



Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel für biomedizinische Anwendungen: Biokompatible Synthese und Funktionalisierung

superparamagnetic iron oxide nanoparticles for biomedical
applications: biocompatible synthesis and functionilization

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Sebastian Willruth

Fachbereich Chemie
Institut für Physikalische Chemie
Universität Hamburg

2023

Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. Horst Weller

Prof. Dr. Alf Mews

Prüfungskommission der Disputation:

Prof. Dr Horst Weller

Prof. Dr Jakob Albert

Dr. Thomas Hackl

Datum der Disputation: 04.08.2023

Datum der Druckfreigabe: 04.08.2023

Publikationen

Jakob Benedikt Mietner, Sebastian Willruth, Rajesh Kombar, Christoph Gimmmler, Bilal Nehmeh, Julien R. G. Navarro, *Polymer-Modified Cellulose Nanofibrils Cross-Linked with Cobalt Iron Oxide Nanoparticles as a Gel Ink for 3D Printing Objects with Magnetic and Electrochemical Properties*, *Fibers*, **2023**, 11, 2.

DOI: 10.3390/fib11010002

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	9
3	Theoretischer Hintergrund	13
3.1	Bildung von Nanopartikeln	13
3.2	Polyolsynthese von Eisenoxidnanopartikeln	17
3.3	Magnetismus	18
3.3.1	Verschiedene Formen des Magnetismus	19
3.3.2	Diamagnetismus	19
3.3.3	Paramagnetismus	20
3.3.4	Kollektiver Magnetismus	21
3.3.5	Magnetische Anisotropie	25
3.3.6	Hysterese	26
3.3.7	Superparamagnetismus	28
3.3.8	Sättigungsmagnetisierung von Nanopartikeln	30
3.3.9	Kolloidstabilität	31
3.4	Magnetresonanztomographie (MRT)	32
3.4.1	Nanopartikel als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie	36
3.5	Partikelagglomerate	39
3.6	Magnetische Partikel Tomographie	40
4	Zielstellung	45
5	Ergebnisse und Diskussion	47
5.1	USPIONs als T_1 Kontrastmittel	49
5.1.1	Batch Synthese	50
5.1.2	Flusssynthese	53
5.2	Stabilisierung im wässrigen Medium	62
5.2.1	Mizellare Stabilisierung	63
5.2.2	Direkte Stabilisierung nach Synthese	64

5.2.3	Ligandenaustausch	66
5.2.4	Relaxometrische Messungen	68
5.3	Kontrollierte Agglomeration für MPT-Tracer	71
5.3.1	Herstellung blumenartiger Partikelagglomerate durch die ausschließliche Verwendung des Eisen(II)Precursors	72
5.3.2	Kontrollierte Agglomeration durch Wasserzugabe	75
5.4	Eignung als MPT-Tracer	76
5.5	Darstellung magnetofluoreszenter Partikelaggregate	84
5.5.1	Herstellung magnetischer Partikelaggregate durch evaporationsinduzierte Selbstassemblierungsverfahren (EISA)	85
5.5.2	Herstellung magnetischer Partikelaggregate durch mikrofluidische Tropfenherstellung	91
5.5.3	Herstellung fluoreszenter QD-Cluster	96
5.5.4	Kopplung der magnetischen und fluoreszenten Partikelaggregate	99
6	Experimenteller Teil	107
6.1	Analytische Methoden	107
6.1.1	Kernresonanz Relaxometrie	107
6.1.2	Dynamische Lichtstreuung	108
6.1.3	Transmissionselektronenmikroskopie	108
6.1.4	Infrarotspektroskopie	108
6.1.5	Elementaranalyse	108
6.1.6	Magnetometer mit vibrierender Probe	108
6.1.7	Magnetische Partikel Spektrometer	109
6.1.8	Pulver-Röntgendiffraktometrie	109
6.2	Synthetische Methoden	109
6.3	Chemikalien	109
6.4	Synthese der SPIONs	110
6.4.1	Batch-Synthese	110
6.4.2	Flusssynthese	111
6.5	Verweilzeitbestimmung	112
6.6	Aufreinigung der SPIONs	112
6.6.1	Zweiphasensystem	113
6.7	Stabilisierung im wässrigen Medium	113
6.7.1	PEG-Phosphat	113
6.7.2	Mizellare Verkapselung	114
6.8	Herstellung magnetischer Partikelagglomerate	115
6.8.1	Erste Emulsionspolymerisation	115

6.8.2	Zweite Emulsionspolymerisation	116
6.8.3	Emulgierung mittels <i>focussed flow droplet generator</i>	117
6.9	Herstellung fluoreszierender Partikelagglomerate	117
6.10	Kopplungsexperimente der magnetofluoreszenten Konstrukte	118
6.10.1	EDC/NHS Kopplung	118
7	Sicherheit und Entsorgung	119

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung der Konzentration des Monomers vor und nach der Nukleation als Funktion der Zeit nach LAMER <i>et al.</i> ^[29]	14
2	Graphische Darstellung der Änderung der freien Enthalpie der Kristallisation als Funktion des Kristallradius unter Betrachtung der Wechselwirkung der Oberflächenenergie zu der Enthalpie der Kristallbildung nach KLABUNDE und RICHARDS. ^[33]	16
3	Schematische Darstellung der Trennung von Nukleation und Wachstum von Nanopartikeln und den Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung nach KLABUNDE und RICHARDS. ^[28]	17
4	Schematische Darstellung der Ausrichtung der magnetischen Momente in Ferro-, Antiferro- und Ferromagneten nach KLABUNDE und RICHARDS. ^[28]	22
5	Darstellung der Spinrotation zwischen zwei antiparallel ausgerichteten Domänen durch die Ausbildung einer NÉEL-Wand (oben) oder einer BLOCH-Wand (unten). In diesen Bereichen wird die Rotation der Spins auf möglichst viele Spins verteilt um die Energie zu minimieren. Die Abbildung wurde in Anlehnung nach MARROWS erstellt. ^[47]	25
6	Vergrößerung der WEISS'SCHEN Bezirke bei Anlegen eines äußeren Magnetfeldes. In Anlehnung an BARTELMANN. ^[48]	27
7	Schematischer Verlauf der Magnetisierung $\vec{M}$ eines Ferromagneten bei Anlegung eines externen Magnetfeldes mit der Feldstärke $\vec{H}$ in Anlehnung an COEY. ^[41]	28
8	Verlauf der Koerzitivfeldstärke H_C in Abhängigkeit von dem Partikeldurchmesser d . In Anlehnung an KLABUNDE. ^[28]	29
9	Schematische Abbildung der Abhängigkeit der Magnetisierung von magnetischen Nanopartikeln durch die Ausbildung glasartiger Spinstrukturen an der Oberfläche. In Anlehnung nach Jeon <i>et al.</i> ^[6]	30

10	Wechselwirkungen zwischen den attraktiven VAN DER WAALS-Kräften V_A und der repulsiven Überlappung elektrischer Doppelschichten V_R als Funktion des Abstands der Teilchen. In Anlehnung an LAUTH und KOWALCZYK. ^[54]	32
11	Schematische Darstellung der Präzessionsbewegung des Kernspins und des daraus resultierenden magnetischen Moments $\vec{\mu}$, um die Feldrichtung eines Magnetfeldes $\vec{B}_0$. In Anlehnung an REISER und SEMMLER. ^[61]	33
12	Schematische Darstellung der longitudinalen T_1 - und transversalen T_2 -Relaxation nach der Anregung mit einem 90 ° Puls.	35
13	Schematische Darstellung eines SPIONs mit Ligandenhülle und deren Interaktionen mit Wasser Molekülen in der inneren und äußeren Sphäre der Liganden in Anlehnung an JEON. ^[6]	38
14	Foto von einem mit 50 mM Resovist® gefüllten Schlauch und dessen Projektion in einem MPT Scanner. Diese Abbildung wurde übernommen mit Erlaubnis aus <i>Projection Reconstruction Magnetic Particle Imaging</i> ©2013 IEEE. ^[80]	40
15	Schematisches Funktionsprinzip einer MPT Messung. Es sind zwei SPIONs in zwei verschiedenen Bereichen im angelegten Magnetfeld dargestellt. In Schwarz ist ein SPION im feldfreien Punkt und seine Antwort auf ein oszillierendes Magnetfeld dargestellt. In Blau ist ein SPION und seine Antwort auf ein oszillierendes Magnetfeld außerhalb des feldfreien Punktes dargestellt. Die Abbildung wurde in Anlehnung an KNOPP und MINARD erstellt. ^[79,81]	41
16	Schematische Darstellung der BROWN und NÉEL-Relaxation magnetischer Nanopartikel in Anlehnung an KNOPP. ^[79]	42
17	TEM-Bilder des Wachstumsverlaufs der SPIONs in der <i>hot injection</i> Reaktion in Anlehnung an GOLOVERDA <i>et al.</i> ^[87] , in einem Zeitraum von bis zu 60 min nach der Injektion der Eduktlösung. Für die Verfolgung des Partikelwachstums wurde eine Probe vor der Nukleation (A) und Proben nach 5 (B), 15 (C), 30 (D), 45 (E) und 60 min (F) entnommen und mit dem TEM untersucht. ^[90]	51
18	XRD Diffraktogramm von 6.6 nm $\pm$ 14 % SPIONs mit Referenzkarten für Magnetit (blau 00-019-0629) ^[91] und Maghemit (grün 00-039-1346) ^[92]	52
19	Schematische Darstellung der Flusssynthese von Eisenoxiden. Der Flussreaktor besteht aus einem Spritzenpumpensystem (1), einer <i>split and combine</i> Mischstruktur (2) und einem Wachstumsofen (3).	55

20	Foto des Aufbaus der Flusssynthese zur kontinuierlichen Flusssynthese von USPIONs mit TEM Beispielbildern einer Flusssynthese und ihre Größenstatistik.	56
21	Auftragung der Absorption bei 584 nm (Absorptionsmaximum Rhodamin in DEG) gegenüber der reduzierten Verweilzeit zur Bestimmung der Verweilzeitverteilung.	58
22	Einfluss der Flussrate bei einer Konzentration der Eduktlösung von 111 und 150 mmol/L (A) und der Temperatur des WachstumsOfens (B) auf die Partikelgröße.	59
23	Einfluss der Eisenkonzentration in der Eduktlösung auf den Partikeldurchmesser bei einer Flussrate von 0.5 ml/min. Der Partikeldurchmesser der USPIONs bei einer Eisenkonzentration von 150 mmol L ⁻¹ und Flussraten von 0.75 und 1.00 ml/min sind zusätzlich gezeigt, um den Trend in der Partikelgröße zu zeigen.	60
24	Verfolgung der Partikelgrößenänderung im Laufe einer Flusssynthese durch Probenzug bei drei unterschiedlichen Synthesen (links) und Partikelgröße von 4 Flusssynthesen unter gleichen Reaktionsparametern zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit (rechts).	61
25	Foto des Phasentransfers von Diehtylenglykol (unten) in Toluol (oben) von Proben einer Flusssynthese unter Standardbedingungen des Vorlaufs, nach 20 min, 60 min und der Nachspülung, sowie TEM-Bilder der Probe nach 60 min.	62
26	DLS Messungen vor und nach der mizellaren Stabilisierung von 3 nm SPI-ONs mit Polysorbat 80 und TEM Übersichtsbild nach der Stabilisierung. .	64
27	Mittels DLS bestimmte Volumenverteilung der mit PEG-Phosphat stabilisierten USPIONs und dem Blindexperiment durch Wasserzugabe, sowie TEM-Übersichtsbild der PEG-Phosphat stabilisierten USPIONs.	65
28	KBr FTIR Messungen des PEG-Phosphat Liganden, PEG-Phosphat stabilisierten USPION, USPION Blindprobe in Wasser und Oleylphosphat stabilisierte USPIONs.	65
29	Mittels DLS bestimmte Volumenverteilung und TEM Übersichtsbild der 4 nm USPIONs, welche mittels Polymaleinsäure- <i>alt</i> -decan in Wasser stabilisiert wurden.	66
30	Stabilisierung hydrophober Nanopartikel nach MULVANEY an 6.9 nm SPI-ONs durch eine Ringöffnung des Maleinäureanhydrids durch Zugabe von Ethanolamin in einem Zweiphasensystem (rechts) und einer Blindprobe ohne Ethanolamin (links). ^[104]	67

31	Mittels DLS bestimmte Volumenverteilung und TEM-Übersichtsbild der nach MULVANEY mittels Öffnung des Anhydrids durch Ethanolamin in Wasser stabilisierten SPIONs. ^[105]	67
32	Relaxivitäten von SPIONs unterschiedlicher Größe verkapselt mit Polysorbat 80, stabilisiert direkt nach der Synthese mit PEG-Phosphat (3 nm PEG) und SPIONs stabilisiert mit Polymaleinsäure- <i>alt</i> -decan (*).	68
33	TEM-Bilder des Probenzugs bei 180 °C mit nur Eisen(II)chlorid als Eisenquelle nach 15 (A), 45 (B), 105 (C), 165 (D) und 195 min (E).	72
34	TEM-Bilder der Synthese mit reinem Eisen(II)chlorid als Eisenquelle für 1 h (A) und 3 h (B) bei 230 °C.	73
35	XRD blumenartigen SPION-Clustern mit Referenz für Wüstit (rot 01-086-2316) ^[112] , Magnetit (blau 00-019-0629) ^[91] und Maghemit (grün 00-039-1346) ^[92]	74
36	Normierte Intensitätsverteilung von Synthesen mit unterschiedlicher Zugabe von Wasser zur kontrollierten Agglomeration und TEM-Bilder.	76
37	Magnetisierungskurven der für die MPS verwendeten Proben bestimmt durch Probenvibrationsmagnetometer Messungen von -2 bis 2 T mit einem Zoom in von -40 bis 40 mT.	77
38	Ableitung der Magnetisierungskurven der für die MPS verwendeten Proben in einem Bereich von -40 bis 40 mT.	78
39	Vergleich unterschiedlicher SPION-Cluster im MPS mit Resovist® (A) und Perimag® (B). In den MPS Ergebnissen wurden nur die ungeradzahlig harmonischen Schwingungen dargestellt.	80
40	Unnormierte MPS Messungen an ausgesuchten SPION Proben. Da die Messung nicht geeicht wurde, sind die absoluten Werte nur untereinander vergleichbar.	81
41	TEM Bilder der drei besten SPION-Cluster Proben und durch DLS bestimmte Intensitätsverteilung mit Resovist® und Perimag® als Vergleich.	82
42	Schematische Darstellung der Detektion von Antigenen durch Kopplung von magnetischen mit fluoreszenten Clustern.	84
43	Schematische Darstellung des EISA Verfahrens mit anschließender Verkapselung und Einbringung funktioneller Gruppen durch PI-PEO-X.	86
44	TEM-Bilder der Grundpartikel (A), der erzeugten Clustern nach der ersten (B) und zweiten Emulsionspolymerisation (C) und DLS Übersicht einer beispielhaften Synthese von Carbonsäure-modifizierten SPION-Clustern. Die SPION-Cluster nach magnetischer Auftrennung und erfolgreicher Funktionalisierung mit 5 % PI- <i>b</i> -PEO-COOH/95 % PI- <i>b</i> -PEO-OMe sind in Blau dargestellt. Der Z-Average betrug 541 nm mit einem PDI von 0.08.	88

45	DLS Verlauf nach mehreren magnetischen Auftrennungen von OMe funktionalisierten SPION-Clustern (links) und TEM-Bild der mit Pi- <i>b</i> -PEO-OMe funktionalisierten SPION-Cluster. In dem DLS Verlauf ist die Intensitätsverteilung des Überstands (rot) und der erhaltenen SPION-Cluster (schwarz) nach der ersten magnetischen Auftrennung, sowie der Cluster nach der ersten (blau) und zweiten Verkapselung (grün) dargestellt.	89
46	Mittels DLS gemessene Intensitätsverteilung und TEM-Bild der mit Pi- <i>b</i> -PEO-N ₃ funktionalisierten SPION-Cluster.	90
47	Fluoreszenzspektren von Azid funktionalisierten SPION-Clustern (grün) und unfunktionalisierten SPIONs (schwarz) nach der Kopplung mit DBCO-CY5. Das Fluoreszenzspektrum von verdünntem DBCO-CY5 (rot) ist als Referenz gezeigt. $\lambda_{ex} = 600$ nm $\lambda_{em} = 620-670$ nm.	91
48	Fotografie des Versuchsaufbaus zur Herstellung monodisperser Emulsionen mittels einem <i>focussed flow droplet generator</i>	92
49	Zoom-in des <i>focussed flow droplet generator</i> während der Erzeugung einer Emulsion. In den äußeren Kanälen fließt eine wässrige DTAB-Lösung und in den inneren Kanal die SPIONs in Chloroform.	93
50	Z-Average bei unterschiedlichen Flussraten der organischen Nanopartikelphase und der wässrigen Tensidphase. Es wurden nur Cluster gezeigt mit einem PDI < 0.3.	94
51	TEM-Bilder von Clustern mit einem Z-Average von 461 nm und einem PDI von 0.12 aus 5.3 nm SPIONs mit dem <i>focussed flow droplet generator</i> mit Flussraten von 75 μ l/min Wasser/DTAB (20 mg/mL) und 10 μ l/min Chloroform/SPIONs (20 mg/mL) nach magnetischer Aufreinigung, sowie mittels DLS bestimmter Intensitätsverteilung und REM-Bild.	95
52	Intensitätsverteilungen bei gleicher Flussrate bei unterschiedlichen Umdrehungen pro Minute auf dem Schüttler.	96
53	Mittels DLS bestimmte Volumenverteilung der durch Zentrifugation auf gereinigten QD-Agglomerate und TEM Übersichtsbild der Fraktion bei 9000 g.	97
54	Foto der Herstellung der QD-Cluster mittels <i>split and combine</i> Mischer (A) und TEM Beispielbilder der erhaltenen QD Cluster ohne (B) und mit (C) quer vernetzter Polystyrolhülle.	98
55	Schematischer Reaktionsverlauf der Kopplung von Carbonsäure-funktionalisierten SPION-Clustern und Amino-funktionalisierten QD Clustern mittels EDC/NHS Kopplung.	100
56	Fotografie der mittels EDC/NHS Kopplung hergestellten magnetofluoreszenten Konstrukte mit den Überständen nach den magnetischen Auftrennungen (A) und Abtrennung am Magneten (B).	101

57	TEM-Bilder der Kopplung von Carbonsäure-funktionalisierten Eisenoxid-nanoclustern mit Amino-modifizierten Quantum dot Nanoclustern durch EDC/NHS Kopplung.	101
58	Überlagerung der Mikroskopaufnahmen und der Fluoreszenzbilder im Konfokalmikroskop der EDC/NHS gekoppelten SPION-QD Cluster von zwei unterschiedlichen Probenbereichen.	102
59	Foto der magnetofluoreszenten Konstrukte im Fluss (A) und Fluoreszenz Messung während des Durchflusses.	103
60	Fraktionen der magnetischen Auftrennung im Blindexperiment und TEM-Bild der Methoxy-funktionalisierten SPIONs nach dem Blindexperiment. .	103
61	Fluoreszenzspektrum der mittels IgG gekoppelten SPION-IgG-QD Konstrukte und des Blindversuches zum Nachweis unspezifischer Kopplung. . .	105
62	UV-Vis (A) und Fluoreszenzintensitäts (B) Spektren der mittels IgG gekoppelten magnetofluoreszenten Konstrukte und Tests auf unspezifische Bindung mit GFP als nicht bindendes Protein und in PBS Puffer.	106
63	Initiierung der Keimung durch Wasserinjektion bei einer stark verdünnten Reaktionslösung.	111
64	Phasentransfer gezeigt an einem Probenzug und am Ende einer Reaktion. .	113
65	Strukturformel des verwendeten mPEG-Phosphats zur Stabilisierung einzelner USPIOs im wässrigen Medium.	114
66	Verwendetes Polysorbat 80 (TWEEN 80).	114
67	Polymaleinsäure- <i>alt</i> -decan.	115
68	Strukturformel der Monomere Styrol und Divinylbenzol.	116
69	Verwendeter UV-Initiator VA-044 (2,2'-Azobis[2-(2-imadiazolin-2-yl)-propan]dihydrochlorid.	116
70	Verwendetes Blockcopolymer aus Polyisopren und Polyethylenoxid.	116
71	Aufbau des <i>split and combine</i> Mischers von Micronit.	131
72	Lorentz Fit des XRDs der 33 nm Partikelagglomerate.	132
73	Lorentz Fit des XRDs der 70 nm Partikelagglomerate.	132
74	Lorentz Fit des XRDs der 76 nm Partikelagglomerate.	133
75	Lorentz Fit des XRDs der 40 nm blumenförmigen Partikelagglomerate. . .	133

Tabellenverzeichnis

3	Mittelwerte der durch durch TEM bestimmten Größenverteilung und die Standardabweichung vom Mittelwert der <i>hot injection</i> Synthese mit Probenzug.	51
4	Literaturvergleich von USPIOs als T ₁ Kontrastmittel bei 1.5 T. ^[26]	70
5	Mittelwerte der Größenverteilung und die Standardabweichung vom Mittelwert der Synthese bei 180 °C mit ausschließlich Eisen(II)chlorid als Eisenquelle	73
6	Mittelwerte der Größenverteilung und die Standardabweichung vom Mittelwert der Synthese bei 230 °C unter der ausschließlichen Verwendung von Eisen(II).	73
7	Durch XRD bestimmte Partikeldurchmesser der verwendeten SPION-Cluster.	83
8	Verlauf des intensitätsgewichteten mittleren hydrodynamischen Durchmessers (Z-Average) und des Polydispersionsindex (PDI) des Überstands nach erster magnetischer Auftrennung nach dem EISA Verfahren und den abgetrennten Partikeln, sowie den SPION-Clustern nach der 1. und 2. Verkapselung und jeweils einer magnetischen Auftrennung.	89
9	Verlauf des intensitätsgewichteten mittleren hydrodynamischen Durchmessers (Z-Average) und des Polydispersionsindex (PDI) der mittels des <i>split and combine</i> Mischers hergestellten QD-Cluster nach Aufreinigung und 2 Wochen später, um die Langzeitstabilität zu prüfen.	99
10	Varierte Reaktionsparameter der in dieser Arbeit diskutierten Flusssynthesen.	112
11	Verwendete Substanzen und ihre Gefahren.	119
11	Verwendete Substanzen und ihre Gefahren.	120
11	Verwendete Substanzen und ihre Gefahren.	121

Abkürzungsverzeichnis

EISA	evaporations-induzierte Selbstassemblierung
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
DEG	Diethylenglykol
DBCO-CY5	Dibenzocyclooctinsäure-Cyanin5
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLVO	DERJAGUIN-LANDAU-VERWEY-OVERBEEK Modell
DTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethyl-aminopropyl]-carbodiimid
Mankind	magnetofluoreszente Nanokonstrukte für den Einsatz in Hochdurchsatz und Point of Care Diagnostik
MPT	magnetische Partikel Tomographie
MPS	magnetische Partikel Spektrometer
MRT	magnetische Resonanz Tomographie
NMR	Kernspinresonanz
PI- <i>b</i> -PEG	Polyisopren- <i>b</i> -Polyethylenglykol
QD	Quantum Dot
SPION	<i>superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i>
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimid
USPION	<i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
VSM	vibrierende Probe Magnetometer
XRD	<i>X-Ray diffraction</i>

Symbolverzeichnis

A	HAMAKER Konstante
$\vec{B}$	magnetische Flussdichte
c	Lichtgeschwindigkeit
C	CURIE-Konstante
χ	Suszeptibilität
χ_{DL}	DEBYE-HÜCKEL Parameter
c_N	Nukleationskonzentration
c_S	Sättigungskonzentration

c_1^0	Ausgangskonzentration aller gelösten Ionen
$\langle \cos\Theta \rangle$	mittlere Ausrichtung der magnetischen Momente
D	Partikeldurchmesser
D_k	Durchmesser der kristallinen Domänen
e	Elementarladung
E_{ex}	Austauschenergie
E_A	Anisotropieenergie
g_j	Landé-Faktor
ΔG	GIBBS-Energie
ΔG_v	Differenz der freien Enthalpie zwischen einem Monomer in Lösung zu dem Einheitsvolumen des Kristalls
ΔG_n	Freie Energie der Nukleation
<i>et. al.</i>	und andere
g_j	LANDÉ Faktor
Γ	freie Oberflächenenergie
γ	gyromagnetisches Verhältnis
H_C	Koerzitivfeldstärke
$\vec{H}$	magnetische Feldstärke
$\vec{I}$	Eigendrehimpuls
J	Gesamtdrehimpulsquantenzahl
J_{ex}	Austauschintegral
k	BOLTZMANN Konstante
K_A	Anisotropiekonstante
$\vec{M}$	Magnetisierung
μ_0	Permeabilität des Vakuums
μ_b	bohresches Magneton
M_S	Sättigungsmagnetisierung
M_r	Remanenzmagnetisierung
θ	Winkel zwischen der Magnetisierung und der leichten Achse
θ_k	kritische Temperatur
T	Temperatur
T_N	NÉEL Temperatur
T_C	CURIE Temperatur
V_A	attraktive Wechselwirkungen
V_R	repulsive Wechselwirkungen
z_i	Ladungszahl

Kapitel 1

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPIONs) über eine Hochtemperatur Hydrolyse von Eisendiethylenglykolat Komplexen für die Anwendung als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT), Tracer für die magnetische Partikel Tomographie (MPT), sowie in einem Projekt zur Entwicklung magnetofluoreszenter Nanokonstrukte für den Einsatz in Hochdurchsatz und Point of Care Diagnostik (Mankind) hergestellt, funktionalisiert und charakterisiert. Die Synthese und Funktionalisierung der SPIONs wurde in dieser Arbeit auf die Anwendung in den unterschiedlichen biomedizinischen Anwendungen angepasst.

Für die Verwendung der SPIONs als T_1 -Kontrastmittel in der MRT wurden SPIONs mit einer Partikelgröße von <5 nm hergestellt. Durch die geringe Größe der Nanopartikel nimmt die Magnetisierung stark ab, wodurch r_2 so weit verringert wird, dass SPIONs als T_1 -Kontrastmittel verwendet werden können. Um eine hohe Reproduzierbarkeit, hohen Durchsatz und einen leichten Transfer auf die industrielle Produktion durch *numbering up* zu ermöglichen, wurde die Synthese erfolgreich auf eine Flusssynthese überführt. Die in dieser Arbeit entwickelte Flusssynthese ermöglicht die Synthese von SPIONs mit einer Größe von 2-4 nm im g/h Maßstab mit sehr hoher Reproduzierbarkeit. Die SPIONs wurden anschließend mit Polysorbat 80, Polymaleinsäure-*alt*-decan und Polyethylenglykol-Phosphat im wässrigen Medium stabilisiert, um den Einfluss der Ligandenhülle auf die Wasser Relaxation zu untersuchen. 3 nm SPIONs mit Polyethylenglykol-Phosphat als Ligand zeigten ein sehr hohes Potential als T_1 -Kontrastmittel mit $r_1 = 7.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r_2 = 15.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ und einem r_2/r_1 von 2.18. Die besten publizierten T_1 Kontrastmittel auf SPION Basis besitzen ein r_2/r_1 Verhältnis von ≈ 2 bei 1.5 T. Somit lassen sich mit der in dieser Arbeit entwickelten Flusssynthese und anschließender Stabilisierung mit Polyethylenglykol-Phosphat biokompatible SPION basierte T_1 -Kontrastmittel mit einem hohen Durchsatz und hoher Reproduzierbarkeit herstellen, welche ausgezeichnete Kontrasteigenschaften besitzen.

Für die Anwendung von SPIONs im MPT als Tracer wurden in dieser Arbeit zwei Methoden entwickelt, mit denen SPIONs während der Synthese kontrolliert agglomeriert werden können. In der ersten Methode agglomerieren die SPIONs kurz nach der Nukleation durch die ausschließliche Verwendung von Eisen(II)chlorid als Eisenprecursor und bilden blumenartige Partikelagglomerate. In der zweiten Methode werden die SPIONs durch eine erhöhte Wasserzugabe in Lösung destabilisiert und agglomerieren. Durch diese Methode lassen sich SPIONs von 40 bis 410 nm kontrolliert agglomerieren. Diese Agglomerate wurden dann auf ihre Eignung als Tracer im MPT durch Untersuchungen im MPS und VSM untersucht. Die über diese Methoden hergestellten SPION Agglomerate zeigten eine sehr gute Größenkontrolle und besitzen ein hohes Potential als MPT Tracer. Partikelagglomerate mit einem hydrodynamischen Durchmesser von >70 nm und 40 nm blumenartige SPION Agglomerate zeigten deutlich bessere Ergebnisse im MPS als die kommerziell erhältlichen SPION MPT Tracer Resovist® und Perimag® in dem Messbereich bis zu ≈ 30 harmonischen Frequenzen. Die 40 nm blumenartige Agglomerate zeigten ein bis zu dreimal höheres Signal als Resovist® und zweimal höher als Perimag® bei einer harmonischen Frequenz von $f/f_0 = 9$. Das Signal der blumenartigen Agglomerate fiel bei höheren Frequenzen schnell ab, sodass Perimag® ab $f/f_0 = 25$ ein höheres Signal zeigte. Das Signal der Agglomerate, die über erhöhte Wasserzugabe erhalten wurden, fiel deutlich langsamer in den MPS Messungen ab, war aber zu Beginn nicht so hoch, wie das der blumenartigen Agglomerate. Agglomerate mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 76 nm zeigten bis zu $f/f_0 = 37$ ein höheres Signal als Perimag® und über den gesamten Messbereich als Resovist®.

Im Rahmen des Mankind Projektes sollte eine neue Methode zur Detektion von Antigenen durch Kopplung von magnetischen SPION- und fluoreszenten QD-Agglomeraten entwickelt werden. Die hohe Fluoreszenz der QD-Agglomerate ermöglicht die Detektion einzelner magnetofluoreszenter Konstrukte, wodurch eine hohe Sensitivität erreicht werden kann. Dies ermöglicht den Nachweis von viralen Antigenen in geringen Konzentrationen ohne Polymerase-Kettenreaktion. In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Herstellung funktionalisierter magnetischer SPION-Agglomerate über das evaporations-induzierte Selbstassemblierungs-Verfahren in einem Größenbereich von 200-700 nm entwickelt. Diese Agglomerate wurden anschließend durch Emulsionspolymerisation mit einer quervernetzten Polystyrolhülle verkapselt und durch die Verwendung von Carbonsäure-, Methoxy- und Azid-funktionalisierten PI-*b*-PEG für anschließende Kopplungen erfolgreich funktionalisiert. Durch Verwendung eines *flow focussed droplet Generators* konnte die Reproduzierbarkeit und Größenverteilung der magnetischen Nanopartikelagglomerate in einem Größenbereich von 380 bis 470 nm signifikant verbessert werden.

In einem Modellexperiment in dem die SPION- und QD-Agglomerate mittels einer EDC/-NHS-Reaktion gekoppelt wurden, konnte das hohe Potential dieser magnetofluoreszenten Konstrukte für diagnostische Anwendungen gezeigt werden. Eine große Menge an QD-Agglomeraten konnte an den SPION-Agglomeraten erfolgreich immobilisiert werden. Dies ermöglichte die Einzeldetektion der magnetofluoreszenten Konstrukte im Fluss, in einem noch nicht auf die Fluoreszenz der QDs optimierten Versuchsaufbau. In weiteren Experimenten konnte erfolgreich sekundäres IgG als Antigen mittels primären IgG-funktionalisierten SPION- und QD-Agglomeraten detektiert werden. Das Signal der magnetofluoreszenten Konstrukte war um einen Faktor von 4 höher als in dem Blindexperiment, mit einem nicht bindenden Protein. Diese vorläufigen Ergebnisse zeigen das hohe Potential dieser Methode zur Detektion viraler Antigene, aber die Kopplungseffizienz der Antikörper-funktionalisierten Agglomerate war deutlich geringer als der mittels EDC/NHS-gekoppelten magnetofluoreszenten Konstrukte. Bevor diese Methode klinisch getestet werden kann, muss die Kopplungseffizienz der Antikörper-funktionalisierten Agglomerate deutlich erhöht werden. Weiterhin muss die Reproduzierbarkeit der magnetischen und fluoreszenten Agglomerate sichergestellt werden.

Summary

In this work, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were obtained via high-temperature hydrolysis of iron diethylene glycolate complexes for use as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI), tracers for magnetic particle imaging (MPI) and in a project to develop magnetofluorescent nanoconstructs for use in high-throughput and point-of-care diagnostics (Mankind). The synthesis and functionalization of the SPIONs was adapted for use in different biomedical applications..

SPIONs with a particle size of <5 nm were synthesized for the use of SPIONs as T_1 contrast agents in MRI. Due to the small size of the nanoparticles, the magnetization decreases greatly, reducing r_2 enough that SPIONs can be used as T_1 contrast agents. To enable high reproducibility, high throughput, and easy transfer to industrial production by numbering up, the synthesis was successfully transferred to a flow synthesis. The flow synthesis developed in this work enables the synthesis of SPIONs with a size of 2-4 nm on a g/h scale with very high reproducibility. The SPIONs were then stabilized in an aqueous medium with polysorbate 80, polymaleic acid-*alt*-decane and polyethylene glycol phosphate in order to investigate the influence of the ligand shell on water relaxation. 3 nm SPIONS with polyethylene glycol phosphate as a ligand showed a very high potential as a T_1 contrast agent with $r_1 = 7.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r_2 = 15.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ and a r_2/r_1 of 2.18. The best published T_1 contrast agents based on SPION have a r_2/r_1 ratio of ≈ 2 at 1.5 T. Thus, with the flow synthesis developed in this work and subsequent stabilization with polyethylene glycol phosphate, biocompatible SPION-based T_1 - contrast agents with a high throughput and high reproducibility can be obtained, which show excellent contrast properties.

For the application of SPIONs in the MPI as a tracer, two methods were developed in this work, with which SPIONs can be agglomerated during the synthesis in a controlled manner. In the first method, the SPIONs agglomerate shortly after nucleation by using only Iron(II) chloride as the iron precursor and form flower-like particle agglomerates. In the second method, the SPIONs are destabilized in solution and agglomerate by the addition of high water contents. With this method, SPIONs from 40 to 410 nm can be

agglomerated in a controlled manner. These agglomerates were then examined for their suitability as tracers in the MPI by investigations in the MPS and VSM. The SPION agglomerates produced using these methods showed very good size control and have great potential as MPI tracers. Particle agglomerates with a hydrodynamic diameter of >70 nm and 40 nm flower-like SPION agglomerates showed significantly better results in the MPS than the commercially available SPION MPI tracers Resovist[®] and Perimag[®] in the measuring range up to ≈ 30 harmonic frequencies. The 40 nm flower-like agglomerates showed up to three times higher signal than Resovist[®] and two times higher than Perimag[®] at a harmonic frequency of $f/f_0 = 9$. The signal from the flower-like agglomerates dropped off quickly at higher frequencies, so Perimag[®] showed a higher signal from $f/f_0 = 25$ onwards. The signal of the agglomerates, which were obtained via increased water addition, fell off much more slowly in the MPS measurements, but was initially not as high as that of the flower-like agglomerates. Agglomerates with a hydrodynamic diameter of 76 nm showed up to $f/f_0 = 37$ a higher signal than Perimag[®] and over the entire measuring range than Resovist[®].

As part of the Mankind project, a new method for the detection of antigens by coupling magnetic SPION and fluorescent QD agglomerates should be developed. The high fluorescence of the QD agglomerates enables the detection of individual magnetofluorescent constructs, which means that high sensitivity can be achieved. This enables the detection of viral antigens at low concentrations without polymerase chain reaction. In this work, a method for the production of functionalized magnetic SPION agglomerates via the evaporation-induced self-assembly process in a size range of 200-700 nm was developed. These agglomerates were then encapsulated with a crosslinked polystyrene shell by emulsion polymerization and successfully functionalized by using carboxylic acid, methoxy, and azide functionalized PI-*b*-PEG for subsequent couplings. By using a *flow focused droplet generator*, the reproducibility and size distribution of the magnetic nanoparticle agglomerates in a size range from 380 to 470 nm could be significantly improved.

In a model experiment in which the SPION and QD agglomerates were coupled via an EDC/NHS reaction, the high potential of these magnetofluorescent constructs for diagnostic applications could be shown. A large amount of QD agglomerates could be successfully immobilized on the SPION agglomerates. This enabled the single detection of the magnetofluorescent constructs in the flow, in an experimental setup not yet optimized for the fluorescence of the QDs. In further experiments, secondary IgG could be successfully detected as an antigen using primary IgG-functionalized SPION and QD agglomerates. The signal from the magnetofluorescent constructs was a factor of 4 higher than in the blind experiment, with a non-binding protein. These preliminary results show the high poten-

tial of this method for the detection of viral antigens, but the coupling efficiency of the antibody-functionalized agglomerates was significantly lower than that of the EDC/NHS-coupled magnetofluorescent constructs. Before this method can be tested clinically, the coupling efficiency of the antibody-functionalized agglomerates must be significantly increased. Furthermore, the reproducibility of the magnetic and fluorescent agglomerates must be ensured.

Kapitel 2

Einleitung

Als Nanopartikel werden Partikel in einem Größenbereich von unter 100 nm bezeichnet. Sie besitzen aufgrund ihrer Größe und ihrem großen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen physikalische und chemische Eigenschaften, welche in makroskopischen Systemen nicht zu finden sind. In diesem Größenbereich beeinflussen quantenmechanische Effekte die Partikeleigenschaften deutlich. Eine Veränderung der Größe um nur wenige Nanometer hat einen großen Einfluss auf die Materialeigenschaften.^[1,2]

Eines der bekanntesten Beispiele für auftretende Phänomenen in Nanomaterialien ist der Größenquantisierungseffekt, welcher bei nanoskaligen Halbleitermaterialien auftritt und die optischen Eigenschaften dieser Materialien bestimmt.^[2] Da die Eigenschaften von Nanopartikeln von ihrer Größe abhängig sind, ist eine genaue Kontrolle der Größenverteilung wichtig, um die gewünschten Eigenschaften zu erhalten.^[1,3]

Nanopartikel werden heutzutage in vielen Bereichen, wie in Displays, Brennstoffzellen, Katalysatoren und auch als Kontrastmittel in bildgebenden medizinischen Geräten verwendet.^[4–8] Für biomedizinische Anwendungen sind unter anderem Eisenoxidnanopartikel aus Magnetit/Maghemit aufgrund ihrer besonderen magnetischen Eigenschaften und ihrer hohen Biokompatibilität von sehr hohem Interesse.^[3] Bei Eisenoxidnanopartikeln mit einer Größe von unter circa 30 nm tritt eine besondere Form des Magnetismus, der Superparamagnetismus auf.^[9] Partikel dieser Größe besitzen nur eine magnetische Domäne, welche durch die thermische Energie ständig neu ausgerichtet werden kann. Dadurch besitzen *superparamagnetic iron oxide nanoparticles* (SPIONs) keine Remanenzmagnetisierung und eine hohe Stabilität in Lösung.^[9] SPIONs besitzen gegenüber anderen magnetischen Nanopartikeln eine hohe Biokompatibilität, da sie von dem retikulohistiozytären System aufgenommen und anschließend für den Eisenspeicher des Körpers zur Verfügung stehen.^[10,11]

Aufgrund dieser außergewöhnlichen magnetischen Eigenschaften sind SPIONs für viele medizinische Anwendungen wie für die Magnetresonanztomographie (MRT), den Wirkstofftransport, der magnetische Hyperthermie und Zellaufreinigung von hohem Interesse.^[12–14] Um geeignete Partikel zu synthetisieren, wurde eine Vielzahl an unterschiedlichen Synthesen entwickelt, mit denen sich SPIONs unterschiedlichster Größen und auch Formen synthetisieren lassen.^[15,16] Die Größe, Form, sowie der Agglomerationsgrad der Nanopartikel hat einen großen Einfluss auf ihre magnetischen Eigenschaften.^[17–19] Für viele Bioanwendungen, wie zum Beispiel den Wirkstofftransport, ist es vorteilhaft die Partikelgröße möglichst gering zu halten, um die minimale Dosis an benötigten SPIONs und die Belastung für den Körper zu verringern.^[20] Eine Verringerung der Partikelgröße führt aber auch zu einer Verschlechterung der magnetischen Eigenschaften, weil Oberflächendefekte bei kleinen SPIONs einen starken Einfluss auf ihre magnetischen Eigenschaften haben. Der Anteil an Oberflächenatomen liegt bei einem 10 nm großen Partikel bei ungefähr 20 %. Bei Partikeln mit einer Größe von 2 nm steigt der Anteil der Oberflächenatome auf 80 % aller Atome im Partikel an.^[21,22]

Neben den Partikeln selbst hat die Ligandenhülle und eventuelle Verkapselungen eine essentielle Rolle auf die Eignung für biomedizinischen Anwendungen.^[23] Die Liganden stabilisieren die Partikel im wässrigen Medium, steuern ihre Bluthalbwertszeiten, sowie die Wassermobilität in der Nähe der Partikeloberfläche und die Bindung an Antikörper für gezielten Wirkstofftransport. Verkapselungen von toxischen Nanopartikeln, wie zum Beispiel CdSe Nanopartikeln, verringern ihre Toxizität deutlich, da das Cd nur schwer freigesetzt werden kann.^[17] Im Falle von Eisenoxidnanopartikeln erschwert die Verkapselung die Bioabbaubarkeit und Umwandlung in für den Körper verfügbares Eisen.

Eine Unterklasse der SPIONs, die sogenannten *ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticle* (USPIONs < 5 nm), sind als Ersatz für gadoliniumbasierte T₁-Kontrastmittel im MRT von sehr hohem wissenschaftlichem Interesse, da die gadoliniumbasierten Kontrastmittel in einigen Patienten bei wiederholter Anwendung Nebenwirkungen zeigen.^[24,25] Häufig werden die USPIONs über organische Synthesen in kleinen Reaktionsansätzen hergestellt. Diese haben den Nachteil, dass sie anschließend mit Hilfe von Mizellarer Verkapselung oder einem Ligandenaustausch in Wasser stabilisiert werden müssen. Nachteilig bei dieser Synthese ist, dass die SPIONs nach dieser Synthese aufgrund der Stabilisierung mit organischen Liganden in Wasser unlöslich sind.^[3] Um diese Partikel für biomedizinischen Anwendungen verwenden zu können, muss dieser Ligand gegen einen hydrophilen

Liganden ausgetauscht werden oder die Partikel mit Hilfe von amphiphilen Tensiden oder Polymerhüllen in Wasser stabilisiert werden.^[3,20]

Für den Transfer auf die klinische Anwendung von USPIONs als T₁-Kontrastmittel, muss eine Synthese entwickelt werden, mit der sich SPIONs kostengünstig, langzeitstabil und im großen Maßstab produzieren lassen. USPIONs neigen häufig aufgrund ihrer hohen Oberflächenenergie zu Aggregation, was die Kontrasteigenschaften stark verändern kann. Doping mit anderen Metallen kann das r_2/r_1 -Verhältnis verringern, aber solche Nanopartikelsysteme sind nicht von Interesse als Alternative zu den gadoliniumbasierten Kontrastmitteln, wenn das zur Dotierung verwendete Metall im Körper nicht abgebaut werden kann oder toxisch ist.^[26]

Aufgrund dessen ist die Entwicklung einer Synthese, mit der sich USPIONs biokompatibel, kostengünstig, direkt in Wasser stabilisiert und langzeitstabil herstellen lassen, von hohem wissenschaftlichem Interesse.^[6]

Kapitel 3

Theoretischer Hintergrund

3.1 Bildung von Nanopartikeln

Nanopartikel können entweder an Keimen wachsen oder aus übersättigten Lösungen nukleieren.^[27] Sind vor der Reaktion schon Keime in der Lösung vorhanden, an denen die Nanopartikel wachsen, wird dies als heterogene Nukleation bezeichnet. Bei der Nukleation der Nanopartikel in Abwesenheit von Keimen und anschließendem Wachstum wird dies als homogene Nukleation bezeichnet.^[28]

LAMER beschrieb 1950 die schlagartige Bildung von Schwefelkeimen aus einer übersättigten Thiosulfatlösung und dem anschließenden Wachstum dieser Keime.^[29] Diese theoretische Betrachtung der schlagartigen Keimbildung mit anschließendem Wachstum, das LAMER Modell, wird auch noch heute für die Beschreibung der Nukleation und Wachstum von Nanopartikeln verwendet. Das LAMER Modell für die homogene Nukleation von Kristallen ist in Abbildung 1 dargestellt und beschreibt den zeitlichen Verlauf der Konzentration des Monomers vor und nach der Nukleation.^[29]

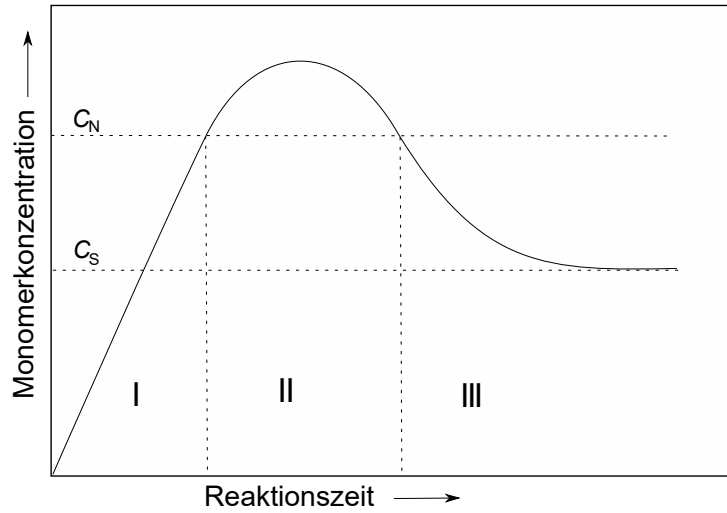


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Konzentration des Monomers vor und nach der Nukleation als Funktion der Zeit nach LAMER *et al.*^[29]

Das LAMER-Diagramm ist in drei Phasen unterteilt, die Monomeraanreicherungsphase (I), die Nukleationsphase (II) und die Wachstumsphase (III). In der Monomeraanreicherungsphase (I) steigt die Monomerkonzentration an, durchläuft dabei die Sättigungskonzentration c_s und erreicht anschließend die Nukleationskonzentration c_N . Bei der Sättigungskonzentration können noch keine Partikel gebildet werden, da erst eine Energiebarriere überwunden werden muss, welche daraus resultiert, dass das System spontan von einer homogenen in eine heterogene Phase übergehen muss.^[30] Dies führt dazu, dass die Lösung erst übersättigt und die Keimbildung erst nach Erreichen der Nukleationskonzentration einsetzt. In der Nukleationsphase (II) bilden sich Keime, die Monomerkonzentration sinkt unter die kritische Nukleationskonzentration. Anschließend beginnt die Wachstumsphase (III), in der die Übersättigung durch das Wachstum der Keime unter Verbrauch von Monomer bis zur Sättigungskonzentration abgebaut wird.^[29]

Die Energiebarriere zwischen dem Erreichen der Sättigungskonzentration und der Bildung der ersten in Lösung stabilen Keime erklärt sich thermodynamisch aus der Konkurrenz der Oberflächenenergie und der Differenz der freien Enthalpie zwischen einem Monomer in Lösung zu dem Einheitsvolumen des Kristalls. Die Änderung der GIBBS-Energie ΔG bei der Bildung eines sphärischen Kristalls mit dem Radius r in einer Lösung wird durch Gleichung 3.1 beschrieben.^[30]

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v \quad (3.1)$$

In Gleichung 3.1 ist hierbei γ die freie Oberflächenenthalpie und ΔG_v die Differenz der freien Enthalpie zwischen einem Monomer in Lösung und im Kristall.^[31] Die Oberflä-

chenenthalpie ist positiv und aus Gleichung 3.2 folgt, dass ΔG_v negativ ist, solange eine Übersättigung der Lösung S vorliegt.^[30]

$$\Delta G_v = -\frac{RT \ln S}{V_m} \quad (3.2)$$

Dabei bezeichnet V_m das Molvolumen des Kristalls, S den Übersättigungsgrad und T die Temperatur. Für Nanopartikel gelten diese Gleichungen nur als Näherung, da die Oberflächenenergie der Nanopartikel γ und die Enthalpie der Kristallbildung ΔG_v stark größenabhängig sind.^[32] Der kritische Radius r_c beschreibt den Radius, welche ein Nanopartikel benötigt um sich spontan zu bilden und nicht wieder aufgrund seiner hohen Oberflächenenthalpie aufgelöst zu werden. Der kritische Radius ist das Maximum der Gleichung 3.1 und wird unter dem Kriterium $\frac{d\Delta G}{dr} = 0$ erhalten.^[30]

$$r_c = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v} = \frac{2\gamma V_m}{RT \ln S} \quad (3.3)$$

Durch Einsetzen des kritischen Radius in Gleichung 3.1, wird eine Gleichung für die freie Enthalpie der Nukleation ΔG_N erhalten.^[33]

$$\Delta G_N = \frac{16\pi\gamma^3}{3(\Delta G_v)^2} = \frac{16\pi\gamma^3 V_m^2}{3(RT \ln S)^2} \quad (3.4)$$

In der Abbildung 2 sind diese Gleichungen schematisch als Darstellung der freien Enthalpie der Nukleation gegen den Partikelradius dargestellt.

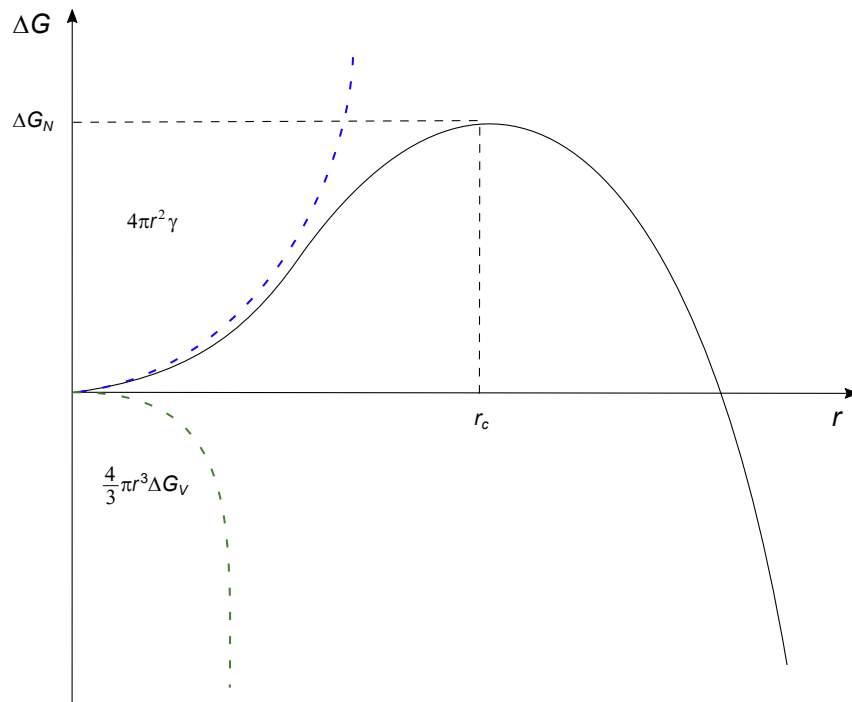


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Änderung der freien Enthalpie der Kristallisation als Funktion des Kristallradius unter Betrachtung der Wechselwirkung der Oberflächenenergie zu der Enthalpie der Kristallbildung nach KLABUNDE und RICHARDS.^[33]

Um eine möglichst geringe Größenverteilung zu erhalten, ist es in der Nanopartikelsynthese wichtig die Keimbildungsphase möglichst kurz zu halten und von der Wachstumsphase zu trennen. In Abbildung 3 ist das Partikelwachstum einer Synthese, in der die Nukleation und Wachstum nicht klar getrennt wurden (links) und einer Reaktion mit einer kurzen abgegrenzten Nukleationsphase mit anschließendem Partikelwachstum (rechts) gezeigt.

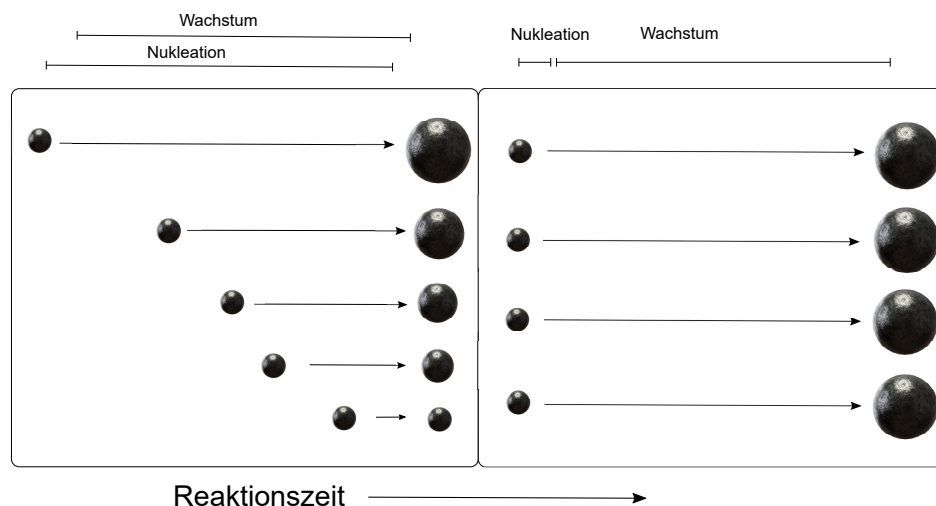


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Trennung von Nukleation und Wachstum von Nanopartikeln und den Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung nach KLABUNDE und RICHARDS.^[28]

In dem Modell der Trennung von Nukleation und Wachstum bilden sich die Kristallisationskeime nahezu gleichzeitig und wachsen daraufhin, ohne die Bildung weiterer Keime. Da der Keimbildungszeitraum sehr kurz ist, können die Nanopartikel parallel wachsen und die Größenverteilung der Partikel bleibt sehr eng. Bei einer Überlappung der Nukleations- und Wachstumsphase ist eine genaue Größenkontrolle nicht möglich, da die Partikel unterschiedliche Wachstumsdauern besitzen.^[30]

In einer realen Synthese können nicht alle Keime gleichzeitig gebildet werden, sondern es wird versucht die Keimbildungsphase möglichst gering zu halten. Diese Keime besitzen durch die unterschiedlichen Wachstumsdauern leicht unterschiedliche Größen. Da kleine Partikel schneller wachsen als Größere, kann dieser Größenunterschied teilweise ausgeglichen werden.^[33]

3.2 Polyolsynthese von Eisenoxidnanopartikeln

Die Polyolsynthese hat sich als eine Synthesemethode herausgestellt, welche für die Synthese von Nanopartikeln im industriellen Maßstab gut geeignet ist. Sie basiert auf der Reduktion von Metallsalzen zu ihren Metallen in hochsiedenden Polyolen.^[34] Als Polyole werden verschiedene Diole wie Ethylenglykol und auch deren Oligomere wie Diethylenglykol, Triethylenglykol bis hin zum Polyethylenglykol bezeichnet. Schon seit den frühen 90er Jahren wurden Cobalt- und Nickel- Nanopartikel von der Firma Eurotungstene großtechnisch über eine Polyolsynthese hergestellt.^[35] Seitdem hat sich die Polyol Synthese in der Industrie für die Synthese von Gold-, Kupfer- und Nickel-Nanopartikeln etabliert. Die

Polyolsynthese besitzt einige Vorteile gegenüber anderen wässrigen Synthesemethoden. Durch den hohen Siedepunkt der Polyole ist es möglich Synthesen bei Temperaturen über 200 °C durchzuführen, um kristalline Partikel zu erhalten. Die Polyole sind in der Lage die Metallvorläuferverbindungen zu koordinieren und die Nanopartikeloberfläche zu stabilisieren, wodurch die Koaleszenz reduziert wird. Die hohe Viskosität bevorzugt einen diffusionskontrollierten Prozess, wodurch das Partikelwachstum gesteuert werden kann.^[34,36]

Eisen bildet hier eine Ausnahme zu den Synthesen der anderen Nanopartikelsynthesen, da es zu elektropositiv ist um von Fe(II) zu Fe(0) reduziert zu werden. Bei der Polyolsynthese von SPIONs werden meistens Eisenacetate, -chloride oder -hydroxide als Precursoren verwendet, welche in einer basischen Lösung eines Polyols zu den Eisenoxiden hydrolysiert werden. Hierbei bildet sich zuerst ein Eisendiethylenglykolat Komplex aus, welcher anschließend hydrolysiert wird.^[34] Für Eisen(II) mit Diethylenglykol wurde ein heterocubanartiger Komplex als Zwischenprodukt mittels Einkristallröntgendiffraktion identifiziert.^[37] Als Eisen(II) Komplex wurde $\text{Fe}_4^{\text{II}}\text{Cl}_4(\text{HDEG})_4$ identifiziert. Hierbei sind die Ecken der würfelförmigen Grundstruktur alternierend von einem Eisenatom und einem endständigen Sauerstoffatom des einfach deprotonierten Diethylenglykols besetzt. Die anderen beiden Koordinationsstellen des Diethylenglykols chelatisieren die Metallatome außerhalb des Würfelgerüsts. Weiterhin ist jedes Eisenatom noch durch ein Chloridion koordiniert und somit ist jedes Eisenatom verzerrt oktaedrisch von fünf Sauerstoffatomen und einem Chloridatom koordiniert.^[37]

3.3 Magnetismus

Jede Bewegung geladener Teilchen resultiert in der Erzeugung eines Magnetfeldes. Auf atomarer Ebene ist der Magnetismus nur auf die Bewegung der Elektronen in ihren Orbitalen und ihren Elektronenspin, sowie dem Spin der Protonen im Atomkern zurückzuführen.^[28] Der Kernmagnetismus ist für die Beschreibung magnetischer Effekte meistens vernachlässigbar, da das magnetische Moment eines Elektrons circa 658-mal so groß ist wie das magnetische Moment eines Protons.^[38,39]

Bei der Betrachtung magnetischer Effekte wird zwischen zwei Strömen unterschieden. Hierbei handelt es sich um die freien Ströme, welche aus stromdurchflossenen Spulen resultieren und frei regulierbar sind und die Äquivalentströme, welche auf den Bahndrehimpuls und den Spin der Elektronen zurückzuführen sind. Die freien Ströme werden durch die magnetische Feldstärke $\vec{H}$ beschrieben und die Äquivalentströme durch die Magneti-

sierung $\vec{M}$. Die Überlagerung dieser beiden Größen wird in der magnetischen Flussdichte $\vec{B}$ zusammengefasst.^[38]

$$\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \vec{M}) \quad (3.5)$$

Hierbei ist in Gleichung 3.5 μ_0 die Permeabilität des Vakuums. Die Permeabilität μ eines Materials ist als der Quotient aus der magnetischen Flussdichte $\vec{B}$ und der magnetischen Feldstärke $\vec{H}$ nach Gleichung 3.6 definiert.

$$\mu = \frac{\vec{B}}{\vec{H}} \quad (3.6)$$

Wird ein Material einem äußeren magnetischen Feld ausgesetzt, kann eine durch das Feld ausgelöste Magnetisierung gemessen werden.^[28] Die Suszeptibilität χ beschreibt die Effektivität dieser magnetischen Induktion und ist nach Gleichung 3.7 als das Verhältnis der Magnetisierung zu der angelegten magnetischen Feldstärke definiert.^[40]

$$\chi = \frac{d\vec{M}}{d\vec{H}} \quad (3.7)$$

3.3.1 Verschiedene Formen des Magnetismus

Alle Materialien können durch ihre Interaktionen mit dem magnetischen Feld in drei Kategorien zusammengefasst werden. Diese Kategorien sind der Diamagnetismus, Paramagnetismus und die kollektiven magnetischen Effekte.^[28] Hierbei wirken der Diamagnetismus sowie der Paramagnetismus nur über kurze Reichweiten, wohingegen sich der kollektive Magnetismus über weite Strecken in alle drei Dimensionen erstreckt.^[38]

3.3.2 Diamagnetismus

Diamagnetische Eigenschaften treten in Materialien mit abgeschlossenen Elektronenschalen auf. Da dies auf alle Materialien zutrifft, tritt der Diamagnetismus immer schwach auf. Reine Diamagneten besitzen kein magnetisches Gesamtmoment, da sich alle magnetischen Momente auslöschen. Wird ein diamagnetisches Material einem äußeren Magnetfeld ausgesetzt, induzieren die Elektronen in den abgeschlossenen Schalen ein schwaches Magnetfeld, welches gegensätzlich zum vorhandenen Magnetfeld ausgerichtet ist. Dadurch entsteht eine repulsive Kraft und somit ist die Suszeptibilität χ eines diamagnetischen Stoffes negativ.^[38] Die magnetische Suszeptibilität eines Diamagneten ist nach Gleichung 3.8 definiert.

$$\chi = -\frac{NZe^2}{mc^2}\langle r^2 \rangle \quad (3.8)$$

Hierbei ist N die Anzahl der Atome pro Volumen, Z die Ordnungszahl, e die Elementarladung, m die Masse, c die Lichtgeschwindigkeit und $\langle r^2 \rangle$ das mittlere Abstandsquadrat zwischen Elektron und Atomkern.

3.3.3 Paramagnetismus

Der Paramagnetismus tritt in Materialien auf, welche Orbitale mit ungepaarten Elektronen besitzen. Die magnetischen Momente der Elektronen kompensieren sich hierbei nicht gegenseitig, wodurch paramagnetische Stoffe ein magnetisches Dipolmoment besitzen, welches sich feldverstärkend ausrichten kann.^[38] Das magnetische Moment μ eines Paramagneten setzt sich aus den Bahn- und Elektronenspinbeiträgen zusammen, da die Kernspinbeiträge vernachlässigt werden können und kann nach Gleichung 3.9 berechnet werden.

$$\mu = g_j J(J+1) \mu_B^2 \quad (3.9)$$

In Gleichung 3.9 ist g_j der Landé-Faktor, μ_B das BOHRSCHE Magneton und J die Gesamtdrehimpulsquantenzahl. Durch die thermische Energie sind die magnetischen Momente in Abwesenheit eines magnetischen Feldes zufällig ausgerichtet und die Magnetisierung ist gleich null. Wird ein äußeres Magnetfeld an ein paramagnetisches Material angelegt, richten sich die magnetischen Momente feldverstärkend in Richtung des Magnetfeldes aus. Die thermische Energie steht hierbei in Konkurrenz mit der richtenden Kraft des Magnetfeldes. Dadurch ist der Paramagnetismus temperaturabhängig und kann mit Hilfe des LANGEVIN-Modells beschrieben werden.^[28]

Die Magnetisierung $\vec{M}$ ist proportional zum magnetischen Moment μ und zur mittleren Ausrichtung der atomaren Momente $\langle \cos \Theta \rangle$. Die Magnetisierung lässt sich nach Gleichung 3.10 berechnen.

$$\vec{M} = N \mu \langle \cos \Theta \rangle \quad (3.10)$$

Wird von einer BOLTZMANN-Verteilung der magnetischen Momente ausgegangen, lässt sich die mittlere Ausrichtung der magnetischen Momente $\langle \cos \Theta \rangle$ nach Gleichung 3.11 mit der Energie der Interaktion der magnetischen Momente mit dem Feld $U = -\mu H \cos \Theta$ berechnen.^[28]

$$\langle \cos \Theta \rangle = \frac{\int \cos \Theta \cdot e^{-\frac{U}{kT}} d\Omega}{\int e^{-\frac{U}{kT}} d\Omega} \quad (3.11)$$

Nach Integration von Gleichung 3.11 nach dem Volumenelement $d\Omega$ und Einführung einer neuen Variablen $x = \frac{\mu B}{kT}$ wird die LANGEVIN-Funktion $L(x)$ erhalten.^[41]

$$\langle \cos \Theta \rangle = L(x) = \coth x - x^{-1} \quad (3.12)$$

Die Variable x stellt hier die Konkurrenz von der thermischen Energie $k(T)$ und der magnetostatischen Energie (μB) dar. Im Folgenden werden zwei Grenzfälle betrachtet, in denen sich die magnetostatische und die thermische Energie stark unterscheiden. In dem ersten Fall ist die thermische Energie sehr viel größer als die magnetostatische Energie $kT \gg \mu B$. Dadurch vereinfacht sich die LANGEVIN-Funktion zu Gleichung 3.13.^[42]

$$L(x) \approx \frac{x}{3} \quad (3.13)$$

Hierbei ergibt sich durch Vereinfachung für die Magnetisierung nach Gleichung 3.14.

$$M \approx \frac{N\mu^2 B}{3kT} = \frac{C}{T} B \quad (3.14)$$

Hierbei ist C die CURIE-Konstante. Diese Gleichung beschreibt die Abhängigkeit der magnetischen Suszeptibilität von der Temperatur. Das CURIE-Gesetz gilt hierbei nur bei nicht zu starken Magnetfeldern und nicht zu geringen Temperaturen.^[43]

Im zweiten Grenzfall ist die magnetostatische Energie sehr viel größer als die thermische Energie $\mu B \gg kT$. In diesem Grenzfall nähert sich die LANGEVIN-Funktion dem Wert 1 an. Wird dies in die Vereinfachung von Gleichung 3.10 eingesetzt, wird die Gleichung für die Sättigungsmagnetisierung M_S erhalten.

$$M_S = N\mu \quad (3.15)$$

3.3.4 Kollektiver Magnetismus

Unterhalb einer bestimmten Temperatur ist die thermische Energie so niedrig, dass die in Paramagneten verknüpften Spins richtenden Kräften ausgesetzt sind. Hierbei erfolgt ein Übergang vom paramagnetischen in einen dreidimensional geordneten Zustand. Diese magnetischen Ordnungen werden unter Ferro-, Ferri- und Antiferromagnetismus zusammengefasst.^[43] Die Übergangstemperatur ist materialabhängig und liegt bei vielen Materialien über der Raumtemperatur. Als Beispiel liegt dieser Übergang von Magnetit bei 850 K.^[44]

Für die bevorzugte Ausrichtung dieser richtenden Kräfte sind die Austauschwechselwirkungen zwischen den Elektronen unterschiedlicher Zentren verantwortlich. Die Austauschwechselwirkungen können direkt über die Orbitale oder indirekt über Leitungselektronen aus zum Beispiel verbrückenden Liganden wirken. Ihre Wechselwirkungen sind kurz, dennoch können sich die Auswirkungen über weite Distanzen in alle drei Dimensionen erstrecken.^[28]

Die Wechselwirkungen der Spins untereinander können quantenmechanisch durch die Coulomb Wechselwirkungen und der Austauschwechselwirkung zwischen zwei Atomen aufgrund ihrer Symmetrie beschrieben werden. Die Austauschwechselwirkungen können durch das PAULI-Prinzip beschrieben werden. Bei einem System aus zwei Atomen mit jeweils einem Elektron können die Spins entweder zueinander parallel oder antiparallel vorliegen. Sind diese Atome nahe genug zueinander, überlappen die Wellenfunktionen der beiden Elektronen. Nach dem PAULI-Prinzip ist eine antiparallele Ausrichtung der Spins zueinander zwingend, wenn die übrigen Quantenzustände beider Elektronen gleich sind.^[28] Um eine parallele Spinausrichtung zu erhalten, müssen sich die Elektronen in ihren anderen Quantenzuständen unterscheiden, da die beiden Elektronen nicht in allen vier Quantenzahlen gleich sein dürfen.^[28]

Der Energieunterschied zwischen der antiparallelen und parallelen Anordnung der Spins resultiert somit aus der Änderung des Quantenzustands und wird als Austauschenergie nach Gleichung 3.16 beschrieben.^[28]

$$E_{ex} = -2J_{ex}\vec{S}_i\vec{S}_j \quad (3.16)$$

Sie beschreibt die Energie der Wechselwirkung zweier benachbarter Spins $\vec{S}_i$ und $\vec{S}_j$. J_{ex} ist hier das Austauschintegral der Spins.

Die unterschiedlichen Arten des kollektiven Magnetismus besitzen jeweils unterschiedliche Spinanordnungen und sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

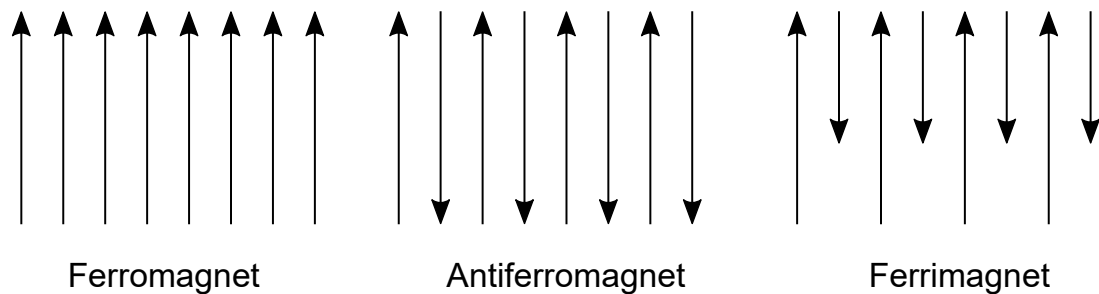


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ausrichtung der magnetischen Momente in Ferro-, Antiferro- und Ferromagneten nach KLABUNDE und RICHARDS.^[28]

Beim Ferromagnetismus richten sich die magnetischen Momente parallel aus, ohne dass ein äußeres Magnetfeld angelegt werden muss. Hierbei wird die Coulomb-Abstoßung durch die parallele Ausrichtung der magnetischen Momente minimiert. Das Austauschintegral ist hierbei größer null, wodurch Energie benötigt wird.^[28] Der Ferromagnetismus tritt häufig

in Materialien mit d- und f- Orbitalen auf, da dort die Elektronen in Orbitalen höherer Niveaus liegen können und dadurch bei paralleler Ausrichtung das PAULI-Prinzip erfüllen. Der Ferromagnetismus tritt auf, wenn der Energiegewinn durch die Austauschwechselwirkung größer ist als der Energieverlust durch die Besetzung der höheren Energieniveaus.

In einem Antiferromagnet bilden sich zwei magnetische Untergitter aus, welche antiparallel zueinander vorliegen und sich kompensieren, wodurch das magnetische Moment null beträgt. Das Austauschintegral ist hierbei kleiner null, was zu einem Energiegewinn führt.^[41]

Liegt eine antiparallele Ausrichtung der einzelnen Spins vor, das magnetische Gesamtmoment kompensiert sich aber nicht zu null, so wird von Ferrimagnetismus gesprochen. Hierbei gibt es eine Ungleichverteilung der einzelnen Spinausrichtungen, wodurch sich die magnetischen Momente der einzelnen Spins nicht komplett aufheben. Daher kann die Magnetisierung, mit der eines Ferromagneten verglichen werden. Aufgrund der teilweisen Aufhebung der magnetischen Momente ist die Magnetisierung im Ferrimagneten jedoch geringer als im Ferromagneten.

Die Magnetisierung eines kollektiven Magneten ist temperaturabhängig, da die Temperatur einer geordneten magnetischen Struktur in einem Ferromagneten entgegenwirkt.^[43] Ist die Temperatur hoch und erreicht die CURIE-Temperatur T_C , so geht ein Ferromagnet in einen Paramagneten über. Die Ausrichtung der Spins wird somit von der thermischen Energie überwunden und liegt statistisch verteilt vor. Diese Temperaturabhängigkeit wird durch das CURIE-WEISS-Gesetz beschrieben und ist in Gleichung 3.17 dargestellt.^[43]

$$\chi = \frac{C}{T - \theta_k} \quad (3.17)$$

Hierbei ist θ_k die kritische Temperatur. Ein Ferrimagnet verhält sich analog zum Ferromagneten, wobei die Suszeptibilität geringer durch die teilweise antiparallel angeordneten magnetischen Momente ist. Somit zeigt auch ein Ferrimagnet oberhalb der CURIE-Temperatur paramagnetisches Verhalten.^[28,41]

Analog zum Ferro- und Ferrimagnetismus gibt es auch bei einem Antiferromagneten eine Temperatur, wo bei Überschreitung die geordnete magnetische Struktur verloren geht. Diese Temperatur ist die NÉEL-Temperatur T_N . Über der NÉEL-Temperatur bricht die gerichtete Kopplung der Spins zusammen und der Antiferromagnet zeigt paramagnetisches Verhalten.^[41]

Ein normales Stück Eisen ist bei Raumtemperatur weit unter der CURIE-Temperatur

($T_c = 771 \text{ °C}$)^[45], wodurch die Austauschenergie die benachbarten magnetischen Momente feldverstärkend ausrichten kann, aber trotzdem besitzt es in der Abwesenheit eines äußeren magnetischen Feldes kein eigenes magnetisches Moment. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die parallele Ausrichtung der Spins nicht einheitlich über den gesamten makroskopischen Körper erstreckt, sondern nur in kleinen mikroskopischen Teilbereichen, den Domänen.^[28] Diese Domänen, werden als WEISS-Bezirke bezeichnet und erstrecken sich über Bereiche von ca. $1 \cdot 10^{-6}$ bis $1 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$.^[41] Innerhalb einer Domäne sind die magnetischen Momente parallel entlang einer leichten Magnetisierungsrichtung ausgerichtet. Hierbei ist die Ausrichtung der Domänen untereinander nicht parallel, sodass sich das Gesamtmoment des Materials aufhebt. Die Triebkraft für die Ausbildung der magnetischen Domänen ist die Reduzierung der magnetostatischen Energie. Die magnetostatische Energie ist volumenabhängig und somit steigt mit der Domänengröße auch die magnetostatische Energie. Zur Minimierung der magnetostatischen Energie bilden sich viele kleine Domänen aus, um das Volumen der einzelnen Domänen zu verringern. Die Domänengröße kann aber nicht beliebig gering sein, da an den Domänengrenzen die Spins aus ihrer leichten Achse gedreht werden müssen und die Austauschenergie aufgebracht werden muss.^[28] Daraus ergibt sich eine begünstigte Domänengröße, in der ein Gleichgewicht zwischen der magnetostatischen Energie und der Austauschenergie an den Grenzen der Domänen herrscht.^[46] Die Spinumkehr an den Domänengrenzen ist energetisch ungünstig und um die benötigte Energie zu reduzieren, wird die Rotation über mehrere Spins verteilt, wobei jeder Spin etwas weiter aus der leichten Achse gekippt ist. Dieser Bereich, über den die Spinumkehr stattfindet, wird als die Domänenwand bezeichnet. Die Domänenwand kann in zwei Arten, die BLOCH- und NÉEL-Wand, unterteilt werden. Beide Arten der Spinumkehr in der Domänenwand sind schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

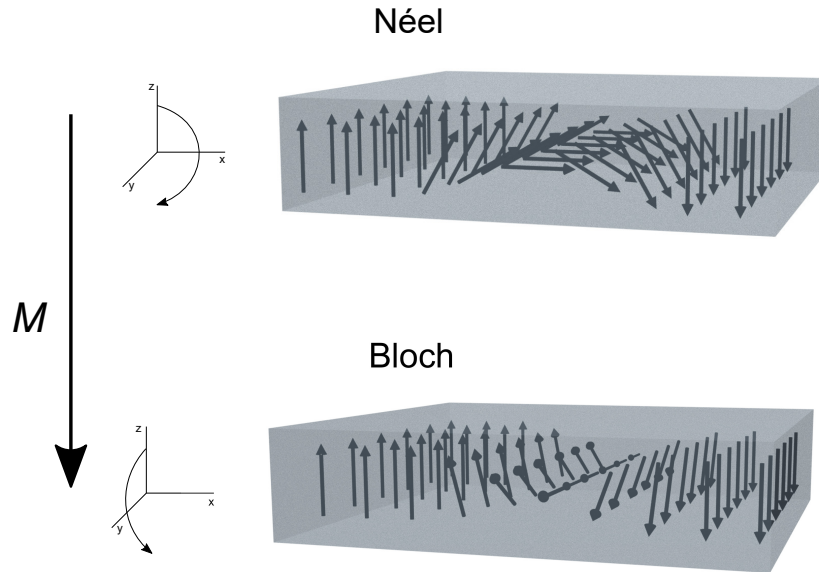


Abbildung 5: Darstellung der Spinrotation zwischen zwei antiparallel ausgerichteten Domänen durch die Ausbildung einer NÉEL-Wand (oben) oder einer BLOCH-Wand (unten). In diesen Bereichen wird die Rotation der Spins auf möglichst viele Spins verteilt um die Energie zu minimieren. Die Abbildung wurde in Anlehnung nach MARROWS erstellt.^[47]

In der NÉEL-Wand rotieren die Spins in der Ebene der Domänenwand und in der BLOCH-Wand rotieren die Spins aus der Ebene der Domänenwand heraus. Die BLOCH-Wand tritt in makroskopischen Materialien auf und die NÉEL-Wand bildet sich bei dünnen Film-Materialien aus.^[47] Zur Minimierung der Austauschenergie ist eine möglichst große Wanddicke begünstigt, um die Rotation auf möglichst viele Spins aufzuteilen, aber nur die antiparallelen Spins sind entlang der leichten Achse ausgerichtet. Mit der Wanddicke steigt somit auch die Anzahl der aus der leichten Achse gekippten Spins und somit die Anisotropieenergie. Durch die Wechselwirkung der Anisotropieenergie und der Austauschwechselwirkung ergibt sich in magnetischen Materialien eine bevorzugte Domänenwanddicke.

3.3.5 Magnetische Anisotropie

Die Suszeptibilität χ ist in vielen Materialien abhängig von der Messrichtung. Als Beispiel ist die Sättigungsmagnetisierung in einem einzelnen Eisenkristall am einfachsten mit einer Feldrichtung in $[100]$ zu erreichen. Wird ein Feld in der $[110]$ Richtung angelegt, wird die Sättigungsmagnetisierung erst bei höheren Feldstärken erreicht und in der $[111]$ Feldaus-

richtung werden noch höhere Feldstärken benötigt.^[28] Dieser Effekt wird als magnetische Anisotropie bezeichnet und kann nach Gleichung 3.18 beschrieben werden.

$$E_A = K_A V \sin^2 \theta \quad (3.18)$$

Hierbei sind K_A die Anisotropiekonstante, V das Teilchenvolumen und θ der Winkel zwischen der Magnetisierungsrichtung und der leichten Achse.^[28] Für die magnetische Anisotropie von Materialien gibt es verschiedene Ursachen, welche aus dem Material selber oder auch durch mechanische Beanspruchung resultieren können.^[28]

Der Einfluss der Kristallstruktur auf die magnetische Anisotropie wird als magnetokristalline Anisotropie bezeichnet. Sie ist eine materialintrinsische Eigenschaft und ist für einen Großteil der magnetischen Anisotropie verantwortlich. Durch die Kristallstruktur bedingt besitzen magnetische Materialien bestimmte bevorzugten Drehimpulsausrichtungen. Diese bevorzugten Drehimpulsausrichtungen werden als leichte Achse bezeichnet und um die Spins aus der magnetischen Achse zu drehen muss die Anisotropieenergie aufgebracht werden. Die Anzahl von leichten Achsen ist hierbei materialspezifisch.^[46] Um die Sättigungsmagnetisierung eines Materials zu erreichen, ist die Stärke des benötigten äußeren Magnetfeldes demnach unterschiedlich, je nachdem in welche kristallographischen Richtungen das Magnetfeld angelegt wird.

3.3.6 Hysterese

Wird ein externes Magnetfeld an einem Material angelegt, sind die parallel zu dem Magnetfeld ausgerichteten Domänen energetisch begünstigt. Diese Domänen wachsen durch Domänenwandverschiebung mit zunehmender Feldstärke, bis das gesamte Material aus einer Domäne besteht.^[48] In Abbildung 6 ist dieses schematisch dargestellt.

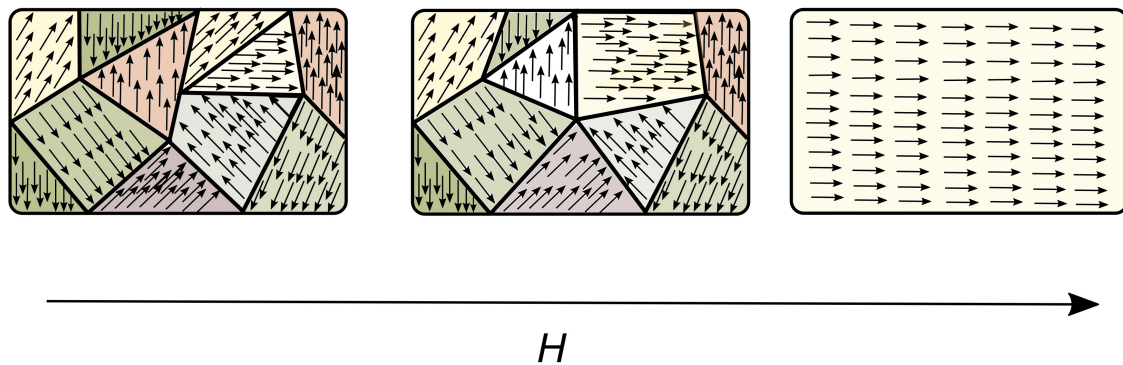


Abbildung 6: Vergrößerung der WEISS'SCHEN Bezirke bei Anlegen eines äußeren Magnetfeldes. In Anlehnung an BARTELMANN .^[48]

Besteht der gesamte Ferromagnet nur noch aus einer Domäne, in der alle Spins entlang dem angelegten Magnetfeld ausgerichtet sind, ist die Sättigungsmagnetisierung des Materials erreicht. Die Veränderung der Magnetisierung $\vec{M}$ eines Ferromagneten mit steigender Feldstärke $\vec{H}$ wird durch die Hysteresekurve beschrieben. In Abbildung 7 ist der Hystereseverlauf eines Ferromagneten schematisch dargestellt.

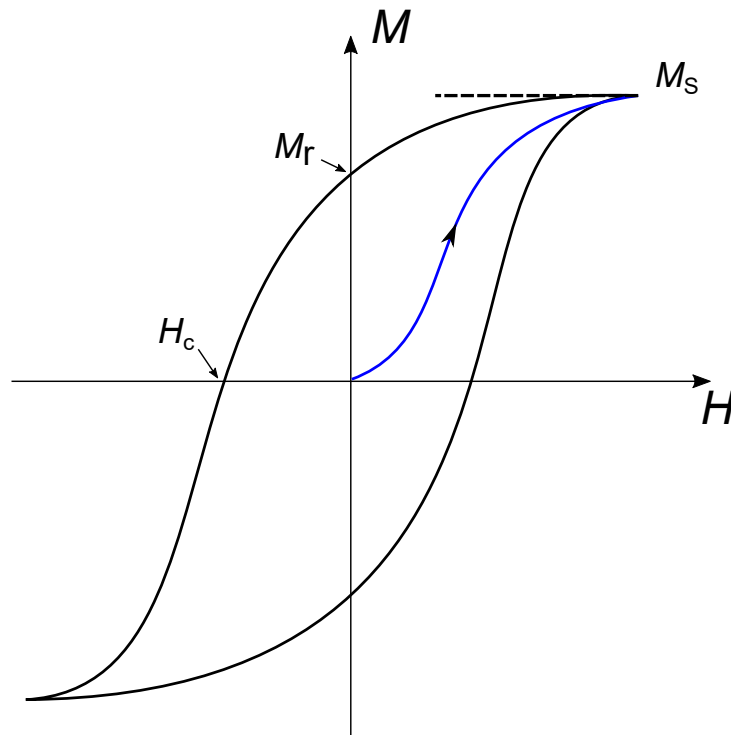


Abbildung 7: Schematischer Verlauf der Magnetisierung $\vec{M}$ eines Ferromagneten bei Anlegung eines externen Magnetfeldes mit der Feldstärke $\vec{H}$ in Anlehnung an COEY.^[41]

Wurde ein Ferromagnet noch keinem externen Magnetfeld ausgesetzt, ist seine Magnetisierung gleich null, da sich alle WEISS-Bezirke ausgleichen. Bei Anlegen eines externen Magnetfeldes folgt der Magnetismus der in Abbildung 7 dargestellten blauen Kurve. Dieser Verlauf wird auch als Neukurve bezeichnet. Die parallel zum Magnetfeld ausgerichteten Domänen wachsen bis die Sättigungsmagnetisierung M_s erreicht wird. Bei Entfernen des Magnetfeldes geht die Magnetisierung nicht auf null zurück, da die Anisotropieenergie überwunden werden muss um das Material zu entmagnetisieren und es bleibt eine Remanenzmagnetisierung M_r . Um das Material wieder zu entmagnetisieren, muss ein dem ursprünglichen Feld antiparalleles Feld mit der Stärke der Koerzitivfeldstärke H_c angelegt werden. Wird nun die Feldstärke weiter verringert geht das Material wieder in Sättigung. Anschließend kann die Ausrichtung des magnetischen Feldes gedreht werden und es wird die in Abbildung 7 dargestellte Hysteresekurve eines ferromagnetischen Materials erhalten.^[41]

3.3.7 Superparamagnetismus

Die Koerzitivfeldstärke ist stark von der Partikelgröße abhängig und kann sogar im Nanometerbereich auf null sinken. In Abbildung 8 ist eine grafische Auftragung der Koerzitivfeldstärke in Abhängigkeit vom Teilchendurchmesser dargestellt.

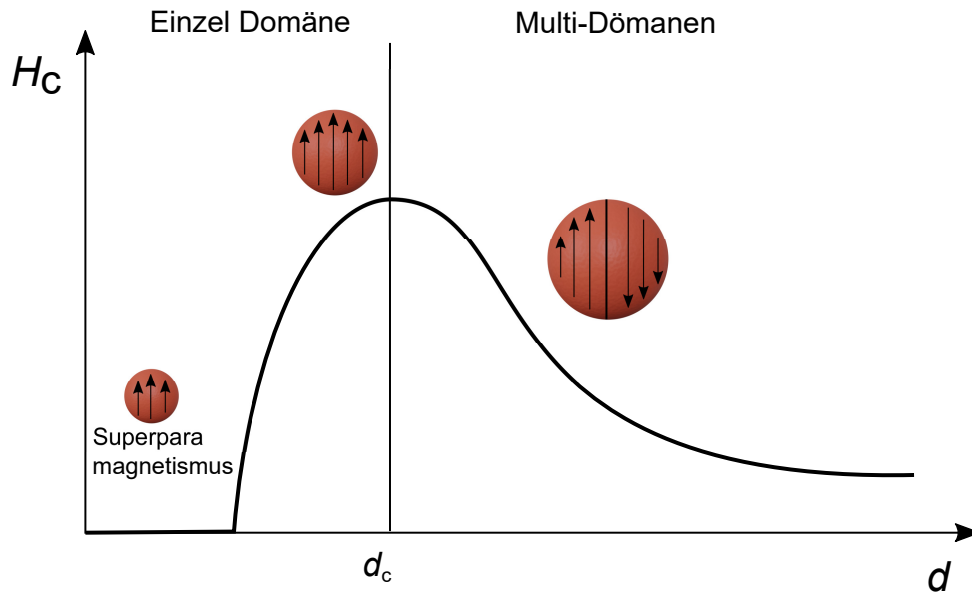


Abbildung 8: Verlauf der Koerzitivfeldstärke H_C in Abhängigkeit von dem Partikeldurchmesser d . In Anlehnung an KLABUNDE.^[28]

Um diesen Verlauf zu erklären, müssen zwei unterschiedliche Prozesse betrachtet werden. Diese Prozesse sind die Änderung der Magnetisierung durch Wanderung der Domänenwände und die Änderung der Magnetisierung durch Rotation des magnetischen Gesamtmomentes.

Im Multi-Domänen Bereich ist H_C noch gering, da eine Änderung der Magnetisierungsrichtung durch Domänenwandwachstum energiearm, über mehrere Spins in der Domänenwand, stattfinden kann. Bei einer Verringerung des Partikeldurchmessers wird auch die Domänenwand kleiner und die Spinumkehr findet über weniger Spins statt, was in einer erhöhten benötigten Koerzitivfeldstärke resultiert. Erreicht der Partikeldurchmesser den kritischen Durchmesser d_c können sich keine Domänen mehr ausbilden und die Koerzitivfeldstärke ist maximal, da dort die Änderung der Magnetisierungsrichtung nicht mehr über die energetisch günstigere Methode der Spinumkehr über eine Domänenwand stattfinden kann. Hier müssen alle Spins im Partikel gleichzeitig aus der leichten Achse herausgedreht werden und die Anisotropieenergie aufbringen. Bei einer weiteren Verringerung des Partikeldurchmessers nimmt auch die Anzahl der Spins, welche sich entlang des Magnetfelds ausrichten müssen, ab, wodurch die Koerzitivfeldstärke sinkt. Wird der Partikeldurchmesser weiter reduziert, ist die benötigte Anisotropieenergie so gering, dass die thermische Energie ausreicht die Spins frei auszurichten. Ab dieser Größe verhält sich ein Ferromagnet superparamagnetisch und die Koerzitivfeldstärke ist gleich null.^[28] Superparamagnetische Materialien zeigen ein deutlich höheres magnetisches Moment gegenüber dem paramagnetischen Verhalten.^[49] Der Übergang von Ferromagneten zum Superpara-

magneten ist hierbei von der Messzeit abhängig, wodurch sich der Übergang je nach Messmethode unterscheidet. Durch die thermische Energie ändert sich die Spinausrichtung um eine bestimmte Anzahl pro Sekunde. Ist die Messzeit geringer als die Zeit in der die Spinausrichtung sich neu ausrichtet, können die einzelnen Spinausrichtungen gemessen werden und eine sehr geringe Restmagnetisierung ist messbar. Somit verschiebt sich der Übergang von einem Ferro- oder Ferrimagneten je nach gewählter Messmethode.

3.3.8 Sättigungsmagnetisierung von Nanopartikeln

Die Sättigungsmagnetisierung magnetischer Nanopartikel ist stark größenabhängig, da die Spinausrichtung an der Oberfläche gestört ist.^[50] An der Oberfläche der Nanopartikel ist die Austauschenergie geringer, wodurch sich glasartige Spinstrukturen ausbilden, welche die ferromagnetische Ordnung der Elektronenspins stören. Mit sinkendem Partikeldurchmesser tritt dieser Effekt stärker auf, da der Anteil der Oberflächenatome stark ansteigt.^[50,51] Der Durchmesser dieser glasartigen Spinstruktur beträgt circa 0.5 nm. In 15 nm großen Partikeln sind nur 19 % der Spins von diesem Effekt betroffen und bei 2.5 nm großen Partikeln befinden sich 78 % der Elektronenspins in der glasartigen Spinstruktur.^[51] Aufgrund dessen ist die Magnetisierung kleiner SPIONs stark reduziert. In Abbildung 9 ist die Reduzierung des magnetischen Anteils im Nanopartikel mit abnehmender Größe dargestellt.

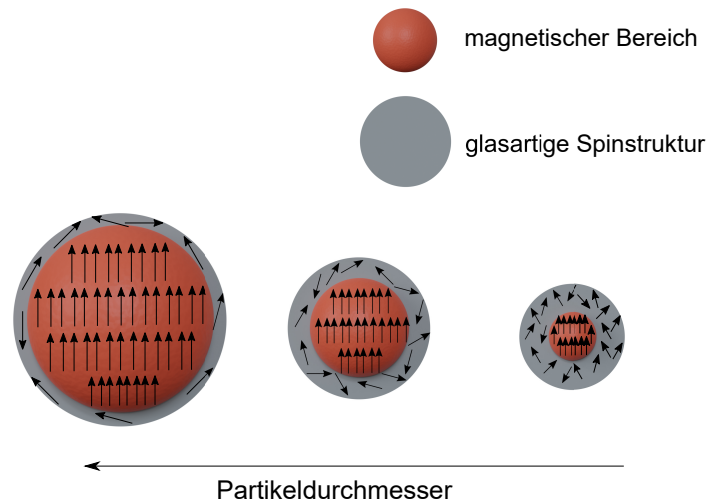


Abbildung 9: Schematische Abbildung der Abhängigkeit der Magnetisierung von magnetischen Nanopartikeln durch die Ausbildung glasartiger Spinstrukturen an der Oberfläche. In Anlehnung nach Jeon *et al.*^[6].

Bei Partikelmorphologien mit hohen Oberfläche zu Volumen Verhältnissen, wie Octapods oder Stäbchen, tritt dieser Effekt verstärkt auf.

3.3.9 Kolloidstabilität

Die DERJAUIN-LANDAU-VERWEY-OVERBEEK-Theorie (DLVO) ist eine der grundlegenden Theorien um die Stabilität von elektrostatisch stabilisierten kolloidalen Lösungen zu beschreiben.^[52–54] Nach dieser Theorie hängt die Stabilität von kolloidalen Lösungen von den attraktiven VAN DER WAALS-Kräften V_A und der Überlappung elektrischer Doppelschichten V_R , als abstoßende Kräften, ab. Nach der HAMAKER-Theorie ist die potenzielle Energie zwischen zwei gleich großen kugelförmigen Teilchen durch Gleichung 3.19 gegeben.

$$V_A = -\frac{AR_{Kugel}}{12D} \quad (3.19)$$

Hierbei ist A die HAMAKER-Konstante und D der Abstand zwischen den Partikeln.

Die repulsiven Wechselwirkungen durch die Überlappung der elektrischen Doppelschichten werden durch Gleichung 3.20 beschrieben.

$$V_R = \frac{64n^0k_BTZ^2}{x_{DL}} \cdot e^{-x_{DL}D} \quad (3.20)$$

Hierbei ist $Z = \tanh \frac{ze\phi_0}{4k_BT}$ und $\chi_{DL} = \sqrt{\frac{\sum z_i^2 e^2 c_i^0}{\epsilon \epsilon_0 k_B T}}$ der DEBYE-HÜCKEL Parameter. Dieser hängt von der Ladungszahl z_i , der Elektronenladung e und der Ausgangskonzentration aller gelösten Ionenarten c_i^0 ab. Die Gesamtwechselwirkungen können somit durch folgende Gleichung beschrieben werden.

$$V = V_A + V_R = -\frac{AR_{Kugel}}{12D} + \frac{64n^0k_BTZ^2}{x_{DL}} \cdot e^{-x_{DL}D} \quad (3.21)$$

Aus Gleichung 3.21 ergibt sich, dass die attraktiven Wechselwirkungen proportional zu $\frac{1}{r^n}$ und die repulsiven proportional zu $e^{-x_{DL}D}$ sind. Daraus ergibt sich, dass bei kurzen und großen Abständen die anziehenden Kräfte dominieren und bei mittleren die repulsiven Wechselwirkungen durch die Abstoßung durch die elektrische Doppelschicht. Diese Wechselwirkungen sind in Abbildung 10 als Überlagerung der beiden Kräfte für eine stabile Lösung dargestellt.^[54]

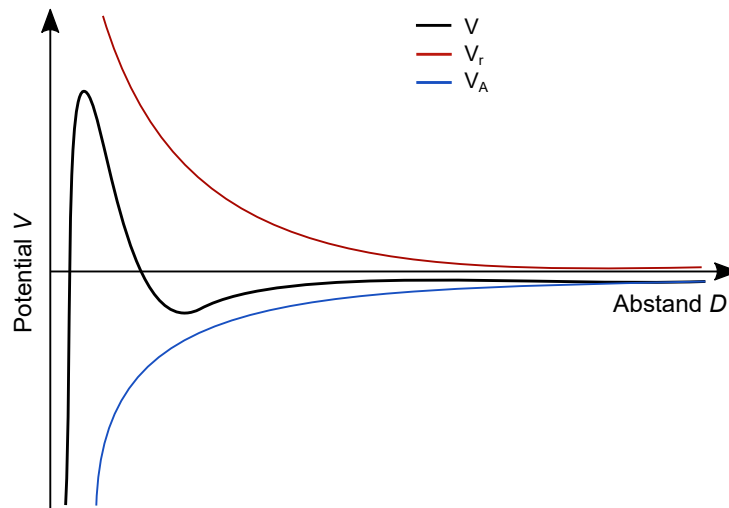


Abbildung 10: Wechselwirkungen zwischen den attraktiven VAN DER WAALS-Kräften V_A und der repulsiven Überlappung elektrischer Doppelschichten V_R als Funktion des Abstands der Teilchen. In Anlehnung an LAUTH und KOWALCZYK.^[54]

Bei großen Partikelabständen wechselwirken die Partikel nur schwach miteinander. Mit abnehmendem Partikelabstand nehmen die attraktiven Wechselwirkungen zuerst zu und das Potential durchläuft ein Energieminimum. Hier beginnen die Partikel reversibel zu agglomerieren. Damit das System irreversibel agglomerieren kann muss erst die Energiebarriere durch die elektrische Abstoßung überwunden werden. Die Höhe der Energiebarriere hängt dabei von der HAMAKER-Konstante, dem STERN-Potenzial und der Ionenkonzentration ab.^[54]

Die HAMAKER-Konstante kann durch die Wahl des Lösungsmittels und durch die Ligandenhülle bei Nanopartikeln kontrolliert werden. Damit die Nanopartikel stabil in Lösung vorliegen, muss die Ligandenhülle ausreichend dick sein. Polymerliganden stabilisieren Nanopartikel besonders gut, da sie keinen Beitrag zur Anziehung der Nanopartikel liefern, da in diesem Fall die HAMAKER-Konstante der Ligandenhülle und des Lösungsmittels gleich sind. Durch eine Reduktion der Elektrolytkonzentration kann das STERN-Potential zwischen den Teilchen erhöht werden, wodurch die Doppelschicht und somit die Abstoßung zwischen den Partikeln zunimmt. Eine wässrige Dispersion ist somit stabiler, je höher die Konzentration der potenzialbestimmenden Ionen im Kolloid, je niedriger die Ionenstärke der Lösung und je niedriger die Wertigkeit der Ionen ist.^[54–56]

3.4 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie ist eine der bedeutendsten und am häufigsten verwendeten nicht invasiven medizinischen Bildgebungsmethoden heutzutage. Sie bietet eine

hervorragende Gewebeeindringtiefe bei einer sehr hohen räumlichen Auflösung. Durch die Verwendung eines Magnetfeldes und keiner Emission von schädlicher ionisierender Strahlung gilt die MRT als unbedenkliche Bildgebungsmethode.^[25,57–59] Die Bildgebung basiert auf dem unterschiedlichen Relaxationsverhalten der Wasserstoffkerne in verschiedenen Gewebearten nach der Anregung.^[60] Im Folgenden werden die Kernresonanz und die Grundlagen der MRT genauer behandelt.

Wie im Unterkapitel zur Theorie des Magnetismus erwähnt, besitzen alle bewegten Ladungen ein zugehöriges magnetisches Moment. Während für den Gesamtmagnetismus eines Materials hauptsächlich die Elektronen betrachtet werden und der Kernmagnetismus vernachlässigt werden kann, wird bei der Magnetresonanztomographie die Änderung der Kernmagnetisierung über die Zeit in einem homogenen externen Magnetfeld betrachtet.^[61] Die Magnetresonanztomographie basiert auf dem klassischen Kernspinresonanz(NMR)-Experiment und kann prinzipiell an allen Atomkernen die eine ungerade Anzahl von Protonen und/oder Neutronen besitzen und damit einen Kernspin von $\vec{I} \neq 0$ aufweisen durchgeführt werden.^[61] In Abbildung 11 ist dargestellt, wie sich ein Atomkern mit einem Kernspin ungleich null in einem Magnetfeld verhält.

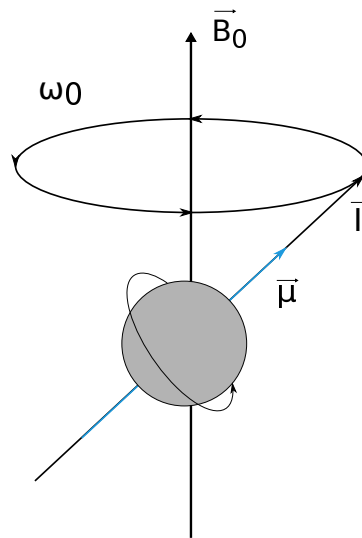


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Präzessionsbewegung des Kernspins und des daraus resultierenden magnetischen Moments $\vec{\mu}$, um die Feldrichtung eines Magnetfeldes $\vec{B}_0$. In Anlehnung an REISER und SEMMLER.^[61]

Der magnetische Kern kann sich aufgrund seines Eigendrehimpulses $\vec{I}$ nicht in die energetisch günstigere Lage parallel zu dem Magnetfeld ausrichten, sondern bewegt sich aufgrund der Drehimpulserhaltung auf einer Kreislaufbahn mit der Frequenz von ω_0 um die Richtung des Magnetfeldes $\vec{B}_0$. Diese Frequenz der Präzession des Atomkerns um das Magnetfeld wird als Larmorfrequenz bezeichnet.^[61] Das magnetische Moment $\vec{\mu}$ verläuft

parallel zu dem Eigendrehimpuls $\vec{I}$ des Atomkerns und hängt über das gyromagnetisches Verhältnis γ von dem Eigendrehimpuls ab.^[61]

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (3.22)$$

Bei einer MRT-Messung wird der Wasserstoffatomkern, und somit ein Proton, angeregt, da er mit Abstand am häufigsten in biologischen Geweben vorkommt und von allen stabilen Isotopen das größte gyromagnetische Verhältnis besitzt. Der Wasserstoffatomkern besitzt eine Spinquantenzahl I von $1/2$ und damit ergeben sich durch die Quantisierung des Drehimpulses zwei mögliche Energieniveaus, da die Anzahl der Energieniveaus $2I + 1$ entspricht. Daraus resultiert, dass sich ein Doppelpräzessionskegel im Magnetfeld ausbildet. Hierbei ist in dem einen Fall das magnetische Moment parallel zum Magnetfeld und in dem anderen Fall antiparallel ausgerichtet. Diese beiden Energieniveaus sind nach der BOLTZMANN-Statistik besetzt, wobei der parallel zum Magnetfeld ausgerichtete Zustand energetisch niedriger und der antiparallel zum Magnetfeld ausgerichtete energetisch höher ist. Die beiden Zustände sind bei 37°C nahezu gleich besetzt und die Besetzungszahldifferenz beträgt nur 0.0000068 bei einem angelegten magnetischen Feld von 1 T .^[61] Aufgrund der hohen Anzahl an vorhandenen Spins im Menschen bildet sich aber ein messbares magnetisches Moment in Richtung des Magnetfeldes $\vec{B}_0$ aus.

Bei einer MRT-Messung wird mit Hilfe eines Hochfrequenzpulses, mit der Energie der Larmorfrequenz, das Besetzungsverhältnis der beiden Zustände verändert. Entspricht die Dauer der Einstrahlung des Hochfrequenzpulses der benötigten Energie, um die beiden Energieniveaus gleich zu besetzen, wird von einem 90° Puls gesprochen und die Magnetisierung in z -Richtung ist 0 . Die Magnetisierung präzediert nun in der x - y Ebene und induziert bei Spulen, welche auf der x - y Ebene angebracht sind einen Strom. Anschließend relaxiert das magnetische Moment wieder in den Ursprungszustand über zwei verschiedene Relaxationsmechanismen, welche in Abbildung 12 dargestellt sind.

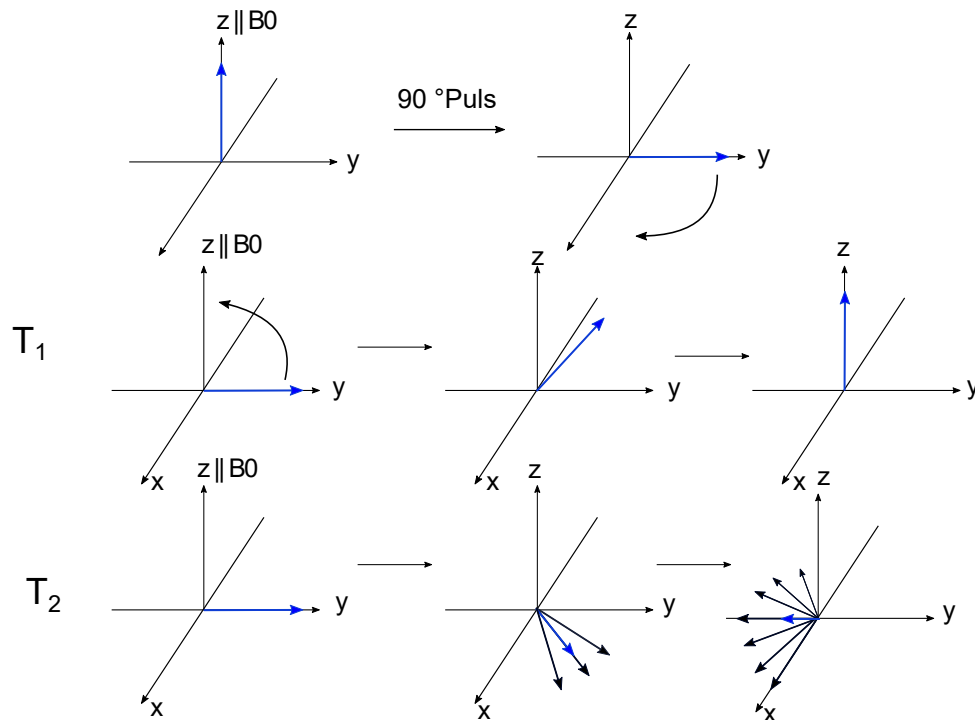


Abbildung 12: Schematische Darstellung der longitudinalen T_1 - und transversalen T_2 -Relaxation nach der Anregung mit einem 90 ° Puls.

Die Relaxation zurück in den Ursprungszustand besteht aus zwei unterschiedlichen Komponenten. Die eine Komponente ist die longitudinale oder auch Spin-Gitter Relaxation T_1 , in der die Magnetisierung sich wieder in die z-Richtung ausrichtet. Bei der T_1 -Relaxation werden so lange Energiequanten an Kernspins aller Atome und Moleküle in der Umgebung ("Gitter") abgegeben, bis die BOLTZMANN Verteilung der Energieniveaus erreicht ist. Die zweite Komponente wird als transversale Relaxation oder auch Spin-Spin Relaxation T_2 bezeichnet und beschreibt die Verringerung der Magnetisierung in der x-y Ebene. Durch magnetische Fluktuationen im Magnetfeld der Protonen ändert sich die Larmorfrequenz der einzelnen Komponenten geringfügig, was zu einer Dephasierung und dadurch zu einer Reduktion der Magnetisierung in der x-y Ebene führt.^[61] Die Zeit für diese Relaxationsprozesse kann bestimmt werden und wird in die T_1 -Relaxationszeit und die T_2 -Relaxationszeit unterteilt. Hierbei ist die T_1 -Relaxationszeit die Zeit, welche benötigt wird, um auf 63 % des Ursprungswertes in z-Richtung zu relaxieren und die T_2 -Relaxationszeit die Zeit, in der die Magnetisierung in der x-y Ebene um 63 %, durch die Dephasierung, abgenommen hat. Durch technisch bedingte räumliche Inhomogenitäten im angelegten Magnetfeld kommt es bei einer MRT-Messung zu einer weiteren Dephasierung der Spins als nur durch die T_2 -Relaxationszeit, wodurch sich die effektive Relaxationszeit T_2^* ergibt.^[61,62]

Der Kontrast im MRT ist stark von der Protonenkonzentration und der Umgebung, in der sich die Protonen befinden abhängig. Die Viskosität hat zum Beispiel einen starken Einfluss auf die T_1 -Relaxationszeit, da bei einer gering viskosen Umgebung, durch die thermische Bewegung der Moleküle, mehr Interaktionen mit Molekülen in der Umgebung stattfinden. Dadurch können die Protonen schneller in den Ursprungszustand nach der Anregung zurückkehren, wodurch die T_1 -Relaxationszeit geringer ist. Im Kontrast dazu steigt die T_2 -Relaxationszeit in einer gering viskosen Umgebung. Da sich hier die Wasserstoffkerne ständig bewegen, gleichen sich die zur T_2 -Relaxationszeit beitragenden Feldfluktuationen weitestgehend aus.^[61] Diese Effekte ermöglichen der MRT durch die unterschiedlichen Relaxationszeiten in verschiedenen Umgebungen eine hohe Auflösung von diversen Gewebearten.

3.4.1 Nanopartikel als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie

Kontrastmittel erhöhen durch die Beeinflussung der Relaxationszeit der Wasserstoffkerne den Kontrast im MRT. Sie werden in Kontrastmittel eingeteilt, welche die T_1 -Relaxationszeit verringern und das Bild heller erscheinen lassen und welche, die die T_2 -Relaxationszeit verringern und das Bild verdunkeln. Die Erhöhung des Kontrasts ermöglicht die leichtere Unterscheidung von krankem und gesundem Gewebe.^[51] Aufgrund dessen werden auf gadoliniumbasierte Kontrastmittel in 40 % aller MRT Messungen verwendet.^[49] Das entspricht 40 Millionen Dosen weltweit und ungefähr 50 Tonnen Gadolinium pro Jahr.^[63]

T_1 -Kontrastmittel werden in MRT-Untersuchungen deutlich häufiger als T_2 -Kontrastmittel verwendet. Dies liegt an dem sogenannten *Blooming* Effekt der bei der Verwendung von T_2 -Kontrastmitteln auftritt. Die hohe Magnetisierung der T_2 -Kontrastmittel beeinflusst hierbei auch das umliegende Gewebe, wodurch die Verdunkelung des Bildes über den Anwendungsort des Kontrastmittels hinausgeht.^[64] Aufgrund dessen kann der Ort des T_2 -Kontrastmittels oft nicht genau bestimmt werden. Weiterhin können andere Effekte, welche zu einer Verdunkelung des MRT-Bildes führen, wie Ansammlungen von Blut im Gewebe, Kalzifizierung oder Ansammlungen von Metallen, zu einer Fehlinterpretation führen. Da bei der Verwendung von T_1 -Kontrastmittel diese Effekte nicht auftreten werden sie deutlich häufiger verwendet.^[65]

Die Kritik an gadoliniumbasierten Kontrastmitteln steigt seitdem 2013 ein erhöhter Kontrast im zentralen Nervensystem von Patienten, denen Gd(III) Kontrastmittel verabreicht wurde, entdeckt wurde. Dieser Kontrast nahm mit der Zeit auch nicht ab und bei der Autopsie dieser Patienten 2015 wurde bestätigt, dass der erhöhte Kontrast aufgrund von

Gd(III) Ablagerungen im zentralen Nervensystem erfolgte.^[24,25] Aufgrund dessen gab es Bedenken der Sicherheit bei der Verwendung von gadoliniumbasierten Kontrastmittel und in 2010 hat die FDA die Nutzung von drei gadoliniumbasierenden Kontrastmitteln in Patienten mit geringer Nierenfunktion untersagt.^[66] Nach dem Fund von Gadolinium im Gehirn hat auch die Europäische medizinische Agentur 2017 bekanntgegeben dass es die Marktzulassung von 3 von 8 zugelassenen intravenösen Kontrastmitteln zurückzieht.^[67] Weiterhin ist die Bluthalbwertszeit von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln häufig sehr gering, wodurch für die zeitaufwendigeren hochauflösenden MRT-Messungen mehrere Dosen des Kontrastmittels gegeben werden müssen.^[25]

Aufgrund dessen ist der Bedarf an biokompatiblen MRT-Kontrastmitteln hoch. SPION basierte Kontrastmittel sind aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität ein guter Kandidat für den Ersatz der gadoliniumbasierten Kontrastmittel. SPION Kontrastmittel finden schon seit längerem Anwendung als T₂-Kontrastmittel. Die ersten klinisch zugelassenen SPION basierten Kontrastmittel für das MRT sind Ferridex (1996 USA) und Resovist (2001 Europa).^[68] Beide sind T₂-Leber-Kontrastmittel, welche eine deutliche Verbesserung für die Erkennung kleiner Leber-Läsionen ermöglicht.^[69,70] Intravenös verabreichte SPION Kontrastmittel mit einer hydrodynamischen Größe von über 80 nm werden durch die Makrophagen der Leber, den sogenannten Kupffer-Zellen, von den reticuloendothelialen System aus dem Blut in die Leber (ca. 80 %), Niere (6-10 %), Knochenmark und die Lymphknoten transportiert. Anschließend werden sie in den Lysosomen in paramagnetisches Eisen(III) umgewandelt, welches für den normalen Eisenspeicher in Form von Ferritin oder Hämoglobin zur Verfügung steht.^[71] In Leber-Läsionen sind keine Kupffer-Zellen vorhanden, wodurch ein Kontrast zu dem restlichen Lebergewebe entsteht.^[71] Dies erhöht den Kontrast zwischen gesundem Leber-Gewebe und Leber-Läsionen deutlich.

Kleine Eisenoxide eignen sich aufgrund ihrer geringen Magnetisierung als T₁-Kontrastmittel und sind eventuell ein Kandidat für den Ersatz der gadoliniumbasierten Kontrastmittel. Sie besitzen auch deutlich höhere Bluthalbwertszeiten im Bereich von Stunden bis auch zu Tagen, wodurch sie für Angiographien geeignet sind und bieten durch ihre Modifizierbarkeit Tumor Zellen zu labeln oder Behandlungen nachzuverfolgen.^[6,72]

Der Einfluss eines SPIONs auf die longitudinale Relaxationszeit der Wasserstoffkerne im Wasser hängt sehr stark von der Ligandenhülle der Partikel ab. In Abbildung 13 sind die Interaktionen von Wasser mit einem SPION und seiner Ligandenhülle schematisch dargestellt.

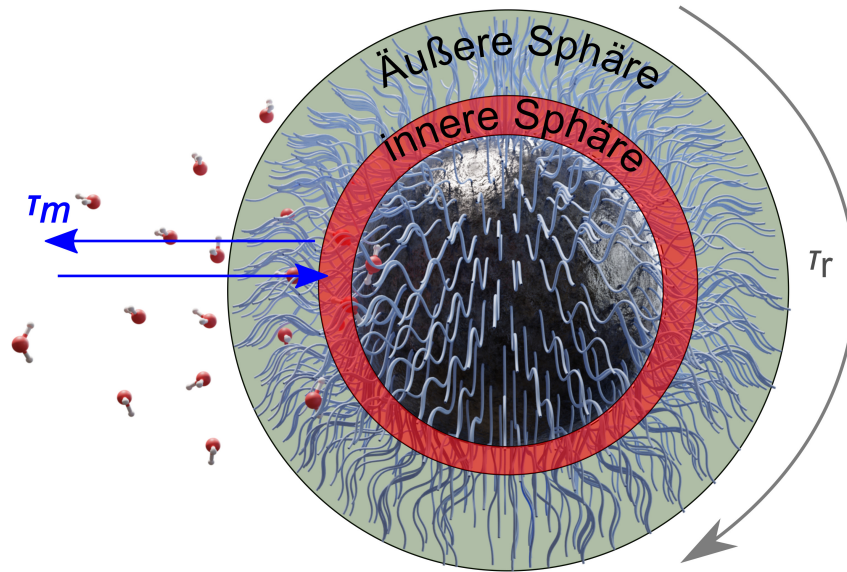


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines SPIONs mit Ligandenhülle und deren Interaktionen mit Wasser Molekülen in der inneren und äußeren Sphäre der Liganden in Anlehnung an JEON.^[6]

Hier ist die Ligandenhülle in eine innere und eine äußere Sphäre unterteilt. In der inneren Sphäre kommen die Wasser Moleküle in direkten Kontakt mit der Eisenoxidoberfläche und können über Spin-Gitter Wechselwirkungen relaxieren. In der äußeren Sphäre können die Protonen relaxieren, indem sie entweder durch die Magnetisierung des SPIONs relaxieren oder durch Austausch mit dem Wasserstoff in der Ligandenhülle. Hierbei spielen die mittlere Wasser Residenzzeit τ_m und die Rotations-Korrelationszeit des Partikel τ_r eine große Rolle bei der Fähigkeit des Kontrastmittels Wasser zu relaxieren. Die Relaxivität in der inneren Sphäre ist direkt proportional zu der Anzahl an Wasser Molekülen.^[49] Der Einfluss der Rotation-Korrelationszeit auf die Relaxivität ist von der angelegten Feldstärke abhängig. Bei Gadolinium-Komplexen nimmt die Relaxivität bei geringen Feldstärken mit sinkender Rotations-Korrelationszeit zu. Bei hohen Feldstärken nimmt die Relaxivität zuerst mit steigender Rotations-Korrelationszeit zu und nimmt dann wieder ab. Der Einfluss der Rotations-Korrelationszeit auf die Relaxivität ist im Vergleich zu den Gadolinium-Komplexen noch kaum untersucht, aber es ist zu vermuten, dass ähnliche Effekte auftreten. Die Wasser Austauschzeit sollte möglichst gering sein, um möglichst viele Wasser Moleküle in der inneren Sphäre austauschen zu können. Bei sehr hohen Wasser Austauschzeiten sinkt die Relaxivität aber auch wieder, da die Verweilzeit der Wasser Moleküle zu gering ist um mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu relaxieren.^[49] Die große Herausforderung bei der Herstellung geeigneter T_1 -Kontrastmittel auf SPION Basis liegt

darin, die Wasser Interaktionen mit dem Partikel möglichst hoch durch die Kontrolle der Wassermobilität τ_m und Rotations-Korrelationszeit τ_r zu halten, während der Einfluss des magnetischen Feldes auf das Wasser so gering wie möglich sein sollte, um die T₂-Relaxation so gering wie möglich zu halten.^[49]

Der Einfluss der Liganden auf das Relaxationsverhalten wurde in mehreren Studien untersucht. Monte Carlo Berechnungen sagen voraus, dass wenn die Ligandenhülle als ein Bereich mit verringerter Diffusion betrachtet wird, eine Erhöhung der Dicke der Ligandenhülle r_1 erhöht da das Wasser längere Zeit zum relaxieren hatte, aber auch länger im Magnetfeld des SPIONs war, wodurch auch r_2 erhöht wurde.^[73] In experimentiellen Studien, in denen PEG-Liganden mit Molekulargewichten von 550 bis 5000 g/mol untersucht wurden war aber kein klarer Trend erkennbar. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass bei der Stabilisierung mit kürzeren PEG-Liganden die SPIONs nicht vollständig stabilisieren konnten und es zu Aggregation kam. Die größeren PEG-Liganden von 1000 bis 3000 g/mol zeigten hierbei höhere r_1 und niedrigere r_2 Werte. Hierbei war aber unschlüssig, ob dies durch eine Änderung der Wassermobilität und Rotationskorrelationszeit in der Ligandenhülle erreicht wurde oder durch eine bessere Stabilisierung einzelner SPIONs. Ähnliche Experimente zeigten hierbei auch keinen klaren Einfluss der PEG Länge auf das Relaxationsverhalten.^[74?, 75]

Eisenoxide zeigen großes Potentail aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität, Modifizierbarkeit und ihrem Superparamagnetismus. Trotz der großen Fortschritte bei der Anwendung von Eisenoxiden als MRT-Kontrastmittel wurden nur sehr wenige SPION basierte Kontrastmittel auf den Markt gebracht. Dies liegt zu einem großen Teil daran, dass die Synthese von biokompatiblen USPION noch nicht in großen Mengen möglich ist. Zum anderen ist noch die Erforschung der Prozesse in der Ligandenhülle nötig, um die Relaxation, Bluthalbwertszeit, Ausscheidungswege und die spezifische Bindung an bestimmte Gewebe zu steuern.^[25, 76]

3.5 Partikelagglomerate

Durch die Agglomeration von SPIONs kann das Relaxationsverhalten stark beeinflusst werden. Mit der Größe von Partikelagglomeraten steigt auch die r_2 -Relaxation deutlich. Experimente zeigen, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der r_2 -Relaxation und der Anzahl an Nanopartikeln in einem Agglomerat gibt. Dieser Anstieg resultiert durch die Interaktion der SPION Partikel im Cluster. Die von den Nanopartikeln induzierten Felder können hierbei konstruktiv oder destruktiv wechselwirken und dadurch

die Inhomogenität des Magnetfeldes erhöhen, was zu einer schnelleren Dephasierung der Spins in der Umgebung führt.^[77] Die r_1 -Relaxation nimmt bei der Agglomeration von Nanopartikeln stark ab, da die Partikel innerhalb des Clusters nicht in Kontakt mit Wasser Molekülen kommen, wodurch die Spin-Gitter Relaxation abnimmt. Aufgrund dessen sollte die Agglomeration von Partikeln für die Entwicklung eines T_1 -Kontrastmittels auf SPION Basis unterdrückt werden, da auch kleine Agglomerate sich negativ auswirken. Bei der Entwicklung eines T_2 -Kontrastmittels hingegen verbessern sich die Eigenschaften durch eine Agglomeration und kann auch erwünscht sein. Auf SPION basierte T_2 Kontrastmittel wie zum Beispiel Resovist® und Ferridex® nutzen dies aus. Sie bestehen aus circa 5 nm großen Partikeln die in Clustern mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ungefähr 120 nm vorliegen.^[68]

3.6 Magnetische Partikel Tomographie

Die Grundlagen für die magnetische Partikel Tomographie (MPT) wurde von GLEICH in dem Jahr 2001 in dem Forschungslabor von Philipps in Hamburg erforscht um eine neue Bildgebungsmethode zu entwickeln, mit der sich Tumore mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung abbilden lassen. Im Jahr 2002 bauten GLEICH und WEIZENECKER den ersten Prototyp, der in der Lage war erste Bilder aufzunehmen.^[78,79] Im Gegensatz zum MRT, wirken die SPIONs im MPT nicht als Kontrastmittel, sondern werden direkt durch ihre Antwort auf ein oszillierendes magnetisches Feld abgebildet. Hierbei werden die SPIONs direkt im Raum detektiert und nicht wie im MRT indirekt durch ihre Wirkung auf die Relaxationszeit von Wasser. In Abbildung 14 ist ein mit Resovist® gefüllter Schlauch und seine Projektion in einen MPT Scanner gezeigt.

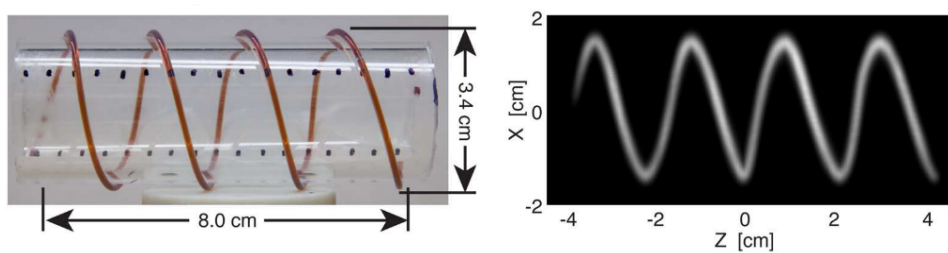


Abbildung 14: Foto von einem mit 50 mM Resovist® gefüllten Schlauch und dessen Projektion in einem MPT Scanner. Diese Abbildung wurde übernommen mit Erlaubnis aus *Projection Reconstruction Magnetic Particle Imaging* ©2013 IEEE.^[80]

Die MPT basiert auf der nichtlinearen Magnetisierung der SPIONs in einem oszillierenden Magnetfeld mit einer Stärke von 0.1 - 20 mT.^[78] Durch diese nichtlineare Magnetisierung entstehen harmonische Frequenzen im detektierten Signal, mit denen die SPION

Konzentration in dem feldfreien Punkt bestimmt werden kann. Durch die Intensität der harmonischen Frequenzen kann dann die SPION Konzentration in dem Messpunkt bestimmt werden. In Abbildung 15 ist das Grundprinzip der Signalerzeugung bei der MPT dargestellt.^[81]

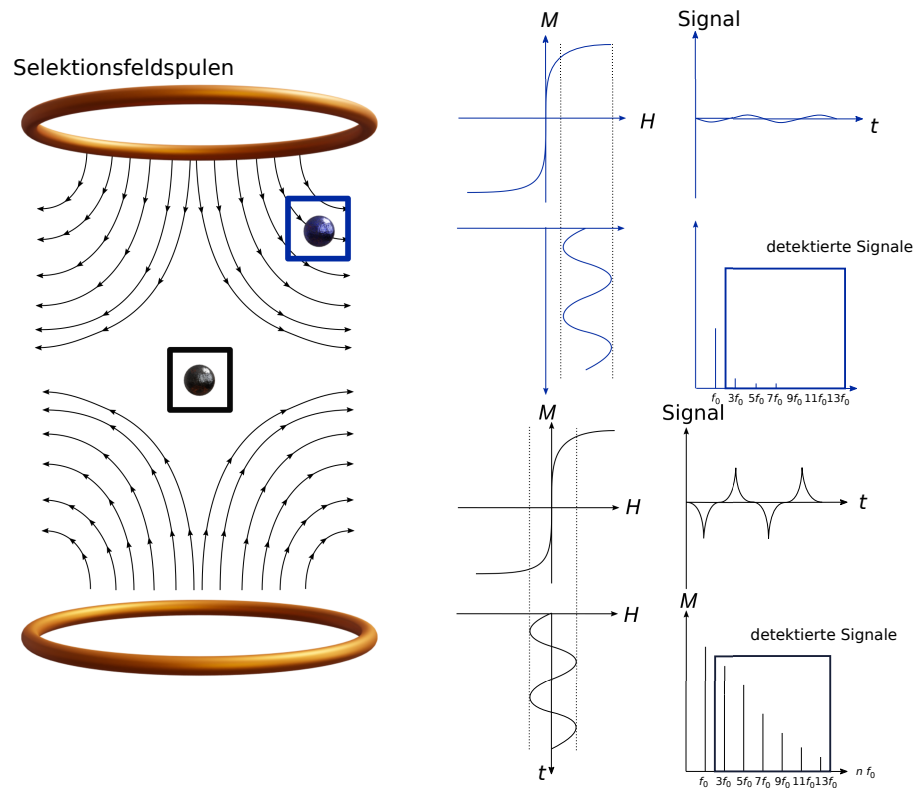


Abbildung 15: Schematisches Funktionsprinzip einer MPT Messung. Es sind zwei SPIONs in zwei verschiedenen Bereichen im angelegten Magnetfeld dargestellt. In Schwarz ist ein SPION im feldfreien Punkt und seine Antwort auf ein oszillierendes Magnetfeld dargestellt. In Blau ist ein SPION und seine Antwort auf ein oszillierendes Magnetfeld außerhalb des feldfreien Punktes dargestellt. Die Abbildung wurde in Anlehnung an KNOPP und MINARD erstellt.^[79,81]

Bei der MPT werden zwei sich überlagernde Magnetfelder an die Probe angelegt, wodurch sie sich in der Mitte ausgleichen und einen feldfreien Punkt bilden. Wird jetzt ein oszillierendes Magnetfeld an die Probe angelegt, folgen die Nanopartikel im feldfreien Punkt dem angelegten Magnetfeld. Durch das nichtlineare Magnetisierungsverhalten der SPIONs enthält das Partikelsignal nicht nur die Grundfrequenz des angelegten Magnetfeldes, sondern auch alle höheren harmonischen Frequenzen. Dies ist in Abbildung 15 in Schwarz dargestellt. Dort wird nur das entstehende Partikelsignal und nicht die Überlagerung von Partikelsignal und Grundfrequenz zur Veranschaulichung betrachtet. Das Partikelsignal bei den höheren Frequenzen ist hierbei ohne Hintergrundrauschen, da andere im Körper enthaltene magnetische Substanzen, wie zum Beispiel Eisen, ein lineares

Magnetisierungsverhalten zeigen und somit keine höheren Frequenzen enthalten. Durch die Intensität dieser harmonischen Frequenzen kann direkt auf die SPION Konzentration im feldfreien Punkt zurückgeschlossen werden.^[79] In Blau in der Abbildung 15 ist das Verhalten der SPIONs außerhalb des feldfreien Punktes dargestellt. Diese Partikel befinden sich in dem Bereich der Sättigungsmagnetisierung, wodurch diese Partikel auf das angelegte oszillierende Magnetfeld kaum Signal geben. Dadurch haben die SPIONs außerhalb des feldfreien Punktes nur wenig Einfluss auf das detektierte Signal. Um eine räumliche Auflösung des Signals zu erreichen, wird bei der MPT noch ein weiteres variables Feld angelegt, mit dem der feldfreie Punkt durch den Raum bewegt wird. Dadurch kann dann die SPION Konzentration im Raum dargestellt werden.^[78,79,81]

Um ein möglichst hohes Signal zu erreichen, sollten die Eisenoxide eine möglichst hohe Magnetisierung bei der relativ geringen angelegten Feldstärke des oszillierenden Magnetfelds von 0.1 - 20 mT besitzen. Zum anderen müssen die SPIONs schnell genug relaxieren können, um der Frequenz des Magnetfelds zu folgen. Sind die SPIONs nicht in der Lage schnell genug zu relaxieren, können sie dem angelegten Magnetfeld nicht folgen und ein großer Teil des Signals geht verloren.

Magnetische Nanopartikel können über zwei verschiedene Mechanismen relaxieren und dem angelegten Magnetfeld folgen. Diese beiden Relaxationsmechanismen sind die NÉEL und BROWN Relaxation.

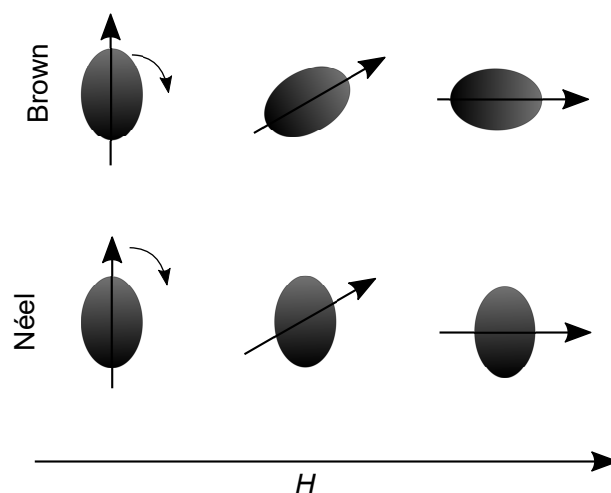


Abbildung 16: Schematische Darstellung der BROWN und NÉEL-Relaxation magnetischer Nanopartikel in Anlehnung an KNOPP.^[79]

Bei der NÉEL-Relaxation τ^N ändert sich nur die Magnetisierungsrichtung und nicht die Ausrichtung des Nanopartikels. Hierbei muss die Magnetisierung über die leichten Achsen heraus rotieren. Die NÉEL-Relaxation kann durch Gleichung 3.23 beschrieben werden.

$$\tau^N = \tau_0 \exp\left(\frac{K^A V}{k_B T}\right) \quad (3.23)$$

Hierbei ist K^A die Anisotropiekonstante und V das Volumen des Partikels. Bei der BROWN Relaxation rotiert das gesamte Partikel und ändert dadurch seine Magnetisierungsrichtung. Die BROWN-Relaxationszeit kann nach Gleichung 3.24 beschrieben werden.

$$\tau^B = \frac{3\eta V^H}{k_B T} \quad (3.24)$$

Hierbei ist η die Viskosität des Lösungsmittels und V^H das hydrodynamische Volumen. Die gesamte Relaxationszeit eines magnetischen Nanopartikels setzt sich aus der BROWN und NÉEL-Relaxation zusammen und wird durch Gleichung 3.25 beschrieben.

$$\tau = \frac{\tau^B \tau^N}{\tau^B + \tau^N} \quad (3.25)$$

Dadurch ergibt sich, dass die kürzere Relaxationszeit für die gesamte Relaxationszeit bestimmend ist.^[79]

Diese beiden Effekte sind gegenläufig, da kleinere Partikel schneller relaxieren und dem Magnetfeld folgen können, aber größere Nanopartikel eine höhere Magnetisierung aufgrund der sogenannten Spin Glas Struktur auf der Oberfläche der Nanopartikel besitzen. Für ein möglichst gutes Signal sollten die Eisenoxide bei geringen Feldstärken schon in Sättigung sein, da dadurch der feldfreie Punkt kleiner sein kann. Mit der Partikelgröße nimmt auch die Größe des dynamischen Bereichs der Magnetisierung ab, aber ab einer Nanopartikelgröße von circa 25 nm sind die Partikel nicht mehr superparamagnetisch und gehen zu einem ferromagnetischen Verhalten über. Hier kommt auch noch das Relaxationsverhalten der SPIONs zu tragen. Die Partikelmagnetisierung muss in der Lage sein der Frequenz des angelegten Magnetfelds zu folgen, da sonst viel Signal verloren geht. Kleine SPIONs sind in der Lage schneller zu relaxieren und können damit dem angelegten Magnetfeld leichter folgen.^[79]

Kapitel 4

Zielstellung

Die Synthese von großen Mengen an biokompatiblen Eisenoxidnanopartikeln mit einer guten Kontrolle über ihre Größe und Größenverteilung ist bis heute ein Problem, welche die klinische Anwendung von SPION zurückhält.^[25] Ziel dieser Dissertation war die Synthese und Charakterisierung von Eisenoxidnanopartikeln für die Verwendung in unterschiedlichen biomedizinischen Anwendungen. Die Nanopartikel sollten über eine Synthese hergestellt werden, welche sich einfach skalieren lässt und in der möglichst keine kanzerogenen Chemikalien verwendet werden, um eine hohe Biokompatibilität zu gewährleisten. Der Einfluss der Agglomeration von SPIONs auf ihren Magnetismus und ihre Eignung in MRT und MPI soll untersucht werden.

Diese Arbeit ist in drei Unterbereiche eingeteilt. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte eine leicht skalierbare Synthese von biokompatiblen USPIONs basierend auf einer Polyolsynthese entwickelt werden. Hierbei sollte geprüft werden, ob die Synthese auf einem Flussreaktor übertragbar ist, um eine hohe Reproduzierbarkeit und Skalierbarkeit zu gewährleisten. Die hergestellten USPIONs sollten anschließend mit unterschiedlichen Methoden im wässrigen System stabilisiert werden mit dem Ziel der Herstellung von Nanopartikeln, die eine sehr gute Eignung als T₁-Kontrastmittel zeigen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die hergestellten Eisenoxidnanopartikel kontrolliert agglomeriert werden, um Cluster in einem Größenbereich bis 100 nm hydrodynamischen Durchmesser zu erhalten. Der Einfluss der Agglomeration auf ihre magnetischen Eigenschaften und auf ihre Eignung im MRT und MPT sollte anschließend untersucht werden.

In dem dritten Teilbereich dieser Arbeit sollten große Eisenoxid Cluster in einem Größenbereich von 200- 700 nm im Rahmen des Mankind Projektes hergestellt werden. An-

schließlich sollten sie aufgrund ihrer hohen Magnetisierung in einer neuen Methode zur Detektierung diverser Antigene oder Viren verwendet werden. Die SPION-Cluster sollten hierbei so funktionalisiert werden, sodass sie gezielt an Quantumdots gekoppelt werden können und magnetofluoreszente Konstrukte erzeugen. Diese können anschließend mit Hilfe eines Magneten aus der Lösung entfernt werden, um Biofluoreszenz zu vermeiden.

Kapitel 5

Ergebnisse und Diskussion

SPIONs sind durch ihre außergewöhnlichen magnetischen Eigenschaften und ihrer hohen Bioabbaubarkeit für medizinische Anwendungen, wie die Magnetresonanztomographie, magnetische Partikel Tomographie, Hyperthermie und den gezielten Wirkstofftransport von sehr hohem wissenschaftlichem Interesse.^[9] Die magnetischen Eigenschaften der SPIONs werden stark durch ihre Kristallinität, Größe, Form, Aggregationsgrad und Kristallstruktur beeinflusst.^[30]

Eisenoxide wurden schon ausgiebig in der Anwendung als T₂-Kontrastmittel in der MRT untersucht und zeigten lange Bluthalbwertszeiten und eine geringe Toxizität.^[77,82] Durch Modifizierung der Liganden bieten SPIONs die Möglichkeit ihre Eigenschaften stark zu verändern und ihre Stabilität im Körper zu erhöhen. Bei den meisten Eisenoxiden binden kurz nach kurzer Zeit im Blutkreislauf Plasmaproteine an die Oberfläche, welche die Aufnahme von Makrophagen erleichtern.^[83] Eine Stabilisierung mit Polyethylenglykol (PEG) Liganden, kann die Bindung von diesen Plasmaproteinen unterdrücken und bietet eine hohe Stabilität der SPIONS durch sterische Abstoßung.^[84] Der hydrodynamische Radius und die Ladung der Partikel spielen eine große Rolle bei der Stabilität von SPIONs im Blut. Sowie hohe positive und auch negative geladene Ligandenhüllen führten zu einer schnellen Aufnahme von Macrophagen.^[85] Viele dieser Ergebnisse sind aber nicht untereinander konsistent, da häufig die experimentellen Bedingungen und die Grundpartikel in den Studien unterschiedlich sind.^[86] Auch der hydrodynamische Radius der verkapselten SPIONs hat einen großen Einfluss auf ihre Bluthalbwertszeit, sowie den Ausscheidungsweg aus dem Körper. SPIONs mit einem hydrodynamischen Radius von über 100 nm werden sehr schnell durch Makrophagen in der Leber und Milz aus dem Blutkreislauf entfernt. SPIONs mit einem hydrodynamischen Durchmesser unter 10 nm werden hingegen vorwiegend durch die Niere aus dem Blutkreislauf gefiltert.^[86] Somit hat neben den SPIONs selber, auch ihre Ligandenhülle und der hydrodynamische Durchmesser einen sehr großen Einfluss auf ihre Eigenschaften im Körper.

Die Synthese der SPIONs in dieser Arbeit wurde auf der Basis einer Hochtemperatur-Hydrolyse von chelatisierten Eisen(III)- und Eisen(II)- Diethylenglykolatkomplexen nach GOLOVERDA *et al.* entwickelt.^[87] Diese Synthese wurde optimiert, um die Stabilität in Lösung zu optimieren und die Größe, Kristallstruktur und den Aggregationsgrad präzise steuern zu können. Die in dieser Arbeit verwendete Polyolsynthese zeichnet sich durch ihre ausgezeichnete Biokompatibilität aus, da als Nebenprodukt der Synthese nur Natriumchlorid gebildet wird und kanzerogene Lösungsmittel vermieden werden.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit sind in drei verschiedene Unterkapitel aufgeteilt, die jeweils die Optimierung der Synthese und der Eigenschaften der SPIONs für unterschiedliche medizinische Anwendungen thematisieren.

Das erste Unterkapitel behandelt die Herstellung von SPION basierten T₁-Kontrastmitteln und den Transfer auf ein Flusssystem, um die Reproduzierbarkeit, den Durchsatz und die Skalierbarkeit der Synthese signifikant zu erhöhen. Hierfür wurde die Hochtemperatur-Hydrolyse von chelatisierten Eisen(III)- und Eisen(II)- Diethylenglykolkomplexen nach GOLOVERDA *et al.* optimiert, um möglichst kleine Eisenoxide <5 nm sogenannte USPI-ONs als T₁-Kontrastmittel zu erhalten.^[87] Anschließend wurde ein Transfer dieser optimierten Polyolsynthese auf eine Flusssynthese durchgeführt, um eine hohe Reproduzierbarkeit und Skalierbarkeit zu erreichen. Die SPIONs wurden daraufhin mit unterschiedlichen Ligandensystemen in Wasser stabilisiert, um ihre Eigenschaften als T₁-Kontrastmittel zu untersuchen und durch die Wahl des richtigen Ligandensystems zu optimieren.

Das zweite Unterkapitel dieser Arbeit behandelt die Entwicklung SPION basierter Tracer für die magnetische Partikel Tomographie. Hierfür wurde der Agglomerationsgrad der SPIONs gezielt über Methoden zur kontrollierten Aggregation gesteuert. Agglomerate zeigen oft durch konstruktive und destruktive Wechselwirkungen untereinander stark unterschiedliches magnetisches Verhalten gegenüber einzelnen SPIONs.^[88] Durch die in dieser Arbeit verwendeten Methoden konnten Partikelaggregate mit einem hydrodynamischen Durchmesser von bis zu 120 nm hergestellt werden. Diese Partikelaggregate wurden anschließend durch Messungen im MPS auf ihre Eignung als MPT-Tracer untersucht.

Im dritten und letzten Unterkapitel dieser Arbeit wurden große SPION Partikelagglomerate mit einer Größe von 200 bis zu 700 nm über die evaporations-induzierte Selbstassemblierung (EISA) hergestellt. Diese magnetischen Suprapartikel wurden anschließend im Rahmen des Projektes zur Entwicklung **m**agnetofluoreszenter **N**ano**K**onstrukte für

den Einsatz **in** Hochdurchsatz und Point of Care Diagnostik (Mankind) und mit fluoreszierenden CdSe Quantendots gekoppelt. Durch die weit überlegende Fluoreszenz der gekoppelten QDs gegenüber konventionellen Farbstoffen können diese Konstrukte virale Antigene in sehr geringer Konzentration bestimmen. Durch die hohe Sensitivität dieser Nanokonstrukte ist es theoretisch möglich, virale Antigene in geringen Konzentrationen ohne die Verwendung des zeitintensiven Prozesses der Polymerase-Kettenreaktion und sogar einzelne magnetofluoreszente Konstrukte im Fluss zu detektieren.

5.1 USPIONS als T_1 Kontrastmittel

Gadoliniumbasierte Kontrastmittel sind sehr weit verbreitet und werden im MRT in 40 % aller Messungen verwendet.^[49] gadoliniumbasierte T_1 -Kontrastmittel besitzen geringe Bluthalbwertszeiten, sodass oft für die Messung von zeitaufwändigen hochauflösenden MRT-Messungen mehrere Kontrastmittel Zugaben erfolgen müssen.^[49] Aufgrund von Gadolinium Ablagerungen in Patienten und dem Rückruf mehrerer auf gadoliniumbasierenden Kontrastmitteln, ist die Erforschung von alternativen T_1 -Kontrastmitteln von hohem wissenschaftlichem Interesse.^[67] Sehr kleine SPIONs mit einer Größe von unter fünf Nanometern, sogenannte *ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticle* (USPION), zeigen ein hohes Potential als Ersatz für die gadoliniumbasierten Kontrastmitteln. Durch die geringe Partikelgröße ist ihre Magnetisierung stark reduziert, wodurch auch ihr Einfluss auf die T_2 -Relaxationszeit stark abnimmt. Durch Optimierung der Ligandenhülle kann die Wassermobilität an der Nanopartikeloberfläche und somit ihr Einfluss auf die T_1 -Relaxationszeit erhöht werden. USPIONs zeigen ein gutes r_1 zu r_2 Verhältnis, eine hervorragende Biokompatibilität, eine lange Bluthalbwertszeit und eine sehr hohe Flexibilität durch die Modifizierung der Ligandenhülle. Neben der Suche nach der richtigen Ligandenhülle ist eine der großen Hürden, um USPIONs im klinischen Maßstab als T_1 -Kontrastmittel nutzen zu können, die Suche nach einer biokompatiblen Synthese, mit der sich USPIONs in großen Mengen, mit hoher Reproduzierbarkeit und mit geringen Kosten synthetisieren lassen.^[6,51]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden USPIONs über eine Polyolsynthese in Anlehnung an eine Synthese nach GOLOVERDA et. al. hergestellt.^[87] Diese Synthese wurde optimiert und anschließend auf ein Flussreaktorsystem übertragen, um eine hohe Reproduzierbarkeit und Skalierbarkeit dieser Synthese zu erhalten. Anschließend wurden die USPIONs im wässrigen Medium mit unterschiedlichen Liganden stabilisiert und auf ihre Eignung als T_1 -Kontrastmittel untersucht.

5.1.1 Batch Synthese

Die in dieser Arbeit verwendeten Batchsynthesen basieren auf einer modifizierten Polyolsynthese nach GOLOVERDA *et al.*^[87] Diese Synthese unterscheidet sich von den klassischen Polyolsynthesen, durch die Verwendung wasserfreier Edukte, wodurch die Wassermenge in der Synthese kontrolliert wird und die Stabilität einzelner Partikel erhöht wird. Um eine wasserfreie Eduktlösung zu erhalten werden wasserfreie Eisenvorläuferverbindungen genutzt und Natrium statt Natriumhydroxid als Base. Durch diese Änderungen kann der Wassergehalt anschließend präzise durch Wasserzugabe bei Temperaturen von 160 bis 180 °C gesteuert und die Nukleation ausgelöst werden. Ist die Wassermenge in der Reaktionslösung zu hoch, nukleieren die Nanopartikel schon während der Heizphase und die Partikelstabilität in Lösung nimmt stark ab und es kommt zur Bildung von Agglomeraten. Aufgrund dessen ist die genaue Kontrolle der Wassermenge in der Synthese von hoher Wichtigkeit. Die Vermeidung von Wasser in der Reaktionslösung ermöglicht die Durchführung einer klassischen *hot injection* Synthese, in der die Partikelnukleation kontrolliert über die Zugabe einer definierten Wassermenge erfolgt. Durch diese Änderungen wird eine Aggregation der einzelnen Nanopartikel in der Reaktionslösung unterdrückt und eine höhere Kontrolle über Nukleation und Wachstum ermöglicht.^[87,89]

In Abbildung 17 und Tabelle 3 ist ein Probenzug aus einer *hot injection* Synthese über 60 min bei 230 °C exemplarisch dargestellt. Der Probenzug wurde schon im Rahmen der Masterarbeit gezeigt. Für ein besseres Verständnis des Partikelwachstums, wird der Reaktionsverlauf hier diskutiert.^[90]

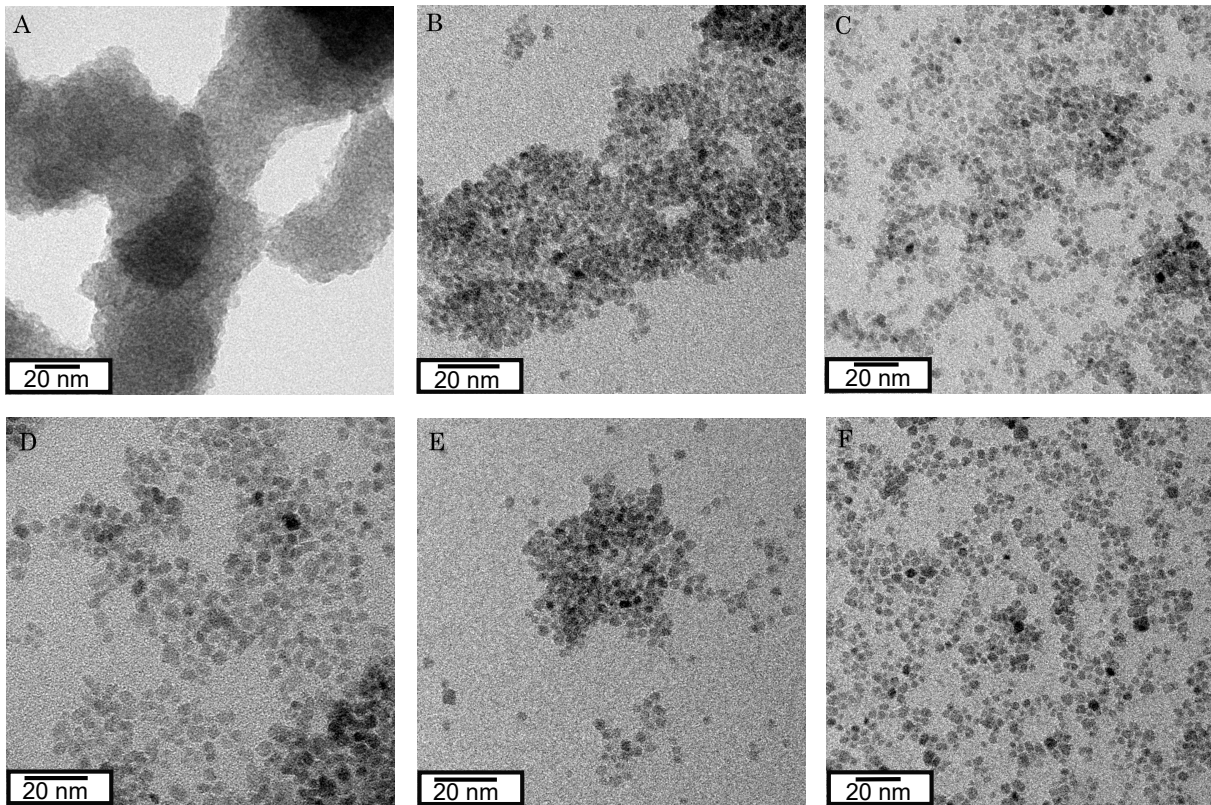


Abbildung 17: TEM-Bilder des Wachstumsverlaufs der SPIONs in der *hot injection* Reaktion in Anlehnung an GOLOVERDA *et al.*^[87], in einem Zeitraum von bis zu 60 min nach der Injektion der Eduktlösung. Für die Verfolgung des Partikelwachstums wurde eine Probe vor der Nukleation (A) und Proben nach 5 (B), 15 (C), 30 (D), 45 (E) und 60 min (F) entnommen und mit dem TEM untersucht.^[90]

Tabelle 3: Mittelwerte der durch durch TEM bestimmten Größenverteilung und die Standardabweichung vom Mittelwert der *hot injection* Synthese mit Probenzug.

Reaktionszeit /min	Mittelwert /nm	Standardabweichung $\sigma/\%$
5	2.8	24
15	3.4	19
30	3.5	22
45	3.2	21
60	3.6	20

Durch die Verwendung wasserfreier Edukte findet vor der Zugabe des Wassers keine Nukleation statt und es sind im TEM keine Nanopartikel sichtbar (Abbildung 17 A). Nach der Nukleation durch Wasserzugabe folgt eine Wachstumsphase, welche nach ungefähr 15 min bei 230 °C abgeschlossen ist. In den folgenden 45 min findet praktisch kein Partikelwachstum mehr statt und der Partikeldurchmesser, sowie die Größenverteilung ändert

sich nur wenig. Somit ist das Partikelwachstum in dieser Synthese bereits nach ungefähr 15 min beendet. Da die Partikel nicht langzeitstabil in der DEG Lösung sind, wird ein Ligandenaustausch mit Oleylphosphat durchgeführt, wodurch die SPIONs in Toluol stabilisiert werden.

In Abbildung 18 ist ein XRD von durch die Kolbensynthese synthetisierten SPIONs mit einem Partikeldurchmesser von $6.6 \text{ nm} \pm 14 \%$ beispielhaft für alle durchgeführten Kolbensynthesen dargestellt.

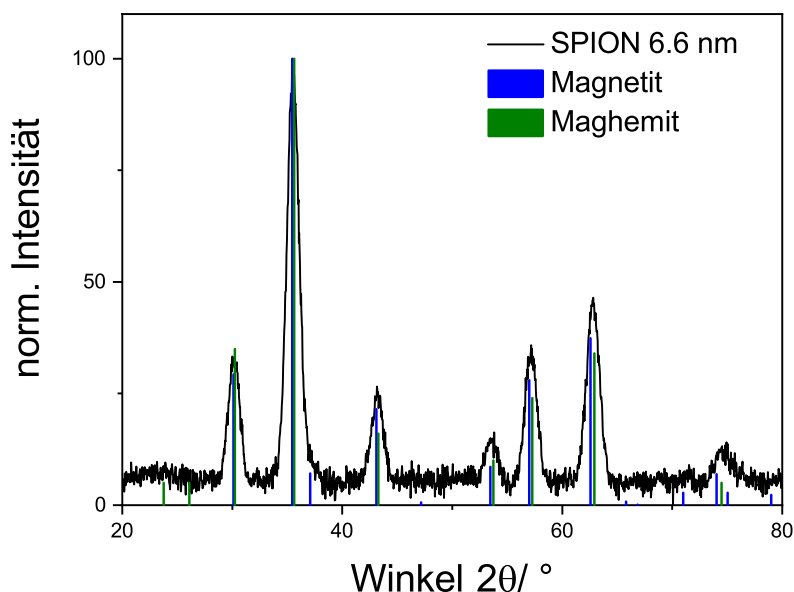


Abbildung 18: XRD Diffraktogramm von $6.6 \text{ nm} \pm 14 \%$ SPIONs mit Referenzkarten für Magnetit (blau 00-019-0629)^[91] und Maghemit (grün 00-039-1346)^[92].

In dem Diffraktogramm ist erkennbar, dass die SPIONs aus Maghemit, Magnetit oder einer Mischphase beider Strukturen bestehen. Es ist davon auszugehen, dass die Partikel bei der Aufarbeitung und Lagerung schnell aufgrund des geringen Partikeldurchmessers vollständig zu Maghemit oxidierten. Der Anteil von Maghemit zu Magnetit in den Partikeln kann nicht mit Hilfe von XRD Messungen bestimmt werden, da die Diffraktogramme beider Kristallstrukturen sich zu sehr ähneln.^[93] Um den Maghemit Anteil in den SPIONs zu bestimmen, müsste eine Mößbauer Messung durchgeführt werden um das Verhältnis von Eisen(III) zu Eisen(II) in den Partikeln zu bestimmen.

Durchgeführte Mößbauer-Messungen von GOLOVERDA *et al.* zeigen, dass die Partikel in der Magnetit Struktur direkt nach der Synthese vorliegen. Die Proben wurden hierbei zum Schutz vor Oxidation immer unter Stickstoff als Schutzgas gehalten.^[94]

5.1.2 Flusssynthese

USPIONS sind für die Anwendung als biokompatible T_1 -Kontrastmittel von hohem wissenschaftlichem Interesse, um die Risiken durch die gadoliniumbasierten Kontrastmittel zu verringern. Eine der großen Herausforderungen um USPIONS in klinischen Anwendungen zu nutzen, liegt derzeit noch bei der Entwicklung einer Synthese, mit der große Mengen an USPIONS mit einer hohen Reproduzierbarkeit und geringen Kosten synthetisiert werden können.^[76]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hochtemperatur Hydrolyse von Eisendiethylenglykolat Komplexen zur Herstellung von USPIONS auf eine kontinuierliche Flusssynthese überführt. Flusssynthesen bieten gegenüber den Kolbensynthesen eine hohe Reproduzierbarkeit, schnellen Wärmeaustausch, erhöhte Kontrolle über das Mischungsverhalten durch die Auswahl geeigneter Mischstrukturen, genaue Kontrolle des Verhältnisses der Eduktlösungen durch Steuerung der Flussraten, sowie die Möglichkeit eines kontinuierlichen Betriebes. Durch einen kontinuierlichen Betrieb des Flussreaktors ist eine Produktion von großen Mengen an Nanopartikeln über lange Zeiträume mit geringem Personalaufwand möglich, wenn genügend Sicherheitsvorkehrungen und Notfallabschaltungen vorhanden sind, um Defekte schnell zu detektieren. Ein signifikanter Vorteil der Flusssynthese gegenüber der Kolbensynthese ist der leichte Transfer auf eine industrielle Produktion, durch zum Beispiel *numbering up*. Es ist möglich mehrere zehntausende Rohre mit geringem Durchmesser nebeneinander zu heizen, wodurch die Reaktionsbedingungen, wie zum Beispiel der Wärmeaustausch und Mischverhältnis relativ gleich zum Einzelrohrreaktor bleiben und eine signifikante Hochskalierung erreicht wird.^[95]

Bei einer Hochskalierung im Kolben oder dem großtechnischen Äquivalent, dem Rührkessel, wird meistens das Volumen erhöht, wodurch das Oberfläche zu Volumen Verhältnis sich stark verändert, was wiederum den Wärmeaustausch und die schnelle Durchmischung erschwert. Nachteilig an Flusssynthesen ist, dass sie recht inflexibel gegenüber größeren Änderungen in der Synthese sind. Weiterhin ist die Bildung von gasförmigen Nebenprodukten, wie zum Beispiel bei der Pyrolyse Synthese von SPIONS, ein Problem, da die Flusssysteme unter Druck stehen und der Ablass von Gasen schwierig ist. Für Mikroreaktoren ist die richtige Wahl des Reaktors von hoher Wichtigkeit, da häufig laminares Fließverhalten auftritt. Hierbei bildet sich ein Strömungsprofil aus, indem die Lösung in der Mitte des Rohres am schnellsten fließt. Zur Rohrwand nimmt hierbei die Strömungsgeschwindigkeit parabolisch ab. Dies würde zu einer Verweilzeitverbreiterung der Nanopartikel im Reaktor führen und sollte durch genaue Kontrolle der Parameter des Reaktors vermieden werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Synthese besitzt mehrere Eigenschaften, welche den Transfer auf einen Flussreaktor ermöglichen. Die Reaktion ist wie in Abbildung 17 gezeigt schon nach 15 min abgeschlossen, wodurch die Schlauchlänge und damit auch der Druck auf das System nach der Gleichung von HAGEN-POISEUILLE gering gehalten werden kann.^[96–98]

$$\vec{V} = \frac{\pi \cdot r^4 \Delta p}{8 \cdot \eta l} \quad (5.1)$$

Durch die HAGEN-POISEUILLE-Gleichung ergibt sich ein Druckanstieg Δp bei einer Verlängerung des Rohres l , bei konstanten Volumenstrom $\vec{V}$, Viskosität der Flüssigkeit η und Innenradius des Rohres r .

Die geringe Reaktionstemperatur von 180 °C und die Verwendungen von schwer entzündlichen Chemikalien mit hohen Siedepunkten ($T_s \text{ DEG} = 245 \text{ °C}$) ermöglicht die Verwendung von Schläuchen aus Polyetheretherketonen (PEEK) und es besteht keine Gefahr einer Entzündung durch austretende Reaktionslösung von eventuellen Undichtigkeiten oder Beschädigungen.

In Abbildung 19 ist der schematische Aufbau des kontinuierlichen Flussreaktors zur Herstellung von USPIONs dargestellt.

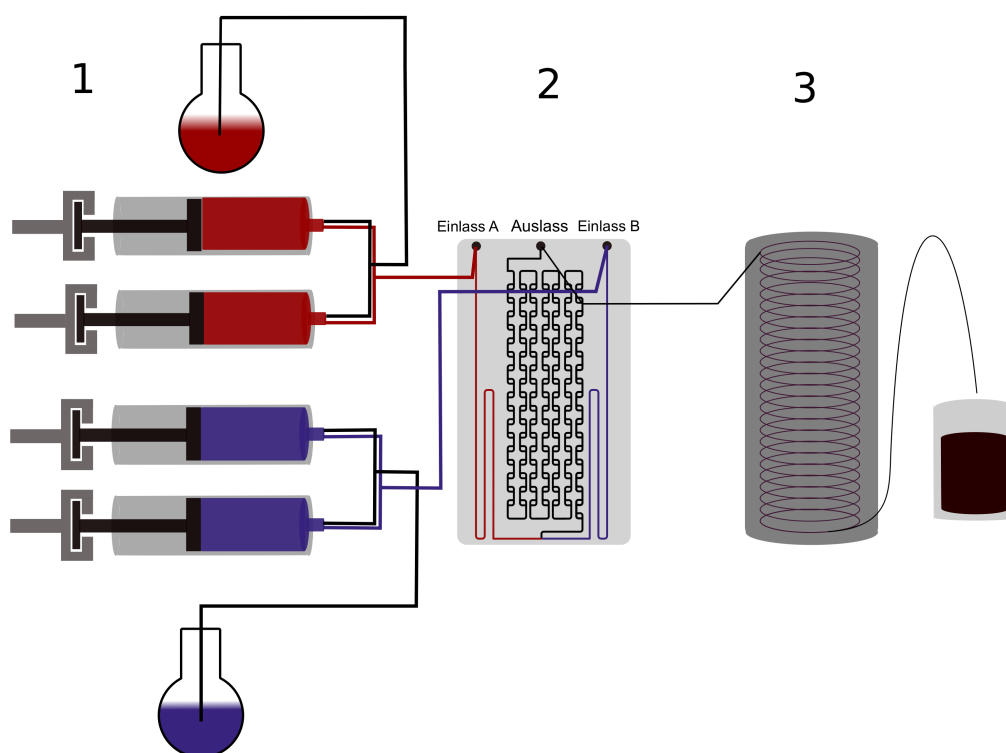


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Flusssynthese von Eisenoxiden. Der Flussreaktor besteht aus einem Spritzenpumpensystem (1), einer *split and combine* Mischstruktur (2) und einem Wachstumssofen (3).

Der Flussreaktor ist aus drei Stufen aufgebaut. In der ersten Stufe (1) sind die vorbereiteten Vorläuferverbindungen aus zum einen Eisen(III)-chlorid, Eisen(II)-chlorid und Natriumdiethylenglykolat (rot) und zum anderen eine Mischung aus Diethylenglykol und Wasser (blau). Diese Vorläuferlösungen werden mittels eines kontinuierlichen Spritzenpumpensystems mit einer konstanten Flussrate gepumpt. Um einen konstanten Fluss ohne Schwankungen in der Flussgeschwindigkeit zu ermöglichen, sind die Spritzen mit Drucksensoren ausgestattet. Wenn eine Spritze fast leer gepumpt wurde, übernimmt die zweite vorher gefüllte Spritze, wobei der Gesamtdruck beider Spritzen konstant gehalten wird, um die Flussrate bei dem Wechsel der Spritzen konstant zu halten. Anschließend werden die Vorläuferlösungen in einen mittels eines Ölbadess vorgeheizten *Split and combine* Mischer (2) gepumpt. Die Mischstruktur ist aus F-geformten Mischern aufgebaut, die sehr gute Mischeigenschaften bei geringen Reynolds Zahlen besitzen.^[99] Um die Wachstumszeit zu verlängern, wird die Nanopartikel Lösung in einen Wachstumssofen geleitet.

In der folgenden Abbildung ist ein Foto des Flussreaktors zur Synthese von USPIONS, sowie die TEM-Bilder und Größenstatistik einer beispielhaften USPION Synthese gezeigt.

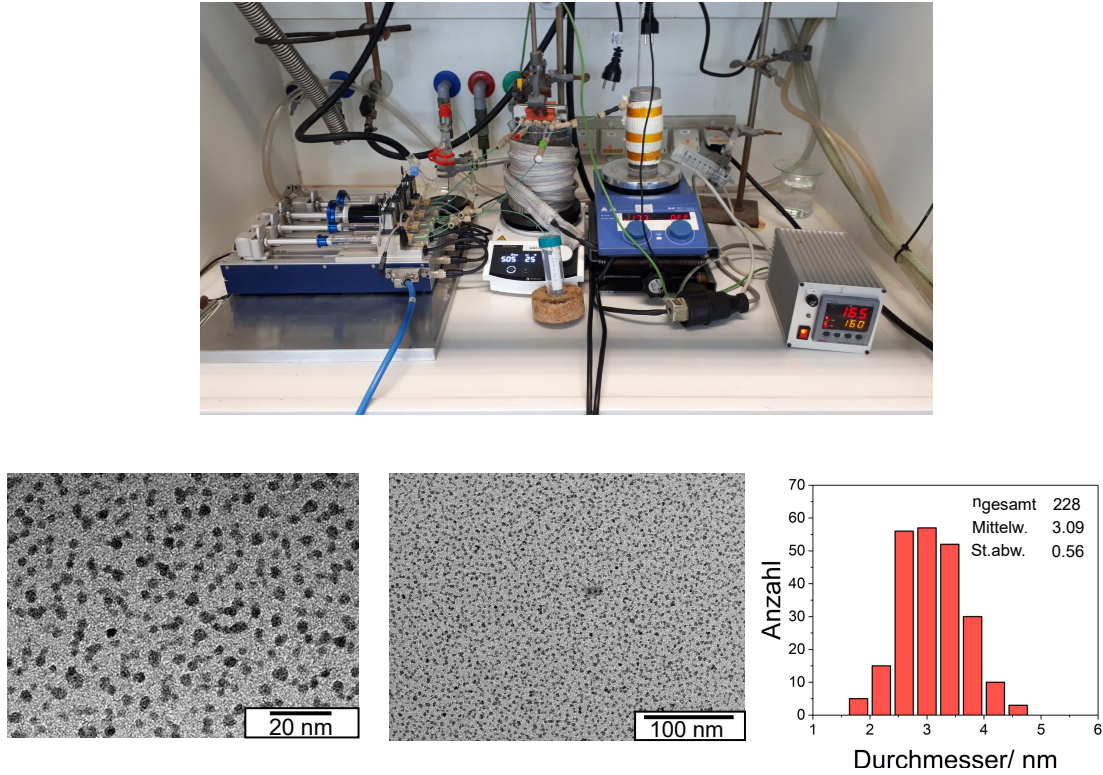


Abbildung 20: Foto des Aufbaus der Flusssynthese zur kontinuierlichen Flusssynthese von USPIOs mit TEM Beispielen und deren Größenstatistik.

Um zu überprüfen, ob ein laminarer Fluss vorliegt wird die REYNOLDS Zahl bestimmt.^[95] Die Reynoldszahl ist eine dimensionslose Kennzahl für Reaktoren, welche es ermöglicht das Verhalten der Lösungen in unterschiedlichen Reaktoren zu vergleichen. In Flussreaktoren liegt unter einer Reynolds Zahl von ≈ 2300 , der kritischen Reynoldszahl Re_{krit} , ein laminares Strömungsverhalten vor und oberhalb ein turbulentes. Die Reynoldszahl errechnet sich aus Gleichung 5.2.^[95]

$$Re = \frac{ud}{v} \quad (5.2)$$

Hierbei ist u die Strömungsgeschwindigkeit, d der Rohrrinnendurchmesser und v die kinematischen Viskosität der Flüssigkeit.

Mit einem Innendurchmesser von 0.75 mm, einer kinematischen Viskosität von 29 mm²/s bei 25 °C^[100] und einen angelegten Volumenstrom von 0.5 mL/min errechnet sich nach Gleichung 5.3 und 5.4 eine Reynoldszahl von ≈ 0.05 bei 25 °C.

$$Re = \frac{1.89 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}}{\text{s}} \cdot 0.00075 \text{ m}}{29 \cdot 10^{-6} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}} = 4.89 \quad (5.3)$$

Die Strömungsgeschwindigkeit u berechnet sich nach Gleichung 5.4

$$u = \frac{0.5 \cdot 10^{-6} \frac{\text{m}^3}{\text{min}} \cdot 4}{60 \cdot \pi (0.00075 \text{ m})^2} = 0.189 \frac{\text{m}}{\text{s}} \quad (5.4)$$

Da die kinematische Viskosität bei steigender Temperatur sinkt, würde die Reynoldszahl steigen. Da die Reynoldszahl aber so gering ist, ist davon auszugehen, dass auch bei 180 °C noch ein laminares Flussverhalten vorliegt. Im laminaren Fluss liegt ein parabolischer Verlauf der Flussgeschwindigkeit innerhalb des Rohres vor. Am Rohrrand ist die Flussgeschwindigkeit minimal und nimmt parabolisch zum Zentrum des Rohres zu. Das führt dazu, dass die Partikel am Rand des Rohres eine längere Verweilzeit im Flussreaktor besitzen als die Partikel in der Mitte des Rohres, was zu einer breiteren Größenverteilung führen kann.^[95]

Somit besitzt die Verweilzeitverteilung einen sehr großen Einfluss auf die gebildeten Nanopartikel. Da reale Reaktoren sich von den idealen Systemen stark unterscheiden, wurde eine Verweilzeitbestimmung durchgeführt. Die Verweilzeit wurde über eine Sprungfunktion mit Rhodamin 101 als Tracer durchgeführt. Hierbei wird ab einem bestimmten Zeitpunkt die Farbstofflösung durch den Reaktor gepumpt und über einen UV-Vis Detektor am Reaktorende wurde die Farbstoffkonzentration bestimmt. Bei einem idealen Strömungsverhalten würde das Rhodamin 101 nach $\tau_R = 1$ in der Ausgangskonzentration detektiert werden. Hierbei ist τ_R die reduzierte Verweilzeit, welche sich aus dem Quotienten der Zeit t geteilt durch die hydrodynamische Verweilzeit bestimmen lässt.^[95]

$$\tau_R = \frac{t}{\tau_H} \quad (5.5)$$

Die hydrodynamische Verweilzeit τ_H ist hierbei das Reaktorvolumen V_r geteilt durch den Volumenstrom V_s .

$$\tau_H = \frac{V_r}{V_s} \quad (5.6)$$

Die Verweilzeitverteilung eines Flussreaktors mit laminarem Fluss kann nach Gleichung 5.7 beschrieben werden.

$$F(\tau_R) = 1 - \frac{1}{4\tau_R^2} \quad (5.7)$$

Diese Gleichung gilt nur in einem Bereich von $\tau_R \geq 0.5$. In dem Bereich von $0 \leq \tau_R < 0.5$ ist die Verweilzeitverteilung 0.

In Abbildung 21 ist die normierte Absorbanz gegen die reduzierte Verweilzeit aufgetragen.

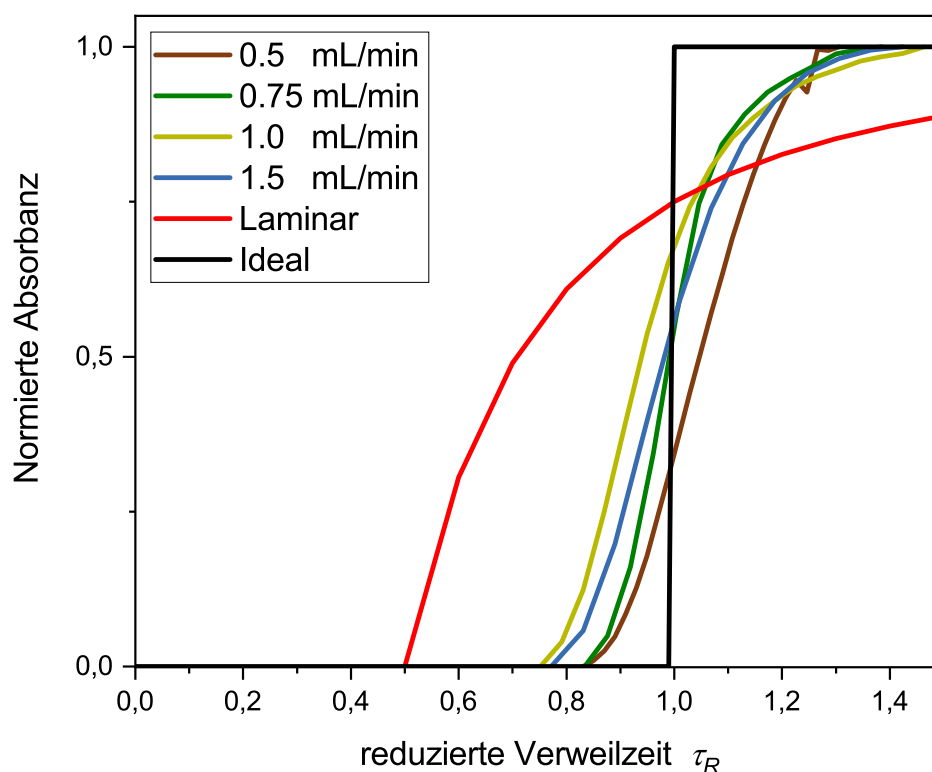


Abbildung 21: Auftragung der Absorption bei 584 nm (Absorptionsmaximum Rhodamin in DEG) gegenüber der reduzierten Verweilzeit zur Bestimmung der Verweilzeitverteilung.

Die gemessenen Verweilzeitverteilungen ähneln sich sehr und liegen zwischen τ_R 0.8-1.4. Alle Flussraten zeigen nur ein schwach laminares Verhalten. Bei einer Flussrate von 0.5 mL/min ist der Anstieg deutlich langsamer als bei 0.75 mL/min, aber ist noch weit vom idealen laminaren Strömungsverhalten entfernt. Es kann davon ausgegangen werden, dass in den *split and combine* Mischer turbulentes und in den Wachstumsofen laminares Flussverhalten vorliegt. Dies erklärt die enge Verweilzeitverteilung, die sich aber noch stark vom idealen Flussverhalten unterscheidet.

Durch Variation der Reaktionsbedingungen konnten mit der Flussynthese USPIONS mit einem Partikeldurchmesser von 2 bis 4 nm hergestellt werden. In den folgenden Abbildungen sind die Einflüsse der Reaktionsparameter auf den Partikeldurchmesser der hergestellten USPIONS und der Größenverteilung in der Flussynthese dargestellt. In Abbildung 22 ist der Einfluss der Gesamtflussrate bei einer Konzentration von 111 und 150 mmol/L Fe (A) und der Temperatur des Wachstumsofens (B) bei einer Flussrate von 0.5 mL/min auf den Partikeldurchmesser und die Größenverteilung dargestellt.

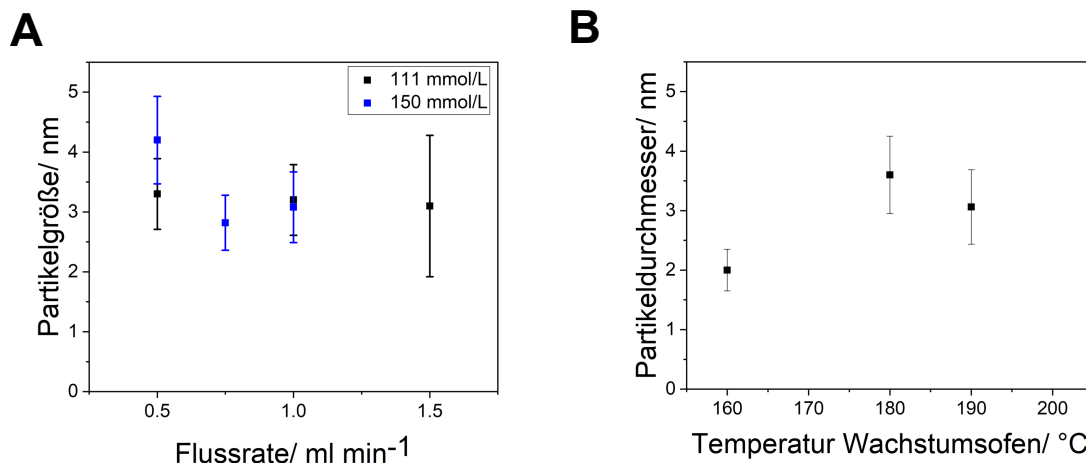


Abbildung 22: Einfluss der Flussrate bei einer Konzentration der Eduktlösung von 111 und 150 mmol/L (A) und der Temperatur des WachstumsOfens (B) auf die Partikelgröße.

Bei einer Konzentration von 111 mmol/L zeigt eine Änderung der Flussrate nur einen sehr geringen Einfluss auf die Partikelgröße. Die Größenverteilung nimmt aber mit steigender Flussrate zu. Das ist vermutlich auf den laminaren Fluss zurückzuführen. Die mittlere Verweildauer im WachstumsOfen bei einem Fluss von 1,5 ml/min beträgt nur noch drei Minuten und durch den parabolischen Verlauf der Strömungsgeschwindigkeit im laminaren Fluss, ist die Verweildauer der Lösung in der Mitte des Rohres so gering, dass die Wachstumsphase nicht abgeschlossen ist und die Größenverteilung ansteigt. In der Verweilzeitverteilung stieg die Rhodamin Konzentration schon nach 4 min 20 s an und die Sättigung war nach 8 min erreicht. Aufgrund dessen ist für einen Teil der SPIONs die Reaktionszeit zu gering, wodurch sich die Größenverteilung verbreitert. Bei niedrigeren Flussraten ist die Verweilzeit ausreichend, damit alle Partikel eine ausreichend lange Wachstumsphase erfahren. In der Verweilzeitbestimmung war das Rhodamin bei einem Fluss von 0,5 mL/min nach 16 min, bei einem Fluss von 0,75 ml/min nach 9 min 50 s und bei einem Fluss von 1 mL/min nach 6 min 20 s messbar. Durch diese verlängerte Zeit im Flussreaktor, war die Wachstumsphase ausreichend lang und die Größenverteilung ist enger. Bei einer Konzentration von 150 mmol/L ist der Partikeldurchmesser zuerst bei einer Gesamtflussrate von 0,5 mL/min größer, nimmt dann aber wieder schnell ab. Dies ist wahrscheinlich auch auf eine nicht ausreichend lange Wachstumsphase bei höheren Flussraten zurückzuführen. Bei einer Temperatur des WachstumsOfens von 160 °C ist der Partikeldurchmesser deutlich geringer als bei 180-190 °C.

In Abbildung 23 wird der Einfluss der Eisenkonzentration bei einer gleichbleibenden Flussrate von 0,5 ml/min auf die Partikeldurchmesser und Größenverteilung verglichen.

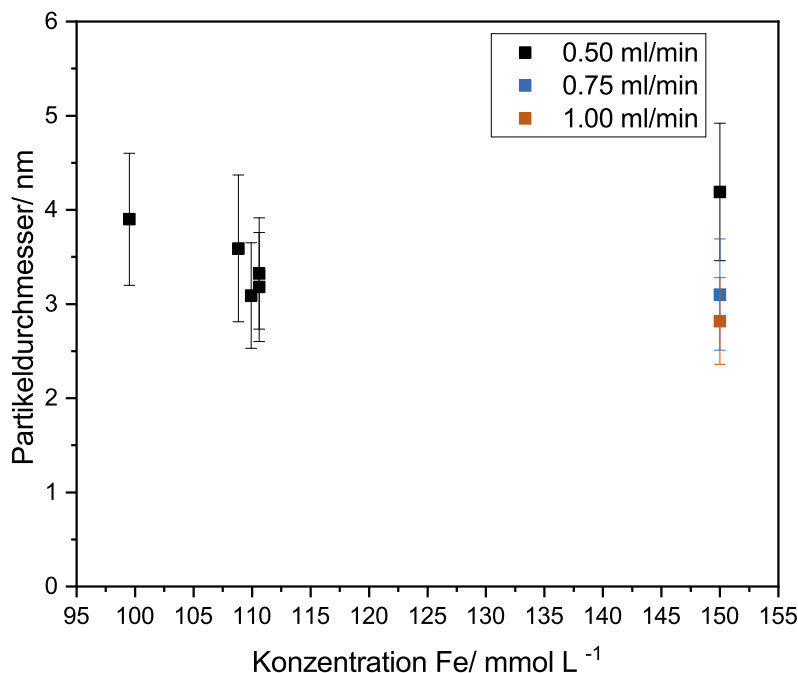


Abbildung 23: Einfluss der Eisenkonzentration in der Eduktlösung auf den Partikeldurchmesser bei einer Flussrate von 0.5 ml/min. Der Partikeldurchmesser der USPIONS bei einer Eisenkonzentration von 150 mmol L⁻¹ und Flussraten von 0.75 und 1.00 ml/min sind zusätzlich gezeigt, um den Trend in der Partikelgröße zu zeigen.

Mit einer Erhöhung der Konzentration ist ein schwach abnehmender Trend des Partikeldurchmessers der synthetisierten USPIONS zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass der Punkt bei einer Eisenkonzentration von 150 mmol L⁻¹ und einer Flussrate von 0.5 ml/min nur ein Ausreißer ist, da bei den Flussraten von 0.75 und 1.00 ml/min der Partikeldurchmesser geringer war und die Flussrate nur einen geringen Einfluss auf den Partikeldurchmesser hat, wie in Abbildung 22 gezeigt. Eine weitere Erhöhung der Eisenkonzentration auf 224 mmol/L führte zu mehrfachen Verstopfungen im Reaktor.

In Abbildung 24 (links) ist die Varianz der Partikelgrößenverteilung innerhalb einer Synthese dargestellt und der Synthesen unter gleichen Reaktionsbedingungen untereinander.

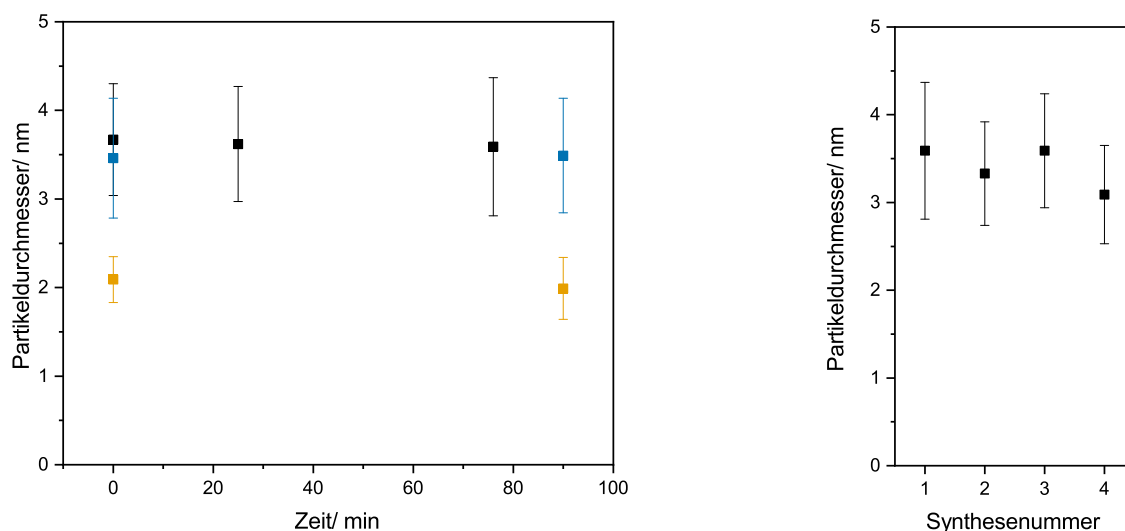


Abbildung 24: Verfolgung der Partikelgrößenänderung im Laufe einer Flusssynthese durch Probenzug bei drei unterschiedlichen Synthesen (links) und Partikelgröße von 4 Flusssynthesen unter gleichen Reaktionsparametern zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit (rechts).

Innerhalb einer Synthese zeigten die synthetisierten Nanopartikel praktisch die gleiche Größe und Größenverteilung. Unterschiedliche Flusssynthesen unter gleichen Bedingungen zeigten nur eine sehr geringe Varianz in ihrer Größe und Größenverteilung. Dies verdeutlicht die hohe Reproduzierbarkeit der Flusssynthese.

Unter den Standardbedingungen können mit Hilfe des Flussreaktors ≈ 0.8 g/h SPIONs bei einer Flussrate von 0.5 mL/min, einer Eisenkonzentration von 111 mmol/L, einer Temperatur des *split and combine* Mischers von 160 °C und einer Temperatur des Wachstumsofens von 180 °C hergestellt werden. In Abbildung 25 ist ein Phasentransfer nach einer Flusssynthese unter den Standardbedingungen, sowie TEM-Übersichtsbilder dargestellt.

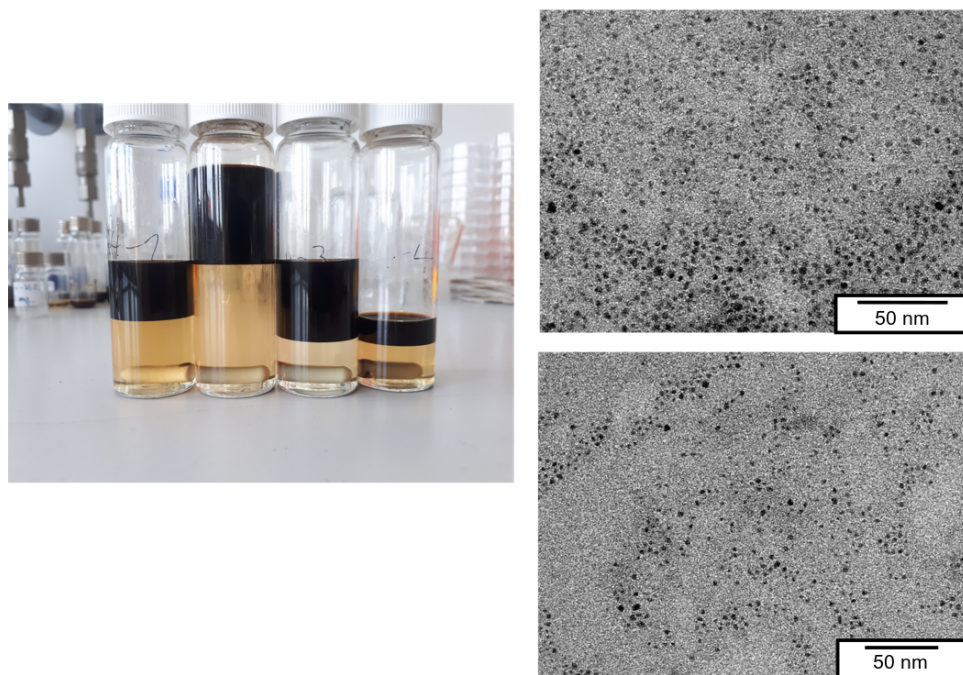


Abbildung 25: Foto des Phasentransfers von Diehtylenglykol (unten) in Toluol (oben) von Proben einer Flusssynthese unter Standardbedingungen des Vorlaufs, nach 20 min, 60 min und der Nachspülung, sowie TEM-Bilder der Probe nach 60 min.

Nach dem Phasentransfer ist die Reaktionslösung nur noch schwach gefärbt, wodurch von einem hohen Umsatz der Eisenvorläuferverbindung ausgegangen werden kann. Der höchste an diesem Flussreaktor erfolgreich getestete Durchsatz beträgt 2.3 g/h bei einer Flussrate von 1.5 mL/min und einer Eisenkonzentration von 110.6 mmol/L. Unter diesen Reaktionsbedingungen trat eine stärkere Färbung der DEG-Lösung nach dem Phasentransfer auf, wodurch von einem geringeren Umsatz ausgegangen werden kann. Weiterhin wiesen die unter diesen Bedingungen erhaltenen SPIONs eine sehr breite Größenverteilung auf. Um den Durchsatz weiter zu erhöhen, sollte die Zeit in dem Wachstumsfen verlängert werden.

5.2 Stabilisierung im wässrigen Medium

Der Einfluss von SPIONs auf die T_1 -Relaxationszeit wirkt vor allem durch Interaktionen der SPIONs mit Wasser in der Nähe der Partikeloberfläche, der sogenannten inneren Sphäre. Aufgrund dessen ist der T_1 -Kontrast der SPIONs stark von der Ligandenhülle der Partikel abhängig. Durch die Verwendung unterschiedlicher Liganden kann die Wassermobilität τ_m in der Nähe der Nanopartikeloberfläche und die Konzentration von Wassermolekülen in der inneren Sphäre des Nanopartikels gesteuert werden. Um die her-

gestellten Nanopartikel auf ihre Eignung als T_1 -Kontrastmittel zu untersuchen, wurden die hergestellten SPIONs über drei unterschiedliche Methoden und Liganden in Wasser stabilisiert. Über die erste Methode wurden die SPIONs mit TWEEN 80® (Polysorbat 80) mit einer im Arbeitskreis Weller entwickelte Methode zur mizellaren Stabilisierung hydrophober Nanopartikel in Wasser stabilisiert.^[101] Bei dieser Methode bleibt die organische Ligandenhülle um die Partikel bestehen, was die Wassermobilität in der Nähe der Partikeloberfläche einschränkt.

In einer zweiten Methode zur Stabilisierung der SPIONs in Wasser wurden sie direkt nach der Synthese mit PEG-Phosphat als Ligand in einer wässrigen Lösung stabilisiert. Dadurch sind die Partikel von einer durchgehenden wasserlöslichen Ligandenhülle umgeben. In der dritten Methode wurde ein Ligandenaustausch mit Polymaleinsäure-alt-dodecan nach dem Transfer in die organische Phase durchgeführt. Durch diese drei Methoden wurden USPIONs im Wasser stabilisiert und als T_1 -Kontrastmittel untersucht. Der Aufbau der Ligandenhülle ist aber bei allen drei Methoden unterschiedlich, was sich auf die Wassermobilität in der Nähe der Partikeloberfläche und somit den T_1 -Kontrast auswirkt. Für die Untersuchungen der Partikel im Relaxometer wurden für die Stabilisierung mit den PEG-Phosphat Liganden und die mizellar mit Polysorbat 80 stabilisierten SPION die gleichen Nanopartikel verwendet um den Einfluss der organischen Ligandenhülle auf das T_1 -Relaxationsverhalten zu untersuchen.

5.2.1 Mizellare Stabilisierung

Die Verkapselung der SPIONs mit Polysorbat 80 erfolgte nach einer in der Arbeitsgruppe WELLER entwickelten Methode zur mizellaren Einkapselung von hydrophoben Nanopartikeln.^[101] Hierfür werden die Partikel nach dem Phasentransfer mit Oleylphosphat mit Aceton gefällt, zentrifugiert und in THF aufgenommen. Anschließend wird ein Tensid, wie Polysorbat 80 oder ein Diblockcopolymer, wie zum Beispiel PI-*b*-PEG, in THF gelöst hinzugegeben. Anschließend werden die Partikel über ein mikrofluidisches System, bestehend aus NEMESYS Spritzenpumpen und einer Mischkammer mit einem Interdigitalmischer, mit Wasser gemischt. Durch die Verwendung des Interdigitalmischers und der gesteuerten Spritzenpumpen können die Scherkräfte und das Mischungsverhalten genau gesteuert werden, um die Partikel reproduzierbar einzeln zu verkapseln. Das Tensid stabilisiert die hydrophoben Nanopartikel hierbei mizellar. Durch diese Verkapselung steigt der hydrodynamische Durchmesser der Partikel an, da die ursprüngliche hydrophobe Ligandenhülle erhalten bleibt.

In der folgenden Abbildung ist die mittels DLS bestimmte Volumenverteilung der SPIONs in Toluol vor und in Wasser nach der mizellaren Verkapselung, sowie ein TEM-Übersichtsbild dargestellt.

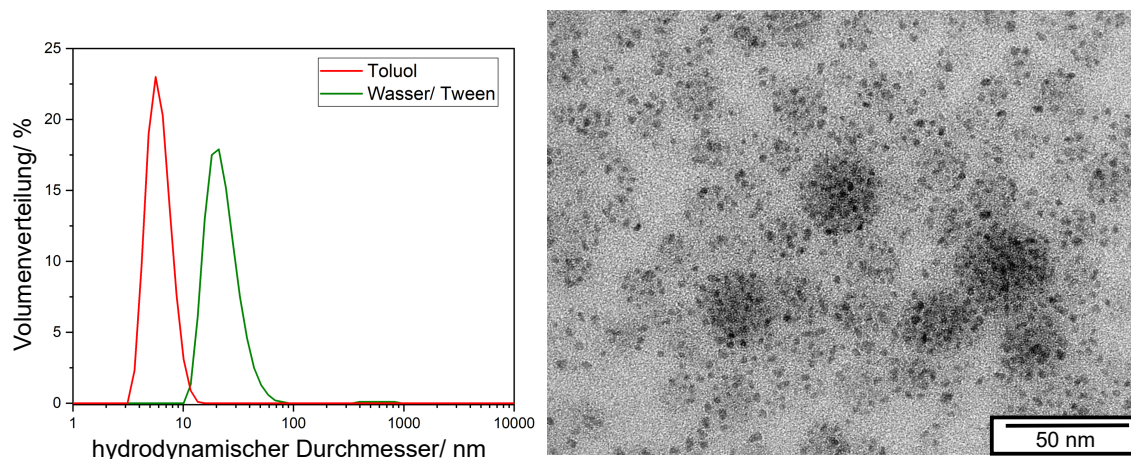


Abbildung 26: DLS Messungen vor und nach der mizellaren Stabilisierung von 3 nm SPIONs mit Polysorbat 80 und TEM Übersichtsbild nach der Stabilisierung.

Die in Abbildung 26 dargestellten DLS Messungen und das TEM Übersichtsbild sind von den selben 3 nm USPIOs, welche auch für die Stabilisierung mit dem PEG-Phosphat Liganden verwendet wurden. Die Größenzunahme durch die mizellare Verkapselung mit Polysorbat 80 ist deutlich zu erkennen. Bei der mizellaren Verkapselung kam es zu einer teilweisen Agglomeration der USPIOs. Dies ist durch die Verbreiterung der Volumenverteilung im DLS und die Bildung einiger weniger Aggregate im TEM-Übersichtsbild erkennbar.

5.2.2 Direkte Stabilisierung nach Synthese

Direkt nach der Synthese sind die Partikel in DEG stabilisiert. Für die Langzeitlagerung werden die USPIOs normalerweise mit Oleylphosphat in Toluol stabilisiert, da aufgrund des hohen pH-Wertes der Nanopartikellösung die direkte Stabilisierung herausfordernd ist. Viele wasserlösliche Liganden, wie zum Beispiel Zitronensäure, Weinsäure und Dopamin waren nicht in der Lage die Partikel in diesem hohen pH-Bereich einzeln zu stabilisieren. PEG ist aber relativ unempfindlich gegenüber Änderungen im pH-Wert und aufgrund dessen konnten die Partikel durch Zugabe einer wässrigen PEG-Phosphat Lösung direkt nach der Synthese in Wasser stabilisiert werden. Somit konnten Partikel mit einer Ligandenhülle modifiziert werden, die eine hohe Mobilität der Wassermoleküle bis zur Partikeloberfläche gewährleistet. In der folgenden Abbildung ist neben der Volumenverteilung

der mit PEG-Phosphat stabilisierten USPIOs noch ein Blindexperiment, in dem nur Wasser ohne PEG-Ligand zu der DEG Reaktionslösung gegeben wurde, dargestellt.

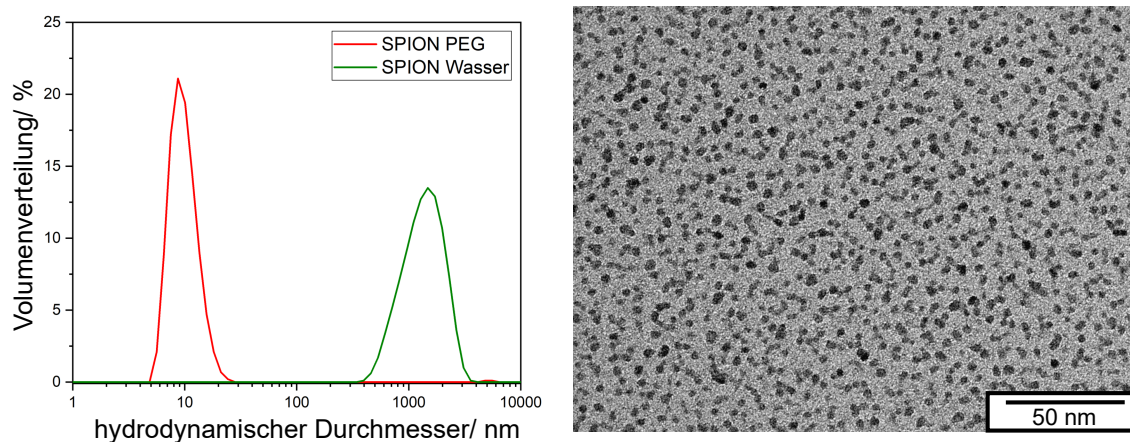


Abbildung 27: Mittels DLS bestimmte Volumenverteilung der mit PEG-Phosphat stabilisierten USPIOs und dem Blindexperiment durch Wasserzugabe, sowie TEM-Übersichtsbild der PEG-Phosphat stabilisierten USPIOs.

Die USPIOs konnten sehr gut einzeln mit dem PEG-Phosphat in Wasser stabilisiert werden. Die Volumenverteilung ist schmal und in dem TEM-Übersichtsbild ist keine Agglomeration zu erkennen. In dem Blindexperiment, in dem nur Wasser zu den Partikeln gegeben wurde, aggregierten die Partikel stark. Als weiterer Nachweis der Stabilisierung der USPIOs mittels des PEG-Phosphat Liganden wurden die Nanopartikel mittels KBr FTIR-Messungen untersucht.

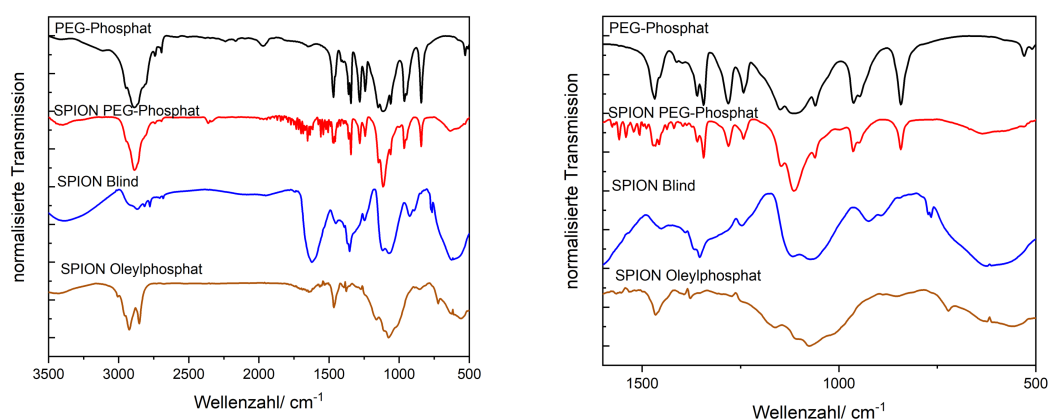


Abbildung 28: KBr FTIR Messungen des PEG-Phosphat Liganden, PEG-Phosphat stabilisierten USPIO, USPIO Blindprobe in Wasser und Oleylphosphat stabilisierte USPIOs.

Die KBr FTIR Messungen zeigen, dass die SPIONs erfolgreich mit dem PEG-Phosphat stabilisiert wurden. Die CH_2 Deformationsschwingung bei 842 cm^{-1} , C-O Deformationsschwingung bei 960 cm^{-1} und das Triplett der C-C und C-O Streckschwingungen bei $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ sind deutlich im FTIR Spektrum des PEG-Phosphats und der modifizierten Partikel zu finden.^[102]

5.2.3 Ligandenaustausch

Weitere Partikel wurden mit Polymaleinsäure-*alt*-dodecyl (PMADD) nach einer Methode nach PELLEGRINO *et al.* verkapselt.^[103] Hierfür wurden die Partikel aus Tetrahydrofuran mit dem Polymaleinsäure-*alt*-decan (4100 g/mol) eingetrocknet und anschließend in einem TBE-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von Ultraschall in Lösung gebracht. In Abbildung 29 ist eine DLS Messung und ein TEM-Übersichtsbild von SPIONs, welche mit Hilfe von Polymaleinsäure-*alt*-decan in Wasser stabilisiert wurden, gezeigt.

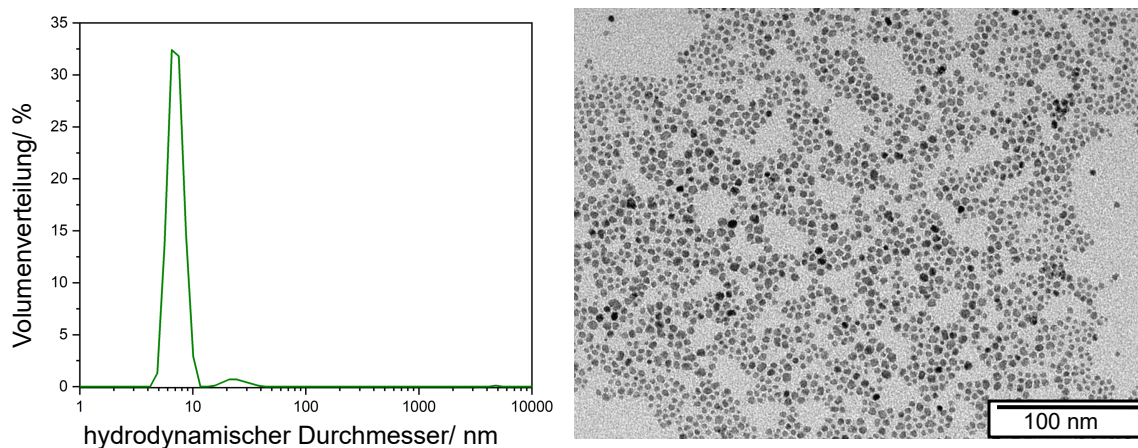


Abbildung 29: Mittels DLS bestimmte Volumenverteilung und TEM Übersichtsbild der 4 nm USPIONs, welche mittels Polymaleinsäure-*alt*-decan in Wasser stabilisiert wurden.

Über diese Methode konnten die SPIONs gut im Wasser einzeln stabilisiert werden. In der DLS-Messung ist die Bildung von Agglomeraten erkennbar, aber der Großteil der Probe konnte erfolgreich einzeln in Wasser mit dieser Methode stabilisiert werden.

Die USPIONs wurden auch mit PMaDD über einen Ansatz nach MULVANEY in Wasser stabilisiert.^[104] Hierbei wird das Anhydrid des PMaDD mit den Partikeln vermischt und durch Zugabe von Ethanolamin erfolgt eine Ringöffnung, wodurch die hydrophoben Partikel in Wasser Mizellen stabilisiert werden. In Abbildung 30 ist die Ringöffnung von Polymaleinsäureanhydrid-*alt*-dodecan mit und einer Blindprobe ohne die Zugabe von Ethanolamin dargestellt.

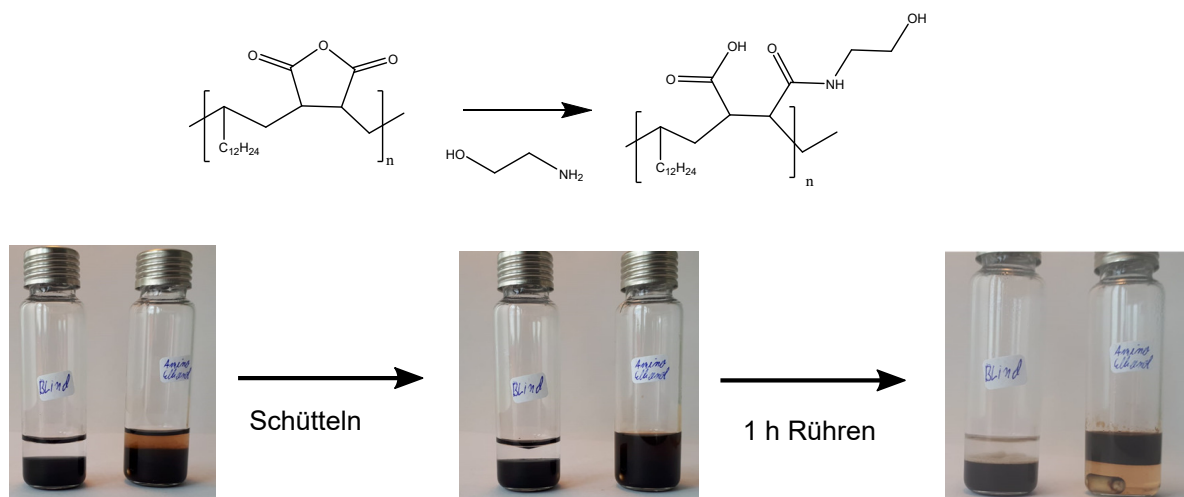


Abbildung 30: Stabilisierung hydrophober Nanopartikel nach MULVANEY an 6.9 nm SPIONs durch eine Ringöffnung des Maleinäureanhydrids durch Zugabe von Ethanolamin in einem Zweiphasensystem (rechts) und einer Blindprobe ohne Ethanolamin (links).^[104]

Bereits nach kurzem Schütteln gehen die SPIONs unter der Zugabe von Ethanolamin in die wässrige Phase über. Nach 1 h Rühren sind die Partikel nahezu vollständig in der wässrigen Phase stabilisiert. Ohne die Zugabe von Ethanolamin erfolgte kein Phasentransfer der Partikel.

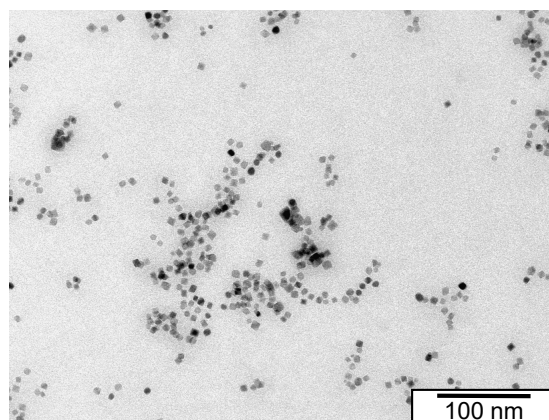
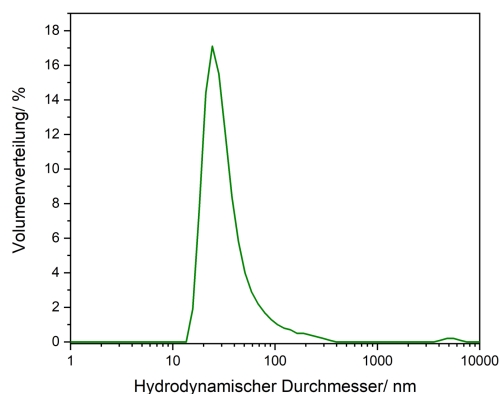


Abbildung 31: Mittels DLS bestimmte Volumenverteilung und TEM-Übersichtsbild der nach MULVANEY mittels Öffnung des Anhydrids durch Ethanolamin in Wasser stabilisierten SPIONs.^[105]

In den DLS-Messungen ist eine deutliche Verbreiterung der Volumenverteilung und somit die Bildung von Aggregaten erkennbar. Somit konnte mit der Methode nach MULVANEY die USPIONs nicht gut einzeln stabilisiert werden und ein nicht unsignifikanter Anteil agglomerierte.

Es wurde auch versucht mit dem Polymaleinsäure-*alt*-dodecan direkt nach der Synthese die Partikel zu stabilisieren, aber aufgrund des hohen pH-Wertes der Reaktionslösung agglomerierte ein großer Anteil der SPIONs. Mit der Methode nach PELLEGRINO *et al.*^[103] konnten die am besten einzeln stabilisierten USPIOs erhalten werden.

5.2.4 Relaxometrische Messungen

In der Abbildung 32 sind die r_1 und r_2 Werte ausgewählter USPIO Proben mit unterschiedlichen Liganden und Magnevist® als Referenz für die gadoliniumbasierten T₁-Kontrastmitteln dargestellt. Gute SPION basierte T₁-Kontrastmittel zeigen eine möglichst hohe r_1 Relaxivität bei einer geringen r_2 Relaxivität.

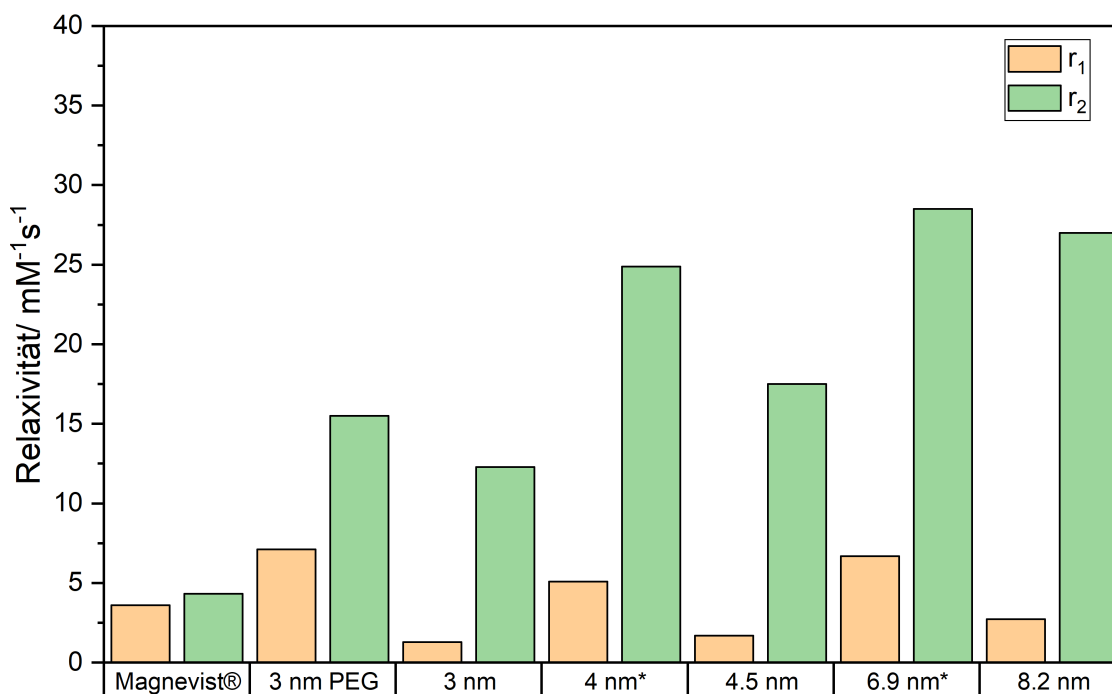


Abbildung 32: Relaxivitäten von SPIONs unterschiedlicher Größe verkapselt mit Polysorbat 80, stabilisiert direkt nach der Synthese mit PEG-Phosphat (3 nm PEG) und SPIONs stabilisiert mit Polymaleinsäure-*alt*-decan (*).

In Abbildung 32 sind die 3 nm PEG und 3 nm Partikel aus der gleichen Partikelsynthese dargestellt, um die mit PEG-Phosphat funktionalisierten Partikel direkt mit den mizellar mit Polysorbat 80 verkapselten Partikeln vergleichen zu können. Die PEG-Phosphat stabilisierten Partikel zeigen hierbei sehr hohe Werte für r_1 und ein sehr gutes r_2/r_1 Verhältnis. Die mizellar stabilisierten Partikel zeigen etwas geringere Werte für r_2 , aber dafür nimmt

die r_1 Relaxivität stark ab. Durch die organische Ligandenhülle der mizellar stabilisierten USPIONS ist die Wassermobilität in der Nähe der Partikeloberfläche stark eingeschränkt und die r_1 Relaxivität sinkt stark. Die PEG-Phosphat stabilisierten Partikel besitzen eine durchgängige Ligandenhülle aus PEG, wodurch eine hohe Protonenmobilität in der gesamten Ligandenhülle gewährleistet wird.

Zwischen den mit Polysorbat 80 und Polymaleinsäure-*alt*-decan stabilisierten Partikeln lassen sich noch weitere Unterschiede erkennen. Die mit PMAD stabilisierten Partikel besitzen deutlich höhere r_1 und r_2 Relaxivitäten. Dies lässt sich durch den unterschiedlichen Aufbau der äußeren Sphäre erklären. Die Carbonsäuregruppen im Polymaleinsäure-*alt*-decan sind hier möglicherweise in der Lage Protonen schnell auszutauschen und dadurch zur Relaxation beizutragen. Das PEG im Polysorbat 80 ist zwar hydrophil, kann aber nicht im gleichen Maße Protonen austauschen.

Die mit Polysorbat 80 stabilisierten Nanopartikel besitzen bei gleicher Partikelgröße eine geringere r_2 Relaxivität. Monte Carlo Simulationen zeigen, dass eine hydrophobe Schicht um die Nanopartikel die Wassermobilität in Nähe der Partikeloberfläche verringert. Das führt dazu, dass die Wasserkonzentration nahe der Nanopartikeloberfläche, an der das induzierte Magnetfeld am höchsten ist, abnimmt, wodurch r_2 sinkt.^[106] Dies erklärt die geringere r_2 Relaxivität der mit Polysorbat 80 stabilisierten Partikel gegenüber den mit PEG-Phosphat. Die Polysorbat 80 mizellar stabilisierten SPIONS zeigen auch eine geringere r_2 -Relaxivität gegenüber den Polymaleinsäure-*alt*-decan Partikeln, was sich auch zum Teil durch die bessere Protonenmobilität der Carbonsäuren im Polymaleinsäure-*alt*-decan erklären lässt. Weitere Unterschiede in der r_2 Relaxivität sind auf eventuelle Aggregation der Partikel zurückzuführen. Schon ein geringer Anteil an Aggregaten im Kontrastmittel erhöht die r_2 -Relaxation.

Im Folgenden werden die hergestellten T_1 -Kontrastmittel mit der aktuellen Literatur verglichen, um ihre Eignung beurteilen zu können. In Tabelle 4 wurden die mit PEG-Phosphat modifizierten und mit Polysorbat 80 und PMAD mizellar stabilisierten Partikel mit den besten T_1 -Kontrastmitteln auf USPION Basis aus einem Review von 2021 mit dem Thema *Iron Oxide Nanoparticles as T_1 Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: Fundamentals, Challenges, Applications, and Prospectives* verglichen.^[26] Hierbei wurden die hergestellten USPIONS nur mit anderen Messungen bei 1.5 T verglichen, da die Relaxivitäten von der angelegten Feldstärke abhängen.

Tabelle 4: Literaturvergleich von USPIONs als T₁ Kontrastmittel bei 1.5 T.^[26]

Partikel- durchmes /nm	Ligand	Liganden MW/ g mol ⁻¹	Hydrody- namischer Durchmes- ser/ nm	r ₁ / mM ⁻¹ s ⁻¹	r ₂ / mM ⁻¹ s ⁻¹	r ₂ /r ₁
3	PEG-Phosphat	2000	15	7.1	15.5	2.18
3	Polysorbat 80	1310	34	1.3	12.3	9.53
4	PMaDD	4100	28	5.1	24.9	4.88
3.5	PEG-Phosphat	750	20	11	28.1	2.55 ^[107]
3.5	PEG-Phosphat	2000	22	6.8	17.9	2.63 ^[107]
3.6	PEG-Carbonsäure	600	10	19.7	39.4	2.00 ^[107]
4.8	Zitronensäure	192	18	14.6	66.9	4.61 ^[26]
4	Tanninsäure	1701	32	2.25	5.27	2.34 ^[108]

Die aus der Flusssynthese direkt mit PEG-Phosphat stabilisierten Partikel zeigen ein ausgezeichnetes r_2/r_1 Verhältnis von 2.18 und einen geringen hydrodynamischen Durchmesser von 15 nm. Im Vergleich zu den von LAURENT *et al.* synthetisierten PEG-Phosphat 3.5 nm USPIONs ist r_1 leicht und r_2 erhöht, sowie der hydrodynamische Radius verringert. Dies ist zum Teil der geringeren Partikelgröße zu verdanken. Den größeren Beitrag hat hierbei aber mit hoher Wahrscheinlichkeit die geringere Anzahl an Aggregaten in der Probe, was in dem deutlich geringeren hydrodynamischen Durchmesser zu erkennen ist. Dieser Effekt zeigt sich an den PEG-Carbonsäure Partikeln, wo der hydrodynamische Durchmesser deutlich geringer ist und die Relaxivitäten erhöht sind.

Die besten publizierten T₁ Kontrastmittel auf SPION Basis besitzen ein r_2/r_1 Verhältnis von ≈ 2 . Viele der USPIONs Synthesen liefern nur geringe Mengen an USPIONs, durch die Synthese oder sind nach der Synthese zuerst im organischen Lösungsmittel stabilisiert und müssen anschließend noch modifiziert werden. Weiterhin besteht bei diesen Synthesen die Möglichkeit, dass Pyrolyseprodukte an der Nanopartikeloberfläche gebunden sind, welche vor der klinischen Anwendung am Menschen aufwändig entfernt werden müssen. Die in dieser Arbeit entwickelte Flusssynthese ermöglicht die Synthese von USPIONs im g/h Maßstab, welche anschließend direkt nach der Herstellung mit wässrigen Liganden stabilisiert werden können. Weiterhin lässt sich diese Synthese leicht durch zum Beispiel Parallelisierung im Rohrreaktor hoch skalieren, um USPIONs im industriellen Maßstab zu produzieren. Die über die Flusssynthese erhalten USPIONs mit PEG-Phosphat als Liganden zeigen eine sehr gute Eignung als T₁-Kontrastmittel und einen sehr geringen Agglomerationsgrad. Somit bietet die in dieser Arbeit entwickelte Flusssynthese ein hohes

Potential biokompatible USPIOs mit hoher Reproduzierbarkeit und in großen Mengen zu synthetisieren.

5.3 Kontrollierte Agglomeration für MPT-Tracer

Die Signal Detektion und Bildqualität im MPT hängt zum großen Teil von den Eigenschaften der verwendeten SPION Tracer ab.^[7] Auf der Suche nach geeigneten MPT-Tracern wurden zuerst die kommerziellen SPION MRT Kontrastmittel untersucht. Aus den untersuchten SPION Kontrastmitteln zeigte nur Resovist® ein gutes MPT-Signal. Resovist® besteht aus einer breiten Verteilung von ≈ 5.5 nm SPIONs die kleinen Aggregate mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 62 nm bilden.^[69] Diese Ergebnisse waren überraschend, da GLEICH und WEIZENECKER zeigten, dass nach der LANGEVIN Theorie nur die 30 nm Partikel signifikant zum MPT Signal beitragen. Da Nanopartikel dieser Größe nur 3 % der Eisenmasse in Resovist® ausmachen, konnte sich die guten Tracer Eigenschaften von Resovist® nicht erklärt werden.^[109] Spätere Studien zeigten, dass sich die kleinen Aggregate aus ≈ 5.5 nm, welche 30 % der Eisenmasse ausmachen, wie Einzeldomänen Partikel deutlich größerer SPIONs verhalten.^[88] Somit können auch Aggregate kleinerer SPION Partikel sehr gute Signale im MPT liefern. Die genaue Kontrolle der Größe, Größenverteilung, Partikeldurchmesser der einzelnen SPION Kernpartikel, Form der Aggregate und Partikel-Partikel Abstand ist sehr herausfordernd. Selbst kleine Änderungen in einem dieser Parameter beeinflussen die Dipol-Dipol oder Austauschwechselwirkung in den Partikelaggregaten signifikant und somit auch das Signal im MPT.^[110?]

Da Resovist® lange Zeit der beste kommerziell erhältliche MPT-Tracer war, wird es häufig als Referenz zum Vergleich neuer Tracer genutzt. Da Resovist® sehr polydispers ist, kann sich das Signal um den Faktor 3, je nach Charge, unterscheiden, was zu Fehlinterpretation auf der Suche nach guten MPT-Tracern führen kann.^[7] Mittlerweile sind auch MPT-Tracer, wie zum Beispiel Perimag®, kommerziell erhältlich, welche ein besseres Signal und eine geringere Varianz in der Signalstärke in unterschiedlichen Chargen zeigen.

In dieser Arbeit werden zwei Methoden zur kontrollierten Agglomeration von SPIONs gezeigt, mit der sich Partikelagglomerate und blumenartige Partikelcluster in einem Größenbereich von 40 bis 410 nm mit einer für Agglomerate dieser Größe sehr guten Größenverteilung herstellen lassen. Diese Cluster wurden dann anschließend mit Polysorbat 80 in Wasser mizellar stabilisiert und auf ihre Eignung als MPT-Tracer geprüft.

5.3.1 Herstellung blumenartiger Partikelagglomerate durch die ausschließliche Verwendung des Eisen(II)Precursors

Wird nur Eisen(II)chlorid als Eisenvorläuferverbindung in der modifizierten Polyolsynthese nach GOLOVERDA et al.^[87] verwendet, unterscheidet sich das Wachstumsverhalten zu dem Eisen(III)/Eisen(II) Gemisch deutlich. Es bilden sich dichtgepackte blumenartige Partikelaggregate aus, welche bei hohen Temperaturen von 230 °C sintern. Solche blumenartigen Partikelaggregate sind als MPT-Tracer interessant, da spinaufgelöste Kleinwinkel Neutronenstreuungen (SANS) Experimente zeigen, dass in solchen blumenartigen SPION Aggregaten die magnetischen Momente zwischen benachbarten Partikeln bevorzugt parallel vorliegen.^[111]

Die folgenden beiden Probenzüge wurden schon im Rahmen der Masterarbeit durchgeführt, werden hier aber noch einmal diskutiert, um den Prozess der Aggregation bei der Verwendung von ausschließlich Eisen(II)chlorid als Eisenvorläuferverbindung darzustellen.^[90] In Abbildung 33 und Tabelle 5 ist ein Probenzug einer Reaktion bei 180 °C über 195 min mit ausschließlich Eisen(II)chlorid als Eisenquelle gezeigt.

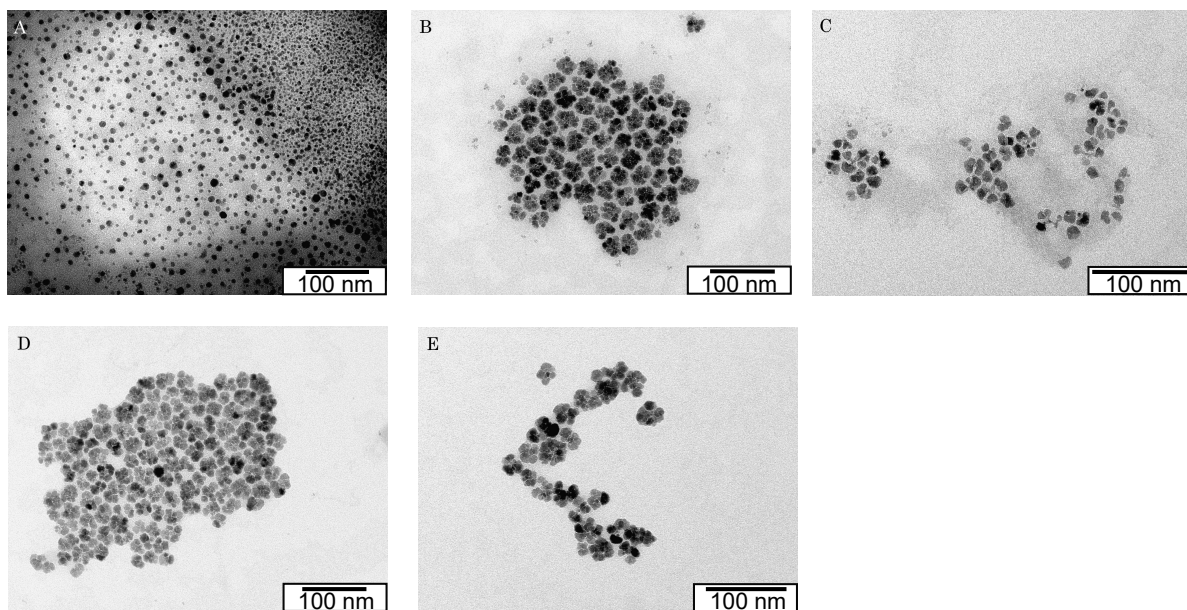


Abbildung 33: TEM-Bilder des Probenzugs bei 180 °C mit nur Eisen(II)chlorid als Eisenquelle nach 15 (A), 45 (B), 105 (C), 165 (D) und 195 min (E).

Tabelle 5: Mittelwerte der Größenverteilung und die Standardabweichung vom Mittelwert der Synthese bei 180 °C mit ausschließlich Eisen(II)chlorid als Eisenquelle .

Reaktionszeit /min	Mittelwert /nm	Standardabweichung $\sigma/\%$
15	7.2	20
45	27	16
105	9.9	23
165	26	19
195	27	24

Hier bilden sich nach 15 min deutlich größere Partikel aus. Während bei dem Eisen(III)/Eisen(II)-Syntheseansatz die Wachstumsphase schon beendet ist und sich die Partikel nicht weiter verändern, bilden sich sogenannte blumenartigen Partikelaggregate aus. Bei einer Reaktionstemperatur von 180 °C verändern sich diese Partikel kaum. Bei einer höheren Reaktionstemperatur beginnen diese blumenartigen Partikelaggregate mit längeren Reaktionszeiten zu sintern. In Abbildung 34 und Tabelle 6 ist dieser Prozess dargestellt.

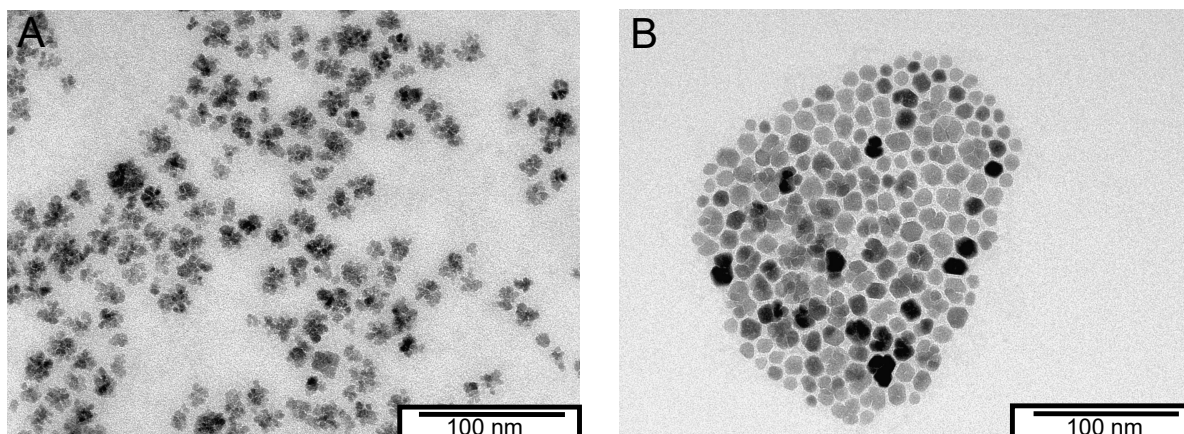


Abbildung 34: TEM-Bilder der Synthese mit reinem Eisen(II)chlorid als Eisenquelle für 1 h (A) und 3 h (B) bei 230 °C.

Tabelle 6: Mittelwerte der Größenverteilung und die Standardabweichung vom Mittelwert der Synthese bei 230 °C unter der ausschließlichen Verwendung von Eisen(II).

Reaktionszeit /h	Mittelwert /nm	Standardabweichung $\sigma/\%$
1	15.9	22
3	12.4	19

Bei einer Reaktionstemperatur von 230 °C bilden sich auch zuerst blumenartige Partikelaggregate aus, welche anschließend zu unförmigen großen Partikeln sintern.

Durch Erhöhung der Wassermenge lassen sich diese blumenförmigen Aggregate weiter destabilisieren, um deutlich größere Aggregate zu erhalten.

Durch die Verwendung von ausschließlich der Eisen(II) Vorläuferverbindung treten auch Änderungen in der Kristallstruktur der gebildeten Partikel auf. In Abbildung 35 ist das XRD von Partikeln aus einer Synthese in der ausschließlich Eisen(II) als Eisenquelle verwendet wurde, dargestellt.

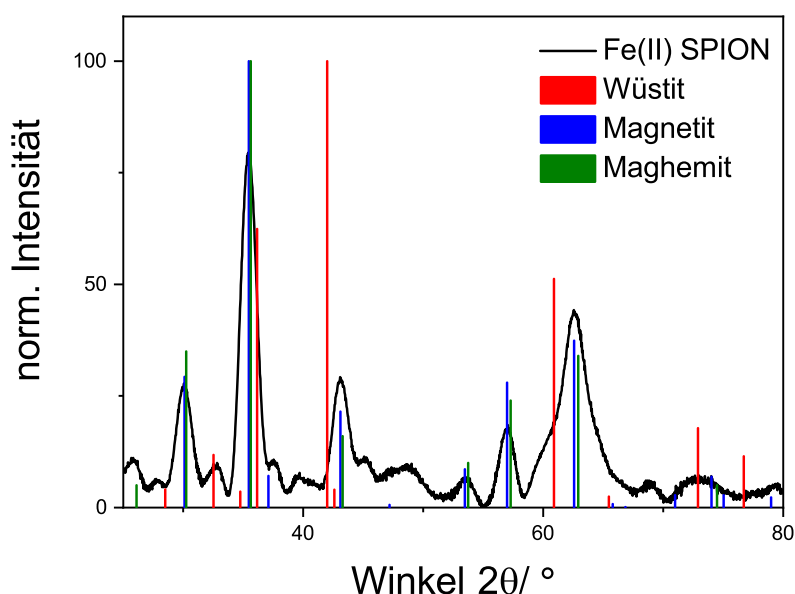


Abbildung 35: XRD blumenartigen SPION-Clustern mit Referenz für Wüstit (rot 01-086-2316)^[112], Magnetit (blau 00-019-0629)^[91] und Maghemit (grün 00-039-1346)^[92].

Das XRD zeigt, dass die Partikel zum Großteil aus Magnetit/Maghemit bestehen mit einem kleinen Anteil an Wüstit. Durch die Linienverbreiterung lässt sich keine Aussage über das Verhältnis von Magnetit zu Maghemit treffen, da die Reflexe zu ähnlich sind. Da noch Reste von Wüstit im XRD zu sehen sind, ist davon auszugehen, dass die Partikel als Wüstit gebildet werden und dann unter Kontakt mit dem Sauerstoff aus der Raumluft zu Magnetit und auch Maghemit oxidieren. Die hier untersuchten Partikel besitzen noch einen Wüstit Kern und eine Magnetit/Maghemit Hülle, da die Partikel noch nicht vollständig oxidiert wurden. Bei einer längeren Lagerung unter Raumluft kann davon ausgegangen werden, dass die Partikel vollständig zu Magnetit/Maghemit oxidiert werden.

Der Wüstit Gehalt in diesen blumenartigen SPION-Clustern Aggregaten, ist bedenklich

da für *in vivo* Anwendungen versucht wird, den Eisen(II) Gehalt der SPIONs möglichst gering zu halten, um oxidativen Stress auf die Zellen zu vermeiden.^[113]

5.3.2 Kontrollierte Agglomeration durch Wasserzugabe

Die Wassermenge, welche während der Synthese hinzugegeben wird, hat einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität der erzeugten SPIONs. Eine erhöhte Wasserzugabe während der Synthese oder eine Zugabe von Wasser nach der Nukleation führt dazu, dass ein Teil der deprotonierten DEG-Liganden protoniert werden. Dadurch wird die Stabilität der Nanopartikel reduziert und die Partikel agglomerieren. Durch diesen Effekt können die Partikel in der Synthese gezielt agglomeriert werden. In Abbildung 36 ist der Einfluss der Wassermenge auf den Agglomerationsgrad dargestellt. Hierbei ist die Intensitätsverteilung aus DLS-Messungen der Partikelaggregate nach dem Phasentransfer mit Oleylphosphat dargestellt.

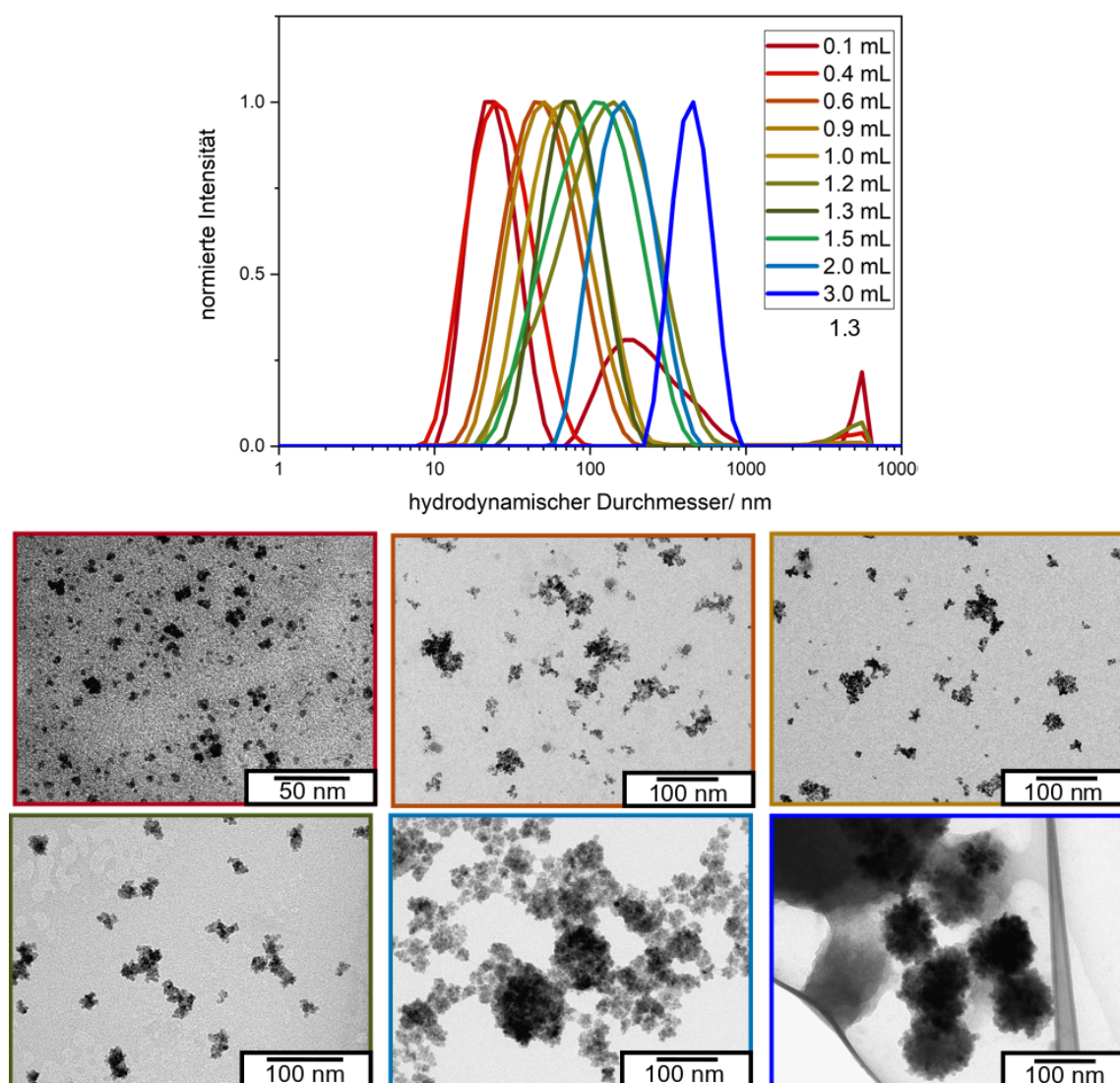


Abbildung 36: Normierte Intensitätsverteilung von Synthesen mit unterschiedlicher Zugabe von Wasser zur kontrollierten Agglomeration und TEM-Bilder.

Die Agglomeration der Partikel ließ sich durch Zugabe von 0.1 bis 3 mL Wasser während der Synthese steuern. Durch diese Zugabe konnten Partikelagglomerate mit einem hydrodynamischen Radius von 40 nm bis 410 nm erhalten werden.

5.4 Eignung als MPT-Tracer

Ein Teil der Arbeiten wurde in Zusammenarbeit mit Hanh Thu Pham im Rahmen ihrer unveröffentlichten Bachelorarbeit durchgeführt. Ausgewählte Partikelclusterproben wurden mit einer in der Arbeitsgruppe Weller etablierten Methode zur mizellaren Stabilisierung von Nanopartikeln mit Polysorbat 80 in die wässrige Phase überführt.^[101] Mittels eines vibrierenden Proben Magnetometers (VSM) und eines magnetischen Partikel Spek-

trometers (MPS) wurden die Partikelagglomerate auf ihre Eignung als Tracer für das MPT untersucht. Hierbei wurde als Vergleich zwischen Partikelagglomeraten aus kleinen Nanopartikeln und größeren einzelnen Nanopartikeln, eine von Michael Kampferbeck zur Verfügung gestellte Probe mit einem Partikeldurchmesser von 13 nm aus einer Pyrolysesynthese untersucht. Die synthetisierten Nanopartikelagglomerate wurden mit den MPT-Tracern Resovist[®] und Perimag[®] verglichen, um sie im Vergleich zu kommerziell erhältlichen MPT-Tracern zu betrachten. In der Abbildung 37 sind die VSM Ergebnisse der ausgewählten Cluster (links) und deren Ableitung (rechts) dargestellt. Die Größenangabe aller Proben ist hierbei der mittels DLS bestimmte Z-Average der Cluster im wässrigen Medium.

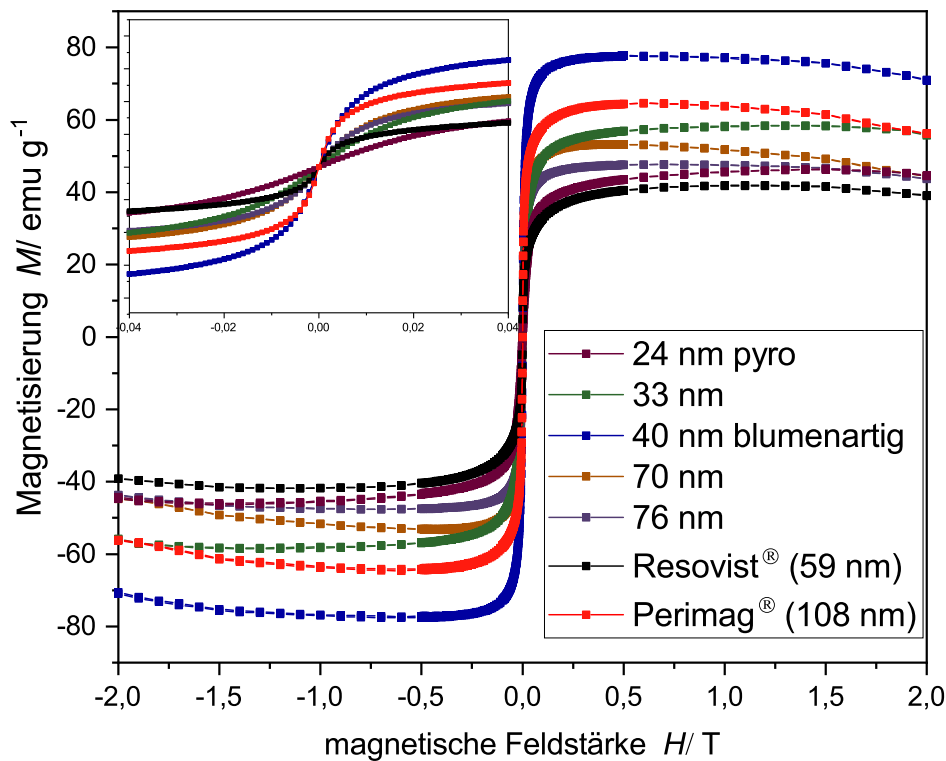


Abbildung 37: Magnetisierungskurven der für die MPS verwendeten Proben bestimmt durch Probenvibrationsmagnetometer Messungen von -2 bis 2 T mit einem Zoom in von -40 bis 40 mT.

Die untersuchten Partikelcluster besitzen eine Sättigungsmagnetisierung zwischen 40 und 72 emu g^{-1} . Diese Werte berücksichtigen nur den anorganischen Anteil der Nanopartikel, unter der Annahme, dass die Partikel aus Magnetit bestehen. Von den untersuchten Proben besitzt Resovist[®] die geringste Sättigungsmagnetisierung und die 40 nm blumen-

artigen Cluster die höchste. Zwischen der Größe der Agglomerate und der Sättigungsmagnetisierung liegt kein direkter Zusammenhang vor, da die Sättigungsmagnetisierung von der Größe und Kristallinität der Kernpartikel und nicht von der Größe der Agglomerate abhängt. Die hier vermessenen 13 nm SPIONs aus der Pyrolysesynthese (24 nm pyro) zeigen trotz des deutlich höheren Partikeldurchmessers eine geringe Sättigungsmagnetisierung. In der Pyrolysesynthese von SPIONs bilden sich zuerst Wüstit Partikel, welche anschließend oxidieren.^[15] Aufgrund dessen kann noch ein Wüstit Kern in den Partikeln vorhanden sein, der die Sättigungsmagnetisierung verringert.

Für Messungen im MPT ist eine hohe Sättigungsmagnetisierung der Partikel zwar wichtig, aber für die Eignung als MPT-Tracer ist die Nichtlinearität der Magnetisierung bei geringen Feldstärken von größerem Einfluss.

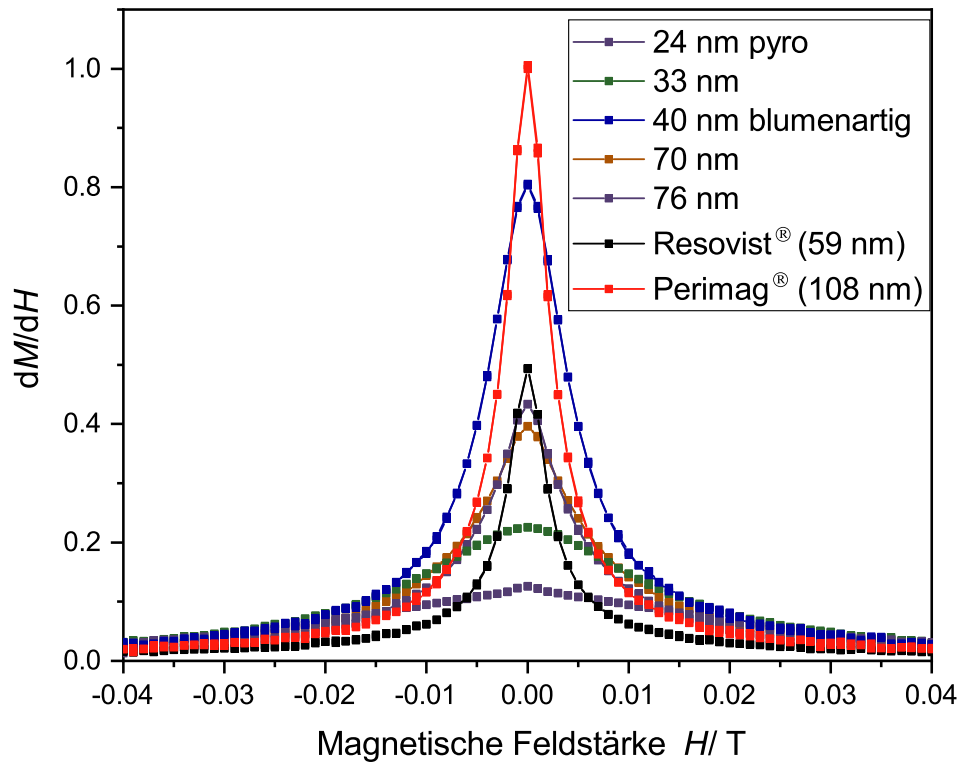


Abbildung 38: Ableitung der Magnetisierungskurven der für die MPS verwendeten Proben in einem Bereich von -40 bis 40 mT.

In MPT-Messungen wird oft nur mit einem schwachen oszillierenden magnetischen Feld von nur 0.1-20 mT gemessen.^[78] In diesem Bereich ist ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Nanopartikeln und den Nanopartikelagglomeraten erkennbar. Die 13 nm großen einzeln vorliegenden SPIONs aus der Pyrolysesynthese (24 nm pyro) zeigen hier

nur eine sehr geringe Änderung. Die Steigung ändert sich nur wenig und auch bei geringen Feldstärken nahe 0 nimmt die Steigung nur schwach zu. Bei den untersuchten Nanopartikelagglomeraten nimmt die Steigung mit zunehmendem hydrodynamischem Durchmesser stark zu. Dieser Effekt ist vor allem bei geringen Feldstärken sehr ausgeprägt. Nahe einer Feldstärke von 0 nimmt die Änderung der Magnetisierung in den Partikelagglomeraten stark zu. Dort durchläuft die Änderung der Magnetisierung ein Maximum und nimmt hohe Werte an. Die deutlich erhöhte Steigung der Agglomerate gegenüber den größeren Partikeln aus der Pyrolyse liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Partikeln in den Clustern. Durch die räumliche Nähe der SPIONs zueinander sind sie in der Lage miteinander konstruktiv oder destruktiv wechselzuwirken. Diese Wechselwirkungen führen anscheinend zu einer deutlichen Zunahme der Änderung der Magnetisierung bei geringen Feldstärken. Dieser Effekt wurde auch schon in Untersuchungen von blumenartigen Nanopartikelagglomeraten als T_2 -Kontrastmittel beobachtet. Hierbei stieg mit der Clustergröße auch r_2 stark an.^[77,111]

Besonders fällt auf, dass die 76 nm großen Cluster eine etwas geringere Sättigungsmagnetisierung als die Vergleichbaren 70 nm großen Cluster besitzen, die Änderung der Magnetisierung nahe einer Feldstärke von 0 aber etwas höher ist. Perimag[®] zeigt im Vergleich zu den anderen Proben die höchste Steigung bei sehr geringen Feldstärken. Die Halbwertsbreite ist aber mit 6.2 mT geringer als die der blumenartigen Agglomerate, die nur eine etwas geringere maximale Steigung bei einer Halbwertsbreite von 11 mT besitzen. Die 70 und 76 nm großen Cluster zeigen eine ähnliche maximale Steigung wie Resovist[®], bei einer deutlich erhöhten Halbwertsbreite. Aufgrund der höheren Halbwertsbreiten der hergestellten SPION Agglomerate gegenüber den kommerziellen Tracern, bei vergleichbaren Stärken der Steigung, zeigen die Agglomerate ein hohes Potential für MPT-Messungen, welche bei höheren Feldstärken, wie zum Beispiel 20 mT durchgeführt werden.

Die Partikel wurden alle mit einer Konzentration von 15 mmol/L Eisen in einem MPS vermessen, um die Eignung als Tracer im MPT zu prüfen. Die Ergebnisse sind normiert auf Resovist[®] (A) und Perimag[®] (B) in Abbildung 39 dargestellt, da aktuelle Messgeräte nicht geeicht sind und immer gegen eine Referenz gemessen wird. Resovist[®] ist als Referenz nur schlecht geeignet, da es je nach Charge stark unterschiedliche Performance im MPT zeigt. Perimag[®] Chargen zeigen eine eher untereinander vergleichbare Performance in der MPT.

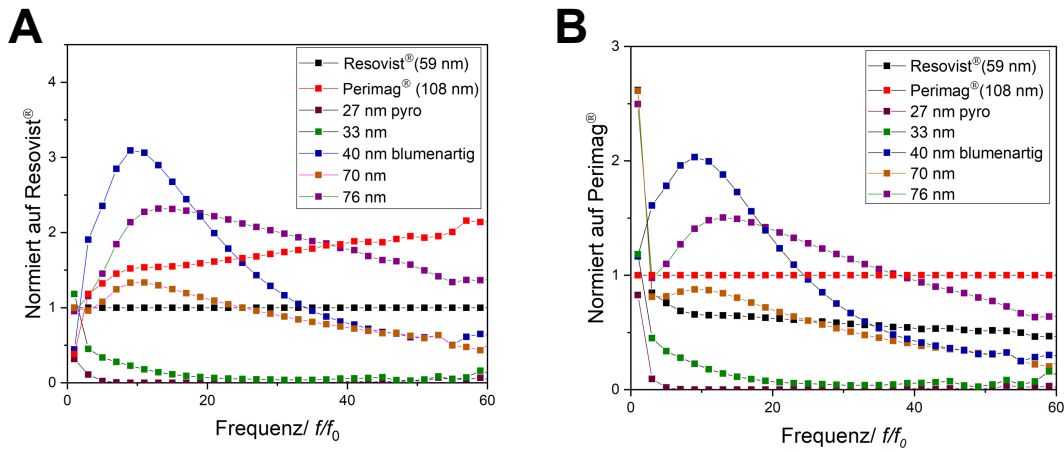


Abbildung 39: Vergleich unterschiedlicher SPION-Cluster im MPS mit Resovist® (A) und Perimag® (B). In den MPS Ergebnissen wurden nur die ungeradzahigen harmonischen Schwingungen dargestellt.

Das Signal der einzelnen SPIONs und der kleinen Cluster mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 33 nm sinkt sehr schnell und ist deutlich geringer als von Resovist®. Dies kann unter anderem daran liegen, dass die 13 nm großen SPIONs ein langsames Relaxationsverhalten zeigen, als die aus 5-8 nm bestehenden Cluster und somit dem angelegten hochfrequenten Magnetfeld nicht ausreichend schnell folgen können. Mit steigender Cluster Größe steigt das Signal deutlich an. Die Cluster mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 70 und 76 nm und die 40 nm blumenartigen Cluster zeigen über einen weiten Frequenzbereich bessere Signale als Resovist®. Die blumenartigen Cluster zeigen bis zu einer Frequenz von f/f_0 von 25 und die 76 nm Cluster bis zu einer Frequenz von f/f_0 von 37 ein höheres Signal als Perimag®. Da das Signal mit steigender Frequenz schnell abnimmt, sind vor allem die niedrigen harmonischen Schwingungen wichtig, da ihr Beitrag zum Gesamtsignal am höchsten ist.

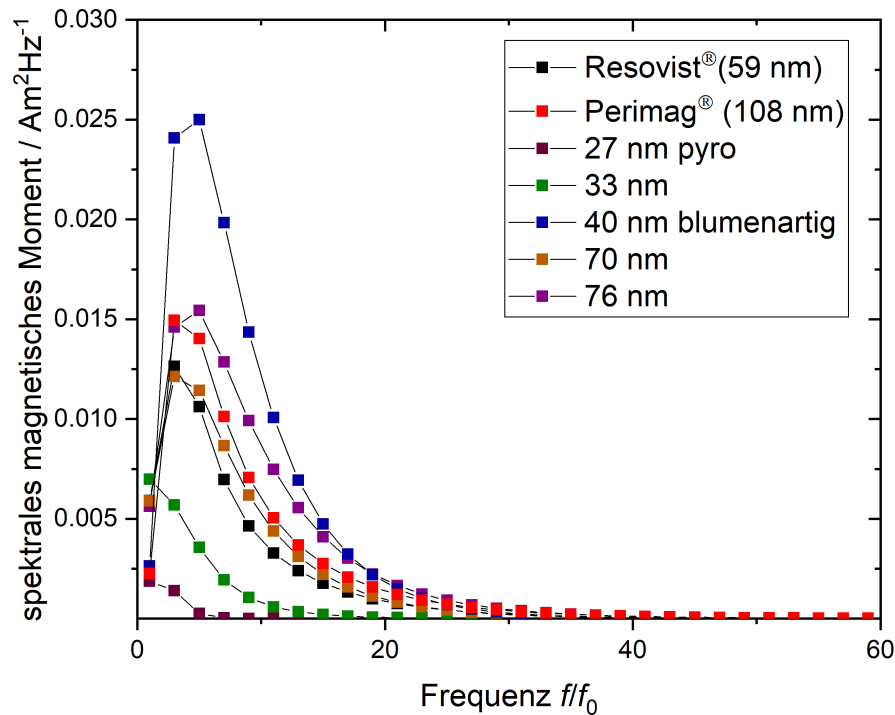


Abbildung 40: Unnormierte MPS Messungen an ausgesuchten SPION Proben. Da die Messung nicht geeicht wurde, sind die absoluten Werte nur untereinander vergleichbar.

Nach ungefähr 30 harmonischen Schwingungen ist die Signalstärke nur noch sehr gering und trägt zum Gesamtsignal wenig bei. Die MPS-Ergebnisse zeigen also hiermit, dass die 40 nm blumenartigen und die 76 nm großen Cluster sehr geeignet als MPT-Tracer sind und sogar ein höheres Signal als Perimag® zeigen. Besonders interessant ist hierbei der sehr große Unterschied zwischen den untersuchten Clustern mit einem Z-Average von 33 nm und den blumenartigen Clustern. Die blumenartigen Cluster zeigen ein deutlich höheres Signal bei einem ähnlichen hydrodynamischen Durchmesser.

In Abbildung 41 sind die TEM Bilder der drei besten Cluster Proben und ihre DLS Messungen im Vergleich zu Resovist® und Perimag® gezeigt.

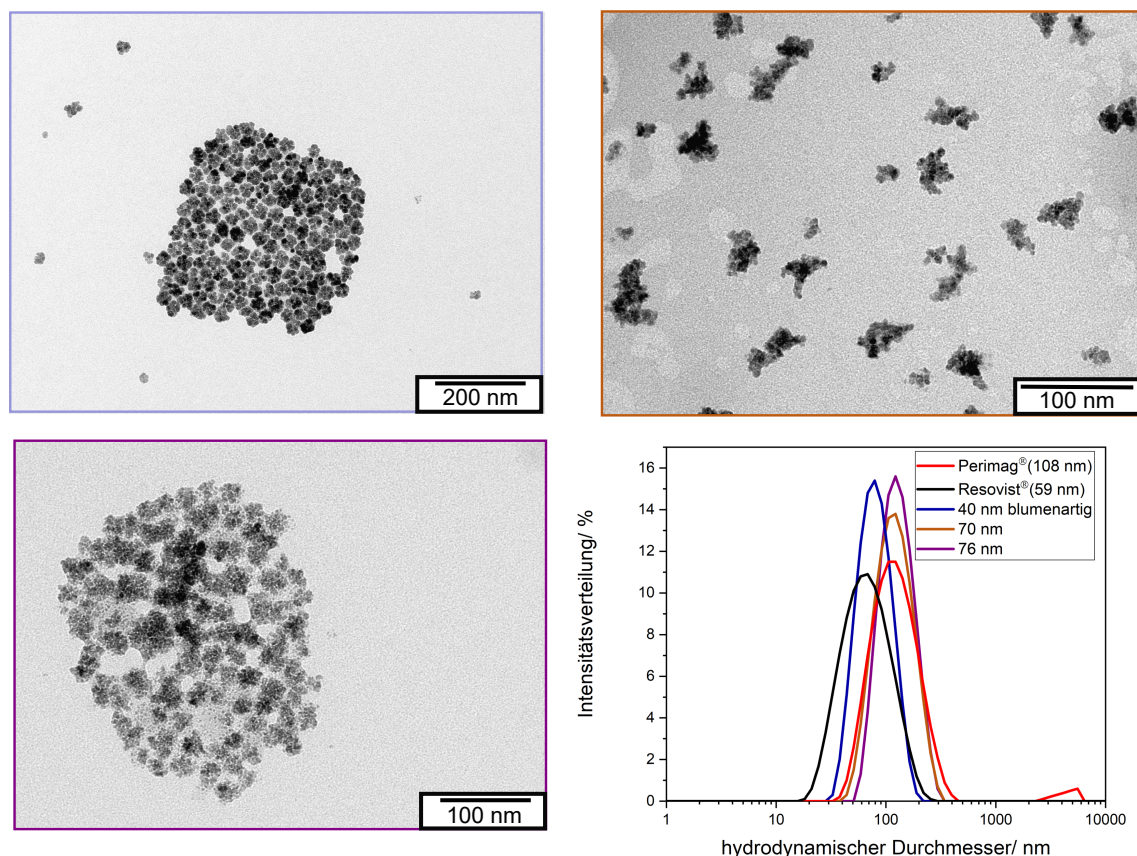


Abbildung 41: TEM Bilder der drei besten SPION-Cluster Proben und durch DLS bestimmte Intensitätsverteilung mit Resovist® und Perimag® als Vergleich.

Die DLS-Messungen zeigen, dass in der verwendeten Resovist® Probe noch viele kleine Cluster vorhanden sind, welche nur schwach zum Signal im MPI beitragen. Die in dieser Arbeit hergestellten SPION Agglomerate zeigen eine deutlich schmalere Intensitätsverteilung als die kommerziellen Tracer.

Die blumenartigen Partikelagglomerate zeigen ein besseres Signal im MPS als die kommerziellen Tracer, bei einem deutlich geringeren hydrodynamischen Durchmesser von 40 nm. Der kleine hydrodynamische Radius könnte den Partikeln ermöglichen die Aufnahme in Makrophagen zu verringern und die Bluthalbwertszeit zu erhöhen. Die hohe Performance der blumenartigen Agglomerate bei geringem hydrodynamischem Durchmesser zeigt das hohe Potential der blumenartigen SPION-Cluster für die Anwendung im MPI. Die 70 und 76 nm Cluster sind in einem sehr ähnlichen Größenbereich wie der kommerzielle Tracer Perimag®, zeigen aber eine schmalere Intensitätsverteilung. Dies verdeutlicht, dass mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden zur kontrollierten Agglomeration SPION Agglomerate mit einer sehr guten Größenkontrolle in dem biologisch interessanten Größenbereich hergestellt werden können.

Da der Partikeldurchmesser der einzelnen Partikel in den Agglomeraten einen großen Einfluss auf die magnetischen Eigenschaften hat, wurde mittels XRD der Partikeldurchmesser bestimmt. In der folgenden Tabelle sind die durch XRD nach der SCHERRER-Gleichung bestimmten Partikeldurchmesser gezeigt.

$$d = \frac{K \cdot \lambda}{\Delta(2\theta) \cdot \cos\Theta_0} \quad (5.8)$$

In Gleichung 5.8 ist d der Partikeldurchmesser, λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung, $\Delta(2\theta)$ die Halbwertsbreite des Reflexes, Θ_0 der Braggwinkel und K der Formfaktor. Für den Formfaktor wurde ein Wert von 1 angenommen.

Tabelle 7: Durch XRD bestimmte Partikeldurchmesser der verwendeten SPION-Cluster.

Z-Average/ nm	Partikeldurchmesser D / nm
33 nm	6.9
40 nm blumenartig	8.3
70 nm	7.8
76 nm	8.2

Es fällt auf, dass die kleinen Cluster, welche nur ein sehr geringes Signal im MPS gezeigt haben, einen geringeren Partikeldurchmesser besitzen als die größeren Cluster, welche deutlich bessere Eigenschaften zeigen. Die 76 nm und 40 nm blumenartigen Cluster besitzen hierbei die größten Kernpartikel mit 8.2 und 8.3 nm. Dies kann neben der besseren Größenkontrolle ein zusätzlicher Effekt sein, der die höhere Performance gegenüber Resovist® mit einer Partikelgröße ≈ 5 nm erklärt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit hergestellten SPION-Cluster eine sehr gute Größenkontrolle besitzen und deutlich bessere Ergebnisse im MPS als Resovist® und sogar auch teilweise als Perimag® zeigen. Die blumenartigen Partikel zeigen in den MPS-Messungen sehr gute Ergebnisse, bei einem im Vergleich geringen hydrodynamischen Durchmesser. Dies zeigt das hohe Potential dieser Nanopartikelagglomerate in der Anwendung als Tracer im MPT.

5.5 Darstellung magnetofluoreszenter Partikelaggregate

In diesem Abschnitt wird die Arbeit an dem Projekt zur Entwicklung **magnetofluoreszenter NanoKonstrukte** für den Einsatz **in** Hochdurchsatz und Point of Care Diagnostik (Mankind) dargestellt. Dieses Projekt wurde in Kooperation mit dem Fraunhofer-Zentrum für angewandte Nanotechnologie (CAN) durchgeführt. Die in diesem Projekt hergestellten magnetofluoreszenten Nanokonstrukte bieten das Potential sehr geringe Konzentrationen an Antigenen durch die starke Fluoreszenz der QD-Cluster zu bestimmen, ohne vorher eine zeitaufwändige PCR durchzuführen, um die virale Antigen Anzahl zu erhöhen. Das schematische Prinzip der Detektion von Antigenen mittels der magnetischen und fluoreszenten Cluster ist in Abbildung 42 dargestellt.

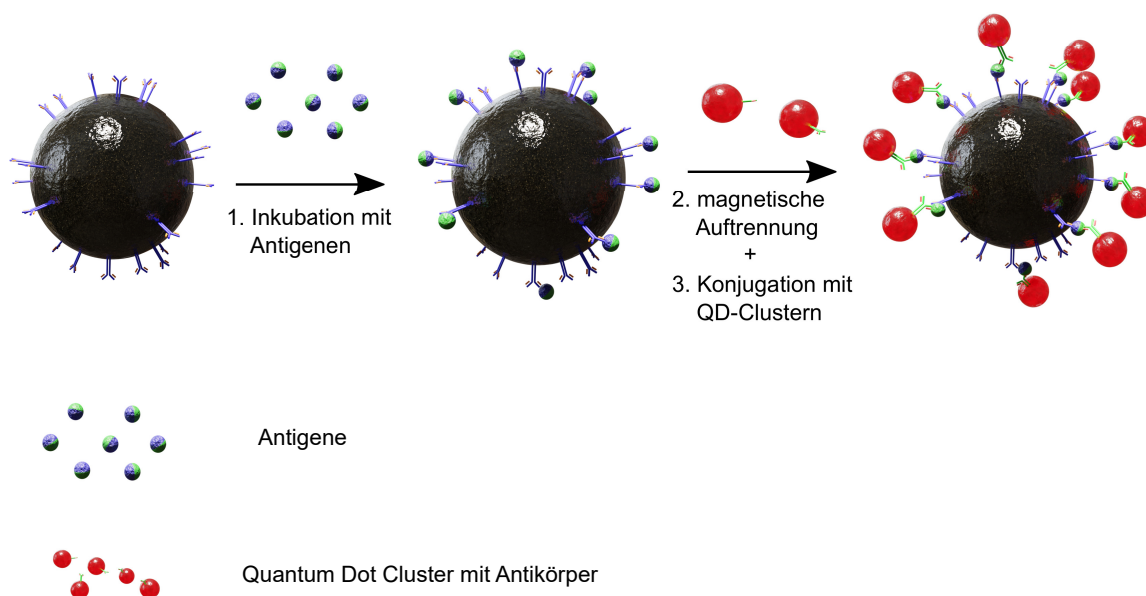


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Detektion von Antigenen durch Kopplung von magnetischen mit fluoreszenten Clustern.

Virale Antigene können durch mit Antikörpern modifizierte SPION-Cluster aus der Lösung magnetisch abgetrennt werden. Anschließend werden mit Antikörpern modifizierte QD-Cluster hinzugegeben, welche an die SPION-Cluster durch das Antigen verbrückt, koppeln. So werden magnetofluoreszente Nanokonstrukte erhalten, die sich magnetisch auftrennen und anschließend über die Fluoreszenz detektieren lassen. Sind keine viralen Antigene vorhanden, koppeln die QD-Cluster nicht an die SPION-Cluster und nach der magnetischen Aufreinigung wird keine Fluoreszenz detektiert. Die Fluoreszenz der Quantum Dots ist herkömmlichen Farbstoffen deutlich überlegen. Durch die Clusterung der

einzelnen Quantum Dots wird die Fluoreszenz weiter verstärkt, wodurch die Detektion von einzelnen magnetofluoreszenten Konstrukten möglich ist. Durch die Modifizierbarkeit der hergestellten SPION- und QD-Cluster bietet dieses Verfahren das Potential für die Detektion einer Vielzahl an Antigenen.

Ziele dieses Projekts waren die Herstellung geeigneter magnetischer und fluoreszenter Cluster auf der Basis von SPIONs und CdSe Quantum Dots, sowie erste Modellversuche mit etablierten Konjugationstechniken, um das Potential der magnetofluoreszenten Konstrukte zu zeigen. Die QD und die für die Funktionalisierung verwendeten PI-*b*-PEG-X Blockcopolymere wurden für dieses Projekt vom Fraunhofer Zentrum für angewandte Nanotechnologie (CAN) zur Verfügung gestellt.

5.5.1 Herstellung magnetischer Partikelaggregate durch evaporationsinduzierte Selbstassemblierungsverfahren (EISA)

Es sollen aus den SPIONs magnetische Aggregate mit einer Größe von 200-700 nm hergestellt werden. Diese Aggregate sollen ein hohes magnetisches Moment für die magnetische Separation und superparamagnetische Eigenschaften besitzen, um die kolloidale Stabilität zu bewahren. Diese Eigenschaften können über die Größe der Kernpartikel und die Größe der Aggregate gesteuert werden. Durch eine Polymerverkapselung mit einer quer vernetzten Polystyrolhülle und einer Stabilisierung mit funktionalisierten PI-*b*-PEG, kann ein Entweichen von Eisenionen sowie unspezifische Proteinadsorption unterdrückt werden und die Funktionalität für die Kopplungschemie ermöglicht werden.

Die Herstellung der Eisenoxidnanocluster erfolgte über die evaporations-induzierte Selbstassemblierung. Bei dieser Methode wird eine Emulsion aus Nanopartikeln in einem leicht flüchtigen organischen Lösungsmittel in einer wässrigen Tensidlösung hergestellt. Nach der Erzeugung der Emulsion wird anschließend das organische Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt. Beim Verdampfen assemblieren die Nanopartikel und werden durch das Tensid in der wässrigen Lösung stabilisiert.^[114] Im Gegensatz zu den anderen Methoden zur Herstellung von Nanopartikelaggregaten ist bei der EISA die Form durch die organischen Tropfen vorgegeben. Dadurch können Cluster mit einer ausgeprägten Kugelform erhalten werden. Die Größe und Größenverteilung der Nanopartikelcluster hängt hierbei von einer Reihe von Faktoren ab, die entweder die resultierende Emulsion und deren Tröpfchenverteilung beeinflussen oder Einfluss auf die Nanopartikel in den organischen Tröpfchen nehmen. Die Kontrolle der Scherkräfte während der Bildung der Emulsion und des Verdampfens des organischen Lösungsmittels spielt hierbei eine große Rolle. Neben den Scherkräften kann durch die Wahl des Tensids, der Konzentration des Tensids sowie

des Verhältnisses von der organischen Phase und der wässrigen Phase die Erzeugung der Emulsion und deren darauffolgende Stabilität kontrolliert werden. Durch die Konzentration der Nanopartikel in dem organischen Lösungsmittel kann direkt auf die Größe der Nanopartikelcluster Einfluss genommen werden.^[115]

In der folgenden Abbildung ist das evaporationsinduzierte Selbstassemblierungsverfahren (EISA) zur Herstellung der verwendeten Nanopartikelaggregate schematisch dargestellt.

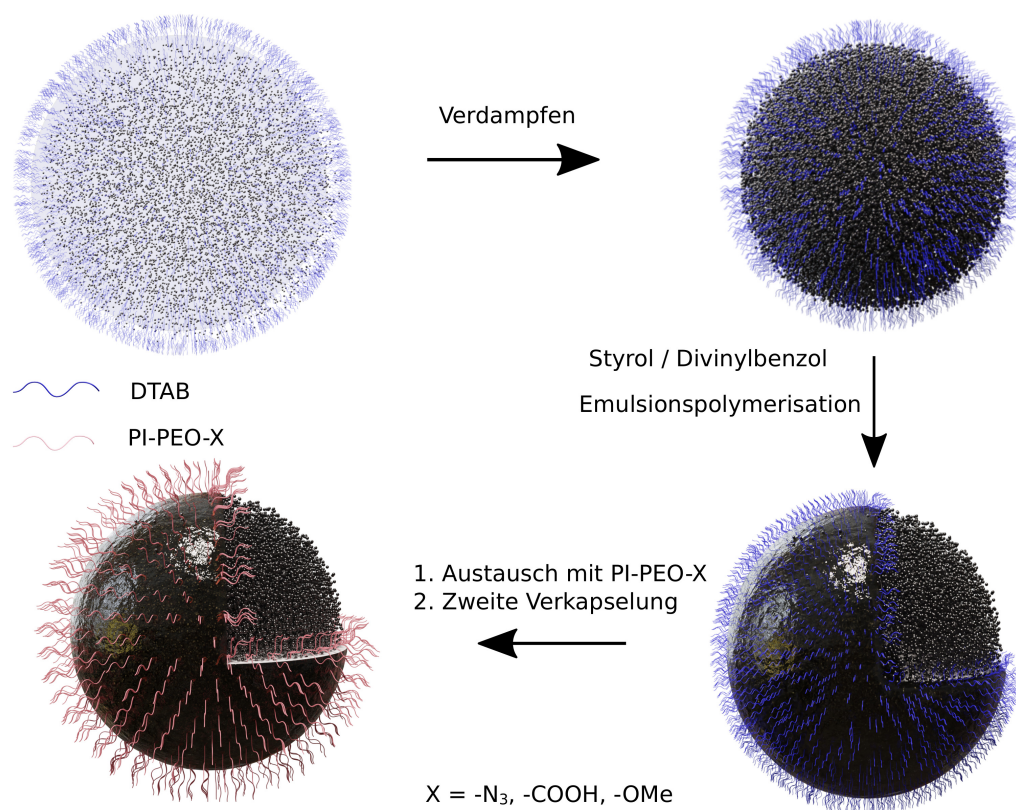


Abbildung 43: Schematische Darstellung des EISA Verfahrens mit anschließender Verkapselung und Einbringung funktioneller Gruppen durch PI-PEO-X.

Die Partikel liegen in Chloroform vor und mit Hilfe einer wässrigen Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTAB) Lösung wird über einen Vortexer eine Emulsion hergestellt. Durch anschließendes Rühren bei Raumtemperatur oder leicht erhöhter Temperatur wird das Chloroform verdampft und das DTAB stabilisiert die Nanopartikelaggregate. Durch die Tropfenform des organischen Lösungsmittels besitzen die gebildeten Cluster eine definierte Kugelform. Um die Stabilität der Cluster zu erhöhen, werden sie in einer Polystyrolhülle, welche mit Hilfe von Divinylbenzol quer vernetzt wurde, verkapselt. Anschließend werden die Partikel magnetisch aufgereinigt und das DTAB mit PI-*b*-PEO-X im Überschuss ausgetauscht. Es wurde immer eine Abmischung von 95 % unfunktionalisierten PI-*b*-PEO-OMe mit 5 % des funktionalisierten Polymers verwendet, um die Anzahl an

funktionalen Gruppen auf dem Clustern zu kontrollieren. Durch eine zweite Verkapselung mit Styrol/Divinylbenzol wird das PI-*b*-PEO-X an der Oberfläche befestigt.

In den unveröffentlichten Masterarbeiten im Arbeitskreis Weller von Lea Klauke und Alexander Busler wurden die Reaktionsbedingungen im EISA-Verfahren zur Herstellung von SPION-Clustern ausgiebig untersucht. Aus diesen Arbeiten ergab sich, dass bei einer SPION Konzentration von 20 mg/mL und ein Verhältnis von organischer Phase zu wässriger Phase von 1:1 Cluster mit einer relativ geringen Größenverteilung erhalten werden können. In dieser Arbeit wurden Carbonsäure-, Methoxy- und Azid-funktionalisierte SPION-Cluster für Kopplungsexperimente in einem Größenbereich von 200 bis 600 nm über das in Abbildung 43 dargestellte EISA Verfahren hergestellt. Die Carbonsäure-modifizierten Cluster wurden für die Kopplung über eine etablierte Kopplungsmethode, die EDC/NHS Kopplung, die Methoxy-modifizierten Cluster als Blindprobe und die Azid funktionalisierten Cluster für anschließende weitere Modifizierung mittels Click-Chemie, hergestellt.

In der folgenden Abbildung ist der Verlauf des EISA-Verfahrens am Beispiel zur Herstellung von Carbonsäure-modifizierten SPION-Clustern dargestellt.

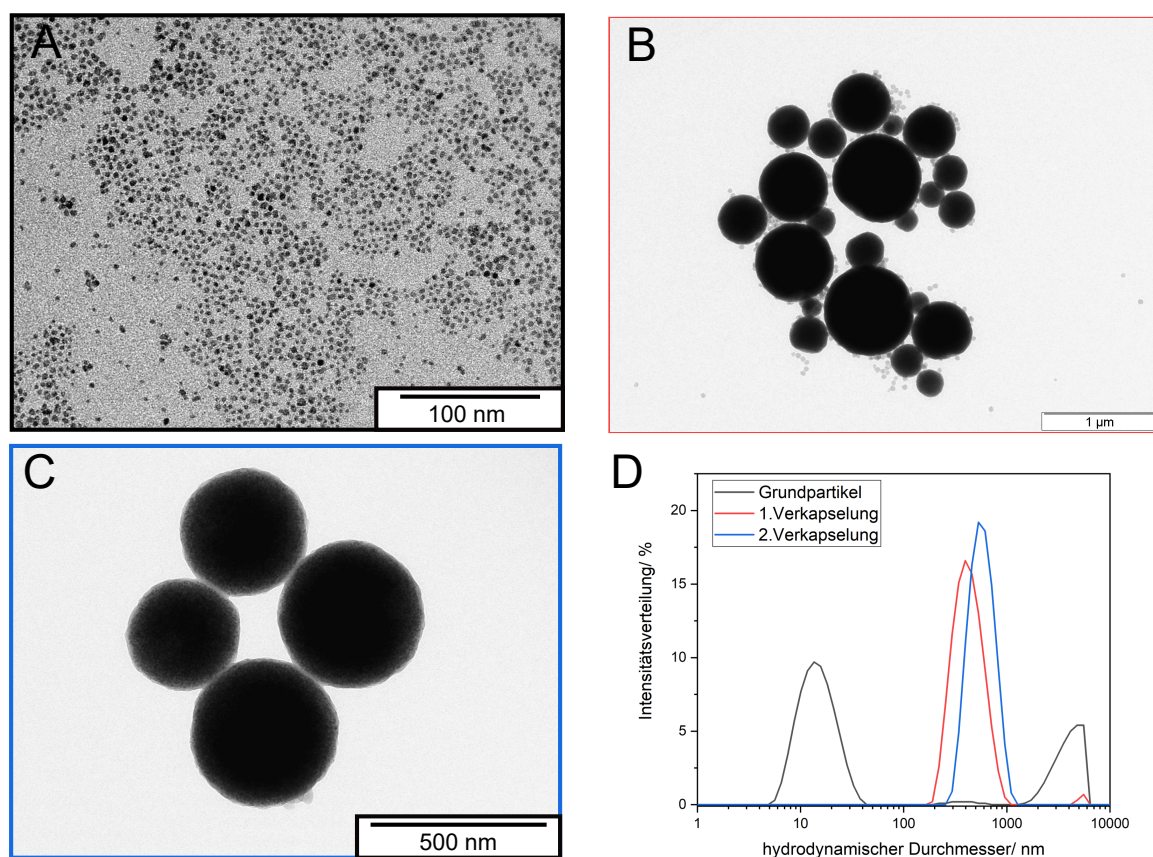


Abbildung 44: TEM-Bilder der Grundpartikel (A), der erzeugten Clustern nach der ersten (B) und zweiten Emulsionspolymerisation (C) und DLS Übersicht einer beispielhaften Synthese von Carbonsäure-modifizierten SPION-Clustern. Die SPION-Cluster nach magnetischer Auftrennung und erfolgreicher Funktionalisierung mit 5 % PI-*b*-PEO-COOH/95 % PI-*b*-PEO-OMe sind in Blau dargestellt. Der Z-Average betrug 541 nm mit einem PDI von 0.08.

Aus den Grundpartikeln konnten erfolgreich kugelförmige SPION-Cluster hergestellt werden. Nach der ersten Verkapselung und magnetischen Aufreinigung sind noch kleinere Cluster und kleine Polystyrolkugeln erkennbar. Nach der zweiten Verkapselung und magnetischen Aufreinigung konnten die kleineren Cluster und Polystyrolkugeln erfolgreich abgetrennt werden. Kleine Polystyrolkugeln entstehen, wenn die DTAB Konzentration über der kritischen Mizellkonzentration ($c_{\text{krit}} \text{ DTAB} \approx 4.5 \text{ mg/mL}$) liegt, wodurch auch Styrol in den leeren Mizellen polymerisiert.

Die Kontrolle der Scherkräfte auf die Tröpfchen während das organische Lösungsmittel verdampft wird und die Bedingungen bei der Erzeugung der Emulsion haben einen starken Einfluss auf die Größenverteilung der Cluster. Durch die Herstellung der Emulsion durch Einspritzen der organischen Lösung in die wässrige Phase auf einem Vortex Mischer und anschließendem Rühren ist die resultierende Emulsion relativ polydispers. Daraus resultiert, dass die hergestellten Cluster eine breite Größenverteilung besitzen. Durch die

geringe Magnetisierung der USPIONs lassen sich die Cluster mit Hilfe eines Magneten aufreinigen. Kleine Cluster $\approx < 200$ nm werden weniger stark angezogen und lassen sich abtrennen. Dies erlaubt die schrittweise Verbesserung der Größenverteilung der Cluster nach jeder magnetischen Aufreinigung. Dies ist in Abbildung 45 und Tabelle 8 an dem Beispiel von Methoxy-modifizierten Clustern gezeigt.

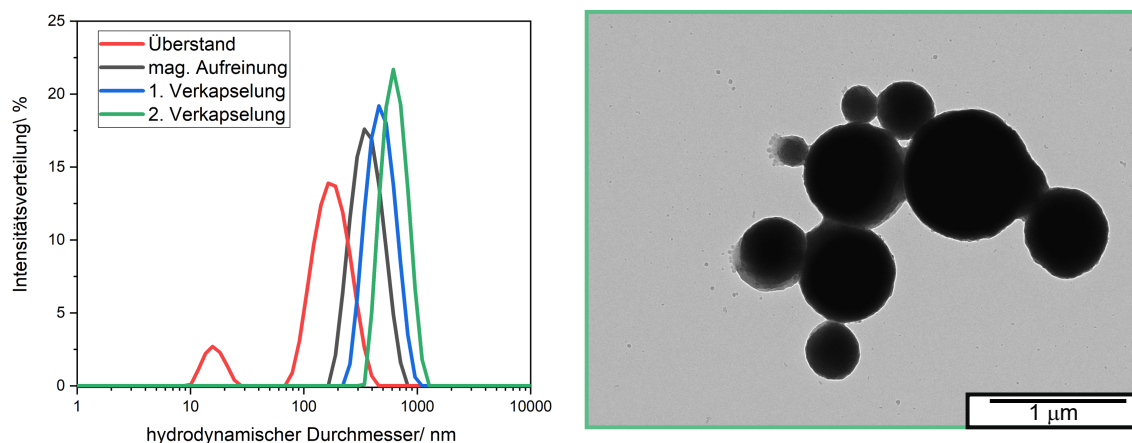


Abbildung 45: DLS Verlauf nach mehreren magnetischen Auftrennungen von OMe funktionalisierten SPION-Clustern (links) und TEM-Bild der mit Pi-*b*-PEO-OMe funktionalisierten SPION-Cluster. In dem DLS Verlauf ist die Intensitätsverteilung des Überstands (rot) und der erhaltenen SPION-Cluster (schwarz) nach der ersten magnetischen Auftrennung, sowie der Cluster nach der ersten (blau) und zweiten Verkapselung (grün) dargestellt.

Tabelle 8: Verlauf des intensitätsgewichteten mittleren hydrodynamischen Durchmessers (Z-Average) und des Polydispersitätsindex (PDI) des Überstands nach erster magnetischer Auftrennung nach dem EISA Verfahren und den abgetrennten Partikeln, sowie den SPION-Clustern nach der 1. und 2. Verkapselung und jeweils einer magnetischen Auftrennung.

	Z-Average/ nm	PDI
Überstand	115	0.375
magnetische Auftrennung	328	0.253
1. Verkapselung	428	0.239
2. Verkapselung OMe	626	0.119

Nach dem Verdampfen des Chloroforms wurden die Cluster magnetisch aufgetrennt und kleine Cluster konnten entfernt werden (rot). Nach jeder Verkapselung wurden die Partikel magnetisch aufgetrennt, wodurch der Z-Average ansteigt und der PDI deutlich sinkt. Durch die magnetische Auftrennung ist es möglich, bei der Verwendung von SPIONs mit

einem geringen Partikeldurchmesser und somit auch einer niedrigen Magnetisierung, Cluster mit einer sehr guten Größenverteilung zu erhalten. Werden größere SPIONs verwendet ist eine magnetische Auftrennung nicht mehr möglich, da selbst kleine Cluster (< 200 nm) sehr stark vom Magneten innerhalb weniger Sekunden abgetrennt werden.

In Abbildung 46 sind die Intensitätsverteilung und ein TEM-Bild der Azid funktionalisierten SPION-Cluster, welche anschließend in den Kopplungsexperimenten verwendet wurden, dargestellt. Für diese Synthese von SPION-Clustern wurden Partikel mit einer Größe von 5 nm verwendet.

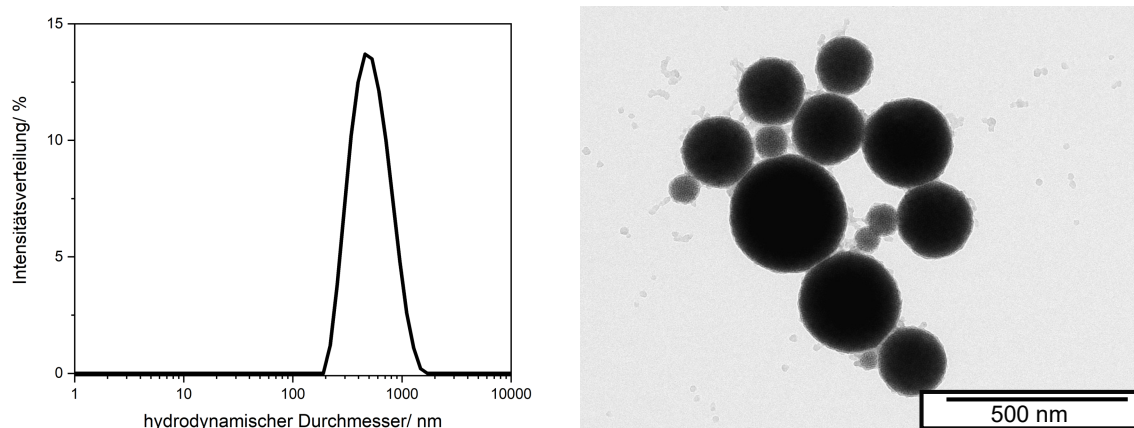


Abbildung 46: Mittels DLS gemessene Intensitätsverteilung und TEM-Bild der mit $\text{Pi-}b\text{-PEO-N}_3$ funktionalisierten SPION-Cluster.

Im TEM-Bild sind noch kleinere SPION-Cluster erkennbar, welche in der DLS-Messung von den größeren Clustern überstreut werden. Durch die Verwendung größerer Kernpartikel (5 nm) sind die kleinen Cluster ausreichend magnetisch, sodass sie sich deutlich schwieriger magnetisch abtrennen lassen. Aufgrund dessen ist die Größenverteilung etwas breiter als bei den Carbonsäure- und Methoxy-funktionalisierten Clustern. Der Vorteil bei Verwendung größerer Kernpartikel ist, dass sich durch die höhere Magnetisierung die Cluster deutlich schneller magnetisch abtrennen lassen.

Um die erfolgreiche Modifizierung und die Zugänglichkeit der Azid-Gruppen zu testen, wurden die hergestellten Cluster von Dr. Holzapfel mit einem Verhältnis von 1:100000 mit DBCO-CY5, einem rot fluoreszierenden Farbstoff, gekoppelt. Als Blindversuch wurde die Kopplung an SPION-Clustern ohne PI-PEO- N_3 durchgeführt. In Abbildung 47 sind die Fluoreszenzspektren nach der Kopplung mit dem Farbstoff Dibenzocyclooctinsäure-Cyanin5 (DBCO-CY5) gezeigt.

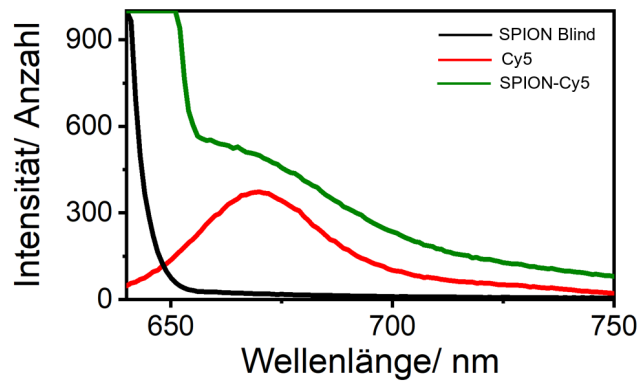


Abbildung 47: Fluoreszenzspektren von Azid funktionalisierten SPION-Clustern (grün) und unfunktionalisierten SPIONs (schwarz) nach der Kopplung mit DBCO-CY5. Das Fluoreszenzspektrum von verdünntem DBCO-CY5 (rot) ist als Referenz gezeigt.

$$\lambda_{ex} = 600 \text{ nm } \lambda_{em} = 620\text{-}670 \text{ nm.}$$

Da die Fluoreszenzintensität der gekoppelten SPION-Cluster so gering war, wurde mit stark geöffneten Schutzblenden (20 nm) gemessen, was zu einem starken Anstieg der Intensität $< 650 \text{ nm}$ durch Streulicht führte. Die Azid funktionalisierten SPION-Cluster zeigen eine Fluoreszenz bei 662 nm, die dem DBCO-CY5 Fluoreszenzfarbstoff zugeordnet werden kann. Die Oberflächenfunktionalisierung der Cluster mit PI-*b*-PEO- N_3 war erfolgreich. In der Blindprobe ist keine Fluoreszenz sichtbar, sodass davon ausgegangen werden kann, dass keine unspezifische Kopplung mit dem DBCO-CY5 aufgetreten ist.

5.5.2 Herstellung magnetischer Partikelaggregate durch mikrofluidische Tropfenherstellung

Ein Teil der Arbeiten wurde in Zusammenarbeit mit Lisa Onyema im Rahmen Ihrer unveröffentlichten Bachelorarbeit durchgeführt. Durch magnetische Auftrennung können die aus dem EISA-Verfahren hergestellten SPION-Cluster gut aufgetrennt werden. Durch die magnetische Auftrennung geht aber ein großer Teil verloren. Bei der Verwendung größerer SPIONs ist die magnetische Auftrennung deutlich erschwert und es werden oft Cluster mit einer breiteren Größenverteilung erhalten. Um das EISA-Verfahren zu optimieren und eine bessere Größenverteilung und Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurde der Schritt der Emulgierung optimiert. Um eine möglichst monodisperse Größenverteilung der Tröpfchen in einer Emulsion zu erhalten, gibt es zwei unterschiedliche Ansätze. Beide Ansätze versuchen die Scherkräfte, welche auf die Tröpfchen wirken, zu kontrollieren, um eine monodisperse Emulsion zu erhalten. Entweder werden die Scherkräfte bei

der Bildung der Emulsion genau kontrolliert, wie zum Beispiel in einem mikrofluidischen *focussed flow droplet generator* oder die Größenverteilung einer polydispersen Emulsion wird verbessert, indem auf alle Tröpfchen gleiche Scherkräfte, wie in einer Couvette Zelle, wirken.^[116–119] In einer Couvette Zelle wird die Emulsion einer gleichmäßigen Scherkraft ausgesetzt, indem die Emulsion zwischen zwei parallele Platten geleitet wird, wobei eine Platte stationär ist und die andere bewegt wird. Die auf die Flüssigkeit wirkenden Scherkräfte sind hierbei über das gesamte Volumen gleich.^[116]

In dieser Arbeit wurde ein *focussed flow droplet generator* verwendet, um die Dispersität der Emulsion zu verbessern. Hierbei fließen die wässrige Tensidlösung und die organische Phase durch parallel verlaufende kleine Kanäle mit Durchmessern von bis zu 200 μm , bis sie sich an einem Punkt vereinigen. Der Kanal der organischen Phase wird hierbei zu einer Kapillare verengt und durch die Scherkräfte der wässrigen Tensidlösung werden Tröpfchen mit einer definierten Größe und Frequenz von der organischen Phase abgerissen. Durch den laminaren Fluss beider Flüssigkeiten ist dieser Prozess sehr kontrolliert und es können monodisperse Emulsionen erhalten werden. Die resultierende Tröpfchen-Größe ist von der Viskosität und den Flussraten beider Phasen, sowie der Grenzflächenspannung abhängig.^[120?] Die Grenzflächenspannung kann durch die Wahl des Tensids und dessen Konzentration gesteuert werden.

In der Abbildung 48 ist ein Foto des Aufbaus zur Herstellung monodisperser Emulsionen mittels *focussed flow droplet generator* dargestellt.

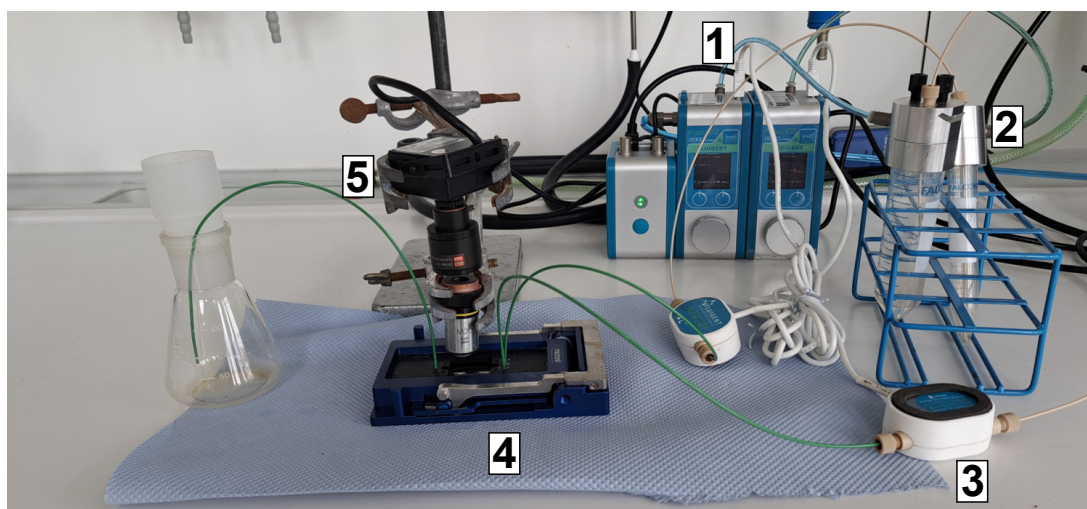


Abbildung 48: Fotografie des Versuchsaufbaus zur Herstellung monodisperser Emulsionen mittels einem *focussed flow droplet generator*.

Die Flussrate beider Flüssigkeiten wird über zwei LineUp Flow EZ (1) von Fluigent druckbasiert gesteuert. Durch die beiden LineUp Flow EZ wird ein Überdruck auf zwei ver-

schlossene Gefäße (2), in denen die Lösungen vorliegen, angelegt. Beide Phasen fließen dann über zwei Flussmesser (3), dem Flow Unit M von Fluigent, in einen mikrofluidischen *focussed flow droplet generator* mit einem Durchmesser von 75 μm von Micronit aus Glas (4). Die beiden Flussmesser messen den realen Fluss und regulieren den angelegten Druck, um die Flussraten genau einzustellen. Über eine USB-Kamera und ein Mikroskop Objektiv (5), kann die Tröpfchen Bildung im Mikrochip nachverfolgt werden. Der benötigte Überdruck für die Pumpen wird über eine Stickstoffgasflasche geliefert und vor den Flussmessern sind Filter verbaut, da Staub oder ähnliche Verunreinigungen sich im *focussed flow droplet generator* ablagern können und das Flussverhalten stark beeinflussen.

In der Abbildung 49 ist ein Bild der mikrofluidischen Tropfenherstellung mit einer 20 mg/mL wässrigen DTAB-Lösung und einer Lösung von SPIONs in Chloroform mit einer Konzentration von 20 mg/mL gezeigt.

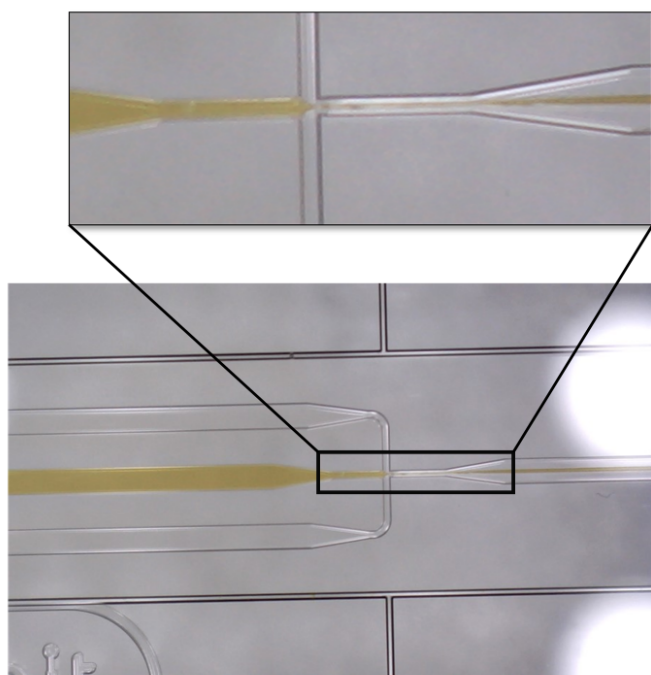


Abbildung 49: Zoom-in des *focussed flow droplet generator* während der Erzeugung einer Emulsion. In den äußeren Kanälen fließt eine wässrige DTAB-Lösung und in den inneren Kanal die SPIONs in Chloroform.

Durch Variation der Flussraten lässt sich die resultierende Tröpfchengröße steuern. Bei zu hohen Flussraten des Chloroforms oder zu niedrigen der wässrigen Phase, werden keine Tröpfchen mehr gebildet, sondern die Flüssigkeiten fließen parallel, bis der organische

Strahl zerreißt und in Tröpfchen zerfällt. Um die Tröpfchengröße genau steuern zu können, muss in einem Bereich der Flussraten gearbeitet werden, in dem kontrolliert Tröpfchen an der Spitze der Kapillare gebildet werden. In Abbildung 50 sind die Ergebnisse der Clustergröße mit der Variation der Flussraten von 5.3 nm großen SPIONs dargestellt.

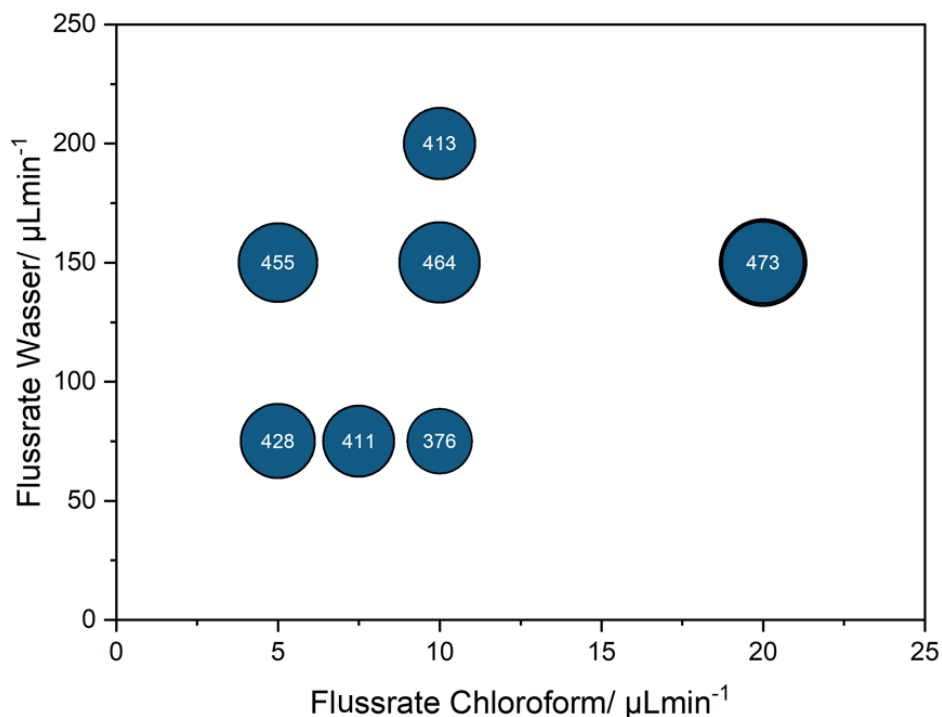


Abbildung 50: Z-Average bei unterschiedlichen Flussraten der organischen Nanopartikelfase und der wässrigen Tensidphase. Es wurden nur Cluster gezeigt mit einem PDI < 0.3.

Durch Variation der Flussraten konnten erfolgreich Cluster mit einer Größe von 376-473 nm erhalten werden. Die Cluster zeigten direkt nach dem EISA-Verfahren einen guten PDI. In Abbildung 51 sind Cluster mit einem Z-Average von 461 nm und einem PDI von 0.12 aus 5.3 nm SPIONs, welche mit einer Flussrate der organischen Phase von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ und der wässrigen Phase von 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ hergestellt wurden, nach einer Emulsionspolymerisation mit Styrol/DVB dargestellt.

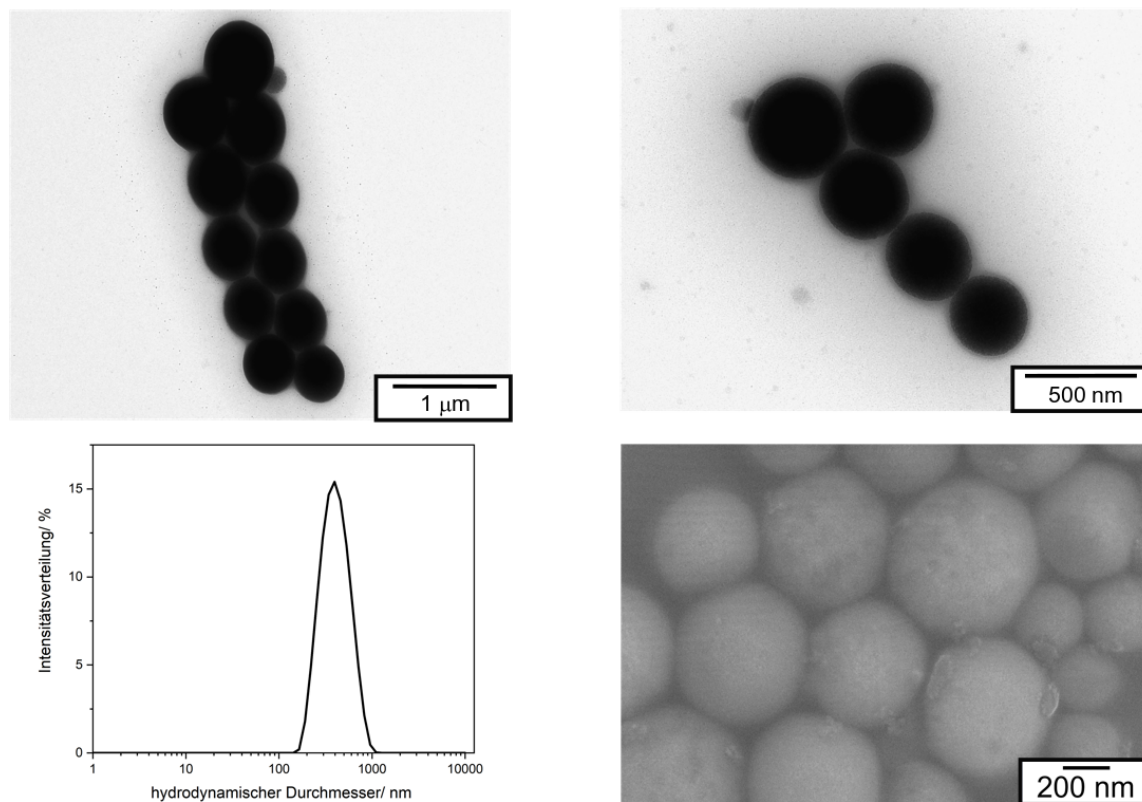


Abbildung 51: TEM-Bilder von Clustern mit einem Z-Average von 461 nm und einem PDI von 0.12 aus 5.3 nm SPIONs mit dem *focussed flow droplet generator* mit Flussraten von 75 µl/min Wasser/DTAB (20 mg/mL) und 10 µl/min Chloroform/SPIONs (20 mg/mL) nach magnetischer Aufreinigung, sowie mittels DLS bestimmter Intensitätsverteilung und REM-Bild.

In Abbildung 52 sind die Intensitätsverteilungen der SPION-Cluster gezeigt, wenn der Auffangbehälter auf einen Rüttler mit unterschiedlicher Stärke gestellt wird. Die Flussraten sind hierbei identisch.

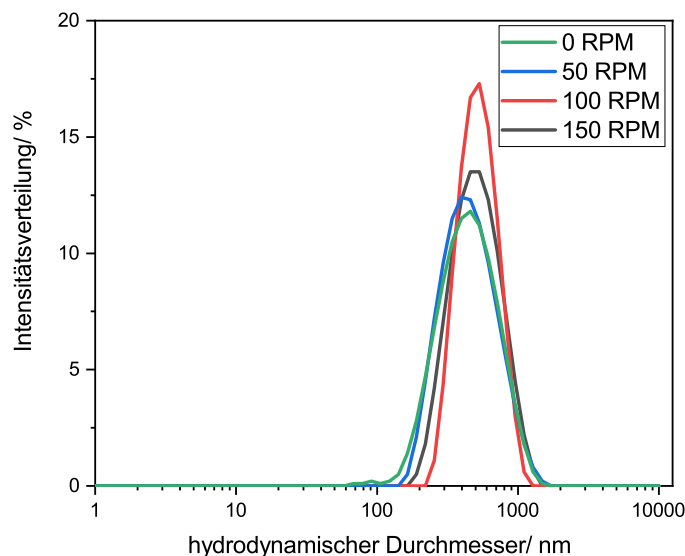


Abbildung 52: Intensitätsverteilungen bei gleicher Flussrate bei unterschiedlichen Umdrehungen pro Minute auf dem Schüttler.

Die Änderung in der Intensität des Schüttlers, zeigt keinen großen Einfluss auf die Intensitätsverteilung der SPION-Cluster. Dieses Experiment zeigt deutlich die hohe Reproduzierbarkeit der Clusterherstellung durch den *focussed flow droplet generator*. In den unterschiedlichen Experimenten ist nur eine geringe Änderung in der Größenverteilung der SPION-Cluster erkennbar.

Mittels des *focussed flow droplet generator* konnten SPION-Cluster mit geringen PDI < 0.2 und hoher Reproduzierbarkeit erhalten werden. Diese Methode zeigt ein hohes Potential die Reproduzierbarkeit und Größenkontrolle der über den EISA-Prozess erhaltenen Cluster zu erhöhen. Durch die ausschließliche Verwendung eines *focussed flow droplet generator* mit einer 75 μm Kapillare war die Größenvarianz der erhaltenen Cluster eingeschränkt. Die Verwendung von unterschiedlichen Kapillardurchmessern würde den Größenbereich der über den *focussed flow droplet generator* herstellbaren SPION-Cluster deutlich vergrößern.

5.5.3 Herstellung fluoreszenter QD-Cluster

Um die Sensitivität der magnetofluoreszenten Konstrukte weiter zu erhöhen, wurden QD-Dots kontrolliert agglomeriert. Dadurch wird bei einer erfolgreichen Kopplung nicht nur ein QD-Dot sondern gleich mehrere QD-Dots in einem Agglomerat gebunden, sodass die Fluoreszenz deutlich ansteigt.

Für die Herstellung der QD-Cluster wurden *giant shell* Quantum Dots vom Fraunhofer CAN zur Verfügung gestellt. Die Entwicklung des Protokolls zur kontrollierten Agglomeration der QD-Cluster wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Feld und Dr. Weimer durchgeführt. Zur kontrollierten Agglomeration wurde nur ein 30-60 facher molarer Überschuss des PI-*b*-PEO mit einer Abmischung von 99 - 99.1 % PI-*b*-PEO-OMe und 1 - 0.1 % PI-*b*-PEO-NH₂ verwendet. Weiterhin wurde die Gesamtflussrate auf 1.6 mL/min reduziert. Anschließend wurden ausgewählte QD-Agglomerate mit einer quer vernetzten Polystyrolhülle verkapselt, um die QDs vor Quenching zu schützen. In den QD-Agglomeraten, welche nicht mittels einer Emulsionspolymerisation mit einer quer vernetzten Polystyrolhülle eingekapselt wurden, wurde der Polyisoprenanteil in dem PI-*b*-PEO Blockcopolymer mit Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) quer vernetzt. Die über den Interdigitalmischer hergestellten QD-Agglomerate zeigten häufig noch eine sehr breite Größenverteilung. Um bessere Proben für die Kopplungsexperimente zu erzeugen, wurden die QD-Agglomerate über Zentrifugation größenselektiv gefällt. In der folgenden Abbildung sind die unterschiedlichen Fraktionen, welche über die Zentrifugation erhalten werden konnten, dargestellt. Die Zentrifugationsschritte wurden jeweils für 5 min durchgeführt. In Abbildung 53 ist dieser Prozess exemplarisch dargestellt.

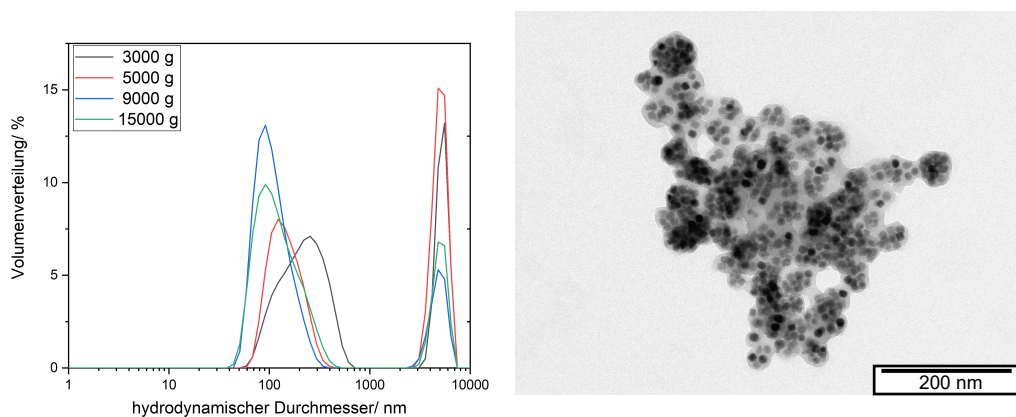


Abbildung 53: Mittels DLS bestimmte Volumenverteilung der durch Zentrifugation auf gereinigten QD-Agglomerate und TEM Übersichtsbild der Fraktion bei 9000 g.

Durch die schrittweise Auftrennung der QD-Agglomerate mittels Zentrifugation konnte die Größenverteilung deutlich verbessert werden. Auffallend ist, dass nach den unterschiedlichen Zentrifugationsschritten noch sehr große Agglomerate verbleiben. Eventuell waren die Zentrifugationsschritte hier zu kurz oder ein Teil der QD-Cluster lässt sich nicht mehr in Lösung aufnehmen.

Da die über den Interdigitalmischer hergestellten QD-Agglomerate Probleme in der Lang-

zeitstabilität besaßen und die Größenverteilung noch sehr breit war, wurden Versuche zur kontrollierten Agglomeration mit einem *split and combine* Mischer zur Optimierung durchgeführt. Hierbei wurde die Flussrate zwischen 2 bis 4 mL/min variiert und die Auftrennung durch Zentrifugation wurde bei niedrigeren g Kräften für längere Zeit durchgeführt, um Destabilisierung durch die Zentrifugation zu verhindern. Zur Auftrennung wurden die QD-Agglomerate für 1 h bei 2000 g zentrifugiert, um große Agglomerate zu entfernen und anschließend für 1 h bei 5000 g um die QD-Agglomerate zu erhalten und freies Polymer abzutrennen. In der folgenden Abbildung ist die kontrollierte Agglomeration über den *split and combine* Mischer, sowie TEM-Beispielbilder der erhaltenen QD-Agglomerate mit und ohne Polystyrolhülle dargestellt.

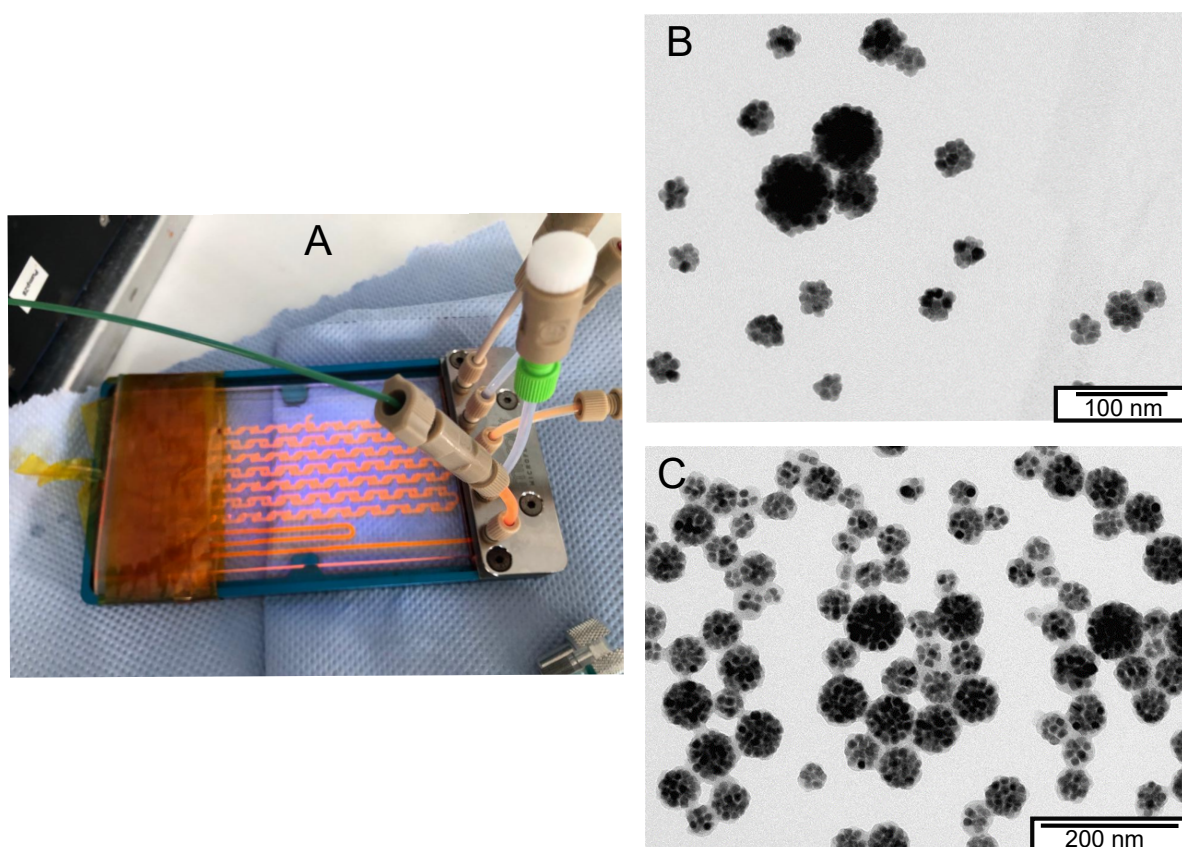


Abbildung 54: Foto der Herstellung der QD-Cluster mittels *split and combine* Mischer (A) und TEM Beispielbilder der erhaltenen QD Cluster ohne (B) und mit (C) quer vernetzter Polystyrolhülle.

In Tabelle 9 ist der Z-Average und der PDI nach der Herstellung und zwei Wochen später dargestellt, um die Stabilität über einen längeren Zeitraum darzustellen.

Tabelle 9: Verlauf des intensitätsgewichteten mittleren hydrodynamischen Durchmessers (Z-Average) und des Polydispersionsindexes (PDI) der mittels des *split and combine* Mischers hergestellten QD-Cluster nach Aufreinigung und 2 Wochen später, um die Langzeitstabilität zu prüfen.

Flussrate/ ml/min	Z-Average/ nm	PDI	Z-Average/ nm	PDI
Mit Polystyrolhülle			Nach 2 Wochen	
4	93.9	0.09	558	0.61
3	99.1	0.08	96.1	0.10
2	129	0.22	115	0.19
Ohne Polystyrolhülle			Nach 2 Wochen	
4	105	0.09	157	0.11
3	82.4	0.05	115	0.23
2	121	0.10	102	0.10

Die über den *split and combine* Mischer hergestellten QD-Cluster zeigten eine gute Langzeitstabilität, bis auf den Ansatz mit einer Flussrate von 4 mL/min mit Polystyrolhülle. Die Größenverteilung der über den *split and combine* Mischer hergestellten QD-Cluster zeigte auch deutliche Verbesserungen gegenüber den ersten Versuchen zur Herstellung der QD-Cluster mit dem Interdigitalmischer. Beide Verfahren für die kontrollierte Agglomeration wurden anschließend am Fraunhofer CAN weiter optimiert, um weitere QD-Agglomerate für Kopplungsexperimente herzustellen und die Größe genau einstellen zu können.

5.5.4 Kopplung der magnetischen und fluoreszenten Partikelaggregate

In einer ersten Machbarkeitsstudie des MANKIND Projektes wurden magnetofluoreszente Konstrukte über eine EDC/NHS Kopplung hergestellt. In Abbildung 55 ist die EDC/NHS Kopplung von SPION und QD Clustern schematisch dargestellt.

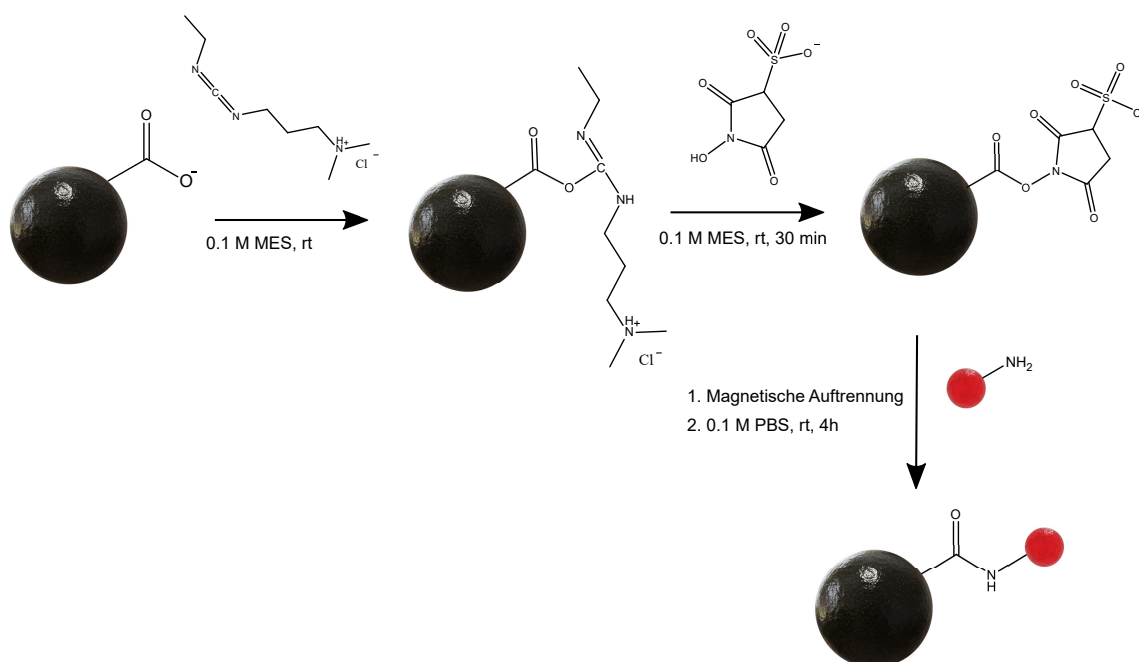


Abbildung 55: Schematischer Reaktionsverlauf der Kopplung von Carbonsäure-funktionalisierten SPION-Clustern und Amino-funktionalisierten QD Clustern mittels EDC/NHS Kopplung.

Im ersten Reaktionsschritt wird die Carbonsäure der funktionalisierten SPION-Cluster mit EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethyl-aminopropyl]-carbodiimid) in leicht basischem MES (2-[morpholino]ethansulfonsäure)-Puffer aktiviert wodurch ein reaktives Zwischenprodukt entsteht. Durch die Zugabe von Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimid) wird ein stabiles Zwischenprodukt erhalten. Anschließend werden die SPION-Cluster magnetisch abgetrennt und in einer Phosphat gepufferten Lösung aufgenommen. Daraufhin werden die Amino-funktionalisierten QD-Cluster im Überschuss hinzugegeben und es bildet sich eine Amid-Bindung zwischen den SPION- und QD-Clustern aus. Die ungekoppelten QD-Cluster werden durch magnetische Auftrennung entfernt. In Abbildung 56 sind die Überstände nach den magnetischen Auftrennungen und die Auftrennung am Magneten dargestellt.

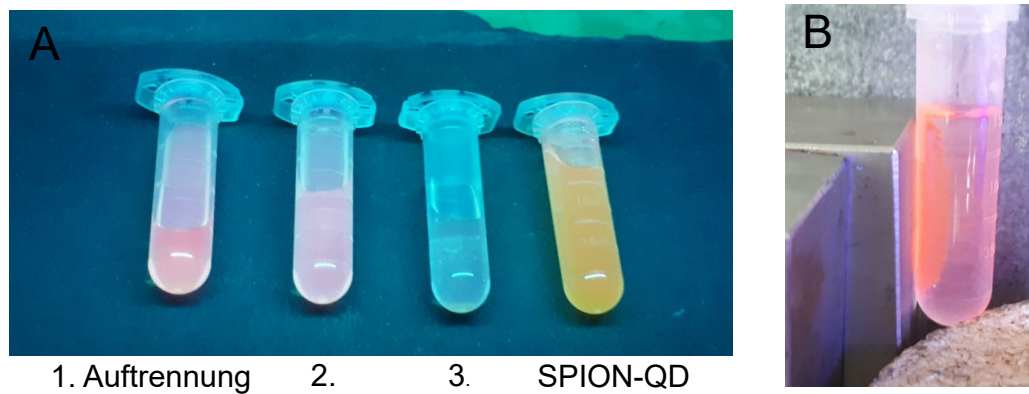


Abbildung 56: Fotografie der mittels EDC/NHS Kopplung hergestellten magnetofluoreszenten Konstrukte mit den Überständen nach den magnetischen Auftrennungen (A) und Abtrennung am Magneten (B).

Nach der dritten magnetischen Auftrennung zeigt der Überstand keine sichtbare Fluoreszenz mehr. Die SPION Lösung zeigt nach der magnetischen Auftrennung noch eine mit bloßem Auge erkennbare Fluoreszenz. Die über die EDC/NHS gekoppelten magnetofluoreszenten Cluster wurden anschließend mittels TEM und Konfokalmikroskop untersucht. Die Konfokalmikroskopmessungen wurden von Dr. Christian Strelow durchgeführt.

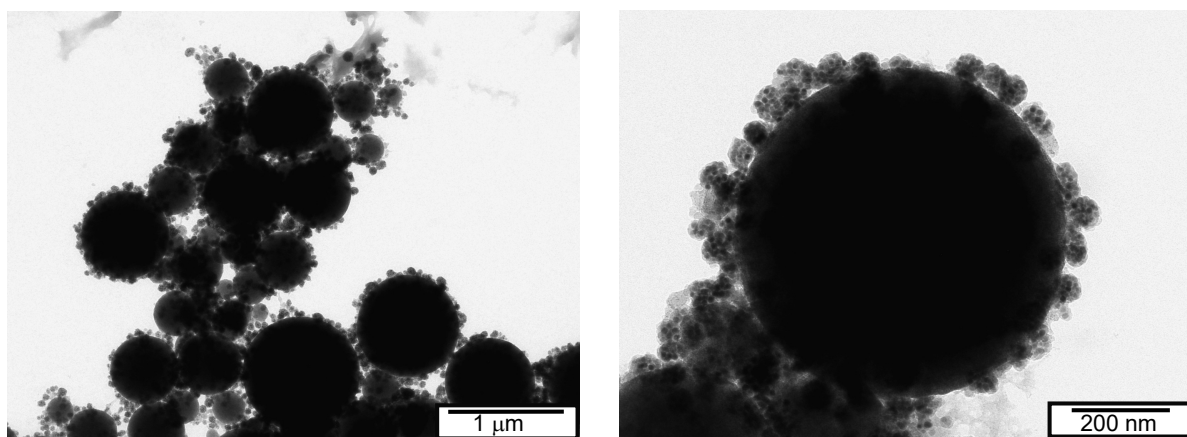


Abbildung 57: TEM-Bilder der Kopplung von Carbonsäure-funktionalisierten Eisenoxidnanoclustern mit Amino-modifizierten Quantum dot Nanoclustern durch EDC/NHS Kopplung.

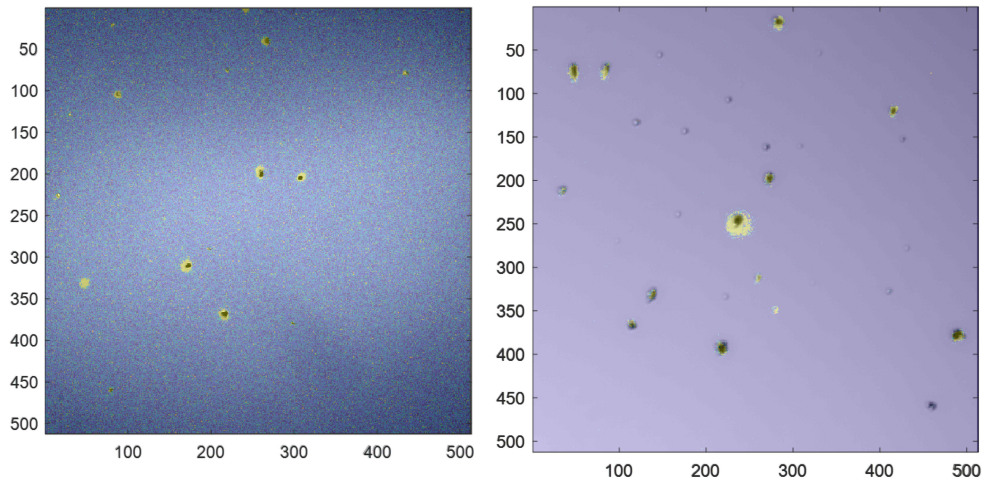


Abbildung 58: Überlagerung der Mikroskopaufnahmen und der Fluoreszenzbilder im Konfokalmikroskop der EDC/NHS gekoppelten SPION-QD Cluster von zwei unterschiedlichen Probenbereichen.

Die TEM-Bilder zeigen, dass die Oberfläche der SPIONs nahezu vollständig mit QD-Clustern bedeckt ist. Die Herstellung von magnetofluoreszenten Konstrukten durch die EDC/NHS Kopplung war somit erfolgreich. In dem Konfokalmikroskop sollten nur die SPION-Cluster als schwarze Punkte zu erkennen sein, da die Auflösung nicht hoch genug ist um die QD-Cluster aufzulösen. In fast allen Punkten, in denen Fluoreszenz gemessen wurde, sind auch SPION-Cluster sichtbar. Das zeigt, dass die Auftrennung mittels Magneten erfolgreich war und nur wenige freie QD-Cluster vorhanden sind. Um zu überprüfen, ob einzelne magnetofluoreszente Konstrukte im Fluss nachweisbar sind, wurden sie in einem Flussaufbau von Dr. Irene Fernandez-Cuesta vom Institut für Nanostruktur- und Festkörperphysik der Universität Hamburg untersucht. Die Ergebnisse der Messungen an durch EDC/NHS Kopplung erhaltenen magnetofluoreszenten Konstrukten von Dr. Feld und Dr. Weimer sind in Abbildung 59 dargestellt, da die Untersuchung nur an einer Probe repräsentativ durchgeführt wurde.

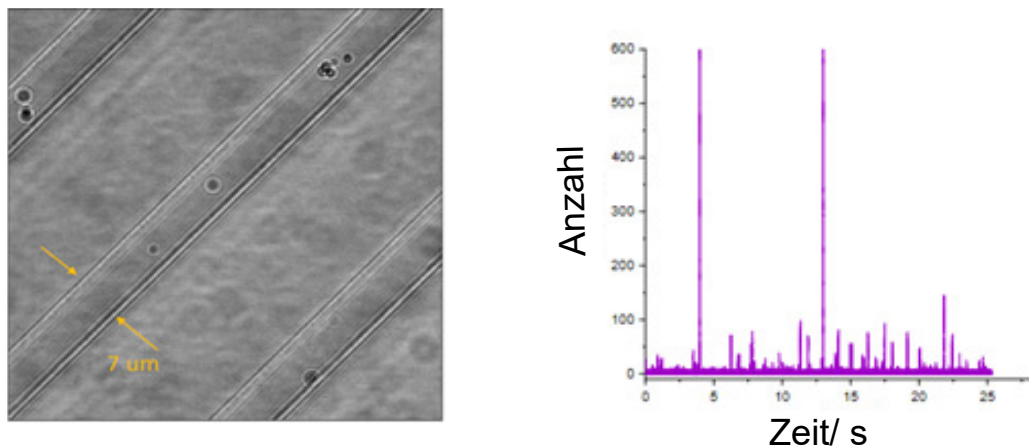


Abbildung 59: Foto der magnetofluoreszenten Konstrukte im Fluss (A) und Fluoreszenz Messung während des Durchflusses.

Die Ergebnisse der Untersuchungen im Fluss sind sehr positiv zu bewerten. Die magnetofluoreszenten Konstrukte zeigen eine starke Fluoreszenz, welche sich signifikant von dem Signal Untergrund unterscheiden lassen. In diesem Experiment wurden die Fluoreszenz Filter und der Detektionsbereich noch nicht auf die verwendeten QD-Cluster angepasst, sodass sich das Signal durch Anpassung des Experimentes an die Emission der QD-Cluster deutlich erhöhen würde. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass sich die magnetofluoreszenten Konstrukte einzeln im Fluss nachweisen lassen.

Auch schon ohne EDC/NHS Kopplung zeigen die Amino-funktionalisierten QD-Cluster eine Affinität zu den Carbonsäure-funktionalisierten SPION-Clustern. Um zu überprüfen, ob diese Affinität nur durch elektrostatische Wechselwirkungen der Cluster untereinander auftritt, wurde ein Blindexperiment mit Methoxy-funktionalisierten SPION-Clustern durchgeführt. Die Ergebnisse des Blindexperimentes sind in Abbildung 60 dargestellt.

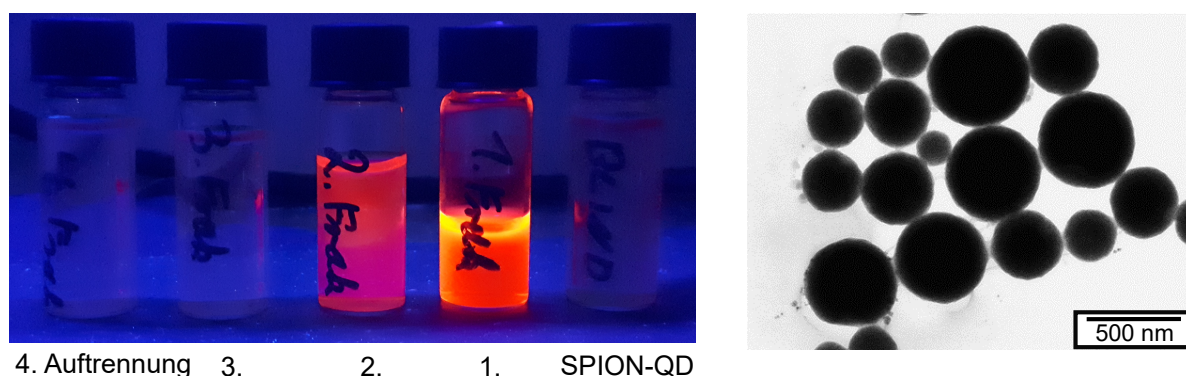


Abbildung 60: Fraktionen der magnetischen Auftrennung im Blindexperiment und TEM-Bild der Methoxy-funktionalisierten SPIONs nach dem Blindexperiment.

Ähnlich wie in dem EDC/NHS Kopplungs Experiment zeigt die abgetrennte Lösung nach drei magnetischen Auftrennungen keine sichtbare Fluoreszenz mehr. Die SPION-Cluster (Abbildung 60 rechts) zeigen keine sichtbare Fluoreszenz unter UV-Licht nach drei magnetischen Auftrennungen. In den TEM-Bildern der mit Methoxy-funktionalisierten SPION-Cluster sind nur sehr vereinzelt noch QD-Cluster zu erkennen. Es ist somit davon auszugehen, dass die vorige Affinität der SPION-Cluster zu den QD-Clustern auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

In diesem Modellversuch konnte die Herstellung von magnetofluoreszenten Konstrukten gezeigt werden. Sie zeigten keine unspezifischen Wechselwirkungen zwischen unmodifizierten Clustern und ließen sich einzeln mit einer hohen Signalstärke in einem Flussexperiment nachweisen.

Die magnetofluoreszenten Konstrukte zeigten ein hohes Potential, Antigene mit einer sehr hohen Sensitivität nachzuweisen. Der nächste Schritt ist der Nachweis von Antigenen. Hierfür werden die SPION- und QD-Cluster mit Antikörpern modifiziert und sollen über ein Antigen gekoppelt werden. Die EDC/NHS Kopplung ist eine unspezifische Kopplungsreaktion und führt zu der Kopplung an eine beliebige Amino-Funktion an einen Antikörper. Um zu vermeiden, dass durch die Kopplung die Funktion des Antikörpers eingeschränkt ist, wurden Azid modifizierte SPION- und QD-Cluster verwendet um eine Kopplung mittels Alkin-Azid Click-Chemie zu ermöglichen. Dies ermöglicht die selektive Kopplung in die F_C Region des Antikörpers. Die Antikörper Modifizierung der magnetischen und fluoreszenten Agglomerate, sowie die folgenden Kopplungsexperimente wurden am Fraunhofer Zentrum für angewandte Nanotechnologie von Dr. Holzapfel durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Kopplungen werden hier kurz dargestellt, um das Potential der in dieser Arbeit erzeugten SPION- und QD-Cluster für die Detektion von Antigenen zu zeigen. Die in den folgenden Kopplungsexperimenten verwendeten SPION-Cluster sind hierbei die in dieser Arbeit hergestellten Azid funktionalisierten SPION-Cluster.

Als ersten Vorversuch wurden die QD- und SPION-Cluster über Antikörper-Antikörper Wechselwirkungen direkt miteinander ohne ein Antigen gekoppelt. Hierfür wurden die SPION- und QD-Cluster mit jeweils 5 % Azid Funktionalisierung über 16 h bei Raumtemperatur mit DBCO-IgG inkubiert und anschließend auf gereinigt. Die SPION-Cluster wurden mit den primären und die QD-Cluster mit den sekundären IgG Antikörper funktionalisiert. Die so mit IgG funktionalisierten SPION und QD-Cluster wurden anschließend für 16 h bei Raumtemperatur miteinander gekoppelt. Nach magnetischer Auftrennung wurde durch Fluoreszenzspektroskopie untersucht, ob sich magnetofluoreszente Konstrukte gebildet haben. Als Blindversuch wurden die Cluster mit nur IgG inkubiert, um un-

spezifische Kopplung des IgG auf die Cluster auszuschließen. Das Fluoreszenzspektrum der magnetofluoreszenten Konstrukte mit dem Blindexperiment ist in Abbildung 61 dargestellt.

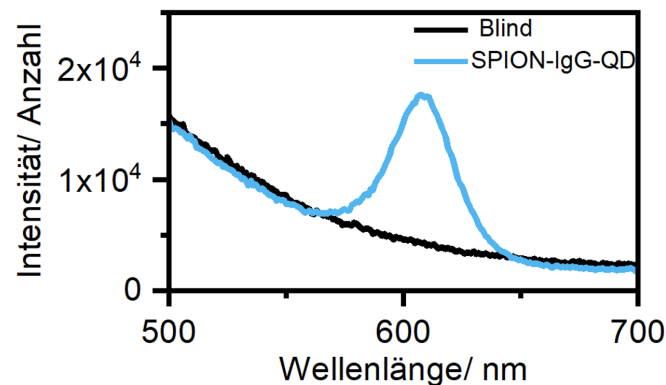


Abbildung 61: Fluoreszenzspektrum der mittels IgG gekoppelten SPION-IgG-QD Konstrukte und des Blindversuches zum Nachweis unspezifischer Kopplung.

Die mittels IgG gekoppelten magnetofluoreszenten Konstrukte zeigten eine schwache Fluoreszenz und im Blindexperiment ist keine Kopplung zwischen den SPION- und QD-Clustern sichtbar. Die Kopplung durch Antikörper-Antikörper-Bindung konnte somit erfolgreich gezeigt werden und das IgG zeigte keine unspezifische Bindung zu den Clustern. Die magnetofluoreszenten Konstrukte lassen sich deutlich von der Blindprobe unterscheiden. Die Fluoreszenz der magnetofluoreszenten Konstrukte ist aber nur sehr gering und in TEM-Bildern konnte die Kopplung von QD-Clustern an die SPION-Cluster nur vereinzelt beobachtet werden.

Da die Antikörper-Antikörper-Kopplung erfolgreich war, wurde ein Modellversuch durchgeführt, in dem beide Cluster mit primären IgG Antikörper modifiziert wurden. Als Antigen wurde hier der sekundäre IgG Antikörper verwendet. In diesem Experiment sollte somit das Prinzip der Detektion von Antigenen mittels magnetofluoreszenter Konstrukte am Beispiel der Detektion des sekundären Antikörpers gezeigt werden. Die SPION-Cluster wurden mit 1000 Äquivalenten des sekundären Antikörpers für 16 h inkubiert und dann magnetisch aufgetrennt, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden 100 Äquivalente der mit dem primären Antikörper modifizierten QD-Cluster für 2 h mit den SPION-Clustern inkubiert. Ungebundene QD-Cluster wurden nach den 2 h durch magnetische Auftrennung entfernt. Als Test auf unspezifische Bindungen wurden Blindexperimente mit GFP als nicht bindendes Protein und ohne sekundären Antikörper in Phosphat gepufferter Lösung durchgeführt. In Abbildung 62 sind die Absorptionsspektren und Fluoreszenzspektren des Tests auf Detektion eines Antigens dargestellt.

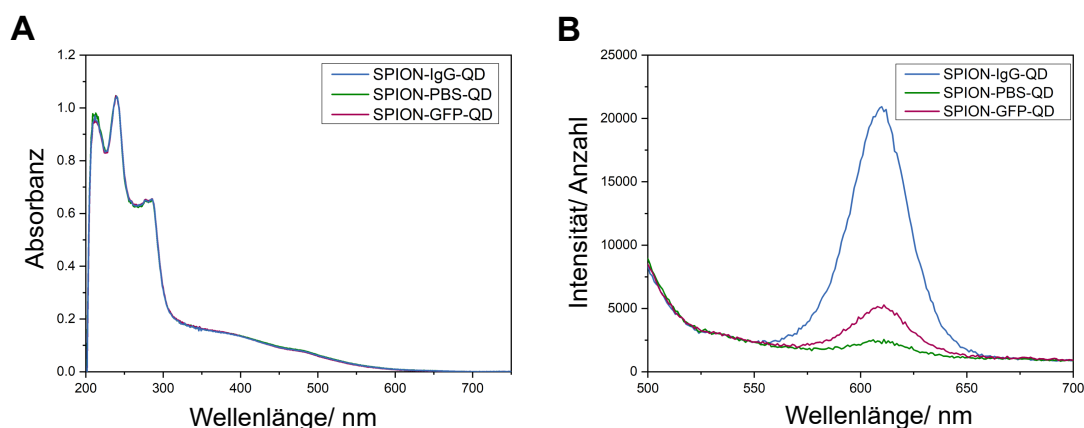


Abbildung 62: UV-Vis (A) und Fluoreszenzintensitäts (B) Spektren der mittels IgG gekoppelten magnetofluoreszenten Konstrukte und Tests auf unspezifische Bindung mit GFP als nicht bindendes Protein und in PBS Puffer.

In der Blindprobe im PBS-Puffer ist eine schwache Kopplung erkennbar. Diese tritt entweder durch eine geringe unspezifische Kopplung der primären Antikörper miteinander auf oder durch eine nicht ausreichende magnetische Auftrennung, da in dem vorigen Blindexperiment keine unspezifische Kopplung zwischen den Antikörpern auftrat. Mit GFP als nicht bindendem Antigen ist eine stärkere Fluoreszenz erkennbar. Somit tritt eine geringe unspezifische Kopplung auf. Die Fluoreszenzintensität ist in den SPION-IgG-QD magnetofluoreszenten Konstrukten deutlich höher, aber immer noch niedrig. Das Antigen konnte somit erfolgreich detektiert werden und unspezifische Kopplung tritt zwar auf ist aber gering genug, dass zwischen unspezifischer und spezifischer Kopplung unterschieden werden kann. Auch in diesem Modellversuch ist die Kopplungseffizienz zwischen den SPION- und QD-Clustern nur sehr gering. In weiterführenden Experimenten muss geklärt werden wie mehr Antikörper an die Oberfläche der SPION-Cluster gebunden werden können, um die Kopplungseffizienz zu steigern und somit auch die Sensitivität.

In dem Mankind Projekt konnte erfolgreich die Detektion von Antigenen mittels Antikörper modifizierten SPION- und QD-Clustern gezeigt werden. Die Effizienz der Kopplung war hierbei noch sehr gering und bedarf Optimierung. In dem *Proof of concept* Experiment der EDC/NHS magnetofluoreszenten Konstrukte konnte das große Potential dieser Partikel für diagnostische Anwendungen gezeigt werden. Es ließen sich viele QD-Cluster an den SPION-Clustern durch eine EDC/NHS Kopplung immobilisieren. Dies erlaubte die Einzeldetektion der Konstrukte im Fluss in einem noch nicht auf die Emission der QDs optimierten Versuchsaufbau. Es konnte gezeigt werden, dass unspezifische Wechselwirkungen der Amin funktionalisierten QD-Cluster mit den Carbonsäure-funktionalisierten SPION-Clustern nur auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen waren.

Kapitel 6

Experimenteller Teil

Die Größe der SPIONs wurde mit Hilfe des Programmes *ImageJ* aus den Transmissions-elektronenmikroskopiebildern (TEM-Bildern) bestimmt, indem mindestens 200 Partikel ausgezählt wurden. Alle Synthesen wurden unter einer Stickstoffschutzgasatmosphäre durchgeführt um Nebenreaktionen, wie die Oxidation des Eisen(II)-*Precursors* zu vermeiden. Alle Chemikalien wurden vor der Verwendung getrocknet.

6.1 Analytische Methoden

6.1.1 Kernresonanz Relaxometrie

Die Relaxationszeiten wurden mit einem minispec mq-60 NMR Analyzer von Bruker bei einer magnetischen Feldstärke von 1.5 T gemessen. Für die Bestimmung der Relaxationszeiten wurden jeweils 300 μL der in Wasser stabilisierten SPIONs in einer Verdünnungsreihe mit 5 Proben untersucht. Vor der Messung wurde das Gerät mit einer Wasserreferenzprobe kalibriert.

Die T_1 -Relaxationszeit wurde über eine *Inversion-Recovery*-Sequenz mit 20 nicht äquidistanten Verzögerungszeiten zwischen dem Inversionspuls und Detektionspuls bestimmt. Die *First Pulse Separation* wurde hierfür zwischen 5 - 90 ms und die *Final Pulse Separation* zwischen 40 - 7200 ms variiert. Die Zeit der *Final Pulse Separation* betrug bei allen Messungen das 80-fache der *First Pulse Separation*.

Die T_2 -Relaxationszeit wurde mit einer CARR-PURCELL-MEIBOOM-GILL Spin Echo Sequenz bestimmt. Hierbei wurden 200 äquidistante Datenpunkte als Vielfache der Echozeit T_E . Die Zeit zwischen dem 90° -Anregungspuls und dem ersten 180° -Refokussierungspuls τ wurde variiert, sodass der exponentielle Abfall erst nach ≈ 100 Datenpunkten auftrat.

6.1.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers erfolge an einem Malvern Zetasizer NANO ZS Zen 3600 bei einer Wellenlänge von 633 nm. Wässrige Nanopartikeldispersio-
nen wurden in Polymethylmethacrylat (PMMA)-Einmalküvetten vermessen und organi-
sche Nanopartikeldispersio-
nen in Quarzglas Küvetten. Die Auswertung erfolgte mit der *Dispersion Technology Software* (DTS) der Firma Malvern Instruments.

6.1.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die TEM-Aufnahmen wurden mithilfe eines JEM-1011 der Firma Jeol bei einer Be-
schleunigungsspannung von 100 kV erstellt. Zur Probenvorbereitung wurde ein Tropfen
einer stark verdünnten Nanopartikellösung auf einen mit Kohlenstoff beschichteten TEM-
Probenträger aus Kupfer mit 400 Maschen gegeben.

6.1.4 Infrarotspektroskopie

Für die Infrarotspektroskopie wurde die Probe mit getrocknetem KBr-Pulver vermischt
und zu einem Pressling gepresst. Der Pressling wurde in einem Invenio R FTIR-Spektrometer
der Firma Bruker vermessen.

6.1.5 Elementaranalyse

Zur Bestimmung der Eisenkonzentration von wässrigen Eisenoxidnanopartikeldispersio-
nen wurden die Nanopartikel unter Zugabe von konzentrierter Salpetersäure bei 60 °C
für 2 h aufgeschlossen. Anschließend wurde die Eisenkonzentration mittels Flammenab-
sorptionsspektroskopie (F-AAS) an einem Solar S Series von der Firma Thermo Fisher
Scientific bestimmt.

6.1.6 Magnetometer mit vibrierender Probe

Die Bestimmung der Magnetisierungskurven der SPIONs erfolgte an einem EZ-9 von
MicroSense. Für die Messung wurden 67 µL der aufkonzentrierten wässrigen SPION Lö-
sung in ein verschließbares Polyetherimid (ULTEM) Gefäß gefüllt. Dabei wurde auf die
Vermeidung von Luftblasen geachtet. Die Probe wurde anschließend mit doppelseitigem
Klebeband und Teflonband an dem Quarz Probenträger befestigt. Die Magnetisierung der
Probe wurde dann von einer Feldstärke von -2.5 bis 2.5 T in 100 mT Schritten zwischen

-2.5 bis -0.25 T und in 10 mT Schritten im nichtlinearen Bereich von -0.25 bis 0.25 T gemessen. Hierbei wurde die Hin und Rückkurve aufgenommen. Nach der Messung wurde eine Messung von 67 μL Wasser im ULTEM Gefäß von der Messung abgezogen, um den Diamagnetismus des Wassers abzuziehen.

6.1.7 Magnetische Partikel Spektrometer

Das verwendete MPS wurde von der Gruppe Knopp vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gebaut und zur Verfügung gestellt. Es wird mit einem oszillierenden Magnetfeld mit einer Amplitude $20 \text{ mT}/\mu_0$ bei einer Frequenz 25.699 kHz gemessen. Das empfangene Signal zur Bestimmung der harmonischen Schwingungen wird bis $\approx 2 \text{ MHz}$ aufgenommen. Für die Messung werden 40 μL wässrige SPION Lösung mit einer Konzentration von 15 mmol Fe/L in einem 200 μL Eppendorf Tube vermessen.

6.1.8 Pulver-Röntgendiffraktometrie

Die Pulver-Röntgendiffraktometrie wurde an einem Philips X'Pert-Diffraktometer mit BRAGG- BRENTANO-Geometrie gemessen. Dabei wurde Kupfer- K_α -Strahlung ($\lambda=0.154 \text{ nm}$) verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden einige Tropen einer konzentrierten Nanopartikellösung auf einen Silizium-Träger aufgetragen.

6.2 Synthetische Methoden

6.3 Chemikalien

Mit Methoxy, Azid und Amin funktionalisierte PI-*b*-PEG Blockcopolymere und das Polymaleinsäure-*alt*-dodecan wurden vom Fraunhofer Zentrum für angewandte Nanotechnologie CAN zur Verfügung gestellt. Alle in der Reaktion verwendeten Chemikalien wurden vor Benutzung für mindestens zwei Stunden entgast. Alle für die Synthese verwendeten Chemikalien wurden wasserfrei verwendet, um die Wasserkonzentration in der Reaktion genau zu kontrollieren. Alle zur Fällung verwendeten Lösungsmittel wurden von verschiedenen Herstellern (Sigma Aldrich, VWR, Grüssing) bezogen und entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad (p.a.). TWEEN80, Dodecyltrimethylammoniumbromid (97 %), Ölsäure (90 %), Eisen(II)-chlorid (wasserfrei, 98 %), EDC (100 %), Sulfo-NHS (100 %) wurden über Sigma Aldrich bezogen. Divinylbenzol (Isomerengemisch), Salpetersäure (p.a., rauchend) und Styrol (99 %) wurden von Merck erhalten. Salzsäure (p.a., 37 %) wurde über VWR bezogen. Diethylenglykol (99 %), Eisen(III)-chlorid (wasserfrei, 98 %) wurden von Grüssing bezogen. Polyethyleneglykolmethyletherphosphate (PEG-Phosphat, 99 % funk-

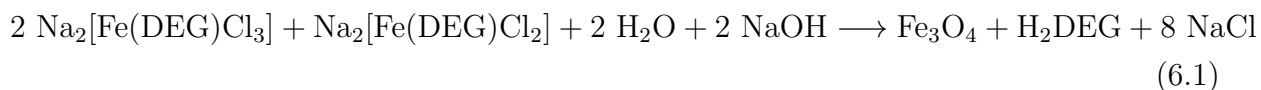
tionalisiert) wurde von creative Pegworks bezogen. Divinylbenzol und Styrol wurden bei 60 °C durch Anlegen eines Unterdrucks destilliert und bis zur Nutzung bei -20 °C gelagert.

6.4 Synthese der SPIONs

Die in dieser Arbeit hergestellten SPIONs wurden über eine Batch-Synthese und eine Flusssynthese hergestellt. Alle Synthesen wurden unter einer Stickstoffschutzgasatmosphäre durchgeführt, um eine Oxidation des Eisen(II)precursors zu verhindern und wasserfrei arbeiten zu können.

6.4.1 Batch-Synthese

Nach GOLOVERDA *et al.*^[87] wurden SPIONs über eine Hochtemperatur Hydrolyse von Diethylenglykolalkoxidkomplexen in Diethylenglykol über eine *hot injection* Synthese durchgeführt. Die Reaktion folgt folgender Reaktionsgleichung.



Zuerst wurden 0.298 g (13 mmol) Natrium in Form von flachen Plättchen in 10 mL Diethylenglykol über Nacht gelöst. Anschließend wurden 470 mg (2.90 mmol) Eisen(III)chlorid und 190 mg (1.50 mmol) Eisen(II)chlorid in 50 mL Diethylenglykol gelöst. Hierbei verfärbt sich die Lösung orange. Beide Eduktlösungen wurden vereinigt und die Farbe ändert sich zu einem dunkelgrün. Dies ist auf die Komplexbildung des Natriumdiethylenglykolats mit dem gelösten Eisenchlorid zurückzuführen.

Anschließend wurde auf 230 °C erhitzt und unter starkem Rühren wurde 0.126 mL (7.00 mmol) Wasser in 1 mL Diethylenglykol injiziert, um die Nukleation auszulösen. Die Lösung wurde drei Stunden bei 230 °C gehalten. In der Abbildung 63 ist die Keimung der SPIONs nach der Injektion von Wasser an einer verdünnten Reaktionslösung dargestellt um den Farbwechsel durch die Nukleation zu verdeutlichen.



(a) Reaktionslösung vor Wasserinjektion

(b) Reaktionslösung nach Wasserinjektion

Abbildung 63: Initiierung der Keimung durch Wasserinjektion bei einer stark verdünnten Reaktionslösung.

6.4.2 Flusssynthese

Die Eduktlösungen wurden auf dieselbe Art und mit den gleichen Mengen wie in der Batch-Synthese vorbereitet. Der gesamte Reaktor ist aus 1/16 Zoll PEEK Rohren mit einem Innendurchmesser von 0.03 Zoll (0.76 mm) aufgebaut. Die Eisenprecursorlösung wurde hierbei in insgesamt 40 mL DEG gelöst und das Wasser in 4 mL. Über ein Spritzenpumpensystem (neMESYS von cetoni) wurden dann beide Eduktlösungen mit einer Gesamtflussrate von 0.5 mL/min in den *split and combine* Mischer (Innenvolumen 3.4 mL), der mit einem Ölbad und Heizband auf 160 °C erhitzt wurde, gepumpt. Die Flussrate der Eisenprecursorlösung (0.4545 mL/min) betrug hierbei das 10-fache der Wasser/DEG-Lösung (0.04545 mL/min). Aufgrund der geringeren Flussrate der Wasser/DEG-Lösung wurde diese mit einer Vorlaufzeit von 7 min 53 s gestartet, damit beide Eduktlösungen ungefähr zeitgleich in der Mischstruktur ankommen. Nach der Nukleation und einer Verweilzeit von ≈ 7 min im *split and combine* Mischer wurde die Reaktionslösung in einen auf 180 °C geheizten Wachstumsofen mit einer Länge von 10 m (≈ 4.5 mL Volumen, Verweilzeit 9 min) geleitet. Die ersten 5 mL der hergestellten Nanopartikellösung wurden verworfen. Durch Variation der Konzentration der Precursorlösung, Temperatur des Wachstumsofens, sowie der Flussrate konnte die erhaltene Partikelgröße und der Durchsatz geändert werden. Hierbei wurde die Natriumkonzentration immer bei dem 2.9-fachen, die Wasserkonzentration beim 1.55-fachen der Eisenprecursorkonzentration gehalten und das Flussratenverhältnis der beiden Eduktlösungen nicht geändert. In der folgenden Tabelle ist eine Auflistung der variierten Reaktionsparameter der in dieser Arbeit diskutierten Flusssynthesen dargestellt.

Tabelle 10: Variierte Reaktionsparameter der in dieser Arbeit diskutierten Flusssynthesen.

Eisenprecursorkonzentr mmol/L	Gesamtflussrate/ ml/min	Temperatur Wachstumsofen/ °C	Partikeldurchmesser/ nm
109	0.5	190	5.3
109	0.5	180	3.6
109	0.5	160	2.0
109	0.5	180	3.5
110	0.5	180	3.1
111	0.5	180	3.3
111	1.0	180	3.2
111	1.5	180	3.1
150	0.5	180	4.2
150	0.75	180	2.8
150	1.0	180	3.1

6.5 Verweilzeitbestimmung

2 mg Rhodamin 101 wurde in 4 mL DEG gelöst. Diese Farbstofflösung wurde anschließend um den Faktor 1:300 verdünnt (1.66 µg/mL), um eine für den Detektor ausreichende Konzentration zu erreichen. Anschließend wurde in der Hitze eine DEG-Lösung durch den Reaktor gepumpt und ab einem bestimmten Zeitpunkt wurde auf die Farbstofflösung umgeschaltet. Durch einen Tec5 MultiSpec Desktop ETH UV-Vis Detektor am Ende des Reaktors wurde alle 10-30 s ein Spektrum aufgenommen. Die UV-Vis Spektren wurden mit dem Programm MultiSpec Pro II von Tec5 ausgewertet und die Absorption bei dem Absorptionsmaximum von Rhodamin 101 (584 nm) bestimmt.

6.6 Aufreinigung der SPIONs

Da die SPIONs nicht in der DEG-Lösung langzeitstabil sind und nach mehreren Wochen aggregieren, wurden die Partikel entweder über ein Zweiphasensystem in Toluol oder direkt mit einem geeigneten Liganden, wie PEG-Phosphat im wässrigen Medium für die Langzeitlagerung stabilisiert.

6.6.1 Zweiphasensystem

Zu der SPION-Lösung wurde nach der Reaktion 15 mL einer 20 mg/mL Oleylphosphat in Toluol, für die Batch-Synthese nach der allgemeinen Vorschrift, gegeben. Das dadurch entstandene Zweiphasensystem wurde über 13 h stark gerührt, wobei die SPIONs aus der Diethylenglykolphase nahezu vollständig in die organische Oleylphosphat/Toluol Phase übergehen. In Abbildung 64 ist der Phasentransfer beispielhaft für eine Synthese und einen Probenzug gezeigt.



(a) Phasentransfer im Reaktionskolben.



(b) Phasentransfer von einem Probenzug.

Abbildung 64: Phasentransfer gezeigt an einem Probenzug und am Ende einer Reaktion.

Anschließend wurden die Partikel mit zwei Volumenäquivalenten Aceton gefällt und bei 10000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet in Toluol wieder aufgenommen. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt, um überschüssiges Oleylphosphat zu entfernen.

6.7 Stabilisierung im wässrigen Medium

Für die Untersuchungen der Eignung der SPIONs als T_1 -Kontrastmittel und MPT-Tracer müssen die Partikel in die wässrige Phase überführt werden. Dies wurde direkt über die Modifizierung der SPIONs nach der Synthese mit PEG-Phosphat oder nach dem Zweiphasentransfer ins organische Lösungsmittel mit einer in der Arbeitsgruppe Weller entwickelten Methode der mizellaren Verkapselung hydrophober Nanopartikel erreicht.

6.7.1 PEG-Phosphat

Die SPIONs wurden direkt mit PEG-Phosphat nach der Synthese im wässrigen Medium stabilisiert. Zu 12 mL der Reaktionslösung nach der Flusssynthese wurde 0.5 g PEG-Phosphat in 10 mL Wasser gelöst hinzugegeben. Nach 2 h Rühren, wurde die Lösung mit Amicon® Ultra-15 10 kDa Zentrifugen Filtern auf ca. 1 mL aufkonzentriert. Anschließend

wurde mit Wasser bis 15 mL aufgefüllt und wieder auf ca. 1 mL aufkonzentriert. Dieser Schritt wurde vier Mal durchgeführt, um das DEG und überschüssiges PEG-Phosphat aus der Nanopartikellösung zu entfernen.

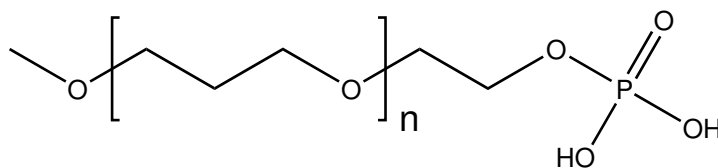


Abbildung 65: Strukturformel des verwendeten mPEG-Phosphats zur Stabilisierung einzelner USPIOs im wässrigen Medium.

6.7.2 Mizellare Verkapselung

Für die weitere Modifizierung und Stabilisierung im wässrigen Medium ist eine Verkapselung der SPIONs wichtig. Im Folgenden sind die Verkapselungen mit Polyisopren-*b*-Polyethylenoxid, Polymaleinsäure-*alt*-octadecen und Styrol/Divenylbenzol dargestellt. Die mit Polyisopren-*b*-Polyethylenoxid verkapselten Partikel wurden mit einer Sucrose-Gradienten Zentrifugation aufgereinigt. Das Gemisch wurde durch einen 0.2 μm PTFE-Spritzenfilter filtriert und anschließend mit Hilfe eines laminaren Interdigitalmischers mit Spritzenpumpensystem (Mischchip) ins wässrige Medium überführt. Zu 30 mg SPIONs in 1 mL THF wurde 90 mg TWEEN-80 hinzugegeben. Die Lösung wurde mit einem 0.2 μm PTFE-Spritzenfilter filtriert und anschließend mit Hilfe eines Mischchips ins wässrige Medium überführt. In Abbildung 66 ist das TWEEN-80 dargestellt, welches zur Stabilisierung der SPIONs im wässrigen Medium verwendet wurde.

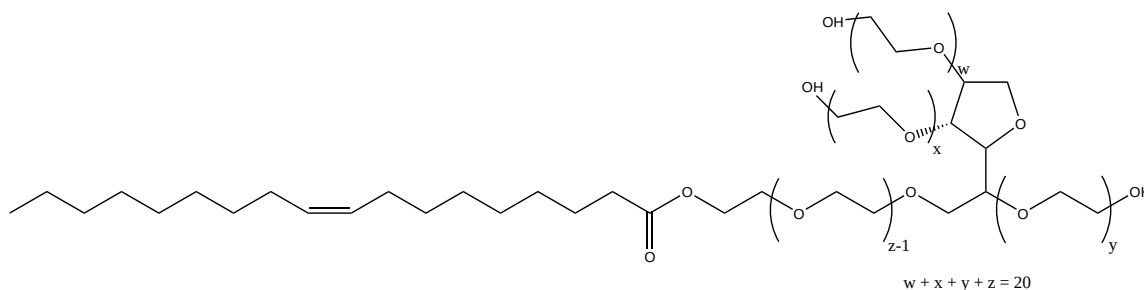


Abbildung 66: Verwendetes Polysorbat 80 (TWEEN 80).

Polymaleinsäure-*alt*-decan

Nach der Verkapselungsmethode nach PELLEGRINO wurden 11 mg SPIONs mit 200 mg Polymaleinsäure-*alt*-decan in 10 mL Chloroform 30 min gerührt. Anschließend wurde das Chloroform durch einen Rotationsverdampfer entfernt und die Partikel in 15 mL

Tris-Borat-EDTA-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung für 4 h im Ultraschallbad behandelt.

Nach der Methode von MULVANEY wurden 22 mg SPIONs mit 100 mg Polymaleinsäureanhydrid-*alt*-dodecan in 2 mL Chloroform gerührt. Die Lösung wurde mit 50 μ L Ethanolamin in 4 ml Wasser überschichtet und anschließend für 1 h gerührt.

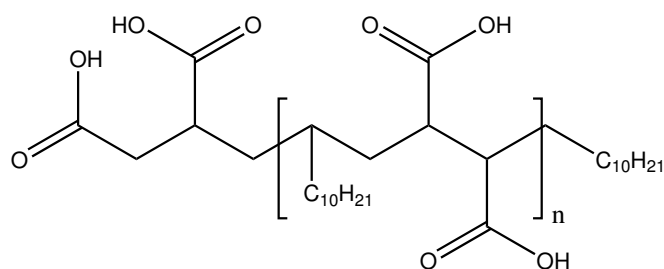


Abbildung 67: Polymaleinsäure-*alt*-decan.

6.8 Herstellung magnetischer Partikelagglomerate

2 mL einer SPION Probe in Chloroform (30 mg/mL) wurde in 2 mL einer wässrigen DTAB-Lösung (20 mg/mL) unter starkem Mischen auf dem Vortexer injiziert, um eine Emulsion zu erhalten. Anschließend wurde das Chloroform unter Rühren bei 350 U/min über 1 h verdampft. Darauf folgend wurde die Lösung auf ca. 10 mL mit Wasser aufgefüllt, um die DTAB-Konzentration auf ca. 4 mg/mL zu reduzieren. Dadurch wird die DTAB-Konzentration unter die kritische Mizellkonzentration ($c_{\text{krit DTAB}} = 4.5 \text{ mg/mL}$) gesenkt und die Polymerisation in freien Mizellen verhindert.

6.8.1 Erste Emulsionspolymerisation

Für die erste Emulsionspolymerisation wurde die Lösung für 20 min unter Vakuum entgast und währenddessen wurde die Atmosphäre mehrmals gegen Stickstoff ausgetauscht, um den in der Lösung enthaltenen Sauerstoff zu entfernen. Im Stickstoff Gegenstrom wurde für die erste Emulsionspolymerisation jeweils 100 μ L Styrol und Divinylbenzol, sowie $\approx 1 \text{ mg}$ VA-044 als Initiator hinzugegeben. Daraufhin wurde die Emulsionspolymerisation bei 67°C für 8 h unter Rühren mit einem Glasrührstab durchgeführt. Nach dem ersten Polymerisationsschritt werden die magnetischen Partikelagglomerate zweimal mit einem 1.5 T Neodym Magneten abgetrennt und wieder in Wasser aufgenommen, um Nebenprodukte zu entfernen und eine erste Abtrennung kleiner Partikelagglomerate zu erreichen.

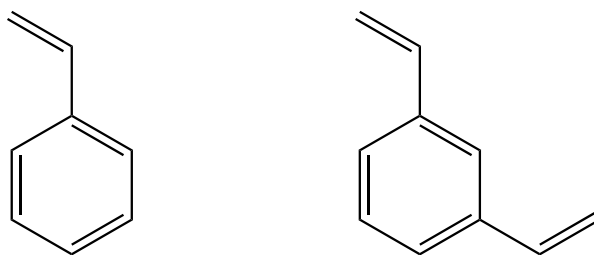


Abbildung 68: Strukturformel der Monomere Styrol und Divinylbenzol.

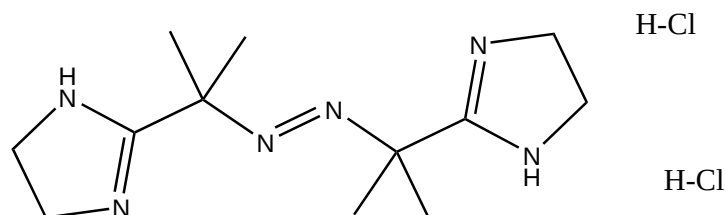


Abbildung 69: Verwendeter UV-Initiator VA-044
(2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)-propan]dihydrochlorid.

6.8.2 Zweite Emulsionspolymerisation

Das verwendete PI-*b*-PEO- N_3 und PI-*b*-PEO-OMe besaß eine molare Masse von 18000 g/mol und das PI-*b*-PEO-COOH und PI-*b*-PEO-NH₂ eine molare Masse von 13000 g/mol. Nach einer weiteren magnetischen Abtrennung werden die magnetischen Partikelagglomerate in 20 mL einer 1 mg/mL PI-*b*-PEO- N_3 /PI-*b*-PEO-OMe 1:1 aufgenommen. Daraufhin wurde die Lösung für 2 h geschüttelt, um die Cluster mit dem PI-*b*-PEO- N_3 /PI-*b*-PEO-OMe zu umhüllen. Anschließend wurden die Cluster wieder von der Lösung magnetisch abgetrennt und in 20 mL einer 0.02 mg/mL PI-*b*-PEO- N_3 /PI-*b*-PEO-OMe 1:1 Lösung aufgenommen. In einer zweiten Emulsionspolymerisation mit jeweils 15 μ L Styrol und Divinylbenzol, sowie 0.5 mg VA-044 bei 67 °C für 8 h wird das PI-*b*-PEO- N_3 /PI-*b*-PEO-OMe an der Oberfläche befestigt.

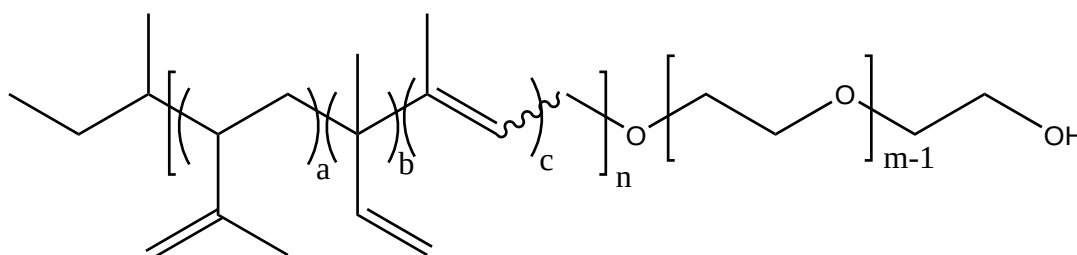


Abbildung 70: Verwendetes Blockcopolymer aus Polyisopren und Polyethylenoxid.

6.8.3 Emulgierung mittels *focussed flow droplet generator*

Um eine höhere Kontrolle der Scherkräfte bei der Emulgierung und somit eine erhöhte Kontrolle über die Größenverteilung und Reproduzierbarkeit der über das EISA-Verfahren erhaltenen SPION-Cluster zu erhalten, wurde dieser Schritt mit einem *focussed flow droplet generator* von Micronit durchgeführt. Die Flussrate der Fluigent Flow Ez Pumpen wurde über die Software OxyGen gesteuert.

Die Flussraten wurden so kontrolliert, dass nur einzelne Tropfen von der organischen Phase abgerissen wurden und kein *jetting* auftrat. Die beste Größenverteilung der SPION-Cluster wurde bei einer Flussrate der SPION-Lösung in Chloroform (20 mg/mL) mit 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ und die der wässrigen DTAB-Lösung (20 mg/mL) mit 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ erreicht. Da die Flussmesser auf Isopropanol geeicht sind, muss ein in dieser Arbeit experimentell bestimmter Faktor von 0.84 angewendet werden, um die reale Flussrate der in Chloroform gelösten SPION-Lösung zu erhalten.

6.9 Herstellung fluoreszierender Partikelagglomerate

Die fluoreszierenden Partikelagglomerate wurden mit einem 30-60 fachen molarer Überschuss des PI-*b*-PEO mit einer Abmischung von 99 - 99.1 % PI-*b*-PEO-OMe und 1 - 0.1 % PI-*b*-PEO-NH₂ auf die QD Menge modifiziert. Die für die Herstellung fluoreszierender Partikelagglomerate verwendeten QDs wurden vom Fraunhofer Zentrum für angewandte Nanowissenschaften CAN zur Verfügung gestellt. Im Folgenden ist die allgemeine Beschreibung für die Herstellung der Amino-funktionalisierten fluoreszierenden QD-Cluster aus 30 mg QD beschrieben.

Zu 30 mg QD Partikeln in 3 mL THF wurden 36 mg mit einer Abmischung von 99.1 % PI-*b*-PEO-OMe und 0.1 % PI-*b*-PEO-NH₂ in 1 mL THF vermischt. Anschließend wurden die QDs wie bei der mizellaren Verkapselung beschrieben in die wässrige Phase überführt. Die Gesamtflussrate wurde hierbei auf 1.6 mL/min reduziert. Anschließend wurden die QD-Agglomerate in einer Emulsionspolymerisation mit 54 μL Styrol und Divinylbenzol bei 67 °C für 8 h verkapselt. Anschließend werden die QD Cluster über sequentielle Zentrifugation von 3000 g bis 15000 g für 5 min fraktioniert.

6.10 Kopplungsexperimente der magnetofluoreszenten Konstrukte

6.10.1 EDC/NHS Kopplung

Für die EDC/NHS Kopplung wurde zu 500 μL Carbonsäure modifizierten SPION-Cluster 250 μL einer 1.5 mg/mL EDC-Lösung und 4.5 mg/mL Sulfo-NHS, sowie 500 μL 0.1 M MES Puffer hinzugegeben. Nach 30 min Rühren werden die magnetischen Cluster magnetisch abgetrennt und in 1 mL PBS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 700 μL der Amino funktionalisierten QD-Cluster zu der SPION Lösung gegeben. Nach 2 h werden die magnetofluoreszenten Konstrukte so oft magnetisch abgetrennt, bis die letzten 2 Überstände keine sichtbare Fluoreszenz unter UV-Licht im dunklen zeigen.

Kapitel 7

Sicherheit und Entsorgung

In Tabelle 11 sind die verwendeten Chemikalien mit ihren Sicherheitshinweisen dargestellt.^[121,122]

Tabelle 11: Verwendete Substanzen und ihre Gefahren.

Substanz	Gefahren- piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	 	225, 319, 336	210, 240, 305 + 351 + 338, 403 + 233
Chloroform	 	302, 315, 319, 331, 336, 351, 361d, 372, 412	201, 273, 301+312+330, 302+352, 304+340+311, 308+313
DBCO-CY5		315, 319, 335	261, 264, 271, 280, 302+352, 305+351+338
Diethylenglykol	 	302, 373	-
Diethylether	 	224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 301+312+330, 403+233
Divinylbenzol		Keine Einstufung nach GHS	
Eisen(II)chlorid	 	302, 314	280, 305 + 351 + 338, 310
Eisen(III)chlorid	 	290, 302, 315, 318	280, 305 + 351 + 338
Eisenoxid	-	-	-

Tabelle 11: Verwendete Substanzen und ihre Gefahren.

Substanz	Gefahren- piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
EDC		315,319,335	280, 264, 261, 271, 302+352, 305+351+338, 332+313, 337+313, 304+340,
Natrium	 	260, 314	223, 231 + 232, 280, 305 + 351 + 338, 370 + 378, 422
Sulfo-NHS		Keine gefährliche Substanz oder Mischung gemäss Richtlinie (EC) Nr. 1272/	
Polyisopren- <i>b</i> - Polyethylenoxid		Keine Einstufung nach GHS	
Polyisopren- <i>b</i> - Polyethylenoxid-Azid		Keine Einstufung nach GHS	
Polyisopren- <i>b</i> - Polyethylenoxid- Carbonsäure		Keine Einstufung nach GHS	
Polymaleinsäure- <i>alt</i> - decan		Keine Einstufung nach GHS	
Salzsäure	 	290, 314, 335	234, 261, 271, 280, 303+361+353, 305+351+338
Styrol	  	226, 332, 315, 319, 361d, 372	210, 302 + 352, 305 + 351 + 338, 314
Salpetersäure	  	272, 290, 330, 314	210, 220, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Tetrahydrofuran	  	225, 302, 319, 335, 351	210, 280, 301 + 312 + 330, 305 + 351 + 338, 370 + 378, 403 + 235
Toluol	  	225, 361d, 304, 373, 315, 336	210, 240, 301 + 310 + 330, 302 + 352, 308 + 313, 314, 403 + 233

Tabelle 11: Verwendete Substanzen und ihre Gefahren.

Substanz	Gefahren- piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Tris(hydroxymethyl)aminomethan			Kein gefährlicher Stoff nach GHS
Oleylphosphat		318	
Tween 80			Kein gefährlicher Stoff nach GHS
Wolframatophosphorsäure		314	280, 305 + 351 + 338, 310
Divinylbenzol	 	315, 319, 411	264, 273, 280, 302+352, 305+351+338, 332+313

Es wurden keine KMR-Stoffe der Kategorie 1 verwendet.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Ali, H. Zafar, M. Zia, I. ul Haq, A. R. Phull, J. S. Ali, A. Hussain, *Nanotechnology Science and Applications* **2016**, *9*, 49–67.
- [2] B. A. L. Rogach, D. V. Talapin, E. V. Shevchenko, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller **2002**, 653–664.
- [3] W. Wu, C. Z. Jiang, V. A. Roy, *Nanoscale* **2016**, *8*, 19421–19474.
- [4] Y. Shu, X. Lin, H. Qin, Z. Hu, Y. Jin, X. Peng, *Angewandte Chemie* **2020**, *132*, 22496–22507.
- [5] E. M. Materón, C. M. Miyazaki, O. Carr, N. Joshi, P. H. Picciani, C. J. Dalmaschio, F. Davis, F. M. Shimizu, *Applied Surface Science Advances* **2021**, *6*, year.
- [6] M. Jeon, M. V. Halbert, Z. R. Stephen, M. Zhang, *Advanced Materials* **2020**, *1906539*, 1–18.
- [7] N. Panagiotopoulos, R. L. Duschka, M. Ahlborg, G. Bringout, C. Debbeler, M. Graesser, C. Kaethner, K. Lüdtke-Buzug, H. Medimagh, J. Stelzner, T. M. Buzug, J. Barkhausen, F. M. Vogt, J. Haegele, *International Journal of Nanomedicine* **2015**, *10*, 3097–3114.
- [8] S. Gul, S. B. Khan, I. U. Rehman, M. A. Khan, M. I. Khan, *Frontiers in Materials* **2019**, *6*, 1–15.
- [9] G. Kandasamy, D. Maity, *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *496*, 191–218.
- [10] A. Cherkasov, E. N. Muratov, D. Fourches, A. Varnek, I. Igor, M. Cronin, J. Dear-den, P. Gramatica, Y. C. Martin, V. Consonni, V. E. Kuz, R. Cramer, *J Med Chem* **2015**, *57*, 4977–5010.
- [11] C. Zimmer, R. Weissleder, K. Poss, A. Bogdanova, S. C. Wright, W. S. Enochs, *Radiology* **1995**, *197*, 533–538.

- [12] B. J. Tefft, S. Uthamaraj, J. J. Harburn, M. Klabusay, D. Dragomir-Daescu, G. S. Sandhu, *Journal of Visualized Experiments* **2015**, 2015, 1–9.
- [13] T. Vangijzegem, D. Stanicki, S. Laurent, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2019**, 16, 69–78.
- [14] Z. Shen, A. Wu, X. Chen, *Molecular Pharmaceutics* **2017**, 14, 1352–1364.
- [15] A. Feld, A. Weimer, A. Kornowski, N. Winckelmans, J. P. Merkl, H. Kloust, R. Zierold, C. Schmidtke, T. Schotten, M. Riedner, S. Bals, H. Weller, *ACS Nano* **2019**, 13, 152–162.
- [16] M. Kampferbeck, L. R. Klauke, H. Weller, T. Vossmeier, *Langmuir* **2021**, 37, 9851–9857.
- [17] C. Schmidtke, R. Eggers, R. Zierold, A. Feld, H. Kloust, C. Wolter, J. Ostermann, J. P. Merkl, T. Schotten, K. Nielsch, H. Weller, *Langmuir* **2014**, 30, 11190–11196.
- [18] W. W. Yu, J. C. Falkner, C. T. Yavuz, V. L. Colvin, *Chemical communications (Cambridge England)* **2004**, 2306–2307.
- [19] Y. C. taeghwan Hyeon, Su Seong Lee, Jongnam Park, H. B. Na., *Journal of American Chemical Society* **2001**, 123, 12789–12801.
- [20] M. Gonzales-Weimuller, M. Zeisberger, K. M. Krishnan, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, 321, 1947–1950.
- [21] K. Winnacker, L. Küchler, *Chemische Technik: Prozesse und Produkte, Vol. 2: Neue Technologien*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [22] W. Baaziz, B. P. Pichon, S. Fleutot, Y. Liu, C. Lefevre, J. M. Greneche, M. Toumi, T. Mhiri, S. Begin-Colin, *Journal of Physical Chemistry C* **2014**, 118, 3795–3810.
- [23] E. Pöselt, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, U. Schumacher, C. Wagener, S. Förster, H. Weller, *ACS Nano* **2012**, 6, 3346–3355.
- [24] T. Kanda, T. Fukusato, M. Matsuda, K. Toyoda, H. Oba, J. Kotoku, T. Haruyama, K. Kitajima, S. Furui, *Radiology* **2015**, 276, 228–232.
- [25] C. Chen, J. Ge, Y. Gao, L. Chen, J. Cui, J. Zeng, M. Gao, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2022**, 14, 1–22.
- [26] M. Jeon, M. V. Halbert, Z. R. Stephen, M. Zhang, *Advanced Materials* **2021**, 33, 1–18.

- [27] J. W. Mullin, *Crystallization*, Oxford University Press, Oxford, 4th ed., **2001**.
- [28] C. M. S. Kenneth J. Klabunde, *Nanoscale Materials in Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1st ed., **2001**, pp. 169–180.
- [29] V. K. LaMer, H. R. Dinegar, *Journal of American Chemical Society* **1950**, *72*, 4847–4854.
- [30] J. Park, J. Joo, S. G. Kwon, Y. Jang, T. Hyeon, *Angewandte Chemie* **2007**, *119*, 4714–4745.
- [31] J. Ulrich, T. Stelzer, *Crystallization*, Butterworth Heinemann, **2011**, pp. 1–63.
- [32] A. P. Alivisatos, *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 13226 – 13239.
- [33] *Nanoscale Materials in Chemistry*, (Eds.: K. J. Klabunde, R. M. Richards), John Wiley & Sons, New Jersey, second edi ed., **2009**, pp. 128–140.
- [34] F. Fievet, S. Ammar-Merah, R. Brayner, F. Chau, M. Giraud, F. Mammeri, J. Peron, J. Y. Piquemal, L. Sicard, G. Viau, *Chemical Society Reviews* **2018**, *47*, 5187–5233.
- [35] M. FIGLARZ, F. FIEVET, J.-P. LAGIER, SOISY-SUR-SEINE, *VERFAHREN ZUR REDUKTION VON METALLISCHEN VERBINDUNGEN UNTER VERWENDUNG VON POLYOLEN UND AUF DIESE WEISE HERGESTELLTES METALLISCHES PULVER.*, **1985**.
- [36] T. D. Nguyen, *Nanoscale* **2013**, *5*, 9455–9482.
- [37] S. Diewald, Y. Lan, R. Clérac, A. K. Powell, C. Feldmann, *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie* **2008**, *634*, 1880–1886.
- [38] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, **2003**, p. 3485.
- [39] M. Reiser, W. Semmler, *Magnetresonanztomographie*, Springer Berlin Heidelberg, New York, 3rd ed., **2002**.
- [40] H. Lueken, *Magnetochemie: Eine Einführung in Theorie und Anwendung*, Teubner-Studienbücher, **1999**.
- [41] J. M. D. Coey, *Magnetism of localized electrons on the atom*, **2012**, pp. 97–127.
- [42] S. Vandendriessche, W. Brullot, D. Slavov, V. K. Valev, T. Verbiest, *Applied Physics Letters* **2013**, *102*, 161903.

- [43] H. Lueken, *Magnetochemie: Eine Einführung in Theorie und Anwendung*, Vieweg+Teubner Verlag, Leipzig, 1st ed., **1999**, p. 27.
- [44] P. Hu, S. Zhang, H. Wang, D. Pan, J. Tian, Z. Tang, A. A. Volinsky, *Journal of Alloys and Compounds* **2011**, *509*, 2316–2319.
- [45] D. M. Edwards, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1983**, *36*, 213–216.
- [46] D. L. Leslie-Pelecky, R. D. Rieke, *Chemistry of Materials* **1996**, *8*, 1770–1783.
- [47] C. H. Marrows, *Advances in Physics* **2005**, *54*, 585–713.
- [48] M. Bartelmann, B. Feuerbacher, T. Krüger, D. Lüst, A. Rebhan, A. Wipf, *Theoretische Physik*, Springer Spektrum, Berlin, 1st ed., **2015**, pp. 519–530.
- [49] J. Wahsner, E. M. Gale, A. Rodríguez-Rodríguez, P. Caravan, *Chemical Reviews* **2019**, *119*, 957–1057.
- [50] Y. W. Jun, J. W. Seo, J. Cheon, *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 179–189.
- [51] M. Jeon, M. V. Halbert, Z. R. Stephen, M. Zhang, *Advanced Materials* **2021**, *33*, 1–18.
- [52] B. Derjaguin, L. Landau, *Progress in Surface Science* **1993**, *43*, 30–59.
- [53] E. J. W. Verwey, N. Laboratorium, D. Waals, *Journal of Physical Chemistry* **1946**, *51*, 631–636.
- [54] G. J. Lauth, J. Kowalczyk, *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*, Springer Berlin Heidelberg, **2016**, pp. 409–419.
- [55] E. J. Teh, Y. K. Leong, Y. Liu, B. C. Ong, C. C. Berndt, S. B. Chen, *Powder Technology* **2010**, *198*, 114–119.
- [56] T. Aslamazova, K. Tauer, *Advances in Colloid and Interface Science* **2003**, *104*, 273–283.
- [57] B. Blasiak, F. C. Van Veggel, B. Tomanek, *Journal of Nanomaterials* **2013**, *2013*, 1–12.
- [58] J. Estelrich, M. J. Sánchez-Martín, M. A. Busquets, *International Journal of Nanomedicine* **2015**, *10*, 1727–1741.
- [59] E. Terreno, D. D. Castelli, A. Viale, S. Aime, *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 3019–3042.

- [60] Vlaardingerbroek, M. T, J. A. den Boer, *Magnetic resonance imaging Theory and Practice*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York, 3rd ed., **2003**.
- [61] M. Reiser, W. Semmler, *Magnetresonanztomographie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg, 3rd ed., **2002**.
- [62] M. T. Vlaardingerbroek, J. A. den Boer, *Magnetic Resonance Imaging Theory and Practice, Vol. 3*, Springer Berlin Heidelberg, New York, 3rd ed., **2003**.
- [63] V. M. Runge, *Investigative Radiology* **2017**, *52*, 317–323.
- [64] J. Kim, N. Lee, T. Hyeon, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2017**, *375*, year.
- [65] Y. Bao, J. A. Sherwood, Z. Sun, *Journal of Materials Chemistry C* **2018**, *6*, 1280–1290.
- [66] L. Yang, I. Krefting, A. Gorovets, L. Marzella, J. Kaiser, R. Boucher, D. Rieves, *Radiology* **2012**, *265*, 248–253.
- [67] European Medicines Agency, *European Medicines Agency* **2017**, November, Document Reference: EMA/625317/2017 EMA's.
- [68] *acs.chemrev.8b00363.pdf*.
- [69] P. Reimer, T. Balzer, *European Radiology* **2003**, *13*, 1266–1276.
- [70] Y. X. Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin, *European Radiology* **2001**, *11*, 2319–2331.
- [71] Y.-X. J. Wang, *Quantitative imaging in medicine and surgery* **2011**, *1*, 35–40.
- [72] M. R. Bashir, L. Bhatti, D. Marin, R. C. Nelson, *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2015**, *41*, 884–898.
- [73] M. R. Carroll, P. P. Huffstetler, W. C. Miles, J. D. Goff, R. M. Davis, J. S. Riffle, M. J. House, R. C. Woodward, T. G. St Pierre, *Nanotechnology* **2011**, *22*, year.
- [74] U. I. Tromsdorf, O. T. Bruns, S. C. Salmen, U. Beisiegel, H. Weller, *Nano Letters* **2009**, *9*, 4434–4440.
- [75] F. Hajesmaeelzadeh, S. Shanehsazzadeh, C. Grüttner, F. J. Daha, M. A. Oghabian, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **2016**, *19*, 166–171.
- [76] A. Avasthi, C. Caro, E. Pozo-Torres, M. P. Leal, M. L. García-Martín, *Surface-modified Nanobiomaterials for Electrochemical and Biomedicine Applications*, **2020**, pp. 49–91.

- [77] S. Hak, S. Stenmark, F. F. Bjerkholt, O. Haraldseth, *Magnetic Resonance in Medicine* **2015**, *74*, 858–867.
- [78] M. H. Pablico-Lansigan, S. F. Situ, A. C. S. Samia, *Nanoscale* **2013**, *5*, 4040–4055.
- [79] T. Knopp, T. M. Buzug, *Magnetic particle imaging, Vol. 1*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg, **2012**.
- [80] J. J. Konkle, P. W. Goodwill, O. M. Carrasco-Zevallos, S. M. Conolly, *IEEE Transactions on Medical Imaging* **2013**, *32*, 338–347.
- [81] N. D. Thorat, S. A. M. Tofail, B. V. Rechenberg, H. Townley, G. Brennan, C. Silien, H. M. Yadav, T. Steffen, J. Bauer, *Applied Physical reviews* **2020**, *041306*, year.
- [82] K. Motomura, M. Ishitobi, Y. Komoike, H. Koyama, A. Noguchi, H. Sumino, Y. Kumatani, H. Inaji, T. Horinouchi, K. Nakanishi, *Annals of Surgical Oncology* **2011**, *18*, 3422–3429.
- [83] A. Kumar, A. K. Pandey, S. S. Singh, R. Shanker, A. Dhawan, *Chemosphere* **2011**, *83*, 1124–1132.
- [84] A. Lechanteur, T. Furst, B. Evrard, P. Delvenne, P. Hubert, G. Piel, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *93*, 493–503.
- [85] J. Shen, H. C. Kim, H. Su, F. Wang, J. Wolfram, D. Kirui, J. Mai, C. Mu, L. N. Ji, Z. W. Mao, H. Shen, *Theranostics* **2014**, *4*, 487–497.
- [86] A. Kumar, A. K. Pandey, S. S. Singh, R. Shanker, A. Dhawan, *Chemosphere* **2011**, *83*, 1124–1132.
- [87] G. Goloverda, B. Jackson, C. Kidd, V. Kolesnichenko, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, *321*, 1372–1376.
- [88] D. Eberbeck, F. Wiekhorst, S. Wagner, L. Trahms, *Applied Physics Letters* **2011**, *98*, 1–4.
- [89] P. Kucheryavy, J. He, V. T. John, P. Maharjan, L. Spinu, G. Z. Goloverda, V. L. Kolesnichenko, *Langmuir* **2013**, *29*, 710–716.
- [90] S. Willruth, *Entwicklung einer pyrolysefreien Synthese von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln für biomedizinische Anwendungen*, **2018**.
- [91] H. E. Swanson, H. F. McMurdie, M. C. Morris, E. H. Evans, *Standard X-Ray Diffraction Powder Patterns*, U. S Government Printing Office, Washington, 25th ed., **1967**, p. 31.

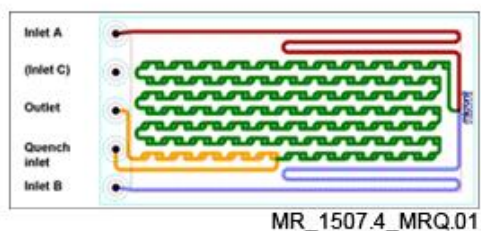
- [92] *International Centre for diffraction Data*, <https://www.icdd.com/grant-in-aid/>.
- [93] A. Ullrich, N. Rölle, S. Horn, *Journal of Nanoparticle Research* **2019**, *21*, 1–8.
- [94] C. E. Johnson, J. A. Johnson, H. Y. Hah, M. Cole, S. Gray, V. Kolesnichenko, P. Kucheryavy, G. Goloverda, *Hyperfine Interactions* **2016**, *237*, 1–10.
- [95] G. Emig in *Chemische Reaktionstechnik*, **2019**, pp. 125–244.
- [96] H. Bruus, *Choice Reviews Online* **2008**, *45*, 45–5602–45–5602.
- [97] G. Hagen, *Pogendorfs Annalen*, **1839**, p. 423.
- [98] J. L. Poisselle, *chem. Savants Etrangers* **1846**, 433.
- [99] H. Chen, J. C. Meiners, *Applied Physics Letters* **2004**, *84*, 2193–2195.
- [100] A. Wypych in *Plasticizers Databook*, ChemTec Publishing, Toronto, **2013**, Chapter Glycols, pp. 212–293.
- [101] J. Ostermann, C. Schmidtke, C. Wolter, J. P. Merkl, H. Kloust, H. Weller, *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2015**, *6*, 232–242.
- [102] N. S. Vrandečić, M. Erceg, M. Jakić, I. Klarić, *Thermochimica Acta* **2010**, *498*, 71–80.
- [103] R. Di Corato, A. Quarta, P. Piacenza, A. Ragusa, A. Figuerola, R. Buonsanti, R. Cingolani, L. Manna, T. Pellegrino, *Journal of Materials Chemistry* **2008**, *18*, 1991–1996.
- [104] E. E. Lees, T. L. Nguyen, A. H. Clayton, P. Mulvaney, *ACS Nano* **2009**, *3*, 1121–1128.
- [105] E. E. Lees, T. L. Nguyen, A. H. Clayton, P. Mulvaney, *ACS Nano* **2009**, *3*, 1121–1128.
- [106] L. E. LaConte, N. Nitin, O. Zurkiya, D. Caruntu, C. J. O'Connor, X. Hu, G. Bao, *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2007**, *26*, 1634–1641.
- [107] T. Vangijzegem, D. Stanicki, S. Boutry, Q. Paternoster, L. Vander Elst, R. N. Muller, S. Laurent, *Nanotechnology* **2018**, *29*, year.
- [108] J. Sherwood, M. Rich, K. Lovas, J. Warram, M. S. Bolding, Y. Bao, *Nanoscale* **2017**, *9*, 11785–11792.
- [109] B. Gleich, J. Weizenecker, *Nature* **2005**, *435*, 1214–1217.

- [110] T. Krasia-Christoforou, V. Socoliuc, K. D. Knudsen, E. Tombácz, R. Turcu, L. Vékás, *From single-core nanoparticles in ferrofluids to multi-core magnetic nanocomposites: Assembly strategies, structure, and magnetic behavior*, **2020**.
- [111] P. Bender, D. Honecker, L. Fernández Barquín, *Applied Physics Letters* **2019**, *115*, year.
- [112] A. Yamamoto, *Acta Crystallographica* **1982**, *B38*, 1451–1456.
- [113] Z. Yarjanli, K. Ghaedi, A. Esmaeili, S. Rahgozar, A. Zarrabi, *Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation*, **2017**.
- [114] N. Bao, A. Gupta, *Journal of Materials Research* **2011**, *26*, 111–121.
- [115] C. Paquet, L. Pagé, A. Kell, B. Simard, *Langmuir* **2010**, *26*, 5388–5396.
- [116] C. Mabilille, V. Schmitt, P. Gorria, F. Leal Calderon, V. Faye, B. Deminière, J. Biette, *Langmuir* **2000**, *16*, 422–429.
- [117] B. Amoyav, O. Benny, *Applied Nanoscience (Switzerland)* **2018**, *8*, 905–914.
- [118] D. Noel.
- [119] R. K. Shah, H. C. Shum, A. C. Rowat, D. Lee, J. J. Agresti, A. S. Utada, L. Y. Chu, J. W. Kim, A. Fernandez-Nieves, C. J. Martinez, D. A. Weitz, *Materials Today* **2008**, *11*, 18–27.
- [120] A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, H. A. Stone, D. A. Weitz, *Physical Review Letters* **2007**, *99*, 1–4.
- [121] Gestis.irtust.de, *Gefahrstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung*, **2016**.
- [122] Www.sigmaaldrich.com, *Sigma-Aldrich*.

Anhang

● Microreactors

Type	Pre-heating Section (Red)	Pre-heating Section (Blue)	Mixing Section (Green)	Quench Section (Yellow)	Total
MR_1507.4_MRQ.01	0.4ml	0.4ml	2.4ml	0.2ml	3.4ml



<Microreactor Specifications>

Material	Borosilicate Glass
Internal Volume	0.5ml - 4.0ml
Reactor Dimensions	14.6 x 7.3 x 0.4cm
Channel Dimensions	1-2mm
Operating Pressure	10bar
Operating Temperature	<100°C

Abbildung 71: Aufbau des *split and combine Mischers* von Micronit.

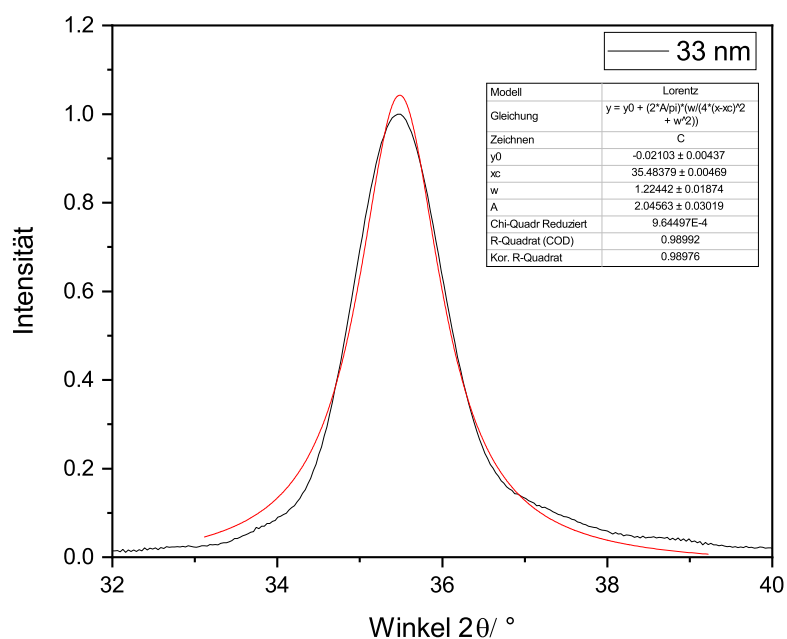


Abbildung 72: Lorentz Fit des XRDs der 33 nm Partikelagglomerate.

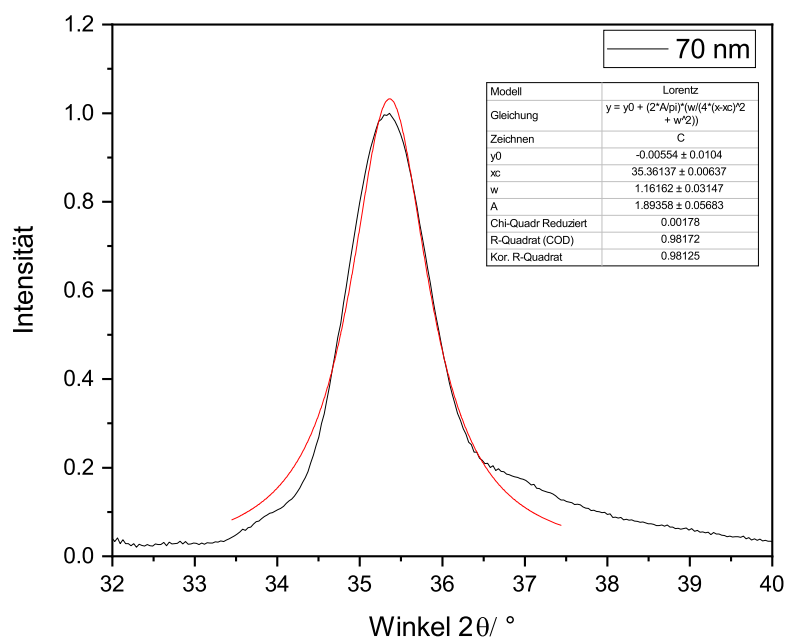


Abbildung 73: Lorentz Fit des XRDs der 70 nm Partikelagglomerate.

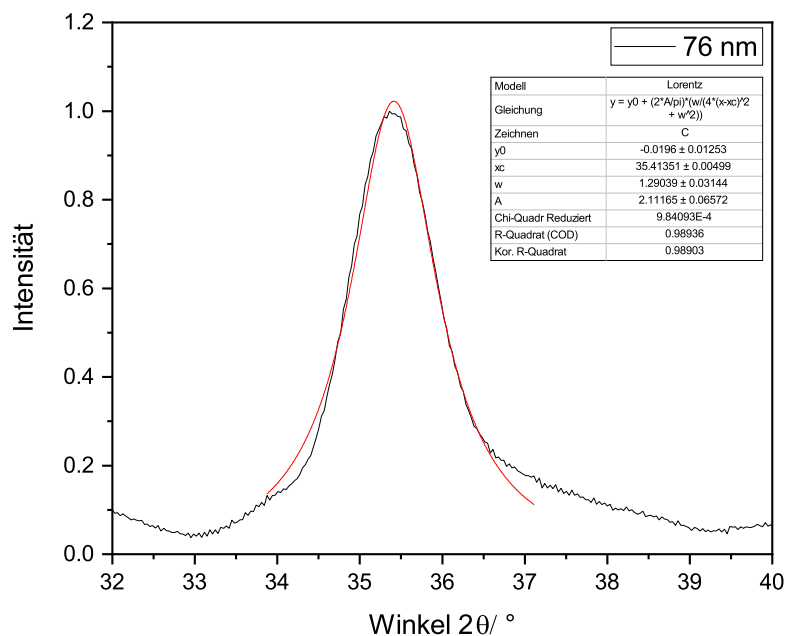


Abbildung 74: Lorentz Fit des XRDs der 76 nm Partikelagglomerate.

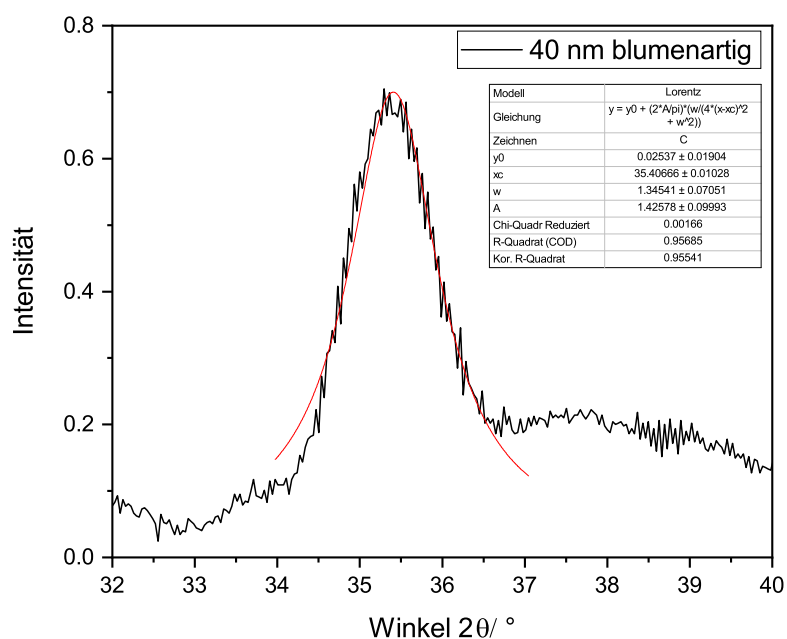


Abbildung 75: Lorentz Fit des XRDs der 40 nm blumenförmigen Partikelagglomerate.

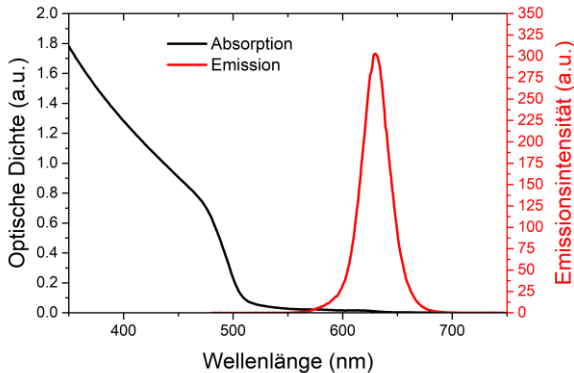
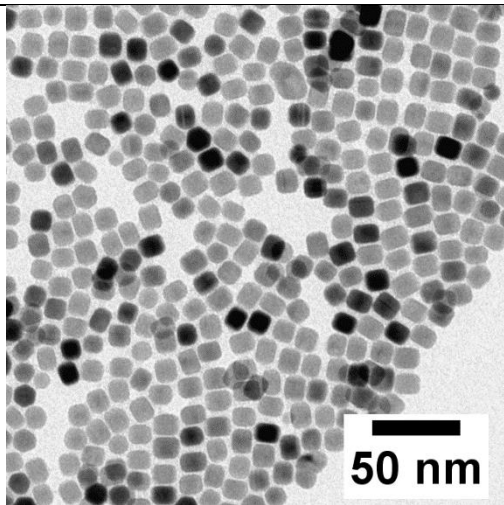
Im Folgenden ist das Datenblatt der verwendeten QDs für die Herstellung der QD-Cluster angehängt.

Datasheet

CdSe/CdS nanoparticles dispersed in hexane			
LOT number:	Cd-0-286-2f	Type:	Giant-Shell Particles CdSe/CdS
Solvent:	Hexan	Surface groups:	OA/OAm
Appearance (form):	colloid	Appearance (color):	orange/red
Concentration:	11,4 mg/mL (ges.: 500 mg)	Emission:	625 +/- 5 nm
Storage:	Do not freeze, store under room temperature		

Analysis

Data			Visualization
Absorption spectroscopy			
Absorption maximum	HWHM		
-	-		
Fluorescence Spectroscopy			
Emission-maximum	FWHM	Quantum Yield ¹	
630 nm	29	80 %	
¹ measured by integrating sphere (exc. at 450 nm)			
Transmission electron microscopy			
Diameter			
12,3 +/- 1,3 nm			
Shape	Note/comment		
spherical	--		

Danksagung

Zum Ende dieser Arbeit möchte ich noch allen Personen danken, die mich in der Zeit meiner Promotion unterstützt haben. Zuallererst danke ich Prof. Dr. Horst Weller für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die Bereitstellung dieser Arbeit und die große Freiheit bei der Forschung an meinen Projekten. Er war immer für ein Gespräch verfügbar und unterstützte mich mit vielen Tipps und leitete mir den Weg. Außerdem danke ich Prof. Dr. Alf Mews für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin will ich dem gesamten Arbeitskreis Weller für die tolle Zeit im Arbeitskreis danken. Besonders hervorheben will ich meine Bürokollegen Michael, Jil und Lea. Die Gespräche und Diskussionen mit euch haben viel Freude in den Arbeitsalltag gebracht und ich hoffe wir bleiben auch noch nach dieser Arbeit in Kontakt. Auch Steffen, Hauke, Bendix, Maik, Jana und vielen weiteren will ich danken. Ihr habt die Zeit in der Arbeit deutlich bereichert und wart immer für ein nettes Gespräch oder auch einen schöne Feier zu haben.

Stefan und Almut danke ich für die unzähligen TEM und XRD Aufnahmen, die sie im Laufe meiner Arbeit durchgeführt haben.

Danken will ich auch noch meinen Praktikanten Thomas, Hanh, Lisa, Sascha, Katrin und Jan. Sie haben mir sehr geholfen und zeigten ein hohes Interesse an meiner Arbeit. Ohne sie wäre die Arbeit nicht so geworden, wie sie ist und ich hoffe sie hatten bei der Forschung genauso viel Freude wie ich.

Zuletzt danke ich auch meiner Familie und meiner Frau Anne für die Unterstützung und dass ihr immer über die ganzen Jahre an mich geglaubt habt.

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Hamburg, Datum, Unterschrift

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt