



Universität Ulm
Abteilung Organische Chemie III
Makromolekulare Chemie
und Organische Materialien



Funktionalisierte fluoreszierende und magnetische Polymernanopartikel für biomedizinische Anwendungen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von

Verena Holzapfel
aus Ulm an der Donau

Ulm im Jahre 2006

Amtierender Dekan

Herr Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

1. Gutachterin

Frau Prof. Dr. Katharina Landfester

2. Gutachter

Frau Prof. Dr. Nicola Hüsing

Tag der Promotion

28. November 2006

Quidquid agis, prudenter agas et repice finem.

(gesta romanorum, c. 103)

Mensch, was Du tust, bedenk das End, das wird die höchst Weisheit genennt.

Hans Sachs, 1557

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1	Einleitung	1
Kapitel 2	Theorie und Grundlagen	5
2.1	Heterophasensysteme	5
2.1.1	Emulsionen	5
2.1.2	Miniemulsionen	8
2.1.2.1	Brechen von Emulsionen	8
2.1.2.2	Präparation von Miniemulsionen	10
2.2	Radikalische Polymerisation	13
2.2.1	Kinetik der radikalische Emulsionspolymerisation	15
2.2.2	Kinetik der radikalische Miniemulsionspolymerisation	18
2.2.3	Nukleationsmechanismen	18
2.3	Polyaddition	20
2.4	Verkapselung in Polymeren	25
2.5	Einsatz von Nanopartikeln in der Medizin	27
2.5.1	Fluoreszierende Polymernanopartikel in der Medizin	27
2.5.2	Magnetitnanopartikel in der Medizin	27
2.5.2.1	Magnetresonanztomographie (MRT)	29
2.5.2.2	Hyperthermie	30
2.5.3	Funktionalisierung von Polymeren für biomedizinische Anwendungen ..	30
2.6	Magnetismus	33
2.6.1	Magnetische Eigenschaften der Materie	34
2.6.1.1	Diamagnetismus	34
2.6.1.2	Paramagnetismus	34

2.6.1.3	Ferromagnetismus, Antiferromagnetismus und Ferrimagnetismus.	35
2.6.1.4	Superparamagnetismus	37
Kapitel 3	Messmethoden	39
3.1	Dynamische Lichtstreuung	39
3.2	Transmissionselektronenmikroskopie	41
3.3	Oberflächenladungsbestimmung	43
3.3.1	ζ -Potentialmessungen	43
3.3.2	Partikelladungsdetektion	44
3.4	SQUID-Messungen	46
Kapitel 4	Ergebnisse und Diskussion	49
4.1	Fluoreszierende Polystyrol-Nanopartikel	49
4.1.1	Fluoreszierende Poly(Styrol-co-Acrylsäure)-Nanopartikel.	50
4.1.2	Fluoreszierende Poly(Styrol-co-Glycidylmethacrylat)-Nanopartikel	59
4.2	Magnetische Polystyrol-Nanopartikel	65
4.2.1	Magnetit-Nanopartikel und gezielte Aggregatbildung	66
4.2.2	Veränderung des Magnetit-Gehalts in magnetischen Polystyrolpartikeln	69
4.2.3	Veränderung der Oberflächenfunktionalisierung	71
4.2.3.1	Carboxylfunktionalisierte magnetische Polystyrolpartikel	72
4.2.3.2	Glycidylfunktionalisierte magnetische Polystyrolpartikel	83
4.2.4	Verkapselung von Magnetitnanokristallen	84
4.3	Modifizierung der Teilchenoberfläche	90
4.3.1	Modifizierung der carboxylierten Teilchen.	91
4.3.2	Modifizierung der glycidylfunktionalisierten Teilchen.	101
4.4	Verkapselung von Magnetit-Nanopartikeln in Polymeren aus Polyadditionsreaktionen	103
4.4.1	Verkapselung von Magnetit in Polyurethan	103
4.4.2	Verkapselung von Magnetit in Epoxidharzen	107
Kapitel 5	Zusammenfassung	117
Kapitel 6	Summary	121
Kapitel 7	Experimenteller Teil.	125
7.1	Fluoreszierende Polystyrol-Nanopartikel	125
7.1.1	Carboxylfunktionalisierte Polystyrol-Nanopartikel	125
7.1.2	Glycidylfunktionalisierte fluoreszierende Polystyrol-Nanopartikel	127
7.2	Magnetit-Miniemulsionen	128

7.2.1	Ausfällen von hydrophobisierten Magnetit-Nanopartikeln	128
7.2.2	Herstellung der Magnetit-Miniemulsionen	128
7.3	Verkapselung von Magnetit-Nanopartikeln in Poly(Styrol-co-Acrylsäure)	129
7.3.1	Magnetische Polystyrol-Nanopartikel	129
7.3.2	Fluoreszierende magnetische Polystyrol-Nanopartikel	130
7.4	Verkapselung von Magnetit-Nanopartikeln in Poly(Styrol-co-Glycidylmethacrylat).	131
7.5	Synthese und Verkapselung von Magnetitnanokristallen	132
7.5.1	Ausfällen von Fe(III)oleat	132
7.5.2	Fällung der Magnetitnanokristalle	132
7.5.3	Herstellung der Magnetit-Miniemulsion VH-Mag30	132
7.5.4	Verkapselung in Poly(Styrol-co-Acrylsäure)	133
7.6	Magnetische Polyurethan-Nanopartikeln.	133
7.7	Epoxidharz-Nanopartikeln	133
7.8	Magnetische Epoxidharz-Nanopartikel	134
7.9	Modifizierung der Oberfläche von verschiedenen Polystyrol-Nanopartikeln	134
7.9.1	Modifizierung der Oberfläche von carboxyfunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln	134
7.9.1.1	Kopplung von Aminosäuren	134
7.9.1.2	Kopplung von Antikörpern	135
7.9.2	Modifizierung der Oberfläche von glycidylfunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln	135
Kapitel 8	Anhang	137
8.1	Geräte und Methoden	137
8.2	Abkürzungen, Chemikalien	140
8.3	Abkürzungen, allgemein	141
8.4	Symbole	142

Kapitel 9	Literatur	145
	Danksagung.....	153
	Lebenslauf.....	155
	Publikationen	157
	Erklärung	159

Jeder Schritt führt näher zum Ziel. Das gilt auch für Rückschritte.

Ernst Jünger

Das Phänomen Magnetismus beschäftigt die Menschen seit Tausenden von Jahren. Schon die Ägypter vertrauten vor 2000 Jahren auf die Heilkraft magnetischer Steine. 800 v. Chr. wurde zum ersten Mal das Wort „Magnet“ in griechischen Schriften erwähnt, der Ursprung des Wortes blieb aber zunächst unbekannt. Plinius der Ältere schrieb 50 v. Chr. in „Naturalis Historia“, dem Vorläufer der Enzyklopädie, von dem Hirten Magnes, der in der Provinz Magnesia den Magnetismus entdeckte, daß „dessen genagelte Schuhe an einem magnetischen Felde hafteten, als er seine Herde hütete.“ Die Begriffe „Magnet“ und „Magnetismus“ werden auf den Namen des Schäfers und der Provinz zurückgeführt. 300 v. Chr. wurden in China metallene Löffel verwendet, die frei drehbar auf einer Holzscheibe angebracht waren und sich nach Süden ausrichteten. Dieser Kompaß ist noch heute bekannt, allerdings nutzten ihn die Chinesen nicht zur Navigation, sondern für ihre Architektur, um die Gebäude auszurichten. Unser heutiger Kompaß tauchte in einer frühen Form zum ersten Mal um das Jahr 1200 n. Chr. auf. In der Neuzeit wurden einige Experimente mit Magneten durchgeführt, so wurde im 13. Jahrhundert entdeckt, daß selbst ein runder Magnet zwei Pole hat, im 17. Jahrhundert wurde zum ersten Mal die Erde als ein großer Magnet beschrieben. Dennoch dauerte es bis zum Anfang des 19. Jahrhunderts, bis man anfang, den Magnetismus zu verstehen. 1819 entdeckte Oersted eher zufällig die Ablenkung einer Kompaßnadel durch ein elektrisches Feld. Faraday wiederholte die Versuche und erweiterte sie, bis er am 29. August 1831 den Effekt der elektromagnetischen Induktion entdeckte, ohne mathematisches Hintergrundwissen zu besitzen.^[1] Maxwell formulierte hierzu die Maxwell-Gleichungen. Elektrizität erzeugt Magnetismus, elektrischer Strom induziert ein Magnetfeld und umgekehrt.^[2]

Obwohl der Magnetismus heute verstanden ist, hat er dennoch für die meisten Menschen etwas Mysteriöses, Geheimnisvolles. Und so verwundert es nicht, daß magnetischem Gestein seit dem Mittelalter die Fähigkeit zugeschrieben wird, Schmerzen und Unwohlsein aus dem

Körper zu ziehen. Auch heute noch bieten naturheilkundlich orientierte Ärzte die Magnetfeldtherapie an. Vor allem Menschen mit Schmerzen vertrauen auf magnetische Halsketten, Armbänder oder Bandagen. Diese sollen den gestörten Energiefluß des Körpers wieder normalisieren. Die Schwingungen von Zellen sollen normalisiert werden, die Heilung von rheumatischen Krankheiten, Rückenschmerzen, Knochenwachstums- und Durchblutungsstörungen, Asthma, Migräne und sogar Depressionen soll gefördert werden. Der Effekt ist jedoch bisher nicht wissenschaftlich erwiesen.

Auch im täglichen Leben spielt der Magnetismus eine wichtige Rolle: Vögel,^[3] Bienen^[4] und Fische^[5] nutzen Magnetit zur Orientierung im Erdmagnetfeld. Magneten finden sich nicht nur im schon erwähnten Kompaß, sondern in der Kühlschrankschraube, in der Türklingel, auf der Kreditkarte, im Telefon, im Fernseher, im Computer, in Stereolautsprechern und im Auto. In Krankenhäusern werden Patienten mit Kernspintomographen untersucht, deren Wirkungsweise auf dem Magnetismus von Atomen beruht.

Spätestens seit dem Ausspruch von Richard P. Feynman „There’s plenty of room at the bottom“^[6] ist klar, daß die Forschung und Entwicklung im Bereich der Nanowissenschaften nicht ruht. Die Nanotechnologie bietet eine Vielzahl neuer Anwendungsmöglichkeiten, auch für Magneten. Ferrofluide bieten interessante neue Eigenschaften. Unter Ferrofluiden versteht man Suspensionen aus ferromagnetischen Nanopartikeln. Sie können durch Einwirkung eines Magnetfelds hochviskos werden und Drehdurchführungen abdichten, oder sie können als magnetische Bremsen wirken.

Zunehmend bedeutender werden magnetische Nanopartikel im biomedizinischen Bereich.^[7]^[10] Aufgrund ihrer Größe sind sie vielfältig einsetzbar und können Zellmembranen durchdringen. Für die Diagnostik werden sie schon verwendet: Mit Hilfe der magnetischen Partikel in den Zellen können diese mit einem einfachen Magneten von Zellen ohne Partikel abgetrennt werden. Für die Kernspintomographie sind Ferrofluide aus Magnetit entwickelt worden. Sie können aufgrund ihres Magnetismus die Kontraste in den Abbildungen erhöhen und sind, ausgestattet mit einer biopolymeren Hülle, biokompatibel. Die hierfür verwendeten Magnetitpartikel werden SPION genannt, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles.

Noch in der Grundlagenforschung steckt die Anwendung der Ferrofluide in der Tumorbehandlung. Aufgrund ihrer superparamagnetischen Eigenschaften werden Magnetitnanopartikel in einem magnetischen Wechselfeld aufgeheizt und sollten in der Lage sein, durch diese Wärmeproduktion Tumorzellen zu zerstören. Probleme bereitet die Gefahr der Agglomeration hydrophil umhüllter Teilchen, was eine Thrombose zur Folge hätte,^[11] und die Menge, die für effektive Hyperthermie im menschlichen Körper benötigt würde. Dennoch ist Magnetit das Material der Wahl für biomedizinische Anwendungen, da es weder im

Tierversuch noch im menschlichen Patienten toxisch wirkt,^{[12]-[14]} biokompatibel ist, und nach dem Abbau zu elementarem Eisen in den Eisenpool des Körpers überführt wird.

Ziel ist es, daß magnetische Nanopartikel ihren Weg im Körper alleine finden können. Sie sollen maligne Zellen aufspüren und in sie eindringen, damit diese im Rahmen der Hyperthermie zerstört werden können. Hierbei werden die Nanopartikel in Tumorzellen eingebracht und der Körper dann einem magnetischen Wechselfeld ausgesetzt. Dabei erhitzen die magnetischen Nanopartikel ihre Umgebung und zerstören so den Tumor. Idealerweise tragen die Nanopartikel zusätzlich noch Medikamente wie Chemotherapeutika, die sie direkt am Tumor freisetzen. Hierdurch würden gezielt die Tumorzellen zerstört, ohne gesunde Zellen negativ zu beeinflussen.

Es gilt nun, die Stabilität der einzusetzenden Magnetitnanopartikel zu erhöhen, und ihre Oberfläche so zu gestalten, daß sie nur in bestimmte Zellen aufgenommen werden. In der vorliegenden Dissertation wird die Verkapselung von Magnetitnanopartikeln in Polymeren und deren Funktionalisierung beschrieben. Diese Verkapselung dient dazu, die Umhüllung der Partikel hydrophober zu gestalten als die bisher in kommerziellen Magnetitsuspensionen eingesetzten Hüllen. Dadurch wird gewährleistet, daß die Hülle nicht abgewaschen wird. Durch die Wahl der Polymere ist es möglich, die vorfunktionalisierte Oberfläche weiter zu funktionalisieren (Endfunktionalisierung) und Proteine anzubinden, die von biomedizinischem Interesse sind. Die hier für die Verkapselung vorgestellten Polymere sind Polystyrol, Polyurethan und Epoxidharze. Da Polystyrol keinerlei funktionelle Gruppen trägt, sollen diese durch Copolymerisation mit verschiedenen Anteilen an Acrylsäure und Glycidylmethacrylat eingeführt werden, wodurch vorfunktionalisierte Partikel erhalten werden. Die Anbindung von einfachen Aminosäuren und komplexeren Proteinen, die Endfunktionalisierung, wird vorgenommen, und der Einfluß der Oberflächenladung und der Endfunktionalisierung auf die Zellaufnahme in verschiedene Zelllinien untersucht. Hierfür wurden zunächst Modellpartikel aus funktionalisiertem Polystyrol hergestellt und getestet. Zur Detektion tragen diese einen Fluoreszenzfarbstoff. Dieser Farbstoff wird auch bei der Verkapselung von Magnetit in Polymer eingesetzt. Dadurch werden diese magnetischen Polymerpartikel zu zweifach markierten Partikeln. Sie tragen eine Fluoreszenzfunktion für die Detektion und eine Magnetit-Funktion für Magnetresonanztomographie- oder Hyperthermie-Anwendungen oder Anwendung in der gezielten Wirkstofffreisetzung.

THEORIE UND GRUNDLAGEN

Es gibt nichts praktischeres als eine gute Theorie.

Immanuel Kant

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen zum besseren Verständnis der Arbeit vorgestellt. Insbesondere wird auf den Miniemulsionsprozess und die Miniemulsionspolymerisation sowie die Grundlagen des Magnetismus eingegangen. Außerdem wird ein Überblick über die Anwendung von Nanopartikeln in der Medizin gegeben.

2.1 Heterophasensysteme

Heterophasen-Systeme bestehen aus zwei Komponenten, die nicht miteinander mischbar sind. Eine Komponente (disperse Phase) ist in der anderen Komponente (kontinuierliche Phase) verteilt, oft wird das Gemisch durch ein Dispergiermittel stabilisiert. Beide Komponenten können unterschiedliche Aggregatzustände haben: In Nebel sind Flüssigkeitströpfchen in Gas verteilt, in Schäumen sind Gasbläschen in einer Flüssigkeit stabilisiert, Milch besteht aus zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten, Rauch oder Deodorants aus festen Teilchen, die in Gas verteilt sind.

Systeme mit einer flüssigen kontinuierlichen Phase und einer flüssigen oder festen dispersen Phase nennt man Dispersionen. Hier wird noch unterschieden in Suspensionen, in denen eine feste Phase dispergiert ist, und Emulsionen, in denen eine flüssige Phase dispergiert ist.

2.1.1 Emulsionen

Emulsionen sind metastabile heterogene Systeme, bestehend aus zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten. Kleine Tröpfchen der einen Flüssigkeit (dispergierte Phase) sind in der zweiten Flüssigkeit (kontinuierliche Phase) verteilt. Die Verteilung der Tröpfchen kann durch

Schütteln, Rühren oder auch Ultraschall erreicht werden. Durch ein Dispergiermittel, das Tensid, wird die Entmischung der beiden Phasen, das Zusammenfließen der dispergierten Tröpfchen, kinetisch gehemmt. Je nachdem, welche Komponente die kontinuierliche Phase bildet, spricht man von direkten (Öl-in-Wasser-, O/W-) Emulsionen oder inversen (Wasser-in-Öl-, W/O-) Emulsionen. Außerdem können Emulsionen weiter in Makro-, Mikro- und Miniemulsionen unterteilt werden. Sie unterscheiden sich in Tröpfchengröße, Thermodynamik und Herstellung.

In Makroemulsionen, den konventionellen Emulsionen, wird die dispergierte Phase durch Rühren in der kontinuierlichen Phase verteilt. Durch Zugabe von Tensiden wird die Stabilität der Emulsion erhöht. Die Größe der Tröpfchen ist nicht einheitlich, und die Tensidkonzentration ist so hoch, daß noch Tensidmizellen in Lösung vorliegen. Makroemulsionen sind im Allgemeinen nicht stabil und brechen innerhalb kurzer Zeit. Die Tröpfchengröße in Makroemulsionen kann zwischen 100 nm und mehreren μm betragen.

Mikroemulsionen enthalten soviel Tensid (Konzentration weit oberhalb der cmc, der „critical micelle concentration“), daß die Grenzflächenspannung zwischen beiden Phasen minimal wird. Daher bilden sich Mikroemulsionen spontan aus und sind thermodynamisch stabil. Die Tröpfchengröße in Mikroemulsion beträgt zwischen 1 und 100 nm, und sie sind oft nur schwach lichtstreuend, wodurch Mikroemulsionen häufig transparent erscheinen. Neben Tensid enthalten sie häufig noch ein Cotensid. Cotenside bilden selbst keine Mizellen, sie sind oberflächenaktive Substanzen, die zusammen mit Tensiden die Oberflächenspannung weiter herabsetzen. Üblicherweise werden Alkohole mittlerer Kettenlänge als Cotenside in Mikroemulsionen eingesetzt.

Bei Miniemulsionen handelt es sich um Systeme, die nur wenig Tensid enthalten. Die Stabilität wird durch Zugabe eines in der dispergierten Phase gut, in der kontinuierlichen Phase sehr schlecht löslichen Reagenzes erreicht. Dieses Reagenz ist in normalen Miniemulsionen ein Hydrophob, wie zum Beispiel langkettige Alkane, in inversen Miniemulsionen werden Lipophobe eingesetzt, zum Beispiel Zucker oder Salze. Die dispergierten Tröpfchen werden nach intensivem Rühren durch zusätzlichen Energieeintrag wie zum Beispiel Ultraschall verkleinert und homogenisiert. Dadurch werden Tröpfchengrößen im Bereich von 50 bis 500 nm sowie eine hohe Stabilität erreicht (siehe auch Kapitel 2.1.2).

Tenside oder auch Emulgatoren nennt man Stoffe, die die Oberflächenspannung von Wasser herabsetzen. Ihre Grenzflächenaktivität beruht auf ihrer Struktur: Sie sind amphiphile Moleküle, das heißt, sie tragen sowohl polare als auch unpolare Gruppen. Tenside lassen sich in ionische und nichtionische Tenside unterteilen, die ionischen weiter in anionische und kationische. Nichtionische Tenside bestehen zum Beispiel aus einer Kohlenstoffkette als hydrophobem Teil und einigen Ethylenoxid-Einheiten als hydrophilem Teil. Ein Vertreter dieser Gruppe ist Lutensol AT 50, das auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Lutensol ist ein

Polyethylenoxid-Hexadecylether oder Polyethylenoxid-Octadecylether mit 50 Ethylenoxid-Einheiten. Nichtionische Tenside stabilisieren eine Emulsion sterisch: Die Polymerketten durchdringen sich nicht, daher können sich die Tröpfchen nicht annähern.

Ionische Tenside bestehen aus einer Kohlenstoffkette, die einen ionischen Kopf trägt. Typische Vertreter sind das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) und das kationische Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB, Cetyltrimethylammoniumbromid). Ionische Tenside werden für direkte Emulsionen verwendet, die Kohlenstoffkette ist in den Öltröpfchen gelöst, die ionische Gruppe ragt in das Wasser. Die elektrostatische Stabilisierung durch ionische Tenside ist in der DLVO-Theorie von *Derjaguin, Landau, Verveij* und *Overbeek* beschrieben.^{[15],[16]} Die Coulomb-Abstoßung zwischen den ionischen Gruppen bewirkt die Stabilisierung der Emulsion. Das Gesamtpotential V setzt sich aus den Termen des Abstoßungspotentials (elektrostatische Abstoßung), des Anziehungspotentials (*van der Waals*-Anziehung) und der Kernabstoßung (*Born*-Abstoßung) zusammen. Hieraus resultiert der in Abbildung 2.1 dargestellte Potentialverlauf.

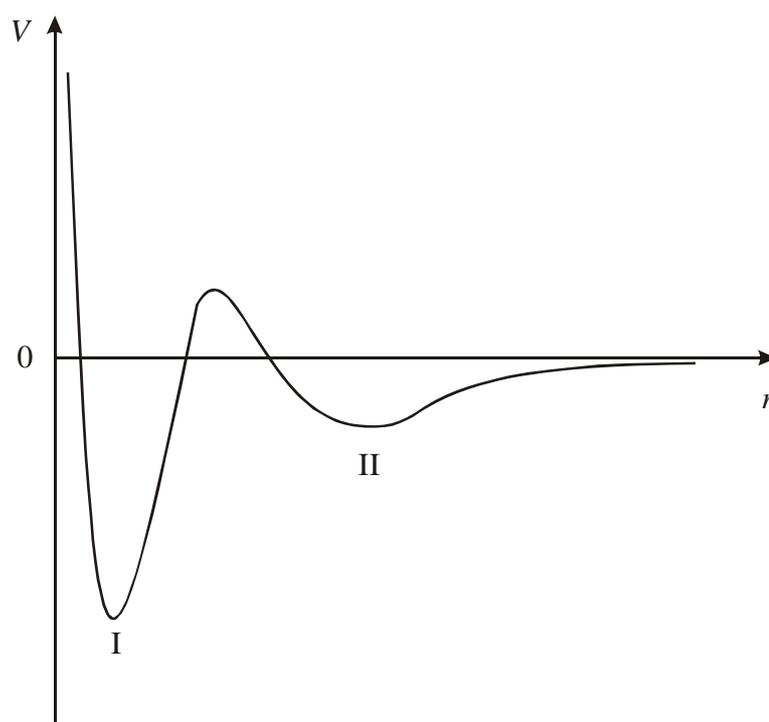


Abbildung 2.1 Potentialverlauf als Funktion des Abstandes vom Mittelpunkt eines Latexteilchens für elektrostatische Stabilisierung.

Zwei elektrostatische Teilchen in unendlichem Abstand r voneinander spüren keine Wechselwirkungen. Nähern sie sich einander an, so nehmen elektrostatische Abstoßung und van-der-Waals-Anziehung zu. In einem Abstand, der dem Minimum II entspricht, überwiegt die van-der-Waals-Anziehung, und die Teilchen aggregieren in diesem Abstand. Wird die

Energiebarriere zwischen Minimum I und II überwunden, so können sich die Teilchen weiter annähern und koagulieren. Dies kann zum Beispiel durch Erhöhung der Temperatur oder durch Salzzugabe erreicht werden.

Grundsätzlich können mit kleineren Mengen ionischer Tenside kleinere Teilchen als mit nicht-ionischen Tensiden hergestellt werden. Für biomedizinische Anwendungen können biokompatible Tenside verwendet werden wie zum Beispiel Lecithin oder Cholsäure, deren Strukturen in Abbildung 2.2 gezeigt sind.

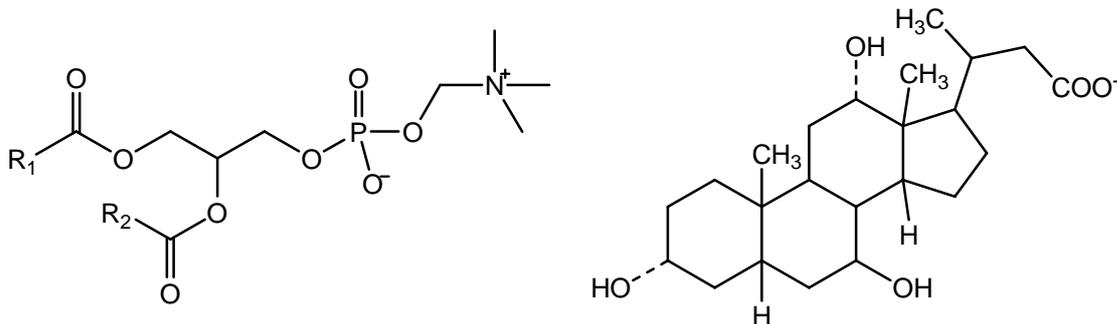


Abbildung 2.2 Strukturformeln von a) Lecithin: R_1 und R_2 sind ungesättigte Kohlenstoffketten, b) Natriumsalz der Cholsäure.

2.1.2 Miniemulsionen

2.1.2.1 Brechen von Emulsionen

Zwei Mechanismen sind für das Brechen von Emulsionen durch Wachsen von Tröpfchen verantwortlich, die Koaleszenz und die Ostwald-Reifung. Koaleszenz beschreibt die Verschmelzung zweier Tröpfchen durch Kollision, unter Ostwald-Reifung versteht man das Anwachsen von Tröpfchen durch Diffusion der dispergierten Phase durch die kontinuierliche Phase (siehe Abbildung 2.3).^{[17],[18]}

Koaleszenz kann durch den Einsatz von Tensiden unterdrückt werden, wenn die Annäherung der Tröpfchen durch elektrostatische Abstoßung oder sterische Stabilisierung verhindert wird, jedoch kann in konventionellen Emulsionen die Diffusion nicht unterdrückt werden, wenn die dispergierte Phase in der kontinuierlichen Phase zu einem gewissen Prozentsatz löslich ist. Liegen Tröpfchen unterschiedlicher Größe vor, so zeigen kleine Tröpfchen eine größere Tendenz, sich zugunsten von größeren aufzulösen. Der Grund hierfür ist der Laplace-Druck p_{Laplace} in den Tröpfchen:

$$p_{\text{Laplace}} = \frac{2 \cdot \gamma}{r} \quad (2.1)$$

γ ist hierbei die Grenzflächenspannung, r der Tröpfchenradius.

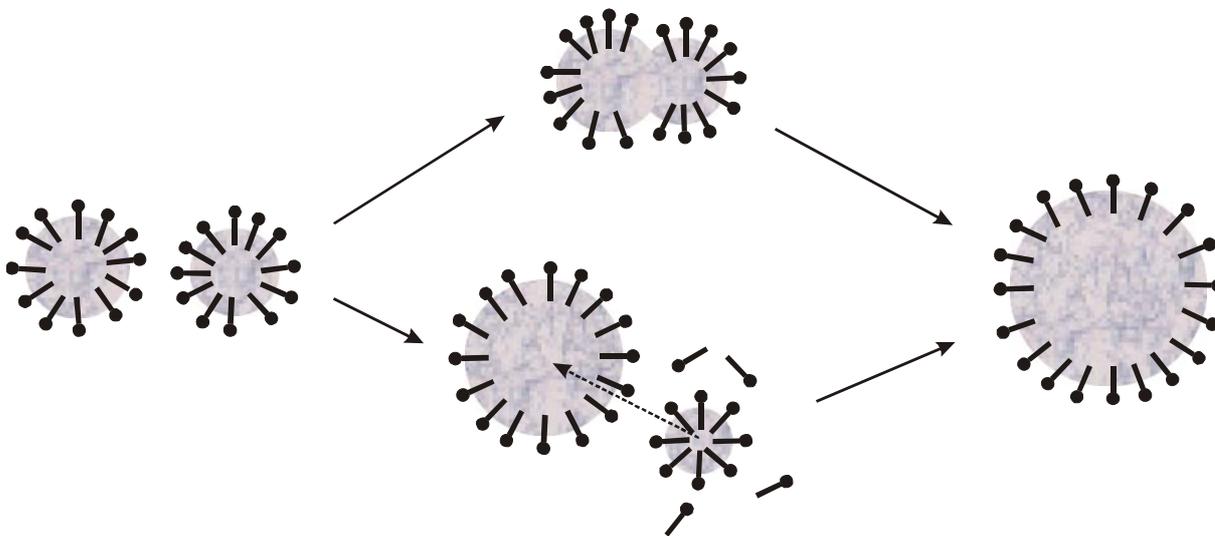


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung von Koaleszenz (oben) und Diffusion (unten).

Da mit zunehmendem Tröpfchenradius der Laplace-Druck abnimmt, sind größere Tröpfchen energetisch begünstigt. In Systemen mit einer großen Verteilung der Tröpfchengröße wird die Ostwald-Reifung begünstigt, da die unterschiedlichen chemischen Potentiale durch Diffusion ausgeglichen werden. Die kleinen Tröpfchen verschwinden dabei, die durchschnittliche Tröpfchengröße nimmt zu und die Größenverteilung wird immer enger.

Durch Zugabe einer Substanz, je nach Emulsionstyp eines hydrophoben oder lipophoben Reagenzes, kann die Diffusion in Miniemulsionen unterdrückt werden. Diese Substanz ist im kontinuierlichen Medium nicht löslich, wodurch sich in den Tröpfchen ein osmotischer Druck aufbaut (Π_{Osm}), der dem Laplace-Druck entgegenwirkt:

$$\Pi_{\text{Osm}} = \frac{R \cdot T \cdot c}{M} \quad (2.2)$$

Dabei ist R die Gaskonstante, T die Temperatur, c die Konzentration des Reagenzes und M die molare Masse des Reagenzes.

Anschaulich lässt sich das an Abbildung 2.4 erläutern: Wenn aus der dispergierten Phase Teile durch die kontinuierliche Phase in andere Tröpfchen diffundieren, so würde sich damit die Konzentration des zugegebenen Reagenzes ändern. Damit würde sich aber das chemische Potential in den Tröpfchen ändern und so zu einem thermodynamisch ungünstigen Ungleichgewicht führen.

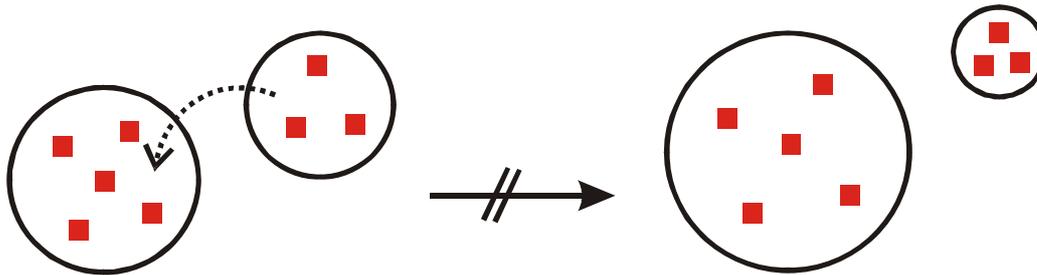


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der unterdrückten Ostwald-Reifung.

2.1.2.2 Präparation von Miniemulsionen

Eine Miniemulsion ist eine stabile Dispersion von einheitlich verteilten Tröpfchen mit einer Größe zwischen 50 und 500 nm. Die Homogenisierung des Systems erfolgt unter hohen Scherkräften, die durch Ultraschall oder Hochdruckhomogenisatoren erzeugt werden können, wodurch man die geringe Polydispersität erreicht. Da in den ersten Veröffentlichungen zunächst nur gerührt wurde,^{[19],[20]} reichte die Energie für die Verkleinerung und Homogenisierung nicht aus.^[21] Ultraschall wird effektiv für kleinere Laboransätze gebraucht, für größere Maßstäbe kommen Hochdruckhomogenisatoren zum Einsatz.

Für eine direkte (Öl-in-Wasser) Miniemulsion werden Ölphase und Wasser gemischt, in der Ölphase befindet sich zusätzlich das Hydrophob, in dieser Arbeit Hexadecan, in der wässrigen Phase befindet sich das Tensid, in dieser Arbeit meist SDS. Die beiden Phasen werden zunächst intensiv gerührt, danach werden die Tröpfchen einer hohen Scherung unterworfen, das heißt mit Ultraschall verkleinert und homogenisiert. Dadurch und durch die Zugabe des Hydrophobs können auch mit geringen Tensidmengen stabile Emulsionen mit kleinen Tröpfchengrößen oder durch anschließende Reaktion, zum Beispiel einer Polymerisation, stabile Latices mit kleinen Teilchengrößen hergestellt werden. In Abbildung 2.5 ist das Prinzip der Miniemulsion mit anschließender Polymerisation gezeigt. Die Polymerisation kann durch einen wasserlöslichen Initiator gestartet werden, der nach der Herstellung der Miniemulsion durch Ultraschall zugegeben wird, oder durch einen öllöslichen Initiator, der schon in der Ölphase gelöst wird.

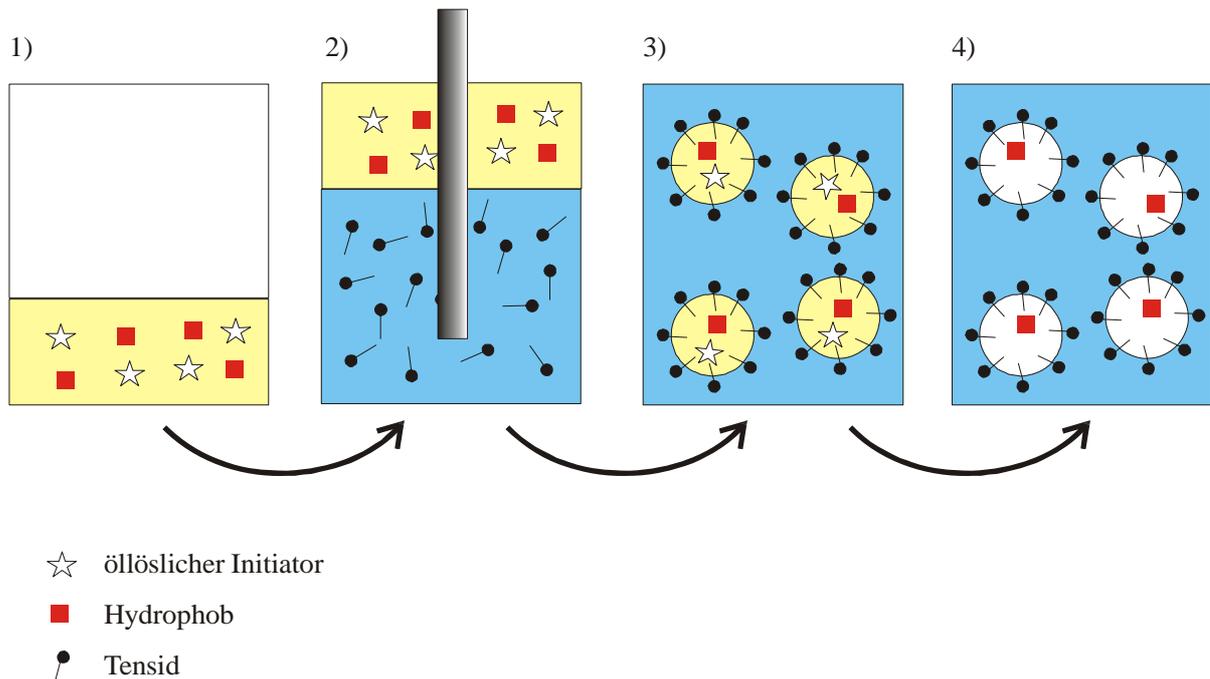


Abbildung 2.5 Herstellung einer Miniemulsion mit anschließender Polymerisation: 1) Lösung von Hydrophob und hydrophobem Initiator im Monomeren; 2) Miniemulgierung mit Ultraschall; 3) fertige Miniemulsion; 4) Polymerlatex nach Polymerisation.

Durch Ultraschall bildet sich in einer Flüssigkeit ständig wechselnd ein Unter- und Überdruck aus, wodurch es zu Kavitation kommt. Bei Kavitation handelt es sich um die Bildung von Gas- oder Dampfblasen, sogenannten Kavitäten, durch Zerreißen der Flüssigkeit in akustischen Feldern hoher Intensität.^{[22],[23]} Durch die Kollabierung der Blasen bilden sich im Innern drastische Temperaturen und sehr hohe Drücke. In diesen „hot spots“ herrschen Temperaturen von etwa 5000 K und Drücke von etwa 1000 bar. Bei der Kollabierung einer Kavität werden Druckwellen in die Umgebung abgegeben, und es werden Strahlen, in denen die Flüssigkeit hohe Geschwindigkeiten erreicht, gebildet.^[24] Dadurch werden die Öltröpfchen in der direkten Umgebung der Kavitäten zerrissen. Aufgrund der großen Gesamtoberfläche können diese nicht mehr stabilisiert werden und fließen zum Teil wieder zusammen. Durch häufiges Wiederholen dieses Prozesses, der in Abbildung 2.6 gezeigt ist, in schneller Folge verringert sich die Tröpfchengröße und die Größenverteilung wird enger.

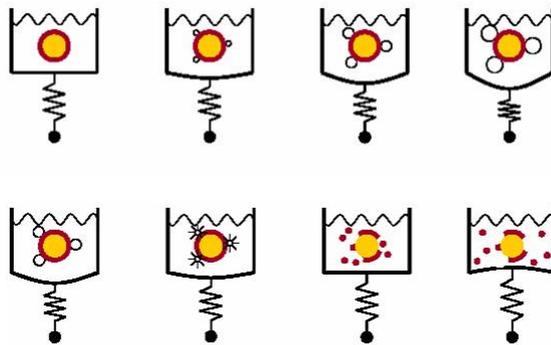


Abbildung 2.6 Prinzip der Kavitation: Durch wechselnden Über- und Unterdruck in der beschallten Probe bilden sich Dampfbläschen, die kollabieren und die Emulsionströpfchen zerreißen.

2.2 Radikalische Polymerisation

Die radikalische Polymerisation wird, wie der Name schon sagt, von Radikalen gestartet und weitergeführt. Sie gehört zu den Kettenreaktionen, bei denen an eine wachsende Kette jeweils ein Monomermolekül angelagert wird. Die radikalische Polymerisation eignet sich für vinylische Monomere, in dieser Arbeit wird zum Beispiel Styrol verwendet. Die Radikale werden meist thermisch, elektrochemisch oder photochemisch erzeugt, als Initiatoren eignen sich zum Beispiel temperaturempfindliche Azoverbindungen, Peroxoverbindungen oder auch Redox-Systeme wie $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Öllösliche Initiatoren, die im Monomeren löslich sind, sind meist Azoverbindungen wie Azobis(isobutyronitril) (AIBN), als wasserlöslicher Initiator wird zum Beispiel Kaliumperoxodisulfat (KPS) $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde der öllösliche Initiator V59 eingesetzt, dessen Strukturformel in Abbildung 2.7 gezeigt ist. Um die Polymerisation mit Azo- oder Peroxoverbindungen zu starten, muß das System erwärmt werden, die Initiierung mit Redoxsystemen erlaubt Polymerisationen bei niedrigeren Temperaturen. Für die thermische Initiierung werden Temperaturen gewählt, die leicht oberhalb der 10 h-Halbwertszeit des Zerfalls liegen, bei AIBN und V59 wird eine Reaktionstemperatur von 72 °C eingestellt.

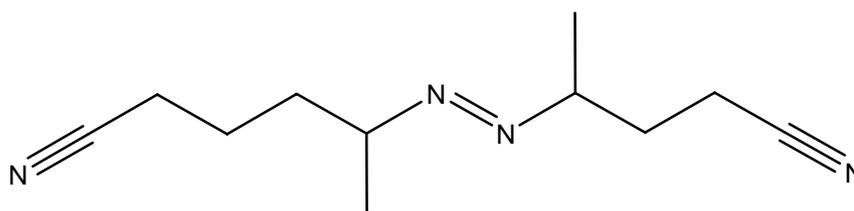


Abbildung 2.7 Strukturformel des öllöslichen Initiators V59.

Eine radikalische Polymerisation gliedert sich in 3 Abschnitte: Die Initiierung, die Wachstumsreaktion (auch Propagierung genannt) und die Abbruchreaktion (auch Terminierung genannt).

Bei der Initiierung zerfällt der Initiator I, die gebildeten Radikale $\text{R}\bullet$ reagieren mit der Doppelbindung des Monomers M unter Ausbildung eines neuen Radikals $\text{RM}\bullet$.

In der Wachstumsphase reagieren die Monomerradikale $\text{RM}\bullet$ (und später Makroradikale $\text{P}\bullet$) mit weiteren Monomermolekülen und bilden so Oligomere und schließlich Polymere.

Ein Abbruch der Kettenreaktion kann durch Rekombination zweier Radikale oder durch Disproportionierung erfolgen.

Schon nach kurzer Zeit stellt sich bei den meisten radikalischen Polymerisationen ein stationärer Zustand ein, in dem die Konzentration der Radikale konstant bleibt, da sie genauso schnell durch Initiatorzerfall gebildet werden, wie sie durch Rekombination der Makroradikale vernichtet werden. Die Bruttogeschwindigkeit der radikalischen Polymerisation v_{brutto} ist dann:

$$v_{brutto} = -\frac{d[M]}{dt} = k_W \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot f \cdot k_2}{k_a}} \cdot \sqrt{[I]} \cdot [M] \quad (2.3)$$

Dabei ist $[M]$ die Monomerkonzentration, k_W die Geschwindigkeitskonstante der Wachstumsreaktion, k_2 die Geschwindigkeitskonstante des Initiatorzerfalls, k_a die Geschwindigkeitskonstante der Abbruchreaktion, $[I]$ die Initiatorkonzentration. f ist die Zerfalleffizienz und gibt an, wieviele aus dem Initiatorzerfall entstandene Radikale aktiv sind. Es gilt: $0 < f \leq 1$, da ein Teil dieser Radikale durch sofortige Rekombination wieder verloren geht.

Die Polymerisationsgeschwindigkeit ist somit nur von der Initiator- und der Monomerkonzentration abhängig. Es ist außerdem ersichtlich, daß mit zunehmender Reaktionsdauer, das heißt mit abnehmender Monomerkonzentration, die Reaktionsgeschwindigkeit abnehmen sollte. Tatsächlich wird aber gegen Ende der Reaktion oft ein weiterer Anstieg der Geschwindigkeit beobachtet. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich die Ketten, die bei radikalischen Polymerisationsgraden hohe Molekulargewichte aufweisen, „verzahnen“ können. Dadurch steigt die Viskosität und die Diffusion der Polymerketten ist stark eingeschränkt, weshalb die Zahl der Abbruchreaktion durch Rekombination zweier Makromoleküle abnimmt. Gleichzeitig werden durch Initiatorzerfall laufend Radikale nachgeliefert, und die Radikalkonzentration und damit die Reaktionsgeschwindigkeit steigen stark an. Dieser Effekt wird *Trommsdorff-Norrish-Effekt*^{[25],[26]} oder Gel-Effekt genannt. Schließlich wird die Mischung so viskos, daß sogar die Diffusion der Monomere gehemmt wird, und die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt wieder ab. Schließlich ist das Monomer verbraucht und die Reaktionsgeschwindigkeit gleich null.

Vorteile der radikalischen Polymerisation sind die Unempfindlichkeit der Reaktion gegenüber Verunreinigungen (im Gegensatz zur anionischen Polymerisation zum Beispiel), die einfache Handhabung der Initiatoren und die Durchführbarkeit in Masse und in Suspension oder Emulsion. Die Molmassen sind schon bei kleinen Umsätzen sehr hoch, wie in Abbildung 2.8 gezeigt ist, und die Polymerisationsgeschwindigkeiten und Polymerisationsgrade sind gut steuerbar. Außerdem erlaubt die radikalische Polymerisation eine Copolymerisation vieler verschiedener Monomere in verschiedenen Verhältnissen.

Doch die radikalische Polymerisation birgt auch einige Nachteile, so ist diese Reaktion unspezifisch im Bezug auf die Stereokontrolle, und die Molmassenverteilungen sind relativ breit. Auch im Fall der Copolymerisation können die Sequenzlängen nur schlecht kontrolliert werden.

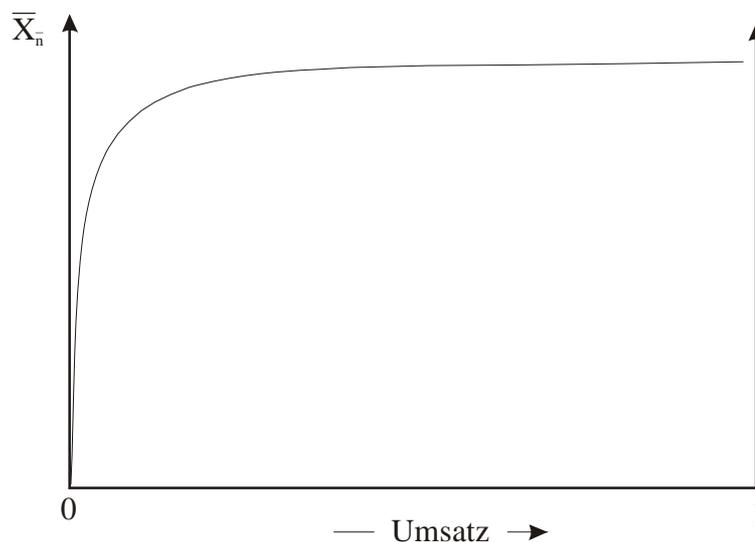


Abbildung 2.8 Zahlenmittel des Polymerisationsgrades als Funktion des Umsatzes bei der radikalischen Polymerisation.

2.2.1 Kinetik der radikalische Emulsionspolymerisation

Emulsionspolymerisationen sind radikalische Polymerisationen von wasserunlöslichen Monomeren in Wasser. Hierbei liegen Monomertröpfchen vor, die durch Tenside stabilisiert sind. Die Reaktion wird durch wasserlösliche Initiatoren gestartet. Der Vorteil von Emulsionspolymerisationen ist die Abführung der Reaktionswärme durch Wasser, die Reaktion wird sozusagen „wassergekühlt“ durchgeführt. Durch den Einsatz der Tenside sind die Polymere nicht mehr rein, deshalb bietet sich an, den entstehenden Latex direkt weiterzuverwenden, zum Beispiel als Anstrichmittel, Klebstoff oder Beschichtung.^[27]

Abbildung 2.9 zeigt das Schema der Emulsionspolymerisation: In einer Emulsion liegen zunächst große Monomertröpfchen (Durchmesser $> 1\mu\text{m}$), mit Monomer gefüllte Tensid-Mizellen und leere Tensid-Mizellen vor. Dieses System ist nicht statisch, sondern einzelne Monomer-Moleküle diffundieren durch die wässrige Phase zwischen Monomertröpfchen und Mizellen. Tatsächlich wachsen die Polymerketten in den Mizellen und nicht in den Monomertröpfchen, da die Zahl der Mizellen und damit deren Gesamtoberfläche sehr viel größer ist. Ein Eintritt der Radikale in die Mizellen ist daher wahrscheinlicher.

Die wachsenden Ketten liegen in Mizellen getrennt voneinander vor. Damit ist die Kinetik der Emulsionspolymerisation eine andere als die der Substanzpolymerisation. In jeder Mizelle wächst eine Kette, bis ein zweites Radikal eindringt und beide Radikale rekombinieren. Es ist daher entweder kein oder genau ein Radikal vorhanden, im Mittel befinden sich daher in jeder Mizelle 0.5 Radikale. Die Bruttogeschwindigkeit ist nicht mehr von der Initiatorkonzentration und der Monomerkonzentration abhängig, sondern von der Zahl der Latexteilchen. Aufgrund von Rekombination zweier Makroradikale als vorrangiger Abbruchreaktion können in Emulsionspolymerisationen höhere Molekulargewichte als in Substanzpolymerisationen erzielt werden.

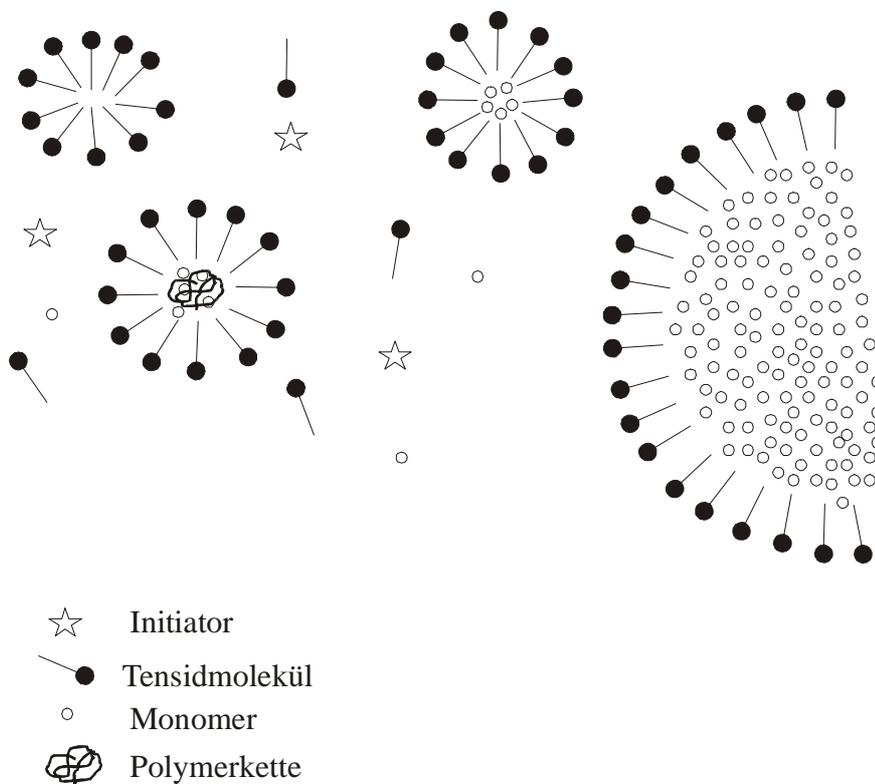


Abbildung 2.9 Schema der Emulsionspolymerisation: In monomergefüllten Mizellen wachsen die Polymerketten, Monomer diffundiert aus den Monomertröpfchen nach.

Der zeitliche Verlauf einer Emulsionspolymerisation läßt sich nach Harkins in vier Intervalle einteilen.^[28] In Abbildung 2.10 ist die Änderung der Polymerisationsgeschwindigkeit mit der Zeit gezeigt. Das erste Intervall ist das sogenannte Teilchennukleationsintervall. Hier wachsen Makroradikale in Mizellen, die mit Monomer gefüllt sind, oder in der wässrigen Phase. Die Zahl der Mizellen nimmt ab, die Konzentration des Tensids sinkt unter die cmc (critical micelle concentration), dadurch steigt die Oberflächenspannung an. Am Ende von Intervall I sind keine Mizellen mehr vorhanden, das Tensid befindet sich vollständig in den Monomertröpfchen und den monomergefüllten Mizellen. Die Polymerisationsgeschwindigkeit

steigt in diesem Intervall stark an, da die Zahl der Polymerteilchen schnell wächst. Die Zahl an aktiven Radikalen pro Mizelle erreicht den Wert 0.5.

In Intervall II wachsen die Polymerketten, indem verbrauchtes Monomer aus den Monomertröpfchen nachdiffundiert. Diese dienen als Reservoir. Die Monomerkonzentration in den Mizellen bleibt konstant und damit auch die Polymerisationsgeschwindigkeit. Die Teilchenzahl nimmt in Intervall II und auch in Intervall III nicht mehr zu, dagegen nimmt die Teilchenoberfläche zu, da die Teilchen während der Polymerisation wachsen. Kleinere Teilchen wachsen dabei aufgrund des größeren Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen schneller als größere Teilchen, wodurch die Größenverteilung enger wird.

In Intervall III sind schließlich die Monomertröpfchen aufgebraucht, die Monomerkonzentration in den wachsenden Latexteilchen sinkt, und die Polymerisationsgeschwindigkeit nimmt exponentiell ab.

Oft tritt noch ein viertes Intervall auf, das durch den vorher schon erwähnte Gelpeak (*Trommsdorff-Norrish-Effekt*) charakterisiert ist.^{[25],[26]} Die Viskosität in den Latexteilchen wird aufgrund der wachsenden Ketten so hoch, daß die Diffusion zweier Makroradikale zueinander gehemmt wird. Damit kann die Zahl der aktiven Teilchen pro Mizelle größer als 0.5 werden, und die Polymerisationsgeschwindigkeit steigt. Schließlich wird die Viskosität so hoch, daß auch die Monomere nicht mehr frei diffundieren können, daher wird die Polymerisationsgeschwindigkeit wieder kleiner.

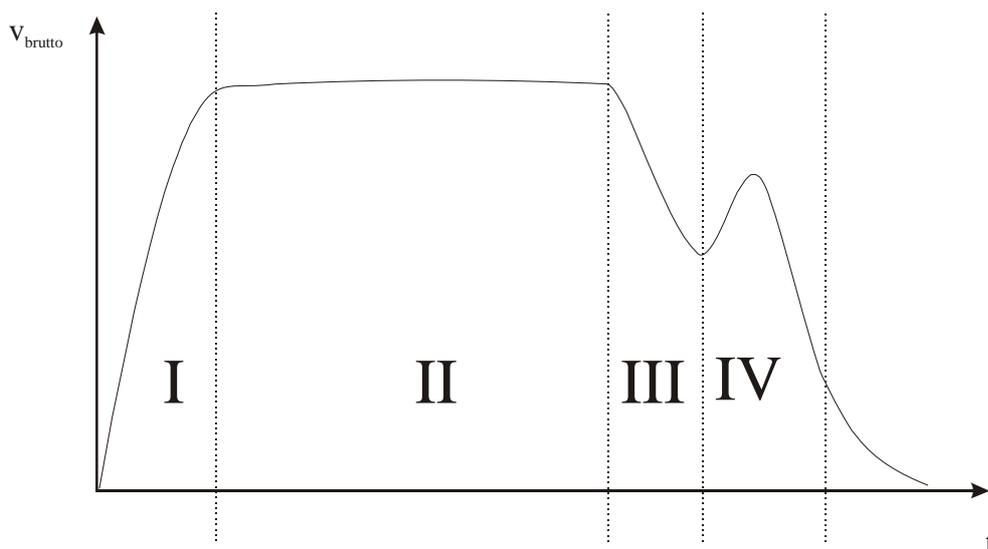


Abbildung 2.10 Emulsionspolymerisation nach Harkins.^[28] Schematische Darstellung der Änderung der Polymerisationsgeschwindigkeit mit der Zeit. I: Teilchenbildungsintervall, II: Polymerisation in Latexteilchen unter Monomerdiffusion, III: Polymerisation nach Verbrauch der Monomertröpfchen, IV Gelpeak.

2.2.2 Kinetik der radikalische Miniemulsionspolymerisation

Eine Miniemulsion wird idealerweise so hergestellt, daß sich Größe und Anzahl der Tröpfchen nicht ändern. Daher muß sich auch die Kinetik einer Miniemulsionspolymerisation von der einer Emulsionspolymerisation unterscheiden. In jedem Tropfen findet unabhängig von allen anderen Tropfen eine Polymerisation statt, und die Monomertropfen haben zu Beginn die gleiche Größe wie die Polymerteilchen am Ende der Reaktion. Man spricht daher auch von Nanoreaktoren.^{[29],[30]}

Abgeleitet von Harkins' Theorie für Emulsionspolymerisation gibt es bei der Miniemulsionspolymerisationen nur die Intervalle I, III und IV. Definitionsgemäß muß Intervall II bei der Miniemulsionspolymerisation fehlen, da die Monomerdiffusion durch die wässrige Phase unterdrückt ist.

In Intervall I wird ein Gleichgewicht eingestellt, in dem die durchschnittliche Zahl der aktiven Radikale pro Tröpfchen 0.5 ist. Die Zahl der Radikale ist zunächst kleiner als 0.5 und steigt langsam an. Die Polymerisation startet nicht in allen Tröpfchen gleichzeitig, und der Umsatz ist daher nicht zu jedem Zeitpunkt in allen Tröpfchen der gleiche.

In Intervall III wird Monomer aus den Tröpfchen verbraucht, die Monomerkonzentration nimmt exponentiell ab und die Kinetik in diesem Intervall gleicht der einer Substanzpolymerisation. Die Zahl der Radikale pro Tröpfchen ist aber auch in diesem Intervall konstant bei 0.5.

Auch bei Miniemulsionspolymerisationen kann Intervall IV, der sogenannte Gelpeak, auftreten. Hier steigt die Viskosität der Tröpfchen durch fortschreitende Polymerisation und wachsende Ketten an, die Diffusion der Makroradikale wird gehemmt, so daß die Zahl der Radikale pro Tröpfchen größer als 0.5 werden kann. Dadurch wird die Reaktion beschleunigt.

2.2.3 Nukleationsmechanismen

Es werden drei verschiedene Nukleationsmechanismen diskutiert: die mizellare Nukleation, die homogene Nukleation und die Tröpfchennukleation.

Bei der mizellaren Nukleation tritt ein Radikal in eine mit Monomer gequollene Mizelle ein und polymerisiert dort. Weiteres Monomer diffundiert während der Reaktion aus anderen Mizellen nach. Dieser Mechanismus kann nur auftreten, wenn die Tensidkonzentration oberhalb der cmc liegt, da sonst keine Mizellen vorliegen. Für Miniemulsionspolymerisationen spielt dieser Mechanismus keine Rolle, da aufgrund der geringen Tensidkonzentration keine Mizellen im System vorliegen.

Bei der Tröpfchennukleation werden die beim Emulgieren des Systems gebildeten Tröpfchen polymerisiert, indem Radikale in diese Tröpfchen eintreten. Dieser Mechanismus ist der vorrangige für Miniemulsions-Polymerisationen, da in Miniemulsionen die Diffusion von Monomer durch die Wasserphase vernachlässigbar klein ist. Jedes Tröpfchen wird einzeln nukleiert. Dieser Mechanismus erklärt auch den Erfolg der Initiierung mit öllöslichen Initiatoren in Miniemulsionspolymerisationen.

Besonders für tensidfreie Emulsionspolymerisationen ist die homogene Nukleation von Bedeutung, sie kann aber auch in Miniemulsionspolymerisationen eine, wenn auch untergeordnete, Rolle spielen. Hier bilden sich Nukleationskeime aus Oligomeren durch Initiierung in der wässrigen Phase. Diese fallen aus und dienen als Keime für weitere Polymerisationen, indem Monomer durch die wässrige Phase zu diesen diffundiert.

2.3 Polyaddition

Während die radikalische Polymerisation eine Kettenreaktion ist, bei der Monomer an eine Radikalkette addiert wird, gehört die Polyaddition zu den Stufenreaktionen. Hier reagieren die Polymerketten nicht nur mit Monomeren, sondern auch mit Oligomeren. Bei Polyadditionen lagern sich funktionelle Gruppen an Doppelbindungen oder Ringen an. Beispiele hierfür sind zum einen die Addition von Diolen an Diisocyanate unter Bildung von Polyurethan (siehe Abbildung 2.11), zum anderen die Addition von Diaminen an Diepoxide (siehe Abbildung 2.12). In Abbildung 2.13 ist gezeigt, wie die bei der Addition entstandenen Hydroxylgruppen mit weiteren Glycidylgruppen reagieren können.

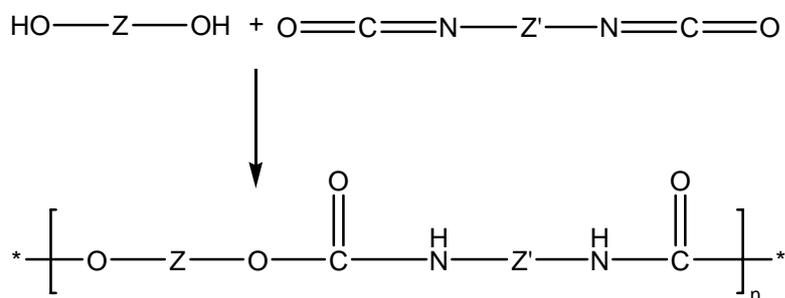


Abbildung 2.11 Reaktion von Diolen und Diisocyanaten zu Polyurethanen.

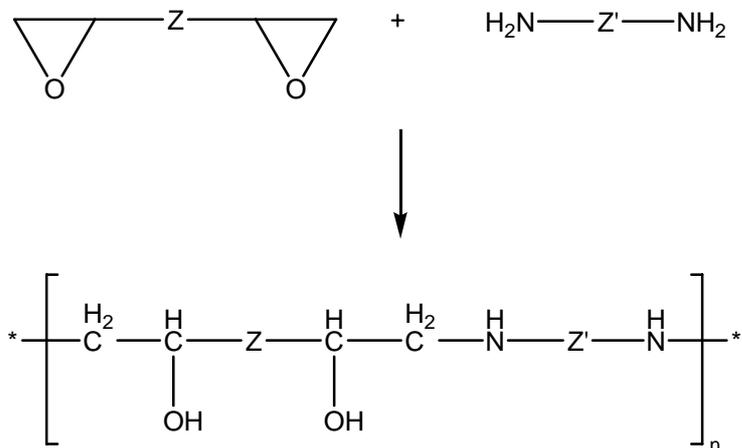


Abbildung 2.12 Addition von Diaminen an Diepoxide.

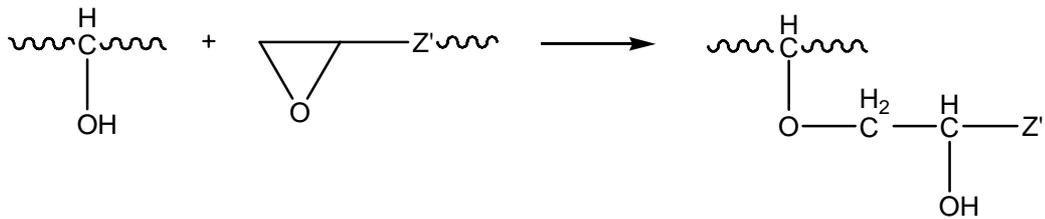


Abbildung 2.13 Reaktion der bei der Additionsreaktion von Diaminen an Diepoxide entstandenen Hydroxylgruppen mit weiteren Epoxidgruppen.

Die Polyaddition soll anhand der Bildung von Polyurethan näher erläutert werden.

Der erste Schritt ist die Bildung eines Dimeren aus Diol und Diisocyanat (Abbildung 2.14).

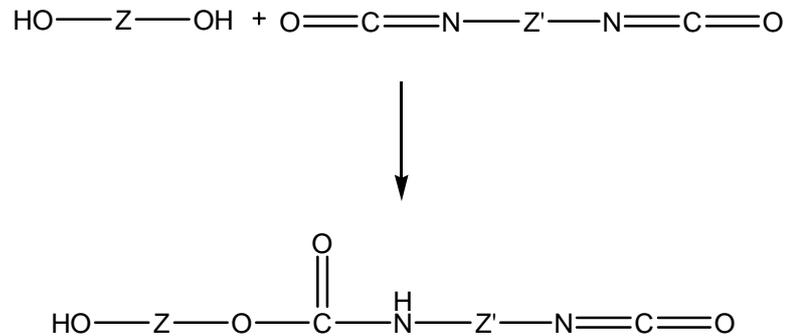
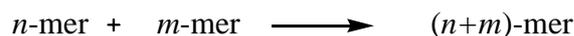


Abbildung 2.14 Bildung eines Dimeren aus einem Diol und einem Diisocyanat.

Dieses Dimer kann mit weiteren Diaminen oder Diisocyanaten Trimere bilden oder mit anderen Dimeren Tetramere. Diese können alle untereinander weiterreagieren. Die Polymerisation läuft daher stufenartig weiter, und schon sehr früh während der Reaktion ist in der Mischung wenig Monomer im Unterschied zur radikalischen Polymerisation vorhanden. Generell kann formuliert werden:



Aufgrund dieses Mechanismus wächst das Molekulargewicht nur langsam mit der Reaktionszeit.

Das Zahlenmittel des Polymerisationsgrades X_n berechnet sich nach Carothers' Gleichung:^[31]

$$X_n = \frac{1}{1-p_A} \quad (2.4)$$

p_A ist das Reaktionsausmaß und bezeichnet den Anteil der funktionellen Gruppen, der schon reagiert hat. Aus dieser Gleichung geht hervor, daß eine Polymerkette aus erst durchschnittlich 10 Monomereinheiten besteht, wenn schon 90% der funktionellen Gruppen reagiert haben. Erst wenn sich p_A an den Wert 1 annähert, steigt der Polymerisationsgrad steil an. Dieses Verhalten ist auch in Abbildung 2.15 gezeigt.

Für technisch interessante Polymere muß ein Reaktionsausmaß von mindestens 99,5% erreicht werden. Bei einem theoretischen Umsatz von 100% wäre die Polymerkette unendlich lang.

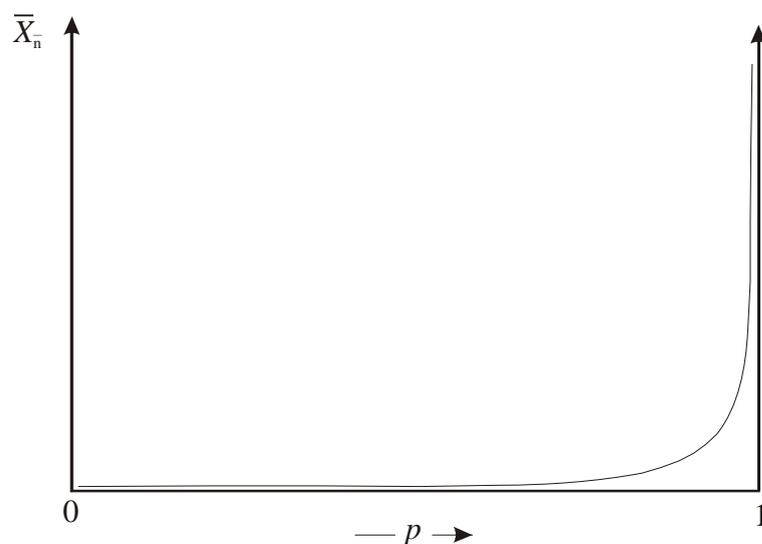


Abbildung 2.15 Zahlenmittel des Polymerisationsgrades X_n als Funktion des Reaktionsausmaßes p_A bei der Polyaddition.

Da die Isocyanatgruppen sehr empfindlich gegenüber Wasser sind, ist es einfacher, Polyurethane in organischen Lösungsmitteln zu polymerisieren. Um wässrige Dispersionen von Polyurethanen zu erhalten, mußte ein zweistufiger Prozess angewandt werden, in dem zuerst ein Präpolymer in nicht-wässrigen Lösemitteln hergestellt wurde, das dann in einem zweiten Schritt in Wasser dispergiert werden konnte.^[32] 2001 gelang es zum ersten Mal, ein Polyurethan in wässriger Miniemulsion herzustellen.^[33] Da die Monomere in Tröpfchen von Wasser umgeben sind, muß die Reaktion mit Wasser zu Polyharnstoff (Abbildung 2.16) unterdrückt werden.

Durch den Einsatz von Katalysatoren wie Organo-Zinn-Verbindungen wird die Reaktion der Isocyanate mit Alkoholen gegenüber der Reaktion mit Wasser bevorzugt, so daß vorzugsweise die Reaktion zu Polyurethan stattfindet.^[34] Damit können auch im Dispersionsmedium Wasser hohe Molekulargewichte erzielt werden.

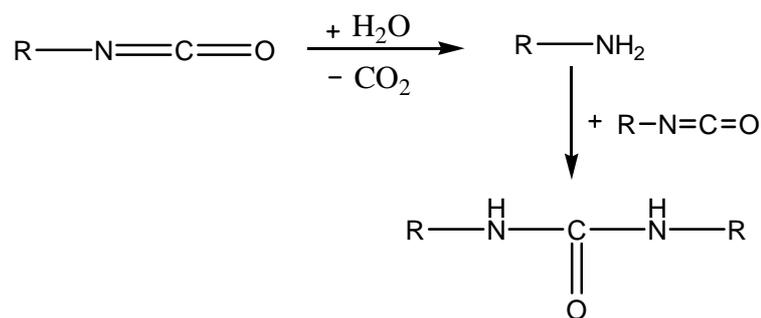


Abbildung 2.16 Die Reaktion von Isocyanaten mit Wasser unter Bildung von Polyharnstoff.

Das gleiche Problem ergibt sich für Epoxide, die ebenfalls sehr reaktiv gegenüber Wasser sind. Doch auch die Addition von Diaminen an Diepoxide konnte bereits erfolgreich in Miniemulsion durchgeführt werden.^[35]

Um hohe Molekulargewichte zu erhalten, muß bei der Polyaddition auf genaue Stöchiometrie geachtet werden. Im Fall von Polyurethanen ist das ein Molverhältnis der beiden Monomere von 1:1, im Fall der Addition von Diaminen an Diepoxide ein Verhältnis von 1:1 oder ein Verhältnis Diamin : Diepoxid von 2:1. In den ersten beiden Fällen wird ein lineares Polymer gebildet, im letzten Fall reagieren beide Aminogruppen des Diamins mit zwei Epoxidgruppen und man erhält ein verzweigtes Polymer. Dennoch kann in manchen Fällen eine leichte Nicht-Stöchiometrie erwünscht sein. So wird das Molekulargewicht durch Nicht-Stöchiometrie kontrolliert: Ist ein Reaktant vollständig aufgebraucht, stoppt die Polymerisation und kann auch später nicht mehr weiterlaufen, da die Polymerketten an beiden Enden die gleiche Funktionalität tragen, wie am Beispiel der Diepoxid-Diamin-Reaktion in Abbildung 2.17 gezeigt ist. Durch eine Nicht-Stöchiometrie der Reaktanten können in Miniemulsions-Polyadditionen Nanopartikel erhalten werden, die auf der Oberfläche bestimmte funktionelle Gruppen, zum Beispiel Amino- oder Glycidyl-Gruppen, tragen. Diese Gruppen können dann genutzt werden, um die Partikel weiter zu funktionalisieren.

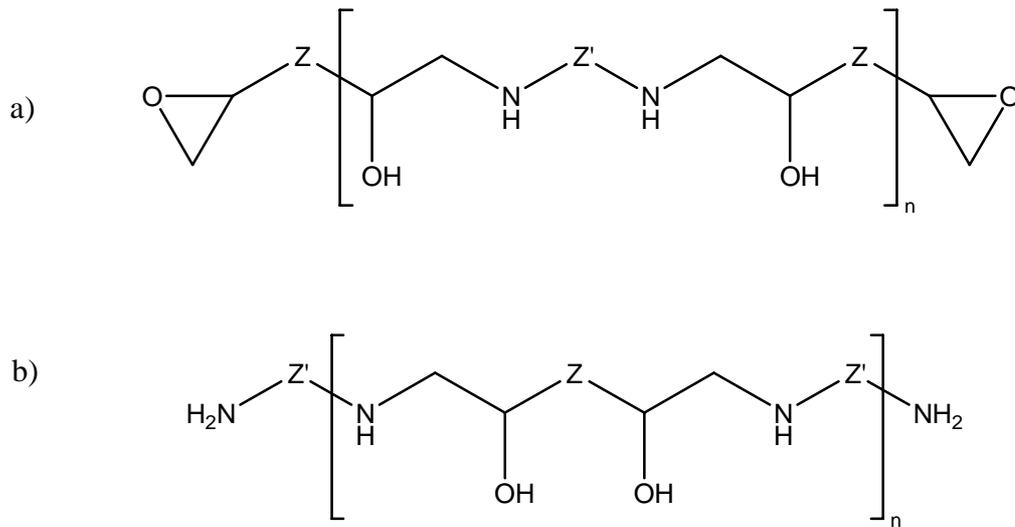


Abbildung 2.17 Die Produkte der Addition von Diaminen und Diepoxiden mit a) leichtem Überschuss an Diepoxid b) leichtem Überschuss an Diamin.

2.4 Verkapselung in Polymeren

Die Verkapselung von anorganischen Stoffen in Polymeren hat verschiedene Vorteile. Zum einen können die mechanischen Eigenschaften der Polymere verbessert werden, die Lichtstreuung und die Verfilmbarkeit verändert werden, zum anderen kann das verkapselte Material vor äußeren Einflüssen geschützt oder an gewünschte Bedingungen angepaßt werden. So kann durch entsprechende Hüllmaterialien die Hydrophilie gezielt verändert werden, was zum Beispiel für die Anwendung als Druckertinte interessant ist, oder es kann eine Biokompatibilität erreicht werden, wie es für die Zellmarkierungen nötig ist.

Wasser als Dispergiermedium hat für die meisten Anwendungen den Vorteil des umweltfreundlichen und nicht-toxischen Lösemittels. Eine oft genutzte Möglichkeit zur Verkapselung ist die Emulsionspolymerisation. Hierbei können grenzflächenaktive Monomere zur Stabilisierung der Partikel genutzt und polymerisiert werden, wie es schon 1989 von Nagai et al. in emulgatorfreier Emulsionspolymerisation durchgeführt wurde.^[36] Es wurde ein kationisches grenzflächenaktives Monomer radikalisch auf Silica-Partikeln polymerisiert, wobei erst ab einem bestimmten Silica zu Monomer-Verhältnis kein freies Polymer mehr erhalten wurde. Es konnte nachweisen werden, daß die Silica-Partikel gleichmäßig verkapselt wurden, doch der Polymergehalt war gering. Statt der Monomere können auch die Initiatoren auf den Partikeln adsorbiert werden und eine Polymerisation auf den Partikeln initiieren. Dieser Weg ist für verschiedene Materialien wie TiO_2 ,^[37] CaCO_3 ,^[38] Metall und Metalloxide^{[39]-[41]} beschrieben.

Eine sehr elegante und effektive Methode der Verkapselung von anorganischen Nanopartikeln in Polymeren stellt die Miniemulsionspolymerisation dar. Zwei Ansätze sind möglich: Zum einen können die zu verkapselnden Materialien in der Monomermischung dispergiert werden, die dann in Miniemulsion polymerisiert wird. Dieser Weg ist besonders erfolgreich bei der Verkapselung von hydrophoben Pigmenten.^[42] Im Fall von TiO_2 kann nur eine geringe Menge des Pigments eingeschlossen werden, und es bilden sich zusätzlich reine Polymerpartikel.^{[43]-[45]} Ein höherer Pigmentanteil bei der Verkapselung von Pigmenten kann erzielt werden, wenn die hydrophilen anorganischen Partikel hydrophobisiert werden: CaCO_3 kann durch Adsorption von Stearinsäure hydrophobisiert werden,^[46] Fe_3O_4 wird durch zum Beispiel durch Ölsäure hydrophobisiert.^[47] 2001 gelang es Hoffmann et al., mit Oleoylsarcosin hydrophobisierte Magnetitnanopartikel zu verkapseln. Die Nanopartikel wurden im Monomer Styrol dispergiert, die anschließende Miniemulsionspolymerisation führt zu in Polystyrol verkapselten Magnetitnanopartikeln mit einem resultierenden Magnetitanteil von 15%.^[48] 2004 verkapselten Csetneki et al. Magnetit in Polystyrol, indem sie Styrol mit einem Ferrofluid

mischten und anschließend polymerisierten.^[49] In beiden Fällen war die Verteilung von Magnetitnanopartikeln in den Polystyrolpartikeln inhomogen.

Zum anderen können zwei Miniemulsionen hergestellt werden, eine vom Monomer, eine vom zu verkapselnden Material, die dann mit Ultraschall vermischt werden. Ramírez und Landfester entwickelten 2003 einen dreistufigen Prozess mit zwei Miniemulsionen, der erlaubt, Magnetit homogen und in großen Anteilen in Polystyrol zu verkapseln.^[50]

2.5 Einsatz von Nanopartikeln in der Medizin

2.5.1 Fluoreszierende Polymernanopartikel in der Medizin

Schon seit langem werden polymere Nanopartikel in der Medizin verwendet, als Trägermaterialien für Proteinen oder Peptide und damit in den Bereichen der Wirkstofffreisetzung, der kontrollierten Wirkstofffreisetzung, der Immunoassays und der Immunodiagnostik. Speziell auf dem Gebiet der Wirkstofffreisetzung bringen sie einige bedeutende Vorteile mit sich, wie erhöhte Bioverfügbarkeit und eine angepaßte Biodistribution.^{[51]-[54]}

Von den Polymeren spielt Polystyrol eine besondere Rolle. Polystyrol-Latices sind monodispers hinsichtlich der Teilchengröße, und die Teilchengröße kann zudem gezielt variiert werden. Die Partikel sind nicht bioabbaubar und können daher über einen langen Zeitraum verfolgt und nachgewiesen werden. Der Nachteil ist, daß Polystyrol, einmal in ein biologisches System eingebracht, nur schwer identifiziert werden kann und daher markiert werden muß.^[55] Die einfachste Art dieser Markierung ist das Einbringen eines Fluoreszenzfarbstoffes. Fluoreszenzmarkierung wird bereits in der Biomedizin als Nachweissystem eingesetzt, so zum Beispiel in der Genetik und in der Zellmarkierung.^{[56]-[58]} Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Fluoreszenzmoleküle in die Dispersion einzubringen. So kann ein fluoreszierender Farbstoff zum Beispiel auf der Oberfläche der Polymerpartikel physikalisch adsorbiert werden,^[59] oder ein fluoreszierendes Monomer wird mit Polystyrol copolymerisiert.^[60] Die physikalische Adsorption birgt einige Nachteile: die Bindung unterliegt ständig dem Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption, wodurch Grenzen gesetzt werden, außerdem kann eine sich ändernde chemische Umgebung die Stabilität dieser Bindung zusätzlich negativ beeinflussen. Der Einbau von fluoreszierenden Comonomeren in das Polymer gelingt nicht in einer Emulsionspolymerisation, da diese Comonomere in der Regel wasserunlöslich sind. Dadurch können sie nicht durch die wässrige Phase diffundieren und werden nicht homogen in den Partikeln eingebaut.

Die Miniemulsionspolymerisation bietet den Vorteil der Nanoreaktoren, wobei eine Diffusion des Fluoreszenzfarbstoffes nicht notwendig ist.^[61] Dabei kann ein öllöslicher Fluoreszenzfarbstoff homogen in Polymerpartikeln verteilt werden. Zudem wird in Miniemulsionen nur wenig Tensid benötigt, was ein großer Vorteil für den Einsatz in der Biomedizin ist.

2.5.2 Magnetitnanopartikel in der Medizin

Magnetische Nanopartikel haben spezielle Eigenschaften, die sie interessant für den Einsatz in der Biomedizin machen.^[7] Aggregate dieser Partikel, die durch wasserlösliche Polymere

stabilisiert sind, sind klein genug, um in Zellen einzudringen oder sogar die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren.^[62] Ihre Oberfläche kann funktionalisiert werden, um selektive Wechselwirkungen zu erzielen, und ihre magnetischen Eigenschaften erlauben die Kontrolle durch ein externes magnetisches Feld. Aufgrund dieser Kontrollierbarkeit werden sie nicht nur angewandt für Zellseparation, sondern auch für weit komplexere Methoden wie die Kernmagnetresonanztomographie (MRT),^[63] eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung oder Hyperthermie.^[64] Der Superparamagnetismus (siehe Kapitel Kapitel 2.6) dieser Teilchen verhindert eine weitere Aggregation oder Koagulation der Teilchen während der Einwirkung eines magnetischen Feldes. Aggregation und Koagulation hätten vor allem in kleinen Blutgefäßen fatale Auswirkung wie Gefäßverschuß.

Magnetit ist das einzige superparamagnetische Material, das bisher für den Einsatz am Menschen zugelassen ist. Es ist das einzige bekanntermaßen biokompatible Material ohne relevante Toxizität in der anzuwendenden Dosis. Sobald Magnetitpartikel intravenös injiziert worden sind, bleiben sie im Blutkreislauf, bis sie über Leber oder Niere ausgewaschen werden oder von Phagozyten metabolisiert werden.^[65]

Hergestellt werden können Magnetitnanopartikel am einfachsten durch Ausfällen aus $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Lösung im molaren Verhältnis 3:2 mit Ammoniak, wobei gleichzeitig Ölsäure zur Stabilisierung zugegeben wird.^{[47],[50]} Eine andere Art der Stabilisierung ist die Beschichtung mit Polelektrolyten. Si et al. gelang durch Ausfällen von Magnetit in Gegenwart von Polyacrylsäure die Synthese monodisperser Magnetitnanopartikel unterschiedlicher Größen in Gegenwart von Polyacrylsäure oder Carboxymethylcellulose.^[66] Die zweite Möglichkeit, Magnetitnanopartikel herzustellen, ist die thermische Zersetzung von Vorstufen wie Eisentriacetylacetonat $\text{Fe}(\text{acac})_3$ oder Eisenpentacarbonyl $\text{Fe}(\text{CO})_5$,^{[67],[68]} wodurch aber Nanopartikel erhalten werden, die lediglich in organischen Lösemitteln löslich sind. Ein weiterer Nachteil beider Synthesewege ist, daß nur Nanopartikel bis 15 nm Durchmesser ausfällbar sind. Es ist aber bekannt, daß Relaxationszeiten und Hystereseverluste mit zunehmendem Teilchendurchmesser zunehmen.^[69] Daher ist es für Anwendungen in der MRT (siehe Kapitel Kapitel 2.5.2.1) und für die Hyperthermie (siehe Kapitel Kapitel 2.5.2.2) von Interesse, gezielt Magnetitnanopartikel von 20 - 30 nm Durchmesser herzustellen. Magnetotaktische Bakterien wie *Magnetospirillum gryphiswaldense* sind in der Lage, einheitliche Magnetitnanokristalle, die von einer Lipidmembran umgeben sind, sogenannte Magnetosome, herzustellen. Die Ausbeute aus diesem Bakterium ist mit ca. 6 mg Magnetit pro Liter und Tag hoch verglichen mit anderen Bakterien.^[71] Aber für kommerzielle Anwendungen sind diese Mengen zuwenig. Daher muß ein Weg gefunden werden, Magnetitnanopartikel dieser Größe auf künstlichem Weg herzustellen. 2004 berichteten Jana et al. von einem neuen Syntheseweg, der die größenkontrollierte Herstellung von Magnetitnanokristallen erlaubt. Sie zersetzten Fe^{II} - bzw. Fe^{III} -oleat in Gegenwart

verschiedener Mengen Ölsäure und konnten so Magnetitnanopartikel definierter Größe herstellen.^[72]

Die Systeme, die derzeit in Anwendung sind, sind Magnetitnanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 10 nm, stabilisiert durch eine hydrophile Polymerhülle wie Dextran oder Carbodextran. Durch Funktionalisierung der Hülle ist es möglich, zum Beispiel Medikamente ionisch anzubinden, die am gewünschten Ort im Körper freigesetzt werden können, nachdem sie durch ein externes magnetisches Feld an diesen Ort geleitet worden sind.^[73] Auch konnte gezeigt werden, daß Magnetitnanopartikel in einem magnetischen Wechselfeld ausreichend Wärme produzieren, um für Hyperthermie-Anwendungen genutzt werden zu können.^[74]

Der schon erwähnte Nachteil der möglichen Koagulation der Partikel sowie das „Ausbluten“ können vermieden werden, indem die hydrophile Polymerhülle durch eine hydrophobe Polymerhülle ausgetauscht wird, und die Magnetitnanopartikel in einem hydrophoben Polymer verkapselt werden.^{[75],[76]} Dadurch wird sichergestellt, daß die Polymerhülle in wässrigem Milieu wie dem Blut im menschlichen Körper nicht abgewaschen wird, woraus Sedimentation und Aggregation der Magnetitpartikel resultieren würde. Gleichzeitig kann ein hoher Magnetitanteil und eine homogene Verteilung im Material erzielt werden. Für die Verkapselung wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Polymere untersucht. Zum einen ist dies Polystyrol, aus Gründen, die in Kapitel 2.5.1 schon diskutiert wurden, und aufgrund der Möglichkeit der Oberflächenfunktionalisierung durch Copolymerisation mit funktionellen Monomeren wie Acrylsäure. Zum anderen sind dies Polyurethan und Epoxidharze, die ebenfalls schon in der Biomedizin zum Einsatz kommen, allerdings bisher nicht als polymere Nanopartikel.

2.5.2.1 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie beruht auf der Aufnahme von NMR-Signalen der Protonen in Gewebeflüssigkeit, Membranlipiden und Proteinen. Gemessen wird die Relaxationszeit zur Wiederherstellung des Gleichgewichts einer durch ein statisches Magnetfeld aufgebauten Magnetisierung, das durch ein transversales Feld gestört wurde. Dieses Gleichgewicht wird durch zwei verschiedene Prozesse wiederhergestellt: longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxation, gekennzeichnet durch die Relaxationszeit T_1 , und die transversale oder Spin-Spin-Relaxation, gekennzeichnet durch die Relaxationszeit T_2 . Man unterscheidet in der MRT zwischen T_1 -gewichteten Bildern, in denen Fettgewebe mit kurzer T_1 -Relaxationszeit dargestellt werden und T_2 -gewichteten Bildern, in denen Flüssigkeiten, darunter auch die in bösartigen Tumoren, mit langer T_2 -Relaxationszeit dargestellt werden.^[9]

Um den Kontrast in MRT-Aufnahmen zu erhöhen, werden Kontrastmittel eingesetzt. Superparamagnetische Magnetitnanopartikel dienen dazu, die T_2 -Relaxationszeit zu

verkürzen, was zu einer Signalreduktion und damit einem negativen Kontrast in T_2 -gewichteten Bildern führt. Nanopartikel bauen in Nachbarschaft zu den angeregten Protonen ein magnetisches Störfeld auf, das zu einer Verkürzung von T_2 , nicht aber T_1 führt.^[7] So können Tumore durch ein superparamagnetisches Kontrastmittel heller dargestellt werden und leichter erkannt werden.

2.5.2.2 Hyperthermie

Hyperthermie ist das griechische Wort für „Überhitzung“ und bezeichnet die Behandlung von Krankheiten durch Wärme. Heutzutage versteht man darunter meist die Zerstörung oder Schwächung bösartiger Krebszellen durch Wärmebehandlung. Man muß unterscheiden zwischen der milden Hyperthermie, bei der eine Aufheizung auf 41 °C bis 46 °C erzielt wird, um die Wirkung von Chemotherapeutika zu verstärken, und der aggressiveren Thermoablation, bei der Gewebe auf 46 °C bis 56 °C aufgeheizt wird und die eine Zellzerstörung zur Folge hat.^[77] Anstatt nun das Gewebe großflächig von außen aufzuheizen, sollen magnetische Nanopartikel eingespritzt werden, die durch ein äußeres magnetisches Wechselfeld aufgeheizt werden können. Damit könnten die Krebszellen gezielt zerstört werden und die Gefahr des Verlustes gesunden Gewebes minimiert werden.

Werden superparamagnetische Nanopartikel einem magnetischen Wechselfeld ausgesetzt, so beginnen ihre magnetischen Momente entsprechend zu rotieren, wenn die Energie des Wechselfeldes hoch genug ist. Wenn die Magnetisierung wieder den Gleichgewichtszustand einnimmt, wird Energie in Form von Wärme frei. Diesen Mechanismus bezeichnet man als Néel-Relaxation.^[78] Zum anderen können die Partikel als ganzes im Dispergiermedium zu rotieren beginnen, was als Brown-Relaxation bezeichnet wird.^[79] Hier wird Energie in Form von Reibungswärme frei. In beiden Fällen wird die Umgebung aufgeheizt.^{[7]-[9]}

2.5.3 Funktionalisierung von Polymeren für biomedizinische Anwendungen

Funktionalisierung oder Modifizierung von Polymeren für biomedizinische Anwendungen kann unterschiedliche Gründe haben.

Zunächst können dies einfache diagnostische Zwecke sein. Die Affinitätschromatographie wird genutzt, um ähnliche Proteine voneinander abzutrennen, indem Polymerpartikel in einer Säule gepackt werden, die eine Funktionalität auf der Oberfläche tragen, durch die Proteine gebunden werden.^{[80],[81]} Diese Bindung kann aus einer der folgenden Komplexe bestehen: Antigen-Antikörper-Komplexe, Zelladhäsionsprotein-Rezeptor-Komplexe, Enzym-Substrat-Komplexe oder DNA-DNA-Komplexe bzw. RNA-RNA-Komplexe.

In Immunoassays, für Enzymimmobilisierung, Zellsortierung und DNA-Sequenzierung und andere diagnostische Verfahren kann es von Vorteil sein, Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren, um sie verfolgen zu können.^[82] Proteine werden zu diesem Zweck meist an die Aminogruppen von Fluoreszenzfarbstoffen wie Rhodamin- oder Fluoresceinisothiocyanat gebunden.^[83] Auf ähnliche Art können bestimmte Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen und damit sichtbar gemacht werden.

Zu den therapeutischen Zwecken gehört zunächst der Ersatz oder die Unterstützung von Gewebe durch künstliche Materialien wie Polyurethane, Silikone, Polyolefine, Polyvinylchlorid oder Polyethylenterephthalat, das in künstlichen Blutgefäßen zum Einsatz kommt. Hier ist die Biokompatibilität von hohem Interesse: Minimierung der Wechselwirkungen lautet das oberste Ziel, das eine Vermeidung von Proteinadsorption und Zelladhäsion beinhaltet. In erster Linie ist eine Biokompatibilität durch die Wahl eines geeigneten Polymers gegeben, doch reicht das nicht immer aus. Besonders in künstlichen Blutgefäßen ist die Bildung von Thrombosen und damit der Verschluß der Gefäße zu vermeiden. Hier wurde die Einführung von Antikoagulantien auf der Polymeroberfläche beschrieben.^[84]

Auch in der immer präsenter werdenden Nanotechnologie spielt die Oberflächenfunktionalisierung eine wichtige Rolle. Nanopartikel werden in vielen Bereichen eingesetzt, wie schon in Kapitel 2.5.1 erwähnt wurde. DNA-Arrays und Immunoassays verlangen nicht nur eine Fluoreszenzmarkierung, sondern auch starke Wechselwirkungen mit Polymeren und Polymernanopartikeln, um Proteine voneinander trennen zu können. Für eine Fluoreszenzmarkierung von Gewebe und Zellen muß der Fluoreszenzmarker spezifisch in das Gewebe oder die Zellen eingebracht werden. In den Bereichen der Wirkstofffreisetzung und der kontrollierten Wirkstofffreisetzung müssen Nanopartikel Medikamente transportieren, und für MRT-Kontrastmittel ist es wichtig, daß sie sich am abzubildenden Ort aufhalten. Hierfür kann eine Vielzahl von Biomolekülen angebunden werden, wie Antikörper, Peptide und Polysaccharide.^{[85]-[87]} Die Selektivität der Zellaufnahme antikörper-modifizierter Quantenpunkte konnte bereits nachgewiesen werden.^[88] Mit Streptavidin- und Immunoglobulin G-funktionalisierten Quantenpunkten wurde spezifisch der Brustkrebs-Rezeptor Her2 in fixierten und lebenden Zellen sowie Aktin und Mikrotubuli innerhalb der Zellen markiert. In Tierversuchen ist es bereits gelungen, die Quantenpunkte zu steuern, indem Peptide auf ihrer Oberfläche immobilisiert wurden.^[89] Je nach Art des angebundenen Peptides sammelten sich die Quantenpunkte in der Lunge von Mäusen, in Blutgefäßen oder Lymphgefäßen von Tumoren. In anderen Tierversuchen wurden mit Immunoglobulin G funktionalisierte Eisenoxidteilchen eingesetzt.^{[90]-[92]} Die Partikel konnten spezifisch in den gewünschten Körperregionen nachgewiesen werden. Auch für Hyperthermie-Anwendungen konnte die spezifische Zellaufnahme in Krebszellen durch Anbindung eines monoklonalen

Antikörpers an magnetitbeladene Liposomen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erhöht werden.^{[93]-[95]}

Für die Funktionalisierung von Polymernanopartikeln gibt es mehrere Wege. Der einfachste ist die Adsorption des Biomoleküls auf der Partikeloberfläche. Diese Methode weist allerdings einige Nachteile auf wie Desorption und die fehlende Selektivität in Bezug auf die zu bindenden Proteine. Ein wesentlich effektiverer Ansatz ist die kovalente Anbindung von Biomolekülen an funktionelle Gruppen auf der Oberfläche des Polymers. Diese funktionellen Gruppen sind idealerweise Thiol- oder Mercaptogruppen^{[96]-[98]}, Maleimidgruppen, Aldehydgruppen, Aminogruppen, Carboxylgruppen^[99] oder Epoxygruppen.^{[100],[101]} Die Kopplung zwischen Aminen und Carboxylgruppen ist gut untersucht und wird seit langem in der Biomedizin angewandt.^{[82],[102]-[104]} Hierbei werden die Carboxylgruppen mit einem Carbodiimid, wie zum Beispiel dem wasserlöslichen N-Ethyl-N'-dimethylaminpropylcarbodiimid (EDC) aktiviert und binden nach der Aktivierung an Aminogruppen. Als Katalysator kann zusätzlich noch N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) eingesetzt werden (siehe Abbildung 2.18). Ein einfacherer Weg ohne Aktivierung der funktionellen Gruppen stellt die Bindung zwischen Epoxygruppen und Amino- oder anderen hydrophilen Gruppen dar.^[105]

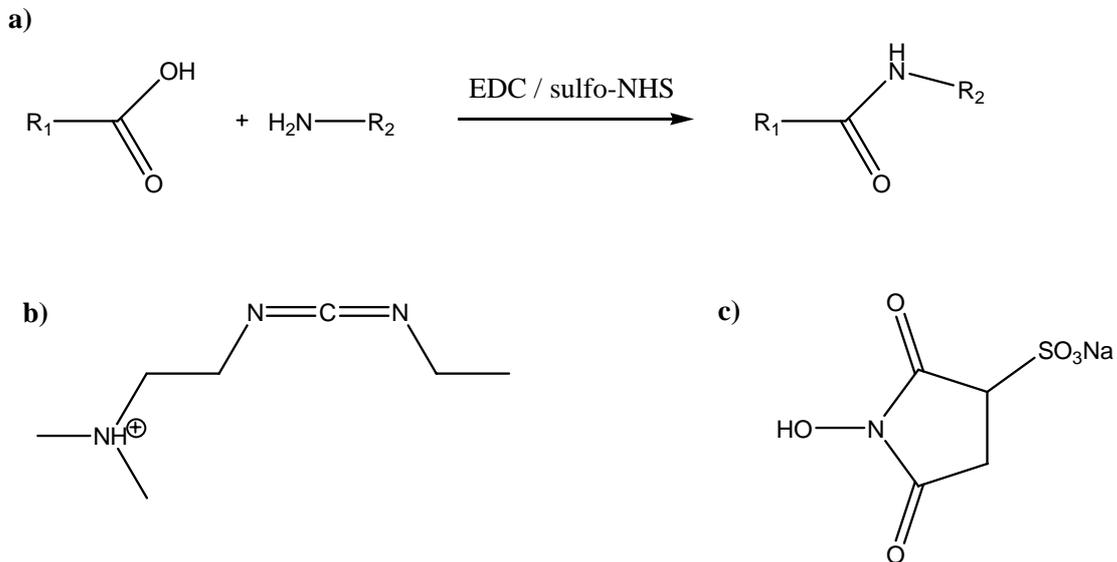


Abbildung 2.18 EDC-Kopplung; a) Reaktionsschema der Bildung einer Peptidbindung mit EDC und Sulfo-NHS; b) Strukturformel von N-Ethyl-N'-dimethylaminomethylcarbodiimid (EDC); c) Strukturformel von N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS).

2.6 Magnetismus^{[106],[107]}

Ein homogenes Magnetfeld kann durch die magnetische Flußdichte oder magnetische Induktion B beschreiben werden, die durch die Dichte der magnetischen Feldlinien pro Fläche veranschaulicht werden kann oder durch die magnetische Feldstärke H . Zwischen beiden gilt im Vakuum die Beziehung:

$$B = \mu_0 \cdot H \quad (2.5)$$

wobei μ_0 die magnetische Feldkonstante $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \frac{\text{Vs}}{\text{Am}}$ ist. Im materiefüllten Raum gilt:

$$B = \mu \cdot H = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot H \quad (2.6)$$

mit μ als der magnetischen Permeabilität und μ_r der relativen Permeabilitätszahl.

Bringt man nun einen Körper in ein homogenes Magnetfeld, so sind zwei Fälle möglich: Der Körper kann die Feldlinien in seinem Innern verdichten oder auseinanderdrängen. Im Inneren des Körpers herrscht dann nicht mehr die ursprüngliche Induktion B_a , sondern die neue Induktion B_i :

$$B_i = B_a + B' \quad (2.7)$$

Die ursprüngliche Zahl an Feldlinien ist damit um den Betrag B' erhöht (B' positiv) oder erniedrigt (B' negativ) worden. B' wird auch magnetische Polarisation genannt. Bei einer Erhöhung spricht man von paramagnetischem Material, bei einer Erniedrigung von diamagnetischem Material. Beide Begriffe werden in Kapitel 2.6.1 näher erläutert.

Man kann für die Induktion auch formulieren:

$$B_i = \mu_r \cdot B_a \text{ und } B' = \chi_v \cdot B_a \quad (2.8)$$

Beide Proportionalitätskonstanten, die oben schon erwähnte Permeabilität μ_r und die Volumenssuszeptibilität χ_v , sind dimensionslos.

Statt der magnetischen Polarisation B' wird im allgemeinen die Magnetisierung M , d.h. das magnetische Moment pro Volumeneinheit, angegeben:

$$B' = \mu_0 \cdot M \quad (2.9)$$

Hieraus folgt:

$$M = \chi_v \cdot H \quad (2.10)$$

H ist hier das externe Magnetfeld.

Der Magnetismus ist eine Folge der Bewegung der Elektronen um die Atomkerne. Bewegte Ladungen erzeugen Magnetfelder, so auch Elektronen. Alle Elektronen besitzen aufgrund des Spins ein magnetisches Spinmoment m_S , alle p-, d- und f-Elektronen außerdem aufgrund des Bahndrehimpulses ein magnetisches Bahndrehmoment. Die einzelnen Elektronen in Atomen, Ionen und Molekülen koppeln untereinander zu einem Gesamtdrehimpuls, woraus ein magnetisches Gesamtmoment resultiert. Ein externes Magnetfeld kann die Elektronen natürlich beeinflussen und eine Polarisierung der Materie hervorrufen.

2.6.1 Magnetische Eigenschaften der Materie

Der Magnetismus in Materie kann in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden: Diamagnetismus, Paramagnetismus, Ferromagnetismus, Antiferromagnetismus, Ferrimagnetismus und Superparamagnetismus. Sie sollen hier kurz erklärt werden.

2.6.1.1 Diamagnetismus

Diamagnetische Materialien verringern die magnetische Flußdichte in ihrem Inneren, wie oben bereits erwähnt. Eine Folge hiervon ist, daß sie aus einem inhomogenen Magnetfeld hinausgedrängt werden. Die Elektronenschalen in diamagnetischen Materialien sind gefüllt, es gibt keine ungepaarten Elektronen. Daher heben sich die magnetischen Momente gegenseitig auf. Die Permeabilität von diamagnetischen Stoffen ist kleiner als 1, die Volumenssuszeptibilität nimmt sehr kleine negative Werte an ($-10^{-4} \leq \chi_v \leq -10^{-5}$). Beispiele für diamagnetische Stoffe sind alle Edelgase oder Ionen mit abgeschlossenen Elektronenschalen, wie in NaCl. Die diamagnetischen Eigenschaften eines Stoffes setzen sich additiv aus den diamagnetischen Eigenschaften der einzelnen Atome, Ionen oder Bindungen zusammen.

Die diamagnetische Suszeptibilität ist von Magnetfeldstärke und Temperatur unabhängig.

2.6.1.2 Paramagnetismus

Paramagnetische Materialien erhöhen die magnetische Flußdichte in ihrem Inneren und werden von einem inhomogenen Magnetfeld angezogen. Die Elektronenzahl paramagnetischer Ionen oder Moleküle ist ungerade und die magnetischen Einzelmomente können sich nicht ausgleichen. Es resultiert ein permanentes magnetisches Gesamtmoment. Ohne ein äußeres Magnetfeld sind diese Molekularmagnete statistisch verteilt. Wird ein Magnetfeld angelegt, so richten sie sich parallel dazu aus, es entsteht ein Magnetfeld, das dem

äußeren Feld gleichgerichtet ist. Die Permeabilität von paramagnetischen Stoffen ist größer als 1, die Volumenssuszeptibilität nimmt positive Werte an ($10^{-5} \leq \chi_v \leq 10^{-3}$). Diese sind sehr klein, da die thermische Bewegung der vollständigen parallelen Ausrichtung der Dipole entgegenwirkt. Auch die paramagnetischen Eigenschaften eines Stoffes setzen sich additiv aus den paramagnetischen Eigenschaften der Atome, Ionen oder Bindungen zusammen.

Die paramagnetische Suszeptibilität ist ebenfalls unabhängig von der Feldstärke, ihre Temperaturabhängigkeit läßt sich im Curie-Weiss'schen Gesetz formulieren:

$$\chi = \frac{C}{T - \Theta} \quad (2.11)$$

C heißt Curie-Konstante, sie ist materialspezifisch, Θ ist die paramagnetische Curie-Temperatur und T die Temperatur. Nach dieser Gleichung ist auch die Magnetisierung M umgekehrt abhängig von der Temperatur:

$$M = \frac{C}{T - \Theta} \cdot H \quad (2.12)$$

Aus dieser Gleichung geht auch hervor, daß die Magnetisierung nur vorliegt, solange ein Magnetfeld angelegt ist.

2.6.1.3 Ferromagnetismus, Antiferromagnetismus und Ferrimagnetismus

Die drei Erscheinungsformen des Magnetismus Ferromagnetismus, Antiferromagnetismus und Ferrimagnetismus beruhen darauf, daß die Atome oder Ionen nicht mehr isoliert voneinander vorliegen, sondern auch untereinander koppeln können. Die Suszeptibilität und die Magnetisierung hängen von der Feldstärke und der Temperatur ab.

In Ferromagneten richten sich die magnetischen Momente innerhalb kleiner Bereiche im Festkörper, sogenannter „Weiss'scher Bezirke“, spontan parallel aus. Die magnetischen Momente aller Weiss'schen Bezirke kompensieren sich aber, so daß keine Magnetisierung resultiert. Wird nun ein externes Magnetfeld angelegt, so richten sich die einzelnen Bezirke parallel zu diesem Feld bis zur Sättigungsmagnetisierung M_S aus. Wenn das Feld wieder entfernt wird, bleibt die parallele Ausrichtung der Momente und damit die Magnetisierung bestehen, man spricht von einem „magnetischen Gedächtnis“ dieses Materials. In Abbildung 2.19 ist die Abhängigkeit der Magnetisierung von einem angelegten Magnetfeld gezeigt. An das entmagnetisierte Material wird ein Magnetfeld angelegt, die Magnetisierung des Ferromagneten steigt bis zur Sättigungsmagnetisierung M_S (Neukurve). Wird dann das Magnetfeld wieder reduziert, so geht die Magnetisierung nicht auf Null zurück, sondern es bleibt eine Restmagnetisierung zurück, die Remanenz M_r . Die Feldstärke, die notwendig ist, um die Magnetisierung wieder auf Null zu bringen, heißt Koerzitivfeldstärke H_c .

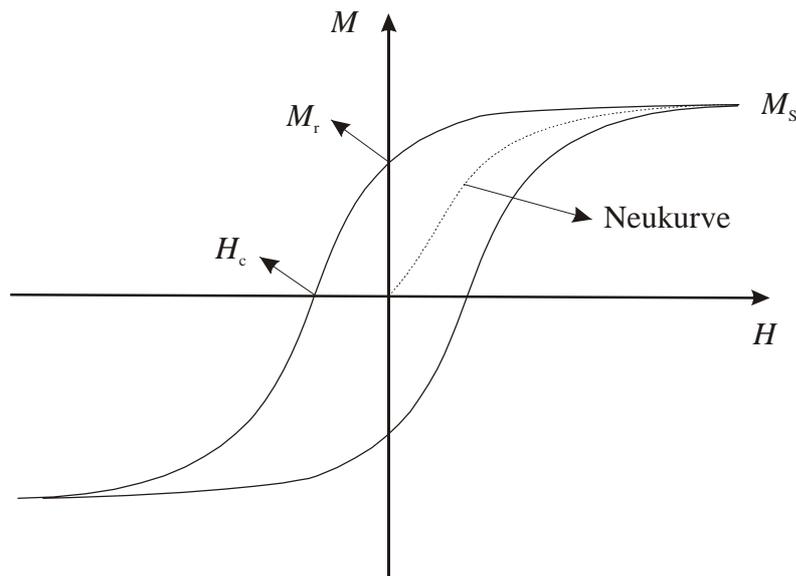


Abbildung 2.19 Hystereseschleife eines Ferromagneten.

Oberhalb der stoffspezifischen ferromagnetischen Curie-Temperatur verhalten sich auch Ferromagneten wie Eisen oder Gadolinium paramagnetisch.

In Antiferromagneten wie FeO oder α -Fe₂O₃ sind die Spins innerhalb der Weisschen Bezirke antiparallel ausgerichtet. Man kann die Teilchen mit paralleler magnetischer Ausrichtung in Gitter einteilen, so daß zwei Untergitter entstehen, die sich ohne externes Feld vollständig kompensieren. Am absoluten Nullpunkt besitzen Antiferromagneten eine kleine paramagnetische Suszeptibilität. Mit steigender Temperatur nimmt diese durch thermische Störung der Ordnung zu, durchläuft dann ein Maximum bei der sogenannten Néel-Temperatur T_N und nimmt dann nach dem Curie-Weiss-Gesetz wie bei einem Paramagneten ab.

Auch in Ferrimagneten lassen sich die magnetischen Momente gemäß ihrer Ausrichtung in Untergitter einteilen, doch kompensieren sie sich nicht, und es bleibt ein resultierendes Moment übrig. Ferrimagneten zeigen ein ähnliches Verhalten wie Ferromagneten, auch hier wird eine Magnetisierung erst nach Anlegen eines externen Magnetfeldes sichtbar.

Ferrimagnetismus tritt in Ferriten auf, daher der Name. Magnetit ist ein Ferrit der Zusammensetzung FeO · Fe₂O₃ oder Fe³⁺[Fe²⁺Fe³⁺]O₄ und besitzt inverse Spinell-Struktur: Die Sauerstoff-Atome sind kubisch-flächenzentriert angeordnet, die Oktaederlücken werden von Fe³⁺-Ionen besetzt, die Tetraederlücken zu gleichen Teilen von Fe²⁺ und Fe³⁺-Ionen.

2.6.1.4 Superparamagnetismus

Koerzitivfeldstärke und Remanenz (siehe Abbildung 2.19) ändern sich mit der Teilchengröße. Große Teilchen sind in mehrere Weissche Bezirke eingeteilt. Um in solchen Teilchen die Magnetisierung zu ändern, müssen nur die Wände zwischen den Bezirken, die Bloch-Wände, verschoben werden, was ein energetisch einfacher Prozess ist. Solche Materialien weisen kleine Koerzitivfeldstärken- und Remanenz-Werte auf und werden als magnetisch weich bezeichnet (siehe Abbildung 2.20). Werden die Teilchen kleiner, so bestehen sie nur noch aus einem einzigen Bezirk, sie sind „Eindomänen-Teilchen“. Um die Magnetisierung zu ändern, müssen die magnetischen Momente gedreht werden, was einen energetisch sehr aufwändigen Prozess darstellt. Daher sind Koerzitivfeldstärke und Remanenz auch hoch, und man spricht von magnetisch harten Materialien. Die Hysterese-Kurve von magnetisch harten Stoffen ist sehr breit.

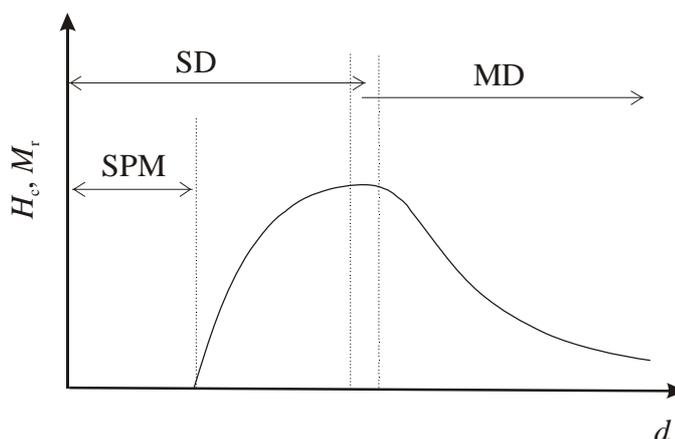


Abbildung 2.20 Änderung der Koerzitivfeldstärke und der Remanenz mit der Teilchengröße; SPM: Superparamagnetismus, SD: „single domain“-Teilchen, MD „multi domain“-Teilchen.

Geht man nun über zu noch kleineren Teilchen, so gehen Koerzitivfeldstärke und Remanenz gegen den Wert Null. Die Magnetisierungskurve ähnelt der eines Paramagneten, es gibt keine Hysterese mehr, und ohne externes Magnetfeld ist keine Magnetisierung zu beobachten. Der Unterschied liegt aber im magnetischen Moment. Da bei einem Superparamagneten sehr viele Atome zum Moment beitragen, ist dieses sehr viel größer als bei einem Paramagneten, daher auch der Ausdruck *Superparamagnet*.

Vor den Verdienst setzten den Schweiß die Götter.

Hesiod

Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Methoden zur Charakterisierung der Latices beschrieben. Es werden die dynamische Lichtstreuung, die Transmissionselektronenmikroskopie, die Oberflächenladungsbestimmung und das SQUID erklärt.

3.1 Dynamische Lichtstreuung

Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Teilchengröße und ihrer Verteilung in kolloidalen Systemen ist die dynamische Lichtstreuung (DLS, dynamic light scattering) oder auch Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS, photon correlation spectroscopy). Bei dieser Methode wird die Intensität des Streulichts einer Laserquelle gemessen. Die Zahl der in einem bestimmten Streuwinkel \mathcal{G} gestreuten Photonen wird gemessen.

Kolloidale Teilchen sind durch die Brown'sche Molekularbewegung nicht statisch, und das Streulicht erfährt entsprechend des Doppler-Effektes eine Frequenzverschiebung. Die Halbwertsbreite Γ der spektralen Verteilung ist proportional dem translatorischen Diffusionskoeffizienten D_T . Da diese sehr klein ist, kann man sie nicht direkt auflösen, sondern muß sie nach dem *Wiener-Khintschin*-Theorem umrechnen: Durch eine Fourier-Transformation kann die Frequenzverteilung $I(\omega)$ in eine Autokorrelationsfunktion $g(t)$ im reziproken Raum umgewandelt werden.

Bei der dynamischen Lichtstreuung, wie sie in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt ist, wird die Intensität des Streulichts in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Intensität zum Zeitpunkt t , $I(t)$, wird mit der Intensität zum Zeitpunkt $t+\tau$, $I(t+\tau)$, verglichen, und dadurch eine Korrelation erstellt: Ist τ sehr groß, so sind beide Intensitäten unabhängig voneinander, bei

kleinem τ besteht eine enge Beziehung. Die Korrelation ist ein Maß dafür, wie weit sich ein Teilchen im Zeitraum τ bewegt hat: Je weiter die Bewegung, desto kleiner wird die Korrelation. Kleine Teilchen bewegen sich schnell, die Korrelation nimmt schnell ab, große Teilchen bewegen sich langsam, und die Korrelation nimmt langsam ab. Für monodisperse, kugelförmige Teilchen ohne gegenseitige Wechselwirkung ist die Korrelationsfunktion $g(t)$ eine einfache exponentielle Funktion:

$$g(t) = A \cdot \exp(-q^2 D t) \quad (3.1)$$

q heißt Streulichtvektor.

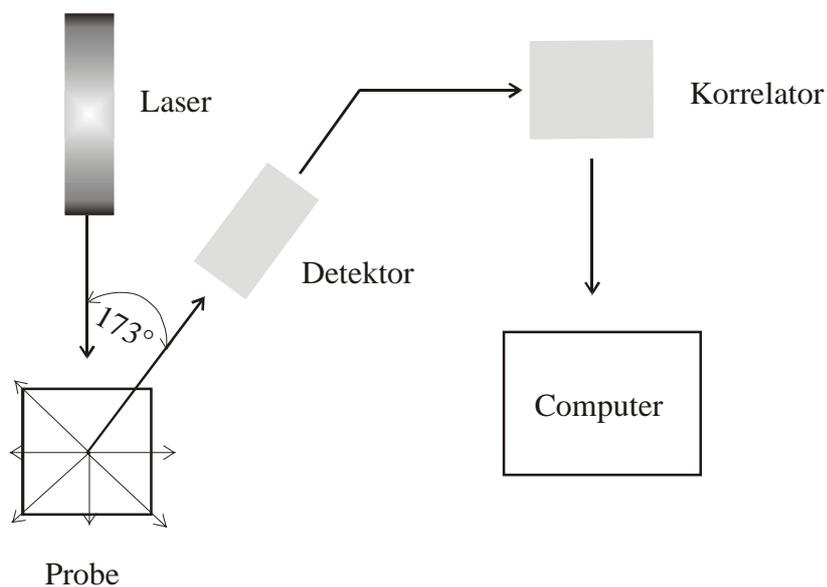


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau eines DLS-Gerätes.

Aus der Korrelationsfunktion ist der Diffusionskoeffizient bestimmbar, mit dem sich über die Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Durchmesser berechnen läßt:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \eta r_H} \quad (3.2)$$

Dabei ist k_B die Boltzmann-Konstante, η die Viskosität und T die Temperatur in Kelvin.

3.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Da Nanopartikel kleiner als die Wellenlänge des Lichts sind, können sie in einem optischen Lichtmikroskop nicht mehr abgebildet werden. Man nutzt daher den Wellencharakter von Elektronen, um sehr kleine Teilchen in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) abbilden zu können.

Der Aufbau eines TEM's ist dem eines Lichtmikroskops sehr ähnlich. In Abbildung 3.2 ist der Vergleich schematisch gezeigt. Statt der Lichtquelle wird im Elektronenmikroskop eine Elektronenquelle benutzt. Die Elektronen werden mit Spannungen zwischen 60 und 200 kV beschleunigt. Die optischen Linsen im Lichtmikroskop werden von magnetischen „Linsen“ ersetzt, die den Strahl fokussieren. Das Bild wird auf einem Fluoreszenzschirm abgebildet.

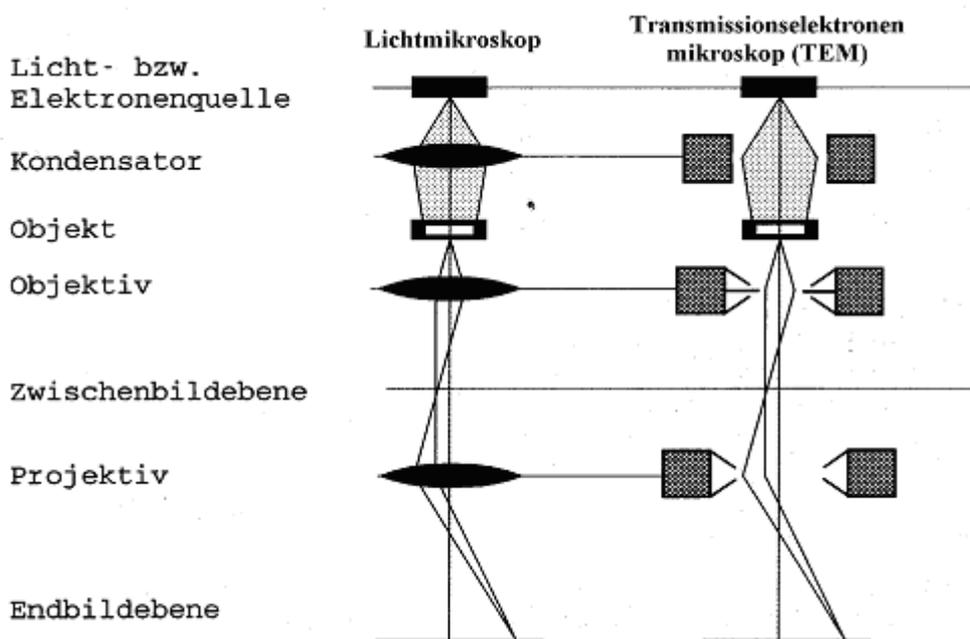


Abbildung 3.2 Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops, verglichen mit dem Aufbau eines Lichtmikroskops.^[111]

Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Mikroskopen ist, daß im TEM Hochvakuum herrschen muß, damit der Elektronenstrahl nicht durch Stöße mit Gasteilchen abgelenkt wird.

Eine Erhöhung der Beschleunigungsspannung dient der Verbesserung der Auflösung. Nach de Broglie ist die Wellenlänge eines Teilchens:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m \cdot v} \quad (3.3)$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum, p der Impuls, m die Ruhemasse und v die Geschwindigkeit.

Das Auflösungsvermögen d ist nach Abbé gegeben durch:

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \quad (3.4)$$

wobei n der Brechungsindex zwischen Objektiv und Probe und α der Öffnungswinkel ist.

Mit dem Transmissionselektronenmikroskop können Objekte bis zum 100 000fachen vergrößert werden und bis zu 0,1 nm aufgelöst werden.

Das Bild im Transmissionselektronenmikroskop entsteht durch Beugung: an Stellen mit viel Materie im Objekt werden die Elektronen abgelenkt und gelangen nicht durch das Objektiv auf den Schirm; an Stellen mit viel Materie ist der Schirm also hell, an Stellen mit wenig Materie ist der Schirm dunkel. Der Kontrast entsteht durch Massendicke- und Elektronendichtedifferenz. Wegen der starken Wechselwirkung der Elektronen mit Materie können nur dünne Schichten bis 100 nm durchstrahlt werden.

3.3 Oberflächenladungsbestimmung

Für die Bestimmung der Oberflächenladungen können zwei Verfahren angewendet werden. Zum einen ist dies die Bestimmung des ζ -Potentials, was nur Vergleiche zwischen zwei verschiedenen Proben zulässt, zum anderen die Oberflächenladungsdetektion, mit der die genaue Konzentration an Ladungen auf der Partikeloberfläche bestimmt werden kann. Beide Verfahren beruhen auf der Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht um ein geladenes Teilchen im protischen Dispersionsmedium, indem sich Gegenionen um die Oberfläche anlagern, um die Elektroneutralität zu wahren.

3.3.1 ζ -Potentialmessungen

Die Grundlage für die ζ -Potentialmessungen ist das Prinzip der Elektrophorese. Partikel bewegen sich aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes in einem Medium, in diesem Fall Wasser. Die Messung der Geschwindigkeit dieser Bewegung erlaubt Rückschlüsse auf die Ladung der Teilchen: je höher die Ladung, desto höher ist die Geschwindigkeit der Teilchen. Bei der Bewegung wird die elektrochemische Doppelschicht um das Teilchen abgestreift, es resultiert eine Ladung, die als ζ -Potential gemessen wird. Die Bewegung der Teilchen kann mikroskopisch verfolgt werden, eine elegantere Möglichkeit ist die Verfolgung mittels eines Laserstrahls. Der schematische Aufbau für diese Messung ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Die Teilchen werden einem elektrischen Wechselfeld ausgesetzt. Ein einfallender Laserstrahl wird an den sich bewegenden Teilchen gestreut, wobei sich nach dem Laser-Doppler-Effekt die Frequenz des gestreuten Lichts ändert. Aus dieser Frequenzänderung kann auf die Geschwindigkeit der Teilchen zurückgerechnet werden. Aus dieser Geschwindigkeit wird das ζ -Potential berechnet. Für die meisten Fälle gilt die Helmholtz-Smoluchowski-Näherung:

$$\zeta = \frac{v}{\eta \cdot \varepsilon \cdot E} \quad (3.5)$$

Dabei ist ζ das ζ -Potential, v die Geschwindigkeit der Teilchen im elektrischen Wechselfeld, η die Viskosität des Mediums, ε die Dielektrizitätskonstante und E die elektrische Feldstärke.

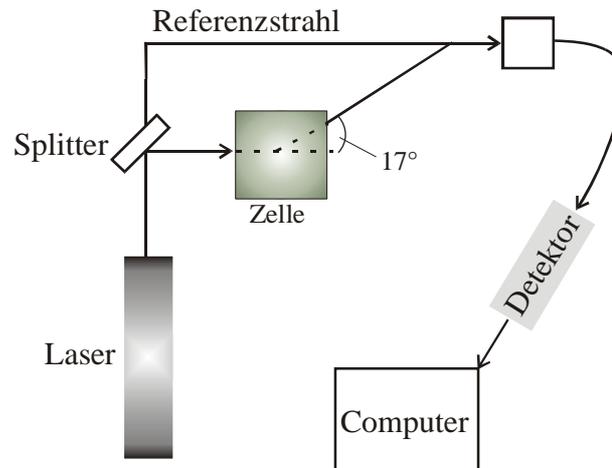


Abbildung 3.3 Schematischer Aufbau einer ζ -Potentialmessung.

3.3.2 Partikelladungsdetektion

Für die Partikelladungsdetektion wird ein Strömungspotential aufgebaut, das sich bildet, wenn das Dispersionsmedium unter Druck an den Teilchen vorbeifließt. Hierfür wird die Dispersion in ein Kunststoffrohr gefüllt, in dem sich ein Kolben schnell auf- und abbewegt (siehe Abbildung 3.4). Die Teilchen adsorbieren an der Gefäßwand, durch die Bewegung des Kolbens wird das Dispersionsmedium an den Teilchen vorbei bewegt. Ladungen aus der Doppelschicht werden in der Flüssigkeit fortgetragen, wobei ein elektrisches Feld aufgebaut wird. Das nach Ausbildung eines Gleichgewichts gemessene Potential wird als Strömungspotential bezeichnet.

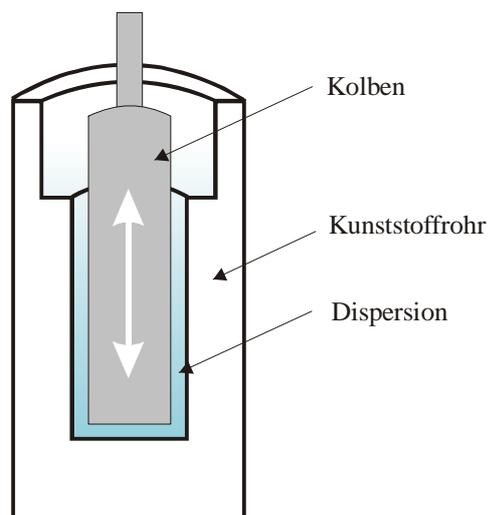


Abbildung 3.4 Aufbau eines Strömungspotentials bei der Partikelladungsdetektion durch Bewegung eines Kolbens in der Dispersion.

Aus diesem Strömungspotential wird durch klassische Titration die Oberflächenladung bestimmt. Als Titrator wird ein Polyelektrolyt, zum Beispiel Poly-Diallyldimethylammoniumchlorid (Poly-DADMAC) verwendet. Dessen Strukturformel ist in Abbildung 3.5 gezeigt. Das Meßergebnis ist der Verbrauch an Polyelektrolytlösung, das Strömungspotential hat die Funktion der Endpunktsbestimmung. Bei der Titration wird ein sogenannter Symplex gebildet, ein Komplex aus Polyanion (hier die geladenen Teilchen) und Polykation (hier der Polyelektrolyt). Während der Titration kommt es zu einer Änderung des Strömungspotentials zu kleineren Beträgen aufgrund der fortschreitenden Symplexbildung. Bei einem gemessenen Strömungspotential von 0 mV wird die Titration gestoppt. Auf Basis der Annahme einer 1:1-Stöchiometrie bei der Ladungsneutralisation kann aus dem Verbrauch an Polyelektrolytlösung die Konzentration der Oberflächenladungen berechnet werden nach:

$$c = \frac{c_0 \cdot V}{V_0} \quad (3.6)$$

Dabei ist c die Konzentration der Ladungen im Titranden, V das Volumen des Titranden, c_0 die Konzentration der Ladungen im Titrator und V_0 das Volumen des Titrators.

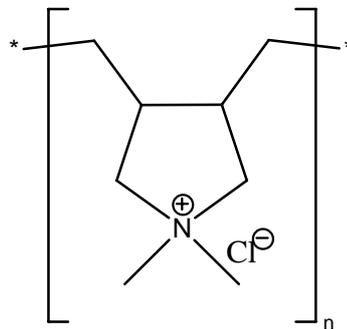


Abbildung 3.5 Strukturformel des Polyelektrolyten Poly-DADMAC.

3.4 SQUID-Messungen

SQUID ist die Abkürzung für Superconducting Quantum Interference Device (Supraleitende Quanteninterferenzeinheit). Mit dem SQUID lassen sich sehr präzise kleinste Magnetfeldänderungen bis zu 10^{-5} T messen.

Das Gerät besteht aus einer mit flüssigem Helium gekühlten supraleitenden Spule mit Josephson-Kontakten, durch die aufgrund von Tunneleffekten ein Suprastrom fließen kann. Die Josephson-Kontakte sind sehr dünne Unterbrechungen aus normal leitendem oder elektrisch isolierendem Material. Innerhalb der Spule befindet sich die Probe.

Während der Messung wird die Probe durch die Spule bewegt, was in der supraleitenden Spule einen Gegenstrom I zum angelegten Strom I_0 induziert, der das Magnetfeld im Inneren so abschirmt, dass die Quantenbedingung:

$$\phi = n \cdot \phi_0 \quad (3.7)$$

erfüllt ist. ϕ ist die magnetische Flußdichte, n ist eine ganze natürliche Zahl, und ϕ_0 das magnetische Flußquant $\phi_0 = \frac{h}{2 \cdot e}$ mit e als der Elementarladung. Dieser Strom ist abhängig von ϕ und verhält sich wie eine Cosinus-Funktion. Sobald ein kritischer Strom $I = I_c$ fließt, wird die Spule normalleitend. Auch der kritische Strom ist von ϕ periodisch abhängig. Er wird maximal für $\phi = n \cdot \phi_0$ und ist minimal für $\phi = \left(n + \frac{1}{2}\right) \cdot \phi_0$. Wird in der Spule ein konstanter Strom $I_0 > I_c$ angelegt, so ändert sich der Spannungsabfall ΔU mit dem magnetischen Fluß. Daraus kann auf die Magnetisierung der Probe geschlossen werden.

Sehr empfindliche Messungen können durchgeführt werden, indem zwei Josephson-Kontakt parallel geschaltet werden. Der angelegte Strom wird vor den Kontakten geteilt und danach wieder vereinigt. Durch das die Spule durchdringende Magnetfeld kommt es zu einer Phasendifferenz δ .

$$\delta = \frac{2 \cdot e}{h} \cdot \phi \quad (3.8)$$

und der Suprastrom variiert mit dem magnetischen Fluß durch die Probe. Theoretisch kann mit dieser Anordnung ein einzelnes Flußquant detektiert werden, was einer Änderung des magnetischen Flusses von $2,15 \cdot 10^{-7} \text{ Tm}^{-2}$ entspricht.

Um die Supraleitung in der Spule zu gewährleisten, die meist aus Niob hergestellt ist, muß das SQUID im Betrieb mit flüssigem Helium gekühlt werden. Niob ist bei einer Temperatur von 9,2 K supraleitend.

Man muß die Welt nicht verstehen - man muß sich darin zurechtfinden!

(Albert Einstein)

In diesem Kapitel werden die Synthese und Charakterisierung von fluoreszierenden und magnetischen Polymerpartikeln beschrieben und die erzielten Ergebnisse diskutiert. Als Polymere wurden Polystyrol, Polyurethan und Epoxidharze verwendet; der Fluoreszenzfarbstoff ist ein Perylenmonoimid, das verkapselte magnetische Material sind Magnetit-Nanopartikel.

4.1 Fluoreszierende Polystyrol-Nanopartikel

Zunächst wurden als Modellpartikel funktionalisierte Polystyrol-Partikel hergestellt, anhand derer die Aufnahme in Zellen untersucht werden sollte. Diese Partikel tragen zum Nachweis der Zellaufnahme einen fluoreszierenden Marker, den Fluoreszenzfarbstoff Perylenmonoimid (PMI), dessen Strukturformel in Abbildung 4.1 gezeigt ist. Die Funktionalisierung der Oberfläche wird durch Copolymerisation des Styrols mit funktionellen Monomeren erreicht. Hierfür wurde zum einen Acrylsäure verwendet, wodurch die Partikel später Carboxylgruppen auf der Oberfläche tragen, zum anderen Glycidylmethacrylat, wodurch eine Oberflächenfunktionalisierung mit Glycidylgruppen erreicht wird. Die hergestellten Polymer-Dispersionen sind in Bezug auf Teilchengröße, Anzahl der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche und Gehalt des Fluoreszenzfarbstoffes untersucht worden.

An die Carboxylgruppen und Glycidylgruppen der Teilchen können über ihre Aminofunktion Biomoleküle gekoppelt werden, wie Aminosäuren oder Antikörper (siehe Kapitel 4.3). Durch diese Modifizierung der Oberfläche kann die Zellaufnahme verändert, im besten Fall optimiert werden, außerdem können die Partikel im Hinblick auf Zellaufnahme spezifisch werden. Durch Kopplung bestimmter Antikörper kann es möglich sein, daß die Partikel nur von ausgewählten Zelltypen aufgenommen werden.

4.1.1 Fluoreszierende Poly(Styrol-co-Acrylsäure)-Nanopartikel

Die fluoreszierenden Polystyrolpartikel wurden über den Prozess der Miniemulsionspolymerisation hergestellt. Die Ölphase besteht aus Styrol, Acrylsäure, dem Fluoreszenzfarbstoff PMI und Hexadecan, die wässrige Phase ist eine wässrige Lösung des Tensids SDS. Das Verhältnis der Monomeren wurde variiert (0 - 20% Acrylsäure), die Menge an Fluoreszenzfarbstoff konstant bei ca. 0,5 mg pro g Polymer gehalten, wobei die tatsächlich eingebaute Menge später quantifiziert werden kann. Es wurde eine Reihe funktionalisierter Polystyrol-Partikel hergestellt, die auf der Oberfläche unterschiedliche Mengen an Carboxylgruppen tragen sollten. Die Polymerisation erfolgte bei 72 °C über Nacht. In Tabelle 4.1 sind die eingesetzten Mengen an Monomeren aufgelistet. In Tabelle 4.2 sind die Eigenschaften der Partikel aufgelistet.

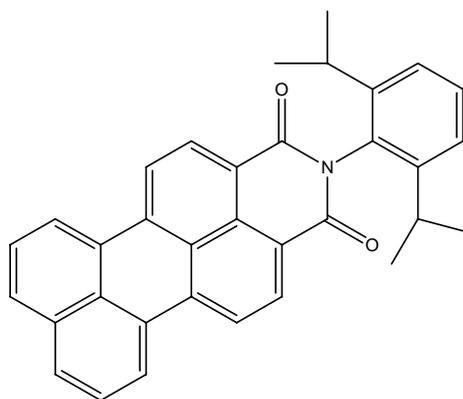


Abbildung 4.1 Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes PMI.

Tabelle 4.1 Die Mengen der eingesetzten Monomere für die Synthese fluoreszierender Polystyrol-Nanopartikel.

Probenname	Menge Styrol [g]	Menge Acrylsäure [g]	Anteil Acrylsäure [%]
VHPM0	6	0	0
VHPM1	5,94	0,06	1
VHPM2	5,88	0,12	2
VHPM3	5,82	0,18	3
VHPM5	5,7	0,3	5
VHPM10	5,4	0,6	10
VHPM15	5,1	0,9	15
VHPM20	4,8	1,2	20

Die Dispersionen waren stabil, keine Probe zeigte nach der Polymerisation Agglomeratbildung. Der Feststoffgehalt nach der Polymerisation war jeweils ca. 20%, in der Reaktionsmischung konnte kein Monomer mehr nachgewiesen werden, was bedeutet, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war. Die Dispersionen zeigen eine leicht rosafarbene Färbung und deutliche Fluoreszenz im UV-Licht. Abbildung 4.2 zeigt eine Aufnahme von fluoreszierenden Styrol-Nanopartikel-Dispersionen unter Tageslicht und UV-Licht.

Tabelle 4.2 Eigenschaften der fluoreszierenden Polystyrol-Partikel.

Probenname	Partikelgröße $D^a)$ [nm]	PDI ^{a)}	Feststoffgehalt [%]	ζ -Potential bei pH 6 [mV]
VHPM0	101	0,003	20,13	-20
VHPM1	99	0,038	19,39	-50
VHPM2	98	0,039	19,65	-59
VHPM3	100	0,054	20,08	-62
VHPM5	97	0,030	19,95	-64
VHPM10	103	0,076	20,34	-51
VHPM15	148	0,019	20,46	-42
VHPM20	150	0,157	20,05	-59

a) bestimmt aus DLS-Messungen.

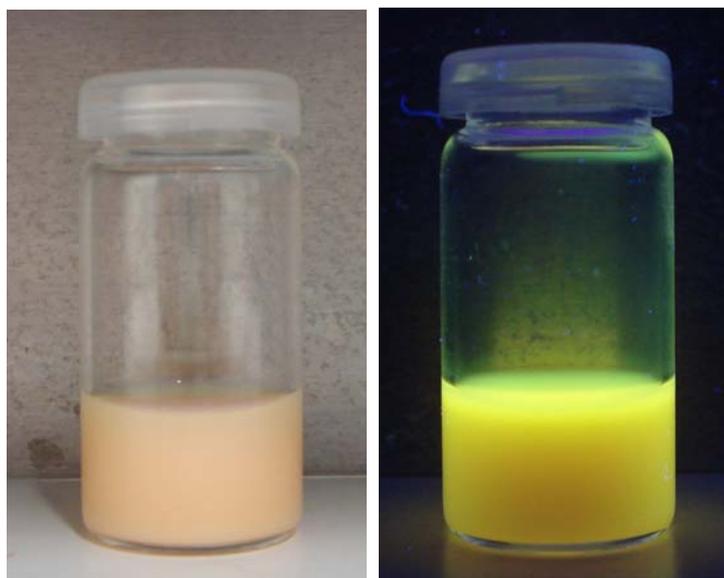


Abbildung 4.2 Fluoreszierender Polystyrol-Latex im Tageslicht (links) und unter UV-Licht (rechts)

Die DLS-Messungen zeigten, daß die Dispersionen monodispers bezüglich der Größenverteilung sind: Die PDI-Werte liegen bei 0,1 oder deutlich darunter. Gleichzeitig ist zu erkennen, daß sich die Teilchengrößen der Proben bis zu einem Acrylsäuregehalt von 10% nicht ändern, sie liegen alle bei ca. 100 nm. Die Werte für die Proben mit 15% und 20% Acrylsäure liegen jedoch um 50% höher bei 150 nm. Die Erklärung hierfür liegt in der Synthese. Da Acrylsäure copolymerisiert wird, ist der pH-Wert umso niedriger, je höher die Konzentration an funktionellem Monomer ist. Bei niedrigeren pH-Werten polymerisiert Acrylsäure schneller, dadurch werden längere Polyacrylsäure-Ketten an der Polymer/Wasser-Grenzfläche gebildet, was zum Quellen der Partikel durch eine „haarige“ Struktur führt. Durch dieses Aufquellen der Partikel wird ein größerer hydrodynamischer Durchmesser gemessen.

Ein Vergleich mit TEM-Aufnahmen (siehe Abbildung 4.3) bestätigt dies: Im getrockneten Zustand sind die Partikel deutlich kleiner, jedoch mit 110 nm immer noch um ca. 35% größer als VHPM10 (80 nm). Hier bestätigt sich die Annahme der Bildung einer haarigen Acrylsäure-Schicht auf der Partikel-Oberfläche, die zum Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers führt. Beim Trocknen der Dispersion kollabiert die Schicht, und die Partikel sind kleiner. Auf den TEM-Aufnahmen ist auch deutlich die Monodispersität der Partikel zu sehen, besonders in den Aufnahmen der Proben VHPM1 und VHPM10. Die Partikel ordnen sich dichtest gepackt an, was zu einem hexagonalen Muster führt. Dies ist nur möglich, wenn die Teilchen gleich groß sind.

Das ζ -Potential wurde bei pH 6 gemessen, nachdem das Tensid SDS zu 95% von der Teilchenoberfläche gewaschen worden war. Das Waschwasser wies am Ende des Waschprozesses eine Leitfähigkeit von weniger als 3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ auf. Die ζ -Potential-Messungen zeigen, daß auch der Latex VHPM0 eine Oberflächenladung trägt, obwohl im System keine Acrylsäure vorhanden ist. Das ist ein guter Hinweis darauf, daß SDS nicht vollständig abgewaschen werden konnte. Der negative Beitrag des neutralen Latex VHPM0 muß von den Sulfat-Gruppen des SDS stammen, da auch durch den öllöslichen Initiator AIBN keine anionischen Gruppen in das Polymer eingebracht werden. Daß für die weiteren Latices kein Anstieg des ζ -Potentials beobachtet wird, liegt nicht nur an vorhanden Tensidmolekülen, sondern auch an der Messung selbst. Da die Wanderung der Teilchen im elektrischen Feld gemessen wird, spielt auch die Teilchengröße eine Rolle, die in dieser Meßreihe nicht konstant bleibt.

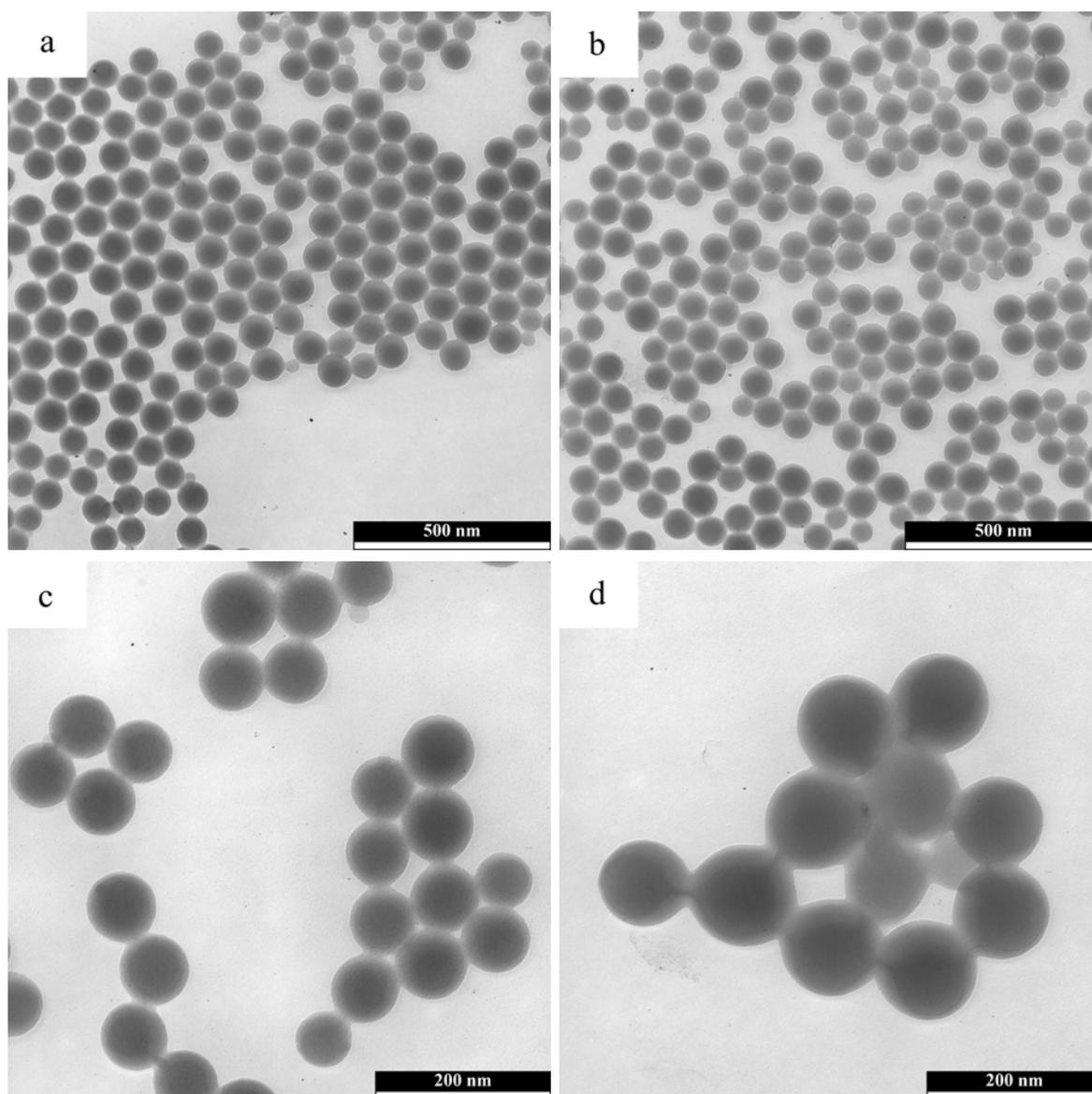


Abbildung 4.3 TEM-Aufnahmen der Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure)-Partikel: a) VHPM1 b), c) VHPM10 (verschiedene Vergrößerungen) d) VHPM15.

In Tabelle 4.3 und in Abbildung 4.4 sind die Oberflächenladungen bei pH 6 und 9 aufgelistet, die Messungen bei pH 2 dienten nur zur Auswertung: Die Differenz aus den Werten bei pH 6 bzw. pH 9 (Detektion von Carboxylgruppen und Sulfatgruppen aus SDS) und den Werten bei pH 2 (nur Sulfatgruppen aus SDS) ergibt die Anzahl der Carboxylgruppen auf der Oberfläche. Es ist deutlich zu erkennen, daß mit ansteigendem Acrylsäure-Gehalt wie zu erwarten die Oberflächenladung zunimmt. Gleichzeitig nimmt der prozentuale Anteil der Carboxylgruppen an der Oberfläche ab. Dieser Anteil wurde aus der Titration bei pH 9 bestimmt. Bei pH 9 sind die Carboxylgruppen vollständig deprotoniert und nachweisbar. So kann durch Vergleich der Titrationsergebnisse und der Einwaage bestimmt werden, welcher Anteil der eingesetzten Acrylsäure sich tatsächlich an der Partikeloberfläche befindet. Während sich bei einem

Acrylsäuregehalt von 1% noch fast 90% aller Carboxylgruppen der eingesetzten Acrylsäure an der Teilchenoberfläche befinden, sinkt dieser Wert mit zunehmendem Acrylsäuregehalt, bis er bei Acrylsäuregehalten von 10% und höher konstant bei ca. 25% bleibt. Da nach der Polymerisation keine freie unreaktierte Acrylsäure oder Polyacrylsäure mehr in der wässrigen Phase nachgewiesen werden kann, befindet sich der Rest im Teilcheninneren. Acrylsäure hat durch die Carboxylgruppe hydrophilen Charakter und lagert sich soweit möglich an der Grenzfläche Styrol/Wasser an, wo sie dann auch in das Polymer eingebaut wird. Dennoch ist Acrylsäure in Styrol gut löslich, hat also vor allem bei niedrigen pH-Werten auch hydrophoben Charakter. Ist die Tröpfchen- oder Partikeloberfläche durch eine ausreichend große Menge Acrylsäure abgesättigt, so ist es möglich, daß sich Acrylsäure innerhalb der Styroltröpfchen befindet und auch innerhalb dieser Tröpfchen polymerisiert. Dadurch werden nicht alle Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche gefunden, ein Teil geht im Teilcheninneren verloren.

Für Zellversuche von Interesse ist der genaue Gehalt an PMI in den Teilchen, da über die Fluoreszenz die Aufnahme in Zellen quantifiziert wird. Mit Hilfe von UV-Spektroskopie wurde dieser Gehalt ermittelt. Abbildung 4.5 zeigt das UV-Spektrum von PMI in THF. Dieses Spektrum zeigt zwei charakteristische Peaks. Das Maximum bei 479 nm wird zur Auswertung herangezogen. Durch Messungen verschiedener Konzentrationen an PMI in THF wurde eine Kalibriergerade erstellt, aus der die PMI-Gehalte der vermessenen Latices bestimmt wurden.

Bei der Herstellung der Latices wurden ca. 3 mg Farbstoff auf 6 g Monomer eingewogen. Das würde einem Gehalt an Farbstoff von $0,5 \text{ mg/g}_{\text{Polymer}}$ entsprechen. Eine genaue Quantifizierung ist jedoch unerlässlich. Für die Bestimmung der PMI-Gehalte der Polymer-Latices wurden diese getrocknet und in THF gelöst. Von diesen Lösungen wurden UV-Spektren aufgenommen. Abbildung 4.6 zeigt das typische Spektrum eines fluoreszierenden Latex. Die Absorption unterhalb von 400 nm ist auf Polystyrol zurückzuführen. Die Absorption bei 479 nm wird abgelesen und daraus mit Hilfe der Kalibriergeraden der Gehalt an PMI pro ml und pro g Polymer errechnet. In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse angegeben. Bei fast allen Latices wird der theoretische PMI-Gehalt, der bei $0,5 \text{ mg/g}_{\text{Polymer}}$ liegt, annähernd erreicht. Da der Umsatz der Polymerisation bei 100% liegt und keine Agglomeration beobachtet wurde, war diese Beobachtung auch zu erwarten. Der geringere Gehalt an PMI in VHPM0 ist auf Ungenauigkeiten bei der Einwaage zurückzuführen. Aus Feststoffgehalt und Teilchengröße kann ebenso die Anzahl der PMI-Moleküle pro Partikel berechnet werden (siehe Tabelle 4.4).

Tabelle 4.3 Oberflächenladungen der fluoreszierenden Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure)-Latices.

Probenname	Anzahl der Carboxylgruppen						Anteil der Carboxylgruppen auf der Oberfläche ^{c)} [%]
	pro Partikel	pro nm ²	pro Partikel	pro nm ²	pro Partikel	pro nm ²	
	pH 2 ^{a)}		pH 6 ^{b)}		pH 9 ^{b)}		
VHPM0	7945	0,25	0	0	0	0	0
VHPM1	5303	0,17	5864	0,19	37485	1,23	89
VHPM2	9761	0,33	9266	0,31	68609	2,30	84
VHPM3	8410	0,27	12275	0,39	86570	2,72	66
VHPM5	11816	0,4	11847	0,40	79818	2,77	41
VHPM10	5918	0,18	21733	0,66	99407	3,01	21
VHPM15	_a)	_a)	150844	2,19	568066	8,23	27
VHPM20	_a)	_a)	317821	4,48	713832	10,07	24

^{a)} Die Messung bei pH 2 dient der Berechnung der Oberflächenladungen. Hier werden nur die Ladungen des Tensids gemessen. Die Latices VHPM15 und VHPM20 sind bei pH 2 nicht stabil, daher wird zur weiteren Berechnung ein Mittelwert aus allen anderen Ergebnissen gebildet.

^{b)} Die Werte sind um den Beitrag des Tensids zur Oberflächenladung korrigiert.

^{c)} berechnet aus den ermittelten Werten der Oberflächenladung bei pH 9.

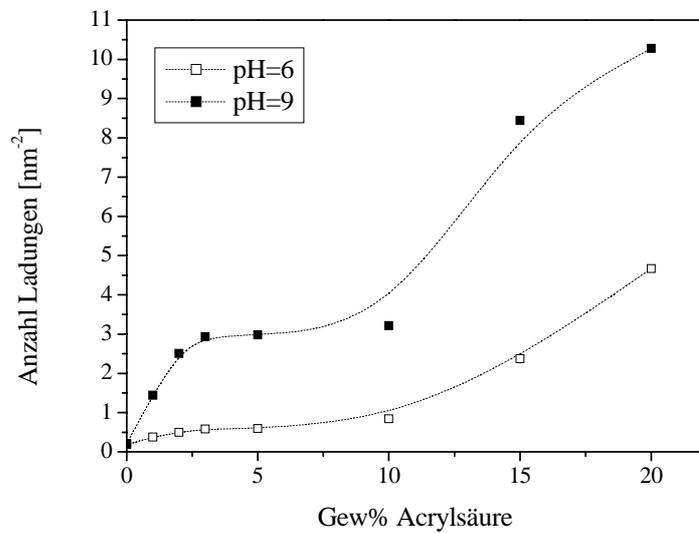


Abbildung 4.4 Oberflächenladung in Abhängigkeit von der Acrylsäure-Konzentration bei pH 6 und pH 9. pH 6 ist der biomedizinisch interessante Wert, während bei pH 9 alle Carboxylgruppen deprotoniert sind und die gesamte Menge an Acrylsäure auf der Oberfläche bestimmt werden kann.

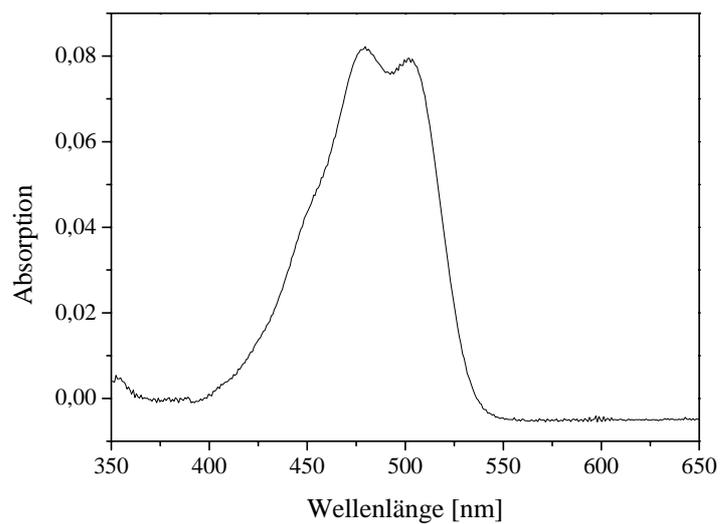


Abbildung 4.5 UV-Spektrum des Fluoreszenzfarbstoffes PMI in THF.

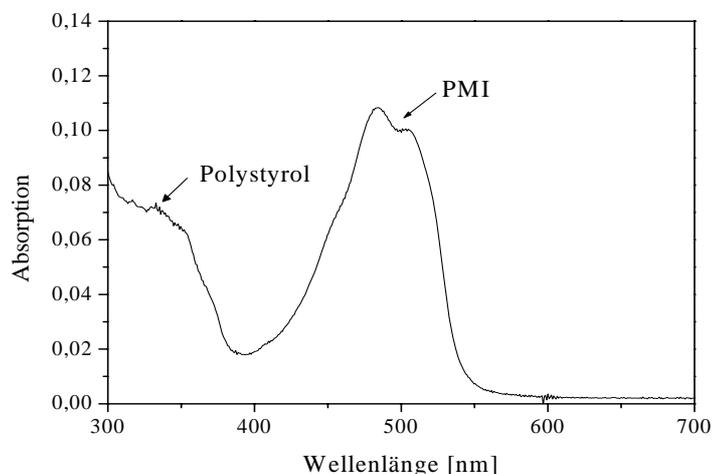


Abbildung 4.6 UV-Spektrum von VHPM5; Polymer in THF gelöst zur Auswertung des exakten PMI-Gehalts in den Partikeln.

Tabelle 4.4 Ergebnisse des Einschlusses von Fluoreszenzfarbstoff in Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure)-Latices.

Probenname	PMI-Gehalt [mg/g _{Polymer}]	PMI-Moleküle/ Partikel
VHPM0	0,28	197
VHPM1	0,43	288
VHPM2	0,40	259
VHPM3	0,40	275
VHPM5	0,49	310
VHPM10	0,48	358
VHPM15	0,37	822
VHPM20	0,44	1697

Die fluoreszierenden Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure)-Nanopartikel wurden als Zellmarker in HeLa-Zellen eingesetzt. Diese Versuche wurden von Frau Myriam Lorenz im Rahmen ihrer Dissertation am Institut für klinische Transfusionsmedizin in Ulm durchgeführt.^{[112],[113]} Die Zellen wurden mit den Partikeln für 24 h inkubiert und dann gewaschen. Die Aufnahme der Partikel in die Zellen wurde durch Messungen im FACS (fluorescence activated cell sorter) quantitativ nachgewiesen. Um Vergleiche machen zu können, muss die Fluoreszenz-Aktivität auf die Menge an PMI-Molekülen pro Partikel normiert werden. Als Referenz diente die Menge an PMI-Molekülen pro Partikel in Latex VHPM1.

Es zeigt sich, daß die Aufnahme abhängig von der Oberflächenladung ist (Abbildung 4.7): Bis zu einem Acrylsäure-Gehalt von 10% steigt die Aufnahme der Partikel in die Zellen mit der Oberflächenladung auf das Vierfache, verglichen mit Partikeln mit einem Acrylsäuregehalt von 1%. Partikel mit noch mehr Ladungen auf der Oberfläche werden dagegen wieder weniger gut aufgenommen. Dies kann durch die oben schon erwähnte haarige Oberflächenstruktur der Partikel mit hohen Acrylsäuregehalten begründet sein.

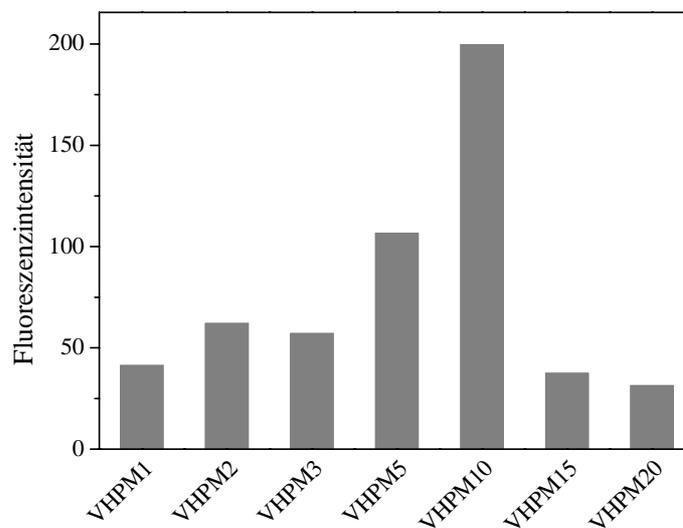


Abbildung 4.7 FACS-Messungen der HeLa-Zellen mit Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure)-Partikeln nach 24 h Inkubation.

Die Aufnahme der Partikel in die Zellen wurde durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesen. Die Bilder bestätigen, daß sich die Partikel tatsächlich in den Zellen befinden und nicht an die Zelloberfläche angelagert wurde. Eine solche Aufnahme zeigt Abbildung 4.8. Die Zellwand wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff RH414 rot eingefärbt, die Partikel sind als grüne Punkte sichtbar.

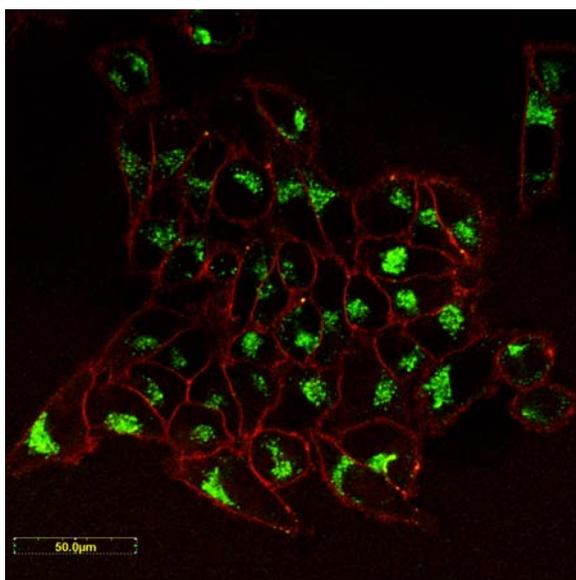


Abbildung 4.8 Fluoreszenzspektroskopische Aufnahme von Mesenchymalen Stammzellen (MSCs) nach Aufnahme von VHPM10. Die Zellwand ist rot gefärbt, die Partikel sind als grüne Punkte erkennbar.

4.1.2 Fluoreszierende Poly(Styrol-*co*-Glycidylmethacrylat)-Nanopartikel

Die glycidylfunktionalisierten Polystyrolpartikel wurden wie die carboxylfunktionalisierten Partikel über Miniemulsionspolymerisation hergestellt. Das Monomeren-Verhältnis wurde in allen Proben konstant gehalten. Der Anteil an Glycidylmethacrylat betrug 10%. Zusätzlich wurde bei diesen Partikeln die Teilchengröße variiert, um Einflüsse auf die Zellaufnahme zu untersuchen. Die kleinere Teilchengröße wurde durch eine größere Menge Tensid erzielt. In Tabelle 4.5 sind die für die Synthesen eingesetzten Mengen an Tensid und die Ergebnisse der DLS-Messungen aufgelistet.

Die über DLS gemessenen Teilchengrößen sind für die Proben VH-PSG10 und VHPG10.2 mit 91 nm und 99 nm praktisch konstant und vergleichbar mit der Teilchengröße der Probe VHPM10, in der Styrol mit 10% Acrylsäure copolymerisiert wurde. Wird die Tensidmenge von 1,2% bezogen auf die Polymermenge in diesen Proben auf 8,3% in der Probe VH-PSG10/500.3 erhöht, so erhält man kleinere Partikel mit einer Teilchengröße von nur noch 63 nm.

Die Teilchengrößen können in TEM-Aufnahmen bestätigt werden. Tatsächlich werden bei Verwendung von mehr SDS die Partikel kleiner, wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist. Die Teilchen sind außerdem in beiden Proben (VH-PSG10 und VH-PSG10/500.3) monodispers, stellenweise ist die hexagonale Anordnung zu sehen.

Die Dispersion mit kleineren Partikeln (VH-PSG10/500.3) unterscheidet sich auch äußerlich von einer Dispersion mit größeren Partikeln (VH-PSG10), wie in Abbildung 4.10 zu sehen ist.

Sie scheinen farbintensiver zu sein. Das kommt daher, daß das Licht an kleineren Teilchen weniger stark gestreut wird und die Dispersion daher nur wenig trüb erscheint.

Um den Gehalt an Glycidylgruppen auf der Oberfläche zu bestimmen, wird die Reaktivität von Glycidylgruppen gegen Aminogruppen ausgenutzt. Glycin im Überschuß reagiert mit den funktionalisierten Teilchen, der Überschuß wird nach Reaktion mit Ninhydrin, wobei sich blaues Ruhemann'sches Purpur bildet, UV-spektrometrisch nachgewiesen. In Abbildung 4.11 ist die Bildung des blauen Farbstoffes und in Abbildung 4.12 sein UV-Spektrum gezeigt.

Tabelle 4.5 Eigenschaften der fluoreszierenden Poly(Styrol-*co*-Glycidylmethacrylat)-Partikel. Der Anteil an Glycidylmethacrylat im Monomeren beträgt jeweils 10%.

Probenname	Menge SDS [mg]	Feststoffgehalt [%]	Teilchengröße D^a) [nm]	PDI ^{a)}
VH-PSG10	72	20,89	99	0,051
VH-PSG10.2	72	20,32	91	0,023
VH-PSG10/500.3	500	19,40	63	0,152

^{a)} aus DLS-Messungen bestimmt.

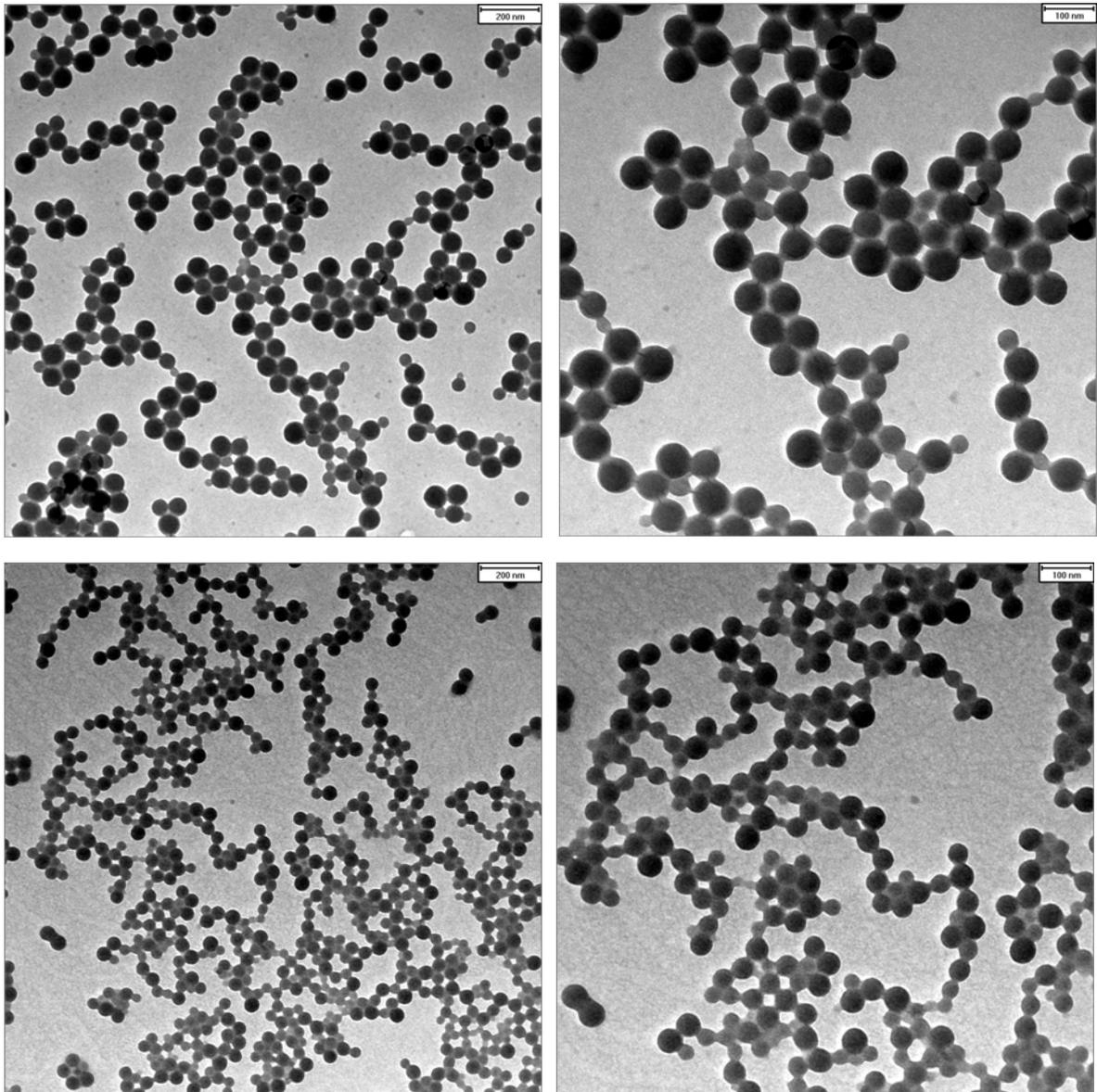


Abbildung 4.9 TEM-Aufnahmen von VHPSG10 (oben) und VHPSG10/500.3 (unten) bei zwei unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Teilchengröße liegt in VH-PSG10 bei 91 nm, in VH-PSG10.3 bei 63 nm.



Abbildung 4.10 VHPSG10 (links) und VHPSG10/500.3 (rechts). Die Probe VHPSG10 scheint heller zu sein, die Probe VHPSG10/500.3 farbintensiver.

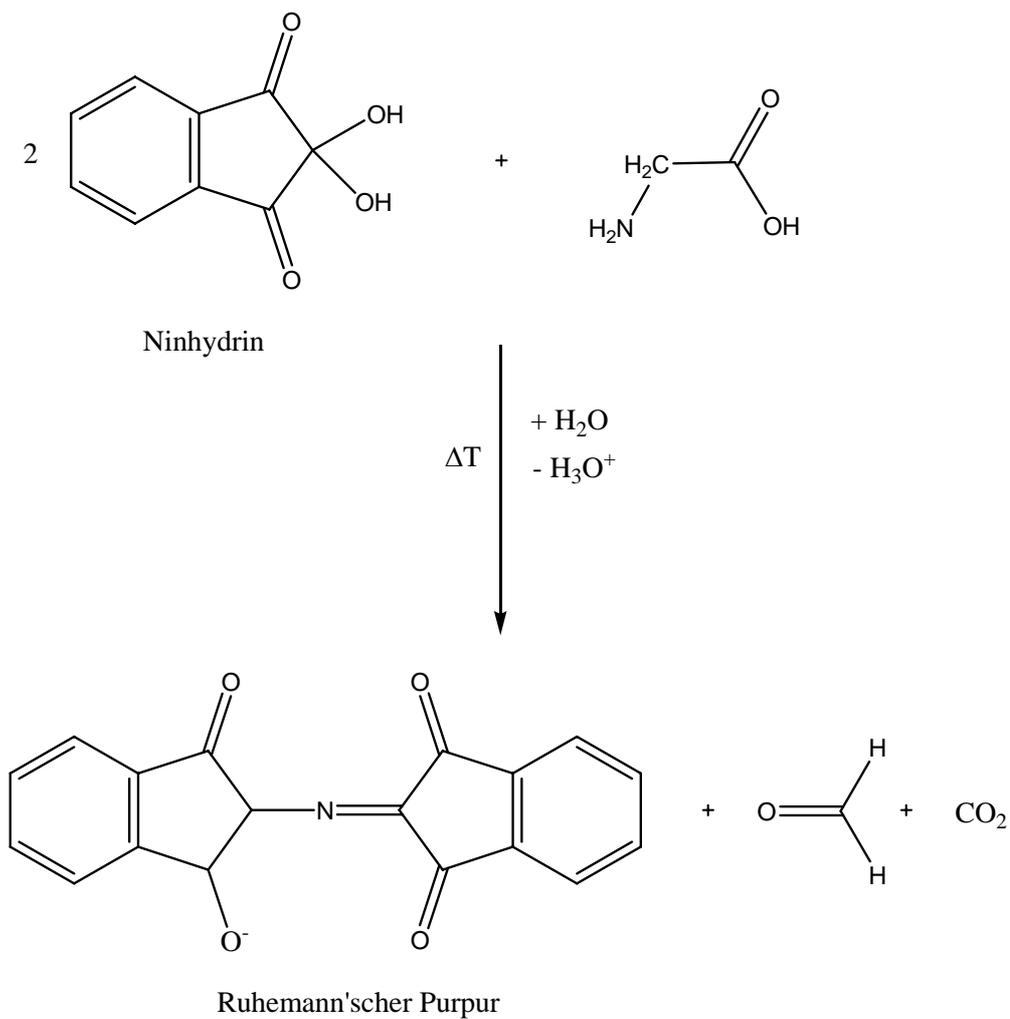


Abbildung 4.11 Bildung des Ruhemann'schen Purpurs aus Ninhydrin und Glycin unter Abspaltung von Formaldehyd und CO_2 .

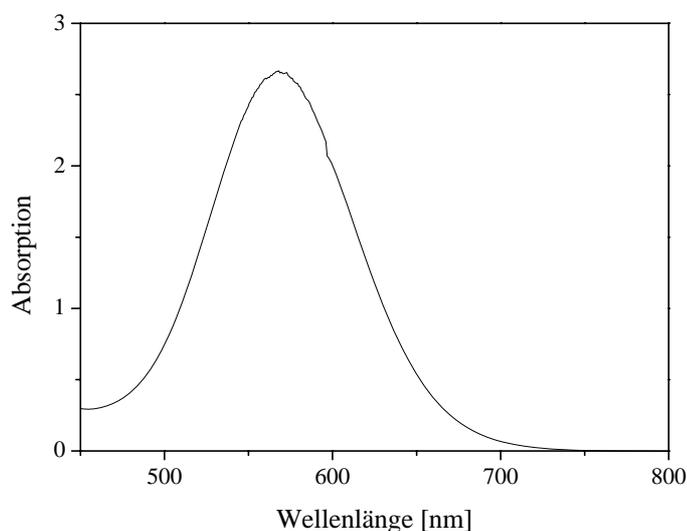


Abbildung 4.12 UV-Spektrum einer wässrigen Lösung des Ruhemann'schen Purpurs.

Durch Auswertung der UV-Spektren kann die Menge an Glycin bestimmt werden, die nicht reagiert hat und daraus Rückschlüsse auf die Konzentration an zugänglichen Glycidylgruppen an der Partikeloberfläche in der Dispersion gezogen werden. Ebenfalls durch UV-Messungen wird der Gehalt an Fluoreszenzfarbstoff bestimmt. Die getrockneten Proben werden in THF gelöst und das UV-Spektrum gemessen, aus dem dann wie oben beschrieben der PMI-Gehalt pro g Polymer und pro Partikel bestimmt werden kann. Die Ergebnisse der Glycidylgruppenbestimmung und der PMI-Bestimmung sind in Tabelle 4.6 zusammengefaßt. Zum Vergleich ist die Probe VHPM10 aufgeführt. Sie enthält 10% Acrylsäure und ist damit mit dem gleichen Anteil an funktionellem Monomer copolymerisiert worden.

Tabelle 4.6 Eigenschaften der glycidylfunktionalisierten Polystyrolpartikel.

Probenname	Nachweis der funktionellen Gruppen nach [d]	funktionelle Gruppen pro Partikel	funktionelle Gruppen pro nm ²	PMI-Gehalt [mg/ g _{Polymer}]	PMI- Moleküle pro Partikel
VHPM10	7	99407	3,01	0,48	358
VHPSG10	7	48328	1,58	0,33	220
VHPSG10.2	1	83300	3,20	0,46	238
VHPSG10/ 500.3	0	47306	3,79	0,6	103

Es ist zu erkennen, daß der PMI-Gehalt bei allen Proben nahe des theoretischen Wertes von 0,5 mg/g_{Polymer} liegt. Die Anzahl der PMI-Moleküle pro Partikel schwankt, was an der Teilchengröße liegt. Je größer die Teilchen bei gleichem PMI-Gehalt, desto mehr Moleküle befinden sich einem einzigen Teilchen.

Die Anzahl der funktionellen Gruppen stimmt für VHPSG10.2 und VHPSG10/500-3 mit der Probe VHPM10 überein, wie es zu erwarten war, da alle Proben mit 10% funktionellem Monomer funktionalisiert wurden. Auffällig ist, daß in VHPSG10 nur halb so viele funktionelle Gruppen gefunden wie in VHPM10. Der Grund darin liegt in der Hydrolyseempfindlichkeit der Glycidylgruppen. In einer wässrigen Miniemulsion sind die Gruppen auf der Partikeloberfläche ständig mit Wasser in Kontakt. Je länger die Miniemulsion gelagert wurde, desto mehr Glycidylgruppen sind hydrolysiert. Die entstandenen Hydroxylgruppen reagieren nicht spontan mit Aminogruppen und sind somit auf diesem Weg nicht mehr nachweisbar. VHPSG10 war beim Nachweis schon eine Woche alt, während die Nachweise für VHPSG10.2 und VHPSG10/500-3 sofort oder einen Tag nach der Synthese durchgeführt wurden. Die Anzahl an Glycidylgruppen auf der Oberfläche nimmt bei Lagerung ab. Das bedeutet für weitere Modifizierungen, daß die Anbindung von Aminosäuren oder Antikörper nur an frisch präparierten Miniemulsionen durchgeführt werden können, wenn eine maximale Anzahl an Biomolekülen auf der Oberfläche erwünscht ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Miniemulsionspolymerisation die Herstellung monodisperser Polystyrolnanopartikel erlaubt, deren Oberfläche gezielt durch Copolymerisation funktionalisiert werden kann. Durch Variation des Anteils an Acrylsäure kann die Menge an Ladungen auf der Oberfläche kontrolliert werden. Das Nanoreaktorprinzip der Miniemulsion erlaubt gleichmäßige Verkapselung eines hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffes in den Partikeln.

Eine Erhöhung der Oberflächenladungen wirkt sich positiv auf die Aufnahme der Polystyrolpartikel in HeLa- und mesenchymale Stammzellen aus, daher ist eine Kontrolle der Ladungen wünschenswert.

4.2 Magnetische Polystyrol-Nanopartikel

Durch Verkapselung von Magnetit in Polystyrol oder Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure) konnten funktionalisierte magnetische Polymer-Nanopartikel erhalten werden, die zur Zellmarkierung herangezogen werden können. Um die magnetischen Partikel in den Zellen schnell und einfach nachweisen zu können, wurden zweifach funktionalisierte Partikel, sogenannte „Dual Reporter“-Partikel hergestellt, die neben Magnetit auch noch den Fluoreszenzfarbstoff PMI enthalten. Somit können diese Partikel *in vitro* über den Fluoreszenzfarbstoff durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesen werden, *in vivo* über das verkapselte magnetisch Material durch Magnetresonanztomographie (MRT). Die Verkapselung von superparamagnetischen Magnetitnanopartikeln macht sie zudem interessant als Kontrastmittel in der MRT, für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung oder die Hyperthermie. Da die Zellaufnahme der fluoreszierenden Polystyrolpartikel eine Abhängigkeit von der Oberflächenladung zeigte, war auch im Falle der magnetischen Partikel die Veränderung der Zahl der Oberflächenladungen von besonderem Interesse. Desweiteren kann die Oberflächenfunktionalisierung wieder dazu dienen, die Partikel weiter zu modifizieren, indem Biomoleküle an die Partikel angebunden werden, aus diesem Grund wurde nicht nur die Funktionalisierung der Partikel mit Carboxylgruppen durch Copolymerisation von Styrol und Acrylsäure durchgeführt, sondern auch eine Funktionalisierung mit Glycidylgruppen, indem Styrol mit Glycidylmethacrylat copolymerisiert wurde. Für konkrete biomedizinische Anwendungen wie die MRT ist es besonders wichtig, daß die Menge an Magnetit in den Partikeln gezielt steuerbar ist, daher wurde untersucht, wie sich eine Veränderung des Monomeranteils in den Hybridpartikeln auf den Magnetitgehalt auswirkt und ob der Magnetitgehalt beliebig erhöht werden kann. Neben dem Magnetitgehalt spielt auch die Größe der Magnetitpartikel eine große Rolle. Um die magnetischen Polystyrolpartikel in der Biomedizin optimal nutzen zu können, sei es in MRT- oder Hyperthermie-Anwendungen oder als Systeme für die Wirkstofffreisetzung, müssen die magnetischen Eigenschaften ideal sein. Daher wurden nicht nur Magnetitnanopartikel von 10 nm Durchmesser verkapselt, sondern auch größere Partikel, deren Durchmesser bei 30 nm liegt.

Die verschiedenen magnetischen Polystyrolpartikel wurden hinsichtlich ihrer Teilchengröße, ihres Magnetit-Gehalts, ihrer Oberflächenladung und ihrer Magnetisierung untersucht. Die Ergebnisse sollen in diesem Kapitel zusammengefaßt werden.

Die Herstellung der magnetischen Polystyrol-Latices beinhaltet drei Stufen, der Prozess ist in Abbildung 4.13 schematisch dargestellt. Zunächst wird Magnetit ausgefällt, wobei Partikel von ca. 10 nm Durchmesser erhalten werden. Da Magnetit hydrophil ist, kann es nicht direkt in hydrophobem Polystyrol verkapselt werden, sondern muß hydrophobisiert werden. Zu diesem Zweck werden die Teilchen mit Ölsäure beschichtet, diese wird während der Fällung zugegeben.

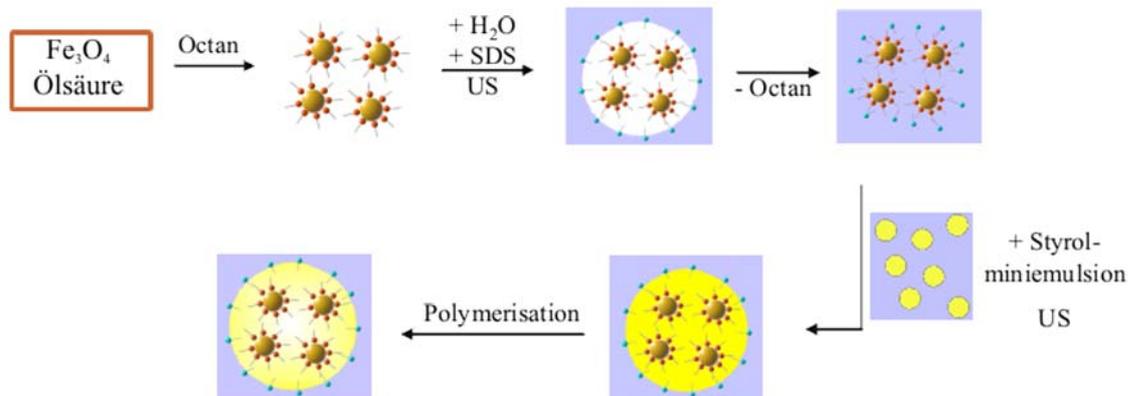


Abbildung 4.13 Schematische Darstellung des Verkapselungsprozesses von hydrophobisierten Magnetitnanopartikeln in Polystyrol.

Anstatt diese hydrophobisierten Magnetit-Nanopartikel direkt im Monomer zu dispergieren und daraus eine Miniemulsion herzustellen, wie es in früheren Experimenten durchgeführt worden war,^{[108],[109]} wird eine weitere Stufe eingebaut, in der Magnetitaggregate erzeugt werden. Damit kann die Verkapselungseffizienz erhöht werden und größere Mengen an Magnetit können verkapselt werden. Dafür werden die Magnetit-Teilchen in Octan dispergiert und diese Dispersion mit einem Tensid in eine wässrige Miniemulsion umgewandelt. In dieser Miniemulsion befinden sich feste Magnetit-Teilchen als Aggregate in Wasser. Dazu wird eine Monomer-Miniemulsion gegeben, beide Miniemulsionen vermischt und unter Verwendung von Ultraschall die Vereinigung der Magnetit-Teilchen mit den Monomer-Tröpfchen erreicht. Durch Ultraschall werden die Tröpfchen kleiner, wodurch sie instabil werden und sich wieder vereinigen. Aus statistischen Gründen können sich jetzt Monomer-Tröpfchen nicht nur mit Monomer-Tröpfchen vereinigen, sondern auch mit Magnetit-Aggregaten. Wird lange genug Ultraschall angewendet, so findet eine vollständige Vereinigung beider Miniemulsionen statt, so daß sich am Ende alle Magnetit-Aggregate in Monomer-Tröpfchen befinden. Nach dem Nanoreaktor-Prinzip verändern sich diese Tröpfchen nun beim Polymerisieren nicht mehr, und man erhält Polymer-Teilchen, in denen Magnetit-Partikel eingeschlossen sind.

4.2.1 Magnetit-Nanopartikel und gezielte Aggregatbildung

Beim Ausfällen von Magnetit aus FeCl_2 und FeCl_3 mit NH_3 erhält man Teilchen von ca. 10 nm Durchmesser. Um diese hydrophilen Teilchen zu hydrophobisieren, wird bei der Ausfällung von Magnetit Ölsäure zugegeben. Dadurch werden die Magnetitteilchen dispergierbar in organischen Lösemitteln. Es ist sinnvoll, hierfür ein Lösemittel zu wählen, das nicht die Ölsäure von der Teilchenoberfläche löst, dennoch aber die Teilchen dispergiert. Als beste Wahl hierfür hat sich Octan erwiesen. Aus dieser Dispersion wird eine wässrige Miniemulsion mit

SDS als Tensid hergestellt. Nach der Entfernung von Octan durch Erwärmen der Miniemulsion erhält man die festen Magnetitpartikel dispergiert in Wasser. Aufgrund des Prozesses liegen sie als Aggregate von ca. 50 nm Durchmesser vor und werden später auch als Aggregate verkapselt und nicht als einzelne Partikel. Der Unterschied ist in Abbildung 4.14 gezeigt. Die Verkapselung von Aggregaten führt zu einem höheren Magnetit-Gehalt, da die Magnetitteilchen als Aggregate mit schon vorgegebenem hohen Magnetitanteil von Polymer umhüllt werden und nicht als einzelne getrennte Partikel.



Abbildung 4.14 Unterschiedliche Arten, Magnetit zu verkapseln: Links ist die Verkapselung eines einzelnen Magnetitteilchens gezeigt, rechts die Verkapselung von Magnetitaggregaten, die zu einem höheren Magnetitgehalt führt.

Diese Aggregate sind stabilisiert durch eine Tensid-Doppelschicht: Die innere Schicht besteht aus Ölsäure oder Oleat, wodurch die Partikel hydrophobisiert wurden, die äußere Schicht besteht aus SDS, das die Aggregate der hydrophobisierten Partikel in Wasser stabilisiert. Die Stabilisierung ist in Abbildung 4.15 gezeigt.

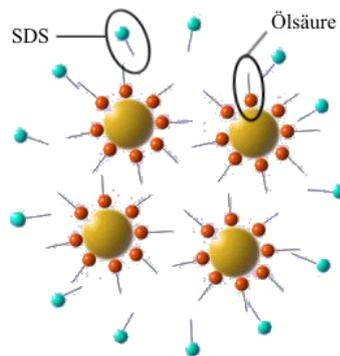


Abbildung 4.15 Stabilisierung von Magnetitnanopartikeln in Wasser. Die einzelnen Magnetitpartikel werden durch Ölsäure stabilisiert, die Aggregate durch SDS.

Abbildung 4.16 zeigt eine TEM-Aufnahme von Magnetitaggregaten nach Miniemulgierung der hydrophobisierten Partikel und Verdampfen von Octan.

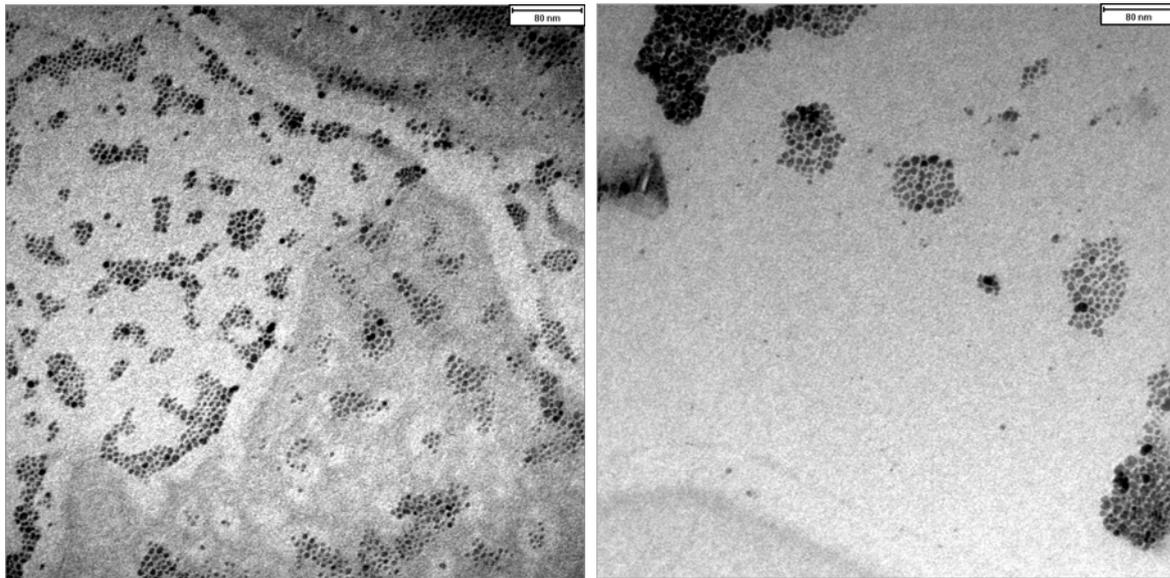


Abbildung 4.16 TEM-Aufnahme von hydrophobisierten Magnetit-Nanopartikeln nach Miniemulgierung in Wasser und Verdampfen von Octan bei verschiedenen Vergrößerungen.

Der Gehalt an Ölsäure auf den Teilchen nach dem Hydrophobisierungsprozess und nach Waschen kann mit TGA bestimmt werden. Es wurden 3 verschiedene Ansätze für die Synthese von Magnetit-Nanopartikel durchgeführt (Tabelle 4.7). VH-Magnetit1 und VH-Magnetit2 sind braun gefärbt, was für einen Anteil an anderen Eisenoxiden spricht, da auch das Verhältnis von Fe^{II} zu Fe^{III} nicht ideal gewählt war. Dennoch sind auch diese Eisenoxid-Teilchen stark magnetisch, weshalb sie in weiteren Synthesen verwendet wurden. Laut Reimers und Khalafalla sollen Fe^{II} und Fe^{III} im molaren Verhältnis von 3:2 vorliegen, um die Oxidation von Fe^{II} zu Fe^{III} auszugleichen.^[47] Wird dieses Verhältnis eingehalten, so erhält man ein schwarzes Pulver, wie im Fall von VH-Magnetit3.

Tabelle 4.7 Ausfällung von Magnetit-Nanopartikeln.

Probenname	Menge $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ [g]	Menge FeCl_3 [g]	eingewogene Menge Ölsäure [g]	Anteil Ölsäure nach Waschen und Trocknen ^{a)} [%]
VH-Magnetit1	17,9	9,7	6,2	31
VH-Magnetit2	17,9	9,7	6,2	37
VH-Magnetit3	12	14,6	6	27

^{a)} aus TGA-Messungen unter N_2 -Atmosphäre bestimmt.

Wie oben beschrieben, wird aus ausgefälltem und ölsäurebeschichtetem Fe_3O_4 eine wässrige Miniemulsion hergestellt.

Tabelle 4.8 listet die erhaltenen Magnetit-Miniemulsionen nach Verdampfen des Octans und deren Feststoffgehalte auf.

Tabelle 4.8 Magnetit-Miniemulsionen

Probenname	eingesetzte Fe_3O_4 -Probe	Feststoffgehalt [%]
VH-Mag5.13	VH-Magnetit1	5,13
VH-Mag6.25	VH-Magnetit1	6,25
VH-Mag6.10	VH-Magnetit2	6,1
VH-Mag4.05	VH-Magnetit2	4,05
VH-Mag5.22	VH-Magnetit2	5,22
VH-Mag4.95	VH-Magnetit3	4,95
VH-Mag6.11	VH-Magnetit3	6,11
VH-Mag5.64	VH-Magnetit3	5,64
VH-Mag5.43	VH-Magnetit3	5,43
VH-Mag3.66	VH-Magnetit3	3,66
VH-Mag5.17	VH-Magnetit3	5,17
BB-Mag4.35	VH-Magnetit3	4,35
VH-Mag4.12	VH-Magnetit3	5,75
VH-Mag5.86	VH-Magnetit3	5,86
VH-Mag4.46	VH-Magnetit3	4,46

4.2.2 Veränderung des Magnetit-Gehalts in magnetischen Polystyrolpartikeln

Der Gehalt an Magnetit in den Polystyrol-Kapseln kann durch den Anteil an Polystyrol in der Miniemulsion bis zu 41% Magnetit gesteuert werden. Je mehr Polystyrol-Miniemulsion zur Magnetit-Miniemulsion gegeben wird, desto weniger Magnetit-Teilchen sind in den Polystyrol-Partikeln vorhanden. In Tabelle 4.9 sind die Dispersionen mit magnetischen Polystyrol-Partikeln aufgelistet. Für die Verkapselung wurden die Miniemulsionen VH-Mag4.95 und VH-Mag5.13 verwendet. Der Feststoffgehalt der Magnetit-Miniemulsionen diente als Grundlage für die Berechnung des Anteils an Styrol in der Mischung.

Tabelle 4.9 Magnetische Polystyrol-Partikel mit unterschiedlichen Magnetit-Gehalten.

Probenname	Magnetit-Probe	Anteil Styrol ^{a)} [%]	Magnetit-Gehalt ^{b)} [%]
VHMPSA0t3	VH-Mag4.95	10	41,4
VHMPSA0t4	VH-Mag4.95	30	40,2
VHMPSA0t1	VH-Mag5.13	50	32,1
VHMPSA0t2	VH-Mag5.13	65	21,3

^{a)} bezogen auf die Gesamtmenge an Polystyrol, Magnetit und Ölsäure in der Dispersion.

^{b)} aus TGA-Messungen unter N₂-Atmosphäre bestimmt.

Die Magnetitgehalte wurden thermogravimetrisch unter N₂-Atmosphäre bestimmt: Das Polymer zersetzt sich unter N₂ im Gegensatz zu Magnetit. Bei ca. 500 °C ist nur noch Magnetit vorhanden, bei dieser Temperatur kann der Magnetitgehalt der Probe abgelesen werden. Es ist zu erkennen, daß der Magnetit-Gehalt wie zu erwarten mit abnehmendem Styrolanteil zunimmt. Bei der Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten (zur Durchführung siehe Kapitel 8.1) können die in der Dispersion vorhandenen Partikel aufgrund ihrer Dichte getrennt werden. Man kann unterscheiden zwischen Hybridpartikeln, freien Polymerpartikeln und freien Magnetitpartikeln. Außerdem kann über die Dichteverteilung der Hybridpartikel auf die Homogenität der Verkapselung geschlossen werden. Ultrazentrifugationsexperimente zeigen, daß die Hybridpartikel sehr einheitlich bezüglich der Verkapselung sind, da in jeder Probe nur ein enger Dichtebereich für die Partikel gefunden wird. Zudem wird hier bestätigt, daß der Magnetitgehalt mit abnehmendem Styrolanteil zunimmt (Abbildung 4.17). Je höher der Magnetitgehalt ist, desto schwerer sind die Partikel, und desto tiefer sinken sie im Gradienten. Die Unterschiede sind deutlich zu erkennen (siehe Pfeile).

Außerdem ist in Tabelle 4.9 zu erkennen, daß sich der Magnetitgehalt nicht beliebig steigern läßt. Obwohl der Gehalt an Styrol bis auf 10% gesenkt wurde, konnten nicht mehr als 41% an Magnetitgehalt im Polymeren erreicht werden. Dies scheint der maximal mögliche Wert zu sein und unterscheidet sich nur wenig vom erreichten Magnetitgehalt bei einem Styrolanteil von 30%, der mit 40% Magnetit fast ebenso hoch liegt. Daher wurde in weiteren Experimenten der Styrolanteil bei 50%, bezogen auf den Gesamtstoffgehalt aus Polystyrol, Magnetit und Ölsäure, gehalten.

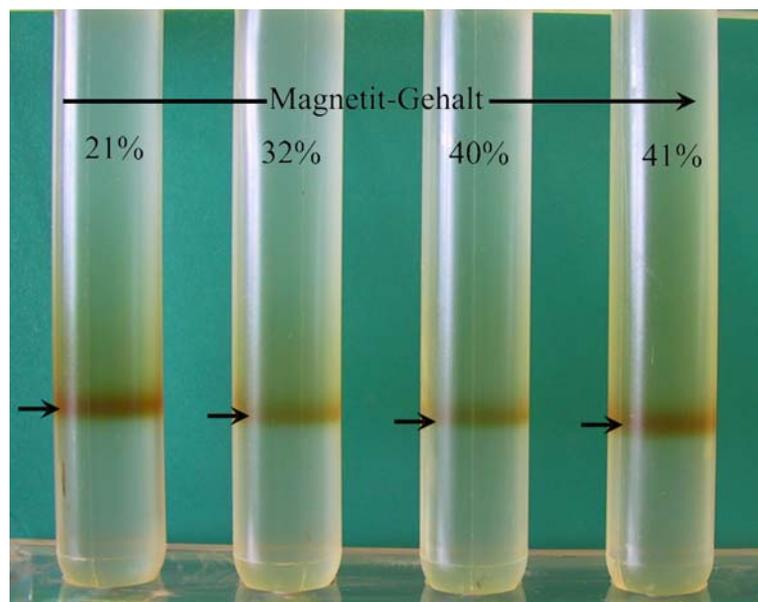


Abbildung 4.17 Ultrazentrifugation von magnetischen Polystyrol-Nanopartikeln im Dichtegradienten; von links nach rechts nimmt der Magnetit-Gehalt zu.

4.2.3 Veränderung der Oberflächenfunktionalisierung

Wie bei den fluoreszierenden Polystyrolpartikeln ist auch bei den magnetischen Polystyrol-Partikeln eine Oberflächenfunktionalisierung wünschenswert, da die Partikel über die Oberflächenfunktionalität durch Anbindung von Biomolekülen modifiziert werden können. Schon bei den fluoreszierenden Polystyrolpartikeln ist eine Abhängigkeit der Zellaufnahme von der Zahl der Oberflächenladungen zu erkennen, dies ist für die magnetischen Partikel ebenso zu erwarten. Außerdem können ebenso weitere Moleküle an die Oberfläche angebunden werden. Diese Oberflächenfunktionalisierung kann, wie bei den fluoreszierenden Polystyrol-Nanopartikeln, durch Copolymerisation von Styrol mit funktionellen Monomeren erfolgen. Wieder wurden hier Acrylsäure (AA) und Glycidylmethacrylat (GMA) gewählt, um Carboxylgruppen bzw. Glycidylgruppen auf der Oberfläche zu erhalten.

Ziel ist es, die Oberflächenladung zu variieren, um den Einfluß auf die Zellaufnahme zu untersuchen und durch gezielte Modifizierung der Oberfläche die Aufnahme zu verändern und zu spezifizieren. Durch Copolymerisation von Styrol und Acrylsäure werden auf der Teilchenoberfläche Oberflächenladungen in Form von Carboxylgruppen erhalten, deren Zahl durch Variation der Monomerenverhältnisse gezielt verändert werden kann. An Carboxylgruppen können außerdem die Aminogruppen von Aminosäuren und Peptiden binden, und die Oberfläche wird modifiziert. Um diese Modifizierung noch einfacher zu gestalten, wurde außerdem Styrol mit Glycidylmethacrylat copolymerisiert, dadurch tragen die Partikel auf der Oberfläche Glycidylgruppen, die schnell und vollständig mit Aminogruppen reagieren. Die Partikel sollen als zweifach funktionalisierte „Dual Reporter“-Partikel gestaltet

werden, in die zusätzlich zu Magnetit noch der Fluoreszenzfarbstoff PMI eingebaut wird. Die Magnetit-Funktion dient der Detektion *in vivo* über MRT, die Fluoreszenz-Funktion der Detektion *in vitro* durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.

4.2.3.1 Carboxylfunktionalisierte magnetische Polystyrolpartikel

Bei der Charakterisierung der fluoreszierenden Polystyrolpartikel konnte gezeigt werden, daß bei der Copolymerisation von Styrol und Acrylsäure die Carboxylgruppen aufgrund ihrer Hydrophilie an der Grenzfläche Polystyrol/Wasser angelagert sind, bei höheren Anteilen an Acrylsäure jedoch der hydrophobe Anteil in Acrylsäure groß genug ist, um die Gruppen im Inneren der Teilchen zu verbergen, wodurch nicht mehr der maximal mögliche Anteil an Carboxylgruppen an der Oberfläche gefunden wird. Wird jetzt zusätzlich noch Magnetit verkapselt, so sind zwei Grenzflächen zwischen Polystyrol und hydrophilem Material vorhanden. Zum einen ist dies die Grenzfläche Polystyrol/Wasser, an der die Carboxylgruppen idealerweise später gefunden werden. Zum anderen existiert aber auch die Grenzfläche Polystyrol/Magnetit, die im Teilcheninneren liegt. Lagern sich die Carboxylgruppen bevorzugt dort an, so sind sie an der Teilchenoberfläche nicht mehr vorhanden und können keinen Beitrag zur Oberflächenladung leisten. Um den Anteil der Carboxylgruppen im Teilcheninneren zu minimieren, werden die Miniemulsionen aus Styrol und Magnetit wie oben beschrieben vermischt und für einige Zeit polymerisiert, so daß sich eine Polystyrolhülle um die Magnetitpartikel bildet. Diese sind somit für Acrylsäure, die dann erst zugegeben wird, abgeschirmt und die Carboxylgruppen lagern sich an der Grenze zum Dispergiermittel Wasser an.

Für die Herstellung carboxylfunktionalisierter magnetischer Polystyrol-Nanopartikel werden eine Magnetit-Miniemulsion und eine Styrol-Miniemulsion mit der entsprechenden Menge an Styrol, wie oben beschrieben, mit Ultraschall gemischt, so daß der Styrol-Anteil 50% beträgt. Die Polymerisation wird gestartet und nach verschiedenen Zeiten wird die entsprechende Menge Acrylsäure zugegeben. Der Anteil an Acrylsäure im Monomeren wird konstant bei 3% gehalten. Die eingesetzten Mengen und Zugabezeiten sind in Tabelle 4.10 aufgeführt.

Tabelle 4.10 Carboxylfunktionalisierte magnetische Polystyrol-Nanopartikel: Variation der Polymerisationszeit vor Acrylsäurezugabe.

Probenname	eingesetzte Magnetit-Miniemulsion	Acrylsäurezugabe nach
VH-3Kb	Mag6.25	40 min
VH-3Kh	VH-Mag4.05	5 h
VH-3Ka	VH-Mag6.10	6 h

Um die Oberflächenladung zu bestimmen, wurden die mit Latices zunächst durch Zentrifugation über eine Membran (MWCO 30 000) dialysiert. Es wurde solange gewaschen, bis das Waschwasser eine Leitfähigkeit von weniger als $3 \mu\text{S}/\text{cm}$ aufwies. Dann wurde die Oberflächenladung mittels eines Partikelladungsdetektors titriert. Die Titration wurde bei pH 6 durchgeführt. Aus der Titration mit Poly-DADMAC, das eine definierte Menge an positiven Ladungen trägt, wird mit dem Feststoffgehalt und der Größe der Teilchen die Menge an Ladungen auf der Oberfläche berechnet. In Tabelle 4.11 sind die Eigenschaften der magnetischen Polystyrol-Latices aufgelistet.

Tabelle 4.11 Charakteristika magnetischer carboxylfunktionalisierter Polystyrol-Latices.

Probenname	Feststoffgehalt [%]	Feststoffgehalt nach Dialyse [%]	Teilchengröße $D^a)$ [nm]	Oberflächenladung ^{b)} [nm^{-2}]
VH-3Kb	5,9	0,32	55	0,43
VH-3Kh	5,12	0,75	90	0,60
VH-3Ka	9,09	0,18	68	0,54

a) aus DLS-Messungen bestimmt.

b) gemessen bei pH 6.

Man kann erkennen, daß bei der Acrylsäurezugabe nach 40 min in der Probe VH-3Kb eine niedrigere Oberflächenladungsdichte von $0,43 \text{ nm}^{-2}$ resultiert. Im Vergleich dazu konnte in den Proben, zu denen Acrylsäure erst nach einigen Stunden gegeben wurde (VH-3Kh und VH-3Ka), eine Oberflächenladungsdichte von ca. $0,6 \text{ nm}^{-2}$ nachgewiesen werden. Ein Teil der Acrylsäure geht daher tatsächlich an der Grenzfläche Polystyrol/Magnetit verloren, wenn die Magnetitnanopartikel bei Acrylsäurezugabe noch nicht vollständig von Polymer umgeben sind. Acrylsäure kann dann auch ins Innere der Partikel diffundieren und dort einpolymerisieren. Damit sind nicht mehr alle Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche verfügbar. Der Anteil der Acrylsäure an der Grenzfläche Polystyrol/Wasser kann maximiert werden, indem Styrol vopolymerisiert wird, so daß sich eine möglichst große Polystyrolhülle um die Magnetit-Nanopartikel bildet und diese Grenzfläche verschwindet. Nach 5 h bzw. 6 h Polymerisationszeit sind die Werte der Oberflächenladungen mit $0,6 \text{ nm}^{-2}$ (VH-3Kh) und $0,54 \text{ nm}^{-2}$ (VH-3Ka) nahezu gleich, weshalb davon ausgegangen werden kann, daß eine weitere Steigerung nicht möglich ist. Zudem darf die Polymerisation vor der Zugabe von Acrylsäure noch nicht abgeschlossen sein. In weiteren Experimenten wurde Acrylsäure nach 6 h zugegeben.

Um den Einfluß der Acrylsäuremenge auf die Oberflächenladung zu bestimmen, wurde eine Reihe magnetischer Polystyrol-Latices hergestellt, die mit unterschiedlichen Mengen an Acrylsäure funktionalisiert wurden. Hierfür wurden die Magnetit-Miniemulsionen mit Styrol-

Miniemulsionen, wie oben beschrieben, durch Ultraschall gemischt. Das Mischungsverhältnis wurde jeweils so gewählt, daß der Monomer-Anteil 50% beträgt. Die Polymerisation wurde gestartet, und nach 6 h wurden die entsprechenden Mengen an Acrylsäure, die Anteilen zwischen 0% und 15% bezogen auf die Gesamtmonomermenge entsprechen, zugegeben. Diese Partikel wurden als neue bifunktionelle „Dual Reporter“-Partikel gestaltet. Sie tragen neben der superparamagnetischen Funktion, die der biomedizinischen Anwendung, zum Beispiel als Kontrastmittel für Magnetresonanztomographie, dient, auch eine Fluoreszenzfunktion, die der histologischen Untersuchung dient. Um den Nachweis nach Zellaufnahme zu vereinfachen, wurden jeweils 3 mg des Fluoreszenzfarbstoff PMI (siehe Abbildung 4.1) in Styrol gelöst. So konnten die Partikel als Dual-Marker genutzt werden. Tabelle 4.12 führt die eingesetzten Mengen für die fluoreszierenden magnetischen Polystyrol-Partikel auf.

Tabelle 4.12 Herstellung der fluoreszierenden magnetischen Polystyrol-Latices.

Probenname	eingesetzte Magnetit-Miniemulsion	Anteil Acrylsäure im Monomeren [%]	Menge Styrol [g]
VH-MPM0	VH-Mag6.11	0	6,00
VH-MPM1	VH-Mag5.64	1	5,94
VH-MPM2	VH-Mag5.43	2	5,88
VH-MPM5	VH-Mag5.64	5	5,70
VH-MPM10	VH-Mag5.43	10	5,40
VH-MPM15	VH-Mag6.11	15	5,10

Nach der Polymerisation wurden die Dispersionen filtriert, im Anschluß wurden Feststoffgehalt und Teilchengröße gemessen. An getrockneten Proben wurden durch TGA die Magnetit-Gehalte der einzelnen Proben bestimmt und SQUID-Messungen durchgeführt.

Die Oberflächenladungen wurden nach Dialyse der Proben gemessen. Die Dialyse wurde durch Druckfiltration über eine Membran der Porengröße 100.000 Da durchgeführt, bis das Waschwasser eine Leitfähigkeit von weniger als 3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ aufwies. Aus dem Titrationsergebnis bei pH 6 mit Poly-DADMAC im Partikelladungsdetektor wurde über Feststoffgehalt und Teilchengröße die Oberflächenladung bestimmt.

In Tabelle 4.13 sind die Eigenschaften der fluoreszierenden magnetischen Polystyrolpartikel aufgeführt.

Die erhaltenen Feststoffgehalte liegen zwischen 7% und 9% und stimmen mit den theoretisch berechneten gut überein, wie Tabelle 4.14 zeigt.

Tabelle 4.13 Charakteristika der fluoreszierenden magnetischen Polystyrolpartikel

Probenname	Feststoffgehalt [%]	Feststoffgehalt nach Dialyse [%]	$D^a)$ [nm]	PDI ^{a)}	Magnetit-Gehalt ^{b)} [%]	Oberflächenladung ^{c)} [nm ⁻²]
VH-MPM0	6,82	1,20	46	0,254	30	0,08
VH-MPM1	7,51	1,02	56	0,336	40	0,11
VH-MPM2	6,91	0,91	44	0,219	36	0,11
VH-MPM5	7,31	0,18	44	0,195	36	0,31
VH-MPM10	6,81	0,08	49	0,197	39	0,85
VH-MPM15	8,91	0,19	70	0,374	39	1,52

a) aus DLS-Messungen bestimmt.

b) aus TGA-Messungen unter N₂-Atmosphäre bestimmt.

c) gemessen bei pH 6.

Tabelle 4.14 Vergleich der erhaltenen Feststoffgehalte der fluoreszierenden magnetischen Polystyrol-Latices mit den theoretisch berechneten.

Probenname	Feststoffgehalt gemessen [%]	Feststoffgehalt berechnet [%]
VH-MPM0	6,82	9,4
VH-MPM1	7,51	8,8
VH-MPM2	6,91	8,5
VH-MPM5	7,31	8,8
VH-MPM10	6,81	8,5
VH-MPM15	8,91	9,4

Die Teilchengrößen liegen in allen Proben bei 50 nm mit PDI-Werten zwischen 0,2 und 0,3. Damit ist keine Abhängigkeit der Teilchengröße von der Anzahl der Oberflächenladungen zu erkennen, lediglich die Probe VH-MPM15 mit einem Acrylsäure-Wert von 15% weist einen höheren Teilchendurchmesser von 70 nm auf. Dies ist vergleichbar mit den Teilchengrößen der fluoreszierenden Polystyrolpartikel ohne Magnetit. Auch dort blieben die Teilchengrößen bis zu einem Wert von 10% Acrylsäureanteil konstant und stiegen ab 15% Acrylsäureanteil an. Bei den magnetischen Latices ist von dem gleichen Effekt auszugehen, der schon oben beschrieben wurde: Bei der Copolymerisation mit Acrylsäure sinkt der pH-Wert mit zunehmender Acrylsäurekonzentration. Bei niedrigeren pH-Werten polymerisiert Acrylsäure schneller und bildet längere Ketten. Diese Ketten quellen in Wasser auf, was einen höheren

hydrodynamischen Durchmesser zur Folge hat. Vergleicht man die Teilchengrößen dieser magnetischen Latices mit den Teilchengrößen der fluoreszierenden Latices, so fällt auf, daß die Teilchen, die Magnetit enthalten, kleiner sind. Da die Styrolminiemulsionen zur Verkapselung von Magnetit mit Magnetitminiemulsion gemischt werden, ist in den resultierenden Dispersionen eine größere Menge des Tensids SDS enthalten, als weiteres Tensid enthält das System Ölsäure. Zudem ist die Größe der Hybridpartikel durch die Größe der vorher gebildeten Magnetitaggregate vorgegeben.

Die Magnetit-Gehalte liegen, wie erwartet, bei ca. 40%. Wie schon oben erläutert, scheint ein Maximum bei 41% zu liegen, über diesen Wert hinaus kann nicht mehr Magnetit verkapselt werden. Auch in dieser Reihe wird nahezu der maximal mögliche Anteil an Magnetit verkapselt.

Die schon erwähnten Ultrazentrifugationsexperimente im Dichtegradienten zeigen, daß die Verkapselung homogen ist. Die Partikel werden bei der Zentrifugation entsprechend ihrer Dichte getrennt, so kann zwischen Polymerpartikel, Hybridpartikeln und Magnetitpartikeln unterschieden werden. Zusätzlich kann man noch erkennen, ob die Hybridpartikel weitgehend die selbe Dichte besitzen. Die Ergebnisse der Ultrazentrifugation sind in Abbildung 4.18 gezeigt. Alle Proben sind homogen.

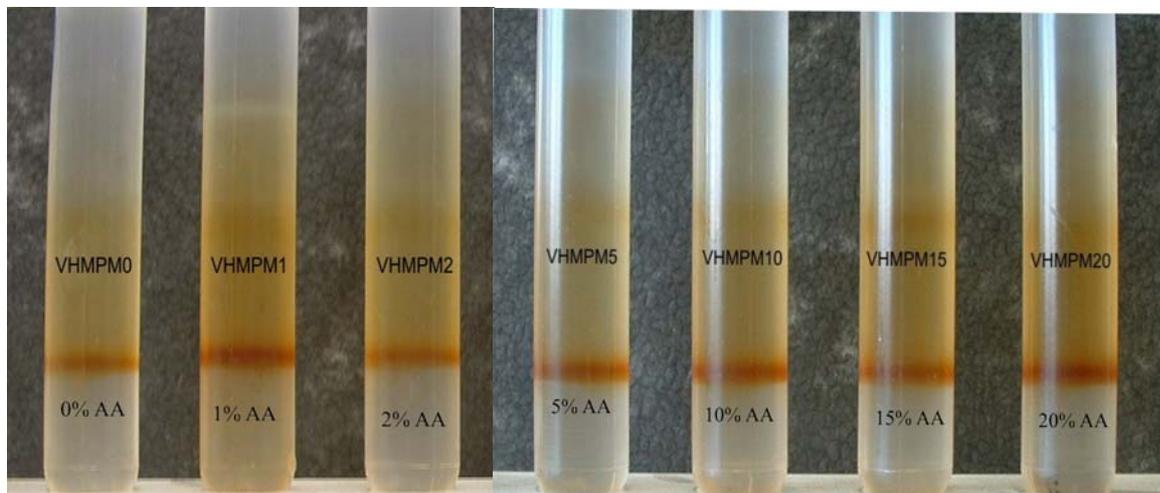


Abbildung 4.18 Ultrazentrifugation von fluoreszierenden magnetischen Polystyrol-nanopartikeln. Von links nach rechts nimmt der Acrylsäuregehalt (AA) zu.

Aus Abbildung 4.18 ist auch zu erkennen, daß sich die Dichte der Hybridpartikel nicht mit dem Acrylsäuregehalt ändert. Das bedeutet, daß der Verkapselungsprozess nicht durch Acrylsäure beeinflusst wird. Das ist auch nicht zu erwarten, da bei der Vermischung der Monomer- und Magnetit-Miniemulsion Acrylsäure im System noch nicht vorhanden ist. Eine Entmischung beider Miniemulsionen nach Start der Polymerisation ist nicht wahrscheinlich,

das System sollte stabil sein. Da Acrylsäure erst nach 6 h zugegeben wird, ist kein Einfluß auf die Verkapselung zu erwarten.

Die erfolgreiche Verkapselung von Magnetit-Nanopartikeln in der Polymerhülle kann auch im TEM beobachtet werden (Abbildung 4.19). Es sind deutlich kugelförmige Aggregate von Magnetit-Nanopartikeln zu sehen. Die Größe der Hybridpartikel erscheint hier kleiner als der mit DLS gemessene hydrodynamische Durchmesser, aber auch hier ist deutlich zu sehen, daß die Partikel nicht monodispers sind: Es sind Partikel verschiedener Größe zu sehen.

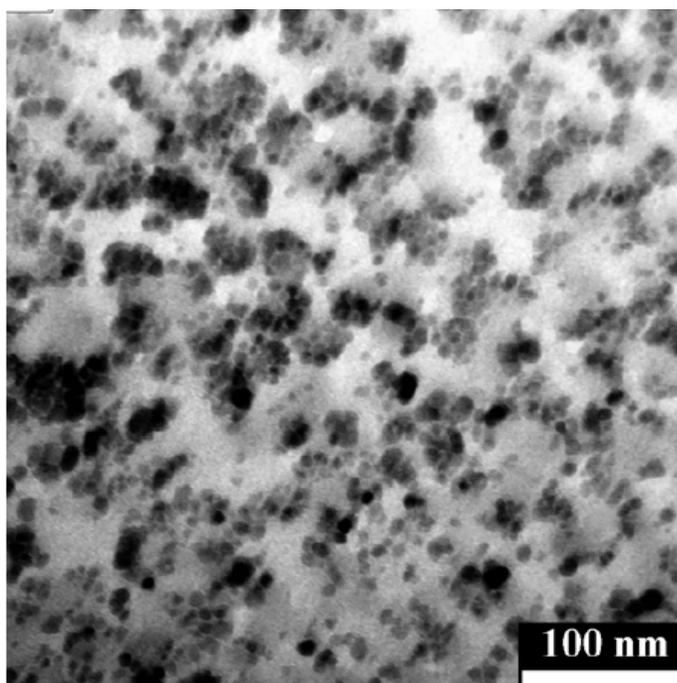


Abbildung 4.19 TEM-Aufnahme von verkapselten Magnetit-Nanopartikeln in VHMPM1.

Die Oberflächenladungsdichte steigt, wie zu erwarten war, mit zunehmendem Acrylsäuregehalt an. Verglichen mit den fluoreszierenden Polystyrolpartikeln, die in Kapitel 4.1.1 beschrieben sind, ist die Ladungsdichte in den magnetithaltigen Hybridpartikeln jedoch geringer, wie in Abbildung 4.20 zu erkennen ist. Wie schon oben erläutert, können sich Carboxylgruppen nicht nur an der Grenzfläche Styrol/Wasser anlagern, sondern auch an der Grenzfläche Styrol/Magnetit. Damit werden sie zum Teil im Teilcheninneren eingelagert und sind somit an der Teilchenoberfläche nicht mehr nachweisbar. Dieser Effekt konnte zwar vermindert werden, indem Styrol sechs Stunden lang vor Acrylsäurezugabe vorpolymerisiert wird, kann jedoch nicht vollständig verhindert werden.

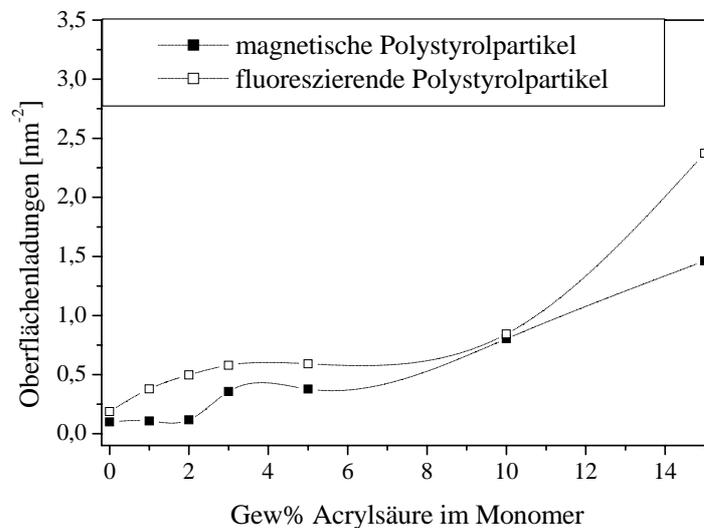


Abbildung 4.20 Oberflächenladung in Abhängigkeit vom Acrylsäuregehalt. Vergleich zwischen fluoreszierenden Polystyrolpartikeln und magnetischen Polystyrolpartikeln.

Für die praktischen Anwendungen der Teilchen von besonderem Interesse sind die magnetischen Eigenschaften. Für SQUID-Messungen wurden alle Proben getrocknet und als Pulver bei 293 K vermessen. In Tabelle 4.15 sind die Sättigungsmagnetisierung und die Anfangssuszeptibilität einiger ausgewählter Partikel aufgelistet. Hier ist ein Vergleich zwischen den ausgefällten ölsäurebeschichteten Magnetit-Partikeln, den Magnetit-Partikeln in Wasser und den in Polystyrol verkapselten Magnetit-Partikeln gegeben.

Tabelle 4.15 Magnetische Eigenschaften einiger fluoreszierender magnetischer Polystyrol-Partikel.

Probenname	Probenbeschreibung	Sättigungs- magnetisierung [emu/g _{Magnetit}]	Anfangs- suszeptibilität [emu/Oe]
VH-Magnetit3	ölsäurebeschichtete Magnetitnanopartikel	80,43	0,029
VH-MPM0	magnetische	35,56	0,013
VH-MPM1	carboxyl- funktionalisierte	44,7	0,017
VH-MPM5	Magnetit-	37,26	0,013
VH-MPM15	nanopartikel	37,07	0,013

Die Sättigungsmagnetisierung der ausgefällten Magnetitnanopartikel VH-Magnetit3 liegt mit 80,43 emu nahe am Wert für Magnetit in Bulk, der bei 89 emu liegt.^[50] Werden diese Partikel in Polymer verkapselt, so sinkt die Sättigungsmagnetisierung auf ca. 40 emu (VH-MPM0, VH-MPM1, VH-MPM5, VHMPM15). Das ist auf eine Oxidation zurückzuführen, bei der Eisen(II,III)oxid zu nichtmagnetischen Eisenoxid-Phasen oxidiert wird. Dies geschieht bei der Polymerisation und Verkapselung in Polymer. Ein möglicher Grund hierfür ist die Erwärmung über mehrere Stunden, die für die Polymerisation notwendig ist. Ein anderer Grund könnte die Behandlung mit Ultraschall sein, bei der sehr viel Energie in das System eingebracht wird, wodurch sich die Dispersion lokal stark aufheizt.

Die hohen Suszeptibilitäten sprechen für ferromagnetisches oder superparamagnetisches Verhalten. Daß sich sowohl die Magnetitpartikel als auch die Hybridpartikel superparamagnetisch verhalten, läßt sich aus den Magnetisierungskurven ersehen, die in Abbildung 4.21 gezeigt sind. Die Teilchen weisen keine oder nur eine minimale Remanenz auf. Für VHMPM15 wurde eine Remanenzmessung bei 293 K durchgeführt. Hierfür wurden bei der Messung der Magnetisierung die Feldstärken in sehr kleinen Intervallen im Bereich von -100 Oe bis 100 Oe geändert, wodurch ein genaueres Bild der Änderung der Magnetisierung bei sehr kleinen Feldstärken erhalten wird. Diese Messung ist in Abbildung 4.22 gezeigt.

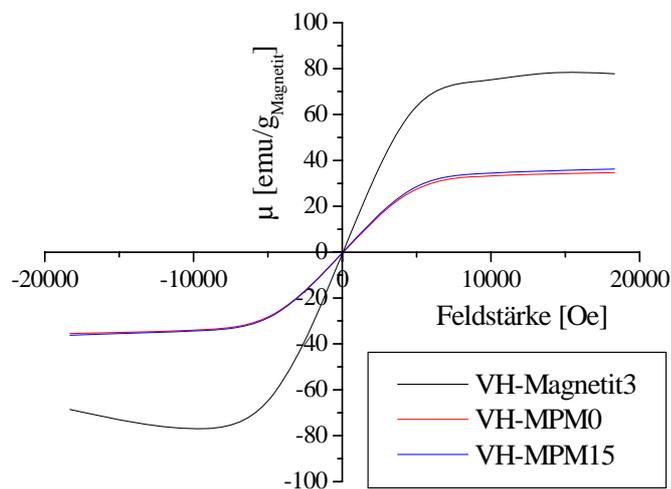


Abbildung 4.21 Magnetisierungskurven von VH-Magnetit3 (Magnetitnanopartikel), VH-MPM0 und VH-MPM15 (Hybridpartikel) bei 293 K.

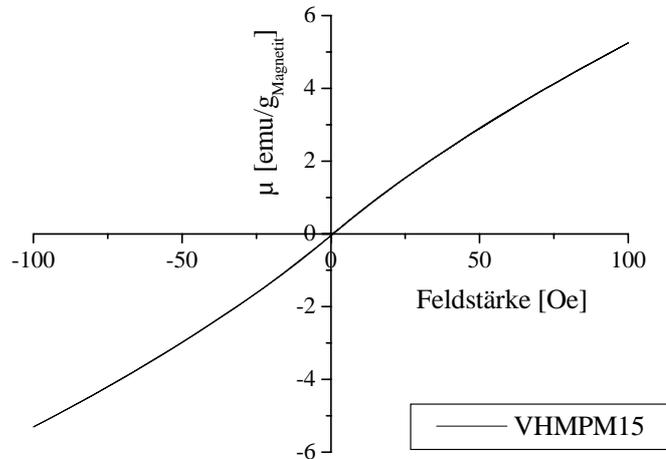


Abbildung 4.22 Remanenzmessung der Probe VHMPM15 bei 293 K.

Auch in diesem Ausschnitt einer herkömmlichen Magnetisierungsmessung werden Remanenz und Hysterese nicht beobachtet, wodurch der Superparamagnetismus der Proben bewiesen ist. Bemerkenswert ist, daß der Superparamagnetismus auch bei der Polymerisation nicht verloren geht. Das macht diese Partikel für weitere Anwendungen besonders interessant.

Aus den Magnetisierungsmessungen lassen sich die Größen der Magnetitpartikel nach folgender Formel berechnen:^[114]

$$D_{\text{SPM}} = \sqrt[3]{\frac{18kT}{\pi} \cdot \frac{\chi_i}{\rho M_S^2}} \quad (4.1)$$

Dabei ist D_{SPM} ist der berechnete Teilchendurchmesser, k die Boltzmannkonstante, T die Temperatur, χ_i die Anfangssuszeptibilität, ρ die Dichte und M_S die Sättigungsmagnetisierung. Die Teilchengröße aus der Formel in cm erhalten. Tabelle 4.16 gibt die berechneten Teilchengrößen der vermessenen Proben wider.

Während die ausgefällten Magnetitpartikel einen Durchmesser von fast 10 nm haben, der auch im TEM ermittelt wurde, scheinen die anderen Teilchen sehr viel kleiner zu sein. Es ist jedoch zu beachten, daß mit dieser Methode nur die Größe der superparamagnetischen Domäne D_{SPM} bestimmt werden kann. Diese kann durchaus kleiner sein als die Teilchengröße, die durch Elektronenmikroskopie (10 nm) gemessen wurde. Die Differenz zwischen beiden Werten rührt wahrscheinlich von einer magnetisch „toten“ Schicht her, die sich auf der Partikeloberfläche befindet.^[115] Diese Schicht besteht aus nicht-magnetischem Eisenoxid, das sich durch Oxidation an der Partikeleoberfläche bildet. Es ist zu beobachten, daß die Oxidation in den

gefällten Magnetitpartikeln VH-Magnetit3 auch nach einigen Wochen nicht stattfindet: Der aus den neun Monate später durchgeführten SQUID-Messungen berechnete Durchmesser von 9,6 nm entspricht dem in TEM-Aufnahmen gemessenen Durchmesser von 10 nm. Erst bei der Verkapselung und Polymerisation wird Magnetit oxidiert.

Tabelle 4.16 Berechnete Größen der Magnetit-Teilchen

Probenname	D_{SPM} [nm]
VH-Magnetit3	9,6
VH-MPM0	4,3
VH-MPM1	5,4
VH-MPM5	4,4
VH-MPM15	4,4

Um die magnetischen Partikel in ihrer Funktion als bifunktionelle „Dual Reporter“-Partikel zu testen, wurden sie mit verschiedenen Zelllinien inkubiert. Hierfür wurden Mesenchymale Stammzellen (MSC), HeLa-, Jurkat- und KG1a-Zellen verwendet. Die Zellaufnahme wurde quantitativ anhand von FACS-Messungen ausgewertet. Diese Experimente wurden von Frau Myriam Lorenz im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.^[112] Wie in Abbildung 4.23 zu erkennen ist, nimmt für alle Zelltypen die Aufnahme der Partikel mit steigender Oberflächenladung zu.

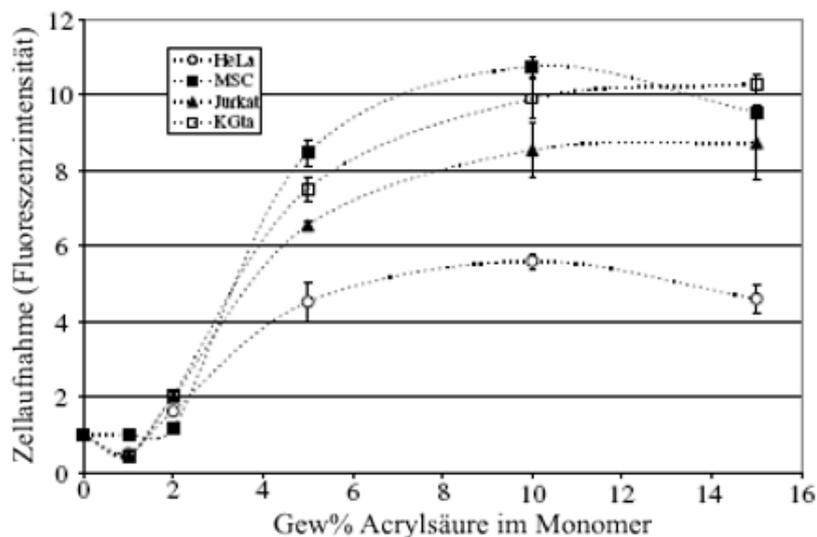


Abbildung 4.23 Aufnahme der magnetischen fluoreszierenden Polystyrolpartikel in verschiedene Zelllinien. Es ist die Abhängigkeit der Aufnahme von der Oberflächenladung gezeigt.

Daß die Partikel intrazellulär aufgenommen werden, wurde durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesen (Abbildung 4.24). Um die Zellen sichtbar zu machen, wurde die Zellwand mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff RH414 eingefärbt, die Partikel fluoreszieren grün. So ist deutlich zu erkennen, daß die Partikel sich innerhalb der Zellwände befinden und damit in die Zellen aufgenommen wurden und sich nicht an der Zellmembran anlagern.

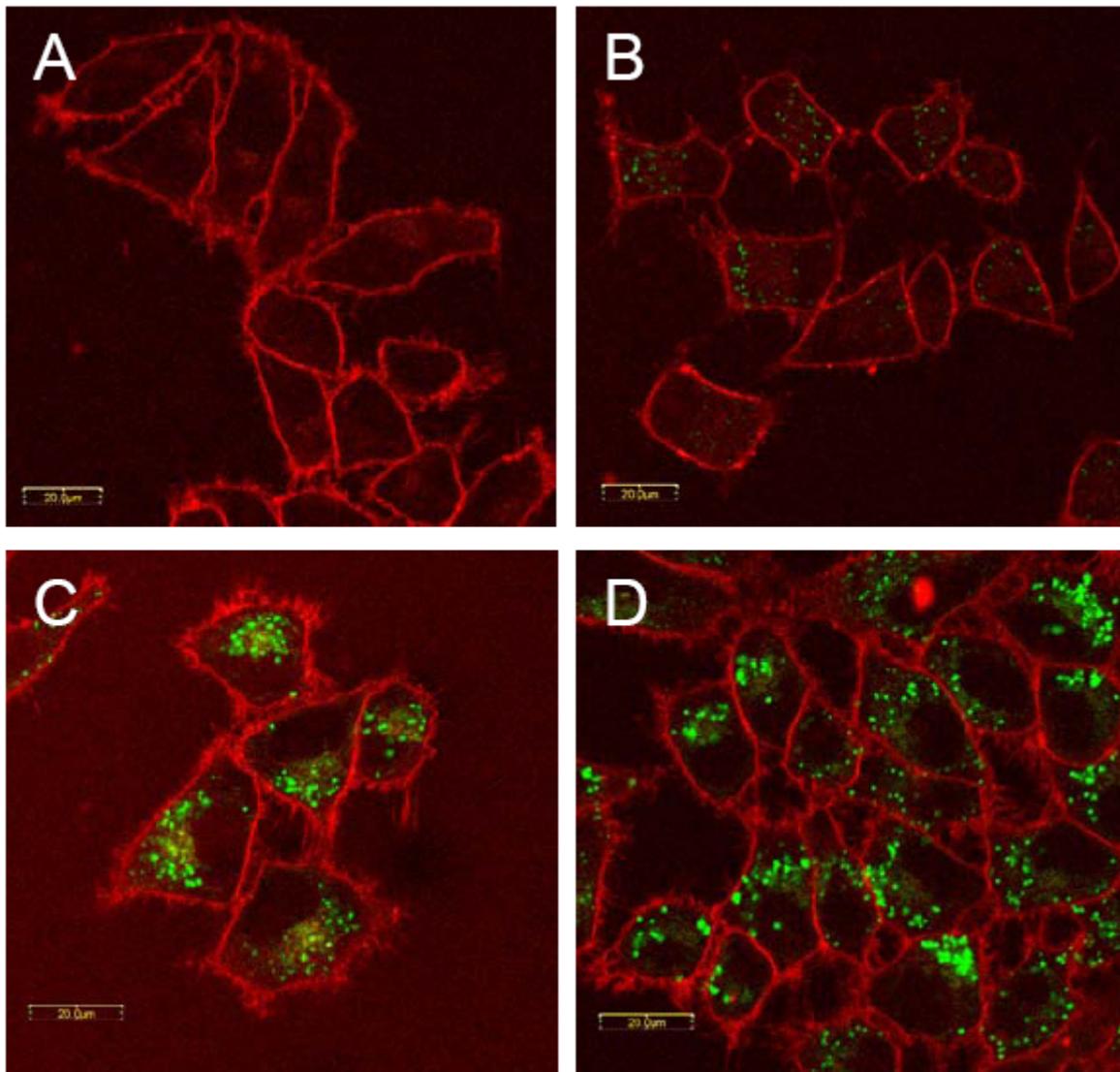


Abbildung 4.24 Laser-Scanning-Mikroskopie von HeLa-Zellen: A) Negativkontrolle ohne Partikel B) nach Aufnahme von VHMPM2 C) nach Aufnahme von VHMPM5 D) nach Aufnahme von VHMPM10.

Diese bifunktionellen fluoreszierenden magnetischen Polystyrolnanopartikel sind für biomedizinische Zwecke gut geeignet, da sie von verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit der Oberflächenladung aufgenommen werden und dort auch über Laser-Scanning-Mikroskopie und FACS nachgewiesen werden können. Ein weiterer Vorteil neben zweifacher Markierung ist,

daß die superparamagnetischen Eigenschaften während der Polymerisation erhalten bleiben und die Partikel damit zugänglich sind für MRT- und Hyperthermie-Anwendungen.

4.2.3.2 Glycidylfunktionalisierte magnetische Polystyrolpartikel

Um die Anbindung von Biomolekülen an die Partikeloberfläche zu vereinfachen, wurde auch für die magnetischen Polystyrolpartikel eine Funktionalisierung mit Glycidylgruppen gewählt. Diese Funktionalisierung wird durch Copolymerisation von Styrol und 10% Glycidylmethacrylat erreicht, wie es auch für die fluoreszierenden Polystyrolpartikel durchgeführt wurde. Die Ansätze sind in Tabelle 4.17 aufgeführt.

Tabelle 4.17 Eigenschaften der glycidylfunktionalisierten magnetischen Polystyrolpartikel.

Probenname	Magnetit-Probe	Menge PMI [mg]	Feststoffgehalt [%]	D^a) [nm]
VH-MPSG10	VH-Mag5,17	-	5,49	73
VH-MPSGM	BB-Mag4.35	3	2,51	45

^{a)} aus DLS-Messungen bestimmt.

Für die Probe VH-MPSGM wurde eine Bestimmung der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche über den Ninhydrin-Test durchgeführt. Glycin im Überschuss reagierte mit den Glycidylgruppen, nicht reagiertes Glycin wurde nach Umsetzung mit Ninhydrin zu Ruhemann'schem Purpur UV-spektrometrisch nachgewiesen. Daraus wurde berechnet, welche Menge Glycin reagiert hatte, und daraus auf die Konzentration an Glycidylgruppen auf der Oberfläche geschlossen. Tabelle 4.18 zeigt eine Gegenüberstellung von funktionalisierten Partikeln und die Menge der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche. Fluoreszierende magnetische glycidylfunktionalisierte Polystyrolpartikel (VH-MPSGM) werden mit fluoreszierenden glycidylfunktionalisierten Polystyrolpartikel ohne Magnetit (VH-PSG10.2) und fluoreszierenden carboxylfunktionalisierten Polystyrolpartikeln ohne Magnetit verglichen. Die Anzahl der funktionellen Gruppen pro Fläche ist in allen drei Proben annähernd gleich. Daraus läßt sich schließen, daß Glycidylmethacrylat in gleichen Anteilen im Partikelinneren copolymerisiert wird wie Acrylsäure, unabhängig davon, ob Magnetit verkapselt wird oder nicht.

Tabelle 4.18 Vergleich funktionalisierter Polystyrolpartikel.

	VH-MPSGM	VHPSG10.2	VHPM10
	Glycidylgruppen	Glycidylgruppen	Carboxylgruppen
funktionelle Gruppen auf der Oberfläche [nm ⁻²]	2,82	3,20	3,22
funktionelle Gruppen pro Partikel	17915	83300	106322

Die glycidylfunktionalisierten magnetischen Polystyrolpartikel wurden später mit Streptavidin modifiziert (Kapitel 4.3.2). Hierfür wurde die Reaktivität der Glycidylgruppen gegenüber Aminogruppen genutzt, die eine schnelle Reaktion beider Gruppen ohne vorherige Aktivierung erlaubt.

4.2.4 Verkapselung von Magnetitnanokristallen

Bisher war nur die Verkapselung der 10 nm großen ausgefällten Magnetitpartikel beschrieben. Um die magnetischen Eigenschaften für eine Verlängerung der Relaxationszeiten und damit Kontrastverbesserung in der MRT und größere Hystereseverluste für bessere Wärmeentwicklung in der Hyperthermie zu optimieren, ist es allerdings von Interesse, größere Magnetitpartikel herzustellen und auch zu verkapseln.

Eine effektive Methode, Magnetitnanopartikel von ca. 30 nm Durchmesser herzustellen, wurde von Jana et al. beschrieben.^[72] Um Magnetitnanopartikel größeren Durchmessers (im Folgenden Magnetitnanokristalle genannt) zu erhalten, kann Eisen(III)oleat unter Zugabe von Ölsäure bei 300 °C thermisch zersetzt werden.

Nach dieser Vorschrift wurden Magnetitnanokristalle ausgefällt und in Analogie zu den 10 nm großen Teilchen in Octan dispergiert. Der Anteil an ölsäurebeschichteten Magnetitnanopartikeln in dieser Dispersion beträgt 4,7%. Es zeigt sich, daß die Nanopartikel größer ausfallen als bei der herkömmlichen Ausfällungsmethode: Die Partikel sinken über Nacht ab, sind jedoch so stabil, daß sie sich durch Schütteln wieder redispersieren lassen. Im Gegensatz dazu sind die Dispersionen der 10 nm großen Magnetitteilchen stabil (Abbildung 4.25). Aus dieser Dispersion wurde dann ebenfalls analog eine wässrige Miniemulsion der Magnetitnanokristalle in Wasser mit SDS als Tensid hergestellt und anschließend Octan verdampft. Dadurch liegen die Magnetitnanokristalle als Aggregate von ca. 70 nm Durchmesser vor, wie schon für die Miniemulsionen der 10 nm großen Magnetitteilchen beschrieben (siehe auch Abbildung 4.15). Diese Probe VH-Mag30 hat einen Feststoffgehalt von 3,29%. Der Anteil an Ölsäure wurde in TGA-Messungen zu 57%

bestimmt. Die Nanokristalle haben einen Durchmesser von ca. 30 nm, wie TEM-Aufnahmen der wässrigen Miniemulsion nach Verdampfen von Octan in Abbildung 4.26 zeigen.



Abbildung 4.25 Magnetitnanopartikel dispergiert in Octan. Links: 10 nm große Partikel sind stabil. Mitte und rechts: größere Partikel sinken ab, lassen sich jedoch wieder redispersieren.

Die Verkapselung in Polystyrol läuft ebenfalls analog zur schon gezeigten Verkapselung von 10 nm großen Magnetitpartikeln. Die Magnetitminiemulsion wird mit einer Styrol-Miniemulsion durch Anwendung von Ultraschall vereinigt und polymerisiert. Der Anteil an Styrol beträgt 50% bezogen auf die Gesamtmenge an Monomer und hydrophobisiertem Magnetit. Nach 6 h werden 3% Acrylsäure, bezogen auf Styrol, zugegeben, um Oberflächenladungen einzuführen. Durch die Verkapselung der Magnetitaggregate wird eine maximale Menge an Magnetitnanopartikeln pro Polystyrolpartikeln erreicht. In Tabelle 4.19 sind diese Hybridpartikel beschrieben. Es wurden zwei Latices von Hybridpartikeln hergestellt, die sich in der Vereinigung der Magnetit- und der Styrolminiemulsion unterscheiden. Während für die Probe VHM30PS eine Schallzeit von 2 x 1 min bei einer Amplitude von 50% angewandt wurde, wurde für die Probe VH-M30PS2 die Schallzeit bei gleicher Amplitude auf 4 x 1 min erhöht. In beiden Proben haben die Teilchen einen Durchmesser von 69 nm, was der Größe der Magnetitaggregate entspricht.

Durch Ultrazentrifugation im Dichtegradienten wird die Homogenität der Verkapselung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27 gezeigt.

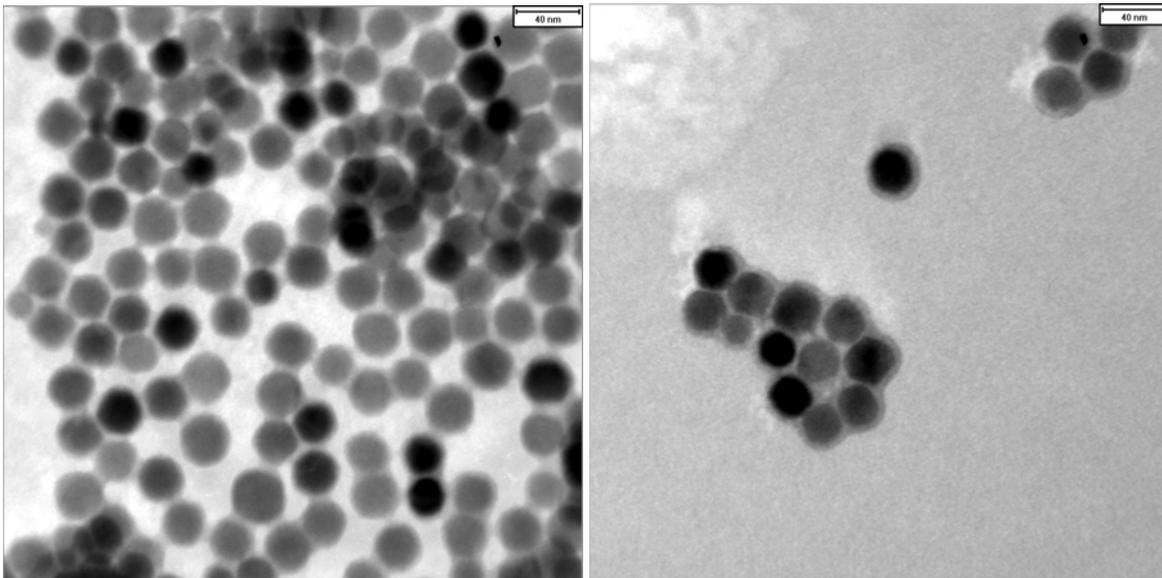


Abbildung 4.26 VH-Mag30 in H₂O bei verschiedenen Vergrößerungen. Im rechten Bild ist die Ölsäureschicht um die Partikel zu erkennen.

Tabelle 4.19 Herstellung und Eigenschaften von Polystyrolpartikeln, in denen Magnetitpartikel von 30 nm Durchmesser verkapselt sind.

Probenname	Vereinigung mit Styrol-Miniemulsion durch	Feststoffgehalt [%]	$D^a)$ [nm]
VH-M30PS	US (50%, 2 x 1 min)	4,58	69
VH-M30PS2	US (50%, 4 x 1 min)	2,49	69

^{a)} aus DLS-Messungen bestimmt.

VH-M30PS2 zeigt in Bezug auf die Hybridpartikel eine engere Dichteverteilung als VH-M30PS, was auf eine homogenere Verkapselung hinweist. In VH-M30PS sind zudem noch reine Polymerpartikel vorhanden, nicht so in VH-M30PS2. Um die größeren Magnetitteilchen effektiv zu verkapseln, muß damit eine längere Schallzeit angewandt werden, um Magnetit- und Styrol-Miniemulsion zu vereinigen. Trotz dieser längeren Schallzeit ist keine Auswirkung auf die Teilchengröße zu beobachten.

Daß die Verkapselung der Magnetitnanokristalle in Polystyrol tatsächlich gelungen ist, zeigt eine TEM-Aufnahme von VH-M30PS2 (Abbildung 4.28).



Abbildung 4.27 Ultrazentrifugation von verkapselten Magnetitnanokristallen. VH-M30PS2 zeigt eine engere Dichteverteilung der Hybridpartikel.

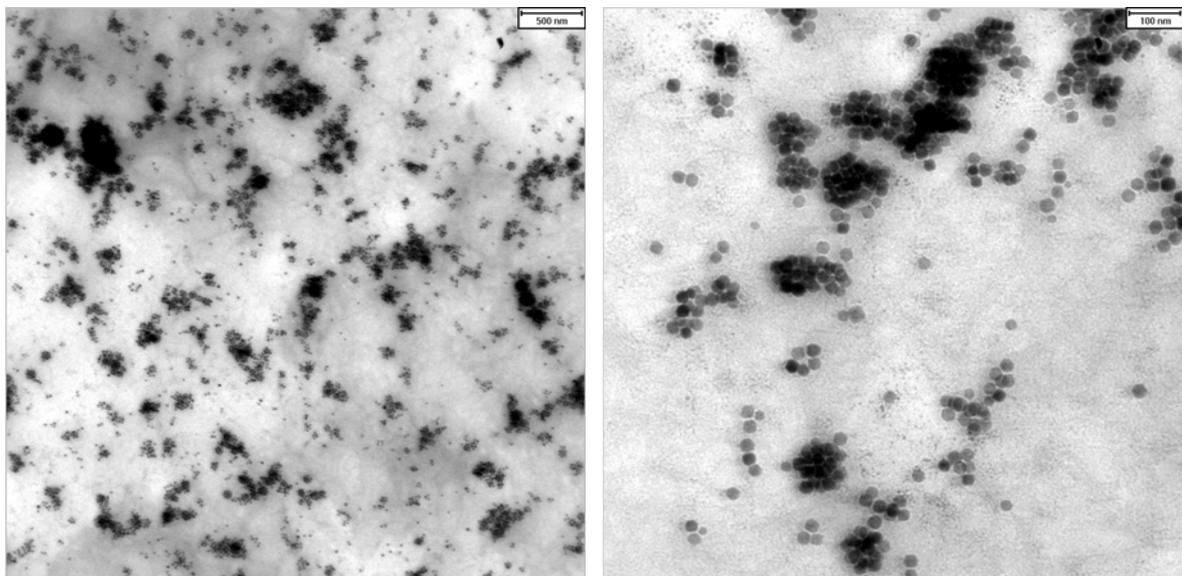


Abbildung 4.28 TEM-Aufnahmen von VH-M30PS2, aufgenommen bei unterschiedlichen Vergrößerungen.

Zur Untersuchung der magnetischen Eigenschaften wurden SQUID-Messungen der getrockneten Proben VH-Mag30 und VH-M30PS2 durchgeführt. Die Magnetisierungskurven (Tabelle 4.29) in Verbindung mit den Werten für Sättigungsmagnetisierung und Anfangsuszeptibilität (Tabelle 4.20) zeigen superparamagnetisches Verhalten.

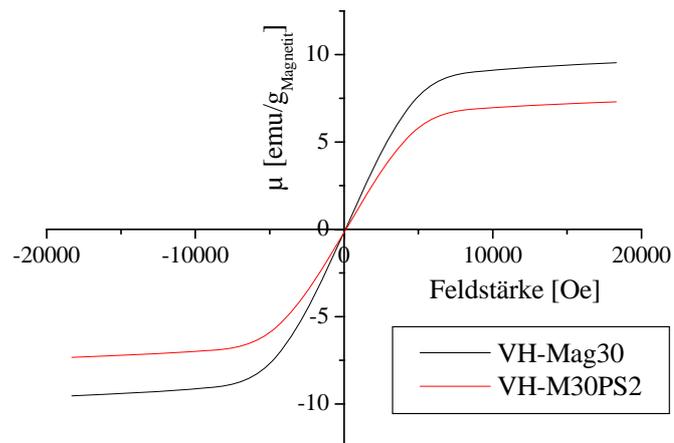


Abbildung 4.29 Magnetisierungskurven einer Miniemulsion von VH-Mag30 (Magnetitnanokristalle) und VH-M30PS2 (Hybridpartikel) bei 293 K.

Tabelle 4.20 Magnetische Eigenschaften unverkapselter und verkapselter Magnetitnanokristalle.

Probenname	Sättigungsmagnetisierung [emu/g _{Magnetit}]	Anfangsuszeptibilität [emu/Oe]
VH-Mag30	10,13	0,004
VH-M30PS2	7,76	0,003

Die sehr geringen Sättigungsmagnetisierungen beider Proben, sowohl der in wässriger Miniemulsion vorliegenden Magnetitnanokristalle VH-Mag30 als auch der in Polystyrol verkapselter Magnetitnanokristalle VH-M30PS2 sprechen für einen nur kleinen Magnetitkern. Während einkristalline superparamagnetische Teilchen einkristallin sind, liegen in polykristallinen oder amorphen Stoffen immer mehrere Domänen vor. Betrachtet man die TEM-Aufnahmen der Magnetitnanokristalle in Abbildung 4.26, so fällt die runde Form der Teilchen auf, die gegen das Vorhandensein von Einkristallen spricht. Da trotzdem keine Hysterese auftritt, kommt nur das Auftreten einer anderen nicht-magnetischen Eisenoxidphase in Betracht, die sich um einen kleinen Magnetitkern gebildet haben könnte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Magnetitnanopartikel in Polystyrolnanopartikeln in großen Mengen und sehr homogen verkapselt werden können, wenn ein dreistufiger Miniemulsionsprozess angewandt wird, indem zunächst Aggregate von Magnetitnanopartikeln dispergiert in Wasser gebildet werden, die anschließend mit einer Styrolminiemulsion vermischt werden. Nach der Polymerisation sind die Magnetitaggregate in Polystyrol verkapselt. Durch Copolymerisation können gezielt Oberflächenfunktionalitäten auf die

Partikel aufgebracht werden. Auch erlaubt das Nanoreaktorprinzip der Miniemulsion eine Verkapselung eines hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffes. Dadurch können die Partikel als „Dual Marker“ gestaltet werden, deren Vorteil darin liegt, daß sie *in vitro* über den Fluoreszenzmarker durch Fluoreszenzmikroskopie und *in vivo* über die superparamagnetischen Magnetitnanopartikel durch MRT detektiert werden können.

Die Oberflächenladung der Teilchen spielt eine wichtige Rolle bei der Zellaufnahme. Wie gezeigt werden konnte, nimmt die Zellaufnahme mit zunehmender Ladung zu.

4.3 Modifizierung der Teilchenoberfläche

Die Modifizierung der Partikel kann unterschiedlichen Zwecken dienen: Werden einfache Moleküle wie Aminosäuren gebunden, so ist es möglich, die Oberflächenladung zu ändern oder neue funktionelle Gruppen auf die Oberfläche zu bringen. Werden komplexere Antikörper gebunden, so können die Partikel spezifiziert werden im Hinblick auf die Zellaufnahme. Es könnte erreicht werden, daß ein bestimmter Antikörper auf der Partikeloberfläche nur die Aufnahme in bestimmte Zelltypen mit entsprechenden Rezeptoren zuläßt. Somit können die die Partikel selektiv auf einen Zelltyp ansprechen, und Zellen können aufgrund der Partikelaufnahme indentifiziert werden.

Die für die Kopplung ausgewählten Proteine sind anti-alpha Aktin (ASM-1), Streptavidin, CD34, Mabthera, Herceptin, Early/Immediate Early und ein Glycoprotein. Sie sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Streptavidin dient als Universal-Linker. Es bildet einen stabilen Antigen-Antikörper-Komplex mit Biotin. Somit können alle biotinylierten Antikörper an Streptavidin gekoppelt werden. Streptavidin-modifizierte Partikel können somit als Standard-Partikel eingesetzt werden, an die die jeweils benötigten Antikörper gebunden werden können.^[99]

Antikörper sollen auch direkt an Partikel gebunden werden, und zwar die monoklonalen Antikörper CD20 und Herceptin. Monoklonale Antikörper binden spezifisch ein Antigen. Zur Herstellung werden Mäuse immunisiert, worauf sie die gewünschten Antikörper produzieren, die dann isoliert werden. Diese tierischen oder murinen Antikörper rufen jedoch im menschlichen Körper eine Immunreaktion hervor und sind für therapeutische Zwecke ungeeignet. Daher wurde dazu übergegangen, die murinen Antikörper zu modifizieren und mit humanen Antikörpern zu verschmelzen, so daß sie im menschlichen Körper nicht mehr als Fremdkörper erkannt werden. Diese Antikörper-Hybride sind in Abbildung 4.30 abgebildet.

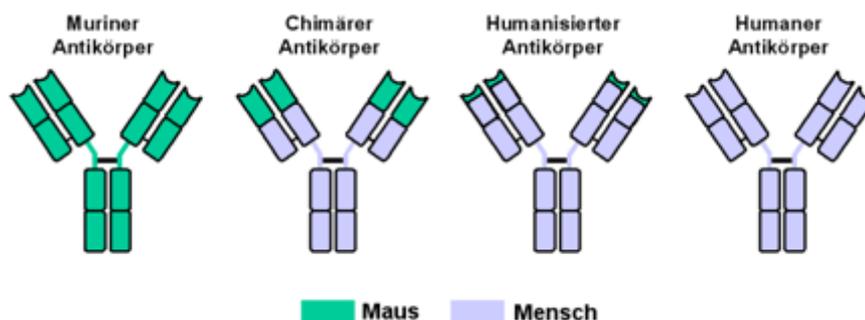


Abbildung 4.30 Antikörper-Hybride. Murine Antikörper werden aus Mäusen, humane Antikörper aus Menschen isoliert. Chimäre und humanisierte Antikörper sind Hybride aus humanen und murinen Antikörpern.

Mabthera ist der Handelsname für den chimären monoklonalen Antikörper CD20. Dieser Antikörper bindet an ein Oberflächenantigen, das auf B-Lymphozyten vorkommt. Es wird heute eingesetzt in der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen.^[116] Mabthera dient der spezifischen Anbindung von Partikeln an Lymphozyten.

Herceptin ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper und bindet an den Rezeptor HER2/neu, der sich auf der Oberfläche von Mammakarzinom-Zellen befindet und wird deshalb auch zur Brustkrebs-Therapie eingesetzt.^{[117],[118]} Herceptin soll zur spezifischen Anbindung der Partikel an Mammakarzinom-Zellen genutzt werden.

Early und Immediate Early sind Antigene auf der Oberfläche von Viren. Durch Kopplung der Antikörper an Partikel soll es möglich sein, Viren zu markieren.

CD34 bindet an das CD34-Antigen, das auf der Oberfläche von Stammzellen zu finden ist. Somit sind Partikel, an die CD34 gekoppelt ist, in der Lage, Stammzellen zu markieren.

Der Glycoproteinrezeptor GP VI spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Thromben an Gefäßen, zum Beispiel beim Herzinfarkt. GP VI bindet an Kollagen, das an sogenannten vulnerablen Plaques an der Oberfläche vorkommt. Wird GP VI an Nanopartikel gebunden, kann so freiliegendes Kollagen in Gefäßen und damit der vulnerable Plaque detektiert werden.^{[119],[120]}

Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt, besonders häufig in Muskelzellen, wo es zusammen mit Myosin die Muskelkontraktion auslöst. Der Antikörper anti- α -Aktin bindet an Aktin. Hierfür eingesetzt wurde ASM-1, ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der zur Gruppe der Immunglobuline G gehört. Die Kopplung von ASM-1 dient nicht der spezifischen Anbindung an Zellen, sondern der spezifischen Verteilung der Partikeln in den Zellen nach der Zellaufnahme.^[88]

4.3.1 Modifizierung der carboxylierten Teilchen

Reagieren Carboxylgruppen mit Aminogruppen, so entsteht eine Bindung, die auch in Peptiden zu finden ist. Diese Peptidbindung hat den Vorteil, daß sie sehr stabil ist. Der Nachteil dieser Reaktion ist aber, daß sie nicht spontan abläuft. Zur Durchführung bedient man sich daher der EDC-Kopplung, bei der zunächst eine Reaktion der Carboxylgruppe mit N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) erfolgt. Das reaktive Zwischenprodukt reagiert dann mit der Aminogruppe.^{[121]-[123]} Diese Reaktion wird heute erfolgreich in der Peptidsynthese eingesetzt, oft unter Zusatz des Katalysators N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS). Da alle Aminosäuren und Peptide, die aus Aminosäuren aufgebaut sind, Aminogruppen tragen, können solche Biomoleküle irreversibel an carboxylierte Polystyrol-Partikel gebunden werden.

Die Kopplungen wurden mit den fluoreszierenden und magnetischen carboxylierten Polystyrolpartikeln durchgeführt, deren Eigenschaften in Tabelle 4.21 aufgeführt sind. Da über die EDC-Kopplung Aminogruppen auch mit Sulfatgruppen des Tensids SDS reagieren, müssen die Proben vor der Kopplung dialysiert sein.

Tabelle 4.21 Eigenschaften der verschiedenen Polystyrolpartikel, funktionalisiert mit 3% Acrylsäure, an die Biomoleküle gebunden wurden.

Probenname	PMI-Gehalt [mg/g _{Polymer}]	Magnetit-Gehalt [%]	Feststoffgehalt nach Dialyse [%]	$D^a)$ [nm]	Ladungen auf der Oberfläche [nm ⁻²]	ζ -Potential ^{b)} [mV]
VHPM3.3	0,5	-	0,27	104	0,56	-42,4
VH-3Ka	-	28	0,61	68	0,54	-47,5
VHMPM3	0,5	35	0,25	68	0,77	-45,7
VHMPM3 .2	0,5	33	0,3	86	0,57	-

a) bestimmt durch DLS-Messungen.

b) gemessen bei pH 6.

Zunächst wurde an die Probe VH-3Ka, in der Magnetit verkapselt ist, Lysin gebunden, um den Einfluß auf die Zellaufnahme zu untersuchen. Es wurde ein molarer Überschuß an Lysin bezogen auf die Mengen an Carboxylgruppen auf der Oberfläche zugegeben, um alle Carboxylgruppen zu binden. Diese Probe wird als VH-3Ka-Lys bezeichnet. Nach der Kopplung betrug der Feststoffgehalt 0,5%. Messungen von Teilchengröße und ζ -Potential vor und nach der Kopplung zeigen, daß Lysin an die Partikel gebunden wurde: Die Teilchengröße änderte sich von 68 nm auf 151 nm um mehr als das doppelte, das ζ -Potential änderte sich von -47,5 mV auf -10,9 mV auf einen positiveren Wert, was nur durch das Aufbringen von positiven Ladungen bedingt sein kann. Eine Quantifizierung der gekoppelten Menge an Lysin ist jedoch nur schwer möglich. Da auf der Oberfläche immer noch Tensid SDS adsorbiert ist, werden Messungen der Oberflächenladungen verfälscht.

Der Unterschied in der Oberflächenladung zwischen VH-3Ka und VH-3Ka-Lys macht sich in der Zellaufnahme bemerkbar. Diese wurde an HeLa-Zellen und mesenchymalen Stammzellen (MSC) am Institut für Transfusionsmedizin Ulm von Frau Myriam Lorenz im Rahmen ihrer Dissertation getestet.^{[112],[113]} Da diese Partikel keinen Fluoreszenzmarker tragen, wurde der Eisengehalt in den Zellen durch Berliner Blau-Färbung optisch sichtbar gemacht und quantitativ mit Ferrocen nachgewiesen. In Abbildung 4.31 ist die Menge an aufgenommenem Eisen in HeLa-Zellen für verschiedene Mengen an VH-3Ka und VH-3Ka-Lys gezeigt. 0.1x entspricht einer Konzentration von 7,5 µg Nanopartikeln pro ml Kulturmedium, 1x entspricht

der zehnfachen Menge. Für VH-3Ka lag der Eisengehalt nach der Zellaufnahme unterhalb der Detektionsgrenze, daher wurde hierfür ein Transfektionsagens, Poly-L-Lysin (PLL), verwendet, woraufhin eine Aufnahme der Partikel in die Zellen detektiert werden konnte (VH-3Ka + PLL). Es ist bekannt, daß die positiv geladenen Seitengruppen in PLL die Zellaufnahme positiv beeinflussen.^{[124],[125]} Es ist ein Anstieg der aufgenommenen Menge an Eisen in Abhängigkeit der verwendeten Menge an Nanopartikeln zu erkennen. Die in den Zellen aufgenommene Eisenmenge steigt bei zehnfacher Partikelkonzentration um das Dreifache. Da Transfektionsagentien jedoch toxisch wirken, ist deren Anwendung nicht erwünscht.

In VH-3Ka-Lys ist die Transfunktionsfunktionalität direkt kovalent an die Partikel gebunden. Der Vorteil dieser Methode zeigt sich in der höheren Aufnahme von Partikeln in die Zellen bei gleicher Abhängigkeit von der Konzentration der Partikel im Kulturmedium (Abbildung 4.31). Wird die Partikelkonzentration auf das Zehnfache erhöht, so steigt die Menge an aufgenommenem Eisen auf das Achtfache. Damit eignen sich die Lysin-modifizierten Partikel am besten für die Zellaufnahme.

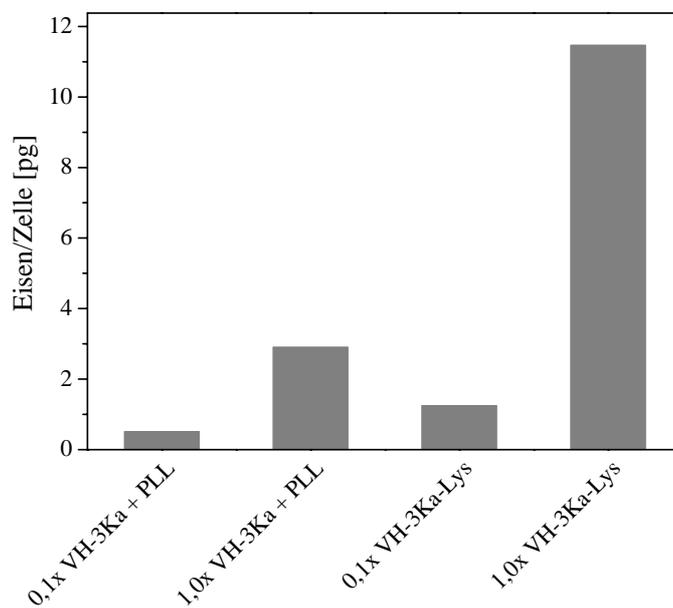


Abbildung 4.31 Aufnahme von VH-3Ka-Lys und VH-3Ka + PLL. Die Menge an Eisen pro Zellen steigt mit der Partikelkonzentration. Bei kovalent gebundener Transfunktionsfunktionalität (VH-3Ka-Lys) kann mehr Eisen aufgenommen werden als bei Partikeln mit adsorptiv gebundenem Transfektionsagens (VH-3Ka + PLL).

Die Aufnahme der Teilchen wurde auch im Lichtmikroskop bestätigt, nachdem das Eisen durch eine Preussisch Blau-Reaktion sichtbar gemacht worden war. In Abbildung 4.32 sind die intrazellulär aufgenommenen Nanopartikel als blaue Punkte erkennbar. Im Fall von VH-3Ka wurde ohne Zugabe von PLL keine nachweisbare Menge an Eisen aufgenommen.

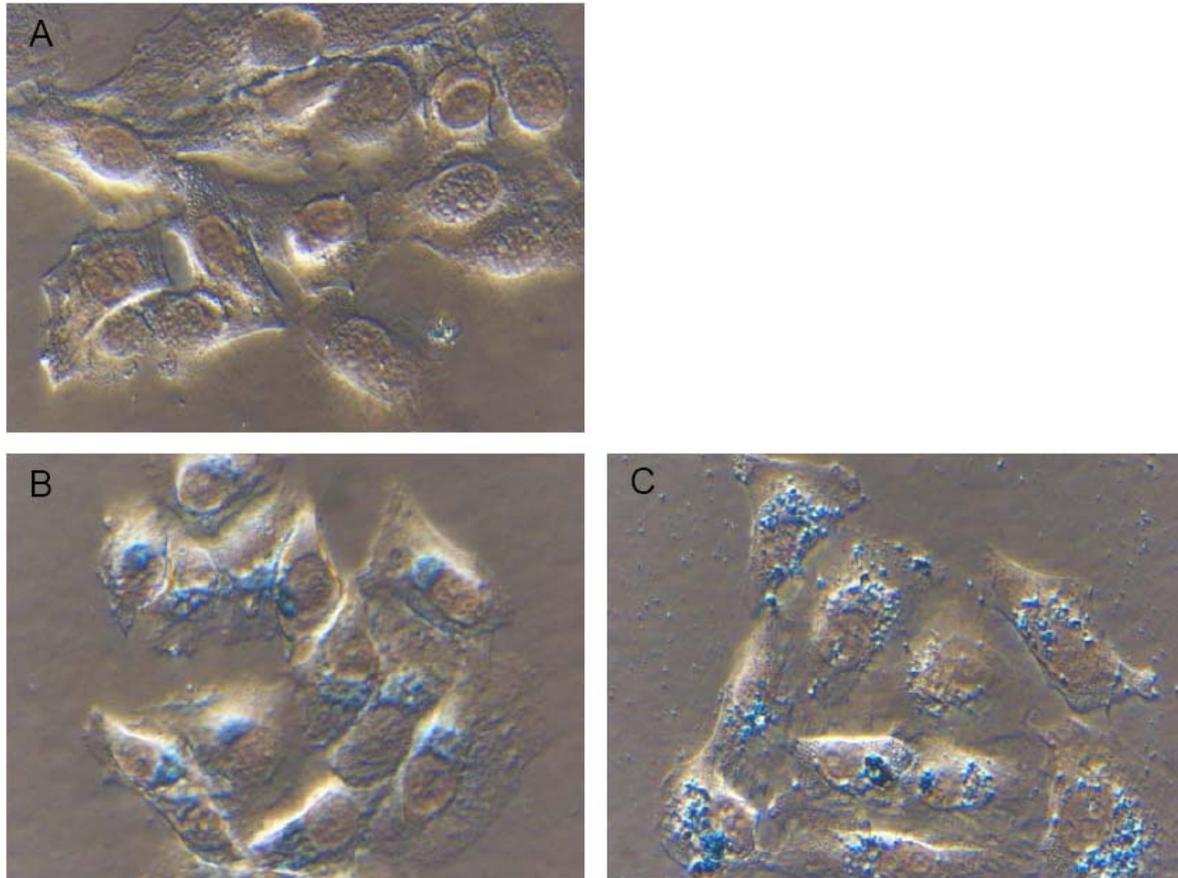


Abbildung 4.32 Lichtmikroskopische Aufnahme von HeLa-Zellen nach Aufnahme von magnetischen Polystyrolpartikeln. A) Negativkontrolle B) VH-3Ka + PLL C) VH-3Ka-Lys. Blaue Färbungen weisen auf Eisen hin.

TEM-Aufnahmen der Zellen sind in Abbildung 4.33 gezeigt. In diesen hochauflösenden Bildern können die funktionalisierten Nanopartikel VH-3Ka-Lys in endosomalen Kompartimenten in den Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.33 A). In Abbildung 4.33 B ist zu erkennen, wie die Nanopartikel von der Zellmembran umschlossen werden, was auf einen endozytischen Aufnahmeprozess hinweist. Im Fall von VH-3Ka, die wieder unter Verwendung von PLL in die Zellen eingebracht wurden, wurden die Partikel sowohl intra- als auch extrazellulär gefunden (Abbildung 4.33 C und D).

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, daß eine chemische Anbindung der positiven Ladungen, die die Zellaufnahme positiv beeinflussen, einen größeren Vorteil hat als die physikalische Adsorption von Poly-L-Lysin an die Partikel. Die Menge an

aufgenommenem Eisen ist im Fall der Lysin-modifizierten Partikel höher, und die Partikel werden nur intrazellulär gefunden.

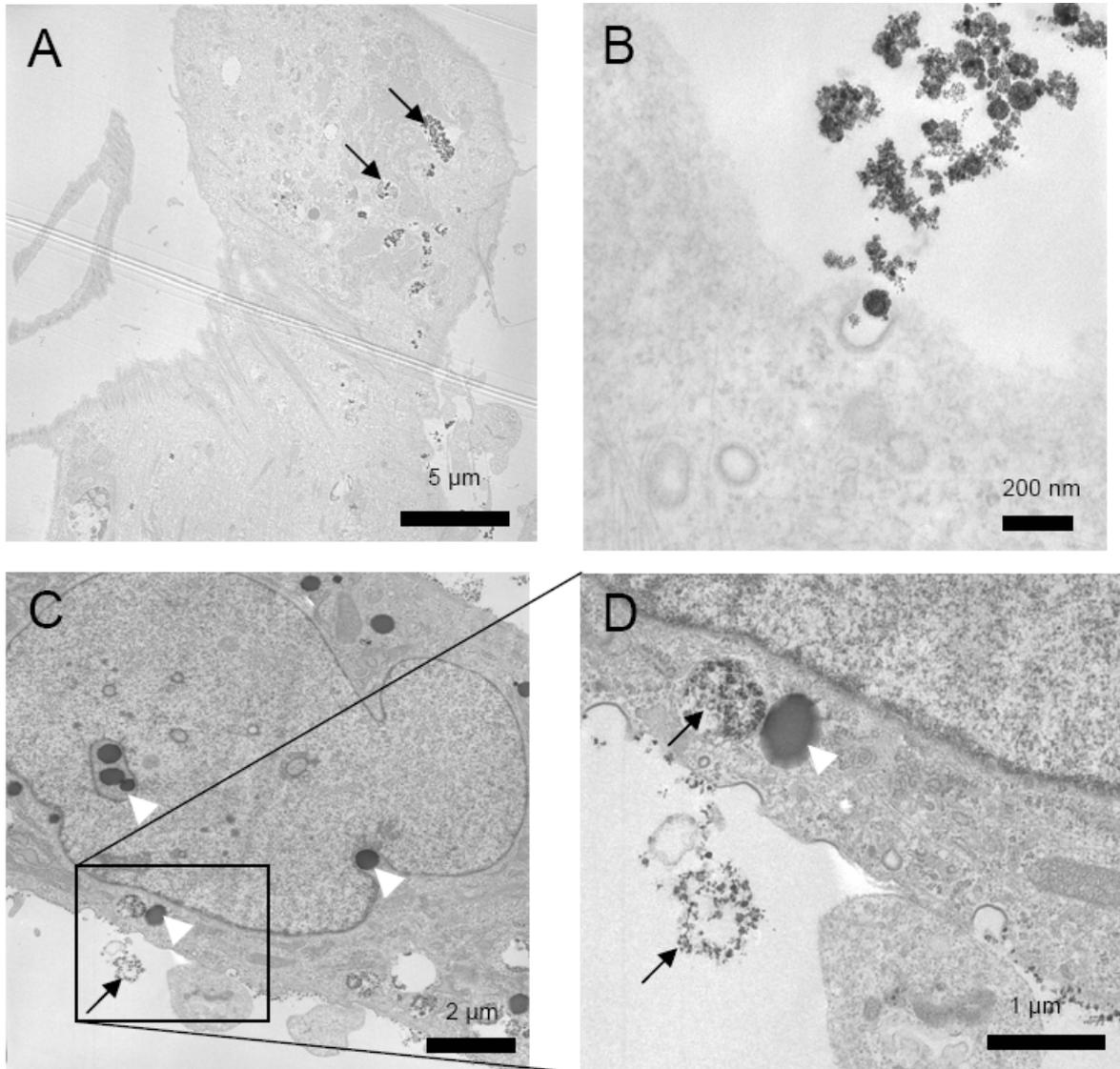


Abbildung 4.33 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mesenchymalen Stammzellen nach der Inkubation mit VH-3Ka-Lys (A und B) und VH-3Ka +PLL (C und D). Schwarze Pfeile weisen auf magnetische Nanopartikel hin, weiße Pfeile auf Zellorganellen, die durch Kontrastierung mit Bleicitrat hervorgehoben wurden.

Mit VHPM3.3, die nur einen Fluoreszenzmarker tragen, wurde die Kopplung dann an mehreren einfachen Aminosäuren getestet. Hierfür wurden zunächst alle Carboxylgruppen des Latex durch einen molaren Überschuss an EDC (bezogen auf die Konzentration an Carboxylgruppen) aktiviert, danach wurde die jeweilige Aminosäure im Überschuss zugegeben, um eine maximale Menge an Carboxylgruppen zur Reaktion zu bringen. Für die Kopplung wurden die vier Aminosäuren Glycin, Lysin, Glutamin und Asparagin, die in Abbildung 4.34 gezeigt sind, gewählt. Nachgewiesen wurde die Kopplung durch eine

Änderung in Teilchengröße und ζ -Potential. Tabelle 4.22 zeigt, wie sich diese Größen nach der Kopplung geändert haben.

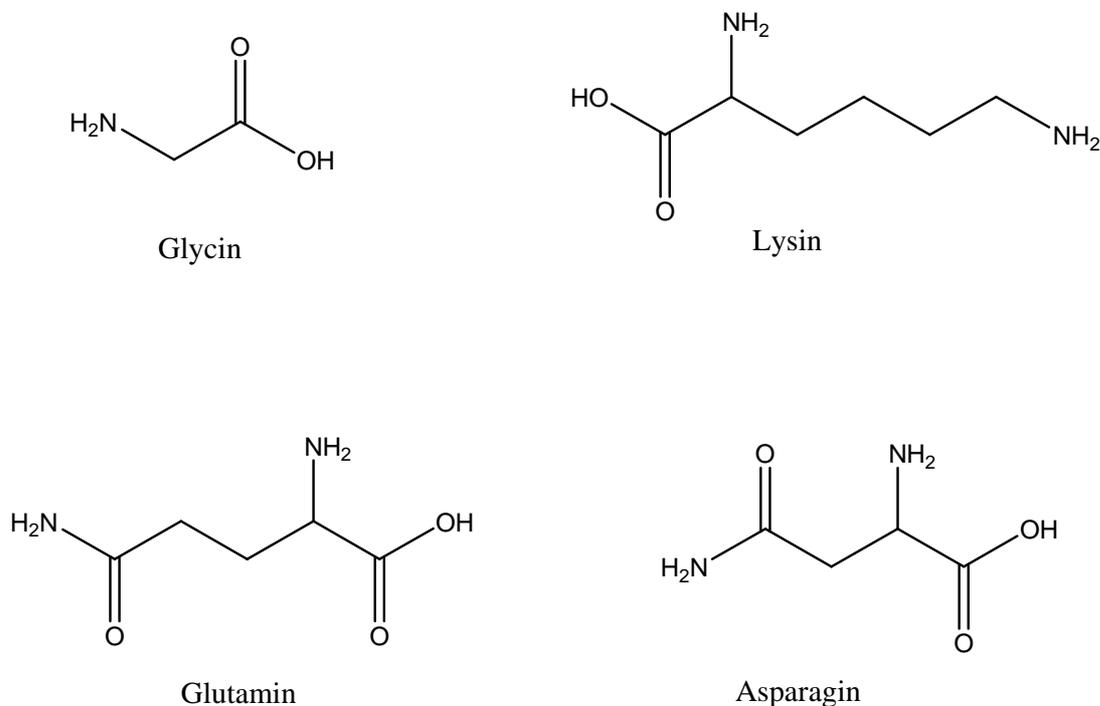


Abbildung 4.34 Strukturformel der an carboxylierte Polystyrolpartikel gebundenen Aminosäuren Glycin, Lysin, Glutamin und Asparagin.

Tabelle 4.22 Änderung von Teilchengröße und ζ -Potential durch die Anbindung verschiedener Aminosäuren an VHPM3.3.

Probenname	gebundene Aminosäure	D vor Kopplung ^{a)} [nm]	D nach Kopplung ^{a)} [nm]	ζ -Potential vor Kopplung ^{b)} [mV]	ζ -Potential nach Kopplung ^{b)} [mV]
VHPM-Gly	Glycin		101		-41,1
VHPM-Lys	Lysin		134		-35,4
VHPM-Glu	Glutamin	104	101	-42,4	-47,2
VHPM-Asp	Asparagin		105		-56,5

^{a)} bestimmt durch DLS-Messungen.

^{b)} gemessen bei pH 6.

Bei der Kopplung von Lysin, Glutamin und Asparagin ist eine Änderung des ζ -Potentials zu erkennen. Es ändert sich auch bei Lysin trotz der positiv geladenen Aminogruppen nicht zu positiven Werten, da der positive Beitrag teilweise durch weiterhin vorhandene

Carboxylgruppen und nicht vollständig abgewaschenes Tensid kompensiert wird. Asparagin und Glutamin liefern sogar einen negativen Beitrag zum ζ -Potential, da die Amidgruppe in diesen Molekülen in der deprotonierten Form isomiestabilisiert ist. Die Teilchengrößenänderung ist bei der Ankopplung von Lysin besonders stark. Hier ist der große Unterschied auf die Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers durch die Aminogruppe zurückzuführen. In den anderen Fällen ist keine Änderung zu beobachten. Die Aminosäuren sind zu klein, um bedeutenden Einfluß auf die Teilchengröße zu haben. Im Fall von Glycin ändern sich weder ζ -Potential noch Teilchengröße. Da durch Glycin keine neuen funktionellen Gruppen auf die Teilchenoberfläche gebracht werden, ist auch kein Effekt zu erwarten. Die erfolgreiche Anbindung von Glycin kann daher bislang nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 4.35 zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Zellaufnahme der funktionalisierten Partikel in mesenchymalen Stammzellen, die von Frau Myriam Lorenz am Institut für Transfusionsmedizin im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt wurden.^[112] Hier zeigt sich wiederum die positive Auswirkung der Funktionalisierung mit Lysin. Werden an die Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure)-Partikel positiv geladene Aminosäuren gebunden, so wird die Zellaufnahme um ca. 30% erhöht. Durch Anbindung von Glycin zeigt sich kein Effekt, was auch zu erwarten war, da sich die Oberflächenladung nicht ändert. Die Anbindung von Glutamin und Asparagin hat keinen oder einen nur geringen negativen Effekt.

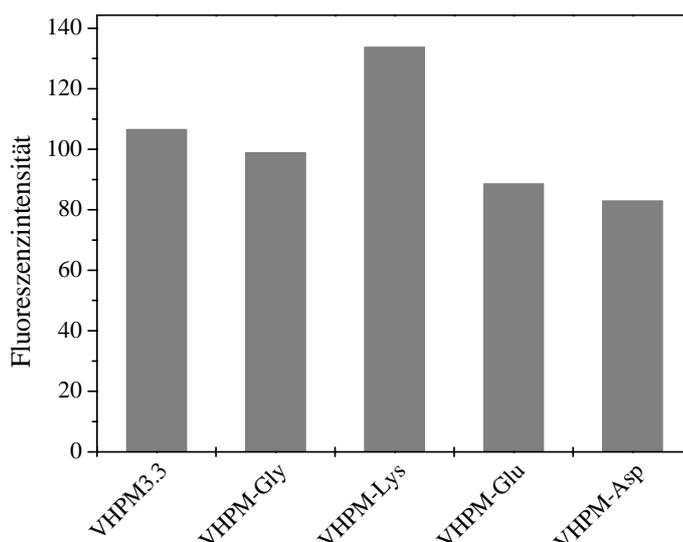


Abbildung 4.35 Zellaufnahme von VHPM3.3 und VHPM3.3 nach Funktionalisierung mit verschiedenen Aminosäuren. Die Anbindung von Aminogruppen aus Lysin führt zu einer deutlichen Erhöhung der Zellaufnahme.

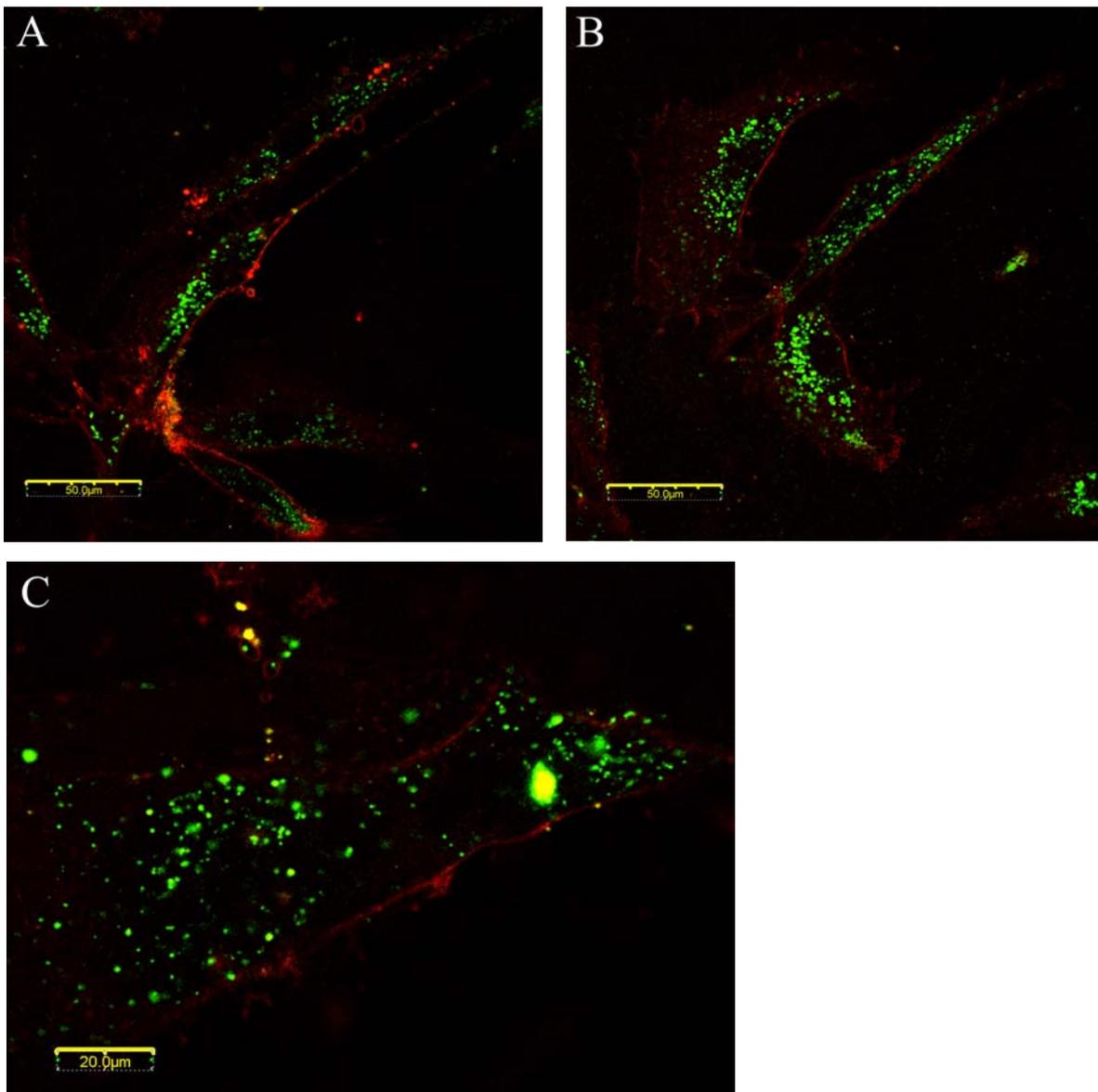


Abbildung 4.36 Laser-Scanning-Mikroskopie von MSCs nach Aufnahme von A) VHPM-Gly, B) VHPM-Asp, C) VHPM-Lys.

Während die Anbindung von Aminosäuren nur eine neue Oberflächenfunktionalisierung auf die Partikel bringt, hat die Anbindung von komplexen Proteinen wie zum Beispiel Antikörpern das Ziel, die Partikel spezifisch auf einen Zelltyp zu machen. Zu diesem Zweck wurden carboxylierte Teilchen mit ASM-1, Streptavidin, CD34, Early/Immediate Early, Mabthera und Herceptin und das Glykoprotein GP VI gekoppelt.

Da alle diese Proteine hohe Molekulargewichte von mehreren kDa aufweisen, ist es nicht sinnvoll, die Oberfläche der Partikel abzusättigen, d.h. alle vorhandenen Carboxylgruppen zu funktionalisieren. Vielmehr sollen nur ein bis zehn Moleküle pro Partikel gebunden werden, um die Dispersionen stabil zu halten und Ausflockung zu verhindern. Dennoch wurden

zunächst alle Gruppen mit EDC aktiviert, um die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung hoch zu halten. Eine durch EDC aktivierte Carboxylgruppe ist hydrolyseempfindlich. Liegt keine Aminogruppe zur Weiterreaktion vor, so hydrolysiert sie wieder zur Carboxylgruppe. Daher können alle Carboxylgruppen aktiviert werden, da sie nach der Kopplung, die im wässrigen Medium stattfindet, wieder im ursprünglichen Zustand vorliegen, mit Ausnahme derer, die mit den Proteinen reagieren konnten. In Tabelle 4.23 sind die durchgeführten Kopplungen aufgelistet.

Die Kopplungen wurden über die Änderung der Teilchengröße und zum Teil über die Änderung des ζ -Potentials nachgewiesen. VHPM-Her und VHPM-Her10 blieben nicht stabil und konnten daher nicht vermessen werden. VHMPM-vir blieb lange genug stabil, um das ζ -Potential messen zu können. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.24.

Tabelle 4.23 Übersicht über die durchgeführten Kopplungen von Proteinen an carboxylierte Polystyrolpartikel.

Probenname	verwendeter Latex	gekoppeltes Protein	eingesetzte Menge an Molekülen pro Partikel
VHPM-AK	VHPM3.3	ASM-1	1
VHPM-Mab	VHPM3.3	Mabthera	1
VHPM-Mab10	VHPM3.3	Mabthera	10
VHPM-Her	VHPM3.3	Herceptin	1
VHPM-Her10	VHPM3.3	Herceptin	10
VHMPM-GP16	VHMPM3	Glykoprotein	1
VHMPM-vir	VHMPM3	Early / Immediate Early	1
VHMPM-STR	VHMPM3.2	Streptavidin	1

Tabelle 4.24 Änderung der Teilchengrößen und ζ -Potentiale durch Kopplung von Proteinen an carboxylierte Polystyrolnanopartikel.

Probenname	$D^a)$ [nm]		ζ -Potential ^{b)} [nm]	
	vor der Kopplung	nach der Kopplung	vor der Kopplung	nach der Kopplung
VHPM-AK	100	129	-42,4	-23,4
VHPM-Mab	100	113	-42,4	-41,4
VHPM-Mab10	100	128	-42,4	-33,3
VHMPM-GP16	48	111	-46	-18,7
VHMPM-vir	48	-	-46	-27,9
VHMPM-STR	86	112	-	-

a) bestimmt durch DLS-Messungen.

b) gemessen bei pH 6.

Die Teilchengrößen steigen nach Anbindung aller Proteine stark an. Proteine sind also groß genug, um einen sichtbaren Einfluß auf die Teilchengröße zu haben. Auch das ζ -Potential ändert sich in allen Proben zu einem positiveren Wert, der Betrag wird kleiner. Das bedeutet zum einen, daß negative Ladungen auf der Oberfläche durch die Anbindung verloren gehen, zum anderen, daß positive Ladungen auf Teilchen aufgebracht werden.

Für alle Proben darf aufgrund dieser Messungen davon ausgegangen werden, daß die Kopplung erfolgreich war. Eine genaue Quantifizierung, welcher Anteil der Proteine angekoppelt worden war, konnte bislang nicht erfolgreich durchgeführt werden.

VHMPM-STR war nicht stabil und flockte nach wenigen Tagen aus.

Zellversuche mit den modifizierten Partikeln zeigten bisher nur eine geringe spezifische Aufnahme der Teilchen VHPM-Mab und VHPM-Mab10. Da die Partikel jedoch sehr klein sind, muß davon ausgegangen werden, daß sie unspezifisch über die Zellwand aufgenommen werden, bevor eine Bindung an den entsprechenden Rezeptor erfolgen kann. Außerdem ist die Konzentration an Proteinen pro Partikel sehr gering, kann aber aufgrund der geringeren Stabilität nur schwer erhöht werden.

Die EDC-Kopplung ist eine bekannte Art, Carboxyl- und Aminogruppen zu Peptidbindungen reagieren zu lassen. Diese Methode konnte auf die Anbindung von Biomolekülen an Polystyrolnanopartikel übertragen werden. Die erfolgreich Kopplung von Lysin an magnetische Polystyrolnanopartikel führte zu einer Erhöhung der Aufnahme in HeLa- und mesenchymalen Stammzellen.

4.3.2 Modifizierung der glycidylfunktionalisierten Teilchen

Der Vorteil der Kopplung an Glycidylgruppen ist, daß keine Aktivierung der Gruppen mit EDC erfolgen muß. Die Glycidylgruppen sind ausreichend reaktiv, es müssen nur Partikel und anzubindendes Protein gemischt und über Nacht gerührt werden. Hinzu kommt, daß die Aminogruppen in diesem Fall nicht mit den Sulfatgruppen des Tensids reagieren können. Die Proben müssen daher nicht nahezu tensidfrei gewaschen werden. Sie werden allerdings kurz dialysiert, um überschüssiges Tensid abzuwaschen. Nachteil ist, daß die Glycidylgruppen auch hydrolyseempfindlich sind. Damit können für die Kopplungen nur frisch hergestellte Dispersionen verwendet werden.

An die glycidylfunktionalisierten Partikel VHPSG10 und VHMPG10 wurden CD34, Herceptin, Mabthera und Streptavidin gebunden.

In Tabelle 4.25 sind die Experimente aufgeführt. Um eine Ausflockung der Dispersionen zu verhindern, wurden nicht alle Glycidylgruppen auf der Oberfläche modifiziert. Die Menge an Protein wurde variiert zwischen einem und 1000 Molekülen pro Partikel.

Tabelle 4.25 Kopplung von Proteinen an glycidylfunktionalisierte Polystyrolpartikel.

Probenname	verwendeter Latex	verwendetes Protein	gekoppelte Moleküle pro Partikel
VHPSG-CD34	VHPSG10	CD34	1
VHPSG-CD34-10	VHPSG10	CD34	10
VHPSG-Her	VHPSG10	Herceptin	10
VHPSG-Mab	VHPSG10	Mabthera	10
VHPSG-Mab100	VHPSG10	Mabthera	100
VHMPG-STR10	VHMPG10	Streptavidin	10
VHMPG-STR100	VHMPG10	Streptavidin	100
VHMPG-STR1000	VHMPG10	Streptavidin	1000

Die Kopplungen wurden in diesem Fall nur durch die Änderung der Teilchengröße nachgewiesen. Da die Proben nicht tensidfrei gewaschen wurden, wird das ζ -Potential hauptsächlich durch SDS aufgebaut und ist daher nicht aussagekräftig. Die Änderungen der Teilchengrößen sind in Tabelle 4.26 aufgeführt.

Tabelle 4.26 Änderung der Teilchengröße durch Anbindung von Proteinen an glycidylfunktionalisierte Polystyrolpartikel.

Probenname	$D^a)$ [nm]	
	vor der Kopplung	nach der Kopplung
VHPSG-CD34	99	113
VHPSG-CD34-10	99	117
VHPSG-Her	99	104
VHPSG-Mab	99	130
VHPSG-Mab100	99	3380
VHMPSG-STR10	73	295
VHMPSG-STR100	73	1220
VHMPSG-STR1000	73	2210

^{a)} aus DLS-Messungen.

In allen Proben sind deutliche Änderungen der Teilchengrößen zu sehen, was ein Hinweis auf eine erfolgreiche Kopplung ist. Die Teilchengrößen für VHPSG-Mab100, VHMPSG-STR100 und VHMPSG-STR1000 liegen im Mikrometerbereich und sind nicht für längere Zeit stabil. Die Beladung war damit zu hoch, es kam zur Bildung von Aggregaten und die Dispersionen wurden schnell instabil. Trotz des fehlenden Schrittes der Aktivierung der funktionellen Gruppen kann somit die Konzentration an Proteinen auf der Partikeloberfläche nicht beliebig erhöht werden.

Trotz der erfolgreichen Funktionalisierung der Partikel zeigten die Zellversuche keine ausgeprägte Selektivität. Hier ist das Problem zusätzlich zur kleinen Teilchengröße auch in der Oberflächenfunktionalisierung zu suchen. Glycidylgruppen sind sehr reaktiv und können an viele funktionelle Gruppen, die in Zellmembranen und im Zellinneren vorhanden sind, binden, wodurch die Selektivität verloren geht.

4.4 Verkapselung von Magnetit-Nanopartikeln in Polymeren aus Polyadditionsreaktionen

Neben Polystyrol werden neue Polymere speziell für den Einsatz in der Medizin benötigt. Polystyrol ist nicht bioabbaubar und bleibt im System, während für bestimmte Anwendungen ein Abbau des Polymers erwünscht wäre.

Da Polystyrol für medizinische Einsätze nicht zugelassen ist, bietet es sich an, auf ein Polymer zu wechseln, das bereits in der Medizintechnik eingesetzt wird. Hier stößt man schnell auf Polyurethan, das schon in der Implantattechnik Einsatz findet. So sind künstliche Blutgefäße, künstliche Herzklappen und Hautimplantate aus Polyurethan. Außerdem wird es für Dialyse- und Infusionsschläuche verwendet. Neben Polyurethan soll auch die Verkapselung in Epoxidharzen getestet werden.

Sowohl Polyurethan als auch Epoxidharze werden durch Polyaddition hergestellt. Daß Polyadditionsreaktion in Miniemulsionen möglich sind, wurde schon früher bewiesen.^{[33],[34],[35]} Nun soll ebenfalls in Miniemulsion in diesen Polymeren Magnetit verkapselt werden, um sie für verschiedene biomedizinische Anwendungsmöglichkeiten nutzbar zu machen.

4.4.1 Verkapselung von Magnetit in Polyurethan

Polyurethan kann in Miniemulsion aus Isophorondiisocyanat und Dodecandiol polymersiert werden. Die Strukturformel von Isophorondiisocyanat ist in Abbildung 4.37 gezeigt.

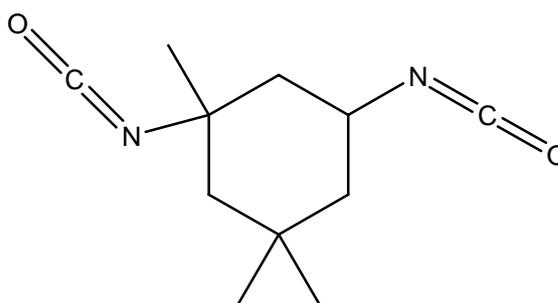


Abbildung 4.37 Strukturformel von Isophorondiisocyanat.

Für die Verkapselung von Magnetit wird die gleiche Vorgehensweise gewählt wie bei der Verkapselung von Magnetit in Polystyrol: Zunächst wird die wässrige Miniemulsion der Monomere hergestellt, indem die Monomermischung mit einer wässrigen SDS-Lösung eine Stunde lang gerührt wird und danach Ultraschall angewandt wird. Die Monomerminiemulsion wird dann mit einer Magnetit-Miniemulsion durch Anwendung von Ultraschall gemischt,

wodurch sich die Tröpfchen und Nanopartikel vereinigen sollen. Erst im Anschluß wird durch Temperaturerhöhung polymerisiert. Tabelle 4.27 zeigt die Herstellung der beiden Proben.

Tabelle 4.27 Herstellung von magnetischen Polyurethanpartikeln.

Probenname	Monomeremulsion 1 h gerührt bei	verwendete Magnetit- Miniemulsion	Vereinigung der Miniemulsionen durch
VHMPU2	RT	VH-Mag4.12	US, 2 x 1 min (50%)
VHMPU3	0 °C	VH-Mag4.95 VH-Mag4.12	US, 3 x 1 min (50%)

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.28 zusammengefaßt. Keine der Proben zeigte Aggregatbildung, die Proben blieben stabil.

Tabelle 4.28 Eigenschaften der magnetischen Polyurethanpartikel.

Probenname	SC [%]	Magnetitgehalt [%]	D [nm]	PDI
VHMPU2	5,29	31	136	0,2
VHMPU3	2,89	36	126	0,199

Die unterschiedlichen Arten der Miniemulsionsherstellung und der Vereinigung der beiden Miniemulsionen hat keinen Einfluß auf die Teilchengröße. Diese Größen liegen in dem erwarteten Bereich von ca. 100 nm. Um die Effektivität der Verkapselung zu überprüfen, wurden Ultrazentrifugationsexperimente im Dichtegradienten durchgeführt. Hier werden Polymerpartikel, Hybridpartikel und Magnetitpartikel aufgrund ihrer Dichte getrennt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.38 gezeigt.

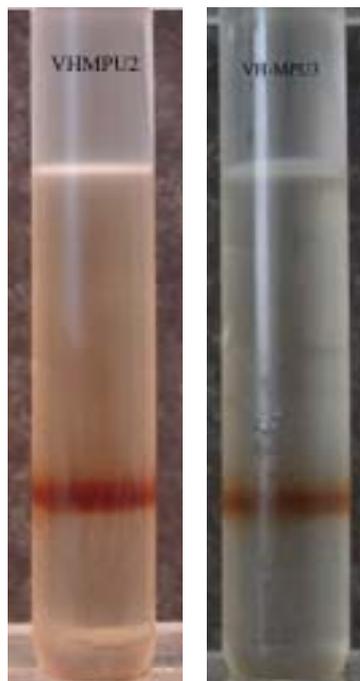


Abbildung 4.38 Ergebnisse der Ultrazentrifugation von VHMPU2 (links) und VHMPU3 (rechts).

In beiden Proben ist die Dichteverteilung der Hybridpartikel sehr eng. Doch weisen sie noch große Mengen an reinem Polymer und unverkapseltem Material auf, auch die verlängerte Schallzeit zur Vereinigung der Miniemulsionen hat darauf keinen Einfluß. Daraus ist zu schließen, daß die Verkapselung nicht effektiv ist. Um diese Annahme zu untermauern, wurden TEM-Aufnahmen von beiden Proben gemacht. Diese sind in Abbildung 4.39 gezeigt. Auf diesen Aufnahmen ist deutlich zu sehen, daß die Magnetitpartikel nicht verkapselt sind. Vielmehr lagern sie sich auf den Polyurethanpartikeln an.

Zwar werden mit verlängerter Schallzeit auch Polyurethanpartikel gefunden, in denen Magnetitpartikel verkapselt sind, wie in Abbildung 4.40 zu erkennen ist, doch überwiegt die Zahl der reinen Polymerpartikel, auf deren Oberfläche die Magnetitpartikel angelagert sind. Diese Anlagerung auf der Partikeloberfläche ist jedoch teilweise so stark, daß die Partikel während der Ultrazentrifugation nicht vollständig getrennt werden, weshalb im Dichtegradienten Hybridpartikel zu sehen sind.

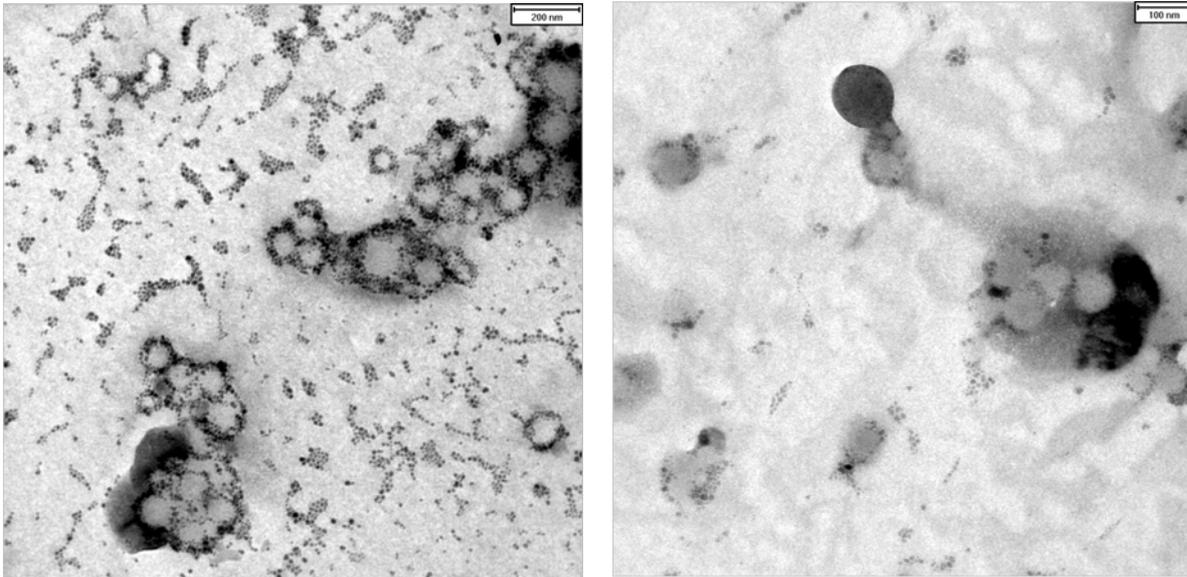


Abbildung 4.39 TEM-Aufnahmen von VHMPU2 (links) und VHMPU3 (rechts).

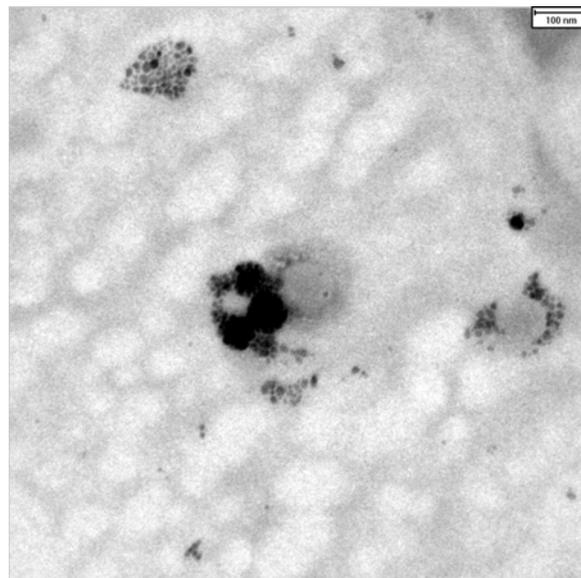


Abbildung 4.40 TEM-Aufnahme von VHMPU3, die in Polyurethan verkapselte Magnetitnanopartikel zeigt.

Der Grund dafür, daß Magnetit in Polyurethan nicht verkapselt wird, ist möglicherweise in der unterschiedlichen Hydrophobie der Partikel zu suchen. Bei den Magnetitpartikeln ist durch die Beschichtung mit einer langkettigen Fettsäure der hydrophobe Charakter wesentlich stärker ausgeprägt als in Polyurethan, was zu einer Erhöhung der Grenzflächenenergie führt. Die Urethangruppen leisten einen erheblichen Anteil zur Hydrophilie des Polymers. Dieses Problem sollte gelöst werden können, indem die Beschichtung der Magnetitpartikel variiert wird, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

4.4.2 Verkapselung von Magnetit in Epoxidharzen

Für die Verkapselung von Magnetitpartikeln in Epoxidharzen wurde das Additionsprodukt aus Bisphenol-A-diglycidylether (BGE) und Diaminododecan (C12DA) gewählt. Die Strukturformel von Bisphenol-A-diglycidylether ist in Abbildung 4.41 gezeigt.

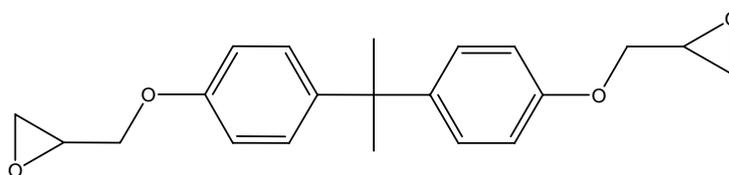


Abbildung 4.41 Strukturformel von Bisphenol-A-diglycidylether.

Für diese beiden Monomere stellt sich die Frage der sinnvollen Herstellung der Miniemulsion, da Bisphenol-A-diglycidylether sehr viskos ist. In der Literatur werden die Monomere vermischt und dann die Miniemulsion wie im Fall von Polystyrol hergestellt, nachdem eine Stunde bei 0 °C gerührt wurde.^[29] Um die Teilchengröße und die Monodispersität zu optimieren, wurden zunächst einige Versuche durchgeführt, Epoxidharze in Miniemulsion herzustellen, wobei das Verhältnis der Monomere zueinander, die Art der Emulgierung (Ultra-Turrax UT oder Rührer), der pH-Wert der wässrigen Phase und die Schallzeiten zur Herstellung der Miniemulsionen variiert wurden. In Tabelle 4.29 ist eine Übersicht über die durchgeführten Experimente gegeben. Es wurden zunächst nur zwei Monomerverhältnisse gewählt, zum einen ein stöchiometrisches Verhältnis, zum einen ein Verhältnis Bisphenol-A-diglycidylether : 1,12-Diaminododecan von 2:1. Ein Verhältnis 2:1 bewirkt einen hohen Vernetzungsgrad im Polymer, da die Aminogruppen des Diamins zweifach reagieren.

Die besten Ergebnisse in Bezug auf Stabilität und Teilchengröße wurden erzielt, wenn die wässrige Phase einen pH von über 9 aufweist, da mit zunehmenden pH-Werten das Diamin immer unlöslicher in Wasser wird. Außerdem scheint wichtig zu sein, daß die Temperatur bei der Anwendung von Ultraschall nicht zu hoch steigt. Wird temperaturkontrolliert geschallt, so erhält man nach Polymerisation eine stabile Miniemulsion. Wird die Temperatur nicht kontrolliert, so besteht die Gefahr, daß die Monomere polymerisieren, bevor die Miniemulsion stabil ist. Dadurch können sehr große Polymerpartikel entstehen. Dieses Phänomen ist zu beobachten in der Probe VH-Ep3, aber auch in den Proben VH-Ep5 und VH-Ep7, in denen zunächst mit dem Ultra-Turrax gerührt wurde. Das Mischen der Monomerphase kombiniert mit Temperaturkontrolle während der Anwendung von Ultraschall mit der wässrigen Phase bei 0 °C zu Teilchengröße unter 300 nm, wie in den Proben VH-Ep4 und VH-Ep14. Teilchengrößen von weniger als 300 nm können auch erhalten werden, indem man auf das Voremulgieren der beiden Phasen verzichtet und die Schallzeit auf zweimal zwei Minuten erhöht (VH-Ep11).

Tabelle 4.29 Änderung der Parameter bei der Polyaddition von BGE und C12DA in Miniemulsion.

Probenname	Verhältnis BGE:C12DA	pH der wässrigen Phase	Mischen der beiden Phasen mit	US-Einstellungen	$D^a)$ [nm]	PDI
VH-Ep3	2:1	9,56	Rührer 1 h bei RT	3 min, 90%, T<15 °C	924	0,897
VH-Ep4	2:1	9,56	Rührer 1 h bei 0 °C	3 min, 90%, T<20 °C	292	0,313
VH-Ep5	1:1	6	UT 1 min, Rührer 1 h bei 0 °C	2 min, 90%	765	0,667
VH-Ep6	1:1	9,6	Rührer 1 h bei 0 °C	3 min, 90%	227	0,432
VH-Ep7	1:1	9,6	30 s UT, Rührer 1 h bei 0 °C	3 min, 90%	1510	0,840
VH-Ep8	1:1	9,7	30 min US, 15% (20 s Puls, 20 s Pause)	3 min, 90%	94	0,450
VH-Ep9	1:1	9,7	-	2x 2 min, 90%	131	0,511
VH-Ep10	1:1	9,8	30 min US, 20% (20 s Puls, 20 s Pause)	3 min, 90%	509	0,496
VH-Ep11	2:1	9,8	-	2x 2 min	240	0,419
VH-Ep13	1:1	6	Rührer 1 h bei 0 °C	2x 2 min, 90%	274	0,395
VH-Ep14	1:1	9,5	UT 5 min bei 0 °C	2x 2 min, 90%	285	0,443

^{a)} aus DLS-Messungen bestimmt.

Für die Verkapselung von Magnetit wurde der Ansatz VH-Ep4 zur Grundlage genommen. Hier konnte das beste Ergebnis bezüglich Stabilität, Teilchengröße und PDI erzielt werden. Das Verhältnis der Monomeren Bisphenol-A-diglycidylether : Diaminododecan wurde variiert zwischen einem stöchiometrischen Verhältnis 1:1, dem Verhältnis 2:1, einem leichten Überschuss von Bisphenol-A-diglycidylether bei einem Verhältnis 1,1:1 und einem leichten Überschuss an Diaminododecan bei einem Verhältnis von 1:1,1. Neben dem gewöhnlichen Produkt aus dem Verhältnis von 1:1 soll durch ein Monomerenverhältnis von 2:1 ein hochvernetztes Polymer entstehen, bei dem die Aminogruppen mit zwei Glycidylgruppen reagieren. Ein leichter Überschuss an Bisphenol-A-diglycidylether erhöht die Konzentration an Glycidylgruppen im Polymer und speziell auf der Partikeloberfläche, ein leichter Überschuss an Diaminododecan erhöht umgekehrt die Konzentration an Aminogruppen. So kann eine Oberflächenfunktionalisierung erzielt werden.

Die Monomerminiemulsion wurde mit der Magnetitminiemulsion, wie im Fall der magnetischen Polystyrolpartikel, so gemischt, daß der Anteil an Polymer in den Hybridpartikeln 50% beträgt. Die verschiedenen Ansätze und Ergebnisse sind in Tabelle 4.30 aufgelistet.

In den Ansätzen VH-MEp5, VH-MEp6, VH-MEp7 und VH-MEp8 wurde die wässrige Phase lediglich mit ein bis zwei Tropfen 1M NaOH versetzt, ohne den pH-Wert zu kontrollieren. Hier erwies sich die höhere Konzentration an NaOH als sinnvoller in Bezug auf die Einstellung der Teilchengröße. Daher wurde der pH-Wert in den Ansätzen VH-MEp9, VH-MEp10, VH-MEp11 und VH-MEp12 auf 10 erhöht. Auch aus der Literatur ist bekannt, daß der optimale pH-Wert für die Polyaddition von Diaminen an Diepoxide bei 9-10 liegt.^[29] Die Teilchengrößen sind weiterhin klein (< 100 nm), die PDI-Werte liegen bei 0,3.

Generell ist eine Emulgierung der Monomere durch magnetisches Rühren am sinnvollsten. Die Teilchen werden kleiner, die Verkapselung homogener. Durch Emulgieren mit dem Ultra-Turrax wird die Viskosität der Monomerminiemulsion so hoch, daß eine Vermischung mit der Magnetitminiemulsion und das Vereinigen der beiden Miniemulsion erschwert wird.

Tabelle 4.30 Herstellung und Eigenschaften der magnetischen Epoxidharzpartikel.

Probenname	Verhältnis BGE:C12DA	pH in der Monomer- miniemulsion	verwendete Magnetit- miniemulsion	Feststoffgehalt [%]	Magnetitgehalt [%]	D^a) [nm]	PDI ^{a)}
VH-MEp5	1:1	keine pH- Kontrolle (Zugabe von 1 Tr. NaOH)	VH-Mag4.12	2,43	35	223	0,268
VH-MEp6	2:1	keine pH- Kontrolle (Zugabe von 1 Tr. NaOH)	VH-Mag4.12	1,96	37	474	0,523
VH-MEp7	1,1:1	keine pH- Kontrolle (Zugabe von 2 Tr. NaOH)	VH-Mag4.12	4,48	34	90	0,17
VH-MEp8	1:1,1	keine pH- Kontrolle (Zugabe von 2 Tr. NaOH)	VH-Mag4.12	2,00	46	79	0,128
VH-MEp9	1:1	10	VH-Mag4.46	2,35	37	113	0,339
VH-MEp10	2:1	10,1	VH-Mag4.46	1,93	30	73	0,339
VH-MEp11	1,1:1	10,3	VH-Mag4.46	1,49	32	74	0,313
VH-MEp12	1:1,1	10,4	VH-Mag4.46, VH-Mag4.12	1,97	33	72	0,293

^{a)} aus DLS-Messungen bestimmt.

Eine Änderung des pH-Wertes wirkt sich auf die Verkapselung von Magnetit aus. Abbildung 4.42 zeigt die Ergebnisse der Ultrazentrifugation im Dichtegradienten. Die Proben VH-MEp9, VH-MEp10, VH-MEp11 und VH-MEp12, in denen ein pH-Wert von über 10 eingestellt wurde, weisen alle eine enge Dichteverteilung der Hybridpartikel auf. Zudem ist nur wenig reines Polymer vorhanden, und es findet sich nur wenig unverkapseltes Material. Im Gegensatz hierzu findet man in den Proben VH-MEp5, VH-MEp6, VH-MEp7 und VH-MEp8, in denen der pH-Wert nicht kontrolliert wurde, jeweils reines Polymer und viel unverkapseltes Material. Die Verkapselung in diesen Proben ist weniger effektiv.

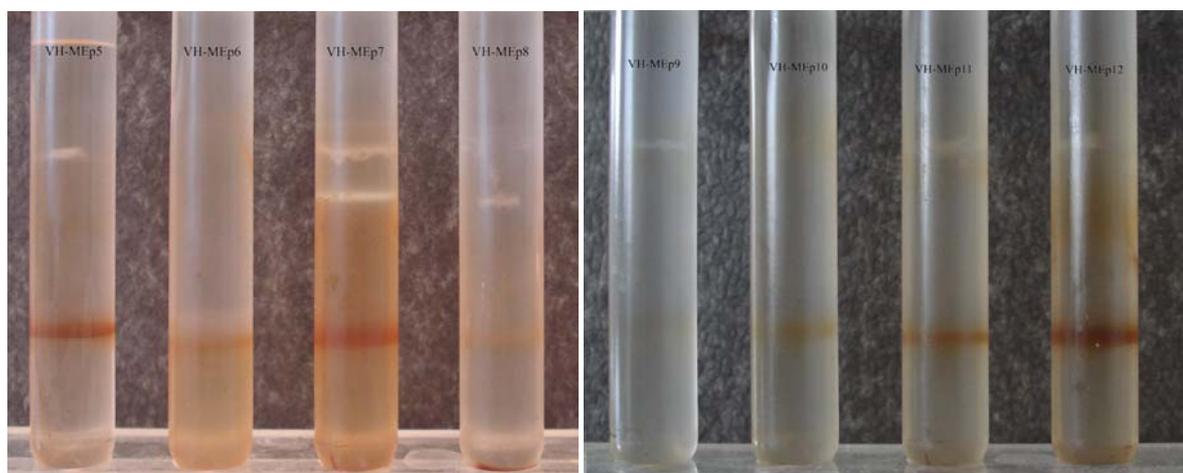


Abbildung 4.42 Ultrazentrifugation der magnetischen Epoxidharzpartikel. Links sind die Proben ohne pH-Kontrolle gezeigt, rechts die Proben mit einem pH von ca. 10. Bei höherem pH ist die Verkapselung effektiver.

Es ist literaturbekannt, daß sich Diaminododecan bei höheren pH-Werten schlechter in der wässrigen Phase löst.^[29] Darin ist der Grund zu suchen, warum bei der Herstellung der Epoxidharz-Miniemulsion in der wässrigen Phase ein pH-Wert zwischen 9 und 10 eingestellt werden muß. Aus dem gleichen Grund gelingt möglicherweise die Verkapselung besser, wenn ein höherer pH-Wert eingestellt wird. Das Monomermischung wird hydrophober und mischt sich besser mit den hydrophobisierten Magnetitpartikeln.

Die Effektivität der Verkapselung läßt sich mit TEM-Aufnahmen bestätigen. Die Aufnahmen der Proben VH-MEp5, VH-MEp6, VH-MEp7 und VH-MEp8 sind in Abbildung 4.43 gezeigt. Der pH-Wert der wässrigen Phase lag in diesen Proben unkontrolliert unter einem Wert von 10. Man kann in den Proben VH-MEp5, VH-MEp6 und VH-MEp8 Hybridpartikel erkennen, allerdings neben viel freien Magnetitpartikeln. In der Probe VH-MEp7 tritt das gleiche Phänomen auf wie bei der Verkapselung in Polyurethan: Die Magnetitpartikel werden nicht verkapselt, sondern lagern sich um die Polymerpartikel an, teilweise jedoch so stark, daß sie bei der Ultrazentrifugation nicht getrennt werden.

Wie in Abbildung 4.44 zu erkennen ist, verbessert eine Erhöhung des pH-Wertes die Verkapselung deutlich. In allen Proben, in denen ein pH-Wert von über 10 eingestellt worden war, liegt Magnetit verkapselt vor. Sowohl reines Polymer als auch freie Magnetitpartikel sind praktisch nicht vorhanden. Der höhere pH-Wert verstärkt den hydrophoben Charakter sowohl der Polymermischung als auch des Polymers. Damit ist eine effektive Verkapselung von hydrophobisierten Magnetitpartikeln möglich.

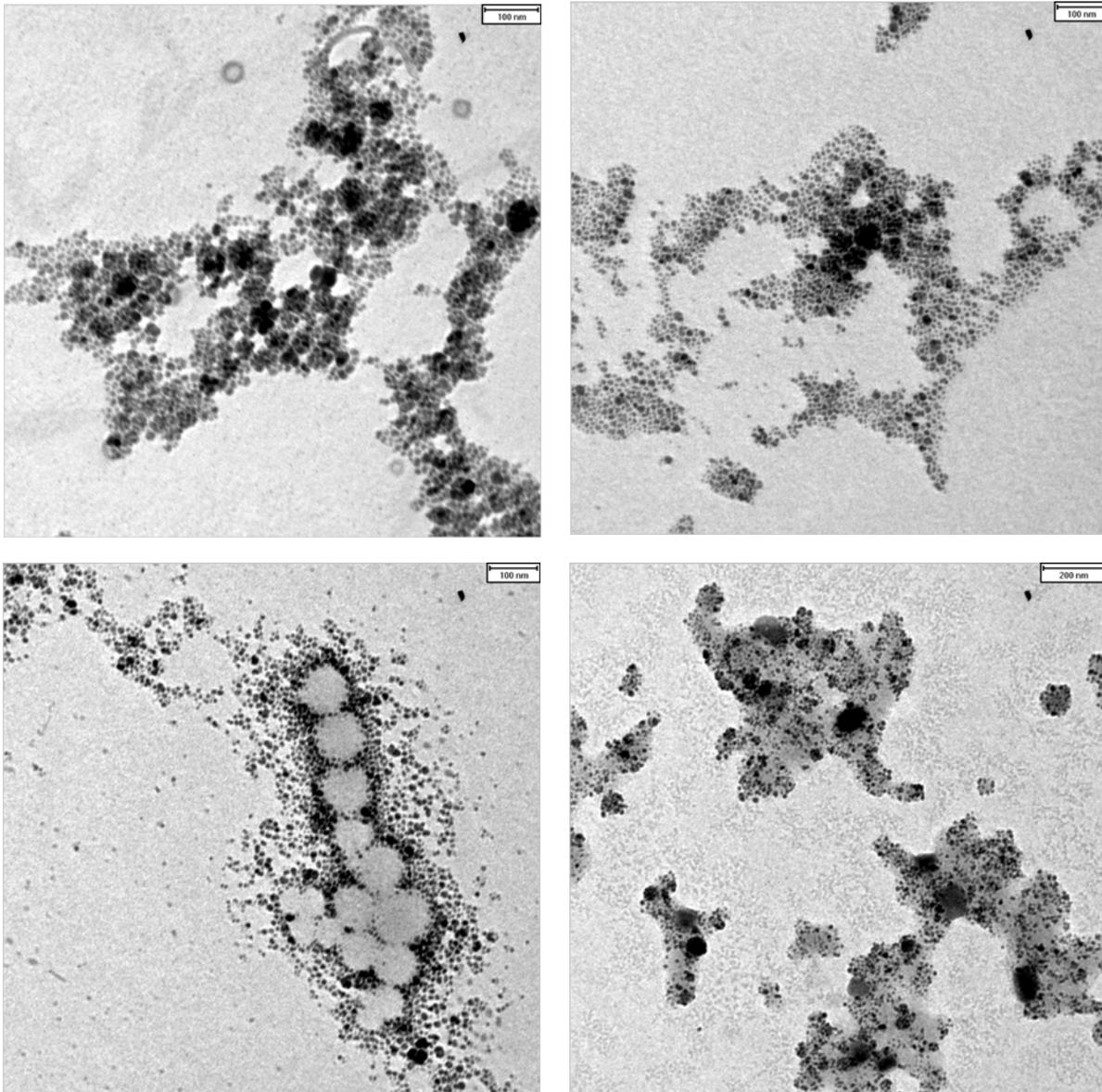


Abbildung 4.43 TEM-Aufnahmen von magnetischen Epoxidharzpartikeln. Von links oben nach rechts unten VH-MEp5, VH-MEp6, VH-MEp7, VH-MEp8.

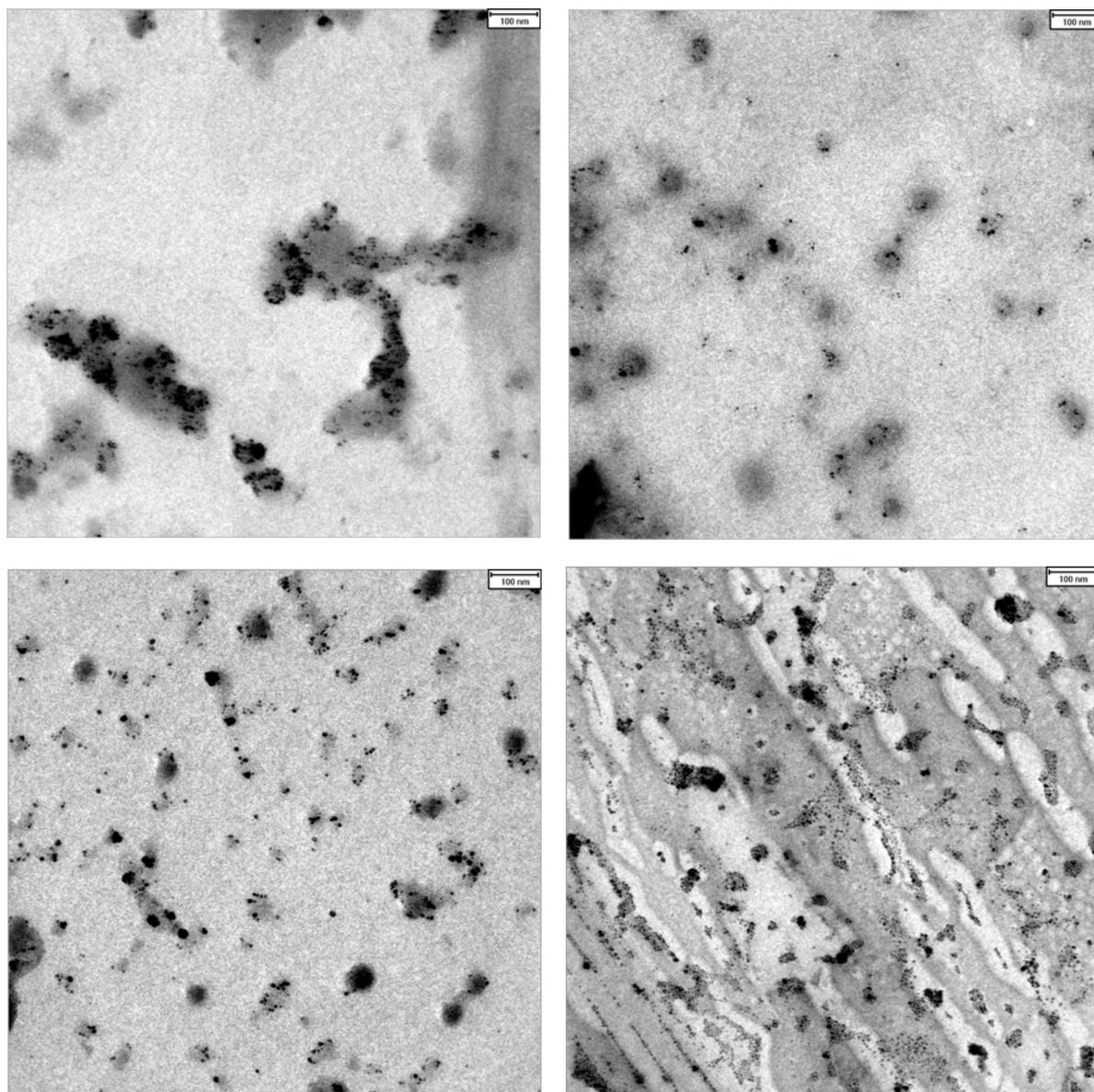


Abbildung 4.44 TEM-Aufnahmen von magnetischen Epoxidharzpartikel. Von links oben nach rechts unten: VH-MEp9, VH-MEp10, VH-MEp11, VH-MEp12.

Die Feststoffgehalte aller Proben sind geringer als erwartet (ca. 6%). Da die Monomere nicht vollständig miteinander mischbar sind, ist es nicht möglich, das gesamte Material zu emulgieren. Während der Polymerisation fällt immer ein kleiner Anteil an Polymer aus, das sich nicht in den Polymerpartikeln befindet. Dieses setzt sich nach kurzer Zeit ab und wird bei der Bestimmung des Feststoffgehaltes nicht berücksichtigt. Das ausgefallene Material enthielt jedoch in keinem der untersuchten Fälle Magnetit: Das ausgefallene Material war weiß, während schon ein geringer Anteil an Magnetit eine Braunfärbung hervorrufen würde.

Zur Untersuchung der magnetischen Eigenschaften wurden die Proben getrocknet, von denen SQUID-Messungen bei 293 K durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.31 aufgeführt.

Tabelle 4.31 Magnetische Eigenschaften einiger magnetischer Epoxidharzpartikel.

Probenname	Sättigungsmagnetisierung [emu/g _{Magnetit}]	Anfangssuszeptibilität [emu/Oe]
VH-MEp9	23,31	0,008
VH-MEp10	32,26	0,011
VH-MEp11	38,42	0,014

Die Sättigungsmagnetisierungen nehmen innerhalb dieser Reihe zu, unterscheiden sich aber deutlich von den ausgefällten Magnetitnanopartikeln, die eine Sättigungsmagnetisierung von 80,43 emu aufweisen (siehe Tabelle 4.15). Die Sättigungsmagnetisierungen der Proben VH-MEp9 und VH-MEp10 liegen auch unterhalb der Sättigungsmagnetisierungen der magnetischen Polystyrolpartikel. Es ist davon auszugehen, daß an der Oberfläche der Magnetitnanopartikel während der Polyaddition eine Oxidation und Phasenumwandlung zu nicht-magnetischen Eisenoxiden oder eine Reaktion des Magnetits stattfindet. Auch die niedrigen Anfangssuszeptibilitäten weisen darauf hin. Dennoch sprechen die Anfangssuszeptibilitäten aller Proben für superparamagnetisches Verhalten. Dieses Verhalten ist auch in den Magnetisierungskurven in Abbildung 4.45 zu erkennen: Die Proben weisen weder Remanenz noch Koerzivität auf.

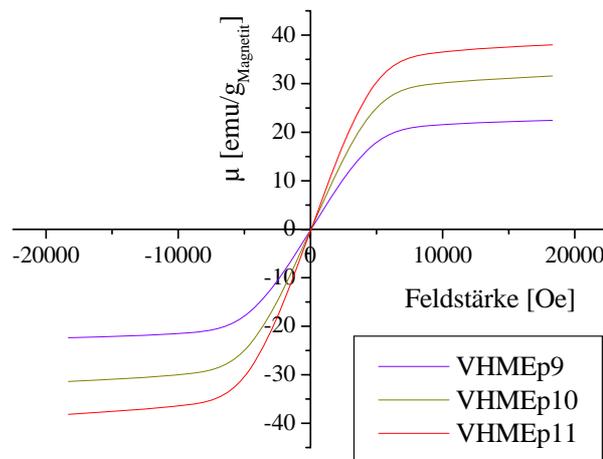


Abbildung 4.45 Magnetisierungskurven magnetischer Epoxidharzpartikel bei 293 K.

Aus den Magnetisierungsmessungen lässt sich nach Gleichung (4.1) die Teilchengröße der superparamagnetischen Domäne D_{SPM} berechnen. Diese Werte sind in Tabelle 4.32 angegeben.

Tabelle 4.32 Berechnete Größen der Magnetitteilchen in magnetischen Epoxidharzpartikeln.

Probenname	D_{SPM} [nm]
VH-MEp9	2,7
VH-MEp10	3,8
VH-MEp11	4,6

Hier wird, wie bei den magnetischen Polystyrolpartikeln (Tabelle 4.16), eine kleinere Teilchengröße erhalten als aus TEM-Aufnahmen, die Magnetitnanopartikel von 10 nm Durchmesser zeigen. Auch diese Berechnung spricht für die Bildung einer „magnetisch toten“ Schicht auf der Oberfläche der Magnetitteilchen durch Oxidation und Phasenumwandlung oder Reaktion.

Für die Probe VH-MEp10 wurde eine Remanenzmessung bei 293 K durchgeführt. Hierfür wurden bei der Messung der Magnetisierung die Feldstärken in sehr kleinen Intervallen geändert, wodurch ein genaues Bild der Änderung der Magnetisierung bei kleinen Feldstärken erhalten werden konnte. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 4.46 gezeigt.

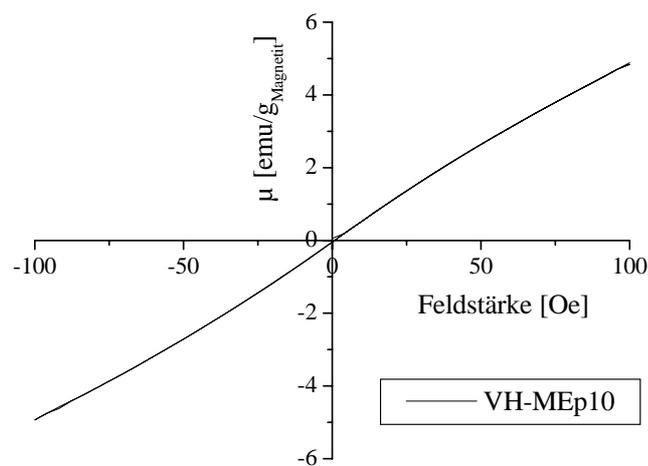


Abbildung 4.46 Remanenzmessung der Probe VH-MEp10 bei 293 K.

Auch in diesem Ausschnitt einer herkömmlichen Magnetisierungsmessung werden Remanenz und Hysterese nicht beobachtet, wodurch der Superparamagnetismus der Proben bewiesen ist. Bemerkenswert ist, daß der Superparamagnetismus der Proben auch während der Polymerisation nicht verloren geht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß generell die Verkapselung von Magnetit in Epoxidharzen möglich ist. Hierbei ist auf einen hohen pH-Wert der Monomerminiemulsion und Temperaturkontrolle während der Miniemulgierung zu achten, um Diffusion und Polymerisation zu vermeiden.

Der Ausgang gibt den Taten ihre Titel.

Johann Wolfgang von Goethe

Fluoreszierende und magnetische Polystyrolnanopartikel mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung wurden mit Hilfe des Miniemulsionsprozesses hergestellt und die Zellaufnahme in Abhängigkeit von der Oberflächenladung untersucht. Diese Oberflächenladung wurde durch Copolymerisation von Styrol mit verschiedenen Anteilen an Acrylsäure erreicht. Die Fluoreszenzmarkierung der Partikel wurde durch Einlagerung eines styrollöslichen (hydrophoben) Fluoreszenzfarbstoffes eingebracht, magnetisch wurden die Styrolnanopartikel durch Verkapselung von Magnetit. Die Polymerisation und Verkapselung in Miniemulsion bietet den Vorteil der effektiven Verkapselung von hohen Anteilen an Magnetit, zudem ist es gleichzeitig möglich, den Fluoreszenzfarbstoff in die Polymerkapseln einzulagern.

Es konnten monodisperse fluoreszierende Poly(Styrol-co-Acrylsäure)-Latices mit einem Feststoffgehalt von ca. 20% hergestellt werden, die durch SDS stabilisiert sind. Die Teilchengröße beträgt ca. 100 nm und steigt bei hohen Acrylsäureanteilen von 15% und mehr auf ca. 150 nm an. Die Oberflächenladung steigt mit zunehmendem Anteil an Acrylsäure im Monomergemisch an. Die hydrophilen Carboxylgruppen lagern sich bevorzugt an der Grenzfläche Styrol/Wasser an, und die Polymernanopartikel werden an der Oberfläche funktionalisiert. Je höher der Acrylsäureanteil im Monomer ist, desto mehr Carboxylgruppen können nach Polymerisation auf der Partikeloberfläche nachgewiesen werden. Mit steigendem Acrylsäuregehalt werden die funktionellen Gruppen aus Platzmangel auch im Partikelinneren eingebaut. Das ist aufgrund des hydrophoben Charakters der vinylischen Einheit in Acrylsäure möglich.

Die Partikel wurden von HeLa- und mesenchymalen Stammzellen aufgenommen. Die Zellaufnahme ist dabei abhängig von der Oberflächenladung: Je höher die Ladung ist, desto

mehr Teilchen werden aufgenommen. Wird der Acrylsäureanteil im Monomer von 1% auf 10% erhöht, was zu einer Verdoppelung der Oberflächenladung führt, steigt die Zellaufnahme auf das Fünffache.

Magnetit wurde erfolgreich in Polystyrol verkapselt. Für die Verkapselung wurde ein dreistufiger Prozess angewandt, in dem zunächst mit Ölsäure hydrophobisierte Magnetitpartikel von 10 nm Durchmesser in Octan suspendiert wurden, diese Suspension in eine wässrige Miniemulsion überführt wurde, die anschließend mit einer Styrolminiemulsion vermischt und polymerisiert wurde. Der maximal mögliche Anteil an Magnetit in den Hybridpartikeln betrug 41%. Eine Funktionalisierung dieser Hybridpartikel konnte durch Copolymerisation mit Acrylsäure erfolgen. Dabei war es von Vorteil, Acrylsäure erst nach Beginn der Polymerisation zum System zu geben. Zusätzlich zur Grenzfläche Styrol/Wasser existiert noch die Grenzfläche Styrol/Magnetit im Teilcheninneren. Da die Acrylsäure aufgrund ihrer hydrophoben Vinyleinheit durch die Styroltröpfchen diffundieren kann, können sich die Carboxylgruppen auch an die Grenzfläche im Partikelinneren anlagern. Durch beginnende Polymerisation von Styrol wird eine Polymerhülle um die Magnetitnanopartikel aufgebaut, wodurch sie von Acrylsäure abgeschirmt werden. Acrylsäure lagert sich dann nur an der Grenzfläche Styrol/Wasser auf der Partikeloberfläche an, und die maximal mögliche Oberflächenladungsdichte wird erreicht.

Des Weiteren wurden fluoreszierende magnetische Polystyrol-Latices hergestellt. Der große Vorteil dieser sogenannten „Dual Marker“-Partikel ist, daß sie zum einen einen Fluoreszenzmarker tragen, der die Detektion *in vitro* durch Fluoreszenzmikroskopie (qualitativ) und durch FACS (quantitativ) erlaubt, zum anderen superparamagnetische Magnetitnanopartikel für die qualitative und quantitative *in vivo*-Detektion durch Magnetresonanztomographie. Magnetit wurde dabei homogen in hohen Anteilen von ca. 40% in Polystyrol verkapselt. Eine Copolymerisation mit Acrylsäure führte zu carboxylfunktionalisierten Partikeln. Auch hier zeigte sich eine Zunahme der Oberflächenladung mit steigendem Acrylsäuregehalt, die sich auch positiv auf die Zellaufnahme auswirkt. Mit zunehmender Oberflächenladung wurden mehr Partikel aufgenommen, was gleichermaßen für HeLa-, KG1a-, Jurkat- und mesenchymale Stammzellen gefunden wurde. Magnetische Untersuchungen ergaben, daß der superparamagnetische Charakter der Magnetitnanopartikel während der Verkapselung erhalten bleibt, was ein sehr wichtiger Aspekt im Hinblick auf biomedizinische Anwendungen wie Magnetresonanztomographie, gezielte Wirkstofffreisetzung oder Hyperthermie ist.

Sowohl fluoreszierende als auch magnetische vorfunktionalisierte Polystyrolpartikel konnten erfolgreich endfunktionalisiert werden, indem an die Acrylsäuregruppen Aminosäuren und Antikörper gebunden wurden. Hierfür wurde die EDC-Kopplung verwendet, wobei in einem ersten Schritt die Carboxylgruppen aktiviert wurden und in einem zweiten Schritt die Aminogruppen der Aminosäuren und Antikörper reagierten. Ein anderes Kopplungsverfahren

beruht auf der Reaktivität von Epoxygruppen gegenüber Aminogruppen. Hierfür wurden Polymer- und Hybridlatices durch Copolymerisation von Styrol und Glycidylmethacrylat hergestellt, an die dann die Aminogruppen von Antikörper gebunden werden konnten. In Zellversuchen konnte eine erhebliche Verbesserung der Latices mit Lysin auf der Oberfläche gegenüber carboxylierten Latices festgestellt werden. Die Zellaufnahme stieg nach der kovalenten Anbindung von Lysin auf das Vierfache. Durch die kovalente Anbindung von positiven Aminogruppen konnte auch auf die Verwendung des toxischen Transfektionsagens Poly-L-Lysin verzichtet werden. Mit der Anbindung von Antikörpern sollten die Latices auf bestimmte extra- und intrazelluläre Rezeptoren spezifiziert werden. Die Kopplung konnte zwar erfolgreich durchgeführt werden, allerdings konnte in Zellversuchen bisher nur eine geringfügige Selektivität erkannt werden

Für biomedizinische Anwendungen müssen die magnetischen Eigenschaften optimal sein. Für die MRT sollten die Teilchen eine möglichst lange Relaxationszeit aufweisen, für die Hyperthermie muß die Wärmeentwicklung im magnetischen Wechselfeld möglichst groß sein. Beide Parameter sind abhängig von der Größe der superparamagnetischen Teilchen. Durch die Herstellung und Verkapselung größerer Magnetitanokristalle sollten die magnetischen Eigenschaften verbessert werden. Dafür wurde zunächst Eisen(III)oleat thermisch zu 30 nm großen Magnetitanokristallen zersetzt. Diese konnten analog zu den Magnetitanopartikeln homogen und mit hohen Magnetitanteilen in Polystyrol verkapselt werden. Auch diese Teilchen wiesen nach der Polymerisation superparamagnetisches Verhalten auf, jedoch mit geringeren Sättigungsmagnetisierungen als magnetische Polystyrolpartikel, in denen Magnetitanopartikel mit einem Durchmesser von 10 nm verkapselt sind.

Da Polystyrol bisher für den Einsatz in der Medizin nicht zugelassen ist, müssen biokompatible Polymere für die Verkapselung von Magnetit gefunden werden. In dieser Arbeit wurden hierfür Polyurethan und Epoxidharze getestet. Im Fall von Polyurethan konnte aufgrund der Hydrophilie der Monomere und des Polymers keine Verkapselung erreicht werden. Eine Verkapselung von Magnetit in Epoxidharzen dagegen ist möglich. Auch hier konnte homogene Verkapselung von hohen Anteilen an Magnetit (bis zu 40%) gefunden werden. Der Superparamagnetismus der verkapselten Magnetitanopartikel bleibt auch während der Polymerisation vorhanden, was die Hybridpartikel für biomedizinische Anwendungen interessant macht.

Aufbauend auf der erfolgreichen Funktionalisierung der Polystyrolnanopartikel mit verschiedenen Biomolekülen können nun weitere Experimente durchgeführt werden, um die Selektivität der Zellaufnahme dieser funktionalisierten Partikel zu erhöhen und die unspezifische Zellaufnahme zu unterdrücken.

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, daß die Verkapselung von Magnetit auch mit anderen Polymeren als Polystyrol möglich ist, können in weiterführenden Arbeiten diese in

Zellen auf ihre Toxizität und Biokompatibilität getestet werden. Des Weiteren können in Zukunft auch weitere biokompatible Poymere für die Verkapselung genutzt werden.

Nature does not care what we call it. She just keeps on doing it.

Richard P. Feynman

Fluorescent and magnetic polystyrene nanoparticles bearing different surface functionalization were synthesized by the miniemulsion process and cellular uptake behavior depending on the surface functionalization was examined. The surface charge was brought onto the particles by copolymerisation of styrene with different amounts of acrylic acid. For fluorescent and magnetic labelling, dye and magnetite nanoparticles were encapsulated, respectively. Applying the miniemulsion process high encapsulation yields of magnetite nanoparticles could be obtained.

Monodisperse fluorescent poly(styrene-*co*-acrylic acid) latexes, stabilised by SDS, with solid contents of about 20% were synthesized. The particle size was around 100 nm, increasing to 150 nm with acrylic acid concentrations of 15% and higher. The number of surface charges increases with increasing concentrations of acrylic acid in the monomer. Hydrophilic carboxyl groups tend to accumulate at the styrene/water interface, therefore polystyrene nanoparticles are functionalized on the surface. The higher the concentration of acrylic acid, the more carboxyl groups can be found on the particles' surface after polymerization. With increasing concentration of acrylic acid, carboxyl groups are incorporated inside the particles for lack of space at the surface. This is possible due to the hydrophobic character of the vinylic unit in acrylic acid.

The particles were effectively taken up by HeLa and mesenchymal stem cells. Cellular uptake is depending on the surface charge: higher surface charge leads to more incorporation of the particles. By increasing the concentration of acrylic acid from 1% to 10% (doubling the surface charge) the uptake is quintupled.

Magnetite was successfully encapsulated in polystyrene by a three-step miniemulsion process: First, magnetite nanoparticles of 10 nm diameter hydrophobized by oleic acid were suspended in octane. This suspension was turned into a miniemulsion based on water, which was later mixed with a styrene miniemulsion; this mixture was polymerized. The maximal concentration of magnetite in these hybrid particles is 41%. Functionalization of these particles was achieved by copolymerisation of styrene and acrylic acid. It proved advantageous to add acrylic acid after the polymerisation of styrene has started, as in addition to the styrene/water interface, an additional hydrophobic/hydrophilic interface (styrene/magnetite) inside the particles is present. Carboxyl groups can accumulate there by diffusion of acrylic acid through styrene. By starting the polymerisation of styrene it is possible to build up a layer of polystyrene around the hydrophilic magnetite nanoparticles to shield them from the acrylic acid. The carboxyl groups are then mainly accumulating at the water/styrene interface, thus the maximal amount of surface charges can be achieved.

A series of bifunctional dual reporter particles was also synthesized. These particles contain a fluorescent dye for *in vitro* detection by fluorescence microscopy (qualitative) and FACS (quantitative) and they also contain superparamagnetic particles for qualitative and quantitative *in vivo* detection by magnetic resonance imaging. The influence of the concentration of acrylic acid on the surface charge was investigated. For this purpose, high amounts of magnetite of about 40% were homogeneously encapsulated in polystyrene. An increase of surface charge with increasing concentration of acrylic acid was found. The surface charge affected the cellular uptake in a positive way: with increasing surface charge more particles were taken up by cells, which was consistent for HeLa, KG1a, Jurkat and mesenchymal stem cells. Magnetic investigations revealed that the superparamagnetic behavior of the magnetite nanoparticles was maintained during polymerization, which is an important aspect with respect to biomedical applications in magnetic resonance imaging, targeted drug delivery or hyperthermia.

Fluorescent as well as magnetic functionalised polystyrene particles were successfully modified by coupling amino acids and antibodies to the carboxyl groups. Therefore EDC coupling was applied. After activation of the carboxyl groups with the water soluble carbodiimide the surface properties were changed by the reaction with biomolecules. Another way of coupling is based on the high reactivity of glycidyl groups towards amino groups. Polymer and hybrid latexes were synthesised by copolymerisation of styrene and glycidyl methacrylate. These latexes were subsequently coupled to antibodies. Experiments revealed that amino groups covalently coupled to the particle surface increase cellular uptake compared to carboxylated particles. Uptake was quadrupled after covalently coupling lysine to the particles. By covalently binding lysine to the particles, cellular uptake was possible without the use of the toxic transfection agent poly-L-lysine. By immobilising antibodies at the particles, surface targeting to specific extra- and intracellular receptors should be possible. The coupling

was successful, but up to now, only a small selectivity in receptor recognition could be observed.

For biomedical applications, the magnetic characteristics have to be ideal. For magnetic resonance imaging (MRI), the relaxation time needs to be as high as possible, for hyperthermia treatments it is necessary to generate as much heat as possible. By the encapsulation of bigger magnetite nanocrystals, the magnetic characteristics should be optimised. For this purpose, Fe(III) oleate was decomposed thermally to give magnetite nanocrystals of 30 nm diameter. These were homogeneously encapsulated in high concentrations in polystyrene. They also show superparamagnetic behavior, however with smaller saturation magnetizations than the 10 nm particles.

As polystyrene is not admitted for medical use, biocompatible polymers have to be found for the encapsulation of magnetite nanoparticles. In this thesis, polyurethane and epoxy resins were tested. In the case of polyurethane particles, magnetite could not be encapsulated, whereas encapsulation in epoxy resin particles was found to be possible. Magnetite nanoparticles were homogeneously encapsulated in concentrations up to 40% in epoxy resin particles via the miniemulsion process. The superparamagnetism of these particles is maintained during polymerization, which makes these particles interesting for biomedical applications.

On the basis of the successful functionalization of polystyrene nanoparticles with different biomolecules, further experiments can be done to increase the selectivity to receptor targeting and to suppress non-specific uptake in cells.

As we have been successful in encapsulating magnetite in epoxy resins, the next step is to test these hybrid particles in cells with regard to uptake behavior, biocompatibility and toxicity. Furthermore new biocompatible polymers can be applied to create hybrid particles for the use in biomedical applications.

Gutta cavat lapidem.

Steter Tropfen höhlt den Stein.

(Ovid)

Es werden die Synthesen der untersuchten polymeren Nanopartikel beschrieben. Es handelt sich hier um polymere Nanopartikel, die zum Teil fluoreszierenden Farbstoff oder Magnetitnanopartikel enthalten. Außerdem wird beschrieben, wie carboxyl- und glycidylfunktionalisierte Polystyrolnanopartikel mit Aminosäuren und Proteinen modifiziert werden.

7.1 Fluoreszierende Polystyrol-Nanopartikel

Styrol (Merck), Acrylsäure (Aldrich) und Glycidylmethacrylat (Merck) wurden vor Gebrauch unter Vakuum destilliert. Alle weiteren Chemikalien wurden ohne weitere Aufbereitung verwendet: Hexadecan (Aldrich, 99%), 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril) (V59) (Wako Chemicals), N-(2,6-Diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarboximid (PMI) (BASF), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Fluka, 96%), Glycin (Merck), Ninhydrin (Merck), Lutensol AT-50 (BASF), ein Poly(ethylenoxid)-hexadecylether einer EO-Kettenlänge von ca. 50 Einheiten (MW = 2 450 g mol⁻¹). Demineralisiertes Wasser wurde für alle Experimente verwendet.

7.1.1 Carboxylfunktionalisierte Polystyrol-Nanopartikel

3 mg Perylenmonoimid (PMI), 100 mg V59 und 250 mg Hexadecan werden in 6 g Monomermischung, zusammengesetzt aus Styrol und Acrylsäure (nähere Angaben siehe Tabelle 7.1) gelöst. Diese Lösung wird mit einer Lösung von 72 mg SDS in 24 g H₂O vermischt und 1 h lang magnetisch bei höchster Geschwindigkeit gerührt. Anschließend wird durch Ultraschall (2 min, 90% Amplitude, 10 mm-Spitze) unter Eiskühlung bei 0 °C die Miniemulsion hergestellt und dann bei 72 °C über Nacht polymerisiert.

Tabelle 7.1. Monomierzusammensetzungen für carboxylfunktionalisierte Polystyrolnanopartikel.

Probenname	Menge Styrol [g]	Menge Acrylsäure [mg]
VHPM0	6	0
VHPM1	5,94	60
VHPM2	5,88	120
VHPM3	5,82	180
VHPM3.3	5,82	180
VHPM5	5,7	300
VHPM10	5,4	600
VHPM15	5,1	900
VHPM20	4,8	1200

Die erhaltene Miniemulsion wird abfiltriert, Feststoffgehalt und Teilchengröße werden gemessen. Ein Teil des Latex wird durch Druckfiltration über eine Größenausschlußmembran (MWCO 100000 Da) gewaschen, um SDS von der Oberfläche der Teilchen abzuwaschen. Es wird solange dialysiert, bis die Leitfähigkeit des Waschwassers $\sigma < 3 \mu\text{S/cm}$ beträgt.

Um die Oberflächenladungen quantitativ nachzuweisen und die Größenabhängigkeit auszuschließen, wurden die Ladungen durch Titration der auf ca. 0,1% verdünnten Latices mit einem Partikelladungsdetektor nachgewiesen. Die Titration wurde bei pH 6 durchgeführt, der dem pH am nächsten ist, in dem die Teilchen in Zellversuchen eingesetzt werden, im basischen Bereich bei pH 9, so daß alle Carboxylgruppen deprotoniert sind, und schließlich im Säuren bei pH 2, wo alle Carboxylgruppen protoniert sind und nur noch die Ladungen der Sulfatgruppen des Tensids gemessen werden. Aus der Titration mit Poly-DADMAC-Lösung, die eine definierte Konzentration an positiven Ladungen enthält (10^{-4} M), wird mit dem Feststoffgehalt und der Größe der Teilchen die Menge an Ladungen auf der Oberfläche nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Gruppen/nm}^2 = \frac{V \cdot M \cdot N_A \cdot \rho \cdot D \cdot 10^{-18}}{SC \cdot 6} \quad (7.1)$$

V ist das verbrauchte Volumen an Poly-DADMAC in L, M die Konzentration an Polyelektrolyt in $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, N_A die Avogadro-Zahl, ρ die Dichte von Polystyrol, die $1,4 \cdot 10^6 \text{ g/L}$ beträgt, D die durchschnittliche Teilchengröße und SC der Feststoffgehalt in g.

Durch die Messung bei pH 2 ist es möglich, den Beitrag von SDS zur Oberflächenladung herauszurechnen. Da hier nur die Ladungen des Tensids gemessen werden, kann dieser Betrag

von den bei pH 6 und 9 bestimmten Ladungen abgezogen werden. Damit ist die Gesamtladung um den Wert des Tensids korrigiert und nur die Ladungen der Carboxylgruppen gemessen.

Um den Gehalt an Fluoreszenzfarbstoff quantitativ nachzuweisen, werden 7,8 mg des getrockneten Latex in 2,5 g THF gelöst. Von der Lösung wird ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Über die Intensität bei der Wellenlänge 479 nm wird durch Vergleich mit einer Kalibriergerade die Konzentration errechnet.

7.1.2 Glycidylfunktionalisierte fluoreszierende Polystyrol-Nanopartikel

3 mg Perylenmonoimid (PMI), 100 mg V59 und 250 mg Hexadecan werden in 6 g Monomermischung aus 5,4 g Styrol und 0,6 g Glycidylmethacrylat gelöst. Diese Lösung wird mit einer Lösung aus verschiedenen Mengen SDS in 24 g H₂O (siehe Tabelle 7.2) vermischt und 1 h lang magnetisch bei höchster Geschwindigkeit gerührt. Anschließend wird durch Ultraschall (2 min, 90% Amplitude, 10 mm-Spitze) unter Eiskühlung bei 0 °C die Miniemulsion hergestellt und dann bei 72 °C über Nacht polymerisiert.

Tabelle 7.2. Poly(Styrol-*co*-Glycidylmethacrylat)-Nanopartikel mit unterschiedlichen Mengen an Tensid.

Probenname	Menge SDS [mg]	Anteil SDS [% Monomer]
VHPSG10	72	1,2
VHPSG10.2	72	1,2
VHPSG10/500	500	8,3

Die erhaltene Miniemulsion wird abfiltriert, Feststoffgehalt und Teilchengröße werden gemessen. Für Zellversuche wird der Latex zwei Tage lang durch Druckfiltration über eine Größenausschlußmembran (MWCO 100000 Da) dialysiert, um überschüssiges SDS auszuwaschen.

Um den Anteil an Glycidylgruppen auf der Oberfläche zu bestimmen, wird die schnelle Reaktion von Aminogruppen mit Epoxiden ausgenutzt (Abbildung 7.1). Glycin wird im zweifachen molaren Überschuß bezogen auf die theoretische Menge an Glycidylmethacrylat in der Miniemulsion zugegeben. Die Reaktion läuft bei Raumtemperatur unter leichtem mechanischem Rühren für 24 h, dann wird über eine Größenausschlußmembran (MWCO 100000) vollständig abzentrifugiert. Das Zentrifugat wird auf das dreifache Volumen verdünnt, dann wird zu 1 ml des verdünnten Zentrifugats 1 ml einer wässrigen Lösung von Ninhydrin (1 mg/ml) gegeben. Um die Reaktion zu starten, wird im Wasserbad bei 60 °C ca. 1 min lang erwärmt, bis die Lösung sich blau gefärbt hat. Jetzt hat sich der sogenannte „Ruhemann’sche Purpur“ gebildet, der sich UV-spektrometrisch nachweisen läßt (siehe Abbildung 4.11).

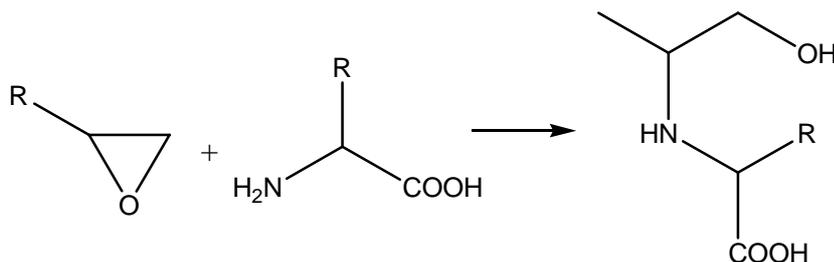


Abbildung 7.1 Reaktion von Epoxiden mit Aminen.

Über diese Nachweisreaktion lässt sich die Menge an Glycin bestimmen, die nicht reagiert hat, und daraus die Menge an Glycidylgruppe an der Oberfläche errechnen.

Um den Gehalt an Fluoreszenzfarbstoff quantitativ nachzuweisen, werden 7,8 mg des getrockneten Latex in 2,5 g THF gelöst. Von der Lösung wird ein UV-Spektrum aufgenommen. Über die Intensität bei der Wellenlänge 479 nm wird durch Vergleich mit einer Kalibriergerade die Konzentration errechnet.

7.2 Magnetit-Miniemulsionen

Folgende Chemikalien wurden ohne Aufbereitung verwendet: FeCl₂·4H₂O (Merck), FeCl₃ (Merck), Ammoniumhydroxid (Riedel-de-Haën, 26%), Ölsäure (Merck), Octan (Fluka, 96%), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Alfa Aesar, 99%), 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril) (V59) (Wako Chemicals). In allen Experimenten wurde demineralisiertes Wasser benutzt.

7.2.1 Ausfällen von hydrophobisierten Magnetit-Nanopartikeln

FeCl₃ und FeCl₂·4H₂O werden in 50 ml Wasser gelöst. Dazu werden 40 ml NH₃ (26%ig) und Ölsäure (44% bez. Fe₃O₄) gegeben, wobei Fe₃O₄ ausfällt. Die genauen Mengen sind in Tabelle 4.7 gegeben. Man erhitzt 30 min unter Rühren auf 70 °C, anschließend auf 110 °C, um Wasser und Ammoniak zu verdampfen, bis ein schwarzer schmieriger Niederschlag zurückbleibt. Dieser wird nach mehrmaligem Waschen mit Wasser über Nacht im Trockenschrank bei 110 °C getrocknet. Der Magnetitgehalt bzw. Ölsäuregehalt wird durch thermogravimetrische Analyse (TGA) bestimmt.

7.2.2 Herstellung der Magnetit-Miniemulsionen

Aus den mit Ölsäure beschichteten Magnetit-Teilchen werden Miniemulsionen hergestellt:

Je 1 g Magnetit-Niederschlag wird in 6 g Octan dispergiert, mit einer Lösung von 721 mg SDS in 24 g H₂O vereinigt, 1 h lang mechanisch auf höchstmöglicher Stufe gerührt und mit US

(zweimal 2min, 90% Amplitude, 10 mm-Spitze; Pause ca. 60 s) unter Eiskühlung bei 0 °C die Miniemulsion hergestellt; dann wird 6 h lang bei 80 °C ebenfalls mechanisch bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt, um Octan zu verdampfen, dabei alle 30 min ca. 2 ml H₂O zugegeben. Nach dem Abkühlen wird abfiltriert und der Feststoffgehalt gemessen.

7.3 Verkapselung von Magnetit-Nanopartikeln in Poly(Styrol-co-Acrylsäure)

Styrol (Merck) und Acrylsäure (Aldrich) wurden vor Gebrauch unter Vakuum destilliert. Alle anderen Chemikalien wurden ohne Aufbereitung verwendet: Hexadecan (Aldrich, 99%), 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril) (V59) (Wako Chemicals), N-(2,6-Diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarboximid (PMI) (BASF), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Fluka, 96%), Lutensol AT-50 (BASF), ein Poly(ethylenoxid)-hexadecylether mit einer EO-Kettenlänge von ca. 50 Einheiten (MW = 2 450 g mol⁻¹). Demineralisiertes Wasser wurde für alle Experimente verwendet.

7.3.1 Magnetische Polystyrol-Nanopartikel

Zunächst wird eine Styrol-Miniemulsion hergestellt. Hierfür werden 250 mg Hexadecan und 100 mg V59 in Styrol (Mengen siehe Tabelle 7.3) gelöst, und dann mit der wässrigen Phase, die 72 mg SDS in 24 g H₂O enthält gemischt; hierfür wird 1 h lang magnetisch bei höchster Geschwindigkeit gerührt. Nach dieser Präemulgierung wird mit Ultraschall (2 min, 90% Amplitude, 10 mm-Spitze) unter Eiskühlung bei 0 °C die Miniemulsion hergestellt. Diese wird durch kurzes Schütteln mit einer Magnetit-Miniemulsion gemischt, mit verschiedenen resultierenden Anteilen an Styrol (siehe Tabelle 7.3). Durch erneute Anwendung von Ultraschall (zweimal 1 min, 50% Amplitude, 10 mm-Spitze; ca. 60 s Pause) unter Eiskühlung bei 0 °C wird der Einschluß von Magnetit-Teilchen in die Styrol-Tröpfchen erreicht.

Bei 72 °C wird unter mäßigem mechanischen Rühren polymerisiert. Nach einiger Zeit werden entsprechende Mengen Acrylsäure (siehe Tabelle 7.3) zugeben. Die Polymerisation wird über Nacht fortgeführt. Dann wird abfiltriert, und es werden Feststoffgehalt und Teilchengröße gemessen. Für Zellversuche und Bestimmung der Oberflächenladungen werden die Latices durch Druckfiltration über eine Größenausschlußmembran (MWCO 100000 Da) dialysiert, bis die Leitfähigkeit einen Wert von $\sigma < 3 \mu\text{S/cm}$ erreicht.

Tabelle 7.3. Verkapselung von Magnetit in Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure).

Probenname	Anteil Monomer	Menge Styrol [g]	Dauer der Polymerisation vor Acrylsäure-Zugabe [min]
VHMPSA0t3	10%	6	-
VHMPSA0t4	30%	6	-
VHMPSA0t1	50%	6	-
VHMPSA0t2	65%	6	-
VH-3Kb	50%	5,82	40
VH-3Kh	50%	5,82	300
VH-3Kad	50%	5,82	360

Um die Oberflächenladungen quantitativ nachzuweisen und die Größenabhängigkeit auszuschließen, wurden die Ladungen durch Titration der auf ca. 0,1% verdünnten Latices mit einem Partikelladungsdetektor nachgewiesen. Die Titration wurde bei pH 6 durchgeführt, wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben.

7.3.2 Fluoreszierende magnetische Polystyrol-Nanopartikel

Zunächst wird eine Styrol-Miniemulsion hergestellt. Hierfür werden 250 mg Hexadecan, 100 mg V59 und 3 mg PMI in Styrol (Mengen siehe Tabelle 7.4) gelöst und dann mit der wässrigen Phase, die 72 mg SDS in 24 g H₂O enthält gemischt; hierfür wird 1 h lang magnetisch bei höchster Geschwindigkeit gerührt. Nach dieser Präemulgierung wird mit Ultraschall (2 min, 90% Amplitude, 10 mm-Spitze) unter Eiskühlung die Miniemulsion hergestellt.

Diese wird mit einer Magnetit-Miniemulsion gemischt, mit einem resultierenden Anteil an Monomer von 50%. Durch erneute Anwendung von Ultraschall (zweimal 1 min, 50% Amplitude, 10 mm-Spitze; Pause ca. 60 s) unter Eiskühlung wird der Einschluß von Magnetit-Teilchen in die Styrol-Tröpfchen erreicht.

Bei 72 °C wird unter mäßigem mechanischen Rühren polymerisiert. Nach 6 h werden entsprechende Mengen Acrylsäure zugeben. Die Polymerisation wird über Nacht fortgeführt. Dann wird abfiltriert und es werden Feststoffgehalt und Teilchengröße gemessen. Für Zellversuche und Bestimmung der Oberflächenladungen werden die Latices durch Druckfiltration über eine Größenausschlußmembran (MWCO 100000 Da) dialysiert, bis die Leitfähigkeit einen Wert von $\sigma < 3 \mu\text{S/cm}$ erreicht. In VHMPM0, VHMPM1 und VHMPM2 wird SDS gegen Lutensol AT-50 ausgetauscht, indem gegen eine 0,05%ige Lutensol AT50-Lösung dialysiert wird.

Tabelle 7.4. Herstellung fluoreszierender magnetischer Polystyrolnanopartikel.

Probenname	Anteil Monomer [%]	Menge Styrol
VHMPM0	50	6
VHMPM1	50	5,94
VHMPM2	50	5,88
VHMPM3	50	5,82
VHMPM3.2	50	5,82
VH-Mag22.08.05	50	5,82
VHMPM5	50	5,7
VHMPM10	50	5,4
VHMPM15	50	5,1

Um die Oberflächenladungen quantitativ nachzuweisen und die Größenabhängigkeit auszuschließen, wurden die Ladungen durch Titration der auf ca. 0,1% verdünnten Latices mit einem Partikelladungsdetektor nachgewiesen. Die Titration wurde bei pH 6 durchgeführt, wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben.

7.4 Verkapselung von Magnetit-Nanopartikeln in Poly(Styrol-co-Glycidylmethacrylat)

Styrol (Merck) und Glycidylmethacrylat (Merck) wurden vor Gebrauch unter Vakuum destilliert. Alle weiteren Chemikalien wurden ohne weitere Aufbereitung verwendet: Hexadecan (Aldrich, 99%), 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril) (V59) (Wako Chemicals), N-(2,6-Diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarboximid (PMI) (BASF), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Fluka, 96%), Glycin (Merck), Ninhydrin (Merck). Demineralisiertes Wasser wurde für alle Experimente verwendet.

Zunächst wird eine Styrol-Miniemulsion hergestellt. Hierfür werden 250 mg Hexadecan, 100 mg V59 und zum Teil 3 mg PMI (siehe Tabelle 4.17) in 5,4 g Styrol gelöst, und dann mit der wässrigen Phase, die 72 mg SDS in 24 g H₂O enthält, gemischt; hierfür wird 1 h lang magnetisch bei höchster Geschwindigkeit gerührt. Nach dieser Präemulgierung wird mit Ultraschall (2 min, 90% Amplitude, 10 mm-Spitze) unter Eiskühlung die Miniemulsion hergestellt.

Diese wird mit einer Magnetit-Miniemulsion gemischt, mit einem resultierenden Anteil an Monomer von 50%. Durch erneute Anwendung von Ultraschall (zweimal 1 min, 50%

Amplitude, 10 mm-Spitze; Pause ca. 60 s) unter Eiskühlung wird der Einschluß von Magnetit-Teilchen in die Styrol-Tröpfchen erreicht.

Bei 72 °C wird unter mäßigem mechanischen Rühren polymerisiert. Nach 6 h werden 10% Glycidylmethacrylat, bezogen auf Styrol, zugegeben. Die Polymerisation wird über Nacht fortgeführt. Dann wird abfiltriert und es werden Feststoffgehalt und Teilchengröße gemessen. Für Zellversuche und Bestimmung der Oberflächenladungen werden die Latices 2 Tage lang durch Druckfiltration über eine Größenausschlußmembran (MWCO 100000 Da) dialysiert.

7.5 Synthese und Verkapselung von Magnetitnanokristallen

Styrol (Merck) und Acrylsäure (Aldrich) werden vor Gebrauch unter Vakuum destilliert. Alle weiteren Chemikalien wurden ohne Aufbereitung verwendet: FeCl₃ (Merck), Ölsäure (Merck), NaOH (Merck), Octadecen (Merck), Methanol, Aceton, Octan (BASF), Hexadecan (Aldrich, 99%), 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril) (V59) (Wako Chemicals), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Fluka, 96%). Demineralisiertes Wasser wurde für alle Experimente verwendet.

7.5.1 Ausfällen von Fe(III)oleat

3,24 g FeCl₃ werden in 100 ml Methanol gelöst, dazu werden 17 ml Ölsäure (3 molare Äquivalente) gegeben. Unter Rühren wird eine Lösung von 2,4 g NaOH in 200 ml Methanol zugetropft, wobei ein brauner Niederschlag entsteht. Dieser wird fünfmal mit Methanol gewaschen und über Nacht im Vakuum getrocknet. Dann wird er in 20 ml Octadecen bei ca. 70 °C gelöst.

7.5.2 Fällung der Magnetitnanokristalle

10 ml der unter 7.5.1 erhaltenen Lösung werden mit 40 ml Octadecen verdünnt, dazu werden 3 g Ölsäure gegeben. Der Kolben wird unter Argon gesetzt, dann wird für 2 h unter Rückfluß auf 300 °C erhitzt. Nach Abkühlen können mit 4 ml einer Mischung aus Aceton und Methanol (1:1) die Magnetitnanopartikel ausgefällt und abzentrifugiert werden. Der Niederschlag wird in Octan gelöst und nochmals mit Aceton und Methanol ausgefällt. Dieser Waschschrift wird noch zweimal wiederholt, dann werden die Magnetitpartikel in 7,5 g Octan dispergiert.

7.5.3 Herstellung der Magnetit-Miniemulsion VH-Mag30

Zur Verkapselung dieser Partikel wird eine wässrige Miniemulsion hergestellt. 7,87 g der unter 7.5.2 erhaltenen Dispersion werden mit einer Lösung von 811 mg SDS in Wasser 1 h lang magnetisch bei höchster Geschwindigkeit gerührt. Die Miniemulsion wird mit Ultraschall (zweimal 2 min, 90% Amplitude, 10 mm-Spitze; Pause ca. 60 s) unter Eiskühlung hergestellt.

Octan wird verdampft, indem die Miniemulsion 6 h lang auf 80 °C erhitzt wird, wobei alle 30 min ca. 2 ml Wasser nachgefüllt werden müssen.

7.5.4 Verkapselung in Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure)

Zunächst wird eine Styrol-Miniemulsion aus 6 g Styrol, 250 mg Hexadecan, 100 mg V59, 72 mg SDS und 24 g Wasser hergestellt. Diese wird mit VH-Mag30 gemischt, so daß ein Monomeranteil von 50% resultiert. Unter Anwendung von Ultraschall bei 50% Amplitude (Dauer siehe Tabelle 4.19; 10 mm-Spitze, Pause ca. 60 s) unter Eiskühlung werden die Magnetitpartikel und Styroltröpfchen vereinigt und dann bei 72 °C polymerisiert. Nach 6 h wird Acrylsäure zugegeben, die Polymerisation wird für 12 - 18 h fortgeführt. Anschließend wird abfiltriert und Feststoffgehalt und Teilchengrößen bestimmt.

7.6 Magnetische Polyurethan-Nanopartikeln

Alle Chemikalien werden ohne Aufbereitung verwendet: Isophorondiisocyanat, Dodecandiol (Fluka), Hexadecan (Aldrich, 99%) und Natriumdodecylsulfat (SDS) (Fluka, 96%). Demineralisiertes Wasser wurde für alle Experimente verwendet.

3,141 g Isophorondiisocyanat, 2,859 g Dodecandiol und 200 mg Hexadecan werden gut gemischt und mit einer Lösung von 200 mg SDS in 24 g Wasser 1 h lang magnetisch bei höchster Geschwindigkeit gerührt. Nach dieser Präemulgierung wird durch Anwendung von Ultraschall (2 min, 90% Amplitude, 10 mm-Spitze) unter Eiskühlung die Miniemulsion hergestellt. Diese wird mit einer Magnetit-Miniemulsion gemischt, mit einem resultierenden Anteil an Monomer im Feststoff von 50%. Durch erneute Anwendung von Ultraschall (zweimal 1 min, 50% Amplitude, 10 mm-Spitze; Pause ca. 60 s) unter Eiskühlung wird der Einschluß von Magnetit-Teilchen in die Monomer-Tröpfchen erreicht.

Das Gemisch wird auf 63 °C erwärmt, nach Erreichen der Temperatur wird 1 Tropfen Dibutylzinndilaureat als Katalysator zugegeben. Nach 4 h Polymerisation wird abfiltriert.

7.7 Epoxidharz-Nanopartikeln

Alle Chemikalien werden ohne Aufbereitung verwendet: Bisphenol-A-diglycidylether (Lancaster), Diaminododecan (Fluka) und Natriumdodecylsulfat (SDS) (Fluka, 96%). Demineralisiertes Wasser wurde für alle Experimente verwendet.

Die Monomere Bisphenol-A-diglycidylether und Diaminododecan werden vermischt und mit einer Lösung von 125 mg SDS in 20 g Wasser 1 h lang magnetisch bei höchster Geschwindigkeit gerührt. Nach Präemulgierung wird unter Anwendung von Ultraschall unter Eiskühlung die Miniemulsion hergestellt. Genaue Angaben zur Ultraschallanwendung sind in

Tabelle 4.29 zu finden. Die Miniemulsion wird 2 h lang bei 60 °C polymerisiert und dann durch ein Metallsieb abfiltriert. Anschließend wird die Teilchengröße gemessen.

7.8 Magnetische Epoxidharz-Nanopartikel

Alle Chemikalien werden ohne Aufbereitung verwendet: Bisphenol-A-diglycidylether (Lancaster), Diaminododecan (Fluka) und Natriumdodecylsulfat (SDS) (Fluka, 96%). Demineralisiertes Wasser wurde für alle Experimente verwendet.

Zunächst wird wie unter 7.7 und in Tabelle 4.30 beschrieben, die Monomer-Miniemulsion hergestellt. Diese wird unter Anwendung von Ultraschall mit einer Magnetitminiemulsion gemischt, so daß der resultierende Anteil an Monomer im Feststoff 50% beträgt. Die Mischung wird 2 h lang bei 60 °C polymerisiert und dann durch ein Metallsieb abfiltriert. Anschließend werden Teilchengröße und Feststoffgehalt bestimmt. In getrockneten Proben wird durch thermogravimetrische Analyse (TGA) der Magnetitgehalt gemessen.

7.9 Modifizierung der Oberfläche von verschiedenen Polystyrol-Nanopartikeln

Folgende Aminosäuren und Proteine werden verwendet: Glycin (Merck), L-Lysinmonohydrat (Merck), (S)-(+)-Asparaginmonohydrat (Merck), L-Glutamin (Merck), Streptavidin (IBA). Die Antikörper Mabthera (Roche) und Herceptin (Roche) wurden vom Institut für Transfusionsmedizin zur Verfügung gestellt, Aktin (Progen) und CD34 (DakoCytomation) von der Abteilung für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Ulm, GP VI (Abteilung für Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen), Early (Perkin-Elmer) und IEarly (Argene Biosoft) von der Abteilung Virologie der Universität Ulm.

7.9.1 Modifizierung der Oberfläche von carboxyfunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln

Für die Aktivierung der Carboxylgruppen werden N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) (Aldrich, 98%) und N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) (Fluka, 98,5%) verwendet.

7.9.1.1 Kopplung von Aminosäuren

Zu 5 ml eines zu modifizierenden gewaschenen Latex werden ein zehnfacher molarer Überschuß an EDC, bezogen auf die vorher bestimmte Menge an Oberflächenladung, und ein fünffacher molarer Überschuß an Sulfo-NHS, ebenfalls bezogen auf die Oberflächenladung, gegeben, die Mischung wird für 20 min gerührt. Dann wird der Latex auf das ca. sechsfache Volumen verdünnt und in einer Ultrafiltrationszelle durch Druckfiltration über eine

Größenausschlußmembran (MWCO 100000 Da) wieder eingeeengt, wobei überschüssiges EDC und Sulfo-NHS ausgewaschen werden. Der aktivierte Latex wird wieder in ein Glas gegeben, und die zehnfache molare Menge, bezogen auf die Oberflächenladungen, an Aminosäure zugegeben. Die Mischung wird jetzt über Nacht gerührt, dann wird der Latex auf das 10fache verdünnt und wieder in einer Ultrafiltrationszelle über eine Membran (MWCO 1000000) auf das ursprüngliche Volumen von 5 ml eingeeengt.

Von den mit Aminosäure-funktionalisierten Latices werden Feststoffgehalt und Teilchengröße sowie zum Teil ζ -Potential gemessen.

7.9.1.2 Kopplung von Antikörpern

Zu 5 ml eines zu modifizierenden gewaschenen Latex werden ein zehnfacher molarer Überschuß an EDC, bezogen auf die vorher bestimmte Menge an Oberflächenladung, und ein fünffacher molarer Überschuß, ebenfalls bezogen auf die Oberflächenladung, an Sulfo-NHS gegeben, die Mischung wird für 20 min gerührt. Dann wird der Latex auf das ca. sechsfache Volumen verdünnt und durch Druckfiltration über eine Größenausschlußmembran (MWCO 100000 Da) wieder eingeeengt, wobei überschüssiges EDC und Sulfo-NHS ausgewaschen werden. Der aktivierte Latex wird wieder in ein Glas gegeben, und die gewünschte Menge an Antikörper zugegeben. Die Mischung wird jetzt über Nacht gerührt, dann wird der Latex auf das zehnfache Volumen verdünnt und wieder durch Druckfiltration über eine Größenausschlußmembran (MWCO 100000 Da) auf das ursprüngliche Volumen von 5 ml eingeeengt.

Von den mit Antikörper-funktionalisierten Latices werden Feststoffgehalt und Teilchengröße sowie zum Teil ζ -Potential gemessen.

7.9.2 Modifizierung der Oberfläche von glycidylfunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln

Zu 5 ml der gewaschenen Proben wird die gewünschte Menge an Antikörper zugegeben. Die Mischung rührt 24 bis 48 Stunden. Danach wird auf das zehnfache Volumen verdünnt und in einer Druckfiltrationszelle über eine Membran (MWCO 100000 Da) auf das ursprüngliche Volumen eingeeengt.

Von den modifizierten Latices werden Feststoffgehalt und Teilchengröße gemessen.

Per aspera ad astra.

(Auf rauhen Pfaden zu den Sternen.)

Lucius Annaeus Seneca, der Jüngere

8.1 Geräte und Methoden

Bestimmung des Feststoffgehaltes

Der Feststoff der Polymerlatices wurde mit einem Kern RH 120-3 Gravimeter bestimmt.

Bestimmung der Oberflächenladung

Die Oberflächenladungsdichten wurden mit einem Partikelladungsdetektor PCD 02 (Mütek) mit angeschlossenem Titriergerät 702 SM Titrino (Metrohm) bestimmt. Als Titriermedium diente eine 0,1 mM kationische Poly-DADMAC-Lösung. Die Konzentration der vorgelegten Latices betrug ca. 0,5%.

Dynamische Lichtstreuung (DLS) und ζ -Potentialmessungen

Die Teilchengröße und das ζ -Potential wurden mit einem Zeta-Nanosizer der Firma Malvern Instruments bestimmt. Für die Messung des ζ -Potentials wurden die Proben mit 10^{-3} M KCl-Lösung verdünnt. Die Konzentration der vermessenen Latices lag zwischen 0,1 und 0,2%.

Präparative Ultrazentrifugation

Präparative Ultrazentrifugation wurde durchgeführt, um Informationen über die Verteilung der Magnetitpartikel im Polymer zu erhalten. Zwei Tropfen einer Probe werden in ein Ultrazentrifugationsröhrchen, das einen Saccharose-Dichtegradienten enthält, gegeben. Dieser Gradient wird aufgebaut durch vier übereinander geschichteten Saccharose-Lösungen mit

Dichten zwischen $1,0 \text{ g/cm}^3$ und $1,3 \text{ g/cm}^3$. Die Proben wurden 2 h lang bei 37000 U/min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer L8-55M Ultrazentrifuge (Beckmann) zentrifugiert.

Superconducting quantum interference device (SQUID)

SQUID Messungen wurden mit einem MPMS-5 (Quantum Design) bei einer Temperatur von 293 K zwischen -55000 Oe und 55000 Oe durchgeführt. Remanenzmessungen wurden bei 293 K zwischen -100 Oe und 100 Oe durchgeführt. Für die Messungen wurden einige mg in eine Gelatinekapsel eingewogen, die in einem PVC-Röhrchen fixiert wurde.

Thermogravimetrische Analyse

Der Magnetitgehalt der getrockneten Proben wurde durch thermogravimetrische Analyse mit einem TGA/SDTA851e (Mettler-Toledo) bestimmt. Die Messungen werden unter Stickstoffatmosphäre in einem Temperaturbereich von Raumtemperatur bis $1100 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

TEM-Aufnahmen wurden mit einem Philips 400T TEM aufgenommen, dessen Arbeitsspannung bei 80 kV liegt. Die Proben wurden mit Wasser verdünnt und ohne zusätzliche Kontrastierung auf ein 400 mesh Kupfernetz aufgetragen.

Ultrafiltration

Die Latices wurden durch Druckfiltration weitgehend tensidfrei gewaschen. Hierfür wurden Ultrafiltrationszellen der Firma Millipore mit einem Volumen von 50 ml verwendet, die Größenausschlußmembranen haben eine Porengröße von 100000 Da. Für die Ultrafiltration werden die Latices auf einen Feststoffgehalt von ca. 2% verdünnt.

Ultraschall

Die Miniemulsionen wurden hergestellt durch Anwendung von Ultraschall unter Eiskühlung mit einem Sonifier W50 (Branson). Es wurde eine Spitze mit einem Durchmesser von 10 mm verwendet.

UV/Vis-Spektrometrie

UV-Absorptionsspektren der Partikel wurden mit einem UV/Vis-Spektrometer Lambda 16 (Perkin-Elmer) gemessen. Für die Messungen wurden genau abgewogene Mengen der getrockneten Latices in 2,5 g THF gelöst.

Zellversuche

Die Zellversuche wurden hauptsächlich durchgeführt vom Institut für Transfusionsmedizin der Universität Ulm.

Spezielle Zellversuche mit immobilisierten Antikörpern Aktin und CD34 und immobilisierten GPVI wurden durchgeführt von der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Ulm.

8.2 Abkürzungen, Chemikalien

AA	Acrylsäure
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
BGE	Bisphenol-A-diglycidylether
C12DA	Diaminododecan
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DADMAC	Diallyldimethylammoniumchloride
EDC	N-Ethyl-N'-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
GMA	Glycidylmethacrylat
PLL	Poly-L-Lysin
PMI	N-(2,6-diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarboximid
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
THF	Tetrahydrofuran
V59	2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril)

8.3 Abkürzungen, allgemein

cmc	kritische Mizellkonzentration (engl. critical micell concentration)
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. dynamic light scattering)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
MD	„multi-domain“-Teilchen
MRT	Magnetresonanztomographie
MRI	magnetic resonance imaging, magnetische Resonanzbildgebung
MSC	mesenchymale Stammzelle
PCS	Photonen-Korrelationspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
SC	Feststoffgehalt (engl. solid content)
SD	„single-domain“-Teilchen
SPM	Superparamagnetismus
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop (engl. transmission electron microscope)
TGA	Thermogravimetrische Analyse
US	Ultraschall
UV	ultraviolett

8.4 Symbole

α	Öffnungswinkel
B	magnetische Induktion
C	Curie-Konstante
c	Konzentration
d	Auflösungsvermögen
D	hydrodynamischer Radius
D_T	translatinaler Diffusionskoeffizient
D_{SPM}	Größe der superparamagnetischen Domäne
δ	Phasendifferenz
E	elektrische Feldstärke
e	Elementarladung
Γ	Halbwertsbreite der spektralen Verteilung
γ	Grenzflächenspannung
η	Viskosität
f	Zerfallseffizienz des Initiators
h	Plancksches Wirkungsquantum
H	magnetische Feldstärke
H_c	Koerzitiv-Feldstärke
I	elektrische Stromstärke
$[I]$	Initiatorkonzentration
k_B	Boltzmann-Konstante
k_2	Geschwindigkeitskonstante des Initiatorzerfalls
k_a	Geschwindigkeitskonstante der Abbruchreaktion
k_W	Geschwindigkeitskonstante der Wachstumsreaktion
λ	Wellenlänge
μ	magnetische Permeabilität
μ_0	magnetische Feldkonstante
μ_r	relative Permeabilitätszahl
m	Masse
M	molare Masse
M	Magnetisierung
M_S	Sättigungsmagnetisierung
M_r	Remanenz
$[M]$	Monomerkonzentration

m_S	magnetisches Spinmoment
n	Brechungsindex
Π_{Osm}	osmotischer Druck
p_A	Reaktionsausmaß
p	Impuls
p_{Laplace}	Laplace-Druck
ϕ	magnetische Flußdichte
q	Streulichtvektor
R	allgemeine Gaskonstante
r	Radius
ρ	Dichte
T	Temperatur
Θ	Curie-Temperatur
ϑ	Streuwinkel
t	Zeit
U	elektrische Spannung
v	Geschwindigkeit
v_{brutto}	Polymerisationsgeschwindigkeit
χ	Suszeptibilität
X_n	Polymerisationsgrad
ω	Frequenz
ζ	ζ -Potential

Was wir wissen, ist ein Tropfen, was wir nicht wissen, ein Ozean.

Sir Isaac Newton

-
- [1] M. Faraday, *The Forces of Matter*, P. F. Collier Son, originally published **1910**.
- [2] J. C. Maxwell, *A Treatise on Magnetism and Electricity*, Clarendon Press, Oxford **1873**.
- [3] C. Walcott, R.P. Green, *Science* **1974**, 184, 180.
- [4] J. L. Gould, J. L. Kirschvink, K. S. Deffeyes, *Science* **1978**, 201, 1026.
- [5] M. M. Walker, J. L. Kirschvink, S.-B. R. Chang, A. E. Dizon, *Science* **1984**, 224, 751.
- [6] R. P. Feynman, There is plenty of room at the bottom. Rede vom 29.12.1959 auf dem „Annual Meeting of the American Physical Society“ am California Institute of Technology (CIT), Pasadena, **1995**.
- [7] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36, R167.
- [8] C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36, R198.
- [9] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2161.
- [10] D. L. J. Thorek, A. K. Chen, J. Czupryna, A. Tsourkas, *Annals of Biomedical Engineering* **2006**, 34, 22.

-
- [11] P. Tartaj, M. Morales, S. Veintemillas Verdaguer, et al., Serna, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36, R182.
- [12] A. S. Luebbe, C. Bergemann, H. Riess, et al., *Cancer Res.* **1996**, 56, 4686.
- [13] B. R. Bacon, D. D. Stark, C. H. Park, et al., *J. Lab. Clin. Med.* **1987**, 110, 164.
- [14] M. G. Harisinghani, J. Barentz, P. F. Hahn, et al., *N. Engl. J. Med.*, **2003**, 348, 2491.
- [15] B. Derjaguin, L. Landau, *Acta Physicochim.* **2003**, 14, 633.
- [16] E. J. W. Vervey, J. T. G. Overbeek, *Theory of the stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier Amsterdam, **1948**.
- [17] W. Z. Ostwald, *Phys. Chem.* **1901**, 37, 385.
- [18] M. A. Mishchuk, S. V. Verbich, S. S. Dukhin, *J. Dispersion Sci. Techn.* **1997**, 18, 517.
- [19] J. Ugelstad, M. S. El-Aasser, J. W. Vanderhoff, *Polym. Lett. Ed.* **1973**, 11, 503.
- [20] J. Ugelstad, F. K. Hansen, S. Lange, *Makromol. Chem.* **1974**, 175, 507.
- [21] B. Abismail, J. P. Canselier, A. M. Wilhelm, et al., *Ultrasonics Sonochem.* **1999**, 6, 75.
- [22] C. Bondy, K. Söllner, *Trans. Farad. Soc.* **1935**, 31, 835.
- [23] T. J. Mason, *Ultrasonics Sonochem.* **1992**, 30, 192.
- [24] W. Lauterborn, *Ultrasonics Sonochem.* **1997**, 4, 65.
- [25] E. Trommsdorff, H. Köhle, P. Lagally, *Makromol. Chem.* **1948**, 1, 169.
- [26] R. G. W. Norrish, R. R. Smith, *Nature* **1942**, 150, 336.
- [27] G. Odian, *Principles of Polymerization*, J. Wiley and Sons, New York, **1991**.
- [28] W. D. Harkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 1428.
- [29] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, M. Antonietti, *Macromolecules* **1999**, 32, 5222.

-
- [30] K. Landfester, *Macromol. Symp.* **2000**, 150, 171.
- [31] W. H. Carothers, *Trans. Faraday Soc.* **1936**, 32, 39.
- [32] B. K. Kim, *Colloid Polym. Sci.* **1996**, 274, 599.
- [33] F. Tiarks, K. Landfester, M. Antonietti, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2001**, 39, 2520.
- [34] M. Barrère, K. Landfester, *Macromolecules* **2003**, 36, 5119 .
- [35] K. Landfester, F. Tiarks, H.-P. Hentze, M. Antonietti, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, 201, 1.
- [36] K. Nagai, Y. Oshishi, K. Ishiyama, N. Kuramoto, *J. Appl. Polym. Sci.* **1989**, 38, 2183.
- [37] Y. Haga, T. Watanabe, R. Yosomiya, *Angew. Makromolek. Chemie* **1991**, 189, 23.
- [38] Y. Yang, X. Z. Kong, C. Y. Kan, C. G. Sun, *Polym. Adv. Technol.* **1990**, 10, 54.
- [39] T. Yamaguchi, T. Ono, Y. Saito, S. Ohara, *Angew. Makromolek. Chemie* **1976**, 53, 65.
- [40] T. Yamaguchi, T. Ono, Y. Saito, *Chem. Ind.* **1974**, 783.
- [41] T. Yamaguchi, T. Ono, K. Hasegawa, *Chem. Ind.* **1975**, 748.
- [42] S. Lelu, C. Novat, C. Graillat, A. Guyot, E. Bourgeat-Lami, *Polym. Int.* **2003**, 52, 542.
- [43] B. Erdem, E. D. Sudol, V. L. Dimonie, M. S. El-Aasser, *J. Polym. Sci.* **2000**, 38, 4419.
- [44] B. Erdem, E. D. Sudol, V. L. Dimonie, M. S. El-Aasser, *J. Polym. Sci.* **2000**, 38, 4431.
- [45] B. Erdem, E. D. Sudol, V. L. Dimonie, M. S. El-Aasser, *J. Polym. Sci.* **2000**, 38, 4441.
- [46] N. Bechthold, F. Tiarks, M. Willert, K. Landfester, M. Antonietti, *Macromol. Symp.* **2000**, 151, 549 .
- [47] US Patent No. 3,843,540 (1974), invs.: G. W. Reimers, S. E. Khalafalla.
- [48] D. Hoffmann, K. Landfester, M. Antonietti, *Magnetohydrodynamics* **2001**, 37, 217.

-
- [49] I. Csetneki, M. K. Faix, A. Szilágyi, et al., *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2004**, 42, 4802.
- [50] L. Ramírez, K. Landfester, *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, 204, 22.
- [51] H. Takeuchi, H. Yamamoto, Y. Kawashima, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 47, 39.
- [52] M.T. Peracchia, R. Gref, Y. Minamitake, et al., *J. Controlled Release* **1997**, 46, 223.
- [53] S. Sakuma, M. Hayashi, M. Akashi, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 47, 21.
- [54] Y.-P. Li, Y.-Y. Pei, X.-Y. Zhang, et al., *J. Controlled Release* **2001**, 71, 203.
- [55] D. J. Wilkins, *Nature (London)* **1964**, 202, 798.
- [56] M. K. Balghat, R. P. Haugland, J. S. Pollack, et al., *Journal of Immunological Methods* **1998**, 219, 57.
- [57] B. Dubertret, M. Calame, A. J. Libchaber, *Nature Biotechnology* **2001**, 19, 365.
- [58] J. R. Taylor, M.M. Fang, S. Ni, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1979.
- [59] M.-T. Charreyre, P. Zhang, M. A. Winnik, et al., *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, 170, 374.
- [60] F. Tronc, M. Li, J. Lu, et al., *J. Polym. Sci.* **2003**, 41, 766.
- [61] K. Ando, H. Kawaguchi, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 285, 619.
- [62] U. Schroeder, P. Sommerfeld, S. Ulrich, B. A. Sabel, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, 87, 1305.
- [63] J. B. Sundstrom, H. Mao, R. Santoianni, et al., *J Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2004**, 35, 9.
- [64] I. Hilger, R. Hergt, W. A. Kaiser, *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **2005**, 152, 33.
- [65] C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36, R198.
- [66] S.Si, A. Kotal, T. K. Mandal, S. Giri, H. Nakamura, T. Kohara, *Chem. Mater.* **2004**, 16, 3489.
- [67] S. H. Sun, H. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8204.

-
- [68] T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12798.
- [69] R. Hergt, R. Hiergeist, I. Hilger, W. A. Kaiser, *Recent Res. Dev. Mater. Sci.* **2002**, 3, 723.
- [70] D. Schüler, *Int. Microbiol.* **2002**, 5, 209.
- [71] U. Heyen, D. Schüler, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 61, 536.
- [72] N. R. Jana, Y. Chen, X. Peng, *Chem. Mater.* **2004**, 3931.
- [73] C. Alexiou, W. Arnold, R. J. Klein, et al., *Cancer Research* **2000**, 60, 6641.
- [74] I. Hilger, W. Andrä, R. Hergt, et al., *Radiology* **2001**, 218, 570.
- [75] K. Landfester, L. P. Ramírez, *J. Phys.: Condensed Matter* **2003**, 15, 1345.
- [76] L. P. Ramírez, K. Landfester, *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, 204, 22.
- [77] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, et al., *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, 201, 413.
- [78] L. Néel, *C. R. Acad. Sci.* **1949**, 228, 664.
- [79] M. I. Shliomis, *Sov. Phys. - Usp.* **1963**, 17, 153.
- [80] J. M. H. Kijas, J. C. S. Fowler, C. A. Garbett, M. R. Thomas, *Biotechniques* **1994**, 16, 656.
- [81] S. M. O'Brien, O. R. T. Thomas, P. Dunnill, *J. Biotechnol.* **1996**, 50, 113.
- [82] M. Pitschke, A. Fels, B. Schmidt, et al., *Colloid Polym. Sci.* **1995**, 273, 740.
- [83] G. P. Der-Balian, N. Kameda, G. L. Rowley, *Anal. Biochem.* **1988**, 173, 59.
- [84] D. Klee, H. Höcker, *Advances in Polymer Science*, Vol. 149, Springer Verlag Berlin Heidelberg, **2000**.
- [85] C. C. Berry, S. Charles, S. Wells, et al., *Int. J. Pharm.* **2004**, 269, 211.
- [86] G. M. Lanza, D. R. Abendschein, X. Yu, et al., *Acad. Radiol.* **2003**, 9, S330.
- [87] Y. Kawashima, *Ad. Drug Delivery Rev.* **2001**, 47, 1.

-
- [88] X. Wu, J. Liu, H. Liu, et al., *Nat. Biotechnol.* **2003**, 2, 817.
- [89] M. E. Åkerman, W. C. W. Chan, P. Laakonen, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 12617.
- [90] S. Cerdan, H. R. Lotscher, B. Kunnicke, et al., *Magn. Reson. Med.* **1989**, 12, 151.
- [91] R. Weissleder, A. S. Lee, A. J. Fischman, et al., *Radiology* **1991**, 181, 245.
- [92] L. G. Remsen, C. I. McCormick, S. Roman-Goldstein, et al., *Am. J. Neuroradiol.* **1996**, 17, 411.
- [93] B. Le, M. Shinkai, T. Kitade, et al., *J. Chem. Eng. Jpn.* **2001**, 34, 66.
- [94] M. Shinkai, B. Le, H. Honda, et al., *Jpn. J. Cancer Res.* **2001**, 92, 1138.
- [95] A. Ito, Y. Kuga, H. Honda, et al., *Cancer Lett.* **2004**, 212, 167.
- [96] G. P. Mitchell, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8122.
- [97] C. Y. Zhang, H. Ma, L. Jin, D. Y. Chen, *Analyst* **2000**, 125, 1029.
- [98] D. M. Willard, L. L. Carillo, J. Jung, A. V. Orden, *Nano Lett.* **2001**, 1, 469.
- [99] M. J. Murcia, C. A. Naumann, Biofunctionalization of Fluorescent Nanoparticles. In: C. S. S. R. Kumar (ed) *Nanotechnologies for the Life Sciences Vol.1: Biofunctionalization of Nanomaterials*. Wiley-VCH Verlag Weinheim, **2005**.
- [100] M. Hatekeyama, S. Iwato, K. Fujimoto, et al., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **1998**, 10, 161.
- [101] C. Mateo, R. Torres, G. Fernández-Lorente, et al., *Biomacromolecules* **2003**, 4, 772.
- [102] D. F. DeTar, R. Silverstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1013.
- [103] M. C. Desai, L. M. S. Stramiello, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7685.
- [104] X. Ghao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 969.
- [105] Y.-Z. Du, M. Kodaka, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 562

-
- [106] A. F. Hollemann, E. Wiberg, Lehrbuch der Anorganischen Chemie, de Gruyter Verlag Berlin, New York **1995**
- [107] A. Weiss, H. Witte, Magnetochemie, Grundlagen und Anwendungen, Verlag Chemie Weinheim, **1973**.
- [108] US Patent No. 4358388 (1982), invs.: J. -C. Daniel, J.-L. Schuppiser, M. Tricot.
- [109] US Patent No. 5356713 (1994), invs.: D. Charmot, C. Vidil.
- [110] C. P. Bean, J. D. Livingston, *J. Appl. Phys.* **1959**, 30, 120S
- [111] H.-D. Dörfler, Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme, Springer Verlag Berlin Heidelberg, **2002**
- [112] Myriam Lorenz, Dissertationsschrift (in Arbeit).
- [113] M. R. Lorenz, V. Holzapfel, A. Musyanovych, et al., *Biomaterials* **2006**, 27, 2820.
- [114] D. K. Kim, Y. Zhang, W. Voit, K. V. Rao, M. Muhammed, *J. Mag. Magn. Mater.* **2001**, 225, 30.
- [115] R. Kaiser, G. Miskolczy, *J. Appl. Phys.* **1970**, 41, 1064.
- [116] R. S. Csevkovic, C. M. Perry, *Drugs* **2006**, 66, 791.
- [117] R. O. Dillmann, *Cancer Biother. Radiopharm.* **1999**, 14, 5.
- [118] B. C. Pestalozzi, *Ther. Umsch.* **2006**, 63, 255.
- [119] M. Gawaz, I. Konrad, A. I. Hauser, et al. *Thromb Haemost* **2005**, 93, 910.
- [120] A. Bültmann, C. Herdeg, Z. Li, *Thromb Haemost* **2006**, 95, 763.
- [121] Z. Grabarek, J. Gergely, *Anal. Biochem.* **1990**, 185, 131.
- [122] J. V. Staros, R. W. Wright, D. M. Swingle, *Anal. Biochem.* **1986**, 156, 220.
- [123] G. T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, **1996**.

[124] A. S. Arbab, L. A. Bashaw, B. R. Miller, E. K. Jordan, B. K. Lewis, H. Kalish, et al., *Radiology* **2003**, 229, 836.

[125] H. Gershon, R. Ghirlando, S. B. Guttman, A. Minsky, *Biochemistry* **1993**, 32, 7143.

DANKSAGUNG

*Dankbare Menschen sind wie fruchtbare Felder: Sie geben das Empfangene
zehnfach zurück.*

August von Kotzebue

Mein herzlicher Dank gilt allen, die auf ihre eigene Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich meiner Chefin Frau Prof. Dr. Katharina Landfester für die anspruchsvolle und interessante Aufgabenstellung, sowie für die wirklich hervorragende Betreuung.

Außerdem danke ich

Frau Prof. Dr. Nicola Hüsing für die Übernahme des Zweitgutachtens,

Marlies Fritz und Elvira Kaltenecker für die TGA-Messungen,

Dr. Clemens Weiß und Joachim Köhler für die SQUID-Messungen,

Dr. Volker Mailänder für die hervorragende Zusammenarbeit,

meinen Kochknechten Paul, Serena und Benjamin für ihre Beiträge zu den Ergebnissen,

Eugen für die vielen Stunden neben den Dialysezellen.

Allen Angehörigen der Abteilung Organische Chemie 3 danke ich für ein sehr entspanntes Arbeitsklima. Hier seien besonders meine Bürokollegen Andreas W., Andreas S. und Daniel erwähnt, die mich mehr oder weniger erfolgreich in die Kunst des Unreal Tournament eingewiesen haben, und Nicole für die kurzen, aber immer netten Plauderminuten. Ich danke Anna für ihre Einweisung in das Thema und ihre Hilfe, die sie immer gerne angeboten hat. Maria, danke für Deine Freundschaft und Deine unendliche Hilfsbereitschaft! Nicht unerwähnt bleiben soll die ständige Versorgung mit Kuchen und sonstigen Verköstigungen, die in dieser Abteilung gewährleistet war. Und ein spezieller Dank geht an Luis, der mir in der kurzen Zeit ein wichtiger Freund und Gesprächspartner geworden war, sowohl im Labor als auch privat.

Ohne meine Studienkollegen und Freunde wäre die Studienzeit kaum ertragbar gewesen und ich wäre wohl nicht soweit gekommen: Danke an Andy (the artist formerly known as Hein), Dr. Lutz, Stefan, Tilmann, Daniel, Timo und auch Tobi, obwohl er mich vergessen hat. Außerdem danke ich Jochen herzlichst für seine Weinlieferungen und sein immer offenes Ohr.

Rubén, estoy agradecida por conocerte, eres una muy buena persona. Gracias por tu ayuda a encontrar un trabajo interesante en Valencia. Espero volverte a ver en España...

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für jegliche Unterstützung in allem, was ich bisher getan habe, geplant habe und geträumt habe.

LEBENS LAUF



Verena Holzapfel

Donaustraße 6

89231 Neu-Ulm

geb. 23. Juni 1979

Hochschule

01/2004 - 10/2006

Promotion an der Universität Ulm

Arbeitskreis Organische Chemie III, Prof. Dr. Katharina Landfester

Thema der Dissertation: Fluoreszierende und magnetische
Polymernanopartikel zur biomedizinischen
Anwendung

10/1998 - 07/2003

Grund- und Hauptstudium der Chemie an der Universität Ulm

Vordiplom 08/2000 (Gesamtnote 1,3)

Diplom 07/2003 (Gesamtnote 1,2)

Thema der Diplomarbeit: Beiträge zur Kationenverteilung in
einkristallinen Natriummetavanadaten
während des Czochralski-Prozesses

Schule

06/1998

Abitur, Neu-Ulm (Bayern)(Gesamtnote 2,0)

09/1989 - 06/1998

Lessing-Gymnasium Neu-Ulm (Bayern)

09/1985 - 07/1989

Grund- und Teilhauptschule Ludwigsfeld (Bayern)

PUBLIKATIONEN

Poster

EUPOC Konferenz

30/05/2004 - 04/06/2004, Gargnano, Italien

Kolloquium des DFG Schwerpunktprogramms "Colloidal magnetic fluids" (SPP1104)

27/09/2004 - 29/09/2004, Benediktbeuern, Deutschland

Kolloquium des DFG Schwerpunktprogramms "Colloidal magnetic fluids" (SPP1104)

26/09/2004 - 28/09/2004, Benediktbeuern, Deutschland

Kolloquium des DFG-Schwerpunktprogramms "Colloidal magnetic fluids" (SPP1104)

27/09/2006 - 29/09/2006, Benediktbeuern, Deutschland

Vorträge

"Mitarbeitertreffen des DFG Schwerpunktprogramms "Colloidal magnetic fluids" (SPP1104)

25/11/2004 - 26/11/2004, Jena, Deutschland

"3rd Zsigmondy Colloquium

06/04/2006 - 07/04/2006, Berlin, Deutschland

Veröffentlichungen

V. Holzapfel, A. Musyanovych, and K. Landfester, Preparation of Fluorescent Carboxyl and Amino Functionalized Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization as Markers for Cells, *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, 206, 2440-2449.

M. R. Lorenz, V. Holzapfel, A. Musyanovych, K. Nothelfer, P. Walther, H. Frank, K. Landfester, H. Schrezenmeier, and V. Mailänder, Uptake of Functionalized, Fluorescent-Labeled Nanoparticles in Different Cell Lines and Stem Cells, *Biomaterials* **2006**, 27, 2820-2828.

V. Holzapfel, M. Lorenz, C. K. Weiß, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailänder, Synthesis and biomedical applications of functionalized fluorescent and magnetic dual reporter nanoparticles as obtained in the miniemulsion process, *J. of Phys.: Condens. Matter* **2006**, 18, S2581-S2594.

ERKLÄRUNG

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2004 bis November 2006 in der Abteilung Organische Chemie III der Universität Ulm erstellt.

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn gemäß anderen Arbeiten entnommen wurden, sind durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Ulm, den 04.10.06



Verena Holzapfel

