

---

## 3D Druck von Chromatographiesäulen

---





TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

# 3D-Druck von stationären Phasen für die Anwendung in der Flüssigchromatographie

vom Fachbereich Chemie der  
Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades  
Doktor-Ingenieur  
(Dr.-Ing.)

Dissertation  
von Daria Omralinov

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Dipl.-Kfm. Bastian J. M. Etzold

Zweitgutachter: Prof. Dr. Marcus Rose

Darmstadt 2024

---

---

Omralinov, Daria: 3D-Druck von stationären Phasen für die Anwendung in der Flüssigchromatographie

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,  
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2024  
URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-273243  
URL: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/27324>

**Tag der Einreichung:**

14. Februar 2024

**Tag der mündlichen Prüfung:**

17. April 2024

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International  
<https://creativecommons.org/licenses/>

---

---

# Kurzfassung

Die zunehmende Bedeutung von gentechnisch produzierten Medikamenten, sogenannten Pharmazeutika, im Kampf gegen bislang unheilbare Krankheiten, wie Krebs und Diabetes, erfordert neue Chromatographiematerialien und deren Herstellungsmethoden zur Reinigung der Arzneimittel. Der Stand der Technik in der Chromatographie sind sphärische Kugeln, die beispielsweise durch Emulsionspolymerisation hergestellt und als zufällig angeordnete chromatographische Betten verwendet werden. Diese sind jedoch nicht an die komplexen Strukturen der Biopharmazeutika angepasst, was in geringen Bindekapazitäten resultiert.<sup>[1,2]</sup> Computersimulationen haben gezeigt, dass die Leistung chromatographischer Verfahren zur Auftrennung und Reinigung solcher Biomoleküle durch die Verwendung geordneter Strukturen verbessert werden kann.<sup>[3]</sup> Der 3D-Druck von chromatographischen Materialien würde daher eine neue und vorteilhafte Möglichkeit zur Herstellung präzise geordneter und maßgeschneiderter chromatographischer stationärer Phasen bieten. Darüber hinaus ist es mit dem 3D-Druck möglich, eine komplette Chromatographiesäule als einteilige Einheit einschließlich Packung, internen Strömungsverteilern und externen Flüssigkeitsanschlüssen zu drucken und bei jedem Druck reproduzierbare Säulen herzustellen.<sup>[4,5]</sup>

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die derzeitigen Einschränkungen der unzureichenden Druckauflösung sowie der geringen Auswahl an hochauflösenden Materialien im 3D-Druck durch Photopolymerisationsansätze zu überwinden und neuartige stationäre Phasen als Ionentauscher für die Bindung von Proteinen herzustellen. Mit einer Photoharzformulierung bestehend aus den Quervernetzern Pentaerythritetraacrylat und Triethylenglykoldimethacrylat, dem Monomer zur Einbringung funktioneller, modifizierbarer Hydroxylgruppen Hydroxyethylmethacrylat, dem Initiator Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid und dem Photoabsorber 2,5-Bis(5-tert-butyl-benzoxazol-2-yl)thiophen konnten offene 150 µm Gitter- sowie 180 µm Gyroidstrukturen mit dem DLP-3D-Drucker realisiert werden. An 100 mm langen Gittersäulen mit 200 µm Strukturen und einer Strukturporosität von 50% konnte eine erfolgreiche sowie reproduzierbare TEMPO-Oxidation der Hydroxylgruppen erfolgen. Die Chromatographiesäulen zeigten als Anionentauscher eine maximale Bindekapazität des Lysozyms von  $5,42 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1} \text{ Säule}$  mit Wiederfindungsraten  $\sim 100\%$ . Mit dem Porogen Polypropylenglykol 1200 wurden zusätzlich bis zu 500 nm große Poren in die Struktur eingeführt, wodurch die Bindekapazität auf  $33,1 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1} \text{ Säule}$  bzw.  $2,5 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$  erhöht wurde.

---

# Abstract

The increasing importance of genetically engineered drugs, known as pharmaceuticals, in the fight against previously incurable diseases such as cancer and diabetes requires new chromatography materials and their production methods for the purification of the drugs. The current state of the art material in chromatography are spherical beads, e.g. produced by emulsion polymerisation and applied as randomly arranged chromatographic beds, which are not adapted to the complex structures of biopharmaceuticals, resulting in low binding capacities.<sup>[1,2]</sup> Computer simulations have shown that the performance of chromatographic methods for the separation and purification of such biomolecules can be improved by the use of ordered structures.<sup>[3]</sup> 3D printing of chromatographic materials would therefore provide a new and advantageous way to produce precisely ordered and custom tailored chromatographic stationary phases. In addition, 3D printing makes it possible to print a complete chromatography column as a one-piece device, including packing, internal flow distributors and external fluid ports, and to produce reproducible columns each time they are printed.<sup>[4,5]</sup>

The aim of this work is to overcome the current limitations of insufficient printing resolution and the limited choice of high-resolution 3D printing materials by photopolymerization approaches and to fabricate novel stationary phases as ion exchangers for protein binding. Using a photoresin formulation consisting of the crosslinkers pentaerythritol tetracrylate and triethylene glycol dimethacrylate, the monomer for introducing functional, modifiable hydroxyl groups hydroxyethyl methacrylate, the initiator diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide and the photoabsorber 2,5-bis(5-tert-butyl-benzoxazol-2-yl)thiophene, open 150  $\mu\text{m}$  grid structures as well as 180  $\mu\text{m}$  gyroid structures could be realized with the DLP-3D printer. Successful and reproducible TEMPO oxidation of the hydroxyl groups could be performed on 100 mm long lattice columns with 200  $\mu\text{m}$  structures and a structural porosity of 50%. As anion exchangers, the chromatography columns showed a maximum lysozyme binding capacity of 5.42  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Column}}$  with recoveries of  $\sim 100\%$ . The porogen polypropylene glycol 1200 was used to introduce additional pores of up to 500 nm into the structure, increasing the binding capacity to 33.1  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Column}}$  or 2.5  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{m}^{-2}$ .

---

# Danksagung

In diesem Rahmen möchte ich mich bei allen bedanken, die in den vergangenen Jahren zum Erfolg dieser Arbeit und meiner wissenschaftlichen sowie persönlichen Weiterentwicklung beigetragen haben und stets mit Rat und Tat an meiner Seite waren.

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Bastian J. M. Etzold zur Ermöglichung meiner Promotion in seiner Arbeitsgruppe mit dem spannenden und zukunftsweisenden Forschungsfeld der 3D-gedruckten Chromatographiesäulen, für das entgegengebrachte Vertrauen, die gegebenen Freiheiten und für die stets tatkräftige Unterstützung in allen fachlichen sowie persönlichen Belangen.

Prof. Dr. Marcus Rose danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Meinem Gruppenleiter Dr. Jan Gläsel danke ich für die anregenden und spannenden Diskussionen auch über das Forschungsthema hinaus.

Mein besonderer Dank gilt meinem Kooperationspartner Merck KGaA, welcher dieses Projekt erst ermöglicht hat. Speziell danke ich dabei Dr. Michael Schulte, Axel Delp, Dr. Ursula Simon und Franziska Peasler, die von Beginn an dabei waren und auch außerhalb der Forschung ein offenes Ohr angeboten haben. Die Teambuilding-Aktivitäten, die FormNext-Besuche und auch die privaten Zusammenkünfte werden mir immer als eine schöne Erinnerung bleiben.

Den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das stets angenehme Arbeitsklima, sowie für die spaßige und erfolgreiche Zeit auch außerhalb der Labore. Danke für die unvergesslichen Zeiten mit all den erstklassigen Gesprächen und das nicht nur zu Themen der 3D-Druckverfahren oder den stets nicht aufgehenden Plänen, die sich unter dem Wort „Forschung“ zusammenführen lassen. Vor allem an die gemeinsame Zeit im Kleinwalsertal, die Hess-Dienstage, die digitale Weihnachtsfeier oder die gemeinsamen Mittagspausen mit amüsanten Diskussionen werde ich mich voller Freude erinnern.

Danke auch vielfach an Ursula Simon, Maria Omralinov und Konrad Krois für das sorgfältige Korrekturlesen dieses Schriftwerks.

Der größte Dank geht, neben meinen Freunden, die mir auch außerhalb der Universität Freude und Halt gegeben haben, an meine gesamte Familie und besonders meine Eltern und meine Schwester Maria. Euch danke ich von ganzem Herzen für die grenzenlose Unterstützung und die Ermöglichung meines bisherigen Werdegangs.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>ii</b>
<b>Danksagung</b>	<b>iii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Symbolverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Stand der Technik</b>	<b>3</b>
2.1 Flüssigchromatographie	3
2.1.1 Vergleich der Flüssigchromatographietechniken	4
2.1.2 Stationäre Phase	5
2.2 Additive Fertigung	11
2.2.1 Digital Light Processing	12
2.2.2 Photopolymerisation und Photoharz	13
2.2.3 Herausforderungen des 3D Drucks	16
2.3 Poröse 3D-gedruckte Polymere in der Chromatographie	20
2.3.1 Porogentemplierung zur Herstellung poröser Polymere	20
2.3.2 Funktionalisierungsmethoden poröser Polymere	22
2.3.3 Forschungsansätze zur Herstellung 3D-gedruckter Chromatographiematerialien	24
<b>3 Ziel und Umfang</b>	<b>27</b>
<b>4 Experimentelle Beschreibung und Methoden</b>	<b>29</b>
4.1 Herstellung des Photoharzes	29
4.1.1 Photopolymerisation im einfachen Setup	29
4.1.2 3D-Druckprozess von Polymeren	29
4.1.3 Erstellen der CAD-Designs	31
4.1.4 Betrachtung der Druckparameter	32
4.1.5 Kombination von Gehäuse und poröser Gittersäule	33
4.2 Oberflächenfunktionalisierung	34
4.2.1 Thiol-En-Klickreaktion	35
4.2.2 TEMPO Oxidation	35

---

4.3	Analysemethoden	36
4.4	Dynamische Bindungskapazität	38
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>41</b>
5.1	Vorversuche zur Entwicklung einer Photoharzformulierung	41
5.1.1	Auswahl der Einzelkomponenten	41
5.2	Untersuchung zur erzielbaren Auflösung	51
5.2.1	Vorversuche zur erzielbaren Auflösung	51
5.2.2	Einfluss der Harzformulierung auf die Auflösung	53
5.2.1	Einfluss der Druckerwanne auf die xy-Auflösung	56
5.2.2	Einfluss des Druckprozesses auf die Auflösung	57
5.2.3	Untersuchung der Maßhaltigkeit der 3D-gedruckten Objekte	59
5.3	Oberflächenfunktionalisierung von 3D-gedruckten Gitterstrukturen	65
5.3.1	Thiol-En-Klickreaktion zur Umsetzung enthaltener freier Doppelbindungen	65
5.3.2	TEMPO Oxidation zur Umsetzung der Hydroxylfunktionalitäten	68
5.4	Porogentemplierung zur Einbringung von Materialporosität	79
5.4.1	Identifikation eines geeigneten Porogens	79
5.4.2	Übertragung der Porogentemplierung auf den 3D-Druck	81
5.4.3	Anwendung von Chromatographiesäulen mit sekundärer Porosität	87
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>A-1</b>
8.1	Summary	A-1
8.2	Materialien	A-4
8.3	Ergebnisse und Diskussion	A-5
8.4	Erklärungen	A-11

---

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AC	Affinitätschromatographie
AEX	Anionenaustauscher (engl.: <i>Anion Exchanger</i> )
BAPO	Phenyl-bis-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
CAD	Computergestütztes Design (engl.: <i>Computer Aided Design</i> )
CEX	Kationenaustauscher (engl.: <i>Cation Exchanger</i> )
CLIP	<i>Continuous Liquid Interface Production</i>
DB	Doppelbindungen
DBC	Dynamische Bindekapazität
DLP	Digital Light Processing
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
EDMA	Ethylenglykoldimethacrylat
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
FKS	Fischer-Koch-S
GMA	Glycidylmethacrylat
HEMA / H	Hydroxyethylmethacrylat
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HSLA	Hybride Stereolithographie
IEC	Ionenaustauschchromatographie (engl.: <i>Ion Exchange Chromatography</i> )
IPA	Isopropanol / 2-Propanol
LC	Flüssigchromatographie (engl.: <i>Liquid Chromatography</i> )
NPS	2-Nitrodiphenylsulfid
OB184	2,5-Bis(5-tert-butyl-benzoxazol-2-yl)thiophen
OPT	<i>One-Piece-Test</i>
PBC	Festbettchromatographie (engl.: <i>Packed bed chromatography</i> )
PEGDA	Polyethylenglykoldiacrylat
PEMA	Phenoxyethylmethacrylat
PETA / P	Pentaerythrittetraacrylat
PIPS	Polymerisations-induzierte Phasenseparation (engl. <i>Polymerization induced phase separation</i> )
RPC	Umkehrphasenchromatographie (engl.: <i>Reversed-Phase-Chromatography</i> )
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl.: <i>Size Exclusion Chromatography</i> )
SLA	Stereolithographie
SLS	Selektives Lasersintern (engl.: <i>Selective Laser Sintering</i> )
SSA	Spezifische Oberfläche (engl.: <i>Specific Surface Area</i> )

---

TEGDMA / T	Triethylenglykoldimethacrylat
TEMPO	(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
TPL	Zwei-Photonen-Lithographie
TPMS	Dreifachperiodische Minimalflächen (engl.: <i>Triply periodic minimal surface</i> )
TPO	Diphenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid

---

---

---

# Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
$c$	Konzentration	mol L <sup>-1</sup>
$CV$	Säulenvolumen (engl.: <i>Column Volume</i> )	mL
$d$	Schichtdicke	μm
DBC	Dynamische Bindekapazität	mg g <sup>-1</sup>
$E$	Extinktion	
$E(t)$	Verweilzeitverteilung	s <sup>-1</sup>
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient	L mg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
$IK$	Ionische Kapazität	μmol g <sup>-1</sup>
$m$	Masse	g
$\rho$	Dichte	mg L <sup>-1</sup>
$R^2$	Bestimmtheitsmaß	
$t$	Druckzeit	s
$\bar{t}$	Mittlere Verweilzeit	min
$V$	Volumen	mL
WFR	Wiederfindungsrate	%

---



---

# 1 Einleitung

Im Kampf gegen Krebs, Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und verschiedene Immunkrankheiten gewinnen gentechnisch produzierte Medikamente in der pharmazeutischen Industrie zunehmend an Bedeutung.<sup>[2]</sup> Die nächste Generation von Arzneimitteln konzentriert sich daher auf die Herstellung großer Biomoleküle, so genannter Biopharmazeutika, wie therapeutische Proteine, Viren (Lentiviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren) und Nukleinsäuren (genomische DNA, mRNA und Plasmid-DNA), die das Potenzial haben, die menschliche Gesundheitsvorsorge in den Bereichen Diagnose, Prävention und Behandlung von Krankheiten zu unterstützen (Impfstoffe, Blut, Blutbestandteile, Allergene, Gentherapie etc.). Die 1982 in Form von Insulin<sup>[6]</sup> erstmals eingeführten biopharmazeutischen Arzneimittel weisen im Gegensatz zu herkömmlichen Medikamenten, die durch chemische Synthesen hergestellt werden, strukturell identische Merkmale mit menschlichen Verbindungen auf. Diese strukturelle Gemeinsamkeit eröffnet Biopharmazeutika das Potenzial, nicht nur die Symptome einer Krankheit zu bekämpfen, sondern die Krankheit von Grund auf zu heilen.<sup>[2,7-9]</sup> Aufgrund ihrer Größe werden Biopharmazeutika im Gegensatz zu niedermolekularen Arzneimitteln durch Injektion oder Infusion verabreicht und wirken durch externe ortsspezifische zelluläre Bindung. Damit beeinträchtigen sie gesunde Zellen nicht und verursachen nur selten Nebenwirkungen. Da die Biopharmazeutika nicht chemisch synthetisiert, sondern nur rekombinant durch manipulierte lebende Zellen oder Mikroorganismen in komplexen, mehrstufigen biotechnologischen Verfahren hergestellt werden, ist ihre Charakterisierung hinsichtlich ihrer Reinheit, Stabilität und Funktion essenziell.<sup>[2,10]</sup> Die kostenintensivsten Herstellungsschritte stellen dabei die Isolierung und Reinigung der Biomoleküle dar. Die am weitesten verbreitete Methode hierfür, insbesondere im Hinblick auf therapeutische Anwendungen, ist die Flüssigchromatographie.<sup>[9-11]</sup>

Die derzeit verfügbaren konventionellen Chromatographiesysteme sind jedoch nicht an die besonderen und komplexen Eigenschaften dieser Biomoleküle angepasst und ihre analytische Charakterisierung stellt eine immense und zeitintensive Herausforderung dar. Viele dieser Biomoleküle sind größer als die Poren bestehender Chromatographiematerialien, so dass aufgrund interner Diffusionseffekte eine starke Abnahme der Bindekapazität und damit eine geringe Ausbeute beobachtet werden kann. Die Festbettchromatographie ist zwar nach wie vor ein leistungsfähiges Werkzeug, aber nicht die effektivste Methode, um den Herausforderungen bei der Herstellung neuer Biotherapeutika zu begegnen. Daher müssen alternative stationäre Phasen in Betracht gezogen werden.<sup>[12]</sup>

Die Entwicklung neuer Chromatographiematerialien zielt daher auf die Optimierung der Morphologie, der Oberfläche und der Biokompatibilität des Materials ab. Ziel ist es, durch die Kombination von hoher Selektivität und hoher Effizienz eine schnelle chromatographische Trennung großer Biomoleküle ohne Auflösungsverlust zu ermöglichen. Dies kann durch einen

---

geringen Massentransferwiderstand zwischen stationärer und mobiler Phase realisiert werden.<sup>[13]</sup> Dabei haben Computersimulationen gezeigt, dass die Leistung chromatographischer Verfahren durch die Verwendung geordneter Strukturen verbessert werden kann.<sup>[3]</sup>

Daher gilt es neue und innovative Trennoptionen zu entwickeln, die sowohl direkt auf die Zielmoleküle maßgeschneidert sind als auch deren molekulare Komplexität überwinden können. In diesem Zusammenhang ist der 3D-Druck für die Erforschung neuartiger stationärer Chromatographiephasen in den Fokus der Forschung und Entwicklung gerückt. Die Kombination von 3D-Druck und der Flüssigchromatographie könnte den Bereich der Bioseparationstechniken revolutionieren. Der 3D-Druck ermöglicht nämlich die einfache Herstellung geordneter, offenzelliger Strukturen mit komplexen Fließwegen. Dadurch weist die kontinuierliche stationäre Phase einen geringen Massentransferwiderstand auf und die kinetisch limitierte Porendiffusion kann durch Porenkonvektion ersetzt werden.<sup>[13,14]</sup>

Trotz der vielen Vorteile der 3D-Drucktechnologie stellen der Mangel an geeigneten Materialien, die sowohl mit dem 3D-Druck als auch mit der chromatographischen Anwendung kompatibel sind, und die Auflösungsgrenze der Fertigungstechnik dem Erfolg der Technologie in der Chromatographie im Weg. An diesem Punkt knüpft das Ziel dieser Arbeit an, neuartige stationäre Phasen als gebrauchsfertiges Einwegprodukt<sup>[15]</sup> zu entwickeln, welche mit traditionellen Chromatographiematerialien hinsichtlich der Performanz vergleichbar sind und gleichzeitig ihre morphologische Gestaltungsfreiheit durch Herstellung mathematisch definierter Fließwege und Kanalgrößen, vor allem im Hinblick auf große Biomoleküle, übertreffen.

---

# 2 Stand der Technik

Im Folgenden werden der Stand der Technik und der theoretische Hintergrund von 3D-gedruckten chromatographischen Materialien vorgestellt. Der Schwerpunkt liegt auf den einzigartigen Merkmalen geordneter chromatographischer Materialien, den Mechanismen zur Herstellung von porösen Materialien und den Möglichkeiten zur Herstellung stationärer Phasen durch additive Fertigung.

---

## 2.1 Flüssigchromatographie

---

Die Chromatographie ist eine weit verbreitete und leistungsfähige Methode in der qualitativen und quantitativen Analyse, die zur Trennung, Identifizierung und Reinigung einzelner Komponenten eines Gemisches eingesetzt wird. Nach IUPAC ist Chromatographie definiert als „die Trennung von Probenbestandteilen nach ihrer Verteilung auf zwei Phasen“.<sup>[16]</sup> Die Trennung beruht dabei auf der Wechselwirkung der Komponenten mit der stationären und der mobilen Phase. Die Chromatographie umfasst dabei eine Vielzahl von Techniken, die nach ihren Trennprinzipien und den physikalischen Eigenschaften der beiden Phasen kategorisiert werden können.<sup>[17,18]</sup>

Die Flüssigchromatographie (LC, engl. *Liquid Chromatography*) umfasst alle Verfahren mit flüssiger mobiler Phase und wurde erstmals 1903<sup>[19]</sup> von dem russischen Botaniker TSWETT geprägt.<sup>[17,20]</sup> Die mobile Phase übernimmt den Transport des Analytengemisches und wird mit Hilfe von Pumpen über die stationäre Phase geleitet. Die stationäre Phase kann dabei eine zufällig angeordnete Packung kugelförmiger Partikel (Festbettchromatographie) oder eine kontinuierliche poröse Phase (Membran- und Monolithchromatographie) sein. Beim Kontakt der Analyten mit der stationären Phase kommt es aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkungen der einzelnen Analyten zu Unterschieden in der Verweilzeit der Moleküle auf der Säule und damit zu einem Trenneffekt. Moleküle mit höherer Affinität zum Material werden später eluiert als solche mit geringerer Affinität.<sup>[1,21]</sup>

---

## 2.1.1 Vergleich der Flüssigchromatographietechniken

---

Abhängig von der Art der Interaktion zwischen dem Analyten und der festen stationären Phase in der LC lassen sich diverse Chromatographietechniken beschreiben. Im Hinblick auf biologische Makromoleküle als Analyten lassen sich folgende gängige Techniken definieren (Abbildung 2.1):<sup>[17,22]</sup>

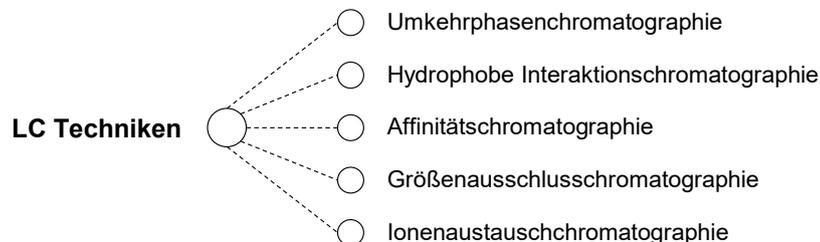


Abbildung 2.1: Ausgewählte LC-Techniken eingesetzt in der Bioseparation.<sup>[17,22]</sup>

### Umkehrphasen- und Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Umkehrphasenchromatographie (RPC, engl. *Reversed-Phase-Chromatography*) und die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) sind weitgenutzte Methoden für die Trennung und Analyse von Proteinen, Proteinfragmenten und Peptiden und beruhen beide auf der reversiblen Wechselwirkung zwischen den hydrophoben Liganden des Matrixmaterials mit dem hydrophoben Anteil des Zielmoleküls. Polare Biomoleküle eluieren zu Beginn, während hydrophobere Moleküle zuletzt vom Säulenmaterial abgetrennt werden. Bei der RCP besteht die mobile Phase aus einem organischen Lösungsmittel-Wasser-Gemisch, wobei mit steigendem Anteil des organischen Lösungsmittels die Hydrophobizität erhöht, die Oberflächenspannung verringert und damit die hydrophoben Fraktionen eluiert werden. Dabei kann es aufgrund des organischen Lösungsmittels zur Denaturierung von Proteinen kommen.<sup>[23,24]</sup>

Die chromatographische Operation der HIC verzichtet auf den Einsatz organischer Lösungsmittel und wird bei milden Konzentrationen lyotroper Salze durchgeführt, welche in Folge ihrer hohen Polarität eine starke Bindung zu Wasser eingehen. Durch den Entzug des Wassers an der Oberfläche der Liganden sowie Analyten werden hydrophobe Wechselwirkungen gefördert. Gleichzeitig stabilisiert das Salz die Proteinstruktur, so dass diese für Proteine gegenüber der RPC zu bevorzugen ist. Die Elution erfolgt hierbei durch die Änderung der Ionenstärke des Puffersystems.<sup>[24]</sup>

### Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie (AC) ist eine der ältesten Methoden der LC. Die Trennung beruht auf spezifischen Wechselwirkungen biochemischer Systeme, wie Enzym-Substrat- oder Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen. Durch eine Komplexbildung des Analyten mit einem an die stationäre Phase gebundenen Liganden wird dieser aus dem Gemisch zurückgehalten und von den anderen Komponenten getrennt. Eine Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke der mobilen Phase erlaubt das anschließende Eluieren des Analyten von der Säule.<sup>[25]</sup> Ein

---

bekanntes Beispiel für die AC ist die Protein-A-Chromatographie, die zur Detektion und Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern eingesetzt wird.<sup>[26]</sup>

### **Größenausschlusschromatographie**

Bei der Größenausschlusschromatographie (SEC, engl.: *Size Exclusion Chromatography*) erfolgt die Trennung der Moleküle nach ihrer Form und Größe, so dass hier keine Wechselwirkung zwischen dem Analyten und der stationären Matrix stattfindet. Dabei werden stationäre Phasen mit einer engen, definierten Porengrößenverteilung verwendet. Ist der effektive Durchmesser der Moleküle größer als der Porendurchmesser der stationären Phase, können sie nicht in die Pore diffundieren und eluieren zuerst. Moleküle mit kleinerem Durchmesser diffundieren in die Pore und haben aufgrund des größeren zur Verfügung stehenden Diffusionsvolumens eine verzögerte Retentionszeit. Aufgrund der unterschiedlichen Verweilzeiten der Moleküle in der Chromatographiesäule können diese am Säulenausgang fraktioniert werden.<sup>[27,28]</sup> Eine Sonderform der SEC ist die sogenannte inverse SEC (iSEC). Durch den Vergleich der Verweilzeit von Tracermolekülen bekannter Masse mit dem Gesamtvolumen der Säule kann eine Aussage über die Porosität und die Porengrößenverteilung des untersuchten Matrixmaterials getroffen werden.<sup>[28,29]</sup>

### **Ionenaustauschchromatographie**

Die Ionenaustauschchromatographie (IEC, engl. *Ion Exchange Chromatography*) ist ein Verfahren zur Trennung von polaren Molekülen und Ionen aufgrund ihrer Ladung. Die poröse stationäre Phase trägt an ihrer Oberfläche anionische oder kationische Zentren und kann so Kationen (Kationenaustauscher, CEX, engl.: *Cation Exchanger*) oder Anionen (Anionenaustauscher, AEX, engl.: *Anion Exchanger*) aus der mobilen Phase binden. Das Grundprinzip der Trennung beruht auf der reversiblen elektrostatischen Bindung der geladenen Moleküle an die entgegengesetzt geladenen Zentren der stationären Phase. Die IC ist somit eine Form der Adsorptionschromatographie. Durch eine Änderung der ionischen Umgebung können die Moleküle wieder eluiert werden. Einflussfaktoren auf den Trennerfolg sind dabei die Ladungsdichte, die Ladungsverteilung und die Größe der Moleküle.<sup>[16,30]</sup> Für die Kationentrennung werden z.B. Sulfon- und Carbonsäuregruppen und für die Anionentrennung primäre oder quartäre Amine eingesetzt. Je nach Material kann zwischen schwachen und starken Ionenaustauschern unterschieden werden. Erstere weisen eine pH-Wert-abhängige Dissoziation der aktiven Gruppe auf, wie z.B. Carboxymethylsulfonat- oder Diethylaminoethylgruppen, während letztere eine konstante, pH-unabhängige Ladung besitzen, wie z.B. Sulfopropyl- und quaternäre Aminoethylgruppen.<sup>[19]</sup>

---

#### **2.1.2 Stationäre Phase**

---

Das Interesse an Biotherapeutika hat durch ihre Möglichkeit die pharmazeutische Industrie zu revolutionieren und bislang unheilbare Erkrankungen zu heilen in den letzten Jahren zugenommen. Ihre besondere und komplexe Struktur bringt etablierte

---

Chromatographiesysteme an ihre Grenzen.<sup>[12]</sup> Biopharmazeutika sind 100-mal größer als herkömmliche Arzneimittel, meist labil und hitze- sowie aggregationsempfindlich.<sup>[6,31]</sup> Da die Trennvorgänge des Analytengemisches in der Flüssigchromatographie an der festen stationären Phase stattfinden, spielt diese eine entscheidende Rolle beim Erfolg der Trennoperation.

### Anforderungen an die stationäre Phase

Es ergeben sich verschiedene Anforderungen an das Material der stationären Phase, damit dieses in der Bioseparation Anwendung finden kann (Abbildung 2.2).

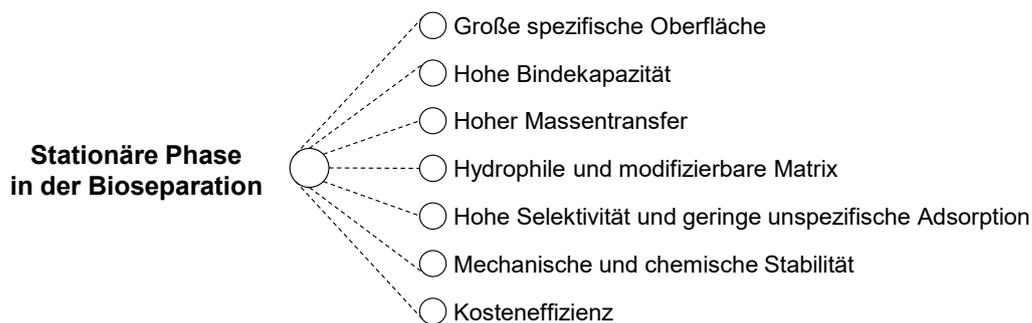


Abbildung 2.2: Anforderungen an die stationäre Phase für die Anwendung in der Bioseparation für Biopharmazeutika.

Für eine hohe Bindekapazität ist eine große spezifische Oberfläche (SSA, engl.: *Specific Surface Area*) notwendig. Dies kann mit hoch porösen Materialien realisiert werden (Abschnitt 2.3.1). Materialien mit kleinen Poren weisen hier zwar eine große SSA auf, jedoch ist der Porendurchmesser für eine erfolgreiche Diffusion der großen Biopharmazeutika meist zu klein und führt zu einem hohen Massentransferwiderstand. Daher muss ein Kompromiss zwischen der SSA und der Porengröße gefunden werden, der eine ausreichende Bindekapazität des Zielmoleküls ermöglicht.<sup>[32]</sup> Dabei gilt, dass eine ungehinderte Diffusion erfolgen kann, wenn der Porendurchmesser das Zehnfache des Zielmoleküldurchmessers beträgt.<sup>[33]</sup> Eine einheitliche Porengröße ist für eine effektive Trennung, vor allem bei der SEC, essentiell und homogene Perlengrößen bzw. Durchgangskanäle erlauben gleichmäßige Fließeigenschaften. Des Weiteren sollte der Adsorptionsprozess reversibel sein, was durch eine hohe Hydrophilie der Matrix ermöglicht werden kann, und gleichzeitig eine geringe unspezifische Adsorption des Moleküls an das Material aufweisen. Infolgedessen eignen sich vor allem natürliche Polymere, wie Cellulose und Agarose oder Polymethacrylate mit z.B. Hydroxyl-tragenden Einheiten, als Matrixmaterial. Neben dem hydrophilen Charakter erlauben die Hydroxylgruppen zudem eine einfache Modifizierung des Matrixmaterials mit Liganden, die aktiv am Separationsprozess beteiligt sind (Abschnitt 2.3.2) und eine hohe Selektivität besitzen sollten. Dafür sollte das Material eine hohe Ligandendichte ( $\geq 100 \mu\text{M}$ )<sup>[32]</sup> aufweisen.

Darüber hinaus müssen die stationären Phasen eine gute mechanische und chemische Stabilität aufweisen. In der Anwendung sind die Materialien hohen Fließgeschwindigkeiten und damit auch hohen Drücken ausgesetzt, welche keine Materialkompression oder Verformung bewirken sollten. Zur Verbesserung der Druckstabilität bieten sich Materialien mit einem hohen Quervernetzungsgrad an.<sup>[34]</sup> Für die Funktionalisierungsreaktionen und während der

Applikation sind die Chromatographiematerialien verschiedenen Chemikalien mit teilweise extremen Bedingungen ausgesetzt. So werden bei Modifizierungsreaktionen organische Lösungsmittel, stark saure oder basische pH-Wert-Bereiche und oxidierende Bedingungen eingesetzt. Während des Chromatographieprozesses kommen wässrige Puffersystem zum Einsatz, die mit organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder Salzen versetzt sein können. Die Reinigungsprozesse der stationären Phase erfolgen dabei unter alkalischen Bedingungen, meist mit Natronlauge. Daher sollte eine gute alkalische Stabilität des Materials vorhanden sein, damit es in Folge von Hydrolysereaktionen zu keinem Abbau des Polymergerüsts oder der Liganden kommt.<sup>[35]</sup> Um preiswerte gentechnisch produzierte Arzneimittel für die breite Bevölkerung anbieten zu können, sollte darüber hinaus die stationäre Phase kostengünstig in der Herstellung sein.<sup>[32]</sup>

Entsprechend ergeben sich viele verschiedene Anforderungen an die stationäre Phase, um für die Bioseparation von Biopharmazeutika geeignet zu sein. Im Folgenden werden poröse sphärische Partikel, poröse Polymermonolithe und Membranen als mögliche stationäre Phase in der Bioseparation diskutiert.<sup>[36]</sup>

### Festbettchromatographie

In der Festbettchromatographie (PBC, engl.: *Packed bed chromatography*) dienen sphärische Partikel, die in einem zylindrischen Säulengehäuse eingeschlossen sind, als stationäre Phase. Hier bilden die Partikel eine matrixartige Packungsstruktur mit Poren ( $\leq 100$  nm)<sup>[32]</sup> und Hohlräumen, die sich je nach Anwendungsgebiet in ihrem Durchmesser und der Porengröße unterscheiden (Abbildung 2.3).<sup>[1]</sup>

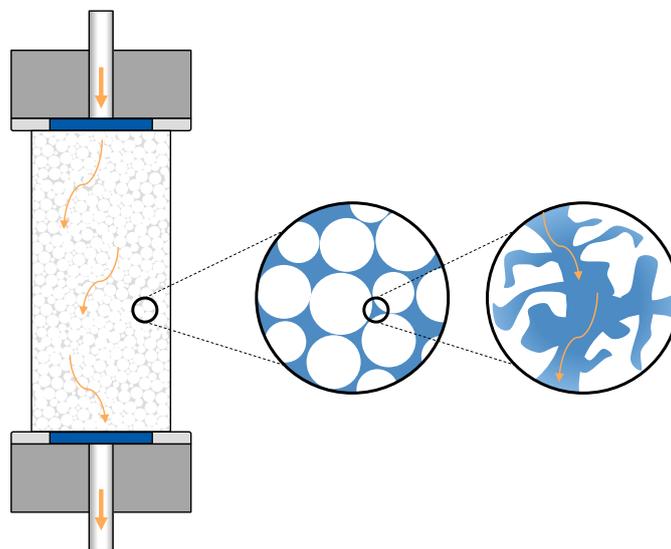


Abbildung 2.3: Aufbau einer mit porösen Partikeln gepackten Chromatographiesäule in der Festbettchromatographie.

Gängige Matrixmaterialien in der Bioseparation sind Agarose oder quervernetzte Polymere, wie Poly(methylmethacrylat) oder Poly(hydroxyethylmethacrylat). Diese werden über das Sol-Gel-Verfahren oder die Emulsionspolymerisation hergestellt. Die große Materialvielfalt, ihre hohe

---

Bindekapazität und hohe Trennauflösung machen die Anwendung der Partikel in der Chromatographie attraktiv.<sup>[37,38]</sup>

Die stationäre Phase und damit eine gute Säulenpackung sind entscheidend für eine stabile und effiziente Trennleistung einer Chromatographiesäule über viele Prozesszyklen hinweg. Daher muss bei der Partikelherstellung ein zusätzlicher Klassifizierungsschritt erfolgen, um zu kleine oder zu große Partikel aus dem Endprodukt ausschließen zu können. Ein einheitlicher Partikeldurchmesser ist dabei vor allem für die Aufrechterhaltung von gleichmäßigen Fließgeschwindigkeiten innerhalb der Matrix wichtig. Für das Packungsverfahren gilt, dass eine zu dicht gepackte Säule neben einem hohen Rückdruck durch Erhöhung des Flüssigkeitswiderstandes und einer Abnahme der Säulenporosität auch zu Materialrissen führen kann, die einen vorzeitigen Durchbruch oder eine Kanalbildung zur Folge haben können. Ist das Chromatographiebett dagegen zu locker gepackt, kann es durch die mobile Phase zu einer Kompression des Materials und damit zur Bildung eines Flüssigkeitsspalts mit möglichen Rückvermischungseffekten kommen. Inhomogenitäten in radialer Richtung hin zur Säuleninnenwand können dabei zur Kanalbildung führen.<sup>[39,40]</sup>

In Allgemeinen werden die Partikel immer ein zufällig gepacktes Chromatographiebett darstellen und somit keine Reproduzierbarkeit der Phase ermöglichen. Dabei entstehen zwischen den einzelnen Partikeln Hohlräume, die  $\sim 30 - 40\%$  der stationären Phase einnehmen und für die gepackten Säulen nicht einstellbar sind. In diesen Hohlräumen dominiert der konvektive Stofftransport, während die Diffusion durch die Poren vergleichsweise langsam ist.<sup>[41]</sup>

Der Massentransfer der Zielmoleküle zwischen der mobilen und stationären Phase findet über Diffusion und Konvektion statt. Durch eine Diffusionslimitierung, vor allem bei großen Molekülen mit niedrigen Diffusionskoeffizienten und Partikeln mit zu kleinen Porengrößen, werden geringe Flussraten und lange Prozesszeiten benötigt, damit das Molekül die Bindungsstelle erreichen kann. Daraus resultieren geringe dynamische Bindekapazitäten für große Biomoleküle.<sup>[12,42]</sup>

Trotz der enormen Popularität gepackter Säulen stellt sich aufgrund der Nachteile von hohen Rückdrücken, einem langwierigen sowie nicht reproduzierbaren Packungsverfahren und des langsamen Diffusionsmassentransfers vor allem von makromolekularen Biomolekülen die Frage nach alternativen Chromatographiematerialien und deren Herstellung. Als Alternativen für eine schnelle und effiziente Auftrennung von großen Biomolekülen werden derzeit Monolithe und Membranen diskutiert.<sup>[43]</sup>

## **Monolithchromatographie**

Als attraktive Alternative zu herkömmlichen gepackten Säulen haben sich starre poröse Polymermonolithe erwiesen, die bereits seit den frühen 1990ern als Materialklasse eingeführt wurden.<sup>[44-46]</sup> Monolithische stationäre Phasen zeichnen sich durch eine kontinuierliche poröse Netzwerkstruktur aus, welche aus miteinander verbundenen Kanälen ( $1 - 2 \mu\text{m}$ ) aufgebaut ist und keine interpartikulären Hohlräume enthält. Diese werden über eine radikalische Polymerisation mit dem PIPS-Prozess (Abschnitt 2.3.1) über ein Formgebungsverfahren in

geschlossenen Behältern hergestellt und als ganzes Objekt in ein Chromatographiegehäuse eingesetzt, wobei die großen Makrodurchgangsporen in schnellen Durchflussverfahren angewendet werden können (Abbildung 2.4).<sup>[43,47–49]</sup>

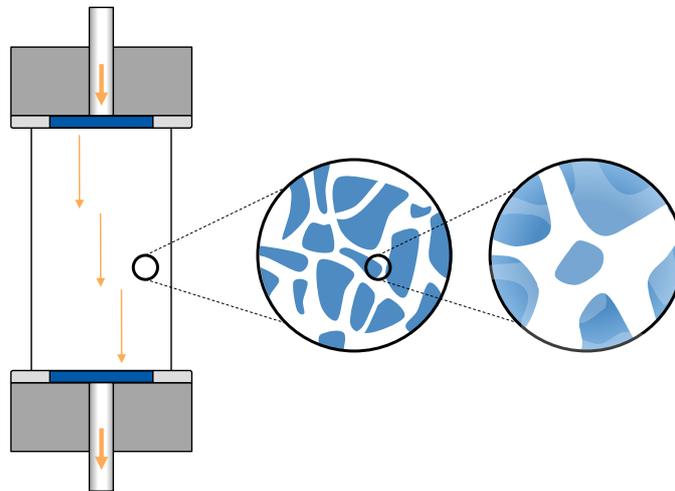


Abbildung 2.4: Aufbau einer porösen Polymermonolithsäule in der Monolithchromatographie.

Durch ihre hierarchische Strukturierung weisen Monolithe einen konvektionsverstärkten Massentransport der Analyten auf, so dass in Folge des geringeren Durchflusswiderstandes die Trennoperation und damit ein schneller Stoffaustausch zwischen stationärer sowie mobiler Phase bei höheren Flussgeschwindigkeiten stattfinden kann.<sup>[50,51]</sup> Dies ist vor allem bei hohen Durchsätzen vorteilhaft. Die Bindekapazität ist dabei unabhängig von der Flussgeschwindigkeit und durch die größeren Poren sind Monolithe für die Applikation großer Biomoleküle wie Proteine geeignet. Im Vergleich zur Partikelpackung ist der Hohlraum zwischen den Poren durch den Einsatz eines einzigen Materialpfropfens stark reduziert und durch die Verwendung der durchgehenden Kanäle wird ein homogener Materialtransport der mobilen Phase begünstigt. Damit findet der Stofftransport durch Konvektion und nicht durch langsame Diffusion statt, was die chromatographische Effizienz insgesamt verbessert.<sup>[13,48,52]</sup>

Für die Herstellung der chromatografischen Polymermonolithe kann eine Vielzahl von Monomeren und Quervernetzer verwendet werden, wobei die Komponenten Glycidylmethacrylat (GMA) und Ethylenglykoldimethacrylat (EDMA), die 1992 von SVEC und FRÉCHET veröffentlicht wurden, die bekanntesten Beispiele sind. GMA bietet einfache und vielseitige Funktionalisierungsmöglichkeiten über eine Epoxid-Ringöffnungsreaktion und EDMA zeichnet sich durch eine geringe unspezifische Proteinadsorption aus.<sup>[43,50,51,53]</sup> Zur Steuerung der Oberflächenchemie stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, wie z.B. die direkte Copolymerisation funktioneller Monomere, die chemische Modifizierung reaktiver Gruppen und das Pfropfen der Porenoberfläche mit ausgewählten Polymerketten.<sup>[44]</sup>

Trotz der schnellen und effizienten Trennung sowie Analyse der Proben mit hohem Durchsatz ergeben sich für die Monolithchromatographie meist geringe Bindekapazitäten mit Skalierungslimitierungen, da infolge des Herstellungsprozesses die Volumina der stationären Phase begrenzt sind. Weiterhin gewährleistet der Herstellungsprozess der Monolithe vergleichbar zur Partikelpackung keine Reproduzierbarkeit der Säulen.

## Membranchromatographie

Eine weitere kosteneffiziente Alternative zu gepackten Säulen stellen Membranen dar und werden bereits zur Auftrennung und Reinigung von Proteinen und großen Biomolekülen in Downstream-Prozessen eingesetzt. Als Matrixmaterial werden meist modifizierte Cellulosemembranen oder synthetische, organische Polymermembranen verwendet, die auf ein Polymergerüst aufgebracht werden. Angelehnt an die Applikation kann dieses folgend mit gewünschten Liganden modifiziert werden.<sup>[39,42]</sup> Typischerweise werden für die Applikation mehrere Membranen in einem Membranhalter (Metall oder Kunststoff) übereinander geschichtet, wie in Abbildung 2.5 dargestellt.

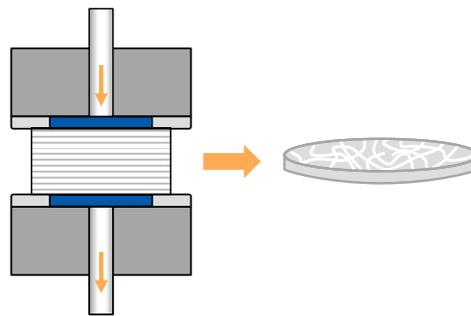


Abbildung 2.5: Aufbau einer Chromatographiesäule mit geschichteten Membranen als stationäre Phase in der Membranchromatographie.

Diese bieten vergleichbar zu Monolithen große Durchflusskanäle ( $3 - 5 \mu\text{m}$ )<sup>[54]</sup> an, wobei deren axiale Abmessung meist wenige Millimeter beträgt und basieren ebenfalls auf dem konvektiven Transport der Zielmoleküle.<sup>[12]</sup> Weiterhin zeigen Membranen ebenfalls geringere Stoffübergangswiderstände, hohe Flussraten, geringe Rückdrücke und Durchsätze, mit dem Zusatz, dass die Membranchromatographie durch das niedrige Porenvolumen weniger Ressourcen während der Anwendung verbraucht und sich besonders für den einmaligen Gebrauch eignet. Dieser bietet die Vorzüge, dass Kreuzkontaminationen verhindert werden sowie die Reinigungs- und Validierungsschritte entfallen.

Im Vergleich zu Partikeln besitzen Membranen jedoch eine geringe spezifische Oberfläche und damit nur wenige Bindungsstellen in der Matrix, was in einer geringeren Bindekapazität resultiert. Hinzu kommt ein ineffizientes Membrandesign, wo in den Halterungen zu vergleichsweise geringen Abmessungen der Membran ein hohes Totvolumen entsteht und nicht reproduzierbare Membrandicke und Porengrößenverteilung beobachtet werden.<sup>[42]</sup>

Zwar ermöglichen Monolithe und Membranen durch ihre Makrostruktur der Durchgangskanäle vor allem für große Biomoleküle ( $> 100 \text{ nm}$ ) eine bessere Bindekapazität im Vergleich zu Partikeln (Porengrößen  $\leq 100 \text{ nm}$ ), weisen jedoch gleichzeitig eine fehlende Reproduzierbarkeit der Morphologie und eine eingeschränkte Gestaltungsfreiheit, vor allem hinsichtlich der Skalierungsoptionen, auf.<sup>[32]</sup> Als Lösung dieses Problems könnte die Fertigungstechnik 3D-Druck dienen und zur Herstellung identischer Säulen führen (Abschnitt 2.2).

---

## 2.2 Additive Fertigung

---

Traditionelle Manufakturverfahren beruhen auf subtraktiver und formativer Fertigung, bei der das Material durch Schleifen, Bohren sowie maschinelle Bearbeitung abgetragen oder in vorgefertigte Formen gegossen wird.<sup>[55]</sup> Additive Fertigung, auch 3D-Druck genannt, stellt dabei eine aufstrebende Technologie in der Fertigungsindustrie dar und hat sich in den letzten Jahrzehnten in diversen Anwendungsgebieten rasant entwickelt. Durch die immense Kostenreduzierung der 3D-Drucker wird erstmal die Anwendung der Drucktechnik in privaten Haushalten ermöglicht, wodurch die Anwendungsbereiche in der Wissenschaft sowie Industrie jetzt ebenfalls auf kleine Unternehmen und die breite Öffentlichkeit ausgeweitet wurden.<sup>[56,57]</sup> Wie der Name bereits einleitet, handelt es sich hier um ein additives Fertigungsverfahren, bei dem eine digitale Konstruktion eines Objektes in einem schichtweisen Aufbau in ein greifbares 3D-Werkstück überführt wird. Im Vergleich zu herkömmlichen Bearbeitungs- oder Gussverfahren kann durch den additiven Fertigungsprozess der Materialabfall und damit die Umweltbelastung reduziert werden. Das Verfahren bietet nicht nur ein hohes Maß an Designfreiheit, wobei ebenfalls die Herstellung von Objekten mit Hohlräumen möglich ist, Individualisierung und Präzision, sondern auch eine hohe Flexibilität des Fertigungsverfahrens. Die Möglichkeit vielfältige Materialien, wie z.B. Polymere, Metalle, Keramiken und Verbundstoffe, in beliebige dreidimensionale Objekte zu verwandeln trägt zur Attraktivität des Verfahrens bei. Im Vergleich zu traditionellen Herstellungsverfahren ermöglicht der 3D-Druck weiterhin das *Rapid Prototyping* und damit das iterative Designen von zu untersuchenden Objekten, um ein schnelles Testen und Optimieren von verschiedenen Konfigurationen zu gewährleisten.<sup>[58]</sup>

Die Additive Fertigung kann in sieben Technologiegruppen unterteilt werden, welche sich durch das Material, das Aushärteprinzip sowie den Anwendungsprozess unterscheiden (Abbildung 2.6).<sup>[59]</sup>

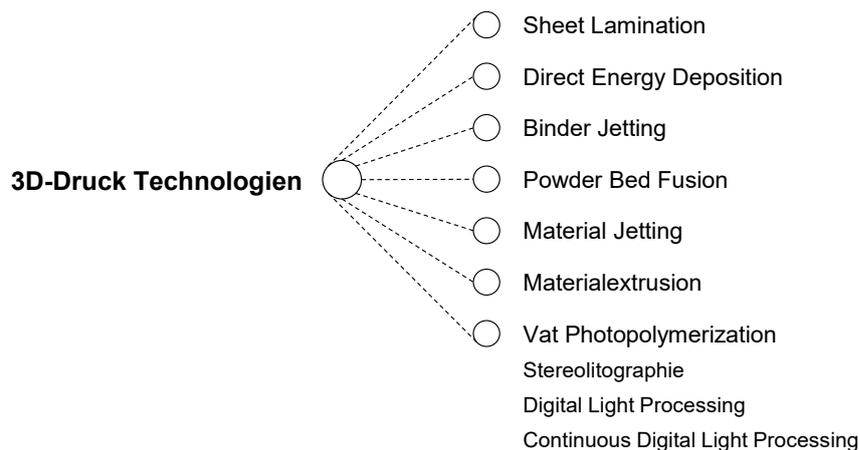


Abbildung 2.6: Einteilung der 3D-Drucktechnologien nach ISO/ASTM 52900.<sup>[59]</sup>

Für die Herstellung von polymerbasierten Materialien sind vor allem Extrusions- oder Schmelztechniken wie das *Fused Deposition Modeling* (FDM) und *Selective Laser Sintering* (SLS)

---

gängige Methoden. Diese Verfahren weisen jedoch Nachteile wie eine vergleichsweise geringe Auflösung, eine schwache Haftung der einzelnen Schichten sowie eine langsame Verarbeitung auf. Im Gegensatz dazu ermöglichen lichtbasierte Verfahren eine Verbesserung der Druckauflösung und der Produktionsgeschwindigkeit aufgrund der außergewöhnlichen räumlichen Kontrolle und Vielseitigkeit der Photopolymerisationsreaktionen. Dabei stellt unter den genannten 3D-Drucktechnologien die im Jahre 1986 von CHUCK HULL patentierte Stereolithographie die erste kommerziell genutzte Methode dar.<sup>[57,60]</sup>

---

### 2.2.1 Digital Light Processing

---

Diese Arbeit richtet sich auf den 3D-Druck von photopolymerbasierten Systemen aus. Zur Herstellung von dreidimensionalen Objekten aus Polymeren mit Zuhilfenahme einer Lichtquelle kann die *Vat Photopolymerisation* (Wannenphotopolymerisation) eingesetzt werden, welche vor allem auf den beiden additiven Fertigungstechnologien Stereolithographie (SLA) und *Digital Light Processing* (DLP) basiert. Letztere besitzt eine Weiterentwicklung zur Ermöglichung des kontinuierlichen 3D-Drucks. Bei beiden Verfahren wird eine flüssige Harzformulierung schichtweise mit einer UV-Lichtquelle zu einem festen Objekt ausgehärtet. Der wesentliche Unterschied zwischen SLA und DLP besteht in der eingesetzten Lichtquelle. Während beim SLA-Verfahren ein Laserstrahl zur punktuellen Aushärtung des Materials eingesetzt wird, bedient sich die DLP-Technologie eines digitalen Projektors, welcher das Lichtmuster einer gesamten Schicht in einer einzigen Belichtung aushärtet. Dadurch ermöglicht der DLP-Prozess einen schnelleren Druck als die SLA-Technologie. Der Aufbau einer kontinuierlichen Struktur aus einem Photopolymer mit der Zuhilfenahme eines Lichtstrahls in einer Maschine wurde bereits 1977 von SWAINSON in Form eines Patentes beschrieben. Allgemein lässt sich der 3D-Druckprozess in drei Phasen unterteilen<sup>[61]</sup>:

1. Entwicklungsphase
  - a. Computergestütztes Designen (CAD: engl. *Computer Aided Design*) eines digitalen dreidimensionalen Modells
  - b. Erstellen der 3D-Datenaustauschinformation
  - c. Überführen der 3D Information in vom 3D-Drucker lesbaren 2D-Schichtbilder
2. Schichtweiser 3D-Druckprozess
3. Nachbearbeitungsphase
  - a. Entfernung der Stützstruktur
  - b. Entfernung von nicht polymerisiertem Material
  - c. Oberflächenbehandlung

Das Funktionsprinzip des DLP-3D-Druckers ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Die wesentlichen Bestandteile des 3D-Druckers stellen eine in z-Achse verfahrbare Bauplattform, auf der das finale Objekt polymerisiert, ein Wannenbehälter (*Vat*) für die flüssige Photoharzformulierung und ein digitaler Projektor für die Projektion der 2D-Schichtbilder dar. Nach dem Startvorgang des Druckprozesses verfährt die Druckplattform in Richtung des Wannenbodens und lässt einen

Spalt einer definierten Schichthöhe zwischen Plattform und Wanne. Wird auf die Oberfläche des Harzes ein Lichtmuster projiziert, so kommt es in Folge der Lichteinwirkung zur Photopolymerisationsreaktion und der belichtete Bereich härtet an der Bauplattform aus. Das projizierte Muster stellt dabei eine 2D-Querschnittschicht des gewünschten Objektes in Form eines Schwarzweißbildes dar. Nach dem Aushärten einer Querschnittschicht verfährt die Bauplattform um eine weitere Schichthöhe vom Wannenboden weg, damit eine neue Harzschicht der Lichtquelle ausgesetzt werden kann und an der ersten polymerisierten Schicht haftet. Dieser Vorgang wiederholt sich Schicht für Schicht, bis das finale Objekt fertiggestellt ist. Da nach dem Druckprozess keine vollständige Umsetzung des Monomers-Quervernetzer-Systems im Polymer vorliegt, erfolgt vor allem im Hinblick auf die mechanischen Eigenschaften eine zusätzliche Nachhärtung des Objektes mit intensiven UV-Licht.

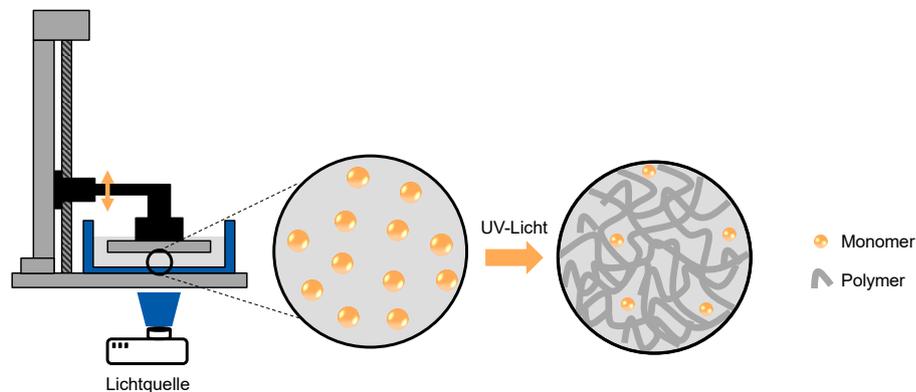


Abbildung 2.7: Aufbau und Funktionsprinzip eines DLP-3D-Druckers.

## 2.2.2 Photopolymerisation und Photoharz

Der DLP-3D-Druckprozess kann auf der radikalischen oder kationischen Polymerisation der Photoharzformulierungen basieren. Die hohen Initiierungsraten, die Reaktionsführung bei Raumtemperatur und die selektive Kontrolle der photoinitierten Polymerisation tragen zu deren Attraktivität für die Anwendung im 3D-Druckprozess bei.

Je nach Anwendungsgebiet kann das Photoharz maßgeschneidert an die gegebenen Anforderungen angepasst werden. Eine photopolymerisierbare Harzformulierung setzt sich typischerweise aus einer Kombination der in Abbildung 2.8 gezeigten Komponenten zusammen.<sup>[61,62]</sup>

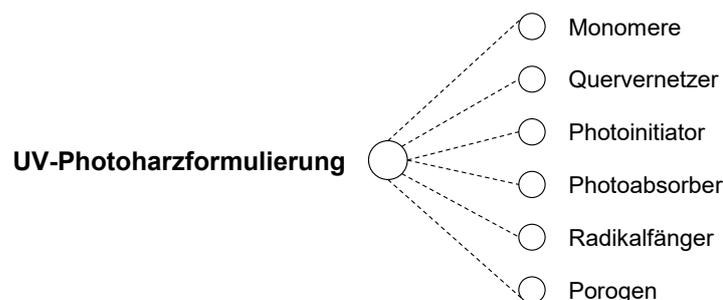
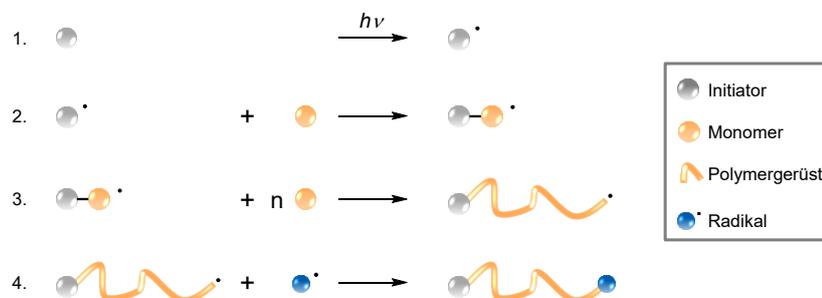


Abbildung 2.8: Bestandteile einer Photoharzformulierung für eine radikalbasierte Polymerisation im 3D-Druckprozess.

Die grundlegenden Schritte der radikalischen photoinduzierten Polymerisation sind in Schema 2.1 dargestellt. Zu Beginn der Reaktion führt die Bestrahlung des Initiators mit UV-Licht zur Ausbildung von aktiven Radikalen (1). In Abhängigkeit des eingesetzten Initiatorsystem werden diese durch eine homolytische Spaltung, eine Elektronenübertragung oder eine Wasserstoffabstraktion erzeugt. Diese können im nächsten Schritt ein naheliegendes Monomer angreifen und damit das Kettenwachstum bzw. die Vernetzungsreaktion starten (2). Hier reagieren die Radikale unter Ausbildung einer kovalenten Bindung und erzeugen gleichzeitig neue Radikale. In der Propagation werden an die wachsenden Polymerketten weitere Monomer- bzw. Quervernetzereinheiten angebunden und damit ein dreidimensionales Polymernetzwerk ausgebildet (3). Hier kann es ebenfalls zur so genannten Kettenübertragung kommen, wo durch die homolytische Abstraktion eines Wasserstoffatoms eine Polymerkette terminiert wird, während ein neues Radikal entsteht. Die Terminierung der Polymerisation kann entweder durch die Rekombination aus zwei Polymerketten oder durch eine Disproportionierung erfolgen, wo ein Wasserstoffatom von einer Polymerkette auf eine andere übertragen wird (4).<sup>[63,64]</sup>



Schema 2.1: Mechanismus der photoinduzierten radikalischen Polymerisation mit den Elementarschritten der Initiation, Propagation und Terminierung.

Die Zusammensetzung des Harzes ist dabei ausschlaggebend für die finalen optischen, chemischen sowie physikalischen Eigenschaften des 3D-gedruckten Objektes. Daher werden bei der Wahl der geeigneten Komponenten verschiedenen Anforderungen an diese gestellt.

## Photoinitiator

Der Photoinitiator leitet die Polymerisationsreaktion ein und wird im 3D-Druckprozess durch die Einwirkung von UV-Licht aktiviert. Hier absorbiert der Initiator Lichtenergie und erzeugt frei Radikale oder Kationen als aktive Spezies und wird damit in das fertige Polymer eingebaut. Da eine Reaktion nur unter Lichteinfluss stattfindet, eignen sich diese hervorragend für eine selektive, schnelle und kontrollierte Aushärtung eines Harzes.<sup>[65,66]</sup> Dabei kann zwischen zwei Arten von Initiatoren unterschieden werden: Bei Typ-I-Initiatoren kommt es infolge des Lichteinfalls zur homolytischen  $\alpha$ -Spaltung, während Typ-II-Initiatoren nur unter Einsatz eines Co-Initiators zur Bildung von Radikalen in der Lage sind. Im direkten Vergleich ermöglichen die Typ-I-Initiatoren bereits bei geringer Wellenlänge eine Photopolymerisation, was vor allem im Hinblick auf farbloses Chromatographiematerial vorteilhaft ist. Des Weiteren findet, bedingt durch die bimolekulare Reaktion, die Initiierung mit einem Typ-II-Initiator langsamer statt als mit einem Typ-I-Initiator.<sup>[67,68]</sup>

---

Die Wahl eines geeigneten Initiators hängt dabei vor allem von der späteren Anwendung, der Wellenlänge des eingesetzten UV-Lichtes und den restlichen Komponenten der Harzformulierung ab. Typische auf Photopolymerharzen basierte 3D-Drucker arbeiten im Wellenlängenbereich von 355 – 405 nm, sodass der gewählte Initiator in diesem Bereich eine hohe Absorption und gleichzeitig eine hohe Initiierungseffizienz aufweisen sollte.<sup>[61]</sup> Da in der Chromatographie ebenfalls die optischen Eigenschaften des Materials eine Rolle spielen, sollte bei der Wahl eines Photoinitiators dessen Einfluss auf eine Färbung des Materials berücksichtigt werden.<sup>[69]</sup> Abhängig von der Wellenlänge der Lichtquelle des 3D-Druckers finden diverse UV-lichtempfindliche Photoinitiatoren Anwendung im 3D-Druck.<sup>[70]</sup> Typische Initiatoren, die Einsatz im DLP-Druckprozess bei Wellenlängen von 385 nm finden, stellen die reaktiven Phosphinoxide wie Phenyl-bis-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid (BAPO) oder Diphenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid (TPO) dar. Diese gehören den Typ-I-Initiatoren an, bei denen es zur photochemischen Spaltung der Phosphor-Kohlenstoff-Bindung kommt.<sup>[65,68-70]</sup>

### Monomere und Quervernetzer

Der wesentliche Bestandteil der Harzformulierung und letztendlich des Polymergerüsts stellen Monomere und Quervernetzer dar, welche mindestens eine funktionelle Gruppe tragen, die an der Polymerisation beteiligt ist. Als Funktionalität kommen hier Methacrylat-, Acrylat- oder auch Vinylgruppen in Frage. Im Hinblick auf die Stabilität des Materials gegenüber alkalischen Bedingungen bieten sich vor allem Methacrylat-basierte Photoharze als Chromatographiematerial an, auch wenn Acrylate eine höhere Reaktivität aufweisen.<sup>[71]</sup> Vinylgruppen zeigen hier die geringste Reaktivität in der Polymerisationsreaktion.<sup>[72]</sup>

Die monofunktionellen Monomere tragen dabei die für die spätere Anwendung relevante Funktionalität und führen zur Reduzierung der Viskosität der Harzformulierung. Der Anteil des Monomers in der Endrezeptur ist dabei zum einen für die Flexibilität des Polymers relevant, da mit höherer Monomerkonzentration längere Ketten entstehen können. Dies verringert vor allem das Risiko von Rissen im Endprodukt. Zum anderen wirkt sich das Monomer auf die Aushärtezeit der Harzformulierung aus, da mehr Bindungen für ein stabiles Polymernetzwerk geschaffen werden müssen.<sup>[63]</sup> Um ein vernetztes Polymergerüst mit guten mechanischen Eigenschaften und geringer Schrumpfung aufzubauen, ist der Einsatz von multifunktionellen Quervernetzer im 3D-Druck unerlässlich. Eine hohe mechanische Stabilität ist notwendig, damit das Material in der späteren Anwendung hohen Drücken und Fließgeschwindigkeiten standhalten kann. Hier werden mit höherer Quervernetzerkonzentration mehr Vernetzungspunkte ausgebildet und damit die Steifigkeit des Polymers erhöht. Gleichzeitig können langkettige, lineare Quervernetzer oder sterisch anspruchsvolle Monomere die Vernetzung reduzieren und damit die Steifigkeit minimieren.<sup>[63,73]</sup> Vor allem im Hinblick auf den hydrophilen Charakter des Chromatographiematerials und der wässrigen Arbeitsumgebung muss eine ausreichende mechanische Stabilität mit dem gewählten Monomer-Quervernetzer-System ermöglicht werden.

---

## UV-Absorber

Neben der Grundrezeptur eines Photoharzes, bestehend aus einem Photoinitiator und einem Monomer-Quervernetzer-System, bieten sich weitere Additive vor allem zur Optimierung der Druckauflösung der Harzformulierung an. Hierzu gehören sogenannte UV-Absorber, welche in der Lage sind, das UV-Licht zu absorbieren und damit die Eindringtiefe des Lichtes im Material zu steuern. Damit konkurrieren diese mit dem Initiator im Hinblick auf die Lichtabsorption.

Bei der Wahl eines geeigneten UV-Absorbers für die gewählte Harzformulierung sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen. GONG et al. (2017) zeigten für verschiedene UV-Absorbers ein Bewertungssystem im Hinblick auf deren Eignung für das gewählte Harz. Der UV-Absorber sollte im Wellenlängenbereich der Lichtquelle des 3D-Druckers eine hohe Absorption aufweisen, eine ausreichende Löslichkeit im Monomersystem besitzen und, vor allem im Hinblick auf die spätere Applikation, den 3D-Druck von kleinen Kanalgrößen ermöglichen.<sup>[74]</sup> Damit werden durch den UV-Absorber die Auflösung in  $z$ -Richtung gesteuert und geringe Schichtdicken von bis zu 5  $\mu\text{m}$  realisiert.

## Inhibitor

Ein weiteres Additiv stellt der sogenannte Inhibitor bzw. Radikalfänger dar. Wie der Name bereits impliziert, sind Inhibitoren in der Lage frei Radikale zu binden. Damit kann das Polymer gegen Umwelteinflüsse stabilisiert, die Lagerstabilität des flüssigen Photoharzes verlängert und gleichzeitig eine unerwünschte Polymerisation verhindert werden. Infolgedessen kann die selektive Polymerisation und damit die Druckauflösung im 3D-DLP-Druckprozess in  $xy$ -Richtung optimiert werden.<sup>[75,76]</sup>

---

### 2.2.3 Herausforderungen des 3D Drucks

---

Trotz des immensen Potenzials des 3D-Drucks von photopolymerbasierten Systemen sind die mit dem Fertigungsverfahren einhergehenden Herausforderungen, vor allem bei der Herstellung von porösen Strukturen für die Chromatographie, nicht zu vernachlässigen. Um die Technologie in den Trennungswissenschaften etablieren zu können, müssen die zwei wesentlichen Herausforderungen einer unzureichenden Druckauflösung und des Mangels eines sowohl für den 3D-Druck als auch für die Anwendung in der Chromatographie geeigneten Materials überwunden werden.

#### Unzureichende Druckauflösung

Eine wichtige Anforderung an das Fertigungsverfahren für stationäre Phasen stellt eine hohe Auflösung des gedruckten Objektes dar. Die Auflösung hängt dabei zum einen vom gewählten Photoharz und zum anderen vom 3D-Drucker selbst ab.<sup>[77]</sup>

Die Druckauflösung beim DLP-Druckprozess hängt von der gewählten Schichtdicke ( $z$ -Ebene) und der Pixelgröße des DLP-Projektors in der zweidimensionalen Flächendimension ( $xy$ -Ebene), welche das kleinstmögliche druckbare Merkmal darstellt, ab. Kommerziell

erhältliche 3D-Drucker ermöglichen Schichtdicken im Bereich von 5 – 500  $\mu\text{m}$ . Da die Druckzeit beim DLP-Druckprozess wesentlich von der Bauhöhe des Objektes und der Anzahl der Querschnitte abhängt, nimmt die Druckzeit mit einer geringen Schichtdicke deutlich zu. Um eine hohe  $z$ -Druckauflösung mit nahtlos ineinander übergehenden Schichten zu erhalten und gleichzeitig die Druckzeit zu reduzieren, kann hier das sogenannte kontinuierliche DLP-Verfahren (CDLP, engl.: *Continuous DLP*), auch CLIP-Verfahren (engl.: *Continuous Liquid Interface Production*) genannt, eingesetzt werden. Der Aufbau des CDLP ist zunächst analog zum normalen DLP-Drucker, mit dem Unterschied, dass sich unter dem Harz eine sauerstoffdurchlässige Membran befindet. Der Sauerstoff kann in die ersten Mikrometerschichten des Harzes eindringen und dort in der sogenannten Totzone die Polymerisation hemmen, so dass das gebildete Polymer nicht am Wannenboden haften bleibt. Damit kann der 3D-Druckprozess nicht schichtweise mit Abreisprozessen des polymerisierten Materials, sondern in einer kontinuierlichen Bewegung der Bauplattform erfolgen (Abbildung 2.9).<sup>[78]</sup>

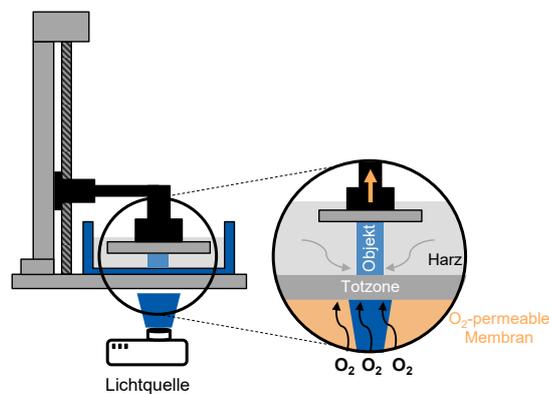


Abbildung 2.9: Aufbau und Funktionsprinzip eines CLIP-3D-Druckers.

Abhängig von der Chromatographietechnik und der Anwendung (analytisch oder präparativ) kann die Partikelgröße in der Festbettchromatographie zwischen  $\leq 5 \mu\text{m}$  und  $300 \mu\text{m}$ <sup>[37]</sup> liegen. Damit 3D-gedruckte stationäre Phasen eine gute Alternative zu herkömmlichen Partikeln bieten, sollten die Größenordnungen vergleichbar sein können. Kommerzielle 3D-Drucker zeigen mit Pixelgrößen von 15 – 100  $\mu\text{m}$  Größenbereiche, die ähnlich zu Materialien der präparativen Chromatographie sind. In Untersuchungen zu hochauflösenden Polymeren konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die theoretische Pixelgröße nicht mit den praktisch druckbaren Auflösungen deckt. Hier wurden von der nominalen Auflösung der Drucker fünf Pixel als kleinstmöglich druckbares Merkmal erzielt, bei dem eine mechanisch stabile Polymerschicht ermöglicht wird. Auf die Abweichung der druckbaren Auflösung haben ebenfalls Lichtstreuungseffekte einen Einfluss.<sup>[79,80]</sup> Damit realisieren die in dieser Arbeit verwendeten DLP-3D-Drucker mit der Pixelgröße von 30 – 50  $\mu\text{m}$  Strukturen mit der maximalen Auflösung von etwa 150 – 250  $\mu\text{m}$ .

Ein hochauflösendes 3D-Druckverfahren für die Herstellung von Mikrostrukturen stellt die Zwei-Photonen-Lithographie (TPL) dar. Die Intensitäten des Laserstrahls liegen dabei geringfügig oberhalb der Polymerisationsschwelle und ermöglichen damit eine lokale Polymerisation, mit Merkmalen kleiner als der projizierte Laserstrahlpunkt, im

---

Nanometerbereich. Zu beachten ist, dass die hohe Druckauflösung mit einer deutlich reduzierten Druckgeschwindigkeit, Materialvielfalt und Baugröße einhergeht.<sup>[81]</sup> Wird das steigende Interesse an der Additiven Fertigungstechnik und die stetige Weiterentwicklung sowie Optimierung der Systeme berücksichtigt, so ist die Verwirklichung hochauflöser 3D-gedruckter stationärer Phasen unabdingbar.

Neben der Druckauflösung des 3D-Druckers ist ebenfalls die Materialauflösung ausschlaggebend für die Qualität des gedruckten Materials. Mit dem Zusatz von Additiven lässt sich die Materialauflösung, wie in Abschnitt 2.2.2. beschrieben, optimieren. Photoabsorber können die Schichtdicken reduzieren, während Inhibitoren die Überpolymerisation inhibieren. Gleichzeitig kann sich der übermäßige Zusatz der Additive infolge der Lichtstreuung jedoch negativ auf die Auflösung auswirken. Eine für das Druckverfahren geeignete und gleichzeitig hochauflösende Harzformulierung zu finden, stellt die zweite große Herausforderung der Manufakturtechnik dar.

### **Geringe Auswahl an hochauflösenden Materialien**

Obwohl der 3D-Druckmarkt ein breites Angebot an druckbaren Materialien für vielfältige Anwendungen bietet, ist dieses im Vergleich zu herkömmlichen Fertigungsmethoden dennoch begrenzt. Vor allem im Hinblick auf hochauflösende Materialien, welche den Anforderungen im Anwendungsfeld der Chromatographie gerecht werden müssen. In den meisten Fällen fehlt jegliche Information über die Zusammensetzung der kommerziellen Harze, dazu gehört insbesondere die Oberflächenchemie im Material (funktionelle Gruppen oder Liganden), die für die chromatographische Trennoperation genutzt werden können. Weiterhin sind 3D-gedruckte Materialien in Folge des Photopolymerisationsprozesses und der mechanischen Stabilität der gedruckten Schichten stark quervernetzt und verfügen ohne den Einsatz von Porenbildnern über keine Porenstruktur vergleichbar zu hochporösen Partikeln. Damit werden nicht nur geeignete Drucktechniken, sondern auch geeignete Photoharze benötigt, um den 3D-Druck in Mikrometerskalen zu realisieren.<sup>[5]</sup>

Um den 3D-Druck von chromatographischen Materialien mit bestehenden Materialien dennoch zu ermöglichen, können drei wesentliche Ansätze angewandt werden.<sup>[82]</sup>

1. 3D-Druck mit kommerziellen Harzformulierungen
2. 3D-Druck und Funktionalisierung
3. Negative Templierung

Der grundlegendste Ansatz stellt den Einsatz kommerziell verfügbarer Materialien dar, die bereits inhärente Trenneigenschaften aufweisen. Damit würde die Forschung und Entwicklung für ein Grund auf neues Material wegfallen, wobei der große Nachteil einer nicht vollständigen Kenntnis über die Materialzusammensetzung bestehen würde. Dieser wirkt sich vor allem auf die Trennoperationen aus, die auf hydrophoben- oder Affinitätswechselwirkungen beruhen. MACDONALD et al. zeigten 2017 mit dem kommerziellen, hochtransparenten UV-Harz *Veroclear-RGD810* den SLA-Druck von nicht modifizierten Dünnschichtchromatographieplattformen zur

---

Auftrennung verschiedener Farbstoff- und Proteinmischungen.<sup>[83]</sup> Um diesen Ansatz erfolgreich für den Einsatz in der Chromatographie zu verfolgen, bedarf es jedoch einer vollständigen Materialcharakterisierung.

Sind die Materialzusammensetzung und die zur Verfügung stehenden Funktionalitäten jedoch bekannt, so kann dieses dazu genutzt werden, geeignete stationäre Phasen mit anschließender Modifizierung herzustellen. Über die Modifizierung können abhängig von der gewünschten Applikation verschiedene chromatographische Liganden in das Material eingeführt werden. Ein bekanntes Beispiel für diesen Ansatz stellt die Verwendung von Cellulose oder Agarose als Chromatographiematerial dar, wobei die Hydroxyleinheiten als Modifizierungspunkte für mögliche Liganden dienen können. Diese Strategie wurde z.B. von HINAMOTO et al.<sup>[84]</sup> und von FEE et al.<sup>[85]</sup> bereits genutzt und ist für die derzeitigen Herstellung von chromatographischen Medien etabliert. Durch diesen Ansatz entsteht durch die anschließende Funktionalisierung des Materials zwar ein zusätzlicher Herstellungsschritt, der jedoch die Nutzung der Ausgangsmatrix als universell modifizierbare stationäre Phase ermöglicht. Damit können mit einem Basismaterial und verschiedenen Modifizierungsreaktionen diverse Chromatographietechniken abgedeckt werden.

Eine andere Herangehensweise zur Herstellung komplexer chromatographischer Materialien stellt die Negative Templierung dar, die vor allem den Einsatz von nicht oder nur schwer druckbaren Materialien ermöglicht. Bei diesem Verfahren wird statt dem direkten Druck der stationären Phasen deren Negativ mit einem auflösbaren Druckmaterial (z.B. wasserlöslich) erstellt. Im nächsten Schritt wird das Negativ mit der stationären Phase gefüllt, ausgehärtet und zuletzt das Negativ mit einem geeigneten Lösungsmittel entfernt. Dieses darf dabei keinen Effekt auf die stationäre Phase haben. FEMMER et al. nutzten diesen Ansatz zur Herstellung von Membranen mit dreidimensionalen TPMS-Strukturen (engl.: *Tripily Periodic Minimal Surface*) aus Polydimethylsiloxan für einen selektiven Gastransport. Diese Methode macht die Herstellung der Medien zu einem mehrstufigen Prozess.<sup>[86]</sup>

Einen weiteren Ansatz für die Anwendung des 3-Druck in dem Themenfeld der Chromatographie, der jedoch keinen direkten Druck einer stationären Phase beinhaltet, stellt die Herstellung von chromatographischen Säulengehäusen z.B. aus Metallen oder Glas<sup>[87]</sup> dar. Dabei können kundenspezifische Gehäuse mit diversen Geometrien gedruckt und anschließend mit kommerziellen Partikeln<sup>[88]</sup> oder Monolithen<sup>[89,90]</sup> ausgefüllt werden. PASSAMONTI et al. konnten damit Poly(Styrol-co-Divinylbenzol)-Monolithe in mit selektivem Laserschmelzen gedruckten Titansäulen herstellen und diese zur Proteinauftrennung nutzen.<sup>[91]</sup> GUPTA et al. untersuchte mit dieser Methode über poröse Poly(Butylmethacrylat-co-Ethylendimethacrylat)-Monolithe den Einfluss der Säulengeometrie (2D-Serpentinen-, 3D-Spiral- sowie 3D-Serpentinsäulen) auf die Proteinseparation.<sup>[90]</sup>

Trotz der Herausforderungen der Druckauflösung und des Materialmangels arbeiten Forscher aktiv daran, die Grenzen des 3D-Drucks von chromatographischen Materialien zu überwinden. Die Möglichkeit, stationäre Phasen mit maßgeschneiderten Eigenschaften mithilfe der 3D-Drucktechnologie zu entwerfen und anzupassen, birgt ein großes Potenzial für die Weiterentwicklung der Chromatographie, die schnelle Herstellung von Prototypen neuer stationärer Phasen und die Lösung spezifischer Trennprobleme. Da sich das Gebiet des 3D-

Drucks weiterentwickelt, ist es wahrscheinlich, dass viele dieser Herausforderungen durch weitere Forschung und Innovation gelöst werden.

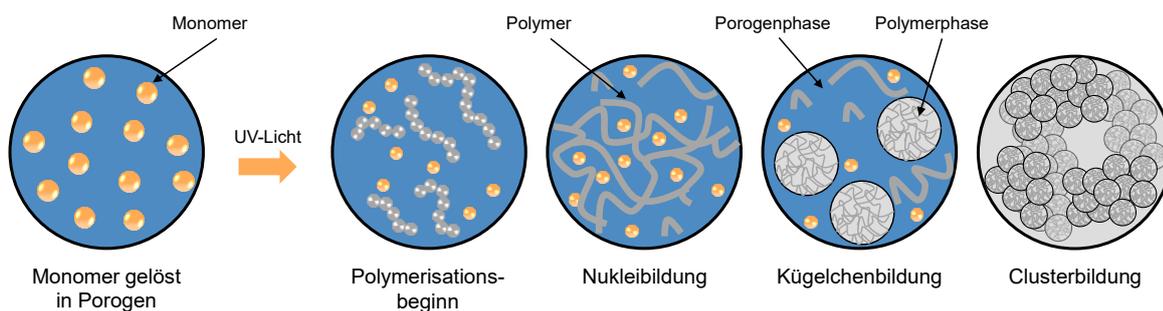
## 2.3 Poröse 3D-gedruckte Polymere in der Chromatographie

Die Technologie des 3D-Druckes stellt ein neues Verfahren im Bereich der Chromatographie dar. Eine hohe spezifische Oberfläche ist vor allem für den Separationsmechanismus relevant und kann mit Hilfe einer Phasentrennung realisiert sowie durch die Kontrolle der Porengröße maßgeschneidert werden. Die funktionellen Gruppen am 3D-gedruckten Polymer ermöglichen weiterhin eine Postfunktionalisierung des Materials, um dieses für die spätere Applikation z.B. in der IEX oder AC anzupassen.

### 2.3.1 Porogentempierung zur Herstellung poröser Polymere

Ein weitverbreitetes Verfahren zum Einführen von Poren in Polymerpartikel, Membranen oder auch Monolithen stellt die sogenannte *Polymerization-induced phase separation* (PIPS) dar.<sup>[92]</sup> Bei diesem bereits in den 1950er<sup>[93]</sup> entwickelten Verfahren wird auf das Phänomen der spontanen Phasentrennung in Folge der Abnahme der Löslichkeit der wachsenden Polymerketten während dem Polymerisationsprozess in einem inerten Lösungsmittel zurückgegriffen. Als Lösungsmittel dienen sogenannte Porogene, welche neben der Inertie gegenüber der Reaktionsmischung ebenfalls Kompatibilität zu der Polymerisationsmethode aufweisen müssen. Für den Einsatz im 3D-Druckprozess sollte das Porogen farblos sein, um den photoinduzierten Polymerisationsprozess nicht zu beeinflussen.<sup>[94]</sup>

Der Mechanismus der polymerisationsinduzierten Phasenseparation ist in Schema 2.2 dargestellt.



Schema 2.2: Mechanismus der polymerinduzierten Phasenseparation (PIPS) einer Photoharzformulierung mit Einsatz eines Porogens.

Zu Beginn wird eine homogene Mischung aus dem inerten Porogen und der monomerhaltigen Harzformulierung vorgelegt. Daraufhin wird die Polymerisation mit einer Temperaturerhöhung oder im Falle des 3D-Druckprozesses mit der Initiierung durch UV-Licht eingeleitet. Die wachsenden Polymerketten bilden Nuklei aus, welche für die Monomere im Gegensatz zum

---

Porogen ein thermodynamisch besseres Lösungsmittel darstellen. Mit der höheren Monomerkonzentration in den Nuklei wird die Polymerisation dort kinetisch bevorzugt. Die Keime wachsen zu Kügelchen (Globuli) heran, wobei sich die weiteren wachsenden Polymerketten an die Kügelchen anlagern. Da diese im Porogen nicht mehr löslich sind, erfolgt eine Phasentrennung in polymerreiche und lösungsmittelreiche Phasen. Letztere stellen im Nachgang die Poren des Systems dar. Die polymerreichen Phasen vernetzten schlussendlich untereinander und aggregieren zu einem Clusternetzwerk. Die Entfernung des Porogens führt zu einer porösen Struktur mit Porengrößen der Längenskala der phasentrennenden Domänen.<sup>[53,93,95,96]</sup>

Dabei ist neben der Wahl der Quervernetzer sowie Monomere ebenfalls die Wahl des Porogens und damit einhergehend dessen Qualität als Lösungsmittel für das Einstellen der Porengröße essenziell.<sup>[93]</sup> Zur Bewertung der Löslichkeit eines Porogens bzw. der Kompatibilität des Porogens und des Polymers können die sogenannten HANSEN-Löslichkeitsparameter (HSP) herangezogen werden. Diese wurden 1979 von HANSEN eingeführt und setzen sich aus einem dispersen, polaren und Wasserstoffbrückenanteil zusammen.<sup>[97,98]</sup> Ein geeignetes Porogen für das untersuchte Harzsystem besitzt einen zum Polymer äquivalenten HSP. Stellt das Porogen ein gutes Lösungsmittel dar, so erfolgt die Phasentrennung erst bei hohen Vernetzungsgraden. Hier bilden sich in Folge der geringen Diffusionsgeschwindigkeit kleine Domänen der Lösungsmittelphase und daraus resultierend Mikro- bis Mesoporen in der Struktur mit hoher spezifischer Oberfläche aus. Nimmt die Löslichkeit jedoch ab, kommt es zu einer frühen Phasentrennung und damit zur Ausbildung eines schwachvernetzten Systems. Durch die höhere Diffusionsgeschwindigkeit des Porogens können sich große Porogendomänen und damit Makroporen im System von geringerer spezifischer Oberfläche ausbilden. Damit gilt der Trend: Je größer der Unterschied der Löslichkeitsparameter zwischen dem gebildeten Polymer und dem Porogen ist, desto geringer ist deren thermodynamische Affinität und damit einhergehend, desto stärker der Effekt der stattfindenden Phasentrennung. Neben der Löslichkeit des Polymers im Porogen ist ebenfalls dessen Anteil in der finalen Reaktionsmischung einflussgebend auf die resultierende Porengröße. Mit höherem Lösungsmittelanteil können sich größere polymerarme Domänen und damit größere Poren ausbilden, was jedoch in einer kleineren spezifischen Oberfläche resultieren kann.<sup>[96-99]</sup>

Anhängig von der gewählten Harzformulierung und der gewünschten Porengröße finden verschiedenste Porogene Anwendung in der Herstellung von porösen Materialien. Bekannte Porogene stellen hier organische Lösungsmittel wie die Alkohole Cyclohexanol, Dodecanol<sup>[100]</sup> oder 1,4-Butandiol<sup>[101]</sup> oder sogar Salze<sup>[49]</sup> dar. Werden als Porogene Polymere oder Oligomere wie Polyethylenglykol<sup>[51,46,102]</sup>, Poly(ethylenoxid)<sup>[103]</sup>, Poly(methylmethacrylat) oder Polystyrol eingesetzt, so können sich infolge einer frühen Phasentrennung Makroporen > 1 µm ausbilden. Hier kann es jedoch zu einer erschwerten Extraktion der langkettigen Polymere kommen.<sup>[104]</sup>

### 2.3.2 Funktionalisierungsmethoden poröser Polymere

Die Oberflächenchemie der stationären Phase spielt eine entscheidende Rolle bei der Interaktion und Trennung der Analyten im chromatographischen Prozess. Um die gewünschte Funktionalität in das 3D-gedruckte Objekt einführen zu können, erschließen sich zwei signifikante Wege. Zum einen lässt sich über die Wahl des Monomers die funktionelle Gruppe direkt während Druckprozesses über die Copolymerisation ins Polymergerüst einbauen. Obwohl dieser Ansatz die einfachste Syntheseroute darstellt, muss für jedes neue Monomer in der Harzrezeptur die gesamte Synthese angepasst werden. Neben einer neuen Validierung des Porogensystems für die gewünschte Materialporosität müssen die Druckparameter für die Polymerisation neu ermittelt werden. Weiterhin ergibt sich der Nachteil, dass sich die Funktionalität nicht nur an der zugänglichen Oberfläche, sondern ebenfalls im Inneren des Polymernetzwerkes finden lässt. Je nach funktioneller Gruppe können spätere Quellungseffekte oder Nebenreaktionen in der Applikation eintreten und damit Einfluss auf die Performanz der chromatographischen Operation haben. Die ineffiziente Nutzung der funktionellen Gruppen könnte zur Limitierung teurer Monomere führen. Zum anderen kann nach dem 3D-Druckprozess das feste Material im Folgeschritt gezielt an der Oberfläche postfunktionalisiert werden. Damit ergibt sich neben dem Vorteil von vermeidbaren Nebenreaktionen im Gerüst des Polymers weiterhin der Vorzug von universell anpassbaren Chromatographiesäulen in Abhängigkeit von der angeforderten Anwendung mit nur einer einzigen Harzrezeptur. Folglich können mit einer optimierten Harzrezeptur Chromatographiesäulen 3D-gedruckt und anschließend über diverse Funktionalisierungsreaktionen individuell für die spätere Applikation angepasst werden. Mögliche funktionelle Gruppen für eine einfache Modifizierung der Polymermatrix nach dem 3D-Druckprozess sind in Abbildung 2.10 dargestellt und finden bereits Anwendung in der Partikelsynthese.<sup>[37]</sup>

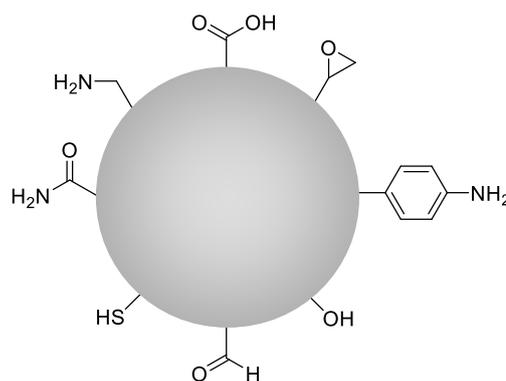
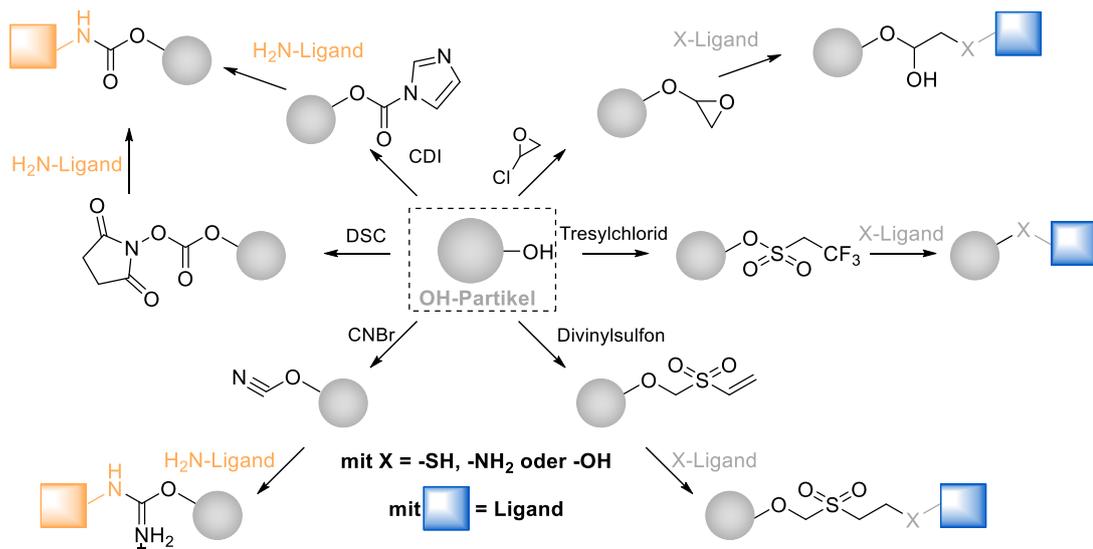


Abbildung 2.10: Gängige funktionelle Gruppen an Partikeln für die Kupplung von z.B. Proteinen oder anderen Liganden.<sup>[37]</sup>

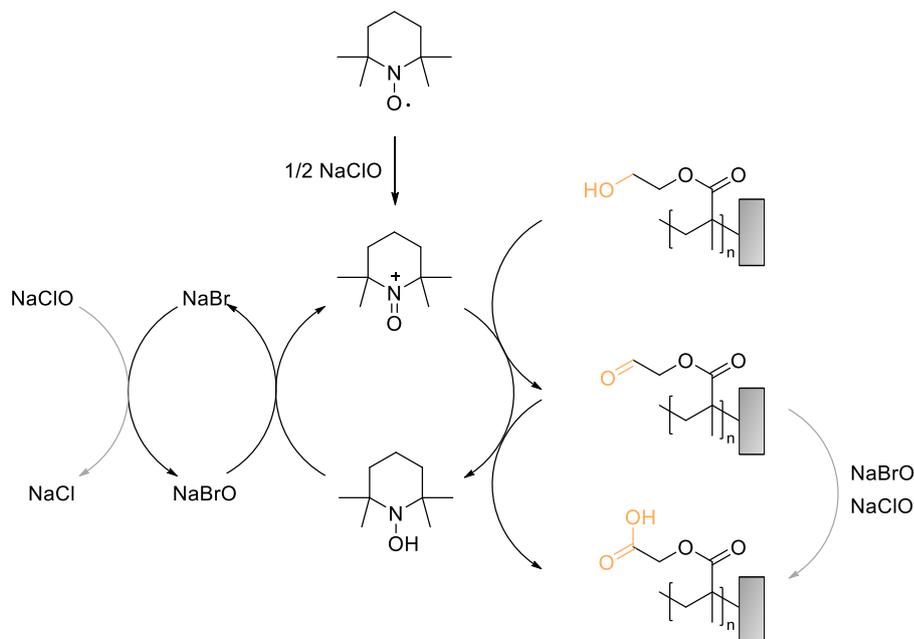
In dieser Arbeit wird die Hydroxylgruppe über das Monomer 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) als Ankerpunkt in der Harzformulierung gewählt, welche im Anschluss in einer chemischen Reaktion in Epoxy-, Amin-, Carboxy-, Sulfon- etc. Funktionalitäten umgesetzt werden kann. Mögliche Reaktionen sind in Schema 2.3 dargestellt.



Schema 2.3: Mögliche Funktionalisierungsreaktionen ausgehend von der Hydroxylgruppe an z.B. Partikel bis hin zur Ligandenkopplung.<sup>[37]</sup>

Die Vielfalt an Reaktionen, die die Hydroxylgruppe eingehen kann, macht sie besonders für die Anwendung in einer universellen Harzformulierung interessant. Eine mögliche Reaktion zur Umsetzung einer primären Hydroxylgruppe in eine Carboxylgruppe, um negative Oberflächenladungen in die 3D-gedruckten Chromatographiesäulen einzuführen und diese damit in Kationentauscher zu überführen, stellt die TEMPO-vermittelte Oxidationsreaktion dar. Die effiziente und selektive TEMPO-Oxidation findet bereits Anwendung in der Umsetzung von Cellulosefasern und Membranen.<sup>[105]</sup>

Der Mechanismus der Oxidationsreaktion ist in Schema 2.4 dargestellt.



Schema 2.4: Mechanismus der TEMPO-vermittelten Oxidation von primären Hydroxylgruppen über ein Aldehyd zu Carbonsäuren.<sup>[106,107]</sup>

In dieser Reaktion dient das stabile Nitroxylradikal 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) als Katalysator. Neben TEMPO wird für die Reaktion ein Oxidationsmittel, wie

---

Natriumhypochlorit (NaOCl), für die Erzeugung und ein Co-Katalysator (NaBr) zur Rückgewinnung der aktiven Spezies benötigt. Die Reaktion initiiert mit der Oxidation des TEMPO-Radikals mit NaOCl zum reaktiven Oxoammoniumkation  $\text{TEMPO}^+$ , welches im Folgeschritt die primäre Hydroxylgruppe über das Aldehyd final in eine Carboxylgruppe umsetzen kann. Das dabei reduzierte *N*-Hydroxylamin kann über das Natriumbromidoxid wieder in die aktive  $\text{TEMPO}^+$  Spezies oxidiert werden. Während der Oxidation wird lediglich das NaOCl verbraucht.<sup>[105–107]</sup> Da die Reaktion unter alkalischen Bedingungen stattfindet (pH-Wert 10 – 11), sollte das Polymer eine hohe chemische Beständigkeit aufweisen. Die alkalische Umgebung verstärkt dabei die Dissoziation der Hydroxylgruppe, sodass die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen der primären Hydroxylgruppe und dem  $\text{TEMPO}^+$ -Ion als Zwischenstufe schneller ablaufen kann. Dabei läuft die Oxidation aufgrund von sterischen Aspekten bevorzugt mit primären als sekundären OH-Gruppen ab.<sup>[106]</sup> Die Carboxyleinheit der stationären Phase kann nun direkt in der IEX-Chromatographie genutzt werden oder über Reaktionen mit Aminen bei Anwesenheit von Carbodiimiden in Anionentauscher oder mit  $\text{NH}_2$ -Liganden für die AC überführt werden.<sup>[37]</sup>

---

### 2.3.3 Forschungsansätze zur Herstellung 3D-gedruckter Chromatographiematerialien

---

Das additive Anfertigen von stationären Phasen stellt einen innovativen Ansatz in der Separationswelt dar. Der 3D-Druck ermöglicht für spezifische Trennaufgaben die Herstellung eines anpassbaren sowie maßgeschneiderten Chromatographiebettes mit präzisen und komplizierten Strukturen, welche mit herkömmlichen Fertigungsmethoden nicht ermöglicht werden. Damit ist vor allem die Anpassung an die einzigartigen Formen und Größen größerer Biomoleküle begünstigt. Hierdurch kann der 3D-Druck mit der selektiven Einstellung der Zugänglichkeit, der Strömungsverhältnisse und der einstellbaren Oberfläche zur Verbesserung der chromatographischen Techniken und gleichzeitig zur Erweiterung der Anwendungsfelder führen.<sup>[108]</sup>

Wie in Abschnitt 2.2.3 erläutert, gibt es verschiedene Ansätze für den 3D-Druck von stationären Phasen. Wird der Ansatz der Negativ Templierung betrachtet, so nutzte ANNE GORDON das Verfahren, um TPMS-Strukturen aus Wachs zu drucken und diese für die Herstellung von stationären Phasen aus Cellulose und Agarose zu nutzen. Die Agarose- und Cellulosematerialien konnten nach der Entfernung des Wachses mit heißem Wasser sowohl zu Anionen- als auch Kationenaustauschern modifiziert werden und zeigten eine erfolgreiche Abtrennung von Proteinen aus einer Hefezellmischung.<sup>[109]</sup> Diesen Ansatz verfolgten ebenfalls MOLEIRINHO et al. zur Reinigung von onkolytischen Adenoviren und lentiviralen Vektoren.<sup>[110]</sup>

Wird der direkte 3D-Druck der stationären Phase betrachtet, so hat die Entwicklung der Materialien, nachdem SCHURE et al. 2004<sup>[108]</sup> in Computersimulationen einen positiven Einfluss einer geordneten Struktur auf den Trennerfolg in der Chromatographie gezeigt haben, einige Jahre gedauert. Das erste Beispiel einer stereolithographisch 3D-gedruckten Chromatographiesäule wurde 2014 von FEE et al. in Form von Packungsbetten in einer einfachen kubischen Anordnung kugelförmiger Partikel und Monolithen mit hexagonalen Kanälen in Parallel- sowie Fischgrätenanordnung vorgestellt. Hier wurden die Säulen als

fertiges „All-in-One“-Werkstück mit innerer poröser Struktur, den Säulenwänden, Flüssigkeitsverteiltern sowie -sammler und der Endstücke zum Anschließen an das experimentelle Chromatographiesystem hergestellt. Als Material wurden nicht-poröse Acrylnitril-Butadien-Styrol-Oligomere eingesetzt.<sup>[111]</sup> 2017 konnte die gleiche Arbeitsgruppe die Vorhersagen von SCHURE et al. bestätigen, indem sie auf Basis eines UV-Urethanoligomerharzes verschiedene geometrisch Formen, wie abgestumpfte Ikosaeder oder tetraedrische Bipyramide, als geordnetes poröses Chromatographiebett gedruckt haben.<sup>[4]</sup>

In den Arbeiten von SIMON und DIMARTINO konnten 2019 mit der DLP-Drucktechnologie in einem einstufigen Verfahren AEX als monolithische, stationäre Phasen hergestellt werden. Durch Copolymerisation eines bifunktionellen Monomers mit einer positiv geladenen quartären Amingruppe und dem Quervernetzer Polyethylenglykoldiacrylat (PEGDA) konnte mit Polyethylenglykol als Porogen eine poröse Struktur hergestellt werden. Diese konnte für eine direkte Bindung von Proteinen angewendet werden.<sup>[82]</sup> 2021 wurde das Material weiterentwickelt und in Form einer offenzelligen Gyroidstruktur mit 500 µm Kanälen als Chromatographiesäule zur Auftrennung eines Proteingemisches genutzt. Dabei konnten jedoch Wiederfindungsraten von lediglich  $\leq 65\%$  erhalten werden, was für unspezifische Adsorption der Proteine am Material spricht.<sup>[112]</sup>

NEWADA und BUDEL entwickelten die Hybride Stereolithographie (HSLA) als eine neue 3D-Drucktechnik, welche eine Kombination aus der traditionellen Stereolithographie und der Photolithographie darstellt. Diese ist in der Lage das Problem der nominalen und der tatsächlichen Auflösung des 3D-Druckers zu umgehen und einen schnellen Druck von hochauflösten Chromatographiesäulen zu realisieren. Dabei wird, wie beim DLP-Prozess, ein Muster auf den Wannboden mit UV-Licht projiziert, wobei zwischen dem Wannboden und dem Projektor beim HSLA eine hochauflösende Fotomaske mit vordefinierten Mustern eingesetzt wird. Damit eine 3D-Struktur erzeugt werden kann, werden mehrere Muster auf der Fotomaske definiert und diese während des Druckprozesses mit einem Lineartisch bewegt. Eine Zylindersäule mit einem Durchmesser von 40 mm konnte mit dem kommerziellen Harz *Nanoclear (FTD Resins)* mit einer Geschwindigkeit von  $5 \text{ mm h}^{-1}$  gedruckt werden. Die Druckauflösung von 50 µm Gitterkanälen konnte dabei realisiert werden, welche über die digitalen Projektionsbilder und Fotomasken aus Abbildung 2.11 hergestellt wurden.<sup>[113]</sup>

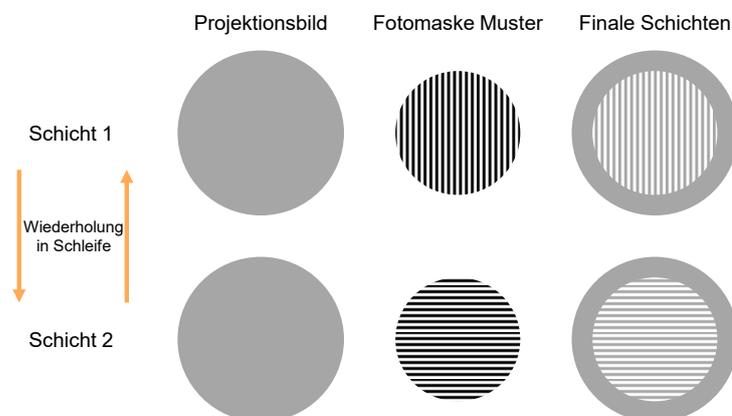


Abbildung 2.11: Funktionsprinzip der HSLA zur Herstellung einer Säule mit Wand und innerer Gitterstruktur unter Zuhilfenahme von zwei Mustern in der Fotomaske.



# 3 Ziel und Umfang

Biopharmazeutika haben sich in den letzten Jahren als die nächste Generation therapeutischer Moleküle in der pharmazeutischen Industrie etabliert. Da sie jedoch in ihrer Struktur wesentlich größer und komplexer sind als niedermolekulare Arzneimittel, stellt ihre analytische Charakterisierung mit herkömmlichen analytischen Methoden hinsichtlich Reinheit, Stabilität und Funktion eine große Herausforderung dar. Klassische chromatographische Methoden wie SEC, IEC oder RPC, die zur Charakterisierung eingesetzt werden, und deren stationären Phasen stoßen jedoch bei der Trennung und Aufreinigung großer Biomoleküle an ihre Auflösungsgrenzen. Um eine effizientere und schnellere Entwicklung von biopharmazeutischen Produkten zu ermöglichen, besteht daher ein großer Bedarf an neuen leistungsfähigen chromatographischen Materialien zur Charakterisierung von Biopharmazeutika.<sup>[2]</sup>

In Computersimulationen konnte gezeigt werden, dass geordnete Strukturen die Trennleistung, Auflösung, Produktivität und Kosteneffizienz von Chromatographiematerialien im Vergleich zu zufällig angeordneten gepackten stationären Phasen verbessern können.<sup>[14]</sup>

Daher ist das Ziel dieser Arbeit neuartige stationäre Phasen als gebrauchsfertige *Single-Piece-Devices* zu entwickeln, welche mit traditionellen Chromatographiematerialien hinsichtlich der Performanz mithalten können und diese gleichzeitig in ihrer Gestaltungsfreiheit durch mathematisch definierte Fließwege und Kanalgrößen, insbesondere im Hinblick auf große Biomoleküle, übertreffen. *Triply Periodic Minimal Surface*-Strukturen lassen sich mit einfachen mathematischen Gleichungen beschreiben, über welche die Porosität, Wanddicke und Oberfläche eingestellt werden kann. Damit eignen sich diese als stationäre Phasen in der Chromatographie zur Maximierung der Grenzflächen für den Stoffaustausch. Als Herstellungstechnologie für die stationären Phasen wurde die auf Photopolymerisation basierende DLP-Technologie gewählt, da sie im Vergleich zur SLA-Technologie sowohl kürzere Druckzeiten als auch geringere Gerätekosten bietet.

Damit richtet sich der Umfang dieser Arbeit auf drei wesentliche Prozessschritte aus. Zunächst erfolgt die Validierung einer geeigneten Harzformulierung auf Basis von Spezifikationen der Additiven Fertigung und von chromatographischen Operationen (Abbildung 3.1).

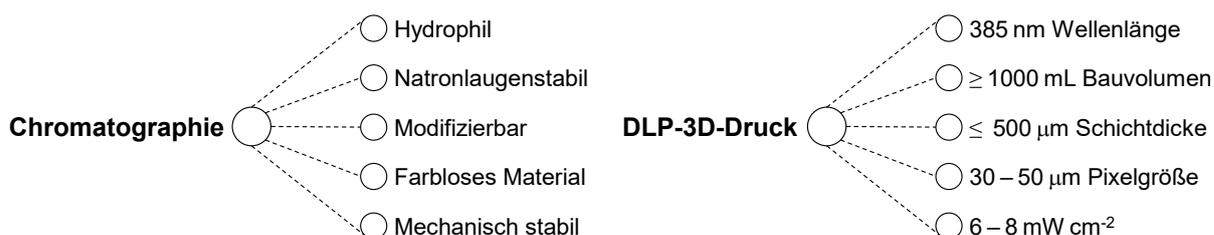


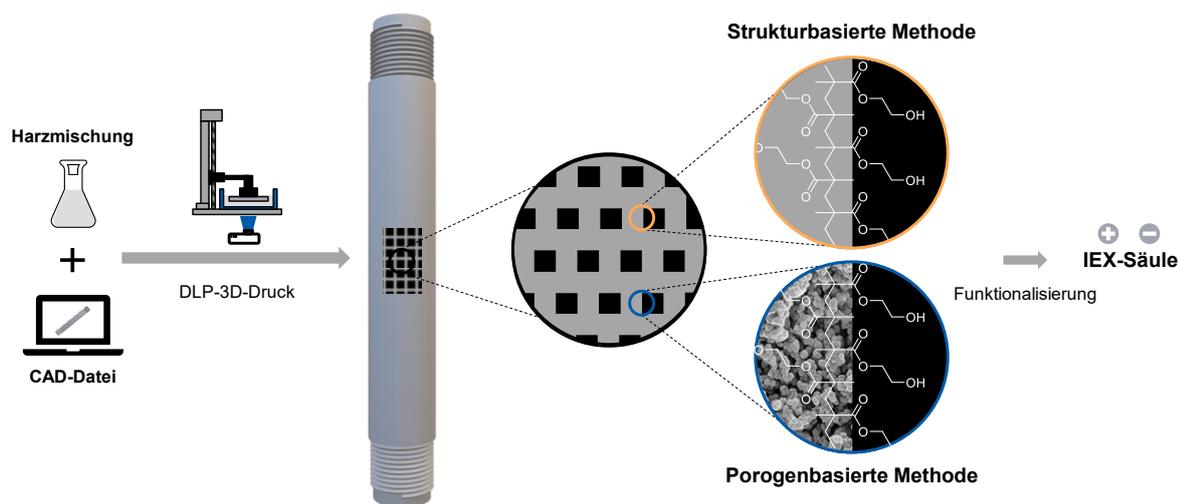
Abbildung 3.1: Vorgegebene Spezifikationen an das Material für die Anwendung in der Chromatographie<sup>[40]</sup> und im DLP-3D-Druckverfahren.

Um eine attraktive und zu bisherigen Chromatographiematerialien kompatible Alternative darzustellen, wird auf Basis von Methacrylaten ein Gemisch aus kommerziell leicht erhältlichen Quervernetzern, Monomeren und Additiven gewählt. Über Zugprüfversuche wird die Natronlaugenstabilität überprüft und durch Betrachtung der Korrelation zwischen der Belichtungszeit und der daraus resultierenden Schichtdicke, was der  $z$ -Auflösung entspricht, werden geeignete Druckparameter und Additivanteile in der Endformulierung identifiziert. Über Variation des Inhibitoranteils in der Harzrezeptur wird die  $xy$ -Druckauflösung von Gitter- und Gyroidstrukturen optimiert und die minimal erreichbare Kanalgröße identifiziert (Strukturbasierte Methode).

Zur Einführung von Makroporen (Ziel  $\sim 1 \mu\text{m}$ ) in das Material wird die Polymerisationsinduzierte Phasenseparation über die Porogentemplierung herangezogen und mit dem 3D-Druck kombiniert (Porogenbasierte Methode). Hier werden die Art und Menge des Porogens variiert und ihre Auswirkungen auf die Porengrößenverteilung und die spezifische Oberfläche mit Hilfe der Hg-Porosimetrie,  $\text{N}_2$ -Adsorptionsanalyse und REM-Messungen betrachtet.

Im zweiten Schritt der Entwicklung von 3D-gedruckten stationären Phasen erfolgt die Funktionalisierung des gedruckten Materials mittels einer TEMPO-vermittelten Oxidation der Hydroxylgruppen im Polymergerüst, um diese in der IEX-Chromatographie zu integrieren. Hier wird die in der Bioseparation weitverbreitete Technik der IEX-Chromatographie gewählt, da diese eine erste kostengünstige Möglichkeit zur Bewertung des Chromatographiematerials darstellt. Die Quantifizierung der oxidierten Carboxylateinheiten erfolgt über eine Säure-Base-Titration oder über die Bestimmung der dynamischen Proteinbindekapazität anhand des Modellproteins Lysozym über die UV-Absorptionsmessung bei 280 nm.

Den dritten und letzten Schritt stellt das Einstellen einer stabilen und reproduzierbaren Proteinbindekapazität der 3D-gedruckten stationären Phasen dar. Der vollständige Herstellungsprozess der IEX-Säulen ist in Schema 3.1 dargestellt.



Schema 3.1: Schematischer Ablauf des 3D-Druckprozesses mit Funktionalisierung des Materials zur Erzeugung einer IEX-Chromatographiesäule.

Abschließend erfolgt auf Basis der zuvor ermittelten Proteinbindekapazitäten der optimierten AEX-Chromatographiesäule ein finaler Vergleich des entwickelten Chromatographiematerials mit etablierten Chromatographiesystemen – der Festbest- und Membranchromatographie.

---

# 4 Experimentelle Beschreibung und Methoden

---

## 4.1 Herstellung des Photoharzes

---

Alle zum Einsatz kommenden Chemikalien werden ohne weitere Aufreinigungsschritte nach Herstellerspezifikation verwendet. Zur Herstellung der photopolymerisierbaren Harzformulierung werden die Quervernetzer Pentaerythritetraacrylat (PETA) (10 mol-%) und Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA) (30 mol-%), sowie das Monomer Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) (60 mol-%) in einer Weithalsflasche vorgelegt. Um eine vorzeitige Polymerisation durch das Tageslicht zu vermeiden, werden braune Weithalsflaschen verwendet. Anschließend werden der Photoinitiator Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)-phosphinoxid (TPO) (1,25 mol-% bezogen auf die organische Flüssigphase), der Photoabsorber 2,5-Bis(5-tert-butyl-benzoxazol-2-yl)thiophen (OB184) (0,025 mol-% bezogen auf die organische Flüssigphase) und der Inhibitor 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) (5 mol-% bezogen auf die organische Flüssigphase) der Mischung zugegeben. Für die Porogentemplierung werden der Mischung weiterhin 33 wt-% Polypropylenglykol mit der mittleren Molmasse von  $1200 \text{ g mol}^{-1}$  beigefügt. Die resultierende Mischung wird für 30 min bei 350 rpm auf einem Kreisschüttler (*VWR® Advanced 3500*) homogenisiert.

---

### 4.1.1 Photopolymerisation im einfachen Setup

---

Für die orientierenden Versuche zur Harzformulierung sowie zum Screening möglicher Porogene erfolgt die Photopolymerisation im vereinfachten Aufbau ohne den Einsatz des 3D-Druckers. Als UV-LED-Lichtquelle wird die *Opsytec Dr. Gröbel UV-LED solo P 385 nm* verwendet. Hierfür werden 300  $\mu\text{L}$  des zu untersuchenden Photoharzes in einem transparenten Polyethylen-Schnappdeckel mit dem Innendurchmesser von 10 mm vorgelegt und für eine definierte Zeit mit einer zuvor eingestellten Lichtintensität auspolymerisiert.

---

### 4.1.2 3D-Druckprozess von Polymeren

---

Das 3D-Druckverfahren des zuvor hergestellten Photoharzes erfolgt mit den *MiiCraft Hyper-50Y* und dem *W2P Engineering SolFlex350* 3D-Drucksystemen, welche auf der DLP-Technologie basieren. Die beiden kommerziellen 3D-Drucker ermöglichen durch ihr offenes System die

vollständige Kontrolle über die einzustellenden Druckparameter, wie z.B. die Belichtungszeit, Verfahrensgeschwindigkeit der Bauplatzform, Lichtintensität etc., und damit das Verdrucken eigens hergestellter Harzformulierungen. Die Harzwanne besteht aus einem Kunststoff- bzw. Metallrahmen, in den eine FEP-Folie mit einer Dicke von 125  $\mu\text{m}$  eingespannt wird. Die Spezifikationen der beiden Drucker sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Tabelle 4.1: Spezifikationen der verwendeten 3D-Drucker.

	<i>Hyper-50Y</i>	<i>SolFlex350</i>
Pixelgröße xy-Ebene / $\mu\text{m}$	30	50
UV-LED Wellenlänge / nm	385	385
Druckvolumen / $\text{mm}^3$	57 x 32 x 120	64 x 120 x 130
Schichtdicke / $\mu\text{m}$	25 – 200	5 – 500
Lichtintensität / $\text{mW cm}^{-2}$	8	6

Zu Beginn des Druckprozesses wird die leere Harzwanne in den Drucker eingebaut und folgend mit 50 mL bis 250 mL Harzformulierung möglichst luftblasenfrei befüllt. Anschließend wird die Bauplatzform in den Drucker eingespannt und zuletzt der Druckprozess mit den zuvor eingestellten Parametern gestartet. Die allgemeinen Druckparameter sind in Tabelle 4.2 aufgelistet und werden, sofern nicht anders angegeben, für den Druckprozess verwendet.

Tabelle 4.2: Druckparameter für den *Hyper-50Y* und *SolFlex350* 3D-Drucker.

	<i>Hyper-50Y</i>	<i>SolFlex350</i>
Schichtdicke / $\mu\text{m}$	30	25
Belichtungszeit Einbrennschicht / s	30	50
Belichtungszeit / s	4	5
Lichtintensität / $\text{mW cm}^{-2}$	6	8

Nach erfolgreichem Druck werden die Objekte vorsichtig von der Bauplatzform gelöst und folgend mit 2-Propanol zweimal im Ultraschallbad für jeweils 3 min gereinigt. Bei den gedruckten Säulen wird zuvor das nicht polymerisierte Harz durch Anlegen eines Vakuums an einer Waschflasche aus dem Säuleninneren entfernt. Nach vollständiger Trocknung wird das Objekt in der UV-Nachhärteneinheit *NK Optiks Otoflash G171* unter Stickstoffatmosphäre mit 2000 Blitzen nachgehärtet.

### Soxhlet-Extraktion

Für eine Reinigung des 3D-Druckobjektes in einem Soxhletaufsatz werden 50 mL Ethanol oder Aceton in einem 100 mL Rundkolben vorgelegt und mit dem 30 mL Soxhlet-Extraktor ohne Extraktionshülse montiert. Die Extraktion erfolgt für 24 h bzw. 48 h, die Proben werden an der Luft getrocknet und der Überstand im UV-Vis-Spektrometer untersucht.

## scCO<sub>2</sub>-Extraktion

Die Reinigung des 3D-Druckobjektes mit Hilfe von superkritischem CO<sub>2</sub> erfolgt bei 50 °C und 150 bar mit einem zweifachen bis vierfachen Gasaustausch in einem Batch-Autoklaven.<sup>[114]</sup>

### 4.1.3 Erstellen der CAD-Designs

Für die additive Fertigung wird neben dem 3D-Drucker und der Photoharzmischung ein zu druckendes Objekt in Form einer STL-Datei benötigt. Die zu druckenden dreidimensionalen Objekte werden mit Hilfe der computergestützten Designsoftware (CAD) *Autodesk Netfabb*<sup>®</sup> *Premium* erstellt. Für das Erstellen der auf dreifachperiodischen Minimalflächen (TPMS, engl. *Triply periodic minimal surface*) basierten Einheitszellen wird die Software *MSLattice* verwendet. Hier können die Geometrien verschiedener Arten von Einheitszellen, wie z.B. Gyroid oder Fischer-Koch S (FKS), mit Hilfe von Niveaugleichungen erstellt werden. Diese stellen eine Reihe von trigonometrischen Funktionen mit der Erfüllung der Gleichheit  $\phi(X, Y, Z) = c$  dar und sind für die Gyroidstruktur in Gleichung 4.1 und für FKS in Gleichung 4.2 angegeben.<sup>[115,116]</sup>

$$c = \sin X \cdot \cos X + \sin Y \cdot \cos Y + \sin Z \cdot \cos Z \quad 4.1$$

$$c = \cos 2X \cdot \sin Y \cdot \cos Z + \cos X \cdot \cos 2Y \cdot \sin Z + \sin X \cdot \cos Y \cdot \cos 2Z \quad 4.2$$

Für die einfache Gitterstruktureinheitszelle werden lediglich vier gleichgroße Rechtecke jeweils orthogonal und versetzt übereinandergestapelt. Nach dem Erstellen der gewünschten Einheitszellen können diese in *Netfabb*<sup>®</sup> importiert und anschließend in das 3D-Objekt überführt werden. Hierfür wird die Einheitszelle für die gewünschte Objektgröße in *xyz*-Ebene dupliziert, auf die benötigte Form zugeschnitten, mit einer Stützstruktur versehen und anschließend als *stl*-Datei exportiert. Die Abfolge der 3D-Modellierung der offenzelligen Strukturen ist beispielhaft für die Gitterstruktur in Abbildung 4.1 dargestellt.

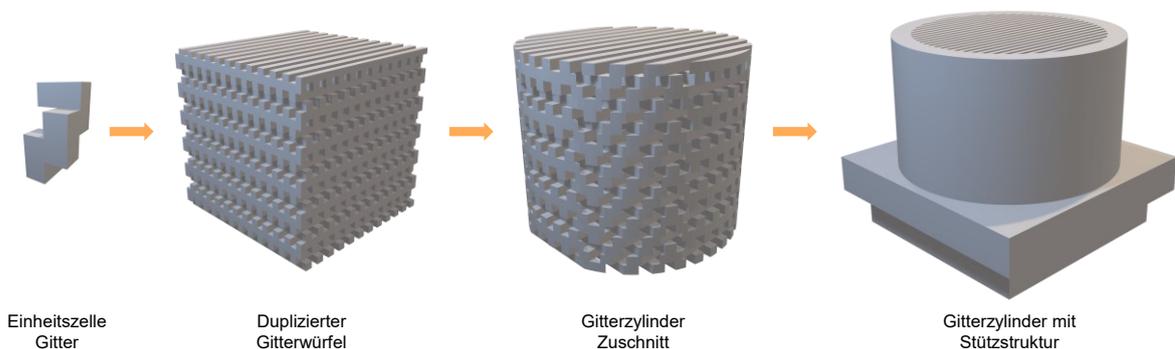


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Schritte zum Erzeugen des CAD-Objektes.

Den letzten Schritt stellt das Überführen der *stl*-Datei mit der dreidimensionalen Information in ein vom 3D-Drucker lesbares und verarbeitbares, zweidimensionales Dateiformat dar. Hierfür muss das 3D-Objekt in Schichtbilder definierter Schichthöhe zerschnitten werden. Die einzelnen Schichten werden als Schwarzweißbilder dargestellt (Abbildung 4.2) und können

---

vom UV-LED-Projektor des 3D-Druckers auf den Wannenboden projiziert werden. Für den *SolFlex350* Drucker erfolgt das Slicen direkt in der *Netfabb*<sup>®</sup> Software und für den *Hyper-50Y* in der druckereigenen *Utility Version 6.3.0.t3* Software.

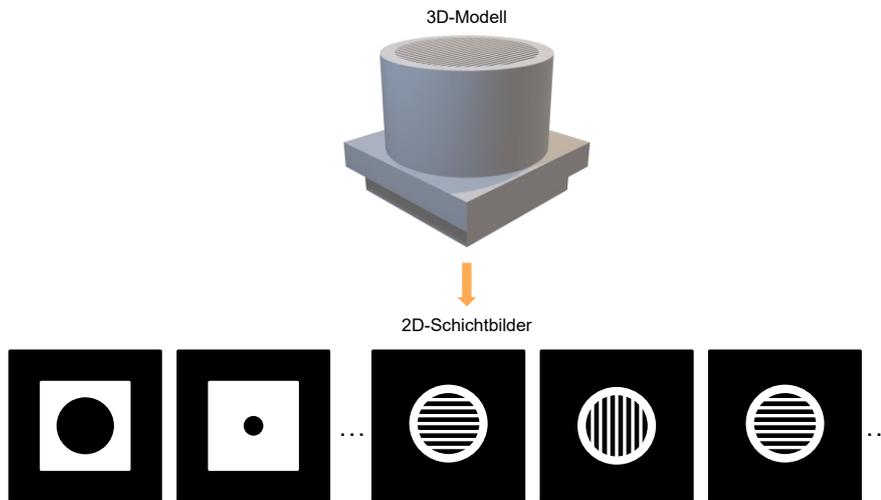


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Verarbeitung von 3D-Objektinformationen in 2D-Schwarzweiß-Schichtbilder.

---

#### 4.1.4 Betrachtung der Druckparameter

---

Nach der Herstellung des Photoharzes müssen geeignete und materialspezifische Druckparameter für den folgenden Druckprozess ermittelt werden. Hierfür wird für jedes Material die Abhängigkeit der Schichtdicke  $d$  von der Belichtungszeit  $t$  in dem sogenannte *One-Piece-Test* (OPT) untersucht. Hier wird direkt auf den Wannenboden ein Druckobjekt mit zwölf unterschiedlich platzierten Würfelfeldern und einem Rahmen projiziert. Dabei wird die Belichtungszeit bei jedem Würfelfeld variiert und die daraus resultierende Schichtdicke an polymerisiertem Material vermessen. Hier gilt: Je länger die Belichtungszeit für ein Feld ist, desto dicker wird die polymerisierte Schicht.

Nach dem Ausführen des OPT wird das Objekt mit einer Pinzette vorsichtig vom Wannenboden gelöst und mit 2-Propanol (IPA) für 10 min bei 50 rpm auf dem Kreisschüttler in einer Wägeschale gereinigt. Dann wird der OPT aus der Schale geholt und mit einer Klammer am Rahmen im Abzug befestigt, bis dieser getrocknet ist. Anschließend wird das Objekt mit jeweils 200 Blitzen von jeder Seite im *Otoflash* nachgehärtet. Das Ausmessen der Schichtdicke erfolgt mit einer Mikrometerschraube (*Mahr Micromar 40 EWRi*). Der OPT ist schematisch in Abbildung 4.3 dargestellt.

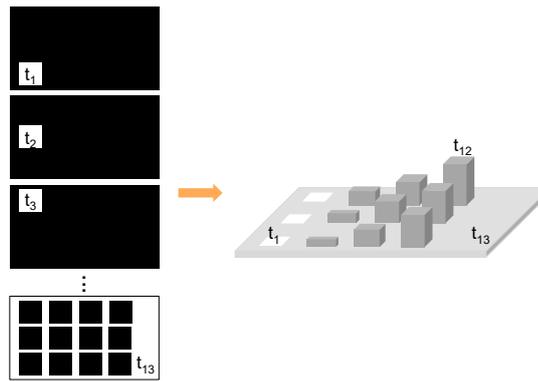


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des *One-Piece-Tests* bestehend aus zwölf viereckigen Feldern mit den Belichtungszeiten  $t_1$  bis  $t_{12}$  sowie einem Rahmen für die Stabilität des Objektes mit  $t_{13}$ . Über die Variation der Belichtungszeit und anschließendes Ausmessen der Schichtdicken, können die gewünschten Druckparameter bestimmt werden.

Anhand der logarithmischen Korrelation zwischen der Belichtungszeit und der Schichtdicke des gedruckten Materials lässt sich für eine feste Lichtintensität ein Wertepaar auch Druckzeit ( $t$ ) und Schichtdicke ( $d$ ) nach Gleichung 4.3 und Gleichung 4.4 bestimmen.

$$d = a \cdot \ln(t) + b \quad 4.3$$

$$t = e^{\frac{d-b}{a}} \quad 4.4$$

Nach erfolgreicher Ermittlung der notwendigen Druckparameter können die gewünschten 3D-Objekte im Anschluss gedruckt werden.

---

#### 4.1.5 Kombination von Gehäuse und poröser Gittersäule

---

Für die Herstellung der Porogensäulen nach der Porogenbasierten Methode wird die innere 300  $\mu\text{m}$  Gitterstruktur mit der Porogenharzformulierung im *Hyper-50Y* gedruckt. Der Druck des 100 mm Gehäuses mit Gewinde und einem Innendurchmesser von 9,25 mm erfolgt im *Formlabs Form3* Drucker mit dem kommerziell erhältlichen *Formlabs* Photopolymerharz *Clear V4*. Da der *Formlabs* ein geschlossenes System darstellt, werden die voreingestellten Druckparameter für das Material übernommen.

Zum Zusammenführen der inneren Gitterstruktur und des Gehäuses werden zwei Methoden getestet (Abbildung 4.4). Bei Methode A wird das Gehäuse so gewählt, dass ein kleiner Spalt zwischen der Innenwand des Gehäuses und des Gitters vorliegt. Dieser Spalt wird dazu genutzt, um die Struktur mit einem Harz als Klebstoff an der Innenwand zu kontaktieren. Dabei wird beim Ansatz A1 die Innenwand mit Harz benetzt, die gereinigte Gitterstruktur in das Gehäuse geschoben und die überstehenden Enden der Struktur mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Ensemble wird in der Nachhärteneinheit nachgehärtet bevor die Reinigung im Durchfluss mit IPA erfolgt. Beim Ansatz A2 wird das Gehäuse vollständig mit Harz gefüllt, das überschüssige Harz mit Hilfe der Gitterstruktur verdrängt und die Abfolge aus A1 weitergeführt. Für den letzten Ansatz A3 wird das Gehäuse in Form von zwei Schalen gedruckt. Eine Schale stellt den

Halbschnitt des 100 mm Gehäuses dar, während eine weitere über zusätzliche Klemmhilfen an beiden Seiten der Schale verfügt. Die Innenwand der Schalen wird wie bei A1 mit Harz benetzt und die Schnittfläche der Schalen mit Sekundenkleber versehen. Folgend wird die Gitterstruktur zwischen die beiden Schalen platziert, mit Klammern zusammengedrückt, nachgehärtet und gereinigt.

Bei Methode B erfolgt der Druck des Gehäuses passgenau zur Gitterstruktur, sodass kein Spalt zwischen den Komponenten entsteht ( $\varnothing_{\text{Innen}} = 9,05 - 9,25 \text{ mm}$ ). Für den Ansatz B1 wird die Gitterstruktur vollständig ins Gehäuse geschoben, der Überstand auf beiden Seiten entfernt und mit IPA gereinigt. Für B2 wird sowohl das Innere des Gehäuses als auch die Gitterstruktur konisch gedrückt. Dabei wird der Innendurchmesser des Gehäuses bzw. der Durchmesser des Gitterzylinders linear von 9 mm auf 8,8 mm reduziert. Die Gitterstruktur wird mit der Seite des geringeren Durchmessers ins Gehäuse auf Seiten des 9 mm Innendurchmessers reingeschoben, bis die Struktur auf der anderen Seite zu sehen ist. Der Überstand wird ebenfalls abgeschnitten und die Säule im Durchfluss gereinigt. Beim letzten Ansatz B3 wird die Gitterstruktur nach der Reinigung mit IPA zum Schrumpfen in 5 M Natriumchloridlösung für 1 – 14 Tage gelagert, ins Gehäuse geschoben, der Überstand entfernt und mit Milli-Q® Wasser das Salz vollständig ausgewaschen.

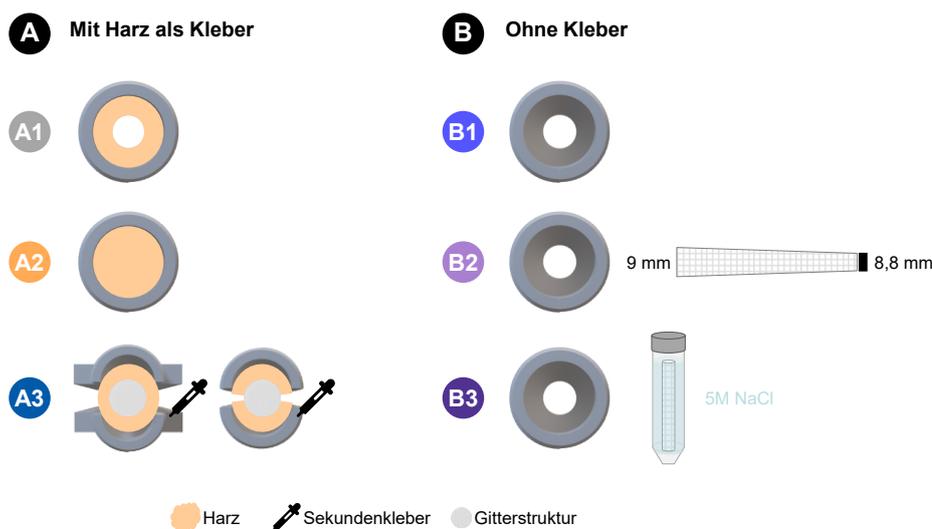


Abbildung 4.4: Verschiedene Ansätze zum Kombinieren eines 100 mm Gehäuses ( $\varnothing = 9,25 \text{ mm}$  bzw.  $9,05 - 9,25 \text{ mm}$ ) und einer porösen  $300 \mu\text{m}$  Gitterstruktur.

## 4.2 Oberflächenfunktionalisierung

Im Hinblick auf die spätere Applikation werden in den 3D-gedruckten Chromatographiesäulen funktionale Gruppen benötigt, welche für die Interaktion des Materials mit den Zielmolekülen sorgen. Je nach Anwendungsgebiet bieten sich hier verschiedene Funktionalitäten an. Der Fokus in der Arbeit liegt auf der Oxidation der Hydroxylgruppen des HEMA-Monomers zur entsprechenden Carbonsäuregruppe. Hierzu wird die Oxidation mit Hilfe des stabilen Aminoxyradikals (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO) als Katalysator durchgeführt. Um die Hydroxylgruppendichte im Material zu erhöhen, bietet sich die Thiol-En-

---

Klickreaktion an. Hier können die freien Doppelbindungen nach dem 3D-Druckprozess zu Hydroxylgruppen umgesetzt werden.

---

#### 4.2.1 Thiol-En-Klickreaktion

---

Für die Umsetzung der freien Doppelbindungen (DB) wird das 3D-gedruckte Material (1 äq., 1 mmol<sub>DB</sub>) in einem 50mL konischen Zentrifugenröhrchen zusammen mit AIBN (0,1 äq, 0,1 mmol) vorgelegt und mit 25 mL Ethanol versetzt. Dann wird das Reaktionsgemisch für 30 min mit Argon gespült, sodass der Sauerstoff aus dem Gemisch entweicht. Im Gegenstrom wird anschließend das Klickreagenz 2-Mercaptoethanol (5 äq., 5 mmol) hinzugegeben und die Reaktion bei 60 °C für 3 h auf dem Thermoschüttler (*Eppendorf, ThermoMixer*<sup>®</sup>C) durchgeführt. Nach Reaktionsende wird Ethanol zum Abbruch der Klickreaktion dem Gemisch zugefügt und das Material so lange mit Ethanol gewaschen, bis kein Geruch des Thiols vernommen werden kann. Die Probe wird bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank (*Binder VDL 56*) über Nacht gelagert.

---

#### 4.2.2 TEMPO Oxidation

---

Die TEMPO Oxidation kann zum einen in einer Batchreaktion und zum anderen im kontinuierlichen Durchfluss erfolgen. Das eingesetzte Wasser wird über ein Reinstwassersystem (*Merck, Milli-Q*<sup>®</sup> IQ 7000) aufgereinigt.

Für beide Methoden werden zunächst Natriumbromid (2 äq., 0,095 mmol) und TEMPO (2 äq., 0,006 mmol) in einem 50mL konischen Zentrifugenröhrchen vorgelegt und in Reinstwasser für 30 min bei Raumtemperatur bei 350 rpm auf einem Thermoschüttler (*Eppendorf, ThermoMixer*<sup>®</sup>C) gelöst. Mit der Wassermenge wird eine Konzentration an Natriumhypochlorit von 0,3 mol L<sup>-1</sup> eingestellt.

Für die Batchreaktion erfolgt anschließend die Zugabe des 3D-gedruckten Objektes (1 äq., 1 mmol<sub>OH</sub>) und zuletzt wird NaOCl (2 äq., 1,6 mmol) der Reaktionsmischung beigefügt. Damit wird die Reaktion gestartet und auf dem Thermoschüttler bei 300 rpm behandelt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird dabei kontinuierlich auf einem Wert von 10 durch Zugabe von 1 M Natronlauge gehalten. Nach 4 h wird mit der Zugabe von Ethanol die Reaktion abgebrochen. Zuletzt wird das 3D-gedruckte Objekt mit 50 mM Essigsäure und Wasser bis zur pH-Neutralität der Lösung gereinigt.

Die Funktionalisierung der Chromatographiesäulen erfolgt hingegen im Durchfluss mit Hilfe einer Spritzenpumpe (*Landgraf Laborsysteme GmbH, Spritzenpumpe LA-110*). Hier wird der TEMPO und NaBr-Lösung das NaOCl direkt hinzugegeben und der pH-Wert der Lösung kontrolliert. Anschließend wird die Reaktionslösung in eine Spritze aufgezogen und die Spritze an der Spritzenpumpe an der Chromatographiesäule angebracht. Die Flussgeschwindigkeit wird über das Volumen der Reaktionslösung und die Reaktionszeit von 4 h berechnet und an der Spritzenpumpe eingestellt. Da kontinuierlich neue Lösung durch die Säule gegeben wird, erfolgt keine Korrektur des pH-Wertes. Nach Reaktionsende erfolgt die gleiche Prozedur wie beim Batchversuch.

---

## 4.3 Analysemethoden

---

### Zugprüfversuche

Die Untersuchung des Elastizitätsmoduls der 75 mm langen 3D-gedruckten Materialien nach Prüfnorm ASTM D 638 erfolgt über Zugversuche an einer Tischprüfmaschine (*Zwick Roell z1.0*) in einem Klimaraum bei 23°C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Messung wird mit einer 1000 N Kraftmessdose bei einer Vorkraft von 0,1 MPa, einer Einspannlänge der Probe von 70 mm und der Prüfgeschwindigkeit des Zugmoduls von 5 mm min<sup>-1</sup> durchgeführt. Die Messdaten werden über die Software *testXpert II* aufgezeichnet. Der E-Modul wird aus der Steigung der Kraftdehnungskurve ermittelt.

### Dynamische Differenzkalorimetrie

Die Bestimmung der freien Doppelbindungen nach dem 3D-Druckprozess erfolgt mit der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC, engl. *differential scanning calorimetry*). Die Proben werden in dem Thermoanalysesystem (*Mettler Toledo, STARe System DSC3*) in einem Temperaturfenster von 25 bis 300 °C mit einer Heizrate von 1 °C min<sup>-1</sup> vermessen, wobei vor jeder Messung die Probe 2 min bei 25°C akklimatisiert wird.

### Elementaranalyse

Um die Menge an mit der Thiol-En-Klickreaktion umgesetzten Doppelbindungen zu ermitteln, wird eine Elementaranalyse des Schwefelgehaltes durchgeführt. Hierfür wird die getrocknete Probe gemörsert und 20 mg für die Gehaltsbestimmung zur Verfügung gestellt.

### Titration

Zur Bestimmung der Dichte an funktionalen Gruppen im 3D-gedruckten Material werden die Carboxygruppen im Material mit 0,01 M Natronlauge austitriert.

Die Probe wird zunächst grob gemörsert, mit etwa 400 mL Reinstwasser in einer 125 mL Glasfritte gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Anschließend wird das Material zweimal mit jeweils 25 mL 0,5 M Salzsäure auf einem Kreisschüttler für 2 h beladen, wobei das Material zwischen den Beladungen ebenfalls in der Glasfritte abgesaugt wird. Danach wird das Material zweimal mit 110 mL 0,001 M Salzsäurelösung für 16 min gewaschen, abgesaugt und im Luftstrom getrocknet. Für eine Doppelbestimmung wird jeweils die Hälfte des Materials in einen 50 mL Titrationsbecher eingewogen und direkt vor Beginn der Titration in 50 mL 0,5 M Natriumchloridlösung suspendiert.

Die Titration erfolgt für die erste Bestimmung gleichgewichtskontrolliert mit der dynamischen Methode, um die Menge an verbrauchter Natronlauge besser einschätzen zu können. Die zweite Bestimmung erfolgt aufgrund von Zeitersparnis mit einer fixen Zeit inkrementell. Hierfür wird der Titrationsbecher mit der Probe in den Titrator (*Mettler Toledo, T70 Titrator*) eingebaut und die Probe zunächst zur homogenen Verteilung der Probe mit einer Geschwindigkeit von 30% für 120 s gerührt. Mit der gleichen Geschwindigkeit wird daraufhin die Titrationsmethode gestartet. Die am Titrator eingestellten Parameter können Tabelle 4.3 entnommen werden.

Tabelle 4.3: Eingestellte Parameter der dynamischen und inkrementellen Titration im Titrator T70.

	dynamisch	inkrementell
$dE_{\text{soll}} / \text{mV}$	3	-
$dV_{\text{min}} / \text{mL}$	0,003	0,020
$dV_{\text{max}} / \text{mL}$	0,3	-
$dE / \text{mV}$	1	-
$dt / \text{s}$	3	10
$t_{\text{min}} / \text{s}$	3	-
$t_{\text{max}} / \text{s}$	30	-
Schwellenwert / $\text{mV mL}^{-1}$	200	150
Abbruch / mV	-200	-175
Abbruch / mL	10	20

Nach der Titration wird die Probe in einer Glasfritte abgesaugt, mit 400 mL Reinstwasser sowie 2-Propanol gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Anschließend wird das Material über Nacht bei 50°C im Vakuumtrockenschrank gelagert und zuletzt die Massen des titrierten Materials ( $m_{\text{Probe}}$ ) bestimmt. Die ionische Kapazität ( $IK_{\text{COOH}}$ ) und damit die Menge an Carboxylgruppen kann über die Konzentration ( $c_{\text{NaOH}}$ ) und den Verbrauch an Titrationslösung ( $V_{\text{NaOH}}$ ) nach Gleichung 4.5 bestimmt werden.

$$IK_{\text{COOH}} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot c_{\text{NaOH}}}{m_{\text{Probe}}} \quad 4.5$$

### Salzpulsinjektion

Zur Bewertung eines erfolgreichen Zusammenführens der porösen Gitterstruktur und des Gehäuses erfolgt eine Stoßmarkierung mit 25  $\mu\text{L}$  einer 2 M Natriumchloridlösung mit 0,2 bzw. 1  $\text{mL min}^{-1}$  an einem Chromatographiesystem (Cytiva, Äkta pure™). Die mittlere Verweilzeit ( $\bar{\tau}$ ) lässt dabei mit Gleichung 4.6 aus der Verweilzeitverteilung  $E(t)$  ermitteln.

$$\bar{\tau} = \int_0^{\infty} E(t) \cdot t \cdot dt \quad 4.6$$

### UV-Vis Spektroskopie

Absorptionsspektren werden mit dem Spektrometer (Eppendorf, BioSpectrometer® Fluorescence) in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 600 nm in UV-Einwegküvetten vermessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt bei einer Wellenlänge von 280 nm.

### Quecksilberporosimetrie

Die Bestimmung der Porengrößenverteilung bei den mit Porogen gedruckten Material erfolgt mit Hilfe der Quecksilberporosimetrie (Quantachrome Instruments, PoreMaster) in einem Bereich von 8 bis 207 MPa, um den Porengrößenbereich von 7 nm bis 175  $\mu\text{m}$  abzudecken.

---

## Physisorption

Die BET-Oberfläche des mit Porogen gedruckten Materials lässt sich mit einer Gasadsorption (*Quantachrome Instruments, QuadraSorb™ SI 7.01*) ermitteln. Als Adsorptionsgas wird Stickstoff bei 77 K verwendet und die Probe wird vor Beginn der Analyse für 72 h bei 60 °C entgast.

## Rasterelektronenmikroskopie

Die Betrachtung der Materialoberfläche erfolgt mit einem *InLens*-Detektor für Sekundärelektronen in dem hochauflösenden Rasterelektronenmikroskop (*Zeiss, SUPRA 35*) mit einer Beschleunigungsspannung von 0,5 – 30 kV in den Auflösungen von 300 nm bis 500 µm. Der Elektronenstrahl wird von einer Feldemissionskathode erzeugt. Die Proben werden mit einem 2K-Epoxidklebstoff auf REM-Aluminiumprobenhalter befestigt, mit Silberleitlack kontaktiert und anschließend mit einer 10 nm Platinschicht beschichtet.

## MicroCT

Für die 3D-Strukturanalyse wird ein MicroCT (*Waygate Technologies, V|tome|x S240*) verwendet. Hierzu wird die Probe mit Wachs am Stifthalter befestigt und in das Analysegerät eingebaut. Die Aufnahmen der Schnittbilder erfolgen bei einer Röhrenspannung von 110 kV, der Stromstärke von 120 µA, einer Voxelgröße von 24 µm<sup>3</sup> und einem 0,1 mm Kupferfilter.

---

## 4.4 Dynamische Bindungskapazität

---

Für die spätere Anwendung der 3D-gedruckten Chromatographiesäulen muss die Dichte an funktionellen Gruppen an der Oberfläche bekannt sein. Da eine Titration ohne das Zerstören des Objektes nicht möglich ist, wird zur Quantifizierung der zugänglichen Carboxygruppen an der Oberfläche eine dynamische Bindekapazität (DBC, engl. *dynamic binding capacity*) mit Lysozym als Testprotein durchgeführt. Diese gibt die Menge an Zielprotein an, welches sich auf der Chromatographiesäule dynamisch bei bestimmter Flussrate beladen lässt. Die Proteinbindekapazität kann unter Zuhilfenahme des LAMBERT-BEERSCHE-Gesetzes mit der Extinktion ( $E$ ), der Probenmasse ( $m_{\text{Probe}}$ ), dem Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ), der Probendichte ( $\rho_{\text{Probe}}$ ) und der Masse der inneren Säulengitterstruktur ( $m_{\text{Säule}}$ ) nach Gleichung 4.7 berechnet werden. Dabei wird die Dichte der in einem wässrigen Puffer gelösten Proteinprobe, näherungsweise als 1 mg mL<sup>-1</sup> angenommen.

$$DBC \left( \frac{\text{mg}_{\text{Lys}}}{\text{g}_{\text{Säule}}} \right) = \frac{E_{\text{Probe}} \cdot m_{\text{Probe}} / d \cdot \epsilon \cdot \rho_{\text{Probe}}}{m_{\text{Säule}}} \quad 4.7$$

Zur Durchführung der DBC wird ein Chromatographiesystem (*Cytiva, Äkta pure™*) eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Äkta-Aufbaus ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Hier werden die Pufferlösungen (1) und die Proteinprobe mit Hilfe der Pumpen (5) über diverse

Einlassventile auf die Chromatographiesäule (7) gegeben. Nach der Säule wird das UV-Signal (8), die ionische Leitfähigkeit (9) sowie der pH-Wert (10) der Lösung analysiert. Dabei können die Fraktionen der DBC-Methode unabhängig voneinander im Fraktionssammler (12) aufgefangen oder direkt in den Abfall geleitet werden.

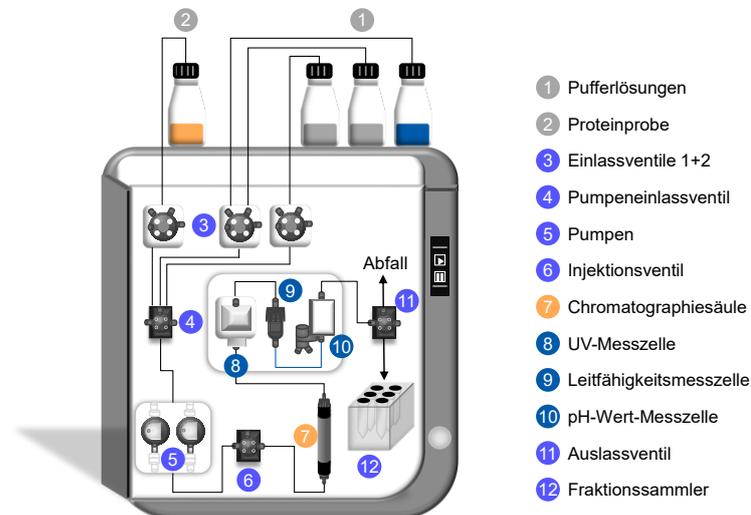


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Äkta-Chromatographiesystems.

Die Parameter der Äkta für die Lysozym-DBC sind in Tabelle 4.4 hinterlegt.

Tabelle 4.4: Parameter für die DBC-Messungen mit Lysozym an dem Äkta-Chromatographiesystem.

	Äkta
UV-Zelle / mm	10
Wellenlänge <sub>1</sub> / nm	280
pH-Wert	5
Flussrate / mL min <sup>-1</sup>	0,5 / 2,5 / 5
Säulenvolumen / mL	7,85

Da für die DBC mit Lysozym ein pH-Wert des Pufferlösungssystems von 5 gewählt wird, werden die pH-Werte 4,01 und 7,00 (*Merck, Certipur®*) zur Kalibrierung des Chromatographiesystems herangezogen. Nachdem die Äkta vorbereitet ist, können anschließend die Pufferlösungen für die DBC-Methode an die Äkta angeschlossen werden. Alle hergestellten Puffer werden vor dem Einsatz an der Äkta durch einen *VacuCap® 60* Filter mit einer *0,45 µm Super® Membran* filtriert. Die Einstellung des pH-Wertes der Pufferlösungen erfolgt mit 100% Essigsäure am pH-Messgerät (*Mettler Toledo, SevenExcellence pH/Cond meter S470*).

Die DBC-Methode mit den einzelnen Schritten ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Hier werden im ersten Schritt 5 Säulenvolumina (CV, engl. *column volume*) 50 mM Essigsäure mit 5 mL min<sup>-1</sup> zum Äquilibrieren der Säuregruppen auf die Chromatographiesäule gegeben. Im zweiten Schritt wird das System ebenfalls mit 5 CV an 50 mM Natriumacetatpuffer (5 mL min<sup>-1</sup>) mit dem pH-Wert von 5 zum Einstellen des Gleichgewichtes äquilibriert. Anschließend wird das Zielprotein Lysozym mit einer Konzentration von 0,5 mg mL<sup>-1</sup> in 50 mM Acetatpuffer mit 0,5 mL min<sup>-1</sup> bis zu einer Sättigung der aktiven Stellen (Plateau des UV-Signals) auf die

oxidierte Säule gegeben. Nichtgebundenes Restprotein wird daraufhin mit 5 CV Acetatpuffer (2,5 mL min<sup>-1</sup>) ausgespült und 15 CV 1 M Natriumchloridlösung in 50 mM Natriumacetatpuffer (2,5 mL min<sup>-1</sup>) werden zum Eluieren des immobilisierten Proteins benutzt. Alle Fraktionen, die Lysozym enthalten, werden im Fraktionssammler in 50 mL konischen Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Fraktionen werden dann ausgewogen und deren Absorption im Spektrometer (*Eppendorf, BioSpectrometer*<sup>®</sup>Fluorescence) bei 280 nm vermessen. Den letzten Schritt der DBC stellt das Auswaschen der Salzlösung aus der Säule mit 5 CV Reinstwasser (5 mL min<sup>-1</sup>) dar. Für jede modifizierte Säule erfolgt eine Dreifachbestimmung.

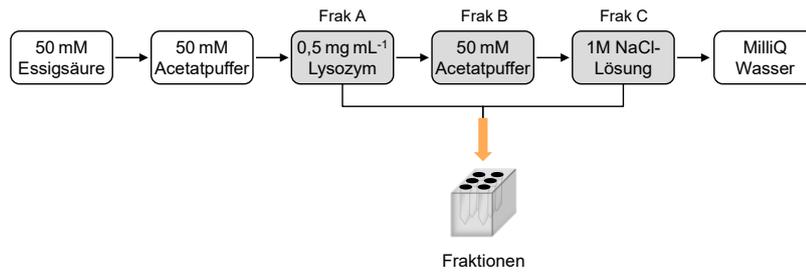


Abbildung 4.6: Darstellung der einzelnen Schritte der DBC-Messung der Chromatographiesäulen an der Äkta mit Lysozym als Zielprotein.

Die Wiederfindungsrate (WFR) kann unter Zuhilfenahme von Gleichung 4.7 über die Proteinmenge in den drei aufgesammelten Fraktionen A, B und C nach Gleichung 4.8 berechnet werden. Dabei sind  $DBC_{\text{Frak A}}$  und  $DBC_{\text{Frak B}}$  die Mengen des ungebundenen Proteins und  $DBC_{\text{Frak C}}$  die Menge an gebundenem sowie eluiertem Protein. Im Nenner kann über  $DBC_{\text{Frak A}}$  und den Extinktionen des *Flow-trough*-Proteins sowie der reinen Proteinlösung die Gesamtproteinmenge berechnet werden, die auf die Säule gegeben wird.

$$WFR(\%) = \frac{DBC_{\text{Frak A}} \cdot DBC_{\text{Frak B}} \cdot DBC_{\text{Frak C}}}{DBC_{\text{Frak A}} \cdot \frac{E_{\text{Proteinlösung}}}{E_{\text{Frak A}}}} \cdot 100\% \quad 4.8$$

---

# 5 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wird in Kapitel 5.1 eine geeignete Harzformulierung für die Entwicklung eines Chromatographiebettes evaluiert. Anschließend wird in 5.2 untersucht, wie die Auflösung des neu entwickelten Materials über die Harzformulierung, die Druckparameter und die Prozessierung erhöht werden kann. In 5.3 wird das Einbringen von weiteren Oberflächenfunktionalitäten des Materials anhand enthaltener freier Hydroxylgruppen diskutiert und die Ergebnisse erster Applikationstests beleuchtet. Anschließend wird in 5.4 auf die Porogentemplierung zur Erzielung einer sekundären Porosität eingegangen.

---

## 5.1 Vorversuche zur Entwicklung einer Photoharzformulierung

---

Um den 3D-Druck als eine neue Methode zur Herstellung innovativer Chromatographiematerialien etablieren zu können, wird zunächst eine geeignete Harzformulierung unter Berücksichtigung der vorgegebenen Parameter hinsichtlich der Drucker- und der Materialeigenschaften (Abbildung 3.1) untersucht. Zur Bewertung der Eignung einer betrachteten Harzformulierung und zur Ermittlung geeigneter Druckparameter werden verschiedene Methoden herangezogen. Der *One-Piece-Test* (OPT) gibt Aufschluss über die Polymerisationstiefe des Materials in Abhängigkeit von der Belichtungszeit und -energie. Hier wird auf den strukturbasierten Methodenansatz zurückgegriffen, so dass der Harzmischung kein Porogen als Additiv zugesetzt wird (Schema 3.1).

---

### 5.1.1 Auswahl der Einzelkomponenten

---

Wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben setzt sich eine photopolymerisierbare Harzformulierung für den Einsatz im DLP-Druckverfahren aus den Grundkomponenten Monomere, Quervernetzer und Photoinitiator zusammen. Für die Optimierung der Druckauflösung können weitere Additive wie Photoabsorber und Inhibitoren zugefügt werden.

Da (Meth)acrylate bereits in den stationären Phasen der Festbettchromatographie zum Einsatz kommen und weiterhin eine gute Stabilität gegenüber Natronlauge gezeigt haben, wird eine chromatographiegeeignete Methacrylatharzformulierung mit hydrophilen Ether- und Carboxyfunctionalitäten gewählt. Für das Grundgerüst des Methacrylatharzes werden die beiden Quervernetzer PETA (P) und TEGDMA (T) (Abbildung 5.1 a und b) ausgewählt. PETA soll als tetrafunktionaler, reaktiver Carbonsäureester zur Reduzierung der Druckzeit und zur Erhöhung der mechanischen Stabilität beitragen, während TEGDMA als Kettenverlängerer der Sprödigkeit entgegenwirken soll.

Zur nachträglichen Oberflächenfunktionalisierung werden Hydroxylgruppen mit Hilfe des Monomers HEMA (H) (Abbildung 5.1 c) in das Material eingebracht, da die Hydroxylfunktionalität eine attraktive Möglichkeit darstellt, verschiedene Liganden in das

Chromatographiematerial einzubringen.<sup>[37]</sup> Zunächst erfolgt die Validierung einer möglichen Zusammensetzung der einzelnen Komponenten des Polymergerüsts.

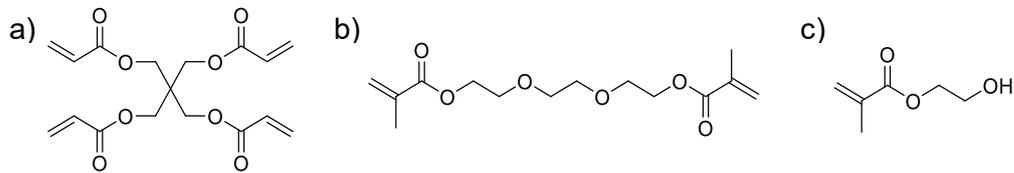


Abbildung 5.1: Chemische Struktur der Quervernetzer PETA (a) sowie TEGDMA (b) und des Monomers HEMA(c).

### Bestimmung des Monomer-Quervernetzer-Anteils

Die drei Hauptkomponenten des Photoharzes werden in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander hergestellt, wobei der Quervernetzeranteil von PETA und TEGDMA von 55 bis 90 mol-% variiert wird. Hier wird TPO als Initiator und 2-Nitrodiphenylsulfid (NPS) als Photoabsorber eingesetzt und die makroskopischen Materialeigenschaften werden an FKS-Säulen mit einem hexagonalen Gitter als Stützstruktur untersucht. In Abbildung 5.2 sind die Druckergebnisse mit den unterschiedlichen Quervernetzeranteilen dargestellt.

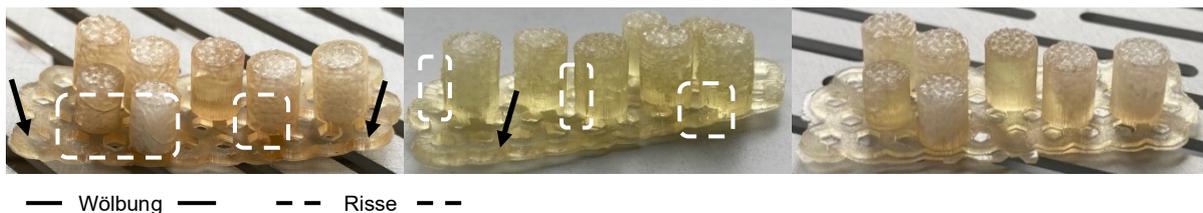


Abbildung 5.2: Variation des Quervernetzeranteils: links 90%, Mitte 65% und rechts 55%. Die Pfeile zeigen die Wölbung in der Stützstruktur und die Risse sind umrahmt.

Es ist die Tendenz zu erkennen, dass mit steigendem Quervernetzeranteil die Sprödigkeit des Materials zunimmt. Das Material mit einem Quervernetzeranteil von 90 mol-% zeigt eine Wölbung der Stützstruktur und Risse in den FKS-Säulen. Die Risse sind auch bei einem Quervernetzeranteil von 65 mol-% zu beobachten, so dass ein Quervernetzeranteil < 55 mol-% festgesetzt wird. Um eine Vergleichbarkeit der 3D-gedruckten Säulen mit bekannten kommerziellen Chromatographiepartikeln zu realisieren, wird das Verhältnis von 40 mol-% Quervernetzeranteil (10 mol-% PETA und 30 mol-% TEGDMA) und 60 mol-% HEMA für weitere Experimente gewählt und als die PTH-Formulierung bezeichnet.

### Natronlaugenstabilität des Acrylatquervernetzers

In der späteren Anwendung ist eine Stabilität des Chromatographiematerials gegenüber 1 M Natronlauge von Vorteil, da das Material dann mit Hilfe der Base gereinigt werden kann. Die aus der Literatur bekannte geringere Stabilität von Acrylaten gegenüber Natronlauge im Vergleich zu Methacrylaten wirft daher die Frage auf, ob die Harzrezeptur ohne den Einsatz von PETA als Quervernetzer eine höhere mechanische Stabilität aufweist.

Um den Einfluss von Natronlauge auf das 3D-gedruckte Material und damit den Einsatz von PETA zu bewerten, wurden Zugprüfversuche an gedrucktem Material mit der

PTH-Harzformulierung und dem Harz ohne den Quervernetzer PETA durchgeführt. Dabei werden Proben direkt nach dem Druck, nach der sukzessiven Aushärtung in der *Otoflash* Nachhärteeinheit sowie nach der Lagerung beider Proben in 1 M Natronlauge für 24 h vermessen. Aus den Steigungen der Kraft-Dehnungs-Kurven (Abbildung 8.1 im Anhang) kann der Elastizitätsmodul für die jeweiligen Proben bestimmt werden. Die Ergebnisse der Zugprüfversuche sind in Abbildung 5.3 dargestellt.

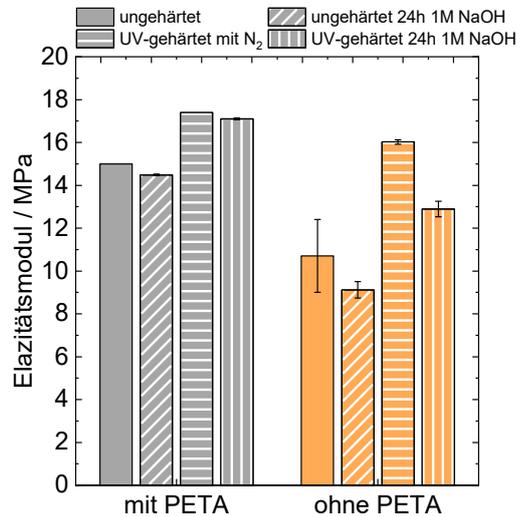


Abbildung 5.3: Vergleich der Elastizitätsmoduln des Harzes mit und ohne PETA als multifunktionellem Quervernetzer unter dem Einfluss einer Behandlung mit Natronlauge in einer Dreifachbestimmung.

Im Allgemeinen weist das Harz mit dem Quervernetzer PETA mit einem E-Modul von 17,4 MPa für die gehärtete und 15,0 MPa für die ungehärtete Probe eine höhere mechanische Stabilität auf als das Harz ohne den Quervernetzer PETA mit einem E-Modul von 16,0 bzw. 10,7 MPa. Werden die E-Moduln der ungehärteten und nachgehärteten Proben betrachtet, so weisen die nachgehärteten Proben für beide Harzzusammensetzungen höhere Elastizitätsmoduln auf als die ungehärteten Proben. Darüber hinaus scheint die Behandlung mit der Natronlauge keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die Stabilität des PTH-Materials zu haben, wenn die Abnahme des Elastizitätsmoduls der gehärteten Probe auf 14,5 MPa (-2%) und der ungehärteten Probe auf 17,1 MPa (-3%) betrachtet wird. Im Gegensatz dazu verliert das Harz ohne PETA nach der basischen Behandlung 15% (9,1 MPa) seines E-Moduls bei der ungehärteten Probe und 20% (12,9 MPa) bei der ausgehärteten Probe. Weiterhin ist mit 14,5 MPa der E-Modul der ungehärteten und mit Natronlauge behandelten Probe mit PETA um 58% höher als bei der Probe ohne PETA-Zusatz. Damit würde PETA mit seiner Tetrafunktionalität an Doppelbindungen zu einem stärker vernetzten Polymer führen und die mechanische Stabilität gegenüber einer möglichen Hydrolyse durch Natronlauge im Material erhöhen.

Da die Harzformulierung mit dem Acrylat PETA das Ziel einer höheren Stabilität, insbesondere gegenüber Natronlauge, aufweist als ohne PETA, wird für die Endformulierung ein PETA-Anteil von 10 mol-% festgelegt.

## Auswahl eines geeigneten Photoinitiators

Aufgrund der Wellenlänge der LED-UV-Lampe im 3D-Drucker von 385 nm werden die kommerziell erhältlichen Photoinitiatoren TPO und BAPO (Abbildung 5.4) für die Harzformulierung in Betracht gezogen und in der PTH-Harzformulierung getestet.

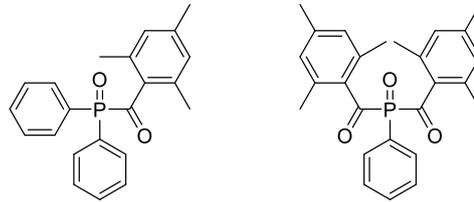


Abbildung 5.4: Chemische Struktur von TPO und BAPO.

Zunächst werden die Initiatoren BAPO und TPO in einem vereinfachten Aufbau untersucht, der die Photopolymerisation außerhalb des 3D-Druckers ermöglicht. Dabei wird die Initiatorkonzentration von 0,24 – 1,05 mol-% variiert und die Zeit bis zur Verfestigung des Polymerpellets bestimmt. Die resultierenden Pellets sind in Abbildung 5.5 zusammen mit den Polymerisationsergebnissen des einfachen Setups dargestellt.

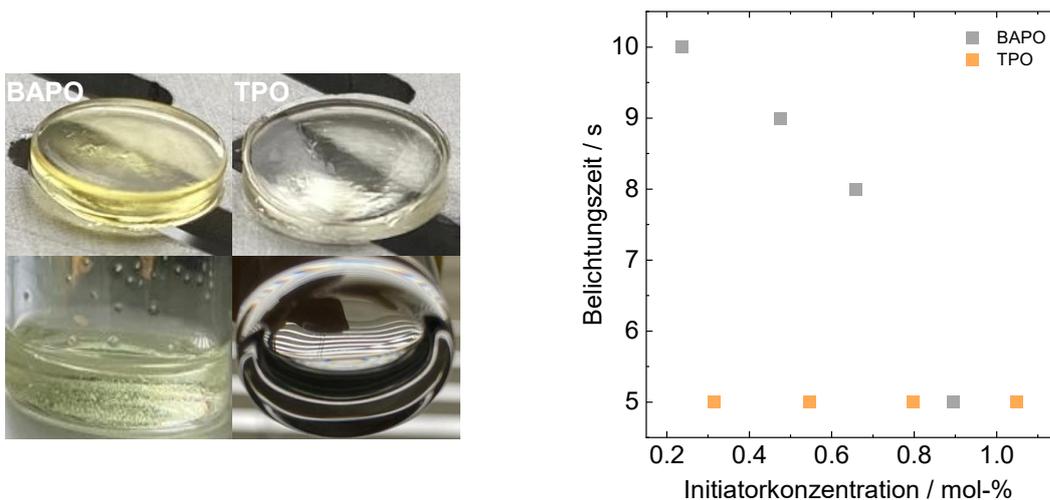


Abbildung 5.5: Links: Polymerisationsversuche im vereinfachten Aufbau mit BAPO und TPO als Photoinitiator. Rechts: Belichtungszeit bis zur Verfestigung des Materials als Funktion der Initiatormenge von BAPO und TPO.

Bei BAPO-haltigen Harzen wird eine Löslichkeitsgrenze von 1,75 mol-% beobachtet und die Objekte zeigen eine Gelbfärbung. Im Gegensatz dazu zeigt TPO eine Löslichkeitsgrenze von 2 mol-% und keine signifikante Verfärbung des Materials. Für BAPO ist der Trend zu beobachten, dass mit steigender Initiatorkonzentration die Belichtungszeit bis zur vollständigen Polymerisation abnimmt. Die Zugabe von TPO hingegen zeigt eine schnelle Reaktion mit einer unteren kinetischen Grenze von 5 s, nach der das Polymer vollständig polymerisiert ist.

Der Einfluss des Initiators und der Initiatormenge auf die Polymerisationstiefe des Materials wird mit dem OPT in einer Dreifachbestimmung untersucht. In Abbildung 5.6 sind beispielhaft OPTs mit unterschiedlichen Konzentrationen von TPO und BAPO dargestellt, anhand derer der Unterschied des Initiatorgehaltes auf das Polymerisationsergebnis sichtbar wird.

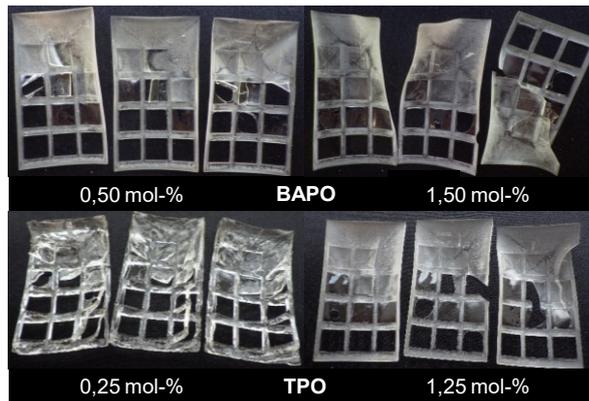


Abbildung 5.6: OPT-Objekte mit BAPO und TPO als Photoinitiatoren in verschiedenen Konzentrationen.

Aufgrund der Löslichkeitsgrenze von BAPO von 1,75 mol-% wird die Prüfung bis zur maximalen Konzentration von 1,50 mol-% durchgeführt. Bei näherer Betrachtung der OPT-Objekte zeigt sich, dass für BAPO alle untersuchten Konzentrationen polymerisierbar sind, wobei die Druckqualität bei einer Konzentration von 0,5 mol-% deutlich abnimmt. Die OPTs zeigen jedoch alle eine Gelbfärbung des Materials. TPO-Konzentrationen  $\leq 1$  mol-% führen zu geschwollenen und mehrschichtigen Strukturen. Bei Konzentrationen  $\geq 2$  mol-% löst sich das TPO nicht mehr in der Harzformulierung. OPT-Materialien mit Konzentrationen von 1,25, 1,50 sowie 1,75 mol-% sind dagegen gut messbar. Die Objekte zeigen im Vergleich zu BAPO keine Gelbfärbung. Die Schichten mit einer Druckzeit von 1 bis 3 s werden entweder nicht gedruckt oder aufgrund ihrer geringen Schichthöhe während des Reinigungsprozesses zerstört. In Abbildung 5.7 sind im OPT die Schichtdicken in Abhängigkeit von der Belichtungszeit von mit TPO und BAPO hergestellten PTH-Harzen dargestellt.

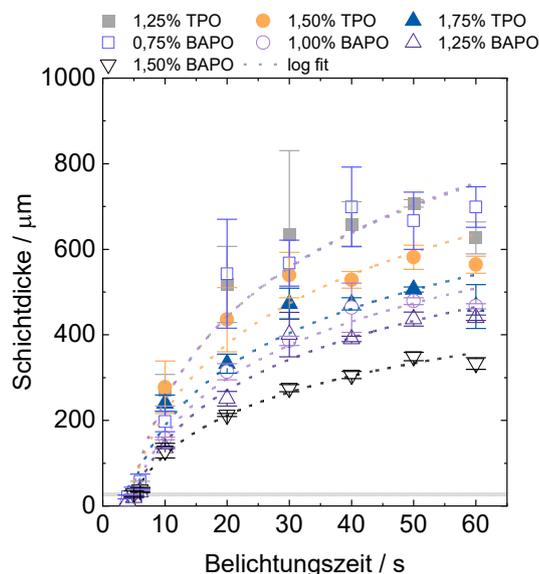


Abbildung 5.7: OPT-Ergebnisse mit der Schichtdicke als Funktion der Belichtungszeit des PTH-Harzes mit BAPO und TPO als Photoinitiatoren.

Werden zunächst die beiden Initiatoren verglichen, so führt BAPO bei gleicher Konzentration zu dünneren Schichten als TPO. Eine höhere Initiatorkonzentration führt bei allen Proben zu einer Sättigung der Kurve, so dass eine Erhöhung der Belichtungszeit  $> 50$  s nicht zu dickeren

---

Schichten führt. Für kurze Belichtungszeiten  $\leq 6$  s zeigt sich eine Unabhängigkeit der Schichtdicke von der Initiatormenge. Hier reichen geringe Radikalkonzentrationen aus, um dünne Schichten zu polymerisieren. Für dickere Schichten werden mehr Radikale und damit eine längere Belichtungszeit benötigt.

Die geringe Druckqualität bei 0,5 mol-% BAPO zeigt sich in einer Standardabweichung von 21%. Analog ist dies für TPO bei Konzentrationen  $\leq 1$  mol-% zu beobachten.

Für die Auswahl eines geeigneten Initiators sind vor allem die Aspekte einer schnellen Reaktion für kurze Druckzeiten bei geringer Konzentration und die Ausbildung dünner Schichten, die zu einem farblosen Objekt führen, zu beachten. In den ersten Vorversuchen im vereinfachten Aufbau zeigt TPO eine schnellere Reaktion als BAPO, was sich jedoch ebenfalls in den höheren Schichtdicken bei gleicher Belichtungszeit und Konzentration im OPT zeigt. Obwohl BAPO bei gleicher Konzentration zu geringeren Schichtdicken führt als TPO, wird TPO aufgrund der Gelbfärbung durch BAPO als Photoinitiator bevorzugt. Da eine Zugabe von  $< 1$  mol-% TPO keine adäquaten Druckergebnisse liefert und die Unterschiede in der Schichtdicke bei Erhöhung der Konzentrationen bis 1,75 mol-% bei kurzen Belichtungszeiten von 5 – 6 s mit  $\pm 5$   $\mu\text{m}$  nicht signifikant sind, wird für die finale Harzformulierung die geringstmögliche Initiatorkonzentration von 1,25 mol-% gewählt (PTH-1,25TPO). Dadurch können die finalen Harzkosten gesenkt und gleichzeitig das Risiko eines möglichen Austritts von nicht umgesetztem Initiator in der späteren Anwendung reduziert werden.

### **Identifikation geeigneter Photoabsorber**

Um feine Schichtdicken von 25 bis 100  $\mu\text{m}$  und damit einhergehend eine bessere Druckauflösung der Objekte zu erreichen, wird als weiteres Additiv ein Photoabsorber eingesetzt, der die Polymerisation in z-Ebene beeinflusst. Dieser wird während des Polymerisationsprozesses nicht in das Polymergerüst eingebaut. Im Applikationsbereich der Chromatographie entsprechen farblose Materialien den Marktanforderungen und Kundenspezifikationen. Photoabsorber stellen jedoch gleichzeitig einen Farbstoff dar, der zu einer Verfärbung des Materials führen kann. Daher wird für den 3D-Druckprozess einerseits eine geringe Wellenlänge von 385 nm im UV-Bereich gewählt, die gleichzeitig die untere Grenze des sichtbaren Lichts darstellt. Andererseits muss für den Photoabsorber weiterhin die Möglichkeit bestehen, den Farbstoff vollständig und zerstörungsfrei aus dem 3D-gedruckten Material zu entfernen oder wenn dies nicht möglich ist, muss ein Absorber gewählt werden, der zu einer vernachlässigbaren Verfärbung des Materials führt.

Ausgehend von der PTH-1,25TPO-Harzformulierung werden verschiedene Photoabsorber hinsichtlich ihrer Eignung für die finale Harzformulierung getestet, die eine hohe Absorption bei 385 nm aufweisen. Die betrachteten Photoabsorber sind in Abbildung 5.8 dargestellt (Absorptionsspektren im Anhang Abbildung 8.2).

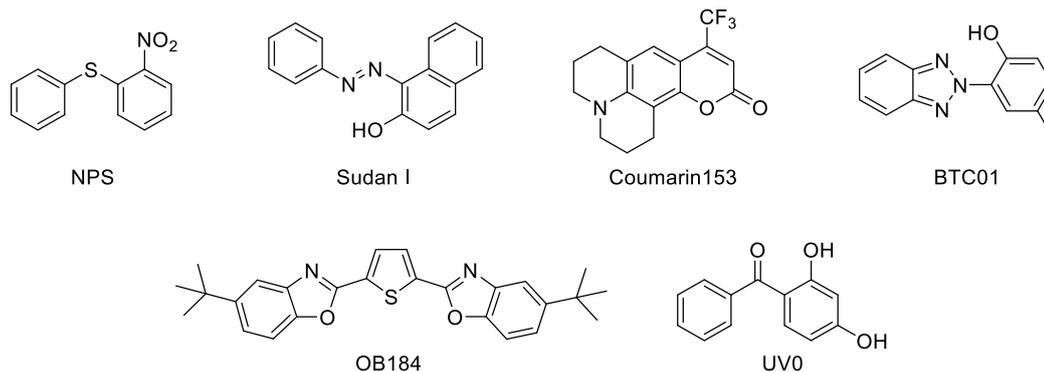


Abbildung 5.8: Chemische Struktur von NPS, Sudan I, Coumarin153, OB184, UV0 und BTC01, die als mögliche Photoabsorber mit dem PTH-1,25TPO-Harz getestet wurden.

Die 3D-gedruckten Objekte, die NPS, Sudan I und Coumarin 153 als Photoabsorber mit hoher Absorption bei 385 nm enthalten, zeigen im Gegensatz zu den weiteren untersuchten Absorbieren eine intensive Verfärbung der Objekte auf. Daher wird zunächst mit zwei Methoden untersucht, ob eine vollständige Entfernung dieser Farbstoffe aus dem Material möglich ist. Zum einen erfolgt eine Extraktion des Photoabsorbers mit einem Lösungsmittel in einer Soxhlet-Extraktionsapparatur und zum anderen wird die schonendere Extraktion mit überkritischem  $scCO_2$  (engl.: *super critical*) getestet.

### Entfärbungsversuche mittels Soxhlet-Extraktion

Für die Entfernung des Photoabsorbers mittels Soxhlet-Extraktion werden Proben mit der PTH-Harzformulierung gedruckt, welche 0,1 mol-% NPS, Sudan I und Coumarin 153 als Photoabsorber enthält. Als Lösungsmittel wird Ethanol und für die mit NPS gedruckten Objekte zusätzlich Aceton zur Entfernung der Farbstoffe getestet. Abbildung 5.9 zeigt die Extraktionsergebnisse der offenzellig gedruckten Testobjekte.

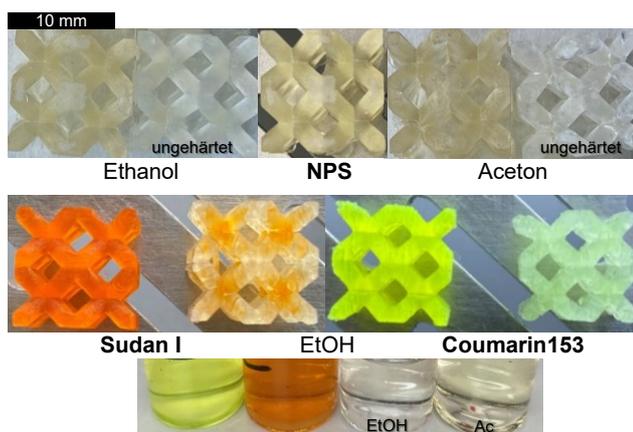


Abbildung 5.9: Extraktionsergebnisse mittels Soxhlet-Apparatur mit Aceton und Ethanol als Lösungsmittel mit NPS, Sudan I und Coumarin 153 als Photoabsorber. Für NPS ist jeweils links die gehärtet und rechts die ungehärtete Probe gezeigt, wobei die mittlere Abbildung das Ausgangsobjekt vor der Behandlung darstellt. Für Sudan I und Coumarin 153 sind links die Objekte vor und rechts nach der Extraktion gezeigt.

Von den mit NPS gedruckten Objekten wird eine in der UV-Nachhärteeinheit nachbehandelte und eine unbehandelte Probe untersucht. Es ist zu erkennen, dass bei der ungehärteten Struktur der Farbstoff vollständig entfernt werden kann. Das Aceton löst den Farbstoff zwar besser aus der Struktur, greift diese aber deutlich an und führt zu Rissen in dem Druckobjekt. Die Absorber Sudan I und Coumarin 153 lassen sich nach 24 h Extraktion mit Ethanol nicht vollständig aus dem Objekt entfernen. Das Sudan I bleibt vor allem an den Kreuzungspunkten der Sternstruktur zurück, während das Coumarin 153 eine homogene Färbung in der gesamten Struktur hinterlässt. Auch hier führt die intensive Behandlung mit dem Lösungsmittel zum Verlust der mechanischen Stabilität.

Werden die UV-Vis-Spektren der Soxhlet-Extrakte in Abbildung 5.10 betrachtet, so ist im Bereich von 190 – 250 nm zu sehen, dass mit der Soxhlet-Extraktion ebenfalls die einzelnen Komponenten des Harzes aus dem Objekt herausgelöst werden (Abbildung 8.2 im Anhang). Bei der geringen Verdünnung des Extraktes sind die Photoabsorber in dem Spektrum jedoch nicht sichtbar. Erst bei hohen Konzentrationen lassen sich die Photoabsorber im Überstand nachweisen.

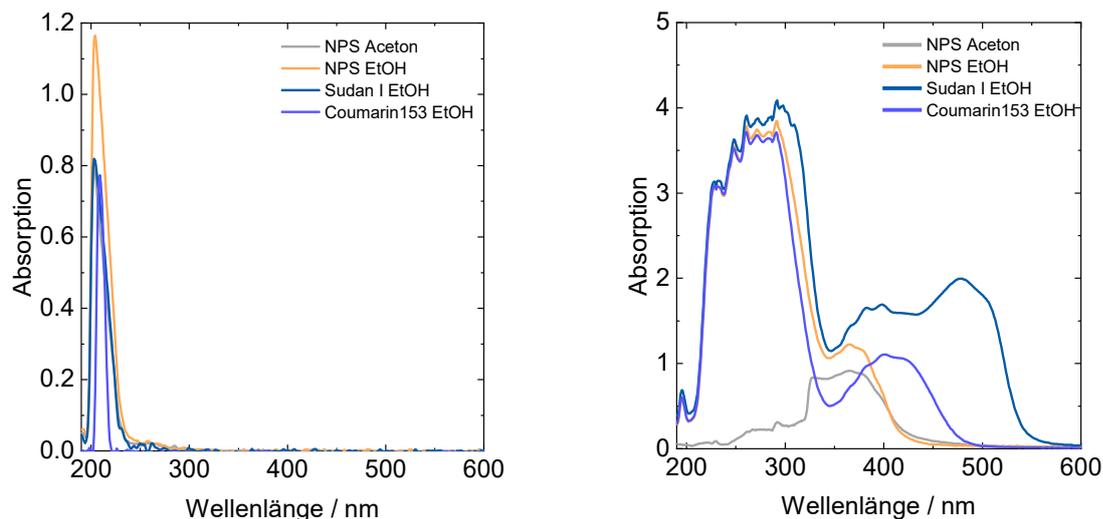


Abbildung 5.10: Absorptionsspektren von den Soxhlet-Extraktionsüberständen.

Da mit Hilfe der Soxhlet-Extraktion keine vollständige und zeitgleich zerstörungsfreie Entfernung des Photoabsorbers realisiert werden kann, wird die Extraktion mit überkritischem Kohlenstoffdioxid getestet.

### Entfärbungsversuche mittels $scCO_2$ -Extraktion

Die überkritische  $CO_2$ -Extraktion soll als Alternative zur Soxhlet-Extraktion zur Entfernung der Photoabsorber und zeitgleich von nicht polymerisierten Harzrückständen dienen.<sup>[114,117]</sup> Zunächst werden mit 0,1 mol-% NPS und Sudan I gedruckte Objekte in der PTH-Zusammensetzung untersucht. In Abbildung 5.11 sind die die Ergebnisse der Extraktion mit  $scCO_2$  dargestellt.

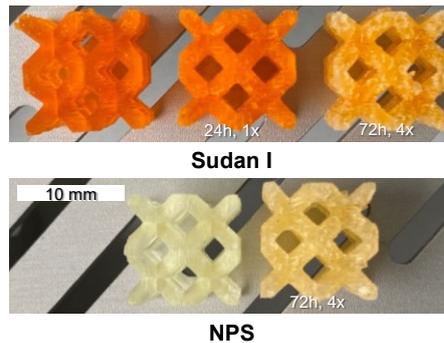


Abbildung 5.11: Sudan I-Probe: 50°C, 150 bar  $scCO_2$ -Extraktion. Links: Ausgangsobjekt, Mitte einfacher  $CO_2$ -Austausch über 24 h, rechts vierfacher Austausch über 72 h. NPS-Probe: links: Ausgangsobjekt, rechts Objekt nach vierfachem Austausch über 72 h. Problem: Verfärbung durch Sudan I.

Werden die mit Sudan I gedruckten Objekte betrachtet, so reicht ein einfacher Gasaustausch im Autoklaven nicht aus, um den Photoabsorber zu entfernen. Hier ist ein mehrfacher  $CO_2$ -Austausch notwendig, um die Verfärbung zu reduzieren. Dennoch ist keine vollständige Entfärbung möglich und die mechanische Stabilität des Materials nimmt nach der Extraktion ab. Das NPS-Objekt wird zusammen mit der Sudan I-Probe im 72 h Versuch behandelt. Hier ist zu erkennen, dass sich das Sudan I im zweiten NPS-Objekt abgelagert hat. Es wäre also nicht möglich, mehrere Objekte gleichzeitig zu behandeln.

Für die Anwendung eines Materials als stationäre Phase in der Chromatographie, insbesondere für die Applikation von Biomolekülen, ist ein farbloses Objekt eine kundenspezifische Vorgabe. Farbige Materialien könnten die Assoziation wecken, dass nicht entfernte Restbestandteile des Photoabsorbers im Material während des Applikationsprozesses austreten und gegebenenfalls schädliche Auswirkungen auf die Biomoleküle haben könnten.

Da eine vollständige Entfernung des Farbstoffes mit den Extraktionsmethoden nicht möglich ist, wird sich folglich auf Farbstoffe fokussiert, die eine hohe Absorption bei 385 nm haben, aber gleichzeitig keine oder nur eine geringe Färbung des Materials verursachen.

### Auswahl eines farblosen Photoabsorbers

Da eine vollständige und zerstörungsfreie Entfernung des Photoabsorbers nicht möglich ist, werden alternative Photoabsorber mit geringer bis keiner Färbung getestet und mit NPS als Literatursubstanz verglichen.<sup>[74]</sup> Von den hier getesteten Photoabsorbern weist OB184 die höchste Absorption auf (Abbildung 8.2 im Anhang).

Analog zur Bewertung des Photoinitiators wird der Einfluss des Photoabsorbers auf die Materialdruckeigenschaften mit Hilfe des OPTs untersucht. Die Absorber UV0 und BTC01 zeigen im Konzentrationsbereich zwischen 0,025 und 0,6 mol-% keine signifikante Verbesserung der Druckqualität im Vergleich zum Harz ohne Zusatz eines Photoabsorbers (Abbildung 8.3 im Anhang). Eine deutliche Verbesserung der Druckqualität kann dagegen bei NPS und OB184 beobachtet werden. In Abbildung 5.12 sind die Ergebnisse der OPT mit NPS und OB184 bei verschiedenen Konzentrationen zu sehen.

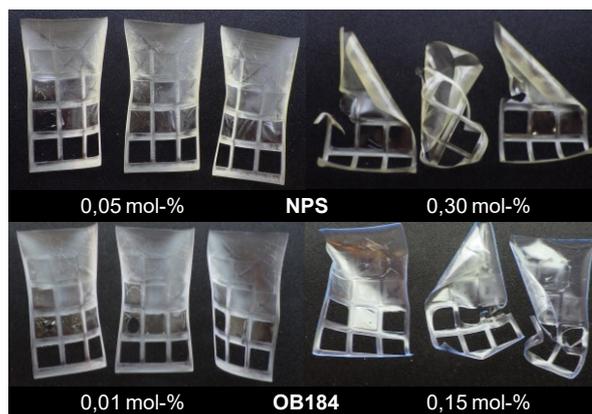


Abbildung 5.12: OPT-Objekte mit NPS und OB184 als Photoabsorber bei verschiedenen Konzentrationen.

Die Löslichkeit des Feststoffes OB184 bei Konzentrationen  $\geq 0,3$  mol-% ist nicht gegeben, so dass die Konzentration nicht weiter erhöht wird und ein Bereich von 0,01 bis 0,15 mol-% getestet wird.

Hohe Absorberkonzentrationen führen bei beiden Substanzen zu einer Verschlechterung der Druckqualität und gleichzeitig zu einer deutlichen Verfärbung des Materials. In diesem Fall wird zu viel UV-Licht absorbiert, so dass insbesondere bei kürzeren Belichtungszeiten nicht genügend Nuklei für das Kettenwachstum ausgebildet werden können und die mechanische Stabilität abnimmt. Bei geringeren Absorberkonzentrationen lassen sich beide Materialien gut verdrucken, wobei bei OB184 bereits die geringe Menge von 0,01 mol-% für gute Druckergebnisse ausreicht.

In Abbildung 5.13 sind die Ergebnisse der Schichtdickenmessung des OPTs dargestellt.

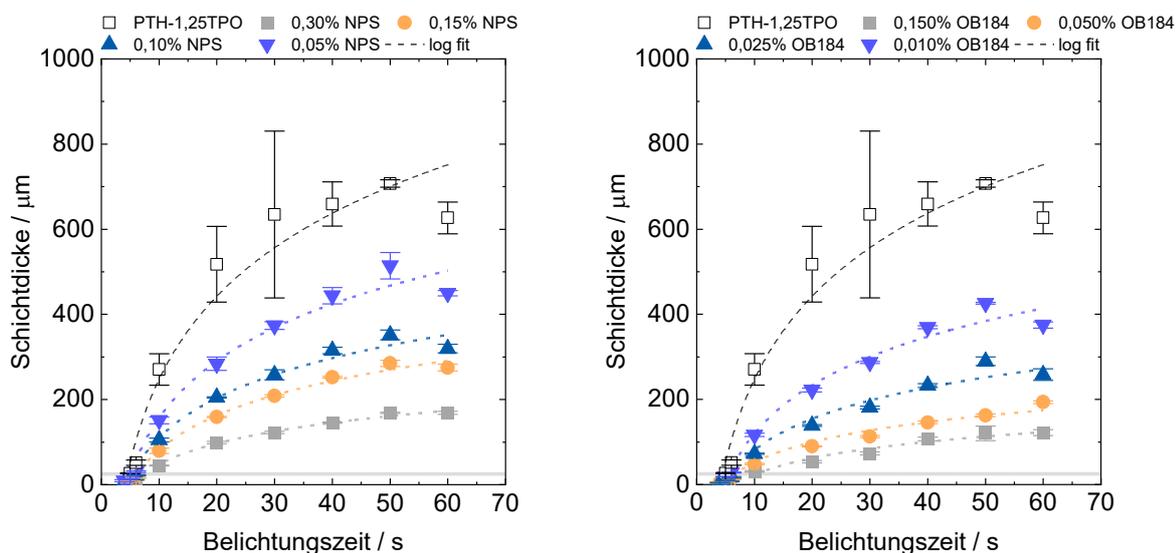


Abbildung 5.13: OPT-Ergebnisse mit der Schichtdicke als Funktion der Belichtungszeit des PTH-Harzes mit NPS (links) und OB184 (rechts) als Photoabsorber. Die Messung erfolgte in einer Dreifachbestimmung.

Im Vergleich zum Harz ohne Farbstoff lassen sich mit beiden Absorbern für alle Belichtungszeiten deutlich geringere Schichtdicken (OB184 36 – 52% und NPS 26 – 52%)

---

erzielen, wobei OB184 bei gleicher Konzentration wie NPS zu einer geringeren Steigung der Kurve führt. OB184 wird vor allem als optischer Aufheller eingesetzt, welcher insbesondere gelblichen Verfärbungen entgegenwirken soll. Dieser hat eine deutlich höhere Absorption bei 385 nm ( $= 35,6 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) als NPS ( $3,8 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) mit dem Vorteil, dass es nicht zu einer Gelbfärbung führt.

Um geringe Schichtdicken zu erzielen und gleichzeitig die Farbstoffkonzentrationen so gering wie möglich zu halten, wird die Konzentration von 0,025 mol-% OB184 für die Harzzusammensetzung (PTH-1,25TPO-0,025OB) gewählt.

---

## 5.2 Untersuchung zur erzielbaren Auflösung

---

Nach den Vorversuchen zur möglichen Harzrezeptur für die Materialherstellung der Chromatographiesäulen konnte die Zusammensetzung PTH-1,25TPO-0,025OB als geeignet identifiziert werden. Im nächsten Schritt soll die bestmögliche Auflösung, die mit diesem Harz erreicht werden kann, eingehend untersucht werden.

---

### 5.2.1 Vorversuche zur erzielbaren Auflösung

---

Da die Objekte 3D-gedruckt werden, müssen die aus dem OPT gewonnenen Parameter für den finalen Druckprozess angepasst werden, da der OPT Unterschiede bezüglich des Polymerisationsprozesses zum 3D-Druck aufweist. Die belichteten Bereiche werden nicht von der Bauplattform eingeschlossen und können nach der eingestellten Belichtungszeit in  $z$ -Richtung weiter polymerisieren. Weiterhin beeinflusst der Reinigungsprozess die gemessenen Schichtdicken, da sehr dünne Schichten von  $< 20 \mu\text{m}$  teilweise mechanisch instabil sind und somit zu einer Abweichung in den logarithmischen Regressionsergebnissen des OPT führen können. Für den 3D-Druck sollten die Belichtungszeiten so genau wie möglich eingestellt werden, da zu lange Belichtungszeiten zu einem *overcuring* der Struktur und damit zur einer schlechten Druckauflösung führen können. Außerdem kann es durch fehlende Verankerungspunkte infolge abreagierter funktioneller Gruppen zur Spaltung von einzelnen Schichten untereinander kommen. Des Weiteren führt eine zu kurz gewählte Belichtungszeit zu einem *undercuring* des Materials, was ebenfalls eine schlechte Druckqualität sowie ein Ablösen der Schichten zur Folge hat. Mit dem OPT wurde für das PTH-1,25TPO-0,025OB-Harz eine Belichtungszeit von  $\sim 6 \text{ s}$  für eine Schichtdicke von  $25 - 30 \mu\text{m}$  über die logarithmische Fitfunktion der OPT-Ergebnisse (Gleichung 5.1) mit Gleichung 4.4 berechnet. Diese konnte im 3D-Drucker auf ein Minimum von  $4 \text{ s}$  reduziert werden, bevor die Druckqualität verloren ging.

$$d = 106 \cdot \ln(t) - 163 \text{ mit } R^2 = 0,97 \quad 5.1$$

Mit dieser Belichtungszeit werden zunächst kurze Säulen mit einer Gitterstruktur mit dem PTH-1,25TPO-0,025OB-Harz gedruckt, um die Druckauflösung von offenzelligen Strukturen zu

validieren. Hierbei wurde die Kanalgröße von 400 bis 100  $\mu\text{m}$  variiert. In Abbildung 5.14 ist das Druckergebnis des Auflösungsstests des PTH-1,25TPO-0,025OB-Harzes dargestellt.

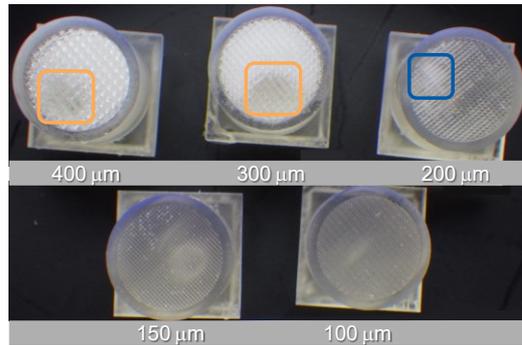


Abbildung 5.14: Kurze Gittersäulen (Auflösungstest) mit Kanalgrößen von 100 bis 400  $\mu\text{m}$ . Orange markiert: Zu polymerisierte Bereiche. Blau markiert: Offene Gitterkanäle.

In den 300 und 400  $\mu\text{m}$  Gitterstrukturen ist eine flächige Verblockung an der zylindrischen Stützstruktur zu erkennen (orange), welche 25 bis 33% der Gitterstruktur einnimmt. Die restliche Gitterstruktur in den beiden Proben weist offene Kanäle auf. Ab einer Kanalgröße von 200  $\mu\text{m}$  ist nur noch ein kleiner Bereich mit offenen Kanälen (blau) zu beobachten. Die Gitter mit 100 und 150  $\mu\text{m}$  Kanälen sowie Stegen sind vollständig geschlossen.

Um die Verblockung innerhalb der Struktur genauer untersuchen zu können, wird im nächsten Schritt die kurze Gittersäule mit 300  $\mu\text{m}$  Kanälen und Stegen im MicroCT untersucht. In Abbildung 5.15 sind die MicroCT-Aufnahmen der 300  $\mu\text{m}$  Gittersäule dargestellt.

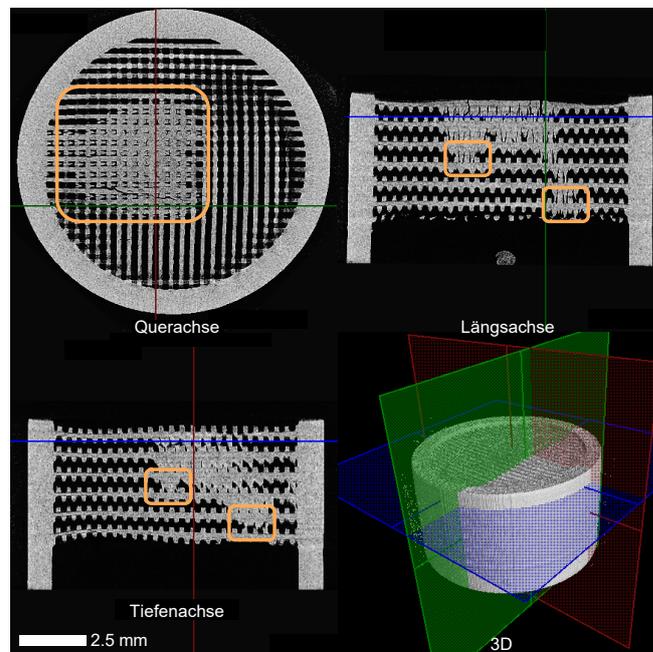


Abbildung 5.15: MicroCT-Aufnahmen einer 300  $\mu\text{m}$  Gittersäule, welche eine Verblockung aufweist.

Oben links ist das Schnittbild entlang der Querachse zu sehen, welche die Verblockung im linken mittleren Bereich der Probe zeigt. Die Bereiche um die Verblockung herum zeigen vollständig geöffnete Kanäle. In der Längsachse ist die Bildung mehrerer Nuklei im unteren Bereich der Gittersäule zu beobachten. Hier beginnt die Polymerisation und damit die Ausbildung der Polymerstruktur in Folge des DLP-Druckprozesses. Im mittleren Bereich der Säule sind weitere Keime zu sehen, welche den Ausgangspunkt der Verblockung darstellen und gradientenförmig größer werden. Diese Beobachtung kann auch in den Aufnahmen entlang der Tiefenachse bestätigt werden. Die Nukleationskeime weisen vermutlich eine Ansammlung von Oligomeren auf, welche dann zu Verblockungen polymerisieren.

## 5.2.2 Einfluss der Harzformulierung auf die Auflösung

Es konnte gezeigt werden, dass mit der PTH-1,25TPO-0,025OB-Harzformulierung keine offenen Kanäle in den 100 – 400  $\mu\text{m}$  Gitterstrukturen erzielt werden können.

Radikalfänger sind eine Möglichkeit, die freien Radikale in der  $xy$ -Ebene einzufangen, indem sie die diffundierenden Radikale abfangen und so die Polymerisation der unerwünscht wachsenden Ketten abbrechen. Dadurch können die Bereiche, die nicht dem UV-Licht des 3D-Druckers ausgesetzt sind und somit nicht polymerisieren sollen, besser abgeschirmt werden. Zur Bewertung der erzielbaren Materialauflösung der Harzformulierung werden zwei TPMS-Strukturen näher betrachtet: Gitter und Gyroid.

### Druckauflösung der Gitterstruktur

Mit der Zusammensetzung PTH-1,25TPO-0,025OB wird zunächst der aus der Literatur bekannte Inhibitor BHT<sup>[76]</sup> im OPT betrachtet, um die Auswirkungen auf die Schichtdicke zu ermitteln. In Abbildung 5.16 sind die Ergebnisse des OPTs dargestellt.

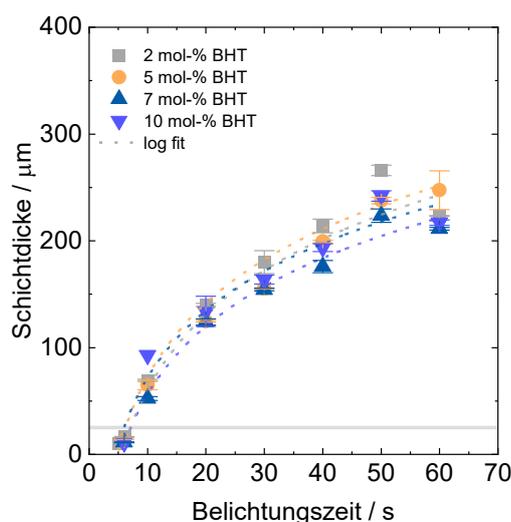


Abbildung 5.16: OPT-Ergebnisse des PTH-1,25TPO-0,025OB-Harzes mit unterschiedlichen Konzentrationen an BHT.

Wie erwartet hat die Konzentration an Inhibitor keinen signifikanten Einfluss auf die Schichtdicke und damit auf die Polymerisation in z-Ebene. Die in Abschnitt 5.2.1 ermittelten Druckparameter von 4 s Belichtungszeit bleiben für die folgenden Harzformulierungen erhalten.

Um den Einfluss der Inhibitormenge auf die Druckauflösung zu ermitteln, werden zunächst Druckauflösungstest mit 100 bis 400  $\mu\text{m}$  Gitterkanälen und BHT-Konzentrationen von 0,25 bis 10 mol-% durchgeführt. In Abbildung 5.17 sind einige Ergebnisse der Auflösungstests dargestellt. Die Ergebnisse aller untersuchten BHT-Konzentrationen sind im Anhang in Abbildung 8.5 abgebildet.

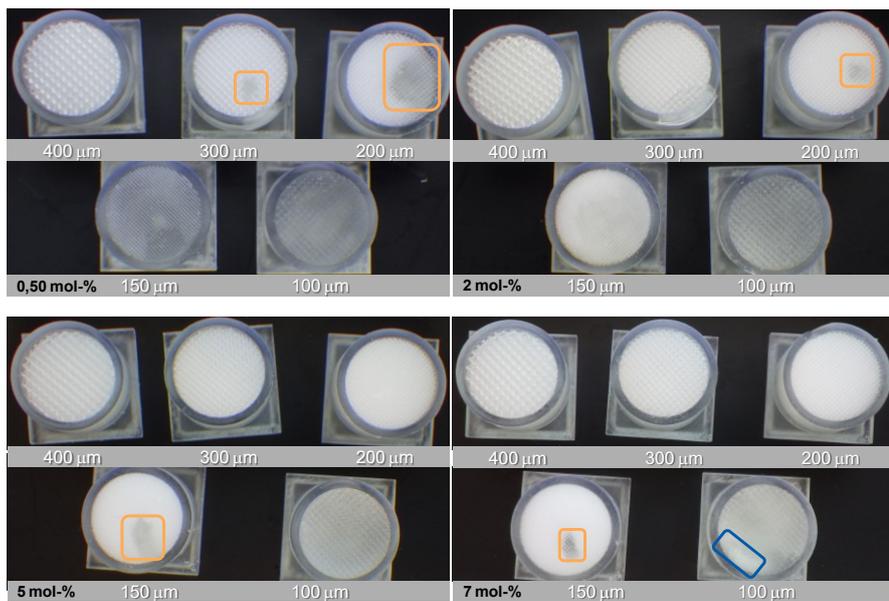


Abbildung 5.17: Ergebnisse der Auflösungstest mit 100 bis 400  $\mu\text{m}$  Gittersäulen der BHT Konzentrationen von 0,5 bis 7 mol-%. Orange markiert: Zu polymerisierte Bereiche. Blau markiert: Offene Gitterkanäle.

Bei 0,25 und 0,50 mol-% sind die 400  $\mu\text{m}$  Kanäle vollständig geöffnet, 200 und 300  $\mu\text{m}$  haben Verblockungen und 100 sowie 150  $\mu\text{m}$  sind geschlossen. Ab einer Konzentration von 1 mol-% an BHT sind die 300  $\mu\text{m}$  und ab 4 mol-% auch die 200  $\mu\text{m}$  Gitterkanäle vollständig geöffnet. Bei 2 mol-% BHT sich auch in der 150  $\mu\text{m}$  Probe und ab 5 mol-% ebenfalls in der 100  $\mu\text{m}$  Probe offene Kanäle zu beobachten, welche bei 7 mol-% stärker ausgeprägt sind.

Werden die 100  $\mu\text{m}$  Gittersäulen mit 5 und 7 mol-% BHT in Abbildung 5.18 von der Frontalebene aus betrachtet, so sind die kleinen offenen Bereiche besser zu sehen. Bei 5 mol-% sind nur die zuletzt gedruckten Schichten offen, während bei 7 mol-% die ersten und letzten Schichten offene Kanäle aufweisen.

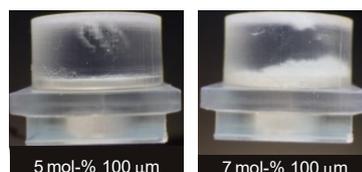


Abbildung 5.18: Frontalansicht der 100  $\mu\text{m}$  Gittersäulen mit 5 und 7 mol-% BHT.

Eine Erhöhung der BHT-Konzentration auf 10 mol-% führt jedoch nicht zu einer Verbesserung der Druckauflösung, sondern zu einer notwendigen Änderung der Druckparameter. Die Belichtungszeit von 4 s für eine 30  $\mu\text{m}$  Schicht muss für einen erfolgreichen Druck auf 4,5 s erhöht werden. Mit der höheren Belichtungszeit ergibt sich wieder eine vollständig geschlossene Struktur in der 100  $\mu\text{m}$  Gittersäule. Eine weitere Erhöhung der BHT-Konzentration kann daher nicht zu einer Verbesserung der Auflösung führen.

Da in einem Konzentrationsbereich von 4 bis 7 mol-% keine signifikante Änderung der Druckauflösung erzielt werden kann, wird 5 mol% BHT als Zielkonzentration für die neue Harzzusammensetzung gewählt. Für die Gitterstruktur kann hier die geringstmögliche Auflösung von 180  $\mu\text{m}$  Kanälen erreicht werden.

### Upscaling der Gittersäule

Um zu überprüfen, ob die Druckauflösung entlang der  $z$ -Achse konstant bleibt, wird eine 10 mm Gitterstruktur aus den Auflösungstests hochskaliert. Dazu werden Chromatographiesäulen mit einer 200  $\mu\text{m}$  Gitterstruktur und einem 40 mm bzw. 100 mm langen Gehäuse mit Gewinde 3D-gedruckt. Die Ergebnisse des *Upscalings* der Gitterstruktur sind in Abbildung 5.19 dargestellt. Für beide Säulenlängen können vollständig geöffnete Kanäle der Größe  $\geq 180 \mu\text{m}$  für die Gitterstruktur erhalten werden. Die 40 mm Gitterstruktur wurde weiterhin in einem MicroCT näher untersucht (Abbildung 5.19). Hier bestätigen die Aufnahmen das erfolgreiche *Upscaling* der Gitterstruktur.

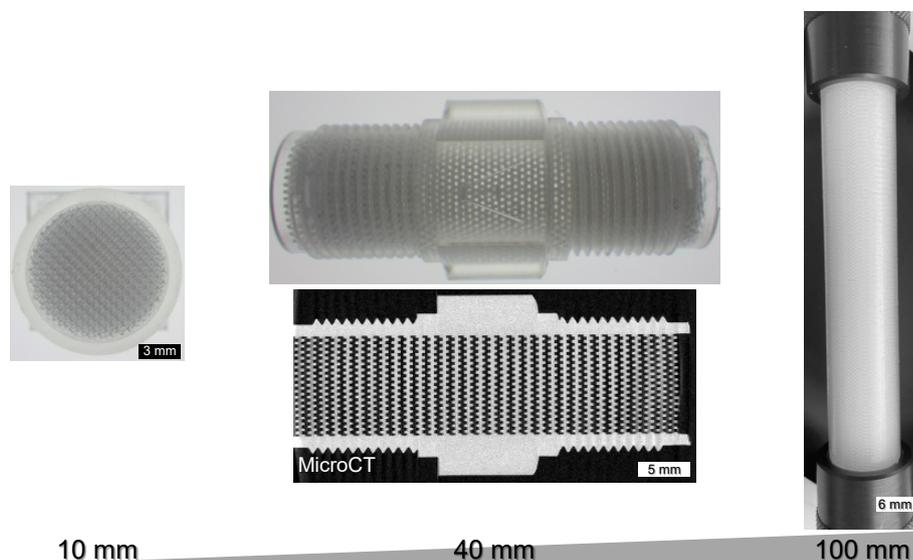


Abbildung 5.19: *Upscaling* einer 200  $\mu\text{m}$  Gitterstruktur auf eine Länge von 40 mm bzw. 100 mm.

### Druckauflösung der Gyroidstruktur

Mit der Rezeptur PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT wird nun die erreichbare Druckauflösung für komplexe Strukturen, wie die Gyroidstruktur, untersucht.

In Abbildung 5.20 sind die Druckauflösungsergebnisse der von 200 bis 300  $\mu\text{m}$  Gyroidstrukturen dargestellt. Für die Gyroidstruktur können offene Kanäle ab einer Breite von

240  $\mu\text{m}$  erreicht werden, wohingegen Kanal- und Stegbreiten  $\leq 200 \mu\text{m}$  verschlossen sind oder polymerisierte Bereiche zeigen.

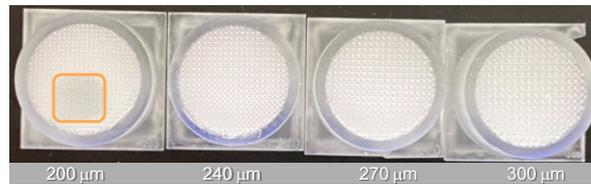


Abbildung 5.20: Ergebnisse der Auflösungstest mit 200 bis 300  $\mu\text{m}$  Gyroidsäulen gedruckt mit der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harzformulierung. Orange markiert: Zu polymerisierter Bereich.

### 5.2.1 Einfluss der Druckerwanne auf die xy-Auflösung

Der 3D-Drucker *SolFlex350* ist sowohl mit einer flexiblen Silikonwanne als auch mit einer Metallwanne mit einer FEP-Folie ausgestattet. Bei der Metallwanne ist am Boden der Wanne ein opakes Glas angebracht. Beim *Hyper-50Y* hingegen wird ein Kunststoffrahmen verwendet, der eine FEP-Folie ohne Glas einspannt. Eine offene Fragestellung ist der Einfluss der unterschiedlichen Wannen auf die Druckqualität des Materials.

Initiale Testdrucke haben gezeigt, dass sich die Druckergebnisse der beiden Wannen unterscheiden. Daher wird im nächsten Schritt untersucht, welchen Einfluss die Wahl der Druckerwanne auf die Druckqualität hat. In Abbildung 5.21 sind die Druckergebnisse mit den beiden *W2P*-Druckerwannen gegenübergestellt.

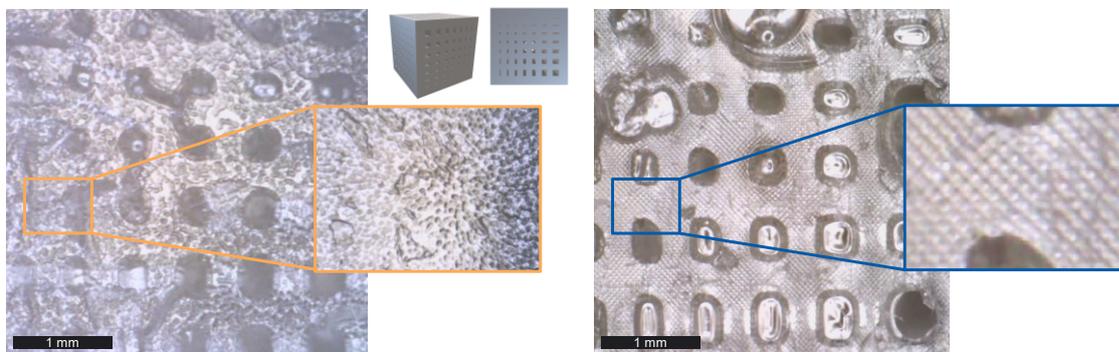


Abbildung 5.21: Druckergebnisse eines Würfels mit unterschiedlich großen Löchern zur Betrachtung der Druckqualität mit der *W2P*-Metallwanne mit opakem Glas am Wannenboden (links) und der Silikonwanne (rechts).

Wird das Objekt mit dem opakem Glas gedruckt, hat die unscharfe und unebene Oberfläche des Materials eine geringe Auflösung. Das opake Glas der Wanne streut das auf den Wannenboden projizierte Licht. Das gedruckte Objekt aus der Silikonwanne zeigt eine höhere Druckauflösung der Oberfläche, so dass die einzelnen Pixel sichtbar sind. Dies ist auf den transparenten Wannenboden zurückzuführen, welcher jedoch gegenüber der Harzformulierung instabil ist und angegriffen wird. Daher wird für die weiteren Druckversuche auf die Verwendung der Silikonwanne verzichtet.

Um nun die Druckauflösung der Metallwanne zu erhöhen, wird nun das opake Glas entfernt. Die Druckergebnisse mit nur einer in den Rahmen eingespannten FEP-Folie sind in Abbildung 5.22 gezeigt.

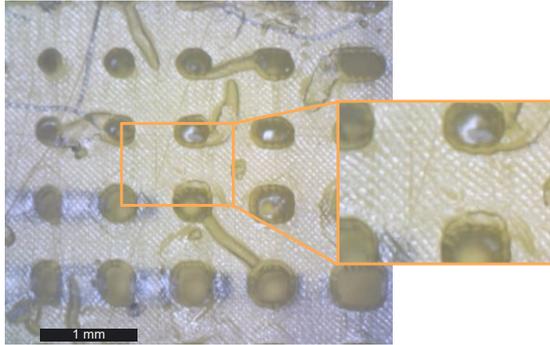


Abbildung 5.22: Druckergebnisse mit der *W2P*-Metallwanne ohne den Einsatz vom opaken Glas, sondern lediglich einer FEP-Folie am Wannensboden. Die Ergebnisse sind vergleichbar zur Silikonwanne.

Die Entfernung des Glases führt zu einer Erhöhung der Druckauflösung, so dass auch hier die Pixel sichtbar sind. Damit sind die Druckergebnisse mit denen der Silikonwanne vergleichbar. Neben der chemischen Beständigkeit der FEP-Folie kann diese weiterhin bei Abnutzungseffekten einfach in der Wannenthalterung ausgetauscht werden. Damit hat die Metallwanne bzw. beim *Hyper-50Y* die Kunststoffwanne eine längere Lebensdauer als die Silikonwanne. Da für die spätere Anwendung eine hohe Druckauflösung des Materials von Vorteil ist, wird für die weiteren Experimente die FEP-Folie als Wannensboden verwendet.

---

## 5.2.2 Einfluss des Druckprozesses auf die Auflösung

---

Die Druckauflösungstests mit den verschiedenen offenzelligen Strukturen zeigen die Grenzen der Anpassung des Druckergebnisses und damit der Materialauflösung durch eine veränderte Harzformulierung. Die Druckauflösung ist nicht nur vom Material, sondern auch vom 3D-Drucker sowie vom Druckprozess selbst abhängig.

Hier spielt die Druckerauflösung des kommerziellen 3D-Druckers eine wichtige Rolle. Die in dieser Arbeit verwendeten 3D-Drucker haben eine *xy*-Pixelauflösung von 30  $\mu\text{m}$  für den *Hyper-50Y* und 50  $\mu\text{m}$  für den *SolFlex350*. Weiterhin haben auch die Parameter des Druckprozesses, wie die Intensität, Abtropfzeit, die Ausrichtung des Druckobjektes, Stützstruktur etc., ebenfalls einen Einfluss auf den Druckerfolg.

Daher soll untersucht werden, inwieweit die Auflösung des Druckobjektes durch Anpassung der Parameter im Druckprozess verbessert werden kann. Bei den Auflösungsversuchen mit den 10 mm Gittersäulen konnte beobachtet werden, dass sich die Verblockungen vor allem am Rand der Gitterstruktur und somit an der Stützstruktur zu beobachten sind. Daher wird untersucht, welchen Einfluss die Stützstruktur auf die Druckauflösung des Objektes hat.

Dazu wird zunächst die äußere Zylinderwand entfernt, so dass nur das untere Ende der Gitterstruktur eine Stützstruktur besitzt. Dadurch soll ein besseres Abfließen der Oligomere ermöglicht werden, so dass weniger Streuzentren und damit weniger Polymerisationskeime zur Bildung von Verblockungen entstehen.

In Abbildung 5.23 sind die gedruckten 150  $\mu\text{m}$  Gitter- und 200  $\mu\text{m}$  Gyroidstrukturen mit und ohne die Zylinderwand dargestellt.

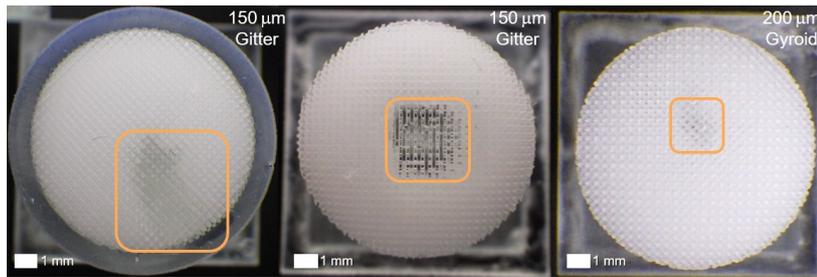


Abbildung 5.23: Auflösungsstest mit einem Zylinder mit 150 µm Gitter (links) im Vergleich zu ohne Zylinderhülle mit einem 150 µm Gitter (Mitte) und einem 200 µm Gyroid (rechts).

Beide Strukturen weisen weiterhin eine Verblockung in der Struktur auf, die sich jedoch bei der offenzelligen Struktur im Gegensatz zu den Drucken mit einer Zylinderwand in der Mitte des Objektes befindet. Der ausgehärtete Bereich hat sich zur Mitte hin verschoben und zeigt somit den Einfluss der Stützstruktur auf die Verblockung. Wird auch die untere Stütze vom Objekt entfernt, wird ein analoges Ergebnis erhalten.

Anschließend wird der Einfluss des Druckwinkels auf die Auflösung des 150 µm Gitters bzw. 180 µm und 200 µm Gyroids untersucht. Dazu wird das Druckobjekt jeweils um 90° gedreht gedruckt und anschließend die Druckqualität bewertet. Es können erstmals offene 150 µm Gitter- sowie 180 µm und 200 µm Gyroidstrukturen erhalten werden (Abbildung 5.24). Eine Umorientierung der Auflösungsstests um 90° führt zu einer Verbesserung der Druckqualität. Allerdings ist hier eine Verformung der Struktur auf der der Bauplattform zugewandten Seite zu beobachten. Daher ist für den weiteren Druck der kleineren Kanalgrößen im 90° Winkel eine Anpassung der Stützstruktur notwendig, die der Verformung entgegenwirkt. Diese wird jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

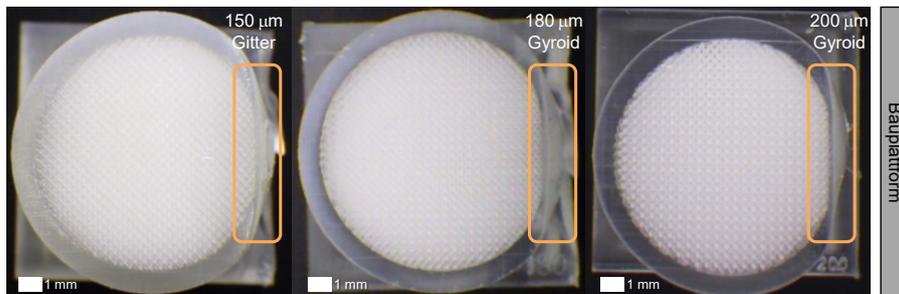


Abbildung 5.24: Im 90° Winkel gedruckte 150 µm Gitter und 180 µm sowie 200 µm-Gyroid Auflösungsstestobjekte.

### 5.2.3 Untersuchung der Maßhaltigkeit der 3D-gedruckten Objekte

Das 3D-gedruckte Objekt wird unter dem Lichtmikroskop betrachtet und überprüft, ob die erzielten Steg- sowie Kanalgrößen der Gitterstrukturen aus dem Auflösungstest den angestrebten entsprechen. Dabei wird eine Strukturporosität von 50% gewählt, so dass die Abmessungen der Gitter und Kanäle gleich groß sind.

Wie in Abbildung 5.25 an einer Aufnahme der 300 µm Gitterstruktur zu erkennen ist, besitzen die Gitter eine geringere Stegbreite im Vergleich zu den Kanälen und weisen somit keine Porosität von 50% auf. Die Abweichung beträgt 14% und findet sich ebenfalls bei der Änderung der Stegbreite in den anderen Objekten wieder.

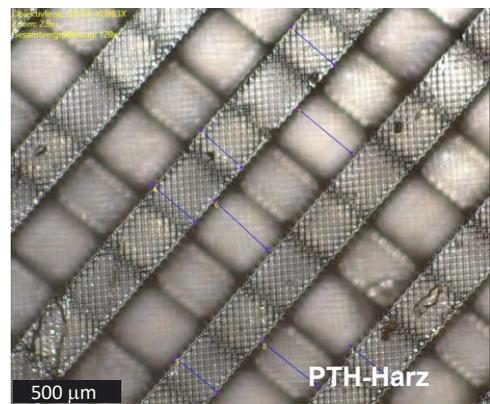
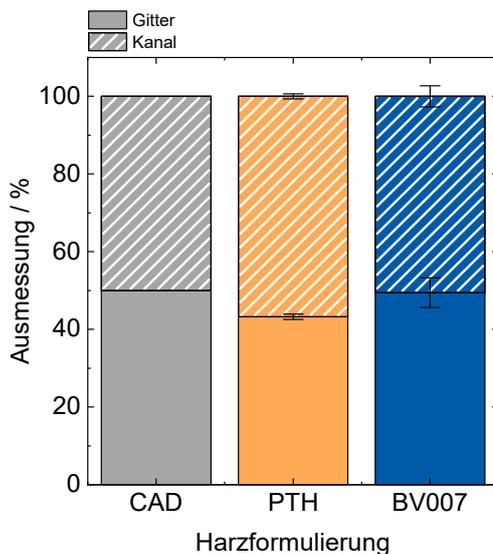


Abbildung 5.25: Vergleich der gedruckten Gitter- und Kanalabmessungen vom PTH- und vom kommerziellen *BV-007A* Harz mit der CAD-Datei links und eine Mikroskopieaufnahme vom 300 µm Gitter gedruckt mit dem PTH-Harz rechts.

Die Kanäle sind um die Größeneinheit größer, die dem Gitter an Abmessung fehlt. Werden die Ausmessungen des PTH-Harzes mit dem kommerziellen *MiiCraft BV-007A* Harz verglichen, so zeigt das kommerzielle Vergleichsharz eine deutlich geringere Abweichung zur CAD-Datei.

Dies wirft die Frage auf, worauf die Abweichungen zwischen der CAD-Datei und den gedruckten Objekten zurückzuführen sind. Einen möglichen Einfluss auf die Druckergebnisse könnten der Druckprozess, Reinigungsprozess und die Materialkomposition haben, die im Folgenden näher betrachtet werden.

#### Einfluss des Druckprozesses

Zunächst wird der Einfluss des Druckprozesses auf die 3D-gedruckten Objekte untersucht. Hier stellt sich die Frage, ob die Abweichung der Stegbreiten bereits im Druckprozess oder erst in der Nachbehandlung entsteht.

Dazu wird eine Gitterstruktur mit dem PTH-Harz hergestellt und unmittelbar nach dem Druck unter dem Mikroskop betrachtet. Anschließend erfolgt ein Vergleich des frisch gedruckten 3D-

Objektes mit den Ausmessungen nach dem Reinigungsschritt mit Ethanol in sukzessiv steigender Dauer. Zu Beginn wird die Kontaktzeit zwischen Lösungsmittel und Objekt sowie die Lösungsmittelmenge so gering wie möglich gehalten. Anschließend wird das Objekt wie üblich mit dem Lösungsmittel auf dem Thermoschüttler gereinigt, um den Einfluss des Reinigungsschrittes auf die Ausmessungen zu untersuchen. Zuletzt wird das getrocknete Objekt wieder über Nacht im Lösungsmittel gelagert, um die Reversibilität der Schrumpfung zu untersuchen. In Abbildung 5.26 sind die Ergebnisse der Ausmessungen des Druckobjektes vor und nach der Lösungsmittelbehandlung gegenübergestellt.

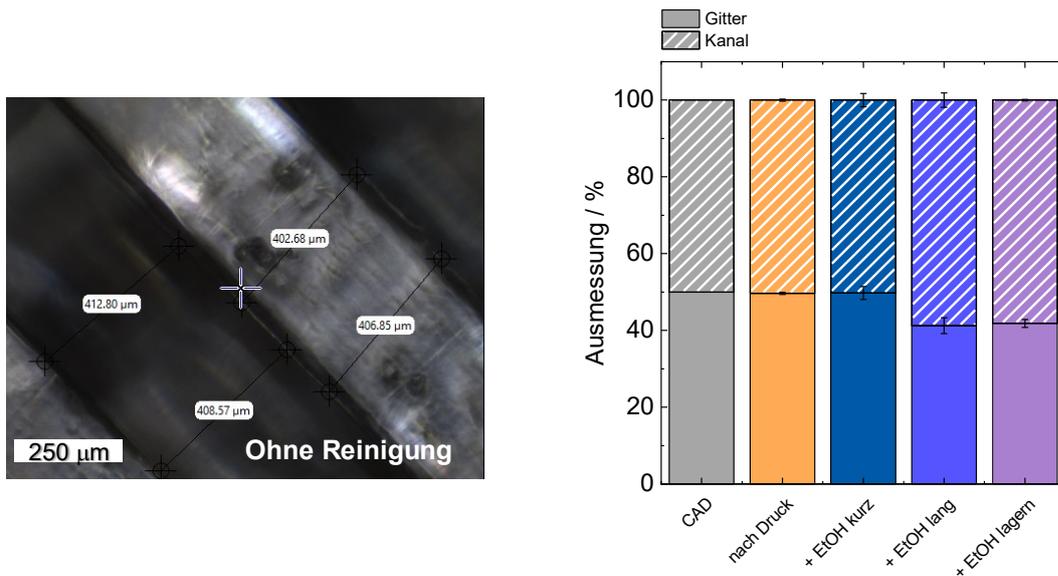


Abbildung 5.26: Mikroskopieaufnahmen eines ungewaschenen 400 µm Gitters verdruckt mit dem PTH-Harz links und Vergleich der Abmessungen des Gitters und der Kanäle nach der Behandlung mit Ethanol rechts.

Wenn die Probe vor dem Reinigungsschritt betrachtet wird, ist die Oberfläche mit nicht polymerisiertem Harz benetzt. Dadurch wird die Ausmessung der Gitter erschwert. Dennoch kann festgestellt werden, dass die Gitter und Kanäle nach dem Druckprozess eine geringere Abweichung (1,2 – 2,7%) von der CAD-Datei aufweisen als die Proben nach der Nachbehandlung. Ein kurzer Kontakt mit Ethanol von 10 s scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Dimension des Objektes zu haben. Bei längerem Kontakt mit dem Lösungsmittel scheinen die Gitter jedoch irreversibel und final um ~17% zu schrumpfen, da nach einer Lagerung des zuvor getrockneten Objektes im Lösungsmittel weder ein Quellen auf die ursprüngliche Ausgangsdimension noch ein weiteres Schrumpfen beobachtet werden kann.

Die mit dem kommerziellen Vergleichsharz *BV-007A* gedruckten Gitter zeigen eine geringe Abweichung zwischen der CAD-Datei und dem gedruckten Objekt. Da diese sowohl mit dem gleichen 3D-Drucker als auch mit der gleichen Druckdatei wie das PTH-Harz hergestellt wurden und auch die gleiche Reinigungsprozedur durchgeführt wurde, kann ein Einfluss des Druckprozesses auf die beobachteten Abweichungen ausgeschlossen werden. Bei weiterer Betrachtung der mikroskopischen Ausmessungen des PTH-Harzes bestätigt sich die Vermutung, dass die Schrumpfung erst nach dem Druckprozess im Reinigungsschritt stattfindet. Daher wird im nächsten Schritt der Reinigungsprozess näher betrachtet.

## Einfluss des Reinigungsprozesses

Um den Einfluss des Reinigungsprozesses auf den Schrumpfprozess näher zu untersuchen, werden Dipropylenglykolmonomethylether (DPGME), IPA, ein kommerziell erhältlicher Harzreiniger (*Monocure 3D Resinaway*<sup>®</sup>), Reinstwasser, Hexan und HEMA zur Reinigung der 3D-gedruckten Gitterstrukturen eingesetzt. Dabei werden sowohl polare als auch unpolare sowie organische als auch wässrige Lösungsmittel verwendet und die Proben anschließend im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Die Ergebnisse der Abmessung der Gitter und Kanäle sind in Abbildung 5.27 für die getesteten Lösungsmittel dargestellt.

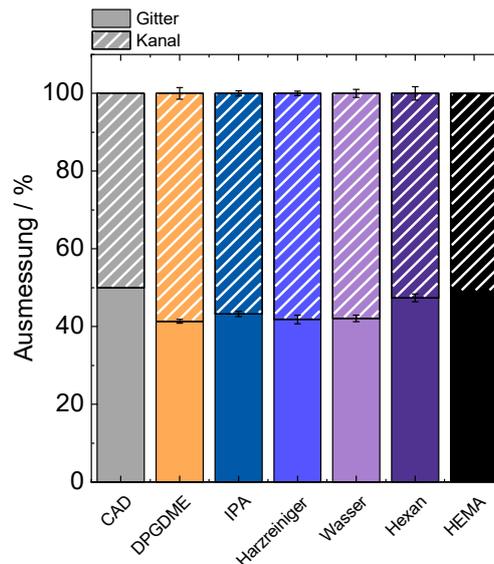


Abbildung 5.27: Vergleich der Abmessungen des Gitters und der Kanäle nach der Behandlung mit DPGME, IPA, einem Harzreiniger, Reinstwasser, Hexan und HEMA, um den Lösungsmiteleinfluss auf das Schrumpfen der Struktur zu bewerten.

Für DPGME, IPA, den Harzreiniger und Wasser werden mit 14 – 17% Abweichung von der angestrebten Größe vergleichbare Ergebnisse erzielt. Für das unpolare Hexan ergibt sich eine Abweichung von 5% und damit eine Schrumpfung von nur einem Drittel im Vergleich zu den anderen Lösungsmitteln. Die geringste Abweichung von 2% ist bei HEMA zu beobachten, welches selbst als Monomer Bestandteil der Harzmischung ist. Dies zeigt, dass die polaren Lösungsmittel zum Schrumpfen des Materials führen. Da HEMA jedoch mit 60 mol-% den größten Anteil an der Rezeptur hat, scheint das Problem eines Angriffs der Polymerstruktur hier nicht zu bestehen.

Bei näherer Betrachtung der gewaschenen Objekte zeigt sich jedoch, dass das gewählte Lösungsmittel auch einen Einfluss auf den Reinigungserfolg des Materials hat. In Abbildung 5.28 sind beispielhaft die mit Hexan, dem Harzreiniger und IPA gewaschenen Gitterstrukturen dargestellt.

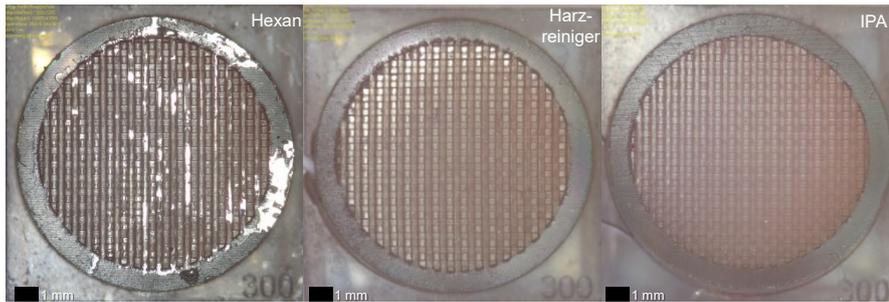


Abbildung 5.28: Auflösungstests von 300 µm Gitterstrukturen gewaschen mit Hexan, DPGME oder IPA.

Es ist zu erkennen, dass das 3D-gedruckte Gitterobjekt nach der Behandlung mit Hexan noch mit unvollständig polymerisiertem Harz benetzt ist. Das unpolare Hexan ist hier nicht in der Lage, die hydrophilen Harzkomponenten zu lösen. Somit ist Hexan trotz der geringen Schrumpfung des Materials für die Reinigung ungeeignet. Der Harzreiniger hinterlässt auch auf der Struktur Oberfläche eine Lösungsmittelschicht. Analoges gilt für HEMA als Lösungsmittel. Nur das 2-Propanol führt zu einer restlosen Entfernung des überschüssigen Harzes und des Lösungsmittels.

Da durch den Einsatz von IPA eine vollständige Reinigung des Objektes erreicht werden kann und dieses gleichzeitig die geringste Maßabweichung innerhalb der polaren Lösungsmittel aufweist, wird 2-Propanol als Lösungsmittel für die weiteren Reinigungsschritte gewählt.

### Einfluss der Hydrophilie des Materials

Werden die Ergebnisse der Lösungsmittelreihe betrachtet, so führen unpolare Lösungsmittel zu einer geringeren Schrumpfung der Struktur. Das untersuchte Harz besteht anwendungsbedingt aus hydrophilen Komponenten und muss daher ebenfalls mit einem polaren Lösungsmittel behandelt werden. Da eine Schrumpfung des Materials durch die Wahl des Lösungsmittels nicht verhindert werden kann, stellt sich die Frage, ob das Schrumpfen der Struktur auf den hydrophilen Charakter der Formulierung zurückzuführen ist.

Bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung des kommerziellen *BV-007A* Harzes konnte 2-Phenoxyethylmethacrylat (PEMA) als Monomer identifiziert werden. Dieses besitzt im Vergleich zu HEMA einen hydrophoben und gleichzeitig sterisch anspruchsvollen Phenylring am endständigen Sauerstoffatom. Um nun den Einfluss der Hydrophilie und Sterik des Monomers auf den Schrumpfprozess des Materials zu bewerten, wird eine Variation des Monomeranteils des HEMA von 0 – 100 mol-% gemischt mit dem hydrophoberen Monomer PEMA durchgeführt (Abbildung 5.29). Der Gesamtmonomeranteil von 60 mol-% in der finalen Harzformulierung wird dabei beibehalten.

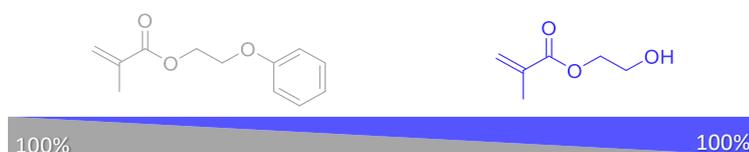


Abbildung 5.29: Strukturen von PEMA und HEMA, welche als Monomer in der PT(H/P)-Harzformulierung eingesetzt werden. Dabei wird der Anteil des HEMA in der Monomergesamtmenge von 0 bis 100% variiert.

Werden die Ergebnisse der Variation in der Monomermischung aus HEMA und PEMA in Abbildung 5.30 betrachtet, so ist der Trend zu erkennen, dass mit steigendem PEMA-Anteil die Abweichung zwischen der CAD-Datei und dem 3D-gedrucktem Objekt abnimmt. Dabei zeigt ein PEMA-Anteil von 16,7% in der Monomermischung keinen signifikanten Einfluss auf das Schrumpfen des Materials und ist somit vergleichbar mit der Basisrezeptur. Erst bei einer Erhöhung des PEMA-Anteils auf 50% ist eine signifikante Abnahme der Schrumpfung um 56% zu beobachten. Die Rezeptur mit nur PEMA als Monomer zeigt wie beim HEMA-Anteil von 16,7% einen Rückgang der Schrumpfung um 87% und damit eine geringe Abweichung der Abmessungen von der CAD-Datei von  $\sim 3\%$ .

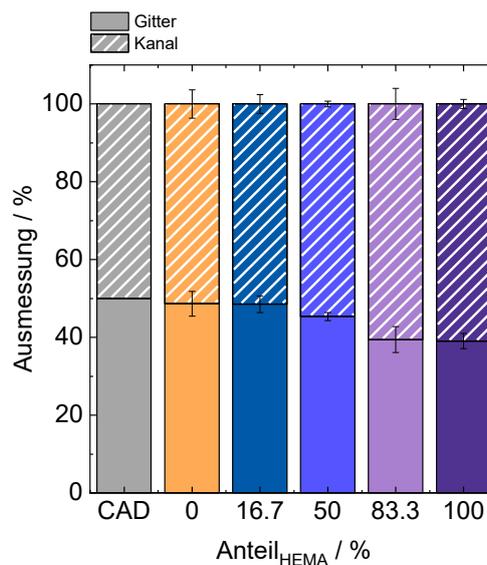


Abbildung 5.30: Vergleich der Abmessungen des Gitters und der Kanäle bei unterschiedlichen Anteilen von HEMA und PEMA als Monomer in der Harzformulierung, um den Einfluss des Monomers auf das Schrumpfen der Struktur zu bewerten.

Da das kommerzielle Vergleichsmaterial eine geringere Abweichung von der CAD-Datei aufweist und der Austausch des Monomers HEMA durch PEMA zu einer Verringerung des Schrumpfens im Material beiträgt, scheint die Schrumpfung auf das Material selbst zurückzuführen zu sein. Da jedoch die Hydroxylgruppe infolge der späteren Funktionalisierung die gewünschte Funktionalität im Material ist und der Anteil von 60 mol-% die Vergleichbarkeit mit kommerziellen Produkten ermöglicht, wäre die Einführung von PEMA in die Rezeptur nicht sinnvoll. Hier würde sich entweder ein sterisch anspruchsvolles Hydroxylmonomer oder ein sterischer Quervernetzer anbieten. Da jedoch die Grundrezeptur für die Vergleichbarkeit der Versuche beibehalten werden soll, wird im letzten Schritt untersucht, ob eine Anpassung der CAD-Datei und damit die Berücksichtigung der Schrumpfung zu definierten Gitter- und Kanalgrößen führt.

### Anpassung der CAD-Datei

Die Untersuchung der Gitter- und Kanalgrößen unter dem Mikroskop ergibt für das in IPA gereinigte Material einen mittleren Schrumpfungsfaktor von  $\sim 1,23$ . Dies bedeutet, dass die Gitterbreite um diesen Faktor vergrößert, während die Kanalgröße um den Faktor 0,77

verkleinert werden muss. Für das 300  $\mu\text{m}$  Gitter wird daher eine Größe von 370  $\mu\text{m}$  und für den Kanal 230  $\mu\text{m}$  gewählt. Die Druckergebnisse des angepassten Objektes sind in Abbildung 5.31 dargestellt.

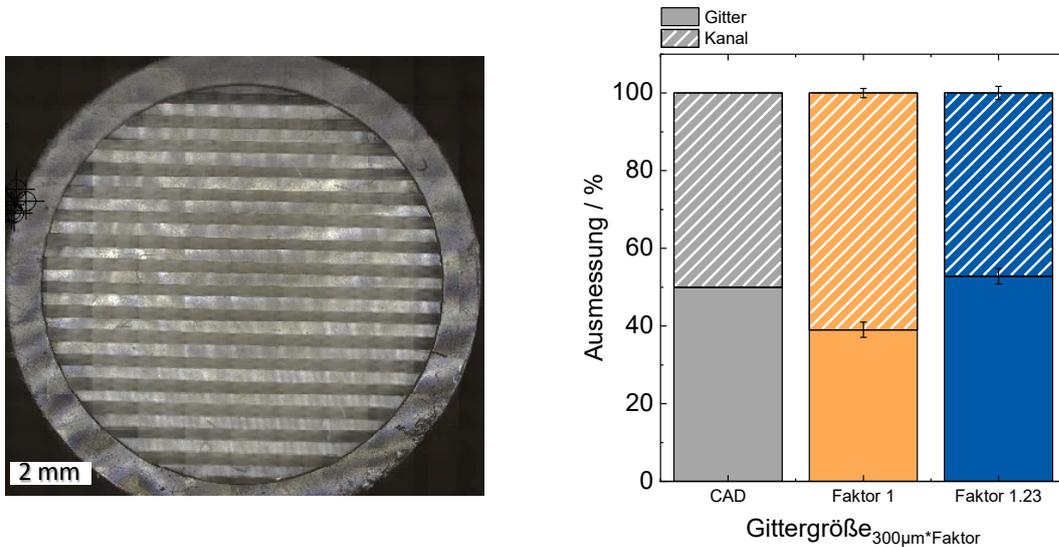


Abbildung 5.31: Mikroskopieaufnahme der Gittersäule mit 370  $\mu\text{m}$  Gittern und 230  $\mu\text{m}$  Löchern (links) und der Vergleich der Abmessungen der angepassten sowie der Originalprobe (rechts).

Hier ist zu erkennen, dass die Anpassung der Struktur zu einer geringeren Abweichung der Abmessungen führt. Somit konnte das Schrumpfen durch die Anpassung der CAD-Datei ohne eine Änderung der Harzrezeptur kompensiert werden und führt zu der gewünschten Porosität von  $\sim 50\%$ .

### 5.3 Oberflächenfunktionalisierung von 3D-gedruckten Gitterstrukturen

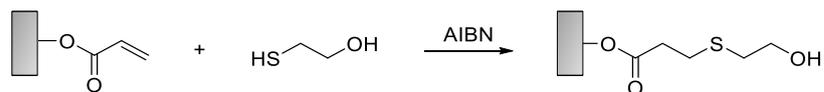
Nach der Identifizierung einer geeigneten Harzformulierung folgt die Betrachtung möglicher Oberflächenfunktionalisierungen für die Herstellung von Ionenaustauschern in Form von 3D-gedruckten Chromatographiesäulen. Hierbei gibt es zwei wesentliche Möglichkeiten, funktionelle Gruppen in die Struktur einzubringen. Zum einen durch die Harzformulierung über die Auswahl geeigneter Monomere. Zum anderen durch eine nachträgliche chemische Modifikation der Oberfläche.

Dabei bietet die nachträgliche Modifikation der Oberflächengruppen nach dem 3D-Druckprozess den Vorteil, dass diese Methode ausgehend von einer universellen Harzformulierung durchgeführt werden kann. Durch verschiedene Oberflächenreaktionen können unterschiedliche Funktionalitäten auf der Oberfläche realisiert und somit mit nur einer Harzformulierung verschiedene Anwendungsgebiete, wie z.B. die Affinitäts- oder Ionenaustauschchromatographie, abgedeckt werden. Daher werden in dieser Arbeit neben der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harzformulierung keine weiteren Rezepturen untersucht.

Für die Funktionalisierung bieten sich entweder die nicht umgesetzten Doppelbindungen oder die Hydroxylgruppen des HEMA-Monomers in der gewählten Harzformulierung an. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Funktionalisierung der Hydroxylgruppen des Materials nach dem 3D-Druckprozess.

#### 5.3.1 Thiol-En-Klickreaktion zur Umsetzung enthaltener freier Doppelbindungen

Zunächst wird überprüft, ob die freien Doppelbindungen nach dem 3D-Druckprozess dazu genutzt werden können, um die OH-Gruppendichte auf der Oberfläche über eine radikalische Thiol-En-Klickreaktion zu erhöhen (Schema 5.1).



Schema 5.1: Reaktionsschema der radikalischen Thiol-En-Klickreaktion an den freien Doppelbindungen der 3D-gedruckten Objekte mit Mercaptoethanol.

#### Bestimmung des Vernetzungsgrads der Druckobjekte

Zur Validierung der Versuchsparameter der radikalischen Additionsreaktion müssen zunächst die freien Doppelbindungen quantifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgt über die Reaktionsenthalpie der Vernetzungsreaktion, welche mit Hilfe der DSC gemessen werden kann. Um unterschiedliche Vernetzungsgrade zu erhalten, werden drei verschiedene Photoabsorber eingesetzt: NPS, Sudan I und Coumarin 153.

Die Ergebnisse der Vernetzungsgrade der untersuchten Materialien sind in Abbildung 5.32 dargestellt.

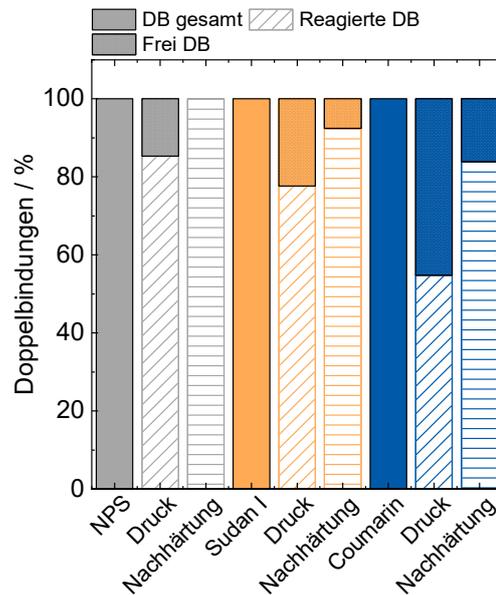


Abbildung 5.32: Ergebnisse der aus den DSC-Messungen erhalten freien Doppelbindungen der Harze mit NPS (13% freie DB), Coumarin 153 (45% freie DB) und Sudan I (22% freie DB) als Photoabsorber.

Ausgehend von dem reinen Harz kann die Gesamtmenge der Doppelbindungen in der Rezeptur als 100% angegeben werden. Die 3D-gedruckten Objekte werden sowohl ungehärtet nach der Reinigung als auch nach der Nachhärtung mit 1000 Blitzern unter Stickstoffatmosphäre untersucht. Die mit NPS gedruckten Objekte weisen nach dem 3D-Druckprozess einen Vernetzungsgrad von 87% auf und besitzen somit 13% freie Doppelbindungen, die für eine Thiol-En-Umsetzung zur Verfügung stehen. Der Nachhärteprozess führt zu einem Vernetzungsgrad von 100%. Werden hingegen die Proben mit Sudan I und Coumarin 153 betrachtet, so besitzen die Sudan I-Objekte 22% und die Coumarin 153-Objekte 45% freie Doppelbindungen. Nach der Aushärtung sind bei beiden Photoabsorbieren noch freie Doppelbindungen zu beobachten. Dies kann auf die geringeren Vernetzungsgrade und die reduzierte Reaktionsumgebung im Material zurückgeführt werden.

Mit den erhaltenen Vernetzungsgraden kann anschließend der Materialeinsatz für die Thiol-En-Reaktion bestimmt werden.

### Umsetzung der freien Doppelbindungen mittels Thiol-En-Reaktion

Zur Ermittlung geeigneter Versuchsparameter werden zunächst 5x5x5 mm große Gitterwürfel mit 400 µm Kanälen mittels Thiol-En-Reaktion umgesetzt. Anschließend erfolgt die Quantifizierung der umgesetzten Doppelbindungen mittels Elementaranalyse des Schwefels, welcher ausschließlich über das Thiol in das Polymer eingeführt wird. Pro umgesetzte Doppelbindung wird ein Schwefelatom eingebaut.

In Abbildung 5.33 sind die Ergebnisse der Schwefelelementaranalyse dargestellt.

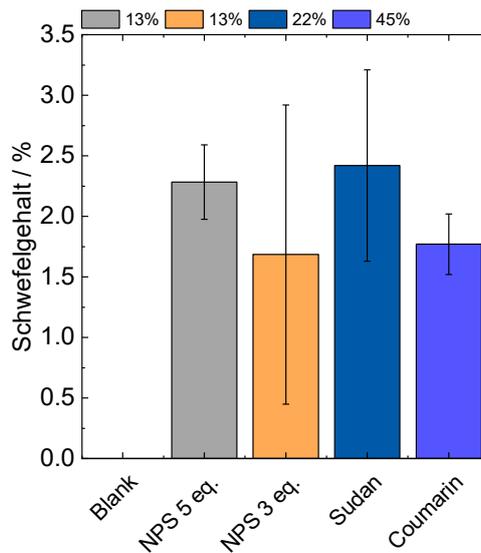


Abbildung 5.33: Ergebnisse der Schwefelelementaranalyse von Proben mit NPS, Sudan I oder Coumarin 153 als Photoabsorber, um den Zusammenhang zwischen S-Gehalt und freien Doppelbindungen zu betrachten.

Aufgrund der geringen Probenmenge wird für jede Probe eine sechsfache Schwefelgehaltsbestimmung durchgeführt. Werden die Schwefelgehalte der untersuchten Proben betrachtet, so ergeben sich hohe Fehlergrenzen und geringe Umsatzgrade ( $< 2,5\%$ ). Bei der Doppelbindungsbestimmung zeigte Coumarin 153 die meisten und NPS die wenigsten freien Doppelbindungen. Infolge des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der freien Doppelbindungen und der damit verbundenen Schwefelmenge, wird für die Absorber Sudan I und Coumarin 153 ein deutlicher höherer Schwefelgehalt als für NPS erwartet. Diese Vermutung kann jedoch durch die Elementaranalyse nicht bestätigt werden. Hier weichen die Ergebnisse deutlich voneinander ab und zeigen keinen eindeutigen Trend zwischen der Anzahl der Doppelbindungen und dem Schwefelgehalt. Mit den über die DSC-Messungen ermittelten freien Doppelbindungen ergeben sich für NPS Ausbeuten von 13 – 18%, Sudan I 11% und Coumarin 153 lediglich 4%.

Aufgrund der Streubreite der Gehaltsbestimmung kann keine akkurate Aussage über den Schwefelgehalt und damit über die Menge der neu eingeführten Hydroxyleinheiten getroffen werden. Aus diesem Grund wird die Reaktion nicht weiter betrachtet.

### 5.3.2 TEMPO Oxidation zur Umsetzung der Hydroxylfunktionalitäten

Ausgehend von der Hydroxylgruppe des HEMA-Monomers können die 3D-gedruckten Chromatographiesäulen mittels TEMPO-Oxidation zu Kationenaustauschern umgewandelt werden. Zur Ermittlung geeigneter Versuchsparameter werden 5x5x5 mm Gitterwürfel mit 400  $\mu\text{m}$  Kanälen mittels TEMPO-Oxidation umgesetzt (Schema 5.2). Die Quantifizierung der Carbonsäuregruppen erfolgt mit Hilfe der Säure-Base-Titration.



Schema 5.2: Reaktionsschema der TEMPO-Oxidation von Hydroxylgruppen zu Carbonsäure-Einheiten.

#### Bestimmung der Versuchsparameter im Batchbetrieb

Werden die ionischen Kapazitäten der untersuchten Gitterwürfel in Abbildung 5.34 betrachtet, so weisen bereits die nicht TEMPO-oxidierten Proben 3,6  $\mu\text{äq g}^{-1}$  (0,2% der theoretischen OH-Gruppendichte) an Säuregruppen auf. Dies ist zum einen auf die Oxidation durch den Luftsauerstoff und zum anderen auf die mechanische Behandlung zurückzuführen. Wird der Katalysator TEMPO nicht in die Reaktionslösung gegeben oder eine zu lange Reaktionszeit von 24 h gewählt, so ist keine signifikante Erhöhung der Kapazität gegenüber dem Blindwert zu beobachten. Diese entsprechen dem Blindwert des Materials. Bei Variation der Reagenzienäquivalente und der Reaktionszeit zeigt die Reaktionsführung mit 4 h Reaktionszeit und zweifachem Reagenzienüberschuss mit 59,2  $\mu\text{äq g}^{-1}$  (3% der theoretischen OH-Gruppendichte) die höchste ionische Kapazität. Mit diesen Versuchsparametern werden die weiteren Materialien umgesetzt.

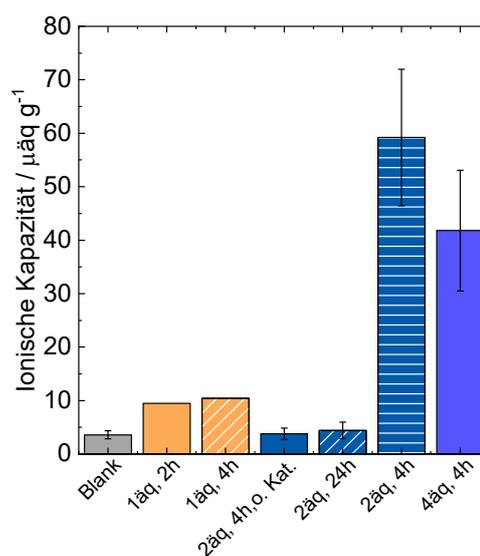


Abbildung 5.34: Titrationsergebnisse der TEMPO-Oxidation von 400  $\mu\text{m}$  Gitterwürfeln mit Variation der Versuchsparameter (nicht korrigiert mit dem Blindwert).

## Überprüfen der Eignung von TEMPO-Oxidation für Chromatographiematerialien

Der nächste Schritt ist die Oxidation von 40 mm und 100 mm langen Chromatographiesäulen, die am Stück gedruckt werden. Als zerstörungsfreies Analyseverfahren der Carboxylgruppendichte, welches eine anschließende Weiterverwendung des 3D-Objektes ermöglicht, wird die Applikation der Säulen als Kationenaustauscher und die Bestimmung der dynamische Bindungskapazität (DBC) genutzt. Dabei wird Lysozym (pI = 11,35) als Modellprotein verwendet und die gesammelten Fraktionen im UV-Vis-Spektrometer bei 280 nm vermessen.

Zunächst wird der lineare Konzentrationsbereich des Lysozyms und damit ein Extinktionskoeffizient für die quantitative Bestimmung der Proteinmenge ermittelt. In Abbildung 5.35 sind die Ergebnisse der Verdünnungsreihe dargestellt.

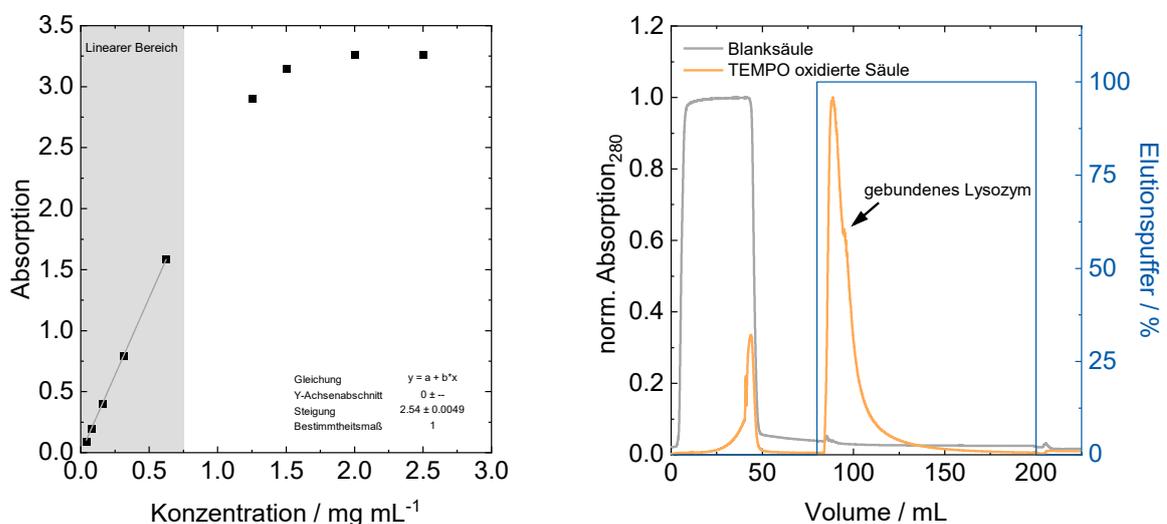


Abbildung 5.35: Kalibrierung der Lysozymkonzentration (links) und Chromatogramm einer Referenzmessung im Vergleich zu einer oxidierten 300 µm sowie 100 mm langen Gittersäule bei pH 4,5 (rechts).

Bis zu einer Konzentration von 1,25 mg mL<sup>-1</sup> ist ein linearer Verlauf der Absorption zu beobachten, der bei steigender Konzentration in eine Sättigung übergeht. Für die DBC wird eine Konzentration von 0,5 mg mL<sup>-1</sup> an Lysozym gewählt. Durch die lineare Regression wird damit ein  $\varepsilon = 2,54 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für die Berechnung der Proteinbindekapazität nach Gleichung 4.7 bestimmt.

Daraufhin wird überprüft, ob Lysozym nicht-spezifisch an die 3D-gedruckte Matrix bindet. Dazu wird eine Blindmessung mit einer nicht TEMPO-behandelten Gittersäule durchgeführt. In Abbildung 5.35 rechts sind die Chromatogramme einer oxidierten und einer nicht oxidierten 300 µm Chromatographiesäule von 100 mm Länge, aufgenommen mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL min<sup>-1</sup>, gegenübergestellt. Das unmodifizierte Material zeigt keine nicht-spezifische Bindung vom Protein am Material. Im Gegensatz dazu ist eine Bindung des Lysozyms an der TEMPO oxidierten Chromatographiesäule und bei Erhöhung der Konzentration des Elutionspuffers (50 mM Natriumacetatpuffer mit 1 M NaCl) die Elution des Proteins möglich. Dies zeigt, dass eine erfolgreiche TEMPO-Oxidation an den 3D-gedruckten Säulen durchgeführt werden konnte und diese als CEX verwendet werden können.

## Optimierung der Reaktionsbedingungen im kontinuierlichen Betrieb

Im nächsten Schritt soll die TEMPO-Modifizierung der Chromatographiesäulen optimiert werden. In diesem Fall wurde der Versuchsaufbau variiert und die Reaktion sowohl statisch auf einem Kreisschüttler als auch dynamisch mit einer Spritzenpumpe durchgeführt. In Abbildung 5.36 sind die Proteinbindekapazitäten des Versuchs dargestellt.

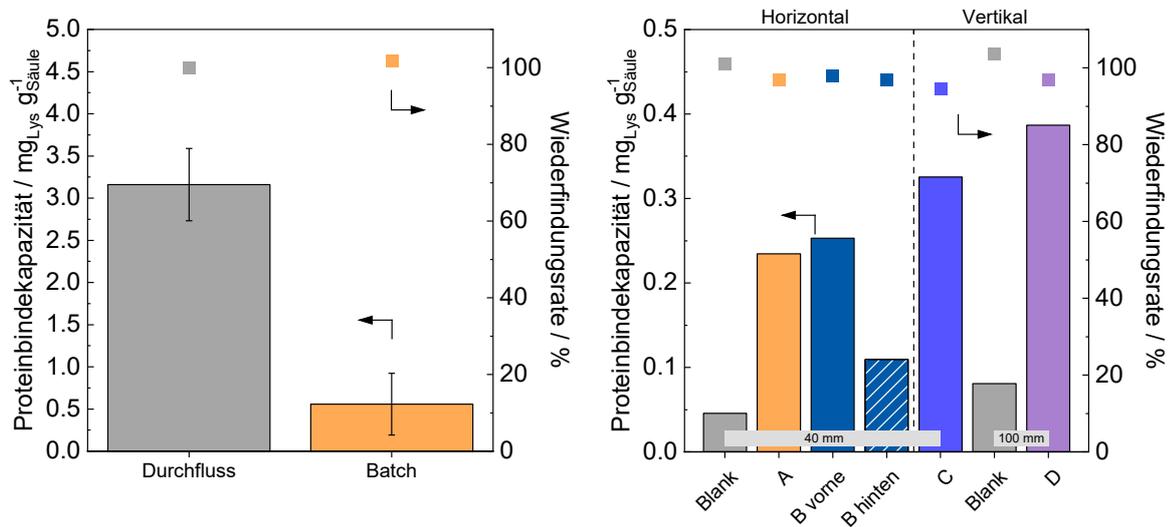


Abbildung 5.36: Die Proteinbindekapazitäten aus der DBC der kontinuierlich (Durchfluss von unten nach oben) und im Batch umgesetzten  $300 \mu\text{m}$   $100 \text{ mm}$  Gittersäulen bei pH-Wert 5 in einer Dreifachbestimmung (links) und die Proteinbindekapazitäten von  $300 \mu\text{m}$   $40$  und  $100 \text{ mm}$  Gittersäulen mit unterschiedlicher Versuchsdurchführung bei pH 4,5 (rechts). Die Unterschiede der Proteinbindekapazitäten der Säule im Durchfluss links und der Säule rechts ergeben sich durch die pH-Wert-Änderung.

Dabei weist die Batchreaktionsführung mit  $0,5 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  eine deutlich geringere Proteinbindekapazität auf, als die dynamische Variante mit der sechsfachen Kapazität. Daher wird die TEMPO-Oxidation der Chromatographiesäulen im Durchfluss durchgeführt.

Weiterhin stellt sich die Frage nach der Positionierung der Säule im Versuchsaufbau mit der Spritzenpumpe. Dazu werden  $40 \text{ mm}$  und  $100 \text{ mm}$  Gittersäulen mit einer Kanalgröße von  $300 \mu\text{m}$  in der Oxidationsreaktion sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Position umgesetzt. Dabei wird ebenfalls der Einfluss einer Kaskade von mehreren Säulen getestet. In Abbildung 5.36 rechts sind die beim pH-Wert von 4,5 in der DBC vermessenen Proteinbindekapazitäten des Aufbauscreenings dargestellt. Werden die Ergebnisse der horizontalen Versuchsdurchführung betrachtet, so ergeben sich für die  $40 \text{ mm}$  Säulen Proteinbindekapazitäten von  $0,23 - 0,25 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$ . Die nachgeschaltete Säule zeigt dagegen mit  $0,11 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  eine deutlich geringere Kapazität auf, so dass auf eine simultane Umsetzung mehrerer Säulen an einer Spritzenpumpe nicht weiterverfolgt wird. Die vertikale Positionierung der Säulen liefert dabei mit  $0,33 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  für die  $40 \text{ mm}$  und mit  $0,39 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  für die  $100 \text{ mm}$  Gittersäule höhere Proteinbindekapazitäten. Daher werden für die folgenden Versuche  $100 \text{ mm}$  lange Säulen in vertikaler Position umgesetzt.

## Einfluss der Oxidation auf das Erscheinungsbild der Chromatographiesäulen

Nach dem Austausch des Photoabsorbers NPS durch OB184 zur Herstellung farbloser Säulen (Abschnitt 5.1.1) kann aufgrund der verbesserten Druckauflösung der 3D-Druck von farblosen 200  $\mu\text{m}$  Gittersäulen für die TEMPO-Oxidation erfolgen. Aufgrund der nun farblosen Objekte kann nach der Oxidation der 3D-gedruckten Säulen erstmals eine gelbliche Verfärbung in dem Material beobachtet werden, welche auf die Reagenzien der TEMPO-Oxidation zurückgeführt werden kann. TEMPO zeigt eine intensive orange und NaOCl eine gelbe Färbung. Eine Einfärbung der 3D-gedruckten Objekte durch diese Reagenzien konnte zuvor aufgrund des verwendeten gelben Photoabsorber NPS nicht festgestellt werden.

Daher wird im folgenden Schritt der Einfluss der Konzentration der Reagenzien auf die Verfärbung des Materials untersucht. Ausgehend von NaOCl wird die Konzentration zwischen 0,05 und 0,53  $\text{mol L}^{-1}$  variiert.

In Abbildung 5.37 sind links die 200  $\mu\text{m}$  Gittersäulen nach der TEMPO Oxidation dargestellt.

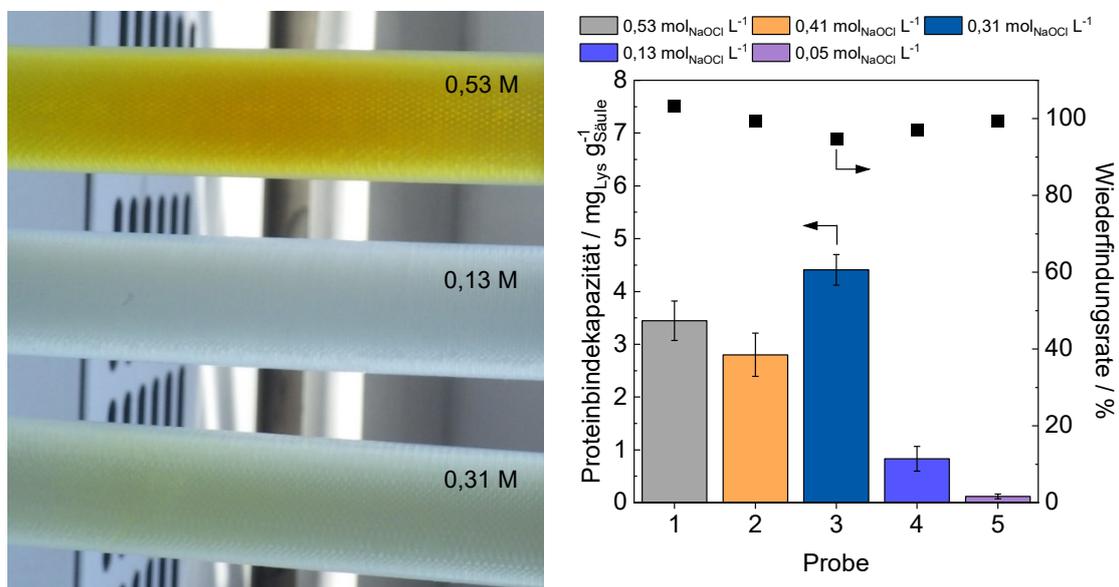


Abbildung 5.37: Links: Verfärbung von TEMPO oxidierten 200  $\mu\text{m}$  Gittersäulen mit Konzentrationen von NaOCl zwischen 0,13 und 0,53 M. Rechts: Proteinbindekapazitäten der Gittersäulen im Konzentrationscreenings der eingesetzten TEMPO-Reagenzien von 0,05 bis 0,53 M in einer Dreifachbestimmung.

Es kann der Trend beobachtet werden, dass eine Erhöhung der Konzentration der Reagenzien zu einer stärkeren Verfärbung des Materials führt. Die Konzentrationen von 0,05 und 0,13  $\text{mol L}^{-1}$  führen zu keiner Färbung des Materials, während eine Konzentration von  $> 0,41 \text{ mol L}^{-1}$  zu deutlich gelben Säulen führt. Bei 0,31  $\text{mol L}^{-1}$  ist nur eine leichte Färbung des Materials zu erkennen.

Werden nun die Proteinbindekapazitäten aus der DBC der Säulen betrachtet, so führen die Konzentrationen von 0,05 und 0,13  $\text{mol L}^{-1}$  zu niedrigen Kapazitäten von  $\leq 0,83 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$ . Hier reicht die geringe Konzentration der Reaktanden nicht für eine vollständige Umsetzung der Hydroxylgruppen aus. Die Konzentrationen von 0,53 und 0,41  $\text{mol L}^{-1}$  führen zwar zu einer Erhöhung der Proteinbindekapazität von bis zu  $3,45 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$ , sind aber aufgrund der intensiven Gelbfärbung des Materials nicht zielführend. Somit führen zu geringe

---

Konzentrationen ( $< 0,13 \text{ mol L}^{-1}$ ) ebenfalls zu geringen Proteinkapazitäten, während zu hohe Konzentrationen ( $> 0,41 \text{ mol L}^{-1}$ ) eine starke Verfärbung zur Folge haben.

Die Konzentration von  $0,31 \text{ mol L}^{-1}$  zeigt mit  $4,42 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1} \text{ Säule}$  die höchste Proteinkapazität und gleichzeitig eine vernachlässigbare Verfärbung des Materials. Infolgedessen wird sie als Zielkonzentration bei weiteren TEMPO-Oxidationen gewählt.

Anschließend wird beurteilt, ob eine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit in Folge der TEMPO-Oxidation stattfindet, da mit NaOCl ein starkes Oxidationsmittel für die Umsetzung der Hydroxylgruppen verwendet wird. Zur Betrachtung der Oberfläche werden REM-Aufnahmen vom Material vor und nach der Oxidationsreaktion aufgenommen.

Werden die REM-Aufnahmen in Abbildung 5.38 betrachtet, so sind bei der unbehandelten  $200 \mu\text{m}$  Gittersäule außer den einzelnen Schichten des Druckprozesses keine Auffälligkeiten zu erkennen.

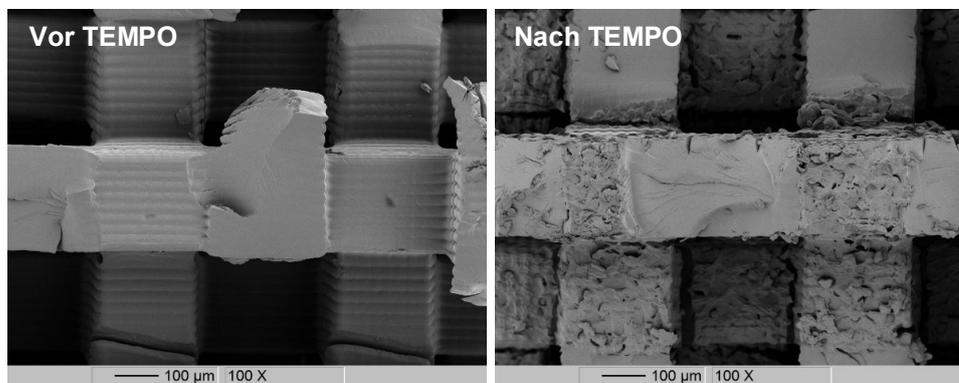


Abbildung 5.38: REM-Aufnahmen eines Gitters vor und nach der TEMPO-Oxidation, um die Auswirkungen der Reaktion auf die Materialbeschaffenheit zu bewerten.

Im Vergleich dazu weist die oxidierte Probe eine Aufrauhung der Oberfläche auf, so dass die Schichten nicht mehr erkennbar sind. An den Bruchkanten ist jedoch zu sehen, dass hauptsächlich die Oberfläche des Materials von der Oxidation betroffen ist und nicht die innere Struktur der Säule. Da eine Aufrauhung der Oberfläche diese nur vergrößert und damit eine hohe Proteinbindekapazität begünstigt, ist die Änderung der Oberflächenbeschaffenheit durch den Oxidationsprozess zu vernachlässigen.

Für die Oxidation der Hydroxylgruppen wird ein starkes Oxidationsmittel benötigt, so dass nicht alle in der Literatur bekannten Oxidationsreaktionen für die Einführung der Carboxylgruppen in das Material in Frage kommen. Darüber hinaus schließt die spätere Anwendung in der Chromatographie Reaktionen aus, welche die Verwendung von Metallen oder bedenklichen Reagenzien erfordern. Mögliche alternative Oxidationsrouten wurden untersucht, jedoch konnten für das untersuchte System keine Alternativen identifiziert werden, die weder zu einer Verfärbung des Materials noch zu einer Veränderung der Oberfläche führen. So führt zum Beispiel der Einsatz von Wasserstoffperoxid zum Verlust der mechanischen Stabilität des Materials und die Oxidation mit Kaliumpermanganat ist aufgrund der Bildung von Mangandioxid, auch bekannt als Braunstein, ebenfalls nicht zielführend.

Daher wird weiterhin auf die TEMPO-Oxidation zur Umsetzung der Hydroxylgruppen zurückgegriffen.

## Optimierung der Bedingungen der dynamischen Bindekapazitätsbestimmung

Der nächste zu bestimmende Parameter ist der pH-Wert der in der DBC verwendeten Puffersysteme. In Anlehnung an bereits etablierte DBC-Systeme wird für die Messung mit Lysozym ein 50 mM Natriumacetatpuffer verwendet. Mit einem pI des Lysozyms von 11,35 zeigt das Protein vor allem in einem Bereich um den pH-Wert von 5 hohe ionische Wechselwirkungen, daher wird der pH-Wertbereich von 4,5 bis 5,5 betrachtet.<sup>[118]</sup> Die Ergebnisse der DBC sind in Abbildung 5.39 dargestellt. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes von 4,5 auf 5 ist ein Anstieg der Proteinbindekapazität um den Faktor fünf zu beobachten. Da eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf 5,5 zu keiner signifikanten Erhöhung des DBC-Ergebnisses führt und nach dem Waschschrift mit Essigsäure (pH-Wert 3,5) eine schnellere Einstellung des pH-Wertes erfolgen kann, wird für die weiteren Messungen der pH-Wert von 5 gewählt.

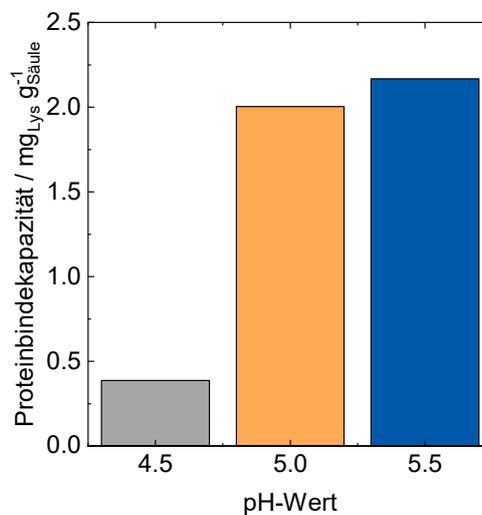


Abbildung 5.39: Proteinbindekapazitäten von 300  $\mu$ m Gittersäulen der Länge von 40 mm bei den pH-Werten von 4.5 bis 5.5.

## Überprüfen der Reproduzierbarkeit der Modifizierung sowie der Mehrweganwendung der Säule

Im Folgenden wird die Reproduzierbarkeit der TEMPO-Modifikation überprüft und gleichzeitig untersucht, ob sich die Chromatographiesäule für den Mehrweggebrauch eignet.

Zunächst werden die Proteinbindekapazitäten der DBC-Messung zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit von drei verschiedenen 200  $\mu$ m Gittersäulen, welche analog in der TEMPO-Oxidation umgesetzt wurden, in Abbildung 5.40 links betrachtet. Hier ist zu sehen, dass die Bindekapazitäten für jeweils die erste Messung  $4,41 \pm 0,29$  mg<sub>Lys</sub> g<sup>-1</sup><sub>Säule</sub> betragen, dann um 19% für die zweite Messung auf  $3,57 \pm 0,46$  mg<sub>Lys</sub> g<sup>-1</sup><sub>Säule</sub> sinken und für die dritte Messung nochmals um 15% abnehmen ( $3,02 \pm 0,41$  mg<sub>Lys</sub> g<sup>-1</sup><sub>Säule</sub>). Damit kann gezeigt werden, dass die Modifizierung und damit einhergehend die Proteinbindekapazität des Lysozyms für alle drei Chromatographiesäulen innerhalb der ersten drei Messungen reproduzierbar ist. Gleichzeitig ist jedoch auch die Abnahme der dynamischen Bindekapazität reproduzierbar.

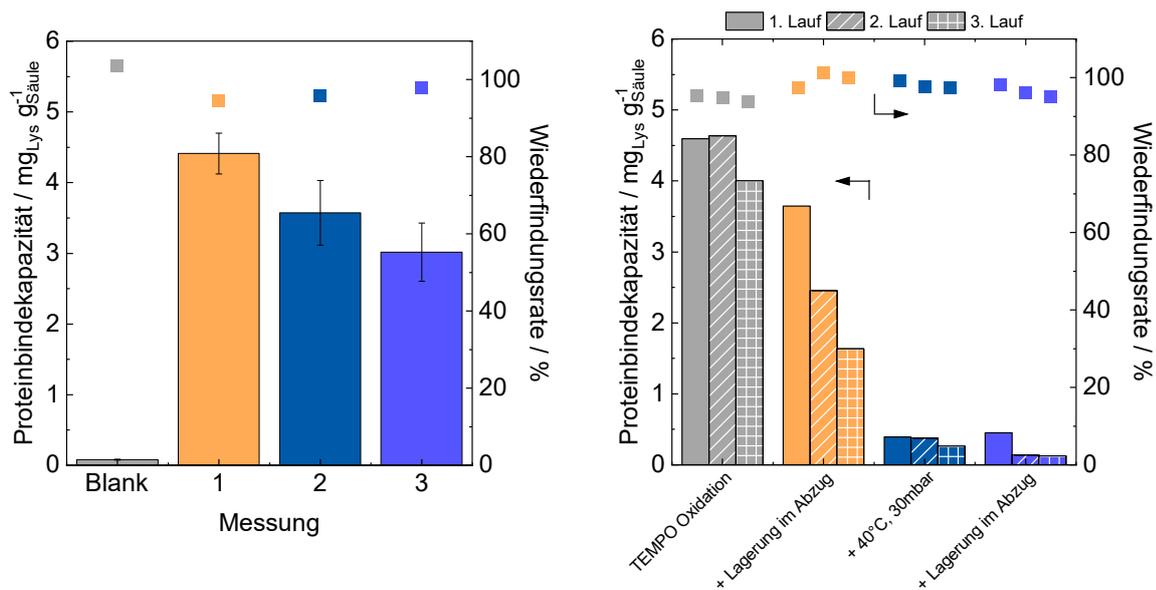


Abbildung 5.40: Betrachtung der Proteinbindekapazitätsabnahme an einer Gittersäule nach unterschiedlicher Behandlung.

Um diesen Effekt näher zu betrachten wird die gleiche Säule mehrmals mit der gleichen DBC-Methode vermessen und der Verlauf der Kapazität analysiert. Während der DBC-Messungen kann festgestellt werden, dass die gemessene Proteinbindekapazität mit jeder weiteren Messung abnimmt. Insbesondere nach der dritten Messung ist ein deutlicher Abfall der Proteinbindekapazität zu beobachten.

In Abbildung 5.40 werden die Proteinbindekapazitäten einer oxidierten 200  $\mu\text{m}$  Gittersäule nach der TEMPO-Oxidation und nach der Lagerung im Abzug sowie Trockenschrank verglichen. Die Proteinbindekapazität beträgt zu Beginn der Messungen 4,6  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1} \text{Säule}$  und sinkt bei der dritten Messung auf 3,6  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1} \text{Säule}$ . Danach wird die Säule eine Woche lang im Abzug gelagert. Nach dieser Zeit sinkt die Kapazität bei der ersten Messung auf 3,6, dann auf 2,5 und schließlich auf 1,6  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1} \text{Säule}$ . Anschließend wird durch Trocknen der Säule im Vakuumtrockenschrank überprüft, ob dieser Kapazitätsverlust reversibel ist. Die Ergebnisse nach dem Trocknen zeigen einen weiteren Kapazitätsverlust bis hin zu einer nahezu totalen Abnahme der Kapazität auf 0,1  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1} \text{Säule}$ .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine reproduzierbare TEMPO-Modifizierung des Materials erfolgen kann. Weiterhin konnte erfolgreich eine 3D-gedruckte stationäre Phase hergestellt werden, die für die chromatographische Anwendung als CEX geeignet ist und zum Binden sowie Eluieren von Proteinen mit einer Wiederfindungsrate von 100% verwendet werden kann. Im Vergleich zu kommerziellen Materialien bindet das 3D-gedruckte Material weniger, was jedoch auf die vergleichsweise geringe Oberfläche im  $\text{cm}^2$ -Bereich zurückzuführen ist. Ein weiteres Problem stellt die Kapazitätsabnahme dar. Als Alternative würde sich hier die Einweganwendung der Säulen anbieten, da hier durch die reproduzierbare Bindekapazität in der ersten Messung die Abnahme vernachlässigbar wäre.

Wird jedoch eine Mehrweganwendung der Chromatographiesäule angestrebt, so stellt sich die Frage, wodurch dieser Kapazitätsverlust verursacht wird. Vermutlich spielen hier mehrere Faktoren eine Rolle, welche im Folgenden diskutiert werden.

## Betrachtung der dynamischen Bindungskapazitätsabnahme

Die Abnahme der Proteinbindekapazität nach jeder weiteren Messung kann bei allen untersuchten Chromatographiesäulen mit einer 200-300 µm Gitterstruktur beobachtet werden. Mögliche Ursachen für den Verlust an Proteinbindekapazität sind in Abbildung 5.41 aufgelistet. Diese umfassen eine Veränderung des Materials oder der Oberfläche während der Bestimmung der Bindekapazität des Lysozyms.

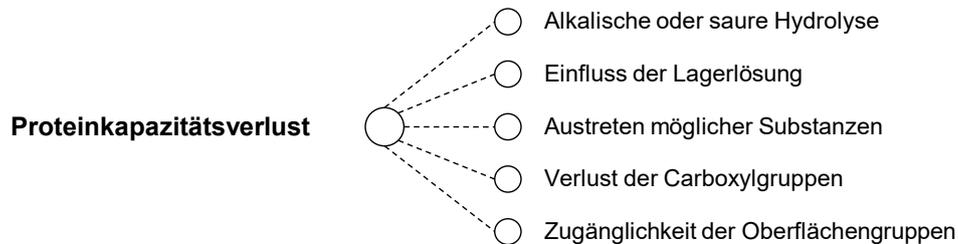


Abbildung 5.41: Mögliche Einflussfaktoren auf die Abnahme der Proteinbindekapazität nach jeder Messung in der DBC.

Eine erste Vermutung ist die Möglichkeit einer basisch- oder sauerkatalysierten Hydrolyse der Ether-, Carbonyl- und Estergruppen im Polymergerüst. Um den Einfluss der pH-Wert-Änderung zu untersuchen, wird die DBC-Methode angepasst. Zum Ausschließen der basischen Hydrolyse wird die Behandlung der Chromatographiesäule mit 1 M Natronlauge in der DBC weggelassen. Die Ergebnisse der Proteinbindekapazitäten ohne eine basische Behandlung des Materials sind in Abbildung 5.42 links dargestellt.

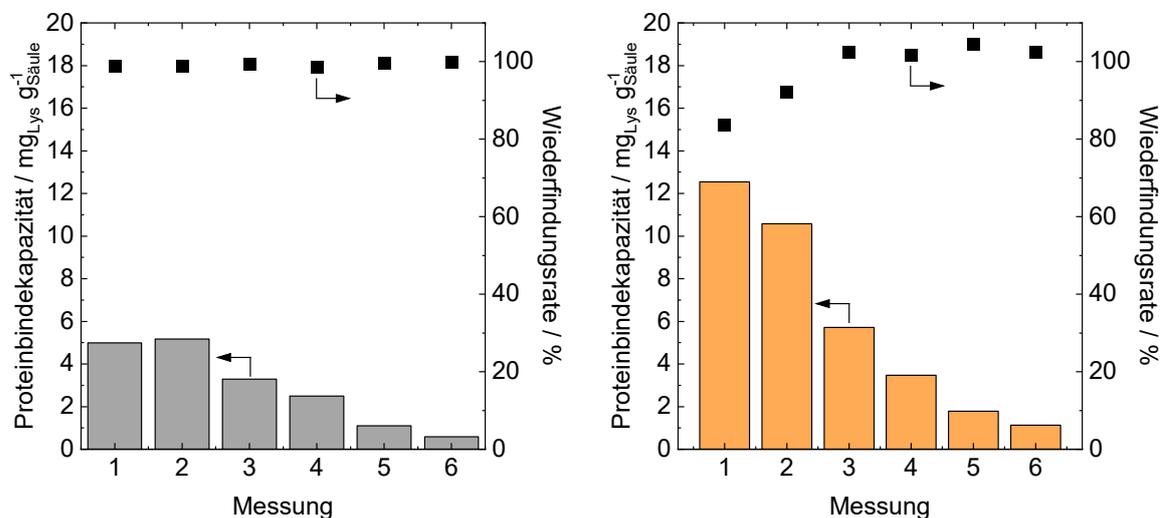


Abbildung 5.42: Proteinbindekapazitäten von 200 µm Gittersäulen zur Überprüfung einer basischen oder sauren Hydrolysereaktion. Links: Keine basische Behandlung der Säule mit NaOH. Rechts: Keine Behandlung der Säule mit Essigsäure und Erhöhung des pH-Wertes in der DBC-Messung auf 6.

Obwohl die Gittersäule keinen stark basischen Medien ausgesetzt ist, kann ein sukzessiver Kapazitätsverlust beobachtet werden. Eine basische Hydrolyse als Ursache für die Kapazitätsabnahme wird daher ausgeschlossen.

Die saure Behandlung des Materials erfolgt direkt nach der TEMPO-Oxidation mit 50 mM Essigsäure, um einerseits basische Reste der TEMPO-Oxidation zu entfernen und andererseits

die Carbonsäuregruppen zu aktivieren. Die Aktivierung erfolgt ebenfalls im ersten Schritt der DBC-Methode. Daher werden diese beiden Schritte weggelassen und der pH-Wert des Natriumacetatpuffers auf 6 erhöht. Wird nun der Einfluss der sauren Hydrolyse auf das Material auf der rechten Seite der Abbildung 5.42 betrachtet, so ist auch hier eine Abnahme der Proteinbindekapazität des Materials zu beobachten. Somit kann auch hier eine saure Hydrolyse des Materials zunächst ausgeschlossen werden.

Was sich hier jedoch von den anderen Messungen unterscheidet, ist die höhere Anfangskapazität von  $12,5 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1} \text{ Säule}$  mit einer Wiederfindungsrate von nur 84%. Diese lag in den bisherigen Versuchen im Bereich von  $4,5 - 5,5 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1} \text{ Säule}$  mit einer Wiederfindungsrate von  $> 90\%$ . Die Proteinbindekapazität der nicht säurebehandelten Säule nimmt erst ab der dritten Messung den erwarteten Wert an und gleichzeitig stabilisiert sich dort die Wiederfindungsrate. Bei der sechsten Messung wird wie bisher eine geringe Proteinbindekapazität von  $1,1 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1} \text{ Säule}$  gemessen. Die höheren Kapazitäten zu Beginn der DBC-Messungen können auf den abgeänderten Reinigungsprozess nach der TEMPO-Oxidation zurückgeführt werden. Der Acetatpuffer reicht nicht aus, um die basischen Komponenten aus dem Material zu entfernen, welche mehr Protein im Material binden. Wird die Säule mit Wasser gespült, so kann ein Anstieg des pH-Wertes beobachtet werden. Dieses Phänomen tritt bei der Reinigung mit Essigsäure nicht auf. Aus diesem Grund wird der Reinigungsschritt mit Essigsäure als essenzieller Bestandteil der Behandlung der Säulen eingegliedert.

Unter Ausschluss der basischen und sauren Hydrolyse des Materials als Ursache für den Kapazitätsverlust wird im nächsten Schritt der Einfluss der Lagerlösung nach den ersten drei DBC-Messungen auf die Kapazitätsabnahme untersucht. Dazu werden die Säulen nach der dritten Messung für eine Woche in 50 mM Natriumacetatpuffer, reinem Milli-Q® Wasser und in 20% Ethanol gelagert. Zusätzlich zu den wässrigen Systemen wird auch das organische Lösungsmittel Dipropylenglykolmonomethylether (DPGME) als Lagerlösung verwendet. In Abbildung 5.43 sind die Verläufe der Proteinbindekapazitäten der vier Lagerlösungen dargestellt.

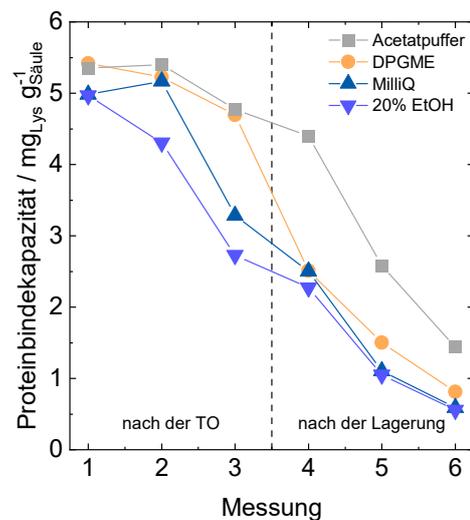


Abbildung 5.43: Proteinbindekapazitäten von  $200 \mu\text{m}$  Gittersäulen, die nach der dritten Messung in Reinstwasser, 20% Ethanol, 50 mM Natriumacetatpuffer oder DPGME gelagert werden, um den Einfluss der Lagerlösung auf den Kapazitätsverlust zu untersuchen.

Nach der Lagerung zeigt die Säule in DPGME zunächst den stärksten Kapazitätsabfall, der für die fünfte und sechste Messung für alle Lagerungslösungen den gleichen Trend aufweist. Damit zeigt auch die Lagerlösung keinen wesentlichen Einfluss auf den Kapazitätsverlust.

Bei der Untersuchung der sauren Hydrolyse konnte beobachtet werden, dass Rückstände von Reagenzien der TEMPO-Oxidation die Werte der gemessenen Proteinbindekapazität der Chromatographiesäule beeinflussen und diese erhöhen. Um festzustellen, ob etwas aus der Säule ausgetreten ist, was ebenfalls mit der Verfärbung zusammenhängt, werden die einzelnen Fraktionen der DBC-Messungen gesammelt und im Spektrometer im Wellenlängenbereich von 200 – 600nm vermessen. Aufgrund der Gelbfärbung der Säulen wird ein Signal im Bereich von 575 nm erwartet, falls während der Messung eine gelbe Substanz aus der Säule ausgetreten ist. Abbildung 5.44 zeigt beispielhaft das UV/VIS-Spektrum der Fraktion des Elutionsschrittes der DBC-Messung. In dieser Fraktion wurden außer dem Lysozysignal bei 280 nm und dem Signal des Acetatpuffers keine Substanzen im höheren Wellenlängenbereich nachgewiesen. Analoges gilt für alle anderen Fraktionen. Das Austreten von Substanzen während der DBC-Messungen kann somit ausgeschlossen werden.

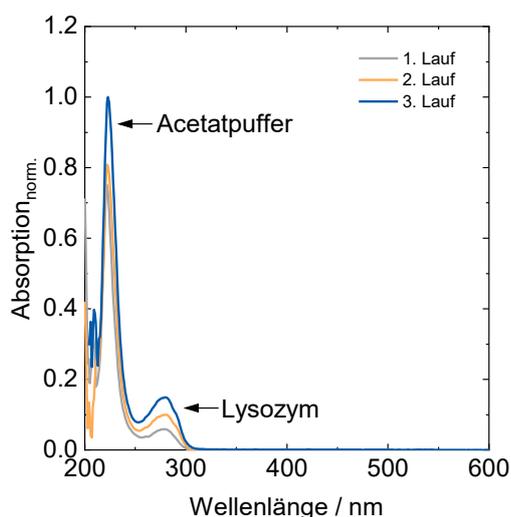


Abbildung 5.44: UV/VIS-Spektrum der ausgesammelten Elutionsfraktionen der DBC-Messung mit Lysozym.

In einem weiteren Schritt wird untersucht, ob ein Verlust der Carboxylgruppen während der analytischen Untersuchungen auftritt. Hierzu wird die Titration der Säuregruppen herangezogen, wobei die Säulen aufgebrochen und die inneren Strukturen zur Titration verwendet werden. Verglichen wird eine frisch oxidierte 200  $\mu\text{m}$  Gittersäule mit einer Chromatographiesäule, welche nach der dritten Messung in Reinstwasser gelagert wurde und nach der sechsten Messung eine Proteinbindekapazität von  $0,6 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1} \text{ Säule}$  aufweist (Rückgang der dynamischen Proteinbindekapazität von 89%). Die Titrationsergebnisse der Säuregruppendichte beider Säulen sind in Abbildung 5.45 dargestellt.

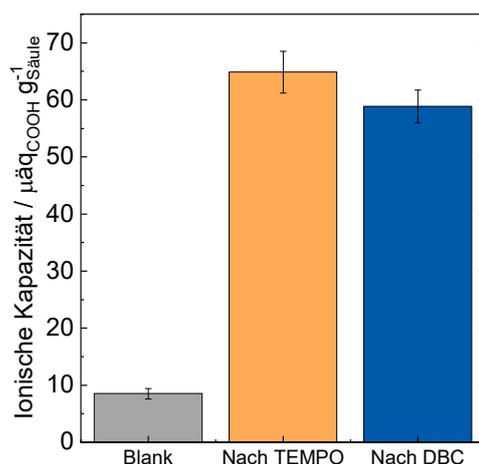


Abbildung 5.45: Titrationsergebnisse einer frisch oxidierten 200  $\mu\text{m}$  Gittersäule im Vergleich zu einer in sechs Messung in der DBC vermessen Säule. Ein Verlust der Carboxylgruppen kann nicht beobachtet werden.

Es zeigt sich, dass die in der DBC vermessene Säule mit  $59 \mu\text{äq}_{\text{COOH}} \text{g}^{-1} \text{Säule}$  im Vergleich zur frisch oxidierten Säule mit  $65 \mu\text{äq}_{\text{COOH}} \text{g}^{-1} \text{Säule}$  keinen deutlichen Verlust der Carboxylgruppen aufweist, welcher die starke Kapazitätsabnahme erklären könnte.

Damit kann mit einer 200  $\mu\text{m}$  Gittersäule der Länge von 100 mm, die mit der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harzformulierung gedruckt wurde, eine maximale dynamische Bindungskapazität des Lysozyms bei der ersten DBC-Messung bei einem pH-Wert von 5 mit einer 100%-Beladung von  $5,42 \text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1} \text{Säule}$  und einer Wiederfindungsrate von 103% erreicht werden.

Die Proteinbindekapazitätsabnahmen der untersuchten Chromatographiesäulen lassen sich somit weder durch die basisch- und säurekatalysierte Hydrolyse noch durch die Wahl der Lagerlösung, das Austreten möglicher Substanzen der TEMPO-Oxidation oder der Carboxylgruppen erklären. Es ist daher zu vermuten, dass die Ursache für den Kapazitätsverlust in einer Änderung der Zugänglichkeit der Oberflächengruppen liegt. Die 3D-gedruckten Gittersäulen weisen im Vergleich zu ihrer hohen Anfangskapazität eine geringe Oberfläche im  $\text{cm}^2$ -Bereich auf. Es stellt sich die Frage, ob eine Änderung der Porosität durch einen irreversiblen Quellungsprozess während der Messungen auftritt.

## 5.4 Porogentemplierung zur Einbringung von Materialporosität

Da die Auflösungsgrenzen sowohl des 3D-Druckers als auch der Photoharzformulierung erreicht sind, wird zur Vergrößerung der Materialoberfläche die Porogentemplierung eingesetzt und somit auf die porogenbasierte Methode zurückgegriffen (Schema 3.1). Dies ist eine gängige Methode zur Herstellung von porösen Chromatographiematerialien.<sup>[94]</sup>

Damit besitzt die fertige Chromatographiesäule neben der primären Strukturporosität des Gitters noch eine sekundäre Materialporosität. Hierzu muss jedoch zunächst ein geeignetes Porogen identifiziert werden, mit dessen Einsatz sich das Ziel von 1 µm großen Poren realisieren lässt.

### 5.4.1 Identifikation eines geeigneten Porogens

Als mögliche Porogene werden verschiedene Alkohole, Acetate und Ether (Abbildung 5.46) im vereinfachten Aufbau mit einer 385 nm UV-Lampe in einem transparenten Polyethylen-Schnappdeckel mit der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harzformulierung untersucht.

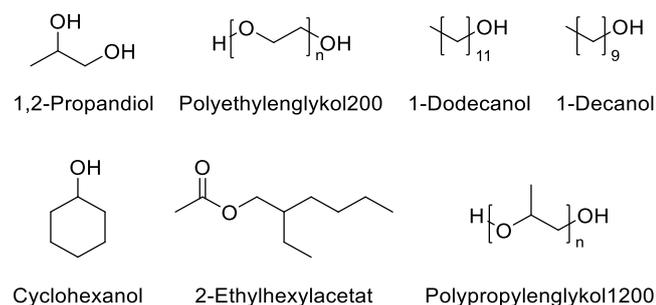


Abbildung 5.46: Chemische Struktur möglicher Porogene zur Ausbildung einer sekundären Materialporosität während des 3D-Druckprozesses.

Zunächst erfolgt eine optische Begutachtung der untersuchten Porogene, um die Ausbildung einer porösen Struktur zu bewerten. In Abbildung 5.47 sind beispielhaft die ausgehärteten Polymerproben vom PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harz mit PEG200 und PPG1200 als Porogen dargestellt.



Abbildung 5.47: Im einfachen Aufbau ausgehärtete Polymerproben mit 33% PEG200 (links) und 33% PPG1200 (rechts) als Porogen in der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT Harzformulierung.

Das PEG200 führt zur Bildung eines farblosen und transparenten Polymers. Dies weist darauf hin, dass das PEG200 als Quellmittel in der Harzformulierung wirkt und zu keiner Ausbildung eines Porensystems führt. Analoges gilt für Cyclohexanol und 1,2-Propandiol, so dass für diese Proben keine weiteren analytischen Untersuchungen durchgeführt werden.

Im Gegensatz dazu führen die anderen vier Porogene, wie für PPG1200 gezeigt, zu farblosen und opaken Polymeren. Sie stellen somit ein Fällungsmittel dar, das zur Bildung eines porösen Systems im Polymer führt. Die Proben werden anschließend im REM betrachtet und die Porengrößenverteilung mittels Hg- porosimetrie vermessen.

Werden die REM-Aufnahmen von Decanol und PPG1200 als Porogen in Abbildung 5.48 betrachtet, zeigt das Decanol keine Poren im gewünschten Größenbereich. Analoges gilt für Ethylhexylacetat dessen REM-Aufnahme in Abbildung 8.7 im Anhang zu finden ist. Das PPG1200 hingegen zeigt eine ausgeprägte Porenstruktur. Auch Dodecanol zeigt hier vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 8.7).

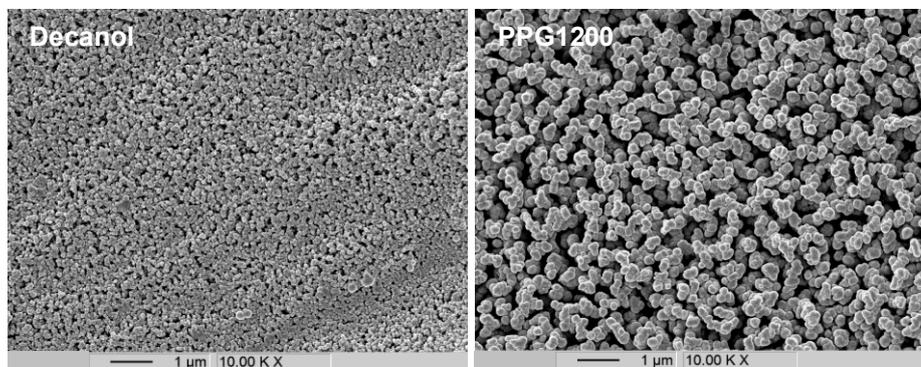


Abbildung 5.48: REM-Aufnahmen der im vereinfachten Aufbau ausgehärteten Polymerproben mit 33% Decanol (links) und 33% PPG1200 (rechts) als Porogen in der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT Harzformulierung.

Zusätzlich zur REM-Analyse wird die Porengrößenverteilung der vier Porogenproben (Abbildung 5.49) betrachtet, um das Erzielen von 1 µm Porendurchmesser näher untersuchen zu können.

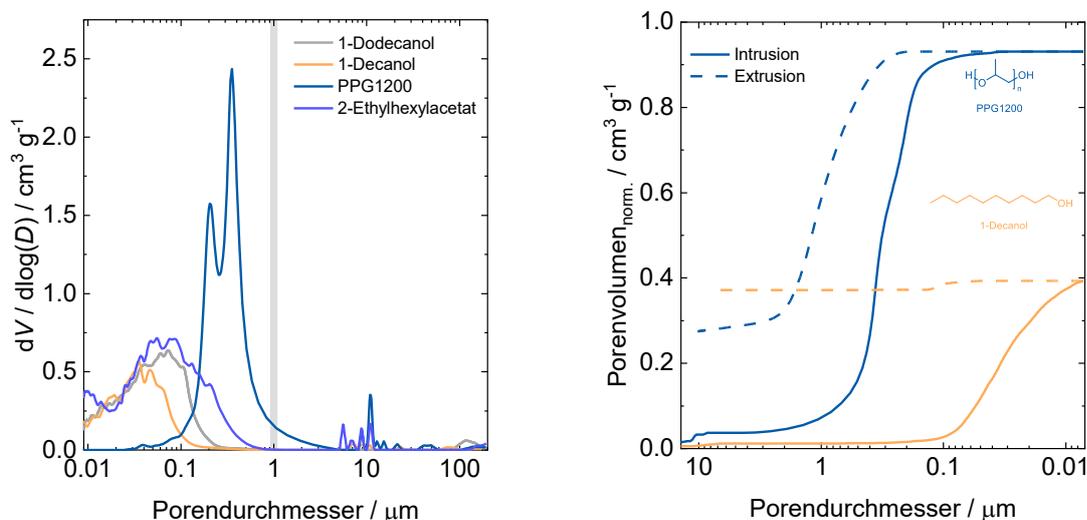


Abbildung 5.49: Porogengrößenverteilung der im vereinfachten Aufbau ausgehärteten Polymerproben mit 33% Dodecanol, Decanol, PPG1200 und Ethylhexylacetat als Porogen in der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT Harzformulierung.

---

Dabei erweist sich lediglich das PPG1200 als geeignetes Porogen, welches ein bimodales Signal im Bereich von 100 nm bis 2  $\mu$ m hat. Die weiteren Porogene besitzen überwiegend Porendurchmesser von < 100 nm, zeigen jedoch bei Betrachtung der Intrusions- und Extrusionskurve des Quecksilbers, beispielhaft dargestellt für 1-Decanol, eine Materialverformung infolge der Druckeinwirkung während der Analyse. Die weiteren Intrusions- und Extrusionskurven sind im Anhang in Abbildung 8.9 hinterlegt.

Bei optischer Betrachtung der Proben nach der Messung zeigt sich bei Dodecanol und Ethylhexylacetat eine teilweise Graufärbung des Materials, was auf ein Eindringen des Quecksilbers in die Porenstruktur des Materials hinweist. Damit konnte trotz der Druckverformung zumindest ein Teil der Porengrößenverteilung adäquat aufgezeichnet werden. Dies stimmt ebenfalls mit den Beobachtungen in den REM-Aufnahmen überein, welche nach PPG1200 die größten Poren der untersuchten Porogene zeigen. Die Polymerprobe mit Decanol zeigt nach der Messung keinerlei Verfärbung des Materials, was für Hg-Porosimetriemessungen untypisch ist, da normalerweise selbst bei vollständiger Entspannung der Probe ein gewisser Anteil des intrudierten Quecksilbers im Material verbleibt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Intrusions- und Extrusionskurven der Proben sowie der REM-Aufnahmen, wo keine bis kleine Poren < 100 nm beobachtet werden können. Lediglich die Polymerprobe mit PPG1200 zeigte nach der Messung die typische, vollständige Graufärbung des Materials. Der Verbleib des Quecksilbers ist ebenfalls in der verschobenen Hystereseurve der Extrusion zu beobachten.

Für eine vollständige Auswertung der Porendurchmesser muss auch die Schrumpfung (3%) des Materials durch den Trocknungsprozess berücksichtigt werden. Diese führt zu einer Verschiebung der Kurve in Richtung kleinerer Porendurchmesser. Somit sind in der Anwendung größere Poren zu erwarten als in der Hg-Porosimetrie gemessen.

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen des Porogenscreenings wird für die weiteren Experimente die Harzformulierung PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT mit PPG1200 als Porogen versetzt.

---

#### **5.4.2 Übertragung der Porogentemplierung auf den 3D-Druck**

---

Zunächst erfolgt die Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf gedruckte Objekte und dabei eine Betrachtung des Einflusses des 3D-Druckprozesses auf die Porengrößenverteilung des Materials. Dazu werden 5x5 mm Zylinder sowohl im *SolFlex350* als auch im *Hyper-50Y* gedruckt. Die Porengrößenverteilungen der Polymere mit den zugehörigen REM-Aufnahmen sind in Abbildung 5.50 dargestellt.

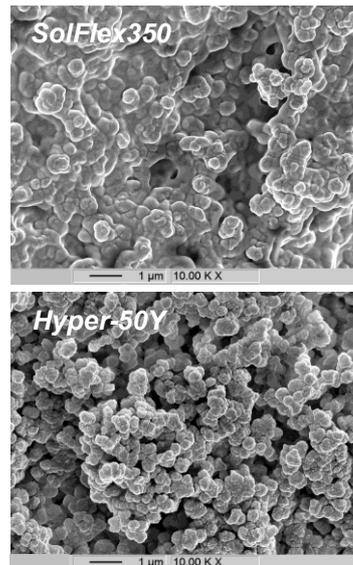
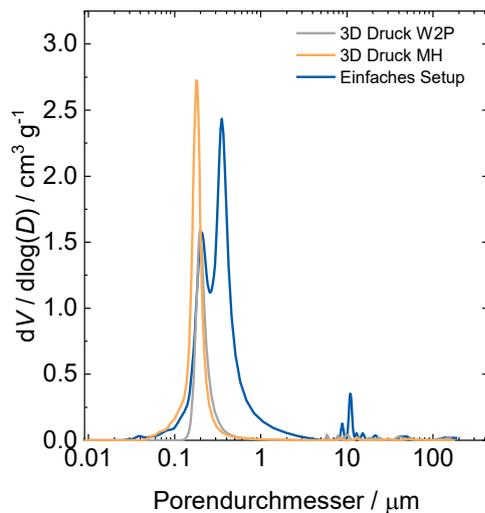


Abbildung 5.50: Vergleich der Porengrößenverteilungen im einfachen Setup und im 3D-Druckprozess mit dem *SolFlex350* sowie *Hyper-50Y* Drucker (links) und die dazugehörigen REM-Aufnahmen der 3D-gedruckten Proben (rechts).

Im Vergleich zur bimodalen Verteilung im vereinfachten Aufbau zeigen die 3D-gedruckten Proben eine monomodale Porengrößenverteilung im Bereich von 100 – 500 nm. Diese entspricht damit dem Signal des vereinfachten Aufbaus bei kleineren Porendurchmessern. Im Vergleich zum *SolFlex350* weist der Druck im *Hyper-50Y* eine engere Verteilung auf, welche erst bei 150 nm beginnt.

Die Unterschiede können auf den unterschiedlichen Aushärteprozess innerhalb der verschiedenen Aufbauten zurückgeführt werden. Im vereinfachten Aufbau wird eine Probe mit einer Schichthöhe von etwa 3 mm mit einer Leistung von  $107 \text{ mW cm}^{-2}$  belichtet, so dass sich eine Intensitätsverteilung des UV-Lichtes innerhalb der Probe ausbildet. Die oberste Schicht der Probe wird dabei mit hoher Energie schnell ausgehärtet, während die unteren Schichten verzögert aushärten. Dies würde den bimodalen Charakter der Verteilung erklären. Im Gegensatz dazu werden beim 3D-Druckprozess die einzelnen  $30 \mu\text{m}$  Schichten mit einer Leistung von etwa  $6 \text{ mW cm}^{-2}$  homogen auspolymerisiert. Dies spiegelt sich im monomodalen und engen Verlauf der Porengrößenverteilung wider.

Werden die REM-Aufnahmen der 3D-gedruckten Proben miteinander verglichen, so zeigt das im *Hyper-50Y* gedruckte Polymer eine bessere Auflösung der Struktur als die Probe aus dem *SolFlex350* Drucker. Das ist wahrscheinlich auf die bessere Auflösung des *Hyper-50Y* Druckers zurückzuführen, dessen Pixelgröße mit  $30 \mu\text{m}$  um  $20 \mu\text{m}$  kleiner ist als die des *SolFlex350* Druckers. Infolgedessen wird der 3D-Druck im *Hyper-50Y* durchgeführt.

### Bewertung des Einflusses des Porogenanteils auf die Porengrößenverteilung

Im nächsten Schritt zur Identifizierung einer geeigneten Porogentemplierung wird der Anteil des PPG1200 mit der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harzformulierung untersucht. Dabei wird der Porogenanteil von 33 – 67% ( $\text{g g}^{-1}$ ) variiert. Werden die REM-Aufnahmen der 3D-gedruckten Proben in Abbildung 5.51 betrachtet, so können mit steigendem PPG1200 Anteil

kleinere Globuli im porösen Material beobachtet werden. Dies ist ebenfalls an den spezifischen Oberflächen zu sehen, welche mit dem PPG-Anteil zunehmen und für 33% PPG  $16,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , für 50% PPG  $21,2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  und für 67% PPG  $26,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  betragen. Ein höherer Anteil an Porogen führt zu einem kleineren Reaktionsvolumen und damit zur Bildung von mehr Polymerisationskeimen in einer Schicht. Außerdem kann damit ein größeres Porensystem generiert werden, da weniger Harz für die Reaktion zur Verfügung steht. Dieser Trend konnte bereits in der Literatur beobachtet werden.<sup>[119,120]</sup>

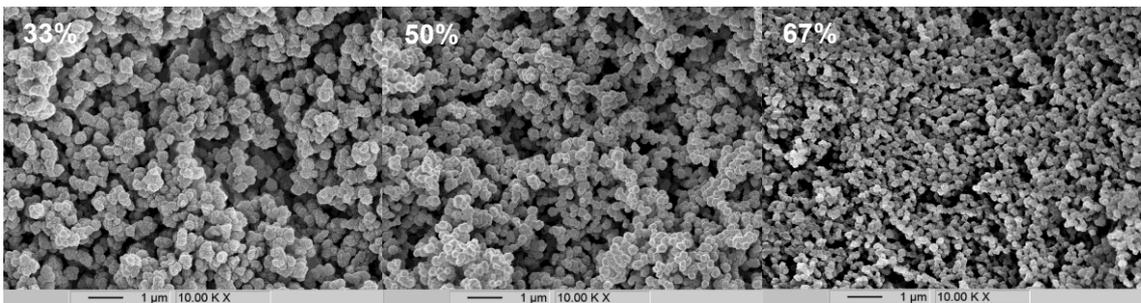


Abbildung 5.51: REM-Aufnahmen von 3D-gedruckten Polymeren im *Hyper-50Y* mit 33, 50 und 67 wt-% PPG1200 im PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harz.

Werden nun die Porengrößenverteilungen der drei Proben in Abbildung 5.52 betrachtet, so zeigen die Proben mit 33 und 50% ( $\text{g g}^{-1}$ ) Porogen eine monomodale Verteilung, wohingegen 67% ( $\text{g g}^{-1}$ ) Porogen zu einer bimodalen Verteilung der Porengröße führt.

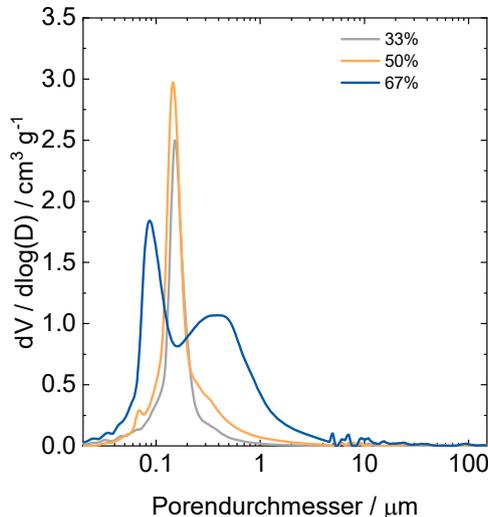


Abbildung 5.52: Porengrößenverteilung von 3D-gedruckten Polymeren im *Hyper-50Y* mit 33, 50 und 67 wt-% PPG1200 im PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harz.

Aufgrund des hohen Porogenanteils könnte eine inhomogene Verteilung des Porogens während des 3D-Druckprozesses zur Bildung von kleinen Poren bei einem Porogendefizit und zu großen Poren bei einem Porogenüberschuss führen. Ein hoher Anteil an Porogen kann ebenfalls zu mehr Lichtstreuungseffekten führen und wäre mit den Inhomogenitäten in der Lichtintensität mit den Ergebnissen im vereinfachten Aufbau vergleichbar. Die größeren Poren könnten ebenfalls auf die Abnahme der Druckqualität infolge des hohen Porogenanteils und der dadurch

reduzierten Reaktionsmenge zurückgeführt werden. Der Trend zu größeren Poren mit steigendem PPG1200-Anteil kann mit der Hg-Pososimetrie bestätigt werden, wobei die Erhöhung des Porogens auf 50% ( $\text{g g}^{-1}$ ) keinen signifikanten Einfluss auf die Porenverteilung hat. Bei den Porengrößen ist weiterhin das Schrumpfen des Materials nicht zu vernachlässigen, so dass die Kurven vermutlich ohne Trocknung nach rechts verschoben sind.

Da bei einem Porogenanteil von 67% ( $\text{g g}^{-1}$ ) die Druckqualität deutlich abnimmt und eine Anpassung der Druckparameter erfolgen müsste, sowie bereits bei einem Porogenanteil von 50% ( $\text{g g}^{-1}$ ) keine signifikante Zunahme der Porengröße erreicht wird, werden die weiteren Experimente mit einem Massenanteil von 33% PPG1200 durchgeführt.

### Untersuchung des Einflusses der Belichtungszeit auf die Porengrößenverteilung

Zuletzt wird der Einfluss der Belichtungszeit auf die Porengröße bei der Porogentemplierung mittels der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-33%PPG1200 Harzformulierung untersucht. Die Belichtungszeit für eine Schicht wird in 0,5 s Schritten von 4 s auf 1,5 s reduziert. Die REM-Aufnahmen der Proben mit der höchsten Belichtungszeit von 4 s und der niedrigsten von 1,5 s sowie die 3D-gedruckten Objekte sind in Abbildung 5.53 dargestellt. Die Aufnahmen der weiteren Belichtungszeiten sind in Abbildung 8.8 zu finden. Werden die Aufnahmen miteinander verglichen, so führt die Reduzierung der Belichtungszeit zur Ausbildung einer schwammartigen statt der blumenkohlartigen Struktur. Proben mit 2 – 3,5 s Belichtungszeit zeigen analog zur 4 s Probe ein Blumenkohlartiges Porensystem. Diese Abweichung in der Porenstruktur ist ebenfalls makroskopisch in den gedruckten Objekten zu sehen. Bei 4 s ist die Materialoberfläche glatt und die spezifische Oberfläche beträgt  $10,4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , wohingegen sie bei 1,5 s Aufrauungen in der Struktur zeigt und damit einhergehend eine größere spezifische Oberfläche besitzt ( $16,8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ).

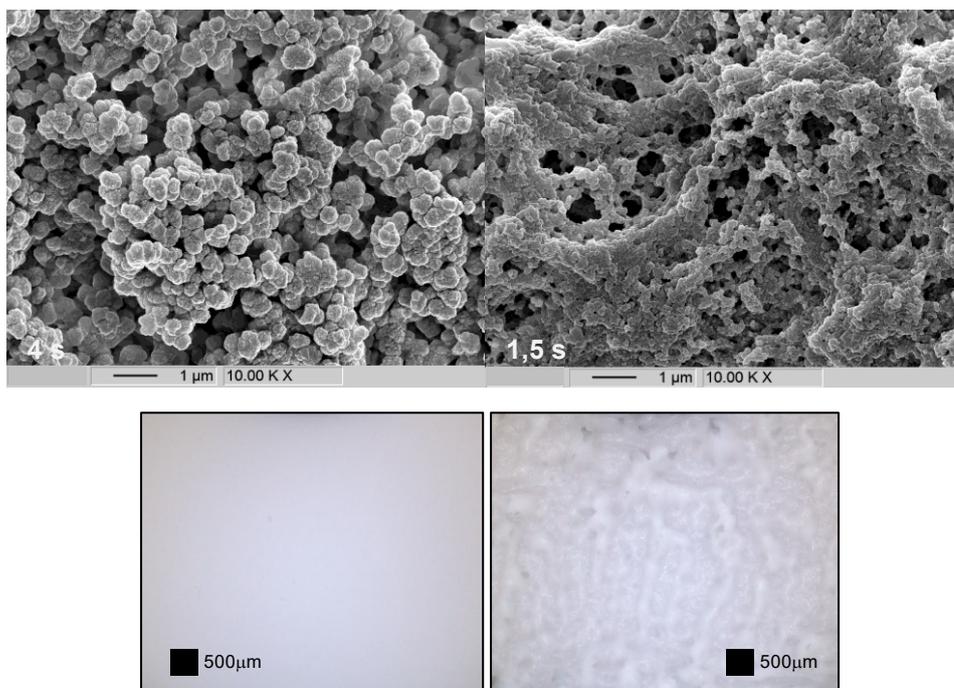


Abbildung 5.53: REM-Aufnahmen und Fotoaufnahmen einer im *Hyper-50Y* gedruckten Probe des PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-33%PPG1200 Harzes mit einer Belichtungszeit von 4 s (links) und 1,5 s (rechts).

Werden die dazugehörigen Porengrößenverteilungen in Abbildung 5.54 links betrachtet, so zeigen alle Proben eine monomodale Verteilung des Porendurchmessers.

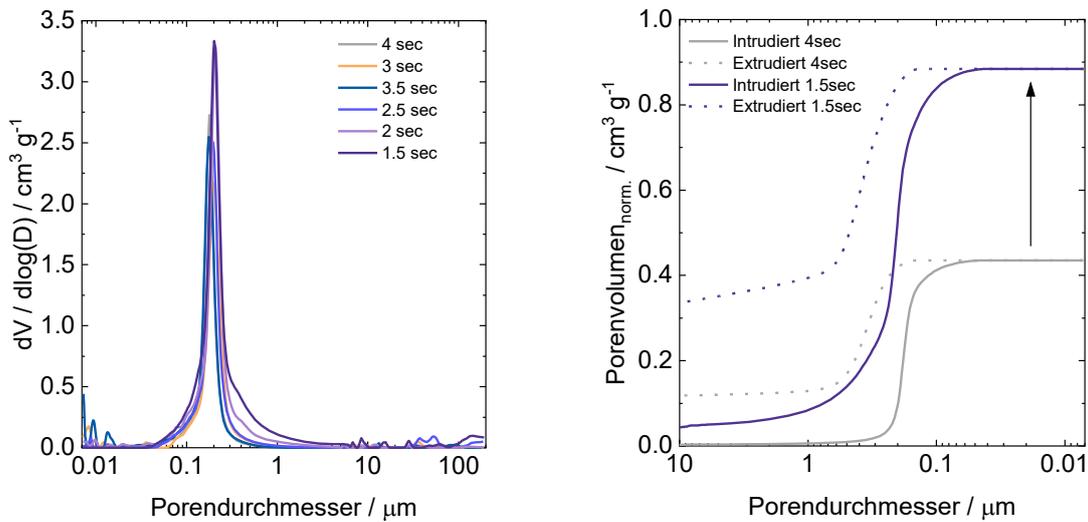


Abbildung 5.54: Porengrößenverteilung der im *Hyper-50Y* gedruckten Proben des PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-33%PPG1200 Harzes mit einer Variation der Belichtungszeit von 1,5 bis 4 s (links) und Verlauf des intrudierten sowie extrudierten Porenvolumens der 1,5 und 4 s Probe (rechts).

Die Reduzierung der Belichtungszeit führt dabei zur Ausbildung von größeren Poren, wobei der Effekt erst bei der Belichtungszeit von 2 und 1,5 s signifikant ist. Dies wird vor allem anhand der Intrusions- und Extrusionskurven der 1,5 s und der 4 s Probe im direkten Vergleich deutlich, wobei sich das intrudierte Volumen des Quecksilbers hier verdoppelt (Abbildung 5.54 rechts). Da die Druckqualität des Materials bei Belichtungszeiten  $< 2,5$  s abnimmt und die Proben von 2,5 bis 4 s keinen signifikanten Unterschied in der Porengrößenverteilung oder der spezifischen Oberfläche zeigen, wird die Belichtungszeit von 4 s beibehalten.

### Einfluss des Quervernetzers auf die Porengrößenverteilung

Die Quervernetzer TEGDMA und PETA dienen zum Aufbau des Polymergerüsts und tragen zur mechanischen Stabilität des Materials bei. Es stellt sich die Frage, ob der tetrafunktionelle Quervernetzer die Ausbildung des Porensystems negativ beeinflusst. Zu diesem Zweck wird der Anteil an PETA in der Harzformulierung durch TEGDMA ersetzt. Die REM-Aufnahmen der 3D-gedruckten Proben mit und ohne PETA sind in Abbildung 5.55 dargestellt. Die Verwendung von PETA führt zu kleineren Globuli und größeren spezifischen Oberflächen ( $16,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), während sich ohne PETA größere Poren und gleichzeitig auch größere Globuli ausbilden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass sich bei einem höheren Anteil an reaktiven Gruppen mehr Nukleationskeime und damit mehr Globuli ausbilden können. Ohne PETA bilden sich weniger Polymerisationszentren aus, die dann zu größeren Globuli heranwachsen. Somit können ohne PETA zwar größere Poren generiert werden, gleichzeitig verringert sich aber mit zunehmender Größe der Globuli die zur Verfügung stehende spezifische Oberfläche ( $10,9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) im Material.

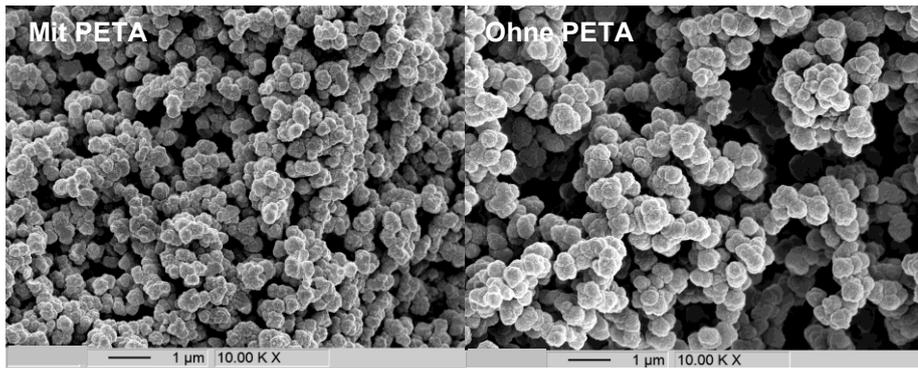


Abbildung 5.55: REM-Aufnahmen einer im *Hyper-50Y* gedruckten Probe des PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-33%PPG1200 Harzes (links) im Vergleich zur gedruckten Probe des TH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-33%PPG1200 (rechts).

Werden nun die Porengrößenverteilungen der Proben in Abbildung 5.56 miteinander verglichen, so zeigen beide Harzformulierungen im vereinfachten Aufbau eine bimodale und im 3D-Druckprozess eine monomodale Verteilung. Die Verschiebung der Verteilung zu größeren Poren ohne PETA kann sowohl im einfachen Polymerisationsaufbau als auch im 3D-Druckprozess bestätigt werden.

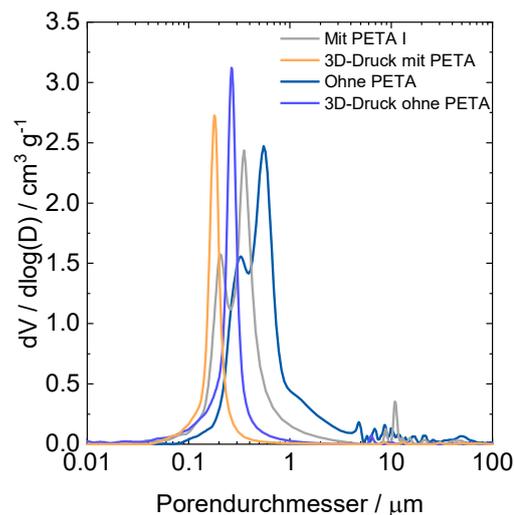


Abbildung 5.56: Vergleich der Porengrößenverteilung von im *Hyper-50Y* gedruckten sowie im vereinfachten Aufbau hergestellten Proben einer Harzformulierung mit 33%PPG 1200 mit und ohne den multifunktionellen Quervernetzer PETA.

In diesem Kapitel wurde die Erzeugung von Materialporosität mit einem Porogen untersucht. Im Porogenscreening erwies sich das PPG1200 in Kombination mit der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harzformulierung als vielversprechendstes Porogen. Bei der Übertragung des Porogensystems auf den 3D-Druckprozess zeigte der *Hyper-50Y* eine höhere Druckauflösung als der *SolFlex350*. Der PPG1200-Anteil von 33 % ( $\text{g g}^{-1}$ ) und die Belichtungszeit von 4 s zeigten keinen Verlust der Druckqualität und wurden damit als Parameter für die Endrezeptur gewählt. Da eine hohe mechanische Stabilität (Kapitel 5.1.1) und eine große Oberfläche im Material für die spätere Anwendung von Vorteil sind, wird PETA als Bestandteil der Harzformulierung beibehalten.

### 5.4.3 Anwendung von Chromatographiesäulen mit sekundärer Porosität

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Porogenscreeningversuche auf die Herstellung poröser 100 mm langer Chromatographiesäulen mit einer Kanalgröße von 300  $\mu\text{m}$  übertragen. Die innere Gitterstruktur wird mit der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-33%PPG1200-Harzformulierung im *Hyper-50Y* mit einer Belichtungszeit von 4 s gedruckt. Anschließend wird das mit dem kommerziellen *Formlabs Clear V4*-Harz gedruckte Gehäuse mit der porösen Gitterstruktur zusammengeführt. Dabei werden verschiedene Methoden des Zusammenfügens der beiden Komponenten mit Hilfe einer Pulsinjektion mit 2 M Natriumchloridlösung miteinander verglichen. Methode A erfolgt mit Verwendung des PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-Harzes als Klebstoff während Methode B ohne den Einsatz von Kleber durchgeführt wird (Abbildung 5.57).

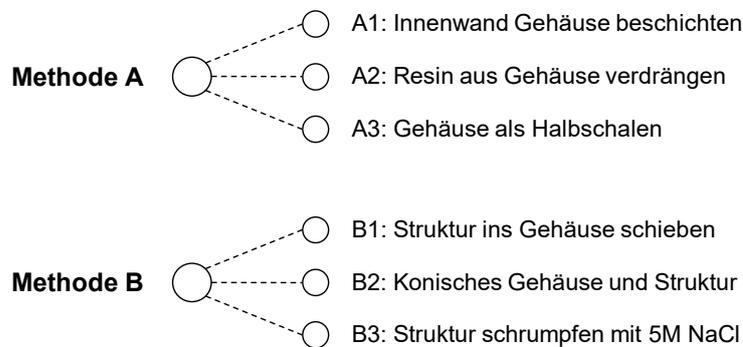


Abbildung 5.57: Zusammenstellung der Kombinationsmethoden A und B mit den Ansätzen 1 – 3 zum Zusammenführen des Gehäuses und der inneren Gitterstruktur.

#### Bewertung der Kombinationsmethoden A und B

In Abbildung 5.58 sind die Verweilzeitverteilungen der getesteten Kombinationsmethoden und in Tabelle 5.1 die daraus ermittelten mittleren Verweilzeiten ( $\bar{t}$ ) gegenübergestellt.

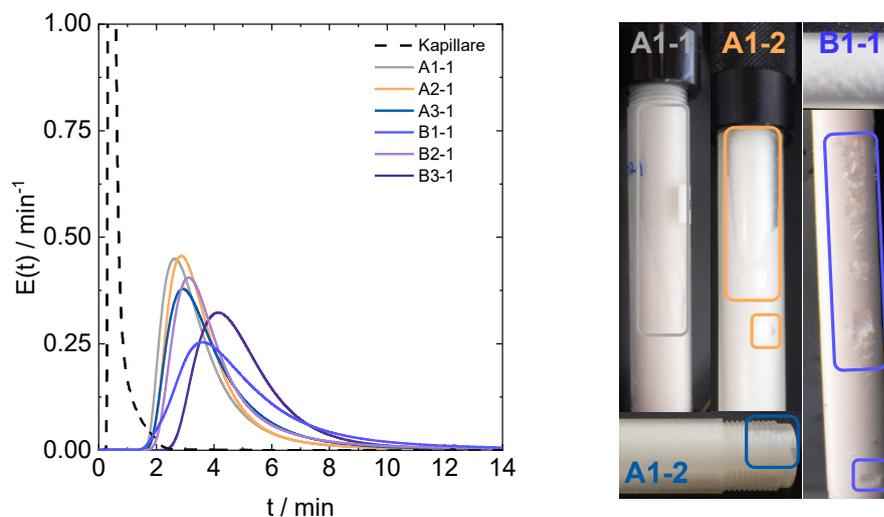


Abbildung 5.58: Verweilzeitverteilungen der getesteten Kombinationsmethoden A und B (links) und Fotos einiger fertiger Chromatographiesäulen, welche die Nachteile der Einbaumethode, wie Luftblasen und Materialdefekte, zeigen (rechts).

Tabelle 5.1: Mittlere Verweilzeiten berechnet aus der Verweilzeitverteilung der beiden Methoden A und B mit jeweils den ersten Messungen der Ansätze 1, 2 und 3. Die berechnete theoretische Verweilzeit beträgt  $\sim 3,2$  min.

Methode A		Methode B	
	$\bar{\tau}$ / min		$\bar{\tau}$ / min
A1-1	3,27	B1-1	4,79
A2-1	3,37	B2-1	3,92
A3-1	3,69	B3-1	4,71

Hier zeigen die nach Methode A hergestellten Chromatographiesäulen A1-1, A2-1 und A3-1, sowie B2-1 einen ähnlichen Verlauf der Verteilung. Zu Beginn ist ein steiler Anstieg der Kurve zu erkennen, bis diese nach dem Maximum der Verteilung in einem *Tailing* ausläuft. Die Chromatographiesäulen der Methode A weisen mit 3,27 – 3,69 min die kürzesten Verweilzeiten des Salzes im System auf. Bei näherer Betrachtung der fertig assemblierten Chromatographiesäulen fällt auf, dass sich bei A Luftblasen zwischen dem Gehäuse und der Gitterstruktur bilden (Abbildung 5.58), wodurch keine vollständige Kontaktfläche zwischen den Komponenten besteht. Bei A3 sind die Luftblasen vor allem im Bereich des Gewindes zu beobachten. Außerdem dringt durch die Porosität der Gittersäule Harz, welches als Klebstoff dient, in die Struktur ein. Aushärtungsprozesses führt dies zu geschlossenen Fehlstellen in der Struktur und reduziert zusammen mit den Luftblasen das verfügbare Volumen der Säule. Dies könnte in einer kürzeren mittleren Verweilzeit resultieren.

Werden die Ergebnisse von Methode B betrachtet, so zeigt Ansatz B2 neben einem ähnlichen Kurvenverlauf wie A ebenfalls eine vergleichbare mittlere Verweilzeit von 3,92 min. Dies kann ebenfalls auf das geringere Volumen (-2%) des Gitterzylinders infolge der Änderung in eine konische Struktur zurückgeführt werden. Die Ansätze B1 und B3 weisen dagegen mit 4,79 bzw. 4,71 min die längsten Verweilzeiten auf. B1 besitzt die breiteste Verteilung der untersuchten Ansätze und zeigt neben einem starken *Tailing* ebenfalls ein *Fronting* der Verteilung. Wird die Gitterstruktur von B1-1 betrachtet, so sind entlang der Außenseite des Gitterzylinders Risse in der Struktur zu erkennen. Diese entstehen durch das Einsetzen der Struktur in das Gehäuse. Der Materialabtrag führt zu Löchern in der Chromatographiesäule, was zu einer intensiveren Rückvermischung während der Pulsinjektion führt. Dies resultiert in einer Verbreitung des Signals und mit der Vergrößerung des zur Verfügung stehenden Volumens gleichzeitig zu einer Erhöhung der mittleren Verweilzeit. Bei der Säule B3 erfolgte das Schrumpfen der Struktur mit 5 M NaCl für 2 Tage. Hier kommt es beim Einführen der Struktur ins Gehäuse zu einem geringen Abtrag von Gittermaterial. Dies führt neben der höheren Verweilzeit des Salzes ebenfalls zu einem breiteren Signal im Vergleich zu Methode A und Ansatz B2. Im Vergleich zu B1 zeigt B3 jedoch ein geringeres *Fronting* sowie eine geringere Rückvermischung. Somit könnte neben den Fehlstellen in der Struktur auch die Behandlung des Systems mit der Salzlösung einen Einfluss auf die Verteilung haben. Die Lagerung der Gitterstruktur in der Salzlösung wird für weitere Experimente ausgeweitet, um ein stärkeres Schrumpfen der Struktur zur Vermeidung von Fehlstellen ermöglichen.

Da die Handhabung der Methode A mit dem Einsatz von Klebstoff und der Konstruktion von Halbschalen einen höheren Montageaufwand erfordert, wird im Folgenden auf die Methode B

zurückgegriffen. Hier werden nur die Ansätze B2 und B3 näher betrachtet, da bei Ansatz B1 kein zerstörungsfreier Einbau der Gitterstruktur möglich war.

In Abbildung 5.59 sind zur Betrachtung der Reproduzierbarkeit der Kombinationsansätze B2 und B3 deren Verweilzeitverteilungen dargestellt. Die daraus berechneten mittleren Verweilzeiten sind in Tabelle 5.2 angegeben.

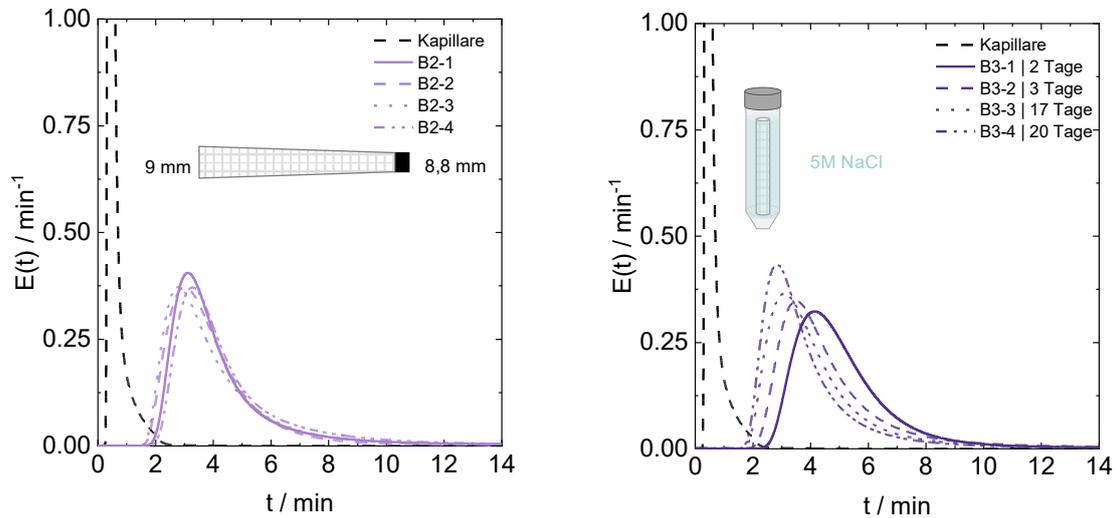


Abbildung 5.59: Verweilzeitverteilungen der konischen Säulen des Ansatzes B2 (links) und der mit Salz geschrumpften Säulen des Ansatzes B3 in Abhängigkeit der Lagerzeit (rechts).

Tabelle 5.2: Mittlere Verweilzeiten der vierfachen Reproduzierbarkeitsmessungen von Ansatz B2 und B3.

Ansatz B2		Ansatz B3		
	$\bar{\tau} / \text{min}$	$\bar{\tau} / \text{min}$	$t_{\text{Lagerung}} / \text{Tage}$	
B2-1	3,92	B3-1	4,71	2
B2-2	3,54	B3-2	4,39	3
B2-3	3,64	B3-3	3,82	17
B2-4	4,22	B3-4	3,49	20
$\bar{B2}$	$3,83 \pm 0,26$	-	-	-

Die Verweilzeitverteilungen der konischen Chromatographiesäulen zeigen alle einen vergleichbaren Verlauf mit einer über alle vier Messungen gemittelten mittleren Verweilzeit von  $3,83 \pm 0,26$  min. Damit ist der Ansatz über die Herstellung konischer Gitterstrukturen mit einer Abweichung von ca. 16 s untereinander gut reproduzierbar.

Wird hingegen der Ansatz des Schrumpfens der Säule mit 5 M NaCl-Lösung betrachtet, so verschiebt sich die Verteilung in Abhängigkeit von der Lagerzeit der Struktur in der Salzlösung. Es ist der Trend zu erkennen, dass mit zunehmender Lagerzeit die Verteilungsfunktion enger wird, sich weiter nach links verschiebt und sich daraus eine stetige Verringerung der mittleren Verweilzeit ergibt. Hier führt eine längere Behandlung des Materials mit einer Salzlösung zu einer stärkeren Schrumpfung der Struktur (2 – 5%), so dass eine Beschädigung des Materials unwahrscheinlicher wird. Darüber hinaus könnte die lange Lagerzeit zu einer irreversiblen Schrumpfung kleinerer Poren im Material und damit zu einer Verringerung des verfügbaren

Volumens in der Säule geführt haben. Dies würde die verkürzte Verweilzeit erklären. Diese deckt sich insbesondere bei den Säulen B3-3 und B3-4 mit den Ergebnissen des B2-Ansatzes, der bereits durch die konische Struktur ein verringertes Volumen aufweist. Zur Weiterverfolgung des Ansatzes B3 müsste ein Optimierungsschritt der Lagerzeit des Materials in der Salzlösung erfolgen. Da der Ansatz B2 keinen zusätzlichen Schritt der chemischen Behandlung der Gitterstruktur vorsieht, der sich auf die Verweilzeitverteilung auswirken könnte, ist dieser Ansatz B3 vorzuziehen.

Den abschließenden Schritt stellt die Übertragung der Porogentemplierung auf die TEMPO-Oxidation dar, um den Einfluss der Zugänglichkeit der Oberfläche auf die Kapazitätsabnahme zu beurteilen. Hier werden bei 200 µm Gittersäulen ohne den Einsatz von Porogen bei der ersten DBC-Messung Proteinbindekapazitäten von ca. 5,4 mg<sub>Lys</sub> g<sup>-1</sup><sub>Säule</sub> erhalten. Diese nehmen mit jeder weiteren Messung ab, bis diese bei der sechsten Messung ein Minimum von 0,6 mg<sub>Lys</sub> g<sup>-1</sup><sub>Säule</sub> erreichen, was einem Kapazitätsverlust von 89% entspricht.

### Bestimmung der dynamischen Bindungskapazität der Porogensäulen

Für die Bestimmung der dynamischen Bindungskapazität werden die zuvor hergestellten 300 µm Gitterchromatographiesäulen (B3-1 und B3-2) mit der Strukturporosität von 50% und der durch das PPG1200 eingeführten sekundären Materialporosität von 33% verwendet. Die Ergebnisse der Proteinbindekapazität der TEMPO oxidierten Gitterporogensäulen sind in Abbildung 5.60 dargestellt.

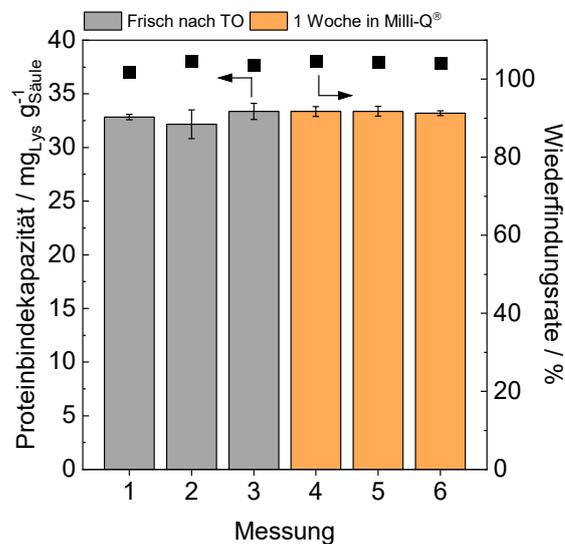


Abbildung 5.60: DBC-Ergebnisse von TEMPO oxidierten 300 µm Porogengitterchromatographiesäulen mit Lysozym als Protein beim pH-Wert von 5 in einer Dreifachbestimmung.

Für die Säulen kann eine reproduzierbare Proteinbindekapazität von etwa 33,1 ± 0,4 mg<sub>Lys</sub> g<sup>-1</sup><sub>Säule</sub> ermittelt werden. Außerdem ist die Kapazität über die sechs Messungen hinweg konstant und der zuvor beobachtete Kapazitätsverlust tritt bei den Porogensäulen nicht auf.

Mit Hilfe der Gasadsorptionsanalyse kann nach der BET-Methode eine Oberfläche der Säulen von  $13,29 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  und somit von ca.  $40 \text{ m}^2$  für die gesamte Säule bestimmt werden, die bei den Säulen ohne Porogen im  $\text{cm}^2$ -Bereich liegt. Damit ergeben sich mit einer größeren Oberfläche ebenfalls eine höhere Hydroxylgruppendichte und damit mehr Aktivzentren, an denen das Lysozym binden kann. Damit könnte sich die Vermutung über ein Zugänglichkeitsproblem der Oberfläche der Gittersäulen ohne den Einsatz von Porogen bestätigen.

Im letzten Schritt wird die Proteinbindungskapazität der neu entwickelten 3D-gedruckten Chromatographiematerialien im Vergleich zu anderen etablierten Chromatographiesystemen bewertet.

### Vergleich mit etablierten chromatographischen Systemen

Mit der nun über die Gassorption bestimmbarer Oberfläche kann die Proteinbindekcapazität auf die Oberfläche bezogen werden und beträgt für die 3D-gedruckten Säulen  $2,5 \pm 0,06 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$ . Damit kann ein Vergleich zwischen den 3D-gedruckten Gittersäulen und den Standardchromatographiematerialien erfolgen. Dazu werden kommerziell erhältliche Hydroxymembranen sowie Hydroxypartikel analog zu den Gittersäulen in der TEMPO-Oxidation umgesetzt und in der DBC mit Lysozym beim pH-Wert von 5 hinsichtlich ihrer Proteinbindekcapazität vermessen. Es ist jedoch zu beachten, dass die für die Gasadsorptionsmessungen zugängliche Oberfläche zugrunde gelegt wird, die sich von der für die Chromatographie zugänglichen Oberfläche unterscheiden könnte. Da jedoch alle Materialien die gleiche Behandlung erfahren und hinsichtlich ihrer Oberflächenchemie ähnlich sind, wird dies für einen indikativen Vergleich an dieser Stelle in Kauf genommen. Der Vergleich der Proteinbindekcapazitäten ist in Abbildung 5.61 dargestellt und die dazugehörigen BET-Oberflächen sind in Tabelle 5.3 hinterlegt.

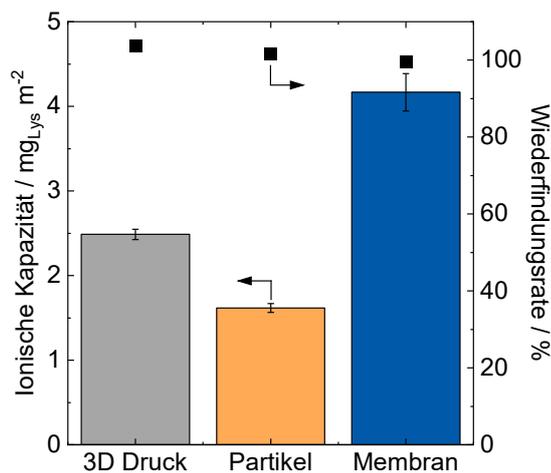


Abbildung 5.61 Vergleich der Proteinbindekcapazität von TEMPO oxidierten 3D-gedruckten Säulen, Membranen sowie Partikeln in Bezug auf deren BET-Oberfläche.

Tabelle 5.3: BET-Oberflächen von den 3D-gedruckten 300 µm Gitterchromatographiesäulen mit PPG1200 und kommerziell erhältlichen Hydroxymembranen sowie Hydroxypartikel.

	3D Druck	Membran	Partikel
BET-Oberfläche / m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	13,29	7,34	130,96
OH-Konzentration / mol%	60	65	50

Beim Vergleich der drei chromatographischen Materialien fällt auf, dass die oxidierten Membranen mit  $4,2 \pm 0,2 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$  die höchste Proteinbindekapazität aufweisen, gefolgt von den 3D-gedruckten Säulen. Die untersuchten Partikel weisen mit  $1,6 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$  die geringste Bindekapazität auf. Die skalierbaren und reproduzierbaren 3D-gedruckten Säulen liegen dementsprechend mit  $2,5 \pm 0,06 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$  im mittleren Bereich der etablierten chromatographischen Systeme und bieten damit eine vergleichbare Proteinbindekapazität zu herkömmlichen Materialien. Durch die neue Technologie des 3D-Drucks kann hier jedoch nicht nur eine Materialporosität, wie bei Partikeln und Membranen, sondern zusätzlich eine Strukturporosität in Form einer offenzelligen Gitterstruktur ermöglicht werden. Durch diesen Vorteil kann die Porosität auf zwei Größenskalen eingestellt werden. Weitere Optimierung des Materials und des Drucksystems könnten zu größeren Poren ( $> 500 \text{ nm}$ ) und zu größerer Auflösung der Durchgangskanäle ( $> 300 \mu\text{m}$ ) führen. Hier könnte über einen Multi-Materialdrucker die simultane Herstellung der inneren Struktur und des äußeren Gehäuses ermöglicht werden. Damit müsste kein Zusammenführen der beiden Komponenten erfolgen und die Chromatographiesäule wäre in einem Schritt fertig.<sup>[121]</sup>

Die freie Strukturgestaltung der Durchgangskanäle und die damit einhergehende Begünstigung des konvektiven Massentransportes ermöglicht zudem höhere Flussgeschwindigkeiten in den DBC-Messungen von  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$  bei einem Rückdruck der Säule von 2,5 bar gegenüber chromatographischen System auf Basis von Partikeln ( $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , 3 bar) und Membranen ( $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ , 3 bar). Die 3D-gedruckten Materialien erlauben somit nicht nur die Einstellung hoher Flussraten, sondern darüber hinaus eine gezielte Einstellung der Strömungseigenschaften durch Optimierung der geordneten Zellstruktur. Damit könnte für jedes Zielmolekül eine Modellierung zur Findung der optimalen Trennstruktur erfolgen, sodass für jedes Molekül die optimale Struktur maßgeschneidert 3D-gedruckt werden kann. Dies ist weder für Partikel noch für Membranen realisierbar. Mit der Möglichkeit des 3D-Drucks auf Anfrage (*Printing on Demand*) könnten kleine Batchproduktionen für sehr spezifische Anwendungen ermöglicht und über das *Prototyping* optimiert werden. Da die Säulen über ein additives Fertigungsverfahren hergestellt werden, sind diese inhärent ressourceneffizient. Im Vergleich dazu entsteht bei der Partikelherstellung durch die Klassifizierung der Partikelgrößenverteilung viel Abfallprodukt (Ausschuss). Für die Membranherstellung werden die Membranvliese durch große Wannen gefüllt mit der Harzformulierung gefahren, sodass hohe Mengen an Harz benötigt werden. Infolge der finalen Formgebung über z.B. Stanzen kann auch hier viel Abfallprodukt als Verschnitt entstehen. Darüber hinaus ermöglicht das handliche und leichte Design eine einfache Handhabung der Säulen bei der Montage sowie Demontage und bei der Durchführung der chromatographischen Analyse. Im Gegensatz zu den Partikeln und Membranen, lässt sich weiterhin die Produktion von den 3D-gedruckten Säulen leicht transferieren und erfordert einen geringen herstellungstechnologischen Aufwand hinsichtlich einer Großproduktionsanlage, z.B. in Form einer 3D-Druckfarm.

---

# 6 Zusammenfassung

Der 3D-Druck ermöglicht die additive Herstellung dreidimensionaler Objekte auf Basis computergestützter Design-Modelle durch schichtweisen Materialaufbau. Diese interessante additive Fertigungsmethode hat jedoch bisher keine nennenswerte Anwendung bei der Herstellung von Medien für chromatographische Trennprozesse gefunden. Ein Brückenschlag zwischen beiden Themenfeldern könnte das Themenfeld der Chromatographie durch die Möglichkeit der gezielten Einstellung von Fließwegen in der stationären Phase mit geordneter und präziser Morphologie revolutionieren.

Da jedoch ein Defizit an geeigneten Materialien besteht, welche mit ausreichender Auflösung und sekundärer Porosität sowie notwendiger Oberflächenfunktionalität gedruckt werden können, die sowohl mit additiven Fertigungsverfahren verarbeitet werden können als auch für den Einsatz in den Trennwissenschaften geeignet sind, war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung neuartiger stationärer Phasen mittels des DLP-3D-Druckverfahrens.

Unter Berücksichtigung vorgegebener Spezifikationen, wie hoher chemischer und mechanischer Stabilität, hoher Reaktivität gegenüber photoinduzierter Polymerisation, möglicher Modifizierbarkeit und Farblosigkeit des Materials, konnte in ersten Vorversuchen eine Harzformulierung auf Basis von 10-mol% PETA, 30 mol-% TEGDMA und 60 mol-% HEMA identifiziert werden. Für einen effektiven Initiierungsschritt bei der Wellenlänge der UV-Lichtquelle des 3D-Druckers von 385 nm wurde der Initiator TPO mit einem Anteil von 1,25 mol-% bezogen auf die flüssigen Harzkomponenten gewählt. Um Schichtdicken im Bereich von 25  $\mu\text{m}$  und damit eine hohe  $z$ -Druckauflösung zu erreichen, musste ein geeigneter Photoabsorber mit hoher Absorption bei 385 nm gefunden werden. Da eine vollständige Entfernung des Farbstoffes weder durch Extraktion mit Ethanol oder Aceton in der Soxhlet-Apparatur noch mit überkritischem  $\text{CO}_2$  möglich war und sich weiterhin negativ auf die mechanische Stabilität auswirkte, wurden zur Optimierung der Harzrezeptur 0,025 mol-% des farblosen optischen Aufhellers OB184 zugesetzt.

Beim 3D-Druck von offenzelligen Gitterstrukturen mit Kanalgrößen von 100 – 400  $\mu\text{m}$  konnten mit dieser Harzzusammensetzung in allen Objekten auspolymerisierte Bereiche festgestellt werden, so dass zur Optimierung der  $xy$ -Druckauflösung der Inhibitor BHT eingesetzt wurde. Bei einer Zielkonzentration von 5 mol-% konnten offene Gitterstrukturen von 180  $\mu\text{m}$  mit einem *Upscaling* der Säulenlänge von 10 mm auf 100 mm sowie Gyroidstrukturen von 240  $\mu\text{m}$  mit einer Belichtungszeit von 4 s pro Schicht realisiert werden. Durch eine Umorientierung der Druckobjekte um 90° konnte die Druckauflösung auf offene 150  $\mu\text{m}$  Gitter und 200  $\mu\text{m}$  Gyroide erhöht werden. Mikroskopische Aufnahmen zeigten jedoch ein Schrumpfen der Strukturen um 33 %, das auf den Reinigungsprozess mit Isopropanol zurückgeführt werden konnte. Über eine Anpassung der Strukturabmessungen unter Berücksichtigung des Schrumpffaktors konnte die gewünschte Strukturporosität von 50% ermöglicht werden.

---

Nach der Festlegung der Harzzusammensetzung und der Bestimmung der Druckparameter des Materials erfolgte als nächster Schritt die Funktionalisierung der freien Hydroxylgruppen des HEMA-Monomers mit Hilfe der TEMPO-vermittelten Oxidation zur Herstellung von Kationenaustauscherchromatographiesäulen. Mit 400  $\mu\text{m}$  Gitterwürfeln zeigten die Versuchsparameter von 4 h Reaktionszeit und einem zweifachen Äquivalent an Oxidationsreagenzien die höchste ionische Kapazität von 59,2  $\mu\text{äq. g}^{-1}$ . Damit wurden diese Parameter für die Folgeversuche gewählt. Für eine zerstörungsfreie Analyse von Gittersäulen mit einer Länge von 100 mm wurde die Analyse der umgesetzten Hydroxylgruppen über die Applikation als CEX bestimmt. Hierbei wurde das gegenüber der Carboxylatgruppen affine Lysozym als Modellprotein zur Bestimmung der dynamischen Proteinbindekapazität der oxidierten Kationenaustauscher bei pH-Wert 5 und einer vollständigen Proteinbeladung eingesetzt und bei einer Absorption von 280 nm quantitativ detektiert. Hierbei konnte bei kontinuierlicher Reaktionsführung der TEMPO-Oxidation von 300  $\mu\text{m}$  Gittersäulen mit 3,16  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  im Vergleich zu 0,50  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  im Batchversuch eine deutlich höhere Bindekapazität erreicht werden. Wiederfindungsraten von  $\sim 100\%$  zeigen, dass keine unspezifische Proteinadsorption am Material stattgefunden hat. Bei der anschließenden optischen Betrachtung der Säulen konnte als Folge der TEMPO-Oxidation eine Gelbfärbung des Materials beobachtet werden, deren Intensität mit der Konzentration der Reaktanden in der Reaktionslösung und den daraus resultierenden Proteinbindekapazitäten korrelierte. Durch eine Variation der Konzentration von 0,05 – 0,53  $\text{mol L}^{-1}$  konnte festgestellt werden, dass zu geringe Konzentrationen ( $< 0,13 \text{ mol L}^{-1}$ ) auch zu niedrigen Proteinbindekapazitäten führten, während zu hohe Konzentrationen ( $> 0,41 \text{ mol L}^{-1}$ ) eine starke Verfärbung zur Folge hatten. Ein Kompromiss zwischen ausreichender Performanz und geringer Verfärbung wurde bei einer Konzentration von 0,31  $\text{mol L}^{-1}$  mit einer Bindekapazität von 4,42  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  und vernachlässigbarer Verfärbung des Materials gefunden. REM-Aufnahmen des oxidierten Materials zeigten weiterhin eine oxidationsbedingte Aufräuhung der Oberfläche, die jedoch nicht in das Innere der Struktur vordrang. Außerdem wurde bei den aufeinanderfolgenden Bestimmungen der Proteinbindekapazität eine irreversible Abnahme der Kapazität festgestellt. Die mit einer 200  $\mu\text{m}$  Gittersäule maximal erreichte Bindekapazität von 5,40  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  zeigte bei der sechsten DBC-Messung mit nur noch 0,60  $\text{mg}_{\text{Lys}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  einen Kapazitätsverlust von etwa 89% auf. Bei der Untersuchung möglicher Einflussfaktoren auf den Kapazitätsverlust konnte sowohl eine basische als auch eine saure Hydrolyse des Materials ausgeschlossen werden. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass eine saure Behandlung des Materials nach der TEMPO-Oxidation unerlässlich ist, um eine vollständige Entfernung der Verunreinigungen durch die TEMPO-Reagenzien zu gewährleisten. Auch zeigte die Lösung, in der die Säulen gelagert wurden, keinen Einfluss auf die Kapazitätsabnahme, welche bei Lagerung im Acetatpuffer, in Wasser, in 20%-Ethanol und DPGME den gleichen Trend zeigte. Weiterhin konnten während der DBC-Messungen keine aus dem Material austretenden Komponenten nachgewiesen werden und eine Titration der Carboxylatgruppen vor den DBC-Messungen sowie nach der Kapazitätsabnahme zeigte mit 59 bzw. 65  $\mu\text{äq}_{\text{COOH}} \text{g}^{-1}_{\text{Säule}}$  keine signifikante Veränderung der Ligandendichte im Material.

Da die 3D-gedruckten Säulen Oberflächen von nur wenigen  $\text{cm}^2$  und mit 60 mol-% HEMA eine hohe Hydroxylgruppendichte aufwiesen, wurde eine mögliche Änderung der Porosität durch Quellvorgänge des Materials als letzter möglicher Einflussfaktor auf die Kapazitätsabnahme

---

untersucht. Hierzu wurde neben der strukturellen Porosität der Säulen in Form von der Gitterstruktur ebenfalls eine Materialporosität über die PIPS mit Hilfe von 33% ( $\text{g g}^{-1}$ ) PPG1200 als Porogen in die Chromatographiesäulen eingeführt. Dadurch konnten Poren im Bereich von 50 – 500 nm generiert und die Oberfläche des Materials auf  $\sim 13 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  erhöht werden. Die 300  $\mu\text{m}$  Porogengittersäulen zeigten nach der TEMPO-Oxidation eine Proteinbindekapazität von  $33,10 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1} \text{ Säule}$  bzw.  $2,5 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$ , welche über alle sechs Messungen hinweg konstant blieb. Damit konnte erfolgreich eine stabile Bindekapazität in der 3D-gedruckten stationären Phase realisiert werden.

Das Ziel war die Entwicklung neuartiger stationärer Phasen mit Hilfe des photobasierten 3D-Druckverfahrens. Ein Vergleich der dynamischen Proteinbindekapazität mit etablierten Chromatographiesystemen hat aufgezeigt, dass die 3D-gedruckten Porogengittersäulen mit  $2,5 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$  eine um 56% höhere Kapazität gegenüber von TEMPO-oxidierten kommerziellen Partikeln ( $1,6 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$ ) aufweisen. Insgesamt konnte somit ein chromatographisches System realisiert werden, welches mit den etablierten Systemen auf Partikel- und Membranbasis eine vergleichbare Leistungsfähigkeit aufweist und diese gleichzeitig mit den zahlreichen Vorteilen einer additiven Fertigung vereint. Das mit der DLP-Technologie neu entwickelte Chromatographiematerial stellt somit eine attraktive Ergänzung zu den bereits verfügbaren stationären Phasen dar. Insbesondere, da sich die Anforderungen an chromatographische Materialien in einem stetigen Wandel befinden und damit ein Bedarf an schnellem und einfachem *Prototyping* von definierten und geordneten Strukturen je nach Applikation besteht, was mit Hilfe der additiven Fertigungstechnik ermöglicht wird.



---

# 7 Literaturverzeichnis

- [1] G. Carta, A. Jungbauer, *Protein chromatography. Process development and scale-up*, Wiley-VCH, Weinheim, **2020**.
- [2] M. Kesik-Brodacka, *Biotechnology and applied biochemistry* **2018**, 65, 306.
- [3] F. Dolamore, C. Fee, S. Dimartino, *Journal of chromatography. A* **2018**, 1532, 150.
- [4] S. Nawada, S. Dimartino, C. Fee, *Chemical Engineering Science* **2017**, 164, 90.
- [5] U. Kalsoom, P. N. Nesterenko, B. Paull, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, 105, 492.
- [6] S. Dasani, R. Palanki, P. Menon, S. K. Bose in *Translational Surgery*, Elsevier, **2023**, S. 535–538.
- [7] A. Strancar, A. Podgornik, M. Barut, R. Necina, *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **2002**, 76, 49.
- [8] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, D. Price, *Chemical biology & drug design* **2013**, 81, 136.
- [9] F. D. Makurvet, *Medicine in Drug Discovery* **2021**, 9, 100075.
- [10] H. A. D. Lagassé, A. Alexaki, V. L. Simhadri, N. H. Katagiri, W. Jankowski, Z. E. Sauna, C. Kimchi-Sarfaty, *F1000Research* **2017**, 6, 113.
- [11] M. S. Hong, K. A. Severson, M. Jiang, A. E. Lu, J. C. Love, R. D. Braatz, *Computers & Chemical Engineering* **2018**, 110, 106.
- [12] W. S. McKechnie, V. Thom, L. Kupracz, J. Pollard, S. Kandula, J. Welsh, *Biotechnology progress* **2023**, 39, e3308.
- [13] R. Hahn, A. Jungbauer, *Analytical chemistry* **2000**, 72, 4853.
- [14] M. T. W. Hearn, *Current Opinion in Chemical Engineering* **2017**, 18, 90.
- [15] A. A. Shukla, U. Gottschalk, *Trends in biotechnology* **2013**, 31, 147.
- [16] Y. M., R. E. in *Column Chromatography* (Hrsg.: D. F. Martin, B. B. Martin), IntechOpen, **2013**.
- [17] *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, Elsevier, **2022**.
- [18] R. J. Gritter (Hrsg.) *Heidelberger Taschenbücher, Vol. 245*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1987**.
- [19] N. A. Parris, *Instrumental liquid chromatography. A practical manual on high-performance liquid chromatographic methods*, Elsevier, Amsterdam, **1976**.
- [20] D. F. Martin, B. B. Martin (Hrsg.) *Column Chromatography*, IntechOpen, **2013**.
- [21] H. Schmidt-Traub, M. Schulte, A. Seidel-Morgenstern (Hrsg.) *Preparative Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, **2020**.
- [22] J. M. Miller, *Chromatography. Concepts and contrasts*, 2. Aufl., Wiley, Hoboken, N.J., **2005**.
- [23] A. Vailaya, C. Horváth, *Journal of chromatography. A* **1998**, 829, 1.

- 
- [24] M. E. Lienqueo, A. Mahn, J. C. Salgado, J. A. Asenjo, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2007**, 849, 53.
- [25] O. Bahadir, G. Saltan, S. Ozbilgin, B. Ergene in *Column Chromatography* (Hrsg.: D. F. Martin, B. B. Martin), IntechOpen, **2013**.
- [26] A. R. Mazzer, X. Perraud, J. Halley, J. O'Hara, D. G. Bracewell, *Journal of chromatography. A* **2015**, 1415, 83.
- [27] in *Journal of chromatography library*, Elsevier, **1984**, S. 253–283.
- [28] 0065-2415.
- [29] Y. Yao, A. M. Lenhoff, *Journal of chromatography. A* **2004**, 1037, 273.
- [30] O. Bahadir in *Column Chromatography* (Hrsg.: D. F. Martin, B. B. Martin), IntechOpen, **2013**.
- [31] A. RYAN, T. TERRELL in *Handbook of Toxicologic Pathology*, Elsevier, **2002**, S. 479–500.
- [32] A. Jungbauer, *Journal of chromatography. A* **2005**, 1065, 3.
- [33] M. T. Tyn, T. W. Gusek, *Biotechnology and bioengineering* **1990**, 35, 327.
- [34] J. J. Stickel, A. Fotopoulos, *Biotechnology progress* **2001**, 17, 744.
- [35] A. Jungbauer, E. Boschetti, *Journal of chromatography. B, Biomedical applications* **1994**, 662, 143.
- [36] T. M. Przybycien, N. S. Pujar, L. M. Steele, *Current opinion in biotechnology* **2004**, 15, 469.
- [37] *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, **2013**.
- [38] S. Fanali, P. R. Haddad, C. Poole, M.-L. Riekkola (Hrsg.) *Liquid chromatography, Volume 2, Applications*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **2017**.
- [39] J. Chen, B. Yu, H. Cong, Y. Shen, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2023**, 415, 45.
- [40] X. Liu, Y. Wang, H. Cong, Y. Shen, B. Yu, *Journal of chromatography. A* **2021**, 1653, 462313.
- [41] R. D. Arrua, M. C. Strumia, C. I. Alvarez Igarzabal, *Materials* **2009**, 2, 2429.
- [42] V. Orr, L. Zhong, M. Moo-Young, C. P. Chou, *Biotechnology advances* **2013**, 31, 450.
- [43] F. ŠVEC, J. M. FRÉCHET in *Journal of chromatography library*, Elsevier, **2003**, S. 19–50.
- [44] F. Svec, *Journal of separation science* **2004**, 27, 747.
- [45] Q. C. Wang, K. Hosoya, F. Svec, J. M. Fréchet, *Analytical chemistry* **1992**, 64, 1232.
- [46] J. Courtois, E. Byström, K. Irgum, *Polymer* **2006**, 47, 2603.
- [47] C. Viklund, E. Pontén, B. Glad, K. Irgum, P. Hörstedt, F. Svec, *Chem. Mater.* **1997**, 9, 463.
- [48] Y. Li, M. L. Lee, *Journal of separation science* **2009**, 32, 3369.
- [49] K.-F. Du, D. Yang, Y. Sun, *Journal of chromatography. A* **2007**, 1163, 212.
- [50] M. R. Buchmeiser, *Polymer* **2007**, 48, 2187.
- [51] X. Jiao, S. Shen, T. Shi, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2015**, 1007, 100.
- [52] R. D. Arrua, M. Talebi, T. J. Causon, E. F. Hilder, *Analytica chimica acta* **2012**, 738, 1.
- [53] E. G. Vlakh, T. B. Tennikova, *Journal of separation science* **2007**, 30, 2801.
- [54] I. Tatárová, R. Fáber, R. Denoyel, M. Polakovic, *Journal of chromatography. A* **2009**, 1216, 941.
- [55] T. Pereira, J. V. Kennedy, J. Potgieter, *Procedia Manufacturing* **2019**, 30, 11.
- [56] B. Lu, D. Li, X. Tian, *Engineering* **2015**, 1, 85.

- 
- [57] M. Štaffová, F. Ondreáš, J. Svatík, M. Zbončák, J. Jančář, P. Lepcio, *Polymer Testing* **2022**, *108*, 107499.
- [58] I. Gibson, D. Rosen, B. Stucker in *Additive Manufacturing Technologies* (Hrsg.: I. Gibson, D. Rosen, B. Stucker), Springer New York, New York, NY, **2015**, S. 1–18.
- [59] M. Pagac, J. Hajnys, Q.-P. Ma, L. Jancar, J. Jansa, P. Stefek, J. Mesicek, *Polymers* **2021**, *13*.
- [60] J. Tu, K. Makarian, N. J. Alvarez, G. R. Palmese, *Materials (Basel, Switzerland)* **2020**, *13*.
- [61] H. Quan, T. Zhang, H. Xu, S. Luo, J. Nie, X. Zhu, *Bioactive materials* **2020**, *5*, 110.
- [62] V. S. D. Voet, T. Strating, G. H. M. Schnelting, P. Dijkstra, M. Tietema, J. Xu, A. J. J. Woortman, K. Loos, J. Jager, R. Folkersma, *ACS omega* **2018**, *3*, 1403.
- [63] A. Ribas-Massonis, M. Cicujano, J. Duran, E. Besalú, A. Poater, *Polymers* **2022**, *14*.
- [64] E. Saldívar-Guerra, *Handbook of polymer synthesis, characterization, and processing*, Wiley-Blackwell, Oxford, **2013**.
- [65] K. Matyjaszewski, T. P. Davis, *Handbook of radical polymerization*, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, **2002**.
- [66] B. Baroli, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 491.
- [67] A. Kowalska, J. Sokolowski, K. Bociong, *Polymers* **2021**, *13*.
- [68] J. J. Schwartz, *MRS bulletin* **2022**, *47*, 628.
- [69] G.-T. Kim, H.-B. Go, J.-H. Yu, S.-Y. Yang, K.-M. Kim, S.-H. Choi, J.-S. Kwon, *Polymers* **2022**, *14*.
- [70] A. Bagheri, J. Jin, *ACS Appl. Polym. Mater.* **2019**, *1*, 593.
- [71] L. C. Scorza, U. Simon, M. Wear, A. Zouliatis, S. Dimartino, A. J. McCormick, *Algal Research* **2021**, *55*, 102253.
- [72] P. Chen, Y. Zhou, Q. Li, Q. Xiao, Y. Lun, Y. Huang, G. Ye, *Polymer* **2022**, *255*, 125153.
- [73] A. Boddapati, S. B. Rahane, R. P. Slopek, V. Breedveld, C. L. Henderson, M. A. Grover, *Polymer* **2011**, *52*, 866.
- [74] H. Gong, B. P. Bickham, A. T. Woolley, G. P. Nordin, *Lab on a chip* **2017**, *17*, 2899.
- [75] P. Esfandiari, S. C. Ligon, J. J. Lagref, R. Frantz, Z. Cherkaoui, R. Liska, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2013**, *51*, 4261.
- [76] I. M. Maafa, *Polymers* **2023**, *15*.
- [77] R. L. Truby, J. A. Lewis, *Nature* **2016**, *540*, 371.
- [78] J. R. Tumbleston, D. Shirvanyants, N. Ermoshkin, R. Januszewicz, A. R. Johnson, D. Kelly, K. Chen, R. Pinschmidt, J. P. Rolland, A. Ermoshkin et al., *Science (New York, N.Y.)* **2015**, *347*, 1349.
- [79] H. Gong, M. Beauchamp, S. Perry, A. T. Woolley, G. P. Nordin, *RSC advances* **2015**, *5*, 106621.
- [80] A. I. Shallan, P. Smejkal, M. Corban, R. M. Guijt, M. C. Breadmore, *Analytical chemistry* **2014**, *86*, 3124.
- [81] V. Harinarayana, Y. C. Shin, *Optics & Laser Technology* **2021**, *142*, 107180.
- [82] U. Simon, S. Dimartino, *Journal of chromatography. A* **2019**, *1587*, 119.
- [83] N. P. Macdonald, S. A. Currivan, L. Tedone, B. Paull, *Analytical chemistry* **2017**, *89*, 2457.
- [84] Y. Hinamoto, A. Sugawara, T.-A. Asoh, M. Nandi, H. Uyama, *RSC Appl. Polym.* **2023**.
- [85] C. Fee, S. Dimartino, T. Huber, WO2017103863A1.

- 
- [86] T. Femmer, A. J. Kuehne, J. Torres-Rendon, A. Walther, M. Wessling, *Journal of Membrane Science* **2015**, 478, 12.
- [87] F. Kotz, K. Arnold, W. Bauer, D. Schild, N. Keller, K. Sachsenheimer, T. M. Nargang, C. Richter, D. Helmer, B. E. Rapp, *Nature* **2017**, 544, 337.
- [88] S. Sandron, B. Heery, V. Gupta, D. A. Collins, E. P. Nesterenko, P. N. Nesterenko, M. Talebi, S. Beirne, F. Thompson, G. G. Wallace et al., *The Analyst* **2014**, 139, 6343.
- [89] V. Gupta, M. Talebi, J. Deverell, S. Sandron, P. N. Nesterenko, B. Heery, F. Thompson, S. Beirne, G. G. Wallace, B. Paull, *Analytica chimica acta* **2016**, 910, 84.
- [90] V. Gupta, S. Beirne, P. N. Nesterenko, B. Paull, *Analytical chemistry* **2018**, 90, 1186.
- [91] M. Passamonti, I. L. Bremer, S. H. Nawada, S. A. Currivan, A. F. G. Gargano, P. J. Schoenmakers, *Analytical chemistry* **2020**, 92, 2589.
- [92] F. Wang, P. Altschuh, L. Ratke, H. Zhang, M. Selzer, B. Nestler, *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2019**, 31, e1806733.
- [93] F. Svec, J. M. J. Frechet, *Macromolecules* **1995**, 28, 7580.
- [94] F. R. Mansour, S. Waheed, B. Paull, F. Maya, *Journal of separation science* **2020**, 43, 56.
- [95] E. Poloni, F. Bouville, A. L. Schmid, P. I. Pelissari, V. C. Pandolfelli, M. L. Sousa, E. Tervoort, G. Christidis, V. Shklover, J. Leuthold et al., *Carbon* **2022**, 195, 80.
- [96] F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, 38, 34.
- [97] C. M. Hansen (Hrsg.) *Hansen solubility parameters. A user's handbook*, CRC, Boca Raton, Fla., **2007**.
- [98] S. Venkatram, C. Kim, A. Chandrasekaran, R. Ramprasad, *Journal of chemical information and modeling* **2019**, 59, 4188.
- [99] R. S. Kovylin, V. V. Yudin, M. P. Shurygina, V. B. Fedoseev, S. A. Chesnokov, I. L. Fedushkin, A. V. Piskunov, *Materials (Basel, Switzerland)* **2023**, 16.
- [100] C. Acquah, C. K. S. Moy, M. K. Danquah, C. M. Ongkudon, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2016**, 1015-1016, 121.
- [101] K. B. Lynch, J. Ren, M. A. Beckner, C. He, S. Liu, *Analytica chimica acta* **2019**, 1046, 48.
- [102] Q. Ma, M. Chen, Z.-G. Shi, Y.-Q. Feng, *Journal of separation science* **2009**, 32, 2592.
- [103] Y. Li, H. D. Tolley, M. L. Lee, *Analytical chemistry* **2009**, 81, 4406.
- [104] M. J. Benes, D. Horák, F. Svec, *Journal of separation science* **2005**, 28, 1855.
- [105] J. Nieminen, I. Anugwom, A. Pihlajamäki, M. Mänttari, *Journal of Membrane Science* **2022**, 659, 120786.
- [106] A. Isogai, T. Hänninen, S. Fujisawa, T. Saito, *Progress in Polymer Science* **2018**, 86, 122.
- [107] A. Isogai, T. Saito, H. Fukuzumi, *Nanoscale* **2011**, 3, 71.
- [108] M. R. Schure, R. S. Maier, D. M. Kroll, H. T. Davis, *Journal of chromatography. A* **2004**, 1031, 79.
- [109] A. Gordon, *Development, Functionalisation, and Characterisation of Triply Periodic Minimum Surface Hydrogels for Solid-Tolerant Chromatography*, **2019**.
- [110] M. G. Moleirinho, S. Feast, A. S. Moreira, R. J. Silva, P. M. Alves, M. J. Carrondo, T. Huber, C. Fee, C. Peixoto, *Separation and Purification Technology* **2021**, 254, 117681.
- [111] C. Fee, S. Nawada, S. Dimartino, *Journal of chromatography. A* **2014**, 1333, 18.
- [112] U. Simon, L. C. T. Scorza, S. Teworte, A. J. McCormick, S. Dimartino, *Journal of separation science* **2021**, 44, 1078.

- 
- [113] S. Nawada, T. Budel, *LCGC North America* **2021**, 414.
- [114] S. G. Kazarian, *Polymer Science* **2000**, 42 (1), 78–101.
- [115] O. Al - Ketan, R. K. Abu Al - Rub, *Mat Design & Process Comms* **2020**, 3.
- [116] M.-T. Hsieh, L. Valdevit, *Software Impacts* **2020**, 6, 100026.
- [117] P. Nikolai, B. Rabiyyat, A. Aslan, A. Ilmutdin, *J. Therm. Sci.* **2019**, 28, 394.
- [118] M. M. Ugrankar, G. Krishnamoorthy, B. S. Prabhananda, *J Biosci* **1991**, 16, 21.
- [119] F. Mayer, D. Ryklin, I. Wacker, R. Curticean, M. Čalkovský, A. Niemeyer, Z. Dong, P. A. Levkin, D. Gerthsen, R. R. Schröder et al., *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2020**, 32, e2002044.
- [120] Z. Dong, H. Cui, H. Zhang, F. Wang, X. Zhan, F. Mayer, B. Nestler, M. Wegener, P. A. Levkin, *Nature communications* **2021**, 12, 247.
- [121] U. Shaukat, E. Rossegger, S. Schlögl, *Polymers* **2022**, 14.



---

# 8 Anhang

---

## 8.1 Summary

---

3D printing enables the additive manufacturing of three-dimensional objects based on computer-aided design models by building up materials layer by layer. However, this interesting additive manufacturing method has not yet found any significant application in the production of media for chromatographic separation processes. Bridging the gap between the two topics could revolutionize the field of chromatography by enabling the targeted setting of flow paths in the stationary phase with ordered and precise morphology.

However, since there is a lack of suitable high-resolution materials with sufficient resolution and secondary porosity as well as the necessary surface functionality, that can be processed by additive manufacturing techniques and are suitable for use in chromatography, the aim of the present work was to develop novel stationary phases using the DLP 3D printing process. Considering given specifications such as high chemical and mechanical stability, high reactivity to photoinduced polymerization, possible modifiability and colorlessness of the material, a resin formulation based on 10 mol % PETA, 30 mol % TEGDMA and 60 mol % HEMA was identified in initial preliminary tests. For an effective initiation step at the wavelength of the UV light source of the 3D printer of 385 nm, the initiator TPO was selected with a proportion of 1.25 mol % based on the liquid resin components. To achieve layer thicknesses in the range of 25  $\mu\text{m}$  and thus a high  $z$ -print resolution, a suitable photoabsorber with high absorption at 385 nm had to be found. Since complete removal of the dye was not possible either by extraction with ethanol or acetone in the Soxhlet apparatus, or with supercritical  $\text{CO}_2$ , and continues to have a negative effect on mechanical stability, 0.025 mol % of the colorless optical brightener OB184 was added to optimize the resin formulation.

When 3D printing open-cell grid structures with channel sizes of 100 – 400  $\mu\text{m}$ , this resin composition showed polymerization in unwanted areas in all objects, so the inhibitor BHT was used to optimize the  $xy$ -print resolution. At a target concentration of 5 mol %, open grid structures of 180  $\mu\text{m}$  with an upscaling of the column length from 10 mm to 100 mm as well as gyroid structures of 240  $\mu\text{m}$  with an exposure time of 4 s per layer could be realized. By reorienting the printed objects by 90°, the printing resolution could be increased to open 150  $\mu\text{m}$  grids and 200  $\mu\text{m}$  gyroids. However, microscopic images showed a shrinkage of the structures by 33%, which could be attributed to the cleaning process with isopropanol. By adjusting the structure dimensions, taking into account the shrinkage factor, the desired structure porosity of 50% could be achieved.

After defining the resin composition and determining the pressure parameters of the material, the next step was to functionalize the free hydroxyl groups of the HEMA monomer using TEMPO-mediated oxidation to produce cation exchange chromatography columns. With an

---

ionic capacity of the 400  $\mu\text{m}$  lattice cubes of  $59.2 \mu\text{eq g}^{-1}$ , suitable experimental parameters of 4 h reaction time and a twofold equivalent of oxidation reagents could be determined. For a non-destructive analysis of lattice columns with a length of 100 mm, the analysis of the reacted hydroxyl groups was determined via the application as CEX itself. Here, the lysozyme with affinity towards the carboxylate groups was used as a model protein to determine the dynamic protein binding capacity of the oxidized cation exchangers at pH 5 and a complete protein loading and quantitatively detected at an absorbance of 280 nm. In this case, a significantly higher binding capacity was achieved with  $3.16 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1}_{\text{column}}$  compared to  $0.50 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1}_{\text{column}}$  when the TEMPO oxidation of 300  $\mu\text{m}$  grid columns was carried out continuously. Subsequent observation of the columns revealed a yellow coloration of the material as a result of TEMPO oxidation, the intensity of which correlated with the concentration of the reactants in the reaction solution and the resulting protein binding capacities. Varying the concentration from 0.05-0.53  $\text{mol L}^{-1}$ , it was found that too low concentrations ( $< 0.13 \text{ mol L}^{-1}$ ) also resulted in low protein capacities, while too high concentrations ( $> 0.41 \text{ mol L}^{-1}$ ) resulted in severe discoloration. A compromise between sufficient performance and low discoloration was found at a concentration of  $0.31 \text{ mol L}^{-1}$  with a binding capacity of  $4.42 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1}_{\text{column}}$  and negligible discoloration of the material. SEM images of the oxidized material continued to show surface roughening due to oxidation, but this did not penetrate the interior of the structure.

In addition, an irreversible decrease in the protein binding capacity was observed in the successive determinations. The maximum binding capacity of  $5.40 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1}_{\text{column}}$  achieved with a 200  $\mu\text{m}$  grid column showed a capacity loss of about 89% with only  $0.60 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1}_{\text{column}}$  in the sixth DBC measurement. When investigating possible factors influencing the capacity loss, both basic and acidic hydrolysis of the material could be ruled out. However, it was found that acidic treatment of the material after TEMPO oxidation was essential to ensure complete removal of impurities by the TEMPO reagents. Also, the solution in which the columns were stored showed no effect on the capacity decrease, which showed the same trend when stored in acetate buffer, in water, in 20% ethanol and DPGME. Furthermore, no components leaking from the material were detected during the DBC measurements and a titration of the carboxylate groups before the DBC measurements and after the capacity decrease showed no change in the ligand density in the material with 59 and  $65 \mu\text{eq}_{\text{COOH}} \text{ g}^{-1}_{\text{column}}$ , respectively.

Since the 3D-printed columns had surface areas of only a few  $\text{cm}^2$  and a high hydroxyl group density with 60 mol-% HEMA, a possible change in porosity due to swelling processes of the material was investigated as the last possible factor influencing the capacity decrease. For this purpose, in addition to the structural porosity of the columns in the form of the lattice structure, material porosity was also introduced into the chromatography columns via the PIPS using 33% ( $\text{g g}^{-1}$ ) PPG1200 as porogen. This generated pores in the range of 50 – 500 nm and increased the surface area of the material to  $\sim 13 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . After TEMPO oxidation, the 300  $\mu\text{m}$  porogen grid columns exhibited a protein binding capacity of  $33.10 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ g}^{-1}_{\text{column}}$  and  $2.5 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$ , respectively, which remained constant throughout all six measurements. Thus, a stable binding capacity was successfully realized in the 3D-printed stationary phase.

The aim was to develop novel stationary phases using the photo-based 3D printing process. A comparison of the dynamic protein binding capacity with established chromatography systems revealed that the 3D-printed porogen lattice columns with  $2.5 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$  have a 56% higher

---

capacity compared to TEMPO-oxidized commercial particles ( $1.6 \text{ mg}_{\text{Lys}} \text{ m}^{-2}$ ). Overall, a chromatographic system has been realized that is comparable in performance to the established particle and membrane-based systems and at the same time combines these with the numerous advantages of additive manufacturing. The newly developed chromatography material using DLP technology thus represents an attractive addition to the stationary phases already available. Especially since the requirements for chromatographic materials are in a constant state of change and thus there is a need for fast and easy prototyping of defined and ordered structures depending on the application, which is made possible by additive manufacturing technology.

## 8.2 Materialien

Material	Hersteller	Reinheit
Aceton	Sigma-Aldrich	-
2,2'-Azobis(2-Methylpropionitril) (AIBN)	Sigma-Aldrich	≥ 99,8%
2,5-Bis(5-tert-butyl-benzoxazol-2-yl)thiophen (OB184)	Sartomer	-
BV-007A	MiiCraft	-
Clear V4 Photopolymer	Formlabs	-
Coumarin 153	Sigma-Aldrich	99%
Cyclohexanol	Sigma Aldrich	99%
1-Decanol	Sigma Aldrich	98%
2,4-Dihydroxybenzophenon (Speedblock UV-0)	Sartomer	-
Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid (TPO)	Merck Life Science	97%
Dipropylenglykolmonomethylether (DPGME)	Sigma-Aldrich	
Di(propylenglykol)methyletheracetat	Sigma Aldrich	99%
2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT)	Merck Life Science	≥ 99%
1-Dodecanol	Sigma Aldrich	98%
Essigsäure 1 M	Merck Life Science	-
Ethanol	Merck Life Science	≥ 99,9%
Ethyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phenylphosphinat (TPO-L)	Sartomer	-
Ethylenglykolphenylethermethacrylat (PEMA)	Sigma Aldrich	-
2-Ethylhexylacetat	Sigma Aldrich	-
Hexan	VWR	-
2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)	Merck Life Science	≥ 97%
2-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)-benzotriazol (BTC01)	Sartomer	-
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich	> 90%
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	> 99%
Natriumacetat	Merck Life Science	≥ 99%
Natriumbromid	Alfa Aesar	> 99%
Natriumchlorid	Merck Life Science	≥ 99,5%
Natriumhydroxidlösung 0,01 M	Merck Life Science	-
Natriumhydroxidlösung 1 M	Merck Life Science	-
Natriumhypochlorid 14% Aktivchlor	VWR	-
2-Nitrodiphenylsulfid	ABCR	98%
Pentaerythritetraacrylat (PETA)	Sigma-Aldrich	60 – 90%
1-Phenylazo-2-naphthol (Sudan I)	Sigma-Aldrich	≥ 95%
Phenylbis(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid (BAPO)	Merck Life Science	97%
Polyethylenglykol 200 (PEG 200)	Sigma Aldrich	-
Polypropylenglykol 1200 (PPG-1200)	Thermo Fisher Scientific	-
1,2-Propandiol	Sigma Aldrich	-
2-Propanol	Merck Life Science	≥ 99,8%
Resinaway	Monocure 3D	-
Salzsäure 0,5 M	Merck Life Science	-
2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO)	Sigma-Aldrich	98%
Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA)	Sigma-Aldrich	95%
Tri(propylenglykol)butylether	Sartomer	

## 8.3 Ergebnisse und Diskussion

### Spannungs-Dehnungs-Diagramme

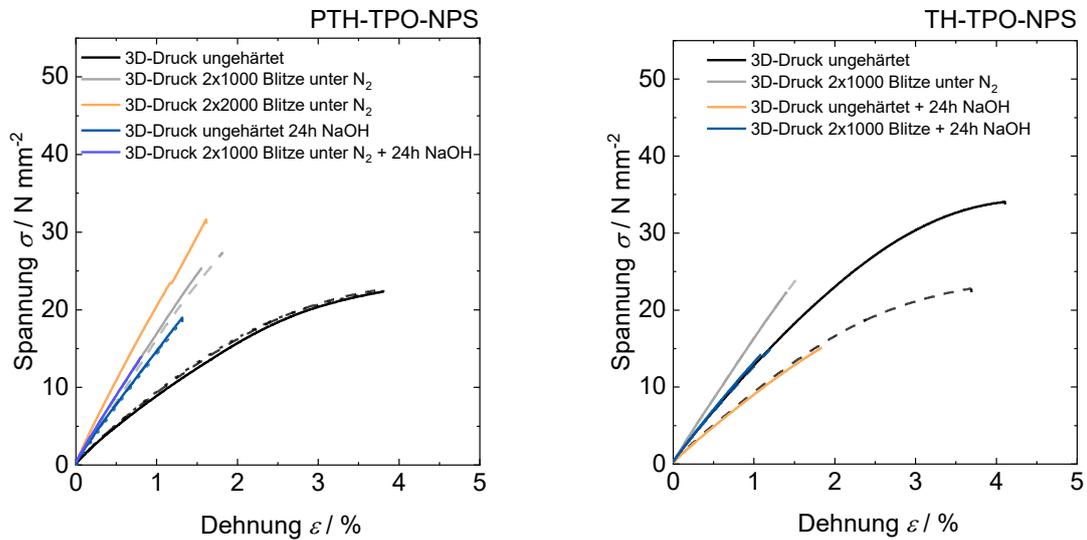


Abbildung 8.1: Dehnungskurven von PTH-TPO und TH-TPO mit NPS.

### UV-Vis-Spektren

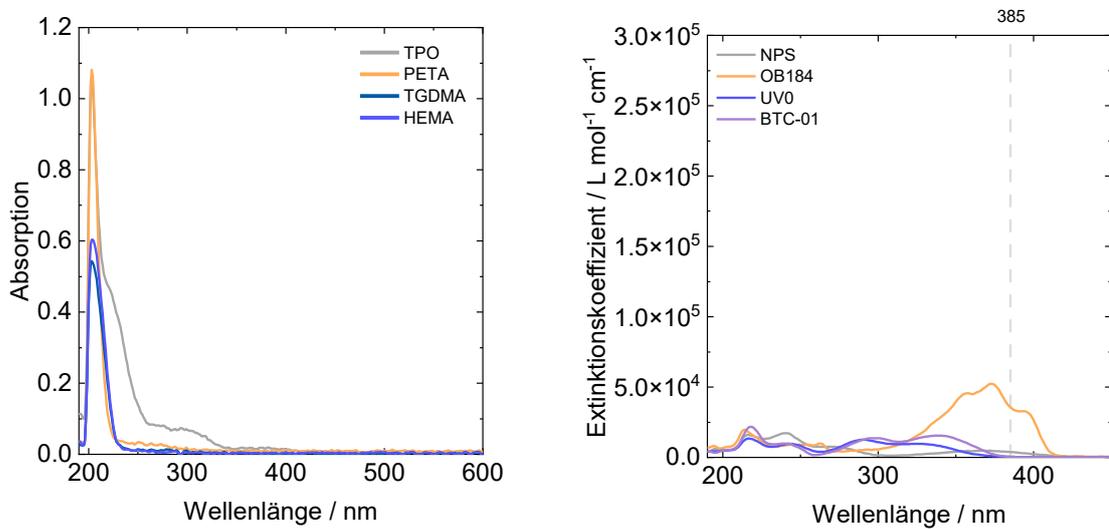


Abbildung 8.2: Links: UV-Spektren der Quervernetzer PETA sowie TEGDMA, des Monomers HEMA und des Photoinitiators TPO. Rechts: UV-Spektren verschiedener Photoabsorber.

## Schichtdickenmessung der *One-Piece-Tests*

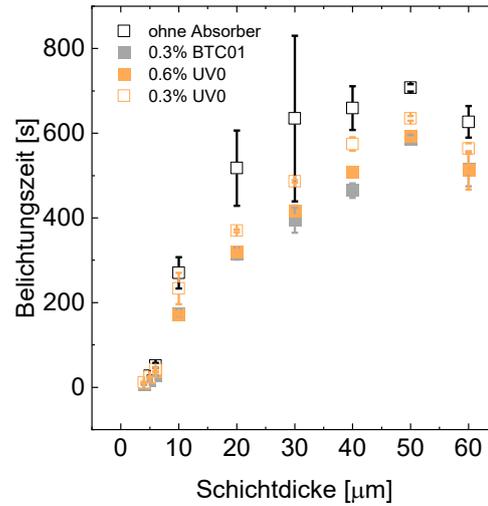


Abbildung 8.3: OPT-Ergebnisse mit der Schichtdicke als Funktion der Belichtungszeit des PTH-Harzes mit BTC01 und UV0 als Photoabsorber.

## Thermische Beständigkeit

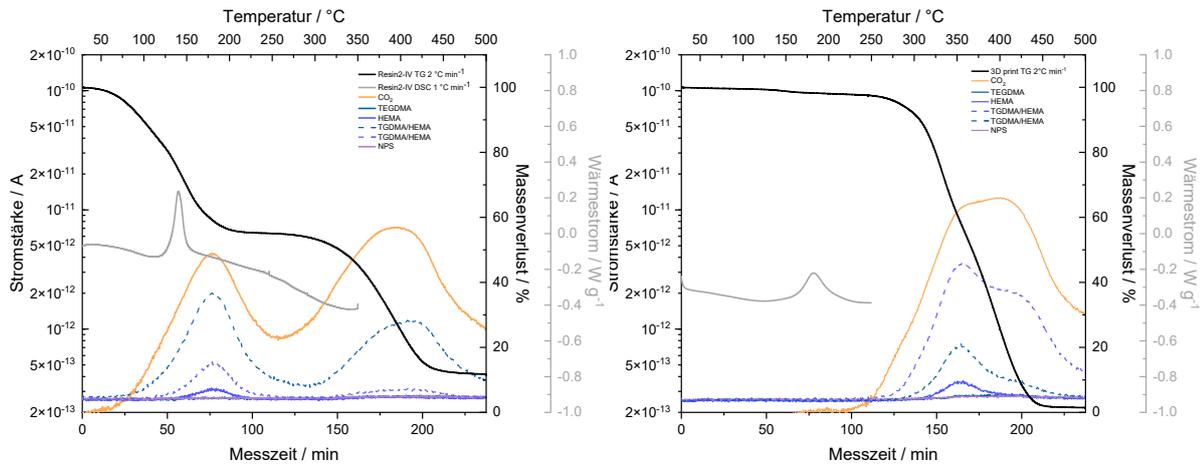


Abbildung 8.4: TG-MS und DSC Ergebnisse vom reinen Harz (links) sowie dem damit gedruckten Objekt (rechts) zur Betrachtung der Temperaturstabilität. Abbau des 3D-gedruckten Polymers findet ab 300 °C in einem einstufigen Prozess statt.

## Druckauflösungsversuche

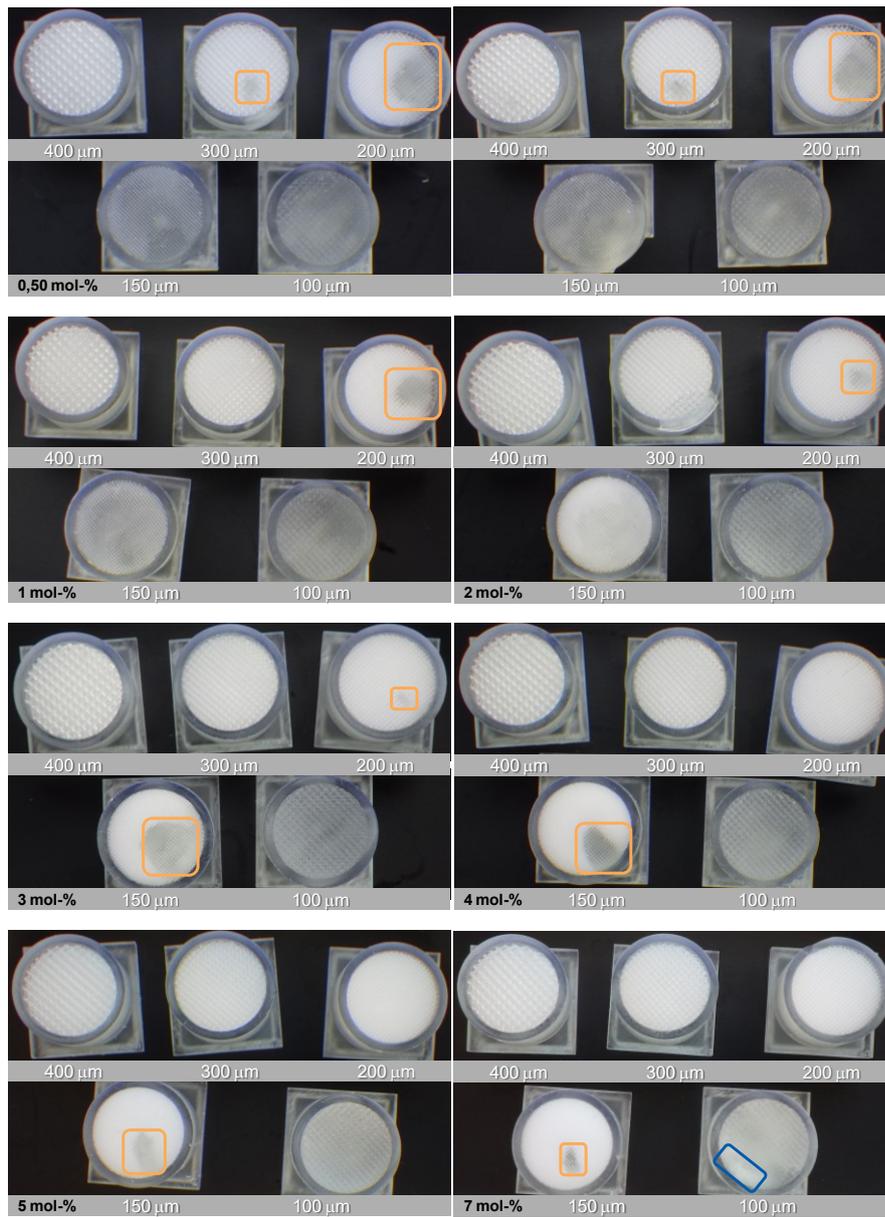


Abbildung 8.5: Druckauflösungsergebnisse mit der Gitterstruktur mit 100 bis 400 μm Kanälen und einer BHT Konzentration von 0,25 mol-%.

## Mikroskopieaufnahmen der Lösungsmittelreihe zur Betrachtung der Gitterstrukturschrumpfung

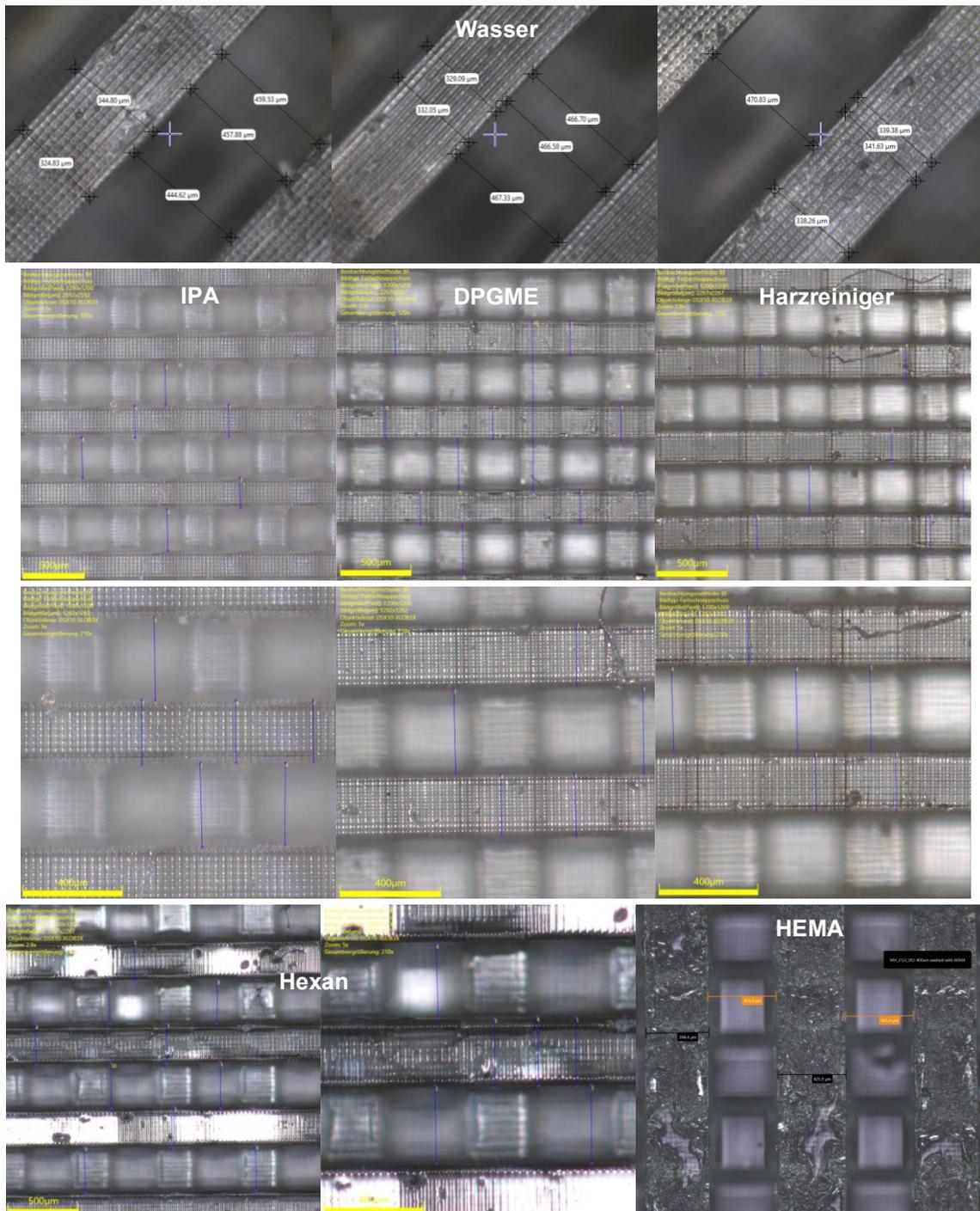


Abbildung 8.6: Mikroskopieaufnahmen der Gitterstruktur gewaschen mit Wasser, IPA, DPGME, einem Harzreiniger, Hexan und HEMA.

## REM-Aufnahmen

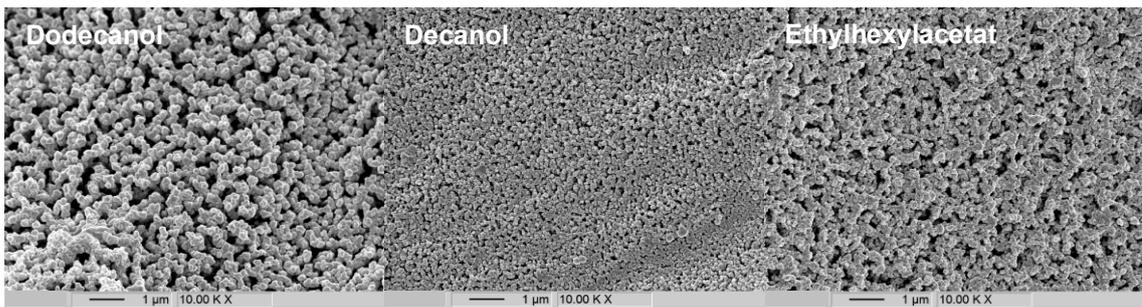


Abbildung 8.7: REM-Aufnahmen der Proben vom Porogenscreening im einfachen Aufbau.

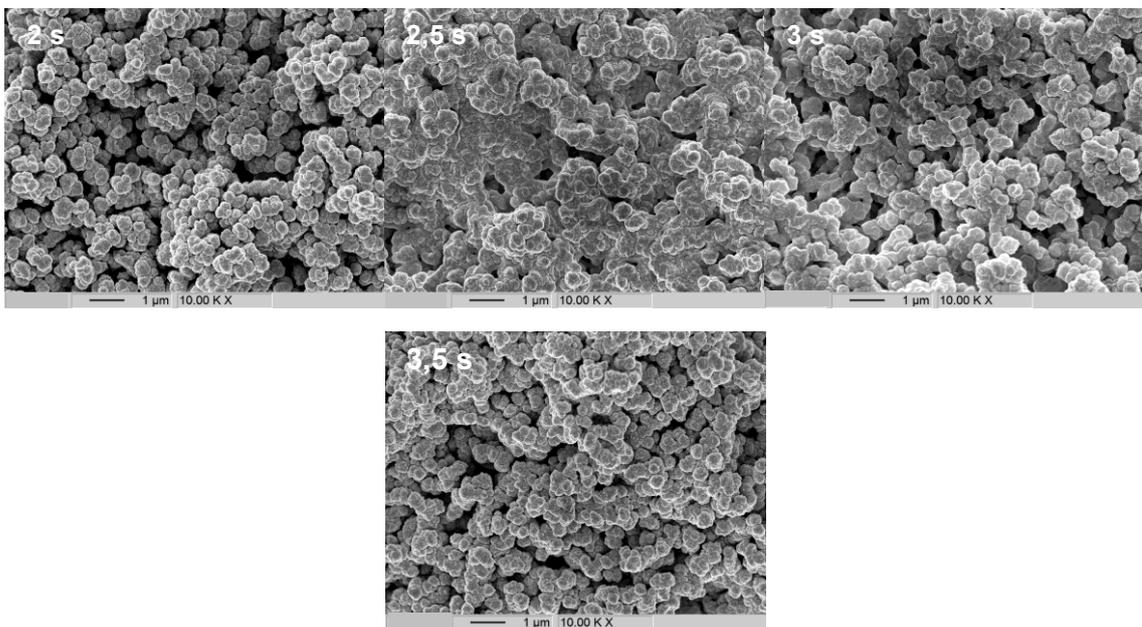


Abbildung 8.8: REM-Aufnahmen der im *Hyper-50Y* gedruckten Probe des PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT-33%PPG1200-Harzes mit der Variation der Belichtungszeit von 2 s bis 3,5 s.

## Hg-Porosimetrie

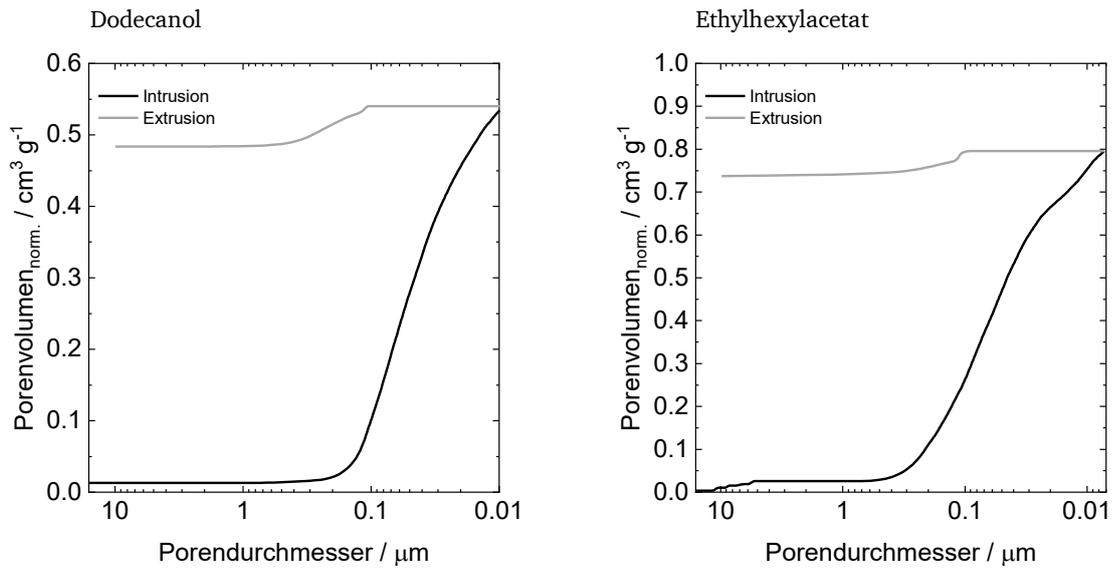


Abbildung 8.9: Hg-Porosimetrie Porengrößenverteilung mit im einfachen Aufbau ausgehärteten Polymerproben mit 33% Dodecanol und Ethylhexylacetat als Porogen in der PTH-1,25TPO-0,025OB-5BHT Harzformulierung.

---

## 8.4 Erklärungen

---

### **§8 Abs. 1 lit. c der Promotionsordnung der TU Darmstadt**

Ich versichere hiermit, dass die elektronische Version meiner Dissertation mit der schriftlichen Version übereinstimmt und für die Durchführung des Promotionsverfahrens vorliegt.

### **§8 Abs. 1 lit. d der Promotionsordnung der TU Darmstadt**

Ich versichere hiermit, dass zu einem vorherigen Zeitpunkt noch keine Promotion versucht wurde und zu keinem früheren Zeitpunkt an einer in- oder ausländischen Hochschule eingereicht wurde. In diesem Fall sind nähere Angaben über Zeitpunkt, Hochschule, Dissertationsthema und Ergebnis dieses Versuchs mitzuteilen.

### **§9 Abs. 1 der Promotionsordnung der TU Darmstadt**

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen verfasst wurde.

### **§9 Abs. 2 der Promotionsordnung der TU Darmstadt**

Die Arbeit hat bisher noch nicht zu Prüfungszwecken gedient.

Darmstadt, den .....

-----  
(Name und Unterschrift)