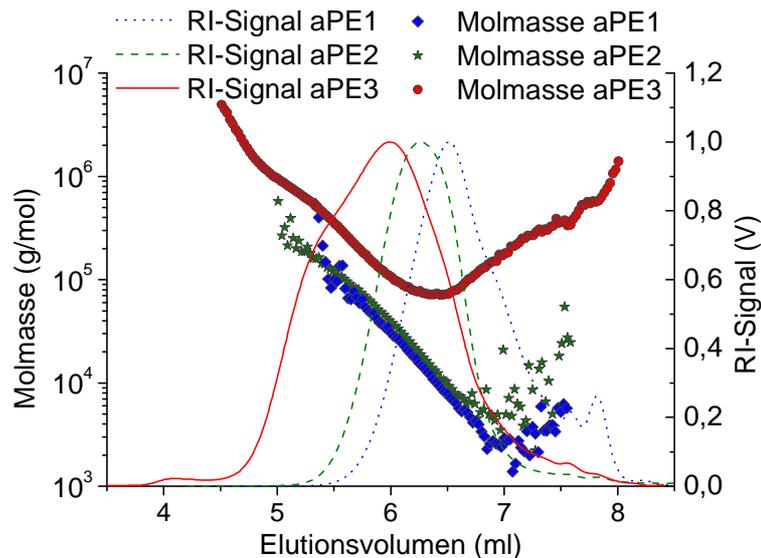


Abbildung 3-2: SEC-Chromatogramm von **aPE1** (blau), **aPE2** (grün) und **aPE3** (rot) mit normalisierten RI-Signalen und Molmassen in Abhängigkeit des Elutionsvolumens in DMAc/LiCl (SEC-System 2)

Im Vergleich zur Messung in THF (Abbildung 3-1) kommt es bei den mittleren Molmassen (**aPE2**) in DMAc/LiCl nicht zur Adsorption (Abbildung 3-2). Wie auch schon bei THF führt das vergleichbar hohe dn/dc (0,270 ml/g) bei den niedrigen Molmassen von **aPE1** und **aPE2** zu verlässlichen SEC-MALLS-Resultaten. Bei dem hochmolekularen **aPE3** tritt jedoch erneut das Phänomen auf, dass die WW mit dem Säulenmaterial die Auftrennung beeinflussen, was sich in Form eines nichtlinearen Molmassenverlaufes in Abhängigkeit des Elutionsvolumens im SEC-Chromatogramm widerspiegelt. Aus der ebenfalls schlechten Reproduzierbarkeit resultieren fehlerhafte Molmassen. Bis zu einer Molmasse von 30.000 g/mol können diese vernachlässigt werden, da eine vollständige Auftrennung erkennbar ist. Auch die Wiederfindung ist bei den „niedermolekularen“ **aPEs** mit annähernd 100 % reproduzierbar sehr hoch. Somit kann davon auch ausgegangen werden, dass mit zunehmender Endgruppenzahl die Affinität zum Säulenmaterial steigt und deswegen verstärkt Adsorptionseffekte zu beobachten sind. Ein weiterer Fakt ist, dass speziell bei dieser Art von hochverzweigten Polymeren, aufgrund der Kompaktheit, der Struktur sich mit zunehmender Molmasse die funktionellen Endgruppen an die Oberfläche des globularen Polymers drängen. Somit erhöht sich das Risiko für WW zusätzlich. Jedoch gibt es keine generelle Grenze für hochverzweigte Polymere oberhalb derer mit enthalpischen Effekten zu rechnen ist. Dieses Limit hängt sowohl von der Monomerstruktur als auch von dem Lösungsverhalten sowie der Güte des Lösungsmittels ab.

Um das dargestellte Problem der enthalpischen Trenneffekte mit zunehmender Molmasse zu umgehen, wurde die Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung zur Untersuchung dieses speziellen Polyesters eingesetzt. Da eine stationäre Phase in Form von Säulenmaterial keine Rolle bei der AF4 spielt, wird somit das Risiko einer verzögerten Elution minimiert. Da die Molmassen der drei Polymerproben zu weit auseinander liegen, war es in diesem Fall nicht möglich, eine Messmethode zu entwickeln mit der **aPE1**, **aPE2** und **aPE3** simultan untersucht werden können. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Messmethoden angewandt (experimentelle Beschreibung, siehe Kapitel 6.2)

In Abbildung 3-3a sind die Elugramme von **aPE1** und **aPE2** dargestellt, welche mit dem isokratischen Querfluss erhalten wurden. Der Verlauf der MM/Elutionszeit-Beziehung ist im Gegensatz zur SEC durch ein Ansteigen der Molmassen bei steigenden Elutionszeiten gekennzeichnet. Dessen Linearität ist ein Beweis dafür, dass bei der AF4 eine wechselwirkungsfreie Trennung hinsichtlich der Molekülgröße stattfindet. Die hohen Molmassen und vergleichsweise geringen Dispersitäten lassen darauf schließen, dass eine Fraktionierung durch die poröse Membran stattgefunden hat. Niedermolekulare Anteile, welche unterhalb von etwa 10.000 g/mol liegen, wurden während der Fokussierungs- oder Elutionsphase durch die Poren der Membran aus dem Trennkanal transportiert bzw. abfiltriert. Somit verbleiben nur die Anteile im Trennkanal, deren Molmasse oberhalb der Porengröße der Membran liegt. Daraus resultieren überschätzte Molmassen und unterschätzte Molmassenverteilungen. Die Fraktionierung von **aPE1** wird außerdem durch eine sehr geringe Wiederfindungsrate von 40 % bestätigt. Für das Polymer **aPE2** lag diese mit 75 % höher, was durch die höhere Ausgangsmolmasse begründet ist.

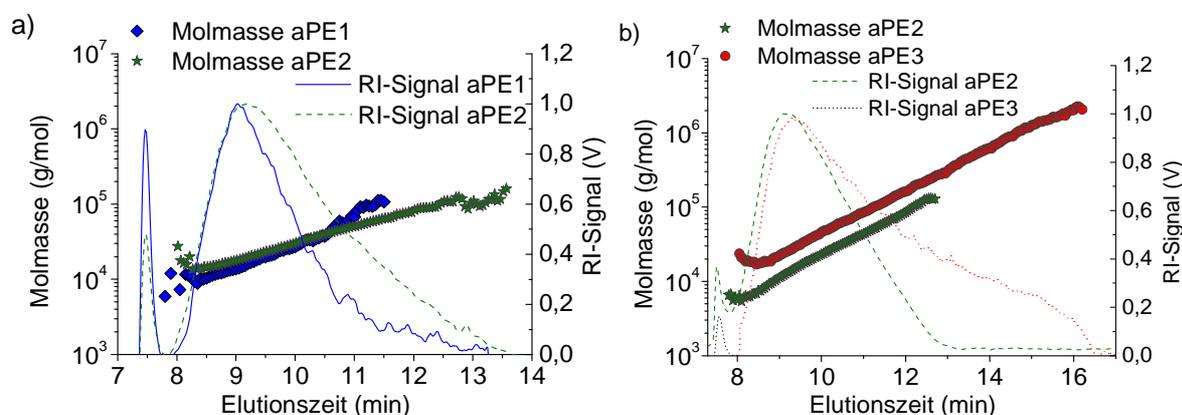


Abbildung 3-3: AF4-Elugramme in THF mit normalisierten RI-Signalen und Molmassen in Abhängigkeit der Elutionszeit von a) **aPE1** und **aPE2** mit isokratischem Querfluss bzw. b) **aPE2** und **aPE3** linearem Querflussgradient

Um einen Anhaltspunkt für einen Vergleich zu haben, wurden mit der Querflussgradientenmethode sowohl **aPE2** als auch **aPE3** untersucht (siehe Abbildung 3-3b). In beiden Fällen wurde eine komplette Trennung innerhalb des kürzeren Zeitraums erreicht. Die Abweichung der ermittelten Molmassen für **aPE2** mit den beiden unterschiedlichen Messmethoden war geringer als 5 % ($M_{W, \text{isokratisch}} = 26.800 \text{ g/mol}$; $M_{W, \text{gradient.}} = 25.600 \text{ g/mol}$) und somit innerhalb des zulässigen Fehlerbereiches der Messmethode. Im Gegensatz zu den dargestellten SEC-Messungen ist der lineare Verlauf der Molmassen-Elutionszeit-Beziehung ein Hinweis auf eine wechselwirkungsfreie Separation. Der unsymmetrische Verlauf des RI-Signals im hochmolekularen Bereich deutet allerdings erneut auf das Vorhandensein von hochmolekularen Bestandteilen hin, welche durch verbesserte AF4-Messmethoden abgetrennt werden könnten.

3.2.3 Konformationsuntersuchungen der hvz, aPE

Mit den Ergebnissen der AF4-Untersuchungen ist es weiterhin möglich, die Gestalt der Polymere in dem jeweiligen Lösungsmittel näher zu betrachten und eventuelle Rückschlüsse auf das Wechselwirkungsverhalten zu ziehen. Als erstes wird hierzu der Konformationsplot herangezogen. Da hier die Trägheitsradien in Abhängigkeit der Molmasse betrachtet werden, müssen die Moleküle eine gewisse Größe besitzen, um von dem Lichtstredetektor erfasst zu werden bzw. die Trägheitsradien ermitteln zu können. Die Proben von **aPE1** und **aPE2** sind aufgrund ihrer geringen Molekülgröße (und der daraus resultierenden winkelunabhängigen Streuung) ungeeignet, um Trägheitsradien mit dem vorhandenen Lichtstredetektor zu bestimmen. Aufgrund der winkelunabhängigen (isotropen) Streuung kleiner Partikel mit einem Durchmesser unterhalb von $\lambda/20$ (Wellenlänge des Lasers) werden akkurate Daten erst ab einer Größe von etwa 30 nm geliefert. Bei kleineren Molekülen werden entweder gar keine oder zu ungenaue, stark streuende Werte erhalten. Bei **aPE3** hingegen sind Informationen hinsichtlich der Molekülgestalt aufgrund der größeren Dimensionen sowohl von der SEC als auch der AF4 möglich. Ein Vergleich der Konformationsplots soll das unterschiedliche Elutionsverhalten der beiden Methoden erklären. Hierzu sind in Abbildung 3-4 die Kurven einer AF4-Messung und einer SEC-Untersuchung dargestellt. Da leider, wie schon erwähnt, bei der SEC-Untersuchung in THF keine Ergebnisse für **aPE3** erhalten wurden, soll an dieser Stelle der Vergleich mit einer Messung in DMAc gezogen werden. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Struktureigenschaften auch vom Lösungsmittel abhängig sind. Der untypische

Verlauf der Kurve aus den SEC-Daten kann darauf hindeuten, dass entweder Verschlaufungen der Polymermoleküle stattfinden oder die Auftrennung innerhalb der Säule nicht nach entropischen Triebkräften verlaufen ist. Dieses Phänomen wurde auch schon bei dem Vergleich von SEC- und AF4-Untersuchungen von verzweigtem Polystyren beobachtet. Hierbei kam es zu intermolekularen Verschlaufungen.⁹⁵ Es ist allerdings bekannt, dass hochverzweigte Polymere aufgrund ihrer kompakten Struktur und kurzen Abständen zwischen den Verzweigungen nicht zu Verschlaufungen neigen.⁸ Jedoch wurden WW von den Polymermolekülen mit dem Säulenmaterial schon in den Chromatogrammen bzw. den daraus resultierenden Kalibrierkurven erkennbar (siehe Abbildung 3-2). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Form des Konformationsplots durch verzögerte Elution aufgrund von WW verzweigter Moleküle mit höherer Molmasse mit dem Säulenmaterial hervorgerufen wird. Leider lassen diese Ergebnisse keine Rückschlüsse auf die Struktur der Moleküle zu.

Im Gegensatz dazu steht der Konformationsplot (siehe Abbildung 3-4), der mittels AF4-Untersuchung erhalten wurde. Hier sind keinerlei Wechselwirkungerscheinungen sichtbar. Jedoch werden strukturelle Unterschiede in Abhängigkeit der Molmasse deutlich. Je höher die Molmasse wird, umso geringer wird der Anstieg der Radien. Das führt zu der Annahme, dass bei den Molmassen bis etwa 500.000 g/mol eine kompaktere und dichtere Struktur vorherrscht. Mit sinkender Molmasse weitet sich die Struktur zunehmend auf. Dieses Verhalten wurde schon häufig bei hochverzweigten Polymeren, wie aliphatischen Polyestern⁹³ oder Polyetheramiden¹⁶² beobachtet.

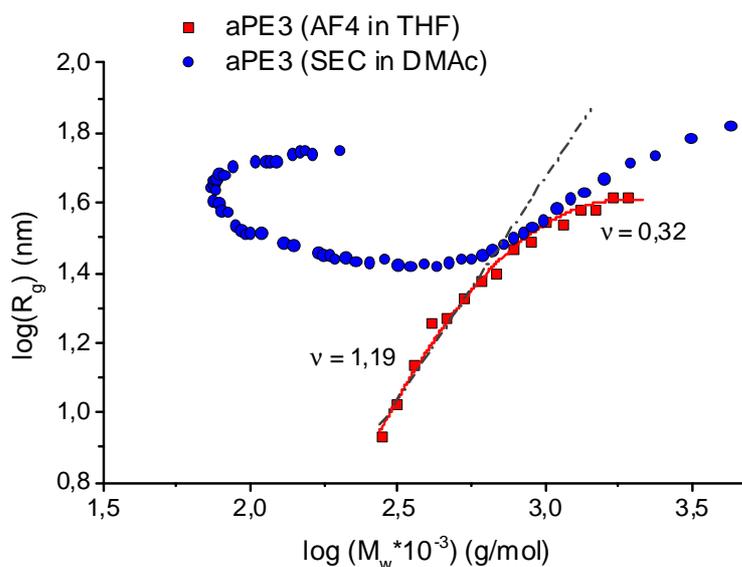


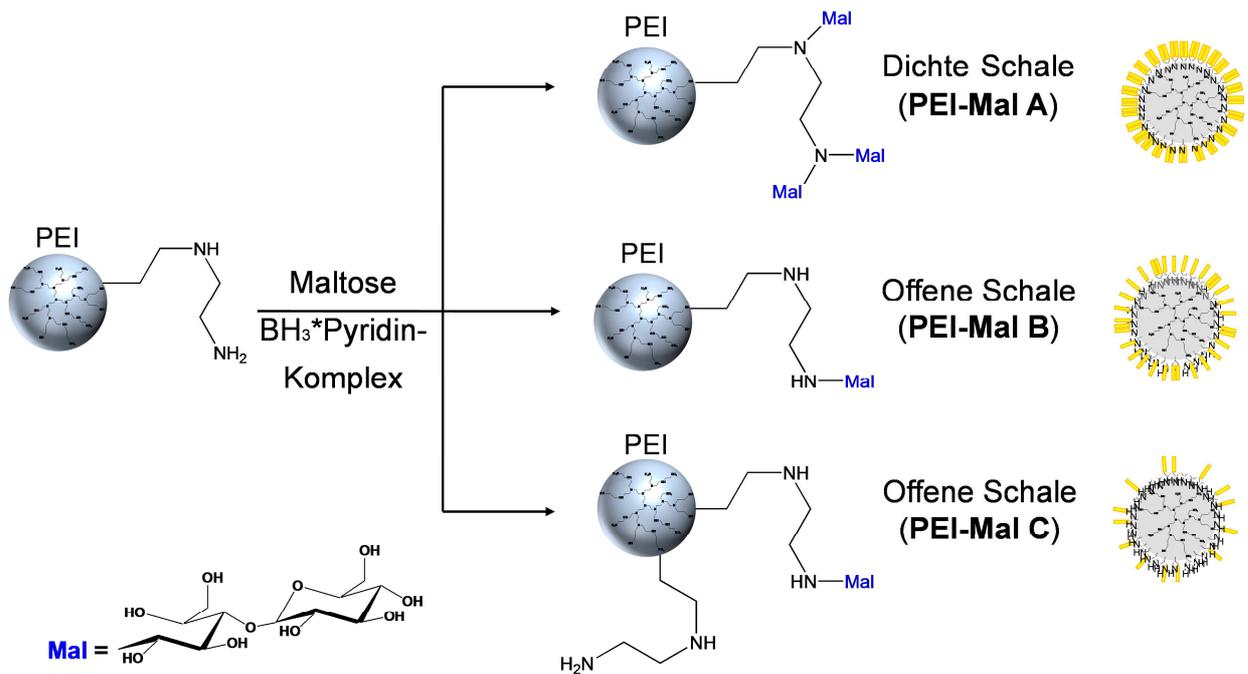
Abbildung 3-4: Darstellung der Konformationsplots: Abhängigkeit von R_g und M_w von aPE3 ermittelt aus den Daten der AF4-Messung in THF (rotes Quadrat) und der SEC in DMAc (blauer Kreis)

Generell ist die AF4 sehr gut geeignet, um das Problem der adsorptiven WW von hochverzweigten Polyestern zu umgehen. Jedoch muss gerade bei niedermolekularen Probensystemen mit einer Teilfraktionierung und der daraus resultierenden Veränderung in der Molmassenverteilung gerechnet werden. Daraus folgende geringere Wiederfindungsraten müssen dabei berücksichtigt werden. Bei höheren Molmassen liefert die Feldflussfraktionierung sehr zuverlässige Ergebnisse und aufgrund der wechselwirkungsfreien Auftrennung sind weitere Aussagen wie z. B. zur Molekülstruktur möglich. Jedoch muss immer der erhöhte Zeitaufwand und Lösungsmiteinsatz in Betracht gezogen werden, da zum einen bei der AF4 für jedes Polymer eine spezifische Messmethode entwickelt werden muss und zum anderen sich die Messzeit aufgrund der Basisliniensubtraktion verdoppelt. Speziell bei den hvz, aromatischen Polyestern ist die SEC für den Bereich der geringeren Molmassen der AF4 vorzuziehen, da hier der zeitliche Aufwand sowie der Lösungsmiteinsatz wesentlich geringer und die Genauigkeit der Ergebnisse höher ist.

3.3 Ergebnisse der Komplexierungsuntersuchungen von dendritischen Glykopolymeren

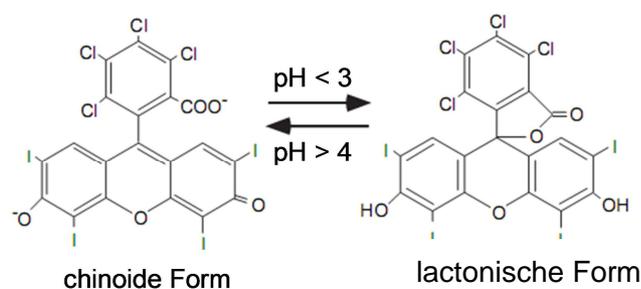
3.3.1 Beschreibung des Polymer-Farbstoff-Komplexes

In diesem Teil des Ergebniskapitels steht ein hochverzweigtes Poly(ethylenimin) (PEI) im Fokus, dessen Endgruppen mit Maltose modifiziert sind. Die Modifizierungen mit unterschiedlichen Dichten der Zuckerschale wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. D. Appelhans (IPF Dresden) durchgeführt und für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Modifizierung wird mittels reduktiver Aminierung in einer Einstufen-Synthese erhalten (siehe Schema 3-6 sowie Experimentalteil Schema 6-1).



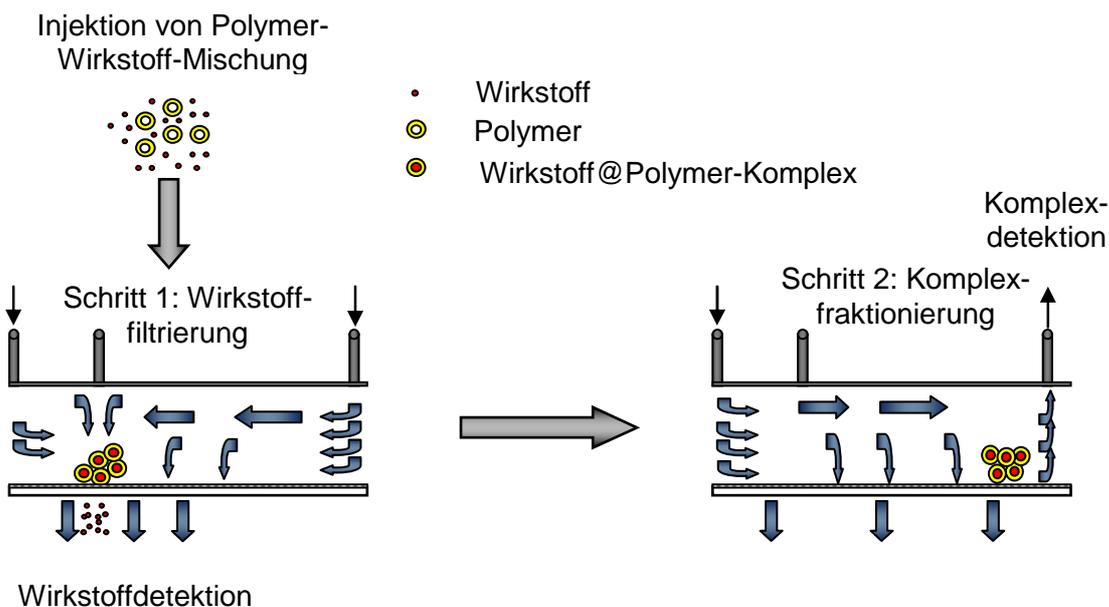
Schema 3-6: Reaktionsschema für Maltosemodifizierung von hvz PEI mit unterschiedlichem Dekorierungsgrad¹⁶⁷ beispielhaft dargestellt anhand einer funktionellen Endgruppe

PEI-Mal zeigt ein hohes Vermögen zur Aufnahme und zum Transport von Wirkstoffen. Um Aufnahme- und Freisetzungseigenschaften von verzweigten Glykopolymeren bei bestimmten Bedingungen wie Temperatur und pH-Wertänderungen untersuchen zu können, werden deren WW mit löslichen Farbstoffen als Modellsubstanzen für partiell geladene Wirkstoffe in wässrigen oder organischen Medien erforscht. Eine der am häufigsten angewandten Modellverbindungen für Verkapselungsuntersuchungen ist der kompakte, polare Farbstoff Rose Bengal (RB, siehe Schema 3-7).¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Die Triebkraft der Aufnahme bzw. Komplexbildung des Farbstoffes durch das Polymerträgermolekül wird durch elektrostatische, bevorzugt ionische WW sowie zusätzliche, etwas schwächere Hydroxy- π -Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem anionischen RB und dem kationischen PEI-Mal beschrieben.¹⁷¹



Schema 3-7: Chinoide und lactonische Struktur des Modellfarbstoffs Rose Bengal (RB) in Abhängigkeit des pH-Werts

Der große Vorteil liegt in der Detektionsmöglichkeit der Komplexbildung mit dem Polymer durch eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums im UV-Vis Spektrum.^{19, 172, 173} Die qualitative Untersuchung der Komplexbildung wurde mit zahlreichen Methoden, wie z. B. UV-Vis- und NMR-Spektroskopie durchgeführt.^{19, 174, 175} Jedoch war die quantitative Charakterisierung bisher durch zahlreiche Probleme limitiert. So sind z. B. direkte UV-Vis-Messungen^{176, 177} durch fehlende Kalibriermöglichkeiten begrenzt, da komplexe Copolymerstrukturen stets als Mischungen aus freiem RB und dem Polymer-Farbstoffkomplex vorliegen. Für die Kalibrierung werden außerdem definierte Komplexe benötigt, welche mit den bisherigen Methoden beispielsweise durch Ultrafiltration nicht erhalten werden konnten. Außerdem ist die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten nicht möglich, da dazu die genaue Lokalisierung des Farbstoffes innerhalb der Kern-Schale-Struktur des Polymers bekannt sein muss bzw. die Komplexität der Polymerstrukturen eine entscheidende Rolle spielt. Eine Kombination aus SEC und UV-Vis Spektroskopie ist speziell bei den multifunktionellen dendritischen Polymeren nicht anwendbar, da aufgrund von sehr starken WW mit dem SEC-Säulenmaterial (siehe Kapitel 2.3 und 3.2) keine bzw. eine verzögerte Elution stattfindet. Eine Größenbestimmung ist in diesem Fall bisher nur über die Dynamische Lichtstreuung (DLS) im Batch möglich. Nachteilig ist dabei jedoch, dass keine Auftrennung stattfindet und demzufolge nur Mittelwerte berechnet werden können. Diese werden durch mögliche Aggregationen verfälscht. Aus den genannten Gründen war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit mittels der AF4 eine neue Alternativmethode zu entwickeln, bei der eine eingehende Molmassencharakterisierung und gleichzeitig eine quantitative Untersuchung des komplexierten Farbstoffgehalts ermöglicht werden. Dabei sollten verschiedene Faktoren geprüft bzw. deren Einfluss bewertet werden. Das generelle Prinzip der alternativen Messmethode beruht dabei auf der Abfiltrierung und Detektion des freien Farbstoffgehalts und der anschließenden Fraktionierung bzw. Auftrennung innerhalb des Trennkanals mit anschließender Molmassencharakterisierung¹⁶⁷ (siehe Schema 3-8).



Schema 3-8: Prinzip der AF4-Messmethode zur Komplexquantifizierung mittels *Wirkstofffiltrierung* und *Komplexfractionierung* bei Injektion eines Polymer-Wirkstoff-Gemisches

Bei dem entwickelten Trennprinzip werden während der Fokussierphase die freien Farbstoffmoleküle mit ihrer geringen Größe ($M_{RB} = 1.017,6 \text{ g/mol}$) durch die Poren der Ultrafiltrationsmembran mit dem Fokus-Eluenten-Strom aus dem Kanal heraus transportiert (Schritt 1: *Wirkstofffiltrierung*). Bisher wurde dieser Prozess nur als positiver Nebeneffekt zur Aufreinigung von Lösungen beschrieben,^{178, 179} eine quantitative Untersuchung hat jedoch nicht stattgefunden. Anschließend wird der Gehalt an ausgespültem, ungebundenem RB mittels UV-Vis-Detektion, die sich am Querflussausgang bzw. der Abfallkapillare befindet, bestimmt. Die Fraktionierung bzw. größenabhängige Auftrennung der im Trennkanal verbliebenen RB-PEI-Mal-Komplexe (Schritt 2: *Komplexfractionierung*), die aufgrund ihrer Größe nicht durch die Poren der Membran migrieren können, findet während der gleichen Messung direkt im Anschluss an die Filtrierung statt. Eine eingehende Molmassencharakterisierung wird durch eine LS-RI-Detektion realisiert.

3.3.2 Voruntersuchungen und Messmethodenoptimierung

Zu Beginn der Messmethodenentwicklung wurde das Absorptionsmaximum von RB bestimmt sowie überprüft, ob eine Komplexbildung stattfindet. Dazu wurden UV-Vis Spektren von reinem RB und dem RB-PEI-Mal Gemisch (1:1) bei verschiedenen pH-Werten im Batch aufgenommen (siehe Abbildung 3-5). Rose Bengal liegt abhängig vom pH-Wert in verschiedenen Zuständen vor: im stark sauren Milieu (unterhalb von $\text{pH} = 3$)

farblos in neutraler, lactonischer Form charakterisiert durch ein breites Spektrum mit sehr geringer Absorption und oberhalb von $\text{pH} = 4$ in negativ geladener, chinoider Form (siehe Schema 3-7) mit einem ausgeprägten Maximum bei $\lambda = 550 \text{ nm}$.

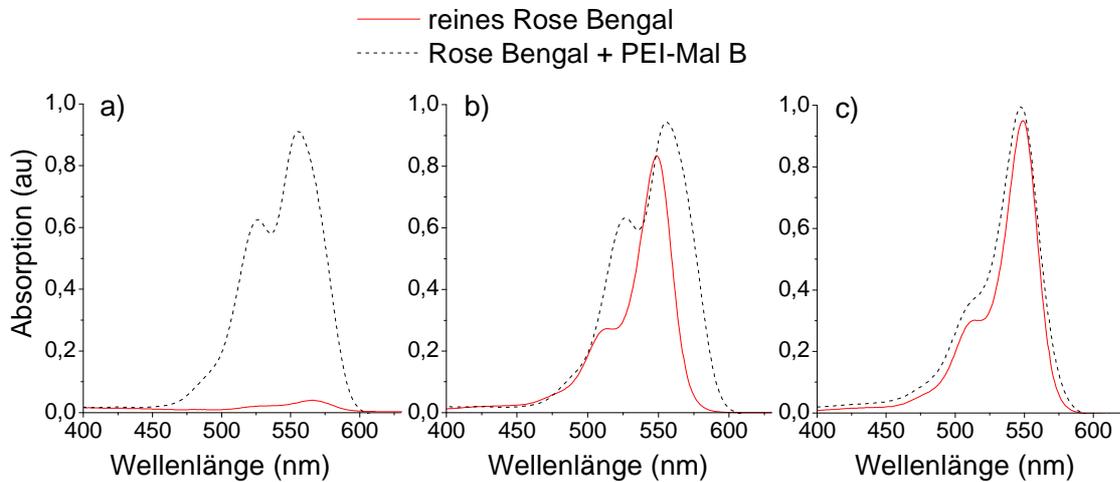


Abbildung 3-5: UV-Vis Spektren mit der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge von reinem RB und PEI-Mal B bei verschiedenen pH-Werten a) $\text{pH} = 2$; b) $\text{pH} = 6,7$ und c) $\text{pH} = 11,5$

Aus den Spektren (siehe Abbildung 3-5) ist eindeutig zu entnehmen, dass die Lage des Absorptionsmaximums von der Umgebung des Farbstoffes beeinflusst wird. Bei $\text{pH} = 6,7$ ist die bathochrome Verschiebung zu höheren Wellenlängen ($\lambda = 558 \text{ nm}$) ein Beweis für die stattfindende Komplexierung von RB und PEI-Mal. Im basischen Milieu bei $\text{pH} = 11,5$ kann dagegen keine Verschiebung beobachtet werden, was darauf zurückzuführen ist, dass aufgrund der negativen Ladung und daraus resultierenden Abstoßungseffekte beider Komponenten keine Komplexierung stattfindet. In saurer Lösung ($\text{pH} = 2$) unterscheidet sich das Spektrum des freien Farbstoffes im Vergleich zu dem gebundenen RB ebenfalls deutlich. Da der Farbstoff bei diesem pH-Wert in lactonischer Form fast farblos ist, sind die Absorptionswerte sehr gering. Weil jedoch eine geringe Verschiebung beobachtet wird, kann davon ausgegangen werden, dass auch unter diesen Bedingungen eine Komplexierung stattfindet. Mit diesen UV-Vis Messungen im Batch konnten die Affinität von RB zu dem Glykopolymer unter bestimmten Bedingungen qualitativ bestätigt werden und gleichzeitig die Lage des Absorptionsmaximums von RB für die quantitative Bestimmung nach der Auftrennung ermittelt werden.

Eine hohe Komplexität der Versuche wird durch eine Vielzahl von Faktoren verursacht. Ein Überblick über die Versuchsplanung ist im Schema A-1 im Anhang dargestellt. Die folgenden Untersuchungen zur Methodenoptimierung wurden der einfachen Durchführ-

barkeit halber (z. B. hoher Eluentenverbrauch) in Lösungen mit reinem Wasser durchgeführt. Der erste Schritt der Optimierung bestand aus der Erstellung einer Kalibrierung des online-UV-Vis-Detektors (bei $\lambda = 550 \text{ nm}$) mit einer geeigneten Messmethode. Die Methode A (siehe Experimentalteil, Abbildung 6-2) besteht dabei aus der Fokussierungsphase, während welcher die *Filtrierung* des freien Farbstoffanteils stattfindet. In der anschließenden Phase der *Fraktionierung* wird der Farbstoff-Polymer-Komplex aufgetrennt und eluiert. Dabei war es wichtig, dass während der *Filtrierung*, unabhängig von der injizierten Menge, der komplette Gehalt an freiem RB aus dem Kanal ausgespült wird. Dadurch wird sichergestellt, dass es bei der *Fraktionierung* nicht zur zusätzlichen Elution von noch vorhandenem, freiem RB kommt, welches bei der Gehaltsbestimmung nicht mit berücksichtigt werden kann.

Der verhältnismäßig starke, langanhaltende Fokussierfluss (3 ml/min für 20 min) der *Methode A* ist vergleichbar mit den Flüssen, die bei der Ultrafiltration vorherrschen, welche bei der bisherigen Untersuchung solcher Komplexierungs- und Verkapselungsstudien angewandt wurden. Dadurch werden schwache WW zwischen Polymer und Farbstoff unterbunden und nur stabile Komplexe können aufgetrennt werden.

Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften und der Neigung zu WW sind sowohl bei RB als auch der Ultrafiltrationsmembran Adsorptionerscheinungen zu erwarten. Durch die Kanalarchitektur mit einem Polycarbonatfenster wurden diese sogar sichtbar (siehe Abbildung 3-6a). Um sie näher zu untersuchen, wurde eine frische Membran mit sukzessiven Wiederholungsmessungen von $50 \mu\text{g}$ einer reinen RB-Lösungen modifiziert (Abbildung 3-6b). Dabei zeigte sich, dass sich schon nach der vierten Injektion ein stabiler Wert der UV-Vis-Signalfächen einstellte und Abweichung zwischen den darauffolgenden Injektionen weniger als 2 % betrug. Das Experiment wurde anschließend mit der doppelten RB-Menge durchgeführt. Hierbei betrug die Abweichung von den ersten zur zweiten Injektion noch 100 %, nach der Vierten jedoch nur noch 0,7 % mit reproduzierbaren Werten der Signalfächen der folgenden Injektionen. Diese Ergebnisse führen zu der Aussage, dass eine RB-Masse von mindestens $250 \mu\text{g}$ benötigt wird, um eine stabile Schicht auf der Membranoberfläche zu erhalten.

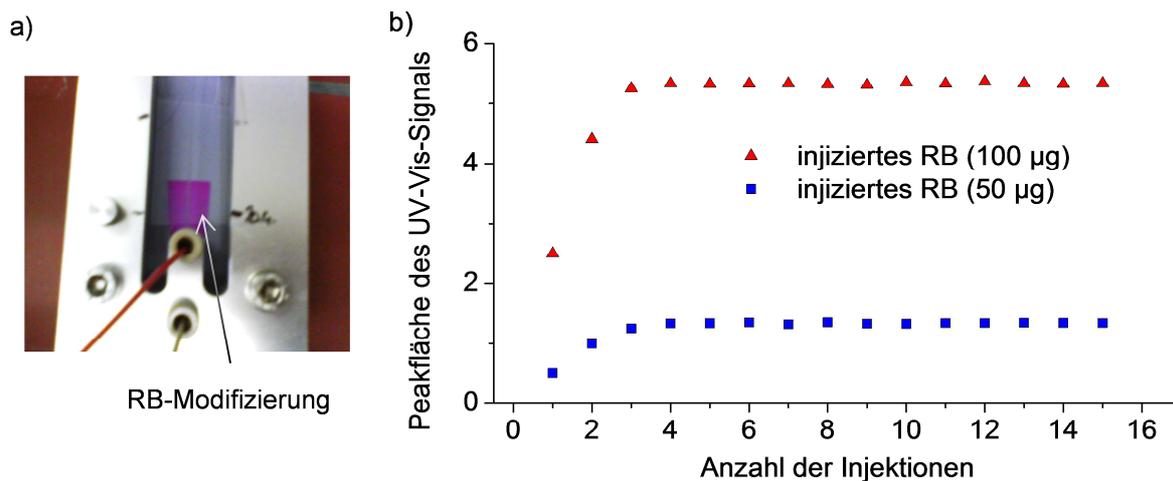


Abbildung 3-6: a) Foto der RB-Membranmodifizierung und b) Flächen des UV-Vis-Signals (bei 550 nm) von 15 sukzessiven Injektionen einer reinen RB-Lösung zur Membranmodifizierung während der *Filtrierung*

Um die Stabilität der erzeugten Schicht zu untersuchen, wurde an den Kanalausgang ein UV-Vis Detektor angeschlossen und das Signal online beim Umschalten sowie während der anschließenden *Fraktionierung* beobachtet. Dabei wurde kein Signal von RB, unabhängig davon, wie viele Messungen gemacht wurden, detektiert. Eine weitere offene Frage war, ob injiziertes PEI-Mal sich auf der Oberfläche befindendes RB komplexiert. Dazu wurde, unter Verwendung einer modifizierten Membran, reines Polymer injiziert und mit der entwickelten Methode innerhalb des Trennkanals fraktioniert. Da auch hier kein RB-Signal im UV-Vis-Detektor beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass sich tatsächlich eine stabile Farbstoffschicht auf der Membranoberfläche ausbildet. Somit wurde bei jedem Membrantausch vor den Untersuchungen die Membran mit einer stabilen RB-Schicht modifiziert. Da sich die chemische Struktur von regenerierter Cellulose nicht von nativer Cellulose unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund von Hydroxy- π -Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen die Modifizierung bei den verwendeten Bedingungen stabil ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde im nächsten Versuch Polyethersulfon (PES, 10 kDa Porengröße) statt der regenerierten Cellulose als Membranmaterial verwendet. Dabei wurden reine RB-Lösungen verschiedener Konzentrationen injiziert und die UV-Vis-Signale beobachtet. Erstaunlicherweise wurde während der *Filtrierung* keinerlei Detektorsignal am Querflussausgang aufgezeichnet, dafür jedoch während der anschließenden Fraktionierung am Kanalausgang. Es liegt die Vermutung nahe, dass eine *Filtrierung* durch Abstoßungseffekte aufgrund von ionischen WW mit der Membranoberfläche verhindert wird und somit der komplette

Gehalt an RB während der *Fraktionierung* aus dem Kanal eluiert wird. Aus diesem Grund ist eine PES-Membran ungeeignet für die Komplexierungsversuche.

3.3.3 Detektorkalibrierung und Durchführung von Reproduzierbarkeitstests

Ziel dieser Experimente war es, über das UV-Vis-Signal eine Quantifizierung der filtrierten, ungebundenen RB-Moleküle zu ermöglichen. Dazu wurden nach vorheriger Membranmodifizierung drei Konzentrationsreihen aus einer Stammlösung hergestellt, injiziert und die UV-Vis-Signalflächen in Abhängigkeit der injizierten RB-Masse aufgetragen (siehe Abbildung 3-7).

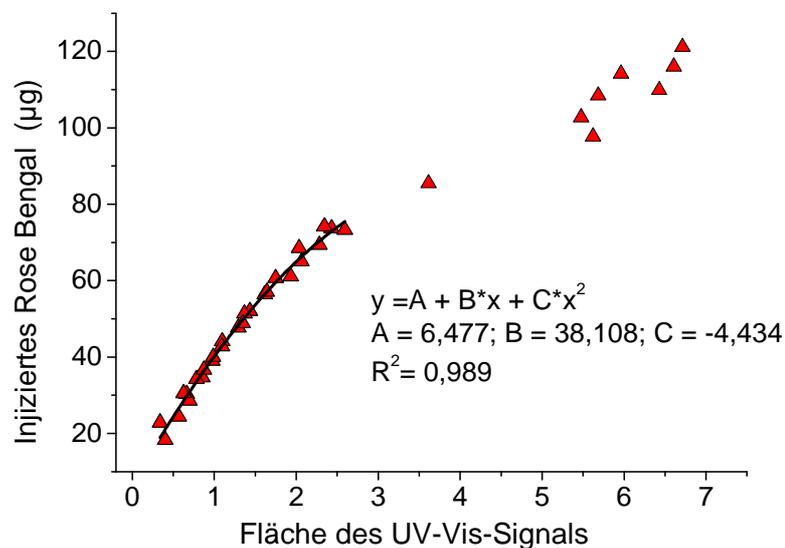


Abbildung 3-7: Ermittelte Kalibriergleichung für die quantitative RB-Bestimmung (polynomialer Fit) während der *Filtrierung*, injizierte RB-Menge in Abhängigkeit der UV-Vis-Signal-Fläche (bei 550 nm)

Hierbei wurde gleichzeitig der Einfluss der Ausschlussgrenze der Membran getestet. Da jedoch keine Unterschiede bei dem Einsatz von 5 und 10 kDa Porengrößen festgestellt wurden, konnten die Resultate von beiden Messreihen für die Kalibrierung verwendet werden. Der Variationskoeffizient zwischen den einzelnen Wiederholungsmessungen lag unterhalb von 0,2 %. Der Messbereich der Kalibrierung liegt zwischen 16 und 80 µg. Die untere Grenze wird durch das Detektionslimit (Sensitivität) des UV-Vis-Detektors verursacht, während die obere Grenze durch den dynamischen Bereich, in dem das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt, festgelegt wird. Höhere Werte wurden nicht berücksichtigt, da die Genauigkeit der Kalibrierung (Regressionsfaktor) deutlich abnimmt und der Fehler der berechneten Massen ansteigt. Der isolierte RB-Gehalt kann somit nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$RB - \text{Gehalt} = 6,477 + 38,108 \cdot (\text{Signalfläche}) - 4,434 \cdot (\text{Signalfläche})^2 \quad \text{Gleichung 3-4}$$

Als Nachweis zur Genauigkeit der Kalibrierung wurden Reproduzierbarkeitstests durchgeführt, indem verschiedene, definierte Mengen von Rose Bengal injiziert und die berechnete mit der tatsächlichen Masse verglichen wurden. Dazu wurde das Injektionsvolumen variiert, um dessen Einfluss auf die Genauigkeit zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3-2 dargestellt.

Tabelle 3-2: Resultate der Injektionen von einer reinen RB-Lösung ($c = 0,33 \text{ mg/ml}$) mit unterschiedlichen Injektionsvolumina zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit während der *Filtrierung*

Injiziertes Volumen (μl)	Injizierte Masse (μg)	UV-Vis- Signalfläche	Berechnete Masse (μg)
50	16,5	0,492	17
100	33	0,996	33
200	66	2,006	64

Die Werte der injizierten Masse konnten sehr gut mit den Ergebnissen der Gleichung 3-4 korreliert werden. Anschließende Messungen von RB-Lösungen mit Konzentrationen von 0,72 und 0,9 mg/ml und variierten Injektionsvolumina (25, 50 und 100 μl) bestätigten die gute Wiederfindung zwischen injizierter und detektierter RB-Masse innerhalb eines Variationskoeffizienten von weniger als 1 %. Einzige Ausnahme stellte hierbei die Messung der RB-Konzentration von 0,9 mg/ml mit einem Injektionsvolumen von 100 μl dar, bei der die zu bestimmende Masse mit 90 μg außerhalb der Kalibriergrenzen lag und demzufolge die Abweichung mit 18 % zu groß war.

3.3.4 Stabilität der Lösungen und Einfluss eines nicht-komplexierten Polymers

Im anschließenden Untersuchungsschritt wurde die Stabilität der Lösungen getestet. RB-Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen (0,5; 1,0 und 3,0 mg/ml) wurden unter gleichen Bedingungen (Methode A) über einen Zeitraum von 10 Tagen im Abstand von 12 h injiziert um die UV-Vis-Signale zu vergleichen. Die Lösungen wurden unter Standardbedingungen ohne zusätzliche Verdunkelung aufbewahrt. Die Ergebnisse zeigten mit einer Abweichung unterhalb von 1 % hervorragende Stabilität bzw. gutes UV-Vis-Absorptionsverhalten.

Auf der Basis der optimierten Messmethodenbedingungen (Methode A) sollte anschließend der Einfluss der *Filtrierung* in Gegenwart eines Polymers, welches keine Komplexbindung verursacht, in Lösung untersucht werden. Hierzu wurde Poly(ethylenglykol) (PEG) als Beispielsubstanz ausgewählt, welche nicht mit RB interagiert. Es wurde eine Mischung (1:1) aus RB und PEG (jeweils 1 mg/ml) hergestellt und mit der entwickelten Trennmethode vermessen. Dazu wurden die UV-Vis-Signale sowohl am Querflussausgang als auch am Kanalausgang erfasst. Während die Signale bei der *Filtrierung* die erwarteten, unveränderten Werte der Signalintensitäten bzw. -flächen in guter Korrelation zu den injizierten Werten zeigten, wurde während der *Fraktionierung* kein RB eluiert bzw. kein UV-Vis-Signal detektiert. Das führt zu der Aussage, dass der gesamte Gehalt an RB während der *Filtrierung* aus dem PEG-RB-Gemisch entfernt wurde und keine Transport- bzw. Verzögerungseffekte durch das PEG stattgefunden haben.

3.3.5 Molmassenbestimmung der Glykopolymere

Um den Molmassenzuwachs in Abhängigkeit der Komplexierung des RB-PEI-Mal-Systems zu untersuchen, ist die Kenntnis des Ausgangswertes von großer Bedeutung. Für die Komplexierungsversuche wurden drei PEI-Mal Strukturen (A - C, siehe Schema 3-6) mit gleichem Kern und variierten Dekorierungsgraden der funktionellen Endgruppen bzw. Dichtegraden der Maltosehülle verwendet. Da der hochverzweigte PEI-Kern den Ausgangspunkt für alle Untersuchungen darstellt, sind die Kenntnis von Molmasse und deren Verteilung von grundlegender Bedeutung. Die Molmasse wurde in früheren Arbeiten mit $M_n = 9.500 \text{ g/mol}$ und $M_w = 25.000 \text{ g/mol}$ angegeben.¹⁸⁰ Diese Werte beruhen jedoch auf einer Kalibrierung mit Pullulan-Standards. Die Nachteile davon wurden in dem Punkt 2.3 ausführlich erläutert. Für verlässliche Werte, die einen Vergleich mit weiteren Ergebnissen erlauben, ist eine Molmassenbestimmung mit Lichtstreuung unumgänglich. Eine vollständige Auftrennung war mittels AF4-LS in reinem Wasser leider nicht möglich, da die niedermolekularen Anteile die Poren (5 kDa) der Ultrafiltrationsmembran passieren und mit dem Querfluss aus dem Kanal hinaus transportiert wurden. Die Folgen davon sind sowohl zu hohe mittlere Molmassen als zu enge Molmassenverteilungen. In dem speziellen Fall des hvz PEI lagen die Werte bei $M_n = 28.000 \text{ g/mol}$ und $M_w = 30.500 \text{ g/mol}$ bzw. $M_w/M_n = 1,09$. Die Wiederfindung lag bei diesen Messungen nur bei 53 %. Eine vollständige Auftrennung sollte mittels SEC-

LS möglich sein. Im wässrigen Medium interagierten die Polymermoleküle zu stark mit dem Säulenmaterial, sodass eine eingehende Charakterisierung nicht gewährleistet werden konnte. Aus diesem Grund wurden SEC-Messungen in DMAc/LiCl mit Zugabe einzelner Tropfen Wasser zur Unterdrückung von Adsorptionserscheinungen und Bildung von H-Brücken (SEC-System 2, siehe Kapitel 6.2) durchgeführt. Die erhaltenen Werte liegen bei $M_n = 11.200 \text{ g/mol}$; $M_w = 37.200 \text{ g/mol}$ und $M_w/M_n = 3,32$. Die SEC-Chromatogramme und die Molmassenverteilung sind in der folgenden Abbildung 3-8 dargestellt.

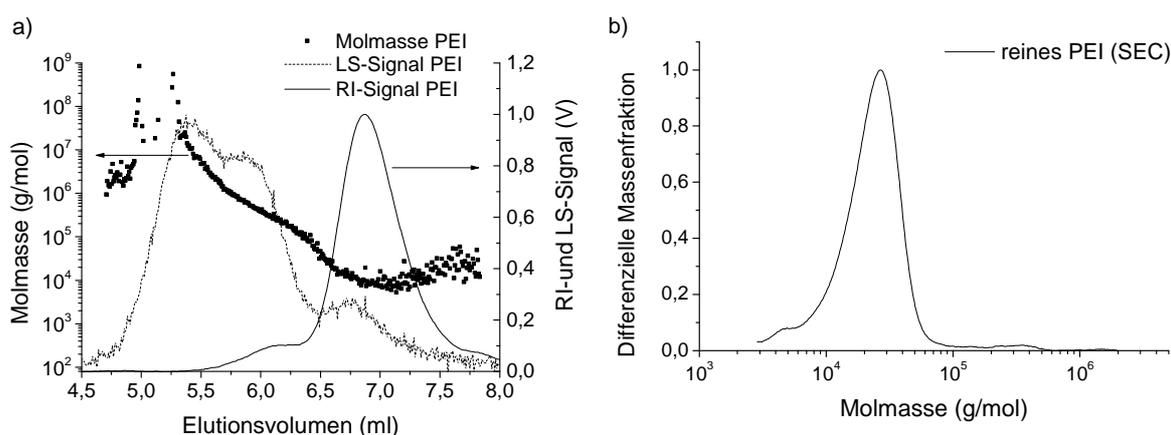


Abbildung 3-8: a) SEC-Chromatogramm von reinem PEI mit Molmassen und LS- bzw. RI-Signalen in Abhängigkeit des Elutionsvolumens in DMAc/LiCl (SEC-System 2) und b) zugehörige Molmassenverteilung von reinem PEI

Die erhaltenen, multimodalen Chromatogramme zeigen einen typischen Verlauf für vorhandene WW mit dem Säulenmaterial. Diese werden durch das Ansteigen der Kalibrierkurve im niedermolekularen Bereich sichtbar bzw. durch die verzögerte Elution werden größere Moleküle später als üblich detektiert. Im hochmolekularen Bereich ist ein geringer Anteil an Partikeln mit sehr großer Molmasse erkennbar. Ebenso wird dies an der kleinen Schulter in der Molmassenverteilung im hochmolekularen Bereich deutlich. Um eine genaue Molmasse zu erhalten, wurde in diesem Fall eine probenspezifische Kalibrierung durchgeführt, in dem der lineare Molmassenverlauf in den niedermolekularen Bereich verlängert wurde (siehe Experimentalteil 6.2).

Zur Herstellung der Kern-Schale-Polymere wurde die Oligosaccharidhülle mittels reduktiver Aminierung und stöchiometrischen Einsatzes von Maltose dargestellt. Struktur A besitzt hierbei die dichteste Oligosaccharidschale, bei der nur etwa 10 % der Aminogruppen unreaktiv sind, während die Anzahl an Maltoseeinheiten bei PEI-Mal B und C abnimmt (siehe Schema 3-6).¹⁷¹

Die Bestimmung der Molmasse mittels SEC-LS war bei diesen nicht-komplexierten Polymeren nicht möglich, da aufgrund von WW der Oligosaccharidhülle mit dem Säulenmaterial eine irreversible Adsorption der Proben im Inneren der Säule stattfand und keine Elution erfolgte. Aus diesem Grund wurden AF4-LS-Untersuchungen durchgeführt. Um eine Aggregation zu verhindern, wurden die Messungen im Vergleich zur o.g. RB-Komplex-Quantifizierungsmethode unter sanfteren Bedingungen durchgeführt. Bei zu starken Fokussierbedingungen kann durch Aufkonzentration der Probenmoleküle eine Aggregatbildung forciert werden. Aus diesem Grund wurde die Fokussierzeit von 20 auf 2 min bzw. der Fokussierungsfluss von 3 auf 1,5 ml/min vermindert (*Methode B*, siehe Kapitel 6.2). Außerdem wurde der Einfluss der injizierten Masse bei identischen Messbedingungen untersucht. In Abbildung 3-9 sind stellvertretend für die drei PEI-Mal Proben die Molmassen von PEI-Mal C in Abhängigkeit der Probenmenge dargestellt. Mit steigender Probenmenge wird deutlich, dass die Molmasse und deren Abweichung abnehmen. Dieser Effekt ist bei allen drei PEI-Mal Proben zu beobachten und wurde schon von Wahlund et al.¹⁸¹ im Rahmen seiner Studien von Überladungseffekten beschrieben. Hinzu kommt, dass mit abnehmender Injektionsmasse auch die Intensität der Detektorsignale und demzufolge die Messgenauigkeit abnimmt. Aus diesem Grund ist eine Mindestmenge von 60 µg für eine akkurate Molmassenbestimmung notwendig.

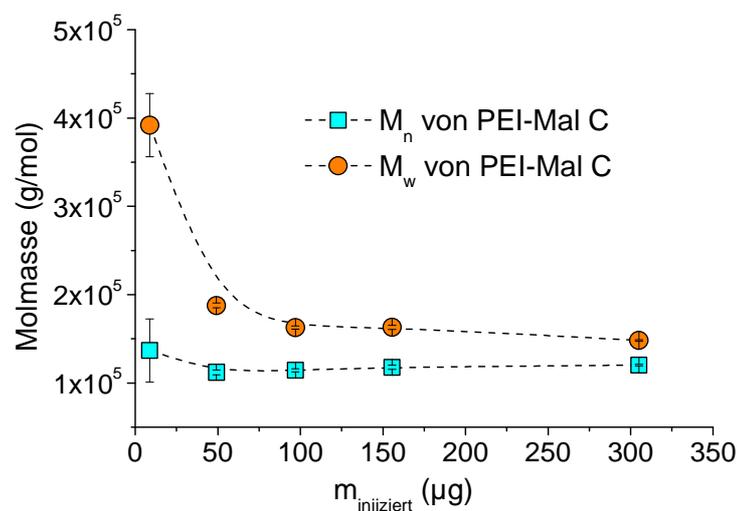


Abbildung 3-9: Molmassen und deren Messfehler als Funktion der injizierten Probenmenge von PEI-Mal C bestimmt mittels AF4-LS

In Tabelle 3-3 sind die ermittelten Molmassen ($m_{\text{injiziert}} = 120 \mu\text{g}$) in Abhängigkeit des Dekorierungsgrades der drei PEI-Mal Proben aufgelistet.

Tabelle 3-3: Dekorierungsgrad (bestimmt mittels NMR)¹⁷¹ und Molmassen der PEI-Mal Strukturen bestimmt mittels AF4-LS

Struktur	Dekorierungsgrad (%)	Theoretische Molmasse ^{a)}	M_n ^{b)} (g/mol)	M_w ^{b)} (g/mol)	(M_w/M_n) ^{b)}
PEI-Mal A	90	108.000	215.000	489.000	2,27
PEI-Mal B	40	59.400	201.000	378.000	1,88
PEI-Mal C	20	35.300	114.000	163.000	1,43

^a berechnet mittels verfügbarer Aminogruppen (ermittelt über Elementaranalyse und NMR¹⁷¹, $P_n = 266,5$), ermitteltem M_n und angestrebter Anzahl an Maltose-Einheiten

^b bestimmt mittels AF4-LS, *Methode B* (siehe Kapitel 6.2)

Anhand dieser Resultate und der zugehörigen LS-Signale (siehe Abbildung 3-10a) zeigt sich deutlich, dass die Molmasse in Abhängigkeit der Anzahl der Maltoseeinheiten steigt. Die Intensitäten des Lichtstreusignals nehmen ebenfalls mit steigender Maltosegruppenanzahl zu, was ebenfalls auf einen Molmassenzuwachs hindeutet. Beispielsweise hat PEI-Mal C, mit dem geringsten Dekorierungsgrad, die geringste Molmasse und demzufolge die Lichtstreu Kurve mit der geringsten Intensität. Die Chromatogramme verschieben sich mit der Molmasse wie erwartet zu höheren Elutionszeiten. In der Molmassenverteilung (Abbildung 3-10b) ist ein Ansteigen des hochmolekularen Anteils mit zunehmender Maltosedichte in der äußeren Schale erkennbar. Im Vergleich zu den erwarteten, theoretischen Molmassen sind die tatsächlichen Werte höher. Das kann durch die Ungenauigkeit in der Bestimmung der freien Aminogruppen durch NMR-Spektroskopie und Elementaranalyse verursacht worden sein, da diese bei so hohen Umsätzen nur tendenzielle Werte liefern. Daraus resultieren fehlerhafte Berechnungen der freien Endgruppen und demzufolge des Einsatzes an Maltoseeinheiten. Da die Ergebnisse bei den AF4-Messbedingungen stabil und reproduzierbar waren, werden diese für weitere Berechnungen zu Grunde gelegt. Auch der Einfluss der Fokussierung machte sich bemerkbar, da die Aggregation hier durch Aufkonzentration der PEI-Mal-Moleküle begünstigt wird. Bei einer längeren und stärkeren Fokussierung wurden deutlich höhere Werte ermittelt (für PEI-Mal B $M_n = 410.000$ g/mol).

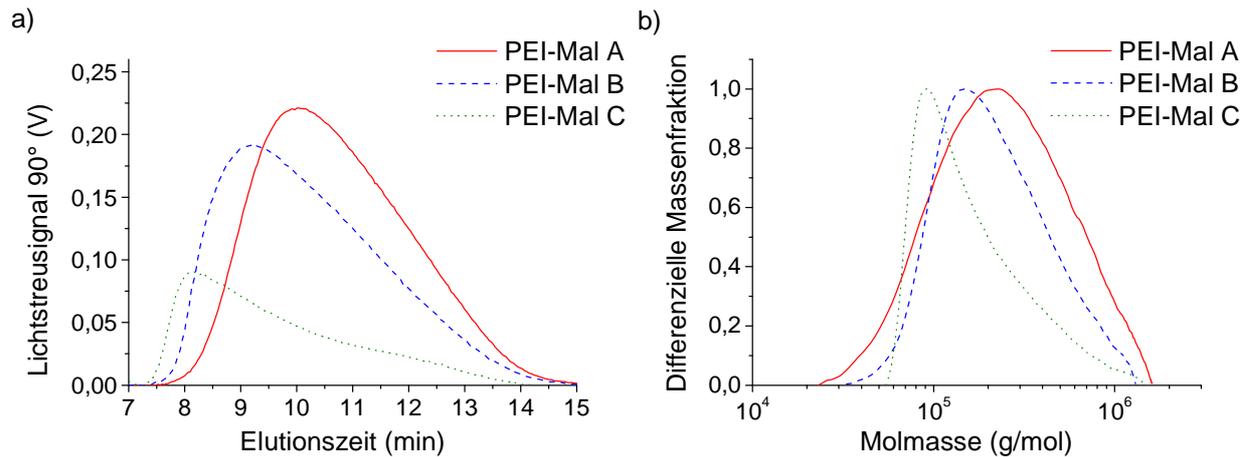


Abbildung 3-10: a) LS-Elutionskurven in Abhängigkeit der Elutionszeit und b) Molmassenverteilungen von PEI-Mal A-C bestimmt mittels AF4-LS

3.3.6 Komplexierungsstudien und Ergebnisverifizierung

Nachdem verschiedene Einflüsse und Faktoren überprüft wurden, konnten erste Komplexierungsuntersuchungen durchgeführt werden. Dazu fanden Vorversuche durch einfaches Zusammengeben von RB und der jeweiligen PEI-Mal Probe statt (molares Verhältnis_{RB:PEI-Mal} ~ 150:1). Im Fall von PEI-Mal A kam es durch die sehr hohe Molmasse, welche bei Komplexierung von einer hohen Anzahl von RB-Molekülen erreicht wird, zur sofortigen Ausfällung des Komplexes. Bei PEI-Mal C ist möglicherweise der geringe Dekorierungsgrad die Ursache dafür, dass der Komplex ebenfalls ausfällt. Einzig bei PEI-Mal B konnte bei diesem molaren Verhältnis kein Ausfällen beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden die folgenden, ersten Untersuchungen mit dieser Probe durchgeführt, da es zu dokumentieren galt, ob die entwickelte Methode für Komplexierungsversuche geeignet ist. Dabei sollte der Einfluss der Zusammensetzung der Mischung aus RB und PEI-Mal bzw. zeitabhängigen Molmassenänderungen analysiert werden. Als repräsentatives Beispiel für die Vielzahl von Daten, die aus den Komplexierungsuntersuchungen erhalten wurde, soll die Mischung aus 75 µg RB und 87,5 µg PEI-Mal (Verhältnis 1 : 169, siehe Tabelle 3-4) näher erläutert werden.

Der während der *Filtrierung* isolierte RB-Gehalt wurde mit Gleichung 3-4 und den jeweiligen Flächen der UV-Vis-Signale berechnet. Da der genaue Anfangsgehalt von RB bekannt ist, kann die Menge an komplexierten bzw. aufgenommenen Farbstoff zurückgerechnet werden. Ein Molmassenzuwachs ist unmittelbar nach dem Mischen der beiden Komponenten nachweisbar (siehe Abbildung 3-11a). Für die Bestimmung der Molmasse mittels LS-RI-Kombination wurde das Brechungsindexinkrement von

0,100 ml/g für den RB@PEI-Mal Komplex extern mit verschiedenen molaren Verhältnissen ermittelt. Über die gesamte Messzeit bleiben zum einen der Molmassenzuwachs und zum anderen der isolierte bzw. komplexierte RB-Gehalt konstant. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine sehr schnelle Komplexbildung stattfindet und der Größenzuwachs dann über den gesamten Zeitraum der Untersuchung stabil ist bzw. die einzelnen Messwerte nur marginale Abweichungen voneinander zeigen. Inwiefern eine Langzeitstabilität vorhanden ist, oder ob nach einer bestimmten Zeit wieder eine Abgabe von Farbstoffmolekülen stattfindet, wurde im Rahmen dieser Methodenentwicklung nicht untersucht, ist jedoch Gegenstand von weiterführenden Untersuchungen.¹⁸² Die sehr hohe mittlere Molmasse von $M_n = 464.000$ g/mol, welche nach der Fraktionierung mittels LS-Detektion bei den starken Fokussierungsbedingungen der *Methode A* (siehe Kapitel 6.2) bestimmt wurde, ist deutlich höher als der erwartete Wert. Dieser ergibt sich aus dem Zuwachs der entsprechenden RB-Stoffmenge, welche sich aus den jeweiligen RB-Massen berechnet, und der Ausgangsmolmasse von PEI-Mal B (siehe Gleichung 3-5).

$$M_{\text{Kkompl.}} = M_{n,\text{PEI-MalB}} + \frac{n_{\text{RB,geb.}}}{n_{\text{PEI-Mal,inj.}}} \cdot M_{\text{RB}} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

Tabelle 3-4: Ergebnisse der Komplexbildungsuntersuchungen am Beispiel der Mischung mit dem molaren Verhältnis RB:PEI-Mal von 1:169 bestimmt mit AF4-*Methode A* und *B*

AF4-Messmethode	Mol. Verhältnis PEI-Mal:RB (injiziert)	$M_{n,\text{PEI-Mal B}}$ (g/mol)	$n_{\text{RB,geb.}}$ (mol)	$n_{\text{PEI-Mal,inj.}}$ (mol)	M_{RB} (g/mol)	$M_{\text{Kkompl.}}$ (g/mol)
<i>Methode A</i> ¹	1:169	201.000	$4,2 \cdot 10^{-8}$	$4,36 \cdot 10^{-10}$	1017,6	299.000
<i>Methode B</i> ²	1:169	201.000	-	-	1017,6	292.000

¹...berechnet mit Gleichung 3-5

²...bestimmt mittels AF4-LS, Molmassenzuwachs korreliert mit $\text{RB}_{\text{geb.}}$

In diesem speziellen Fall liegt die erwartete Molmasse bei rund 299.000 g/mol. Um die Genauigkeit des bestimmten M_n zu prüfen, wurde diese Mischung erneut über einen Zeitraum von 630 min vermessen. Diesmal jedoch bei den „sanfteren“ Bedingungen der *Methode B* (siehe Kapitel 6.2), bei der die Fokussierungsbedingungen nicht mehr so stark sind, wie bei *Methode A*. Die erhaltene Molmasse (siehe Abbildung 3-11) ist nun mit 292.000 g/mol deutlich geringer und sehr gut mit dem Wert korrelierbar, der mittels der UV-Vis-Detektion bestimmt wurde. Das lässt darauf schließen, dass die Fokussierzeit

und -stärke des Flusses einen großen Einfluss auf die Aggregatbildung von PEI-Mal hat. Ebenso ist auch der Trend der Molmassen in dem untersuchten Zeitraum der gleiche, wie mit den extremen Fokussierbedingungen der *Methode A*. Über den gesamten Zeitraum bleiben die Molmassen konstant (siehe Abbildung 3-11a), was darauf hindeutet, dass die Komplexbildung sehr schnell stattfindet und die Komplexe stabil sind. Jedoch kann mit *Methode B* keine quantitative Bestimmung des freien Anteils an RB erfolgen, da hier nicht der gesamte freie RB-Anteil während der *Filtrierungsphase* aus dem Kanal ausgespült werden kann. Untersuchungen zur Filtrierung während der Elutionsphase führten nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Somit werden hierfür die Ergebnisse der *Methode A* verwendet. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass die Aggregation die Komplexbildung des Farbstoffes nicht beeinflusst, da die Farbstoffaufnahme schon vor der Fokussierung im Trennkanal stattfindet.

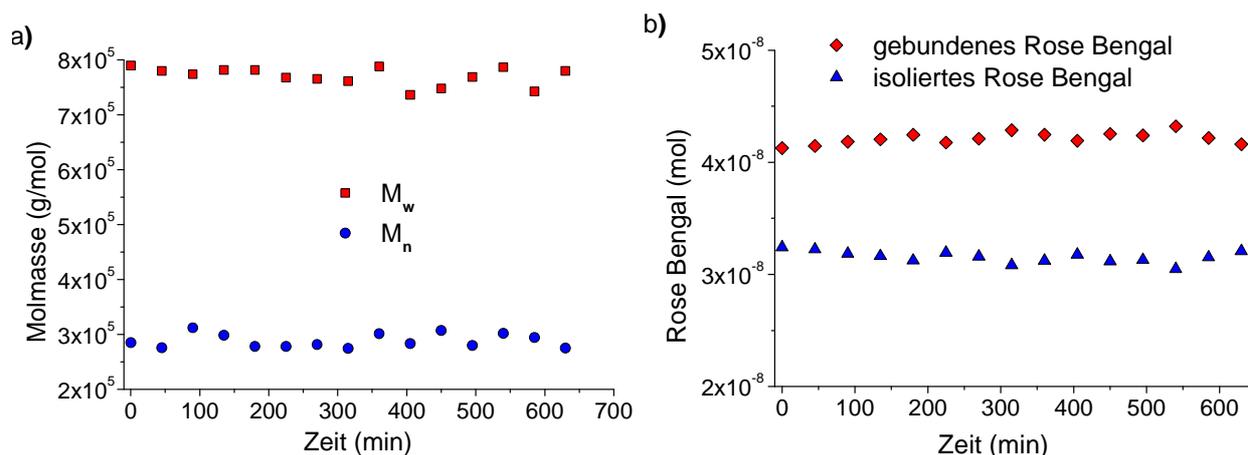


Abbildung 3-11: Ergebnisse der Komplexbildungskinetik von RB und PEI-Mal B (Verhältnis 1 : 169) a) mittlere Molmassen des Komplexes in Abhängigkeit der Zeit bestimmt mit AF4-LS während der *Fraktionierung (Methode B)* und b) isolierter und komplexierter RB-Gehalt bestimmt während der *Filtrierung* mittels UV-Vis (*Methode A*)

Die Werte des isolierten bzw. gebundenen RB, die über UV-Vis-Detektion bestimmt wurden, zeigen ein ähnliches Verhalten (Abbildung 3-11b) wie die Molmassenwerte, welche mit der LS-Detektion erhalten wurden. Der Variationskoeffizient zwischen den einzelnen Injektionen ist in jedem Fall unterhalb von 1,7 %. Mit diesen Daten kann errechnet werden, wie viele Farbstoffmoleküle von dem Polymer durchschnittlich aufgenommen werden. In diesem speziellen Fall wurden von einer Ausgangsmischung von 169 RB Molekülen pro PEI-Mal Molekül nach der *Filtrierung* 96 Farbstoffmoleküle von einem Polymermolekül komplexiert bzw. aufgenommen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei den darauffolgenden Untersuchungen im Anschluss an die Messungen mit *Methode A* zur RB-Bestimmung mit UV-Detektion die Molmassensbestimmung bei den „sanfteren“ Bedingungen (*Methode B*) über 630 min für alle anderen RB und PEI-Mal Zusammensetzungen durchgeführt (siehe Tabelle 3-4). Die auf diesem Weg ermittelten Molmassen stehen ebenfalls in guter Korrelation zu den Ergebnissen, die während der Filtration mittels UV-Vis-Detektion erhalten wurden. Die Injektion der Mischung mit dem größten Überschuss an RB (657:1) führt dazu, dass die Molmasse weiter ansteigt, jedoch hier der Gehalt an filtriertem, freien RB außerhalb der Kalibriergrenzen (siehe Abbildung 3-7) liegt und somit mittels UV-Vis-Detektion nicht akkurat bestimmt werden konnte. Daher wird hierfür der Wert verwendet, der mittels Molmassenzuwachs bestimmt wurde (271 komplexierte RB-Moleküle pro PEI-Mal).

Tabelle 3-5: Vollständige Ergebnisübersicht der quantitativen Komplextionsuntersuchungen von RB und PEI-Mal B in reinem Wasser mittels AF4-LS

RB _{inj.} µg (10 ⁻⁸ mol)	PEI-Mal _{inj.} ^{a)} µg (10 ⁻¹⁰ mol)	Molares Verhältnis RB:PEI-Mal (injiziert)	RB _{isoliert} (10 ⁻⁸ mol)	RB _{gebunden} (10 ⁻⁸ mol)	Molares Verhältnis RB@PEI-Mal im Komplex	M _n ^{b)} RB@PEI- Mal (g/mol)	Molares Verhältnis RB@PEI-Mal im Komplex ^{d)}
50 (4,91)	240 (12,0)	41	0	4,91	41	234.000	33
40 (3,93)	60 (2,99)	131	1,73	2,20	74	272.000	71
75 (7,37)	87,5 (4,36)	169	3,17	4,20	96	292.000	91
50 (4,91)	40 (2,00)	246	2,05	2,86	144	343.000	142
200 (19,6)	60 (2,99)	657	n.b. ^{c)}	n.b. ^{c)}	n.b.^{c)}	476.000	271

^a PEI-Mal B (M_n = 201.000 g/mol)

^b bestimmt mit AF4-LS, *Methode B*

^c nicht bestimmbar, RB-Gehalt ist höher als Limit der Kalibrierung von 80 µg

^d berechnet über Differenz M_n von Komplex und M_n von PEI-Mal B

In Abbildung 3-12 ist der Vergleich von dem reinen PEI-Mal B zu verschiedenen Komplexen dargestellt. Dabei wird deutlich, dass sich mit steigender Anzahl von aufgenommenen RB-Molekülen die Molmassenverteilung zu höheren Molmassen verschiebt.

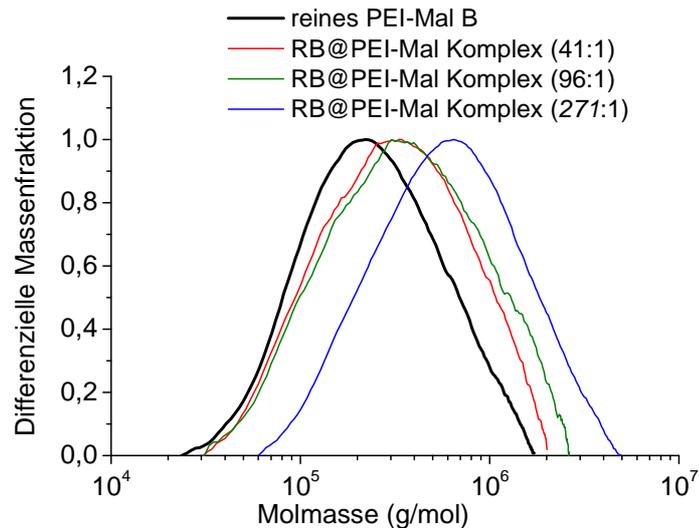


Abbildung 3-12: Differenzielle Molmassenverteilung des reinen PEI-Mals (schwarze Kurve) im Vergleich zu verschiedenen RB@PEI-Mal-Komplexen

Diese ersten Komplexierungsuntersuchungen (siehe Abbildung 3-13) mit der entwickelten AF4-Messmethode zeigten eindeutig, dass der Gehalt an vom Polymer aufgenommenen Farbstoffmolekülen von der Zusammensetzung der Ausgangsmischung abhängig ist. Je größer der Überschuss an RB in der Lösung, desto höher auch die Anzahl an komplexierten Molekülen. Werden die erhaltenen Ergebnisse in einer Kurve aufgetragen, so wird deutlich, dass bei dem höchsten, ermittelten Wert von 271 RB-Molekülen der Kurvenverlauf vom linearen Verhalten abweicht. Der hier ermittelte Wert ist ein Hinweis darauf, dass der Komplex schon sehr nah an dem Maximalwert der Sättigung zu liegen scheint.

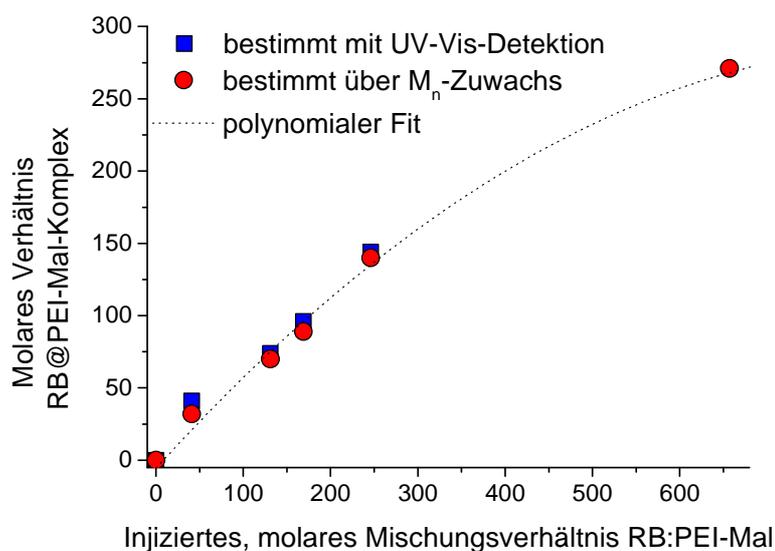


Abbildung 3-13: Molares Verhältnis RB:PEI-Mal B im Komplex bestimmt mittels UV-Vis-Detektion (blaues Rechteck) und über den Molmassenzuwachs des Komplexes (roter Kreis) in Abhängigkeit der

molaren Verhältnisse in der injizierten Ausgangsmischung (polynomieller Fit 2.Ordnung, gestrichelte Linie)

Anhand dieser ersten Komplexierungsstudien wurde festgestellt, dass die Komplexe als isolierte Partikel in reinem Wasser bei $\text{pH} = 6,7$ vorliegen. Es kann demzufolge angenommen werden, dass sich die Farbstoffmoleküle bevorzugt in der Maltoseschale anreichern und nur ein geringer Anteil in dem dendritischen Grundgerüst. Im Rahmen der Promotion von N. Polikarpov aus der Arbeitsgruppe von Dr. D. Appelhans (IPF Dresden) wurden unter anderem diese Annahmen in weiteren Studien experimentell durch Ultrafiltration der freien Farbstoffmoleküle und anschließender direkter UV-Vis-Spektroskopie im Batch bestätigt, ebenso wie der hohe Gehalt an aufgenommenen RB-Molekülen und das Vorhandensein von isolierten Partikeln. In diesen Untersuchungen konnte auch eine Stabilität der Komplexe über einen Zeitraum von mindestens 4 Tagen beobachtet werden.^{182, 183} In der Abbildung 3-14 sind zusätzlich zu den Ergebnissen der AF4-Komplexierungsuntersuchungen die Resultate der Batch-Messungen dargestellt. Hierbei wurde die Ultrafiltration eine Stunde nach erfolgter Mischung von RB und PEI durchgeführt und anschließend mittels UV-Vis Spektroskopie im Batch der Gehalt an freiem RB ermittelt und rückgerechnet.

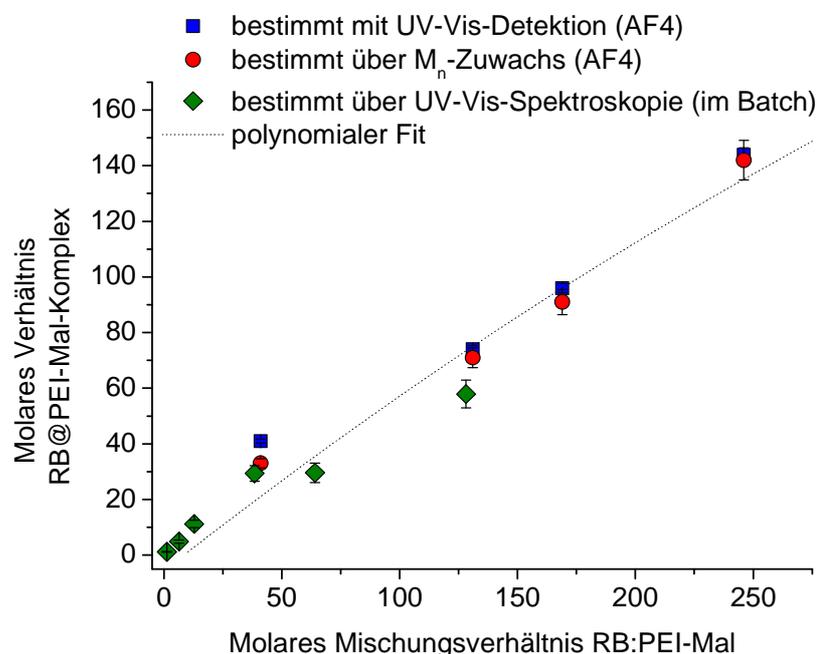


Abbildung 3-14: Molares Verhältnis RB:PEI-Mal B im Komplex in Abhängigkeit der molaren Verhältnisse in der injizierten Ausgangsmischung bestimmt mittels UV-Vis-Detektion (blaues Rechteck), über den Molmassenzuwachs des Komplexes (roter Kreis) mittels AF4 und UV-Vis-Spektroskopie im Batch¹⁸³ (grüne Raute)

Der direkte Vergleich der Ergebnisse aus der AF4-Bestimmung und der UV-Vis-Spektroskopie im Batch erlaubt eine gute Korrelation zwischen den beiden verschiedenen Methoden im Bereich der geringeren Verhältnisse. Weitere Komplexierungsuntersuchungen in verschiedenen Pufferlösungen ergaben, dass durch den Zusatz von Salzen die Oberflächenladungen der Komplexe verringert werden und somit eine Aggregation gefördert wird. In diesem Fall entstehen Komplexe bei denen das RB als „Brücke“ dient, indem es π - π Bindungen zwischen den PEI-Mal-Molekülen ausbildet. In diesem Fall kommt es zur Bildung von Aggregaten, die aus einem RB-Kern bestehen, um den sich die Polymere anordnen. In Abhängigkeit der Anzahl der Maltoseinheiten der Polymere kommt es zu unterschiedlich starker Aggregation. Dabei können bei dem PEI-Mal B sogar Aggregate entstehen, die nach einer Zeit von 100 h eine Partikelgröße von bis zu 700 nm aufweisen.¹⁸³

Als potenzielle Anwendung kann dieses entwickelte Methodenprinzip zur Separation kleiner Moleküle von großen Molekülen, ebenso auch für andere Gast-Wirt-Systeme sowie Freisetzungsstudien bei anderen pH-Werten oder Temperaturen angesehen werden. Wichtigste Voraussetzung ist hierbei, dass die Gastmoleküle detektierbar (z. B. UV-aktiv und bestimmte Molekülgröße) sind. Spezifische Parameter, wie z. B. Membranstabilität oder die Kalibrierung des Detektorsystems müssten dabei erneut überprüft werden. Im folgenden Kapitel wird eine Art der strukturellen und molekularen Untersuchung von großen Molekülen und deren Komplexierungsvorgängen mittels AF4-LS dargestellt. Hierbei steht die Bildung von Glykopolymeraggregaten in Folge von nichtkovalenten WW in Abhängigkeit von zahlreichen Parametern im Vordergrund.

3.4 Ergebnisse der Aggregationsstudien von dendronisierten Glykopolymeren

3.4.1 Notwendigkeit der Untersuchung des Aggregationsverhaltens

Die Größencharakterisierung dendronisierter Glykopolymere ist, ebenso wie der schon erläuterte Fall der hvz Polyester, vor eine Vielzahl an Problemen bei SEC-Separation gestellt. Größtenteils werden diese durch Aggregation und adsorptive WW mit dem Säulenmaterial hervorgerufen. Wie auch bei anderen Polymergruppen ist die genaue Kenntnis der molekularen und strukturellen Parameter wie z. B. Molmasse, Dimensionen oder Molekülstruktur von grundlegender Bedeutung.

Die aktuellen Untersuchungen der Glykopolymere auf der Basis eines Maleimid-Copolymers mit Polylysindendronen und einer Maltosehülle beruhen auf der

potentiellen Anwendung als wasserlösliche Alternative zur bisher universell einsetzbaren Cellulose. Dabei stehen Vorteile wie z. B. das hohe Funktionalisierungspotential durch die sekundären Aminogruppen im Inneren der Polymerstruktur sowie die Ausbildung wurmartiger Strukturen im Vordergrund. Diese Eigenschaften bieten die Möglichkeit zur molekularen Erkennung mittels Maltose-sensitiver Proteine sowie zum Einsatz beim Tissue Engineering, als Bioimplantate, Polymerträgersysteme sowie in der Biokatalyse. Die Synthese dieser neuartigen Strukturen über polymeranalogue Reaktionen (siehe Schema 3-9) erlaubt den Aufbau verschiedener Generationen mit anschließender Maltosemodifizierung in einem stufenweise amphoterem System. Die Oligosaccharidmodifizierung führt, wie schon im Fall des Polyethylenimins (siehe Kapitel 3.3.2.1), zur Unterdrückung der toxischen Eigenschaften. Durch die hohe Molmasse des linearen Rückgrats ist es mit diesen Strukturen möglich, nach dem Anbindungsschritt der Lysindendrone im Vergleich zu Dendrimeren oder hochverzweigten Polylysinen letztendlich sehr hohe Molmassen zu erhalten.

Das Auftreten von Aggregationsphänomenen wird sehr häufig bei Biopolymeren beobachtet. Üblicherweise wird dieses Verhalten mittels verschiedener Lichtstreuungstechniken untersucht, mit denen sehr umfangreiche Ergebnisse gewonnen werden können.¹⁸⁴ Mit einer vorangegangenen Auftrennung z. B. mit SEC können Aussagen zur Form von Einzelmolekülen bzw. zu den Aggregaten gemacht werden. Bei dem Glykopolymersystem, welches untersucht werden soll, erhöht sich die Molekülgröße soweit, dass eine eingehende Charakterisierung mittels SEC nicht mehr möglich ist. Die obere Trennschwelle erreicht wird, ist die Trenneffizienz der Säule stark begrenzt und eine saubere Separation ist nicht mehr gewährleistet. Hinzu kommt weiterhin, dass durch die Funktionalisierung der Endgruppen mit Maltose eine hohe Affinität zu WW mit dem Säulenmaterial begünstigt bzw. hervorgerufen wird, wie es schon bei dem, im vorhergehenden Kapitel beschriebenen maltosemodifizierten Poly(ethylenimin) der Fall war. Auch hier soll die Charakterisierung mittels asymmetrischer Fluss-Feldflussfraktionierung unter milden Messbedingungen als Alternative zur SEC stattfinden.

Für die zukünftige Herstellung von bioaktiven Nanostrukturen sind die zahlreich vorhandenen aktiven Zuckereinheiten bei der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen essentiell. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Prinzipien der Aggregation zu verstehen, um sie später kontrolliert einsetzen zu können. Dafür müssen die Voraussetzungen geklärt sein, in welchem Ausmaß die Konzentration, die

Generationszahl, die Temperatur und besonders der pH-Wert die molekularen Interaktionen der dendronisierten Glykopolymere beeinflussen. Hierbei werden insbesondere Zusammenhänge von der Molmasse und dem Trägheitsradius betrachtet. Um die gewonnenen Ergebnisse zu unterstützen und zu validieren, werden sekundäre Methoden, wie die dynamische Lichtstreuung, molekulardynamische Simulationen und die Mikroskopie eingesetzt.

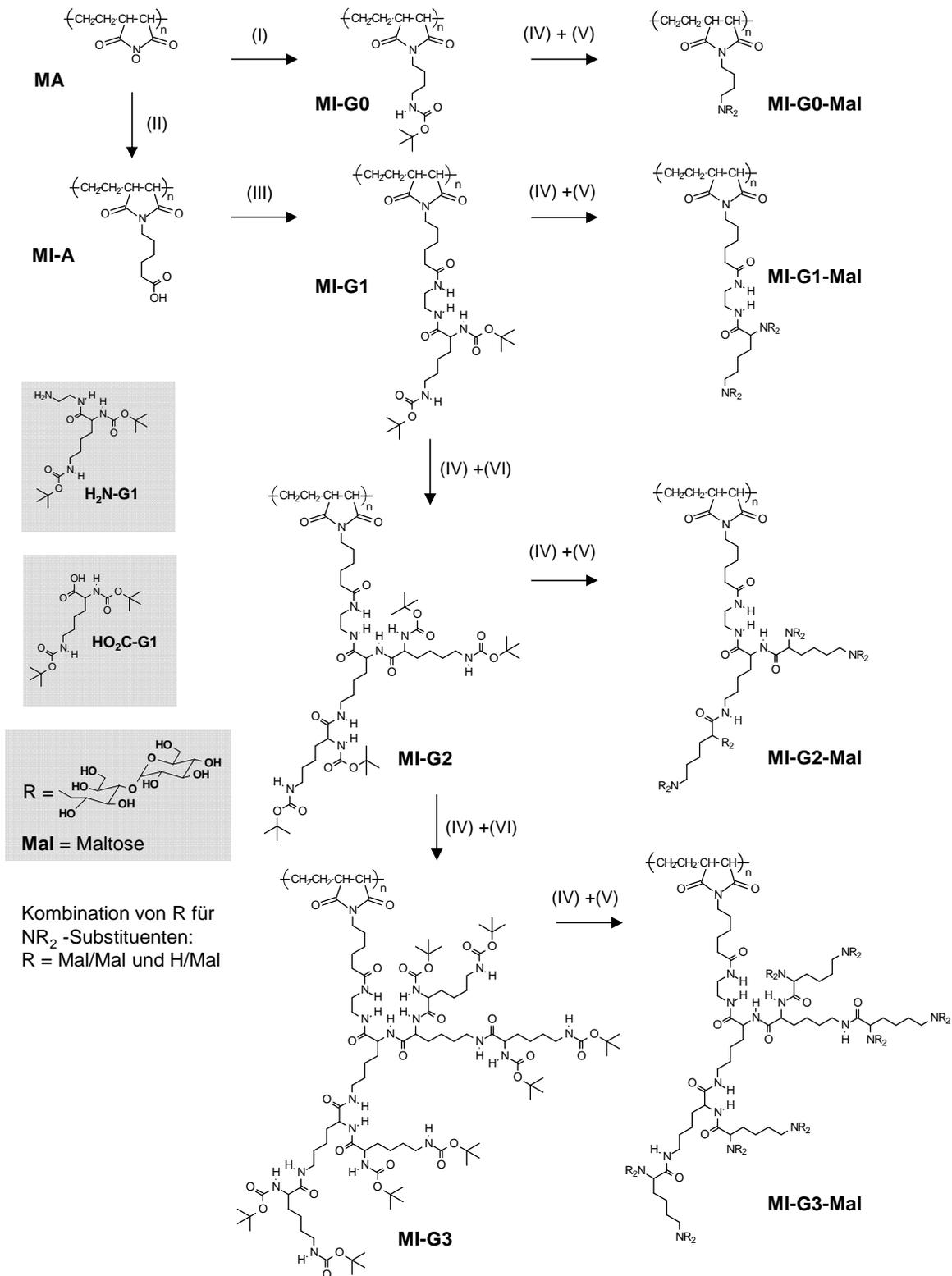
3.4.2 Synthese und NMR-Untersuchungen

Die Bezeichnung der Polymere, welche in der AG Appelhans synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, ist in den Erläuterungen und Diskussionen der Synthese bzw. der Charakterisierungsergebnisse folgendermaßen:

- als „lineares“ Vergleichspolymer gilt die nullte Generation (**MI-G0-Mal**), welche ausgehend von einem Maleinsäureanhydrid-Ethen-Copolymer-Rückgrat maltosemodifizierte *N*-4-Aminobutyl-Substituenten als Seitenketten aufweist
- und die maltosedekorierten Generation 1 bis 3 (**MI-G1-Mal**, **MI-G2-Mal** und **MI-G3-Mal**) mit den verzweigten Lysindendronen entlang des Maleimid-Copolymer-Rückgrats.

In dem Schema 3-9 ist der Syntheseweg der genannten Polymerstrukturen dargestellt. Für alle Zwischenverbindungen und Glykopolymere bilden polymeranalogue Umsetzungen die Grundlage. Einziger synthetischer Unterschied zwischen dem „linearen“ **MI-G0-Mal** und den „verzweigten“ **MI-G1-3-Mal** liegt in der Ausgangsverbindung. Für die Synthese der nullten Generation wurde ein kommerziell erhältliches Maleinsäureanhydrid-Copolymer (**MA**) direkt mit *N*-Boc-geschütztem 1,4-Diaminobutan für einige Stunden bei Temperbedingungen (120 °C) in einem Autoklaven behandelt (Schritt I). Für die Ausgangsverbindung der ersten bis dritten Generation wurde das **MA** ebenfalls unter Temperbedingungen (120 °C) mit 6-Aminohexansäure zu einem Maleimid-Copolymer (**MI-A**) umgesetzt (Schritt II). Die Boc-geschützte Vorstufe **MI-G1** wurde anschließend durch eine Aminierungsreaktion von MI-A mit einem *N*-2-aminoethylmodifizierten Lysinderivat (**H₂N-G1**) hergestellt (Schritt III). Die Abspaltung der Boc-Gruppen erfolgte mittels Trifluoressigsäure (Schritt IV) bei Raumtemperatur. Die entschützte Vorstufe **MI-G1** wurde zur Bildung der Vorstufe **MI-G2** mit dem Lysin-Derivat **HO₂C-G1** bei Aminierungsbedingungen umgesetzt (Schritt VI). Bei dem erneuten Standard-Entschützungs-Kopplungszyklus (Schritt IV und VI), der Umsetzung von **MI-G2** mit **HO₂C-G1**, resultiert die letzte Lysin-dendronisierte Vorstufe **MI-G3**. Der

abschließende Syntheseschritt zur Darstellung der Glykopolymeren besteht aus der reduktiven Aminierung (Schritt V) mit einem Überschuss an Maltose-Monohydrat und einem Boran-Pyridin-Komplex in Na-Borat-Puffer für 7 Tage bei 50 °C. Anschließend folgte zur gründlichen Aufreinigung eine Dialyse mit bidestilliertem Wasser für 3 Tage.



Schema 3-9: Syntheseschema zur Darstellung von Polylysine-dendronisierten MI-Copolymeren mit Maltosehülle von der nullten bis zur dritten Generation

Zur Identifizierung der Strukturen wurden ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren genutzt. Eine ausführliche Erläuterung und Diskussion befindet sich unter ¹⁸⁵. An dieser Stelle soll nur kurz zur Komplettierung der Synthese und zum besseren Strukturverständnis auf die NMR-Untersuchungen eingegangen werden. Folgendes Problem trat mit zunehmender Substituentengröße (Lysin-Generationenzahl) auf. Die Atome des Rückgrats konnten nur noch als stark verbreiterte Signale mit geringer Intensität identifiziert werden. Eine wichtige Information, die aus den Spektren gewonnen wurde, ist, dass die Struktur des Rückgrats während des Imidisierungsprozesses durch die Anbindung des Spacers an den Imid-Stickstoff nicht verändert wurde. Der stufenweise Aufbau der einzelnen Generationen von **MI-G1** bis **MI-G3** konnte mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sehr gut verfolgt werden. Mit den erhaltenen Daten kann davon ausgegangen werden, dass die Anbindung der Polylysin-Dendrone mit einer sehr hohen Ausbeute erfolgt ist. Jedoch können strukturelle Defekte auf Grund der geringen Sensitivität der NMR-Spektroskopie und der Signalverbreiterung bzw. -überlappung bei der zweiten und dritten Generation nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der Glykopolymere **MI-G0-Mal** bis **MI-G3-Mal** bietet die Möglichkeit, die chemische Kopplung der Maltoseeinheiten an die jeweiligen Lysindendrone der entschützten Prepolymere nachzuweisen. Zur Veranschaulichung sind in der folgenden Abbildung 3-15 die Protonenspektren von **MI-G0-Mal** sowie **MI-G1-Mal** dargestellt. Hier ist es möglich, die Signale der Einheiten *g* (Spacer) und *l* (Maltose) zu unterscheiden, welche auf eine erfolgreiche Kopplung hinweisen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die funktionellen Gruppen $-\text{CH}_2\text{-NR}_2$ bevorzugt zwei Maltosegruppen ($\text{R} = \text{Mal/Mal}$, siehe Schema 3-9) binden. Allerdings ist auch sichtbar, dass eine geringe Anzahl an einfacher, chemischer Maltosekopplung ($\text{R} = \text{H/Mal}$, siehe Schema 3-9) stattgefunden hat. Zu erkennen ist diese allerdings nur in den Spektren von **MI-G0-Mal**. Bei den anderen Generationen konnten die Signale aufgrund der geringen Sensitivität nicht nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von einigen wenigen nicht umgesetzten CH-NR_2 und $\text{CH}_2\text{-NR}_2$ -Einheiten bei den höheren Generationen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie konnten die Ergebnisse der Protonenspektren bestätigt und zusätzlich die Informationen über den Maltosesubstitutionsgrad erhalten werden. Diese sind für die vorhandenen NMR-Bedingungen bzw. Sensitivität sehr hoch, jedoch leider nicht quantifizierbar. Sowohl die Protonen- als auch die ^{13}C -NMR-Spektren von **MI-G2-Mal** und **MI-G3-Mal** liefern nur Informationen darüber, dass die Substitution von Maltose

stattgefunden hat. Eine genaue Bezeichnung der Struktureinheiten ist aufgrund von Signalüberlappungen bzw. -verbreiterungen nicht möglich.

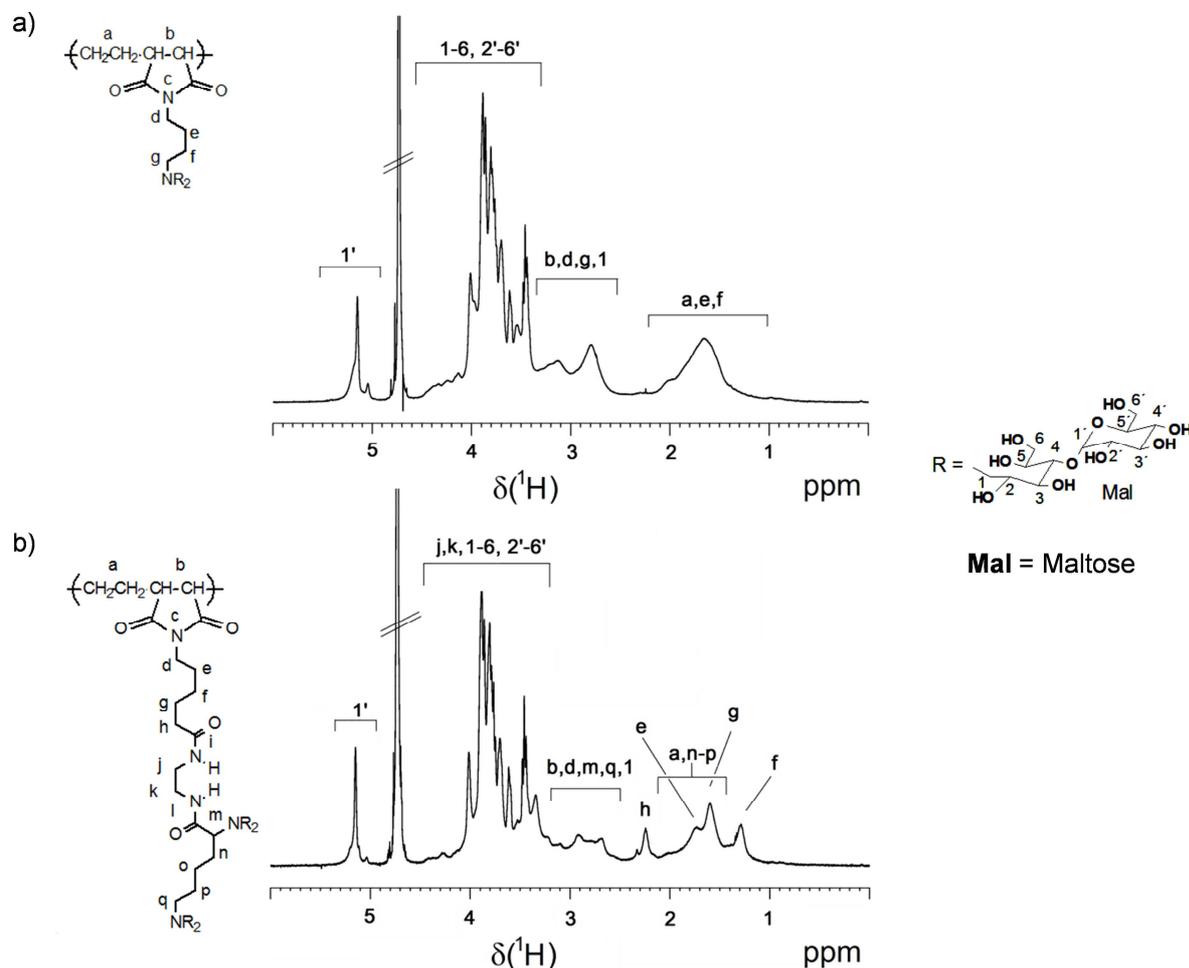


Abbildung 3-15: Strukturen und ^1H -NMR-Spektrum von **MI-G0-Mal** (a) und **MI-G1-Mal** (b) in D_2O , Kombinationen von R für NR_2 -Substituenten sind $\text{R} = \text{Mal}/\text{Mal}$ und $\text{R} = \text{Mal}/\text{H}^{185}$

3.4.3 Ergebnisse der SEC-Untersuchung der Prepolymere

Im Anschluss an die Synthesen und die Strukturaufklärung wurden zuerst die Boc-geschützten Vorstufen der dendronisierten Polymere untersucht. Aufgrund der eingeführten Schutzgruppen sind diese Strukturen nicht im wässrigen Medium, sondern nur in Dimethylacetamid löslich. Hervorgerufen durch mangelnde Membranstabilität ist es aktuell mit dem verwendeten AF4-System nicht möglich, Messungen in diesem Eluenten durchzuführen. Aus diesem Grund wurde die Charakterisierung mit dem SEC-System 2 (siehe Kapitel 6.2) durchgeführt, um WW möglichst auszuschließen. Zum besseren Vergleich der Molekülgrößen der verschiedenen Generationen wurde ebenso das lineare Rückgrat ohne Lysindendrone **MI-A** mitvermessen. Die erhaltenen

Chromatogramme in DMAc mit LiCl sind in der folgenden Abbildung 3-16 a) und b) dargestellt.

Tabelle 3-6: Molmassen bzw. deren Verteilungen, Trägheitsradien und Polymerisationsgrade der dendronisierten Prepolymere **MI-A** und **MI-G1-3** bestimmt mittels SEC-LS in DMAc/LiCl

Glykopolymer	M_n (kg/mol)	M_w (kg/mol)	M_w/M_n	R_g (nm)	P_n
MI-A	125	540	4,32	38	1.228
MI-G1	290	1.220	4,20	42	1.907
MI-G2	744	3.570	4,80	142	3.257
MI-G3	1.250	5.260	4,20	145	2.618

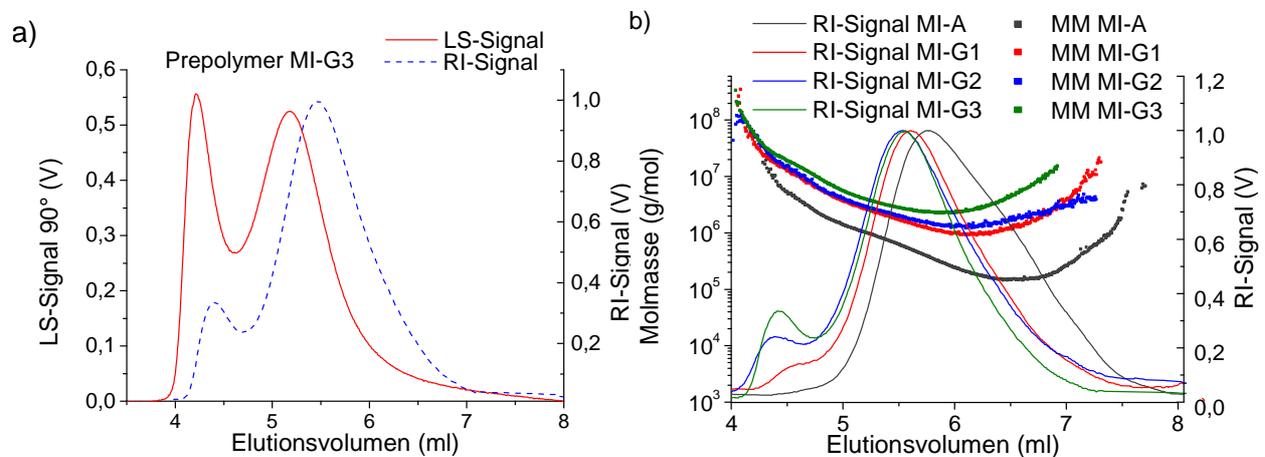


Abbildung 3-16: a) SEC-Kurven (RI- und LS-Signale) des Prepolymers **MI-G3** und b) normalisierte RI-Signale sowie Kalibrierbeziehungen des linearen Rückgrates (**MI-A**) und der Prepolymere **MI-G1-G3** in Abhängigkeit des Elutionsvolumens in DMAc+LiCl

Die Berechnung der Molmassen zeigt den erwartungsgemäßen Anstieg mit zunehmender Generationenzahl. Demzufolge weist das lineare Rückgrat **MI-A** die geringste sowie die dritte Generation die höchste Molmasse auf. Die Ergebnisse der Messungen zeigen zwei bekannte Problematiken auf. Zum einen deutet der Verlauf der Detektorsignale von **MI-G3** (Abbildung 3-16a) als auch der RI-Signale in Abbildung 3-16 b darauf hin, dass hochmolekulare Anteile in allen Vorstufen **MI-G1-G3** vorhanden sind. Erkennbar ist dies an der Kurvenschulter im Bereich geringer Elutionsvolumina. Diese ist sowohl im Lichtstreu- als auch im RI-Signal vorhanden. Mit zunehmender Generationenzahl verstärkt sich die Intensität des hochmolekularen Signals. Daher ist anzunehmen, dass aufgrund der erhöhten Anzahl an funktionellen Gruppen vermehrt Aggregatbildung stattfindet. Zudem wird deutlich, dass die Aggregatbildung erst im Anschluss an die Anbindung der Lysindendrone an das MI-Rückgrat stattfindet, d.h. wenn Lysindendrone im Molekül vorhanden sind, da bei dem linearen **MI-A** noch keine

Bimodalität im hochmolekularen Bereich erkennbar ist. Somit kann die Aggregation auf intermolekulare WW wie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den sekundären Aminogruppen zurückgeführt werden. Diese Aggregatbildung verursacht zu hohe Molmassen und demzufolge sind die Werte für weitere Berechnungen wie z. B. die Aggregationszahl nicht geeignet, da die Werte nicht auf molekularer Ebene liegen. Des Weiteren deuten die Verläufe der Molmassenkurven (Abbildung 3-16b) darauf hin, dass trotz des sehr polaren Lösungsmittels und der polaren Säule enthalpische WW zwischen den Makromolekülen und dem Säulenmaterial stattfinden. Diese verursachen eine verzögerte Elution von Molekülen mit höheren Molmassen, welche dann erst bei höheren Elutionsvolumina die Säule verlassen und somit einen Anstieg der Kurve bewirken. Dieses Problem ist bekannt und soll zukünftig durch den Einsatz von neuentwickelten Membranen eventuell aus Keramik, welche für die AF4-Messungen in DMAc geeignet sind, gelöst werden.

Bei den ermittelten Trägheitsradien ist jedoch zu beachten, dass es sich hierbei um Mittelwerte handelt und diese aufgrund der limitierten Anzahl von Winkeln des Lichtstredetektors nur bis zu einem Trägheitsradius von etwa 50 nm eine hohe Genauigkeit aufweisen. Die Trägheitsradien werden aus der ermittelten Streufunktion bestimmt, welche angibt, wie stark das gestreute Licht mit dem Detektionswinkel variiert. Je größer die Makromoleküle werden, desto größer sollte auch die Winkelabhängigkeit werden. Bei dem verwendeten Drei-Winkellichtstredetektor steigt aufgrund der geringen Anzahl von Winkeln die Fehlerbelastung der Ergebnisse. Die Molmassen sind von dieser Einschränkung nicht betroffen, da diese direkt aus den Streuintensitäten berechnet werden.

Durch den anschließenden Syntheseschritt, welcher die Abspaltung der Boc-Gruppe bzw. die Modifizierung der einzelnen Generationen mit Maltose beinhaltet, wurde es möglich die Glykopolymere mittels wässriger AF4 zu untersuchen. Diverse Lichtstreutechniken erlauben dabei eine besonders genaue Untersuchung der Aggregation. Hierbei steht eine Vielzahl an Untersuchungsmöglichkeiten zur Verfügung. Unter anderem ist es möglich Molmassen und Trägheitsradien in Abhängigkeit von der Generationszahl, der Konzentration, von verschiedenen Puffersystemen sowie pH-Werten mit derselben Apparatur durchzuführen. Die Komplexität dieser Untersuchungen wird im Folgenden aufgezeigt.

Mit dem Ausgangsmolmassenwert des Anfangspolymers **MA** ($M_w = 125.000 \text{ g/mol}$) sollten die Molmassen der verschiedenen Generationen der Glykopolymere bei 100 % Maltoseumsetzung bei den in der Tabelle 3-7 dargestellten theoretischen Werten liegen. Mittels NMR war jedoch, wie schon erwähnt, aufgrund der hohen Molmassen und des hohen Substitutionsgrades keine Quantifizierung des Modifizierungserfolgs möglich.

Tabelle 3-7: Theoretische Molmassen der dendronisierten Glykopolymere

Glykopolymer	P_n^a	M (Wiederholeinheit) (g/mol)	Total $M_{w,0}$ (g/mol)
MI-G0-Mal	~1000	832,9	~ 830.000
MI-G1-Mal	~1000	1714,7	~1.720.000
MI-G2-Mal	~1000	3276,3	~ 3.280.000
MI-G3-Mal	~1000	6656,2	~ 6.660.000

^a berechnet aus M_w des Anfangspolymers MA (Poly(ethan-*alt*-maleinsäureanhydrid) ~ 125.000 g/mol (Angaben laut Hersteller)) und MM der Wiederholeinheit ~ 126,1 g/mol

3.4.4 Ergebnisse der AF4-Messmethodenentwicklung im Nitratpuffer

Eine Überprüfung, ob die theoretischen Werte erreicht wurden, fand im Anschluss an die probenspezifische AF4-Messmethodenentwicklung statt (siehe Experimenteller Teil, siehe Abbildung 6-3). Dazu wurden die Proben eingehend hinsichtlich der Molmassen in Abhängigkeit der Generationszahl und demzufolge der Verzweigungszahl untersucht. Stellvertretend für alle generationsabhängigen Messungen sollen die Ergebnisse diskutiert werden, die im 50 mM NaNO_3 -Puffer erhalten wurden.

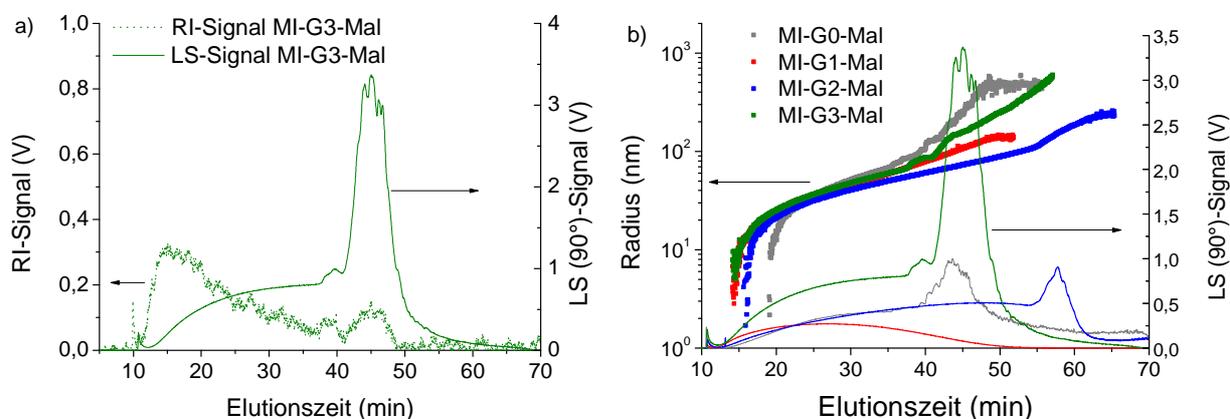


Abbildung 3-17: a) RI-(gestrichelte Linie) und LS-Detektorsignale (durchgezogene Linie) von **MI-G3-Mal** und b) Trägheitsradien sowie LS-Signale in Abhängigkeit der Elutionszeit von **MI-G0-G3-Mal** in 50 mM NaNO_3 -Puffer (pH = 6,5) bestimmt mittels AF4-LS (linearer Querflussgradient $V_x = 1,5 - 0 \text{ ml/min}$ in 60 min)

Die ersten Messungen, in Abbildung 3-17 dargestellt, bestätigen das beobachtete Verhalten der Prepolymere. Die Signalkurvenverläufe lassen darauf schließen, dass die Aggregationsneigung zunehmender Generationenzahl steigt. Der Anstieg der LS-Signalintensität im hochmolekularen Bereich bei höheren Elutionszeiten deutet ebenfalls auf diese Annahme hin. Um diese zu bekräftigen, wurden zusätzlich zu den Detektorsignalen die Trägheitsradien in Abhängigkeit der Elutionszeit abgebildet. Es wird deutlich, dass mit dem Erscheinen der Kurvenschulter ein Anstieg im Verlauf der Radien stattfindet. Dieser ist ein Indiz dafür, dass die Dimensionen der Moleküle aufgrund der Aggregation sprunghaft ansteigen. Bei **MI-G1-Mal** ist dieser Effekt noch nicht sichtbar sondern erst ab der 2. Generation. Bei der dritten Generation findet zusätzlich noch eine Verschiebung der Schulter in Richtung kürzere Elutionszeiten statt. Dies führt zu der Annahme, dass die Aggregate eine Größe erreichen, bei der die normale Trennung im Kanal von einer sterischen Inversion überlagert wird. Hierbei erreichen die Moleküle so große Dimensionen, dass sie in den Kanal hineinragen. Dabei erreichen sie die horizontalen Schichten mit höheren Strömungsgeschwindigkeiten und werden schneller aus dem Kanal transportiert. Die Reihenfolge der Elution dreht sich demzufolge wieder um. Zu diesem Zeitpunkt findet eine Co-Elution von unterschiedlich großen Molekülen statt. Im Allgemeinen wird eine kritische Größe von 1000 nm genannt, bei der es zur Überlagerung der Trenneffekte kommt. Jedoch gibt es hierbei auch Ausnahmen, bei denen der Effekt schon eher sichtbar wird. Dieses Phänomen ist natürlich auch abhängig von der jeweiligen Kanalhöhe.¹¹³

Bei der dargestellten Messung wurde ein linearer Querflussgradient angewandt (experimentelle Beschreibung, siehe 6.2), welcher den großen Nachteil hat, dass durch die sehr lange Elutionszeit das Konzentrationssignal des RI-Detektors extrem „langgestreckt“ ist und demzufolge eine geringe Intensität bzw. ein hohes Rauschen aufweist (siehe Abbildung 3-17a). Das Konzentrationsprofil ist während der Messung sehr flach, da über die gesamte Zeit Moleküle aus dem Kanal eluieren, deren Konzentration allerdings sehr gering ist. Infolgedessen ergibt sich in der Berechnung der Molmassen eine hohe Fehlerbehaftung von über 20 %. Ein weiteres Problem liegt in der Limitierung des Lichtstreuendetektors bei 45°. Dieser reagiert sensitiv auf große Moleküle, welche bei der Methode des linearen F_x -Gradienten gut aufgetrennt werden und stößt somit bei den Aggregaten recht schnell an seine Detektionsgrenzen. Infolgedessen ist eine akkurate Auswertung nicht mehr möglich. Um diese großen Moleküle, die eine schwache Eigendiffusion aufweisen, nicht unverhältnismäßig lange

im Kanal verweilen zu lassen, bietet die Anwendung eines exponentiellen Querflussgradienten einen großen Vorteil gegenüber des linearen Gradienten (experimentelle Beschreibung siehe 6.2, Abbildung 6-1). Ein weiterer, sehr wichtiger Vorteil der Messung der untersuchten Glykopolymere ist, dass die Auswertung der Molmassen deutlich zuverlässigere Werte liefert, da hier die RI-Signale durch die kürzere Elutionszeit höhere Intensitäten aufweisen (siehe Abbildung 3-18). Durch die rasche Absenkung des Querflusses wird eine zeitigere Elution der großen Moleküle forciert.

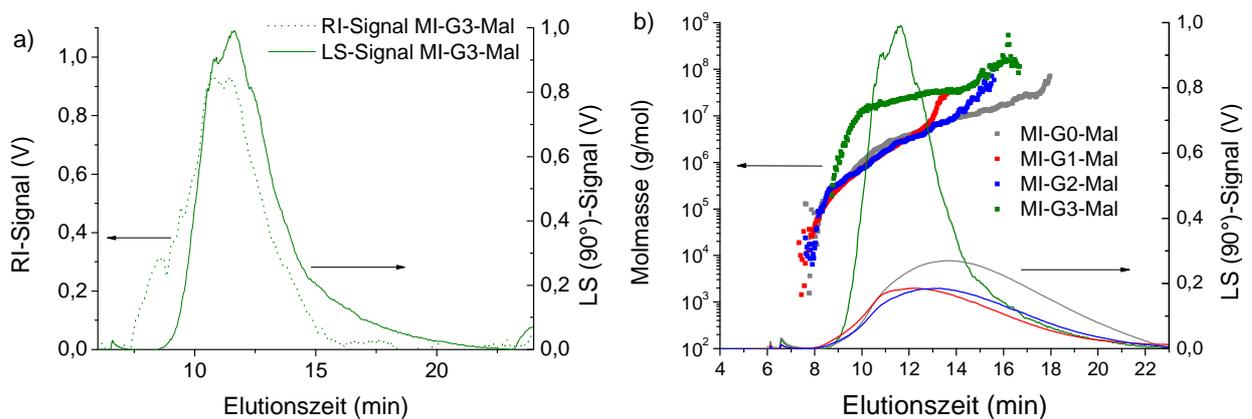


Abbildung 3-18 a) RI-(gestrichelte Linie) und LS-Signale (durchgezogene Linie) von **MI-G3-Mal** und b) Molmassen sowie LS-Signale in Abhängigkeit der Elutionszeit von **MI-G0-G3-Mal** in 50 mM NaNO₃-Puffer (pH = 6,5) bestimmt mittels AF4-LS (exponentieller Querflussgradient $V_x = 1,5 - 0$ ml/min in 15 min)

Tabelle 3-8: Mittels AF4-LS bestimmte Molmassen und Trägheitsradien der dendronisierten Glykopolymere (in NaNO₃-Puffer, pH = 6,5)

Glykopolymer	$M_{w,0,theor.}$ (kg/mol)	M_w (kg/mol)	M_w/M_n	R_g (nm)
MI-G0-Mal	~ 830	5.200	8,7	53
MI-G1-Mal	~1.720	1.720	11,1	53
MI-G2-Mal	~ 3.280	2.400	3,9	87
MI-G3-Mal	~ 6.660	21.400	2,7	90

Beim Vergleich der theoretisch berechneten ($M_{w,0}$) und der experimentell erhaltenen Molmassen (Tabelle 3-8) fällt auf, dass die tatsächlichen Werte für die erste Generation sehr gut übereinstimmen. Die geringeren Werte für **MI-G2-Mal** können damit begründet werden, dass aus synthesesetechischen Gründen die errechneten Polymerisationsgrade nicht erreicht wurden. Es ist wahrscheinlich, dass aufgrund der hohen molekularen Dichte nicht so viele Lysindendrone im ersten Schritt an das Rückgrat gebunden werden konnten. Da die Synthese über eine divergente Route durchgeführt wird,

werden die Generationen sukzessive aufgebaut. Bei **MI-G3-Mal** kann aufgrund der hohen Molmassen davon ausgegangen werden, dass hier eine Aggregation zwischen den einzelnen Molekülen stattfindet. Die Triebkräfte dafür sind beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen. Eine Aggregation der ersten und zweiten Generation kann nicht ausgeschlossen werden, da die Molmassen nur Mittelwerte darstellen. Das wird verursacht durch die etwas ungenauere Auftrennung bei der Methode des exponentiellen Querflussgradienten im Vergleich zu dem linearen F_x -Gradienten. Bei diesen Messungen (siehe Abbildung 3-17b) sind anhand der Elugramme sowie der Verläufe der Radien ein geringer Anteil an Aggregaten erkennbar. Jedoch ist dieser nicht quantifizierbar. Überraschend ist das Verhalten des **MI-G0-Mal**, da diese Generation die geringste Anzahl an funktionellen Gruppen besitzt und trotzdem stärkere intermolekulare WW aufweist. Es liegt die Vermutung nahe, dass die fehlenden Verzweigungen einen Einfluss auf dieses Verhalten haben. Genauere Aussagen über die strukturellen Unterschiede können getroffen werden, indem das Aggregationsverhalten zum einen bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht wird und zum anderen die Struktureigenschaften in Lösung zur Diskussion herangezogen werden. Dazu sind Werte wie z. B. die Aggregationszahlen, die scheinbaren Moleküldichten, die ρ -Parameter sowie die fraktalen Dimensionen unumgänglich. Diese sind durch zusätzliche Messungen mit Dynamischer Lichtstreuung zugänglich und folgen in einem späteren Teil dieses Kapitels, da im folgenden Abschnitt kurz die Einflüsse der Messparameter auf die Ergebnisse erwähnt werden.

3.4.5 Verschiedene Einflussparameter auf die Molekülgröße

Es stellte sich die Frage, inwiefern diese beobachteten Effekte von der jeweiligen Polymerkonzentration in der Lösung abhängen. Hierzu wurden von jeder Generation fünf verschiedene Konzentrationen vermessen. Um den Einfluss auf die Radiengröße besser verfolgen zu können, wurden die Messungen mit dem linearen F_x -Gradienten durchgeführt. In Abbildung 3-19 sind die Lichtstreusignale bei einem Winkel von 90° der konzentrationsabhängigen Messungen in 0,05 M Nitrat-Puffer ($\text{pH} = 6,5$) mit den jeweiligen Radienkurven dargestellt. Auf die Darstellung der RI-Signale wurde verzichtet, da diese aufgrund der schon beschriebenen sehr geringen Signalintensität, ein zu starkes Rauschen und somit eine zu geringe Messgenauigkeit aufweisen. Weiterhin konnten bei den höheren Konzentrationen keine Molmassen berechnet bzw. die Kalibrierbeziehung dargestellt werden, da die Intensität des kleinsten Winkels des

Lichtstredetektors bei 45° ihr Maximum erreicht hat, und demzufolge eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

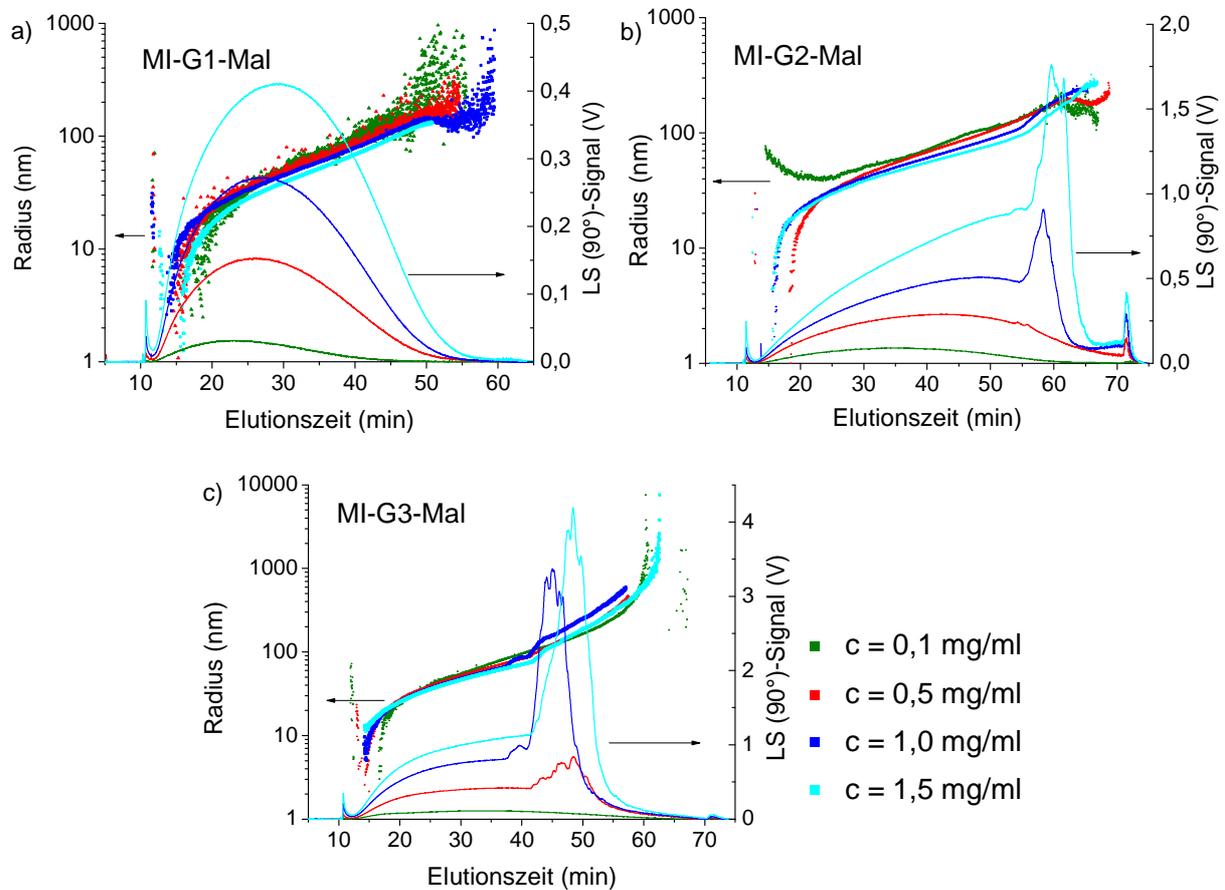


Abbildung 3-19: Trägheitsradien und LS-Signale in Abhängigkeit von der Elutionszeit a) **MI-G1-Mal**, b) **MI-G2-Mal** und c) **MI-G3-Mal** bei unterschiedlichen Konzentrationen in NaNO_3 -Puffer mittels AF4-LS

Auffällig ist, dass alle drei untersuchten Generationen bei Erhöhung der Probenkonzentration sowohl eine zu erwartende Zunahme der Signalintensität als auch eine Zunahme der Signalbreite zeigen. Aufgrund der höheren Anzahl an Molekülen von gleicher Größe verbreitert sich das vertikale Konzentrationsprofil im Kanal und belegt damit eine größere Anzahl an Strömungsschichten. Eine Signalverbreiterung kommt durch die Verbreiterung des Geschwindigkeitsintervalls zwischen Beginn und Ende des Konzentrationsprofils zu Stande. Weiterhin ist eine Abhängigkeit der Form bzw. Modalität des Lichtstreuungssignals erkennbar. Ein Hinweis auf die Existenz von Aggregaten ist zum einen die deutliche Bimodalität (Signalschulter) der Lichtstreuungssignale, welche bei der **MI-G2-Mal** und **MI-G3-Mal** bei höheren Konzentrationen auftritt. Hierbei zeigt das Lichtstreuungssignal einen Intensitätsanstieg. Da die Intensität des LS-Signals laut Gleichung 2-6 entweder abhängig von der Konzentration oder der Größe der Moleküle

ist, kann daraus geschlussfolgert werden, dass diese durch Moleküle mit sehr hoher Molmasse hervorgerufen wird.¹⁸⁶ Zum anderen wird anhand der Kurven deutlich, dass bei zunehmenden Elutionsvolumina genau im Bereich der Kurvenschulter ein starker Anstieg im Radienverlauf zu verzeichnen ist. Dieses Verhalten ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass ab diesem Elutionsvolumen Moleküle mit deutlich größeren Radien (Aggregate) den Trennkanal verlassen, welche bei den geringeren Probenkonzentrationen nicht detektiert wurden.

Bei den konzentrationsabhängigen Messungen, welche mit exponentiellen F_x -Gradienten durchgeführt wurden, ist dieser Trend nicht in diesem Maße anhand der Elugramme ersichtlich, da die einzelnen Fraktionen im Vergleich zum linearen F_x -Gradienten nicht so breit bzw. vollständig fraktioniert werden. Aufgrund der kürzeren Messzeit co-eluieren die Aggregate mit den nichtaggregierten Molekülen. Wie schon erwähnt, ist dabei jedoch die Bestimmung der Molmassen und Trägheitsradien deutlich exakter. In Abbildung 3-20 sind die jeweiligen Trägheitsradien in Abhängigkeit von der untersuchten Konzentration der einzelnen Generationen dargestellt.

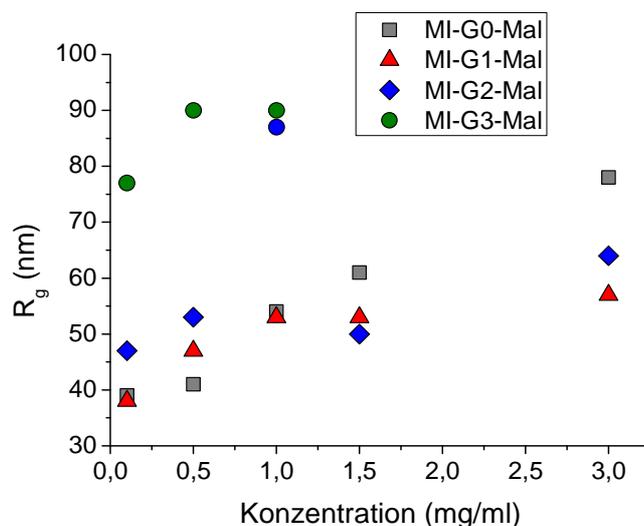


Abbildung 3-20: Konzentrationsabhängigkeit der Trägheitsradien der Polylysine-dendronisierten Glykopolymere **MI-G0-G3-Mal** bestimmt mittels AF4-LS in 50mM NaNO₃-Puffer

Der Verlauf der Radien verdeutlicht anschaulich, dass die Konzentration einen bedeutenden Einfluss auf die jeweiligen Werte hat. Je höher die Konzentration ist, desto größer wird die Spezies bzw. desto höher wird der Trägheitsradius. Diese Entwicklung ist bei allen Generationen zu beobachten. Demzufolge kann daraus entnommen werden, dass die Konzentration einen Einfluss auf die Aggregation besitzt. Durch die höhere Konzentration wird ein vermehrter Kontakt zwischen den einzelnen Molekülen

hervorgerufen und somit die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Aggregaten deutlich erhöht. Bei der dritten Generation ist dieser Effekt so ausgeprägt, dass die Aggregate ab einer Konzentration von 1,5 mg/ml unmittelbar nach dem Lösen ausfallen. Eine akkurate Auswertung der Messungen mit anschließender Berechnung der Molmasse bzw. des Trägheitsradius ist in diesem Fall leider nicht anwendbar. Durch Filtration ist es zwar möglich, die ausgefallenen Aggregate aus der Lösung zu entfernen, jedoch weisen die verbleibenden Moleküle eine deutlich geringere Aggregation auf und verfälschen demzufolge das Ergebnis bzw. den Aggregationstrend. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse für die Konzentration von 1,5 und 3 mg/ml der **MI-G3-Mal** nicht für die Diskussion verwendet.

Eine wichtige Frage, die an dieser Stelle auftauchte, ist, ob die Stärke oder die Dauer des F_x einen Einfluss auf das Messergebnis hat. Da in diesem Schritt eine erhöhte Probe-Membran- oder Probe-Probe-WW stattfindet, ist es im ungünstigsten Fall möglich, dass die Aggregation beschleunigt bzw. erhöht werden kann.¹⁸⁷ Um diese Frage zu klären, wurde die gleiche Probe bei identischen Bedingungen, jedoch unterschiedlichen Flussstärken während der Fokussierphase gemessen (experimentelle Beschreibung, siehe 6.2).

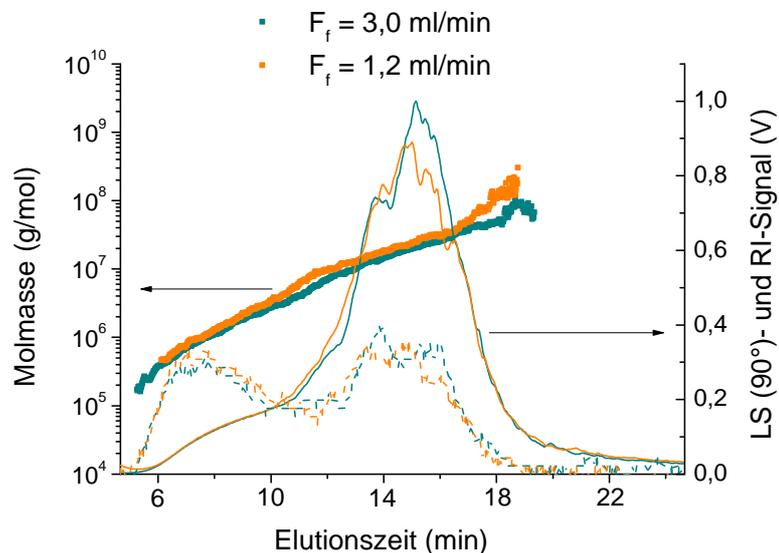


Abbildung 3-21: RI-(gestrichelte Linien), LS-Detektorsignale (durchgezogene Linien) und Molmassen in Abhängigkeit der Elutionszeit von **MI-G3-Mal** bei unterschiedlichen Fokussierbedingungen mittels AF4-LS in reinem Wasser

Tabelle 3-9: Mittels AF4-LS bestimmte Molmassen und Trägheitsradien von **MI-G3-Mal** bei unterschiedlichen Fokussierbedingungen (in reinem Wasser)

Fokussierungsfluss F_f (ml/min)	M_w (kg/mol)	M_w/M_n	R_q (nm)
3	10.800	5,5	135
1,5	11.700	5,4	133

Sowohl aus den Elugrammen als auch aus der Molmassenbeziehung (Abbildung 3-21) wird deutlich, dass ein Einfluss der Stärke des F_f auf die Aggregatbildung nur marginal vorhanden ist. Es findet keine erkennbare Veränderung der Probe statt. Die Kurven der RI- bzw. LS-Signale sind nahezu identisch, ebenso wie der Verlauf der Molmassen in Abhängigkeit der Elutionszeit (Kalibrierbeziehung) und die errechneten Molmassen bzw. Radien. Der Einfluss des Querflusses könnte sich auf zweierlei Arten zeigen. Wenn durch die Stärke des F_f die Aggregation begünstigt würde, dann müsste im Verlauf der blauen LS- und RI-Kurven ($F_f = 3$ ml/min) eine Verschiebung zu höheren Elutionszeiten bzw. zu höheren Molmassen zu erkennen sein, was jedoch nicht der Fall ist. Andererseits kann auch der gegenteilige Effekt auftreten, dass aufgrund stärkerer Flüsse die Scherkräfte zu einer Aggregatsdegradation führen. Eine Verfälschung in Richtung kleinerer Molmassen wäre die Folge. Es lässt sich jedoch nicht überprüfen, ob eine Überlagerung dieser beiden Effekte vorliegt. Der vergleichsweise stärkere Anstieg der Molmassen der orangefarbenen Kurve ($F_f = 1,5$ ml/min) im Bereich der größeren Elutionszeiten kann vernachlässigt werden, da in diesem Bereich die Streuung aufgrund der geringen Intensität des RI-Signals sehr hoch ist und somit die Messgenauigkeit sinkt. Weitere Parameter wie z. B. die Fokussierzeit (3, 5 und 7 min) wurden ebenfalls ohne erkennbaren Einfluss untersucht. Demzufolge kann ein Einfluss der Fokussierungsparameter ausgeschlossen werden.

Da die Temperatur häufig eine wichtige Rolle bei der Aggregationsbildung spielt, wurden die hydrodynamischen Radien der dritten Generation ($c = 1$ mg/ml) mittels DLS im Temperaturbereich von 25 bis 90 °C gemessen. Hierbei konnten keinerlei Effekte beobachtet werden. Die Radien blieben über den gesamten Bereich konstant. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei höheren Temperaturen eine Degradation stattfindet, aber dieser Bereich ist für physiologische Anwendungen nicht relevant.

Es bleibt nun zu klären, ob der pH-Wert auch einen Einfluss auf die Molmasse bzw. den Radius hat. Dazu wurden alle Generationen der Polylysin-dendronisierten Glykopoly-

mere bei den pH-Werten 3,5; 5; 7; 8,5 sowie 11 mittels DLS und AF4-LS vermessen. Mittels Dynamischer Lichtstreuung ist es möglich, die hydrodynamischen Radien zu bestimmen. Da bisher am IPF Dresden keine Möglichkeit zur Online-Messung mit der vorhandenen AF4-Apparatur vorhanden war, wurde hierbei auf Batch-Messungen zurückgegriffen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass keine Auftrennung wie im AF4-Trennkanal stattfindet und somit nur ein Mittelwert berechnet wird. Leider ist es hier demzufolge auch nicht möglich, exakte Aussagen über die Verteilung zu erhalten.

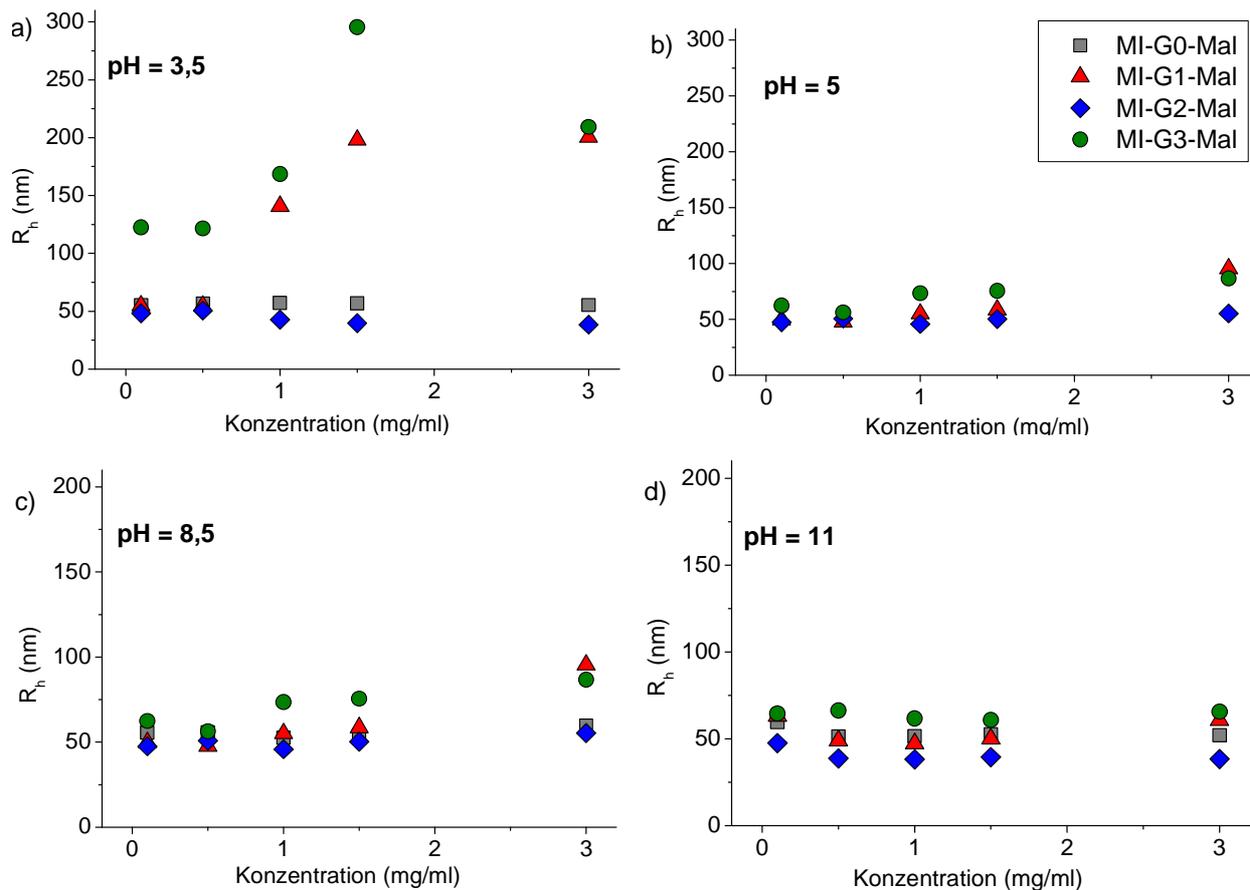


Abbildung 3-22: Konzentrationsabhängigkeit der mittleren hydrodynamischen Radien von **MI-G0-Mal** bis **MI-G3-Mal** bei verschiedenen pH-Werten gemessen mittels Offline-DLS

Ein geringer Anstieg der hydrodynamischen Radien mit steigenden Konzentrationen ist zu verzeichnen. Diese befinden sich im Bereich von 50 bis 140 nm. Nur im stark sauren Bereich von $\text{pH} = 3,5$ ist bei der ersten und der dritten Generation ein Anstieg auch schon bei einer geringen Konzentration erkennbar. Die verbleibenden Proben der **MI-G0-Mal** und **MI-G2-Mal** zeigen kein solches pH-abhängiges Verhalten.

Anschließend wurden dieselben Lösungen mittels AF4-LS bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Um die Störfaktoren so gering, wie möglich zu halten, wurden alle Messungen mit der gleichen Methode (exponentieller F_x -Gradient für 15 min)

durchgeführt. Eine Auswahl (M_w und R_g) der erhaltenen Ergebnisse befindet sich in Tabelle 3-10. Die vollständige Übersicht der ermittelten Werte ist in der Tabelle A-1 im Anhang zusammengestellt. Jedoch ist zu beachten, dass es sich hierbei um Mittelwerte handelt und diese aufgrund der schon erwähnten, limitierten Anzahl von Winkeln des Lichtstredetektors nur bis zu einem Trägheitsradius von etwa 50 nm eine hohe Genauigkeit aufweisen. Ab diesem Wert steigt die Fehlerbehaftung der einzelnen Werte, ein Trend ist jedoch trotzdem ableitbar.

Tabelle 3-10: Auswahl der Ergebnisse der pH-abhängigen AF4-LS-Untersuchungen von **MI-G0-Mal** bis **MI-G3-Mal** ($c = 1 \text{ mg/ml}$)

Generation	pH=3,5		pH=5		pH=7		pH=8,5		pH=11	
	M_w (kg/mol)	R_g (nm)								
MI-G0-Mal	14.400	200	5.200	53	2.620	63	6.470	103	8.900	127
MI-G1-Mal	1.980	83	1.740	53	1.320	56	1.560	62	1.600	46
MI-G2-Mal	4.810	154	2.400	87	1.730	66	1.660	68	3.610	77
MI-G3-Mal	85.900	221	21.400	90	27.000	144	20.600	120	59.800	145

Auffällig ist bei der Betrachtung der Werte, dass **MI-G1-Mal** und **MI-G2-Mal** bei der Änderung des pH-Wertes keine großen Änderungen zeigen, während bei **MI-G0-Mal** und **MI-G3-Mal** große Unterschiede erkennbar sind. Eine umfassende Beleuchtung und Diskussion der Werte befindet sich im folgenden Kapitel.

3.4.6 Betrachtung des Aggregationsverhaltens

Der erste Schritt der Diskussion des Aggregationsverhaltens bestand darin, die mittleren Aggregationszahlen zu berechnen, welche angeben, wie viele Moleküle sich zu einem Aggregat zusammenschließen. Da es im Fall der dendronisierten Glykopolymere nicht möglich war, von den Vorstufen exakte mittlere Molmassen zu erhalten, wird für den Ausgangswert $M_{w,0}$ die aus dem linearen Rückgrat berechnete, theoretische Molmasse bei 100 %iger Dendronenkopplung und Maltoseumsetzung (siehe Tabelle 3-7) verwendet. In Abbildung 3-23 sind die berechneten mittleren Aggregationszahlen in Abhängigkeit des pH-Werts dargestellt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass mit zunehmender Generationenzahl auch die Molmasse und Verteilungsbreite steigen. Demzufolge erhöht sich auch die Fehlerbehaftung der Werte.

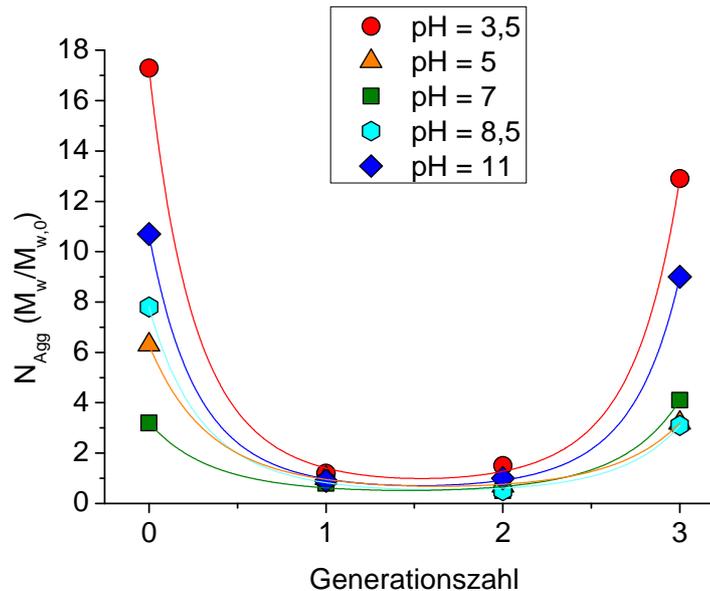


Abbildung 3-23: Mittlere Aggregationszahlen (N_{Agg}) der Polylysine-dendronisierten Glykopolymere **MI-G0-G3-Mal** in Abhängigkeit von Generationszahlen bei verschiedenen pH-Werten berechnet aus theoretischem $M_{w,0}$ und mit AF4-LS ermitteltem M_w

Anhand der berechneten Mittelwerte für die Aggregationszahlen (N_{Agg}) wird ein erster Trend sichtbar. **MI-G1-Mal** und **MI-G2-Mal** verhalten sich bei allen pH-Werten etwa gleich und zeigen nur eine geringe Neigung zur Bildung von Aggregation. Bei **MI-G0-Mal** zeigt sich hier eine deutlich größere Tendenz zur Aggregatbildung, ebenso wie bei der dritten Generation. Für eine bessere Beschreibung der Aggregate bietet es sich an, die scheinbare Dichte ρ_{app} (siehe Gleichung 2-10) der Moleküle zu ermitteln.

Da die Trägheitsradien, die mittels der AF4 nach der Auftrennung mit Lichtstreuung erhalten wurden, aufgrund der begrenzten Detektionswinkel speziell bei den großen Trägheitsradien nicht sehr genau sind, wurden für die Berechnungen die hydrodynamischen Radien aus den Batch-DLS-Messungen verwendet. Auf den ersten Blick fällt auf (siehe Abbildung 3-24), dass die berechneten Werte für ρ_{app} bei der nullten Generation etwas höher liegen als bei den folgenden. Die scheinbaren Dichten für die **MI-G1-3-Mal** sind relativ niedrig im Vergleich zu **MI-G0-Mal**. Einzige Ausnahme bildet dabei **MI-G3-Mal** im stark basischen Bereich. Eine höhere Dichte deutet auf eine kompaktere Struktur hin. Beim Vergleich der Aggregationszahlen und der scheinbaren Dichte fällt auf, dass je höher die mittlere Aggregationszahl wird, desto höher werden auch die Dichtewerte. Daraus kann geschlossen werden, dass mit zunehmender Zusammenlagerung von Molekülen die Strukturen immer kompakter werden. Eine mögliche Erklärung für die höhere Dichte können die WW zwischen den Molekülen

sein, welche aufgrund der geringen Molekülabstände verstärkt vorhanden sind. Dieser Trend wurde auch schon bei der Untersuchung von β -Glucanen⁹¹ oder Gummiarabikum¹⁸⁸ festgestellt.

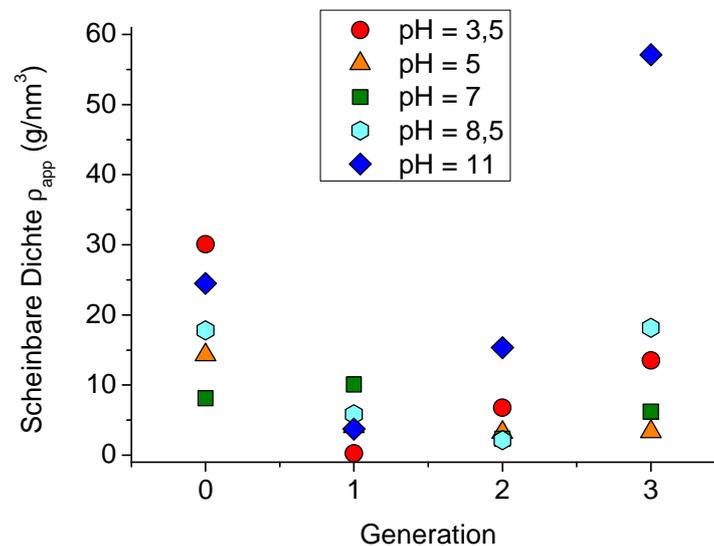


Abbildung 3-24: Scheinbare Dichte der Polylysine-dendronisierten Glykopolymere **MI-G0-G3-Mal**, berechnet mit R_h aus Batch-DLS-Messungen, in Abhängigkeit der Generationszahl bei verschiedenen pH-Werten

Bei **MI-G1-Mal** und **MI-G2-Mal** wird keine bevorzugte Aggregation beobachtet (siehe Abbildung 3-23). Gründe dafür können sein, dass die positiven Ladungen überwiegen und so eine Aggregation im starken Ausmaß verhindern. Es ist möglich, dass Aggregation stattfindet, diese jedoch nur instabile Aggregate hervorruft, welche bei den konzentrationsabhängigen AF4-Messungen (Abbildung 3-21) beobachtet wurden. Bei der nullten und dritten Generation erreichen jedoch die Aggregationszahlen bei einem pH-Wert von 3,5 ihr Maximum. Um dieses Aggregationsverhalten zu begründen, ist es sinnvoll, die Oberflächenladungen näher zu betrachten bzw. das Zeta-Potential in Abhängigkeit des pH-Wertes zu bestimmen. In

Abbildung 3-25 sind die Kurven in einer Messung von pH = 3,5 - 11 mit Autotitration dargestellt.

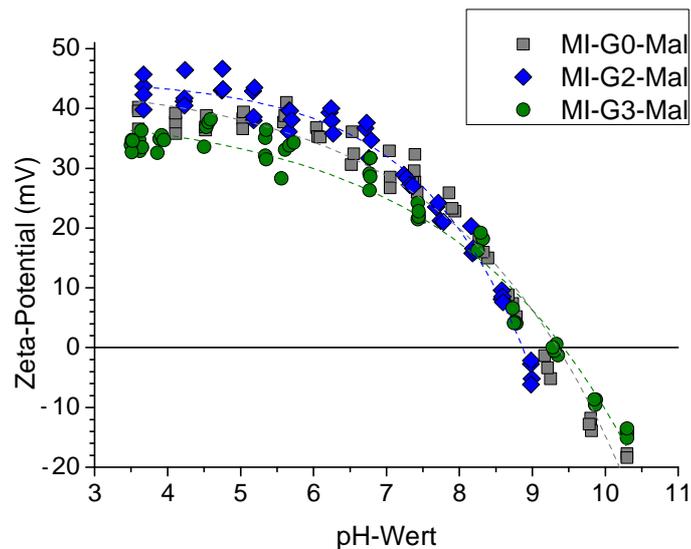


Abbildung 3-25: Ergebnisse der Zeta-Potentialmessungen von MI-G0-Mal, MI-G2-Mal und MI-G3-Mal in Abhängigkeit des pH-Wertes

Bei allen untersuchten Glykopolymerproben zeigt sich ein ähnliches Verhalten. Im sauren pH-Bereich ($\text{pH} = 3,5$) weisen sie das Maximum ihrer Oberflächenladung auf und im basischen Bereich ($\text{pH} = 11$) das entsprechende Minimum. Der isoelektrische Punkt beschreibt die Aufhebung der Ladungen, hier nimmt das Zeta-Potential den Wert 0 an. Dieser liegt für **MI-G0-Mal** sowie **MI-G2-Mal** bei $\text{pH} = 9,0$ und für **MI-G3-Mal** bei $\text{pH} = 9,3$. Bevorzugt bilden sich an diesem Punkt Aggregate. Außerdem kommt es üblicherweise bei sehr hohen bzw. niedrigen Zeta-Potentialen aufgrund von starken Abstoßungsvorgängen nicht zu Aggregatbildungen. Im Fall der untersuchten Glykopolymeren liegen bei $\text{pH} = 3,5$ und 11 die höchsten Aggregationszahlen vor. Aus diesem Grund können die entstandenen Aggregate nicht mit Coulomb-Kräften, sondern nur mit intramolekularen, nichtionischen WW, wie den Wasserstoffbrückenbindungen, beschrieben werden. Diese bilden sich zwischen stark elektronegativen Atomen und Atomen mit freien Elektronenpaaren mit Protonen aus. In dem Fall der dendronisierten Glykopolymeren können sich die H-Brücken sowohl zwischen den Aminogruppen der Lysindendrone als auch den Hydroxylgruppen der Maltoseeinheiten ausbilden. Dabei kommt es zur Delokalisierung eines Molekülorbitals. Die Bindung wird durch eine kurzzeitige Überlappung von Orbitalen hervorgerufen und hat aus diesem Grund nur eine geringe Reichweite. Demzufolge findet eine Aggregation nur bei geringem Molekülabstand statt.¹⁸⁹ Bei geringen Konzentrationen haben die Moleküle ausreichend Freiraum, bei höheren Konzentrationen jedoch sinkt der Abstand und die Neigung zur Aggregation steigt. Weiterhin ist die Stärke der H-Brücken abhängig von der Anzahl der funktionellen Gruppen, die sich bekanntlich mit steigender Generationenzahl erhöht.

Dieses Verhalten wurde auch schon bei Interaktionen von Polylysin-dendronisierten Glykopolymeren mit Zellulose-Nanokristallen beobachtet.¹⁹⁰

Für die genauere Betrachtung des Aggregationsverhaltens ist es nun notwendig die Strukturparameter zu bestimmen, da die Ursachen für das widersprüchliche Verhalten demzufolge bei den strukturellen und geometrischen Eigenschaften zu suchen sind.

Dazu ist es sinnvoll, die Flexibilität der Moleküle sowie die geometrischen und die Struktureigenschaften in Lösung mit Hilfe des ρ -Parameters (siehe Gleichung 2-7) zu beleuchten.

Um die Werte für die untersuchten Glykopolymere zu berechnen, werden die Radien, welche mittels AF4-LS (R_g) und DLS (R_h) ermittelt wurden, zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die dabei errechneten ρ -Parameter liefern Aussagen über die strukturellen Eigenschaften. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Glykopolymere sehr breit verteilt vorliegen und zusätzlich noch eine sehr komplexe Struktur aufweisen. Da mittels Batch-DLS nur R_h -Mittelwerte bestimmt werden können, ist es in diesem Fall sinnvoll, die Mittelwerte der Trägheitsradien aus den AF4-LS-Untersuchungen zu verwenden. Es werden demzufolge die Werte für die Aggregate der **MI-G0-Mal** und **MI-G3-Mal** mit den Einzelmolekülen von **MI-G1-Mal** und **MI-G2-Mal** verglichen. Außerdem ist auch hier zu beachten, dass der für die R_g -Bestimmung verwendete Lichtstredetektor in seiner Sensitivität eingeschränkt ist, und die Werte ab 50 nm höhere Fehler aufweisen. Daher liefern die berechneten ρ -Parameter allenfalls einen Trend. Die vollständige Werteübersicht befindet sich im Kapitel Appendix in Tabelle A-1.

Die erste bis dritte Generation (siehe Abbildung 3-26) bewegen sich bei allen pH-Werten im Bereich zwischen kugelförmigen Molekülen und statistischen Knäuel. Die ρ -Parameter deuten darauf hin, dass sie sich in einem guten Lösungsmittel im Bereich von hochverzweigten Polymeren ($\rho = 1,225$) und statistisch verzweigten Molekülen ($\rho = 1,732$) befinden. Laut Burchard⁸⁷ ist der ρ -Parameter für lineare und verzweigte Polymere in gutem oder θ -Lösungsmittel bei etwa 2. Niedrigere Werte deuten auf Mikrogele bzw. dichte, globulare Strukturen hin. Hinsichtlich der sehr breiten Verteilungen und der komplexen Architektur sind die ermittelten Werte für den ρ -Parameter im Bereich von 2 nicht überraschend. Die Werte liegen demzufolge in dem erwarteten Bereich vom linearen Knäuel und verzweigter Struktur.

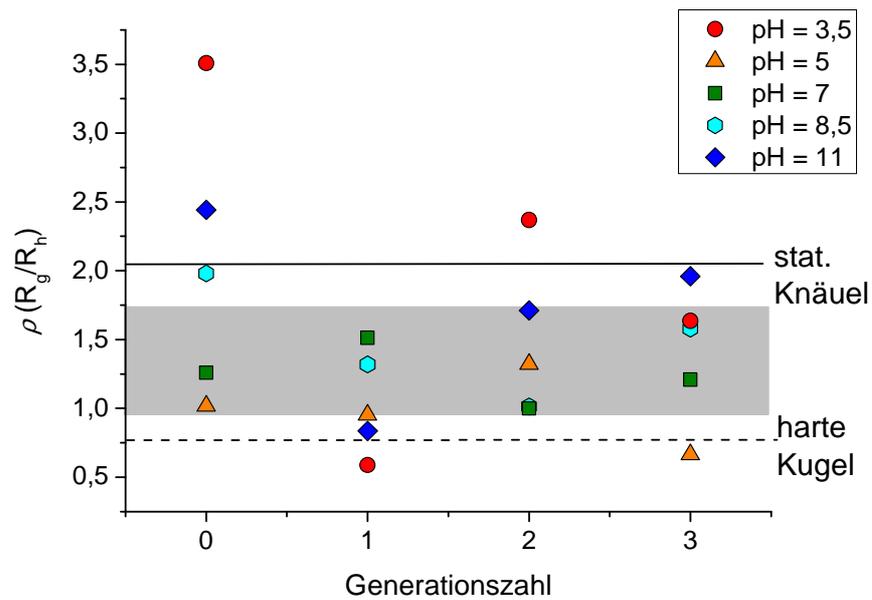


Abbildung 3-26: Mittels AF4-LS und DLS ermittelte ρ -Parameter (R_g/R_h) von **MI-G0-G3-Mal** bei verschiedenen pH-Werten

Die vergleichsweise hohen Werte von **MI-G0-Mal** können mit der anisotropischen Form der Moleküle erklärt werden. Man kann davon ausgehen, dass sich die Lysinderivate abstehend um das lineare Rückgrat anordnen und eine Steifheit des Moleküls hervorrufen. Diese wird durch die Maltosehülle noch zusätzlich verstärkt. Weiterhin kann angenommen werden, dass die reguläre und ungestörte Hauptkette eine größere Persistenzlänge aufweist, als die vergleichbaren dendronisierten Analoga. Der Grund dafür liegt in der bevorzugten helikalen Struktur von **MI-G0-Mal**.¹⁹¹

Eine Möglichkeit zur Bestätigung der helikalen Strukturform stellt dabei die Molekulardynamische Simulation dar. Eine solche Simulation wurde für **MI-G0-Mal** mit 100 Wiederholeinheiten durchgeführt. Da der Rechenaufwand für andere Generationen bzw. zusätzliche Medien zu hoch ist, wurde das Modell am absoluten Nullpunkt (0 K, kein Druck, ohne Einfluss von elektromagnetischen Feldern) erstellt. Das führt zu einem Energieminimum. Im Gegensatz zu den sonst üblichen Simulationen, liegt das modellierte Molekül in isolierter Form vor. Das bedeutet, dass auf die Betrachtung von WW zu anderen Molekülen verzichtet wurde und somit die aus diesen WW resultierenden Bewegungsenergien nicht berücksichtigt werden mussten.

Die methodischen Bedingungen sind im Kapitel 6.2 beschrieben.

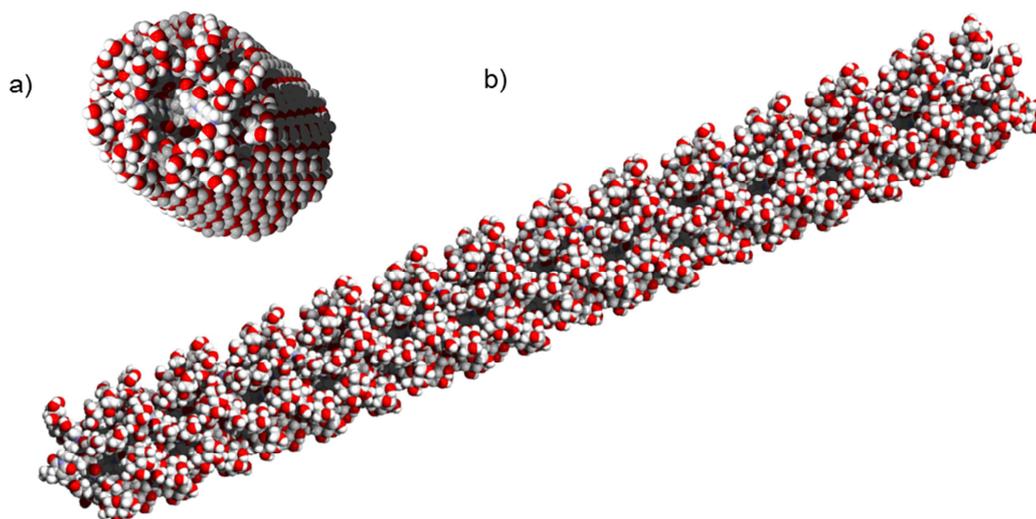


Abbildung 3-27: Molekulardynamische Simulation von **MI-G0-Mal** mit 100 Wiederholeinheiten a) mit Sicht von vorn und b) mit Längssicht

Die Simulation (siehe Abbildung 3-27) zeigt, dass die nullte Generation eine helikale Struktur annimmt, bei der sich die Lysinderivate symmetrisch verteilt um das lineare MI-Copolymer-Rückgrat anordnen. Dabei kommt es zu spiralförmigen Windungen der maltosemodifizierten Lysinderivate. Da der Torsionswinkel ein frei wählbarer Parameter ist, kann auch eine entgegengesetzte Rotation der Dendrone stattfinden und demzufolge eine spiegelverkehrte Struktur mit den gleichen Eigenschaften entstehen. Aufgrund der entropischen Triebkräfte nehmen zahlreiche Biopolymere, wie z. B. Proteine, eine helikale Form an.¹⁹² Auch bei dendronisierten Poly-L-Lysinen wurden bei den niedrigeren Generationszahlen (G1 und G2) im Bereich des Rückgrates helikale Strukturen identifiziert, während bei den höheren Generationen (G3 und G4) gestreckte Strukturen beobachtet wurden.⁷⁰ Arbeiten von Percec¹⁹³ und Schlüter¹⁹⁴ zeigten, dass helikale Strukturen im Polymerrückgrat durch Dendronisierung hervorgerufen und stabilisiert werden können. Untersuchungen mittels NMR, Breitband-Dielektrischer Spektroskopie und molekulardynamischer Berechnungen an dem Maleimid-Copolymer-Rückgrat wiesen ebenfalls auf eine helikale Molekülstruktur hin.¹⁹⁵ Es kann angenommen werden, dass mit zunehmender Dendronisierung die helikale Ordnung gestört wird und sich bei **MI-G1-Mal** und **MI-G2-Mal** knäuelartige Strukturen herausbilden. Bei **MI-G3-Mal** kommt es aufgrund der hohen Dendronendichte zu einer gestreckteren, semiflexiblen Molekülform, die schon als wurmartig bezeichnet werden kann.

Eine Möglichkeit, die nullte und dritte Generation strukturell sowohl auf der Basis von einzelnen Molekülen als auch von Aggregaten zu betrachten, bietet die Untersuchung bzw. Auftrennung der Proben mittels AF4 und deren Detektion mit LS. Hierbei können die breitverteilten Glykopolymersysteme in engverteilte Fraktionen mit unterschiedlichen Molmassen fraktioniert und Aussagen über das Scaling-Verhalten (siehe Kapitel 2.3, Gleichung 2-8 und 2-9) getroffen werden. Damit ist eine genauere Beschreibung der Moleküle, als mit dem schon erläuterten ρ -Parameter, möglich.

Für die strukturelle, geometrische Beschreibung von **MI-G3-Mal** sind in Abbildung 3-28 die R_g - M_w -Beziehungen bei pH = 3,5; 7 und 11 dargestellt. Im sauren Bereich sind die Trägheitsradien aufgrund der starken Aggregatbildung deutlich zu höheren Werten verschoben. Um den gesamten Molmassenbereich von **MI-G3-Mal** abzudecken, wurden für die Darstellung des Konformationsplots die Ergebnisse aus AF4-Messungen mit unterschiedlichen Probenkonzentrationen angewandt.

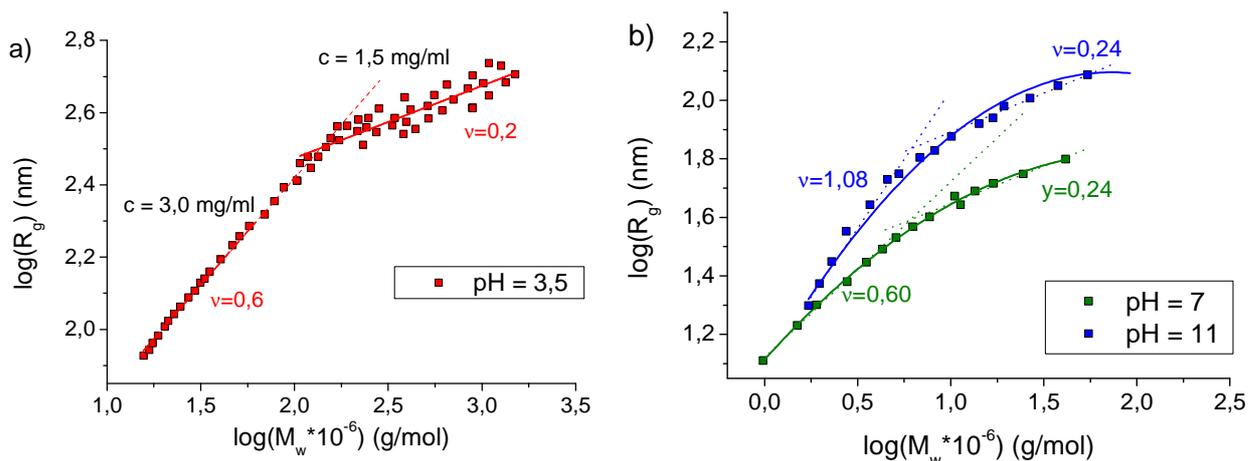
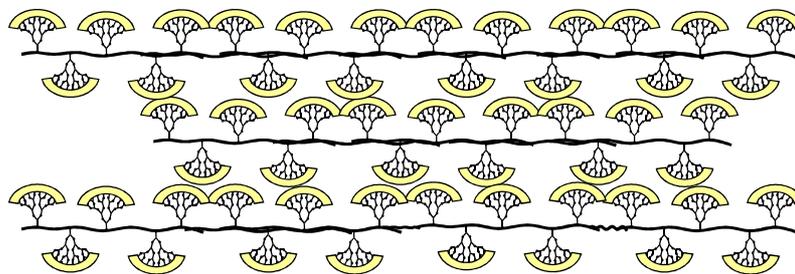


Abbildung 3-28: Abhängigkeit von R_g und M_w (Konformationsplots) von **MI-G3-Mal** bei a) pH = 3,5 (rot) und b) pH = 7 (grün) und pH = 11 (blau) bestimmt mittels AF4-LS, polynomieller Fit zweiter Ordnung ($R^2 > 0,95$) und linearer Fit zur Veranschaulichung bei niedrigeren Molmassen (gestrichelte Linien)

Die Konformationsplots bei allen drei pH-Werten zeigen einen ähnlichen Verlauf. Im Bereich der kleineren Molmassen bzw. Einzelmoleküle ist ein steiler, linearer Anstieg zu erkennen, welcher im hochmolekularen Bereich abflacht. Dieses nichtlineare Verhalten deutet daraufhin, dass eine Formänderung mit zunehmender Molmasse bzw. bei der Aggregation von Einzelmolekülen stattfindet. Zur Verdeutlichung wurde der erste Teil mittels linearem Fit (gestrichelte Linie) verlängert. Anhand des Scaling-Parameters von $\nu = 0,6$ für den sauren und neutralen pH-Bereich kann für die Einzelmoleküle von **MI-G3-Mal** ein ähnliches Verhalten abgelesen werden. Dieser Wert ist charakteristisch für geknäuelte Strukturen in einem guten Lösungsmittel. Bei pH = 11 ist der Anstieg steiler

bzw. der Scaling-Parameter mit $\nu = 1,08$ deutlich größer. Dieser Wert und die fraktale Dimension d_f von rund 1 definieren eine starre Stäbchenform der Moleküle.

Der niedrigere Anstieg im Bereich der hohen Molmassen ist ein Indiz für die Änderung der Struktur hin zu einer sehr kompakten kugelähnlichen Gestalt der Aggregate. Geringe Werte für ν bzw. hohe Werte für d_f bestätigen diese Annahme. Der Radienzuwachs ist nicht mehr direkt proportional zum Anstieg der Molmassen. Im Vergleich zu geknäulten Molekülen ist für sphärische Moleküle typisch, dass, aufgrund der kompakten Struktur, mit steigender Molmasse die Trägheitsradien nicht weniger zunehmen. Eine Ausnahme stellt bei diesen Untersuchungen die Aggregatform bei $\text{pH} = 11$ dar. Infolge der starren Stäbchenform der Moleküle kommt es zur Ausbildung von parallel angeordneten Aggregatstrukturen (siehe Schema 3-10). Solche lateralen Strukturen wurden auch schon bei der Ausbildung von Fibringerinnseeln beobachtet.¹⁹⁶ Dieses Phänomen tritt häufig bei Biomakromolekülen auf, unter anderem auch beim Aufschluss nativer Cellulose, bei dem sich die Elementarfibrillen zu Bändern zusammenschließen.¹⁹⁷ Weiterhin wird diese Art des Zusammenfindens von einzelnen Molekülen genutzt, um mittels „molekularem Kleber“ supramolekulare Nanostrukturen zu konstruieren.¹⁹⁸



Schema 3-10: Schematische Darstellung einer parallelen Anordnung der Aggregate (laterale Aggregation) von **MI-G3-Mal**

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch im basischen pH-Bereich bei sehr hohen Molmassen die Aggregate von **MI-G3-Mal** aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße eine sphärische Form aufweisen.

An dieser Stelle ergab sich die Frage, inwiefern die nullte Generation, welche ursprünglich als lineares Pendant zu den dendronisierten Glykopolymeren gelten sollte, in dieses Bild hinein passt. Aus diesem Grund wurden mit den gewonnenen Daten aus den AF4-LS-Messungen die Konformationsplots für die verschiedenen pH-Werte aufgetragen und die Scaling-Faktoren bestimmt (siehe Abbildung 3-29).

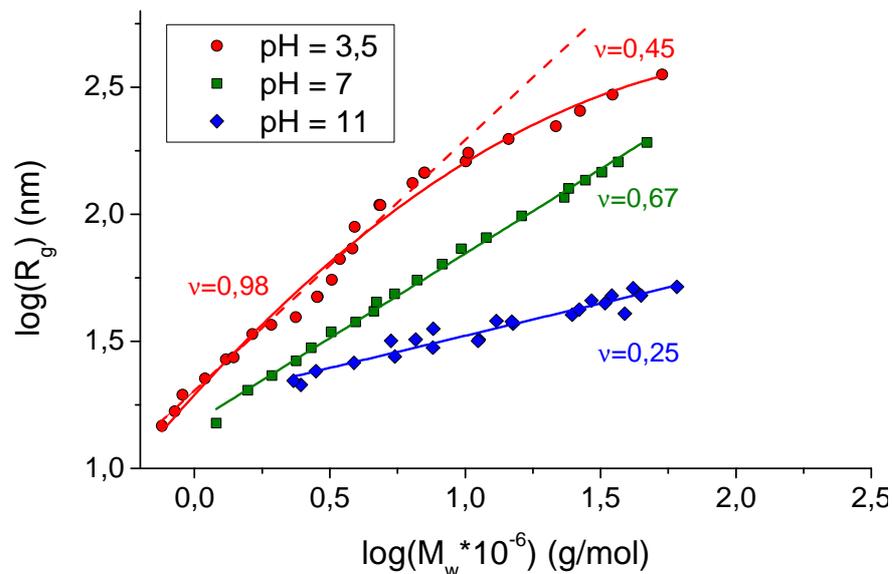


Abbildung 3-29: Darstellung der Konformationsplots: Abhängigkeit von R_g und M_w von MI-G0-Mal ($c = 1 \text{ mg/ml}$) bei verschiedenen pH-Werten zur Ermittlung von ν (bei pH 3,5 polynomieller Fit 2. Ordnung ($R^2 > 0,95$), gestrichelte Linie linearer Fit zur Veranschaulichung, bei pH 7 und 11 linearer Fit)

Der Verlauf des Konformationsplots von **MI-G0-Mal** im sauren Bereich ($\text{pH} = 3,5$) zeigt ein nichtlineares Verhalten, welches auch schon bei MI-G3-Mal beobachtet wurde. Der lineare Verlauf (gestrichelte Linie) im Bereich der niedrigeren Molmassen zeigt mit einem Scaling-Faktor von $\nu = 0,98$ bzw. einer fraktalen Dimension $d_f = 1,02$, dass auch hier die Moleküle in Form von starren Stäbchen vorliegen. Ebenso wie bei **MI-G3-Mal** kann davon ausgegangen werden, dass bei höheren Molmassen die Moleküle kugelförmige Aggregate bilden. Die anderen Messungen zeigen einen linearen R_g/MM -Verlauf. Mit steigendem pH-Wert sinken die Scaling-Faktoren bzw. steigen die fraktalen Dimensionen von **MI-G0-Mal** an. Das bedeutet, dass die Moleküle ihre geometrische Form in Abhängigkeit des pH-Werts von Stäbchen als Einzelmoleküle bei niedrigen pH-Werten über statistische Knäuel bei $\text{pH} = 7$, bis hin zu dichten Aggregatmolekülen bei hohen pH-Werten ($\nu = 0,25$) ändern. Die sehr große fraktale Dimension von 4 bei pH 11 ist unüblich für Polymere, kann jedoch damit begründet werden, dass innerhalb des Moleküls verschiedene Strukturen vorhanden sind, welche von einer definierten, dichten Oberfläche umgeben sind.¹⁹⁹

Um die Aggregationsvorgänge besser verstehen zu können und die bisher erlangten Ergebnisse zu verifizieren und visualisieren, stellt die Anwendung von mikroskopischen Methoden einen weiteren Ansatzpunkt dar. Dazu wurde anfangs eine wässrige, verdünnte **MI-G3-Mal**-Lösung ($c = 0,01 \text{ g/mol}$) auf einen Si-Wafer als Substrat mittels Eintauch-(Dip-) bzw. Rotations-(Spin-)beschichtung aufgebracht. Das Ziel der

Untersuchungen war, einzelne Moleküle bzw. Aggregate sichtbar zu machen. Aus diesem Grund war es notwendig, die verwendete Lösung in sehr geringer Konzentration herzustellen, um das Risiko des Auftretens von Agglomeration in Form eines durchgehenden Films auf dem Substrat zu minimieren. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der AFM-Untersuchungen (Abmessung: 700 nm x 700 nm) dargestellt. Für die Visualisierung der Strukturen wurde eine sehr scharfe Spitze verwendet, um eine möglichst genaue Abbildung der Aggregate zu erhalten.

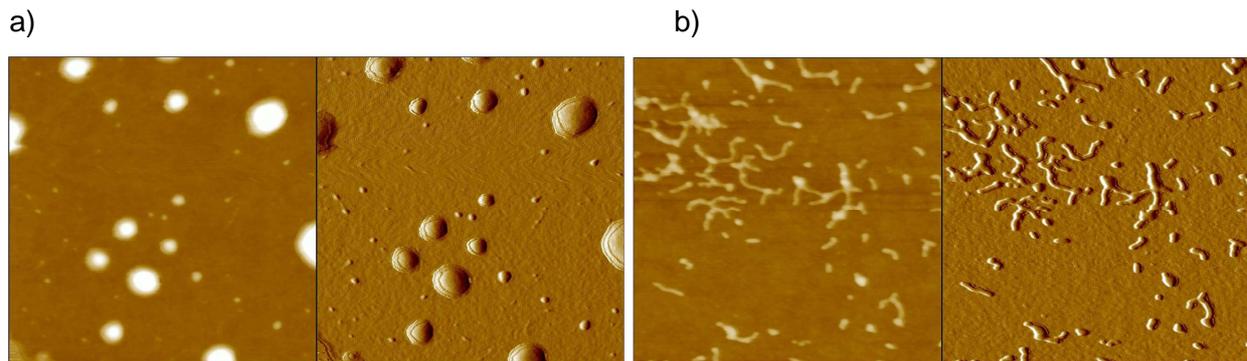


Abbildung 3-30: AFM-Aufnahmen der **MI-G3-Mal** auf Si-Wafer $c = 0,01$ mg/ml (reines Wasser), 700x700 nm Ausschnitt, jeweils Topologie- (links) und Phasenkontrast (rechts) präpariert mittels a) Eintauchbeschichtung und b) Rotationsbeschichtung (50 U/s)

In der Abbildung 3-30a sind die AFM-Aufnahmen des Wafers dargestellt, bei dem die Polymere mittels Eintauchen in die Polymerlösung aufgebracht wurden. Die Strukturen zeigen tropfenförmige Gebilde, die während des Trocknungsvorgangs entstanden sind. Da die Trocknung der Lösung langsam vonstatten ging, kam es zu einer Aufkonzentration der Moleküle, die sich anschließend abhängig von ihrer Löslichkeit in unterschiedlichen Höhenniveaus anreicherten. Diese Beschichtungsmethode ist ungeeignet, um einzelne Aggregate sichtbar zu machen. Aus diesem Grund wurde der Rotationsbeschichtungsprozess angewandt. Bei diesem wird die Lösung durch die Zentrifugalkraft, hervorgerufen durch die Drehbewegung, vom Substrat transportiert, während die Moleküle auf der Substratoberfläche haften bleiben. In Abbildung 3-30b sind die AFM-Aufnahmen dargestellt, bei denen die Moleküle mittels Rotationsbeschichtung mit einer Drehzahl von 50 U/s aufgebracht wurden. Aufgrund der Zentrifugalkraft bzw. des mechanischen Stresses während des Drehvorgangs konnten sich die Moleküle nicht zu den vorher beobachteten tropfenförmigen Gebilden zusammenfinden. Es sind wurmartige Strukturen sichtbar. Die relativ kurzen Moleküle deuten jedoch drauf hin, dass es, aufgrund der hohen Scherkräfte, zu Brüchen in den Molekülketten und zur Deformation kam. Aus diesem Grund wurde eine der

Eintauchmethode ähnliche Adsorption durchgeführt, bei der die Lösung auf das Substrat getropft und anschließend sofort entfernt wird. Dabei konnten ebenfalls einzelne Moleküle sichtbar gemacht werden. In der folgenden Abbildung 3-31 ist ein Vergleich von **MI-G0-Mal**, **MI-G1-Mal** und **MI-G3-Mal** bei $\text{pH} = 3,5$ mit den dazugehörigen Querschnitten dargestellt.

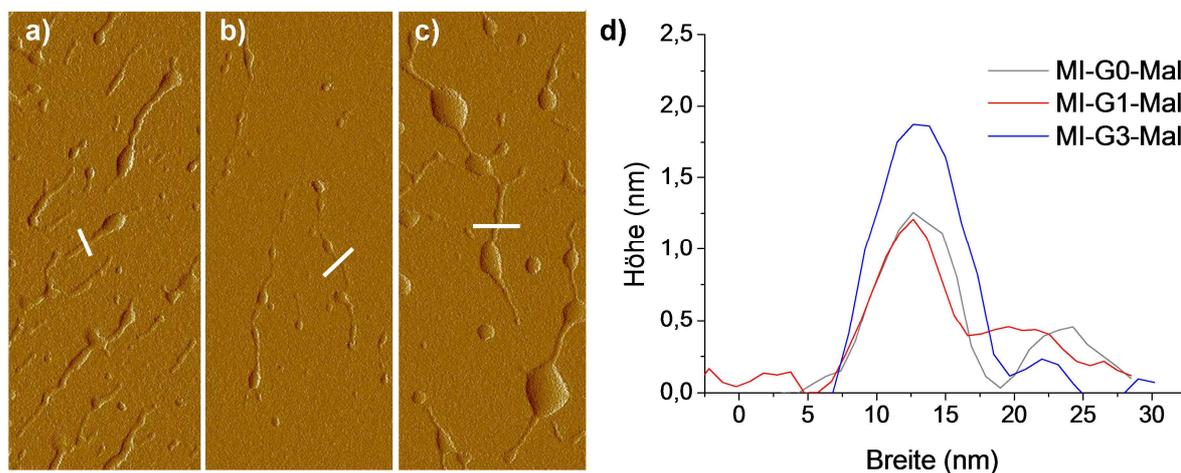


Abbildung 3-31: AFM-Aufnahmen von a) **MI-G0-Mal**, b) **MI-G1-Mal** und c) **MI-G3-Mal** auf Si-Wafern, hergestellt mittels Eintauchen ($\text{pH} = 3,5$). *Peak Force Error* Aufnahme, Bildgröße $400\text{nm} \times 1000\text{nm}$ und d) gemittelte Querschnittsprofile der jeweiligen in a), b) und c) dargestellten, weißen Querschnittsbalken

Die Aufnahmen zeigen, dass die Einzelmoleküle von **MI-G3-Mal** im Vergleich zur nullten und ersten Generation breiter (ca. 12 nm) und höher (ca. 2 nm) sind. Bei den Angaben ist jedoch zu beachten, dass die ermittelten Werte sowohl von der Oberflächengeometrie als auch der AFM-Spitzendicke abhängig sind und daher nur einen tendenziellen Vergleich untereinander ermöglichen.

Versuche, die Strukturen auf einem Substrat mittels Rasterelektronenmikroskopie sichtbar zu machen, brachten leider nicht den gewünschten Erfolg, da die Auflösung niedriger war (Abbildung A-2 im Anhang). Als weitaus geeignetere Methode zur bildhaften Darstellung der Strukturen direkt in der Lösung hat sich die Transmissionselektronenmikroskopie unter cryo-Bedingungen (cryo-TEM) etabliert. Hierbei wird ein Tropfen der Polymerlösung mittels flüssigem Ethan bei -135 °C gefriergetrocknet, wodurch die in Lösung vorliegenden Molekülformen beibehalten werden. Die Aufnahmen von **MI-G1-Mal** bestätigen bei einem niedrigem pH -Wert von $3,5$, die erwartete, wurmförmliche Struktur, welche auch durch die Konformationsplots vorhergesagt wurde. Die Moleküle liegen isoliert vor und bilden, wie erwartet, keine großen Aggregate mit hohen Aggregationszahlen.

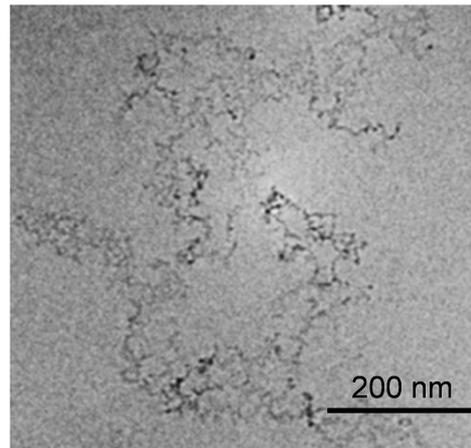


Abbildung 3-32: Cryo-TEM-Aufnahme der Makromoleküle von **MI-G1-Mal** bei pH = 3,5

Bei den Untersuchungen von **MI-G3-Mal** bei verschiedenen pH-Werten wurden folgende Strukturen beobachtet: Im Bereich von pH = 3,5 wurden, wie auch schon bei **MI-G1-Mal** wurmförmige Molekülstrukturen (siehe Abbildung 3-33a, großes Bild) sichtbar. Durch Aggregation von mehreren Molekülen ändert sich die Struktur zu kugelförmigen Gebilden, die Ähnlichkeiten mit Mizellen (siehe Abbildung 3-33a, kleines Bild) aufweisen. Dieses Verhalten wurde ebenso bei pH-Wert 7 beobachtet. Im alkalischen Bereich bei pH = 11 konnten zueinander parallel ausgerichtete Strukturen (gekennzeichnete Struktur, Abbildung 3-33b) bei den einzelnen, gestreckten Molekülen als auch Aggregaten beobachtet werden. Die weiteren Strukturen, welche auf den Bildern erkennbar sind, konnten dem Träger-Kohlenstoffnetzchen zugeordnet werden. Somit stützen diese Aufnahmen die Aussagen, die mittels AF4-LS gewonnen wurden.

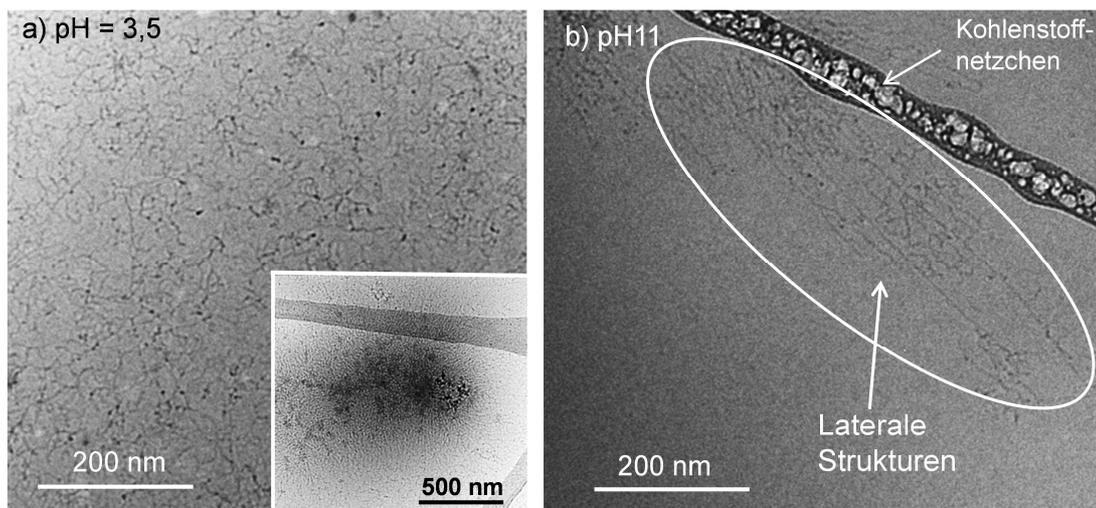


Abbildung 3-33: Cryo-TEM-Aufnahmen von den Einzelmolekülen (großes Bild) und den Aggregaten (kleines Bild) **MI-G3-Mal** a) pH = 3,5; und b) bei pH = 11

Als letzten Schritt wurden die Strukturen von **MI-G0-Mal** bei verschiedenen pH-Werten mittels cryo-TEM untersucht. Hierbei wurden die, bei den Lichtstremessungen beobachteten, Strukturen ebenfalls verifiziert.

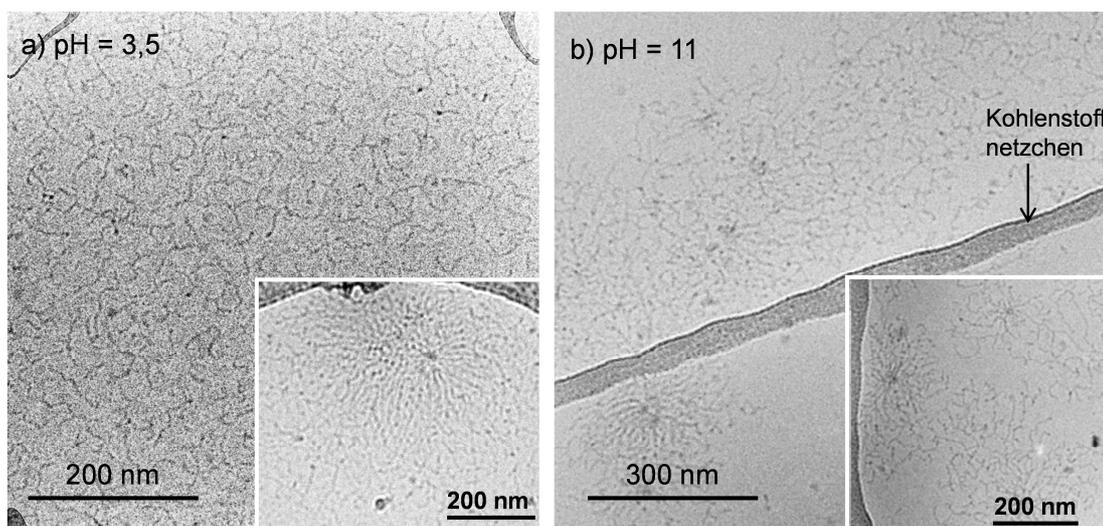


Abbildung 3-34: Cryo-TEM-Aufnahmen von den Einzelmolekülen (großes Bild) und den Aggregaten (kleines Bild) **MI-G0-Mal** a) pH = 3,5; und b) bei pH = 11

Im Bereich von pH = 3,5 konnten bei **MI-G0-Mal** wurmförmliche Strukturen bei den einzelnen Molekülen nachgewiesen werden. Auffällig ist hierbei, dass die Länge (200 nm) im Vergleich zur dritten Generation (etwa 500 nm) signifikant kürzer ist, was durch die helikale Struktur (Abbildung 3-34) hervorgerufen wird. Bei **MI-G3-Mal** kommt es durch die fehlende Ordnung zu einer Streckung des Polymermoleküls und folglich zu längeren Einzelmolekülen. Im Fall von Aggregation bilden sich kugelartige Strukturen, die auch schon bei **MI-G3-Mal** beobachtet wurden. Diese TEM-Aufnahmen für die nullte Generation bestätigen auch die Ergebnisse der Lichtstreuung bzw. der jeweiligen Konformationsplots.

Mit diesen zahlreichen Informationen zur Molekülstruktur und weiteren bekannten Eigenschaften ist es möglich, das pH-abhängige Aggregationsverhalten aufzuklären. Dazu wird ein Konzentrationsbereich von 0,1 bis maximal 1 mg/ml betrachtet. Höhere Konzentrationen begünstigen bei allen Generationen die Bildung von H-Brücken und somit eine Aggregation.

Im Fall von **MI-G1-Mal** und **MI-G2-Mal** wird in dem untersuchten pH-Bereich (3,5 - 11) keine bevorzugte Aggregation beobachtet. Hier ist es möglich, dass bei niedrigen Konzentrationen, durch die vergleichbar geringere Anzahl an funktionellen Gruppen, die

wurmähnliche Struktur und die positiven Ladungen eine Aggregation im starken Ausmaß verhindern bzw. es nicht zur Ausbildung von stabilen Aggregaten kommt.

Obwohl **MI-G3-Mal** eine mit den anderen Generationen vergleichbare Oberflächenladung aufweist, zeigt es bei sehr hohen pH-Werten (pH 11) und niedrigen Konzentrationen eine starke Neigung zur Aggregation, obwohl sich die Moleküle aufgrund der negativen Oberflächenladung abstoßen müssten. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die erhöhte Salzionenkonzentration (OH^- und Na^+) in der Lösung sein, die eine Aggregation induzieren. Durch die hohe Anzahl an OH-Gruppen ist es zusätzlich möglich, dass eine Verdichtung der Maltosehülle stattfindet. So erreichen die Moleküle die beobachtete, hohe molekulare Dichte und nehmen die starre Form eines Stäbchens an. Durch die maximierte Oberfläche wird ebenfalls eine Aggregation durch H-Brücken begünstigt. Es kommt zur parallelen Zusammenlagerung der einzelnen Stäbchen und zur Ausbildung der beobachteten lateralen Strukturen. Im Bereich des isoelektrischen Punktes (pH~9,5) sind keine Ladungen mehr vorhanden, die repulsiven Kräfte nehmen ab und die attraktiven Kräfte zu. Da aber auch die Salzeffekte abnehmen, werden, im Vergleich zu pH 11, geringere Aggregationszahlen beobachtet. Bei der weiteren Absenkung des pHs nehmen die Ladungen und demzufolge auch die repulsiven Kräfte zu, die eine Aggregation durch H-Brücken infolge großer Molekülabstände hemmen. Im stark sauren Bereich (pH 3,5) erreichen die Aggregationszahlen trotz positiver Oberflächenladung ihr Maximum. Ein maximaler Protonierungsgrad der sekundären und tertiären Aminogruppen der Lysindendrone bewirkt eine Aufweitung der Maltoseschale. Dadurch kommt es zu einer höheren Flexibilität und eine wurmartige Gestalt wird hervorgerufen. Da bei pH 3,5 trotz der hohen Ladungen ebenfalls sehr hohe Aggregationszahlen erhalten werden, lässt sich daraus schließen, dass auch hier die Aggregation nicht durch ladungsinduzierte Triebkräfte (Coulomb-Kräfte) hervorgerufen wird. Es liegt die Vermutung nahe, dass auch bei diesen Bedingungen die Bildung von H-Brücken durch Salzeffekte (H^+ und Cl^-) begünstigt wird.

Etwas komplizierter ist die Erklärung des Aggregationsverhaltens von **MI-G0-Mal**. Trotz der deutlich geringeren Anzahl an funktionellen Gruppen und der fehlenden Verzweigung wird hier ein zu **MI-G3-Mal** vergleichbares Aggregationsverhalten beobachtet. Jedoch ist das Strukturverhalten anders. Eine mögliche Ursache ist demzufolge in der veränderten Molekülstruktur zu suchen. Durch die helikale Struktur von **MI-G0-Mal** und der hohen Moleküldichte wird bei niedrigen pH-Werten eine starre Stäbchenform hervorgerufen. Die Stäbchenform begünstigt durch die große Oberfläche

der funktionellen Gruppen die Aggregation. Zusätzlich dazu unterstützen, wie auch bei **MI-G3-Mal**, Salzeffekte die Bildung von H-Brücken. Bei Erhöhung des pH-Wertes bleiben zwar die Oberflächenladungen gleich, jedoch nimmt die Salzkonzentration ab und die metastabile Konfiguration der helikalen Struktur des Polymerrückgrates wird zerstört. Die Folge davon ist eine flexiblere, wurmähnliche Struktur, durch welche die Neigung zur Bildung von Aggregaten abnimmt. Erst im stark basischen pH-Bereich (pH 11) nehmen die Aggregationszahlen wieder zu, weil, wie schon erwähnt, die Salzeffekte die Bildung von H-Brücken begünstigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Polylysin-dendronisierten Glykopolymere von sehr vielen Faktoren abhängt und damit eine sehr hohe Komplexität der Fragestellung verursacht. Als Untersuchungsmethode wurde hierbei die AF4-LS als zielführend erachtet. Nach einer umfassenden Messmethodenentwicklung war es möglich, Messungen bei verschiedenen pH-Werten durchzuführen, welche genaue Aussagen über die strukturellen Eigenschaften der Moleküle bzw. deren Aggregate lieferten. Mit der Auswertung des Konformationsplots und der Bestimmung von Strukturparametern konnten Informationen über die Strukturänderung in Abhängigkeit des pH-Werts und der Molekülgröße erhalten werden. Die dabei erhaltenen Informationen konnten mit mikroskopischen Methoden validiert werden. In der folgenden Tabelle 3-11 ist die vollständige Strukturübersicht der Einzelmoleküle und der Aggregate in Abhängigkeit des pH-Werts dargestellt.

Tabelle 3-11: Schematische Strukturübersicht der einzelnen Makromoleküle sowie der Aggregate der polylysin-dendronisierten Glykopolymere in Abhängigkeit zur Generationszahl und pH-Wert

MI-G0-Mal			MI-G1-Mal / MI-G2-Mal			MI-G3-Mal		
pH 3	pH 7	pH 11	pH 3	pH 7	pH 11	pH 3	pH 7	pH 11
								
								

Mit den Ergebnissen der in diesem Kapitel vorgestellten Untersuchungen wird deutlich, dass die Form der Moleküle das Aggregationsverhalten sehr stark beeinflusst. Es konnte nachgewiesen werden, dass **MI-G0-Mal** aus helikal strukturierten, starren Stäbchen besteht, welche dichte sternähnliche Aggregate bei pH = 3,5 bilden und bei pH-Erhöhung eine globulare Form annehmen. Eine Änderung bzw. Umordnung der helikalen Struktur hin zu wurmähnlichen Formen wird durch die Dendronisierung des Rückgrats erreicht. Bei der ersten und zweiten Generation kommt es dabei zu keiner nennenswerten Aggregation unabhängig vom pH-Wert. Grund dafür ist die geringe Anzahl an funktionellen Gruppen an der Oberfläche. Die Substitution mit Dendronen dritter Generation führt zu dichten, wurmähnlichen Strukturen, welche eine parallele, laterale Anordnung der Moleküle zu Aggregaten bei einem pH-Wert von 11 hervorrufen. Diese Struktur korreliert mit der sehr hohen scheinbaren Dichte von **MI-G3-Mal** bei pH = 11 sowie von **MI-G0-Mal** bei pH = 3,5. **MI-G3-Mal** weist mit abnehmendem pH-Wert eine geringere Steifheit und wurmartige Struktur auf.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Feldflussfraktionierung

Verschiedene multifunktionelle Polymersysteme bzw. deren WW sowie kontrollierte Aggregation zu untersuchen, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Dazu sollten Alternativen für bisherige Standardmethoden zur Bestimmung von Molmassen und Radien von verzweigten Makromolekülen angewandt werden. Aufgrund von zahlreichen Problemen, die bei Untersuchungen mittels der SEC auftreten (WW mit dem Säulenmaterial, Molekülgröße oberhalb der Trennschwelle), wurde die asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung herangezogen, um hochverzweigte Polyester und verschiedene Arten von verzweigten Glykopolymeren sowie deren WW umfassend und genauestens zu untersuchen.

Verzweigte Polymere und besonders hochverzweigte Polyester mit ihrer Vielzahl an funktionellen Gruppen stellen eine Herausforderung für eine eingehende Molmassenbestimmung dar. Mittels der AF4-LS konnte ein breiter Molmassenbereich (M_w von 10.000 bis hin zu 85.000.000 g/mol) bestimmt werden, welchen die SEC nicht ermöglicht hatte. Messungen mit verschiedenen Lösungsmitteln (THF und DMAc) lieferten keine oder fehlerbehaftete Ergebnisse. Demzufolge bietet die AF4 die Möglichkeit, als Alternative zur SEC, eine Separation zu erhalten und im Anschluss

durch die geeignete Detektion eine Molmassenbestimmung durchzuführen, die zu sehr genauen Ergebnissen führt.

Für die Untersuchung des Komplexierungsverhaltens von verzweigten Glykopolymeren (PEI-Mal) mit einem Modellfarbstoff (Rose Bengal) wurde eine neue AF4-Mess- und Quantifizierungsmethode entwickelt, um den Gehalt an aufgenommenen Farbstoff zu bestimmen. Bisher angewandte Methoden liefern dabei fehlerhafte Ergebnisse. Mit einer angepassten Untersuchungsmethode für die AF4-LS ist es nun möglich, unter bestimmten Voraussetzungen, in deutlich kürzerer Zeit, akkurate Ergebnisse zu erhalten. Dabei wurden verschiedene Messparameter, wie z. B. Membranmodifizierung, Stabilität der Lösungen und Einfluss der Flusstärken berücksichtigt. Anschließend wurden Kinetikuntersuchungen mit verschiedenen Zusammensetzungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Komplexbildung sehr schnell stattfindet und die Komplexe eine hohe Stabilität aufweisen. Hierbei wurde der vom Glykopolymer aufgenommene Farbstoffgehalt zum einen mittels einer Kalibrierung einer quantitativen UV-Vis-Detektion innerhalb ermittelten Detektionsgrenzen von 16 und 80 µg RB pro Injektion und zum anderen über den mittels LS-Detektion ermittelten Molmassenzuwachs bestimmt. Die erhaltenen Werte konnten sehr gut miteinander korreliert werden. Die Zusammenfassung aller durchgeführten Versuchsreihen zeigte einen Trend zur maximalen Aufnahme von 271 RB-Molekülen pro PEI-Mal. Die erhaltenen Ergebnisse sind gut mit Werten aus UV-Vis-Messungen im Batch verifizierbar. Die alternative Bestimmungsmethode mittels AF4 birgt eine Vielzahl von weiteren Einsatzmöglichkeiten beispielsweise zur Untersuchung von diversen Gastmolekülen und deren Aufnahme von Wirkstoffen oder anderen Partikeln. Nach einer einmaligen Methodenentwicklung sind hier umfassende Studien möglich.

Ebenfalls ist es erstmals im Rahmen dieser Arbeit gelungen, die AF4-LS anzuwenden, um das Aggregationsverhalten von Glykopolymeren, substituiert mit Polylysindendronen, in verschiedenen Generationen umfassend zu untersuchen. Über die Molmassen und Trägheitsradien konnten Rückschlüsse auf die Aggregation unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Konzentration, pH-Wert) gezogen werden. Dabei zeigte sich, dass mit steigender Konzentration sowohl die Molmassen als auch die Trägheitsradien zunehmen. Dieser Trend verstärkt sich mit zunehmender Generationenzahl. Im Vergleich zur ersten und zweiten Generation zeigten die nullte und dritte Generation weiterhin eine sehr starke pH-Abhängigkeit der Aggregation. Sowohl im stark sauren, als auch im stark basischen Bereich erreichte die jeweilige

Aggregationszahl ihr Maximum. Aufgrund der gelungenen Auftrennung mittels der AF4 konnten auch Aussagen über die Struktur in Abhängigkeit zur Molmasse getroffen werden. Unter Einsatz von zusätzlichen Methoden (DLS, MD-Simulation und Mikroskopie) konnten Aussagen über die Molekül- bzw. Aggregatstruktur in Lösung der verschiedenen Generationen des Polylysin-dendronisierten Glykopolymers getroffen werden und der Einfluss der Molekülstruktur auf das generationsabhängige Aggregationsverhalten aufgeklärt bzw. diskutiert werden. Im Fall der dritten Generation konnten beispielsweise, unter Zuhilfenahme von ρ -Parametern und fraktalen Dimensionen, laterale Aggregatstrukturen nachgewiesen werden. Die Strukturen konnten mittels cryo-TEM-Aufnahmen validiert werden.

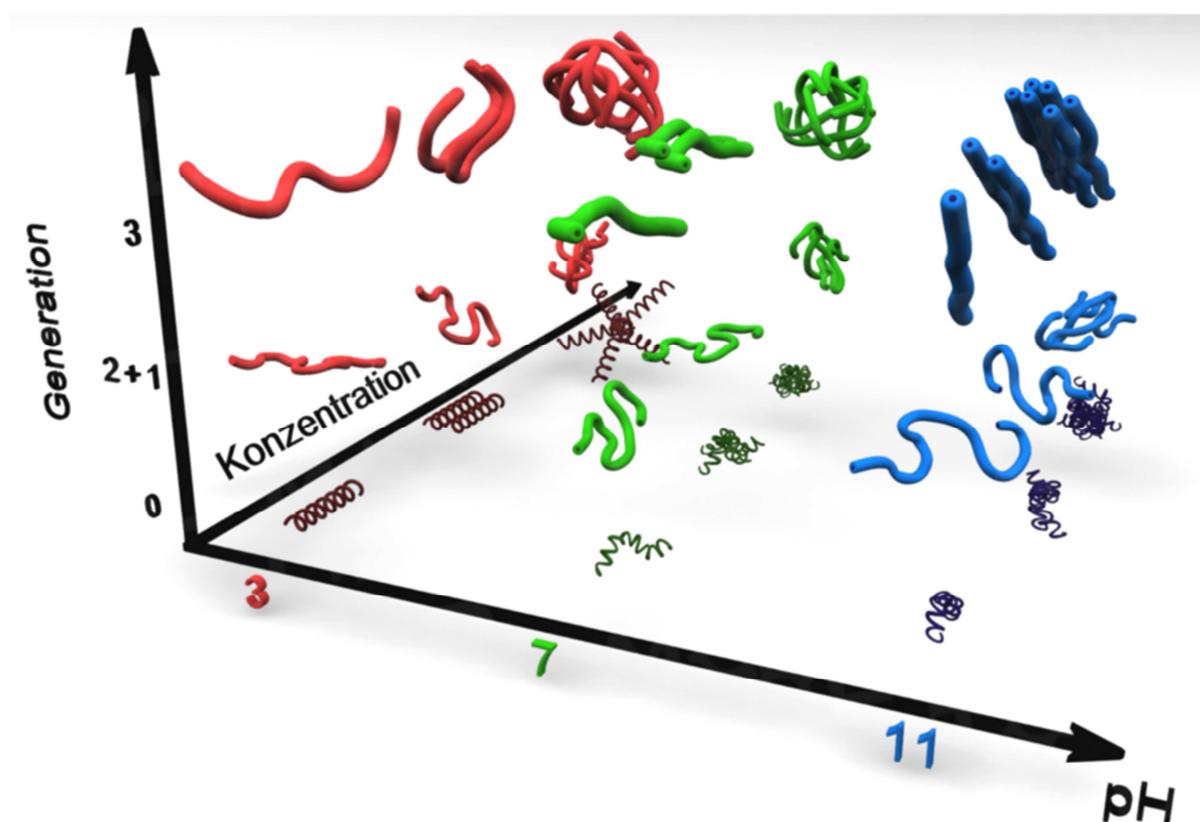


Abbildung 3-35: Vollständige Übersicht der schematischen Molekülstrukturen der verschiedenen Generationen der Polylysin-dendronisierten Polymere mit Maltosehülle als Einzelmoleküle und Aggregate mit der gleichen Rückgratlänge bei verschiedenen pH-Werten

Eine zusätzliche Methode zur Abbildung und Überprüfung der Strukturen ist die *insitu*-AFM. Hierbei sollte es möglich sein, durch eine geladene Substratoberfläche innerhalb eines Flüssigkeitstropfens die Strukturen mit Hilfe der AFM-Spitze darzustellen. Im Anschluss an diese umfassende molekulare Charakterisierung, kann die Eignung für

spezielle Applikation unter anderem als Wirkstoffträger, Biokatalysator oder zur molekularen Erkennung überprüft werden. Weiterhin kann das Verständnis für die Aggregation durch Polyelektrolyttitrations vertieft werden, indem der Einfluss von Salzen auf die Oberflächenladungen beobachtet wird. Durch eine weiterentwickelte Synthese sollte es möglich sein, noch höhere Generationen herzustellen und diese dann analog zu den vorgestellten Methoden zu untersuchen. Weiterhin ist es interessant, den Einfluss der Zuckerhülle auf die Strukturen und Aggregate zu untersuchen. Hierbei könnten beispielsweise Laktose oder Maltotriose eingesetzt und studiert werden.

Für die Separation von multifunktionellen, dendritischen Polymeren ist die AF4 eine gute Alternative zu den bisher angewandten Standardtechniken, wie z. B. der SEC. In zukünftigen Studien könnte der Einfluss der Verzweigung auf die Trennung untersucht werden. Hierbei sollte es möglich sein, durch unterschiedliche Diffusionseigenschaften eine Separation hinsichtlich der Topographie und des Verzweigungscharakters zu erhalten.

4 Phasendistributionschromatographie von verzweigten Polymeren

4.1 Grundlagen der Phasendistributionschromatographie

Die meisten neuen Methoden zur Trennung von linearen und verzweigten Polymeren laufen auf der Basis von thermodynamischen Unterschieden ab. Sehr empfindlich auf diese Unterschiede reagiert das thermodynamisch getriebene Phasenverhalten von Polymeren. Anfang der 1970er Jahre stellten Casper und Schulz²⁰⁰ in Mainz ein neuartiges Konzept zur Fraktionierung von linearem, engverteiltem Polystyren vor. Bis zu diesem Zeitpunkt war es nicht möglich, Polymere mit engen Molmassenverteilungen hinsichtlich ihrer Dispersitäten zu charakterisieren, da es keine theoretische Erklärung des Aufspreizungsphänomens bzw. mathematische Korrektur innerhalb der Trennsäulen gab. Das Prinzip der sogenannten Phasendistributionschromatographie (PDC) beruht auf einer molmassenabhängigen Auftrennung invers zur SEC und einer Modifizierung der bekannten Fraktionierung nach Baker-Williams²⁰¹. Allgemein kann die PDC als ein dynamisches Entmischungsexperiment unterhalb der θ -Temperatur beschrieben werden, welches durch verschiedene Löslichkeitsparameter hervorgerufen wird. Im Gegensatz zur SEC findet die Separation bei der PDC nicht hinsichtlich des hydrodynamischen Volumens statt. Verglichen mit der Baker-Williams-Fraktionierung basiert die PDC-Auftrennung auf der Verteilung bzw. den thermodynamisch-kinetischen WW der Polymerprobe von stationärer und mobiler Phase, jedoch ohne den Einsatz von Lösungsmittelgradienten. Die stationäre Phase besteht bei der PDC aus einem unvernetzten, hochmolekularen Polymerfilm, welcher auf einem Trägermaterial aufgebracht ist. Diese Schicht quillt in ausreichender Entfernung zum kritischen Punkt innerhalb der Mischungslücke des Polymer/Lösungsmittel-Systems bei Kontakt mit dem Lösungsmittel an. Werden nun deutlich kleinere Polymermoleküle mit identischem Monomeraufbau an der stationären Phase vorbeigeführt, so verteilen sich die Homologen entsprechend ihrer Molmasse, wobei die Separationseffizienz abhängig von der Temperatur ist. Außerdem wird hierbei die niedrigere Löslichkeit der stationären Phase aufgrund der höheren Molmasse ausgenutzt, da diese bei den Temperaturen, bei denen die Trennung stattfindet (unterhalb der θ -Temperatur), unlöslich ist.

Um die aktuellen Problemstellungen bei der Auftrennung von linearen und unterschiedlich verzweigten Polymeren bzw. das Problem der Co-Elution bei verschiedenen Verzweigungsdichten aufzuklären, soll die Methode der PDC angewandt

werden. Hierbei wird die im Vergleich zu den linearen Analoga verbesserte Löslichkeit ausgenutzt, wodurch zu erwarten ist, dass günstigere WW zwischen den verzweigten Polymeren und dem Lösungsmittel stattfinden. Demzufolge halten sich die stärker verzweigten Moleküle bevorzugt in der mobilen Phase auf und werden im Vergleich zu den linearen Polymerketten deutlich eher aus der PDC-Säule eluiert. Diese Kombination aus stationärer und mobiler Phase mit identischem chemischem Charakter verspricht eine Auftrennung, welche einzig durch Topologie und Molmasse getrieben wird, ohne weiteren Einfluss von zusätzlichen Wechselwirkungsparametern. In dieser Arbeit wird, wie schon in den vorangegangenen Arbeiten von Casper^{200, 202}, das System von Polystyren (PS) und dessen θ -Lösungsmittel Cyclohexan (CH) verwendet.

Theoretisch betrachtet, wird der Distributionskoeffizient K als Maß für die Verteilung des zu trennenden Polymers zwischen stationärer Phase (UHPS, unvernetzt) und der mobilen Phase (verdünnte PS-Lösung in CH) nach Brønsted und Schulz wie folgt definiert:

$$K(P_n) = \phi_{\text{Gel}} / \phi_{\text{Sol}} = \exp(\varepsilon \cdot P_n) \quad \text{Gleichung 4-1}$$

Hierbei wird K als Funktion des Polymerisationsgrads P_n eingesetzt. Da angenommen wird, dass die beiden Phasen im Gleichgewicht sind, kann $K(P)$ auf der Basis der *Flory-Huggins*-Gleichung direkt aus dem Elutionsvolumen bestimmt werden. Die Variable ϕ bildet die jeweilige Volumenfraktion des zu trennenden Polymers in Sol (mobile Phase) und Gel (stationäre Phase), während ε eine positive Konstante ist. Im Gegensatz zur SEC nimmt hier das Elutionsvolumen V_E mit steigendem P_n zu:

$$V_E = V_0 (1 + K(P_n) \cdot (\frac{V_{\text{Gel}}}{V_{\text{Sol}}})) \quad \text{Gleichung 4-2}$$

Das Totvolumen V_0 der Säule wird als freies Volumen zwischen den Partikeln des Packungsmaterials im Inneren der Säule definiert. Theoretisch betrachtet, führt diese Gleichung zu einer linearen Abhängigkeit, jedoch stützten die bisher durchgeführten Experimente diese Annahme nicht. Weiterhin ist Gleichung 4-2 nur gültig für die Phasenverteilung in der Region nahe der θ -Temperatur (bei PS: 35 °C).^{200, 203} Jedoch wurden, aufgrund zu geringer Auflösung und der verbesserten Löslichkeit von UHPS, die Trennungen nicht in diesem Temperaturbereich durchgeführt.²⁰⁴ Der gesamte theoretische Hintergrund einschließlich Thermodynamik und molekularen Transport-

effekten, Flussgleichgewicht, Bestimmung von engen Molmassenverteilungen sowie Deformationskonzept wurde ausführlich von Greschner beschrieben.²⁰⁵⁻²⁰⁸

4.2 Ergebnisse der Auftrennung von sternförmigem und linearem Polystyren mittels Phasenverteilungschromatographie

4.2.1 Modifizierung und Charakterisierung der stationären Phase

An erster Stelle der PDC-Methodenadaption für die Auftrennung von linearen und verzweigten Polystyrenproben stand die Herstellung einer geeigneten stationären Phase.

Eine homogene und stabile Beschichtung eines Trägermaterials ist für erfolgreiche Trennversuche von grundlegender Voraussetzung. Dazu sollten, wie schon bei Casper beschrieben²⁰⁰, kleine Glaskügelchen (Ballotini, ca. $\varnothing = 0,2$ mm) als Trägermaterial für den Polymerfilm aus ultrahochmolekularen Polystyren (UHPS, $M_w = 8.090.000$ g/mol) dienen. Dabei war die wichtigste Voraussetzung, dass die Molmasse des Polystyrens durch mechanische Einwirkung nicht verringert wird und zum anderen keine Vernetzung stattfindet. In ersten Versuchen wurde eine Immobilisierung auf der Glasoberfläche mittels Elektronenbestrahlung getestet. Der entstandene Polymerfilm war zwar stabil auf der Oberfläche der Ballotini aufgebracht, jedoch fand gleichzeitig eine Vernetzung statt, wodurch die stationäre Phase durch die Veränderung der thermodynamischen Eigenschaften für die PDC unbrauchbar wurde. Aus diesem Grund wurde anschließend die Beschichtung, wie in der Literatur beschrieben²⁰⁹, durch einfaches Vermischen der Ballotini mit einer konzentrierten UHPS-CH-Lösung (40 °C) und anschließender Verdampfung des Lösungsmittels durchgeführt. Jedoch führte diese Methode aufgrund von mechanischen Einwirkungen durch Rühren und Lockerung des sehr festen Polymer-Ballotini-Kuchens zu einer sehr inhomogenen Schicht, deren Qualität mittels einer apparativen Kombination aus Licht- und Elektronenmikroskopie überprüft wurde. In Abbildung 4-1 sind sowohl die Höhen- als auch die Dimensionsunterschiede von der UHPS-Beschichtung sowie des freien UHPS sehr genau erkennbar. Die UHPS-Schicht weist sehr starke Inhomogenitäten sowie Ablösungen von der Glasoberfläche auf. Erkennbar werden diese zum einen durch die Höhenunterschiede im topographischen Modus (Abbildung 4-1a) und zum anderen durch den gut sichtbaren Materialkontrast von Glas und UHPS im Kompositionsmodus (Abbildung 4-1b). Außerdem waren große Agglomerate bzw. eine große Breite von verschiedenen Partikelgrößen erkennbar. Aus

diesem Grund wurde die mittlere Ballotinigröße der reinen Glaskügelchen anschließend mit verschiedenen Sieben (Porengrößen zwischen 100 und 150 μm) eingengt.

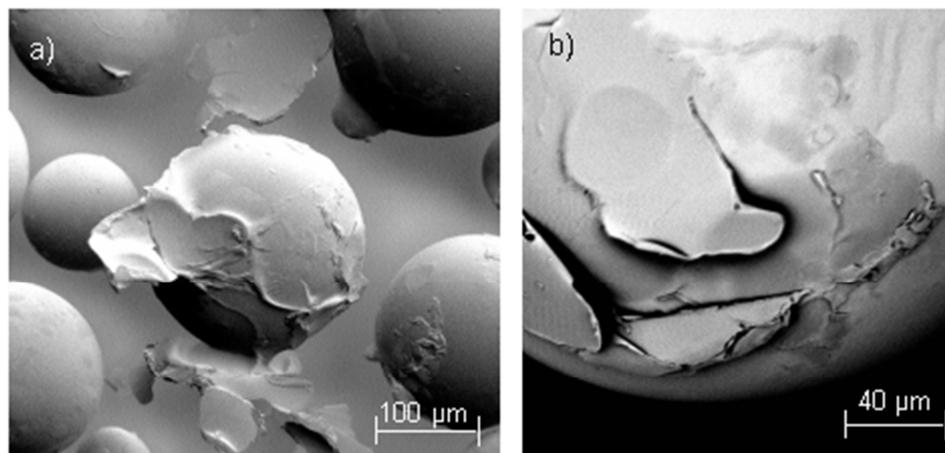


Abbildung 4-1: Aufnahmen von minderwertig beschichteten Ballotini, aufgenommen mit einer Kombination aus Licht- und Elektronenmikroskop im a) Topographie- und b) Kompositionsmodus

Weiterhin wurde der Beschichtungsprozess optimiert, indem eine konzentrierte UHPS-THF-Lösung bei Raumtemperatur auf die fraktionierten Ballotini gegeben wurde. Durch sorgfältiges, vorsichtiges Abdampfen des THF und anschließendem, sukzessivem Wechsel von schwachem Lösungsmittel (Methanol) und gutem Lösungsmittel bzw. deren Abdampfen, war es möglich, ohne mechanische Einwirkungen ein lockeres Gemisch aus einzelnen Kügelchen zu erhalten (siehe Kapitel 6.2). In der anschließenden Überprüfung der Beschichtungsqualität mittels kombinierter Licht- und Elektronenmikroskopie (siehe Abbildung 4-2) konnte eine deutlich verbesserte, gleichmäßigere Beschichtung ohne das Auftreten von Agglomeraten festgestellt werden. Verglichen zu der glatten, kontrastlosen Oberfläche des reinen Glaskügelchens (Abbildung 4-2a) weist das beschichtete Kügelchen (Abbildung 4-2b) eine deutlich gleichmäßigere Oberflächenstruktur auf. Hierbei sind klare Materialkontraste und im Vergleich zu den schlecht beschichteten Kügelchen eine deutlich homogenere Schicht sichtbar. Jedoch wird deutlich, dass die UHPS-Schicht Unterschiede in ihrer Stärke aufweist.

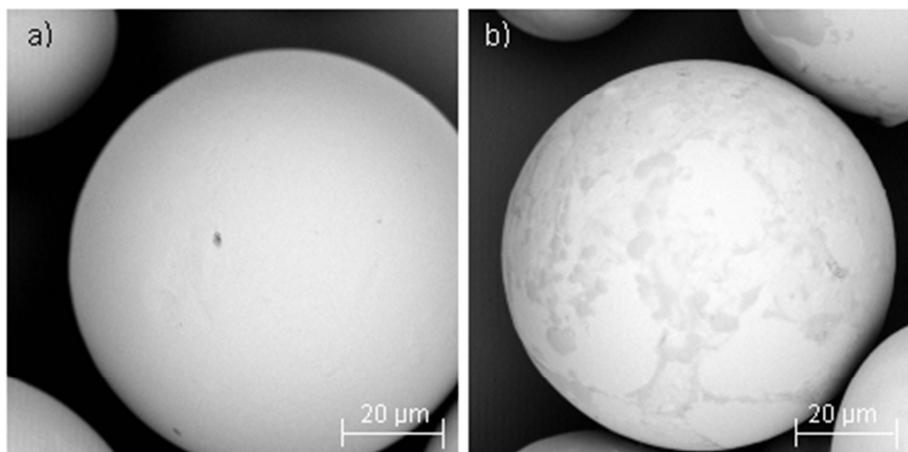


Abbildung 4-2: Aufnahmen von a) reinen und b) beschichteten Ballotini aufgenommen mit einer Kombination aus Licht- und Elektronenmikroskopie im Kompositionsmodus

Zur Quantifizierung des UHPS-Gehalts auf der Oberfläche wurden verschiedene gravimetrische Methoden angewandt. Zum einen wurde dazu die Menge an löslichen Bestandteilen des UHPS bestimmt, die im Anschluss an die Beschichtung durch Spülen mit CH bei 28 °C entfernt wurde. Diese wurde anschließend von der eingesetzten Gesamtmenge an UHPS abgezogen. Außerdem wurden die Werte mittels exakter, quantitativer Bestimmung durch thermogravimetrische (TGA) Untersuchungen der beschichteten Ballotini (siehe Abbildung 4-3) verglichen. Hierbei wurden verschiedene Beschichtungsmengen untersucht, um die optimalen Beschichtungsbedingungen zu bestimmen. Dazu wurden die beschichteten Ballotini mit gleichmäßiger Heizrate auf über 500 °C erhitzt und anschließend der Masseverlust, welcher den Anteil an UHPS darstellt, ermittelt.

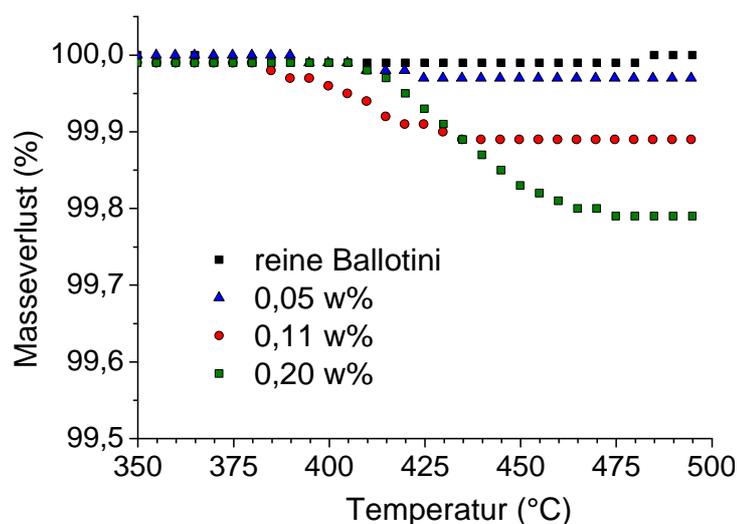


Abbildung 4-3: Masseverlust in Abhängigkeit zur Temperatur der reinen sowie beschichteten Ballotini mit variiertem UHPS-Gehalt bestimmt mittels TGA

Wie erwartet zeigen die unbeschichteten Ballotini keinen Masseverlust im Laufe des TGA-Experiments, während die anderen Proben je nach UHPS-Menge beginnend ab einer Temperatur von etwa 380 °C einen unterschiedlich starken Abfall aufweisen. Die Quantifizierung in Form einer Dreifachbestimmung der UHPS-Beschichtung war reproduzierbar und lieferte sehr genaue Werte, welche gut korreliert werden konnten. In Tabelle 4-1 sind die theoretisch berechneten, gravimetrisch bzw. thermogravimetrisch bestimmten Werte zum Vergleich aufgelistet.

Tabelle 4-1: Ergebnisse der quantitativen Bestimmung des UHPS-Beschichtungsgehalts auf der Ballotinioberfläche

Nr. des Coatings	w% (theoretisch) ¹	w% (gravimetrisch) ²	w% (TGA)
1	0,11	0,05	0,05
2	0,14	0,10	0,11
3	0,25	0,21	0,20

¹ berechnet über Verhältnis von Gesamtmenge Ballotini und Ausgangsmenge UHPS

² berechnet über Verhältnis von Gesamtmasse Ballotini und Mengendifferenz von Ausgangsmenge und Masseverlust durch Spülschritt (mittels Präzisionswaage)

Die große Abweichung zwischen den theoretischen und experimentell bestimmten Werten beruht auf dem schon erwähnten, ausgespülten Anteil an löslichen UHPS-Bestandteilen. Im Fall von Beschichtung Nr. 2 und 3 liegt diese Abweichung bei etwa 20 %. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die in früheren Untersuchungen erhalten wurden.²⁰⁹ Das führt zu der Annahme, dass etwa 20 % des UHPS unterhalb von 28 °C löslich sind. GPC-Messungen des ausgespülten UHPS-Anteils können aufgrund der sehr hohen Molmasse, welche oberhalb der Trennschwelle der Säule liegt, nicht zur genauen Bestimmungen herangezogen werden. Deswegen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die ausgespülten Anteile eine geringere Molmasse aufweisen als der Anteil der verbleibenden UHPS-Beschichtung. Durch die geringere Kettenlänge würde auch eine verbesserte Löslichkeit zustande kommen, welche das Herauslösen dieser Bestandteile erklären könnte. Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen zeigten, dass die gravimetrische und thermogravimetrische Bestimmung in sehr guter Übereinstimmung liegen und somit beide Methoden für die Quantifizierung des Polymergehaltes in der Beschichtung geeignet sind. Weiterhin wird deutlich, dass ein UHPS-Gehalt geringer als 0,1 w% aufgrund des zu hohen experimentellen Fehlers bei der Charakterisierung ungeeignet ist. Als Beschichtungsmenge für die weiteren Experimente wurde eine tatsächliche

Konzentration nach dem Spülvorgang von 0,1 w% UHPS auf den Ballotini verwendet. Da sich diese Arbeit mit der Methodenentwicklung beschäftigt, wurde auf eine Variation des UHPS-Gehalts und die Überprüfung des Einflusses in den folgenden Versuchen verzichtet. Diese sollen jedoch Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

In der Literatur sind für die UHPS-Schichtdicke nur Angaben von theoretischen Berechnungen zu finden.²⁰⁴ Da diese Werte jedoch auf einer homogenen, hypothetischen Verteilung des UHPS auf der Ballotinioberfläche beruhen, und in den mikroskopischen Untersuchungen (siehe Abbildung 4-2) festgestellt wurde, dass die Schichtdicke auf den Kügelchen variiert, war es notwendig diese theoretischen Werte experimentell zu überprüfen. Eine Bestimmung mittels Raman-Spektroskopie blieb leider erfolglos, da hier Schichtdicken von mindestens 200 nm für eine akkurate Bestimmung notwendig sind. Ellipsometrische und Rasterkraftmikroskopische (AFM) Untersuchungen gestalten sich aufgrund der gewölbten Oberflächen und fehlender Modelle ebenfalls schwierig. Aus diesem Grund wurde die für die Schichtdickenbestimmung eher unübliche Methodenkombination aus fokussiertem Ionenstrahl (FIB) und Rasterelektronenmikroskop (REM) angewandt. Mittels dieser Methode wurde durch einen Schnitt mit einer Länge von etwa 30 μm und einer Tiefe von einigen μm auf der Oberfläche des beschichteten Glaskügelchens die Oberfläche abgetragen. Mittels REM konnten anschließend die Phasengrenzen sichtbar gemacht bzw. deren Dicken bestimmt werden (siehe Abbildung 4-4).

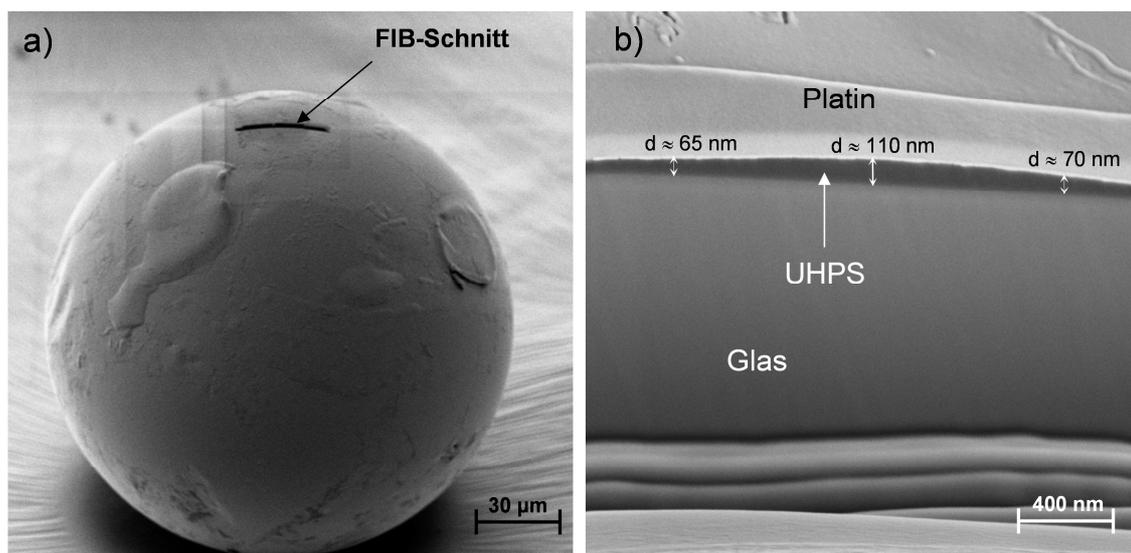


Abbildung 4-4: REM-Aufnahmen von a) dem FIB-Schnitt und b) der UHPS-Schicht zwischen Glasoberfläche und Pt-Schicht zur Schichtdickenbestimmung

Um die UHPS-Oberfläche während des FIB-Schnitts zu schützen und die Probenaufladung während der Bildaufnahme mittels REM zu minimieren, wurde eine Platinschicht auf das UHPS aufgesputtert. Durch das Schrägstellen der Probe wurden in der Queransicht des Schnitts die einzelnen Materialien sichtbar und eindeutig differenzierbar. Die UHPS-Schicht (dunkelgrau) liegt zwischen der Platin-(Pt)-Schicht (hellgrau) und der Glasoberfläche. Messungen an verschiedenen Stellen zeigten, dass die Schichtdicke von 80 bis 150 nm variiert. Der durchschnittliche, experimentelle Wert liegt somit etwas oberhalb der theoretisch berechneten Schichtdicke von 50-70 nm.²⁰⁴ Außerdem konnte mit Hilfe der REM-Aufnahmen nachgewiesen werden, dass die Glasoberfläche vollständig von der UHPS-Schicht bedeckt ist, diese jedoch unterschiedliche Schichtdicken aufweist (siehe Abbildung 4-4a). Das UHPS bildet demzufolge keine einheitlich dicke Schicht auf den Ballotini aus. Ob das einen Einfluss auf die Trennergebnisse hat, sollte in den folgenden Untersuchungen überprüft werden. Es wurden auch einige Beschichtungsversuche von anderen Trägermaterialien mit geringeren Dimensionen ($\varnothing = 25 \mu\text{m}$) unternommen. Jedoch wurden aufgrund von schwieriger Handhabbarkeit, schlechter Beschichtung bzw. Agglomerationen und mangelnder Charakterisierungsmöglichkeiten keine weiterführenden Untersuchungen in diese Richtung unternommen und die PDC-Trennversuche mit den beschichteten Ballotini durchgeführt.

Um die Stabilität UHPS-Beschichtung zu testen, wurden beschichtete Ballotini in eine Glassäule gefüllt, welche schon bei vorangegangenen präparativen Fraktionierungen von Polymeren zum Einsatz kam.^{93, 162, 210} Im Anschluss dazu wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen bei einer Temperatur von 27 °C Fraktionen gesammelt (Flussrate 0,15 ml/h), um zu überprüfen, ob hochmolekulare Anteile trotz des Spülschritts im Anschluss an die Beschichtung herausgespült werden. Die erhaltenen Fraktionen wurden getrocknet und mittels SEC (SEC-System 1, siehe Kapitel 6.2) auf hochmolekulare Anteile untersucht. Bei der Messung aller Fraktionen zeigten sich keinerlei Hinweise auf freies UHPS. Auch während der anschließenden Auftrennung eines PS ($M_w = 123.000 \text{ g/mol}$) konnte in den Fraktionen kein UHPS nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4-5). Es sind nur die Detektorsignale des linearen PS erkennbar. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Schicht auf den Ballotini nach dem Beschichtungs- und anschließendem Spülschritt stabil ist und nichts mehr ausgespült wird bzw. mit den zu trennenden PS-Proben eluiert.

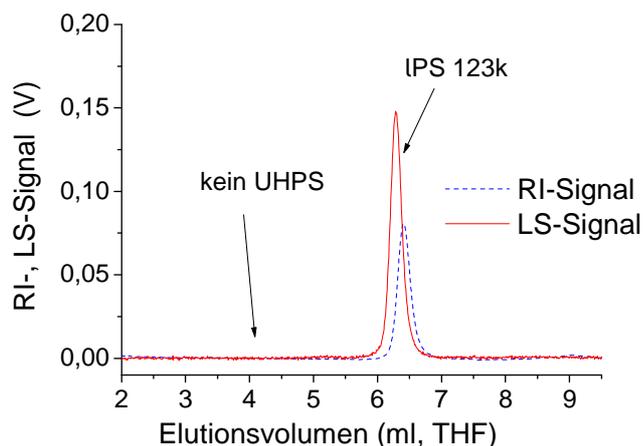


Abbildung 4-5: RI- und LS-Signal in Abhängigkeit des Elutionsvolumens einer Fraktion von IPS 123k in THF bestimmt mittels SEC-LS (SEC-System 1)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Optimierung der erläuterten Beschichtungsmethode der Ballotini mit UHPS erfolgreich verlaufen ist und die Kombination aus qualitativer Beurteilung der Beschichtung mittels Mikroskopie und quantitativer Untersuchung mittels gravimetrischer Methoden eine umfassende Charakterisierung der stationären Phase für die PDC ermöglicht.

4.2.2 Ergebnisse der manuellen PDC-Fraktionierung

Nach der Optimierung der Ballotinibeschichtung als stationäre Phase wurden erste Vorversuche zur Trennung von Mischungen aus Polystyrenproben mit unterschiedlichen Molmassen und Verzweigungstopologien durchgeführt.

Zur Überprüfung der Trenneffizienz wurden die ersten Fraktionierungen mit der im Kapitel 4.2.1 erwähnten Glassäule durchgeführt. Cyclohexan wurde als Eluent bzw. Lösungsmittel verwendet. Die gesammelten Fraktionen wurden mit SEC-LS (SEC-System 1, siehe Kapitel 6.2) untersucht. Bei der ersten Trennung wurde ein Versuch von Casper und Schulz²⁰⁰ wiederholt, bei dem eine 2:3 Mischung, bestehend aus zwei linearen PS-Proben mit unterschiedlichen Molmassen ($M_w = 123.000$ und 354.000 g/mol), fraktioniert wurde. Nach dem Auffangen und Trocknen der Fraktionen wurde die jeweilige Ausbeute gravimetrisch bestimmt. Durch anschließende SEC-Messungen wurde die prozentuale Zusammensetzung jeder Fraktion bestimmt. Um die Frage zu klären, ob das UHPS als stationäre Phase tatsächlich Einfluss auf die Trennung hat, oder ob die Trennung durch andere Kräfte wie Verdünnungseffekte aufgrund der sehr geringen Flussrate hervorgerufen wird, wurde das entsprechende Experiment mit unbeschichteten Ballotini wiederholt (siehe Abbildung 4-6).

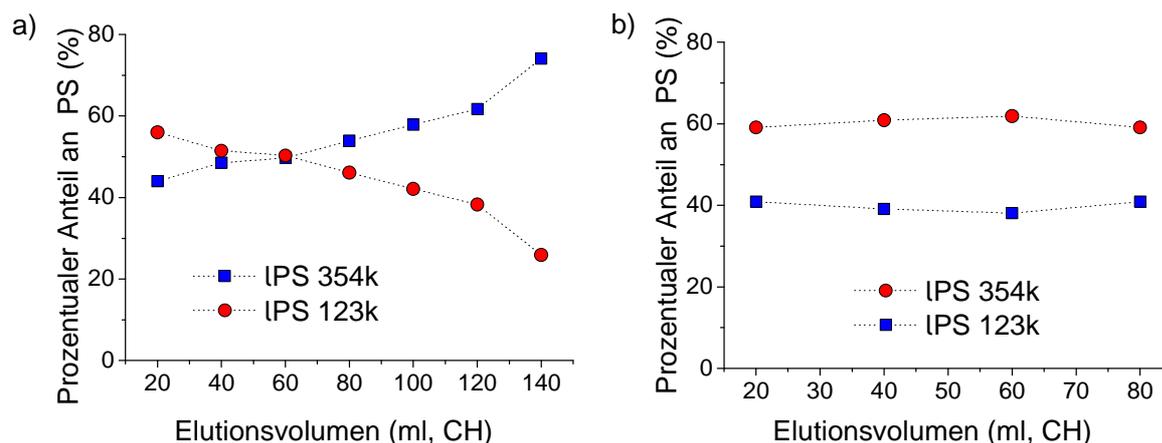


Abbildung 4-6: Prozentualer Anteil von IPS 123k und IPS 354k in Abhängigkeit des Elutionsvolumens bei manueller PDC-Fraktionierung mit a) UHPS-beschichteten und b) unbeschichteten Ballotini bei 25 °C

Die PDC-Vorversuche bestätigten die Annahme, dass die stationäre Phase einen großen Einfluss auf die Trennung hat. Bei der Fraktionierung mit den unbeschichteten Ballotini (Abbildung 4-6b) zeigte sich kein Trenneffekt. Jede Fraktion weist die identische Zusammensetzung der Ausgangsmischung auf. Bei Verwendung von UHPS als stationäre Phase ist dagegen eine Separation erkennbar. Bei geringeren Elutionsvolumina überwiegt der Anteil an der Komponente mit der geringeren Molmasse. Mit zunehmendem Elutionsvolumen steigt der Anteil des höhermolekularen PS in der Mischung an. Demzufolge findet die erwartete Auftrennung hinsichtlich der Molmasse statt. Zuerst eluieren die kürzeren Polymerketten, deren Löslichkeit in CH besser ist, während mit zunehmender Kettenlänge sich die Löslichkeit verschlechtert. Durch die Erhöhung des Verteilungskoeffizienten nimmt im Gegensatz dazu die Verteilung und Verweildauer der Polymere innerhalb der stationären Phase zu bzw. die Elutionszeiten erhöhen sich, wie in den Prinzipien der PDC beschrieben.²⁰⁰ Der nächste Schritt bestand nun daraus, auszutesten, inwiefern eine Trennung nach topologischen Gesichtspunkten mit der PDC möglich ist. Hierzu wurde eine Mischung aus einem sternförmigen (sPS 336k, 3-armig) und linearem PS (IPS 354k) mit gleichen hydrodynamischen Radien bzw. gleichen Molmassen in die Säule injiziert. Im Anschluss an die Separation trat bei der Charakterisierung der Fraktionen mittels SEC das bekannte Problem der Co-Elution von linearem und verzweigtem PS auf, so dass keine Unterscheidung der beiden Komponenten zur Bestimmung der prozentualen Anteile aus dem Chromatogramm möglich war. Um dieses Detektionsproblem zu vermeiden, wurde ein mit einer Fluorescein-Gruppe markiertes, lineares PS (IPS_{fl}) verwendet. Mittels UV-Vis-Spektroskopie wurde das Absorptionsmaximum ($\lambda = 456 \text{ nm}$) bestimmt bzw. mit einer Verdünnungsreihe eine Kalibrierung zur quantitativen Bestimmung

erstellt. Mit folgender Gleichung 4-3 ist es möglich, über die Absorption den Gehalt an markiertem, linearem PS in einer Mischung zu berechnen:

$$\text{Konzentration (IPS)} = (\text{Absorption} + 0,0108)/0,397 \quad \text{Gleichung 4-3}$$

Leider führt die Modifizierung des Polymers zu einer Veränderung des Lösungsverhaltens, da es unterhalb von 32 °C nicht löslich ist. Aus diesem Grund wurde die PDC-Fraktionierung mit einer 1:1 Mischung von dem markierten IPS_{fl} und dem sPS 336k bei 32 °C durchgeführt. Die Fraktionen wurden gesammelt, getrocknet, es wurde gravimetrisch die Masse bestimmt und anschließend mittels UV-Vis Spektroskopie untersucht. Dieser Vorversuch gab erste Hinweise darauf, dass es mit der PDC möglich ist, verzweigtes von linearem Polystyren zu separieren. Die Abhängigkeit der Fraktionszusammensetzung von dem Elutionsvolumen zeigt eindeutig, dass während niedriger Elutionsvolumina der Anteil an dem sternförmigen Polystyren überwiegt, während dieser dann im Laufe der Fraktionierung abnimmt und der Gehalt des linearen PS ansteigt (siehe Abbildung 4-7).

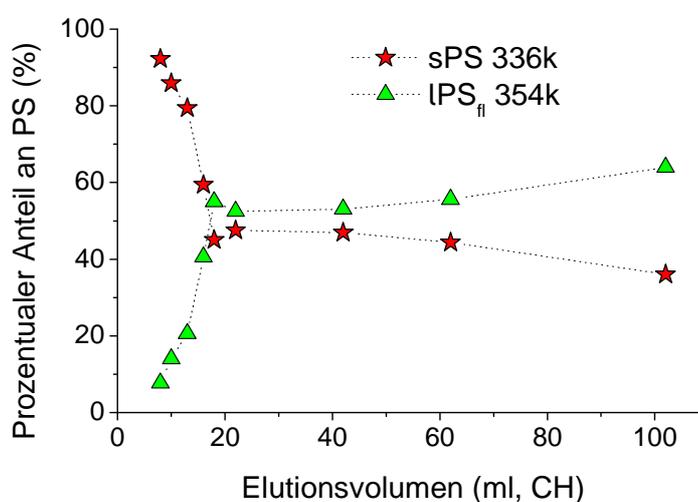


Abbildung 4-7: Prozentualer Anteil von sPS 336k und IPS_{fl} 354k (mit Fluoresceinmarkierung) in Abhängigkeit des Elutionsvolumens bestimmt mittels manueller PDC-Fraktionierung bei 32 °C

Die ermittelten Kurven zeigen einen eindeutigen Trend. Das Elutionsverhalten ist augenscheinlich abhängig von der Topologie, da die beiden PS-Proben zwar gleiche hydrodynamische Dimensionen, aber unterschiedlichen Verzweigungscharaktere aufweisen. Jedoch kann in diesem Fall nicht vollständig geklärt werden, ob die Trennung nach PDC-Trennprinzipien abläuft, oder ob die veränderte Löslichkeit des linearen PS aufgrund der Markierung das Ergebnis beeinflusst. Aus diesem Grund ist

für weitere Untersuchungen eine technische Optimierung der Messapparatur notwendig.

4.2.3 Thermodynamische Untersuchung von Polystyren

Im letzten Schritt der Vorversuche galt es zu klären, ob Unterschiede in den thermodynamischen Eigenschaften als Voraussetzung für eine PDC-Auftrennung in Abhängigkeit des Verzweigungscharakters vorhanden sind. Unterschiede im thermodynamischen Verhalten stehen bekanntermaßen in Beziehung mit strukturellen Parametern, wie z. B. Verzweigungen.²¹¹ Das Phänomen der Inkompatibilität in Hinblick auf die Mischbarkeit von linearen und verzweigten Polymeren wurde in einigen Untersuchungen verschiedener Polymersysteme beobachtet.^{212, 213} Der Einfluss von Verzweigungen auf die kritischen Bedingungen hängt stark von den θ -Bedingungen des spezifischen Polymer-Lösungsmittelsystems ab. Hierzu gibt es experimentelle²¹⁴ und theoretische²¹⁵⁻²¹⁸ Betrachtungen, die unterschiedliche Werte für lineare und verzweigte Polymere lieferten. Es existieren zahlreiche Studien über die Bestimmung von Trübungskurven von dem PS/CH System,^{203, 219-223} wobei hier in den meisten Fällen Änderungen des kritischen Zustands mit zunehmender Verzweigung beobachtet wurden.

Um die thermodynamischen Voraussetzungen für die PDC-Trennungen zu überprüfen, wurden von den schon erwähnten linearen und sternförmigen PS mit gleichen hydrodynamischen Radien die Trübungspunkte in CH sowie die entsprechenden Trübungskurven experimentell bestimmt. Mit diesen ist es möglich, die kritischen Punkte für den Übergang vom Lösungszustand in den festen Zustand bei verschiedenen Konzentrationen zu ermitteln.

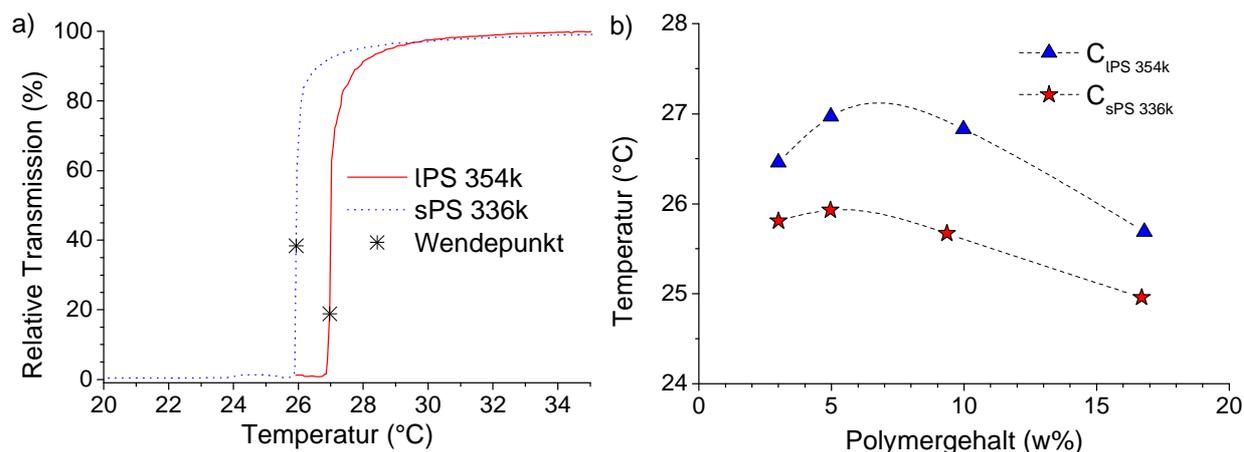


Abbildung 4-8: Bestimmung a) der Trübungspunkte (jeweils 5 w% PS): relative Transmission der Lösung in Abhängigkeit der Temperatur und b) die Trübungskurven (Abhängigkeit der Trübungstemperatur vom Polymergehalt in der Lösung) mit den kritischen Bedingungen von LPS 354k und sPS 336k

In Abbildung 4-8a sind die Kurven zur Bestimmung der Trübungspunkte des linearen und sternförmigen PS bei gleicher Konzentration (5 w%) dargestellt. Die Wendepunkte dieser Kurven, welche über die zweite Ableitung bestimmt wurden, bilden die einzelnen Trübungspunkte zur Bestimmung der kritischen Bedingungen (siehe Abbildung 4-8b). Die Maxima der Trübungskurve definieren die kritischen Punkte bzw. Zustände. Der Unterschied zwischen dem linearen und dem sternförmigen PS ist eindeutig. Während das lineare PS schon bei höheren Temperaturen einen Phasenübergang vom Lösungs- in den festen Zustand zeigt, ist das sternförmige PS deutlich besser löslich und fällt erst bei niedrigeren Temperaturen aus. Demzufolge liegt im speziellen Fall dieser beiden Proben ein Bereich vor, in dem nur die sternförmige Komponente löslich ist, während die lineare Komponente schon ausgefallen ist. Diese Ergebnisse und die Resultate aus den erwähnten, vorangegangenen Studien beweisen, dass in Abhängigkeit der Verzweigungsstruktur eine veränderte Löslichkeit vorhanden ist und dass im direkten Vergleich von linearem und sternförmigem PS in CH, die verzweigte Komponente eine bessere Löslichkeit aufweist. Somit ist für die PDC-Separation eine wichtige Voraussetzung experimentell nachgewiesen worden. Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Optimierung der apparativen Ausrüstung sowie der Durchführung verschiedenster PDC-Trennversuche.

4.2.4 Auftrennung von linearem und sternförmigem Polystyren

Bei der technischen Methodenadaptation der PDC standen die Vereinfachung der Durchführung des Trennungsprozesses und die Optimierung der Trennergebnisse im Vordergrund. Um die zeitaufwendige Methode der manuellen Fraktionierung zu vermeiden, wurde ein modular aufgebautes PDC-Trennsystem appliziert (Beschreibung siehe Kapitel 6.2). Es wurden verschiedene Säulentypen (siehe Tabelle 4-2 sowie Tabelle 6-2) getestet und die Ergebnisse sind im folgenden Teil erläutert und diskutiert.

Tabelle 4-2: Übersicht der verwendeten Säulentypen für PDC-Untersuchungen

Säulentyp	Säulenmaterial	Porengröße (nm)	Partikelgröße (μm)
1	Ballotini	-	130
2	Makroporöses PS-Harz	Makroporen: 4000	10
3	Organosilan-Liganden (C18) mit doppelter Endgruppenmodifizierung	8	5

Für die ersten Messungen wurde eine leere SEC-Säule mit den, in Kapitel 4.2.1 beschriebenen, UHPS-Ballotini manuell, bei Unterdruck und bei mehrmaliger Rotation²⁰⁹ so dicht wie möglich gepackt (Säulentyp 1, Tabelle 4-2 und Kapitel 6.2). Anschließend wurden verschiedene lineare und sternförmige Polystyrenstandards injiziert und die erhaltenen Elutionszeiten miteinander verglichen (siehe Abbildung 4-9).

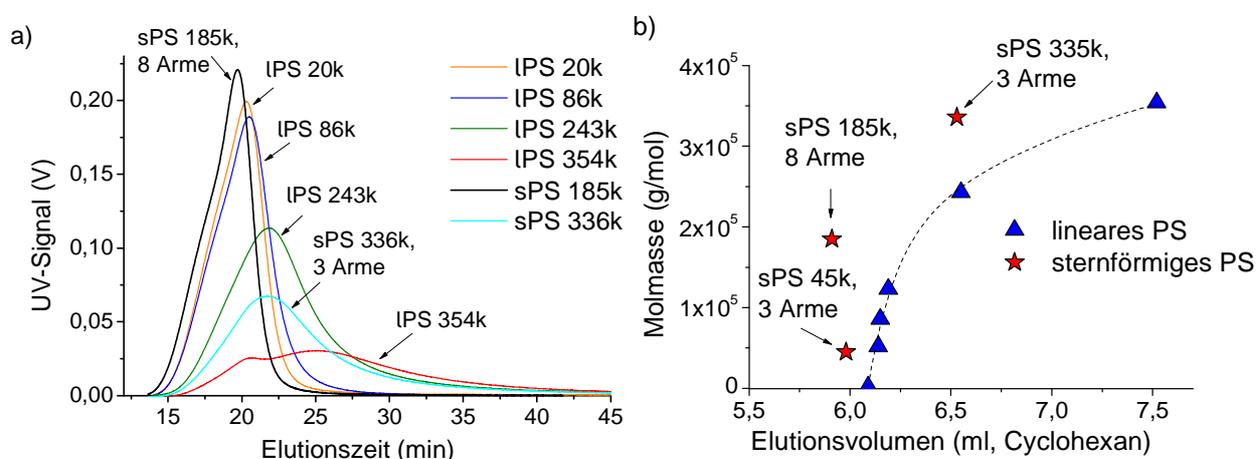


Abbildung 4-9: a) UV-Signale in Abhängigkeit der Elutionszeit und b) Vergleich der Elutionsvolumina in Abhängigkeit der hydrodynamischen Durchmesser von verschiedenen linearen und sternförmigen PS-Standards bei 24 °C (PDC-Säulentyp 1)

Eine Auswertung des RI-Signals war aufgrund der geringen Brechungsindexunterschiede zwischen reinem Cyclohexan und der PS-CH-Lösungen nicht möglich. Aus diesem Grund sind bei den folgenden Messungen die Elutionskurven in Form von UV-Signalen dargestellt. Die Ergebnisse der Doppelbestimmung aller Proben lieferten eine sehr gute Reproduzierbarkeit. In Abbildung 4-9a sind die Elutionskurven von linearen PS-Standards mit verschiedenen Molmassen sowie zwei zusätzlichen verzweigten PS-Proben dargestellt. Unterschiede in dem Elutionsverhalten werden hier schnell deutlich. Wie erwartet, ist bei linearem PS ein Trend zur Auftrennung nach Molmasse erkennbar. Je höher die Molmassen desto länger ist die Verweilzeit innerhalb der Säule und demzufolge erhöht sich die Elutionszeit bzw. das Elutionsvolumen. Werden nun die Elutionszeiten der sternförmigen Proben mit hinzugezogen, wird deutlich, dass bei vergleichbaren Molmassen kürzere Elutionszeiten resultieren. In Abbildung 4-9b ist diese Tendenz verdeutlicht dargestellt. Die Auftrennung hinsichtlich der Molmasse bei den linearen Proben ist eindeutig zu erkennen, während die verzweigten Proben ein anderes Separationsverhalten aufweisen. Nun stellt sich die Frage, was die Trennung beeinflusst bzw. was die Gründe für diese geringeren Elutionsvolumina sind: die Molmasse der Arme, der hydrodynamische Durchmesser oder ein verändertes thermodynamisches Verhalten hervorgerufen durch die Verzweigungstopologie? Um den Effekt der Verzweigung von den Moleküldimensionen zu extrahieren, ist es von Vorteil einen Stern mit 2 Armen mit der jeweiligen Armlänge der verwendeten Sterne anzunehmen und diesen mit den linearen PS-Proben zu vergleichen. Diese Annahme soll die Betrachtung vereinfachen, indem die längste durchgehende lineare Kette mit den tatsächlich linearen Molekülen verglichen wird, ohne dass die Verzweigung eine Rolle spielt. In diesem Fall wäre 30.000 g/mol die Molmasse für den 3-armigen Stern (sPS 45k) und 45.000 g/mol für den 8-armigen Stern (sPS 185k). Werden nun die Elutionsvolumina dieser „pseudo-linearen“ mit den tatsächlich linearen Polymeren verglichen, wird deutlich, dass mit zunehmender Funktionalität die Verweilzeit in der Trennsäule abnimmt und die Moleküle dementsprechend eher eluieren. Bei dieser Betrachtung fällt weiterhin auf, dass mit zunehmender Armlänge der Einfluss der Verzweigung nachlässt, da das Elutionsvolumen des 3-armigen Sterns dem des linearen ähnelt. Der Vergleich des „pseudo-linearen“ 2-armigen Sterns mit einer Molmasse von 220.000 g/mol (sPS 336k) mit dem linearen PS (lPS 243k) deutet darauf hin, dass die Verweildauer innerhalb der Säule die gleiche ist und die beiden zum gleichen Zeitpunkt eluieren.

Messungen der verschiedenen Polystyrenstandards mittels Dynamischer Lichtstreuung wurden durchgeführt, um den Einfluss der hydrodynamischen Durchmesser auf die Elution zu überprüfen (siehe Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: DLS-Ergebnisse der verschiedenen Polystyrenstandards

PS- Standards	lPS 20k	lPS 52k	lPS 86k	lPS 123k	lPS 243k	lPS 354k	sPS 45k (3 Arme)	sPS 336k (3 Arme)	sPS 185k (8 Arme)
D_h [nm]	6,6	10,5	13,4	15,9	22,2	26,5	9,4	27,6	16,6

Da die Trennung bei der SEC hinsichtlich des hydrodynamischen Volumens stattfindet, bietet sich in diesem Fall der Vergleich der Elutionsvolumina mit den ermittelten hydrodynamischen Durchmessern an (Abbildung 4-10).

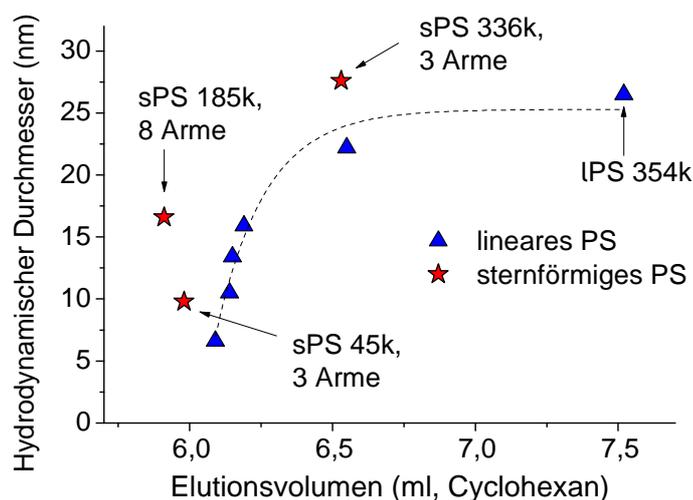


Abbildung 4-10: Elutionsvolumina in Abhängigkeit der hydrodynamischen Durchmesser von verschiedenen PS-Standards (bestimmt mit DLS) (PDC-Säulentyp 1)

Auch diese Abbildung stützt die Tatsache, dass mit steigendem Elutionsvolumen die linearen PS-Proben hinsichtlich ihrer molekularen Dimension wie z. B. Molmasse aufgetrennt werden. Die Tendenz zur Elution entsprechend des Verzweigungscharakters wird in diesem Fall (siehe Abbildung 4-10) noch deutlicher. Während in der SEC sternförmige und lineare Proben mit den gleichen hydrodynamischen Volumina zur gleichen Zeit eluieren würden, vorausgesetzt enthalpische Effekte können ausgeschlossen werden, sieht das Elutionsverhalten der Proben bei der PDC unterschiedlich aus. Denn im Gegensatz zur SEC ist es mit der PDC möglich, sternförmige und lineare PS-Proben mit vergleichbarer molekularer Dimension zu separieren. Die Gründe dafür können in dem unterschiedlichen thermodynamischen Verhalten gefunden werden.

Während das lineare PS dazu tendiert, sich in der stationären UHPS-Phase zu verteilen und dort länger zu verweilen, ist das sternförmige PS aufgrund besserer Löslichkeit bestrebt, sich bevorzugt in der mobilen (CH) Phase aufzuhalten und wird somit schneller eluiert. Dieses Verhalten drückt sich in einem im Vergleich zum linearen PS geringen Distributionskoeffizienten für das sternförmige PS aus.

Ein weiterer Effekt ist, dass mit zunehmender Molmasse die Breite der Elutionskurve zunimmt. Dieses Phänomen wird besonders deutlich im Chromatogramm von IPS 243k mit einem Elutionsbereich, welcher sich über einen Zeitraum von mehr als 20 min erstreckt (siehe Abbildung 4-9a). Noch ausgeprägter ist dieses Verhalten bei IPS 354k, bei dem die Elution mit 30 min noch länger ist. Auf der einen Seite ist die Messtemperatur von 24 °C schon sehr nah an den kritischen Bedingungen (siehe Abbildung 4-8b), wo PS Phasenübergangsbereiche vom Lösungszustand bis hin zum festen Zustand aufweist. Diese sind jedoch auch von der Molmasse abhängig. Die Abhängigkeit des Distributionskoeffizienten $K(DP)$ von der Molmasse ist exponentiell. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass eine Probe mit einer hohen Molmasse und großer Dispersität eine große Signalbreite aufweist. Da jedoch in diesen Versuchen engverteilte PS-Standards verwendet wurden, liegt die Vermutung nahe, dass der Grund für die breiten Signale bei der Packungsdichte der mit UHPS beschichteten Glaskügelchen liegt. Diese besitzen mit ca. 130 µm einen sehr großen Durchmesser weswegen bei unzureichend dichter Säulenpackung größere Zwischenräume entstehen, wodurch das Totvolumen der Säule erheblich erhöht wird. In diesem Fall spielen Effekte wie Rückvermischung durch Diffusion oder Signalverbreiterung eine große Rolle und beeinflussen die Trennschärfe negativ.²²⁴ Um die Separation zu verbessern bzw. die Trenneffizienz zu steigern, ist daher erforderlich, das Totvolumen der Säule deutlich zu verringern. Aus diesem Grund wurde eine andere PDC-Säule verwendet, die auf der Modifizierung einer kommerziell erhältlichen, gepackten Säule beruht (*Säulentyp 2*, siehe Experimententeil 6.2).

Für die ersten Untersuchungen wurde eine SEC-Säule mit einem Packungsmaterial aus makroporösem, vernetztem PS verwendet (*Säulentyp 2*, Tabelle 4-2 und 6-2). Mit einer Partikelgröße von 10 µm kann, im Vergleich zu den Ballotini, eine deutlich bessere Packungsdichte erreicht werden. Um den Einfluss des PS-Harzes auf das Trennergebnis zu überprüfen, wurden Messungen von verschiedenen PS-Standards vor der Säulenmodifizierung durchgeführt. Diese zeigten das typische SEC-

Trennverhalten, bei welchem mit zunehmender Elutionszeit die Molmassen geringer werden (siehe Abbildung 4-11).

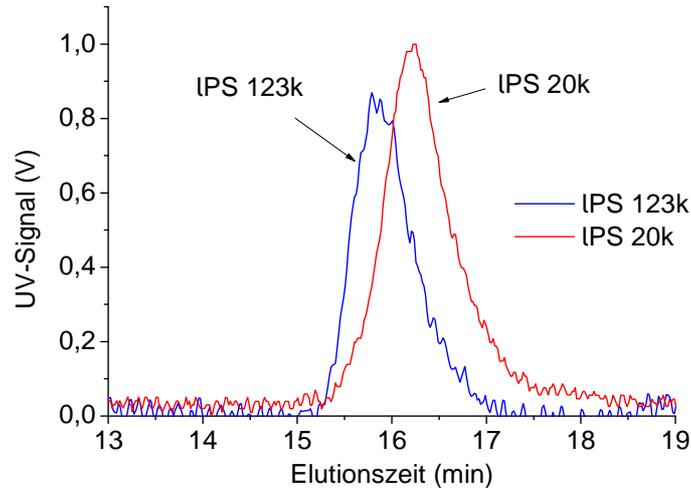


Abbildung 4-11: UV-Signal in Abhängigkeit der Elutionszeiten von IPS 20k und IPS 123k ohne PDC-Säulenmodifizierung mit UHPS (Säulentyp 2)

Im Anschluss an die Modifizierung der Säule mit UHPS wurden die Messungen wiederholt. Hierbei zeigte sich ein komplett anderes Elutionsverhalten im Vergleich zum unmodifizierten Zustand. Zum einen verringern sich die Elutionszeiten, was darauf schließen lässt, dass durch das UHPS die Poren „gefüllt“ wurden und somit eine Diffusion der Moleküle in diese verhindert wird. Zum anderen eluieren die linearen PS-Proben wie erwartet, im Gegensatz zur SEC-Trennung (siehe Abbildung 4-12) jedoch mit steigenden Molmassen bei zunehmenden Elutionszeiten.

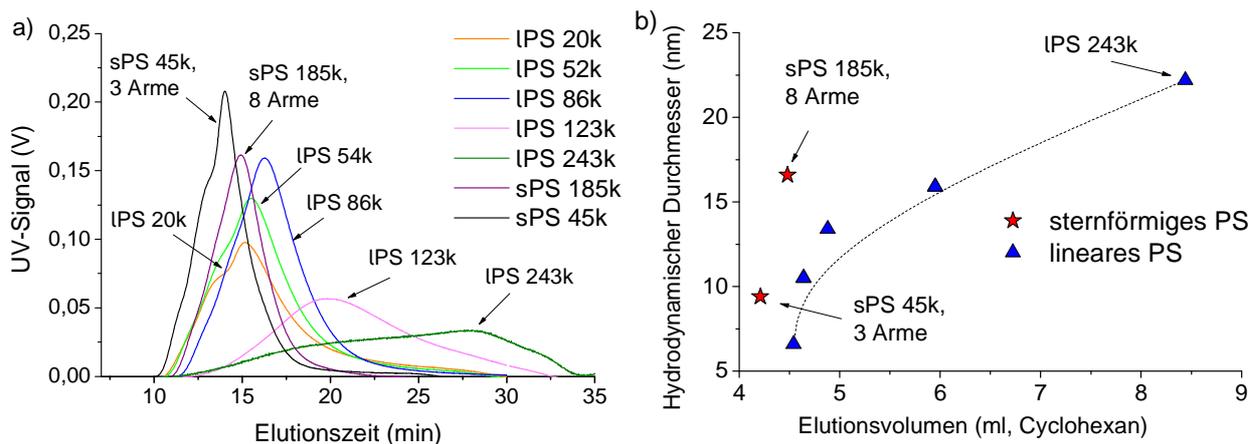


Abbildung 4-12: a) UV-Signale in Abhängigkeit der Elutionszeit und b) Vergleich der Elutionsvolumina in Abhängigkeit der hydrodynamischen Durchmesser von verschiedenen linearen und sternförmigen PS-Standards bei 24 °C (PDC-Säulentyp 2)

Die Abbildung 4-12 zeigt im Vergleich zum Säulentyp 1 eine deutlich verbesserte Auftrennung der linearen PS-Proben im Molmassenbereich zwischen 20.000 und

100.000 g/mol. Aber auch hier ist die gleiche Separationstendenz erkennbar. Auf der einen Seite erfolgte die Trennung der linearen Proben hinsichtlich der Molmasse bzw. des hydrodynamischen Durchmessers. Verglichen dazu eluieren auch hier die sternförmigen PS deutlich eher trotz vergleichbarer Dimensionen. Da bei dem *Säulentyp 2* eine Signalverbreiterung schon bei einer Molmasse von 123.000 g/mol (LPS 123k) zu beobachten ist, kann ein Einfluss des Totvolumens auf die Breite des Signals in diesem Fall ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist es, dass die Menge an UHPS innerhalb der Säule einen Einfluss auf das Trennergebnis hat. Bei den mit UHPS beschichteten Ballotini deckt die gequollene Polymerschicht nicht die kompletten Zwischenräume zwischen den einzelnen Kügelchen ab. Bei dem *Säulentyp 2* ist das Zwischenvolumen durch die geringere Partikelgröße stark verringert. Zusätzlich wird durch die Modifizierung mit dem UHPS das Totvolumen der Säule verringert und somit entsteht durch die gequollene UHPS-Schicht eine kompakte, homogenere stationäre Phase als bei dem *Säulentyp 1*. Ziel der nächsten Untersuchung sollte sein, die Messzeit deutlich zu verkürzen, ohne jedoch die Trenneffizienz zu verschlechtern. Zu diesem Zweck wurde erneut eine kommerziell erhältliche HPLC-Säule verwendet (*Säulentyp 3*, siehe Tabelle 4-2 und 6-2). Diese Säule besitzt nicht nur geringere Dimensionen, sondern gleichzeitig auch eine geringere Partikelgröße (5 µm) des Packungsmaterials (besonders dichte Organo-Silan (C18)-Verbindung mit doppelter Endgruppenmodifizierung). Ein deutlich geringeres Porenvolumen von 8 nm trägt bei dieser Säule dazu bei, dass im unmodifizierten Zustand alle Proben zur gleichen Zeit eluieren. Es kommt demnach nicht zum Größenausschluss, wie bei dem unmodifizierten *Säulentyp 2*. Da keinerlei Auftrennung stattfand, kann ein Einfluss des unmodifizierten Materials auf die Trennung ausgeschlossen werden. Die anschließende UHPS-Modifizierung wurde analog zum vorherigen *Säulentyp 2* durchgeführt.

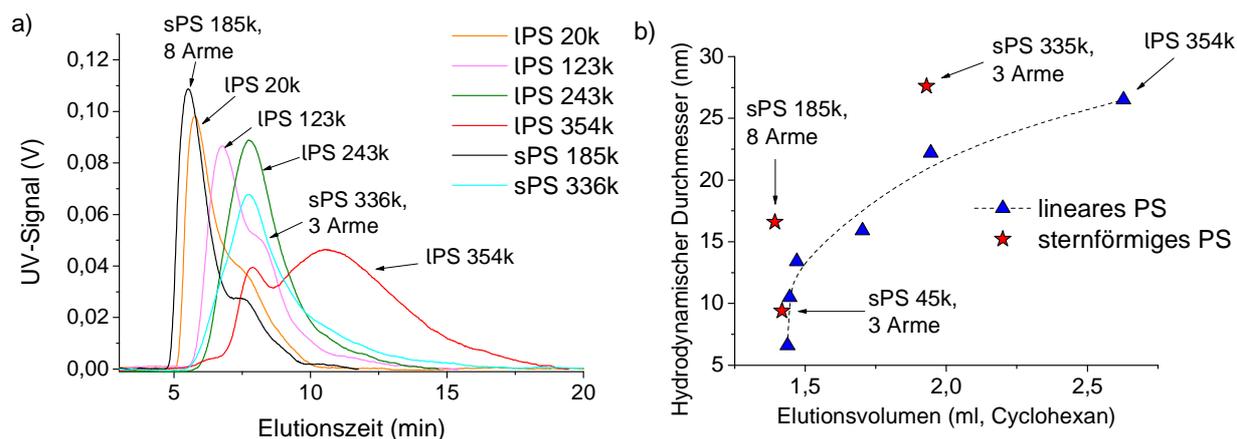


Abbildung 4-13: a) UV-Signale in Abhängigkeit der Elutionszeit und b) Vergleich der Elutionsvolumina in Abhängigkeit der hydrodynamischen Durchmesser von verschiedenen linearen und sternförmigen PS-Standards bei 24 °C (Säulentyp 3)

Die erhaltenen Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 4-13 zeigen erneut, dass eine Auftrennung hinsichtlich der Verzweigungstopologie gelungen ist. Die Separation der linearen PS-Proben findet hinsichtlich Molmasse bzw. hydrodynamischen Durchmessers statt. Wie schon bei den erläuterten anderen Säulentypen eluieren die PS-Sterne im Vergleich zu den linearen deutlich eher. Weiterhin ist augenscheinlich, dass die Proben aufgrund der geringeren Dimensionen der Säule deutlich eher eluieren als bei den Säulentypen 1 und 2, ohne jedoch an Trenneffizienz zu verlieren. Die Chromatogramme des sPS 185k sowie des LPS 354k weisen eine Bimodalität auf. Um die Gründe dafür genauer zu untersuchen, wurden jeweils zwei Fraktionen manuell unmittelbar nach dem UV-Detektor geschnitten und diese nach dem Trocknen mittels SEC-System 1 (siehe Kapitel 6.2) untersucht. Diese Messungen zeigten, dass die Molmassen des Hauptsignals in sehr guter Übereinstimmung mit den vorherigen Werten sind (siehe Tabelle 6-1). Die jeweilige Schulter ist charakterisiert durch niedermolekulare Verbindungen, welche zwar UV-aktiv sind, jedoch durch ihre sehr geringe Konzentration kein auswertbares RI-Signal lieferten. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Schultern durch marginale Anteile von Artefakten, wie z. B. nach der Synthese verbliebene, ungekoppelte Kettenenden, verursacht werden.

Bei allen Messungen fällt auf, dass mit zunehmender Molmasse die Trenneffizienz zunimmt. Da die PDC-Auftrennung durch thermodynamische Kräfte getrieben ist, wurden im nächsten Schritt Messungen durchgeführt, bei denen der Einfluss der Temperatur im Vordergrund stand. Dafür wurden Mischungen von linearen und sternförmigen PS-Standards mit vergleichbaren Molmassen und hydrodynamischen Durchmessern bei variierten Temperaturen mit dem Säulentyp 3 untersucht.

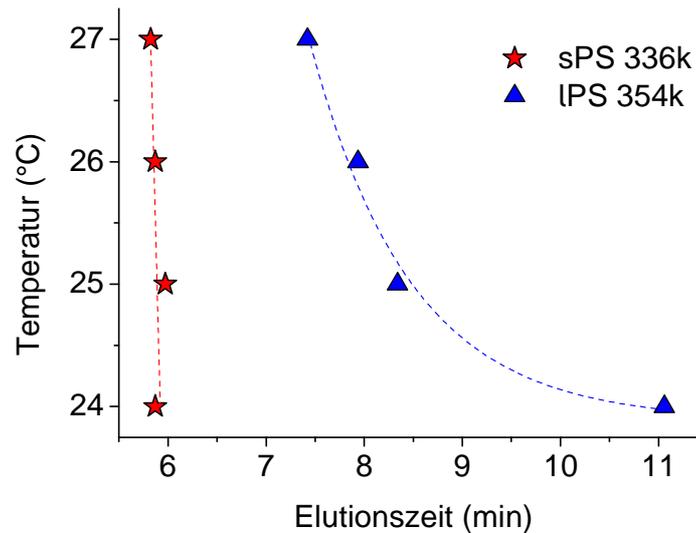


Abbildung 4-14: Elutionszeit in Abhängigkeit der Messtemperatur bei der PDC-Auftrennung von einer Mischung aus sPS 336k und IPS 354k

Abbildung 4-14 zeigt die Lage der Elutionsmaxima in Abhängigkeit der Topologie des Polystyrens und der Temperatur. Je höher die Temperatur wird, desto geringer werden die Trenneffizienz und die Trennung der Kurven der beiden PS-Proben. Je geringer die angewandte Temperatur ist, desto besser wird die Kurvenscheidung vom sternförmigen und linearen PS. Trennungen bei geringeren Temperaturen als 24 °C konnten nicht durchgeführt werden, da die Löslichkeit des IPS 354k zu gering ist. Jedoch beweist der dargestellte Temperaturbereich, dass das Elutionsverhalten ebenso stark von der Temperatur beeinflusst wird. Deutlich wird auch, dass sich die Elution des sternförmigen PS kaum verändert bzw. stabil bleibt. Das ist darauf zurückzuführen, dass eine Veränderung der Temperatur auch die Beweglichkeit der Polymersegmente beeinflusst, was ebenfalls Einfluss auf die kritischen Bedingungen hat. Im Fall der linearen Polystyrenproben haben diese Segmente bei gleichen molekularen Dimensionen einen höheren Freiheitsgrad als die der sternförmigen, bei denen kürzere Arme an einen Kern gekoppelt sind. Diese Tatsache unterstützt erneut die Annahme, dass es mittels der PDC möglich ist, Polystyrenproben hinsichtlich ihrer Topologie zu trennen.

4.3 Zusammenfassung der Phasendistributionschromatographie

Das Kapitel der Phasendistributionschromatographie sollte am Beispiel von Polystyren zeigen, dass es möglich ist, Polymere hinsichtlich ihrer Verzweigungseigenschaften aufzutrennen. Die angewandte, chromatographische Methode der PDC nutzt dabei Unterschiede in den thermodynamischen Eigenschaften, welche sowohl von der Molmasse als auch von der Topologie abhängig sind. Hierbei wird die Elution von der Verteilung der jeweiligen PS-Probe zwischen der mobilen Phase (verdünnte Lösung des zu trennenden PS in CH) und der stationären Phase (UHPS auf Glaskügelchen) beeinflusst. Im Vordergrund der Untersuchungen stand dabei die Methodenadaption zur Auftrennung von sternförmigem und linearem PS mittels der PDC. Dazu gehörte die Präparation einer qualitativ hochwertigen stationären Phase, welche die Optimierung des Beschichtungsprozesses des Trägermaterials und die Analyse der Qualität (mit Mikroskopie) sowie Quantität (mit Gravimetrie) beinhaltete. Hierbei erwies sich eine UHPS-Konzentration von 0,1 w% als am besten geeignet. Weiterhin wurde in Vorversuchen getestet, inwiefern eine Trennung hinsichtlich Molmasse und Verzweigung unter PDC-Bedingungen möglich ist. Dabei konnten erste Erfolge hinsichtlich einer Trennung nach Verzweigungscharakter bzw. Topologie auch in Abhängigkeit von der Temperatur erlangt werden. Ferner konnten in Versuchen im größeren Maßstab die Erfolge der verzweigungsabhängigen Trennung wiederholt bzw. ausgebaut werden. Eine Trennung von linearen und sternförmigen Polystyrenproben mit unterschiedlichen Armzahlen wurde erfolgreich durchgeführt. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Separation mit steigender Armzahl unabhängig vom hydrodynamischen Volumen zunimmt. Weiterhin wurden verschiedene Säulentypen auf ihre Effektivität hin untersucht. So konnte beispielsweise durch die Auswahl einer kürzeren Trennsäule (*Säulentyp 3*) die Elutionszeit verringert und trotzdem eine erfolgreiche Trennung erzielt werden, bei der es möglich war, sternförmige von linearen Polystyrenproben zu separieren. In temperaturabhängigen Messungen in einem Bereich von 24 bis 27 °C konnte eine starke Abhängigkeit der Auflösung des Auftrennungsprozesses beobachtet werden. Die thermodynamischen Voraussetzungen für das lineare und sternförmige Polystyren mit gleichen Molmassen ($M_n \approx 300.000 \text{ g/mol}$) konnten mittels Trübungskurvenmessungen bestätigt werden. Diese Experimente zeigten verschiedene kritische Bedingungen und thermodynamische Verhalten als wichtigste Voraussetzungen für die PDC.

Es liegt ein großes Potential in der Anwendung der PDC zur Auftrennung von verzweigten Polymeren. Ferner können weitere Parameter, wie z. B. die Molmasse oder die Menge des UHPS als stationäre Phase und die Größe bzw. das Material der Trägersubstanz variiert werden. Hier wäre es sehr interessant, eine untere Grenze der Molmasse des UHPS zu ermitteln, bei welcher noch eine Trennung stattfindet. Auf der anderen Seite ist es auch von Bedeutung, Kenntnis über den Einfluss der Molmasse auf das Trennergebnis zu erhalten. Eine Optimierung im Beschichtungsschritt des Trägermaterials könnte mittels Funktionalisierung der Materialoberfläche und der kovalenten Anbindung des hochmolekularen Polymers der stationären Phase erreicht werden.

Weiterhin könnten speziell synthetisierte, hochverzweigte Polystyrene aufgetrennt werden, die verschiedene Verzweigungsgrade besitzen. Durch Variation des Systems der stationären und mobilen Phase können unter Berücksichtigung der Voraussetzungen (θ -LM und hochmolekulare stationäre Phase) eine Bandbreite an Polymeren untersucht werden. Dabei bietet sich eine große Anzahl von Anwendungsmöglichkeiten an. Diese können ebenfalls mit thermodynamischen Messungen, wie der Bestimmung des Trübungspunkts unterstützt werden. Die Verwendung der PDC in Kombination mit verschiedenen Detektorsystemen (beispielsweise Lichtstreuung) ermöglicht eine umfassende Charakterisierung des Trennprozesses bzw. zusätzliche Aussagen über strukturelle Eigenschaften.

Damit eröffnen sich zahlreiche neue und interessante Wege für die Lösung des Problems der Auftrennung hinsichtlich des Verzweigungscharakters.

5 Fazit und Ausblick

Verzweigte Polymere spielen sowohl in der Biologie bzw. Medizin als auch in der Industrie eine bedeutende Rolle. Trotzdem fehlen wichtige Informationen über strukturelle Eigenschaften, speziell Moleküldimensionen und Dichte, die einen immensen Einfluss auf die Einsatzmöglichkeiten und Verarbeitbarkeit haben. Aus diesem Grund spielt die eingehende Charakterisierung von verzweigten Polymeren eine wichtige Rolle. Jedoch stoßen die etablierten Methoden an ihre Grenzen und liefern keine bzw. fehlerbehaftete Ergebnisse. Die Motivation dieser Arbeit lag deshalb darin, Alternativmethoden für bisher angewandte Techniken für die Molmassenbestimmung speziell für verzweigte Polymere zu finden und aufzuzeigen. Der Fokus lag dabei auf chromatographischen bzw. separierenden Methoden, mit welchen es möglich ist, breitverteilte Proben zu fraktionieren. Die Verteilung kann zum einen in Form von Molmassen, zum anderen auch in Form verschiedener Verzweigungsgrade vorliegen.

Um die Problematik von multifunktionellen Polymeren bzw. deren WW (Bildung von schwachen, nicht-kovalent gebundenen Komplexen) zu untersuchen, wurde die Asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung (AF4) angewandt. Hierbei ist es unter anderem erfolgreich gelungen, die Wechselwirkungsproblematik von dendritischen Polymeren zu lösen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde erstmals eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, gleichzeitig das Aufnahme- bzw. Komplexierungsverhalten von dendritischen Glykopolymeren zu charakterisieren sowie die Fraktionierung zur Molmassenbestimmung mit geeigneter Detektion durchzuführen. Unter bestimmten Voraussetzungen, ist mit diesem Weg der Methodenoptimierung ein innovativer Ansatz für die Verwendung der AF4 gelungen, welcher ein riesiges Anwendungspotential bietet. Dieser umfasst sowohl biologische, medizinische als auch nanotechnologische Applikationen, bei denen es um jegliche Art von Transportmechanismen geht. Ein weiterer zusätzlicher Aspekt der AF4-Separation wurde beleuchtet, indem erstmals das Aggregationsverhalten von dendritischen Glykopolymeren durch die Auftrennung der breitverteilten Makromoleküle bzw. Aggregate mit der AF4-LS durchgeführt wurde. Die Untersuchungen belegten, dass es möglich ist, ein pH-kontrollierbares Aggregationsverhalten, abhängig von Konzentration und Generation näher zu beleuchten. Der Vergleich von online AF4-Messungen und offline DLS Untersuchungen zeigte, dass eine Auftrennung nach Größe unumgänglich ist, da die Mittelwerte falsche Tendenzen zeigen können. Erst im Anschluss an eine

Separation wurden Aussagen über die Strukturen der Einzelmoleküle als auch der Aggregate möglich.

Ein wichtiger Punkt bei der AF4-LS ist jedoch, dass diese Methode bisher noch nicht die Universalität und Robustheit der SEC erreicht hat. Eine Methodenentwicklung, die der Untersuchung von unbekanntem Proben vorausgeht, ist unumgänglich. Ein großer Vorteil ist jedoch die große Vielfalt an verschiedenen Einflussparametern, die mit vergleichsweise geringem Aufwand, ausgetestet werden können. Weiterhin kann eine deutlich größere Bandbreite von Einzelmolekülen bis hin zu Partikeln oder Aggregaten aufgetrennt werden, was mittels der SEC nicht möglich ist. Speziell auch für die Untersuchung des Verzweigungscharakters bietet die AF4 ein großes Potential. Hierzu könnten zukünftig beispielsweise Untersuchungen zur Auftrennung von Polymeren mit definierten Verzweigungen und Molmassen durchgeführt werden.

Eine weitere Problematik der Auftrennung hinsichtlich des Verzweigungscharakters konnte durch die Adaption der Phasendistributionschromatographie (PDC) gelöst werden. Mit der PDC wurde ein thermodynamischer Ansatz zur Verzweigungsauf-trennung gefunden, welcher eine Vielzahl an Untersuchungsmöglichkeiten eröffnet. Unterschiedlichste Polymersysteme könnten mit dem entsprechenden experimentellen Aufwand hinsichtlich des Verzweigungscharakters und der Topologien aufgetrennt werden.

Dass die Molmassencharakterisierung von verzweigten Polymeren stets mit einem großen Aufwand verbunden ist und ungeachtet dessen sehr oft fehlerbehaftete Ergebnisse liefert, wurde eingehend erläutert. Mit dieser Arbeit ist ein entscheidender Schritt in der Herangehensweise zur Lösung des Problems der Molmassencharakterisierung und Auftrennung von multifunktionellen, verzweigten Polymeren getan. Alternativen zu bisher etablierten, jedoch ungeeigneten Separationsmethoden wurden ausführlich erläutert, überprüft und evaluiert sowie bestehende Methoden in Hinblick auf multifunktionelle Proben adaptiert und mit einer neuen Herangehensweise zur Problemlösung erfolgreich implementiert.

Weiterführende Arbeiten an multifunktionellen, verzweigten Polymeren haben mit dieser vorliegenden Arbeit bzw. den Anwendungen der vorgestellten Methoden eine solide Grundlage zur Separation und Molmassenbestimmung.

6 Experimentaltteil

6.1 Materialien

Lösungsmittel: Alle Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Sigma-Aldrich (Deutschland) käuflich erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für die AF4-Messungen im wässrigen Medium wurde reines Wasser mit einer Purelab Plus UV/UF-Apparatur (USF Elga, Deutschland) deionisiert, UV-behandelt und ultrafiltriert. Um Bakterien- und Algenwachstum zu verhindern, wurde dem Wasser 0,02 % NaN_3 (m/v) zugegeben. Anschließend wurden die jeweiligen Pufferlösungen (50 mM NaNO_3 - und 0,1 M Acetatpuffer) her- bzw. die pH-Werte mit HCl und NaOH eingestellt. Die AF4-Messungen im organischen Medium wurden mittels destilliertem und mit BHT stabilisiertem THF durchgeführt.

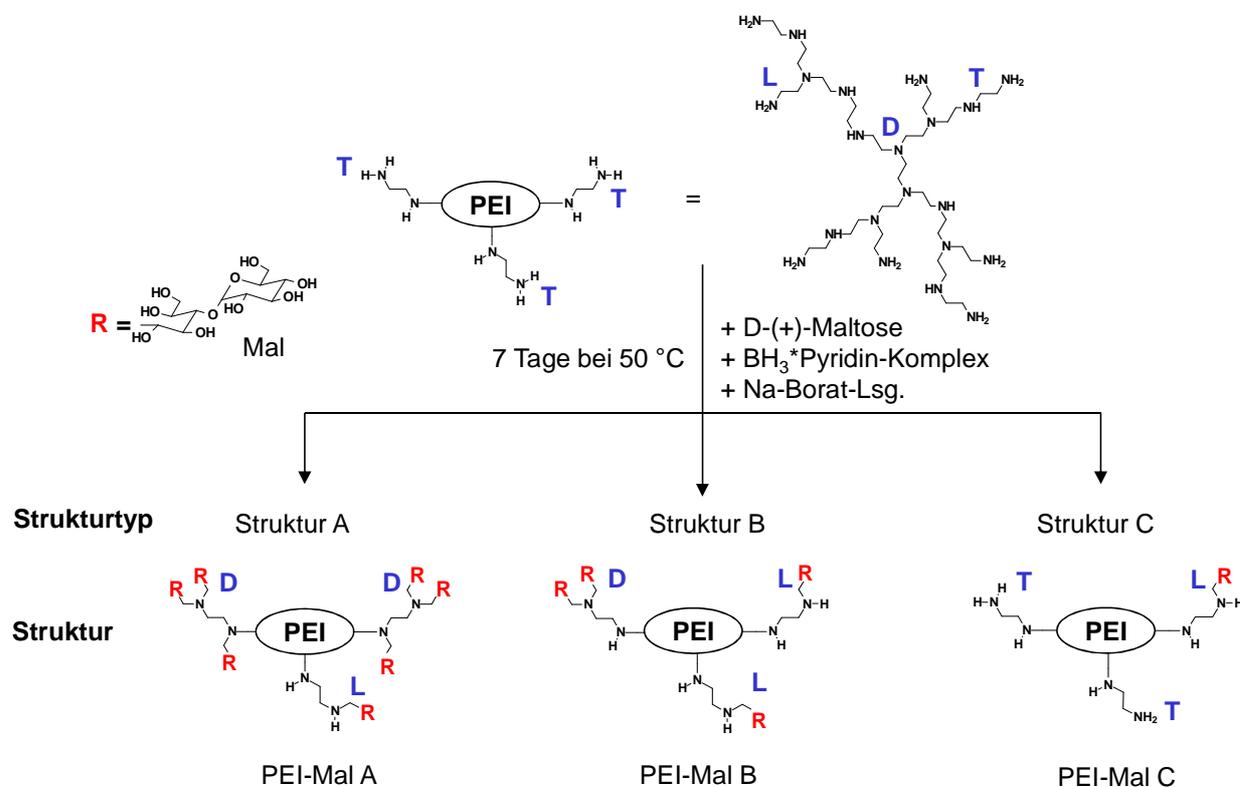
Materialien für die Molmassenbestimmung des hvz Polyesters (Kapitel 3.2):

Der hvz voll-aromatische Polyester wurde aus dem kommerziell erhältlichen Monomer 3,5-Dihydroxybenzoesäure (Sigma-Aldrich, Deutschland) zum einen über Schmelzkondensation und zum anderen mittels Lösungspolymerisation¹⁶³ (Schema 3-5) von Dr. M. Erber synthetisiert und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Die Bezeichnung der Polymere **aPE1**, **aPE2** und **aPE3** erfolgte anhand der Syntheserouten. Die Brechungsindexinkremente wurden in THF ($\text{dn}/\text{dc} = 0,250 \text{ ml/g}$) und in DMAc ($\text{dn}/\text{dc} = 0,270 \text{ ml/g}$) extern bestimmt.

Materialien für die Komplexierungsstudien (Kapitel 3.3):

Als Modellverbindung für die Komplexierungsstudien wurde Rose Bengal (Sigma-Aldrich[®], Deutschland) ausgewählt. Das hochverzweigte Kernmolekül Poly(ethylenimin) (PEI) ($M_w = 25.000 \text{ g/mol}$) wurde unter dem Handelsnamen Lupasol von BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland) käuflich erworben. Die Kern-Schale-Polymere mit der Maltosemodifizierung (PEI-Mal, siehe Schema 6-1) wurden mittels reduktiver Aminierung¹⁷¹ in der Arbeitsgruppe von Dr. D. Appelhans (IPF DD) synthetisiert und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Die Maltosemodifizierung (I) erfolgte mittels reduktiver Aminierung mit D-(+)-Maltose im Beisein eines Boran*Pyridin-Komplexes in einer Natriumborat-Lösung für 7 Tage bei 50 °C mit anschließender Dialyse in destilliertem Wasser. Als Referenzmaterial wurde Poly(ethylenglykol) ($M_n = 91.300 \text{ g/mol}$; $M_w = 95.000 \text{ g/mol}$ Tosoh Corporation, Japan) verwendet. Die

Brechungsindexinkremente wurden extern bestimmt: $dn/dc_{PEI} = 0,125 \text{ ml/g}$ (in DMAc/LiCl) sowie $dn/dc_{RB} = 0,167 \text{ ml/g}$; $dn/dc_{PEI-Mal} = 0,140 \text{ ml/g}$; $dn/dc_{RB@PEI-Mal} = 0,100 \text{ ml/g}$ (in reinem Wasser).



Schema 6-1: Syntheseroute für PEI-Mal mit unterschiedlichem Dekorierungsgrad¹⁷¹ mit Bezeichnung der funktionellen Einheiten

Materialien für die Aggregationsstudien (Kapitel 3.4):

Die dendronisierten Glykopolymere wurden über die divergente Syntheseroute dargestellt (siehe Schema 3-9). Das lineare Rückgrat bildet das Poly(ethen-alt-N-[5-(hydroxycarbonyl)pentyl]maleimid) Copolymer (MI-A), welches durch Umsetzung von dem kommerziell erhältlichen Maleinsäureanhydrid-Copolymer (MA) mit 6-Aminohexansäure und Essigsäure (II) hergestellt wurde. Die erste Generation wurde durch die Reaktion des MI-A mit einem L-Lysin-Derivat (H₂-N-G1)²²⁵ über Nacht bei Raumtemperatur in Gegenwart von BOP und TEA dargestellt (III). Die Entschützung wurde mittels DCM und TFA (1:1) für 2-6 h bei Raumtemperatur (IV) durchgeführt und die anschließende Maltosemodifizierung erfolgte mittels reduktiver Aminierung mit D-(+)-Maltose im Beisein eines Boran*Pyridin-Komplexes in einer Natriumborat-Lösung für 7 Tage bei 50 °C mit anschließender Dialyse in destilliertem Wasser (V). Die zweite und dritte Generation wurden mittels Standard-Kopplungs-Entschützungszyklen synthetisiert. Hierbei wurde auch DCM und TFA (1:1) für 2-6 h bei Raumtemperatur

angewandt, um die N-Boc-geschützten Aminogruppen zu entschützen⁴⁸. Anschließend wurde das Lysin-Derivat (HO₂C-G1)²²⁶ mit BOP/TEA in DMF bei Raumtemperatur über Nacht angekoppelt (VI). Die Entschützung und Maltosemodifizierung erfolgte analog nach (IV) und (VI). Für die **MI-G0-Mal** wurde **MI-A** zuerst mit H₂N-(CH₂)₄-NH-Boc im Beisein von BOP und TEA/DMF (I) und anschließend analog zu ⁴⁸ und (IV), (V) mit Maltoseeinheiten modifiziert. Die Ausbeuten betragen ≤ 85 %. Die ausführliche Synthesebeschreibung befindet sich unter ¹⁸⁵. Die Synthesearbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. D. Appelhans (IPF DD) durchgeführt und die Polymere freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Materialien für die PDC (Kapitel 4):

Die verwendeten PS-Standards für die PDC-Auftrennung sind in Tabelle 6-1 beschrieben. Lineares PS mit der Molmasse von 300.000 g/mol ($M_w/M_n = 1,06$), welches mit einer Fluoresceingruppe (IPS_{fl} 354k) markiert ist, sowie das UHPS ($M_w = 8.090.000$ g/mol, $M_w/M_n = 1,17$) wurden bei Polymer Standards Service (Deutschland) käuflich erworben.

Tabelle 6-1: Molmassen und hydrodynamische Durchmesser von linearem und sternförmigem PS

Polystyren-standards	M_n^1 [g/mol]	M_w^1 [g/mol]	M_w/M_n	Hydrodynamischer Durchmesser ² [nm]
IPS 20k ⁴	18.300	20.000	1,09	6,6
IPS 52k ⁴	46.400	51.500	1,10	10,5
IPS 86k ⁴	79.100	86.300	1,09	13,4
IPS 123k ³	111.000	123.000	1,11	15,9
IPS 243k ⁴	225.000	243.000	1,08	22,2
IPS 354k ³	324.000	354.000	1,09	26,5
sPS 45k (3 Arme) ³	39.100	44.500	1,14	9,4
sPS 336k (3 Arme) ³	300.000	336.000	1,12	27,6
sPS 185k (8 Arme) ³	159.000	185.000	1,16	16,6

¹ bestimmt mittels SEC-LS (SEC-System 1), ² bestimmt mittels DLS, ³ erworben von Polymer Standard Services (Deutschland), ⁴ erworben von Knauer (Deutschland)

6.2 Geräte und Methoden

Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3 und 4):

SEC-System 1: Bei dieser Apparatur wurde stabilisiertes Tetrahydrofuran (THF) sowohl als Eluent als auch als Lösungsmittel verwendet. Die Pumpe (WGE Dr. Bures, Deutschland) ist an ein Viskositäts-/Brechungsindex-(RI)-detektor (ETA-2020, WGE Dr. Bures, Deutschland) und einem Vielwinkellichtstreuendetektor (LS) Dawn[®]EOS (Wyatt Technologies, USA) gekoppelt. Die Messungen wurden mit einer PLgel MIXED-C-Säule (5 µm, 300 x 7,5 mm, Varian, Großbritannien) durchgeführt. Die Flussrate betrug 1,0 ml/min bei einer Temperatur von 25 °C.

SEC-System 2: Bei dem modular aufgebauten SEC-System wurde N,N-Dimethylacetamid (DMAc) mit Lithiumchlorid (3 g/l) als Eluent und Lösungsmittel verwendet. Die Pumpe mit integriertem Entgaser (Agilent Technologies, 1200er Serie, Großbritannien) ist an einen Dreiwinkellichtstreuendetektor Dawn Tristar (Wyatt Technologies, USA, $\lambda = 632$ nm) und einen RI-Detektor (Knauer, Deutschland) gekoppelt. Als Trennsäule wurde eine PolarGel C (Varian, Großbritannien) mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet.

SEC-System 3: Bei dem ebenfalls modular aufgebauten SEC-System wurde im wässrigen Medium gemessen. Hierzu wurde ebenfalls eine Pumpe mit integriertem Entgaser (Agilent Technologies, 1200er Serie, USA), welche an einen Dreiwinkellichtstreuendetektor Dawn Tristar (Wyatt Technologies, USA, $\lambda = 632$ nm) und einen RI-Detektor (Knauer, Deutschland) gekoppelt ist, verwendet. Als Trennsäule wurde eine AquaGel (Varian, Großbritannien) mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet.

Bei allen verwendeten Systemen wurde eine Probenlösung mit einer Konzentration von 2,5-3,5 mg/ml hergestellt, von der 20 µl injiziert wurden.

Datenerfassung und –auswertung: Die Messdaten wurden mit der Software Astra (Version 4.7 und 4.9, Wyatt Technologies, USA) erfasst und ausgewertet. Die Berechnung der Molmassenverteilungen sowie die Bestimmung des M_w wurden mittels probenspezifischer Kalibrierung durchgeführt. Dafür wurde ein linearer Fit durch die Molmassen/Elutionsvolumen-Beziehung gelegt.

Brechungsindexinkrement- (dn/dc-) Bestimmung (Kapitel 3 und 4):

Für die M_w -Bestimmung wurden die Brechungsindexinkremente (dn/dc) extern mit einem RI-Detektor Dn2010 (WGE Dr. Bures, Germany, $\lambda = 620$ nm) bei 25 °C ermittelt. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von einer Stammlösung hergestellt. Die Konzentrationen betragen 0,4; 0,8; 1,6; 2,0; 2,4 und 3,2 mg/ml. 900 μ l von der jeweiligen Probelösung wurden bei einer Flussrate von 0,15 ml/min injiziert und die Signalintensitäten mit der Software dndc520 (Wyatt Technologies, USA) aufgenommen und ausgewertet.

Dynamische Lichtstreuung (Kapitel 3 und 4):

Die Messungen wurden bei 25 °C mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Großbritannien) durch Messung der Rückstreuintensität bei 173° durchgeführt. Für die Zetapotentialmessungen wurde ein zusätzlicher Autotitrator (mit HCl und KOH zur pH-Werteinstellung) (Malvern Instruments Ltd., Großbritannien) verwendet.

UV-Vis-Spektroskopie (Kapitel 3 und 4):

Die UV-Vis-Messungen wurden mit einem Cary 100 Spektrophotometer (Varian, USA) bei 25 °C durchgeführt. Dazu wurde eine Präzisionsglasküvette mit einer Dicke von 10 mm und einem Volumen von 3,5 ml verwendet. Der Wellenlängenbereich des verwendeten Spektroskops beträgt 200 bis 800 nm.

AF4-Messungen (Kapitel 3):

Alle AF4-Messungen wurden mit einem organischen Eclipse 3 System (Wyatt Technology Europe, Deutschland) durchgeführt. Die Flüsse werden mit einer isokratischen Pumpe mit integriertem Entgaser (1200er Serie, Agilent Technologies, USA) gesteuert. Das Detektionssystem bestand aus einem Dreiwinkellichtstredetektor MiniDAWN (Wyatt Technology, USA) sowie einem RI-Detektor Dn 2010 (WGE Dr. Bures, Deutschland, $\lambda = 620$ nm, 25 °C) und einem UV-Detektor mit variabler Wellenlänge (Knauer, Deutschland). Alle Injektionen wurden mit einem Autosampler mit variablem Injektionsvolumen (1200er Serie, Agilent Technologies, USA) und einem Injektionsfluss F_i von 0,2 ml/min durchgeführt. Der Kanalfuss betrug bei allen Messungen $F_k = 1$ ml/min.

Die Kanaldimensionen betragen 26,5 cm in der Länge und 2,1 bis 0,6 cm in der Breite. Bei Messungen im wässrigen Medium bestand der Kanaldeckel aus Aluminium mit einem Poly(carbonat)-Fenster, während bei den Messungen mit THF ein PEEK-Deckel mit einem Kalrez[®]-Dichtring verwendet wurde. Der Spacer (breite Geometrie) bestand aus Poly(tetrafluorethylen) und wurde mit Dicken von 350 und 450 µm verwendet.

Je nach Größe und Beschaffenheit der Polymerprobe wurden unterschiedliche Querfluss-Methoden (isokratisch, linearer und exponentieller Gradient) zur Auftrennung entwickelt.

Die Messdaten wurden mit der Astra Software (Version 4.7 und 4.9, Wyatt Technologies, USA) erfasst und ausgewertet. Von jeder Probe wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt sowie eine Basislinie ohne Injektion aufgenommen. Für die Korrektur des druckschwankungssensitiven RI-Signals wurde im Anschluss an die Messungen eine Basisliniensubtraktion mit der Software Corona 1.4 (Wyatt Technologies, USA) durchgeführt.

Die Berechnung der Molmassen und der Trägheitsradien wurde je nach Molekülgröße entsprechend der Gleichung von Zimm⁸³ bzw. Berry²²⁷ mittels Debye-Plot und einem Kurvenfit der zweiten Ordnung durchgeführt.

AF4-LS-Molmassenbestimmung der hvz, aro PE (Kapitel 3.2)

Im Fall von **aPE1** und **aPE2** ist die optimierte Trennmethode durch einen isokratischen Querfluss von 3 ml/min über einen Zeitraum von 20 min mit einer vorherigen 5 minütigen Fokussierung inklusive 3 minütiger Injektion (0,2 ml/min) charakterisiert. Für das Polymer **aPE3** war diese Messmethode jedoch nicht optimal, da während der 20 Minuten noch keine vollständige Elution erfolgte. Aufgrund dessen wurde in diesem Fall im Anschluss unter identischen Fokussier- und Injektionsbedingungen eine lineare Absenkung des Querflusses (Gradient) von 3 zu 0,15 ml/min innerhalb von 20 min durchgeführt (siehe Abbildung 6-1).

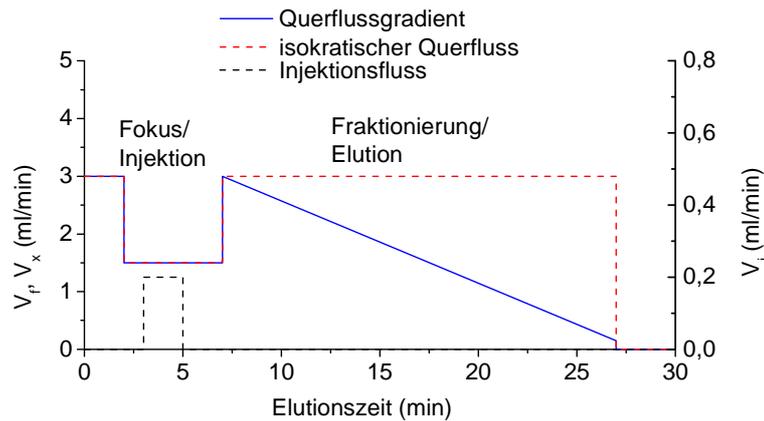


Abbildung 6-1: Vergleich AF4-Messmethoden für die Molmassenbestimmung des hvz-aPE: Flussrate des Querflussgradienten (blau) und isokratischen Querflusses (rot) in Abhängigkeit der Elutionszeit

Komplexierungsuntersuchungen (Kapitel 3.3) :

Die Modifizierung einer frischen Membran wurde durch 15 sukzessive Injektionen (50 μg bzw. 100 μg) reiner RB-Lösung durchgeführt. Für eine vollständige Modifizierung werden mindestens 250 μg RB benötigt.

Erstellung der Kalibrierkurve: Nach erfolgter Membranmodifizierung wurden drei verschiedene Konzentrationsreihen hergestellt und mittels UV-Vis-Detektor (Knauer, Deutschland, $\lambda = 550 \text{ nm}$) vermessen. Der Massenbereich für die Injektionen lag bei 10-300 μg , jede Lösung wurde drei Mal vermessen und der Mittelwert verwendet. Die UV-Vis-Signalfächen wurden in Abhängigkeit der injizierten Masse aufgetragen.

Komplexierungsstudien: Die Mischungen von RB- und PEI-Mal-Lösungen wurden unmittelbar vor den Untersuchungen in den jeweiligen Verhältnissen zusammengegeben. In Hinblick auf kinetische Untersuchungen wurden die jeweiligen Mischungen direkt nach dem Zusammengeben über einen Zeitraum von 630 min 15 Mal mit 100 μl Injektionsvolumen sukzessive injiziert. Die Versuche wurden mit zwei unterschiedlichen AF4-Messmethoden durchgeführt.

Messmethode A: Für die *RB-Filtration* wurde ein F_f von 3 ml/min für 20 min mit einer zweiminütigen Injektion ($F_i = 0,2 \text{ ml/min}$) angewandt. Anschließend fand die *Fraktionierung* bei einem linearen Querflussgradienten von $F_x = 2$ zu 0 ml/min innerhalb von 20 min statt.

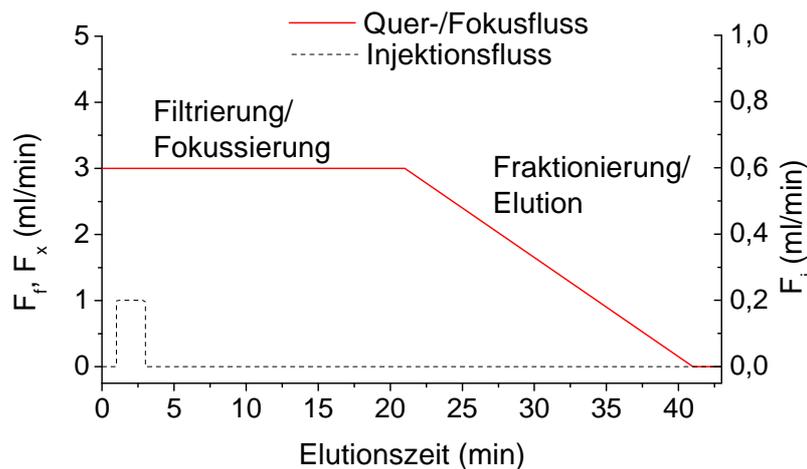


Abbildung 6-2: AF4-Messmethode zur gleichzeitigen *Filtrierung* und *Fraktionierung* (Methode A) zur Komplexquantifizierung, Darstellung der Flussraten in Abhängigkeit der Zeit

Messmethode B: Die Molmassenbestimmung von PEI-Mal erfolgte unter einem F_f von 1,5 ml/min für 2 min bei vorheriger zweiminütiger Injektion ($F_i = 0,2$ ml/min). Die Auftrennung wurde durch einen 20minütigen, linearen Querflussgradienten von $F_x = 2$ zu 0 ml/min hervorgerufen.

Im Anschluss an die Fraktionierung wurde ein F_k von 1 ml/min angewandt, um den Kanal von verbliebenen Resten freizuspülen. Die RB-Detektion wurde mit einem UV-Vis-Detektor (Knauer, Deutschland, $\lambda = 550$ nm) und die Molmassenbestimmung mit der schon erwähnten LS-RI-Kombination durchgeführt.

Kernresonanzspektroskopie (Kapitel 3.4.2):

Die NMR-Experimente wurden mit einem Bruker DRX 500 NMR Spektrometer bei 500,13 MHz für ^1H - und bei 125,75 MHz für ^{13}C durchgeführt. DMSO- d_6 und D_2O wurden als Lösungsmittel verwendet. Für die interne Kalibrierung wurde das Signal des Lösungsmittels DMSO- d_6 genutzt: $\delta (^{13}\text{C}) = 39,6$ ppm; $\delta (^1\text{H}) = 2,50$ ppm. Na-3-(trimethylsilyl)-3,3,2,2-tetradeuteropropionat wurde für die interne Kalibrierung in D_2O eingesetzt: ($\delta (^{13}\text{C}) = 0$ ppm; $\delta (^1\text{H}) = 0$ ppm).

Aggregationsuntersuchungen der dendronisierten Glykopolymere (Kapitel 3.4):

Bei allen AF4-Messungen wurde ein Detektorfluss von 1 ml/min angewandt. Zu Beginn jeder Messung wird der Querfluss für 5 min bei 1,5 ml/min gehalten, um den Kanal zu equilibrieren. Anschließend folgt eine Fokussierung mit einem Fluss von 1,5 ml/min für 2 min. Danach wird die Probe mit einem Fluss von 0,2 ml/min injiziert und für weitere

3 min fokussiert. Zur Auftrennung wurden zwei verschiedene Querflussgradienten angewandt (siehe Abbildung 6-2). *Linearer Querflussgradient*: von 1,5 bis 0 ml/min innerhalb von 60 min, und *Exponentieller Querflussgradient*: von 1,5 bis 0 ml/min innerhalb von 15 min, mit einem Kurvenfaktor von 2 (Abnahme der Kurve). Im Anschluss an die Auftrennung wurden die Kapillaren und der Kanal mit einem Detektorfluss von 1 ml/min und eingeschaltetem Injektionsfluss gespült. Um den Einfluss der Fokussierung auf die Molekülgröße zu überprüfen, wurden der Fokussierungsfluss von 1,5 bis 3 ml/min und die Zeiten von 3 bis 7 min variiert.

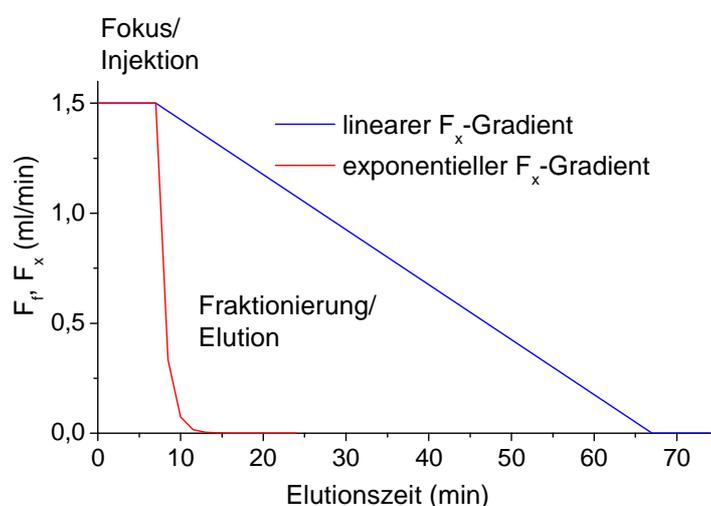


Abbildung 6-3: Vergleich der AF4-Messmethoden mit unterschiedlichen F_x -Gradienten für die Untersuchung der dendronisierten Glykopolymere, linearer (blau) sowie exponentieller F_x -Gradient (rot)

Molekulardynamische Simulation von MI-G0-Mal (Kapitel 3.4.6):

Für die Simulation wurde die Monomereinheit in Succin-(Bis-methyl-amino)butyl-imid und Maltosyl-(amino butyl-amin) aufgespalten, weil die Gesamtatomzahl für die Moleküloptimierung mittels quantenmechanischer *ab-initio* Berechnungen zu hoch war. Anschließend wurden die Untereinheiten mittels eines Überlappungsbereichs verbunden. Die Co-Monomer-Ethaneinheit wurde alternierend in die optimierte Monomereinheit integriert. Als einzige frei wählbare, geometrische Parameter wurden die Torsionswinkel von Ethan zu Maleimid auf 60° und von Maleimid zu Ethan auf 120° festgelegt. Das Molekül befindet sich bei der Simulation am absoluten Nullpunkt (0 K) ohne Druck und umgebendes Medium. Die *ab-initio* quantenmechanische Berechnung wurde mit der Software GAMESS²²⁸ durchgeführt. Die grafische Darstellung erfolgte mit dem Programm Rasmol (Version 2.7.5.2.).²²⁹

CryoTEM-Messungen (Kapitel 3.4.6):

Die Bilder der tiefgefrorenen Polymerlösungen wurden in Libra120 TEM (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena, DE) bei einer Beschleunigungsspannung von 120kV aufgenommen. Die dünnen Filme der Polymerlösung wurden durch Gefriertrocknung mit flüssigem Ethan in einem Leica Netzchen-Plunger (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE) auf "Lacey" bzw. Quantifoil® R1.2/1.3 TEM-Netzchen (Type S166-3 bzw. S143-2, Plano GmbH, Wetzlar, DE) präpariert.

AFM-Messungen (Kapitel 3.4.6):

Für die AFM-Messungen der 3. Generation wurde eine verdünnte Polymerlösung ($c = 0,01$ mg/ml) mit reinem, ultrafiltriertem Wasser hergestellt und auf Si-Wafer aufgebracht, welche vorher mit flüssigem CO₂ (SnowJet) sorgfältig gereinigt wurden. Zum einen wurde die Polymerschicht mittels Eintauchen in die Polymerlösung und zum anderen mittels Rotationsbeschichtung (50 und 100 Umdrehungen/s) hergestellt. Die AFM-Messungen wurden an einem NanoScope IIIa Dimension 3100 (Veeco, USA) im Tappingmode mit superscharfen Siliziumspitzen (Spitzenradius kleiner 2 nm) (Nanosensors, Deutschland) durchgeführt.

Beschichtung der Glaskügelchen (Kapitel 4.2.1):

Die Glaskügelchen (Ballotini, $\varnothing =$ etwa 130 μm , gesiebt) wurden nach gründlichem Reinigen mit NaNO₃ (3 % m/m) und H₂SO₄ (96 % m/m) mit Wasser abgespült und anschließend getrocknet. Die gereinigten Ballotini wurden mit einer hochkonzentrierten UHPS-Lösung (10 mg/ml THF) vermischt. Das Volumen der UHPS-Lösung wurde so ausgewählt, dass nur ein geringer Überstand oberhalb der Ballotini vorhanden ist. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgedampft und der feste Ballotini-UHPS-Kuchen mit Methanol und CH aufgelockert. Die Lösungsmittel wurden ebenfalls abgedampft und die trockenen, beschichteten Ballotini liegen als lockere, strahlend weiße Partikel vor. Nach dem Füllen der Säule, wurden die löslichen Anteile des HPS mit CH bei 28 °C mit einer Flussgeschwindigkeit von 15 ml/h für mindestens zwei Tage herausgespült. Mehrere Fraktionen wurden zeitabhängig aufgefangen, getrocknet und gravimetrisch untersucht. Anschließend wurde das Vorhandensein von UHPS in Abhängigkeit von der Spülzeit mittels SEC-LS (System 1) überprüft.

Elektronenmikroskopie (Kapitel 4.2.1):

Um die Qualität der UHPS-Beschichtung zu überprüfen, wurden die Glaskügelchen mit einer 8 nm Goldschicht mit dem SCD 500 (Oerlikon Balzers, Deutschland) beschichtet. Anschließend wurden die Kügelchen mit einem Phenom™ Mikroskop (FEI™ Company, Niederlande) analysiert, welches Licht- und Elektronenmikroskopie kombiniert.

Thermogravimetrische Analyse (Kapitel 4.2.1):

Der Gehalt von abgeschiedenem UHPS auf der Oberfläche der Ballotini wurde mit einem Q5000 (TA Instruments, USA) unter N₂-Fluss in Pt-Probepfännchen bei einer Heizrate von 10 °C/min und 300 bis 600 °C bestimmt. Die Kalibrierung des Systems erfolgte mit Curie-Punkt-Standards.

Fokussierter Ionenstrahl (FIB) in Kombination mit REM (Kapitel 4.2.1):

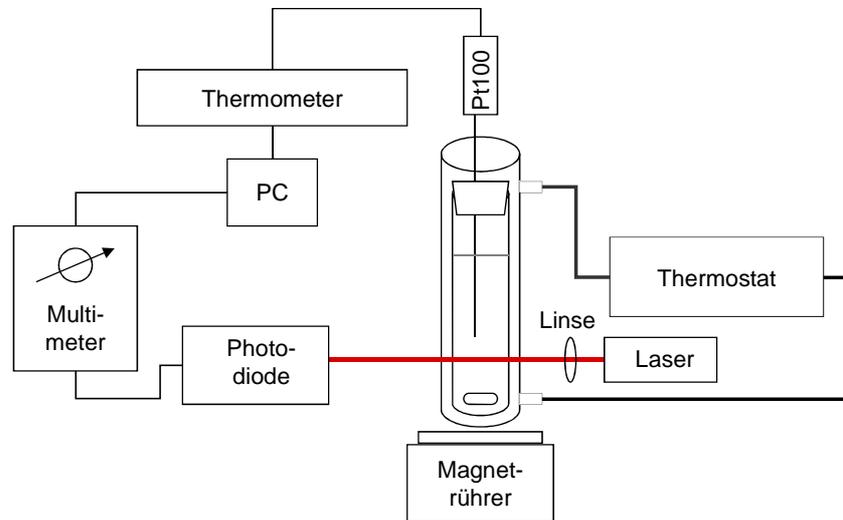
Der Queranschnitt der mit Pt-beschichteten Probe erfolgte mittels fokussiertem Ionenstrahl und wurde mittels REM dargestellt. Dazu wurde eine cross-beam FIB/SEM-Apparatur Neon 40ESB (Carl Zeiss NTS GmbH, Deutschland) verwendet. Die Abtragungsprozedur fand mittels Ga-Ionen mit einer Stärke von 500 pA bei 30 kV für den Grobschnitt und 50 pA bei 30 kV für den Feinschnitt statt. Jedoch neigen die Schnittflächen zur Aufladung. Deswegen wurden bestimmte Bereiche kurzzeitig mit einem geöffneten Pt-Precursor gescannt und eine dünne Pt-Schicht aufgetragen. Um den Scandrift zu minimieren, wurden die Flächen um 70 bis 90° rotiert, was jedoch zu einer Verzerrung der Aufnahmen führt. Um korrekte Schichtdicken zu erhalten, musste somit eine Streckung um den Faktor 1,24 erfolgen. Der Methodenfehler in der Bestimmung liegt bei etwa 10 %.

Manuelle PDC (Kapitel 4.2.2):

Für die Vorversuche wurde eine temperierbare Glassäule mit einer Länge von 27 cm und einem Durchmesser von 1,3 cm genutzt. Die Säule wurde mit CH und Ballotini gefüllt. Cyclohexan wurde als Eluent und Lösungsmittel mit einer Flussrate zwischen 10 und 15 ml/h verwendet. Nach der Injektion der Polymerproben wurden Fraktionen mit einem Volumen von 2 ml gesammelt. Nach der Trocknung der Fraktionen, wurden diese mittels Gravimetrie, TGA, SEC-LS (SEC-System 1) und UV-Vis-Spektroskopie analysiert.

Trübungskurvenbestimmung (Kapitel 4.2.3):

Die technische Apparatur, bestehend aus einem Laser, einem temperierbaren Kolben (Quarzglas) und einer Photodiode, ist in Schema 6-4 dargestellt.



Schema 6-2: Aufbau der Apparatur für die Trübungskurvenbestimmung

Die Lösung wurde mittels eines Magnetrührers so durchmischt, dass keine Blasenbildung stattfand. Der Laserstrahl ($\lambda = 690 \text{ nm}$) wurde mit Hilfe einer Linse fokussiert, durch die Küvette mit der Polymerlösung geleitet und die Transmission der Lösung anhand der Intensität des Strahles mit einer Photodiode detektiert. Für die Datenerfassung wurde eine Inhouse-Software (Universität Mainz) verwendet. Definierte Polymerlösungen wurden mit einer Rate von $0,1 \text{ K/min}$ heruntergekühlt, während gleichzeitig die Trübung der Lösung detektiert wurde.

Automatisiertes Pumpen-Säule-Detektor-System für PDC (Kapitel 4.2.4):

Eine HPLC-Pumpe 64 (Knauer, Germany) wurde mit einem 6-Wegeventil (Rheodyne, USA) als Injektionseinheit, verschiedenen Säulentypen und einem UV-Photometer ($\lambda = 254 \text{ nm}$, Knauer, Germany) bzw. einem RI-Detektor (Differentialrefraktometer, Knauer, Germany) gekoppelt. Die Flussrate lag je nach Säulentyp zwischen 12 (Säulentyp 3) und $18 \text{ ml/h (Säulentyp 1 und 2)}$. Die Datenaufnahme wurde mit einer Inhouse-Software (LC-MWERF Version 2.0, IPF Dresden) durchgeführt. Jede Probe wurde in einer Doppelbestimmung vermessen. Die Temperaturstabilität wurde mittels eines Thermostaten F25-HL (Julabo Labortechnik, Germany) gewährleistet. Ein Injektionsvolumen von $50 \mu\text{l}$ bei einer Konzentration von $1 - 2 \text{ mg/ml}$ wurde als gut

geeignet getestet. Bei höheren Mengen wurde eine Überladung der Säule mit auftretender Kurvenverbreiterung beobachtet.

Säulenmodifizierung für die PDC (Kapitel 4.2.4):

Eine hochkonzentrierte UHPS-CH-Lösung mit einer Temperatur von 60 °C wurde mittels einer 3,5 ml Probenschleife mit einer Flussrate von 18 ml/h in eine kommerziell erhältliche HPLC-Säule injiziert. Bei jeder Säule betrug das Totvolumen weniger als 3,5 ml. Alle Apparaturteile wurden auf über 40 °C temperiert, um ein Ausfällen von UHPS zu verhindern. Die Säulen wurden wie folgt modifiziert: Während die Injektion der hochkonzentrierten UHPS-Lösung in die erste Hälfte der Säule stattfand, wurde gleichzeitig die zweite Hälfte der Säule auf 7-10 °C heruntergekühlt, damit das UHPS unlöslich wird und innerhalb der Säule ausfällt. Anschließend wurde die Säule gedreht und die „ungefüllte“ Hälfte auf die gleiche Weise modifiziert. In beiden Fällen wurde ein Anstieg des Säulendruckes beobachtet, jedoch lag dieser unterhalb von 100 bar und somit innerhalb der apparatetechnischen Grenzen. Nach der Modifizierung wurde die Säule mit CH bei 28 °C und 15 ml/h für mind. zwei Tage gespült. Analog zur Beschichtung der Ballotini wurde der Gehalt an herausgespültem UHPS quantifiziert.

Tabelle 6-2: Verwendete Säulentypen für PDC-Untersuchungen

Säulentyp	Beschichtungs- / Modifizierungs- prozess	Dimensionen Länge x Ø (mm)	Säulenmaterial	Poren- größe (nm)	Partikel- größe (µm)
1	UHPS-Coating der Ballotini außerhalb der Säule	300 x 7,8	Ballotini	-	130
2 ¹	Modifizierung durch Injektion einer hochkonzentrierten UHPS-Lösung	250 x 7	Makroporöses PS- Harz	Makro- poren: 4000	10
3 ²	Modifizierung durch Injektion einer hochkonzentrierten UHPS-Lösung	150 x 4,6	Organosilan- Liganden (C18) mit doppelter Endgruppen- modifizierung	8	5

¹ Hibar® (Merck, Deutschland) gepackt mit Lichrogel® PS4,

² Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent, Großbritannien)

A Appendix

Literaturverzeichnis

- (1) PlasticsEurope, <http://www.plasticseurope.org>, 10.10.2012.
- (2) Elias, H. G., *Makromoleküle 1. Chemische Struktur und Synthesen*. Wiley-VCH: **2000**; Vol. 6. vollst. überarb.A.
- (3) Hoang, N.-L.; Landolfi, A.; Kravchuk, A.; Girard, E.; Peate, J.; Hernandez, J. M.; Gaborieau, M.; Kravchuk, O.; Gilbert, R. G.; Guillaneuf, Y.; Castignolles, P.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1205, (1-2), 60-70.
- (4) Voit, B. I.; Lederer, A.; *Chem. Rev.* **2009**, 109, 5924-5973.
- (5) Arndt, K. F.; Müller, G., *Polymercharakterisierung*. Carl-Hanser Verlag München, Wien: **1996**.
- (6) Flory, P. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2718-2723.
- (7) Jikei, M.; Kakimoto, M.; *Prog. Polym. Sci.* **2001**, 26, (8), 1233-1285.
- (8) Voit, B.; *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **2005**, 43, 2679-2699.
- (9) Yan, D.; Gao, C.; Frey, H., *Hyperbranched Polymers*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, **2011**.
- (10) Ballauff, M.; Likos, C. N.; *Angew. Chem.* **2004**, 116, (23), 3060-3082.
- (11) Flory, P. J., *Principles of polymer chemistry. Molecular Weight Distribution in Non-linear Polymers and the Theory of Gelation*. Cornell University Press: Ithaca, **1953**.
- (12) Hawker, C. J.; Lee, R.; Fréchet, J. M. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4583-4588.
- (13) Kim, Y. H.; Webster, O. W.; *Macromolecules* **1992**, 25, (21), 5561-5572.
- (14) Frey, H.; Hölter, D.; *Acta Polym.* **1999**, 50, (2-3), 67-76.
- (15) Hecht, S.; Frechet, J. M. J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, (1), 74-91.
- (16) Chen, Y.; Shen, Z.; Pastor-Perez, L.; Frey, H.; Stiriba, S. E.; *Macromolecules* **2005**, 38, (2), 227-229.
- (17) Xu, S. J.; Luo, Y.; Graeser, R.; Warnecke, A.; Kratz, F.; Hauff, P.; Licha, K.; Haag, R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, (3), 1030-1034.
- (18) Sunder, A.; Kramer, M.; Hanselmann, R.; Mulhaupt, R.; Frey, H.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, (23), 3552-3555.
- (19) Burakowska, E.; Zimmerman, S. C.; Haag, R.; *Small* **2009**, 5, (19), 2199-2204.
- (20) Boogh, L.; Pettersson, B.; Manson, J. A. E.; *Polymer* **1999**, 40, (9), 2249-2261.
- (21) Foix, D.; Erber, M.; Voit, B.; Lederer, A.; Ramis, X.; Mantecon, A.; Serra, A.; *Poly. Degrad. Stabil.* **2010**, 95, (4), 445-452.
- (22) Yan, D.; Gao, C.; Frey, H., *Hyperbranched Polymers: Synthesis, Properties and Applications*. John Wiley & Sons: New York, **2009**.
- (23) Chattopadhyay, D. K.; Raju, K.; *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, (3), 352-418.
- (24) Kim, Y. H.; *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1998**, 36, (11), 1685-1698.
- (25) Hanselmann, R.; Hölter, D.; Frey, H.; *Macromolecules* **1998**, 31, (12), 3790-3801.
- (26) Gray-Weale, A.; Gilbert, R. G.; *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2009**, 47, (15), 3914-3930.
- (27) Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F.; *Synthesis* **1978**, 2, 155-158.
- (28) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P.; *Polym. J.* **1985**, 17, (1), 117-132.
- (29) Newkome, G. R.; Moorefield, C. N.; Vögtle, F., *Dendrimers and Dendrons*. **2001**.
- (30) Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, (21), 7638-7647.
- (31) Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J.; *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1990**, (15), 1010-1013.
- (32) Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J.; *Chem. Rev.* **2001**, 101, (12), 3819-3868.
- (33) Zhao, M. Q.; Crooks, R. M.; *Adv. Mater.* **1999**, 11, (3), 217-220.
- (34) Crooks, R. M.; Zhao, M. Q.; Sun, L.; Chechik, V.; Yeung, L. K.; *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, (3), 181-190.

- (35) Jansen, J.; de Brabander - van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W.; *Science* **1994**, 266, (5188), 1226-1229.
- (36) Bosman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W.; *Chem. Rev.* **1999**, 99, (7), 1665-1688.
- (37) Boas, U.; Heegaard, P. M. H.; *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, (1), 43-63.
- (38) Esfand, R.; Tomalia, D. A.; *Drug Discov. Today* **2001**, 6, (8), 427-436.
- (39) Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Frechet, J. M. J.; Szoka, F. C.; *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, (12), 1517-1526.
- (40) Ma, H.; Chen, B. Q.; Sassa, T.; Dalton, L. R.; Jen, A. K. Y.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, (5), 986-987.
- (41) Astruc, D.; Boisselier, E.; Ornelas, C.; *Chem. Rev.* **2010**, 110, (4), 1857-1959.
- (42) Kouketsu, T.; Duan, S.; Kai, T.; Kazama, S.; Yamada, K.; *J. Membr. Sci.* **2007**, 287, (1), 51-59.
- (43) Harpham, M. R.; Suzer, O.; Ma, C. Q.; Bauerle, P.; Goodson, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, (3), 973-979.
- (44) Dufes, C.; Uchegbu, I. F.; Schatzlein, A. G.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, (15), 2177-2202.
- (45) Kitchens, K. M.; El-Sayed, M. E. H.; Ghandehari, H.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, (15), 2163-2176.
- (46) DeGennes, P. G.; Hervet, H.; *J. Phys. Lett.-Paris* **1983**, 44, (9), 351-360.
- (47) Lescanec, R. L.; Muthukumar, M.; *Macromolecules* **1990**, 23, (8), 2280-2288.
- (48) Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Ill, W. A. G.; *Angew. Chem.* **1990**, 102, (2), 119-157.
- (49) Hummelen, J. C.; vanDongen, J. L. J.; Meijer, E. W.; *Chem.-Eur. J.* **1997**, 3, (9), 1489-1493.
- (50) Frey, H.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, (16), 2193-2197.
- (51) Schlüter, A. D.; Rabe, J. P.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, (5), 864-883.
- (52) Schlüter, D., A Covalent Chemistry Approach to Giant Macromolecules with Cylindrical Shape and an Engineerable Interior and Surface. In *Top. Curr. Chem.*, Springer: **2005**; Vol. 245, 151-191.
- (53) Frauenrath, H.; *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, (3-4), 325-384.
- (54) Freudenberger, R.; Claussen, W.; Schluter, A. D.; Wallmeier, H.; *Polymer* **1994**, 35, (21), 4496-4501.
- (55) Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, (2), 138-175.
- (56) Percec, V.; Heck, J. A.; Tomazos, D.; Ungar, G.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, (12), 2381-2388.
- (57) Andreopoulou, A. K.; Kallitsis, J. K.; *Macromolecules* **2002**, 35, (15), 5808-5815.
- (58) Voyer, N.; Lamothe, J.; *Tetrahedron* **1995**, 51, (34), 9241-9284.
- (59) Fuhrhop, J. H.; Köning, J., *Macromolecular Assemblies and Membranes*. Royal Society of Chemistry: London, **1994**.
- (60) Hu, Q. S.; Sun, C. D.; Monaghan, C. E.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, (6), 927-930.
- (61) Werz, D. B.; Seeberger, P. H.; *Chem.-Eur. J.* **2005**, 11, (11), 3194-3206.
- (62) Roy, R.; *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, 15, (85), 291-310.
- (63) Ladmiral, V.; Melia, E.; Haddleton, D. M.; *Eur. Polym. J.* **2004**, 40, (3), 431-449.
- (64) Voit, B.; Appelhans, D.; *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, 211, (7), 727-735.
- (65) Spain, S. G.; Gibson, M. I.; Cameron, N. R.; *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2007**, 45, (11), 2059-2072.
- (66) Hawker, C. J.; Wooley, K. L.; Frechet, J. M. J.; *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **1993**, (12), 1287-1297.
- (67) Kubeil, M.; Stephan, H.; Pietzsch, H. J.; Geipel, G.; Appelhans, D.; Voit, B.; Hoffmann, J.; Brutschy, B.; Mironov, Y. V.; Brylev, K. A.; Fedorov, V. E.; *Chem.-Asian J.* **2010**, 5, (12), 2507-2514.
- (68) Höbel, S.; Loos, A.; Appelhans, D.; Schwarz, S.; Seidel, J.; Voit, B.; Aigner, A.; *J. Control. Release* **2011**, 149, (2), 146-158.

- (69) Appelhans, D.; Oertel, U.; Mazzeo, R.; Komber, H.; Hoffmann, J.; Weidner, S.; Brutschy, B.; Voit, B. I.; Ottaviani, M. F.; *Proc. R. Soc. A* **2010**, 466, 1489-1513.
- (70) Lee, C. C.; Frechet, J. M. J.; *Macromolecules* **2006**, 39, (2), 476-481.
- (71) Lubbert, A.; Nguyen, T. Q.; Sun, F.; Sheiko, S. S.; Klok, H. A.; *Macromolecules* **2005**, 38, (6), 2064-2071.
- (72) Laurino, P.; Kikkeri, R.; Azzouz, N.; Seeberger, P. H.; *Nano Lett.* **2011**, 11, (1), 73-78.
- (73) Zhao, H. C.; Sanda, F.; Masuda, T.; *Macromol. Chem. Phys.* **2006**, 207, (21), 1921-1926.
- (74) Caminade, A. M.; Laurent, R.; Majoral, J. P.; *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, 57, (15), 2130-2146.
- (75) Turrin, C.; Caminade, A. M., *Dendrimers*. John Wiley & Sons, Ltd., **2011**; 437-461.
- (76) Dykes, G. M.; Smith, D. K.; Seeley, G. J.; *Angew. Chem.* **2002**, 114, 3388-3391.
- (77) Ohsaki, M.; Okuda, T.; Wada, A.; Hirayama, T.; Niidome, T.; Aoyagi, H.; *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, (3), 510-517.
- (78) Yamagata, M.; Kawano, T.; Shiba, K.; Mori, T.; Katayama, Y.; Niidome, T.; *Bioorgan. Med. Chem.* **2007**, 15, (1), 526-532.
- (79) Benoit, H.; Grubisic, Z.; Rempp, P.; Decker, D.; Zilliox, J.; *J. Chim. Phys.* **1966**, 63, 1507.
- (80) Rayleigh, J. W.; *Phil. Mag.* **1899**, 47, (246).
- (81) Raman, C. V.; *Ind. J. Phys.* **1927**, 2, 1.
- (82) Debye, P.; *J. Chem. Phys.* **1959**, 31, 680.
- (83) Zimm, B. H.; Stockmayer, W. H.; *J. Chem. Phys.* **1949**, 17, (12), 1301-1314.
- (84) Wyatt, P. J.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, 272, (1), 1-40.
- (85) Wyatt, P. J.; *Instrum. Sci. Technol.* **1997**, 25, 1-18.
- (86) Burchard, W., *Laser Light Scattering in Biochemistry*. Royal Soc. Chemistry: Cambridge, **1992**; 3-22.
- (87) Burchard, W.; *Adv. Polym. Sci.* **1999**, 143, 113-194.
- (88) Isaacson, J.; Lubensky, T. C.; *J. Phys. Lett.* **1980**, 41, (19), 469-471.
- (89) Scherrenberg, R.; Coussens, B.; van Vliet, P.; Edouard, G.; Brackman, J.; de Brabander, E.; Mortensen, K.; *Macromolecules* **1998**, 31, (2), 456-461.
- (90) Rojas, C. C.; Wahlund, K.-G.; Bergenstahl, B.; Nilsson, L.; *Biomacromolecules* **2008**, 9, (6), 1684-1690.
- (91) Hakansson, A.; Ulmius, M.; Nilsson, L.; *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87, (1), 518-523.
- (92) Burchard, W.; *Adv. Polym. Sci.* **1983**, 48, 1-124.
- (93) Boye, S.; Komber, H.; Friedel, P.; Lederer, A.; *Polymer* **2010**, 51, (18), 4110-4120.
- (94) Soares, J. B. P.; Anantawaraskul, S.; *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* **2005**, 43, (13), 1557-1570.
- (95) Podzimek, S.; Vlcek, T.; Johann, C.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, 81, (7), 1588-1594.
- (96) Lederer, A.; Boye, S.; *LC-GC Ausgabe in Deutscher Sprache* **2008**, November/Dezember 2008, 24-28.
- (97) Zigon, M.; The, N. K.; Cheng, S. Y.; Grubisic-Gallot, Z.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, 20, (14), 2155-2167.
- (98) Parth, M.; Aust, N.; Lederer, K.; *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2003**, 8, (3), 175-186.
- (99) Gerber, J.; Radke, W.; *Polymer* **2005**, 46, (22), 9224-9229.
- (100) Khalyavina, A.; Schallausky, F.; Komber, H.; Al Samman, M.; Radke, W.; Lederer, A.; *Macromolecules* **2010**, 43, (7), 3268-3276.
- (101) Al Samman, M.; Radke, W.; Khalyavina, A.; Lederer, A.; *Macromolecules* **2010**, 43, (7), 3215-3220.
- (102) Ginzburg, A.; Macko, T.; Dolle, V.; Brull, R.; *Eur. Polym. J.* **2010**, 47, 319-329.
- (103) Vilaplana, F.; Gilbert, R. G.; *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, (28), 4434-4444.
- (104) Meunier, D. M.; Smith, P. B.; Baker, S. A.; *Macromolecules* **2005**, 38, (12), 5313-5320.
- (105) Edam, R.; Meunier, D. M.; Mes, E. P. C.; Van Damme, F. A.; Schoenmakers, P. J.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1201, (2), 208-214.

- (106) Edam, R.; Eeltink, S.; Vanhoutte, D. J. D.; Kok, W. T.; Schoenmakers, P. J.; *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, (48), 8638-8645.
- (107) Hutchings, L. R.; *Macromolecules* **2012**, 45, (14), 5621-5639.
- (108) Ahn, S.; Lee, H.; Lee, S.; Chang, T.; *Macromolecules* **2012**, 45, (8), 3550-3556.
- (109) Fernandez, C.; Rojas, C. C.; Nilsson, L.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, 49, (4), 458-465.
- (110) Makan, A. C.; Otte, T.; Pasch, H.; *Macromolecules* **2012**, 45, (12), 5247-5259.
- (111) Otte, T.; Pasch, H.; Macko, T.; Brull, R.; Stadler, F. J.; Kaschta, J.; Becker, F.; Buback, M.; *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, (27), 4257-4267.
- (112) Rolland-Sabaté, A.; Guilois, S.; Jaillais, B.; Colonna, P.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, (4), 1493-1505.
- (113) Schimpf, M. E.; Caldwell, K. D.; Giddings, J. C., *Field Flow Fractionation Handbook*. John Wiley & Sons: New York, **2000**; Vol. 10.
- (114) Giddings, J. C.; *Science* **1993**, 260, (5113), 1456-1465.
- (115) Giddings, J. C.; *Sep. Sci.* **1966**, 1, 123-125.
- (116) Giddings, J. C.; *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, (1), 81-85.
- (117) Hovingh, M. E.; Thompson, G. H.; Giddings, J. C.; *Anal. Chem.* **1970**, 42, (2), 195-203.
- (118) Myers, M. N.; Caldwell, K. D.; Giddings, J. C.; *Sep. Sci.* **1974**, 9, (1), 47-70.
- (119) Giddings, J. C.; Caldwell, K. D.; Myers, M. N.; *Macromolecules* **1976**, 9, (1), 106-112.
- (120) Schimpf, M. E.; Giddings, J. C.; *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* **1989**, 27, (6), 1317-1332.
- (121) Caldwell, K. D.; Giddings, J. C.; Myers, M. N.; Kesner, L. F.; *Science* **1972**, 176, (4032), 296.
- (122) Caldwell, K. D.; Gao, Y. S.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, (13), 1764-1772.
- (123) Giddings, J. C.; Yang, F. J. F.; Myers, M. N.; *Anal. Chem.* **1974**, 46, (13), 1917-1924.
- (124) Kirkland, J. J.; Yau, W. W.; Doerner, W. A.; Grant, J. W.; *Anal. Chem.* **1980**, 52, (12), 1944-1954.
- (125) Williams, P. S.; Levin, S.; Lenczycki, T.; Giddings, J. C.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **1992**, 31, (9), 2172-2181.
- (126) Jiang, Y.; Kummerow, A.; Hansen, M.; *J. Microcolumn Sep.* **1997**, 9, (4), 261-273.
- (127) Giddings, J. C.; Yang, F. J. F.; Myers, M. N.; *Science* **1976**, 193, (4259), 1244-1245.
- (128) Wahlund, K. G.; Winegarner, H. S.; Caldwell, K. D.; Giddings, J. C.; *Anal. Chem.* **1986**, 58, (3), 573-578.
- (129) Wahlund, K. G.; Giddings, J. C.; *Anal. Chem.* **1987**, 59, (9), 1332-1339.
- (130) Wahlund, K.-G.; Litzén, A.; *J. Chromatogr. A* **1989**, 461, 73-87.
- (131) Litzén, A.; Wahlund, K.-G.; *J. Chromatogr. A* **1989**, 476, 413-421.
- (132) Wijnhoven, J.; Koorn, J. P.; Poppe, H.; Kok, W. T.; *J. Chromatogr. A* **1995**, 699, (1-2), 119-129.
- (133) Zattoni, A.; Casolari, S.; Rambaldi, D. C.; Reschiglian, P.; *Curr. Anal. Chem.* **2007**, 3, (4), 310-323.
- (134) Roessner, D.; Kulicke, W. M.; *J. Chromatogr. A* **1994**, 687, (2), 249-258.
- (135) Otte, T.; Brull, R.; Macko, T.; Pasch, H.; Klein, T.; *J. Chromatogr. A* 1217, (5), 722-730.
- (136) Mes, E. P. C.; de Jonge, H.; Klein, T.; Welz, R. R.; Gillespie, D. T.; *J. Chromatogr. A* **2007**, 1154, (1-2), 319-330.
- (137) Qureshi, R. N.; Kaal, E.; Janssen, H. G.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. T.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, 706, (2), 361-366.
- (138) Knappe, P.; Boehmert, L.; Bienert, R.; Karmutzki, S.; Niemann, B.; Lampen, A.; Thunemann, A. F.; *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, (27), 4160-4166.
- (139) Hoque, M. E.; Khosravi, K.; Newman, K.; Metcalfe, C. D.; *J. Chromatogr. A* **2012**, 1233, 109-115.
- (140) Giddings, J. C.; Myers, M. N.; *Sep. Sci. Technol.* **1978**, 13, (8), 637-645.
- (141) Giddings, J. C.; *Sep. Sci. Technol.* **1983**, 18, (8), 765-773.
- (142) Nilsson, L.; Leeman, M.; Wahlund, K. G.; Bergenstahl, B.; *Biomacromolecules* **2006**, 7, (9), 2671-2679.
- (143) Williams, S. K. R.; Lee, D.; *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 1720-1732.

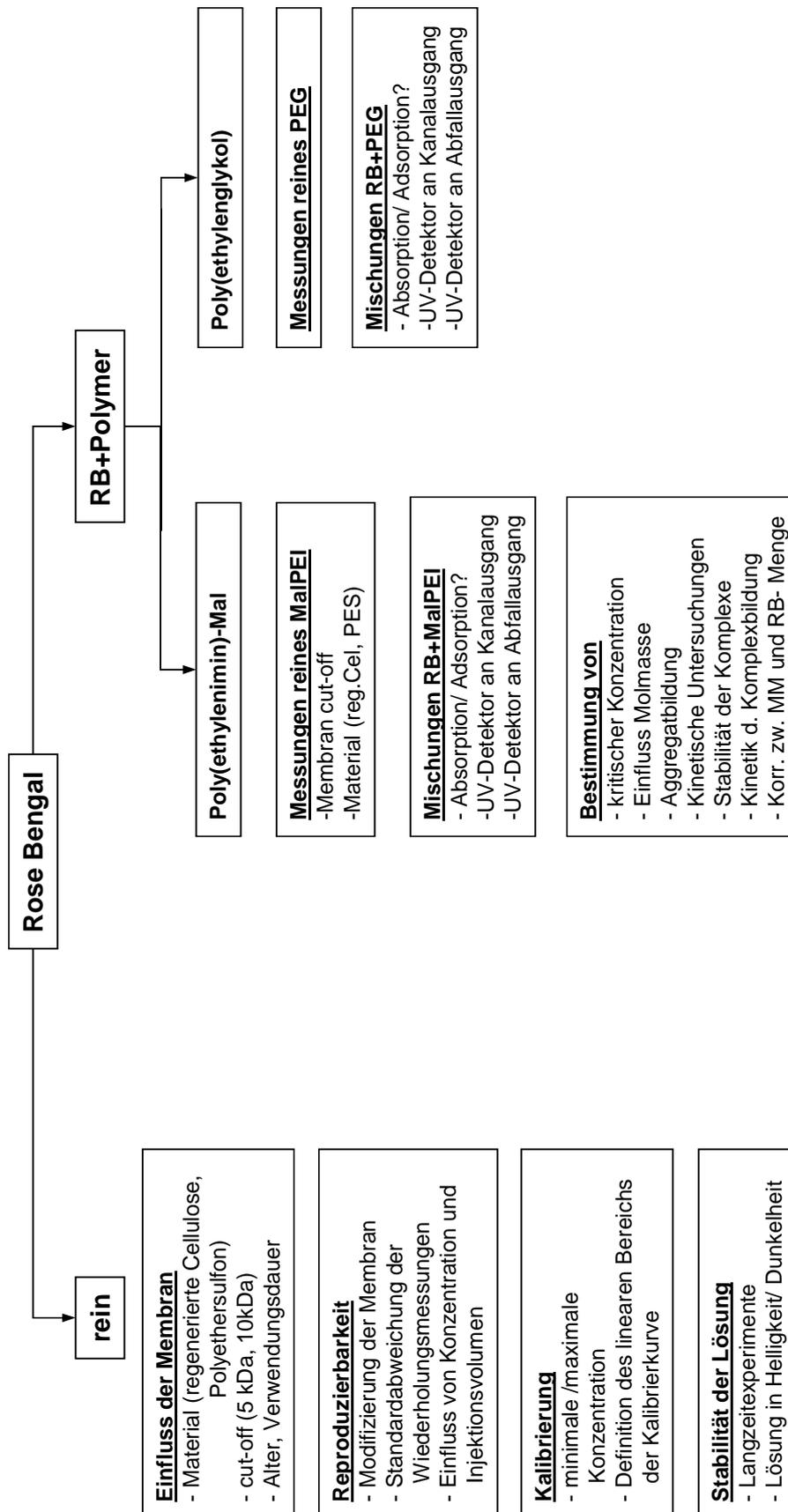
- (144) Messaud, F. A.; Sanderson, R. D.; Runyon, J. R.; Otte, T.; Pasch, H.; Williams, S. K. R.; *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34, (4), 351-368.
- (145) Thünemann, A. F.; Knappe, P.; Bienert, R.; Weidner, S.; *Anal. Methods* **2009**, 1, (3), 177-182.
- (146) Zattoni, A.; Rambaldi, D. C.; Reschiglian, P.; Melucci, M.; Krol, S.; Garcia, A. M. C.; Sanz-Medel, A.; Roessner, D.; Johann, C.; *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, (52), 9106-9112.
- (147) Thünemann, A. F.; Rolf, S.; Knappe, P.; Weidner, S.; *Anal. Chem.* **2009**, 81, (1), 296-301.
- (148) Schmidt, B.; Loeschner, K.; Hadrup, N.; Mortensen, A.; Sloth, J. J.; Koch, C. B.; Larsen, E. H.; *Anal. Chem.* **2011**, 83, (7), 2461-2468.
- (149) Calzolari, L.; Gilliland, D.; Garcia, C. P.; Rossi, F.; *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, (27), 4234-4239.
- (150) Bae, J.; Kim, W.; Rah, K.; Jung, E. C.; Lee, S.; *Microchem J.* **2012**, 104, 44-48.
- (151) Cardot, P. J. P.; Gerota, J.; Martin, M.; *J. Chromatogr.-Biomed. Appl.* **1991**, 568, (1), 93-103.
- (152) Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Roda, B.; Cinque, L.; Melucci, D.; Min, B. R.; Moon, M. H.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 985, (1-2), 519-529.
- (153) Roda, B.; Reschiglian, P.; Alviano, F.; Lanzoni, G.; Bagnara, G. P.; Ricci, F.; Buzzi, M.; Tazzari, P. L.; Pagliaro, P.; Michelini, E.; Roda, A.; *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, (52), 9081-9087.
- (154) Kim, K. H.; Kim, J. Y.; Kim, M. O.; Moon, M. H.; *J. Proteomics* **2012**, 75, (8), 2297-2305.
- (155) Rolland-Sabate, A.; Guilois, S.; Jaillais, B.; Colonna, P.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, (4), 1493-1505.
- (156) Wahlund, K. G.; Leeman, M.; Santacruz, S.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, (4), 1455-1465.
- (157) Juna, S.; Huber, A.; *Starch-Starke* **2012**, 64, (2), 87-96.
- (158) Chuan, Y. P.; Fan, Y. Y.; Lua, L.; Middelberg, A. P. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, 99, (6), 1425-1433.
- (159) Pease, L. F.; Lipin, D. I.; Tsai, D. H.; Zachariah, M. R.; Lua, L. H. L.; Tarlov, M. J.; Middelberg, A. P. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 102, (3), 845-855.
- (160) McEvoy, M.; Razinkov, V.; Wei, Z. P.; Casas-Finet, J. R.; Tous, G. I.; Schenerman, M. A.; *Biotechnol. Prog.* **2011**, 27, (2), 547-554.
- (161) Yohannes, G.; Jussila, M.; Hartonen, K.; Riekkola, M. L.; *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, (27), 4104-4116.
- (162) Lederer, A.; Voigt, D.; Clausnitzer, C.; Voit, B.; *J. Chromatogr. A* **2002**, 976, (1-2), 171-179.
- (163) Erber, M.; Boye, S.; Hartmann, T.; Voit, B. I.; Lederer, A.; *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2009**, 47, (19), 5158-5168.
- (164) Turner, S. R.; Voit, B. I.; Mourey, T. H.; *Macromolecules* **1993**, 26, (17), 4617-4623.
- (165) Schmaljohann, D., *Funktionalisierung von hochverzweigten Polyestern für den Einsatz als Beschichtung- und Blendmaterial*. Dissertation; Technische Universität: München, **1998**.
- (166) Saunders, G.; *LC-GC Ausgabe in deutscher Sprache* **September 2007**, S.53.
- (167) Boye, S.; Polikarpov, N.; Appelhans, D.; Lederer, A.; *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, (29), 4841-4849.
- (168) D'Emanuele, A.; Attwood, D.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, (15), 2147-2162.
- (169) Onclin, S.; Huskens, J.; Ravoo, B. J.; Reinhoudt, D. N.; *Small* **2005**, 1, (8-9), 852-857.
- (170) Xu, S. J.; Luo, Y.; Haag, R.; *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, 29, (2), 171-174.
- (171) Appelhans, D.; Komber, H.; Quadir, M. A.; Richter, S.; Schwarz, S.; van der Vlist, J.; Aigner, A.; Muller, M.; Loos, K.; Seidel, J.; Arndt, K. F.; Haag, R.; Voit, B.; *Biomacromolecules* **2009**, 10, (5), 1114-1124.

- (172) Namazi, H.; Adeli, M.; Zarnegar, Z.; Jafari, S.; Dadkhah, A.; Shukla, A.; *Colloid Polym. Sci.* **2007**, 285, (14), 1527-1533.
- (173) Quadir, M. A.; Radowski, M. R.; Kratz, F.; Licha, K.; Hauff, P.; Haag, R.; *J. Control. Release* **2008**, 132, (3), 289-294.
- (174) Zhao, L. B.; Cheng, Y. Y.; Hu, J. J.; Wu, Q. L.; Xu, T. W.; *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, (43), 14172-14179.
- (175) Helle, A.; Hirsjadvi, S.; Peltonen, L.; Hirvonen, J.; Wiedmer, S. K.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1178, (1-2), 248-255.
- (176) Haba, Y.; Harada, A.; Takagishi, T.; Kono, K.; *Polymer* **2005**, 46, (6), 1813-1820.
- (177) Kono, K.; Fukui, T.; Takagishi, T.; Sakurai, S.; Kojima, C.; *Polymer* **2008**, 49, (12), 2832-2838.
- (178) Giddings, J. C.; Yang, F. J.; Myers, M. N.; *J. Virol.* **1977**, 21, (1), 131-138.
- (179) Li, P.; Giddings, J. C.; *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, (8), 895-898.
- (180) Kramer, M.; Perignon, N.; Haag, R.; Marty, J. D.; Thomann, R.; Lauth-de Viguierie, N.; Mingotaud, C.; *Macromolecules* **2005**, 38, (20), 8308-8315.
- (181) Arfvidsson, C.; Wahlund, K. G.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 1011, (1-2), 99-109.
- (182) Polikarpov, N.; Appelhans, D.; Welzel, P.; Kaufmann, A.; Dhanapal, P.; Bellmann, C.; Voit, B.; *New J. Chem.* **2012**.
- (183) Polikarpov, N. Dissertation, TU Dresden, **2012**.
- (184) *Laser Light Scattering in Biochemistry*. Royal Society of Chemistry: **1992**.
- (185) Boye, S.; Appelhans, D.; Boyko, V.; Zschoche, S.; Komber, H.; Friedel, P.; Formanek, P.; Janke, A.; Voit, B.; Lederer, A.; *eingereicht bei Biomacromolecules* **2012**.
- (186) Grinshpun, V.; Rudin, A.; *J. Appl. Polym. Sci.* **1985**, 30, (6), 2413-2418.
- (187) Schimpf, M. E.; Wahlund, K. G.; *J. Microcolumn Sep.* **1997**, 9, (7), 535-543.
- (188) Alftren, J.; Penarrieta, J. M.; Bergenstahl, B.; Nilsson, L.; *Food Hydrocolloid* **2012**, 26, (1), 54-62.
- (189) Atkins, P. W., *Physikalische Chemie*. VCH: Weinheim, **1999**.
- (190) Majoinen, J.; Houbenov, N.; Olsewska, A.; Rosilo, H.; Seitsonen, J.; Aseyev, V.; Kontturi, E.; Österberg, M.; Lederer, A.; Appelhans, D.; Ikkala, O.; *J. Am. Chem. Soc.* Generation-Dependent Multivalent Binding of Dendronized Polymers to Native Cellulose Colloidal Rods, submitted.
- (191) Komber, H.; *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, 196, (2), 669-678.
- (192) Snir, Y.; Kamien, R. D.; *Science* **2005**, 307, (5712), 1067-1067.
- (193) Percec, V.; Schlueter, D.; Ronda, J. C.; Johansson, G.; Ungar, G.; Zhou, J. P.; *Macromolecules* **1996**, 29, (5), 1464-1472.
- (194) Rudick, J. G.; Percec, V.; *Accounts Chem. Res.* **2008**, 41, (12), 1641-1652.
- (195) Tsuwi, J.; Appelhans, D.; Zschoche, S.; Friedel, P.; Kremer, F.; *Macromolecules* **2004**, 37, (16), 6050-6054.
- (196) Burchard, W.; Muller, M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1980**, 2, (4), 225-234.
- (197) Ioelovitch, M.; *Acta Polym.* **1992**, 43, (2), 110-113.
- (198) Lee, E.; Kim, J. K.; Lee, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6375-6378.
- (199) Porod, G., *General Theory, in Small-Angle X-ray Scattering*. Academic Press: London, **1982**.
- (200) Casper, R. H.; Schulz, G. V.; *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1970**, 8, (6), 833-839.
- (201) Baker, C. A.; Williams, R. J. P.; *J. Chem. Soc.* **1956**, (JUL), 2352-2362.
- (202) Casper, R. H.; Schulz, G. V.; *Sep. Sci.* **1971**, 6, (2), 321-329.
- (203) Orofino, T. A.; Mickey, J. W.; *J. Chem. Phys.* **1963**, 38, (10), 2512-2520.
- (204) Greschner, G. S.; *Adv. Polym. Sci.* **1986**, 73-4, 1-61.
- (205) Greschner, G. S.; *Makromol. Chem.* **1980**, 181, (7), 1435-1458.
- (206) Greschner, G. S.; *Makromol. Chem.* **1981**, 182, (10), 2845-2861.
- (207) Greschner, G. S.; *Makromol. Chem.* **1982**, 183, (11), 2823-2833.
- (208) Greschner, G. S.; *Makromol. Chem.* **1985**, 186, (5), 1047-1057.
- (209) Greschner, G. S.; *Makromol. Chem.* **1979**, 180, (11), 2551-2566.

- (210) Lederer, A.; Elrehim, M. A.; Schallausky, F.; Voigt, D.; Voit, B.; *e-Polymers* **2006**.
- (211) Wolf, B. A.; *Macromol. Theory Simul.* **2010**, 19, (1), 36-43.
- (212) Bercea, M.; Eckelt, J.; Morariu, S.; Wolf, B. A.; *Macromolecules* **2009**, 42, (10), 3620-3626.
- (213) Samadi, F.; Eckelt, J.; Wolf, B. A.; Lopez-Villanueva, F. J.; Frey, H.; *Eur. Polym. J.* **2007**, 43, (10), 4236-4243.
- (214) Berry, G. C.; *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1971**, 9, (4), 687-715.
- (215) Candau, F.; Benoit, H.; Rempp, P.; *Macromolecules* **1972**, 5, (5), 627-635.
- (216) Cherayil, B. J.; Douglas, J. F.; Freed, K. F.; *J. Chem. Phys.* **1987**, 87, (5), 3089-3098.
- (217) DiMarzio, E. A.; Guttman, C. M.; *J. Physical. Chem.* **1989**, 93, (19), 7004-7009.
- (218) Douglas, J. F.; Roovers, J.; Freed, K. F.; *Macromolecules* **1990**, 23, (18), 4168-4180.
- (219) Meunier, J. C.; Vanleemp.R; *Makrom. Chem.* **1971**, 147, 191-211.
- (220) Zilliox, J. G.; *Makromol. Chem.* **1972**, 156, 121-141.
- (221) Okumoto, M.; Tasaka, Y.; Nakamura, Y.; Norisuye, T.; *Macromolecules* **1999**, 32, (22), 7430-7436.
- (222) Cowie, J. M. G.; Horta, A.; McEwen, I. J.; Prochazka, K.; *Polym. Bull.* **1979**, 1, (5), 329-335.
- (223) Orofino, T. A.; Wenger, F.; *J. Phys. Chem.* **1963**, 67, (3), 566-575.
- (224) Striegel, A. M.; Kirkland, J. J.; Yau, W. W.; Bly, D. D., *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography - Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. Second Edition; John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, **2009**.
- (225) Appelhans, D.; Stastny, V.; Komber, H.; Voigt, D.; Voit, B.; Lhotak, P.; Stibor, I.; *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, (38), 7145-7149.
- (226) Appelhans, D.; Smet, M.; Khimich, G.; Komber, H.; Voigt, D.; Lhotak, P.; Kuckling, D.; Voit, B.; *New J.Chem.* **2005**, 29, (11), 1386-1389.
- (227) Berry, G. C.; *J. Chem. Phys.* **1966**, 44, (12), 4550-&.
- (228) Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Ngyuen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A.; *J. Comp. Chem.* **1993**, 14, 1347-1363.
- (229) Rasmol, <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>, 01.08.2012.

Ergänzende Ergebnisse

Ergänzungen zu Kapitel 3.3: Versuchsplanung für Komplexierungsstudien mit RB



Schema A-1: Versuchsplan für Komplexierungsuntersuchungen

Ergebnisse zu Kapitel 3.4: Ergebnistabellen von AF4-LS und DLS bei verschiedenen pH-Werten

Tabelle A-1: Ergebnisse von AF4-LS und DLS bei verschiedenen pH-Werten

pH = 3,5

Generation	M_w (kg/mol)	M_w/M_n	R_g (nm)	R_h (nm)	ρ R_g/R_h	Aggregations- zahl ($M_w/M_{w,0}$)	ρ_{app} (g/nm ³)
MI-G0-Mal	14.400	9,6	200	57	3,51	17,3	30,1
MI-G1-Mal	1.980	3,3	83	141	0,59	1,2	0,3
MI-G2-Mal	4.810	6	154	65	2,37	1,5	6,8
MI-G3-Mal	85.900	-	221	135	1,64	12,9	13,5

pH = 5

Generation	M_w (kg/mol)	M_w/M_n	R_g (nm)	R_h (nm)	ρ R_g/R_h	Aggregations- zahl ($M_w/M_{w,0}$)	ρ_{app} (g/nm ³)
MI-G0-Mal	5.200	8,7	53	52	1,02	6,3	14,3
MI-G1-Mal	1.740	11,1	52,5	55	0,95	1,0	4,0
MI-G2-Mal	2.400	3,9	87,2	66	1,32	0,7	3,2
MI-G3-Mal	21.400	2,7	90	135	0,67	3,2	3,4

pH = 7

Generation	M_w (kg/mol)	M_w/M_n	R_g (nm)	R_h (nm)	ρ R_g/R_h	Aggregations- zahl ($M_w/M_{w,0}$)	ρ_{app} (g/nm ³)
MI-G0-Mal	2.620	5,8	63	50	1,26	3,2	8,1
MI-G1-Mal	1.320	5,6	56	37	1,51	0,8	10,1
MI-G2-Mal	1.730	4,8	66	66	1,00	0,5	2,3
MI-G3-Mal	27.000	10,3	144	119	1,21	4,1	6,2

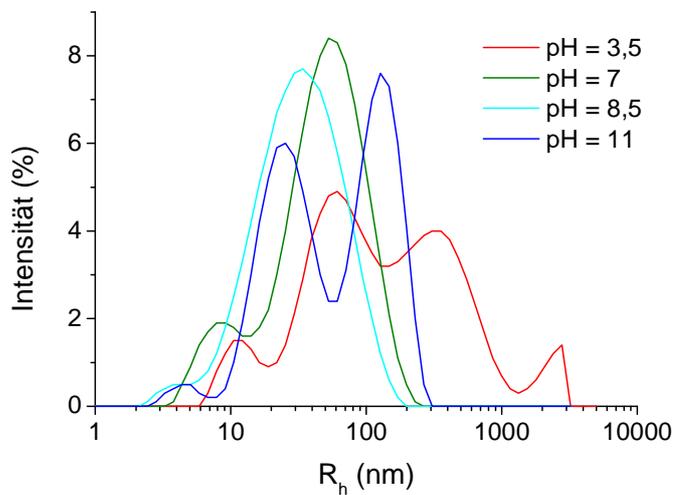
pH = 8,5

Generation	M_w (kg/mol)	M_w/M_n	R_g (nm)	R_h (nm)	ρ R_g/R_h	Aggregations- zahl ($M_w/M_{w,0}$)	ρ_{app} (g/nm ³)
MI-G0-Mal	6.470	3,5	103	52	1,98	7,8	17,8
MI-G1-Mal	1.560	6,7	62	47	1,32	0,9	5,8
MI-G2-Mal	1.660	2,3	68	67	1,01	0,5	2,1
MI-G3-Mal	20.600	4,2	120	76	1,58	3,1	18,1

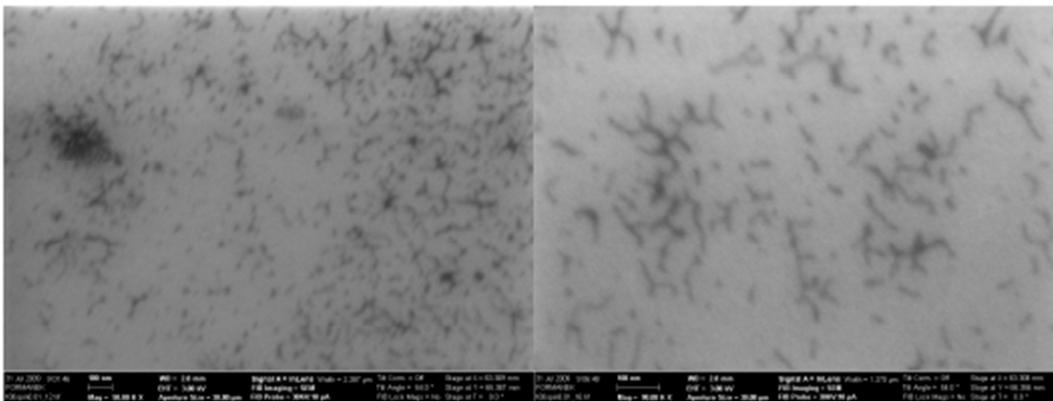
pH = 11

Generation	M_w (kg/mol)	M_w/M_n	R_g (nm)	R_h (nm)	ρ R_g/R_h	Aggregations- zahl ($M_w/M_{w,0}$)	ρ_{app} (g/nm ³)
MI-G0-Mal	8.900	15	127	52	2,44	10,7	24,5
MI-G1-Mal	1.600	6	46	55	0,84	0,9	3,7
MI-G2-Mal	3.610	4,6	77	45	1,71	1,0	15,3
MI-G3-Mal	59.800	6	145	74	1,96	9,0	57,1

Messkurven von DLS von MI-G1-Mal bei verschiedenen pH-Werten

**Abbildung A-1:** DLS-Kurven von MI-G1-Mal ($c = 1$ mg/ml) bei verschiedenen pH-Werten

pH = 3,5: $R_h = 141$ nm, pH = 7: $R_h = 37$ nm;
 pH = 8,5: $R_h = 47$ nm; pH = 11: $R_h = 55$ nm.

REM-Aufnahmen der MI-G3-Mal ($c = 0,01$ mg/ml):**Abbildung A-2:** REM-Aufnahme von MI-G3-Mal auf Si-Wafer (Rotationsbeschichtung)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. habil. Brigitte Voit (IPF, TUD) für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung und bei Frau Prof. Dr. Kathrin Harre (HTW Dresden) für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion im Rahmen eines kooperativen Promotionsverfahrens und die Betreuung bedanken.

Für die sehr herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und ihr Büro, die Betreuung und Unterstützung in jeglicher Hinsicht möchte ich Frau PD Dr. Albena Lederer meinen tiefsten Dank aussprechen.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Bernhard A. Wolf (Universität Mainz) für die Unterstützung mit seiner großen Erfahrung auf dem Gebiet der PDC sowie seinen Mitarbeitern für die herzliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis und Unterstützung bei den Trübungsmessungen während meiner Zeit in Mainz danken. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Wolfgang Radke (DKI Darmstadt) für die vielen, nützlichen und praktischen Tipps auf dem Gebiet der Chromatographie. Herrn Prof. Walther Burchard möchte ich ebenfalls auf diesem Weg für die Einführung in die Welt der Charakterisierung von Aggregaten und die anregenden Diskussionen danken.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Dietmar Appelhans möchte ich für die Synthese der Glykopolymere danken, hier insbesondere Dr. Viktor Boyko und Nikita Polikarpov.

Für die gute Zusammenarbeit, die täglichen, zahlreichen Diskussion, Korrekturen und Kaffeepausen gilt mein Dank Dr. Michael Erber, Dr. Anna Khalyavina, Ulrike Georgi, Christin Striegler und Eileen Schierz.

Für die zahlreichen Analysen möchte ich mich bedanken bei: Petra Treppe und Christina Harnisch (SEC und gute Labornachbarschaft), Anja Caspari (DLS und Zetapotenzial), Andreas Janke (AFM), Petr Formanek (REM und TEM), Michael Göbel (FIB-TEM), Kerstin Arnhold und Liane Häussler (TGA) Dr. Hartmut Komber (NMR-Interpretation) sowie Peter Friedel (MD-Simulation).

Den Studenten Linda Scharfenberg (für die Arbeiten mit der PDC), Josef Brandt (für die Zeichnungen), M. Rodig, T. Bünker und A. Kraut danke ich für gute Zusammenarbeit.

Zum Schluss möchte ich mich für die Unterstützung während meiner Promotion bei meinem Mann André, bei meiner Familie und all meinen Freunden bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre!

Publikationsliste

1. „Molmassenbestimmung von multifunktionellen Polymeren“ A. Lederer, S. Boye *LC-GC Ausgabe in deutscher Sprache* **November/Dezember 2008**, 24 - 28
2. “A convenient room temperature polycondensation toward hyperbranched AB(2)-type all-aromatic polyesters with phenol terminal groups” M. Erber, S. Boye, T. Hartmann, B. Voit, A. Lederer *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2009**, 47, 19, 5158 - 5168.
3. “An alternative route to dye–polymer complexation study using asymmetrical flow field-flow fractionation” S. Boye, N. Polikarpov, D. Appelhans, A. Lederer *J. Chrom. A* **2010**, 1217, 4841-4849
4. “Solution Properties Of Selectively Modified Hyperbranched Polyesters” S. Boye, H. Komber, P. Friedel, A. Lederer *Polymer* **2010**, 51, 4110-4120
6. “Separation of Linear and Star-Shaped Polystyrenes by Phase Distribution Chromatography” S. Boye, L. Scharfenberg, A. Lederer *J. Sep. Sci.* **2010**, 33, 22, 3584-3594
7. “AF4-MALLS for characterization of dendritic polymers and their complexation and aggregation behaviour“ A. Lederer, S. Boye, T. Jocks *Application Note of Wyatt Technologies*, **2010**
8. „Die Anwendung von AF4-MALLS zur Charakterisierung dendritischer Polymere sowie ihres Komplexierungs- und Aggregationsverhaltens“ A. Lederer, S. Boye, T. Jocks *Application Note of Wyatt Technologies (in german language)*, **2010**
9. „Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation for the investigation of intermolecular interactions of multifunctional polymers“ A. Lederer, S. Boye, LCGC Europe: Solutions for Separation Scientists **2012**, 24, 620-628
10. “pH Triggered Aggregate Shape of Different Generations Lysine-Dendronized Maleimide Copolymers with Maltose Shell” S. Boye, D. Appelhans, V. Boyko, S. Zschoche, H. Komber, P. Friedel, P. Formanek, A. Janke, B. Voit, A. Lederer, *Biomacromolecules*, **2012**, 13, 4222-4235

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.

Datum, Unterschrift

Die vorliegende Arbeit wurde unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Prof. Brigitte Voit und Frau Prof. Kathrin Harre im Rahmen eines kooperativen Promotionsverfahrens zwischen der HTW Dresden und der TU Dresden in der Zeit von Dezember 2007 und Oktober 2012 am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. angefertigt.

Bislang haben keine weiteren Promotionsverfahren stattgefunden.

Hiermit erkenne ich die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 23.02.2011 an.

Dresden, den 2013.