

Abschlussbericht
Screening geeigneter Monomer-
Vernetzer-Systeme und sondierende
Versuche zur molekularen Erkennung von
acylierten Sterylglycosiden (ASG)

Vorhaben 540/102

für
Union zur Förderung von Öl- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP)
Claire-Waldoff-Str. 7
10117 Berlin

bearbeitet von

Dr. Carmen Gruber-Traub, Annelie Hauser
Fraunhofer-Institut für Grenzflächen-
und Bioverfahrenstechnik IGB
Nobelstraße 12
70569 Stuttgart

Stuttgart,
01. Juni 2011

Inhalt

1	Aufgabenstellung	2
2	Material und Methoden	5
2.1	Molekular geprägte Polymere	5
2.2	Löslichkeitsversuche Stigmasterol	7
2.3	Monomer-Screening- ASG	10
2.3.1	Herstellung von Partikeln mittels Miniemulsionspolymerisation	11
2.4	Analytik	19
2.4.1	Aufreinigung der hergestellten Partikelsuspensionen	22
2.4.2	Adsorptionsversuche	23
3	Schlussfolgerungen	26
4	Ausblick	27
5	Eingesetzte Chemikalien	29
6	Glossar	30
7	Quellenangaben	31
8	Anhang	32

1 Aufgabenstellung

Gegenstand dieses Vorhabens, das von der AGQM initiiert wurde, war eine Machbarkeitsstudie zur Untersuchung der Einsatzmöglichkeit von nanostrukturierten molekular geprägten polymeren Adsorberpartikeln (MIPs) zur Abtrennung von Minorkomponenten (Wert- und/oder Störstoffe) aus Bioölen. Als beispielhafte Minorkomponente wurde ASG - hier am Beispiel von Stigmasteryl-6-O-palmitoyl-alpha-D-glucopyranosid - als Störstoff in Bioölen ausgewählt.

Acylierte Sterylglycoside (ASG) sind als Minorkomponenten in Pflanzenölen enthalten. Nach der Umesterung des Bioöls bei der Biodieselherstellung wird der Acylrest abgespalten, hierbei entstehen Sterylglycoside (SG). SGs sind im Biodiesel kurzzeitig löslich, kristallisieren allerdings langsam aus dem FAME aus; dieser Prozess lässt sich durch Abkühlung beschleunigen. Die ausgefallenen SGs können zu einer Verstopfung von Filtermaterialien führen.^[1] Die Abtrennung von ASG aus Bioölen ist daher zur Qualitätssteigerung des Biodiesels von Interesse.

Im Rahmen dieses Vorhabens wurden hierbei erste Vorarbeiten durchgeführt, um eine prinzipielle Machbarkeit der Einsatzmöglichkeiten polymerer Adsorberpartikel in Bioölen zu zeigen. Die weitere Optimierung der Materialherstellung und das Einbringen der molekular geprägten Materialien in technische Verfahren sollte dann im Anschluss an diese Machbarkeitsstudie, in einem öffentlich geförderten Projekt auch in Zusammenarbeit mit weiteren Fraunhofer Instituten - wie beispielsweise Fraunhofer UMSICHT - erfolgen.

Im ersten Schritte wurde ein Monomer-Vernetzer-Screening in Kombination mit der Herstellung der Adsorberpartikel durchgeführt. Hierbei sollte in erster Linie untersucht werden, ob prinzipiell Wechselwirkungen zwischen dem Zielmolekül und den Monomeren (polymerisierbare chemische Grundbausteine) und Vernetzern (polymerisierbare netzwerkaufbauende chemische Bausteine) vorhanden sind und eine Herstellung von molekular geprägten Nanopartikel möglich ist.

Zur Herstellung der molekular geprägten Nanopartikel wurde die Miniemulsionspolymerisation eingesetzt.^[2] Bei dieser Methode wird durch Polymerisation eines funktionellen Monomers mit einem Vernetzer um das Templat ein festes Polymernetzwerk, das mit dem Templat durch verschiedene Kräfte (z.B. Wasserstoffbrücken, Van der Waals und elektrostatische Kräfte) wechselwirkt, generiert. Nachdem das Templatmolekül aus dem Nanopartikel durch Lösungsmittelwechsel extrahiert wurde, bleiben im Polymernetzwerk Bindestellen zurück (künstliche Rezeptoren) die die Zielmoleküle SG oder ASG spezifisch adsorbieren (molekular Erkennen) (siehe Abbildung 1).

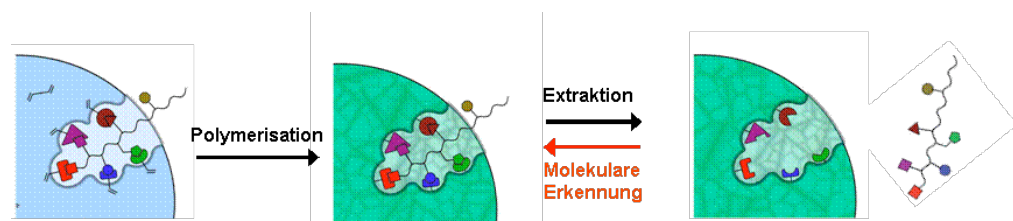


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Verfahrensprinzips zur chemischen Darstellung von selektiv Substanz-bindenden Nanopartikeln durch die molekulare Prägung von Nanopartikeln durch eine Templatpolymerisation von Nanotröpfchen zu sphärischen Partikeln. Nach der Polymerisation werden die Templates, welche die Nanostrukturierung

der Partikeloberfläche bewirken, extrahiert und es verbleiben Nanoporen im Polymernetzwerk, welche Selektivität für die Templatmoleküle aufweisen und diese aus Gemischen bevorzugt adsorbieren (nach Tovar et al.).^[3]

Der Mechanismus der molekularen Erkennung wurde bereits 1894 von Emil Fischer hypothetisch am Beispiel der spezifischen Bindung von Enzym und Substrat beschrieben.^[4] Das so genannte „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ beschreibt das Zusammenspiel von zwei oder mehreren komplementären Strukturen, die räumlich zueinander passen müssen, um eine bestimmte biologische Funktion erfüllen zu können.

Beim Verfahren des molekularen Prägens wird ein passendes Schloss gewissermaßen um einen vorhandenen Schlüssel, das Templatmolekül, herum aufgebaut (Abbildung 2).

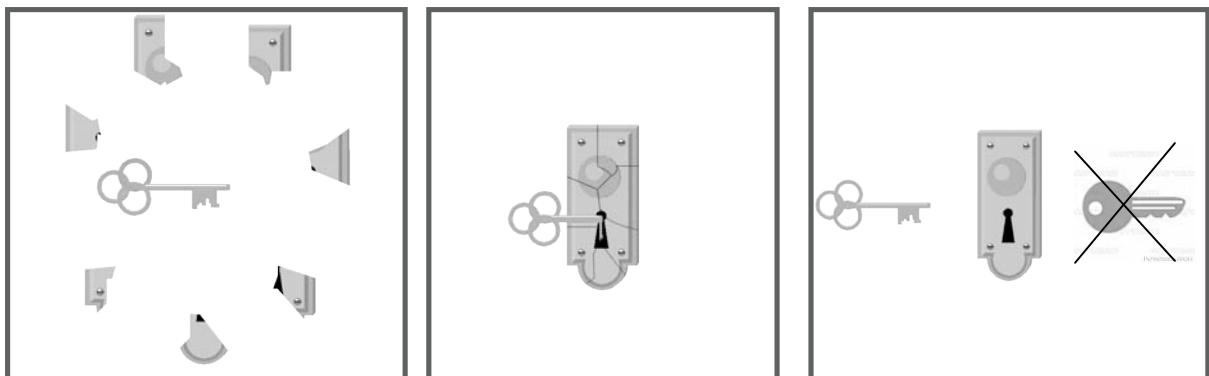


Abbildung 2: Schematische Darstellung des synthetischen Nachbaus des Fischer'schen Schlüssel-Schloss-Prinzips (Grafiken nach Ramstrom, O., *Molecular Imprinting Technology - A Way to Make Artificial Locks for Molecular Keys*, <http://www.molecular-imprinting.org/story/MIT.htm> (1996)).

Molekular geprägte Polymere sind synthetische Adsorbermaterialien, die eine hochselektive Anbindung bestimmter Ziel-Moleküle ermöglichen. Man kann sie also beispielsweise nutzen, um ein unerwünschtes Nebenprodukt aus einer Reaktionsmischung abzutrennen. Oder auch um Störstoffe, zum Beispiel unangenehm riechende Substanzen, zu maskieren: Diese Stoffe bleiben dann in einer Mischung wie zum Beispiel Anstrich-Farbe enthalten, sie werden aber durch ihre Bindung an die Polymeroberfläche daran gehindert in die Gasphase überzugehen und die Nase von in der Nähe befindlichen Lebewesen zu erreichen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekular geprägte Polymere

Molekular geprägte Polymere werden herkömmlich mittels Bulk-Polymerisation als Polymermonolithe hergestellt. Diese müssen dann durch Mahlen zerkleinert werden, um die Prägestellen freizulegen.

In der Monomer-Vernetzer-Templat Mischung erfolgt vor der Polymerisation durch verschiedene Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, π - π -Wechselwirkungen) eine bestimmte räumliche Anordnung der Monomere um die Templatmoleküle herum. Die Vernetzung der Monomere zu einem festen polymeren Material erfolgt dann in einem durch die Anwesenheit der Templatmoleküle beeinflussten Gefüge. Für diese Art des molekularen Prägens steht eine große Anzahl an kommerziell erhältlichen Monomeren und Vernetzern zur Verfügung. Eines der am häufigsten eingesetzten Monomere ist die

Methacrylsäure. Alternativ werden auch basische Monomere (beispielsweise 4-Vinylpyridin) und neutrale Monomere (beispielsweise Acrylamid) eingesetzt. Für jedes Templat muss das optimale Monomer bzw. die optimale Monomermischung ausgewählt werden, damit ein Maximum an molekülspezifischen Wechselwirkungen erzielt wird.^[5] Bei den mittels Bulk-Polymerisation hergestellten Materialien entsteht ein Polymerblock, der zunächst durch Mahlen zu einem Granulat zerkleinert wird. Die Bindestellen sind in dem Granulat herstellungsbedingt inhomogen verteilt und werden durch das Mahlen teilweise zerstört. Durch einen Siebvorgang wird anschließend die Größenverteilung des Granulats in gewissen Grenzen eingestellt. Die einzelnen Körnchen besitzen aber eine unregelmäßige und nicht kontrollierbare Form.

*Am Fraunhofer IGB werden zur direkten Synthese von molekular geprägten Adsorberpartikeln **Miniemulsionspolymerisationen** eingesetzt. Ein Vorteil dieser - vom IGB patentierten - Präge-Methode gegenüber konventionellen Ansätzen ist der einstufige Syntheseprozess und eine genau definierte Morphologie der Nanopartikel. Die geprägten Nanopartikel können nach der Synthese sofort in Suspension eingesetzt werden, Mahl- und Siebprozesse entfallen. Für spezielle Anwendungen können die Nanopartikel auch als selektive Schicht in Kompositmembranen eingebracht werden.*

*Bei komplexen Molekülen können auch einzelne Molekülbausteine als Templatmoleküle eingesetzt werden. Bei diesem sogenannten **Epitop-Ansatz** (s. Abbildung 3) wird nach der Extraktion der Templatmoleküle das gesamte Molekül adsorbiert.*

Molekulare

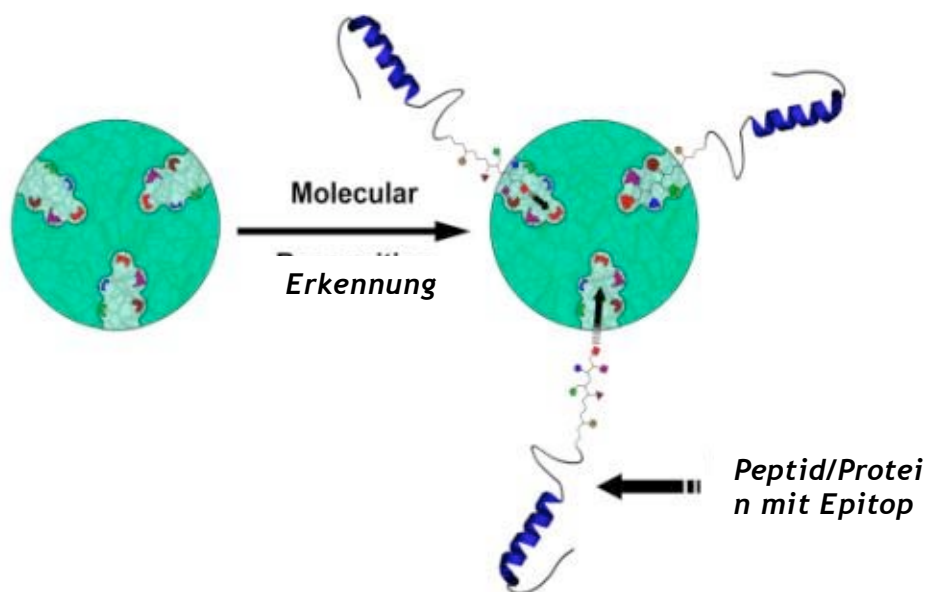


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Epitop-Ansatzes und dessen Einsatz bei der Herstellung molekular geprägter Nanopartikel.

Im Rahmen dieses Vorhabens wurde Stigmasterol (Abbildung 4) als passendes Epitop für die Herstellung der molekular geprägten Adsorberpartikel identifiziert.

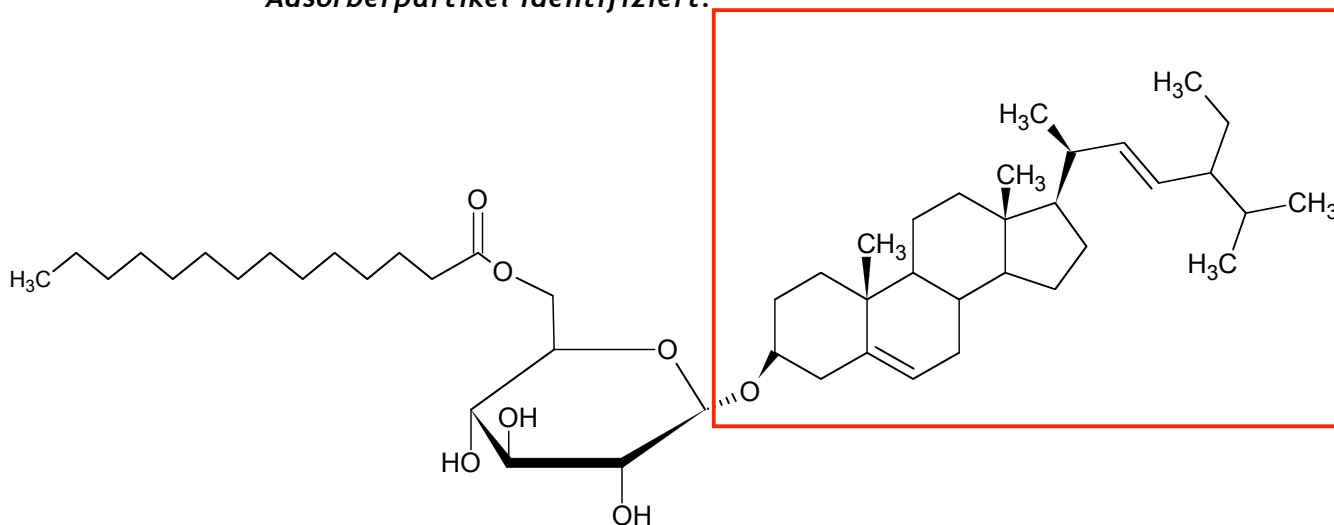


Abbildung 4: Strukturformel von ASG; rot-markiert ist das Stigmasterol-Epitop.

2.2 Löslichkeitsversuche Stigmasterol

Vor der Herstellung der molekular geprägten Partikel (MIPs) wurden Löslichkeitsversuche von Stigmasterol durchgeführt. Es wurde

untersucht, in welchen Lösungsmitteln das Templatmolekül Stigmasterol löslich ist und in welcher Menge Stigmasterol in den Polymersystemen gelöst werden kann. Die Menge an gelöstem Templat ist wichtig, um das Templat / Monomer Verhältnis optimal einstellen zu können. In den nachfolgenden Tabellen ist die maximale Löslichkeit von Stigmasterol aufgezeigt. In Tabelle 1 ist die Löslichkeit in den einzelnen Polymersystemen und in Tabelle 2 die Löslichkeit in verschiedenen Lösemitteln sowie in Lösemittel/Wasser-Mischungen dargestellt.

Tabelle 1: Maximale Löslichkeit von Stigmasterol in den eingesetzten Polymer-Mischungen.

<i>Polymersystem</i>	<i>Mischung /g</i>	<i>gelöste Stigmasterol-Menge /mg</i>
<i>MAA/EGDMA</i>	<i>MAA (0,2)</i>	<i>6,5</i>
	<i>EGDMA (1,8)</i>	
	<i>Hexadekan (0,083)</i>	
	<i>AMBN (0,04)</i>	
<i>TFMAA/EGDMA</i>	<i>TFMAA (0,3)</i>	<i>17,02</i>
	<i>EGDMA (1,7)</i>	
	<i>Hexadekan (0,083)</i>	
	<i>AMBN (0,04)</i>	
<i>MAA/DVB</i>	<i>MAA (0,127)</i>	<i>51,11</i>

<i>Polymersystem</i>	<i>Mischung /g</i>	<i>gelöste Stigmasterol-Menge /mg</i>
	<i>DVB (0,77)</i>	
	<i>Hexadekan (0,0375)</i>	
	<i>AIBN (0,0225)</i>	

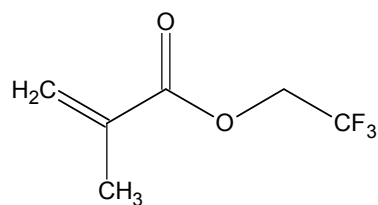
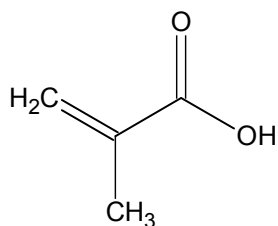
Tabelle 2: Untersuchung der Löslichkeit von Stigmasterol in verschiedenen Lösungsmitteln und in Lösungsmittel/Wasser- Mischungen.

<i>Lösemittel</i>	<i>Löslichkeit von Stigmasterol</i>	<i>Bemerkung</i>
<i>Acetonitril</i>	<i>nein</i>	<i>Flockt; trüb</i>
<i>Methanol</i>	<i>nein</i>	<i>Löst sich teilweise; Reste noch zu erkennen</i>
<i>Hexadekan</i>	<i>nein</i>	
<i>Wasser</i>	<i>nein</i>	<i>Nicht mischbar</i>
<i>Isopropanol</i>	<i>ja</i>	
<i>THF</i>	<i>ja</i>	

<i>Lösemittel</i>	<i>Löslichkeit von Stigmasterol</i>	<i>Bemerkung</i>
<i>Ethanol</i>	<i>ja</i>	
<i>THF/Wasser (50:50)</i>	<i>ja</i>	
<i>IsoP/Wasser (50:50)</i>	<i>nein</i>	
<i>IsoP/Wasser (80:50)</i>	<i>nein</i>	
<i>Ethanol/Wasser (50:50)</i>	<i>nein</i>	

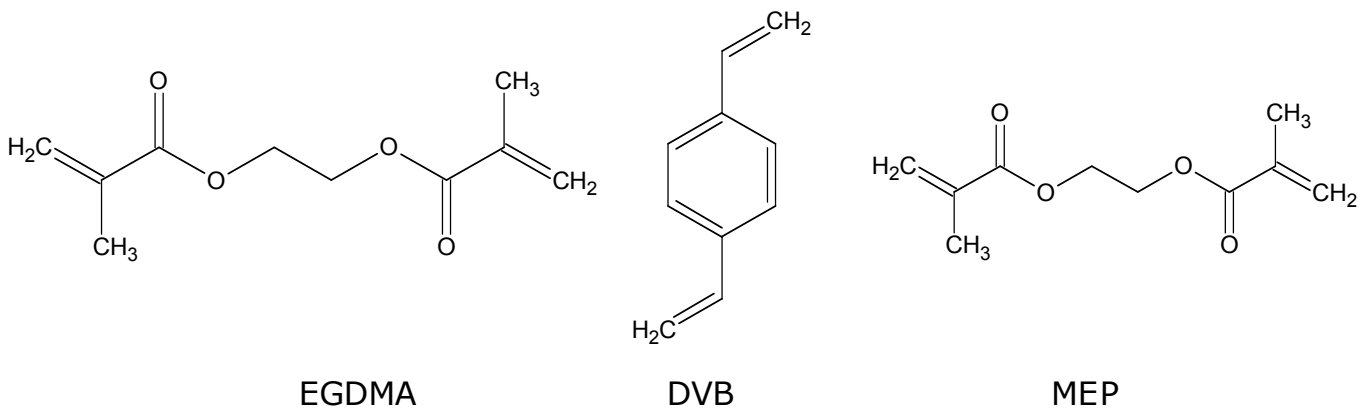
2.3 Monomer-Screening- ASG

Im ersten Schritt wurden verschiedene Monomer-Vernetzer-Systeme ausgewählt. Als Monomere (Abbildung 5) wurden Methacrylsäure (MAA) und 2-(Trifluoroethylmethyl)methacrylsäure (TFMAA) und als Vernetzer (Abbildung 6) Ethylenglykoldimethacrylat (EGDMA), Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (MEP) und Divinylbenzen (DVB) ausgewählt. Als Templatmolekül wurde Stigmasterol eingesetzt, da dieses ein wesentlicher Bestandteil des ASGs und SGs ist und im Rahmen dieses Projektes dem Fraunhofer IGB zur Verfügung stand. Im Folgenden ist der Herstellung der Partikel beschrieben.



TFMAA

MAA

Abbildung 5: Strukturformeln der eingesetzten Monomere.**Abbildung 6: Strukturformeln der eingesetzten Vernetzer.**

2.3.1 Herstellung von Partikeln mittels Miniemulsionspolymerisation

Miniemulsionen sind Emulsionen von Monomertröpfchen mit einer Größe von 50 nm - 500 nm in Wasser. Diese Monomertröpfchengröße kann durch Behandlung mit Ultraschall oder Hochdruck erreicht werden. Dadurch entsteht ein Gleichgewicht zwischen Koaleszenz und Spaltung der Monomertropfen.

Als Stabilisatoren werden sowohl Emulgatoren als auch hydrophobe Hilfsstoffe eingesetzt. Besitzen diese hydrophoben Hilfsstoffe zwei Funktionen werden sie als Co-Stabilisatoren bezeichnet. Sie können zum Einen in Kombination mit dem Emulgator arbeiten, um Tröpfchen vor Koaleszenz zu schützen, indem sich beide an die Öl-Wasser-Grenzfläche anlagern und zum Anderen können sie die Ostwald-Reifung unterdrücken, indem ein osmotischer Druck im Tröpfchen aufgebaut und somit die Diffusion von Monomeren von den kleineren zu den größeren Tropfen, wie in Abbildung 7 dargestellt,

verhindert wird. Besitzt ein hydrophobes Hilfsmittel nur letztere Funktion wird diese Substanz als hydrophobes Agens bezeichnet. Die wichtigste Anforderung, die an einen Co-Stabilisator bzw. an ein hydrophobes Agens gestellt wird, ist eine geringe Wasserlöslichkeit.^[6]

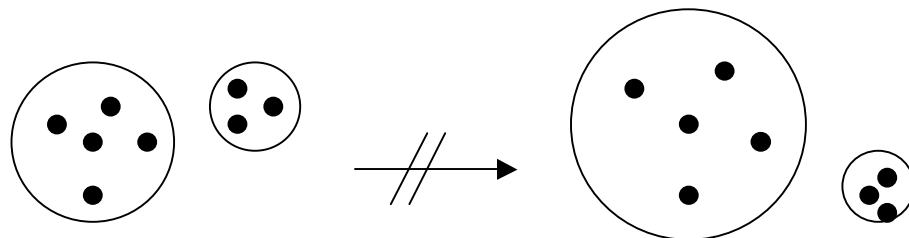


Abbildung 7: Unterdrückung der Ostwald-Reifung während der Miniemulsionspolymerisation durch Einsatz eines hydrophoben Agens.

Bei der Miniemulsionspolymerisation entspricht die Monomertröpfchengröße vor der Polymerisation nahezu der Partikelgröße nach der Polymerisation, was einem 1:1 Kopierprozess entspricht. Dieser Kopierprozess kann durch eine Kombination von Oberflächenspannungsmessung und Konduktometrie nachgewiesen werden. Das Verfahren der Miniemulsionspolymerisation ist in der unteren Abbildung 8 schematisch dargestellt.

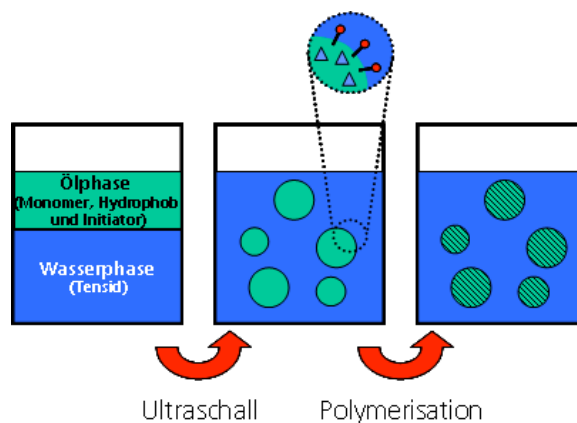


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Miniemulsionspolymerisation.

Die zugegebene Tensidmenge ist bei der Miniemulsionspolymerisation so gering, dass die CMC nicht überschritten und damit die Mizellaggregation unterbunden wird.

Im Folgenden werden die Synthesen beschrieben. Die Homogenisierung zur Herstellung der Miniemulsion erfolgte mittels Ultraschalleintrag. Es wurden verschiedene Monomere und Vernetzer untersucht, sowie das Monomer- Templat -Verhältnis variiert. Hierbei kam es auf die Löslichkeit des Templates im jeweiligen System an.

Herstellungsvorschrift 1:

Die Wasserphase, bestehend aus in Wasser (16,7 mL) gelöstem SDS (24 mg), wurde vorbereitet. Die Ölphase wurde separat hergestellt. Hierzu wurde der Initiator AMBN (0,208 mmol), der Vernetzer, das Monomer und das Templat in Hexadekan (0,083 g) gelöst und solange gerührt, bis alles gelöst war. Die Ölphase wurde der Wasserphase zugegeben und eine Stunde gerührt. Dann wurde die Mischung zwei Minuten bei einer Amplitude von 60% mittels Ultraschallfingers homogenisiert. Danach wurde die Emulsion bei 500 rpm auf 80 °C erhitzt und 4 h bei dieser Temperatur polymerisiert. Anschließend wurden die Partikel zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

In der Tabelle 3 sind die eingesetzten Mengen an Monomer, Vernetzer und gegebenenfalls des Templatmoleküls aufgeführt. NIP bezeichnet hierbei die ungeprägten Polymerpartikel, die ohne

Templatmolekül hergestellt wurden. MIP bezeichnet die molekular geprägten Polymerpartikel, die in Gegenwart des Templatmoleküls Stigmasterol hergestellt wurden. Der Einsatz des Vernetzers EGDMA ermöglichte sowohl bei MAA als auch bei TFMAA die Herstellung von partikulären Systemen. Die Monomer-Vernetzer-Systeme MAA/EGDMA und TFMAA konnten somit erfolgreich polymerisiert werden. Unter Einsatz des MEP als Vernetzer konnten jedoch keine Partikel hergestellt werden. Die Polymerisation war somit nicht erfolgreich. MEP ist als Vernetzer für die Herstellung partikulärer molekular geprägter Materialien nicht geeignet.

Tabelle 3: Eingesetzte Mengen an Monomer, Vernetzer und Acrylsäure bei der Partikelherstellung nach Herstellungsvorschrift 1. STN steht für die Polymerisation eines NIPs (ohne Templat) und STI für die Herstellung eines MIPs (mit Templat).

<i>Ansatz</i>	<i>Templat /g</i>	<i>Monomer /g</i>	<i>Vernetzer /g</i>	<i>Bemerkung</i>
<i>STN1 (NIP)</i>	–	<i>MAA /0,2</i>	<i>EGDMA /1,8</i>	–
<i>STI3 (MIP)</i>	<i>Stigmasterol /0,0196</i>	<i>MAA /0,2</i>	<i>EGDMA /1,8</i>	–
<i>STN4 (NIP)</i>	–	<i>TFMAA /0,3</i>	<i>EGDMA /1,7</i>	–
<i>STN5 (NIP)</i>	–	<i>TFMAA /0,196</i>	<i>MEP /1,8</i>	<i>Keine Polymerisation</i>

<i>Ansatz</i>	<i>Templat /g</i>	<i>Monomer /g</i>	<i>Vernetzer /g</i>	<i>Bemerkung</i>
<i>ST16 (MIP)</i>	<i>Stigmasterol /0,017</i>	<i>TFMAA /0,3</i>	<i>EGDMA /1,7</i>	<i>-</i>

Von den erfolgreich synthetisierten Partikelsystemen wurden rasterelektronenmikroskopische Bilder (REM) aufgenommen. In Abbildung 9 sind die Aufnahmen der ungeprägten (links) und der geprägten Partikel (rechts) gegenübergestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass erfolgreich partikuläre Systeme im gewünschten Größenbereich hergestellt werden konnten.

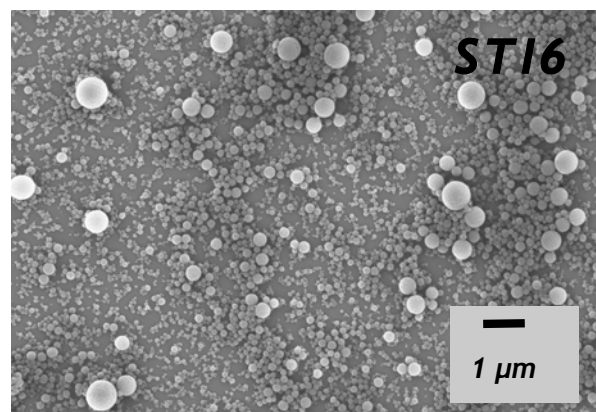
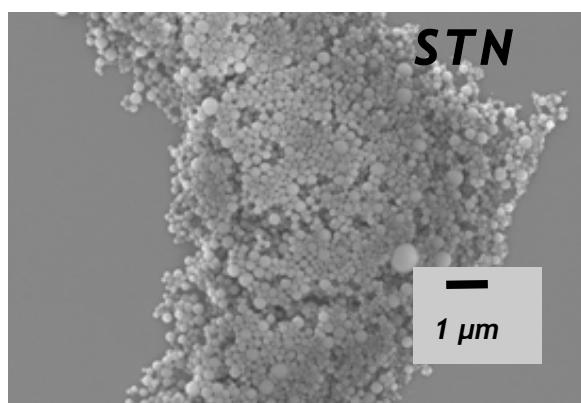
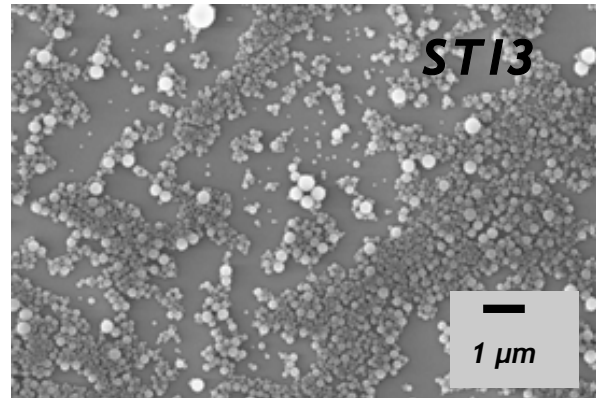
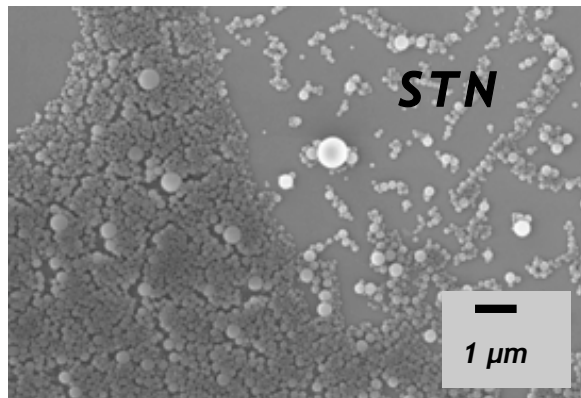


Abbildung 9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Miniemulsionspolymerisate (STN1, STI3 und STN4).

Für die Herstellung der Partikelsysteme mit Divinylbenzol als Vernetzer wurde die Herstellungsvorschrift angepasst. Es wurde hierbei der Initiator AIBN eingesetzt. Im Folgenden wird die Herstellung der Partikel beschrieben.

Herstellungsvorschrift 2:

Die Wasserphase, bestehend aus in Wasser (15 mL) gelöstem SDS (21,6 mg), wurde vorbereitet. Die Ölphase wurde separat hergestellt. Hierzu wurde der Initiator AIBN (0,276 mmol), der Vernetzer, das Monomer und das Templat in Hexadekan (0,075 g) gelöst und solange gerührt bis alles gelöst war. Die Ölphase wurde der Wasserphase zugegeben und eine Stunde gerührt. Dann wurde die Mischung zwei Minuten bei einer Amplitude von 60 % mittels Ultraschallfingers homogenisiert. Danach wurde die Emulsion bei 500 rpm auf 80 °C erhitzt und 4 h bei dieser Temperatur polymerisiert.

In der Tabelle 4 sind die bei der Herstellungsvorschrift 2 eingesetzten Mengen an Monomer und Vernetzer dargestellt. Bei der Synthese unter Einsatz mit DVB als Vernetzer sind partikuläre Systeme (s. Abbildung 10) entstanden. Die Partikel sind jedoch - bis auf wenige Ausnahmen - sehr klein. Eine Abtrennung der Partikel war auch durch mehrmalige Zentrifugation nicht möglich. Eventuell könnten die

Partikel mit einem entsprechenden Filter abgetrennt werden, dieser konnte jedoch im Rahmen dieses Vorhabens aufgrund von Lieferschwierigkeiten nicht eingesetzt werden.

Tabelle 4: Eingesetzte Mengen an Monomer und Vernetzer bei der Partikelherstellung nach Herstellungsvorschrift 2. STN steht für die Polymerisation eines NIPs (ohne Templat) und STI für die Herstellung eines MIPs (mit Templat).

Ansatz	Templat /g	Monomer /g	Vernetzer /g	Bemerkung
STN7 (NIP)	–	MAA /0,255	DVB /1,54	Partikel lassen sich nicht abzentrifugieren
STI8 (MIP)	Stigmasterol /0,102	MAA /0,255	DVB /1,54	Partikel lassen sich nicht abzentrifugieren

In Abbildung 10 ist die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der ungeprägten Partikel, die mit DVB als Vernetzer hergestellt wurden, dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die sehr kleinen Partikelgrößen.

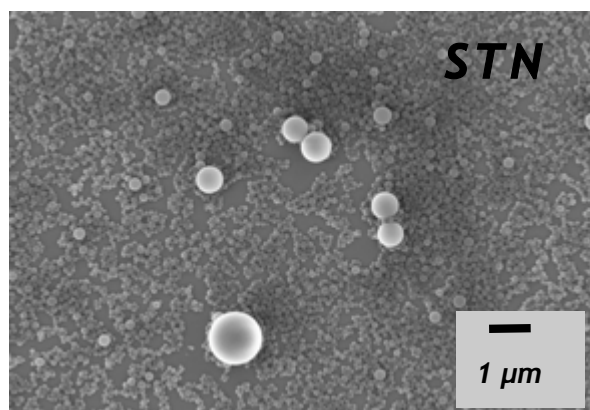


Abbildung 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Miniemulsionspolymerisates (STN7).

In der Tabelle 5 sind die einzelnen, im Rahmen dieses Vorhabens durchgeführten, Versuchsansätze aufgeführt.

Tabelle 5: Übersichtstabelle der einzelnen Versuchsansätze mit den Monomer:Vernetzer, Templat:Monomer- Verhältnissen und der Partikelgröße.

Ansatz	STN1	STI3	STN4	STI6	STN7	STI8
Monomer	MAA	MAA	TFMAA	TFMAA	MAA	MAA
Vernetzer	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA	DVB	DVB
Templat	-	Stigmasterol	-	Stigmasterol	-	Stigmasterol
Monomer:Vernetzer Verhältnis	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
Templat:Monomer	-	1:147		1:54	-	1:12

Ansatz	STN1	STI3	STN4	STI6	STN7	STI8
Verhältnis						
Partikelgröße / nm	163,7 ±1,6	163,9 ±1,4	183,3 ±1,3	151,1	133,9	-
Pdl	0,079	0,086	0,084	-	0,054	-
Umsatz / %	-	-	76,2	89,2	77,9	77,8

2.4 Analytik

Zur Untersuchung der spezifischen bzw. unspezifischen Adsorption von Stigmasterol an die im Rahmen dieses Vorhabens entwickelten polymeren Adsorberpartikel (NIPs bzw. MIPs) wurde eine geeignete Methode für die Analytik von Stigmasterol entwickelt. Es wurden sowohl die HPLC-Chromatographie als auch die LC-MS-Methode eingesetzt. Zum Nachweis des Stigmasterol mittels der HPLC-Chromatographie wurden vorab Löslichkeitsversuche in verschiedenen Lösemitteln durchgeführt (s. Kapitel 2.2).

Diese Löslichkeitsversuche zeigten, dass Stigmasterol in den Lösemitteln Isopropanol und THF löslich ist. Daher wurden die HPLC-Messungen in Isopropanol und THF als Laufmittel durchgeführt. Die Versuche bezüglich der HPLC-Analytik sind im Anhang aufgeführt. Bei den dort aufgeführten Vorversuchen wurde dem Stigmasterol ein Signal zugeordnet, das nur in dieser THF-Charge auftrat. Bei der Wiederholung der Versuche zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurde eine andere THF-Charge eingesetzt.

Bei der Messung der HPLC-Standards, die mit dieser THF-Charge hergestellt wurden, konnte kein Stigmasterol-Signal nachgewiesen werden. Als Kontrollversuch wurde reines THF, welches als Eluent,

eingesetzt wurde, THF aus welchem neue Standards hergestellt wurden, und ein neu hergestellte Standard (250 µg/mL) gemessen und mit den Ergebnissen aus den ersten HPLC-Messungen verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt.

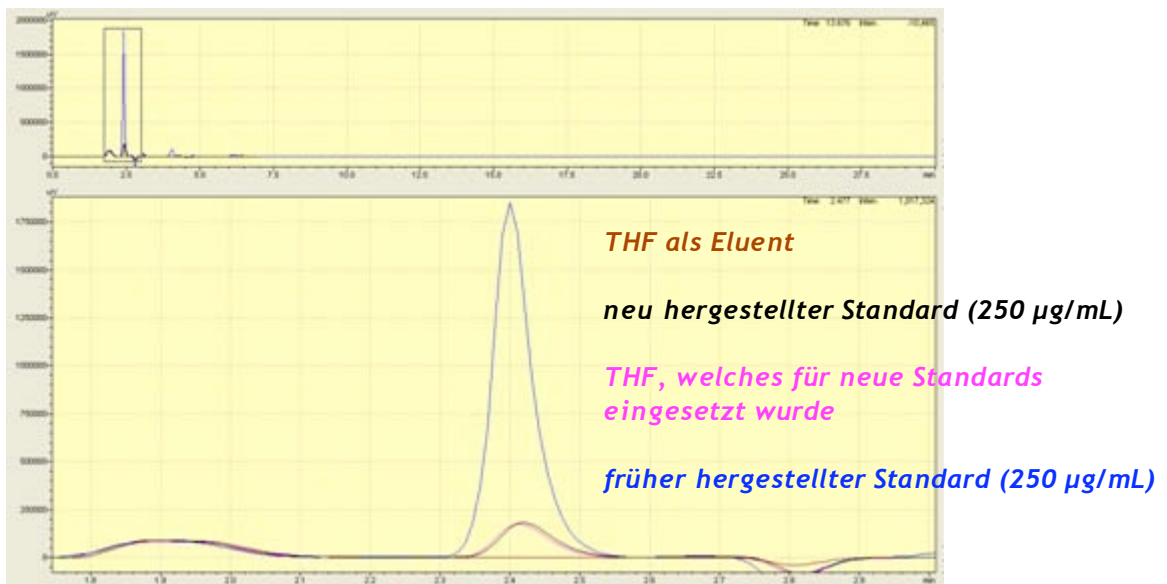


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm von Stigmasterol (Standards mit unterschiedlichen THFs hergestellt) und THF (unterschiedliche Chargen) mittels HPLC-Methode 3 bestimmt.

Aus der Abbildung geht hervor, dass das THF, welches als Eluent eingesetzt wurde, keinen Peak bei der Retentionszeit von Stigmasterol (ca. 2,3 min - 2,56 min) aufweist. Während bei dem THF, welches für den neuen Standard eingesetzt wurde, ein kleiner Peak erscheint. Der neu hergestellte Standard weist genau den gleichen Peak auf.

Bei dem Standard der mit einer früheren THF-Charge hergestellt wurde und mit dem im ersten Schritt die die Methode entwickelt wurde, erscheint bei der angeblichen Retentionszeit von Stigmasterol ein deutlicher Peak, der für den Stigmasterol-Peak

gehalten wurde, da er nur bei Proben mit Stigmasterol aufgetreten ist.

Aufgrund der in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse wird vermutet, dass der Peak eine Verunreinigung oder Bestandteil des THF sein muss und sich nicht um den Stigmasterol-Peak handelt. Das Templat kann daher mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Da das Stigmasterol nicht mittels HPLC-Methode nachgewiesen werden konnte, zum Nachweis von Stigmasterol wurde eine neue Methode entwickelt. Hierzu wurde die LC/MS- Methode ausgewählt. Mit dieser Methode wurden die Proben der Adsorptionsversuche in Kapitel 2.4.2 bestimmt.

LC/MS-Methode 1

LC/MS-System:

Massenspektrometer	LCQ Deca; Thermo Scientific
HPLC	Surveyor; Thermo Scientific
Säule:	Phenomenex Luna C18(2), 150 mm x 2,0 mm, 3 µm
Eluent:	100 % Methanol
Fluss:	200 µL/min
Injektionsvolumen:	20 µL

2.4.1 Aufreinigung der hergestellten Partikelsuspensionen

Die hergestellten Partikelsuspensionen wurden in verschiedenen Waschschrinen aufgereinigt und gegebenenfalls das gebundene Templat extrahiert. Die Aufreinigung der Partikel ohne Templat (NIPs) erfolgte durch zweimaliges Waschen mit Wasser durch Zentrifugation (15.000 rpm; 25 min) und einer anschließenden Dialyse.

Bei den Partikeln, die mit dem Templatmolekül Stigmasterol hergestellt wurden (MIPs), wurde für die folgenden Adsorptionsversuche das gebundene Stigmasterol extrahiert, um die Bindungsstellen wieder frei zugänglich für die Adsorption von Stigmasterol zu machen. Dafür wurden die Partikel mindestens sechs Mal mit THF, durch Zentrifugation (15.000 rpm; 20 min) gewaschen und anschließend in Wasser überführt. Nach der Entfernung des Stigmasterols sind die Bindungsstellen wieder frei zugänglich und es kann untersucht werden ob Stigmasterol spezifisch durch die hergestellten MIPs gebunden werden kann.

2.4.2 Adsorptionsversuche

Nach der vollständigen Aufreinigung der Partikelsuspension wurden die Adsorptionsversuche durchgeführt. Die Adsorptionsversuche wurden in verschiedenen Inkubationsmedien, wie Isopropanol und THF:Wasser (50:50), durchgeführt. Die Polymermenge wurde nicht variiert. Untersucht wurden sowohl NIPs, um die unspezifische Adsorption von Stigmasterol zu bestimmen, als auch MIPs, um die spezifische Adsorption, zu untersuchen.

Bestimmungsmethode 1

Für die Adsorptionsversuche wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Partikelsuspension (10 mg NIPs und MIPs) wurde zentrifugiert und anschließend der Überstand vollständig entfernt. Anschließend wurde das Pellet im gewünschten Adsorptionsmedium (THF/Wasser 50:50 und Isopropanol) resuspendiert. Das Templat (100 µg/mL) wurde zu der Partikelsuspension zugegeben und bei 10 °C, zwei Stunden bei 1.200 rpm geschüttelt. Nach der Inkubation der Partikel mit dem Templat wurde nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels der LC/MS-Methode untersucht.

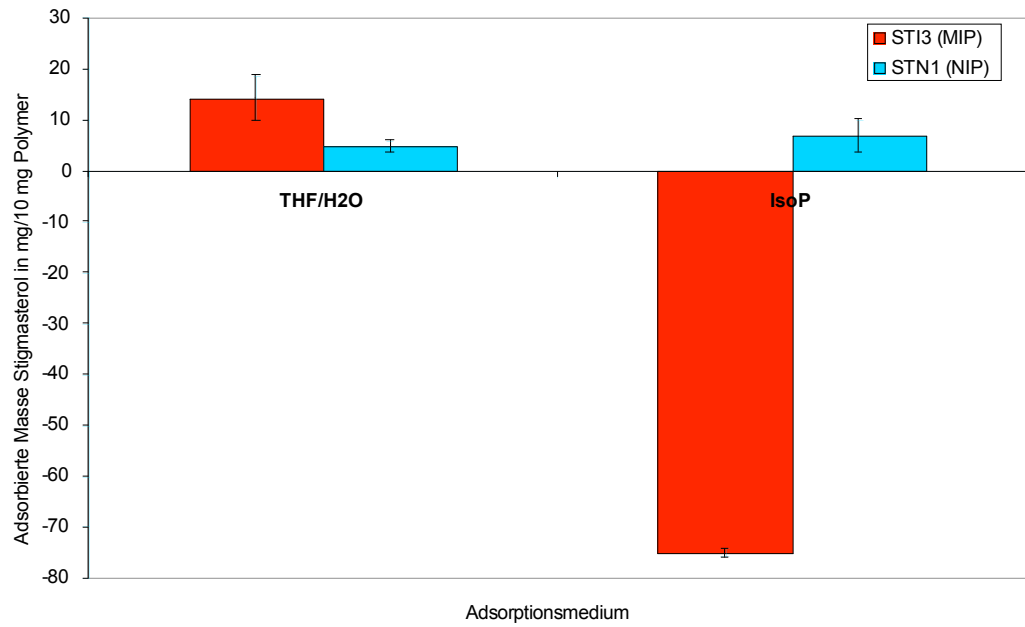


Abbildung 12: Ergebnisse der Adsorptionsversuche von STI3 (MIP) und STN1 (NIP) und Stigmasterol, in den Inkubationsmedien THF/Wasser (50:50) und Isopropanol.

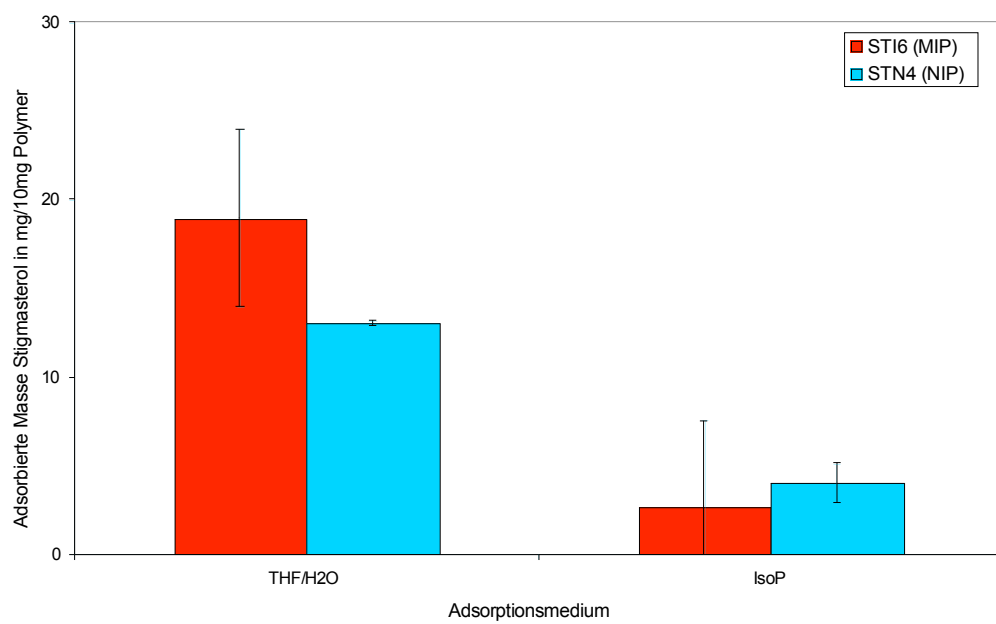


Abbildung 13: Ergebnisse der Adsorptionsversuche von STI6 (MIP) und STN4 (NIP), in den Inkubationsmedien THF/Wasser (50:50) und Isopropanol.

In Abbildung 12 und Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Adsorptionsversuche dargestellt. Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte eine spezifische Bindung von Stigmasterol an das MIP (STI3) nachgewiesen werden, allerdings nur im Inkubationsmedium THF/Wasser (50:50). In Isopropanol konnte keine spezifische Adsorption nachgewiesen werden. In beiden Inkubationsmedien konnte aber eine unspezifische Bindung (STN1) von Stigmasterol an die Polymerpartikel nachgewiesen werden.

Bei den in Abbildung 13 dargestellten Ergebnissen konnte ebenfalls eine spezifische Bindung von Stigmasterol an das MIP (STI6) im Inkubationsmedium THF/Wasser (50:50) nachgewiesen werden. In Isopropanol konnte auch hier keine spezifische Adsorption nachgewiesen werden. In beiden Inkubationsmedien konnte wiederum eine unspezifische Bindung (STN4) nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte sein, dass die Polymersysteme auf Grund ihrer Edukte MAA, TFMAA und EGDMA leicht hydrophob sind. Daher ist die Affinität des Templats zum Polymer deutlich größer als zum Inkubationsmedium (THF/Wasser), wodurch mehr Templat an die Partikel gebunden wird. Bei reinem Lösemittel können Wechselwirkungen zwischen Templat und Lösemittel auftreten, wodurch das Templat auch eine Affinität zum Lösemittel besitzt und dadurch weniger Templat an die Partikel gebunden wird.

Vergleicht man die beiden Polymersysteme miteinander, wird deutlich, dass bei dem Polymersystem TFMAA/EGDMA, in Abbildung 13 dargestellt, etwas mehr Templat, unspezifisch und spezifisch, gebunden wurde als bei dem Polymersystem MAA/EGDMA. Dies könnte

am Templat:Monomer-Verhältnis liegen, das beim TFMAA/EGDMA-System bei 1:54 und beim MAA/EGDMA- System bei 1:147 liegt. Aufgrund dieser Verhältnisse stehen beim TFMAA/EGDMA-System viel mehr Bindungsstellen zur Verfügung.

3 Schlussfolgerungen

Gegenstand des Projektvorhabens war eine sondierende Machbarkeitstudie zur Untersuchung der prinzipiellen Einsatzmöglichkeit von nanostrukturierten molekular geprägten Polymerpartikeln (MIPs) zur Abtrennung von ASG - hier am Beispiel von Stigmasteryl-6-O-palmitoyl-alpha-D-glucopyranosid - aus Bioölen.

Im Rahmen dieses Projektvorhabens wurden im ersten Schritt verschiedene Monomere und Vernetzer zur Herstellung von Nanopartikeln mittels Miniemulsionspolymerisation eingesetzt. Es wurden jeweils sowohl ungeprägte Partikelsysteme (NIPs) als auch molekular geprägte Partikelsysteme (MIPs) synthetisiert. Als geeignetes Templatmolekül wurde Stigmasterol identifiziert. Stigmasterol kommt als Stigmastereleinheit im ASG vor. In Gegenwart von Stigmasterol wurden die molekular geprägten Adsorberpartikel hergestellt. Ethylenglykoldimethacrylat erwies sich als geeigneter Vernetzer. Im Fall von Divinylbenzol (DVB) als Vernetzer konnten ebenfalls erfolgreich Nanopartikel hergestellt werden. Die weitere Aufreinigung dieser Partikelsysteme war jedoch aufgrund der zu kleinen Partikelgrößen mit vertretbarem Aufwand nicht möglich.

Für die Bestimmung des Adsorptionsverhaltens der Nanopartikel konnte eine geeignete Analytik am IGB entwickelt und etabliert werden. Die adsorbierte Menge an Stigmasterol wurde nach Optimierung der Methode erfolgreich mittels LC-MS-Analytik bestimmt.

Eine spezifische Adsorption von Stigmasterol konnte in dem Lösungsmittelgemisch THF/Wasser nachgewiesen werden. Hierbei adsorbierten an die TFMAA/EGDMA-Partikel maximal 18,95 mg Stigmasterol und an die MAA/EGDMA-Partikel 14,3 mg Stigmasterol pro 10 mg Polymer.

Die Ergebnisse dieses Projektvorhabens zeigen, dass die Herstellung von polymeren Adsorberpartikeln für die spezifische Adsorption von ASG möglich ist.

4 Ausblick

Im Rahmen dieses Projektvorhabens konnte gezeigt werden, dass die Herstellung von Adsorberpartikeln für die spezifische Adsorption von ASG möglich ist. Die erfolgreichen Experimente bezüglich der Adsorption und damit der Abtrennung von Stigmasterol unter Einsatz der hier entwickelten polymeren Adsorbermaterialien geben Anlass zur Weiterführung dieses Projektes im größeren Verbund mit angemessenen Mitteln.

Sinnvoll an dieser Stelle ist ein Vergleich des Adsorptionsverhaltens klassischer Adsorbermaterialien mit den hier entwickelten

polymeren Nanopartikeln bezüglich der Adsorption von ASG. Bei diesem Vergleich sollen sowohl polymere Adsorberpartikel ohne Stigmasterol, polymere Adsorberpartikel mit hoher Affinität zu Stigmasterol und seinen Derivaten als auch die molekular geprägten Nanopartikel eingesetzt werden.

Darüber hinaus sind Versuche mit realen, technischen Proben, die direkt aus der Produktion kommen, sinnvoll. Für die Durchführung dieser Versuche ist es jedoch wichtig mit Firmen und einer Forschungseinrichtung zusammenzuarbeiten, die bereits Erfahrung mit der Analytik dieser realen Proben hinsichtlich ihres ASG-Gehalts haben sowie die technischen Proben zur Verfügung stellen.

In einem weiteren Schritt sollen Verfahren für die technische Nutzung dieser Partikelsysteme entwickelt und eine Kosten-Nutzen-Rechnung erstellt werden. Für den verfahrenstechnischen Einsatz der Nanopartikel können die Nanopartikel auf Füllkörper aufgebracht (hierzu gibt es aus dem Fraunhofer IGB vielversprechende Ergebnisse) oder als selektive Schicht in Kompositmembranen eingebaut werden. Nach der Entwicklung einer Versuchsanlage im Labormaßstab soll diese Anlage vor Ort direkt in den Ölmühlen oder bei Biodieselherstellern getestet werden.

5 Eingesetzte Chemikalien

Die im Rahmen dieses Projektes eingesetzten Chemikalien sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Funktion	Reinheit	Firma	Bestell-Nr.
<i>Methacrylsäure</i>	<i>Monomer</i>	$\geq 99\%$	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>15,572-1</i>
<i>Ethylenglycoldimethacrylat</i>	<i>Vernetzer</i>	$\geq 97\%$	<i>Fluka</i>	<i>03808</i>
<i>Stigmasterol</i>	<i>Templat</i>	<i>95 %</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>S2424</i>
<i>2-Trifluormethacrylsäure</i>	<i>Monomer</i>	<i>98 %</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>367346</i>
<i>Divinylbenzen</i>	<i>Vernetzer</i>	<i>80 %</i>	<i>Fluka</i>	<i>43908</i>
<i>2-(Methacryloyloxy)ethylphosphat</i>	<i>Vernetzer</i>	<i>-</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>496758</i>
<i>Hexadekan</i>	<i>Lösemittel</i>	$\geq 98\%$	<i>Fluka</i>	<i>52210</i>

Chemikalien	Funktion	Reinheit	Firma	Bestell-Nr.
<i>Sodiumdodecylsulfat</i>	<i>Emulgator</i>	-	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>436143</i>
<i>Azobis-2-methylbutyronitril</i>	<i>Initiator</i>	$\geq 98 \%$	<i>Fluka</i>	<i>11596</i>
<i>2,2-Azoisobutyronitril</i>	<i>Initiator</i>	$\geq 98 \%$	<i>Fluka</i>	<i>11630</i>
<i>Tetrahydrofuran</i>	<i>Lösemittel</i>	$\geq 99,9 \%$	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>34865</i>
<i>2-Propanol</i>	<i>Lösemittel</i>	$\geq 99,5 \%$	<i>J. T. Baker</i>	<i>8067</i>
<i>Hydrochinon</i>		≥ 99	<i>Sigma-Aldrich</i>	

6 Glossar

Adsorber	<i>Bezeichnung für meist feste Stoffe mit großer, aktiver Oberfläche, die bestimmte Substanzen aus gasförmigen oder flüssigen Mischungen an ihrer Grenzfläche selektiv anreichern können.</i>
HPLC	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography); Analytische Methode in der Chemie, mit der man Substanzen identifizieren und quantifizieren kann.</i>

Molekulares Prägen	Methode zur Herstellung von technisch angepassten, vollsynthetischen hochspezifischen Adsorbentien.
Monomere	Einzelbestandteile oder Grundeinheiten aus denen durch Zusammenlagerung größere Verbindungen, die Polymere, aufgebaut werden.
Polymer	Laut IUPAC-Definition eine Substanz, die aus einer Vielzahl von Molekülen aufgebaut ist, in denen eine Art oder mehrere Arten von Atomen oder Atom-Gruppierungen (Monomere) wiederholt aneinander gereiht sind.
Polymerisation	Chemische Reaktion, bei der Monomere zu Polymeren reagieren. Zum Teil werden dabei Katalysatoren verwendet.
Templat	Molekül, das als Vorlage (Schablone) für die Herstellung von molekular geprägten Materialien eingesetzt wird.

7 Quellenangaben

- [1] J. Haupt, J. Fischer, K. Witt, T. Wilharm, in *Studie zum SG- und ASG-Gehalt von Pflanzenölen und FAME*, Arbeitsgemeinschaft Qualitätsmanagement Biodiesel e. V., 2011.
- [2] G. E. M. Tovar, I. Kräuter, C. Gruber, *Topics in current chemistry* **2003**, *227*, 125-144.
- [3] M. Herold, G. E. M. Tovar, C. Gruber, M. Dettling, S. Sezgin, H. Brunner, *Polymer Prepr.* **2005**, *46*, 1125-1126.
- [4] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 673 - 679.

- [5] C. Alexander, H. S. Andersson, L. I. Andersson, R. J. Ansell, N. Kirsch, I. A. Nicholls, J. O'Mahony, M. J. Whitcombe, *Journal of Molecular Recognition* **2006**, *19*, 106 - 180.
- [6] V. Holzapfel, A. Musyanovych, K. Landfester, M. R. Lorenz, V. Mailänder, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, *206*, 2440-2449.

8 Anhang

HPLC-Methode 1: Laufmittel Isopropanol

Die verwendete HPLC Anlage der Firma SHIMADZU setzt sich aus mehreren Einzelkomponenten zusammen.

- Degasser: DGU-20 A₅
- Liquid Chromatograph: LC-20 AT
- Auto Sampler: SIL-20 AC_{HT}
- Column Oven: CTO-20 AC
- Diode Array Detector: SPD-M20A
- Communications Bus Module: CBM-20 A

Säule: C18 (Innendurchmesser 4 mm; Länge 125 mm; Säulenfüllung 4 µm)

Laufmittelzusammensetzung: 85 % Isopropanol + 15 % Wasser

Fluss: 1 mL/min

Injektionsvolumen: 10 μ L

Detektion: UV, 205 nm

Ergebnis

Wie in **Abbildung 14** dargestellt, wurde ein Stigmasterol-Standard (100 μ g) und pures Isopropanol eingespritzt. Es ist zu erkennen, dass der vermeintliche Stigmasterol-Peak bei einer Retentionszeit von ca. 5,8-6,6 min erscheint.

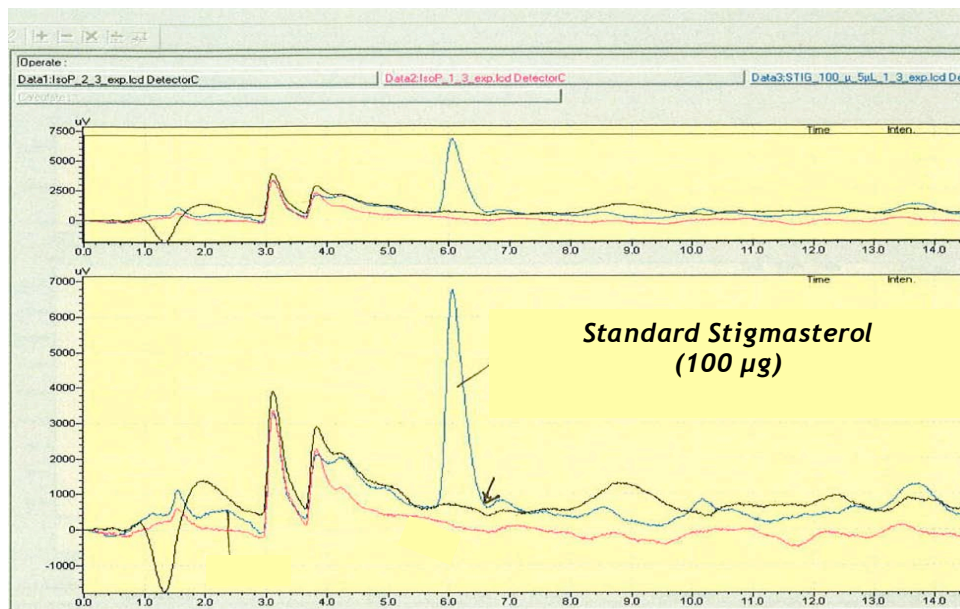


Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von Stigmasterol und Isopropanol mittels HPLC-Methode 1 bestimmt.

Die Methode wurde weiter optimiert, indem das Laufmittel auf THF umgestellt wurde. Daraus folgte HPLC-Methode 2.

HPLC-Methode 2: Laufmittel THF

Für die Messungen wurde eine HPLC Prominence von Shimadzu, siehe HPLC-Methode 1, mit folgenden Einstellungen eingesetzt:

Säule:	C18
Laufmittelzusammensetzung:	80 % THF + 20 % Wasser
Fluss:	1,3 mL/min
Injektionsvolumen:	20 µL
Detektion:	UV, 205 nm

Ergebnis

Wie in Abbildung 15 dargestellt, wurde ein Stigmasterol-Standard (250 µg/mL) sowie pures THF eingespritzt. Es ist zu erkennen, dass der vermeintliche Stigmasterol-Peak bei einer Retentionszeit von ca. 2,2-2,5 min erscheint.

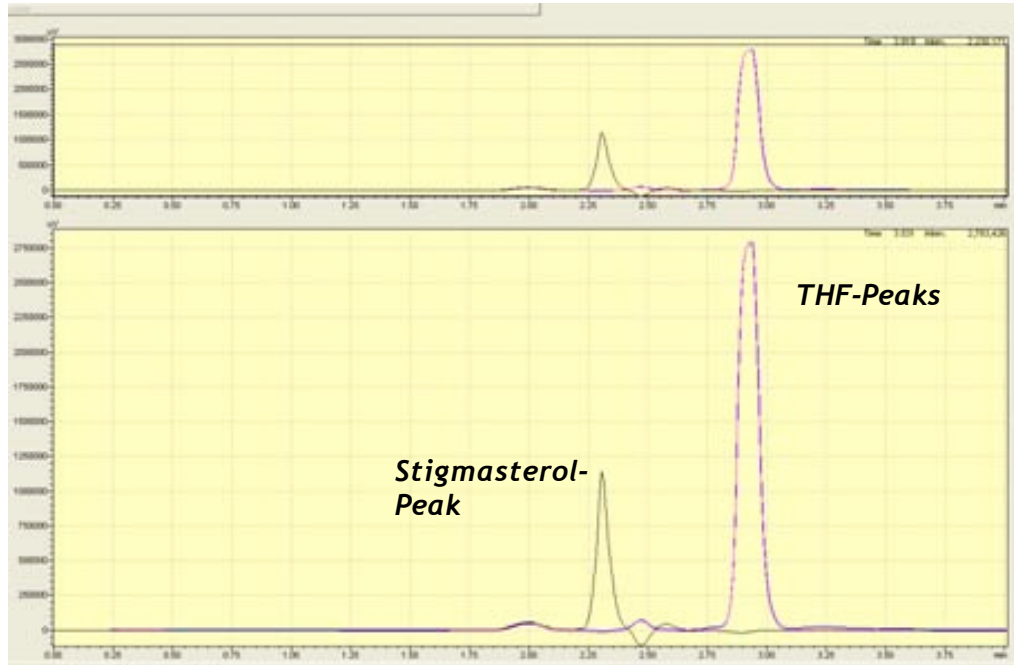


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm von Stigmasterol und THF mittels HPLC-Methode 2 bestimmt.

Die Methode wurde weiter optimiert, indem die Laufmittelzusammensetzung und die Methodenzzeit variiert wurden. Daraus folgte HPLC-Methode 3.

HPLC-Methode 3: Variation der Laufmittelzusammensetzung

Für die Messungen wurde eine HPLC Prominence von Shimadzu, siehe HPLC-Methode 1, mit folgenden Einstellungen eingesetzt:

Säule:	C18
Laufmittelzusammensetzung:	60 % THF + 40 % Wasser
Fluss:	1,3 mL/min
Injektionsvolumen:	20 µL
Detektion:	UV, 205 nm

Ergebnis

Wie in **Abbildung 16** dargestellt, wurde ein Stigmasterol-Standard (250 µg/mL) sowie pures THF eingespritzt. Es ist zu erkennen, dass der vermeintliche Stigmasterol-Peak bei einer Retentionszeit von ca. 2,3-2,56 min erscheint. Außerdem konnte der THF-Peak vor den Probenpeak verschoben werden.

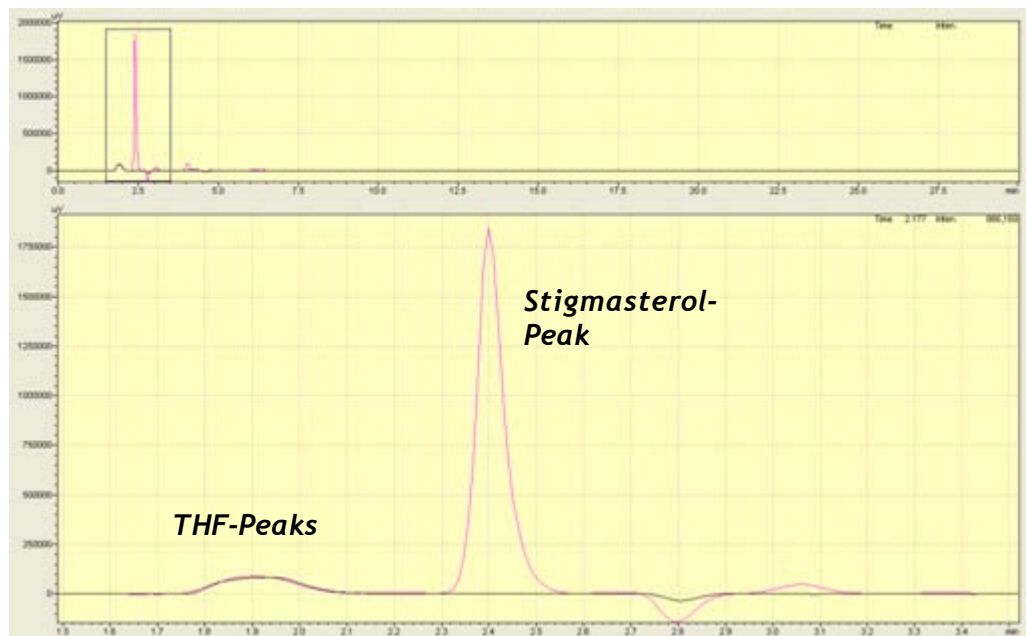


Abbildung 16 : HPLC-Chromatogramm von Stigmasterol und THF mittels HPLC-Methode 3 bestimmt.