

Aus dem Institut für Klinische Radiologie und Nuklearmedizin
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Schönberg)

Herstellung funktionalisierbarer Nanopartikel als duales MRT/CT-
Kontrastmittel für die medizinische Bildgebung.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des

Dr. sc. hum.

der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von

Patrick Illert (M.Sc.)

aus
Viernheim

2018

Dekan: Prof. Dr. med. Sergej Goerdts
Referent: Prof. Dr. Björn Wängler

Für meinen Vater.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	2
1.1 Bildgebende Verfahren in der Medizin.....	2
1.1.1 Computertomographie	2
1.1.2 Magnetresonanztomographie	3
1.2 Kontrastmittel.....	6
1.2.1 CT Kontrastmittel	6
1.2.2 MRT Kontrastmittel	8
1.2.3 Duale Kontrastmittel.....	10
1.3 Ziel der Arbeit	11
2 MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1 Herstellverfahren.....	13
2.1.1 Entgasung von Wasser	13
2.1.2 Fe ₃ O ₄ Nanopartikel Synthese	13
2.1.3 polyMAOETIB Nanopartikel Synthese	14
2.1.4 Fe ₃ O ₄ @MAOETIB Nanopartikel Synthese.....	14
2.1.5 Aufbereitung der Polymerpartikel.....	15
2.2 Funktionalisierung der Fe ₃ O ₄ @MAOETIB Partikel	16
2.3 In Vitro Zellversuche	17
2.4 Messgeräte zur Charakterisierung der Partikel.....	17
2.5 Verwendete Chemikalien	19
3 ERGEBNISSE	20
3.1 Fe ₃ O ₄ Nanopartikelsynthese.....	20
3.1.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.....	20
3.1.2 Variation der Stabilisatormenge	21

3.1.3	Variation der Fe ²⁺ /Fe ³⁺ Gesamteisenkonzentration	22
3.1.4	Variation der Rührergeschwindigkeit	23
3.2	polyMAOETIB Nanopartikelsynthese	25
3.2.1	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	25
3.2.2	Variation der Tensidmenge und der Tensidart	27
3.2.3	Untersuchung weiterer Prozessparameter	29
3.2.4	Alternative Einsatzstoffe	33
3.2.5	Partikelaufbereitung	35
3.2.6	Scale-Up Versuche mit polyMAOETIB	36
3.2.7	polyMAOETIB Anwendung im Computertomographen	37
3.3	Fe ₃ O ₄ @MAOETIB Nanopartikelsynthese	39
3.3.1	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	40
3.3.2	Variation der Tensidmenge	40
3.3.3	Variation der Eisenoxidmenge	42
3.3.4	TEM Aufnahmen der Fe ₃ O ₄ @MAOETIB Nanopartikel	44
3.4	Evaluierung des dualen Kontrastmittels in CT und MRT	47
3.4.1	Evaluierung des CT Kontrasts von Fe ₃ O ₄ @MAOETIB	48
3.4.2	Evaluierung des MRT Kontrasts von Fe ₃ O ₄ @MAOETIB	50
3.5	Funktionalisierung der Partikeloberfläche	52
3.5.1	Allgemeiner Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung	53
3.5.2	Zellversuche	55
4	DISKUSSION	57
4.1	Herstellung der Fe ₃ O ₄ Nanopartikel	57
4.1.1	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	59
4.1.2	Einfluss der Stabilisatormenge	60
4.1.3	Einfluss der Fe ²⁺ /Fe ³⁺ -Eduktkonzentration	62
4.1.4	Einfluss der Rührergeschwindigkeit	62
4.2	Herstellung der polyMAOETIB Nanopartikel	63
4.2.1	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	63
4.2.2	Einfluss der Tensidmenge und der Tensidart	64
4.2.3	Untersuchung weiterer Prozessparameter	70
4.2.4	Alternative Einsatzstoffe	72
4.2.5	Partikelaufbereitung	72
4.2.6	Scale-Up	76

4.2.7	polyMAOETIB Anwendung im Computertomographen.....	76
4.3	Herstellung der Fe ₃ O ₄ @MAOETIB Nanopartikel.....	77
4.3.1	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.....	77
4.3.2	Einfluss der Tensidmenge.....	79
4.3.3	Einfluss der Eisenoxidmenge.....	80
4.3.4	TEM Aufnahmen der Fe ₃ O ₄ @MAOETIB Nanopartikel.....	82
4.4	Evaluierung des dualen Kontrastmittels in CT und MRT.....	83
4.4.1	Evaluierung des CT Kontrasts von Fe ₃ O ₄ @MAOETIB.....	83
4.4.2	Evaluierung des MRT Kontrasts von Fe ₃ O ₄ @MAOETIB.....	85
4.4.3	CT/MRT Kontrastverhältnis.....	87
4.5	Funktionalisierung der Partikeloberfläche.....	88
4.5.1	Allgemeiner Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung.....	88
4.5.2	Zellversuche.....	89
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	92
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	94
7	ANHANG.....	103
8	LEBENS LAUF.....	114
9	DANKSAGUNG.....	115

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFM	Atomic Force Mikroskop
AIBN	Azobisisobutyronitril
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
CT	Computertomographie
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTACl	Cetyltrimethylammoniumchlorid
Cys-TATE	Cystein-Tyr ³ -Octreotate
DIPEA	N,N-diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
EDT	1,2-ethandithiol
EGdiMA	Ethylenglycoldimethacrylat
FCS	Fetal Calf Serum
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl Schutzgruppe
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
HBTU	N,N,N',N'-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1yl)uroniumhexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
MAOETIB	2-methacryloyloxyethyl(2,3,5-triiodobenzoat)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MRT	Magnetresonanztomographie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
SO	Natriumoleat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
XRD	Röntgenbeugung

1 EINLEITUNG

1.1 Bildgebende Verfahren in der Medizin

1.1.1 Computertomographie

Die Computertomographie ist ein medizinisch diagnostisches Verfahren und beruht auf der konventionellen Röntgentechnik. Die Entdeckung der Röntgenstrahlung 1895 durch Wilhelm Conrad Röntgen gilt als Meilenstein der medizinischen Diagnostik.¹ Die Durchleuchtung mit Röntgenstrahlen ermöglichte es erstmals Teile des inneren menschlichen Körpers nicht invasiv abzubilden um schnelle, zuverlässige Diagnosen zu stellen. Das Prinzip beruht auf der Absorption von Röntgenstrahlung durch das Körpergewebe, wobei verschiedene Gewebearten (z.B. Knochen, Muskeln, Haut, etc.) die Röntgenstrahlung unterschiedlich stark absorbieren, und auf dem Bild unterschiedlich hell dargestellt werden. Konventionelle Röntgenbilder auf Röntgenfilmen sind 2-Dimensionale Schattenbilder, welche in ihrer Tiefe nicht zu unterscheiden sind, wodurch Teile des Bildes wiederum andere Teile verdecken können.

Mit Hilfe einer mehrfachen Durchleuchtung des Objekts unter verschiedenen Einfallswinkeln und einer aufwendigen Rekonstruktion der Bilddaten am Computer gelang es Godfrey Hounfield 1972 mittels Computertomographie (CT) erstmals diskrete Schnittbilder menschlicher Körperteile zu erstellen.^{2,3} Weitere Fortschritte in der Computertechnik ermöglichten 1989 die Einführung der Spiral-CT durch Willi Kalender, nach welchem Prinzip Computertomographen bis heute arbeiten.⁴⁻⁶ Der Patient wird hier mit einer konstanten Geschwindigkeit durch eine rotierende Röntgenröhre geschoben. Durch die Rotation der Röhre werden kontinuierlich aus verschiedenen Richtungen spiralförmig Röntgenaufnahmen des Patienten erstellt, welche im Computer nach der Bildrekonstruktion zu Schnittbildern zusammen gefügt werden.

Die Messzeit bis zum rekonstruierten Schnittbild beträgt bei modernen CT Geräten meistens weniger als eine Minute, je nach Körperregion und Auflösung oftmals nur wenige Sekunden. Durch eine dreidimensionale Abtastung der Körperregionen ist eine lückenlose Darstellung feiner Strukturen möglich. So lassen sich zum Beispiel Tumoren gut von gesundem Gewebe abgrenzen und Metastasen genau aufspüren. Die CT eignet sich insbesondere für Lungen- und Thorax Untersuchungen und für eine detaillierte Darstellung von Knochen und Frakturen.¹ Im Vergleich zu anderen Röntgentechniken ist der Patient bei der Computertomographie jedoch einer bis zu 300-fach höheren Strahlenbelastung ausgesetzt.⁷ Ein aktuelles Forschungsgebiet ist die Optimierung der Bildrekonstruktion und des Geräteaufbaus um die Strahlendosis zu verringern.⁸⁻¹²

Die Helligkeit eines Bildes in der CT ist abhängig von der Schwächung der Röntgenstrahlung durch das abzubildende Material. Eine Schwächung der Primärstrahlung wird hauptsächlich hervorgerufen durch Absorption (Photoeffekt) und Streuung der Strahlung. Die gestreute Strahlung wird als möglicher Störfaktor für den Kontrast des Bildes vor der Detektion durch ein Streustrahlenraster minimiert.

Die durch Absorption verursachte Verminderung der auftreffenden Röntgenquanten pro Sekunde N_0 ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz abhängig von der Dicke d des Materials und dessen Schwächungskoeffizienten μ . Die Anzahl der Quanten N der Primärstrahlung nimmt bei der Durchstrahlung des Materials exponentiell ab.¹

$$N = N_0 \cdot e^{-\mu d} \quad (\text{Gl. 1})$$

Für den Schwächungskoeffizienten μ und die Ordnungszahl Z der absorbierenden Atome im Material gilt $\mu \propto Z^4$.¹³ Materialien bzw. Elemente mit hohen Schwächungskoeffizienten werden zum Beispiel für Röntgenabschirmung (Blei; $Z_{\text{Pb}} = 82$) oder in Kontrastmitteln (Iod; $Z_{\text{I}} = 53$) für CT Untersuchungen verwendet.

1.1.2 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist wie die Computertomographie ein bildgebendes Verfahren der nicht invasiven medizinischen Diagnostik. Bei MRT Untersuchungen werden Schnittbilder ausgewählter Körperregionen erstellt um Aussagen über die vorliegende Krankheit treffen zu können.¹⁴⁻¹⁸ Die Untersuchungen liegen dem Prinzip der Kernspinresonanz von Atomen (NMR, nuclear magnetic resonance) zugrunde. Die NMR in Flüssigkeiten und Festkörpern wurde erstmals 1946 von Felix Bloch und Edward Mills Purcell unabhängig voneinander nachgewiesen.¹⁹⁻²¹ Durch digitale Datenverarbeitung und räumlicher Detektion im Magnetfeld wurde NMR 1973 von Paul Lauterbur erstmals als bildgebendes Verfahren verwendet.²²

Atomkerne bestehen aus Protonen und Neutronen, welche einen Eigendrehimpuls (Spin) besitzen. Diese Spins ordnen sich im Atomkern paarweise parallel und antiparallel. Bei Atomkernen mit gerader Anzahl an Protonen und Neutronen heben sich die Spins somit gegenseitig auf. Ist die Anzahl ungerade, resultiert bei Addition der Spins im Kern ein magnetisches Moment, welches in einem externen Magnetfeld ausgerichtet und gemessen werden kann.²³ Die ausgerichteten Atomkerne lassen sich durch magnetische Impulse stören und die Änderung im Magnetfeld detektieren. Das einfachste Atom mit magnetischem Moment ist der Wasserstoff, dessen Kern lediglich aus einem Proton besteht. Wasserstoff ist im menschlichen Körper mit Abstand das häufigste Element und hauptsächlich für den Kontrast im MRT verantwortlich. In einem externen Magnetfeld B_0 richten sich die Spins der Protonen aus und rotieren mit einer Frequenz, der Larmor-Frequenz ω_0 , um die Achse von B_0 (Präzession). Das gyromagnetische Verhältnis γ beschreibt den elementspezifischen Zusammenhang zwischen dem Spin des Atomkerns und dessen magnetischen Moments und beträgt für Wasserstoff $\gamma_H = 42,58 \text{ MHz/T}$.

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (\text{Gl. 2})$$

Die Larmor-Frequenz ω_0 ist direkt proportional zu B_0 .²⁴ Die Ausrichtung der Protonenspins zum externen Magnetfeld B_0 wird durch eine Boltzmannverteilung beschrieben (vgl. Gl. 3) und erfolgt sowohl parallel (N_+) als auch antiparallel (N_-).^{1,16}

Eine parallele Ausrichtung ist energetisch günstiger und leicht im Überschuss woraus eine sehr kleine, jedoch messbare longitudinale Magnetisierung entlang des externen Magnetfeldes B_0 resultiert. Für die Spins lässt sich folgende Verteilungsfunktion erstellen. In dieser Beziehung ist k die Boltzmannkonstante und \hbar das Planck'sche Wirkungsquantum.

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{\frac{\gamma \hbar B_0}{kT}} \quad (\text{Gl. 3})$$

Die resultierende Magnetisierung lässt sich im Raum als Vektor $\vec{M} = [M_x, M_y, M_z]$ formulieren und die Magnetisierungskomponenten für jede Richtung mit Hilfe der Bloch Gleichung bestimmen. Die Vektoren \mathbf{i} , \mathbf{j} und \mathbf{k} sind die Einheitsvektoren in x,y und z Richtung.¹⁶

$$\frac{\partial \vec{M}}{\partial t} = \gamma \cdot \vec{M} \times \vec{B}_0 - \frac{(\mathbf{i} \cdot M_x + \mathbf{j} \cdot M_y)}{T_2} - \frac{\mathbf{k} \cdot (M_z - M_{0,z})}{T_1} \quad (\text{Gl. 4})$$

Zur Aufnahme eines Bildes in der klinischen MRT werden die Protonen im externen Magnetfeld B_0 durch kurzzeitiges Zuschalten einer Hochfrequenzspule angeregt und die Änderungen der Magnetisierung detektiert. Durch Kippen der Spins der Protonen um 90° mit magnetischen Hochfrequenzimpulsen nahe der Larmor-Frequenz nimmt lokal die Longitudinalmagnetisierung ab. Die Spins präzedieren direkt nach dem Impuls transversal in Phase um B_0 unter Aufbau einer Transversalmagnetisierung. Durch Wechselwirkung mit ihrer Umgebung dephasieren die Spins und die Transversalmagnetisierung nimmt ab.

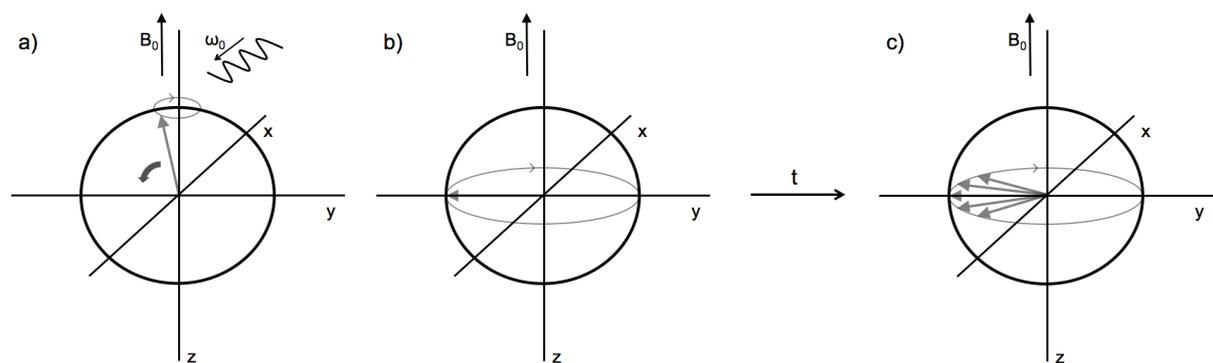


Abb. 1: Schematische Darstellung der transversalen Relaxation (a) Anregung der Spins mit der Larmor Frequenz ω_0 (b) gekippte Spins präzedieren in Phase um B_0 (c) Dephasierung mehrerer Spins nach der Zeit t

Die transversale Magnetisierung in x,y-Richtung lässt sich mit dem x,y-Term aus Gleichung 4 beschreiben. Aus einer Lösung der Bloch Gleichung ergibt sich eine exponentielle Abnahme der transversalen Magnetisierungskomponenten M_x und M_y

(Gl. 5). Die Zeit, nach welcher die Transversalmagnetisierung auf 37% ihres Ausgangswerts abgesunken ist, wird als Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 bezeichnet.

$$M_{x,y}(t) = M_0 \cdot e^{-t/T_2} \quad (\text{Gl. 5})$$

Im selben Moment zur T_2 Relaxation streben die gekippten Spins nach dem 90° Impuls ihren Grundzustand entlang des externen Magnetfeldes B_0 an und richten sich wieder nach B_0 aus. Während die Transversalmagnetisierung abnimmt, baut sich die Longitudinalmagnetisierung des Grundzustandes wieder auf.

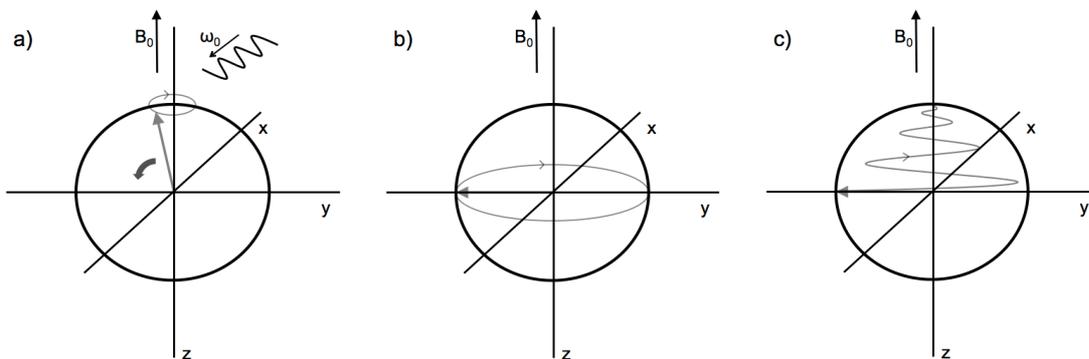


Abb. 2: Schematische Darstellung der longitudinalen Relaxation (a) Anregung der Spins mit der Larmor Frequenz ω_0 (b) gekippte Spins präzedieren in Phase um B_0 (c) Spins richten sich wieder nach B_0 aus

Die Zeit nach dem Impuls, in welcher die Longitudinalmagnetisierung 67% ihres Maximums erreicht hat, ist die Spin-Gitter Relaxationszeit T_1 . Der Zusammenhang wird mit dem letzten Term aus Gleichung 4 beschrieben. Die Lösung der Bloch Gleichung ergibt für die longitudinale Magnetisierungskomponente M_z :

$$M_z(t) = M_0 \cdot (1 - e^{-t/T_1}) \quad (\text{Gl. 6})$$

Allgemein gilt $T_2 < T_1$. Beide Relaxationsvorgänge laufen gleichzeitig ab und können durch verschiedene Messesequenzen unabhängig voneinander detektiert und digital zu einem Bild verarbeitet werden. Die Detektion der abnehmenden Transversalmagnetisierung erlaubt bei T_2 gewichteten Bildern eine Anhebung des Schwarzkontrasts im Bild. Flüssigkeitsreiche Körperstrukturen wie Ödeme oder Liquor cerebrospinalis (Hirnflüssigkeit) werden aufgrund der langen T_2 von Wasser hell dargestellt, während angrenzende Strukturen dunkler erscheinen.

T_1 Messungen heben aufgrund der Zunahme der Longitudinalmagnetisierung den Weißkontrast im Bild an. Fettreiches Gewebe wird z.B. aufgrund der schnellen Relaxation (kurzes T_1) heller dargestellt als umgebendes Gewebe. Für aussagekräftige Bilder muss das Relaxationsverhalten der zu untersuchenden Körperregion bekannt sein, die richtige Bildgewichtung gewählt und die Messesequenz angepasst werden. Die Relaxationszeiten und die resultierende

Signalstärke variiert mit der Anzahl der Protonen im Messbereich, der Art des Gewebes und der Feldstärke des MR Tomographen.^{1,14}

Tab. 1: T_1 und T_2 Relaxationszeiten verschiedener Gewebearten bei einer Feldstärke von 1,5 T¹⁴

Gewebe	rel. Protonendichte (%)	T_1 (ms)	T_2 (ms)
Liquor	100	> 4000	> 2000
Hirnschubstanz Weiß	70	780	90
Hirnschubstanz Grau	85	920	100
Meningeom	90	400	80
Meningeom Metastase	85	1800	85
Fett	100	260	80

Der Patient ist bei der Messung im MRT keiner Strahlenbelastung ausgesetzt und es sind keine Nebenwirkungen oder Spätfolgen bekannt.^{25,26} MRT Untersuchungen liefern auf Bildern einen sehr guten Weichteilkontrast und werden oft bei Gelenk-, Organverletzungen und zur Untersuchung des Gehirns auf Hirntumore angeordnet.²⁷⁻³⁰ Für die Berechnung und den Aufbau eines Bildes sind meist Sequenzen mit hoher Messzeit nötig. Je nach Auflösung, Größe des Messbereichs und verwendeter Sequenz kann eine Aufnahme mehrere Minuten dauern. Die Sequenzoptimierung zur Verkürzung der Messzeit und zur Verbesserung der Bildqualität zählt zu den aktuellen Forschungsgebieten der MRT.³¹⁻³⁵ Durch die starken Magnetfelder ist es zudem nicht möglich während der Messung metallische Gegenstände wie z.B. Herzschrittmacher zu tragen.

1.2 Kontrastmittel

Beide bildgebende Verfahren verlangen oftmals die Verabreichung von Kontrastmitteln um zwischen unterschiedlichen Gewebearten besser unterscheiden zu können.

1.2.1 CT Kontrastmittel

Oftmals liegen bei Röntgenaufnahmen die Schwächungskoeffizienten von Weichteilgewebearten so dicht beieinander, dass sie aufgrund eines ähnlichen Absorptionsverhaltens von Röntgenstrahlung -und des daraus resultierenden geringen Kontrasts- nicht zu unterscheiden sind.

Iodhaltige chemische Verbindungen sind aufgrund der hohen Ordnungszahl von Iod ($Z_I = 53$) in der Lage Röntgenstrahlung gut zu absorbieren und sind daher als Kontrastmittel für CT Untersuchungen geeignet.^{15,36} Speziell für CT Untersuchungen im Darm kommt auch Barium ($Z_{Ba} = 56$) in Form von Bariumsulfat ($BaSO_4$) zum Einsatz, welches vor der Untersuchung oral oder rektal verabreicht wird. Als negative

Kontrastmittel werden Gase wie Luft oder CO₂ (z.B. bei der CO₂ Angiographie) verwendet, da diese Röntgenstrahlen nicht absorbieren und deshalb auf dem Bild schwarz erscheinen.

Gebräuchliche, intravenös verabreichte Kontrastmittel in der klinischen Anwendung bestehen aus wasserlöslichen, iodhaltigen Derivaten der Benzoesäure (vgl. Tab. 2). Ein weit verbreitetes Kontrastmittel für CT Untersuchungen auf dieser Basis ist Iomeprol.

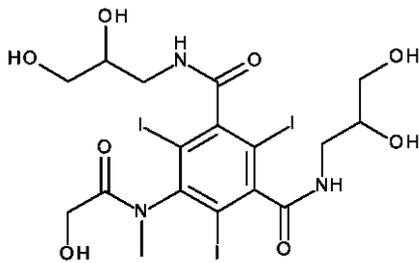


Abb. 3: Strukturformel des kommerziell erhältlichen klinischen Standard CT Kontrastmittels Iomeprol

Neben Iomeprol liefern eine große Bandbreite an kleinen Molekülen, Dimeren und Oligomeren in CT Untersuchungen den gewünschten Kontrast. Diese kleineren chemischen Verbindungen auf molekularer Ebene besitzen durch ihre Nierengängigkeit nur eine kurze Zirkulationszeit im Blut.^{36,37} Zu dem sind bei den kommerziell erhältlichen CT Kontrastmitteln Nebenwirkungen wie z.B. Übelkeit/Erbrechen, Kopfschmerzen, Atemprobleme, Krämpfe, Blutdruckschwankung, Herzrhythmusstörung und allergische Reaktionen wie Juckreiz, Hautausschlag und Schwellungen bekannt. In selteneren, schwerwiegenderen Fällen kann es zur Schwellung des Halses, einem starkem Druckgefühl im Kopf oder zu einer Nephropathie kommen.^{36,38-41}

Tab. 2: Auflistung einiger gängiger CT Kontrastmittel in klinischer Anwendung

Handelsname	DCI	Wirkstoff	Bemerkung
Imeron	Iomeprol	Iod	nicht ionisch, Monomer
Ultravist	Iopromid	Iod	nicht ionisch, Monomer
Xenetix	Iobitridol	Iod	nicht ionisch, Monomer
Visipaque	Iodixanol	Iod	nicht ionisch, Dimer
Hexabrix	Ioxaglinsäure	Iod	ionisch, Dimer
Barilux	Bariumsulfat	Barium	für Magen-Darm-Trakt Untersuchungen

Die Entwicklung neuartiger CT Kontrastmittel soll bei diesen nicht unerheblichen Nachteilen Abhilfe schaffen. Die Verwendung von polymeren Nanopartikeln anstelle von molekularen Verbindungen hat sich über die letzte Dekade als mögliche

Alternative durchgesetzt. Oberflächenmodifizierte Nanopartikel im Größenbereich von 30 - 150 nm haben nach intravenöser Verabreichung eine relativ hohe Zirkulationszeit im Blut.^{36,37,42,43} Ein bedeutendes Beispiel für neuartige CT Kontrastmittel ist das Polymer der Verbindung 2-methacryloyloxyethyl(2,3,5-triiodobenzoat), genannt MAOETIB. PolyMAOETIB besteht aus wasserunlöslichen, iodhaltigen Nanopartikeln, welche nach intravenöser Verabreichung im Blut zirkulieren.

Eine große Zahl an Forschungsgruppen hat mit unterschiedlichen Herangehensweisen polyMAOETIB in zwei verschiedenen Größenbereichen hergestellt. *Mikropartikel* von 0,2 - 200 µm wurden mit Dispersionspolymerisation^{36,44} und Suspensionspolymerisation^{45,46} hergestellt. Galperin et al. synthetisierten polyMAOETIB Partikel mit Dispersionspolymerisation und einer Größe von 0,2 - 1,4 µm.⁴⁴ Diese Partikel wurden hauptsächlich zur Embolisation von Blutgefäßen verwendet und erfolgreich in den Nieren von Kaninchen getestet.⁴⁵ Der Embolisationsprozess konnte im CT bildlich dargestellt werden.

Im Gegensatz zu "großen" Mikropartikeln haben Forschungsgruppen polyMAOETIB *Nanopartikel* mit Emulsionspolymerisation hergestellt. Diese Polymerisationstechnik wurde für polymere Nanopartikel oft verwendet und die polyMAOETIB Partikel konnten in verschiedenen bildgebenden Versuchen Anwendung finden. Galperin et al. stellten z.B. 30 - 350 nm große Nanopartikel her und visualisierten damit verschiedene Organe mit CT in einem Hund.⁴⁷ Aviv et al. synthetisierte 30 - 50 nm Partikel um damit Lebertumoren in Mäusen und Ratten im CT zu untersuchen.⁴⁸

1.2.2 MRT Kontrastmittel

Paramagnetische und Superparamagnetische Verbindungen sind als MRT Kontrastmittel in Verwendung, da sie im Patienten die lokalen Magnetfeldeigenschaften ändern und mit der Magnetisierung der lokalen Protonen wechselwirken.^{15-18,49} Durch diese Wechselwirkung werden sowohl die T₁ als auch T₂ Relaxation beschleunigt und die jeweiligen Relaxationszeiten verkürzt. Intravenös verabreichte Kontrastmittel für klinische MRT Untersuchungen sind hauptsächlich Gadolinium (Gd³⁺)-Komplexe.⁴⁹ Gadolinium selbst ist jedoch durch seine hohe Toxizität bekannt und steht laut neuesten Studien mit Nephrogener Systemischer Fibrose in Verbindung.^{50,51} Da Gadolinium mit 1,08 Å einen ähnlichen Ionendurchmesser wie Calcium (1,14 Å) hat, ist das freie Gadoliniumion (Gd³⁺) ein sehr wirksamer Calciumantagonist. Es blockiert in freier Form von Calcium abhängige Prozesse im Körper wie z.B. die Muskelfunktion, die Zellatmung, die Blutgerinnung oder die Transmission von Nervenimpulsen. Vor einer medizinischen Anwendung ist daher eine Komplexierung des Gadoliniums notwendig. Durch die Bildung eines Metallkomplexes wird das Gd³⁺-Ion stark und spezifisch gebunden und eine Wechselwirkung mit diesen Prozessen verhindert.¹⁴ Eine Vielzahl an Liganden erlaubt neben einer unspezifischen Anwendung von Gadolinium (z.B. DOTA, DTPA) auch eine spezifische Anwendung für zum Beispiel Untersuchungen der Leber (z.B. BOPTA, EOB-DTPA) oder Bloodpool Untersuchungen (MS-325).

Aufgrund der Toxizität von Gadolinium und aufgrund eines gewissen Restrisikos trotz der Komplexierung arbeiten viele Forschungsgruppen an alternativen Kontrastmitteln ohne die genannten Nebeneffekte. Ein Beispiel für solche neuartigen Kontrastmittel sind superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPIONs), welche sich in geringer Anzahl schon in der klinischen Anwendung durchgesetzt haben.

Tab. 3: Liste einiger gängiger MRT Kontrastmittel in klinischer Anwendung

Handelsname	DCI	Wirkstoff	Komplex/ Coating	Kontrast	Bemerkung
Ablavar	Gadofosveset- trinatrium	Gd ³⁺	MS-325 Komplex	T ₁ , T ₂	Bloodpool spezifisch
Gadovist	Gadobutrol	Gd ³⁺	BT-DO3A Komplex	T ₁ , T ₂	unspezifisch
Dotarem	Gadotersäure	Gd ³⁺	DOTA Komplex	T ₁ , T ₂	unspezifisch
Magnevist	Gadopentetat	Gd ³⁺	DTPA Komplex	T ₁ , T ₂	unspezifisch
MultiHance	Gadobenat	Gd ³⁺	BOPTA Komplex	T ₁ , T ₂	Leberspezifisch
Primovist	Gadoxetsäure	Gd ³⁺	EOB-DTPA Komplex	T ₁ , T ₂	Leberspezifisch
Resovist	Ferucarbotran	SPIO	Carboxydextran Coating	T ₁ , T ₂	Leberspezifisch
Endorem	Ferumoxid	SPIO	Dextran Coating	T ₂	Leberspezifisch
Teslascan	Mangafodipir	Mn ²⁺	DPDP Komplex	T ₁	Leberspezifisch

Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel wie Fe₃O₄ werden als alternatives Kontrastmittel für T₂ Untersuchungen verwendet.⁵² Die magnetischen Eigenschaften des zweiwertigen Eisens Fe²⁺ führen lokal zu Feldinhomogenitäten, welche die Dephasierung der Spins und somit die Abnahme der transversalen Magnetisierung bei T₂ Untersuchungen beschleunigt.^{15-18,49}

SPIONs besitzen im Gegensatz zu ferromagnetischen und ferrimagnetischen Eisenverbindungen nur einen Weiss'schen Bezirk. Weiss'sche Bezirke sind Nano- bis Mikrometergroße Bereiche, in denen die magnetischen Momente der Verbindung parallel ausgerichtet sind. Selbst bei großer Partikelzahl besitzen SPIONs keine ferromagnetischen Eigenschaften und es kommt zu keiner Verstärkung eines externen Magnetfelds. Durch geringste thermische Einwirkung kann eine Ausrichtung der magnetischen Momente gestört werden, wodurch das Abschalten eines externen Magnetfeldes zu einer Entmagnetisierung führt.⁵²⁻⁵⁴

Fe₃O₄ Nanopartikel sollten nicht größer als 25 nm sein um superparamagnetische Eigenschaften zu erhalten. Es gibt eine Vielzahl an Herangehensweisen solche Nanopartikel zu synthetisieren. Sol-Gel Prozesse, Aerosol-, Hydrothermische- und Elektrochemische Prozesse haben über die letzten Jahrzehnte an Interesse gewonnen.^{52,55,56} Die klassische Herangehensweise ist eine Fällungsreaktion von Eisenoxid aus zweiwertigen (Fe²⁺) und dreiwertigen (Fe³⁺) Eisensalzen in alkalischer Lösung.^{52,55-62}



Um die generierten Nanopartikel vor Agglomeration zu schützen werden Stabilisatoren verwendet. Der Vorteil einer Fällungsreaktion ist eine relativ kurze Reaktionszeit mit hoher Produktivität. Die Partikelgröße kann durch Änderung der chemischen Parameter und der Reaktionsbedingungen gesteuert werden.

Dieser Herstellprozess ist in der Literatur weit verbreitet. Jiang et al. generierte Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 25 nm durch Erhitzen einer Eisen(II)sulfat/Eisen(III)chlorid in Anwesenheit von Harnstoff und Ammoniumhydroxid. Als Stabilisator wurde Dextran verwendet.⁵⁷

Sun et al. synthetisierte 8 - 20 nm Fe_3O_4 Partikel unter tröpfchenweiser Zugabe von Eisen(II)chlorid/Eisen(III)chlorid in Ammoniak bei stetiger Durchmischung. Die Stabilisatoren waren Natriumoleat und Polyethylenglycol.⁵⁸

Banert et al. stellte Magnetit Nanopartikel durch die Fällung von Eisen(II)sulfat und Eisen(III)chlorid in Ammoniak her. Während der Fällungsreaktion wurde kein Stabilisator verwendet. Die Stabilisierung der generierten Fe_3O_4 Agglomerate ($d = 100 - 500 \text{ nm}$) erfolgte durch die Zugabe einer organischen Lösung aus Dichlormethan und Ölsäure. Die Agglomerate wurden durch die Ölsäure deaggregiert und stabilisiert. Die finale Partikelgröße betrug 10 nm.⁵⁹

Für die kontinuierliche Synthese von Fe_3O_4 Nanopartikeln mit definierter Größe werden Mikroreaktoren verwendet. Mit Hilfe eines coaxialen Mischapparates gewann Hassan et al. Fe_3O_4 Partikel mit einer Größe von 7 nm.⁶⁰ Tetramethylammoniumhydroxid (TMAOH) wurde als alkalisches Fällungsmittel für die Reaktion verwendet. Der Vorteil von TMAOH ist das TMAO^+ Kation, welches nach der Reaktion direkt an die Partikeloberfläche anlagert und als Stabilisator dient, wodurch kein zusätzlicher Stabilisator notwendig ist. Jedoch ist TMAOH hochgiftig für lebende Organismen.

Salazar-Alvatez et al. synthetisierte Partikel mit einer Größe von 2 - 7 nm durch eine Fällungsreaktion mit Hilfe eines Mikroreaktors mit verschiedenen Injektions- und Flussmöglichkeiten. Die Abhängigkeit der Partikelgröße von verschiedenen Reaktionsparametern ist hier sehr gut beschrieben.⁶¹

1.2.3 Duale Kontrastmittel

Die Kombination von CT- und MRT-Kontrastmitteln zu einem dualen Kontrastmittel könnte erhebliche Vorteile mit sich bringen. Im CT kann die Untersuchungsdauer bei Bedarf wesentlich verkürzt werden, welche im MRT relativ lang ist. Die MRT liefert hochauflösende Bilder ohne den Patienten den gesundheitsschädlichen Röntgenstrahlen bei einer CT Untersuchung auszusetzen.^{1,7,25,26} Auch die Stärken bei der bildlichen Darstellung des menschlichen Körpers liegen für beide Verfahren in verschiedenen Bereichen (CT - Lunge/Thorax, Knochen, Tumordiagnose; MRT - Weichteile, Hirntumore).^{1,27-30} Eine unmittelbare Überlagerung der Bilddaten kann zum Beispiel die Diagnose komplexer Gelenkfrakturen oder die Metastasensuche vereinfachen. Die Herstellung dualer CT/MRT Kontrastmittel wurde daher von einigen Arbeitsgruppen untersucht.

40 - 200 μm Core/Shell Mikropartikel bestehend aus einem Kern aus MAOETIB und einer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Hülle wurden von Aviv et al. mit Suspensionspolymerisation

hergestellt. Wie polyMAOETIB Mikropartikel wurden diese Partikel für Embolisationsprozesse verwendet und erfolgreich in der Niere einer Ratte getestet.⁴⁸

Galperin et al. synthetisierte Core/Shell Nanopartikel mit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ als magnetischen Kern und einer röntgendichten MAOETIB Hülle. Eisenoxid mit $d = 15$ nm wurde hier in wässriger Umgebung durch Emulsionspolymerisation von MAOETIB umschlossen. Die finale Partikelgröße betrug 50 - 60 nm.⁶³

Eine weitere Möglichkeit Eisenoxidnanopartikel mit Polymeren zu umschließen ist eine Lösung aus PMMA mit fein dispergiertem Fe_3O_4 und anschließender Sprühtrocknung. Banert et al. generierte mit PMMA umschlossene Fe_3O_4 Nanopartikel mit einer Größe von 15 nm.⁵⁹

Durch die Funktionalisierung von Nanopartikeln für eine gezielte Anreicherung in bestimmtem Körpergewebe ist in den letzten Jahrzehnten ein neues Forschungsgebiet entstanden. Funktionalisierte Nanopartikel können nach intravenöser Verabreichung als Drug Carrier im menschlichen Körper eingesetzt werden. Die Partikel gelangen über Blutbahn an den gewünschten Ort und werden dort gezielt aufgenommen. Mehrere Forschungsgruppen arbeiten an Mikro- und Nanopartikelfunktionalisierung für eine gezielte Verabreichung von Medikamenten, wodurch akkuratere Diagnosen und Therapien mit geringerer Medikamentendosis durchgeführt werden können.^{52,56,64-73}

1.3 Ziel der Arbeit

Medizinische Bildgebungsverfahren bieten eine Vielzahl an Optimierungsmöglichkeiten, wie z.B. die Reduktion der Strahlendosis (CT) und die Verkürzung der Messzeiten (MRT).^{8-12,31-35} Durch eine Kombination der Apparatechnik kann unter Schonung des Patienten das Leistungsvermögen beider Verfahren gesteigert und die Diagnose komplexer Frakturen in Gelenken, Tumorkolonisationen und die Metastasensuche vereinfacht werden.^{1,25-30}

So hat sich über die letzte Dekade auch die Forschung nach neuen Kontrastmitteln für kombinierte CT und MRT Untersuchungen in Form von Nanopartikeln etabliert. Diese Nanopartikel sind für Organismen toxikologisch unbedenklicher als konventionelle Kontrastmittel, zirkulieren über einen längeren Zeitraum im Blut und die Gesundheit des Patienten wird durch Minimierung von Nebenwirkungen und Dosis geschont.^{36-41,50,51} Die Herstellung solcher Kontrastmittel auf Nanopartikelbasis ist mit polyMAOETIB (CT) und Eisenoxid (MRT) sowohl als eigenständige Kontrastmittel als auch in kombinierter Form prinzipiell möglich. Die Wahl eines geeigneten Herstellprozesses und dessen Optimierung soll in dieser Arbeit das Potential dieser neuartigen Kontrastmittel stärken. Die Nanopartikel sollen in ihrer Effizienz mindestens gleichwertig mit dem klinischen Standard sein.

Ziel der Arbeit ist die Herstellung eines dualen CT/MRT Kontrastmittels in Form von Core/Shell Nanopartikeln. Als T_2 Kontrastmittel für MRT Untersuchungen sollen mit einem alkalischen Fällungsprozess superparamagnetische Fe_3O_4 Nanopartikel mit einer einheitlichen Größe von 7 - 10 nm hergestellt werden. Als CT Kontrastmittel sollen quervernetzte polyMAOETIB Nanopartikel mit Mikroemulsionspolymerisation synthetisiert werden. Die Polymernanopartikel sollen in ihrer Größe einheitlich sein.

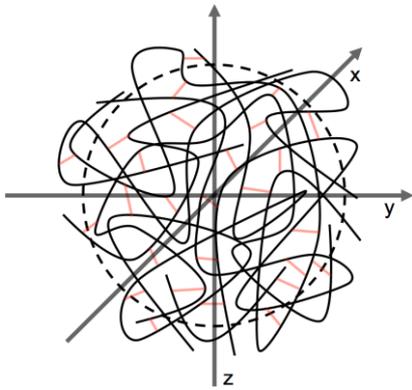


Abb. 4: Schematische Darstellung eines polyMAOETIB Partikels; die Polymerketten (Schwarz) sind mit Ethylenglycoldimethacrylat (rot) quervernetzt und bilden einen sphärischen Nanopartikel

Die Fe_3O_4 Partikel sollen mit Mikroemulsionspolymerisation von polyMAOETIB umschlossen werden um ein duales Kontrastmittel in Form von Core/Shell Nanopartikeln ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MAOETIB}$) zu erhalten. Der Prozess soll eine präzise Steuerung der finalen Partikelgröße im Bereich von 50 - 250 nm erlauben um das Kontrastmittel individuellen Anforderungen anpassen zu können und eine hohe Zirkulationszeit des Kontrastmittels im Blut zu gewährleisten. Die Zusammensetzung der dualen Partikel soll mit Hilfe des $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MAOETIB}$ Verhältnisses variiert und der Kontrast in CT und MRT bildlich dargestellt werden.

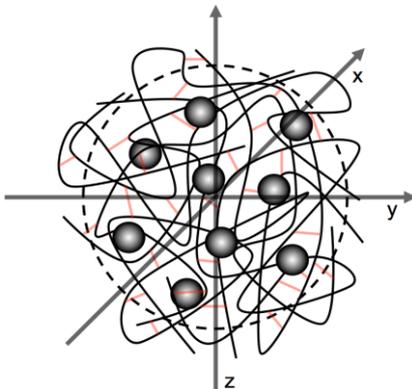


Abb. 5: Schematische Darstellung eines $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MAOETIB}$ Nanopartikels; die Fe_3O_4 Partikel (schwarze Kugeln; $d < 10 \text{ nm}$) sind von den mit Ethylenglycoldimethacrylat (rot) quervernetzten polyMAOETIB Polymerketten (schwarz) umschlossen

Der Gesamtprozess soll mit Hilfe der Reaktionsparameter optimiert werden um eine Weiterverarbeitung zu einem medizinisch anwendbaren dualen Kontrastmittel zu ermöglichen. Die Aufarbeitung der dualen Partikel zu einer stabilen wässrigen Dispersion soll untersucht, optimiert und exemplarisch an Zellen auf Biokompatibilität getestet werden. Eine Funktionalisierung der Partikeloberfläche soll die Modifikation der Partikel für eine gezielte spezifische Aufnahme durch die Zellen, und somit eine Tumorakkumulation der Partikel ermöglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Herstellverfahren

In diesem Kapitel werden die einzelnen Prozesse der Nanopartikelherstellung ausführlich beschrieben.

2.1.1 Entgasung von Wasser

Das für alle die Experimente verwendete VE Wasser wurde vor jedem Prozessschritt mit Argon begast (für 15 Minuten und einem Druck von 1 bar durch eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von $d_i = 1$ mm) um den gelösten Sauerstoff zu desorbieren.

Das Arbeiten in sauerstofffreier Umgebung ist essentiell wichtig für die Stabilität des gesamten Prozesses. Fe_3O_4 neigt in Anwesenheit von Sauerstoff zur Oxidation.⁷⁴ Sauerstoff ist zudem in der Lage Radikale abzufangen, wodurch es zu einem Abbruch der Polymerisationsreaktion kommt.⁷⁵ Zur Sicherstellung einer sauerstofffreien Umgebung im Reaktionssystem wurde experimentell der Sauerstoffgehalt von 100 ml Wasser unter Begasung mit Argon über einen Zeitraum von 15 Minuten ermittelt. Der Sauerstoffgehalt im VE Wasser konnte von 8 mg/l auf 0,1 mg/l reduziert werden. Die Ergebnisse befinden sich im Anhang **A1**.

2.1.2 Fe_3O_4 Nanopartikel Synthese

Salzsäure (HCl) 0,1 mol/l wurde für 15 Minuten mit Argon begast. Eisen(II)chlorid (16,6 mg; 33,3 mmol) und Eisen(III)chlorid (45,1 mg; 66,7 mmol) wurden mit einem molaren $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ Verhältnis von 2:1 in 25 ml HCl gelöst. Die Gesamteisenkonzentration betrug 0,01 mol/l. 10 ml dieser Stammlösung wurden mit einer Spritze über eine PTFE-Leitung ($d_i = 0,17$ mm) bei einer konstanten Flussrate von 2 ml/min unter ständigem Rühren und unter Argonatmosphäre in 10 ml Ammoniaklösung 25 % mit 3 mg/ml Natriumoleat überführt.

Nachdem die $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ Stammlösung in die Ammoniak-/Natriumoleatlösung injiziert war, wurden die Partikel durch Zentrifugieren (10 Minuten, 14000 min^{-1} ; 15500 G) abgetrennt, mit 300 μl Ölsäure versetzt und für 10 Minuten unter Argonatmosphäre auf 100°C erhitzt, um das überschüssige Wasser zu entfernen und den Phasentransfer in die organische Phase durchzuführen. Das Volumen der Ölsäure war mit 300 μl für alle durchgeführten Versuche unabhängig von der darin enthaltenen Eisenoxidmenge konstant, um eine konstante organische Phase bei der Mikroemulsionspolymerisation zu gewährleisten.

2.1.3 polyMAOETIB Nanopartikel Synthese

VE Wasser wurde für 15 Minuten mit Argon begast. Das Tensid wurde in neun Gramm Wasser (500 mmol) gelöst, die Tensidmenge kann je nach gewünschter Partikelgröße variieren. Durch kurzes Erhitzen des Gemischs über ca. 60°C wird der Krafft-Punkt erreicht und das Tensid löst sich unter Bildung von Mizellen vollständig auf. Beim Kühlen auf Raumtemperatur bleiben alle Tensidmoleküle vollständig gelöst.

Zur Herstellung von 1 g hydrophober MAOETIB Monomer Lösung wurden 0,18 g (0,3 mmol) MAOETIB in 0,8 g (8,68 mmol) Toluol gelöst. Zusätzlich wurden 0,02 g (0,1 mmol) EGdiMA als Quervernetzer für das MAOETIB Polymer zugegeben, dies entspricht einer Menge von 10 % w/w bezogen auf MAOETIB. Azobisisobutyronitril (AIBN) wurde im molaren Verhältnis von 1:500 zugegeben; das Verhältnis bezieht sich auf die Einsatzmenge MAOETIB. AIBN 0,0048 g ($5,9 \times 10^{-4}$ mmol) wurde hierzu in 1 ml Toluol gelöst und 20 µl der Lösung zu 1g hydrophober MAOETIB Monomer Lösung pipettiert. Ein Gramm der organischen Toluol/Monomer Lösung wurde zu den 9 g Wasser/Tensid zugegeben.

Anschließend wurde die wässrig/organische Komponentenmischung unter Argonatmosphäre für 5 Minuten mit einem Ultraturrax bei 25000 min^{-1} dispergiert, sodass sich (Toluol/MAOETIB)/Tensid Mizellen in Wasser bildeten. Die Dispersion wurde dann luftdicht unter Argonatmosphäre verschlossen und für 5 Stunden auf 70°C erhitzt.

2.1.4 Fe₃O₄@MAOETIB Nanopartikel Synthese

VE Wasser wurde für 15 Minuten mit Argon begast. Das Tensid wurde in neun Gramm Wasser (500 mmol) gelöst, die Tensidmenge kann je nach gewünschter Partikelgröße variieren. Durch kurzes Erhitzen des Gemischs über ca. 60°C wird der Krafft-Punkt erreicht und das Tensid löst sich unter Bildung von Mizellen vollständig auf. Beim Kühlen auf Raumtemperatur bleiben alle Tensidmoleküle vollständig gelöst.

Zur Herstellung von 1 g hydrophober MAOETIB Monomer Lösung wurden 0,18 g (0,3 mmol) MAOETIB in 0,8 g (8,68 mmol) Toluol gelöst. Zusätzlich wurden 0,02 g (0,1 mmol) EGdiMA als Quervernetzer für das MAOETIB Polymer zugegeben, dies entspricht einer Menge von 10 % w/w bezogen auf MAOETIB. AIBN wurde im molaren Verhältnis von 1:500 zugegeben; das Verhältnis bezieht sich auf die Einsatzmenge MAOETIB. AIBN 0,0048 g ($5,9 \times 10^{-4}$ mmol) wurde hierzu in 1 ml Toluol gelöst und 20 µl der Lösung zu 1g hydrophober MAOETIB Monomer Lösung pipettiert. Der organischen Phase wurden 300 µl Ölsäure + Fe₃O₄ Nanopartikel zugesetzt. 1,3 g der organischen Toluol/Monomer/Fe₃O₄ Lösung wurde zu den 9 g Wasser/Tensid zugegeben.

Anschließend wurde die wässrig/organische Komponentenmischung unter Argonatmosphäre für 5 Minuten mit einem Ultraturrax bei 25000/min dispergiert, sodass sich (Toluol/MAOETIB/Fe₃O₄)/Tensid Mizellen in Wasser bildeten. Die Dispersion wurde dann luftdicht unter Argonatmosphäre verschlossen und für 5 Stunden auf 70°C erhitzt.

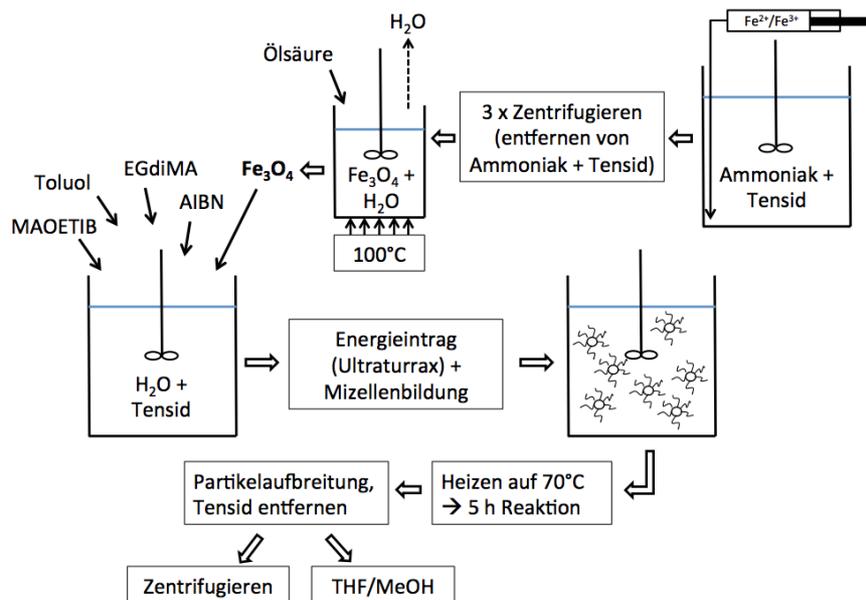


Abb. 6: Schematische Darstellung des Gesamtprozesses (Fe_3O_4 Partikelsynthese und $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Synthese)

2.1.5 Aufbereitung der Polymerpartikel

Nach der Polymerisation gab es zwei Möglichkeiten die Partikel aufzubereiten um das Tensid und Lösungsmittel zu entfernen. Die Partikel konnten einerseits mehrfach zentrifugiert (10 Minuten; 14000 min^{-1} ; 15500 G) und in Wasser redispersiert werden. Alternativ wurden die $0,2 \text{ g}$ polyMAOETIB bzw. $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ in $50\text{-}100 \text{ ml}$ THF gelöst/gequollen, bis keine zweite Phase mehr zu erkennen war. Durch die Zugabe von 200 ml MeOH fallen die gelösten Nanopartikel als große $2 - 5 \mu\text{m}$ Aggregate aus. Die Aggregate der Polymernanopartikel sedimentierten und das in THF/MeOH gelöste Tensid wurde dekantiert. Die sedimentierten Partikel wurden erneut in 50 ml THF gelöst/gequollen und mit einer Vollpipette in 200 ml H₂O gefällt. Nachdem das THF thermisch entfernt wurde, wurden die Partikel mit einem $0,8 \mu\text{m}$ Filter über eine Drucknutsche filtriert. Die gewünschte Partikelkonzentration konnte durch thermisches Entfernen von H₂O erreicht werden. Durch die Zugabe von Salzen wie Natriumchlorid (9 g/l NaCl) oder die Zugabe von Phosphatpuffer (PBS 8 g/l Natriumchlorid, $0,2 \text{ g/l}$ Kaliumdihydrogenphosphat, $1,15 \text{ g/l}$ Dinatriumphosphat, $0,2 \text{ g/l}$ Kaliumchlorid; pH $7,1 - 7,5$) konnte eine isotone Dispersion hergestellt werden.

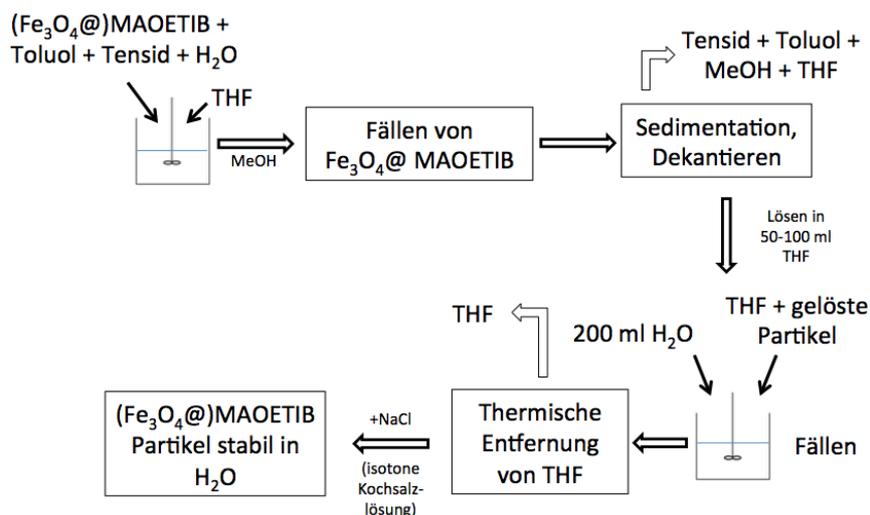


Abb. 7: Schematische Darstellung der Partikelaufbereitung

2.2 Funktionalisierung der $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{MAOETIB}$ Partikel

Zur Funktionalisierung der Partikeloberfläche wurden der organischen Phase 0,1 % w/w (bezogen auf die Monomerkonzentration) des Co-Monomers 2-[(3,4,7)-1,3-dioxo-1,3,3,4,7,7-hexahydro-2H-4,7-epoxyisoindol-2-yl]ethyl-2-methylprop-2-enoate zugegeben. Das Maleimid der Verbindung ist durch eine Furangruppe geschützt. Die Furangruppe konnte nach der Reaktion bzw. nach dem Aufbereitungsprozess aus Kapitel 2.2.2 durch Erhitzen auf 95°C für 60 Minuten abgespalten werden.

Die Partikel wurden nach der Entschützung des Maleimids durch Zugabe des synthetischen Somatostatin Analogon H-Cys-D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-OH (Cystein-Tyr³-Octreotate bzw. Cys-TATE) über eine Thiolgruppe funktionalisiert. Cys-TATE wurde den Partikeln im molaren Verhältnis 1:1 bezogen auf das Co-Monomer zugegeben.

Cys-TATE (0,1 mmol) wurde nach einem Standard Fmoc-basierten Peptidfestphasensyntheseweg mit Hilfe eines für 60 Minuten in DCM (Dichlormethan) gequollenen Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz hergestellt.⁷⁶⁻⁷⁸ 4 eq. der zu koppelnden Aminosäure wurden mit 3.9 eq. HBTU (N,N,N',N'-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uroniumhexafluoro-phosphat) und 4 eq. DIPEA (N,N-diisopropylethylamin) in 2 ml DMF (Dimethylformamid) gelöst und für 2 Minuten aktiviert und danach für 30-40 Minuten dem Harz zur Kopplung der Aminosäure zugesetzt. Nach der Kopplungsreaktion wurde das Harz dreimal mit DMF gewaschen um die überschüssige Aminosäure zu entfernen.

Zur Fmoc Abspaltung wurde das Harz für 7 Minuten mit 2 ml Piperidin:DMF im Verhältnis 1:1 versetzt (1x2 Minuten und 1x5 Minuten).

Die Cyclisierung der fertigen Cys-TATE Peptidsequenz erfolgt durch Zugabe von Tl(III)-trifluoroacetat (4 eq.) gelöst in 2 ml DMF für 45 min. Nach der Cyclisierung wurde die endständige Fmoc-Gruppe abgespalten und Fmoc-Cys(Trt)-OH gekoppelt (Kopplungsbedingungen s.o.). Das Harz mit dem Peptid wurde nun dreimal mit DCM gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte mit 1 ml TFA (Trifluoressigsäure):EDT (1,2-ethandithiol):Anisol im Verhältnis 9:8:2 für eine Stunde. Das Peptid wurde dann in Diethylether gefällt, getrocknet und mit semipräparativer HPLC (Gradient: 15 - 20 % MeCN + 0.1% TFA in 2,2 min) aufgereinigt und nach einer Gefriertrocknung als weißer Feststoff isoliert.

2.3 In Vitro Zellversuche

AR42J Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (ohne HEPES) bei 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit in einer 5 %-igen CO₂ Atmosphäre gezüchtet. Das Medium wurde mit 20 % Fetal Calf Serum (FCS) und 5 % L-Glutamin versetzt. Die gezüchteten Zellen wurden auf vier Wells mit einer Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ Zellen/Well ausgesät.

Vier Fe₃O₄@MAOETIB Stammlösungen mit 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml und 800 µg/ml wurden vorbereitet. Ein Milliliter jeder Stammlösung wurde zum zugehörigen Well zugegeben und die Zellen wurden für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Stammlösungen mit einer Pipette abgezogen und die Zellen dreimal mit einem Milliliter Phosphatpuffer (PBS 8 g/l Natriumchlorid, 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 1,15 g/l Dinatriumphosphat, 0,2 g/l Kaliumchlorid; pH 7,1 - 7,5) gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Milliliter Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 % (w/v) vom Well gelöst, nochmals mit 0,5 ml Trypsin/EDTA nachgespült und in ein 1,5 ml Teströhrchen gegeben (ein Teströhrchen pro Well). Die vier Teströhrchen wurden bei 1500/min zentrifugiert und die Zellen dreimal mit 4 % Formaldehyd gewaschen.

Die Versuche wurden sowohl mit Cys-TATE funktionalisierten, als auch mit unbehandelten Fe₃O₄@MAOETIB Partikeln durchgeführt. Die Experimente wurden insgesamt dreimal wiederholt und die Zellen anschließend für jede Fe₃O₄@MAOETIB Konzentration in einem 1,5 ml Teströhrchen gesammelt um eine angemessene Zellzahl ($4,5 \times 10^5$ Zellen pro Teströhrchen) für die bildliche Darstellung im CT und MRT zu haben.

2.4 Messgeräte zur Charakterisierung der Partikel

Nach der Herstellung wurden die Partikel mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) mit einem Malvern Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments Ltd.; WR14 1XZ Malvern, Vereinigtes Königreich) untersucht. Das Gerät war mit einem 633 nm Laser ausgestattet und der Detektionswinkel des gestreuten Lichts betrug 90°. Für alle Messungen wurde eine rechteckige 10 x 10 mm Glasküvette aus Quarzglas mit vier klaren Seiten verwendet.

Für die Aufreinigung der Partikel wurde eine MPW-251 Zentrifuge (MPW Med. Instruments; 04-373 Warschau, Polen) mit 14000 min^{-1} und dem zugehörigen Rotor MPW 11715 (15500 G) verwendet. Der Rotor fasst 10 x 10 ml Zentrifugenröhrchen mit einem Winkel von 30°.

Die XRD Messungen wurden mit einem Bruker D8 Advance Diffraktometer (Bruker AXS GmbH; 76187 Karlsruhe, Deutschland) von der Firma hte GmbH in Heidelberg durchgeführt. Das Gerät war ausgestattet mit einem Lynxeye XE 1D-Detektor (Parameter - Voltage: 40kV, Current: 40mA; Step size: 0.02°, scan speed 0.2s/step; Soller slits [primary side]: 2.5°; Soller slits [secondary side]: 2.5°; Divergence slit: 0.17°). Die Anode der Röntgenröhre bestand aus Kupfer. Ein Nickel-Filter wurde verwendet um die K_{β} Strahlung zu dämpfen.

Zur bildlichen Darstellung der Core/Shell Partikel wurde das Transmissions-elektronenmikroskop (TEM) Zeiss LIBRA 120 (Carl Zeiss Microscopy GmbH; 07745 Jena, Deutschland) verwendet. Die Messungen wurden am Fraunhofer ICT-IMM in Mainz durchgeführt. Die Elektronenenergie beträgt 120 kV. Zusätzlich wurden die Partikel mit einem Atomic Force Microscope (AFM) MFP-3D Origin (Asylum Research/Oxford Instruments; OX13 5QX Abingdon, Vereinigtes Königreich) abgebildet. Die Resonanzfrequenz der Cantilever betrug 70 kHz mit der Programmeinstellung Intermediate Contact Mode.

CT Bilder wurden mit einem SOMATOM Force Computertomographen (Siemens Healthineers; 91052 Erlangen, Deutschland) im Universitätsklinikum Mannheim aufgenommen. Die Rotationszeit der Röntgenapparatur betrug 1 s^{-1} und die Vorschubgeschwindigkeit des Tisches war auf 0,2 m/s eingestellt. Die MRT Aufnahmen wurden mit einem Magnetom Skyra (Siemens Healthineers; 91052 Erlangen, Deutschland) mit einer Feldstärke von 3 T im Universitätsklinikum Mannheim durchgeführt. Die T_2 Bilder wurden mit einer 2D Spin Echo Sequenz aufgenommen und die Echozeit variiert (Parameter: TR/FA = 5000ms/90°; matrix-size = 128 x 180; FoV = 143 mm x 230 mm; 20 slices, slice thickness 2 mm).

Für die Aufreinigung des Peptids mit HPLC wurde eine Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific; 64293 Darmstadt, Germany) verwendet. Die HPLC war mit einer Chromolith Performance Säule (RP;18e, 100 - 4.6 mm, Merck; 64293 Darmstadt, Deutschland) und einer semipräparativen Chromolith Säule (RP;18e, 100 - 10 mm, Merck; 64293 Darmstadt, Deutschland) ausgestattet und wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 ml/min betrieben. Zur Detektion wurde der Multiple Wavelength Detektor MWD-3000 mit einer Datenerfassungsrate von 100 Hz verwendet.

2.5 Verwendete Chemikalien

Die folgenden Chemikalien sind kommerziell erhältlich und wurden ohne weitere Aufbereitung verwendet.

Tab. 4: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Abkürzung	Reinheit	Hersteller
1,2-Ethandithiol	EDTA	≥98 %	Sigma Aldrich
2-Methacryloyloxyethyl(2,3,5-triiodobenzoat)	MAOETIB	-	Petersen Worms
Acetonitril	MeCN	≥99,9 %	J.T. Baker
Ammoniak	NH ₃	25 %	AppliChem
Anisol	-	≥99 %	Carl Roth
Azobisisobutyronitril	AIBN	98 %	Sigma-Aldrich
Brij 35	-	H ₂ O ≤4 %	Carl Roth
Cetylpyridiniumchlorid	CPC	≥98 %	Carl Roth
Cetyltrimethylammoniumbromid	CTAB	≥98 %	Sigma-Aldrich
Cetyltrimethylammoniumchlorid	CTACl	96 %	Alfa Aesar
Chlorbenzol	-	>99 %	Merck
Dichlormethan	DCM	>99,5 %	Carl Roth
Diethylether	-	99,50%	Acros
Dublecco's Phosphatpuffer	PBS	-	Sigma Aldrich
Eisen-(II)-chlorid Tetrahydrat	Fe ²⁺	≥99 %	Sigma-Aldrich
Eisen-(III)-chlorid Hexahydrat	Fe ³⁺	98,0 - 102 %	Sigma-Aldrich
Ethylenglykoldimethacrylat	EGdiMA	98 %	ABCR
Fmoc-Cys(Acm)-OH	-	≥99 %	Novabiochem
Fmoc-Cys(Trt)-OH	-	≥99 %	Novabiochem
Fmoc-D-Phe-OH	-	≥99 %	Novabiochem
Fmoc-D-Trp(Boc)-OH	-	≥99 %	Novabiochem
Fmoc-Lys(Boc)-OH	-	≥99 %	Novabiochem
Fmoc-Thr(tBU)-OH	-	≥99 %	Novabiochem
Fmoc-Thr(tBu)-Wang	-	≥99 %	Novabiochem
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	-	≥99 %	Novabiochem
Formaldehyd	-	37 %	Carl Roth
N,N-Diisopropylethylamin	DIPEA	99,5 %	Sigma-Aldrich
N,N-Dimethylformamid	DMF	≥99,8 %	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	SDS	>99 %	Bernd Kraft
Natriumoleat	SO	≥99 %	Sigma-Aldrich
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorphosphat	HBTU	>99 %	Carl Roth
Ölsäure	-	≥99 %	Carl Roth
Piperidin	-	≥99,5 %	Carl Roth
Salzsäure	HCl	0,1 mol/l	Carl Roth
Thallium(III)trifluoracetat	-	techn.	Sigma Aldrich
Toluol	-	≥99,5 %	Carl Roth
Trifluoressigsäure	TFA	≥99,9 %	Carl Roth
Trypsin/EDTA	-	0,25%/0,02 % (w/v)	Biochrom
Tween 20	-	H ₂ O ≤3 %	Carl Roth

3 ERGEBNISSE

3.1 Fe₃O₄ Nanopartikelsynthese

Die Eisenoxid Nanopartikel wurden über eine Fällungsreaktion synthetisiert. Eine Fe²⁺/Fe³⁺-Stammlösung wurde über eine Spritzenpumpe bei konstanter Flussrate in ein basisches Fällungsmittel (Ammoniak) unter Bildung von Fe₃O₄ Nanopartikeln injiziert. Anschließend wurden die Partikel dreimal zentrifugiert und in Wasser redispersiert um das Ammoniak und das Tensid zu entfernen. Die gewaschenen Partikel wurden unter Zugabe von Ölsäure in einem Becherglas auf 100°C erhitzt um das Restwasser zu entfernen und die Partikel in die organische Phase zu überführen.

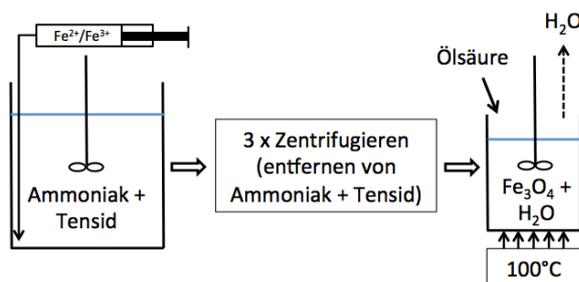


Abb. 8: Schematische Darstellung der Fe₃O₄ Synthese

Nach der Herstellung und vor der Überführung in die organische Phase wurden die Partikeldurchmesser mit dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Der Prozess wurde durch Variation der Reaktionsparameter evaluiert und optimiert.

3.1.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden sechs identische Experimente durchgeführt und die Partikelgrößen mit dynamischer Lichtstreuung gemessen. Die Fe²⁺/Fe³⁺ Konzentration (0,01 mol/l), die Ammoniak Konzentration (25 % w/w) und die Rührergeschwindigkeit (1400/min) waren konstant. Die Einsatzmenge Natriumoleat (SO) wurde für insgesamt zwei Versuchsreihen konstant gehalten bei zwei typischen Konzentrationen von entweder $\gamma_{SO} = 5$ mg/ml oder $\gamma_{SO} = 3$ mg/ml.

Tab. 5: Liste der Versuchsreihen mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen zur Evaluierung der Reproduzierbarkeit der Fe₃O₄ Nanopartikelsynthese.

Versuchsreihe	γ_{SO} [mg/ml]	$C_{Fe^{2+}/Fe^{3+}}$ [mol/l]	N [min ⁻¹]	w_{NH_3} [% w/w]	Anzahl Versuche
1	3	0,01	1400	25	6
2	5	0,01	1400	25	6

Die Größe der Partikel wurde mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Die in Abbildung 9 dargestellten Partikelgrößen sind Mittelwerte aus drei DLS Messungen mit der Standardabweichung der drei ermittelten Partikelgrößen als Fehlerbalken.

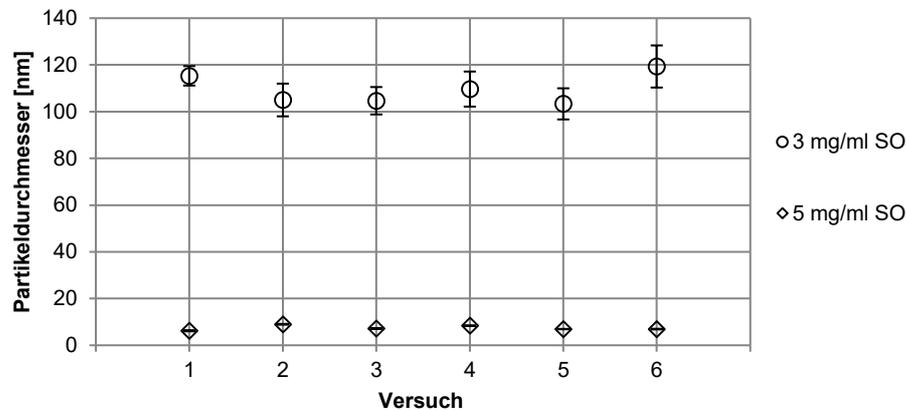


Abb. 9: Partikelgröße von Fe_3O_4 Nanopartikeln aus sechs gleichen Experimenten. Reproduzierbarkeit der Fe_3O_4 Synthese mit $\gamma_{\text{SO}} = 5 \text{ mg/ml}$ und $\gamma_{\text{SO}} = 3 \text{ mg/ml}$ und sonst gleichen Reaktionsbedingungen ($n_{\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}} = 0,01 \text{ mol/l}$; $x_{\text{NH}_3} = 25 \%$; $1400/\text{min}$); die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Für beide Versuchsreihen sind in Abbildung 9 von Versuch 1 - 6 nur geringe Abweichungen der Datenpunkte zu erkennen. Auch die Fehlerbalken sind sehr schmal, aus drei DLS Messungen ergab sich nur eine geringe Abweichung der Partikelgröße. Die gemittelte Partikelgröße aus den sechs Datenpunkten mit $\gamma_{\text{SO}} = 5 \text{ mg/ml}$ betrug $7,4 \text{ nm}$ mit einer Standardabweichung von 1 nm . Für $\gamma_{\text{SO}} = 3 \text{ mg/ml}$ betrug die mittlere Partikelgröße $110 \pm 7 \text{ nm}$. Durch Röntgenbeugungsmessungen (XRD-Messungen) konnte die Synthese von Fe_3O_4 bestätigt und die Bildung von Fe_2O_3 als oxidiertes Nebenprodukt ausgeschlossen werden. Im XRD Spektrum war die kristalline Struktur von Fe_3O_4 mit amorphem Anteil zu erkennen. Das Spektrum befindet sich im Anhang **A2**.

3.1.2 Variation der Stabilisatormenge

Als Stabilisator wurde im Reaktionssystem Natriumoleat (SO) verwendet. Zur Untersuchung des Einflusses der Stabilisatormenge auf die Partikelgröße wurden fünf Experimente mit fünf verschiedenen Natriumoleat Konzentrationen bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Tab. 6: Tabellarische Auflistung der Versuche zur Stabilisatorvariation bei der Fe_3O_4 Synthese mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	γ_{SO} [mg/ml]	$C_{\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}}$ [mol/l]	N [min ⁻¹]	w_{NH_3} [% w/w]
1	1	0,01	1400	25
2	2	0,01	1400	25
3	3	0,01	1400	25
4	4	0,01	1400	25
5	5	0,01	1400	25

Die Partikelgrößen wurden nach der Reaktion mit DLS bestimmt und die Ergebnisse der Versuche sind im Diagramm in Abbildung 10 dargestellt.

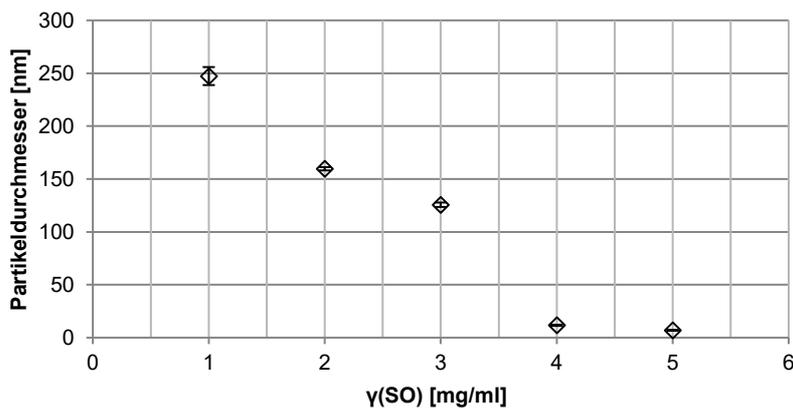


Abb. 10: Partikelgröße von Fe_3O_4 unter Variation der Natriumoleat (SO) Konzentration und sonst gleichen Reaktionsbedingungen ($n_{\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}} = 0,01$ mol/l; $x_{\text{NH}_3} = 25$ %; 1400/min); die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Die Versuche zeigten eine Abhängigkeit der Partikelgröße von der Natriumoleat (SO) Konzentration. Durch das Anheben der Konzentration nahm die Partikelgröße ab. Die Partikelgröße war in den Experimenten von 7 nm bis 246 nm sehr gut variierbar. Zwischen $\gamma_{\text{SO}} = 3$ mg/ml und $\gamma_{\text{SO}} = 4$ mg/ml war ein Sprung in der Partikelgröße zu sehen, hier nimmt die Partikelgröße von 126 nm auf 12 nm ab.

3.1.3 Variation der $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ Gesamteisenkonzentration

Der Einfluss der $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ Konzentration auf die Partikelgröße wurde mit Hilfe von fünf Experimenten untersucht. Das molare Verhältnis wurde für alle Experimente konstant gehalten bei 2:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) und die Gesamteisenkonzentration wurde bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen mit fünf verschiedenen Konzentrationen variiert. Die Partikelgröße wurde mit DLS nach der Reaktion bestimmt.

Tab. 7: Tabellarische Auflistung der Versuche zur Variation der $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ Gesamteisenkonzentration bei der Fe_3O_4 Synthese mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	γ_{SO} [mg/ml]	$c_{\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}}$ [mol/l]	N [min ⁻¹]	w_{NH_3} [% w/w]
1	5	0,005	1400	25
2	5	0,01	1400	25
3	5	0,02	1400	25
4	5	0,03	1400	25
5	5	0,04	1400	25

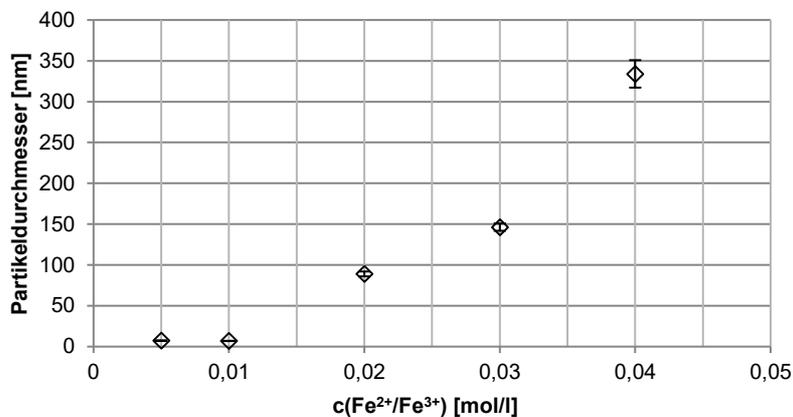


Abb. 11: Partikelgröße von Fe_3O_4 unter Variation der $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ Stammkonzentration mit sonst gleichen Reaktionsbedingungen ($\gamma_{\text{SO}} = 5$ mg/ml; $x_{\text{NH}_3} = 25$ %; 1400/min); die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

In Abbildung 11 ist die mit DLS gemessene Partikelgröße der Fe_3O_4 Partikel in Abhängigkeit der $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ Stammkonzentration dargestellt. Die Partikelgröße nahm mit zunehmender Stammkonzentration zu. Bei niedrigen $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ Konzentrationen $\leq 0,01$ mol/l bildeten sich Nanopartikel mit $d = 7$ nm. Von 0,01 mol/l auf 0,02 mol/l stieg die gemessene Partikelgröße sprunghaft von 7 nm auf 89 nm an. Eine stetige Erhöhung der Konzentration auf maximal 0,04 mol/l hatte einen Anstieg der Partikelgröße bis zu 330 nm zur Folge.

3.1.4 Variation der Rührergeschwindigkeit

Ein weiterer Parameter zur Optimierung des Prozesses der Fe_3O_4 Nanopartikelsynthese war die Rührergeschwindigkeit. Die Fällungsreaktion wurde in fünf Versuchen bei verschiedenen Rührerdrehzahlen und sonst gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Partikel wurden nach der Herstellung mit DLS untersucht.

Tab. 8: Tabellarische Auflistung der Versuche zur Variation der Rührergeschwindigkeit bei der Fe_3O_4 Synthese mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	γ_{SO} [mg/ml]	$C_{\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}}$ [mol/l]	N [min^{-1}]	w_{NH_3} [% w/w]
1	5	0,01	600	25
2	5	0,01	800	25
3	5	0,01	1000	25
4	5	0,01	1200	25
5	5	0,01	1400	25

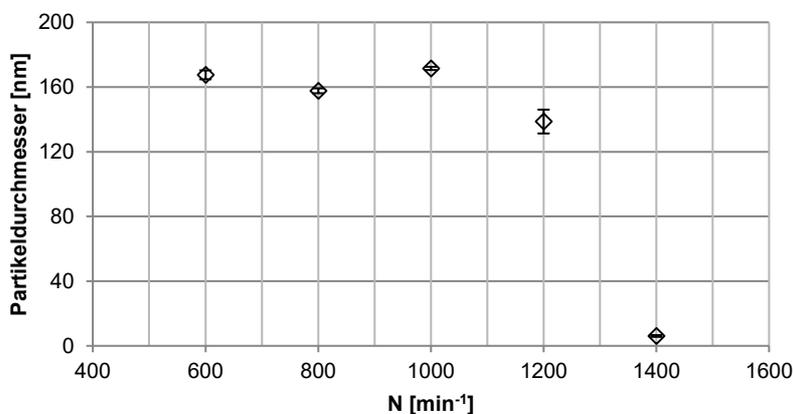


Abb. 12: Partikelgröße von Fe_3O_4 unter Variation der Rührergeschwindigkeit bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen ($\gamma_{\text{SO}} = 5 \text{ mg/ml}$; $n_{\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}} = 0,01 \text{ mol/l}$; $x_{\text{NH}_3} = 25 \%$); die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Abbildung 12 zeigt die Abhängigkeit der Partikelgröße von der Rührergeschwindigkeit. Die Partikelgröße erstreckte sich insgesamt von 6 nm bis 171 nm. Eine Reduktion der maximalen Rührerdrehzahl (1400 min^{-1}) auf 1200 min^{-1} hatte durch die verminderte Durchmischung einen signifikanten Anstieg der Partikelgröße von 6 nm auf 139 nm zur Folge. Bei weiterer Reduktion der Rührergeschwindigkeit änderte sich die Partikelgröße nur unwesentlich und es ist kein eindeutiger Trend zu erkennen.

3.2 polyMAOETIB Nanopartikelsynthese

In Kapitel 3.2 sind die Ergebnisse für die Herstellung von polyMAOETIB Nanopartikeln mit Mikroemulsionspolymerisation und ohne die Zugabe von Fe_3O_4 beschrieben. Das MAOETIB Monomer, der Quervernetzer Ethylenglycoldimethacrylat (EGdiMA) und der Radikalstarter Azobisisobutyronitril (AIBN) wurden zusammen mit dem organischen Lösungsmittel Toluol mit Hilfe eines Tensids in Wasser unter Bildung von Mizellen fein dispergiert und in den Mizellen bei einer Temperatur von 70°C die radikalische Polymerisationsreaktion durchgeführt. Nach der Reaktion wurden die Partikel aufbereitet und die Partikelgröße mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Die Partikelaufbereitung ist in einem separaten Kapitel beschrieben (vgl. Abb. 21, Kapitel 3.2.5).

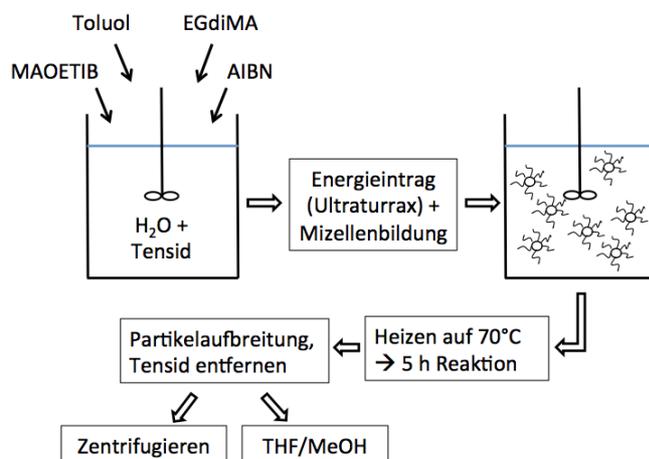


Abb. 13: Schematische Darstellung der polyMAOETIB Synthese ohne Fe_3O_4 . Die Partikel wurden nach dem Aufbereitungsprozess mit THF/MeOH (siehe Kapitel 2.1.4) mit dynamischer Lichtstreuung vermessen. Es wurde die Tauglichkeit verschiedener Tenside für die Reaktion überprüft. Die Reaktionsparameter wurden systematisch variiert und der Prozess optimiert.

3.2.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war essentiell für einen stabilen Polymerisationsprozess. Es wurden hierzu die Partikelgrößen von fünf identischen Versuchen nach der Partikelaufbereitung mit DLS analysiert und verglichen. Als Tensid wurde Natriumoleat (SO) verwendet, die Konzentration war in zwei Versuchsreihen bei entweder $X_{\text{SO}} = 0,06$ oder $X_{\text{SO}} = 0,11$ konstant ($X = m_{\text{Tensid}}/m_{\text{H}_2\text{O}}$).

Tab. 9: Liste der Versuchsreihen mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen zur Evaluierung der Reproduzierbarkeit der polyMAOETIB Synthese.

Versuchsreihe	X_{SO} [g/g]	AIBN/ Monomer	T [°C]	N [min ⁻¹]	t_{Disp} [min]	Anzahl Versuche
1	0,06	1:500	70	25000	5	5
2	0,11	1:500	70	25000	5	5

Die Größe der Partikel wurde mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Die in Abbildung 14 dargestellten Partikelgrößen sind Mittelwerte aus drei DLS Messungen mit der Standardabweichung der drei ermittelten Partikelgrößen als Fehlerbalken.

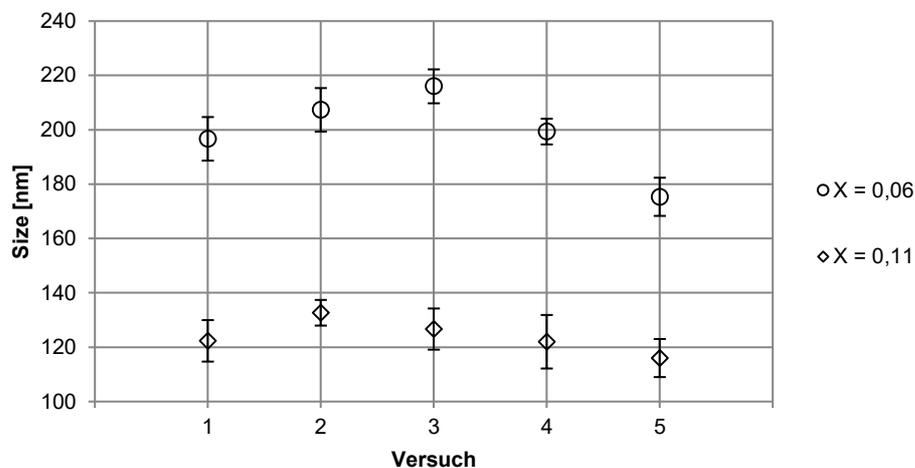


Abb. 14: Partikelgröße von polyMAOETIB Nanopartikeln aus fünf gleichen Experimenten mit Natriumoleat als Tensid. Reproduzierbarkeit der polyMAOETIB Synthese mit $X_{SO} = 0,06$ und $X_{SO} = 0,11$; AIBN/Monomer Verhältnis 1:500, Reaktionstemperatur 70°C; die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Die Datenpunkte in Abbildung 14 weichen von Versuch 1 - 5 für beide Tensidbeladungen nur geringfügig voneinander ab. Die Fehlerbalken sind für jeden der Datenpunkte sehr schmal, da sich die gemessenen Partikelgrößen aus drei DLS Messungen nur geringfügig unterschieden. Bei einer Beladung von $X_{SO} = 0,06$ waren die kleinsten Partikel 175 nm und die größten Partikel 216 nm groß. Die mittlere Partikelgröße aus den fünf Datenpunkten mit $X_{SO} = 0,06$ betrug 199 ± 5 nm. Für eine Tensidbeladung von $X_{SO} = 0,11$ lag die kleinste Partikelgröße bei 116 nm und die größten Partikel waren 133 nm groß. Die mittlere Partikelgröße lag für $X_{SO} = 0,11$ bei 124 ± 6 nm.

3.2.2 Variation der Tensidmenge und der Tensidart

Es wurden fünf verschiedene Tenside auf Tauglichkeit für den Mikroemulsionspolymerisationsprozess geprüft und die Tensidbeladung X ($X = m_{\text{Tensid}}/m_{\text{H}_2\text{O}}$) variiert, um den Einfluss auf die Partikelgröße zu untersuchen. Als kationische Tenside wurden Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTACl) und Cetylpyridiniumchlorid (CPC) verwendet. Die anionischen Tenside waren Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natriumoleat (SO). Die Reaktionen wurden mit einem molaren Initiator:Monomer Verhältnis von 1:500 und 1:1000 (bezogen auf das MAOETIB Monomer) durchgeführt.

Tab. 10: Tabellarische Auflistung der Versuche zur Variation der Tensidmenge bei der Herstellung von polyMAOETIB mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	X_{Tensid} [g/g]	AIBN/ Monomer	T [°C]	N [min ⁻¹]	t_{Disp} [min]
1	0,06	1:500	70	25000	5
2	0,083	1:500	70	25000	5
3	0,11	1:500	70	25000	5
4	0,16	1:500	70	25000	5
5	0,22	1:500	70	25000	5
6	0,06	1:1000	70	25000	5
7	0,083	1:1000	70	25000	5
8	0,11	1:1000	70	25000	5
9	0,16	1:1000	70	25000	5
10	0,22	1:1000	70	25000	5

Die fertigen Polymerpartikel wurden mit THF/MeOH aufbereitet (vgl. Kapitel 2.1.4) und anschließend die Partikelgrößen mit DLS bestimmt. Die Ergebnisse der Versuche sind in den Diagrammen in Abbildung 15 (a) und (b) dargestellt.

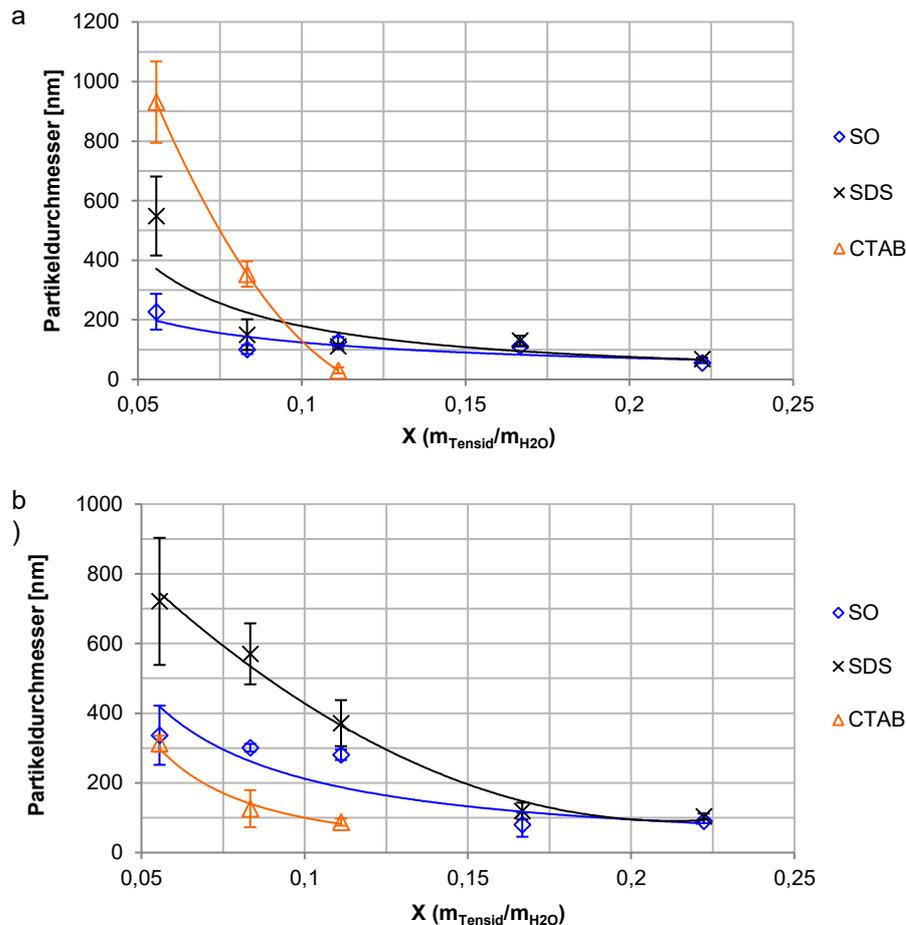


Abb. 15: (a) Partikelgrößen (DLS) von polyMAOETIB unter Variation der Tensidart und -menge mit Trendlinien (polynomisch); molares AIBN/Monomer Verhältnis 1:500 (b) Partikelgrößen (DLS) von polyMAOETIB unter Variation der Tensidart und -menge mit Trendlinien (polynomisch); molares AIBN/Monomer Verhältnis 1:1000; Reaktionstemperatur 70 °C; die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Durch die Versuche konnten Partikel im Größenbereich zwischen 30 - 930 nm hergestellt werden (Abb. 15 a). Die Größenbereiche der einzelnen Tenside erstreckten sich von 56 - 230 nm für SO, von 69 - 550 nm für SDS und von 30 - 930 nm für CTAB. Die kleinsten Partikel ($d = 30$ nm) wurden mit $X_{CTAB} = 0,11$ gewonnen. Bei Verringerung des AIBN/Monomer Verhältnisses von 1:500 auf 1:1000 in Abbildung 15 (b) erstreckten sich die erhaltenen Partikelgrößen insgesamt von 80 - 720 nm. Die Partikelgrößen lagen in den Bereichen von 80 - 340 nm für SO, von 104 - 720 nm für SDS und von 90 - 310 nm für CTAB. Die kleinsten Partikel mit 79 nm entstanden bei $X_{SO} = 0,16$.

Beim Vergleich beider Diagramme (a) und (b) resultierte unabhängig von der Tensidart und des AIBN/Monomer Verhältnisses aus einer höheren Tensidmenge eine kleinere Partikelgröße. Die Tensidart beeinflusste eher den Trend der Kurven, gerade bei geringen Tensidmengen im Reaktionssystem ($X = 0,06$) ist ein deutlicher Größenunterschied der Partikel zu erkennen. Bei einem AIBN/Monomer Verhältnis von 1:1000 waren die Partikel tendenziell kleiner.

Für sehr kleine Tensidmengen ($X = 0,06$) ergaben sich die größten absoluten Fehlerbalken. Bei Tensidmengen $< 0,06$ entstanden bei der Synthese keine

Nanopartikel sondern polydisperse Partikel im Mikrometerbereich. Zu große Tensidmengen $> 0,22$ führten dazu, dass die Mikroemulsion durch die hohe Viskosität nichtmehr rührbar war. Daher ist der Prozess auf Tensidmengen von maximal $X = 0,22$ limitiert.

Ebenso war es mit den kationischen Tensiden CTACI und CPC nicht möglich Nanopartikel zu synthetisieren. Die Partikelgrößen befanden sich hier im unteren μm Bereich. Größere Mengen an CTAB ($X_{\text{CTAB}} > 0,11$) resultierte in gel-ähnlichen Produkten, welche mit DLS nicht mehr analysiert und in weiteren Prozessschritten nicht mehr verwendet werden konnten.

Abbildung 16 zeigt zwei typische von der DLS Software berechnete Partikelgrößenverteilungen von polyMAOETIB synthetisiert mit einer Tensidbeladung von $X_{\text{SO}} = 0,11$ und $X_{\text{SO}} = 0,16$.

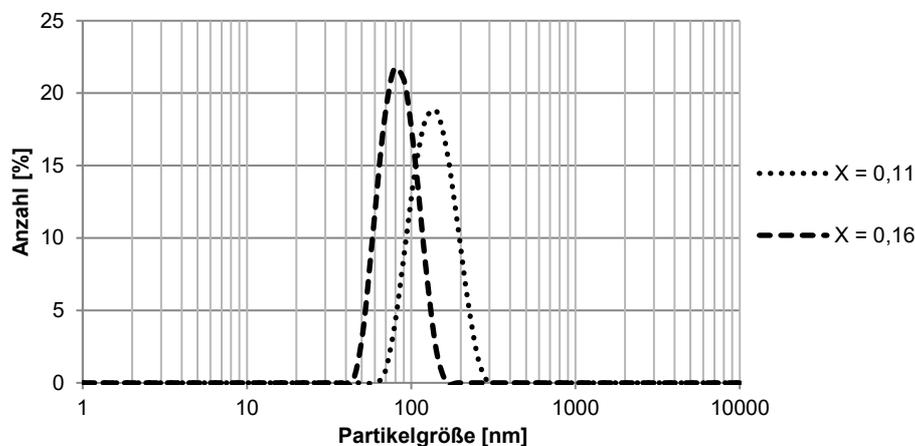


Abb. 16: Partikelgrößenverteilungen von polyMAOETIB synthetisiert mit $X_{\text{SO}} = 0,11$ ($d_{\text{DLS}} = 131 \text{ nm}$) und $X_{\text{SO}} = 0,16$ ($d_{\text{DLS}} = 81 \text{ nm}$)

Bei einer Tensidbeladung von $X_{\text{SO}} = 0,11$ ergab sich durch die DLS Messungen eine Partikelgröße von 131 nm mit einer Halbwertsbreite des Peaks von 108 nm. Bei einer Tensidbeladung von $X_{\text{SO}} = 0,16$ wurde die Partikelgröße zu 81 nm bestimmt, die Halbwertsbreite des Peaks beträgt 57 nm. In beiden Fällen handelt es sich in Abbildung 16 um monomodale Verteilungen. Die Partikelgrößenverteilungen sind repräsentativ für polyMAOETIB Nanopartikel, welche mit Mikroemulsionspolymerisation hergestellt wurden.

3.2.3 Untersuchung weiterer Prozessparameter

Als Prozessparameter zusätzlich zu den Tensiden wurden die Reaktionstemperatur, die Dispersionsintensität und die Dispersionszeit untersucht.

Die Polymerisation wurde bei Temperaturen von 50 - 70 °C durchgeführt. Die Partikel wurden nach der Partikelauflösung mit DLS gemessen.

Tab. 11: Tabellarische Auflistung der Versuche zur Variation der Temperatur bei der Polymerisation von polyMAOETIB mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	X_{SO} [g/g]	AIBN/ Monomer	T [°C]	N [min ⁻¹]	t_{Disp} [min]
1	0,11	1:500	50	25000	5
2	0,11	1:500	60	25000	5
3	0,11	1:500	70	25000	5

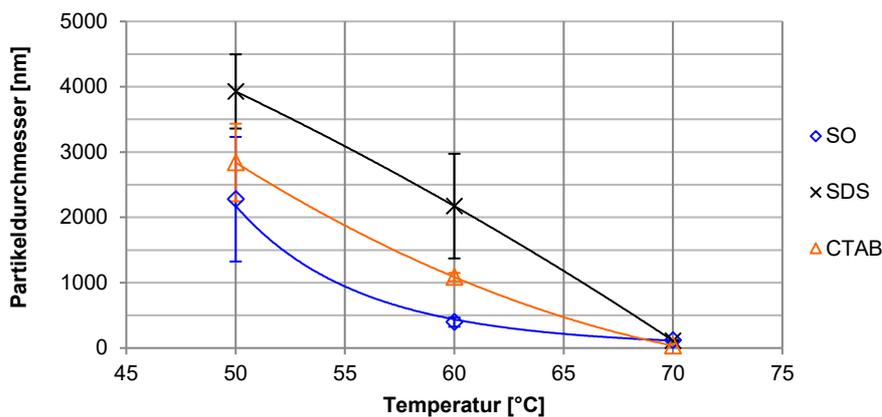


Abb. 17: Partikelgrößen von polyMAOETIB mit Trendlinien (polynomisch) bei verschiedenen Reaktionstemperaturen mit $X_{SO} = 0,11$ und molarem AIBN/Monomer Verhältnis 1:500; die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Die Partikelgröße stieg bei Herabsenken der Reaktionstemperatur von 70°C auf 50°C insgesamt von 35 nm auf 4261 nm an. Die Partikelgröße bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C variierte je nach Tensid zwischen 2279 - 4261 nm. Bei einer Reaktionstemperatur von 60°C erstreckte sich die Partikelgröße insgesamt von 397 - 2713 nm und es ließen sich lediglich mit Natriumoleat Partikel im Nanometerbereich herstellen ($d = 397$ nm). Bei einer Reaktionstemperatur von 70°C entstanden mit allen Tensiden Nanopartikel im gewünschten Größenbereich von 35 - 119 nm.

Zusätzlich zur Temperatur wurde der Einfluss der Dispersionsintensität und der Dispersionszeit auf das Reaktionssystem untersucht. Die Partikelgrößen wurden nach der Aufbereitung mit DLS gemessen. Als Tensid für die Versuche wurde Natriumoleat mit einer Tensidbeladung von $X_{SO} = 0,11$ verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

Tab. 12: Tabellarische Auflistung der Versuche zur Variation der Dispersionsintensität/-zeit bei der Herstellung von polyMAOETIB mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	X _{so} [g/g]	AIBN/ Monomer	T [°C]	N [min ⁻¹]	t _{Disp} [s]
1	0,11	1:500	70	5000	600
2	0,11	1:500	70	10000	600
3	0,11	1:500	70	15000	600
4	0,11	1:500	70	20000	600
5	0,11	1:500	70	25000	600
6	0,11	1:500	70	25000	10
7	0,11	1:500	70	25000	30
8	0,11	1:500	70	25000	60
9	0,11	1:500	70	25000	300
10	0,11	1:500	70	25000	600

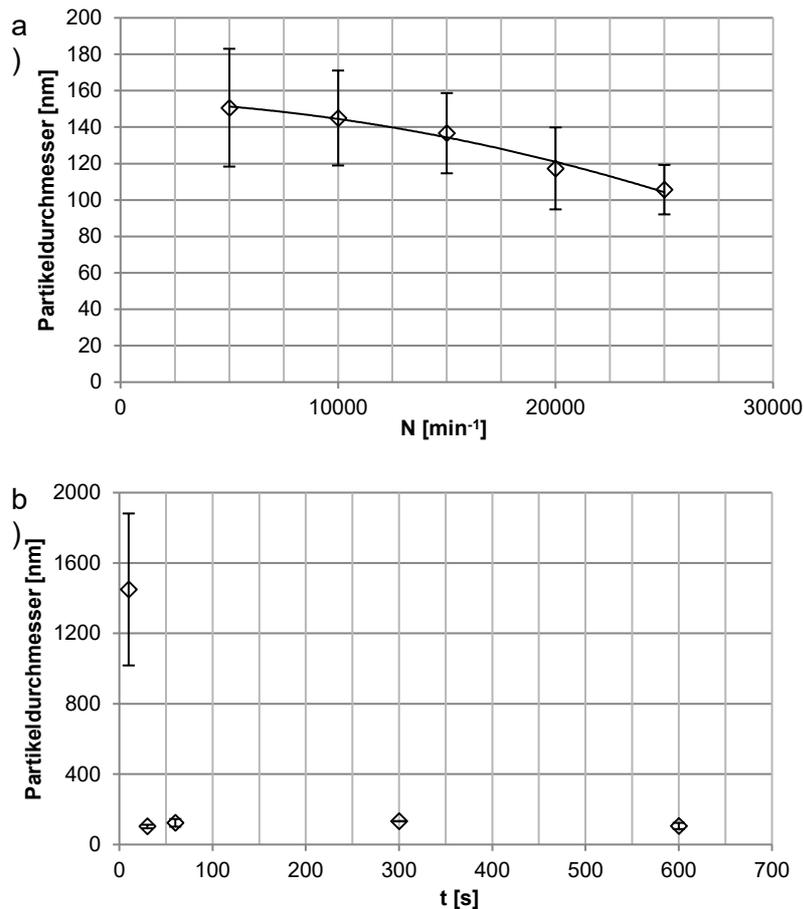


Abb. 18: (a) Partikelgrößen von polyMAOETIB mit Trendlinie (polynomisch) unter Variation der Ultraturax Drehzahl; Synthesebedingungen: $X_{SO} = 0,11$ und AIBN/Monomer Verhältnis 1:500, Reaktionstemperatur 70°C (b) Partikelgröße von polyMAOETIB unter Variation der Dispergierzeit bei einer Drehzahl von 25000 min⁻¹; Synthesebedingungen: $X_{SO} = 0,11$ und AIBN/Monomer Verhältnis 1:500, Reaktionstemperatur 70°C; die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Die Partikelgröße konnte in den Experimenten mit Hilfe der Dispersionsintensität variiert werden (vgl. Abb. 18 a). Der Trend der Datenpunkte zeigt, dass mit größeren Dispersionsintensitäten kleinere Partikel mit engeren Fehlerbalken entstanden. Bei Dispersionsintensitäten zwischen 5000 - 25000 min⁻¹ variierte die Partikelgröße von 106 - 151 nm.

Die Ergebnisse in Abbildung 18 (b) zeigen die Abhängigkeit der Partikelgröße von der Dispersionszeit. Wurde die Dispersionszeit bei einer konstanten Drehzahl von 25000 min⁻¹ mit 10 Sekunden sehr gering gehalten nahm die Partikelgröße von ca. 100 nm auf 1450 nm mit sehr breiten Fehlerbalken zu. Bei Dispersionszeiten ≥ 30 Sekunden änderte sich die Partikelgröße nicht mehr und es ist kein zeitlicher Trend zu erkennen.

3.2.4 Alternative Einsatzstoffe

Zusätzlich zu den bereits verwendeten Edukten wurden weitere Tenside (Tween 20, Brij 35) und ein alternatives Lösungsmittel (Chlorbenzol) auf Tauglichkeit für den Polymerisationsprozess untersucht.

Für einen biokompatiblen Herstellprozess wurden neben Natriumoleat die Tenside Tween 20 und Brij 35 zur Polymerisation von polyMAOETIB verwendet (Lösungsmittel: Toluol, wie in Kapitel 3.2.2). Beide Tenside sind nicht ionisch. Die Versuchsbedingungen waren hier dieselben wie in Kapitel 3.2.2, die Partikelgröße wurde nach der Partikelauflösung mit DLS bestimmt.

Tab. 13: Tabellarische Auflistung der Versuche zur Variation der Tensidmenge bei der Herstellung von polyMAOETIB mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	X_{SO} [g/g]	AIBN/ Monomer	T [°C]	N [min ⁻¹]	t_{Disp} [min]
1	0,06	1:500	70	25000	5
2	0,083	1:500	70	25000	5
3	0,11	1:500	70	25000	5
4	0,16	1:500	70	25000	5
5	0,22	1:500	70	25000	5

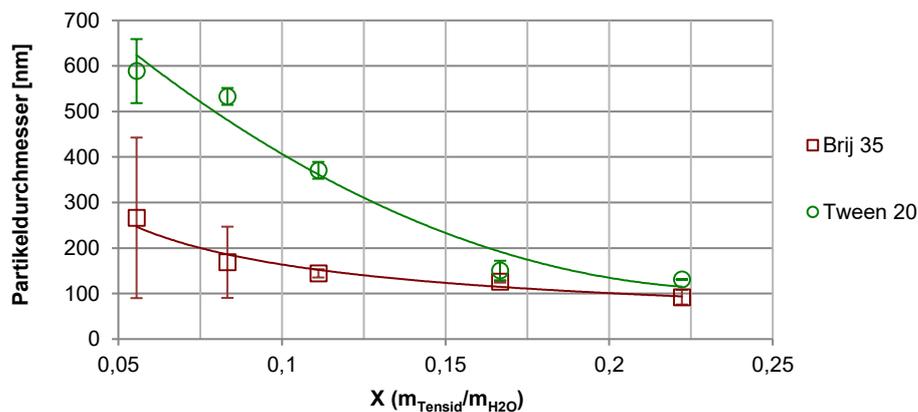


Abb. 19: Partikelgrößen (DLS) von polyMAOETIB unter Variation der Tensidart und -menge mit Trendlinien (polynomisch); Versuche mit biokompatiblen Tensiden Tween 20 und Brij 35 mit Toluol als Lösungsmittel; molares AIBN/Monomer Verhältnis 1:500; Reaktionstemperatur 70°C; die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Die Versuche zeigten analog zu den Experimenten aus Kapitel 3.2.2, dass aus einer höheren Tensidmenge kleinere Polymernanopartikel resultierten. Die Partikelgröße erstreckt sich in Abbildung 19 insgesamt von 92 - 589 nm. Mit Tween 20 ließ sich die

Partikelgröße von 131 - 589 nm und für Brij 35 von 92 - 266 nm steuern. Der Trend der Datenpunkte in Abbildung 19 ist ähnlich wie in Abbildung 15 (b) eher linear, wobei das Größenspektrum von Brij 35 kleiner ist als das von Tween 20. Die Fehlerbalken für $X = 0,06$ sind im Vergleich zu den anderen Versuchen relativ groß. Unterhalb dieser Tensidmenge war es nicht möglich Nanopartikel zu synthetisieren. Aus vergleichbaren Gründen wie in Kapitel 3.2.2 konnte der Prozess mit Tensidmengen $> 0,22$ nicht durchgeführt werden, da die Mikroemulsion aufgrund der hohen Viskosität nicht mehr rührbar war.

Als alternatives Lösungsmittel zu Toluol wurde bei der Mikroemulsionspolymerisation Chlorbenzol verwendet, um polyMAOETIB Nanopartikel herzustellen. Der Einfluss des Lösungsmittels auf den Prozess wurde unter Variation der Tensidart und -menge untersucht. Die verwendeten Tenside waren bei den Versuchen dieselben wie in Kapitel 3.2.2, die Partikel wurden nach der Herstellung aufbereitet und die Partikelgröße mit DLS gemessen.

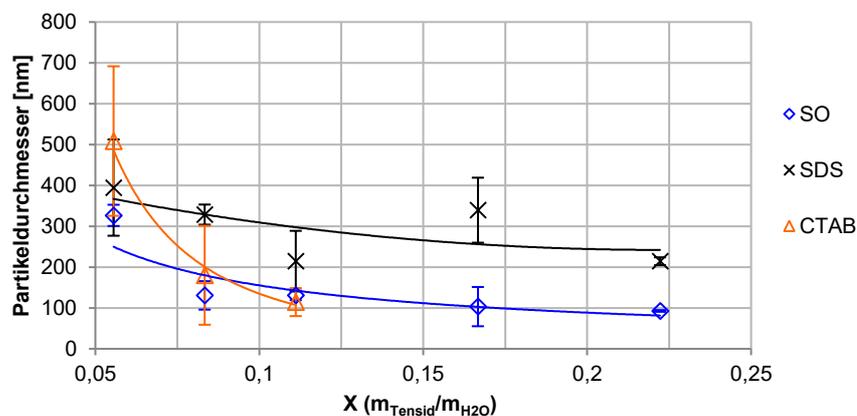


Abb. 20: Partikelgrößen (DLS) von polyMAOETIB unter Variation der Tensidart und -menge mit dem alternativen Lösungsmittel Chlorbenzol mit Trendlinien (polynomisch); molares AIBN/Monomer Verhältnis 1:500; Reaktionstemperatur 70°C; die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Die Partikelgröße erstreckte sich bei den Versuchen insgesamt von 93 nm bis 509 nm. Für die einzelnen Tenside erstreckte sich die Größe von 93 - 325 nm für SO, 215 - 395 nm für SDS und 114 - 509 nm für CTAB. Die kleinsten Partikel entstanden mit Natriumoleat bei $X_{SO} = 0,22$ mit einer Größe von 93 nm. Insgesamt war das Größenfenster etwas kleiner als bei den Experimenten mit Toluol als Lösungsmittel (vgl. Abb. 15 a, Kapitel 3.2.2).

Wie in Kapitel 3.2.2 war es mit den Tensiden CTACI und CPC nicht möglich Nanopartikel zu synthetisieren und größere Mengen an CTAB ($X_{CTAB} > 0,11$) resultierten in Gel-Ähnlichen Produkten und der Prozess konnte bei diesen Tensidmengen nicht durchgeführt werden.

3.2.5 Partikelaufbereitung

Die Partikelaufbereitung ist ein wichtiger Prozessschritt zur Entfernung der großen Mengen an Tensid und organischem Lösungsmittel und dient dem Einstellen physiologischer Bedingungen für die weitere Anwendung der Partikel als Kontrastmittel. Die Partikel wurden hierzu in Tetrahydrofuran (THF) gelöst bzw. gequollen und danach in Methanol (MeOH) gefällt. Das Tensid und das Lösungsmittel blieben nach dem Fällen der Partikel in THF/MeOH gelöst und beide Stoffe konnten nach der Sedimentation der Partikel zusammen mit THF/MeOH dekantiert werden. Im letzten Prozessschritt wurden die Partikel nicht mehr in MeOH sondern in H₂O gefällt und das überschüssige THF wurde thermisch entfernt. Während des Aufbereitungsvorganges änderte sich die Partikelgröße bei jedem Prozessschritt. Abbildung 21 zeigt die schematische Darstellung der Partikelaufbereitung mit zugehörigen Partikelgrößen (DLS) während der einzelnen Prozessschritte.

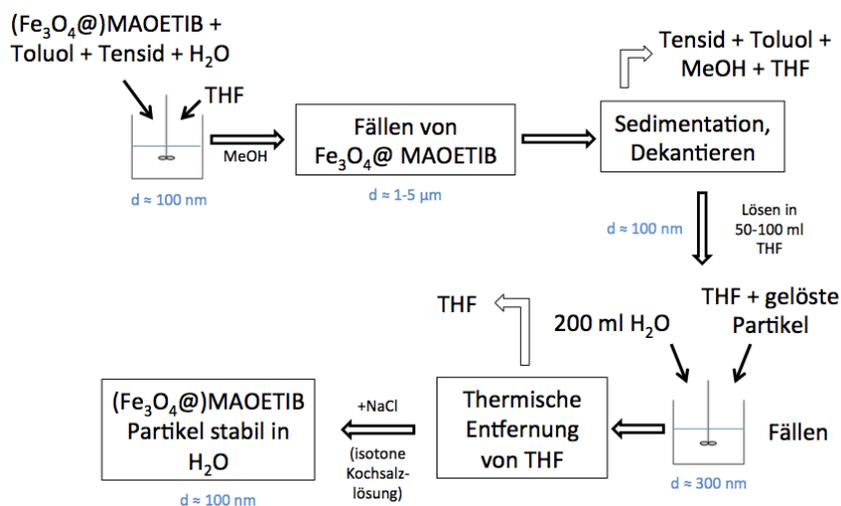


Abb. 21: Schematische Darstellung der Partikelaufbereitung mit zugehörigen Partikelgrößen (DLS) für jeden Prozessschritt

Die Partikelgrößen in Abbildung 21 während der einzelnen Prozessschritte sind exemplarisch und variierten mit der Tensidmenge im Reaktionssystem. Zur Verdeutlichung der Größenänderungen wurde ein Ansatz mit $X_{\text{SO}} = 0,11$ genauer untersucht. Die Partikel wurden zwischen den einzelnen Prozessschritten der Aufbereitung mit DLS analysiert. Die gemessenen Partikelgrößen sind in Abbildung 22 dargestellt.

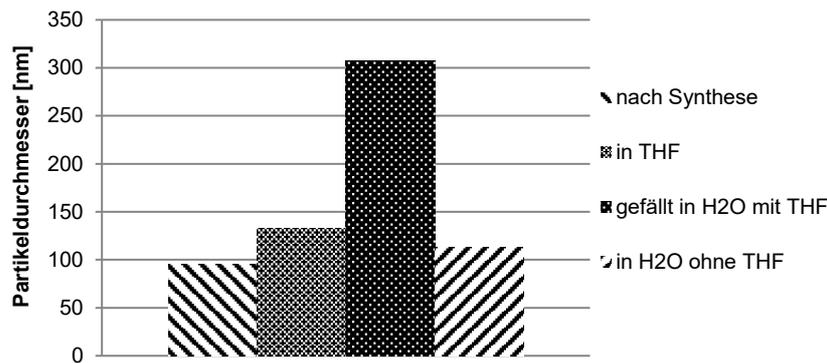


Abb. 22: Partikelgröße von polyMAOETIB während des Aufbereitungsverfahrens mit $X_{SO} = 0,11$ und einem AIBN/Monomer Verhältnis von 1:500, Reaktionstemperatur 70°C

Die Partikelgröße nach der Reaktion betrug 94 nm. Die quervernetzten Nanopartikel quollen beim Lösen in THF leicht und die Partikelgröße stieg auf 132 nm an. Durch Fällen der Partikel in Wasser stieg die Partikelgröße weiter auf 306 nm an und nach thermischer Abtrennung von THF betrug die finale Partikelgröße 113 nm. Beim Vergleich der DLS Messungen vor und nach der Partikelaufbereitung ergab sich eine Partikelgrößendifferenz von 19 nm. Die Partikel waren nun einige Wochen stabil in H₂O ohne zu agglomerieren oder zu sedimentieren. Die Zugabe von NaCl (0,154 mmol/ml) zu der aufbereiteten wässrigen Nanopartikeldispersion zum Herstellen einer isotonen Kochsalzlösung, oder die Zugabe von Phosphatpuffer (PBS 8 g/l Natriumchlorid, 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 1,15 g/l Dinatriumphosphat, 0,2 g/l Kaliumchlorid; pH 7,1 - 7,5) hatte keinen weiteren Einfluss auf die Größe der Partikel oder deren Stabilität.

3.2.6 Scale-Up Versuche mit polyMAOETIB

Zur Überprüfung der Scale-Up Fähigkeit des Prozesses wurden Versuche mit Natriumoleat und einer Tensidmenge von $X_{SO} = 0,11$ durchgeführt. Die Ansatzgröße betrug üblicherweise 1 g organische Phase mit 9 g H₂O + Tensid, bei den Scale-Up versuchen wurden 5 g organische Phase und 45 g H₂O (Scale-Up Verhältnis 1:5) und 10 g organische Phase mit 90 g H₂O (Scale-Up 1:10) verwendet.

Tab. 14: Tabellarische Auflistung der Scale-Up Versuche zur Herstellung von polyMAOETIB mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	X_{SO} [g/g]	AIBN/ Monomer	T [°C]	N [min ⁻¹]	t_{Disp} [min]	Ansatzgröße [ml]
1	0,11	1:500	70	25000	5	10
2	0,11	1:500	70	25000	5	50
3	0,11	1:500	70	25000	5	100

Die Partikelgrößen wurden mit DLS bestimmt. Zur Veranschaulichung des Größenunterschieds der Partikel direkt nach der Herstellung und nach dem Aufbereitungsverfahren wurde die y-Achse in Abbildung 23 auf 120 - 138 nm skaliert.

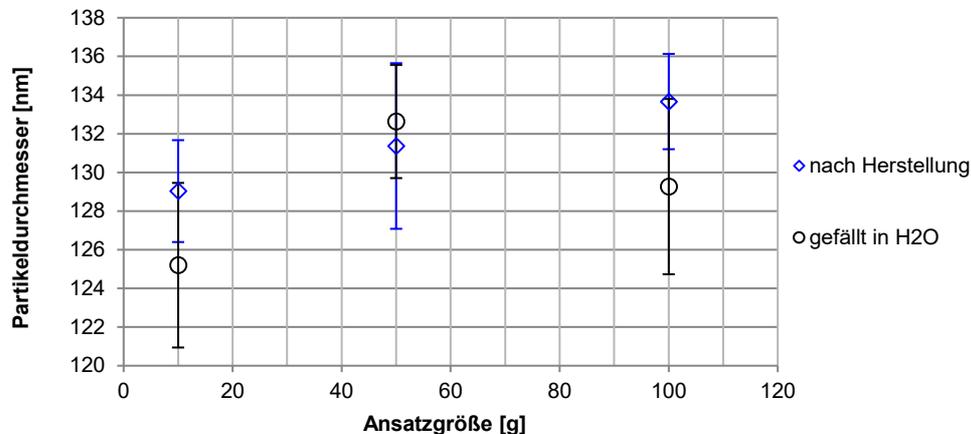


Abb. 23: Partikelgröße von polyMAOETIB nach der Herstellung und nach der Partikelaufbereitung gefällt in H₂O; Scale-Up Ansatzgrößen 1:1, 1:5 und 1:10; Synthesebedingungen: $X_{SO} = 0,11$ und AIBN/Monomer Verhältnis 1:500, Reaktionstemperatur 70°C; die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Die Ergebnisse zeigten, dass die Partikel bei den Scale-Up Versuchen für alle drei Experimente in derselben Größenordnung lagen. Insgesamt erstreckte sich die Partikelgröße von 125 nm bis 134 nm. Es ist in Abbildung 23 kein Trend der Partikelgröße in eine bestimmte Richtung zu erkennen. Die direkt nach der Herstellung mit DLS gemessenen Partikel hatten eine Größe von 129 nm bis 134 nm (maximaler Größenunterschied: 5 nm), wobei die größten Partikel bei einer Ansatzgröße von 100 g (Scale-Up 1:10) entstanden. Nach der Partikelaufbereitung hatten die Partikel insgesamt eine Größe von 125 nm bis 133 nm mit einem maximalen Größenunterschied von 8 nm. Die größten Partikel waren hier bei einer Ansatzgröße von 50 g (Scale-Up 1:5) zu finden.

3.2.7 polyMAOETIB Anwendung im Computertomographen

Für die exemplarische Anwendung von polyMAOETIB als Kontrastmittel wurden die Partikel in den Schenkel eines toten Huhns intramuskulär injiziert und im CT bildlich dargestellt. Die Partikel wurden mit $X_{SO} = 0,11$ und einem AIBN/Monomer Verhältnis von 1:500 mit einer Größe von 112 nm (DLS) synthetisiert.

Die Partikel wurden mit dem kommerziell erwerblichen klinischen Standardkontrastmittel Iomeprol (Imeron) verglichen. Typische Mengen von Imeron 400 (400 mg/ml Iod) für CT Untersuchungen im menschlichen Körper sind 100 ml intravenös. Da diese Konzentration und somit die Röntgenabsorption für intramuskuläre Untersuchungen zu hoch war, wurde die Iodkonzentration bei den Versuchen für beide Kontrastmittel auf 10 mg/ml eingestellt. Die Bilder wurden mit einer für menschliche Patienten üblichen Röhrenspannung von 120 keV aufgenommen.

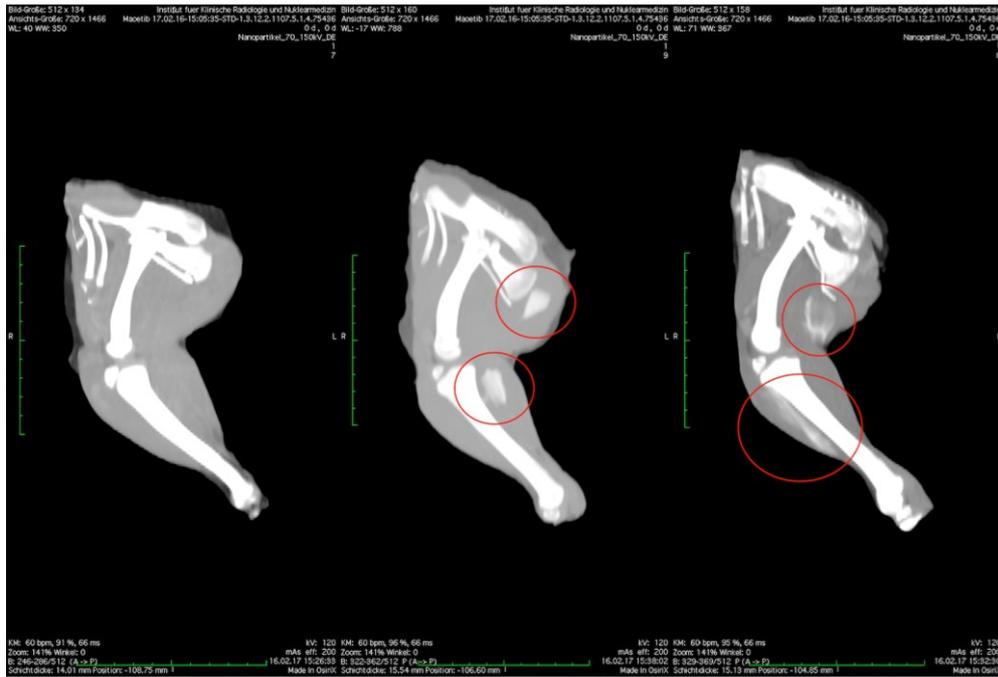


Abb. 24: CT Aufnahmen eines Hühnerschenkels. Links: nativ. Mitte: lomeprol (10 mg/ml Iod), 1 ml direkt injiziert (unterer Schenkel, musculus gastrocnemius), 2 ml gefächert injiziert (Oberschenkel, musculus iliofibularis). Rechts: polyMAOETIB (10 mg/ml Iod), 1 ml direkt injiziert (unterer Schenkel, musculus fibularis longus), 2 ml gefächert injiziert (Oberschenkel, musculus iliofibularis); Synthesebedingungen: $X_{SO} = 0,11$ und AIBN/Monomer Verhältnis 1:500 ($d = 112$ nm), Reaktionstemperatur 70°C

In den CT Aufnahmen in Abbildung 24 ist der Kontrast der intramuskulär verabreichten polyMAOETIB Nanopartikel und von lomeprol deutlich zu erkennen. Laut der Hounsfieldskala⁷⁹ wurde die Röntgenstrahlung durch das Knochengewebe um 137 - 156 HU geschwächt. PolyMAOETIB schwächte die Röntgenstrahlung um 93 HU und lomeprol um 104 HU, woraus sich eine Differenz der beiden Kontrastmittel von 11 HU errechnet.

3.3 Fe₃O₄@MAOETIB Nanopartikelsynthese

Anhand der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2 ist ersichtlich, dass die Partikelgröße für polyMAOETIB Nanopartikel in einem breiten Größenfenster variiert werden konnte (vgl. Abb. 15). Um ein duales Kontrastmittel für CT und MRT Untersuchungen herzustellen wurden dem Polymerisationsprozess zusätzlich superparamagnetische Fe₃O₄ Nanopartikel ($d < 20$ nm) zugegeben. Bei der Fe₃O₄ Partikelsynthese wurde 3 mg/ml Natriumoleat als Stabilisator im Reaktionssystem verwendet um Agglomerate mit einer Größe von 100 - 120 nm zu erhalten (vgl. Abb. 10). Diese Aggregate sind im Vergleich zu Partikeln mit $d < 20$ nm leichter zu zentrifugieren. Die Aggregate wurden durch die Zugabe von Ölsäure im nächsten Prozessschritt voneinander gelöst und dann der organischen Phase zugegeben (vgl. Abb. 6).⁵⁹ Die Fe₃O₄ Partikel sollten während der Polymerisation in den Mizellen von den polyMAOETIB Nanopartikeln umschlossen werden.

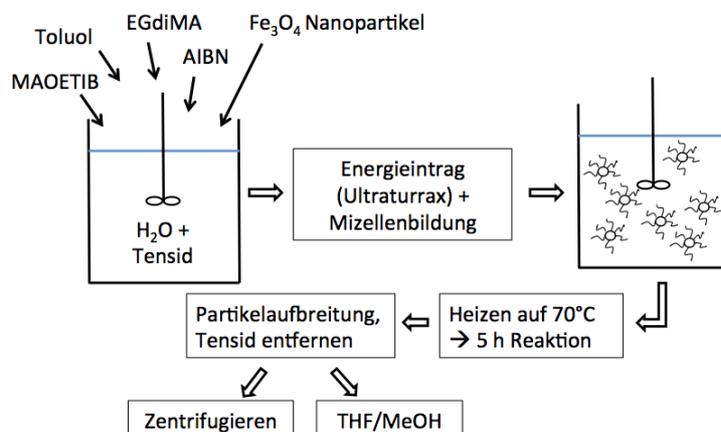


Abb. 25: Schematische Darstellung der Herstellung von Fe₃O₄@MAOETIB

Die Partikelgröße und die Zusammensetzung der Fe₃O₄@MAOETIB Nanopartikel wurden durch Variation der Reaktionsparameter (Tensidbeladung und Eisenoxidmenge im Reaktionssystem) verändert und untersucht. Die Reaktionstemperatur, die Dispersionsintensität/-zeit und das AIBN/Monomer Verhältnis waren bei der Herstellung von Fe₃O₄@MAOETIB für alle Versuche konstant. Aufgrund der guten Prozessstabilität und Reproduzierbarkeit bei der polyMAOETIB Synthese aus Kapitel 3.2 wurden für alle Experimente die Optimalwerte verwendet (Reaktionstemperatur: 70 °C; Ultraturrax Drehzahl: 25000 min⁻¹; Dispersionszeit: 5 min; AIBN/Monomerverhältnis: 1:500).

Zusätzlich zur Optimierung des Herstellprozesses von Fe₃O₄@MAOETIB anhand der Reaktionsparameter wurden die Partikel mit Hilfe eines Co-Monomers funktionalisiert, um eine Target-spezifische Anreicherung des dualen Kontrastmittels in Zielgewebe zu erreichen.

3.3.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden die Partikelgrößen (DLS) aus sechs Chargen und vier verschiedenen Zusammensetzungen nach der Partikelauflösung verglichen. Die Einsatzmenge Fe_3O_4 war für die Experimente konstant bei entweder 3,44 % w/w oder 22,2 % w/w (bezogen auf die organische Phase, $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = m_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/m_{\text{org}}$). Die Einsatzmenge Natriumoleat war für die Experimente konstant bei entweder $X_{\text{SO}} = 0,11$ oder $X_{\text{SO}} = 0,19$ ($X = m_{\text{Tensid}}/m_{\text{H}_2\text{O}}$). Hieraus ergab sich eine Anzahl von 4 x 6 Experimenten.

Tab. 15: Liste der Versuchsreihen mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen zur Evaluierung der Reproduzierbarkeit der polyMAOETIB Synthese.

Versuchsreihe	X_{SO} [g/g]	$w(\text{Fe}_3\text{O}_4)$ [%]	Anzahl Versuche
1	0,11	3,44	6
2	0,19	3,44	6
3	0,11	22,2	6
4	0,19	22,2	6

Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt. Die zugehörigen Diagramme befinden sich im Anhang **A3**.

Tab. 16: Reproduzierbarkeit der Fe_3O_4 @MAOETIB Partikelgröße bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, die Partikelgröße mit absoluter Standardabweichung ist aus sechs Chargen gemittelt.

	$X_{\text{SO}} = 0.11$	$X_{\text{SO}} = 0.19$
3.44 % Fe_3O_4	127 ± 4 nm	48 ± 4 nm
22.2 % Fe_3O_4	160 ± 5 nm	57 ± 6 nm

3.3.2 Variation der Tensidmenge

Der Einfluss der Tensidmenge auf die Partikelgröße wurde untersucht, indem zwei Versuchsreihen mit zwei unterschiedlichen, jedoch für die jeweilige Versuchsreihe konstanten Eisenoxidmengen durchgeführt wurden. Für jede Versuchsreihe wurden dem Reaktionssystem sechs verschiedene Tensidmengen zugegeben. Die Partikelgröße wurde nach dem Aufbereitungsprozess mit DLS bestimmt. Als Tensid wurde Natriumoleat (SO) verwendet.

Tab. 17: Tabellarische Auflistung der Versuche zur Variation der Tensidmenge bei der Herstellung von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	X_{SO} [g/g]	$w(\text{Fe}_3\text{O}_4)$ [%]
1	0,06	3,44
2	0,083	3,44
3	0,11	3,44
4	0,14	3,44
5	0,16	3,44
6	0,19	3,44
<hr/>		
7	0,06	22,2
8	0,083	22,2
9	0,11	22,2
10	0,14	22,2
11	0,16	22,2
12	0,19	22,2

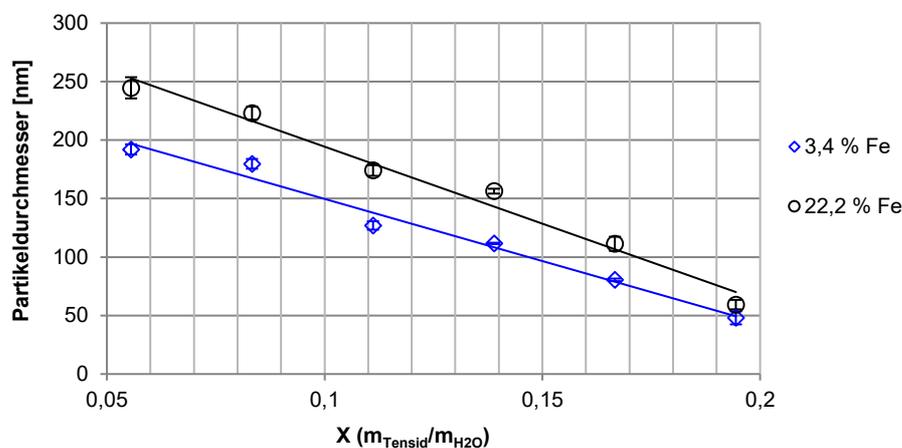


Abb. 26: Partikelgrößen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ unter Variation der Tensidmenge (Natriumoleat) während der Mikroemulsionspolymerisation mit konstanter Fe_3O_4 Menge bei entweder 3,44 % w/w oder 22,2 % w/w und zugehörige Trendlinien (linear); die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

In Abbildung 26 ist für beide Versuchsreihen ein eindeutiger Trend der Partikelgröße zu erkennen. Aus einer größeren Tensidmenge resultierten kleinere Partikel. Die Experimente ermöglichten eine Steuerung der Partikelgröße von 48 nm ($X_{\text{SO}} = 0,19$) bis 245 nm ($X_{\text{SO}} = 0,06$). Bei einem Eisenoxidgehalt von 3,44 % Fe_3O_4 w/w

entstanden Partikel von 48 - 192 nm und mit 22,2 % Fe_3O_4 w/w Partikel von 59 - 245 nm. Die Partikelgröße nahm mit zunehmender Fe_3O_4 Menge von 3,44 % w/w auf 22,2 % w/w leicht zu. Der Größenunterschied betrug in etwa 40 - 50 nm.

Abbildung 27 zeigt zwei typische von der DLS Software berechnete Partikelgrößenverteilungen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB synthetisiert mit zwei unterschiedlichen Tensidmengen.

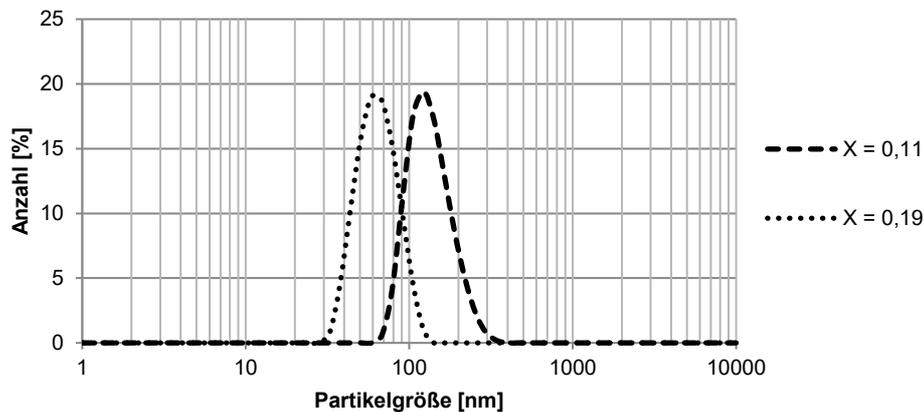


Abb. 27: Partikelgrößenverteilungen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB synthetisiert mit $X_{\text{SO}} = 0,11$ ($d_{\text{DLS}} = 121$ nm) und $X_{\text{SO}} = 0,19$ ($d_{\text{DLS}} = 61$ nm)

Bei einer Tensidbeladung von $X = 0,11$ wurde die Partikelgröße mit DLS zu 121 nm bestimmt. Die Halbwertsbreite des Peaks beträgt 94,5 nm. Für die Tensidbeladung $X = 0,19$ wurde eine Partikelgröße von 61 nm gemessen mit einer Halbwertsbreite von 49,2 nm. Die beiden Größenverteilungen aus DLS Messungen sind repräsentativ für $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB Nanopartikel, welche mit Mikroemulsionspolymerisation hergestellt wurden. Es handelt sich um zwei unabhängige, monomodale Partikelgrößenverteilungen.

3.3.3 Variation der Eisenoxidmenge

Die Einsatzmenge von Fe_3O_4 hatte, wie in Abbildung 26 (Kapitel 3.3.2) zu erkennen, einen Einfluss auf die Partikelgröße. Daher wurde dieser Einfluss durch die Variation der Eisenoxidmenge im System bei konstanter Tensidmenge untersucht. Es wurden zwei Versuchsreihen mit zwei unterschiedlichen, jedoch für die jeweilige Versuchsreihe konstanten Tensidmengen durchgeführt. Natriumoleat (SO) wurde als Tensid verwendet. Für jede Versuchsreihe wurden dem Reaktionssystem acht verschiedene Mengen an Fe_3O_4 Nanopartikeln ($w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,22 - 22,2$ % w/w) zugegeben. Die Partikelgröße wurde nach dem Aufbereitungsprozess mit DLS bestimmt.

Tab. 18: Tabellarische Auflistung der Versuche zur Variation der Eisenoxidmenge bei der Herstellung von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ mit Einsatzmengen und Reaktionsbedingungen.

Versuch	X_{SO} [g/g]	$w(\text{Fe}_3\text{O}_4)$ [%]
1	0,11	0,22
2	0,11	0,44
3	0,11	0,88
4	0,11	1,75
5	0,11	3,44
6	0,11	6,65
7	0,11	12,5
8	0,11	22,2
9	0,14	0,22
10	0,14	0,44
11	0,14	0,88
12	0,14	1,75
13	0,14	3,44
14	0,14	6,65
15	0,14	12,5
16	0,14	22,2

Da bei Eisenoxidmengen von $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,22 - 1,75 \text{ \% w/w}$ (Versuche 1 - 4 und 9 - 12) in den Ergebnissen der DLS Messungen kein sichtbarer Einfluss auf die Partikelgröße zu erkennen war (vgl. Abb. 55, Kapitel 4.3.3) werden die Ergebnisse dieser Versuche in diesem Kapitel nicht dargestellt (in Tabelle 18 grau), sondern nur in Kapitel 4.3.3 diskutiert. Die gemessenen Partikelgrößen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44 - 22,2 \text{ \% w/w}$ (in Tabelle 18 schwarz) sind in Abbildung 28 dargestellt. Die y-Achse ist in Abbildung 28 auf eine Partikelgröße von 75 - 195 nm skaliert.

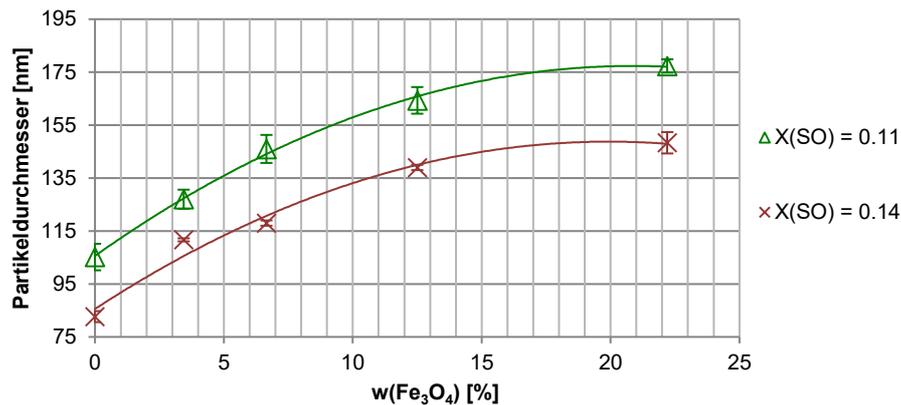


Abb. 28: Partikelgrößen von Fe₃O₄@MAOETIB unter Variation der Fe₃O₄ Menge von 3,44 - 22,2 % w/w während der Mikroemulsionspolymerisation mit konstanter Tensidmenge (Natriumoleat) bei entweder X_{SO} = 0,11 oder X_{SO} = 0,14 mit zugehörigen Trendlinien (polynomisch); die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Bei einer Erhöhung der Fe₃O₄ Menge ist in beiden Versuchsreihen aus Abbildung 28 ein Anstieg der Partikelgröße mit eindeutigem Trend zu erkennen. Durch die Experimente konnte die Partikelgröße insgesamt von 83 nm (w_{Fe₃O₄} = 3,44 %) bis 177 nm (w_{Fe₃O₄} = 22,2 %) variiert werden. Die Toluolmenge und Monomerkonzentration (m_{org}) waren für alle Experimente konstant und die Partikelgröße änderte sich lediglich durch die zusätzliche Zugabe von Eisenoxid (m_{Fe₃O₄}). Für X_{SO} = 0,11 erstreckte sich die Partikelgröße von 127 - 177 nm, die Partikelgröße der nativen polyMAOETIB Partikel ohne Zugabe von Eisenoxid lag bei 105 nm, woraus sich eine maximale Differenz von 72 nm ergibt. Für X_{SO} = 0,14 erstreckte sich die Partikelgröße von 112 - 148 nm, die Partikelgröße der nativen polyMAOETIB Partikel lag bei 83 nm und die maximale Größendifferenz errechnet sich zu 65 nm.

Bei einem Fe₃O₄ Gehalt von 0,22 - 1,75 % w/w war kein signifikanter Größenunterschied zu den nativen Partikeln ohne die Zugabe von Fe₃O₄ zu erkennen (vgl. Abb. 54, Kapitel 4.3.3). Bei Fe₃O₄ Einsatzmengen < 0,22 % w/w war es nicht möglich Partikel mit einer monomodalen Partikelgrößenverteilung zu synthetisieren. In der DLS wurde hier bei der Messung eine bimodale Größenverteilung mit zwei Partikelgrößen bei 49 nm und 142 nm angezeigt (vgl. Abb. 55, Kapitel 4.4.3).

3.3.4 TEM Aufnahmen der Fe₃O₄@MAOETIB Nanopartikel

Die synthetisierten Fe₃O₄@MAOETIB Partikel wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop bildlich dargestellt. Abbildung 29 zeigt die Aufnahmen von zwei Chargen synthetisiert mit einer konstanten Tensidmenge von X_{SO} = 0,19 und zwei unterschiedlichen Fe₃O₄ Einsatzmengen von 0,44 % w/w und 3,44 % w/w.

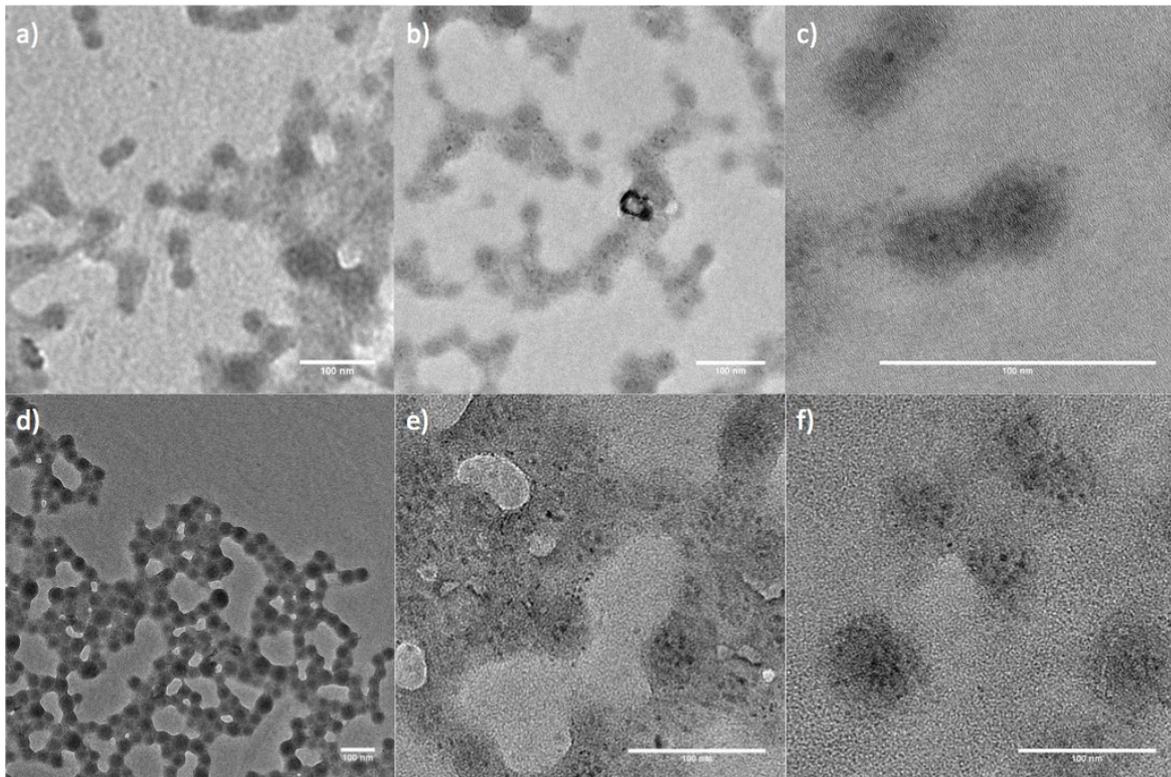


Abb. 29: TEM Aufnahmen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ mit $X_{\text{SO}} = 0,19$; obere Reihe: (a, b, c) mit 0,44 % Fe_3O_4 w/w; untere Reihe (d, e, f) mit 3,44 % Fe_3O_4 w/w; Größenbalken 100 nm

Abbildung 29 zeigt typische TEM Aufnahmen der $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Nanopartikel. Durch die Trocknung auf das Substrat bei der Probenpräparation waren die Partikel aggregiert. Abbildungen 29 (a), (b) und (c) zeigen sphärische Partikel mit einem Eisenoxidanteil von 0,44 % w/w. Die Partikel sind in Abbildung 29 (a) einheitlich in ihrer Form und Größe (40 nm). Mit DLS wurde die Partikelgröße zu 49 nm bestimmt. Bei der Betrachtung von Abbildung 29 (b) und (c) sind Fe_3O_4 Partikel mit einem Durchmesser < 10 nm in den Polymerpartikeln sichtbar. Die meisten polyMAOETIB Partikel enthalten 3 - 5 Fe_3O_4 Partikel.

In Abbildung 29 (d), (e) und (f) sind sphärische $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikel mit 3,44 % Fe_3O_4 w/w zu sehen. Die Größe der Partikel beträgt 60 nm ($d_{\text{DLS}} = 68$ nm). Abbildung 29 (d) zeigt, dass die Partikel in Form und Größe einheitlich sind. Bei Betrachtung von Abbildung 29 (e) und (f) ist im Vergleich zu Abbildung 29 (b) und (c) eine deutlich höhere Anzahl an Fe_3O_4 Partikeln in den polyMAOETIB Partikeln zu erkennen.

Abbildung 30 zeigt TEM Aufnahmen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ hergestellt mit 0,11 % Fe_3O_4 w/w.

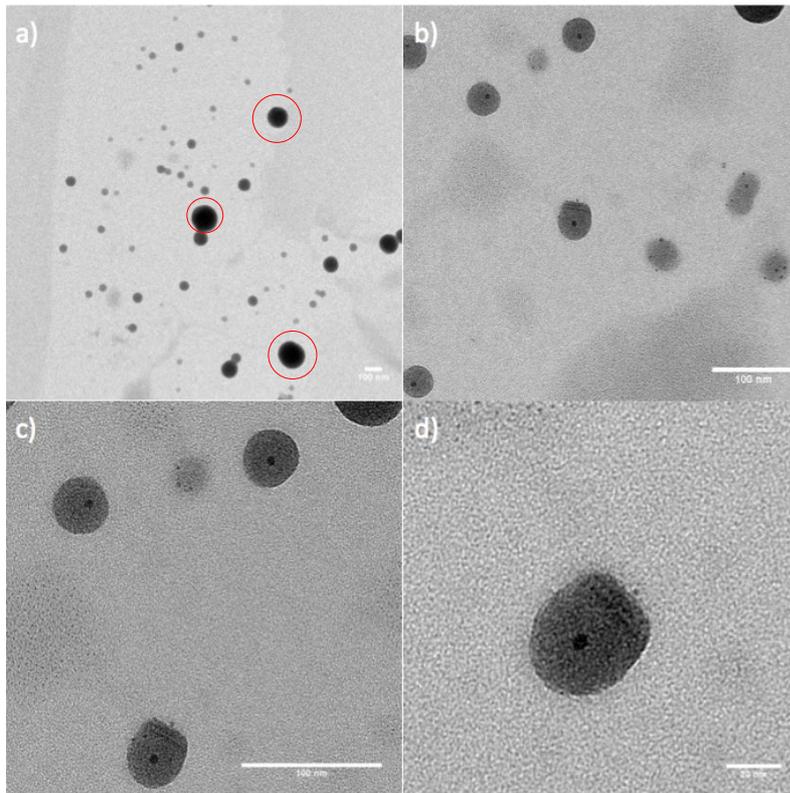


Abb. 30: TEM Aufnahmen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ mit $X_{\text{SO}} = 0,19$ und $0,11$ % Fe_3O_4 w/w; Größenbalken (a - c) 100 nm und (d) 20 nm

In Abbildung 30 (a) ist zu erkennen, dass bei der Verwendung von Eisenoxidemengen $< 0,22$ % w/w keine monomodal verteilten Nanopartikel entstanden, sondern Partikel in zwei unterschiedlichen Größenklassen. Zum einen mit einer Größe von ca. 40 nm (DLS 49 nm) mit 1 - 3 Fe_3O_4 Partikel pro Polymerpartikel, und zum anderen Partikel mit einer Größe von 100 - 120 nm (DLS 142 nm) (rot markiert).

Da die Einsatzmenge Fe_3O_4 relativ gering war, ist in Abbildung 30 (b) und (c) zu erkennen, dass nicht alle Polymerpartikel dieselbe Menge an Eisenoxidpartikeln enthalten. Es konnten keine Eisenoxidpartikel in den 100 - 120 nm großen polyMAOETIB Partikeln gefunden werden, welche in Abbildung 30 (a) rot markiert sind.

Zur Bestätigung der Partikelgröße und zur weiteren Veranschaulichung wurden die Partikel aus Abbildung 29 (d), (e) und (f) und Abbildung 30 mit dem AFM untersucht und die Aufnahmen von TEM und AFM miteinander verglichen.

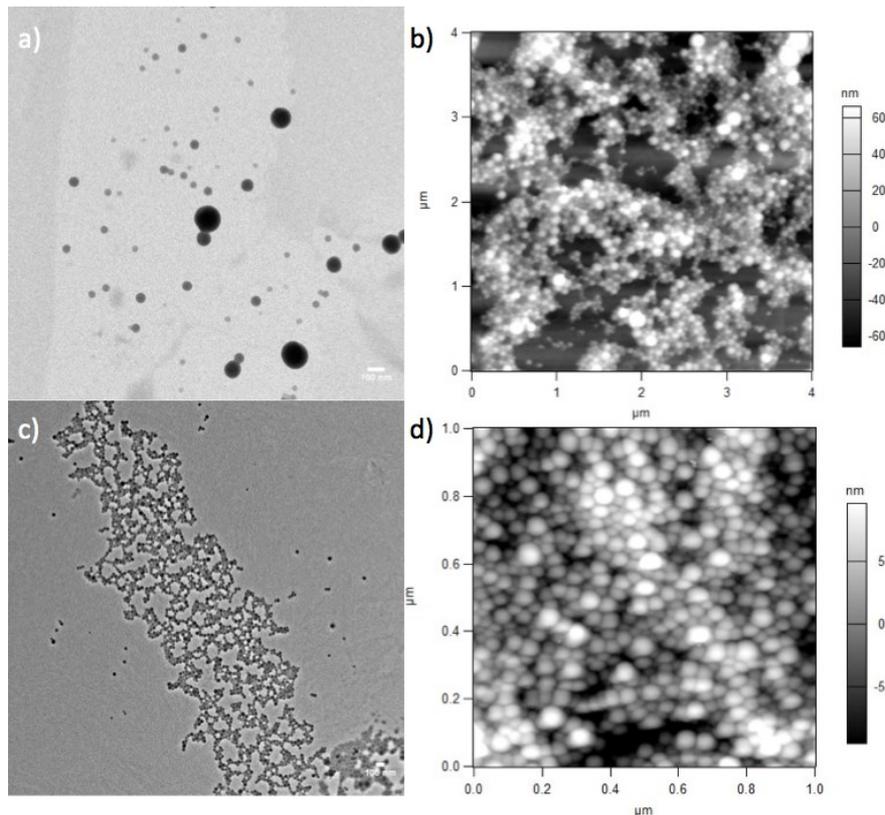


Abb. 31: TEM und AFM Aufnahmen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$; obere Reihe: (a) TEM Aufnahme von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ mit $X_{\text{SO}} = 0,19$ und $0,11$ % Fe_3O_4 w/w, Maßstab 100 nm (b) zugehörige AFM Aufnahme von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ mit $X_{\text{SO}} = 0,19$ und $0,11$ % Fe_3O_4 w/w; untere Reihe: (c) TEM Aufnahme von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ mit $X_{\text{SO}} = 0,19$ und $3,44$ % Fe_3O_4 w/w, Maßstab 100 nm (d) zugehörige AFM Aufnahme von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ mit $X_{\text{SO}} = 0,19$ und $3,44$ % Fe_3O_4 w/w

Die AFM Aufnahme aus Abbildung 31 (b) bestätigt zusätzlich zu den TEM Aufnahmen aus Abbildung 31 (a) und Abbildung 30, dass bei einem Eisenoxidanteil $< 0,22$ % w/w Partikel in zwei unterschiedlichen Größenklassen entstanden. In Abbildung 31 (c) und (d) sind die Partikelgrößen mit einem Eisenoxidanteil von $3,44$ % w/w einheitlich.

3.4 Evaluierung des dualen Kontrastmittels in CT und MRT

Zur Evaluierung des Kontrasts der Polymernanopartikel in CT und MRT wurde eine Versuchsreihe von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ in 1,5 ml Teströhrchen erstellt. Bei den Versuchen wurde das $\text{Fe}_3\text{O}_4/MAOETIB$ Verhältnis und die Kontrastmittelkonzentration variiert.

Das $\text{Fe}_3\text{O}_4/MAOETIB$ Verhältnis wurde über den Eisenoxidanteil in den Polymerpartikeln eingestellt. Hierzu wurden Partikel mit Eisenoxidanteilen von $0,22$ - $22,2$ % Fe_3O_4 w/w synthetisiert. Zur Variation der Kontrastmittelkonzentration wurde für jede Zusammensetzung eine Verdünnungsreihe von 5 - 20 mg/ml Gesamtkontrastmittelkonzentration erstellt. Die Testreihe wurde in CT und MRT untersucht.

3.4.1 Evaluierung des CT Kontrasts von Fe₃O₄@MAOETIB

Für die CT Untersuchungen wurde die Versuchsreihe in einem Siemens SOMATOM Force Computertomographen bildlich dargestellt. Als Referenz wurde das klinische Standardkontrastmittel Imeron (Imeron) verwendet. Die Röhrenspannung wurde auf einen patiententypischen Wert von 120 keV eingestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

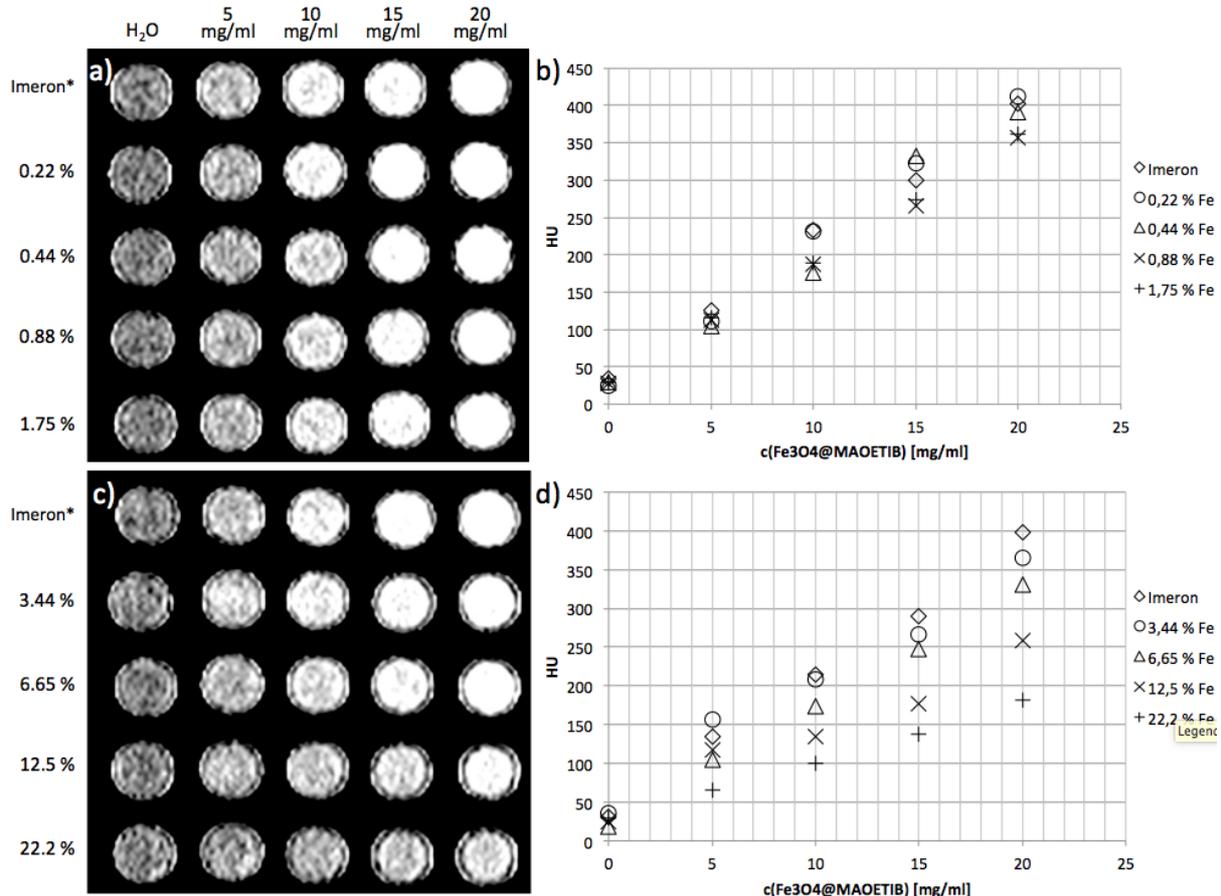


Abb. 32: (a, c) CT Aufnahmen von Fe₃O₄@MAOETIB (d_{DLS} = 56 nm) mit einer Gesamtkonzentration von 5 - 20 mg/ml (außer Imeron) von links nach rechts und mit W_{Fe₃O₄} = 0,22 - 22,22 % von oben nach unten, verglichen mit dem klinischen Standard CT Kontrastmittel Imeron (*Imeron Iod Konzentrationen 3,25 mg/ml I, 6,5 mg/ml I, 9,75 mg/ml I, 13 mg/ml I); Röhrenspannung 120 keV (b, d) zugehörige Diagramme der Signalintensität in Abhängigkeit der Gesamtkonzentration Fe₃O₄@MAOETIB

Abbildung 32 zeigt CT Aufnahmen von Fe₃O₄@MAOETIB mit verschiedenen Konzentrationen und Zusammensetzungen bei einer Röhrenspannung von 120 keV. Das klinische Standard CT Kontrastmittel Imeron wurde als Referenz verwendet und die Iodkonzentration von Imeron wurde für jede Konzentration auf denselben Wert für polyMAOETIB Partikel ohne Fe₃O₄ eingestellt. Die Gesamtmasse der Fe₃O₄@MAOETIB Partikel war konstant für jede Fe₃O₄ Konzentration, um die Abnahme des Iodgehalts (und somit des CT Kontrasts) mit zunehmender Menge an Fe₃O₄ zu verdeutlichen.

Bei der Betrachtung von Abbildung 32 (a) und (c) ist ein Anstieg des CT Kontrasts (5 - 20 mg/ml) mit steigender Gesamtkonzentration (von links nach rechts) zu erkennen und der Kontrast nimmt mit zunehmender Fe_3O_4 Menge (von oben nach unten) von 0,22 - 22,2 % Fe_3O_4 w/w ab.

Die Diagramme in Abbildung 32 (b) und (d) zeigen die Hounsfield Werte der zugehörigen CT Bilder (a) und (c). Der Kontrast der $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikel in Abbildung 32 (b) befindet sich für jede Konzentration und Zusammensetzung in der selben Größenordnung wie der Kontrast von Iomeprol. Die Abnahme des CT Kontrasts war bei niedrigen Eisenoxidkonzentrationen zu vernachlässigen. Bei einer Gesamtkonzentration von 20 mg/ml lag der Kontrast von Iomeprol bei 391 HU und der Kontrast mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 1,75$ % bei 361 HU, woraus sich eine maximale Differenz von 30 HU errechnet. In Abbildung 32 (d) nimmt der CT Kontrast bei konstanter $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Gesamtkonzentration mit zunehmender Fe_3O_4 Menge und abnehmender MAOETIB-/Iodmenge linear ab. Bei einer Gesamtkonzentration von 20 mg/ml lag die Intensität von Iomeprol bei 399 HU und bei den Nanopartikeln mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 22,2$ % bei 181 HU, mit einer Differenz von 218 HU.

Dieselbe Versuchsreihe wurde bei Röhrensparnungen von 150 keV und 70 keV gemessen. Die Ergebnisse befinden sich im Anhang **A4**. Der CT Kontrast nahm hier analog mit steigender Gesamtkonzentration (5 - 20 mg/ml) zu und mit zunehmender Fe_3O_4 Menge (0,22 - 22,2 % Fe_3O_4 w/w) ab. Bei Anheben der Röhrensparnung nahmen die absoluten Hounsfieldwerte ab und bei Herabsetzen der Röhrensparnung nahmen sie zu.

3.4.2 Evaluierung des MRT Kontrasts von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$

Dieselbe Versuchsreihe aus Kapitel 3.4 wurden in einem Siemens Magnetom Skyra MRT bei einer Magnetfeldstärke von 3 Tesla auf Tauglichkeit als T_2 Kontrastmittel untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

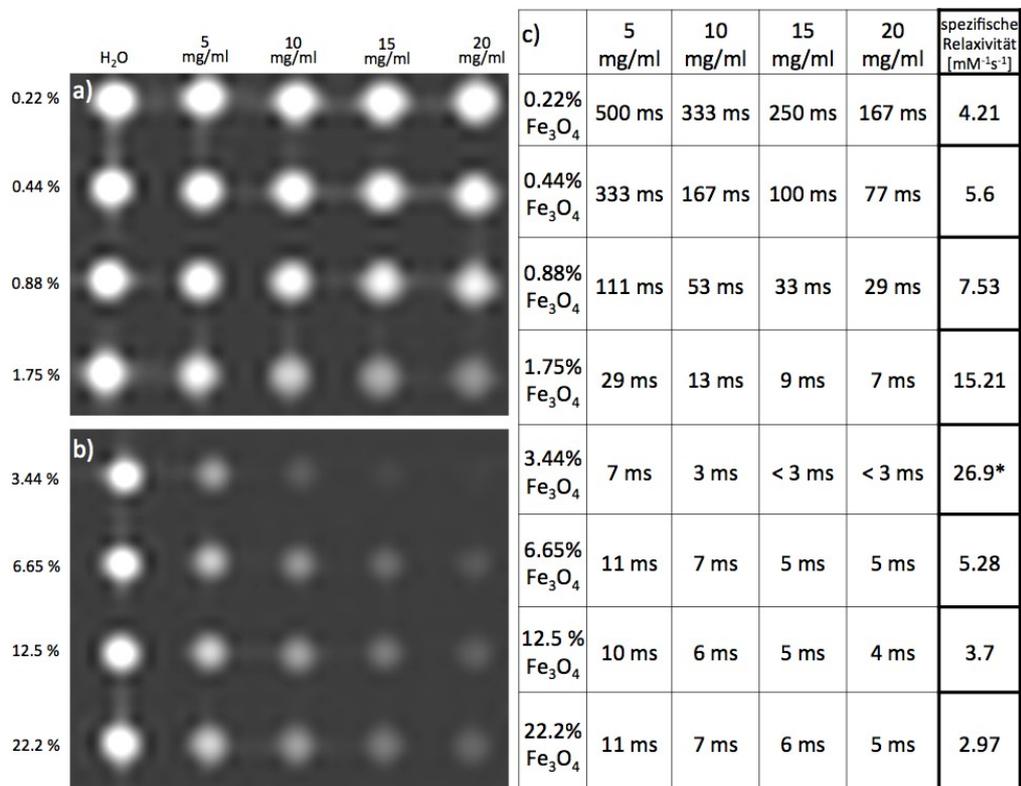


Abb. 33: (a, b) Spin-Echo Aufnahmen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ ($d_{\text{DLS}} = 56$ nm) mit einer Gesamtkonzentration von 5 - 20 mg/ml von links nach rechts und mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,22 - 22,2$ % von oben nach unten, Echozeit $t_E = 10$ ms (c) zugehörige Tabelle der T_2 Relaxationszeiten für jede Zusammensetzung und die spezifische Relaxivität r_2 für jede Verdünnungsreihe; *Wert berechnet unter Berücksichtigung des linearen Trends von r_2 und den durchgeführten Messungen mit 1 - 4 mg/ml

Abbildung 33 zeigt die Abhängigkeit der T_2 Relaxationszeit von der Menge an Fe_3O_4 in den polyMAOETIB Partikeln. Abbildung 33 (a) und (b) sind Spin-Echo Aufnahmen mit einer Echozeit von $t_E = 10$ ms. In Abbildung 33 (a) nimmt die Spin-Spin-Relaxation mit zunehmender Kontrastmittel-Gesamtkonzentration (von links nach rechts) (5 - 20 mg/ml) zu, ebenso mit zunehmender Eisenoxidmenge (von oben nach unten) (0,22 - 22,2 % Fe_3O_4 w/w). Die spezifische Relaxivität nahm von 4,21 bis 26,9 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (0,22 - 3,44 % Fe_3O_4 w/w) linear zu. Da die Echozeit t_E gerätespezifisch auf 10 ms limitiert und die Spin-Spin-Relaxation bei $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44$ % sehr schnell war, war es nicht möglich ausreichend Datenpunkte zu sammeln um r_2 bei Gesamtkonzentrationen von 5 - 20 mg/ml und $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44$ % zu bestimmen. Daher wurden die Messungen bei niedrigeren Konzentrationen von 1 - 4 mg/ml wiederholt (vgl. Abb. 34) und r_2 für $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44$ % in Abbildung 33 (c) linear extrapoliert (vgl. Abb. 59, Kapitel 4.4.2). Somit erreicht T_2 in Abbildung 33 (b) das Minimum bei $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44$ % mit einer berechneten spezifischen Relaxivität von $r_2 = 26,9$ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. T_2 nahm mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} > 3,44$ % wieder zu, analog nahm die spezifische Relaxivität bis auf

ein Minimum von $2,97 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 22,2 \%$) ab. Dieselbe Zunahme von T_2 bei $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} > 3,44 \%$ konnte auch bei niedrigeren Gesamtkonzentrationen des Kontrastmittels von 1 - 4 mg/ml beobachtet werden. Abbildung 34 zeigt dieselben MRT Aufnahmen des Kontrastmittels mit Gesamtkonzentrationen von 1 - 4 mg/ml.

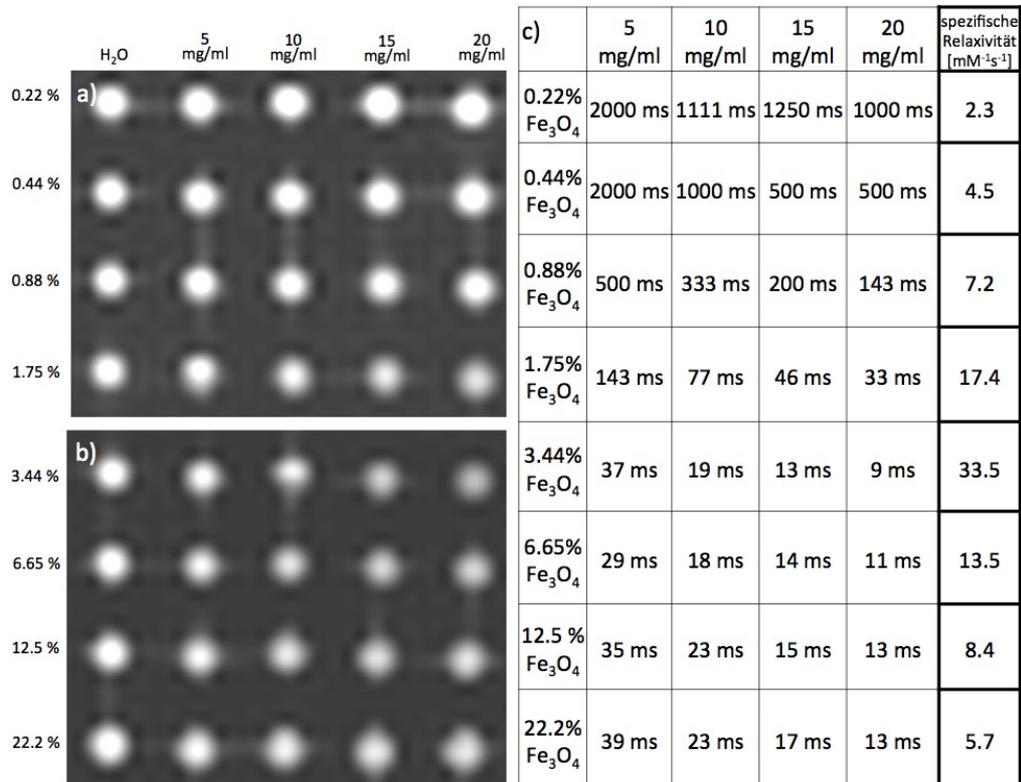


Abb. 34: (a, b) Spin-Echo Aufnahmen von Fe₃O₄@MAOETIB ($d_{\text{DLs}} = 56 \text{ nm}$) mit einer Gesamtkonzentration von 1 - 4 mg/ml von links nach rechts und mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,22 - 22,2 \%$ von oben nach unten, Echozeit $t_E = 10 \text{ ms}$ (c) zugehörige Tabelle der T_2 Relaxationszeiten für jede Zusammensetzung und die spezifische Relaxivität r_2 für jede Verdünnungsreihe

Die Spin-Spin-Relaxation nahm bei den Messungen mit zunehmender Gesamtkonzentration (von links nach rechts) ab (vgl. Abb. 34 a), ebenso mit zunehmender Eisenoxidmenge (von oben nach unten) (0,22 - 1,75 % Fe₃O₄ w/w). Die spezifische Relaxivität nahm, wie in Tabelle (c) zu erkennen, von 2,3 - 33,5 mM⁻¹s⁻¹ bei Eisenoxidkonzentrationen von 0,22 - 3,44 % w/w zu. Bei größeren Eisenoxidmengen von 3,44 - 22,2 % w/w nahm T_2 von oben nach unten wieder zu (vgl. Abb. 34 b). Die spezifische Relaxivität nahm von ihrem Maximum von 33,5 mM⁻¹s⁻¹ bei 3,44 % Fe₃O₄ auf einen Wert von 5,7 mM⁻¹s⁻¹ bei 22,2 % Fe₃O₄ ab. Da sich die spezifische Relaxivität aus der Steigung der Relaxationszeiten der Verdünnungsreihe errechnet, liegen die Werte für r_2 in Abbildung 34 (c) in derselben Größenordnung wie die Werte aus Abbildung 33 (c).

3.5 Funktionalisierung der Partikeloberfläche

Für eine gezielte biomedizinische Anwendung besteht die Möglichkeit dem Reaktionsgemisch vor der Polymerisation Co-Monomere zuzusetzen. Das bei den Experimenten verwendete Co-Monomer (2-[(3,4,7)-1,3-dioxo-1,3,3,4,7,7-hexahydro-2H-4,7-epoxyisoindol-2-yl]ethyl-2-methylprop-2-enoate) besitzt eine Furan geschützte Maleimidgruppe. Nach der Copolymerisation und Entschützung des Maleimids wäre so eine Funktionalisierung der polyMAOETIB Partikel möglich und es könnten bioaktiven Substanzen über eine Thiol- oder Aminogruppe an das Maleimid auf der Partikeloberfläche gekoppelt werden.^{73,80} Auf diese Weise kann aus dem unspezifischen dualen Kontrastmittel ein biomedizinisches Template für gezielte Anwendung im menschlichen Körper erstellt werden.

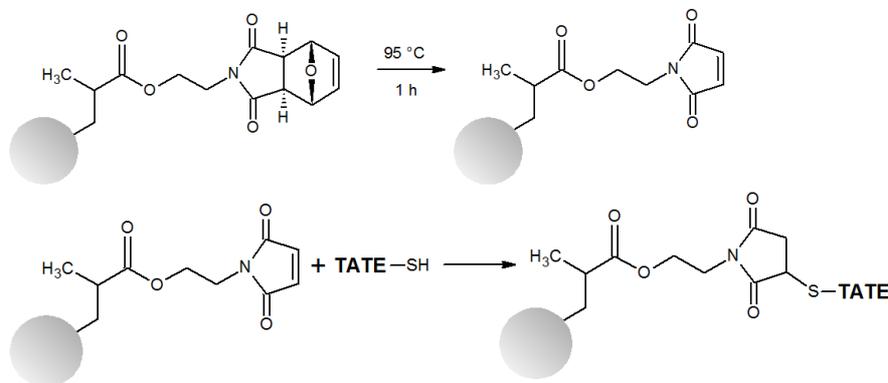


Abb. 35: Entschützung des Maleimids und anschließende Funktionalisierung der Nanopartikel mit der bioaktiven Substanz TATE (Cystein-Tyr³-Octreotate) über die Thiolgruppe

Bioaktive Substanzen an der Partikeloberfläche von Fe₃O₄@MAOETIB sollen die spezifische Anreicherung des Kontrastmittels in einem bestimmten Target-Zellgewebe ermöglichen. Das synthetische Somatostatin Analogon Cystein-Tyr³-Octreotate (Cys-TATE) eignet sich beispielsweise für eine Anreicherung des funktionalisierten Kontrastmittels an Somatostatin Rezeptoren bestimmter Zellen. Bei diversen Tumorzelllinien, wie zum Beispiel der AR42J Tumorzelllinie, sind Somatostatin Rezeptoren überexprimiert. AR42J Zellen sind Pankreas-Tumorzellen einer Ratte (*Rattus norvegicus*) und eignen sich zur Untersuchung einer möglichen überdurchschnittlichen Anreicherung der Cys-TATE funktionalisierten Fe₃O₄@MAOETIB Partikel in den Zellen.⁸¹

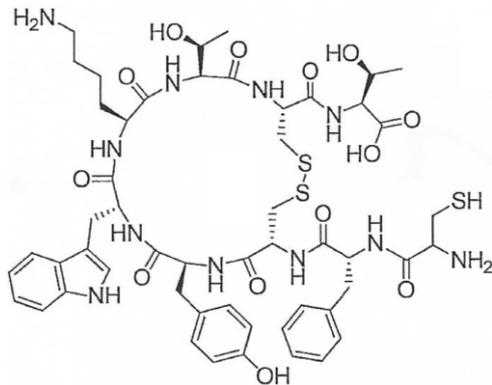


Abb. 36: Strukturformel von Cystein-Tyr³-Octreotate

In den folgenden Unterkapiteln werden die funktionalisierten Nanopartikel untersucht und mit Cys-TATE als bioaktive Substanz und den AR42J Zellen auf praktische Anwendung geprüft.

3.5.1 Allgemeiner Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung

Eine simple Methode zur Überprüfung der erfolgreichen Inkorporation des Co-Monomers in die Polymerketten der polyMAOETIB Nanopartikel ist die Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes an die Partikeloberfläche. Nach der Anlagerung des Farbstoffes und mehrfachem Waschen der Partikel kann der auf der Partikeloberfläche verbliebene Farbstoff mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden.

Zunächst wurden polyMAOETIB Partikel mit verschiedenen Co-Monomerkonzentrationen hergestellt und in zwei unabhängigen Versuchsreihen die Farbstoffe 7-Amino-4-Methylcumarin und Rhodamin 123 über die Aminogruppe der Farbstoffe an das Maleimid der polyMAOETIB Partikel angelagert. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Partikel nach der Anlagerung dreimal zentrifugiert. Die Partikel wurden dann für jede Co-Monomerkonzentration in THF gelöst und mit einem Fluoreszenzspektrometer vermessen.

Fe₃O₄ war für die Überprüfung der Funktionalisierung mit Fluoreszenzspektroskopie nicht geeignet, da eine exakte Bestimmung der Fluoreszenzintensität der Partikel mit Eisenoxid als Quencher unmöglich ist. Da sich die Produktqualität von polyMAOETIB und Fe₃O₄@MAOETIB im gleichen Herstellprozess nur unwesentlich unterschieden wurden die Messungen mit polyMAOETIB Partikeln ohne Fe₃O₄ durchgeführt.

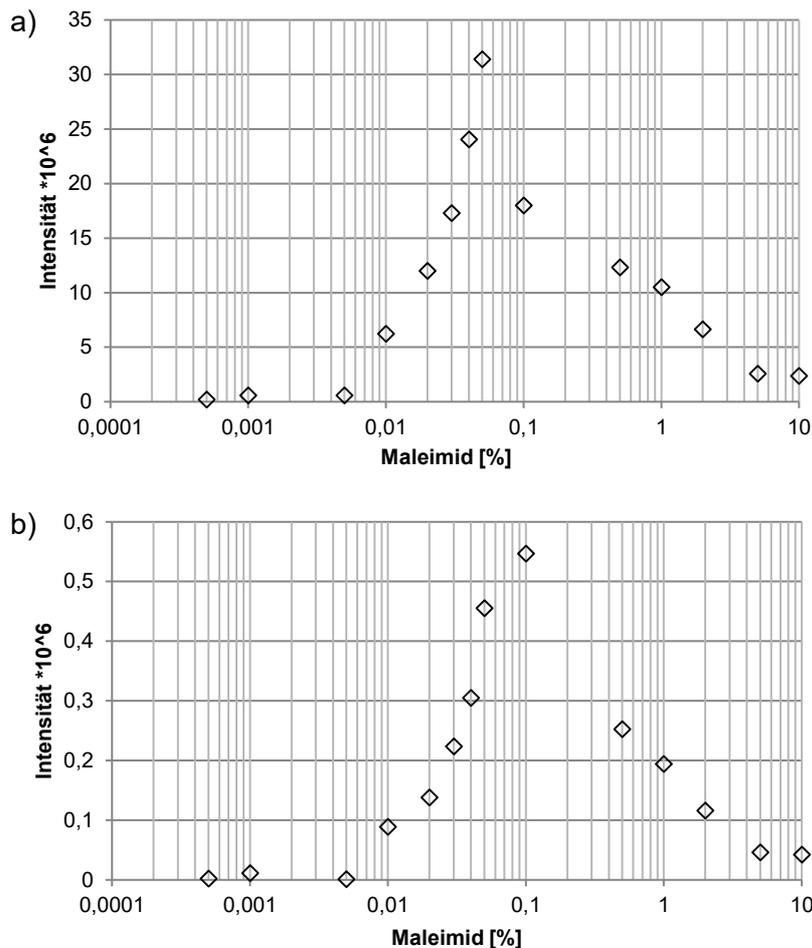


Abb. 37: Fluoreszenzintensität von copolymerisierten und Oberflächenfunktionalisierten polyMAOETIB Nanopartikeln ($X_{SO} = 0,11$) mit unterschiedlichen Mengen (% w/w bezogen auf MAOETIB) des Copolymers "Maleimid" (a) funktionalisiert mit 4,7-Methylcumarin und (b) funktionalisiert mit Rhodamin 123

Durch die Experimente war es möglich die Fluoreszenzintensität der Partikel in einem großen Bereich zu variieren. Bei Betrachtung der Messwerte für Cumarin in Abbildung 37 (a) nimmt die Fluoreszenzintensität bei einer Co-Monomerkonzentration von 0,005 % bis 0,05 % von $0,6 \times 10^6$ auf $31,4 \times 10^6$ bei linearer Auftragung linear zu. Bei Konzentrationen $> 0,05$ % nahm die Intensität bis auf einen Wert von $2,4 \times 10^6$ bei einer Co-Monomerkonzentration von 10% ab. Unterhalb einer Konzentration von 0,005 % war die Fluoreszenzintensität nur sehr gering.

In Abbildung 37 (b) steigt die Fluoreszenzintensität für den Farbstoff Rhodamin bei einer Co-Monomerkonzentration von 0,005 % bis 0,1 % von $0,001 \times 10^6$ auf $0,55 \times 10^6$ linear an. Bei Konzentrationen $> 0,05$ % Co-Monomer nahm die Fluoreszenzintensität bis auf einen Wert von $0,04 \times 10^6$ bei 10% Co-Monomer ab. Auch hier änderte sich der Wert der Intensität bei einer Konzentration $< 0,005$ % Co-Monomer nur noch unwesentlich.

Die Trends der Messpunkte verlaufen in beiden Abbildungen sehr ähnlich und unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Intensität. Zudem nimmt für Rhodamin in Abbildung 37 (b) die Fluoreszenzintensität erst bei einem Wert von 0,1 % Co-Monomer durch Quenchen ab, während dieser Effekt bei Cumarin in Abbildung 37 (a) schon bei 0,05 % Co-Monomer sichtbar ist.

3.5.2 Zellversuche

Um die spezifische Aufnahme, und dadurch die Anreicherung der Partikel in einem bestimmten Zielgewebe zu erhöhen, wurden die copolymerisierten $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikel mit Cystein-Tyr³-Octreotate (Cys-TATE) funktionalisiert. Die Cys-TATE funktionalisierten und native $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikel wurden auf Biokompatibilität und die Aufnahme der Partikel durch AR42J Zellen (*Rattus norvegicus*, exokrine Pankreastumorzelle) geprüft. AR42J Zellen besitzen aufgrund von Überexpression eine sehr hohe Anzahl an Somatostatinrezeptoren und sollten deshalb die Cys-TATE funktionalisierten $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikel bevorzugt in das Innere der Zelle aufnehmen oder spezifisch an der Zelloberfläche binden. Auf diese Weise kann eine Aussage getroffen werden, ob die prinzipielle Möglichkeit besteht den Kontrast der Zellen durch Funktionalisierung der Partikel zu erhöhen, um diese als Kontrastmittel für Zellspezifische Untersuchungen verwenden zu können. Die Zellen wurden verschiedenen Konzentrationen von Cys-TATE funktionalisierten und nativen $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Nanopartikeln ausgesetzt. Nach 20 h Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und in separaten Teströhrchen für die Untersuchung in CT und MRT gesammelt. Die Wechselwirkung der funktionalisierten und nativen Partikel mit den Zellen wurde untersucht und der Kontrast wurde verglichen. Zur Diskussion stehen die CT Aufnahmen bei einer Röhrenspannung von 120 keV. Die Aufnahmen bei 70 keV und 150 keV befinden sich im Anhang **A6**.

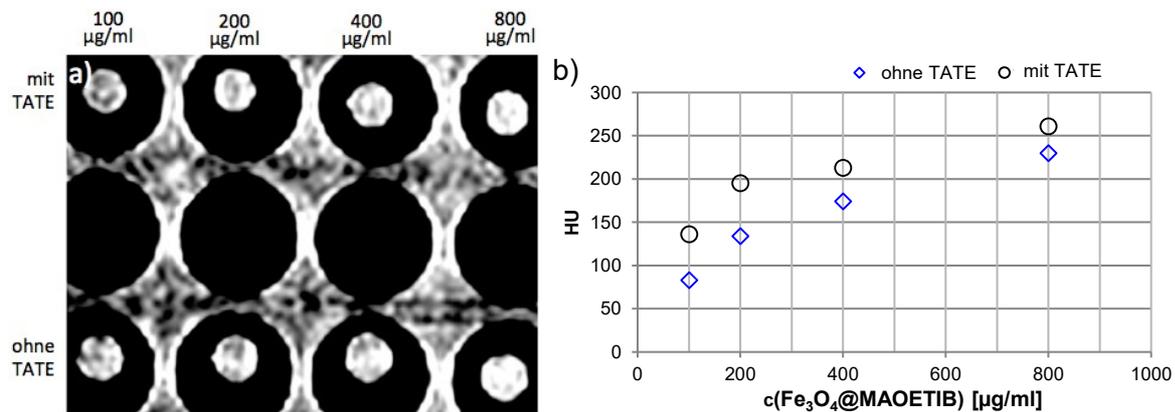


Abb. 38: (a) CT Aufnahmen von AR42J Zellen inkubiert mit nativen und Cys-TATE funktionalisierten $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikeln; Partikeldurchmesser mit Cys-TATE: $d_{\text{DLS}} = 65$ nm und ohne Cys-TATE: $d_{\text{DLS}} = 60$ nm; $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Konzentration 100 - 800 $\mu\text{g/ml}$ mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44$ %; Röhrenspannung 120 keV (b) zugehörige CT Signalintensität in Abhängigkeit der $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Konzentration

Abbildung 38 (a) zeigt die CT Aufnahmen der AR42J Zellen bei verschiedenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Konzentrationen mit einer Röhrenspannung von 120 keV. Durch den sichtbaren Kontrast in beiden Versuchsreihen ist zu erkennen, dass sowohl die nativen als auch die funktionalisierten Partikel von den Zellen aufgenommen wurden. Der CT Kontrast nahm mit steigender Kontrastmittelkonzentration bei beiden Versuchsreihen (100 - 800 $\mu\text{g/ml}$) zu.

Abbildung 38 (b) zeigt die zugehörigen Hounsfield Werte zu den CT Bildern. Durch die limitierte Partikelaufnahme der Zellen ist der Verlauf der Messpunkte nicht linear. Für die mit nativen $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikeln inkubierten Zellen nahm der CT Kontrast von 83 HU (100 $\mu\text{g/ml}$) auf 230 HU ($c = 800$ $\mu\text{g/ml}$) zu. Mit den Cys-TATE funktionalisierten Partikeln nahm der CT Kontrast von 136 HU auf 261 HU zu. Beim

Vergleich der Ergebnisse aus beiden Versuchsreihen ist zu erkennen, dass die Zellen mit den Cys-TATE funktionalisierten Partikeln einen besseren Kontrast lieferten als die Zellen mit den nativen Partikeln. Die mittlere Differenz aus allen vier Versuchen errechnet sich zu 46 HU. Abbildung 39 zeigt die Relaxationsraten bei verschiedenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Konzentrationen.

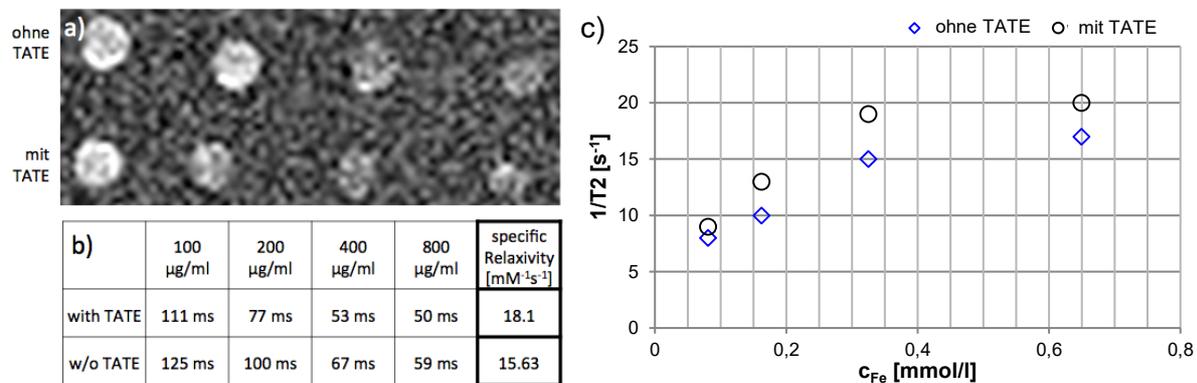


Abb. 39: (a) Spin-Echo MRT Aufnahmen von AR42J Zellen bei einer $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Konzentration von 100 - 800 $\mu\text{g/ml}$ mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44\%$; Echozeit $t_E = 50$ ms; Partikeldurchmesser mit Cys-TATE: $d_{\text{DLS}} = 65$ nm und ohne Cys-TATE: $d_{\text{DLS}} = 60$ nm (b) zugehörige Tabelle mit den T_2 Relaxationszeiten und der spezifischen Relaxivität der Verdünnungsreihen (c) zugehörige MRT Relaxationsraten in Abhängigkeit der Fe_3O_4 Konzentration

Die Spin-Spin-Relaxation nahm für beide Versuchsreihen mit steigender Kontrastmittelkonzentration (100 - 800 $\mu\text{g/ml}$) zu. In Abbildung 39 (a) ist eine Zunahme des Schwarzkontrasts mit zunehmender Kontrastmittelkonzentration zu sehen. Die Relaxation verlief bei den Zellen mit Cys-TATE funktionalisierten $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikeln schneller als bei den Zellen mit den nativen Partikeln. Die Relaxationsraten waren für die funktionalisierten Partikel größer als für die nativen Partikel (vgl. Abb. 39 c). Die Zunahme der Relaxationsraten war wie bei den CT Aufnahmen in Abbildung 38 (b) durch eine limitierte Aufnahmefähigkeit der Partikel durch die Zellen nicht linear. Die mittlere Differenz der $1/T_2$ Relaxationsraten aus allen vier Versuchen betrug $2,75\text{ s}^{-1}$ und die spezifische Relaxivität ist bei den funktionalisierten Partikeln mit $18,1\text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ um $2,47\text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ größer als bei den nativen Partikeln (vgl. Abb. 39 b).

4 DISKUSSION

4.1 Herstellung der Fe₃O₄ Nanopartikel

Die Fe₃O₄ Partikel wurden mit einer basischen Fällungsreaktion aus einer wässrigen Fe²⁺/Fe³⁺-Lösung gewonnen (vgl. Gl. 7, Kapitel 1.2.2) und nach der Reaktion durch Natriumoleat stabilisiert. Die Reaktionsparameter wurden variiert und die Partikelgröße nach der Reaktion mit DLS bestimmt.

Die Fe₃O₄ Nanopartikel entstehen bei der basischen Fällungsreaktion ohne gezieltes Animpfen durch homogene Keimbildung. Die Partikel wachsen nicht wie bei der heterogenen Keimbildung an Fremdkeimen heran, sondern aus einer homogenen, übersättigten Lösung. Die homogene Keimbildung wird nach dem Modell von LaMer beschrieben.⁸² Die Sättigung S der Lösung errechnet sich aus $S = c/c_{\text{Sättigung}}$.

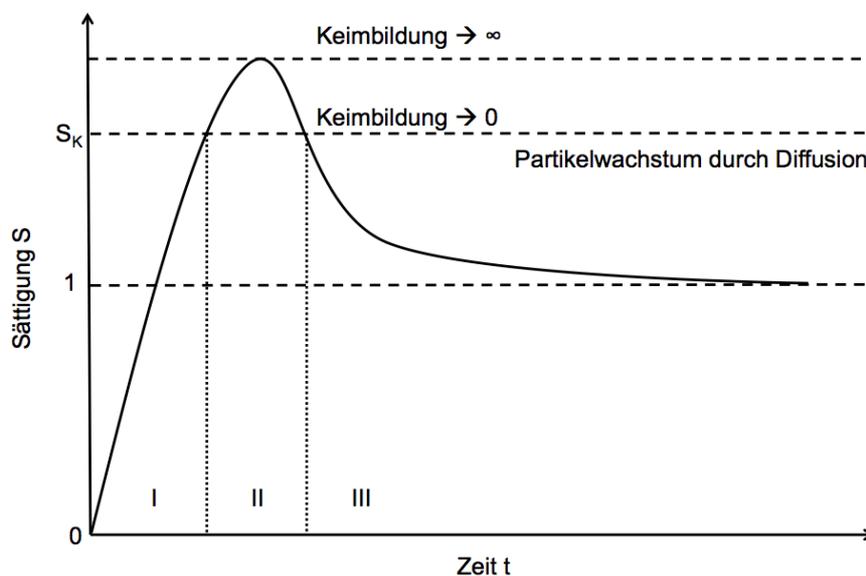


Abb. 40: LaMer Diagramm - Sättigung S in Abhängigkeit der Zeit t bei der homogenen Keimbildung⁸³

Bei der Zugabe der wässrigen Fe²⁺/Fe³⁺-Stammlösung in Ammoniak erreicht die Löslichkeit der gebildeten Fe₃O₄ Monomere rapide ihr Maximum bis zur Sättigungskonzentration bei $S = 1$ (Abschnitt I). Da keine Keime für das Partikelwachstum vorhanden sind, kommt es zunächst zu einer Übersättigung ($S > 1$). Nach weiterer Überschreitung der Sättigungskonzentration kommt es bei der kritischen Übersättigung S_K bedingt durch hohe thermodynamische Instabilität zu einer spontanen Bildung von Fe₃O₄ Keimen (Abschnitt II). Die Partikel wachsen nun durch Diffusion der Fe₃O₄ Monomere gleichmäßig an den gebildeten Fe₃O₄ Keimen heran (Abschnitt III). Die Bildung weiterer Keime erfolgt nicht, da die Fe₃O₄ Monomere für das Partikelwachstum verbraucht werden und dadurch die Übersättigung abgebaut wird. Die finale Partikelgröße hängt bei der homogenen Keimbildung somit von der Anzahl der in Abschnitt II gebildeten Keime ab. Aus einer weiteren Überschreitung der kritischen Übersättigung S_K resultieren mehr Keime und demnach kleinere Nanopartikel.

Thermodynamisch betrachtet gibt es eine energetische Grenze für den spontanen Übergang einer übersättigten homogenen Phase in eine heterogene Phase. Nach Überschreitung dieser Grenze beginnt die Bildung der Kristallisationskeime. Die freie Enthalpie ΔG der Kristallisation errechnet sich mit der spezifischen freien Oberflächenenergie γ und ΔG_v (Energiedifferenz eines gelösten Fe_3O_4 Monomers und eines kristallinen Fe_3O_4 Moleküls) wie folgt.

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v \quad (\text{Gl. 8})$$

mit

$$\Delta G_v = -\frac{RT \ln S}{V_m} \quad (\text{Gl. 9})$$

In Gleichung 9 ist V_m das molare Volumen des Kristalls. Mit einem positiven Wert für γ und einem negativen Wert für ΔG_v bei Übersättigung der Lösung ergibt sich eine ΔG - r -Kurve, bei der das Maximum ΔG^* der kritische Radius r^* der Kristallisationskeime ist.

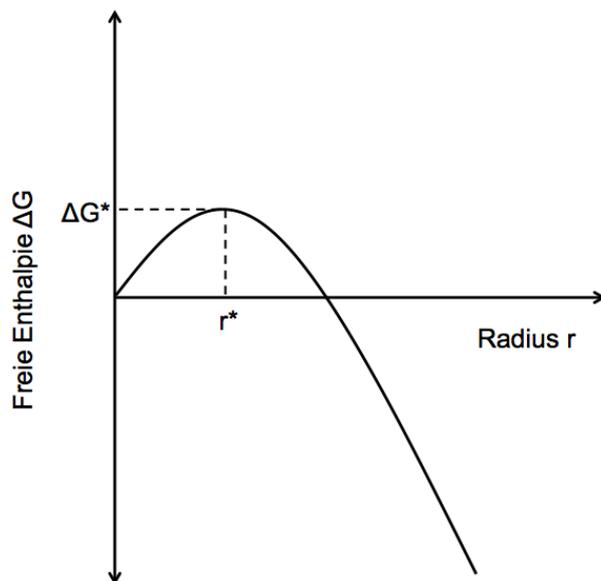


Abb. 41: ΔG - r -Diagramm bei der Kristallisation aus homogener Lösung

Keime mit einem Radius $< r^*$ würden sich sofort wieder auflösen, während Keime $> r^*$ in heterogener Phase stabil sind. Das heißt für die spontane Bildung *unlöslicher* Keime muss die Übersättigung bei der Keimbildungsreaktion also so groß sein, dass sich Keime $> r^*$ bilden.⁸³

4.1.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden in zwei Versuchsreihen mit zwei verschiedenen Natriumoleat (SO) Konzentrationen ($\gamma_{SO} = 5 \text{ mg/ml}$; $\gamma_{SO} = 3 \text{ mg/ml}$) jeweils sechs Experimente unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen ($C_{\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}} = 0,01 \text{ mol/l}$; $x_{\text{NH}_3} = 25 \%$; $1400/\text{min}$) durchgeführt. Die Partikeldurchmesser wurden mit dynamischer Lichtstreuung bestimmt (vgl. Abb. 9, Kapitel 3.1.1). Für jede Versuchsreihe lagen die sechs gemessenen Partikelgrößen in derselben Größenordnung. Die minimalen Abweichungen sind zufälliger Natur, etwa bedingt durch den Einfluss der Reaktionsapparatur oder der Messgeräte. Die Partikelgrößen in Abbildung 9 sind chronologisch geordnet und es ist kein zeitlicher Trend zu erkennen. Die absolute und relative Standardabweichung für die Experimente mit $\gamma_{SO} = 5 \text{ mg/ml}$ beträgt $7,4 \pm 1 \text{ nm} \pm 13,5 \%$. Die absolute und relative Standardabweichung für die Experimente mit $\gamma_{SO} = 3 \text{ mg/ml}$ beträgt $110 \pm 7 \text{ nm} \pm 6,3 \%$. Der Prozess wies eine gute Stabilität auf und die Ergebnisse waren reproduzierbar.

Aus dieser Stichprobe mit 6 Einzelmessungen wurde der Mittelwert \bar{x} berechnet. Unter Annahme einer Normalverteilung der Messwerte ließ sich für die Stichprobe mit Hilfe der statistischen Software MiniTab eine Student-t-Verteilung erstellen. Die t-Verteilung ermöglichte die Abschätzung eines Bereiches, in der sich der reale Mittelwert μ der Grundgesamtheit befindet.

Die Ergebnisse in Abbildung 42 wurden unter Anwendung von Gleichung A1 (siehe Anhang **A8**) und des Student Faktors ($t_{95\%} = 2,571$) bei einem Konfidenzniveau von 95 % ermittelt.

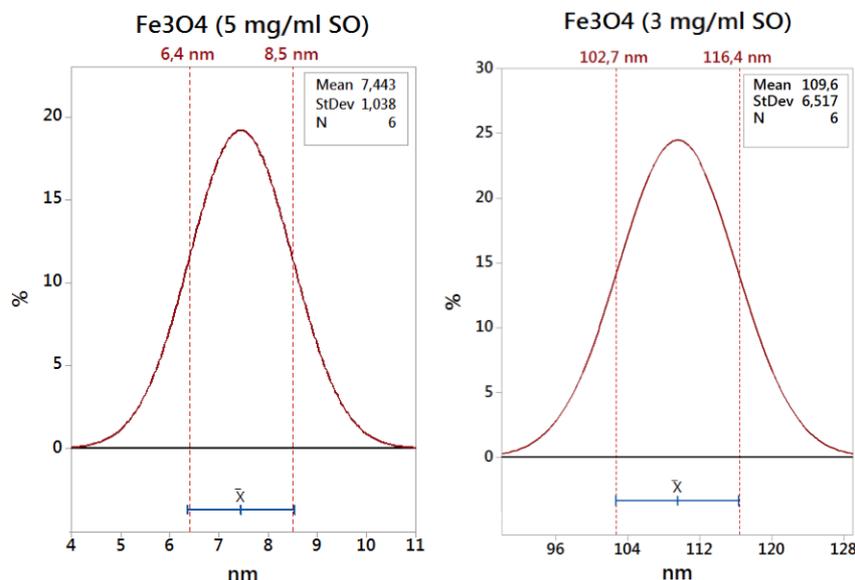


Abb. 42: Student-t-Verteilung der Fe_3O_4 Partikelgrößen aus 6 identischen Versuchen mit 5 mg/ml Natriumoleat und 3 mg/ml Natriumoleat

Für eine Natriumoleat Konzentration von 5 mg/ml liegt der wahre Mittelwert μ der Stichprobe mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zwischen 6,4 - 8,5 nm. Hieraus errechnet sich eine relative Abweichung von $\pm 13,5 \%$ vom Mittelwert der sechs gemessenen Partikelgrößen. Für eine Natriumoleat Konzentration von 3 mg/ml liegt der wahre Mittelwert zwischen 102,7 - 116,4 nm mit $\pm 6,3 \%$ relativer Abweichung.

4.1.2 Einfluss der Stabilisatormenge

In Kapitel 3.1.2 wurde die Stabilisatormenge bei der Fällungsreaktion von Fe_3O_4 variiert. Als Stabilisator wurde Natriumoleat verwendet. Die Variation der Stabilisatormenge hatte einen großen Einfluss auf die Partikelgröße (vgl. Abb. 10). Der mit DLS bestimmte Fe_3O_4 Partikeldurchmesser wurde mit zunehmender Natriumoleat Konzentration kleiner.

Fe_3O_4 Nanopartikel neigen aufgrund ihrer großen spezifischen Oberfläche zur Agglomeration über Wechselwirkungskräfte, zum Beispiel die van-der-Waals Kräfte.⁵⁹ Durch Stabilisierung der Nanopartikel kann der Bildung solcher Aggregate entgegen gewirkt werden, wobei es zwei Möglichkeiten gibt. *Sterische* Stabilisatoren sind meist kurz- bis mittelkettige (typischerweise C_{18}) Polymere oder Tenside, welche auf der Partikeloberfläche anlagern und andere Partikel auf Abstand halten. Die Freiheitsgrade der Tensidketten auf der Partikeloberfläche werden bei Annäherung an andere Partikel geringer. Aus einer Einschränkung der Bewegungsmöglichkeit der Tensidketten resultiert eine Abnahme der Entropie. Dieser Zustand ist nicht auszuschließen, jedoch unwahrscheinlicher als frei bewegliche Tensidketten. Durch entropische Abstoßung wird somit die Agglomeration der Partikel verhindert. Bei einer *elektrostatischen* Stabilisierung lagern sich um eine geladene Partikeloberfläche entsprechende Gegenionen an und bilden eine elektrochemische Doppelschicht. Die Stabilisierung der Partikel erfolgt durch elektrostatische Abstoßung. Sowohl die entropische, als auch die elektrostatische Abstoßung steht mit den van-der-Waals Kräften im Gleichgewicht. Je nach Stabilisator überlagern sich sterische und elektrostatische Stabilisierungseffekte.^{52,59,62,70,84}

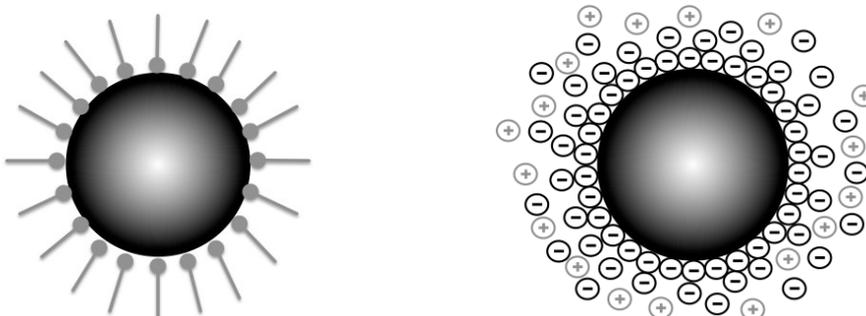


Abb. 43: Schematische Darstellung der Stabilisierungsmöglichkeiten von Nanopartikeln (a) sterische Stabilisierung durch Tensidketten (z.B. Natriumoleat) (b) elektrochemische Stabilisierung durch Ladungen

Die Partikeloberfläche eines Fe_3O_4 Nanopartikels wird bei einer Stabilisierung mit Natriumoleat an den endständigen Eisenatomen mit $-\text{OH}$ Gruppen terminiert. Unmittelbar nach der Entstehung eines Nanopartikels lagern sich die beiden Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe von Natriumoleat über Wasserstoffbrückenbindungen an die Oberfläche der Fe_3O_4 Partikel an und stabilisieren diese elektrostatisch in wässriger Umgebung.^{56,84,85}

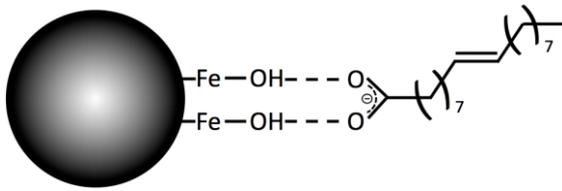


Abb. 44: Schematische Darstellung der Bindung des Oleat-Anions an die Oberfläche von Fe_3O_4 Nanopartikeln über Wasserstoffbrückenbindungen

Das Zetapotential eines Fe_3O_4 Partikels ohne Stabilisatoren beträgt -10 mV (pH 7).⁸⁶ Das leicht negative Zetapotential beruht hier auf der teilweisen Dissoziation von den an der Partikeloberfläche gelegenen $-\text{OH}$ Gruppen zu $-\text{O}^-$. Das chemische Gleichgewicht liegt jedoch stark auf der Seite des undissoziierten Hydroxids und die Stabilisierung der Partikel ist sehr schwach. Durch die Anlagerung von negativ geladenen Carboxylatgruppen an die Partikeloberfläche hatten die SO stabilisierten Fe_3O_4 Partikel bei einem pH-Wert von 7 ein Zetapotential von -59 mV (gemessen mit dem Zetasizer ZS90) und sind so nach der Fällungsreaktion stabiler.

Stehen nicht genügend Stabilisatormoleküle zur Verfügung bilden sich Agglomerate aus Fe_3O_4 Primärpartikeln, wodurch der Anstieg des mit DLS bestimmten Fe_3O_4 Durchmessers in Abbildung 10 zu erklären ist. Der Anlagerungsprozess von Natriumoleat an die Partikeloberfläche ist kinetischer Natur und ist abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit der Natriumoleat Moleküle an die Partikeloberfläche. Die Größe der Agglomerate ist somit abhängig von der Stabilisatormenge (vgl. Abb. 10) jedoch auch von der Anzahl der Primärpartikel (vgl. Abb. 11). Bei Verminderung der Stabilisatormenge bei gleicher Primärpartikelzahl oder bei einer Erhöhung der Primärpartikelzahl bei gleicher Stabilisatormenge entstehen durch die relativ geringere Stabilisatormoleküldichte an der Partikeloberfläche kleine Lücken, welche zu Agglomeration über van-der-Waals Kräfte führen. Dieser Effekt ist in Abbildung 10 ab einer Natriumoleat (SO) Konzentration von $\gamma_{\text{SO}} = 3$ mg/ml durch den sprunghaften Anstieg der Partikelgröße zu sehen.

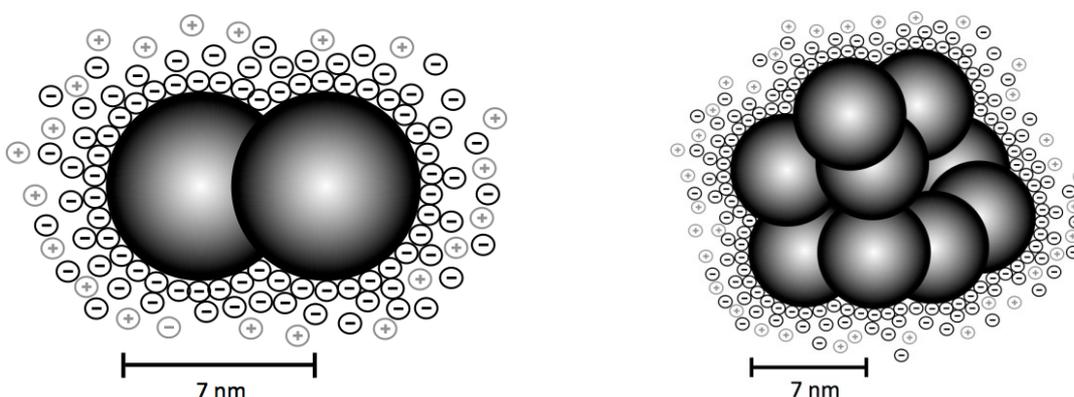


Abb. 45: Schematische Darstellung zweier agglomerierter mit Natriumoleat stabilisierter Fe_3O_4 Partikel (links) und ein großes Fe_3O_4 Aggregat bestehend aus mehreren Primärpartikeln (rechts)

Für die weiteren Prozessschritte in organischer Umgebung ermöglichte die unpolare Kette des Oleat Anions die Überführung der Partikel in organische Lösungsmittel.

Anders als bei der elektrostatischen Stabilisierung über das Zetapotential in wässriger Umgebung sind die Kohlenwasserstoffketten in organischen Medien frei beweglich und die Partikel sind in Ölsäure sterisch stabilisiert. Durch Zugabe von Ölsäure konnten die van-der-Waals Bindungen der Agglomerate gelöst und die einzelnen Partikel voneinander getrennt werden.⁵⁹

4.1.3 Einfluss der $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Eduktkonzentration

Die $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Eduktkonzentration wurde bei der Fe_3O_4 Nanopartikelsynthese von 0,005 - 0,04 mol/l bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen variiert. In Abbildung 11 (Kapitel 3.1.3) ist ein Anstieg der Partikelgröße mit zunehmender Konzentration zu erkennen.

Wie in Kapitel 4.1.2 ausführlich diskutiert, handelt es sich hierbei um Aggregate kleiner Fe_3O_4 Primärpartikel mit $d = 7$ nm. Der Grund für die Bildung solcher Aggregate ist die relative Abnahme der Stabilisatorkonzentration bei zunehmender $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration. Bei höheren $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Konzentrationen bildeten sich mehr Nanopartikel und die lokal verfügbaren Stabilisatormoleküle reichten für eine vollständige Ummantelung der Nanopartikel nicht mehr aus, wodurch die Partikel agglomerierten und die mit DLS bestimmte Partikelgröße zunahm. Die Diffusion der Stabilisatormoleküle an die Partikeloberfläche war bei den Versuchen ab einer Eduktkonzentration von 0,02 mol/l limitiert und es ist in Abbildung 11 zwischen 0,01 mol/l und 0,02 mol/l ein Sprung in der Partikelgröße zu erkennen.

4.1.4 Einfluss der Rührergeschwindigkeit

In Kapitel 3.1.4 wurde die Rührerdrehzahl bei der Synthese mit sonst gleichen Reaktionsbedingungen variiert und die Partikelgrößen des Produkts mit DLS gemessen und verglichen. Die Experimente zeigten, dass bei kleineren Rührerdrehzahlen in der DLS größere Partikel entstanden (vgl. Abb. 12).

Durch das Verringern der Rührerdrehzahl wurde auch die Durchmischung der Komponenten herabgesetzt. Somit war auch direkt nach der Entstehung der Fe_3O_4 Partikel die Diffusion der Stabilisatormoleküle an die Partikeloberfläche begrenzt, da der konvektionelle Stofftransport durch die verminderte Durchmischung kleiner war. Bei verringerter Rührergeschwindigkeit waren lokal zu wenige Stabilisatormoleküle vorhanden um die Partikeloberfläche aller entstandenen Partikel komplett zu bedecken und es bildeten sich bei Herabsetzen der Rührerdrehzahl Agglomerate. Bei großer Rührerdrehzahl hingegen wurden durch die intensive Durchmischung stetig Stabilisatormoleküle an die Partikeloberfläche transportiert und die Partikel konnten vor der Agglomeration stabilisiert werden.

4.2 Herstellung der polyMAOETIB Nanopartikel

Die polyMAOETIB Nanopartikel wurden mit Mikroemulsionspolymerisation synthetisiert. Das MAOETIB Monomer wurde zusammen mit dem Lösungsmittel Toluol und einem Tensid unter Bildung von Mizellen fein in Wasser dispergiert und mit einem radikalischen Polymerisationsprozess in den Mizellen zum Polymer umgewandelt. Der Prozess wurde unter Variation der Reaktionsparameter untersucht und optimiert.

4.2.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Reproduzierbarkeit der Nanopartikelsynthese wurde mit Hilfe von fünf identischen Experimenten bei gleichen Reaktionsbedingungen untersucht. Als Tensid wurde Natriumoleat (SO) verwendet. Die jeweils fünf Experimente wurden in zwei Versuchsreihen für zwei verschiedene Größenbereiche mit zwei unterschiedlichen Tensidbeladungen von $X_{SO} = 0,06$ und $X_{SO} = 0,11$ durchgeführt (AIBN/Monomer Verhältnis 1:500; Reaktionstemperatur 70°C). Für jede Tensidbeladung lagen die jeweils fünf Partikelgrößen in derselben Größenordnung (vgl. Abb. 14, Kapitel 3.2.1). Die absolute und relative Standardabweichung für die Experimente mit $X_{SO} = 0,06$ beträgt $199 \pm 5 \text{ nm} \pm 2,5 \%$. Die absolute und relative Standardabweichung für die Experimente mit $X_{SO} = 0,11$ beträgt $124 \pm 6 \text{ nm} \pm 4,8 \%$.

Unter Berücksichtigung der geringen Anzahl der Messwerte ließ sich analog zu Kapitel 4.1.1 eine Student-t-Verteilung erstellen. Mit Hilfe des Student Faktors t ließ sich für ein Konfidenzintervall von 95 % ($t_{95\%} = 2,571$) der Vertrauensbereich des Mittelwerts bestimmen.

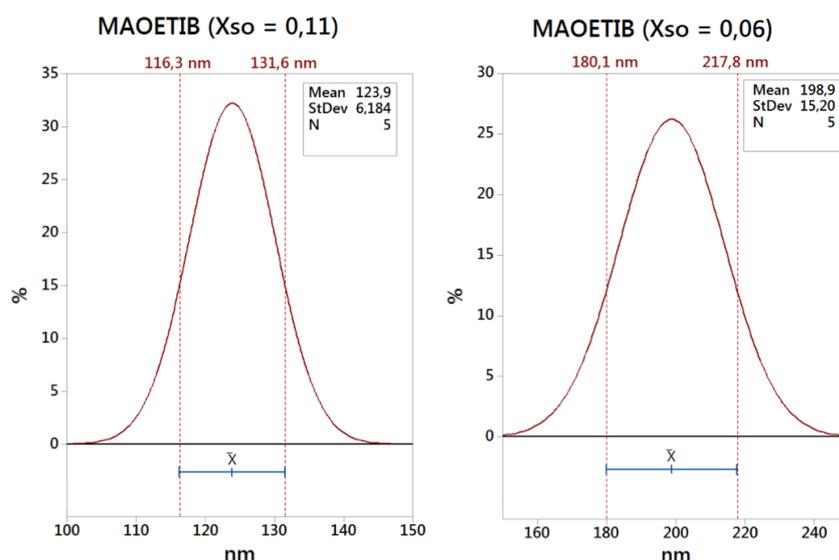


Abb. 46: Student-t-Verteilung der polyMAOETIB Partikelgrößen aus 5 identischen Experimenten mit $X_{SO} = 0,11$ und $X_{SO} = 0,06$

Für $X_{SO} = 0,11$ liegt der wahre Mittelwert der Stichprobe mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zwischen 116,3 - 131,6 nm. Für den Mittelwert der fünf gemessenen Partikelgrößen errechnet sich eine relative Abweichung von $\pm 6,1 \%$. Für $X_{SO} = 0,06$

liegt der wahre Mittelwert zwischen 180,1 - 217,8 nm und die relative Abweichung beträgt $\pm 9,5\%$.

Der Prozess wies eine gute Stabilität und Reproduzierbarkeit auf. Entscheidend für eine gute Reproduzierbarkeit ist die thermodynamische Kontrolle der Partikelgröße. Im Gegensatz zu kinetisch kontrollierten Prozessen wie beispielsweise bei der Emulsionspolymerisation ist die finale Partikelgröße bei der Mikroemulsionspolymerisation unabhängig von einer langen Reaktionszeit.

4.2.2 Einfluss der Tensidmenge und der Tensidart

Der Mikroemulsionspolymerisation wurde mit fünf verschiedenen Tensiden und unterschiedlichen Tensidmengen durchgeführt und die Partikelgröße nach der Partikelaufbereitung mit DLS bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.2). Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natriumoleat (SO) wurden als anionische Tenside verwendet. Cetylpyridiniumchlorid (CPC), Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTACl) wurden als kationische Tenside verwendet. Die Kettenlängen der Tenside sind bei SO mit C_{18} und bei CTAB und CTACl mit C_{19} in etwa gleich, lediglich CPC mit C_{16} und SDS mit C_{12} sind etwas kürzer, wobei die Größe der polyMAOETIB Partikel nur leicht von der unterschiedlichen Charakteristik der verwendeten Tenside beeinflusst wurde (vgl. Abb. 15). Die Einsatzmenge der Tenside war hingegen ausschlaggebend für die nach der Reaktion erhaltene Partikelgröße. Aus einer Erhöhung der Tensidbeladung resultierten kleinere Partikel.

Anders als die Fällung von Fe_3O_4 (vgl. Kapitel 3.1), ist die Mikroemulsionspolymerisation kein kinetisch abhängiger, sondern ein thermodynamisch kontrollierter Prozess. Die Partikelgröße wird nicht durch Diffusionsprozesse der Tensidmoleküle, sondern durch die thermodynamische Stabilität von Tensidmizellen bestimmt. Das Reaktionssystem besteht bei der Mikroemulsionspolymerisation aus einer wässrigen Phase und einer organischen Phase mit einer relativ hohen Menge an Tensid. Das Monomer ist in der organischen Phase gelöst. Bei intensiver Durchmischung des zweiphasigen Gemischs werden die organischen Tröpfchen von dem Tensid ummantelt und es bilden Mizellen, welche auf unbestimmte Zeit thermodynamisch stabil sind. In diesen Mizellen findet im nächsten Prozessschritt die Polymerisationsreaktion statt.

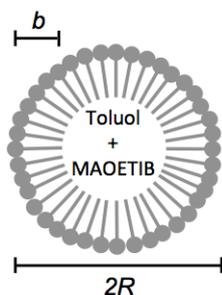


Abb. 47: Schematische Darstellung einer Toluol/MAOETIB Mizelle mit dem Radius R und der mittleren Dicke b der Mizellenhülle

Die Größe der Polymerpartikel ist bei der Mikroemulsionspolymerisation hauptsächlich von der Tensidmenge im Reaktionssystem abhängig. Aus einer

höheren Tensidmenge resultieren kleinere Mizellen und demnach kleinere Partikel. Dieses Verhalten wurde von Antonietti et al. in der Literatur intensiv diskutiert.⁸⁷⁻⁸⁹ Laut der Theorie für Mikroemulsionen ist die thermodynamisch günstigste Position für Tensidmoleküle die Grenzfläche zwischen wässriger und organischer Phase. Mit zunehmender Tensidmenge im Reaktionssystem bei sonst gleichen Einsatzmengen vergrößert sich diese Grenzfläche, wodurch die Mizellen kleiner werden.

Unter der Annahme idealer, kugelförmiger Mizellen mit einheitlicher Größe und einer Monolage des Tensids um den organischen Kern, wird die Mizellengröße in Mikroemulsionen hauptsächlich durch das Verhältnis S der Tensidmenge (m_{Tensid}) zur Masse der organischen Phase (m_{org}) beeinflusst.^{87,88}

$$S = \frac{m_{\text{Tensid}}}{m_{\text{org}}} \quad (\text{Gl. 10})$$

Mit Hilfe der Dichten des Tensids ρ_{Tensid} und des organischen Kerns ρ_{org} lässt sich analog das Volumenverhältnis der gesamten Mizelle zum Kern bestimmen, und somit der Radius R der Mizellen berechnen. Der Parameter b ist die mittlere Dicke der Mizellenhülle, welche den hydrophoben Kern (Toluol/Monomer) von Wasser trennt.⁸⁸

$$\frac{m_{\text{Tensid}}}{m_{\text{org}}} = \frac{\rho_{\text{Tensid}} \left(\frac{4}{3} \pi R^3 - \frac{4}{3} \pi (R-b)^3 \right)}{\rho_{\text{org}} \frac{4}{3} \pi (R-b)^3} \approx \frac{R^3}{(R-b)^3} - 1 \quad (\text{Gl. 11})$$

$$R_{\text{Mizelle}} \approx b \left(1 - (1+S)^{-\frac{1}{3}} \right)^{-1} \quad (\text{Gl. 12})$$

Der allgemeine Zusammenhang zwischen der Tensidmenge und der Partikelgröße wird durch Gleichung 12 sehr gut wiedergegeben, es kann jedoch für jedes System individuell zu Abweichungen von dem idealisierten Modell kommen. Der Parameter b bezieht sich auf eine Monolage der Tensidmoleküle um den organischen Kern. In der Praxis jedoch sind häufig je nach Tensidart mehrere Lagen um eine Mizelle und b ist eine komplexe Funktion von S .^{88,89} Eine weitere Voraussetzung für einen stabilen Prozess ist eine sehr geringe Löslichkeit des Monomers in Wasser. Aufgrund dieser individuellen Parameter kann Gleichung 12 nicht ohne weitere Bedingungen für jedes Mikroemulsionssystem angewendet werden und es kann keine generell gültige Vorhersage der Partikelgröße getroffen werden. Die Art und Einsatzmenge des Monomers, der Co-Monomere, des Lösungsmittels, des Tensids, des Initiators und die Reaktionstemperatur können die Partikelgröße und die Polymerisationskinetik beeinflussen.⁸⁹

Der prinzipielle Trend der Messpunkte in Abbildung 15 (Kapitel 3.2.2) korreliert trotz individueller Reaktionsbedingungen für jedes Tensid mit Gleichung 12. Abbildung 48 zeigt exemplarisch den Partikelgrößenverlauf der Experimente mit Natriumdodecylsulfat (SDS) aus Abbildung 15 in Abhängigkeit von S und die zugehörige berechnete Kurve aus Gleichung 12. Die im Diagramm eingezeichnete Ausgleichskurve ergibt sich durch Minimierung der Fehlerquadrate der Messwerte und den mit Gleichung 12 berechneten Partikeldurchmessern.

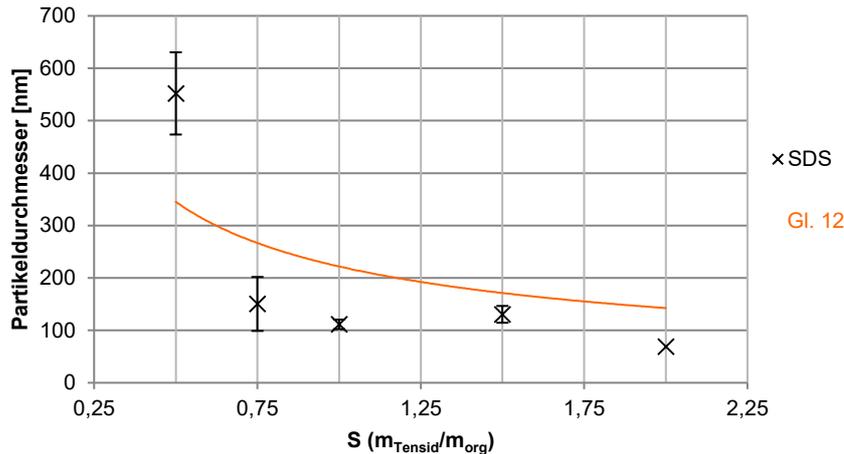


Abb. 48: Partikelgröße von polyMAOETIB synthetisiert mit SDS in Abhängigkeit des Verhältnisses S ($m_{\text{Tensid}}/m_{\text{org}}$) und Gleichung 12 angepasst an die Datenpunkte von SDS mit variablem Parameter b

Die Partikelgrößen erstreckten sich für die Messpunkte (SDS) von 69 bis 552 nm und die berechnete Kurve liegt in einem Größenbereich von 146 bis 354 nm. Beim Vergleich der Kurve mit den Messpunkten sind Abweichungen zu erkennen, wobei das Verhältnis der gemessenen Partikelgröße zu der theoretisch berechneten Partikelgröße qualitativ gut dargestellt wird. Der Wert für b war bei einer Anpassung von Gleichung 12 an die Messdaten (vgl. Abb. 48) im System polyMAOETIB für SDS mit 45 nm, sowie bei den anderen Tensiden aus Kapitel 3.2.2 circa um das zehnfache größer als theoretisch erwartet ($b_{\text{theoretisch}} \approx 0,5$ nm), und kann daher nicht exakt auf das ideale Modell für Mikroemulsionen übertragen werden. Die Ausgleichskurve und die experimentell ermittelten Daten weisen dennoch einen ähnlichen Trend auf, wobei die Partikelgrößen für große Tensidmengen etwas unterhalb und die Partikelgrößen für $S < 0,75$ etwas oberhalb der Ausgleichskurve liegen.

Abweichungen von Gleichung 12 erklären sich im System Toluol/MAOETIB wie folgt. Der Parameter b hängt in der Praxis von dem Verhältnis S ab.^{88,89} Das Innere der Mizelle bestand bei der Polymerisation von polyMAOETIB hauptsächlich aus Lösungsmittel (Toluol) mit einem Toluol/Monomer Massenverhältnis von 4:1 und das Monomer nahm nur einen kleinen Raum in den Mizellen ein. Demnach entsprach die Mizellengröße nicht der mit DLS gemessenen Größe der Polymerpartikel. Durch das Auswaschen von Toluol vor der DLS Messung ergab sich somit eine systematische Abweichung der Messwerte von der idealen Kurve in Abbildung 15 und die Partikelgrößen lagen bei großen Tensidmengen unterhalb der Kurve.

Für sehr kleine Tensidmengen ($S = 0,5$) lagen die gemessenen Partikelgrößen oberhalb der Kurve von Gleichung 12 und die Fehlerbalken sind, auch für die anderen Tenside (vgl. Abb. 15), etwas breiter. Die Breite der Fehlerbalken vergrößerte sich durch Messabweichungen bei den drei DLS Messungen. Die Modellvorstellung geht von einer kompletten Bedeckung der wässrig/organischen Grenzfläche und einer definierten Grenze zwischen Wasser/Tensidmonolage/Kern aus. In der Praxis ist es jedoch möglich, dass sich gerade bei kleinen Tensidmengen die Mizellen durch Lücken in der Tensidmonolage zu größeren Mizellen zusammenschließen, oder die Mizellengröße durch zu geringe Anzahl der Tensidmoleküle etwas ungleichmäßiger ist (bei $X < 0,06$ bzw. $S < 0,5$ konnten keine Nanopartikel synthetisiert werden).⁸⁸ Bei kleinen Tensidmengen ist daher bei der DLS mit

größeren Messfehlern zu rechnen. Große Partikel sedimentieren während der DLS Messung schneller zu Boden als kleine Partikel. Bei DLS Messungen wird davon ausgegangen, dass keine gerichtete Bewegung der Teilchen durch Strömung oder Sedimentation stattfindet. Die Partikelgröße wird lediglich über die brownische Molekularbewegung charakterisiert. Bei kleinen Tensidmengen verschiebt sich durch eine stärker ausgeprägte Sedimentation größerer Partikel die Partikelgrößenverteilung während der drei DLS Messungen leicht in Richtung kleinerer Durchmesser, wodurch die Fehlerbalken etwas größer werden.

Weitere Abweichungen von Gleichung 12 können durch eine sehr geringe, jedoch nicht unmögliche Löslichkeit des MAOETIB Monomers in Wasser verursacht werden. Zudem ist Toluol in den Mizellen zwar ein sehr gutes Lösungsmittel für das MAOETIB Monomer, Teile des Polymers fallen mit wachsender Kettenlänge in den Mizellen durch Mikrophasenseparation aus. Die Löslichkeit des Polymers im organischen Lösungsmittel bestimmt die Stabilität einer Mikroemulsion und die Korrelation der tatsächlichen Partikelgrößen mit Gleichung 12.⁸⁹

Trotz der Abweichung von der Theorie und von Gleichung 12 war der Prozess reproduzierbar und die Partikelgröße ließ sich durch Variation der Tensidmenge von 30 nm bis 930 nm sehr gut steuern. Im Gegensatz zu den anderen Tensiden konnten mit CTACl und CPC keine Nanopartikel gewonnen werden. Die Größe der Partikel lag hier bei 2 - 5 μm . Die relativ kleinen Chloridionen der beiden Tenside besitzen für ihre Größe eine dennoch hohe Ladungsdichte und störten durch elektrostatische Polarisierungseffekte den Ablauf der Polymerisation. Stark polarisierende Gegenionen sind schlecht für den Prozess. Zur Bestätigung dieser These wurden Versuche mit CTAB unter Zugabe von Chloridionen (Natriumchlorid) durchgeführt, woraus Mikropartikel in der selben Größenordnung resultierten.

Es wurde experimentell ermittelt, dass bei radikalischen Polymerisationsprozessen auch die Einsatzmenge des Radikalstarters eine Rolle spielte (vgl. Kapitel 3.3.2, Abb. 15 a,b). Unterschiedliche Verhältnisse des Radikalstarters (AIBN) beeinflussten eher den Trend der Kurven als die Partikelgrößen. Vor allem bei kleineren Tensidmengen und analog größeren Partikeln unterscheiden sich die Kurven in Abbildung 15 in ihrer Form. Bei einem molaren AIBN/Monomer Verhältnis von 1:500 besitzen die Kurven eine größere Krümmung und die Partikelgröße stieg bei abnehmender Tensidmenge stärker an (vgl. Abb. 15 a), während ein molares AIBN/Monomer Verhältnis von 1:1000 einen eher linearen Anstieg der Partikelgröße zur Folge hatte (vgl. Abb. 15 b). Die Theorie der Mikroemulsionspolymerisation mit hoher Quervernetzung enthält keinen Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Initiator. Wie oben erwähnt, gibt es laut der Theorie für Mizellen eine strikte Grenze zwischen wässriger und organischer Phase durch eine Monolage des Tensids. Im Gegensatz dazu kommt es bei einem realen Prozess während der Reaktion mit Toluol/MAOETIB/H₂O/Tensid durch die Restlöslichkeit von Toluol und des Monomers in Wasser zusätzlich zu Transport- und Diffusionsprozessen über die wässrig/organischen Grenzfläche. Zudem können einzelne Mizellen während des Polymerisationsvorganges ineinander übergehen. Eine geringere AIBN/Monomer Konzentration verlangsamte den Polymerisationsprozess, während die Transportprozesse unverändert blieben und den Gesamtprozess stärker beeinflussten. Hieraus resultierten experimentell unterschiedliche Partikelgrößen des Produkts unter Variation der verwendeten Initiatormenge.

Durch eine größere Initiatormenge konnten die genannten Störfaktoren vermindert werden, da die Polymerisationsrate größer war. Zudem war der Einfluss von

Restsauerstoff im Reaktionssystem geringer, welcher den radikalischen Polymerisationsvorgang störte. Dies hatte positive Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit und Prozessstabilität, daher wurde für weitere Versuche das AIBN/Monomerverhältnis von 1:500 verwendet.

Zusätzlich zu den DLS Messungen wurden die polyMAOETIB Partikel mit verschiedenen Größen (unter Variation der Tensidmenge) nach der Partikel-aufbereitung mit einem Atomic Force Mikroskop (AFM) bildlich dargestellt. Als Tensid wurde Natriumoleat verwendet. Die Partikelgrößenanalyse der AFM-Software ermöglicht zudem das Erstellen einer Größenverteilung der Aufnahmen.

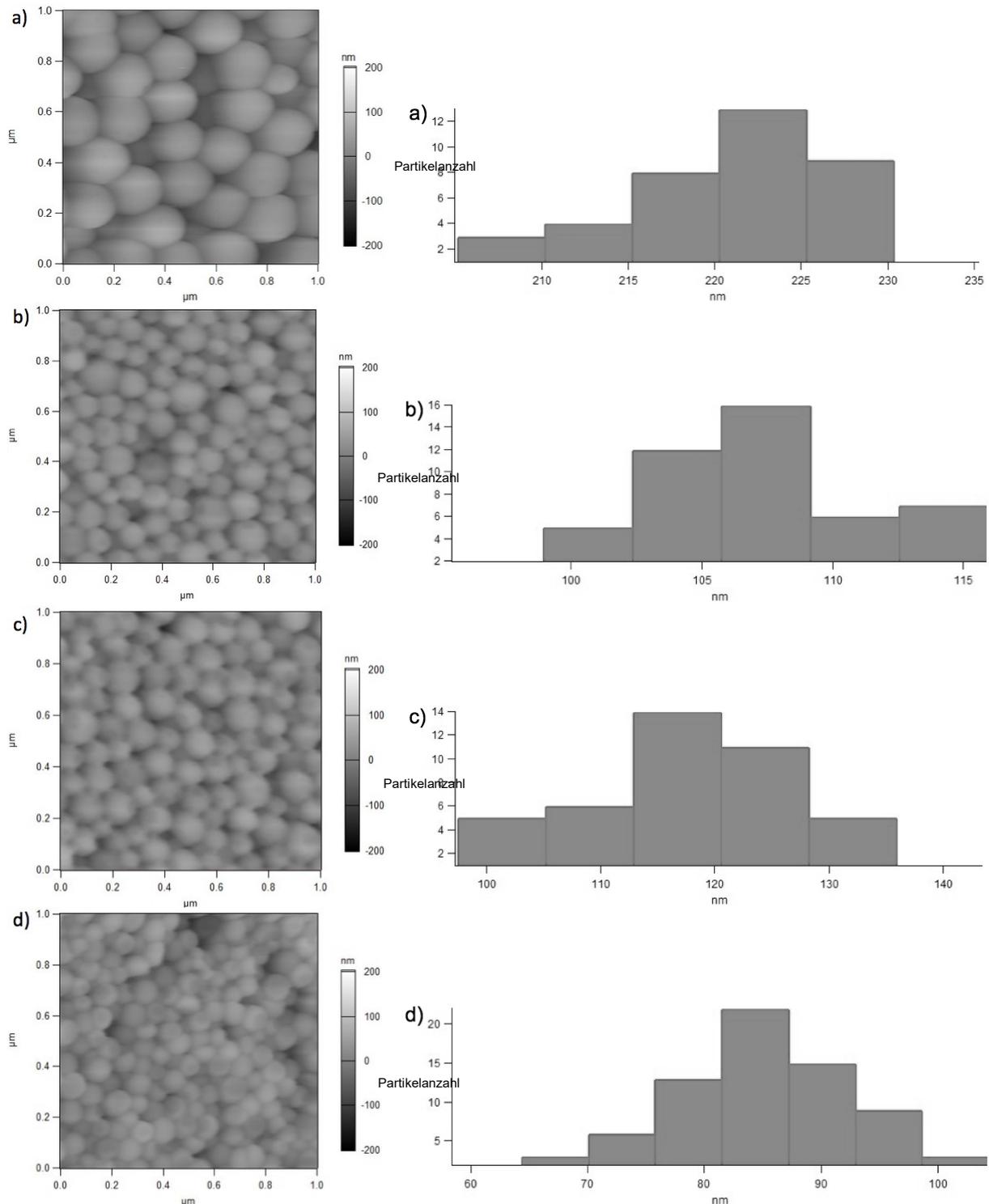


Abb. 49: AFM Aufnahmen von polyMAOETIB Partikeln gefällt in H₂O und synthetisiert mit (a) $X_{SO} = 0,056$ (b) $X_{SO} = 0,083$ (c) $X_{SO} = 0,11$ und (d) $X_{SO} = 0,16$ mit zugehörigen Partikelgrößenverteilungen (a) $d_{AFM} = 221 \pm 8$ nm, $d_{DLS} = 226$ nm (b) $d_{AFM} = 107 \pm 15$ nm, $d_{DLS} = 113$ nm (c) $d_{AFM} = 115 \pm 12$ nm, $d_{DLS} = 121$ (d) $d_{AFM} = 84 \pm 10$ nm, $d_{DLS} = 96$ nm

Die Bilder zeigen uniforme, sphärische Partikel mit annähernd einheitlicher Größe für die jeweilige Tensidmenge. Die mit AFM und DLS bestimmten Partikelgrößen liegen in derselben Größenordnung. Leichte Schwankungen der Partikelgröße bei

Verwendung unterschiedlicher Messverfahren sind nicht unüblich. Die Partikeldurchmesser von AFM und DLS sind zum Vergleich in Abbildung 50 dargestellt.

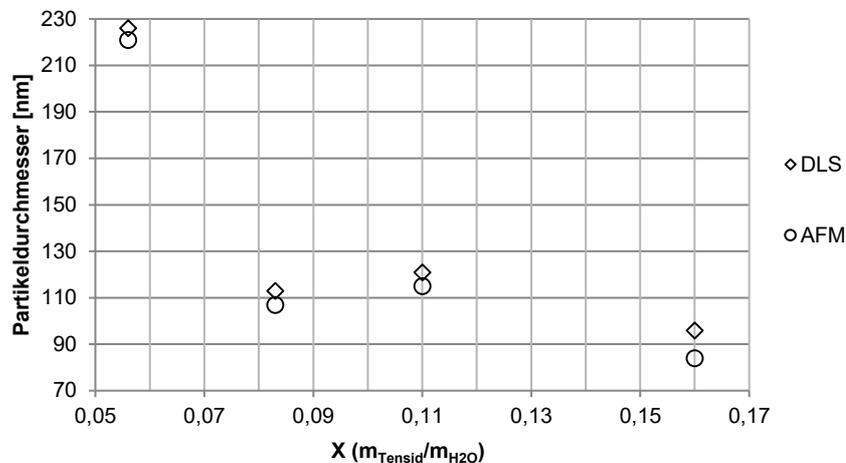


Abb. 50: Partikeldurchmesser von polyMAOETIB gemessen mit AFM und DLS im Vergleich

Die mit DLS gemessenen Partikelgrößen sind in Abbildung 50 für jeden Messpunkt circa 10 nm größer als die mit dem Mikroskop bestimmten Partikelgrößen. Die Größenabweichungen der beiden Messmethoden sind auf die Probenvorbereitung für AFM Messungen oder Fehlerquellen bei der DLS Messung (z.B. leichte Schwankungen der Lösungsmittelviskosität, Probenkonzentration oder Proben-temperatur) zurückzuführen.

Bei der DLS wurde zur Messung eine wässrige Partikeldispersion verwendet. Für die Messung mit dem Mikroskop wurden die Nanopartikel getrocknet und sind daher etwas kleiner. Die Partikelgröße wird zudem bei DLS Messungen über den Diffusionskoeffizienten bestimmt, wobei von einer idealen Kugel ausgegangen wird. In einer realen Partikeldispersion befinden sich in wässriger Lösung stabilisierende Gegenionen um die Partikel, welche die Diffusion der Partikel zwar nur geringfügig, jedoch messbar verringern. Daher erscheinen die Partikel bei den DLS Messungen etwas größer als unter dem AFM.

4.2.3 Untersuchung weiterer Prozessparameter

Die Reaktionstemperatur war ein weiterer Optimierungsparameter für den radikalischen Polymerisationsprozess. Die Polymerisationsreaktion wurde bei den Temperaturen 50°C, 60°C und 70°C durchgeführt und der Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Partikelgröße mit DLS untersucht. Bei den Versuchen stieg die Partikelgröße bei Herabsenken der Reaktionstemperatur unter 70°C rapide an (vgl. Abb. 17, Kapitel 3.2.3).

Laut der Theorie für Mikroemulsionen sind die Mizellen thermodynamisch stabil und die Partikelgröße wird von der Reaktionstemperatur nicht beeinflusst. Somit ist die Mizellengröße nach einer idealen Modellvorstellung identisch mit der finalen Partikelgröße. Bei einem nicht idealen Prozess kommt es während der Polymerisation hingegen zu Diffusions- und Transportprozessen.⁸⁹ Bei herab-setzen

der Reaktionstemperatur ist die Polymerisationsrate substantiell geringer. Diffusions- und Transportprozesse bleiben hingegen von Temperaturänderungen größtenteils unbeeinflusst und wurden daher bei geringeren Temperaturen im Prozess dominanter, wodurch die Partikelgröße zunahm. Daher sind Reaktionstemperaturen zwischen 60 - 70°C für einen gut definierten Prozess notwendig. Eine weitere Temperaturerhöhung > 70 °C hatte keine weiteren Vorteile.

In weiteren Versuchen wurden die Dispersionsintensität und -zeit variiert (vgl. Abb. 18, Kapitel 3.2.3). Das Reaktionsgemisch (Toluol/MAOETIB/Tensid/H₂O) wurde vor dem Start der Polymerisationsreaktion bei unterschiedlichen Drehzahlen von 5000 - 25000 min⁻¹ dispergiert und der Einfluss der Dispersionsintensität auf die Partikelgröße untersucht. Die Partikelgröße wurde mit DLS bestimmt. Zusätzlich wurde bei einer konstanten Drehzahl von 25000 min⁻¹ die Dispersionszeit von 10 - 600 s variiert und die Partikelgröße nach der Reaktion mit DLS bestimmt.

Eine Veränderung der Dispersionsintensität beeinflusste bei den Experimenten die Partikelgröße, wobei mit steigender Drehzahl die Partikel kleiner und die Fehlerbalken enger wurden (vgl. Abb. 18 a). Durch die Änderung der Drehzahl änderte sich auch der Energieeintrag in das Mikroemulsionssystem. Der Energieeintrag in das System nahm mit steigender Drehzahl zu und die Mizellen erfuhren am Rotor/Stator größere Scherkräfte. In der Verfahrenstechnik wird die im System erbrachte Rührerleistung P über die Newton Zahl Ne definiert. Die Newton Zahl ist eine für jedes Rührwerk individuelle, dimensionslose Kennzahl. Die Rührerleistung kann mit Hilfe der Dichte ρ der Flüssigkeit, der Drehzahl n und des Rührerdurchmesser d_R bestimmt werden.⁹⁰

$$P = Ne \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d_R^5 \quad (\text{Gl. 13})$$

In turbulenter Strömung ist die Newton Zahl konstant und es gilt für die Leistung und die Drehzahl somit $P \propto n^3$. Die Mikroemulsionspolymerisation ist ein thermodynamisch limitierter Prozess, wobei der thermodynamisch stabile Zustand der Mizellen nach $t \rightarrow \infty$ ohne äußeren Einfluss erreicht würde. Idealerweise bestehen Mizellen nach Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts aus einer Monolage des Tensids (vgl. Abb. 47) mit einheitlicher Größe und sind auf unbestimmte Zeit stabil. Vor Erreichen dieses Zustandes bestehen die Mizellen aus multiplen Lagen von Tensidmolekülen und die Abstände der Tensidmoleküle können von Mizelle zu Mizelle variieren. Durch den Energieeintrag $P \cdot t$ wird das Erreichen des Gleichgewichtszustandes beschleunigt. Je größer die Drehzahl, desto schneller wird der stabile Zustand der Mizellen erreicht. Die mittlere Partikelgröße und die Fehlerbalken in Abbildung 18 (a) wurden demnach mit steigender Drehzahl kleiner. Das Verkürzen der Dispersionszeit auf 10 Sekunden bei konstanter Dispersionsdrehzahl von 25000 min⁻¹ hatte zur Folge, dass das Mikroemulsionssystem nach Beenden des Energieeintrags noch nicht im thermodynamischen Gleichgewicht war (vgl. Abb. 18 b). Ein Energieeintrag von 10 s reichte nicht aus um die Größe der Mizellen gleichermaßen zu minimieren und es entstanden demnach keine Nanopartikel mit einheitlicher Größe. Nach einer Dispersionszeit > 30 s waren die Mizellen im thermodynamischen Gleichgewicht und alle Mizellen hatten den notwendigen Eintrag an Energie erfahren und besaßen dieselbe Größe. Die gemessene Partikelgröße änderte sich daher bei den Experimenten mit längerem Energieeintrag nicht mehr.

4.2.4 Alternative Einsatzstoffe

Die polyMAOETIB Nanopartikel wurden zusätzlich zu den in Kapitel 3.2.2 verwendeten Tensiden mit den biokompatiblen Tensiden Brij 35 und Tween 20 synthetisiert, um den Herstellprozess umwelt- und patientenfreundlicher zu gestalten. Die beiden Tenside sind anders als die kationischen und anionischen Tenside aus Kapitel 3.2.2 nicht ionisch und besitzen an der Mizellenoberfläche keine Ladung. Der Verlauf der Partikelgröße bei den Versuchen aus Abbildung 19 (Kapitel 3.2.4) ähnelt den Größenverläufen aus Abbildung 15 (Kapitel 3.2.2). Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, hatte die Art des Tensids einen Einfluss auf den Trend der Messpunkte. Bei dem Vergleich der Ergebnisse aus beiden Versuchsreihen in Abbildung 19 ist zu erkennen, dass mit Brij 35 bei hohen Tensidmengen die kleinsten Partikel entstanden, und mit Tween 20 ein breiteres Größenspektrum möglich war. Die beste Variante für einen biokompatiblen Prozess war dennoch Natriumoleat als Salz einer natürlichen Fettsäure. Natriumoleat wies eine gute Stabilität im Polymerisationsprozess auf und die Ergebnisse waren reproduzierbar. Daher wurde Natriumoleat standardmäßig bei allen weiteren Polymerisationsvorgängen verwendet.

Die Experimente mit Chlorbenzol als alternatives Lösungsmittel zeigten, dass prinzipiell die Möglichkeit besteht neben Toluol auch andere Lösemittel bei der Polymerisation zu verwenden. Die Trendlinien aus Abbildung 20 (Kapitel 3.2.4) mit Chlorbenzol als Lösungsmittel und Abbildung 15 (Kapitel 3.2.2) mit Toluol sind sich sehr ähnlich, was auf die sonst gleichen Reaktionsbedingungen zurückzuführen ist. Bei Mikroemulsionspolymerisationen ändert sich die Partikelgröße und somit der Trend der Messpunkte individuell für die Änderung der Reaktionsparameter, so auch bei der Verwendung eines anderen Lösungsmittels.⁸⁹ Das bedeutet, dass je nach Reaktionsparameter keine allgemein gültigen Aussagen für Mikroemulsionen und den Verlauf der Mizellen- und Partikelgröße festgelegt werden können, und diese Aussagen nur experimentell zu ermitteln sind.

Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, konnten mit CTACl und CPC aufgrund der Chloridionen keine Nanopartikel synthetisiert werden. Größere Mengen an CTAB ($X_{CTAB} > 0.11$) resultierte auch hier in gel-ähnlichen Produkten, welche mit DLS nicht mehr analysiert, und medizinisch nicht weiter verwendet werden konnten.

4.2.5 Partikelaufbereitung

Die Aufbereitung der Partikel, vor Allem das Entfernen der großen Mengen an Tensid und Lösungsmittel, ist für eine medizinische Anwendung eines intravenös verabreichten Kontrastmittels essentiell. Eine zeitaufwendige Möglichkeit wäre das Waschen der Partikel durch Zentrifugieren und Redispersieren in H_2O , wobei Tensid und Lösungsmittel in mehreren Schritten entfernt werden. Als schnellere und simple Methode eignete sich das Lösen der Partikel in Tetrahydrofuran (THF) mit anschließendem Fällen in Methanol (MeOH).

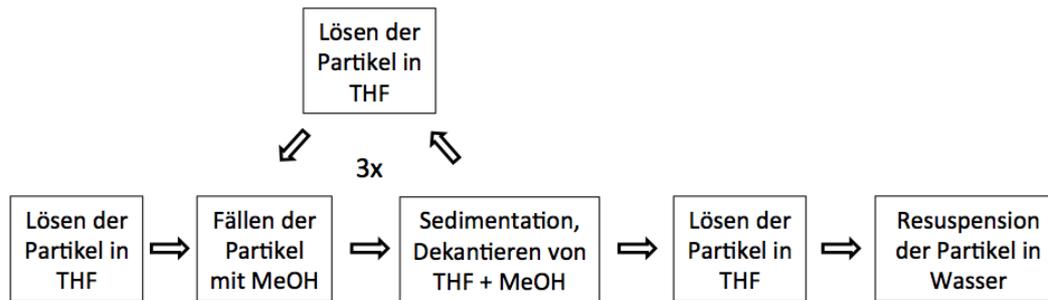


Abb. 51: Schematisches Blockdiagramm der Partikelaufbereitung

Das Tensid und das Toluol konnten nach dem Füllen der Partikel in MeOH dekantiert werden, da die beiden Stoffe in Lösung blieben und nicht mit den gefällten Nanopartikeln sedimentierten. Die Partikel konnten nach drei Waschvorgängen in H₂O redispergiert werden. Sowohl bei den AFM Aufnahmen (vgl. Abb. 49, Kapitel 4.2.2) als auch den TEM Aufnahmen (vgl. Abb. 29 - 31, Kapitel 3.3.4) waren nach dreimaliger Wiederholung der Waschvorgänge keine Tensidreste zu erkennen. Auch die Vitalität der AR42J Zellen wurde von der gewaschenen polyMAOETIB Dispersion nicht beeinflusst (vgl. Abb. 63, Kapitel 4.5.2). Daher wurden die Partikel in allen Versuchen mit drei Waschvorgängen aufbereitet. Der Vorteil dieser Aufbereitung ist ein vergleichsweise geringerer Zeitaufwand zum Zentrifugieren.

Während des Aufbereitungsprozesses änderte sich die Partikelgröße zwischen den einzelnen Prozessschritten (vgl. Abb. 22, Kapitel 3.2.5). THF gilt als gutes organisches Lösungsmittel für viele Polymere und ist zudem gut in Wasser löslich. Bei der Zugabe von THF zu einer wässrigen polyMAOETIB Partikeldispersion quollen die Polymerpartikel. Aufgrund des Verteilungsgleichgewichts von THF in H₂O und polyMAOETIB reicherte sich das THF bevorzugt in den Polymerpartikeln an. Bei sehr geringem Wasseranteil ($\Phi_{\text{H}_2\text{O}} < 5\% \text{ v/v}$) war keine zweite Phase zu erkennen. Die polyMAOETIB Ketten wurden beim Quellen durch den Quervernetzer zusammengehalten und lösten sich nicht komplett voneinander. Beim Lösen der Partikel in THF nach der Reaktion nahm daher die Partikelgröße in der DLS Messung leicht zu (vgl. Abb. 22).

Die Zugabe von MeOH im zweiten Prozessschritt (vgl. Abb. 51) verschob das Verteilungsgleichgewicht von THF stark in Richtung des Methanols. Die gequollenen Polymerpartikel kollabierten schnell und fielen als zweite Phase aus. Da die endständigen Polymerketten einzelner Partikel auch ineinander kollabierten bildeten sich größere Aggregate aus Primärpartikeln, welche schnell zu Boden sedimentierten.

Bei dem Redispergieren der in THF gelösten Partikel in Wasser im letzten Prozessschritt (vgl. Abb. 51) bildeten sich Primärpartikel. Die Partikel waren als zweite Phase sichtbar, aggregierten beim Füllen in H₂O jedoch nicht. Das Verteilungsgleichgewicht von THF wurde hier nicht so stark in Richtung der wässrigen Phase verschoben wie bei der Zugabe von MeOH. Die Partikel waren fein dispergiert und durch das THF immer noch gequollen und die äußeren Polymerketten waren in H₂O/THF je nach Lösungsmittelanteil frei beweglich. Erst durch das thermische Entfernen von THF kollabierten die Primärpartikel langsam und nahmen wieder ihre ursprüngliche Größe an, die sie direkt nach der Reaktion hatten. Das Quellverhalten der quervernetzten polyMAOETIB Partikel in THF wurde zur Untermauerung dieser These untersucht. Hierzu wurde in einem Experiment einer wässrigen polyMAOETIB Dispersion nach und nach THF zugegeben und der

Partikelgrößenverlauf mit DLS bestimmt. Das Quellverhalten von polyMAOETIB in THF ist in Abbildung 52 dargestellt.

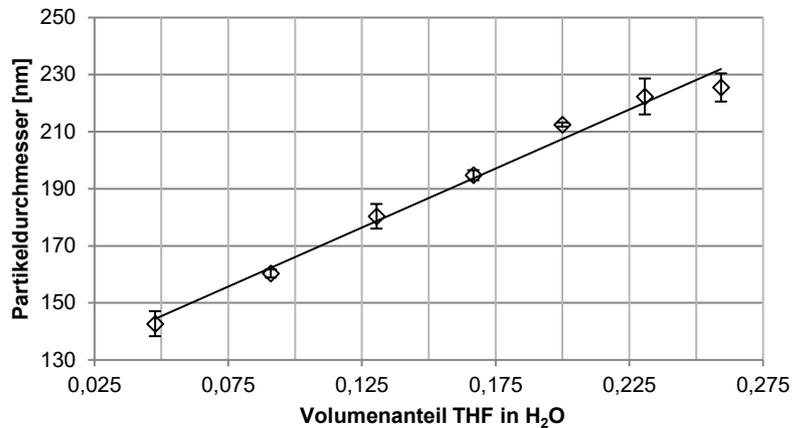


Abb. 52: Partikelgrößen von polyMAOETIB in Wasser/THF mit Trendlinie (linear); Quellverhalten der Nanopartikel unter Zugabe von THF; Synthesebedingungen $X_{SO} = 0,11$ und AIBN/Monomer Verhältnis 1:500; die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Die Versuche zeigten, dass die Partikelgröße durch die Zugabe von THF zu polyMAOETIB/H₂O zunimmt. Zu Beginn des Experiments betrug die Partikelgröße 131 nm in H₂O ohne THF. Mit einem THF Volumenanteil von 0,05 stieg die Partikelgröße auf 143 nm an und nahm mit weiterer Zugabe von THF linear zu. Bei einem Volumenanteil von 0,25 wird die Steigung der Geraden ab einer Größe von 226 nm etwas flacher, da das Quellen von hochvernetzten Polymerpartikeln auf eine maximale Größe limitiert ist. Die Quellung von Polymerpartikeln bei Zugabe geeigneter Lösungsmittel wurde in der Literatur umfangreich untersucht. Kaneda et al. beobachteten ein ähnliches Quellverhalten von PMMA basierten Nanopartikeln bei Zugabe von verschiedenen hydrophilen und hydrophoben organischen Lösungsmitteln.⁹¹

Nach der Partikelauflösung mit THF/MeOH änderte sich die Morphologie der Partikel. Die zentrifugierten Partikel und die Partikel nach dem Aufbereitungsverfahren mit THF/MeOH wurden mit einem Atomic Force Mikroskop (AFM) bildlich dargestellt.

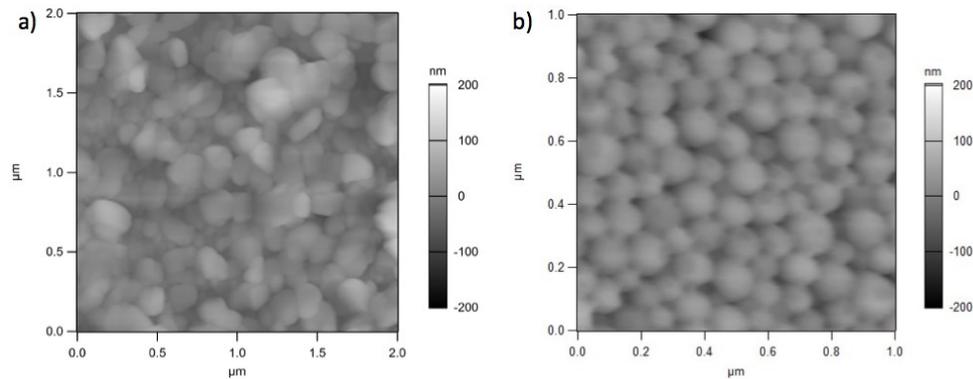


Abb. 53: AFM Aufnahmen von polyMAOETIB Partikeln (a) zentrifugiert und (b) nach Lösen in THF und Fällen in H₂O; Synthesebedingungen X_{SO} = 0,11 und AIBN/Monomer Verhältnis 1:500

Abbildung 53 zeigt das Höhenprofil zweier eingetrockneter Proben unter dem AFM. Abbildung 53 (a) wurde aufgenommen, nachdem die Partikel dreimal zentrifugiert wurden um Tensid und Lösungsmittel zu entfernen. Die Partikel besitzen eine unregelmäßige, nicht kugelförmige Form mit einer Größe von circa 170 nm (DLS 135 nm). Die unregelmäßige Form der Partikel wurde durch Mikrophasenseparation in den Mizellen zwischen Toluol und polyMAOETIB bei wachsendem Molekulargewicht des Polymers hervorgerufen. Toluol ist ein geeignetes Lösungsmittel für das MAOETIB Monomer, jedoch nicht für polyMAOETIB. Das Polymer fällt mit wachsender Kettenlänge in den Mizellen aus.

Die Partikel in Abbildung 53 (b) nach dem Aufbereitungsprozess mit THF/MeOH sind sphärisch mit einem Durchmesser von 115 ± 12 nm (DLS 121 nm). Nachdem die quervernetzten Polymerpartikel nach der Polymerisation in THF gelöst wurden quollen diese (vgl. Abb. 52). Beim Redispergieren in H₂O kollabierten die Partikel wieder und erhielten ihre sphärische Form.

Wären die Nanopartikel nicht quervernetzt, würden sich die Polymerketten in THF vollständig voneinander lösen und die Partikelgröße nach dem Aufbereitungsprozess wäre abhängig davon, wie viele Polymerketten bei der Redispergierung in Wasser ineinander kollabieren. Dennoch war es Wallyn et al. möglich polyMAOETIB Nanopartikel ohne Quervernetzung der Polymerketten herzustellen. Durch Lösen von polyMAOETIB Polymerketten in THF und Fällen in H₂O kollabierten die Ketten ineinander zu Partikeln/Aggregaten mit einer Größe von ca. 150 nm.⁹² Diese Methode eignet sich für eine schnelle Herstellung von polyMAOETIB Nanopartikeln, das Größenspektrum war bei den Versuchen jedoch stark limitiert. Da Zusatzstoffe wie z.B. Fe₃O₄ nach dem Lösen der Partikel ohne Quervernetzung nicht mehr von den einzelnen Polymerketten umschlossen sind, ist eine hohe Quervernetzung für eine definierte Partikelgröße und die dauerhafte Inkorporation von Zusatzstoffen in die Partikel mit wohldefinierter Zusammensetzung von Vorteil.

Die Ausbeute der Partikel nach der Aufbereitung lag sowohl bei MAOETIB als auch bei Fe₃O₄@MAOETIB bei circa 50 - 60 %, die Verluste entstanden beim Dekantieren. Viele Partikel blieben nach dem Fällen MeOH entweder in THF gelöst, oder sie kollabierten in MeOH zu Primärpartikeln, welche nicht sedimentierten. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Partikelqualität, es bieten sich jedoch Optimierungsmöglichkeiten für eine höhere Ausbeute.

Eine Optimierungsmöglichkeit wäre eine Mehrfachaufbereitung des Dekantats. Die dekantierten Partikel könnten wie die gereinigten Partikel in Wasser redispergiert

werden. Ein weiterer Optimierungsparameter wäre der Einsatz eines alternativen Fällungsmittels oder eines Fällungsmittelgemisches um die Anzahl der gefällten Partikel zu erhöhen.

4.2.6 Scale-Up

Zur Überprüfung der Scale-Up Fähigkeit des Mikroemulsionspolymerisationsprozesses wurde der experimentelle Aufbau und die Einsatzmengen um ein Verhältnis von 1:5 und 1:10 skaliert. Die Versuche zeigten, dass sich die Ansatzgröße unter minimaler Schwankung der Partikelgröße sehr leicht nach oben skalieren ließ (vgl. Abb. 23, Kapitel 3.2.6). Der Größenunterschied der Partikel nach Erhöhung der Einsatzmenge ist Prozessbedingt und zufälliger Natur und weist keinen eindeutigen Trend in eine bestimmte Richtung auf. Auch die Größenunterschiede der DLS Messungen direkt nach der Herstellung und nach der Partikelauflösung sind zu vernachlässigen.

Die Mizellen erreichen bei der Mikroemulsionspolymerisation nach intensiver Durchmischung einen thermodynamischen Gleichgewichtszustand und sind dann auf unbegrenzte Zeit stabil. Da das Erreichen dieses Zustands zwar abhängig vom Energieeintrag, jedoch unabhängig von der Ansatzgröße ist, war eine Skalierung der Experimente bei der Herstellung von polyMAOETIB problemlos möglich. Bei einer Ansatzgröße von insgesamt 10 g war ein Energieeintrag von 10 - 30 Sekunden bei 25000 min^{-1} bis zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts notwendig (vgl. Abb. 18 b, Kapitel 3.2.3). Die bei allen Experimenten verwendete Dispersionszeit von 5 Minuten bei einer Drehzahl von 25000 min^{-1} war daher auch bei Ansatzgrößen von 50 g und 100 g ausreichend.

Zudem waren die Stoffe im Prozess nicht Mischungssensitiv und die in den Mizellen entstandene exotherme Reaktionswärme durch die radikalische Polymerisation konnte aufgrund der hohen Wärmekapazität von Wasser einfach durch die H_2O Subphase abgeführt werden. Das Scale-Up der Herstellung von polyMAOETIB mit Mikroemulsionspolymerisation ist somit prinzipiell möglich. Eine weitere Erhöhung auf größere Ansatzgrößen war lediglich durch die Rohstoffmengen und die Apparatur begrenzt.

4.2.7 polyMAOETIB Anwendung im Computertomographen

Zur Überprüfung der Anwendung von polyMAOETIB als Kontrastmittel bei CT Untersuchungen wurde eine wässrige Dispersion der Nanopartikel intramuskulär in den Schenkel eines toten Huhns injiziert. Die Applikation der Dispersion in den Muskel mittels Spritze und Kanüle verlief problemlos und die Anwendung von polyMAOETIB als Kontrastmittel im CT war prinzipiell möglich. Es war kein signifikanter Unterschied in der Bild- bzw. Kontrastqualität zwischen polyMAOETIB und dem kommerziell erhältlichen Iomeprol zu erkennen (vgl. Abb. 24). Aufgrund der gleichen Iodkonzentration lag der Kontrast der polyMAOETIB Partikel im selben Bereich wie der Kontrast von Iomeprol.

Im Vergleich zu Iomeprol sind bei der Anwendung von polyMAOETIB als Kontrastmittel diverse Vorteile zu erwarten. Es sind keine allergischen Reaktionen wie bei der Applikation von Iomeprol bekannt und die niedrige Viskosität der

wässrigen polyMAOETIB Dispersion schont im Vergleich zu dem hochviskosen Iomeprol die Nieren des Patienten.³⁶⁻⁴³ Zudem ist mit einer erhöhten Zirkulationszeit der Partikel im Blut zu rechnen.

Die Zirkulationszeit von Nanopartikeln im Blut hängt von mehreren Faktoren ab, ein wichtiger Faktor ist die Partikelgröße. Nanopartikel < 30 nm werden direkt über die Niere ausgeschieden (Halbwertszeit meist < 1 h).^{36,37,94} Größere Partikel im Bereich weniger μm werden direkt von den Kupffer-Zellen in der Leber erkannt, metabolisiert und über die Galle und letzten Endes den Darm ausgeschieden.^{36,37,93,94} Partikel mit einer Größe von 30 - 150 nm werden hingegen nicht direkt von den Kupffer-Zellen erkannt und werden daher für Untersuchungen mit verlängerter Blutzirkulation verwendet (Halbwertszeit > 10 h).^{36,37,42,43,94}

Eine definierte Partikelgröße allein reicht jedoch für eine erhöhte Zirkulationszeit nicht aus. Zusätzlich zur Größe der Partikel spielt auch deren Oberflächenbeschaffenheit eine wichtige Rolle. Die Oberfläche der 30 - 150 nm großen Partikel muss für eine verlängerte Zirkulationszeit so modifiziert werden, dass im Blutkreislauf keine sofortige Opsonisierung der Partikel erfolgt, da dies die Erkennung der Partikel durch Makrophagen fördert. Klassische Opsonine sind Immunglobuline, Proteine des Komplementsystems (z.B. C1q, C3b) oder Apolipoproteine, welche an die Partikeloberfläche anlagern und den Metabolismus einleiten. Die Modifikation der Partikeloberfläche mit hydrophilen, sterischen Stabilisatoren wie Polyethylenglycol oder anderen hydrophilen Polymeren wie zum Beispiel Polysacharriden unterbindet die Anlagerung dieser Opsonine an die Partikeloberfläche und verzögert somit den Abbau der Partikel.^{42,43,94,95} Die Oberflächenmodifikation von polyMAOETIB Nanopartikeln kann beispielsweise durch Copolymerisation mit anschließender Oberflächenfunktionalisierung (vgl. Kapitel 3.5) erfolgen.

4.3 Herstellung der Fe_3O_4 @MAOETIB Nanopartikel

In diesem Kapitel werden der Prozess der Fe_3O_4 @MAOETIB Synthese und die Optimierung dessen Haupteinflussgrößen diskutiert. Nicht zu den Haupteinflussgrößen gehören die Reaktionstemperatur und die Dispersionsintensität/-zeit. Hier wurden aufgrund der hohen Prozessstabilität und Reproduzierbarkeit die Optimalwerte der polyMAOETIB Herstellung aus Kapitel 3.2 verwendet (Reaktionstemperatur: 70 °C; Ultraturrax Drehzahl: 25000 min^{-1} ; Dispersionszeit: 5 min). Auch die Partikelaufbereitung aus Kapitel 3.2.5 ist im aktuellen Prozess dieselbe und wird deshalb nicht erneut diskutiert. Als Tensid wurde bei den in Kapitel 3.3 beschriebenen Versuchen aufgrund seiner Biokompatibilität ausschließlich Natriumoleat verwendet. Zudem ist Natriumoleat durch seine geringen Herstellungskosten für eine großtechnische Herstellung am wirtschaftlichsten.

4.3.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Zur Untersuchung des der Reproduzierbarkeit des Prozesses wurden die Partikelgrößen (DLS) aus sechs Chargen und vier verschiedenen Zusammensetzungen verglichen. Zum einen waren die Tensidbeladungen konstant bei entweder $X_{\text{So}} = 0,11$ oder $X_{\text{So}} = 0,19$ und zum anderen die Einsatzmengen an Fe_3O_4

konstant bei entweder 3,44 % w/w oder 22,2 % w/w mit einer Gesamtzahl von 4 x 6 Experimenten. Die Versuche wurden mit einem AIBN/Monomer Verhältnis von 1:500 und bei einer Reaktionstemperatur von 70°C durchgeführt. Für jede Zusammensetzung liegen die Partikelgrößen in derselben Größenordnung.

Die absolute und relative Standardabweichung für die Experimente mit 3,44 % w/w Fe₃O₄ mit X_{SO} = 0,11 beträgt 127 ± 4 nm ± 3,2 % und mit X_{SO} = 0,19 liegen die Werte bei 48 ± 4 nm ± 8,3 %. Die absolute und relative Standardabweichung für die Experimente mit 22,2 % w/w Fe₃O₄ mit X_{SO} = 0,11 beträgt 160 ± 5 nm ± 3,1 % und mit X_{SO} = 0,19 liegen die Werte bei 57 ± 6 nm ± 10,5 %. Die Ergebnisse der Versuche waren gut reproduzierbar.

Mit den jeweils sechs Messwerten für jede Versuchsreihe ließ sich analog zu Kapitel 4.2.1 (vgl Abb. 46) eine Student-t-Verteilung erstellen. Für ein Konfidenzintervall von 95 % ließ sich mit Hilfe des Student Faktors (t_{95%} = 2,571) der Vertrauensbereich des Mittelwerts abschätzen. Abbildung 54 zeigt die t-Verteilung für die Experimente mit 3,44 % Fe₃O₄ w/w.

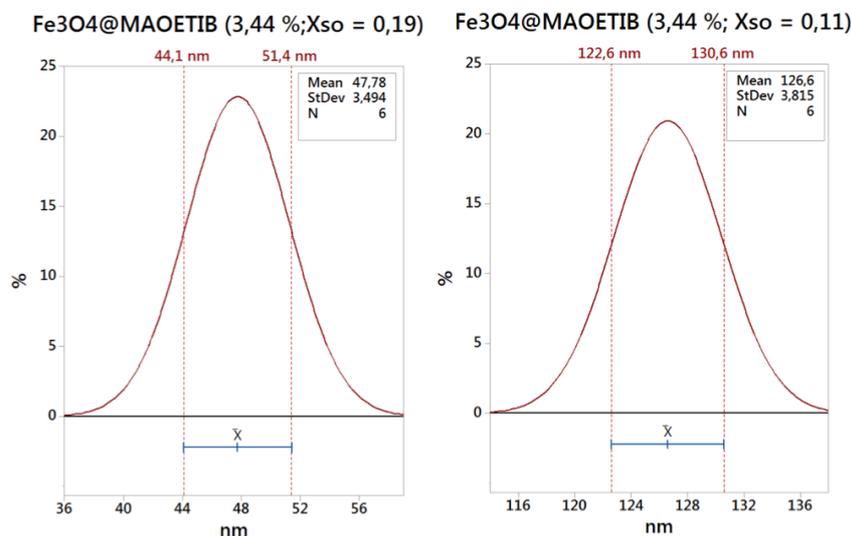


Abb. 54: Student-t-Verteilung der Fe₃O₄@MAOETIB Partikelgrößen aus 6 identischen Versuchen mit 3,44 % Fe₃O₄ w/w und Tensidbeladungen von X_{SO} = 0,19 oder X_{SO} = 0,11

Der wahre Mittelwert der Stichprobe liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % für X_{SO} = 0,19 zwischen 44,1 und 51,4 nm mit einer relativen Abweichung von ± 7,7 % vom Mittelwert der sechs gemessenen Partikelgrößen. Für X_{SO} = 0,11 liegt der Wert zwischen 122,6 und 130,6 nm mit ± 3,2 % relativer Abweichung. Abbildung 55 zeigt die t-Verteilung für die Experimente mit 22,2 % Fe₃O₄ w/w.

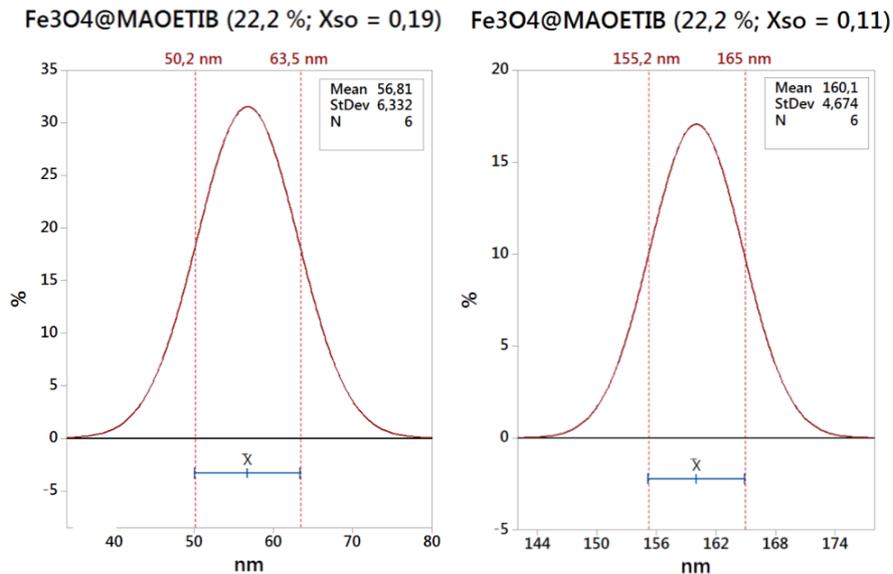


Abb. 55: Student-t-Verteilung der Fe₃O₄@MAOETIB Partikelgrößen aus 6 identischen Versuchen mit 22,2 % Fe₃O₄ w/w und Tensidbelastungen von X_{SO} = 0,19 oder X_{SO} = 0,11

Für X_{SO} = 0,19 liegt der wahre Mittelwert der Stichprobe mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zwischen 50,2 - 63,5 nm, die relative Abweichung vom Mittelwert der sechs mit DLS bestimmten Größen beträgt ± 11,6 %. Für X_{SO} = 0,11 liegt der wahre Mittelwert zwischen 155,2 - 165 nm mit einer relativen Abweichung von ± 3,1 %.

4.3.2 Einfluss der Tensidmenge

Der Einfluss der Tensidmenge auf das Mikroemulsionssystem bei der Polymerisation von polyMAOETIB wurde in Kapitel 4.2.2 ausführlich diskutiert. Bei den Versuchen zur Herstellung von Fe₃O₄@MAOETIB Nanopartikeln ließ sich die Partikelgröße der Polymerpartikel durch die Variation der Tensidmenge gut steuern (vgl. Abb. 26, Kapitel 3.3.2). Die Fe₃O₄@MAOETIB Partikel wurden wie die polyMAOETIB Partikel (vgl. Kapitel 3.2.2) ohne Zusatz von Eisenoxid mit zunehmender Tensidmenge im Reaktionssystem kleiner. Wie schon in Kapitel 4.2.2 beschrieben, vergrößert sich bei der Mikroemulsionspolymerisation mit zunehmender Tensidmenge die Fläche der organisch/wässrigen Grenzschicht und die Mizellen werden kleiner, wodurch sich die Partikelgröße des Polymers über die Mizellengröße sehr gut steuern ließ. Die Partikelgröße war lediglich durch die hohe Viskosität konzentrierter Natriumoleat Lösungen limitiert. Ab einer Natriumoleat (SO) Beladung von X_{SO} > 0,19 war der Reaktionsansatz nichtmehr rührbar und es war kein gleichmäßiger Energieeintrag möglich.

Die Erhöhung des Fe₃O₄ Gehalts hatte einen leichten Anstieg der Partikelgröße zur Folge da die Fe₃O₄ Nanopartikel bei zunehmender Anzahl mehr Raum in den polyMAOETIB Partikeln einnahmen. Die Masse der organischen Phase blieb während der Reaktion konstant, daher ist dieser Effekt auf die Erhöhung des Partikelvolumens zurück zu führen.

4.3.3 Einfluss der Eisenoxidmenge

Der Einfluss der Einsatzmenge an Fe_3O_4 Nanopartikeln auf die Partikelgröße wurde untersucht, indem der organischen Phase in mehreren Versuchen vor der Polymerisation verschiedene Mengen an Eisenoxid zugegeben wurden. Die Partikelgröße wurde mit DLS untersucht.

Die Experimente zeigten, dass bei größeren Fe_3O_4 Einsatzmengen die Partikel insgesamt größer wurden. Mit größeren Fe_3O_4 Mengen bei konstanter MAOETIB Einsatzmenge stieg das Partikelvolumen. Somit nahm bei den Versuchen auch der Partikeldurchmesser zu. Dieser Effekt ist rein geometrisch und ist auf die Addition der Partikelvolumina von polyMAOETIB und Fe_3O_4 zurückzuführen. Die Trendlinien der beiden Datenreihen haben durch die Volumenaddition daher Ähnlichkeit mit einer Funktion der dritten Wurzel (vgl. Abb. 28, Kapitel 3.3.3). Dieser Effekt beeinflusste die Partikelgröße erst nennenswert ab einer Eisenoxidmenge von 3,44 % w/w. Bei den Versuchen für geringere Mengen Fe_3O_4 (0,22 - 1,75 % w/w) ist im Diagramm in Abbildung 56 kein Trend der Partikelgröße zu erkennen. Die y-Achse ist in Abbildung 56 von 70 - 130 nm skaliert.

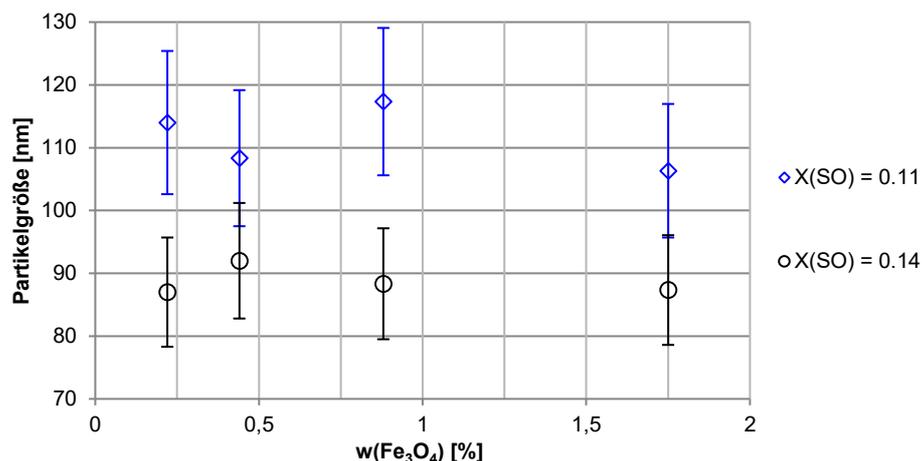


Abb. 56: Partikelgrößen von Fe_3O_4 @MAOETIB unter Variation der Fe_3O_4 Menge von 0,22 - 1,75 % w/w während der Mikroemulsionspolymerisation mit konstanter Tensidmenge (Natriumoleat) bei entweder $X_{\text{SO}} = 0,11$ oder $X_{\text{SO}} = 0,14$; die Datenpunkte und die absoluten Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

Die Partikelgrößen befanden sich bei allen Versuchen für die jeweiligen Tensidmengen in derselben Größenordnung wie polyMAOETIB Partikel ohne Fe_3O_4 . Für die Tensidmenge $X_{\text{SO}} = 0,11$ lag die gemittelte Partikelgröße für alle Versuche bei 112 ± 5 nm und für $X_{\text{SO}} = 0,14$ bei circa 90 ± 3 nm.

Bei Fe_3O_4 Einsatzmengen $< 0,22$ % w/w war es nicht möglich Partikel mit enger Größenverteilung zu synthetisieren (vgl. Abb. 30, Kapitel 3.3.4). Abbildung 57 zeigt die Partikelgrößenverteilung der DLS Software von Fe_3O_4 @MAOETIB Partikeln mit 0,11 % Fe_3O_4 (w/w).

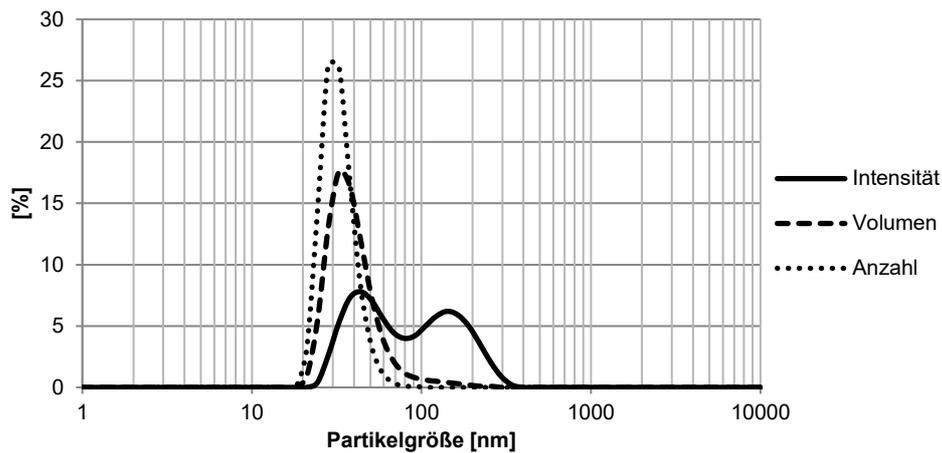


Abb. 57: Partikelgrößenverteilung (DLS) von Fe₃O₄@MAOETIB Partikeln hergestellt mit 0,11 % Fe₃O₄ w/w

In Abbildung 57 sind die Streuintensitäts-, Volumen- und Anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung einer DLS Messung von Fe₃O₄@MAOETIB Partikeln mit 0,11 % Fe₃O₄ w/w abgebildet. Bei der Intensitätsgewichteten Verteilung sind zwei Moden zu erkennen. Es handelt sich um Partikel mit Größen von 49 nm und 142 nm. Bei der Partikelvolumen- und Partikelanzahl gewichteten Größenverteilung ist der Peak bei 142 nm nicht mehr zu erkennen. Durch die unterschiedliche Gewichtung der Verteilungen unterscheiden sich die Peaks in Höhe und Lage.

Das Licht des Lasers wird bei der DLS Messung von großen Partikeln intensiver gestreut als von kleinen Partikeln. Die Streuintensität ist proportional zur sechsten Potenz des Radius r der Partikel. Das bedeutet, Partikel die 10 mal so groß sind streuen das Licht um das 10⁶-fache. Bei der Intensitätsverteilung sind die wenigen großen polyMAOETIB Partikel demnach verhältnismäßig stärker gewichtet und daher als Peak in Abbildung 57 sichtbar. Bei der Umrechnung auf eine volumengewichtete Verteilung skaliert die Streuintensität nur mit r^3 und bei einer anzahlgewichteten Verteilung linear. Der Peak der großen Partikel in der Intensitätsverteilung tritt in der Volumen- und Anzahlverteilung daher nur als Schulter auf und ist kaum zu erkennen.

Da sich bei Eisenoxidmengen < 0,22 % durch eine statistische Verteilung der Eisenoxidnanopartikel sowohl Mizellen mit und ohne Fe₃O₄ im Reaktionssystem befanden, ergaben sich bei der Polymerisation zwei unterschiedliche Reaktionsbedingungen. Aufgrund einer möglichen Oxidation von Fe²⁺ zu Fe³⁺ durch AIBN Radikale an der Fe₃O₄ Partikeloberfläche wurde so die Reaktionsgeschwindigkeit der Polymerisation beeinflusst. Diffusions- und Transportprozesse von Toluol und MAOETIB über die wässrige Subphase beeinflussten das Partikelwachstum und es entstanden Partikel in zwei Größenbereichen. Der Einfluss des AIBN/Monomer Verhältnisses auf die Partikelgröße wurde in Kapitel 4.2.2 ausführlich diskutiert. Eine Oxidation an der Fe₃O₄ Partikeloberfläche durch AIBN Radikale hatte im MRT keinen sichtbaren Einfluss auf den T₂ Kontrast, da das gesamte Partikelvolumen für den Kontrastverstärkenden Effekt verantwortlich ist, wovon die Partikeloberfläche nur einen geringen Anteil einnimmt.

4.3.4 TEM Aufnahmen der Fe₃O₄@MAOETIB Nanopartikel

Die nach der Polymerisation aufbereiteten Fe₃O₄@MAOETIB Partikel wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop bildlich dargestellt. Die Mikroskopaufnahmen aus Abbildung 29 (Kapitel 3.3.4) bestätigten die Einkapselung der Fe₃O₄ Partikel in die Polymerpartikel. Die Fe₃O₄ Partikel wurden bei der Mizellenbildung und während des Energieeintrags vor der Polymerisation statistisch in den Mizellen verteilt und waren nach der Polymerisation von polyMAOETIB umschlossen. Bei einer relativ geringen Fe₃O₄ Einsatzmenge war nicht in allen polyMAOETIB Partikeln dieselbe Anzahl an Fe₃O₄ Kernen zu sehen (vgl. Abb. 29 a,b,c), dieser Effekt nahm mit steigender Einsatzmenge an Fe₃O₄ jedoch sichtbar ab (vgl. Abb. 29 d,e,f). Durch die statistische Verteilung der Fe₃O₄ Partikel in den Mizellen während des Energieeintrags unterlag der Prozess einer gewissen Schwankung, wobei die relative Auswirkung mit steigender Fe₃O₄ Partikelzahl geringer wurde. Bei größeren Fe₃O₄ Einsatzmengen waren die Fe₃O₄ Partikel gleichmäßiger in den polyMAOETIB Partikeln verteilt.

Ausgehend von einer statistischen Gleichverteilung der Fe₃O₄ Partikel in polyMAOETIB ließ sich über die Eduktmengen und die Partikeldurchmesser die Anzahl der Fe₃O₄ Partikel pro Fe₃O₄@MAOETIB Partikel berechnen. Die berechneten Werte sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tab. 19: Berechnete durchschnittliche Anzahl der Fe₃O₄ Kerne (d = 7 nm) pro Fe₃O₄@MAOETIB Partikel (d = 60 nm) bei Variation der Fe₃O₄ Menge während der Partikelsynthese.

w _{Fe₃O₄} [%]	0,11	0,22	0,44	0,88	1,75	3,44	6,65	12,5	22,2
Ø Fe ₃ O ₄ Partikel	1	2	5	9	18	37	73	147	293

Laut Tabelle 19 errechnet sich für einen Fe₃O₄ Anteil von 0,44 % w/w eine durchschnittliche Anzahl von fünf Fe₃O₄ Partikeln pro Polymerpartikel. Für einen Fe₃O₄ Anteil von 3,44 % w/w sind es 37 Fe₃O₄ Partikel. Die berechneten Werte der Eisenoxidkerne in den Polymerpartikeln aus Tabelle 19 stimmen mit den TEM Bildern in Abbildung 29 überein.

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass bei Fe₃O₄ Einsatzmengen < 0,22 % w/w Partikel in zwei Größenklassen entstanden. In den großen polyMAOETIB Partikeln konnten keine Fe₃O₄ Partikel gefunden werden. Die berechnete Anzahl an Fe₃O₄ Partikeln pro Polymerpartikeln hat bei einer Fe₃O₄ Menge von 0,11 % w/w den Wert 1 (vgl. Tabelle 19). Bei zu geringer Fe₃O₄ Menge befanden sich vor der Polymerisation nicht in alle Mizellen Fe₃O₄ Partikel, wodurch zwei verschiedene Klassen von Mizellen, und dadurch Partikel in zwei unterschiedlichen Größenklassen entstanden. Die Reaktionscharakteristik und die daraus resultierende Partikelgröße in Mikroemulsionen kann durch eine Änderung der Reaktionsbedingungen mehr oder weniger intensiv variieren. Hierbei spielen die Wahl des Monomers, des Vernetzers, des Tensids, des Radikalstarters oder des organischen Lösungsmittels eine Rolle, so auch die Zugabe von Fe₃O₄ Nanopartikeln.⁸⁹ Da sich laut Berechnung in jedem Polymerpartikel durchschnittlich ein Fe₃O₄ Partikel befinden sollte, war die Anzahl der großen polyMAOETIB Partikel ohne Fe₃O₄ in den TEM- und AFM-Aufnahmen

sichtbar geringer. Mit Hilfe eines Schnitts durch die AFM Bilder ermöglichte die AFM Software zur weiteren Verdeutlichung die graphische Darstellung eines Höhenprofils (vgl. Abb. 58).

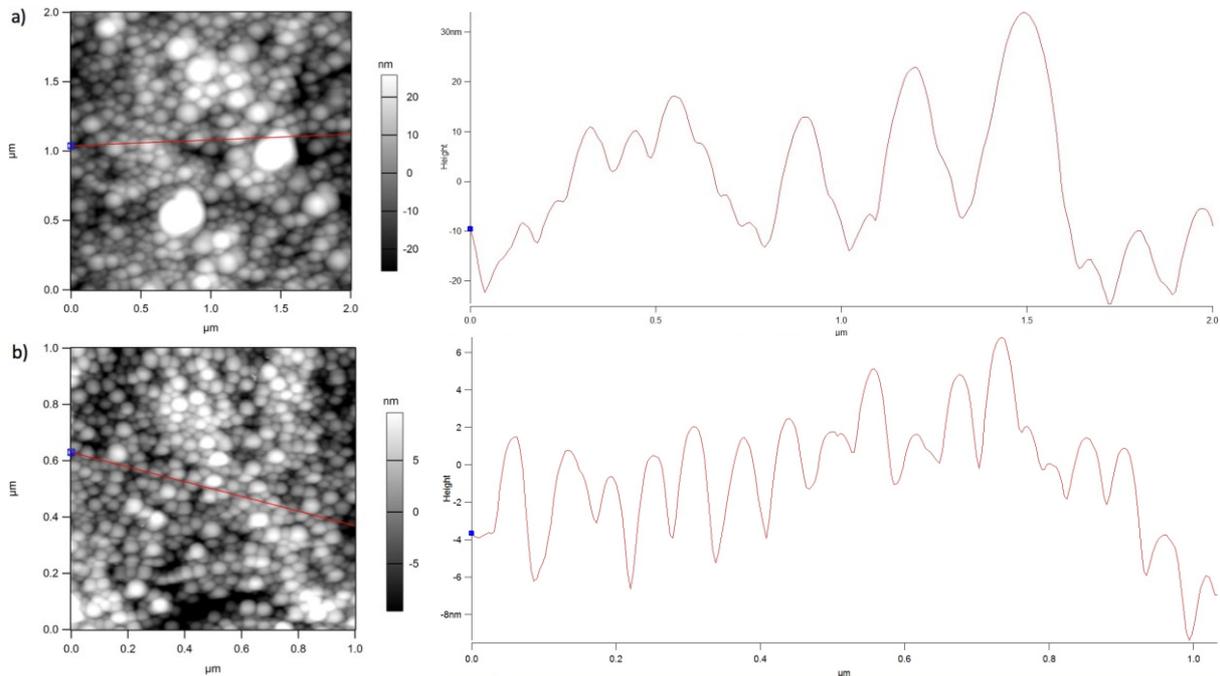


Abb. 58: AFM Aufnahmen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ (links) mit zugehörigem Höhenprofil (rechts); obere Reihe (a) mit $X_{\text{SO}} = 0,19$ und $0,11$ % Fe_3O_4 w/w; untere Reihe: (b) mit $X_{\text{SO}} = 0,19$ und $3,44$ % Fe_3O_4 w/w

Die großen polyMAOETIB Partikel in der Mikroskopaufnahme von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ bei einer Fe_3O_4 Einsatzmenge von $0,11$ % w/w sind in sowohl im Bild als auch in dem Höhenprofil von Abbildung 58 (a) gut zu erkennen. In Abbildung 58 (b) sind die Partikel einheitlich in ihrer Größe und das Höhenprofil ist gleichmäßig.

4.4 Evaluierung des dualen Kontrastmittels in CT und MRT

4.4.1 Evaluierung des CT Kontrasts von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$

Für die CT Aufnahmen wurden Verdünnungsreihen des dualen $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Kontrastmittels erstellt. Die Verdünnungsreihen enthielten verschiedene Fe_3O_4 Mengen in den polyMAOETIB Partikeln um den Effekt von Fe_3O_4 auf den CT Kontrast zu untersuchen. Das $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Kontrastmittel wurde mit einer Verdünnungsreihe des klinischen Standard CT Kontrastmittels Iomeprol verglichen (vgl. Abb. 32, Kapitel 3.4). Die Messungen wurden bei verschiedenen Röhrensparnungen (70 keV, 120 keV und 150 keV) durchgeführt.

Der CT Kontrast nahm mit zunehmender Kontrastmittelkonzentration linear zu, da die Röntgenabsorption näherungsweise proportional zur Anzahl der Iodatome ist.¹ Mit zunehmender Eisenoxidmenge nahm der CT Kontrast hingegen ab. Die Gesamt-

masse des Kontrastmittels war bei den Versuchsreihen von oben nach unten für jede Konzentration konstant. Aus einer Zunahme der Fe_3O_4 Partikel bzw. Menge im System resultierte eine Abnahme der polyMAOETIB Menge und somit eine Abnahme der Anzahl der Iodatome, wodurch der CT Kontrast abnimmt. In Abbildung 59 ist der CT Kontrast gegen die Einsatzmenge Fe_3O_4 (3,44 - 22,2 % w/w) aufgetragen.

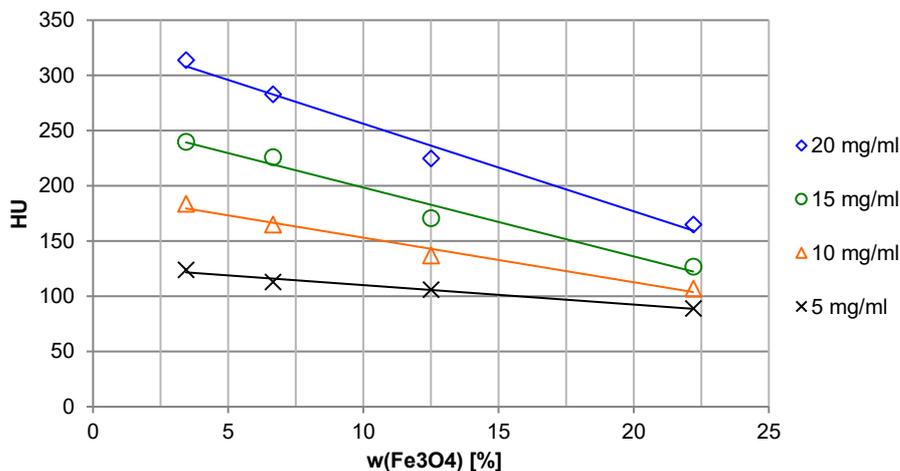


Abb. 59: CT Kontrast in Abhängigkeit der Fe_3O_4 Einsatzmenge mit Trendlinien (linear); Röhrenspannung 150 keV

Aus Abbildung 59 ist zu entnehmen, dass der CT Kontrast bei konstanter Gesamtkonzentration und Eisenoxidmengen von $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44 - 22,2$ % w/w mit zunehmender Eisenoxidmenge linear abnahm, was wiederum auf die Proportionalität des CT Kontrasts zur Anzahl der Iodatome zurückzuführen ist.¹ Unterhalb dieser Eisenoxidmengen im Reaktionssystem war kein eindeutiger Trend des CT Kontrasts zu erkennen. Die Abnahme des CT Kontrasts bei konstanter Gesamtkonzentration war für kleinen Eisenoxidmengen ($w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,22 - 1,75$ % w/w) in den Fe_3O_4 @MAOETIB Partikeln sehr gering.

Die Röntgenabsorption nahm bei der bildlichen Darstellung des Kontrastmittels im CT mit abnehmender Röhrenspannung zu (vgl. Abb. 32 und Anhang **A5**). Es wäre jedoch zu erwarten, dass die Röntgenabsorption und analog der Kontrast bei Verminderung der Röhrenspannung abnimmt.

Bei Betrachtung der Iod Atome nach dem Schalenmodell kann ein Röntgenquant ein Elektron aus den Schalen eines Atoms auf ein höheres Energieniveau heben oder ganz herauslösen (Photoelektrischer Effekt), vorausgesetzt die Energie des Quants ist größer als die Energie, welche das Elektron bindet. Das Quant wird hierbei absorbiert. Die notwendige Energie ein Elektron aus einer Schale herauszuschlagen ist für jedes Element und für jedes Elektron der jeweiligen Schale spezifisch. Wird dieser Energiewert durch eine Anhebung der Röhrenspannung überschritten, werden die Röntgenstrahlen abrupt von den jeweiligen Elektronen absorbiert, was im Absorptionsspektrum durch einen Sprung des Absorptions Wirkungsquerschnitts σ zu erkennen ist. Für die Elektronen der K-Schale bezeichnet man diesen Sprung als K-Kante. Analog, für Elektronen der L- oder M-Schale als L/M-Kanten.^{96,97}

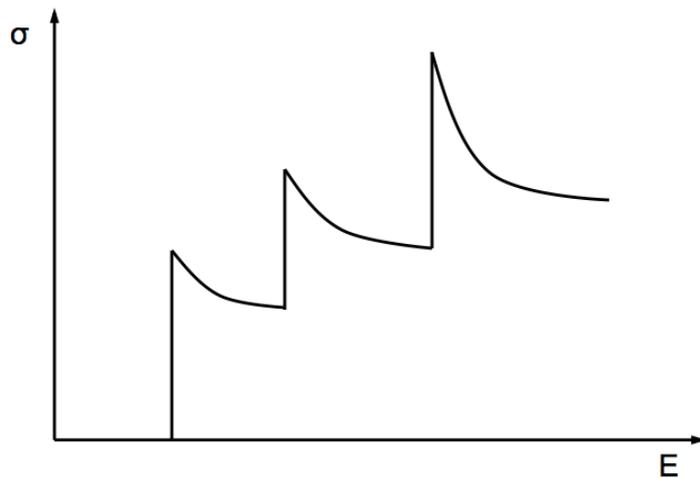


Abb. 60: Schematische Darstellung von Absorptionskanten; Wirkungsquerschnitt in Abhängigkeit der Energie

Der Wirkungsquerschnitt σ der Absorption von Röntgenstrahlung ist näherungsweise proportional zur vierten Potenz der Ordnungszahl Z und hängt außerdem von der Energie E des Röntgenquants ab.^{13,98}

$$\sigma \propto Z^4 \cdot E^{-3,5} \quad (\text{Gl. 14})$$

Die drei L-Kanten von Iod liegen bei 4,6 keV, 4,9 keV und 5,2 keV und die M-Kante bei 1,1 keV. Die erste K-Kante von Iod liegt bei 33,17 keV.^{99,100} Das weitere Anheben der Photonenenergie nach Erreichen der ersten K-Kante von Iod hat bis zum Erreichen der nächsten Absorptionskante keinen Effekt, weshalb der Wirkungsquerschnitt in diesem Bereich wieder abnimmt.

4.4.2 Evaluierung des MRT Kontrasts von Fe₃O₄@MAOETIB

Zur Evaluierung des MRT Kontrasts wurde die Verdünnungsreihe des Fe₃O₄@MAOETIB Kontrastmittels (vgl. Kapitel 3.4) mit verschiedenen Fe₃O₄ Mengen in den polyMAOETIB Partikeln im MRT untersucht. Die Eisenoxidnanopartikel setzten die T₂ Relaxationszeit von Wasser herab und verstärkten den T₂ Kontrast (vgl. Abb. 33, Abb. 34). Wechselwirkungen der Magnetfelder der superparamagnetischen Eisenoxidpartikel mit den H-Atomen in ihrer Umgebung führten zu einer beschleunigten Desorientierung der transversal ausgerichteten Spins.¹⁶⁻¹⁸ Daraus resultierte eine schnellere Abnahme der Transversalmagnetisierung. Jedoch nahm T₂ ab einer bestimmten Fe₃O₄ Einsatzmenge wieder zu und stieg weiter an, analog nahm der Wert für die spezifische Relaxivität ab. In Abbildung 61 ist die spezifische Relaxivität gegen die Eisenoxidmenge aufgetragen.

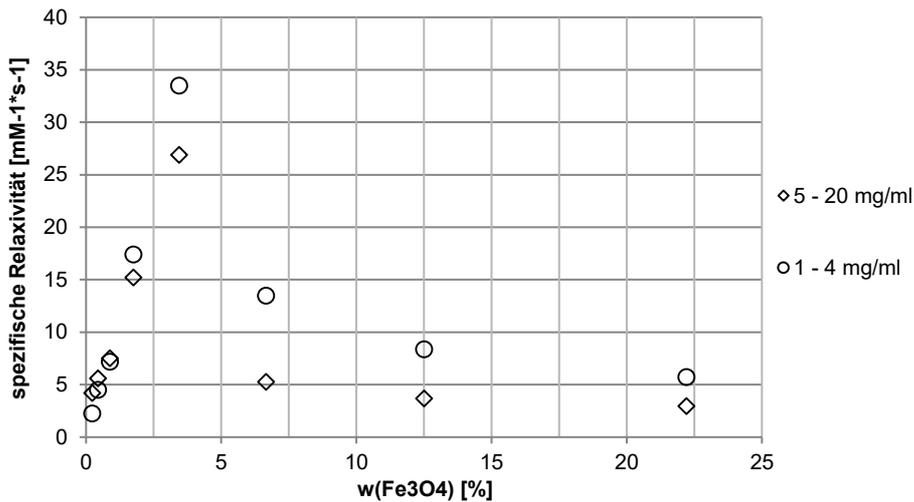


Abb. 61: Spezifische Relaxivität in Abhängigkeit der Eisenoxidmenge mit Verdünnungsreihen von 5 - 20 mg/ml und 1 - 4 mg/ml

Da die Zunahme der spezifischen Relaxivität von $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,22 - 3,44 \%$ linear ist, konnte die spezifische Relaxivität für $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44 \%$ (wie unter Abbildung 33 in Kapitel 3.5 erwähnt) bei Konzentrationen von 5 - 20 mg/ml auf einen Wert von $26,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ berechnet werden. Ab einem Wert von $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 6,65 \%$ nahm die spezifische Relaxivität des dualen Kontrastmittels in beiden Verdünnungsreihen ab.

Mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44 \%$ befinden sich laut Berechnungen im Durchschnitt 37 Fe_3O_4 Kerne in jedem polyMAOETIB Partikel (vgl. Tabelle 19). Eine weitere Erhöhung der Fe_3O_4 Partikelanzahl führte zu Wechselwirkungen der magnetischen Felder der Fe_3O_4 Partikel woraus ein Verlust der superparamagnetischen Eigenschaften resultierte. Analog nahm die spezifische Relaxivität r_2 ab. Auch in der Literatur wurde bei einer Zunahme der Fe_3O_4 Cluster-Größe über einen bestimmten Durchmesser eine Abnahme von r_2 beobachtet.¹⁰¹

Die spezifische Relaxivität für reine Fe_3O_4 Nanopartikel als T_2 Kontrastmittel wurde in der Literatur auf einen Wert von $80 - 120 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese Fe_3O_4 Partikel keine Polymerhülle besaßen. Durch das Anlegen ein externes Magnetfelds wird in den Eisenoxidnanopartikeln ein magnetisches Dipolmoment induziert. Eine Hülle um die Eisenoxidpartikel vergrößert die Entfernung zu den lokalen Protonen, wodurch der beschleunigende Effekt der Relaxation gehemmt wird. Blasiak et al. haben den Einfluss eines Coatings auf die T_2 Relaxationszeit untersucht. T_2 nahm hier mit wachsender Schichtdicke einem Wert von $1,25 \text{ ms/nm}$ zu.¹⁰⁵

Mit Hilfe von T_2 der $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB Partikel und den T_2 Werten für Fe_3O_4 aus der Literatur, lässt sich der Wert für $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB auf 1 ms/nm berechnen, ausgehend von idealisierten Core/Shell-Nanopartikeln mit einer Schichtdicke von 25 nm ($d_{\text{DLS}} = 56 \text{ nm}$ für $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB). Das Verhalten der T_2 Relaxationszeit und der spezifischen Relaxivität bei wachsender Schichtdicke stimmt mit der Literaturwerten überein.

4.4.3 CT/MRT Kontrastverhältnis

Für die gesammelten Daten im CT und MRT ließ sich für jede $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Zusammensetzung durch Division des CT Kontrasts durch die Relaxationsrate $1/T_2$ ein Kontrastverhältnis berechnen. Die Kontrastverhältnisse sind tabellarisch aufgelistet (Tabelle 20) und im Diagramm in Abbildung 62 dargestellt. Die Kontrastverhältnisse für die CT Messungen bei Röhrenspannungen von 70 keV und 150 keV befinden sich im Anhang **A7**.

Tab. 20: CT/MRT Kontrastverhältnis für eine Röhrenspannung von 120 keV

	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml	Mittelwert	AR42J Zellen
0.22 % Fe	55.50	77.00	80.50	68.67	70.42	
0.44 % Fe	34.67	29.33	33.20	30.08	31.82	
0.88 % Fe	12.44	9.89	8.87	10.20	10.35	
1.75 % Fe	3.29	2.52	2.49	2.64	2.73	
3.44 % Fe	0.85	0.66	0.58	0.62	0.68	1.20
6.65 % Fe	1.12	1.16	1.28	1.43	1.25	
12.5 % Fe	1.21	0.96	0.95	1.07	1.05	
22.2 % Fe	0.72	0.67	0.77	0.83	0.73	

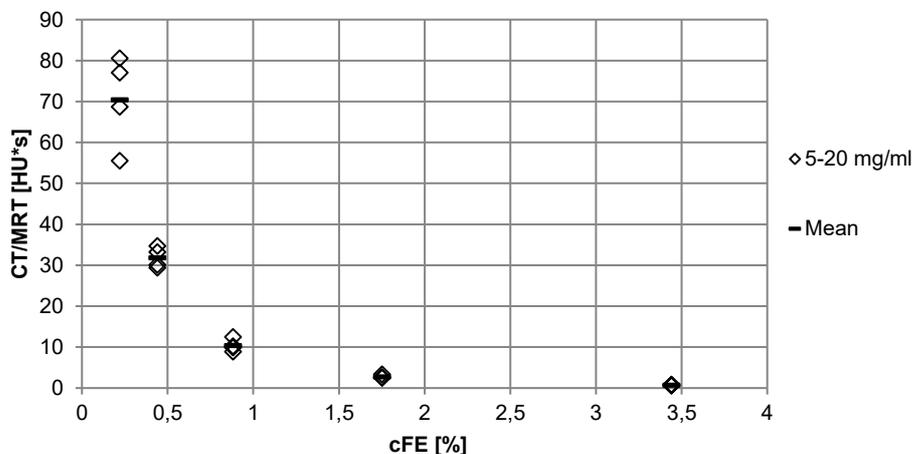


Abb. 62: CT/MRT Kontrastverhältnis in Abhängigkeit der Fe_3O_4 Konzentration; Röhrenspannung 120 keV

Das Kontrastverhältnis war durch die Variation der Eisenoxidmenge in den Experimenten zwischen 70 $\text{HU}\cdot\text{s}$ und 0,7 $\text{HU}\cdot\text{s}$ sehr gut regulierbar. Für die Zellversuche (vgl. Kapitel 3.6.2) errechnete sich für eine Röhrenspannung von 120 keV ein Kontrastverhältnis von 1,20 $\text{HU}\cdot\text{s}$, welches in derselben Größenordnung wie das Kontrastverhältnis für 3,44 % Fe_3O_4 bei den 1,5 ml Teströhrchen Experimenten liegt.

4.5 Funktionalisierung der Partikeloberfläche

Zur Funktionalisierung der Partikel wurde dem Reaktionssystem vor der Polymerisation ein Co-Monomer zugesetzt, welches nach dem Polymerisationsprozess die Anlagerung bioaktiver Substanzen an die Polymerpartikel ermöglichen sollte (Kopplungsmechanismus und Reaktionsgleichung: vgl. Abb. 35). In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zu den Untersuchungen dieses Vorhabens diskutiert. Zudem wurden die funktionalisierten Partikel in Zellversuchen auf ihre Tauglichkeit getestet und im CT und MRT untersucht.

4.5.1 Allgemeiner Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung

Die kovalente Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes an die funktionalisierten Polymerpartikel sollte eine primitive Bestätigung der Funktionalisierungsmöglichkeit der Partikel mit Fluoreszenzspektroskopie ermöglichen. Hierzu wurde nach der Herstellung des copolymerisierten polyMAOETIB ($d = 110 \text{ nm}$) ein Fluoreszenzfarbstoff (in zwei Versuchsreihen mit entweder Rhodamin oder Cumarin) über eine Aminogruppe an das Maleimid auf der Partikeloberfläche gekoppelt. Die Partikel wurden nach der Koppelungsreaktion dreimal zentrifugiert und gewaschen um die überschüssigen, ungekoppelten Farbstoffmoleküle zu entfernen.

Die darauf folgenden fluoreszenzspektroskopischen Messungen zeigten, dass die Herstellung von Partikeln mit aktiver Oberfläche durch Zugabe eines Co-Monomers prinzipiell möglich war (vgl. Abb. 37, Kapitel 3.6.1). Nach dreimaligem Zentrifugieren und Waschen wurde bei den Partikeln Fluoreszenz detektiert, was auf eine kovalente Bindung der Fluoreszenzmoleküle an die Partikeloberfläche zurückzuführen ist. Zudem war es möglich die Fluoreszenzintensität der Partikel über die Co-Monomerkonzentration zu variieren.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus beiden Versuchsreihen mit den zwei Farbstoffen fällt auf, dass die Fluoreszenzintensitäten bei Cumarin (vgl. Abb. 37 a) um ein Vielfaches größer sind als die des Rhodamin (vgl. Abb. 37 b). Das Intensitätsmaximum von Rhodamin ist das Intensitätsminimum des Cumarin. Demnach sollte bei Cumarinkonzentrationen $< 0,005 \%$ Fluoreszenz in einem Intensitätsbereich von $0 - 0,6 \times 10^6$ sichtbar sein. Da die Co-Monomer Moleküle in den polyMAOETIB Partikeln statistisch verteilt waren, befanden sich diese nicht nur auf der Oberfläche, sondern im gesamten Partikelvolumen. Durch die Unterschreitung einer bestimmten Konzentration des Co-Monomers ($0,005 \%$) war die Anzahl der Co-Monomer Moleküle auf der Partikeloberfläche verschwindend gering und den Fluoreszenzmolekülen fehlte die kovalente Bindungsmöglichkeit an die Partikel. Somit konnte der Fluoreszenzfarbstoff nicht gekoppelt werden und wurde beim Zentrifugieren komplett ausgewaschen.

Bei Konzentrationen des Fluorophors $> 0,05 \%$ (Cumarin) und $> 0,1 \%$ (Rhodamin 123) nahm die Fluoreszenzintensität nach Erreichen ihres Maximums wieder ab. Dieser Quench-Effekt tritt bei der Überschreitung der Co-Monomerkonzentration über den Wert auf, bei dem die Co-Monomermoleküle nur noch wenige Nanometer voneinander entfernt sind. Bei einer Verringerung des Abstands der Fluoreszenzmoleküle auf ca. 10 nm wird die Energie der angeregten Fluoreszenzmoleküle nicht mehr in Form von sichtbarer Fluoreszenzstrahlung an die Umgebung abgegeben, sondern strahlungslos über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung von einem auf das nächste Fluoreszenzmolekül übertragen. Das Erreichen des energetischen

Grundzustandes erfolgt über Schwingungsrelaxation. Dieser Effekt wird als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet, der notwendige Abstand für diesen Effekt wird Förster-Radius genannt. Eine weitere Notwendigkeit für diesen Quench-Effekt ist, dass sich die Emissions- und Absorptionsspektren des Fluorophors überlagern, da sonst die Resonanzenergie nicht auf dasselbe Molekül übertragen werden kann. Sowohl bei Rhodamin als auch bei Cumarin ist dies der Fall. Förster-Radien liegen im Bereich von 1 - 10 nm.^{106,107} Anhand der Daten ist eine Modifikation der Polymerpartikel zur Kopplung von Molekülen an die Partikeloberfläche prinzipiell möglich.

4.5.2 Zellversuche

Nach der erfolgreichen Anlagerung der Fluoreszenzfarbstoffe an die Partikeloberfläche von polyMAOETIB (vgl. Kapitel 3.5.1) wurde das Somatostatin-analogon Cystein-Tyr³-Octreotate (Cys-TATE) an das Maleimid copolymerisierter Fe₃O₄@MAOETIB Partikel (d = 60 nm) gekoppelt. Die Cys-TATE funktionalisierten Partikel wurden in einer Versuchsreihe mit der AR42J Tumorzelllinie auf eine Somatostatin rezeptorspezifische Aufnahme durch die Zellen überprüft.

Die AR42J Zellen wurden hierzu mit verschiedenen Konzentrationen des Kontrastmittels für 20 h inkubiert, gewaschen und im CT und MRT untersucht. Die Zellen wurden sowohl mit funktionalisierten als auch mit nativen Partikeln versetzt und die Ergebnisse verglichen. Die Experimente zeigten zunächst, dass die Lebensfähigkeit der Zellen durch die Partikel nicht beeinflusst wurde. Somit konnte kein toxikologischer Effekt festgestellt werden. Abbildung 63 zeigt Lichtmikroskop Aufnahmen der Zellen vor- und nach 20 h Inkubation.

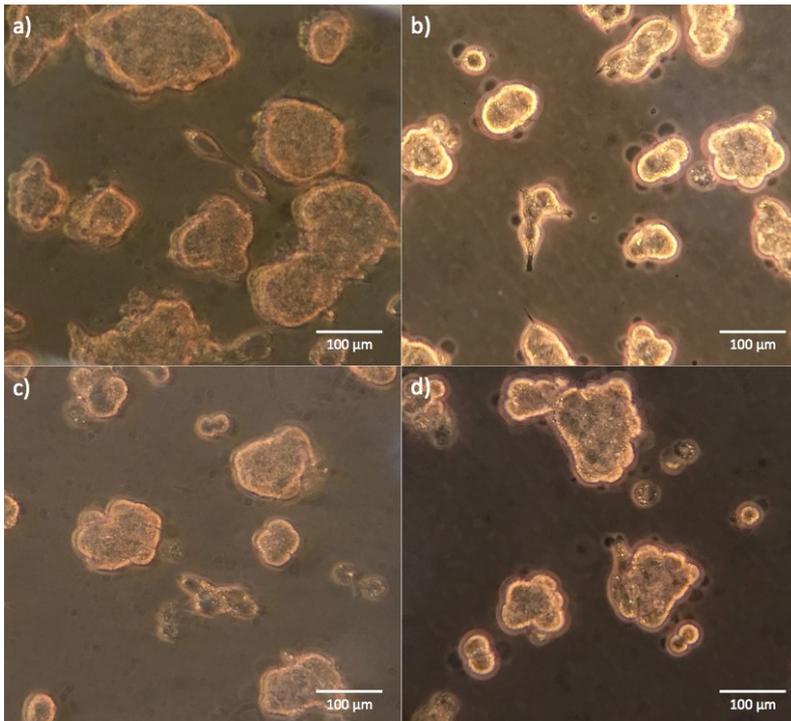


Abb. 63: Lichtmikroskop Aufnahmen von AR42J Zellen (a) vor Inkubation (b) nach 20 h Inkubation mit $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikeln (c) vor Inkubation (d) nach 20 h Inkubation mit Cys-TATE funktionalisierten $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikeln; Skalierung 100 μm

Durch CT und MRT Messungen (vgl. Abb. 38, Abb. 39) war ersichtlich, dass beide Varianten der Partikel von den Zellen aufgenommen wurden, was auf eine unspezifische Aufnahme über einen vesikulären Internalisationsmechanismus (Phagozytose) zurück zu führen ist. Der CT/MRT Kontrast nahm mit zunehmender Kontrastmittelkonzentration gleichermaßen zu.

Anhand der Hounsfieldwerte und T_2 Relaxationszeiten der CT/MRT Bilder (vgl. Abb. 38 b, Abb. 39 b) ist zudem zu erkennen, dass die Aufnahme der Cys-TATE funktionalisierten Partikel nicht nur über einen unspezifischen Mechanismus geschah, sondern zusätzlich über eine rezeptorspezifische Aufnahme. Der CT/MRT Kontrast der Zellen mit den funktionalisierten Partikeln war etwas größer als der Kontrast der Zellen, welche nativen Partikeln ausgesetzt waren.

Cys-TATE kann als Somatostatinanalogon an die überexprimierten Somatostatinrezeptoren der AR42J Tumorzelllinie binden. Daher sollten die peptidmodifizierten Nanopartikel prinzipiell eine höhere Aufnahme durch die Zellen aufweisen als Nanopartikel ohne Cys-TATE Funktionalisierung. Zum einen ist es möglich, dass die funktionalisierten $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikel mit Cys-TATE als Agonisten an die Somatostatinrezeptoren auf der Zelloberfläche binden und so zusätzlich über einen rezeptorspezifischen Mechanismus in das Innere der Zelle aufgenommen werden. Zum anderen kann Cys-TATE mit $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikeln durch die massive Derivatisierung Antagonisten bilden, welche spezifisch an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, jedoch nicht in die Zelle inkorporiert werden. In beiden Fällen ist die Aufnahme der peptidmodifizierten Nanopartikel durch die Zellen höher als die Aufnahme der Nanopartikel ohne Cys-TATE Funktionalisierung, woraus ein erhöhter Kontrast in CT und MRT bei der Versuchsreihe mit den Cys-TATE funktionalisierten Partikeln resultiert.

Die Zunahme des CT Kontrasts von 100 - 800 $\mu\text{g/ml}$ war widererwarten nicht linear, was auf die limitierte Aufnahmefähigkeit der Partikel durch die Zellen bei zu hohen Konzentrationen zurückzuführen ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde ein duales Kontrastmittel für CT und MRT Untersuchungen hergestellt und der Prozess durch Variation der Reaktionsparameter optimiert. Das Polymer der Verbindung 2-methacryloyloxyethyl(2,3,5-triiodobenzoat), kurz polyMAOETIB, diente als CT Kontrastmittel und superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (Fe_3O_4) dienten als MRT Kontrastmittel. Die Fe_3O_4 Nanopartikel wurden im Prozess in die Polymerpartikel eingeschlossen.

Fe_3O_4 Nanopartikel wurden über eine basische Fällungsreaktion in wässriger Umgebung aus $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Salzen gewonnen. Natriumoleat diente während der Reaktion als Stabilisator. Durch die Variation der Stabilisatormenge, der $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Gesamtkonzentration und der Rührergeschwindigkeit ließ sich die Partikelgröße steuern. Die Größe der Partikel war im Bereich von 7 - 330 nm gut einstellbar, wobei es sich bei den größeren Partikeln um Agglomerate kleinerer Partikel ($d = 7$ nm) handelte. Die Ergebnisse waren reproduzierbar. Zur Verwendung in hydrophoben Lösungsmitteln bei der Mikroemulsionspolymerisation wurden die hydrophilen Fe_3O_4 Partikel mit Hilfe von Ölsäure in die organische Phase überführt. Durch die Ölsäure konnten die Agglomerate voneinander getrennt werden.

PolyMAOETIB Nanopartikel mit enger Partikelgrößenverteilung wurden mit Mikroemulsionspolymerisation hergestellt. Die Partikelgröße ließ sich unter Variation der Tensidbeladung im Bereich von 30 - 930 nm wohl definiert einstellen. Es waren bei den Experimenten leichte Abweichungen von der Theorie für sphärische Mizellen in Mikroemulsionen zu erkennen, dennoch zeigt der Prozess insgesamt die typischen Merkmale für Mikroemulsionspolymerisation wie eine gute Reproduzierbarkeit, sehr gute Steuerung der Partikelgröße über die Tensidbeladung und ein einfaches Scale-Up. Die Ansatzgröße konnte experimentell bis auf das zehnfache skaliert werden. Es wurden kationische und anionische Tenside auf Tauglichkeit für den Polymerisationsprozess geprüft. Anionische Tenside führten zu den besten Ergebnissen, wobei Natriumoleat das favorisierte Tensid für eine biokompatible Anwendung war. Die optimale Reaktionstemperatur wurde zu 70°C bestimmt. Die polyMAOETIB Partikel zeigten einen guten CT Kontrast in Muskelgewebe, vergleichbar mit dem des klinischen Standards Iomeprol.

Als duales Kontrastmittel für CT und MRT Untersuchungen wurden Fe_3O_4 @MAOETIB Nanopartikel mit Mikroemulsionspolymerisation synthetisiert. Die Zugabe von hydrophoben Fe_3O_4 Nanopartikeln ($d = 7$ nm) zu dem Polymerisationsprozess von polyMAOETIB hatte keinen negativen Einfluss auf die Stabilität des Prozesses. Natriumoleat wurde als Tensid für alle Versuche verwendet. Die Partikelgröße konnte über die Tensidbeladung im Reaktionssystem von 50 - 250 nm mit einer engen Größenverteilung und einer guten Reproduzierbarkeit gesteuert werden. Das Fe_3O_4 /MAOETIB Verhältnis war in einem großen Bereich einstellbar. Die Einkapselung von Fe_3O_4 Nanopartikeln in die Polymerpartikel und die Anzahl der Fe_3O_4 Partikel pro polyMAOETIB Partikel konnte für verschiedene Fe_3O_4 /MAOETIB Verhältnisse durch bildliche Darstellung mit einem Transmissionselektronenmikroskop bestätigt werden. Die Fe_3O_4 Nanopartikel waren statistisch in den polyMAOETIB Partikeln verteilt.

Die $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB Nanopartikel zeigten in vitro einen guten Kontrast in CT und MRT Untersuchungen. Mehr Fe_3O_4 Partikel in den Polymerpartikeln resultierten bei konstanter Gesamtkonzentration der Partikel in einer kürzeren T_2 Relaxationszeit und einer Anhebung des T_2 Kontrasts in MRT Aufnahmen, während analog der CT Kontrast durch die abnehmende Iodmenge verringert wurde. Das CT/MRT Kontrastverhältnis war von 0,7 - 70 $\text{HU}\cdot\text{s}$ sehr gut einstellbar.

Partikel mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44\%$ lieferten den besten T_2 Kontrast in MRT Aufnahmen. Die spezifische Relaxivität von $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB und die Anhebung des T_2 Kontrasts durch Fe_3O_4 ist in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten. Der CT Kontrast von $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB liegt in derselben Größenordnung wie der Kontrast des kommerziell erhältlichen CT Kontrastmittels Iomeprol.

Nach der Polymerisationsreaktion wurden sowohl die polyMAOETIB Partikel als auch die $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB Partikel durch Lösen in THF und Fällen in MeOH gereinigt. Das Tensid und das organische Lösungsmittel wurden nach der Sedimentation der Partikel durch Dekantieren entfernt. Nach erneutem Lösen der Tensid- und Lösungsmittelfreien Partikel in THF und anschließendem Fällen in H_2O konnten die aufbereiteten Partikel durch Zugabe von Natriumchlorid und/oder Phosphatpuffer zu biokompatiblen Nanodispersionen mit enger Partikelgrößenverteilung weiterverarbeitet werden.

Durch die Zugabe eines Comonomers zum Polymerisationsprozess von $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB war es möglich eine funktionalisierbare Partikeloberfläche zu generieren. Die prinzipielle Möglichkeit die Partikeloberfläche zu funktionalisieren konnte mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Durch eine Änderung der Comonomerkonzentration konnte die Fluoreszenzintensität gezielt variiert werden.

Für eine biomedizinische Anwendung wurden die Partikel mit Cystein-Tyr³-Octreotate (Cys-TATE) funktionalisiert. Native und Cys-TATE-funktionalisierte $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB Partikel wurden auf eine spezifische Aufnahme in Somatostatinrezeptor-positive AR42J Zellen untersucht. Die Zellen zeigten neben einem nicht spezifischen Aufnahmemechanismus für native $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB Partikel eine zusätzliche Aufnahme über den Somatostatinrezeptor bei $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB mit Cys-TATE Modifikation und dadurch einen erhöhten Kontrast in CT und MRT Aufnahmen. Die Inkubation mit $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB für 20 h zeigte keinen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen im beobachteten Zeitraum.

Diese Arbeit zeigt eine schnelle und zuverlässige großtechnische Möglichkeit zur Herstellung von Nanopolymeren für medizinische Anwendungen. $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB in Form von Core/Shell Nanopartikeln hat als neuartiges duales Kontrastmittel für kombinierte CT/MRT Untersuchungen großes Potential die bildliche Darstellung von Tumoren zu vereinfachen und bietet eine positive Entwicklungsmöglichkeit für die medizinische Diagnostik. Durch Tumorakkumulation der Nanopartikel und eine erhöhte Zirkulationszeit im Blut im Vergleich zu den klinischen Standards kann die Kontrastmitteldosis minimiert und die Gesundheit des Patienten geschont werden.

Trotz der Vorteile neuartiger Kontrastmittel in Form von Nanopartikeln muss vor der Einführung in medizinische Untersuchungen der Einfluss von Nanopolymeren auf den menschlichen Körper sowohl direkt nach der Applikation, als auch in Langzeitstudien intensiv untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. O. Dössel, *Bildgebende Verfahren in der Medizin*, Springer, Berlin/Heidelberg, **2016**
2. J. Ambrose, G. Hounsfield "Computerized transverse axial tomography", Br. J. Radiol. **1973** ; *46(542)* , 148-149.
3. G. Hounsfield "Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system", Br. J. Radiol. **1973** ; *46(552)* , 1016-1022.
4. W. Kalender, W. Seissler, E. Klotz, P. Vock "Spiral volumetric CT with single-breath-hold technique, continuous transport, and continuous scanner rotation", Radiology **1990** ; *176(1)* , 181-183.
5. W. Kalender, P. Vock, A. Polacin, M. Soucek "Spiral-CT: a new technique for volumetric scans. I. Basic principles and methodology", Rontgenpraxis **1990** ; *43(9)* , 323-330.
6. M. Soucek, P. Vock, M. Daepf, W. Kalender "Spiral-CT: a new technique for volumetric scans. II. Potential clinical applications", Rontgenpraxis **1990** ; *43(10)* , 365-375.
7. C. Kawaura, T. Aoyama, S. Koyama, M. Achiwa, M. Mori "Organ and effective dose evaluation in diagnostic radiology based on in-phantom dose measurements with novel photodiode-dosimeters", Radiat. Prot. Dosimetry **2006** ; *118* , 421-430.
8. E. Tamm, X. Rong, D. Cody, R. Ernst, N. Fitzgerald, V. Kundra "CT Radiation Dose Reduction: How to Implement Change without Sacrificing Diagnostic Quality", RadioGraphics **2011** ; *31* , 1823-1832.
9. C. McCollough, M. Bruesewitz, J. Kofler "CT Dose Reduction and Dose Management Tools: Overview of Available Options", RadioGraphics **2006** ; *26* , 503-512.
10. M. Kalra, M. Maher, T. Toth, L. Hamberg, M. Blake, J. Shepard, S. Saini "Strategies for CT radiation dose optimization", Radiology **2004** ; *230(3)* , 619-628.
11. C. McCollough, A. Primak, N. Braun, J. Kofler, L. Yu, J. Christner "Strategies for reducing radiation dose in CT", Radiol. Clin. North Am. **2009** ; *47(1)* , 27-40.
12. T. Toth "Dose reduction opportunities for CT scanners", Pediatr. Radiol. **2002** ; *32(4)* , 261-267.
13. K. Krane, *Introductory Nuclear Physics*, Wiley, Hoboken (NJ), **1988**

14. D. Weishaupt, V. Köchli, B. Marincek, *Wie funktioniert MRI?*, Springer, Berlin/Heidelberg, **2014**
15. M. Kircher, J. Willmann "Strategies for reducing radiation dose in CT", *Radiology* **2012** ; 263(3) , 633-643.
16. E. M. Haacke, R. W. Brown, M. R. Thompson, R. Venkatesan, *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*, Wiley, Hoboken (NJ), **2014**
17. S. Huettel, A. Song, G. McCarthy, *Functional Magnetic Resonance Imaging*, Sinauer Associates, Sunderland (MA), **2014**
18. M. T. Vlaardingerbroek, J.A. den Boer, *Magnetic Resonance Imaging: Theory and Practice*, Springer, Berlin/Heidelberg, **2003**
19. E. M. Purcell, H. C. Torrey, and R. V. Pound "Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid", *Phys. Rev.* **1946** ; 69 , 37-38.
20. F. Bloch "Nuclear Introduction", *Phys. Rev.* **1946** ; 70(7-8) , 460-474.
21. E. Andrew "A historical review of NMR and its clinical applications", *Br. Med. Bull.* **1984** ; 40(2) , 115-119.
22. P. Seynaeve, J. Broos "The history of tomography", *J. Belge. Radiol.* **1995** ; 78(5) , 284-288.
23. S. Patz "Basic physics of nuclear magnetic resonance", *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* **1986** ; 8(5-6) , 225-237.
24. H. Carr "Steady-state free precession in nuclear magnetic resonance", *Phys. Rev.* **1958** ; 112 , 1693-1701.
25. E. Kanal, F. Shellock, L. Talagala "Safety considerations in MR imaging", *Radiology* **1990** ; 176(3) , 593-606.
26. F. Shellock, J. Cruess "MR procedures: biologic effects, safety, and patient care", *Radiology* **2004** ; 232(3) , 635-652.
27. C. Althoefer, U. Blum, J. Bathmann, C. Wüstenberg, P. Uhrmeister, J. Laubenberger, W. Lange, J. Schwarzkopf, E. Moser, M. Langer "Comparative diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging and immunoscintigraphy for detection of bone marrow involvement in patients with malignant lymphoma", *J. Clin. Oncol.* **1997** ; 15(5) , 1754-1760.
28. C. Stroszczyński, J. Oellinger, N. Hosten, G. Spahn, H. Amthauer, J. Rieke, K. Hoffmann, H. Eichstaedt, W. Ludwig, R. Felix "Staging and monitoring of malignant lymphoma of the bone: comparison of ⁶⁷Ga scintigraphy and MRI", *J. Nucl. Med.* **1990** ; 40(3) , 387-393.

29. R. Ferraris, A. del Piano, J. Galli "Role of magnetic resonance imaging in the staging of gastrointestinal neoplasms", *Semin. Surg. Oncol.* **2001** ; 20(2) , 122-129.
30. G. Schmidt, A. Baur-Melnyk, P. Herzog, R. Schmid, R. Tiling, M. Schmidt, M. Reiser, S. Schoenberg "High-resolution whole-body magnetic resonance image tumor staging with the use of parallel imaging versus dual-modality positron emission tomography-computed tomography: experience on a 32-channel system", *Invest. Radiol.* **2005** ; 40(12) , 743-753.
31. T. Reese, O. Heid, R. Weisskoff, V. Wedeen "Reduction of eddy-current-induced distortion in diffusion MRI using a twice-refocused spin echo", *Magn. Reson. Med.* **2003** ; 49(1) , 177-182.
32. J. Wang, V. Yarnykh, C. Yuan "Enhanced image quality in black-blood MRI using the improved motion-sensitized driven-equilibrium (iMSDE) sequence", *J. Magn. Reson. Imaging* **2010** ; 31(5) , 1256-1263.
33. B. Hargreaves, C. Cunningham, D. Nishimura, S. Conolly "Variable-rate selective excitation for rapid MRI sequences", *Magn. Reson. Med.* **2004** ; 52(3) , 590-597.
34. J. Shams, L. Martola, T. Cavallin, M. Granberg, P. Shams, L. Aspelin, Wahlund, M. Kristoffersen-Wiberg "SWI or T2*: Which MRI Sequence to Use in the Detection of Cerebral Microbleeds? The Karolinska Imaging Dementia Study", *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **2015** ; 36(6) , 1089-1095.
35. B. Geraghty, J. Lau, A. Chen, C. Cunningham "Dual-Echo EPI sequence for integrated distortion correction in 3D time-resolved hyperpolarized ¹³C MRI", *Magn. Reson. Med.* **2018** ; 79(2) , 643-653.
36. N. Lee, S. Choi, T. Hyeon "Nano-sized CT Contrast Agents" *Adv. Mat.* **2013** ; 25 , 2641-2660.
37. F. Alexis, E. Pridgen, L. Molnar, O. Farokhzad "Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles" *Mol. Pharm.* **2008** ; 5(4) , 505-515.
38. M. Bourin, P. Jolliet, F. Ballereau "An Overview of the Clinical Pharmacokinetics of X-Ray Contrast Media" *Clin. Pharmacokinet.* **1997** ; 32(3) , 180-193.
39. C. Haller, I. Hizoh "The cytotoxicity of iodinated radiocontrast agents on renal cells in vitro" *Invest. Radiol.* **2004** ; 39(3) , 149-154.
40. S. Namasivayam, M. Kalra, W. Torres, W. Small "Adverse reactions to intravenous iodinated contrast media: a primer for radiologists" *Emerg. Radiol.* **2006** ; 12(5) , 210-215.

41. S. Namasivayam, M. Kalra, W. Torres, W. Small "Adverse reactions to intravenous iodinated contrast media: an update" *Curr. Prob. Diagn.* **2006** ; 35(4) , 164-169.
42. S. Moghimi, C. Hunter, J. Murray "Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice" *Pharmacol. Rev.* **2001** ; 53 , 283-318.
43. Z. Liu, Z. Li, J. Liu, S. Gu, Q. Yuan, J. Ren, X. Qu "Long-circulating Er³⁺-doped Yb₂O₃ up-conversion nanoparticle as an in vivo X-Ray CT imaging contrast agent" *Biomaterials* **2012** ; 33 , 6748-6757.
44. A. Galperin, S. Margel "Synthesis and Characterization of New Radiopaque Microspheres by the Dispersion Polymerization of an Iodinated Acrylate Monomer for X-ray Imaging Applications" *J. Polym. Sci. Pol. Chem. A* **2006** ; 44 , 3859-3868.
45. S. Bartling, J. Butjan, H. Biton, S. Haneder, B. Kraenzlin, H. Michael, S. Margel, S. Diehl, W. Semmler, N. Gretz, S. Schoenberg, M. Sadick "First Multimodal Embolization particles visible on X-ray/CT and MRI" *Invest. Radiol.* **2011** ; 46(3) , 178-186.
46. H. Aviv, S. Bartling, J. Budjan, S. Margel "Synthesis and Characterization of Dual Modality (CT/MRI) Core-Shell Microparticles for Embolization Purposes" *Biomacromolecules* **2010** ; 11 , 1600-1607.
47. A. Galperin, D. Margel, J. Baniel, G. Dank, H. Biton, S. Margel "Radiopaque iodinated polymeric nanoparticles for X-ray imaging applications" *Biomaterials* **2007** ; 28 , 4461-4468.
48. H. Aviv, S. Bartling, F. Kiesling, S. Margel "Radiopaque iodinated copolymeric nanoparticles for X-ray imaging applications" *Biomaterials* **2009** ; 30 , 5610-5616.
49. D. Gadian, J. Payne, D. Bryant, I. Young, D. Carr, G. Bydder "Gadolinium-DTPA as a contrast agent in MR imaging-theoretical projections and practical observations" *J. Comput. Assist. Tomogr.* **1985** ; 9(2) , 242-251.
50. A. Beam, K. Moore, S. Gillis, K. Ford, T. Gray, A. Steinwinder, A. Graham "GBCAs and Risk for Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Literature Review" *Radiol. Technol.* **2017** ; 88(6) , 583-589.
51. J. Perez-Rodriguez, S. Lai, B. Ehst, D. Fine, D. Bluemke "Nephrogenic systemic fibrosis: incidence, associations, and effect of risk factor assessment - report of 33 cases" *Radiol.* **2009** ; 250(2) , 371-377.
52. S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Elst, R. Muller "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications" *Chem. Rev.* **2008** ; 108 , 2046-2110.

53. C. Bean, J. Livingston "Superparamagnetism" J. Appl. Phys. **1959** ; 30 , 120.
54. M. Knobel, W. Nunes, L. Socolovsky, E. De Biasi, J. Vargas, J. Denardin "Superparamagnetism and Other Magnetic Features in Granular Materials: A Review on Ideal and Real Systems" J. Nanosci. Nanotechnol. **2008** ; 8(6) , 2836-2857.
55. S. Hasanay, I. Ahmed, J. Rajan, A. Rehman "Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles" J. Nanosci. Nanotechnol. **2012** ; 2(6) , 148-158.
56. F. Herranz, B. Salinas, H. Groult, J. Pellico, A. Lechuga-Vieco, R. Bhavesh, J. Ruiz-Cabello "Superparamagnetic Nanoparticles for Atherosclerosis Imaging" Nanomaterials **2014** ; 4 , 408-438.
57. W. Jiang, H. Yang, S. Yang, H. Horng, J. Hung, Y. Chen, C.-Y. Hong "Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible" J. Magn. Magn. Mater. **2004** ; 283 , 210-214.
58. J. Sun, S. Zhou, P. Hou, Y. Yang, J. Weng, X. Li, M. Li "Synthesis and characterization of biocompatible Fe₃O₄ nanoparticles" J. Biomed. Mater. Res. A **2007** ; 80A(2) , 333-341.
59. T. Banert, U. Peuker "Preparation of highly filled super-paramagnetic PMMA-magnetite nano composites using the solution method" J. Mater. Sci. **2006** ; 41 , 3051-3056.
60. A. Hassan, O. Sandre, V. Cabuila, P. Tabeling "Synthesis of iron oxide nanoparticles in a microfluidic device: preliminary results in a coaxial flow millichannel" Chem. Comm. **2008** ; 15 , 1783-1785.
61. G. Salazar-Alvarez, M. Muhammed, A. Zagrodni "Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution" Chem. Eng. Sci. **2006** ; 61 , 4625-4633.
62. A. Gutpar, M. Gutpar "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications" Biomaterials **2005** ; 26 , 3995-4021.
63. A. Galperin, S. Margel "Synthesis and Characterization of Radiopaque Magnetic Core-Shell Nanoparticles for X-Ray Imaging Applications" J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. **2007** ; 83B(2) , 490-498.
64. J. Li, Y. Ai, L. Wang, P. Bu, C. Sharkey, Q. Wu, B. Wun, S. Roy, X. Shen, M. King "Targeted drug delivery to circulating tumor cells via platelet membrane-functionalized particles" Biomaterials **2016** ; 76 , 52-65.
65. R. Mout, D. F. Moyano, S. Ranaa, V. M. Rotello "Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine" Chem. Soc. Rev. **2012** ; 41 , 2539-2544.

66. T. Neuberger, B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, B. von Rechenberg "Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system" *J. Magn. Mater.* **2005** ; 293(1) , 483-496.
67. Y. Liu, Y. Yang, M. Sun, M. Cui, Y. Fu, Y. Lin, Z. Li, L. Nie "Highly specific noninvasive photoacoustic and positron emission tomography of brain plaque with functionalized croconium dye labeled by a radiotracer" *Chem. Sci.* **2017** ; 8 , 2710-2716.
68. L. Nie, P. Huang, W. Li, X. Yan, A. Jin, Z. Wang, Y. Tang, S. Wang, X. Zhang, G. Niu and X. Chen "Early-Stage Imaging of Nanocarrier-Enhanced Chemotherapy Response in Living Subjects by Scalable Photoacoustic Microscopy" *ACS Nano* **2014** ; 8(12) , 12141-12150.
69. W.-J. Chen, P.-J. Tsai, Y.-C. Chen "Functional Fe₃O₄/TiO₂ Core/Shell Magnetic Nanoparticles as Photokilling Agents for Pathogenic Bacteria" *Small* **2008** ; 4 , 485-491.
70. R. Sperling, W. Parak "Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles" *Phil. Trans. R. Soc. A* **2010** ; 368 , 1333-1383.
71. K. Chatterjee, S. Sarkar, K. Rao, S. Paria "Core/shell nanoparticles in biomedical applications" *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014** ; 209 , 8-39.
72. U. Tamer, Y. Gundogdu, I. Boyaci, K. Pekmez "Synthesis of magnetic core-shell Fe₃O₄-Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection" *J. Nanopart. Res.* **2010** ; 12 , 1187-1196.
73. P. Gobbo, M. Workentin "Improved Methodology for the Preparation of Water-Soluble Maleimide-Functionalized Small Gold Nanoparticles" *Langmuir* **2012** ; 28 , 12357-12363.
74. C. Graf, C. Goroncy, P. Stumpf, E. Weschke, C. Boeglin, H. Ronneburg, E. Rühl "Local Magnetic and Electronic Structure of the Surface Region of Postsynthesis Oxidized Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging" *J. Phys. Chem.* **2015** ; 119 , 19404-19414.
75. H. G. Elias, *Makromoleküle*, Wiley, Hoboken (NJ), **1999**
76. D. Wellings, E. Atherton "Standard Fmoc Protocols" *Methods Enzymol.* **1997** ; 289 , 44-67.
77. C. Wängler, B. Waser, A. Alke, L. Iovkova, H.-G. Buchholz, S. Niedermoser, K. Jurkschat, C. Fottner, P. Bartenstein, R. Schirrmacher, J.-C. Reubi, H.-J. Wester, B. Wängler "One-Step ¹⁸F-Labeling of Carbohydrate-Conjugated Octreotate-Derivatives Containing a Silicon-Fluoride-Acceptor (SiFA): In Vitro and in Vivo Evaluation as Tumor Imaging Agents for Positron Emission Tomography (PET)" *Bioconjugate Chem.* **2010** ; 21 , 2289-2296.

78. S. Litau, S. Niedermoser, N. Vogler, M. Roscher, R. Schirrmacher, G. Fricker, B. Wängler, C. Wängler "Next Generation of SiFAlin-Based TATE Derivatives for PET Imaging of SSTR-Positive Tumors: Influence of Molecular Design on In Vitro SSTR Binding and In Vivo Pharmacokinetics" *Bioconjugate Chem.* **2015** ; 26 , 2350-2359.
79. R. Brooks "A quantitative theory of the Hounsfield unit and its application to dual energy scanning" *J. Comput. Assist. Tomogr.* **1977** ; 1(4) , 487-493.
80. J. Zhu, C. Waengler, R. Lennox, R. Schirrmacher "Preparation of Water-Soluble Maleimide-Functionalized 3 nm Gold Nanoparticles: A New Bioconjugation Template" *Langmuir* **2012** ; 28 , 5508-5512.
81. E. Hofslı, L. Thommesen, K. Nørsett, S. Falkmer, U. Syversen, A. Sandvik, A. Laegreid "Expression of chromogranin A and somatostatin receptors in pancreatic AR42J cells" *Mol. Cell Endocrinol.* **2002** ; 194(1-2) , 165-173.
82. V. LaMer, R. Dinigar "Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols" *J. Am. Chem. Soc.* **1950** ; 72(11) , 4847-4854.
83. J. Park, J. Joo, S. Kwon, Y. Jang, T. Hyeon "Synthese monodisperser sphärischer Nanokristalle" *Angew. Chem.* **2007** ; 119 , 4714-4715.
84. B. Kharisov, H. Dias, O. Kharissova, A. Vazquez, Y. Penaa, I. Gomeza "Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-aqueous solvents: recent trends" *RSC Adv.* **2014** ; 4 , 45354-45381.
85. E. Larsen, T. Nielsen, T. Wittenborn, H. Birkedal, T. Vorup-Jensen, M. Jakobsen, L. Ostergaard, M. Horsman, F. Besenbacher, K. Howard, J. Kjems "Size-Dependent Accumulation of PEGylated Silane-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Murine Tumors" *ACS Nano* **2009** ; 3(7) , 1947-1951.
86. L. Zeng, W. Ren, J. Zheng, P. Cui, A. Wu "Ultrasml water-soluble metal-iron oxide nanoparticles as T₁-weighted contrast agents of magnetic resonance imaging" *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012** ; 14(8) , 2631-2636.
87. M. Antonietti, W. Bremser, D. Muschenborn, C. Rosenauer, B. Schupp "Synthesis and Size Control of Polystyrene Latices via Polymerization in Microemulsion" *Macromolecules* **1991** ; 24 , 6636-6643.
88. M. Antonietti, S. Lohmann, W. Bremser "Polymerization in microemulsion - size and surface control of ultrafine latex particles" *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1992** ; 89 , 62-65.
89. M. Antonietti, R. Basten, S. Lohmann "Polymerization in microemulsions - a new approach to ultrafine, highly functionalized polymer dispersions" *Macromol. Chem. Phys.* **1995** ; 196(2) , 441-466.

90. D. Ankamma, P. Sivashanmugam "Experimental and CFD simulation studies on power consumption in mixing using energy saving turbine agitator" J. Ind. Eng. Chem. **2010** ; *16(1)* , 157-161.
91. I. Kaneda, B. Vincent "Swelling behavior of PMMA-g-PEO microgel particles by organic solvents" J. Colloid Interface Sci. **2004** ; *274* , 49-54.
92. J. Wallyn, N. Anton, C. Serra, M. Bouquey, M. Collot, H. Anton, J.-L. Weickert, N. Messaddeq, T. Vandamme "A new formulation of poly(MAOTIB) nanoparticles as an efficient contrast agent for in vivo X-ray imaging" Acta Biomater. **2017** ; *66* , 200-212.
93. G. Borchard, J. Kreuter "The Role of Serum Complement on the Organ Distribution of Intravenously Administrated Poly (methyl methacrylate) Nanoparticles: Effects of Pre-Coating with Plasma and with Serum Complement" Pharm. Res. **1996** ; *13(7)* , 1055-1058.
94. E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari "Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery " Nat. Biotechnol. **2015** ; *33(9)* , 941 - 951
95. L. Sandiford, A. Phinikaridou, A. Protti, L. Meszaros, X.Cui, Y. Yan, G. Frodsham, P. Williamson, N. Gaddum, R. Botnar, P. Blower, M. Green, R. de Rosales "Bisphosphonate-Anchored PEGylation and Radiolabeling of Superparamagnetic Iron Oxide: Long-Circulating Nanoparticles for in Vivo Multimodal (T1 MRI-SPECT) Imaging" ACS Nano **2013** ; *7(1)* , 500 - 512
96. G. Bunker, *Introduction to XAFS: A Practical Guide to X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy*, Cambridge University Press, Cambridge, **2010**
97. G. Waychunas, M. Apte, G. Brown Jr. "X-ray K-edge absorption spectra of Fe minerals and model compounds: Near-edge structure" Phys. Chem. Miner. **1983** ; *10(1)* , 1-9.
98. R. Murty "Effective Atomic Numbers of Heterogeneous Materials" Nature **1965** ; *207* , 398-399.
99. S. Salem, S. Panossian, R. Krause "Experimental K and L relative x-ray emission rates" At. Data Nucl. Data Tables **1974** ; *14(2)* , 91-109.
100. J. Robinson, *Practical Handbook of Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton (FL), **1991**
101. D. Thorek, A. Tsourkas "Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells" Biomaterials **2008** ; *29* , 3583-3590.
102. P. Soares, C. Laiab, A. Carvalho, L. Pereirac, J. Coutinhoc, I. Ferreiraa, C. Novod, J. Borges "Iron oxide nanoparticles stabilized with a bilayer of oleic acid for magnetic hyperthermia and MRI applications" Appl. Surf. Sci. **2016** ; *383* , 240-247.

103. F. Hu, K. MacRenaris, E. Waters, T. Liang, E. Schultz-Sikma, A. Eckermann, T. Meade "Ultrasmall, Water-Soluble Magnetite Nanoparticles with High Relaxivity for Magnetic Resonance Imaging" *J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces* **2009** ; *113(49)* , 20855-20860.
104. T. Clements, C. Sarsons, C. Platnich, A. Banerjee, B. Blasiak, B. Tomanek, K. Rinker, S. Trudel "Maltol-Functionalized Fe₃O₄ Nanoparticles as T₂ Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents" *ChemistrySelect* **2016** ; *1* , 1602-1606.
105. B. Blasiak, Z. Zhang, X. Zhang, T. Foniok, G. R. Sutherland, T. Veres, B. Tomanek "The effect of coating of Fe₃O₄/silica core/shell nanoparticles on T₂ relaxation time at 9.4 T" *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **2011** ; *55* , 10401-10406.
106. T. Förster "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz" *Ann. Physik.* **1948** ; *437(1-2)* , 55-75.
107. S. Müller, H. Galliardt, J. Schneider, B. Barisas, T. Seidel "Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells" *Front. Plant Sci.* **2013** ; *4* , 413.

7 ANHANG

A1: Zeitlicher Verlauf des Sauerstoffgehalts von Wasser bei Begasung mit Argon

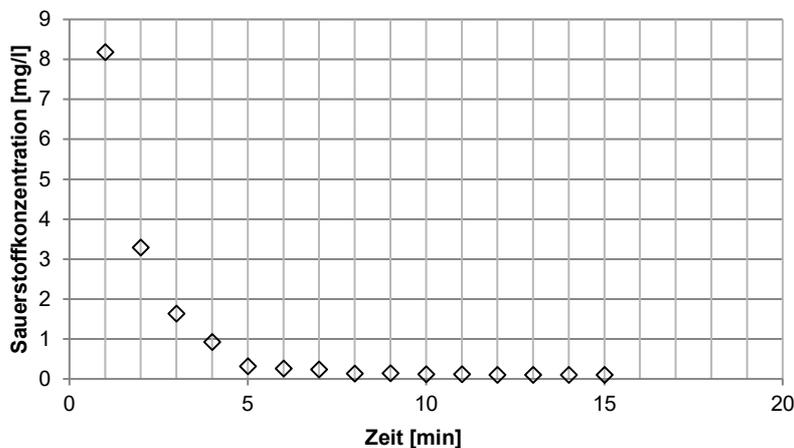


Abb. A1: Sauerstoffgehalt von 100 ml Wasser unter Begasung mit Argon für 15 Minuten

A2: XRD Spektrum von Fe_3O_4

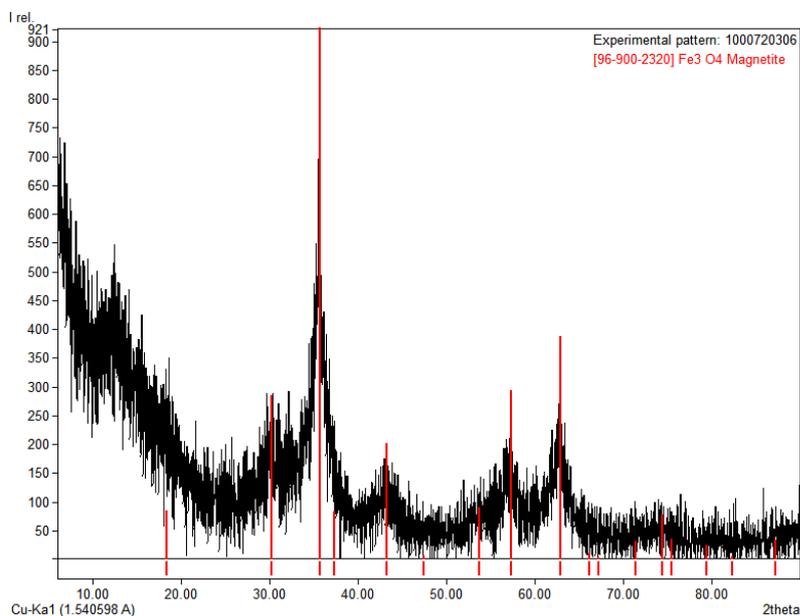


Abb. A2: XRD Spektrum von Fe_3O_4 Nanopartikeln mit $d_{\text{DLS}} = 7$ nm; Röntgenröhre mit Kupferanode, Lynxeye XE 1D-Detektor mit Nickel Filter (Parameter - Voltage: 40kV, Current: 40mA; Step size: 0.02° , scan speed 0.2s/step; Soller slits [primary side]: 2.5° ; Soller slits [secondary side]: 2.5° ; Divergence slit: 0.17°)

Die Röntgendiffraktometrie bestätigt die Kristallstruktur von kubischem Fe_3O_4 . Die Reflexbreiten lassen durch die Bestimmung der Halbwertsbreite auf Kristallitgrößen von 5 nm schließen, wodurch sich die mit DLS bestimmte Partikelgröße von circa 7

nm bestätigt. Das Signalrauschen ist durch die kleinen Kristallitgrößen und die Cu- $K_{\alpha 1}$ Strahlung relativ hoch. Cu- $K_{\alpha 1}$ Strahlung regt in ihrem Energiebereich eisenhaltige Proben zur Röntgenfluoreszenz an und somit zur Emission polychromatische Röntgenstrahlung, welche zu erhöhtem Hintergrundrauschen führt.

A3: Reproduzierbarkeit der $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB Synthese (Kapitel 3.3.1)

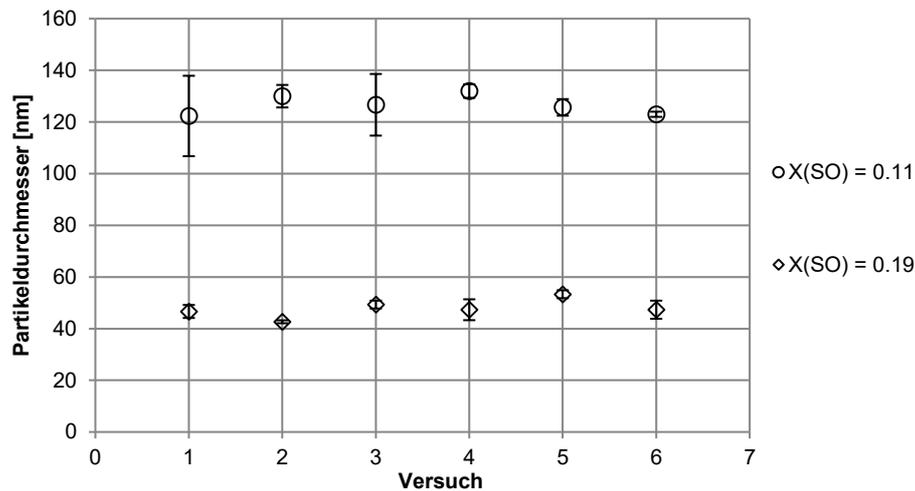


Abb. A3: Partikelgrößen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB aus sechs Versuchen mit 3,44 % Fe_3O_4 w/w und X_{SO} konstant bei jeweils 0,11 und 0,19; die Datenpunkte und Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

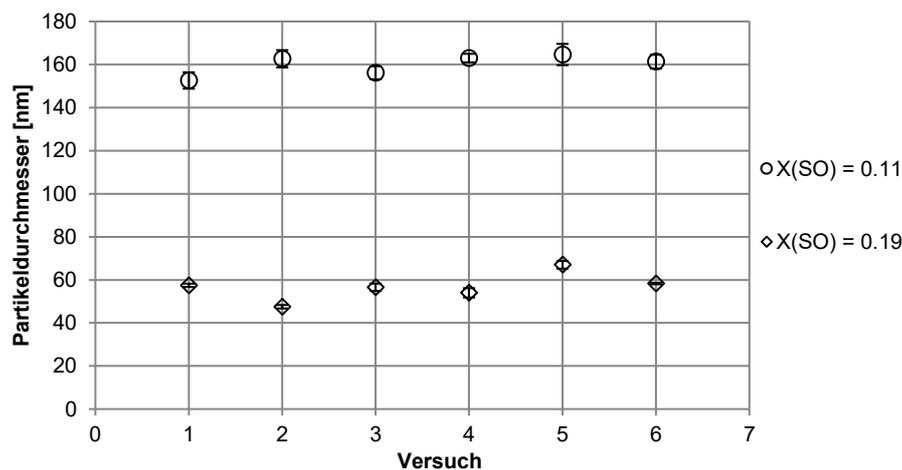


Abb. A4: Partikelgrößen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MAOETIB aus sechs Versuchen mit 22,2 % Fe_3O_4 w/w und X_{SO} konstant bei jeweils 0,11 und 0,19; die Datenpunkte und Fehlerbalken beziehen sich auf eine gemittelte Partikelgröße aus drei DLS Messungen derselben Probe

A4: Charakterisierung der Partikel mit IR und $^1\text{H-NMR}$ SpektroskopieIR Spektroskopie:

Zur weiteren Charakterisierung des Polymerisationsprozesses wurden IR- und NMR-Spektren des Monomers und des Polymers von (poly)MAOETIB aufgenommen.

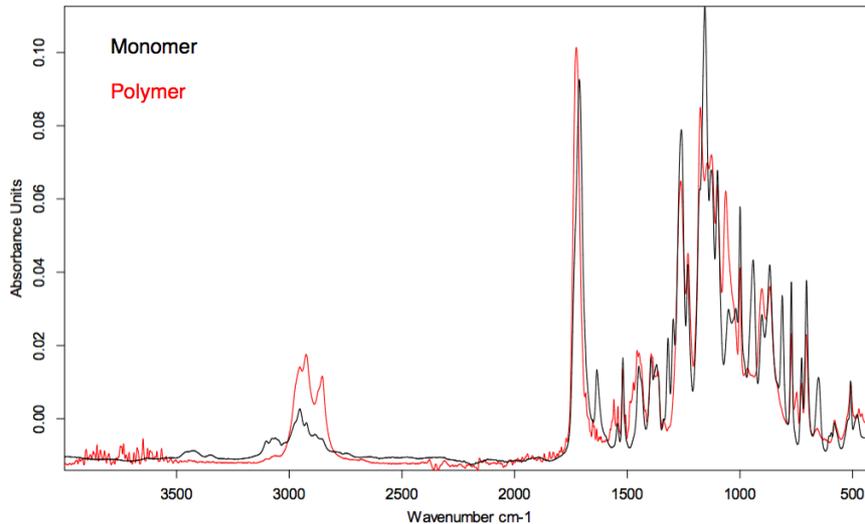


Abb. 5: IR Spektren von MAOETIB (schwarz) und polyMAOETIB (rot); $\nu_{\text{C=O}} = 1712 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C=C}} = 1634 \text{ cm}^{-1}$

Die Messungen wurden mit einem Bruker Alpha FT-IR Platinum ATR Spektrometer durchgeführt. In Abbildung A5 sind zwei typische IR Spektren dargestellt. Der Peak bei 1712 cm^{-1} kann für beide Spektren der Carbonylgruppe des MAOETIB Moleküls zugeordnet werden. Im Spektrum des Monomers befindet sich bei 1634 cm^{-1} der Peak der C=C Doppelbindung, welcher im Polymerspektrum nicht mehr zu sehen ist.

^1H -NMR Spektroskopie:

In Abbildung A6 und Abbildung A7 sind die ^1H -NMR-Spektren des MAOETIB Monomers und von polyMAOETIB dargestellt

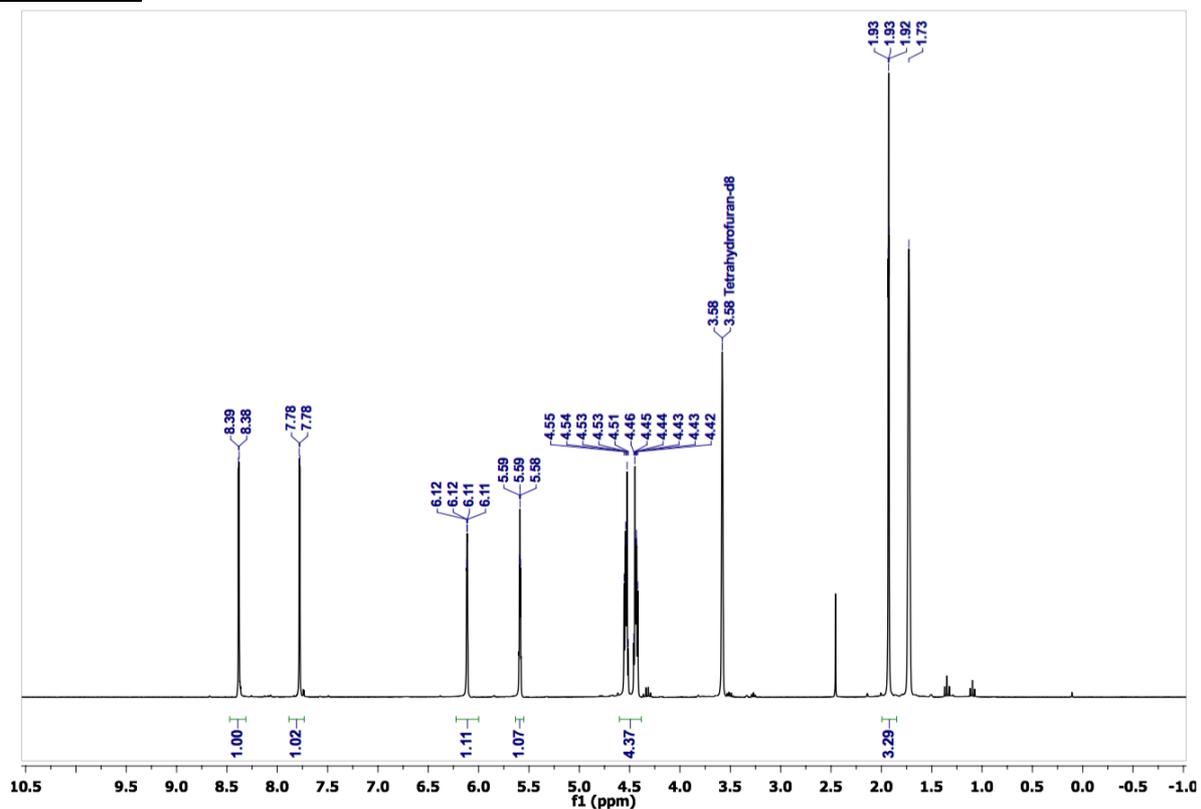
Monomer:

Abb. A6: NMR Spektrum des MAOETIB Monomers; ^1H -NMR (THF-d8), δ 1.93 (s, 3H, CH_3), 4.43 and 4.53 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 5.57–5.61 (m, 1H, olefinic), 6.09–6.15 (m, 1H, olefinic), 7.78 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 8.39 ppm (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, Ar-H)

Polymer:

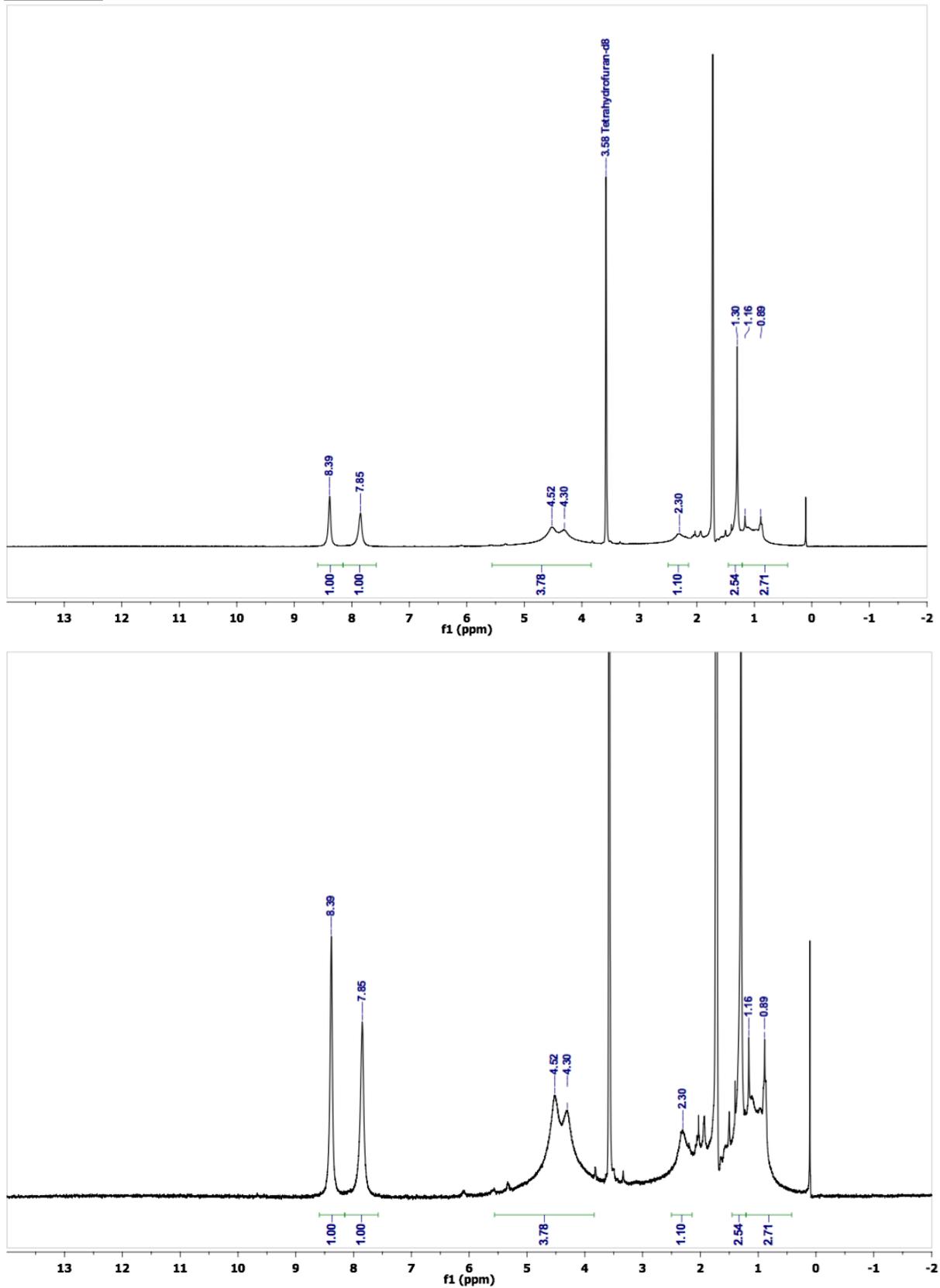


Abb. A7: NMR Spektrum von polyMAOETIB; $^1\text{H-NMR}$ (THF-d_8), δ 1.3 (s, 3H, CH_3), 4.3 and 4.52 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 7.85 (s, 1H, Ar-H), 8.39 ppm (s, 1H, Ar-H)

Die Messungen wurden mit einem Varian Oxford 300 MHz NMR durchgeführt. Deuteriertes Tetrahydrofuran (d8-THF) wurde als Lösungsmittel verwendet. In Abbildung A6 sind bei 5.57–5.61 ppm und 6.09–6.15 ppm die beiden H-Atome der Doppelbindung des Monomers zu erkennen. Im Polymerspektrum in Abbildung A7 sind die beiden Peaks der Vinylgebundenen H-Atome durch die Polymerisation verschwunden.

Die beiden spektroskopischen Methoden dienen der qualitativen Analyse des Edukts (MAOETIB Monomer) und Produkts (polyMAOETIB), um eine Aussage über die erfolgreiche Durchführung der Polymerisation treffen zu können. Die IR Spektren in Abbildung A5 zeigen im Polymerspektrum durch das Verschwinden des Peaks der C=C Schwingung bei 1634 cm^{-1} , dass eine chemische Reaktion, in diesem Falle eine Polymerisation stattgefunden hat. Der Peak der C-I Bindung befindet sich laut Literatur zwischen $1061 - 1057\text{ cm}^{-1}$ und konnte daher nicht exakt bestimmt werden, da er sich im charakteristischen Spektrum (Fingerprint Area) der Substanz befindet. Das NMR Spektrum kann dem MAOETIB Monomer eindeutig zugeordnet werden. Die gemessenen Werte stimmen mit den Literaturwerten überein.^{44,46-48,63} Das Verschwinden der Peaks der beiden H-Atome der C=C Doppelbindung im Spektrum des Polymers deutet auf eine chemische Reaktion bzw. einen Polymerisationsvorgang hin. Da die Löslichkeit des Polymers in THF auf 2 mg/ml limitiert war, sind die Peaks im Spektrum des Polymers etwas kleiner als im Spektrum des Monomers. Bei dem Vergleich beider Spektren ist eine leichter Versatz der Peaks durch chemische Verschiebung zu erkennen. Die Chemische Verschiebung kommt bei diesen Messungen zu Stande, da einerseits keine feste molare Masse vorliegt, sondern eine Molmassenverteilung. Zudem sind die sterischen Konfigurationen des Monomers und des Polymers verschieden.

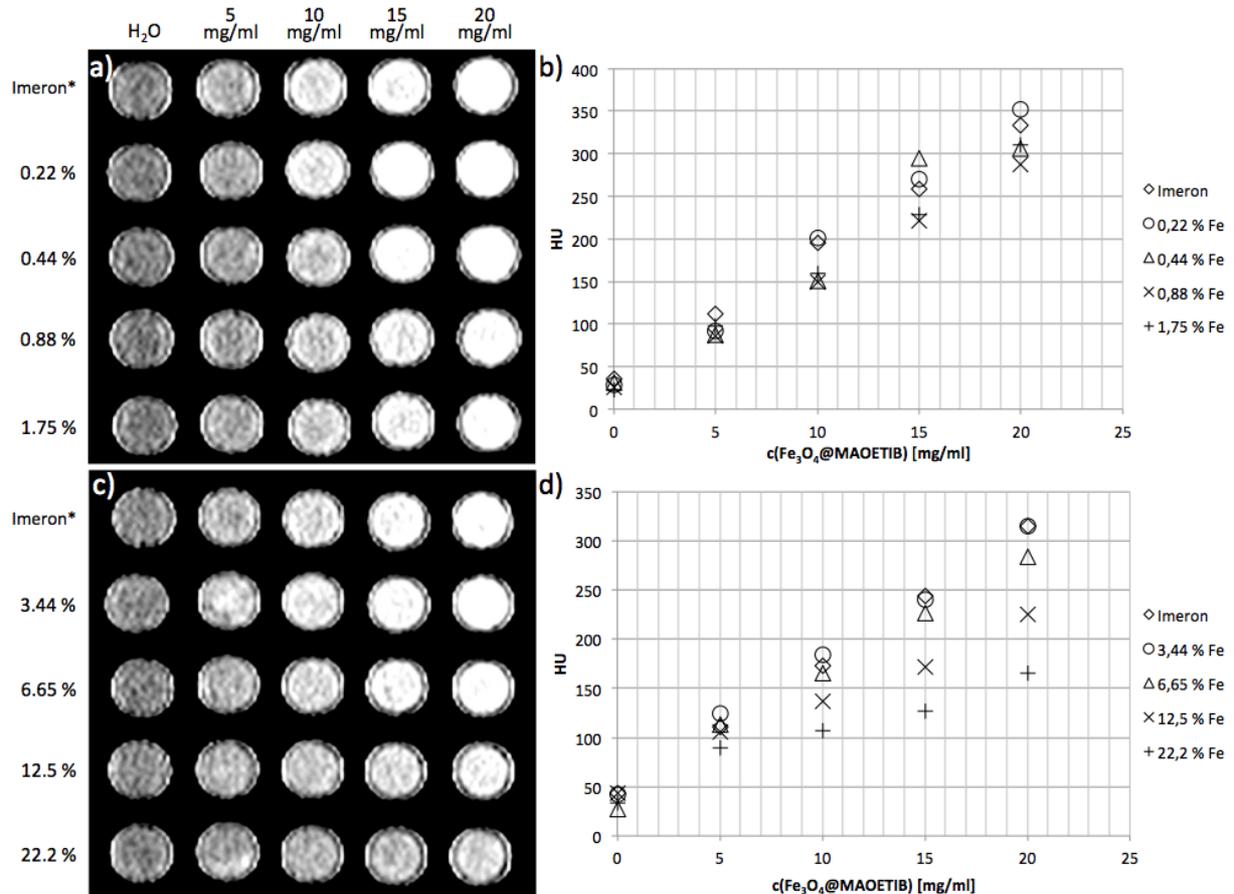
A5: CT Aufnahmen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ bei 150 keV und 70 keV (Kapitel 3.4)

Abb. A8: (a, c) CT Aufnahmen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ ($d_{\text{DLS}} = 56$ nm) mit einer Gesamtkonzentration von 5 - 20 mg/ml (außer Imeron) von links nach rechts und mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,22 - 22,22$ % von oben nach unten, verglichen mit dem klinischen Standard CT Kontrastmittel Imeron (*Imeron Iod Konzentrationen 3,25 mg/ml I, 6,5 mg/ml I, 9,75 mg/ml I, 13 mg/ml I); Röhrenspannung 150 keV (b, d) zugehörige Diagramme der Signalintensität in Abhängigkeit der Gesamtkonzentration $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$

Der CT Kontrast nimmt in Abbildung A8 analog zu Abbildung 32 von links nach rechts (5 - 20 mg/ml) mit steigender Gesamtkonzentration zu und von oben nach unten (0,22 - 22,2 % Fe_3O_4 w/w) mit einer zunehmenden Fe_3O_4 Menge ab. Da lediglich die Röhrenspannung um 30 keV angehoben wurde, sind sich die Bilder und der Trend der Datenpunkte sehr ähnlich. Auch in Abbildung A8 ist die Abnahme des CT Kontrasts bei niedrigen Eisenoxidkonzentrationen nicht signifikant. Bei einer Gesamtkonzentration von 20 mg/ml lag der Kontrast von Iomeprol (Imeron) bei 334 HU und der Kontrast mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 1,75$ % bei 288 HU, woraus sich eine maximale Differenz von 46 HU errechnet. In Abbildung A8 (d) nimmt der CT Kontrast bei konstanter $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Gesamtkonzentration mit zunehmender Fe_3O_4 Menge linear ab. Bei einer Gesamtkonzentration von 20 mg/ml lag die Intensität von Iomeprol bei 314 HU und bei den Nanopartikeln mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 22,2$ % bei 165 HU, mit einer Differenz von 149 HU. Im Vergleich zu den Aufnahmen bei 120 keV aus Abbildung 32 sind die Hounsfield Werte bei 150 keV in Abbildung A8 etwas niedriger.

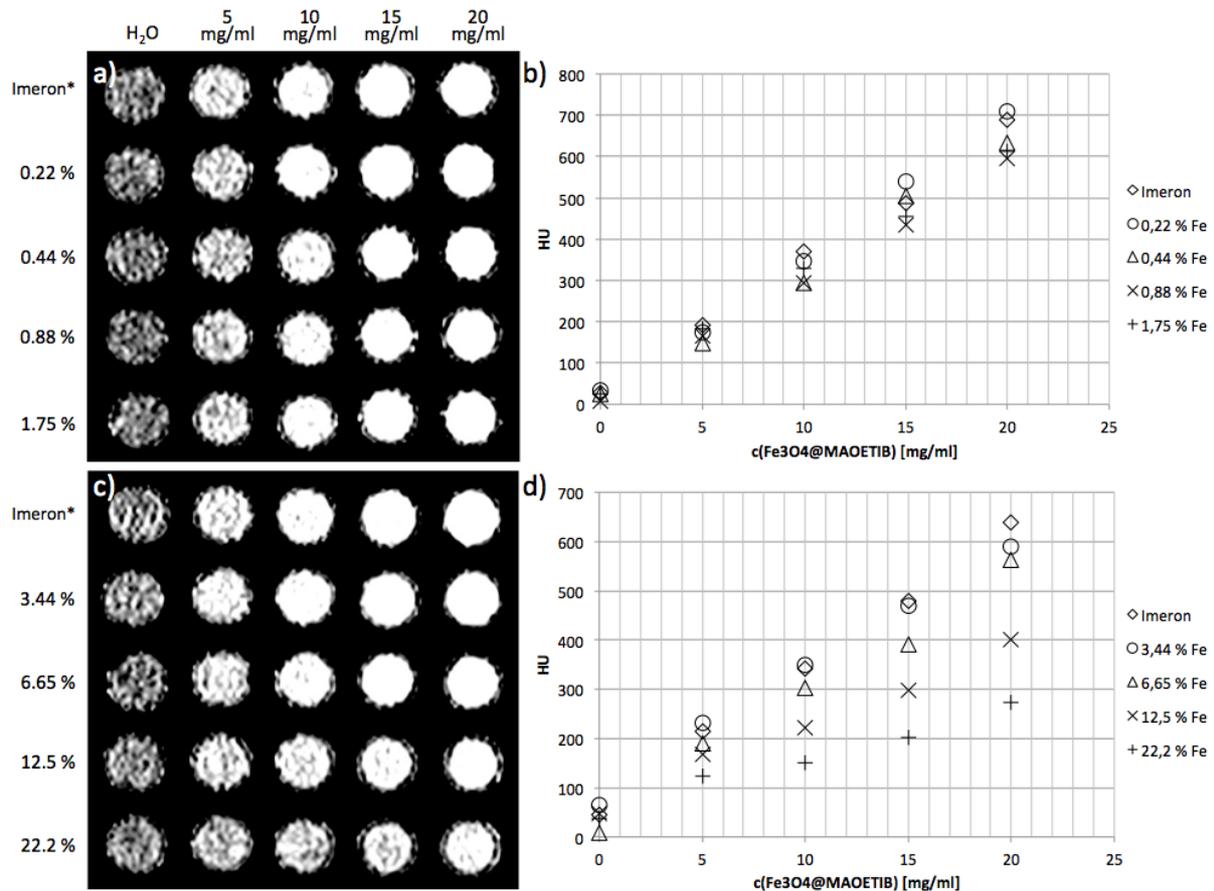


Abb. A9: (a, c) CT Aufnahmen von Fe₃O₄@MAOETIB ($d_{DLS} = 56$ nm) mit einer Gesamtkonzentration von 5 - 20 mg/ml (außer Imeron) von links nach rechts und mit $w_{Fe_3O_4} = 0,22 - 22,22$ % von oben nach unten, verglichen mit dem klinischen Standard CT Kontrastmittel Imeron (*Imeron Iod Konzentrationen 3,25 mg/ml I, 6,5 mg/ml I, 9,75 mg/ml I, 13 mg/ml I); Röhrenspannung 70 keV (b, d) zugehörige Diagramme der Signalintensität in Abhängigkeit der Gesamtkonzentration Fe₃O₄@MAOETIB

Abbildung A9 zeigt die Proben bei einer Röhrenspannung von 70 keV. Der Kontrast von Iomeprol (Imeron) liegt hier bei einer Gesamtkonzentration von 20 mg/ml bei 688 HU und der Kontrast mit $w_{Fe_3O_4} = 1,75$ % bei 612 HU, woraus sich eine maximale Differenz von 76 HU errechnet. In Abbildung A9 (d) nimmt der CT Kontrast bei konstanter Fe₃O₄@MAOETIB Gesamtkonzentration mit zunehmender Fe₃O₄ Menge linear ab. Bei einer Gesamtkonzentration von 20 mg/ml lag die Intensität von Iomeprol bei 640 HU und bei den Nanopartikeln mit $w_{Fe_3O_4} = 22,2$ % bei 273 HU, mit einer Differenz von 367 HU. Bei den Messungen mit 70 keV stiegen die Hounsfieldwerte bei im Vergleich zu den Messungen mit 120 keV an.

A6: CT Aufnahmen der AR42J Zellen bei 70 keV und 120 keV (Kapitel 3.6.2)

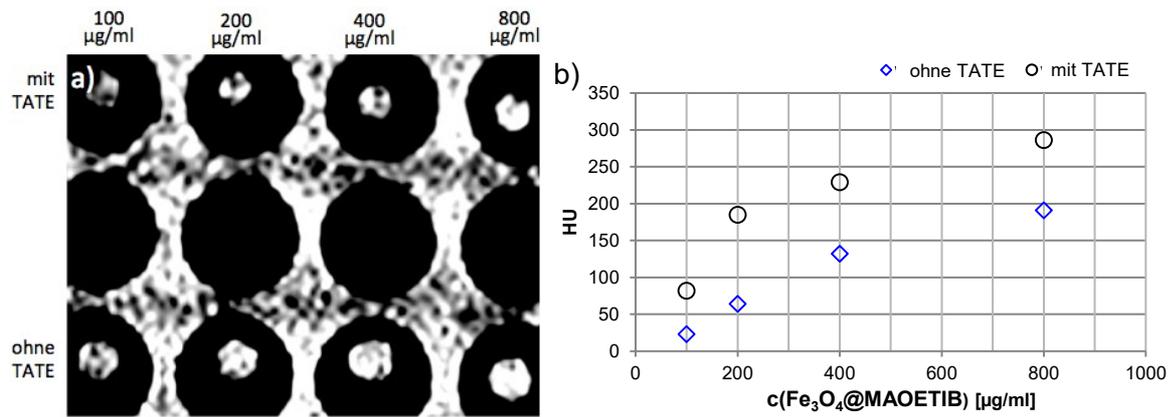


Abb. A10: (a) CT Aufnahmen von AR42J Zellen inkubiert mit nativen und Cys-TATE funktionalisierten $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikeln (mit Cys-TATE: $d_{DLS} = 65$ nm; ohne Cys-TATE: $d_{DLS} = 60$ nm), $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Konzentration 100 - 800 $\mu\text{g/ml}$ mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44$ %; Röhrenspondung 70 keV (b) CT Signalintensität in Abhängigkeit der $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Konzentration

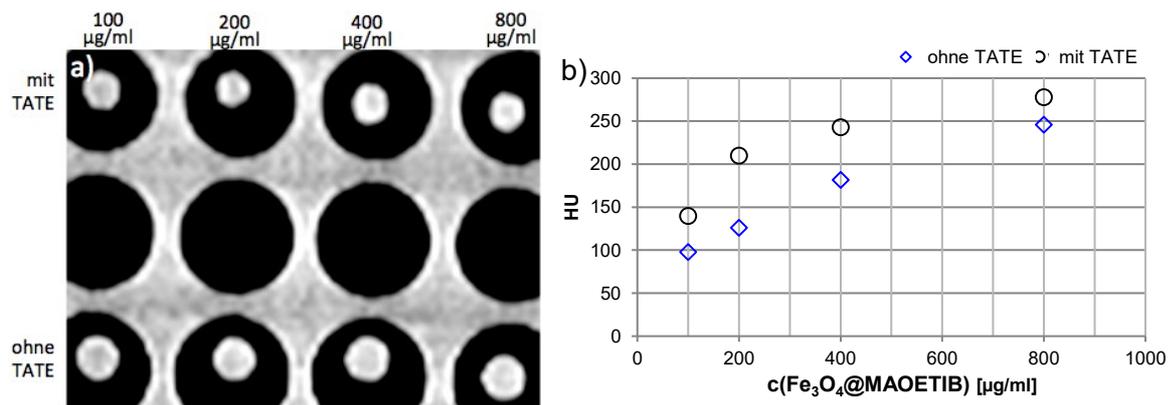
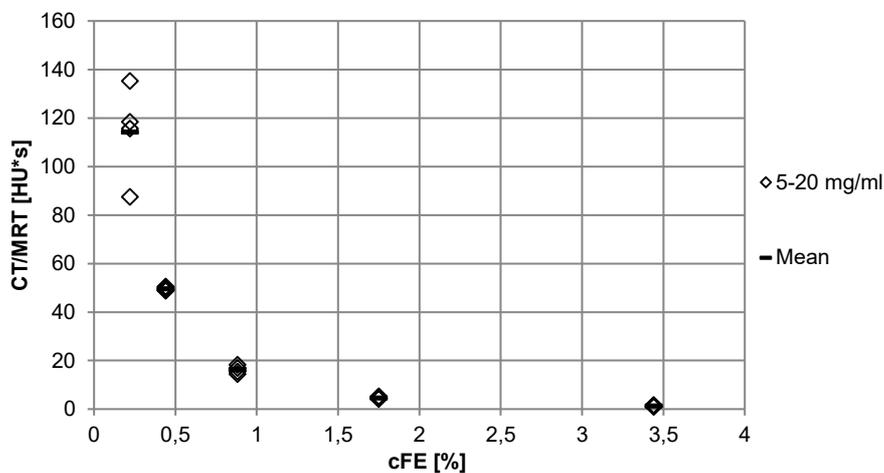


Abb. A11: (a) CT Aufnahmen von AR42J Zellen inkubiert mit nativen und Cys-TATE funktionalisierten $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Partikeln (mit Cys-TATE: $d_{DLS} = 65$ nm; ohne Cys-TATE: $d_{DLS} = 60$ nm), $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Konzentration 100 - 800 $\mu\text{g/ml}$ mit $w_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3,44$ %; Röhrenspondung 150 keV (b) CT Signalintensität in Abhängigkeit der $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAOETIB$ Konzentration

A7: CT/MRT Kontrastverhältnis bei 70 keV und 150 keV

Tab. A1: CT/MRT Kontrastverhältnis für eine Röhrenspannung von 70 keV

	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml	Mittelwert	AR42J Zellen
0.22 % Fe	87.50	115.67	135.25	118.33	114.19	
0.44 % Fe	49.67	49.17	50.40	48.69	49.48	
0.88 % Fe	18.22	15.47	14.47	16.97	16.28	
1.75 % Fe	5.20	4.39	4.14	4.47	4.55	
3.44 % Fe	1.67	1.10	1.02	1.00	1.20	2.95
6.65 % Fe	2.02	2.02	2.03	2.44	2.13	
12.5 % Fe	1.72	1.59	1.61	1.65	1.64	
22.2 % Fe	1.37	1.01	1.12	1.25	1.19	

Abb. A12: CT/MRT Kontrastverhältnis in Abhängigkeit der Fe₃O₄ Konzentration; Röhrenspannung 70 keV

Tab. A2: CT/MRT Kontrastverhältnis für eine Röhrenspannung von 150 keV

	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml	Mittelwert	AR42J Zellen
0.22 % Fe	46.00	67.00	67.50	58.67	59.79	
0.44 % Fe	29.00	25.17	29.50	23.54	26.80	
0.88 % Fe	9.56	7.89	7.37	8.23	8.26	
1.75 % Fe	2.80	2.13	2.08	2.27	2.32	
3.44 % Fe	0.90	0.58	0.52	0.53	0.63	1.33
6.65 % Fe	1.20	1.10	1.17	1.23	1.17	
12.5 % Fe	1.09	0.98	0.92	0.93	0.98	
22.2 % Fe	0.99	0.71	0.71	0.75	0.79	

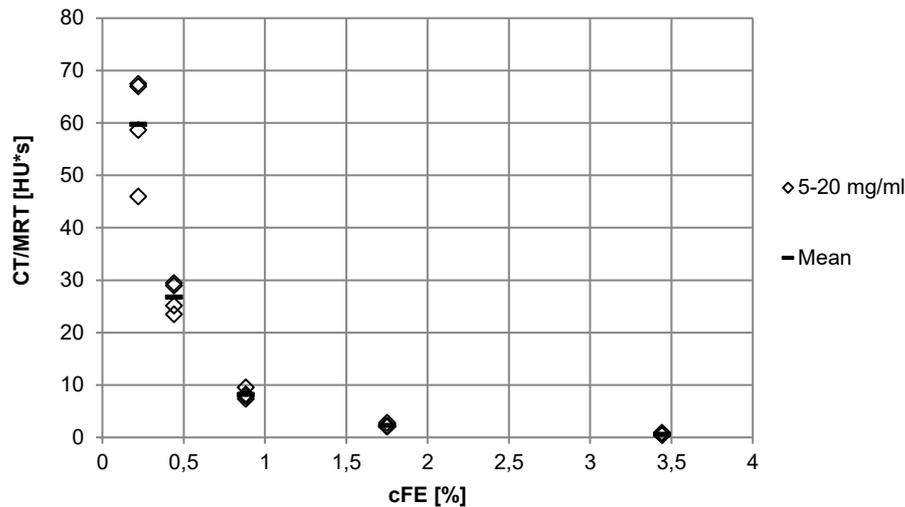


Abb. A13: CT/MRT Kontrastverhältnis in Abhängigkeit der Fe_3O_4 Konzentration; Röhrenspannung 150 keV

A8: Gleichung zur Berechnung der Student-t-Verteilung

Zur Bestimmung des Vertrauensbereiches des Mittelwerts \bar{x} der Stichproben aus Kapitel 3.1.1, Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.3.1 wurde mit Hilfe des Programmes MiniTab eine Student-t-Verteilung erstellt. Das Konfidenzintervall betrug 95 %. Die obere Grenze μ_o und untere Grenze μ_u des Vertrauensbereichs errechnet sich aus Gleichung A1, wobei s die Standardabweichung und n die Anzahl der Messwerte darstellt. Der Wert für t ist mit dem entsprechenden Konfidenzintervall aus einer t-Faktor Tabelle zu entnehmen.

$$\mu_{o/u} = \bar{x} \pm t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Gl. A1})$$

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Illert, Patrick (M.Sc.)
Geburtsdatum: 01.02.1984
Geburtsort: Viernheim
Familienstand: ledig
Vater: Jürgen Illert

SCHULISCHER WERDEGANG

2005 – 2006 BBS-N Ludwigshafen
28.06.2006 Fachhochschulreife

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2006/07 Beginn des Studiums Chemische Technik
An der Hochschule Mannheim
13.01.2011 Bachelor
2011 – 2013 Masterstudium Chemieingenieurwesen
An der Hochschule Mannheim
WS2012/13 Masterarbeit: Herstellung von superparamagnetischen
Fe₃O₄-Nanopartikeln
04.09.2013 Master, Note: 1,5

9 DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Björn Wängler und seiner Frau PD Dr. Carmen Wängler vom Institut für Molekulare Bildgebung & Radiochemie und Biomedizinische Chemie am Universitätsklinikum Mannheim für ihr Vertrauen und die Aufnahme als Doktorand in ihre herzliche Arbeitsgruppe. Außerdem danke ich beiden für die stets sofortige Unterstützung und Betreuung, wenn es notwendig war, sowie für das Korrekturlesen der Doktorarbeit und der Veröffentlichungen.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Thorsten Röder vom Institut für Verfahrens- und Chemietechnik an der Hochschule Mannheim für das Angebot unter seiner Supervision zu promovieren, die intensive Betreuung, seine geduldige Ausdauer und die über nun viele Jahre hinweg fortwährende Unterstützung, für die intensiven wissenschaftliche Diskussionen und die Weitergabe seines sehr umfangreichen Fachwissens.

Ebenso danke ich Frau Dr. Shanna Litau für die Hilfe bei der Durchführung der Peptidfestphasensynthese, und Frau Stephanie Riester und Herrn Dr. Marc Pretze für ihre Hilfe bei den Zellversuchen.

Dr. med. Nils Vogler, Dr. med. Matthias Meyer und vor allem Tanja Uhrig (M.Sc.) möchte ich für die CT und MRT Messungen am Universitätsklinikum Mannheim danken. Des Weiteren möchte ich mich bei Jonas Schramm (M.Sc.) vom Fraunhofer ICT-IMM in Mainz für die TEM Aufnahmen und bei Dr. Sebastian Schäfer von der hte GmbH in Heidelberg für die XRD Messungen bedanken.

Bei meinem Laborteam Dipl.-Ing. Doris Henke, Zhazira Kenzhehanova (M.Sc.), Beate Veltmann, Dipl.-Ing. Claudia Bartling, Dr. Markus Birkenmeier, Dr. Sebastian Schwolow, Tobias Baumeister (M.Sc.), Verena Fath (M.Sc.), Clarissa Benzin (M.Sc.), Felix Hilpert (M.Sc.) und Torsten Klement (M.Sc.) am Institut für Verfahrens- und Chemietechnik an der Hochschule Mannheim möchte ich mich für die wunderschöne Zeit bedanken und vor allem dafür, dass mich jeder in den heißen Phasen der Promotion meiner Konzentration überließ.

Nicht zuletzt danke ich der "Albert und Anneliese Konanz-Stiftung" der Hochschule Mannheim für das Überlassen des Stipendiums und die finanzielle Unterstützung, ohne die das Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank.

Was ich meinem Vater gerne sagen würde, wäre in Worte nicht zu fassen.
Du bist der wichtigste Mensch in meinem Leben.