

## 9. Materialien und Methoden

### 9.1. Einfluss der Molekülarchitektur von Polymeren auf die Stabilisierung von Eisenoxid-Partikeln

#### 9.1.1. Materialien

Eisen(III)chloridhexahydrat, Eisen(II)chloridtetrahydrat, Ammoniumhydroxid, Triphosgen,  $\gamma$ -Benzyl-L-Glutaminsäure (BGlu),  $\beta$ -Benzyl-L-Asparaginsäure (BAsp), N-Hydroxysuccinimid (NHS), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC), n-Butylamin, Natriumbicarbonat, Magnesiumsulfat, Salpetersäure, Methanol, Diethylether, Hexan, Chloroform und Tetrahydrofuran wurden von der Fa. Fluka bezogen.  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-polyethylenoxid ( $M_w = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $M_w/M_n = 1.05$ ) wurde von der Firma Rapp bezogen. N,N-Dimethylformamid (wasserfrei), Ethylacetat (wasserfrei) und Palladium-Aktivkohle (10 Gew.-%) stammten von der Fa. Aldrich. N-Butylamin wurde zur Entfernung von Wasser und anderen Aminen vor Verwendung 24 Stunden lang über Calciumhydrid getrocknet, anschließend 2-mal destilliert und über Molsieb 4A aufbewahrt. Alle anderen Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

#### 9.1.2. Synthese

##### 9.1.2.1. Synthese der N-Carboxyanhydride (NCA) der Benzyl-aminosäuren

Zuerst wurde das monomere N-Carboxyanhydrid (NCA) der Benzyl-aminosäuren (NCA-BGlu bzw. NCA-BAsp) durch Phosgenierung des BGlu bzw. BAsp mit Triphosgen synthetisiert.<sup>1</sup>

0.1 mol der Benzylaminosäure wurden in 350 ml Ethylacetat suspendiert und auf 96° C erhitzt. Eine Lösung von Triphosgen in Ethylacetat (12.3 g, 0.04 mol) wurde über eine Zeit von 4 Stunden kontinuierlich dazu getropft. Die Reaktion ist beendet, wenn aus der Suspension eine klare Lösung wird. Diese Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und 5 x mit 50 ml einer Natriumbicarbonat-Lösung (10 Gew.-%) bei 0° C gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Zum Filtrat wurde Hexan dazugegeben, bis die Kristallisation des NCAs einsetzte, und die Mischung über Nacht bei -20° C gelagert. Auskristallisiertes NCA wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Alle Schritte der NCA-Synthese wurden wasserfrei unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Die Struktur des NCA wurde in DMSO- $d_6$  mittels <sup>1</sup>H-NMR untersucht.

### 9.1.2.2. Synthese der Blockcopolymeren PEO-*b*-Glu<sub>27</sub> und PEO-*b*-Asp<sub>9</sub>

Für die Polymerisation des NCA wurde unter Schutzgasatmosphäre  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-polyethylenoxid (PEO) (3.0 g,  $7.2 \times 10^{-4}$  mol) in 140 ml DMF aufgelöst und NCA-BGlu (0.0216 mol) bzw. NCA-BAsp (0.00864 mol) dazugegeben. Die Lösung wurde 5 Tage bei 35° C gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Produkt in 50 ml Chloroform gelöst. Das Polymer wurde durch zweimaliges Ausfällen in Diethylether isoliert und im Vakuum getrocknet.

Die Entfernung der Benzylschutzgruppen erfolgte durch Hydrierung der Blockcopolymeren für 24 Stunden mit Palladium-Aktivkohle und Wasserstoff in Tetrahydrofuran-Methanol-Mischung bei Raumtemperatur. Danach wurde die Palladium-Aktivkohle abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde in destilliertem Wasser gelöst und 4 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Blockcopolymeren PEO-*b*-poly-(glutaminsäure) (PEO-*b*-Glu) bzw. PEO-*b*-poly-(asparaginsäure) (PEO-*b*-Asp) wurden durch Gefriertrocknung isoliert.

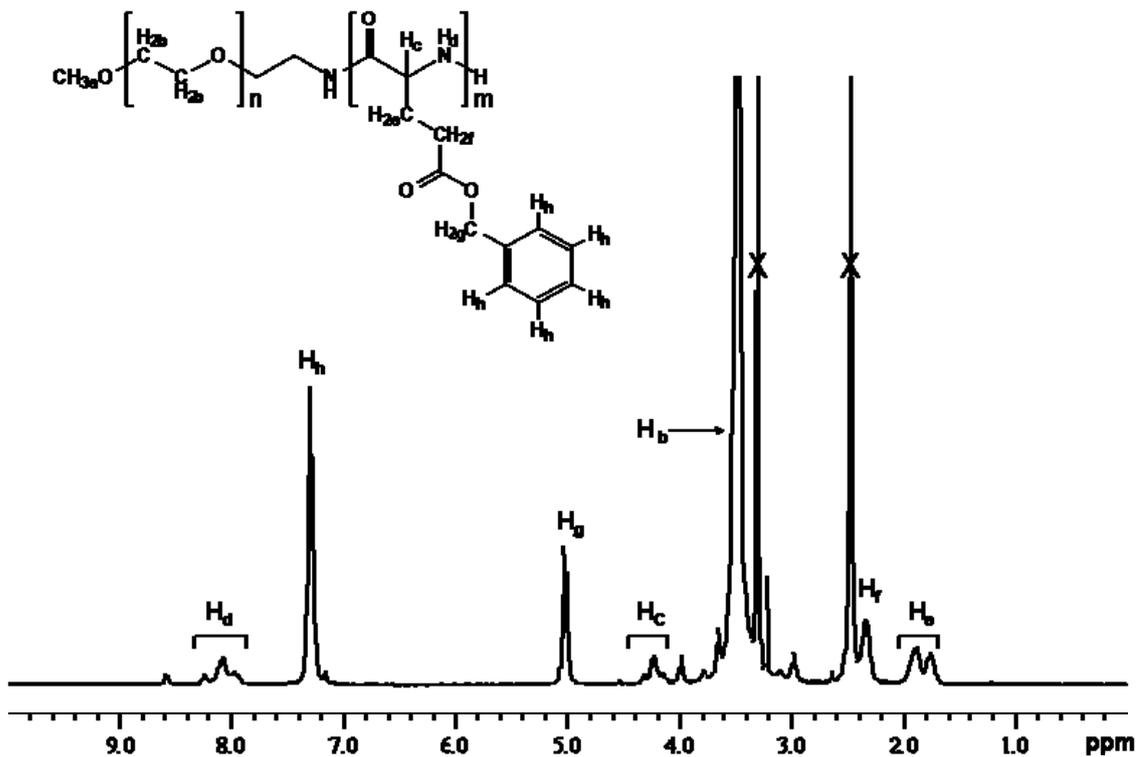


Abbildung 9.1 <sup>1</sup>H-NMR des Blockcopolymeren PEO-*b*-Glu<sub>27</sub> in DMSO-*d*<sub>6</sub>. Der DP beträgt 27.

Die Zusammensetzung der Polymere, der Polymerisationsgrad DP (*degree of polymerisation*) und die vollständige Entfernung der Benzylschutzgruppen wurden mit <sup>1</sup>H-NMR in D<sub>2</sub>O untersucht. Der DP wurde über das Verhältnis der Signalintensitäten der Protonen der Methoxygruppe des PEO ( $\delta = 3.4$  ppm als

3 Protonen gesetzt) zu den Signalintensitäten der jeweilige Aminosäure berechnet.

In Abbildung 9.1 ist als Beispiel das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des Blockcopolymers PEO-*b*-Glu<sub>27</sub> mit Benzylschutzgruppen gezeigt. Es wurden die Signalintensitäten in den Bereichen für PEO ( $\delta = 3.4$  ppm, Protonen a,  $\delta = 3.5$  bis 3.8 ppm, Protonen b, c, d, und e) und der Glutaminsäure ( $\delta = 4.3$  bis 4.4 ppm,  $\delta = 1.85$  bis 2.1 ppm und  $\delta = 2.1$  bis 2.3 ppm, Protonen f, g und h) bestimmt. Der DP beträgt 27, das heißt, es befinden sich 27 Glutaminsäure-Einheiten im Peptidblock des Polymers. Nach Hydrierung konnten keine aromatischen Gruppen nachgewiesen werden, demzufolge wurden die Benzylschutzgruppen vollständig entfernt (2 Protonen der Benzylgruppe  $\delta = 4.8$  bis 5.2 ppm und 5 aromatische Protonen der Benzylgruppe  $\delta = 7.0$  bis 7.4 ppm).

Für das Blockcopolymer PEO-*b*-Asp<sub>9</sub> betrug der DP 9, es konnten auch hier ebenfalls nach Hydrierung keine Benzylgruppen nachgewiesen werden.

### 9.1.2.3. Synthese der Homopolymere

Für die Polymerisation des NCA wurde unter Schutzgasatmosphäre *n*-Butylamin ( $6 \times 10^{-4}$  mol) als Initiator in 140 ml DMF aufgelöst und NCA-BGlu (0.02 mol) bzw. NCA-BAsp ( $7 \times 10^{-3}$  mol) dazugegeben. Die Lösung wurde 5 Tage bei 35° C gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Produkt in 50 ml Chloroform gelöst. Das Polymer wurde durch zweimaliges Ausfällen in Diethylether isoliert und im Vakuum getrocknet. Die Zusammensetzung der Homopolymere wurde mit  $^1\text{H-NMR}$  über das Verhältnis der Signalintensitäten für PEO und die Benzylaminosäuren berechnet. Dafür wurden die Signalintensitäten in den Bereichen von  $\delta = 3.42$  bis 3.52 ppm (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, 4 Protonen, Ethylenoxid-Einheit des PEO),  $\delta = 4.8$  bis 5.2 ppm (-CH<sub>2</sub>-, 2 Protonen der Benzylgruppe) und  $\delta = 7.0$  bis 7.4 ppm (5 aromatische Protonen der Benzylgruppe) bestimmt.

Die Benzylschutzgruppen wurden durch Hydrierung der Homopolymere für 24 Stunden mit Palladium-Aktivkohle und Wasserstoff in Tetrahydrofuran-Methanol-Mischung bei Raumtemperatur entfernt. Danach wurde die Palladium-Aktivkohle abfiltriert, 100 ml destilliertes Wasser dazugegeben und Tetrahydrofuran/Methanol unter Vakuum entfernt. Danach wurde die Lösung 4-mal mit je 150 ml Diethylether ausgeschüttelt und die organische Phase verworfen. Aus der wässrigen Phase wurden die Homopolymere durch Gefriertrocknung isoliert. Die Zusammensetzung der Polymere, der Polymerisationsgrad DP und die vollständige Entfernung der Benzylschutzgruppen wurden mit  $^1\text{H-NMR}$  untersucht. Es konnten keine aromatischen Gruppen nachgewiesen werden, so dass die Benzylschutzgruppen vollständig

entfernt wurden. Das Homopolymer Glu<sub>27</sub> hatte einen DP von 27, das Homopolymer Asp<sub>9</sub> einen DP von 9.

#### 9.1.2.4. Synthese der Pfropfcopolymere

Für das Pfropfcopolymer n-Butylamin-poly-(glutaminsäure)<sub>30</sub>-g-poly-(ethylenoxid)<sub>3</sub> wurde ein Homopolymer Poly-(glutaminsäure) mit 30 Einheiten Glutaminsäure (0.995 g; 0.00039 mol) in 20 ml destilliertem Wasser in einem Einhalsrundkolben unter Rühren bei Raumtemperatur gelöst. EDC (0.005 mol) und NHS (0.005 mol) wurden getrennt in je 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Zuerst wurde die EDC-Lösung unter Rühren zur Polymer-Lösung hinzugegeben und nach 3 Minuten die NHS-Lösung. Danach wurde in 10 ml destilliertem Wasser gelöstes  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-polyethylenoxid (0.0005 mol) dazugegeben und der Ansatz 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der gesamte Ansatz wurde 4 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das Pfropfcopolymer wurde durch Gefriertrocknung isoliert und die Zusammensetzung durch <sup>1</sup>H-NMR bestimmt.

Das Pfropfcopolymer n-Butylamin-poly-(glutaminsäure)<sub>30</sub>-g-poly-(ethylenoxid)<sub>9</sub> wurde mit derselben Methode hergestellt, die Substanzmengen waren dabei: Homopolymer Poly-(glutaminsäure) mit 30 Einheiten Glutaminsäure 0.0002 mol, EDC 0.007 mol, NHS 0.007 mol und PEO 0.0007 mol.

#### 9.1.2.5. Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel

Eisenoxid-Nanopartikel wurden nach der Methode von Bee *et al.* hergestellt.<sup>2</sup> Ammoniumhydroxid wurde zu einer Lösung aus Eisen(II)chlorid und Eisen(III)chlorid gegeben (Gesamtkonzentration an Eisen  $c_{\text{Eisen}} = 0.13 \text{ mol l}^{-1}$ , molares Verhältnis  $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+} = 0.5$ ). Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation isoliert, zweimal durch Rühren in destilliertem Wasser (50 ml) gewaschen und erneut durch Zentrifugation isoliert (15 Minuten bei 2500 Umdrehungen pro Minute). Danach wurde der Niederschlag in Salpetersäure (40 ml,  $2 \text{ mol l}^{-1}$ ) 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, erneut zentrifugiert und der Niederschlag durch Rühren in 50 ml destilliertem Wasser suspendiert. Der pH-Wert der resultierenden Partikel-Suspension betrug 2. Der Feststoffgehalt der Suspension wurde gravimetrisch bestimmt und betrug 7.5 Gew.-%.

### 9.1.3. Methoden

#### 9.1.3.1. <sup>1</sup>H-NMR

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden in DMSO-*d*<sub>6</sub> oder D<sub>2</sub>O mit einem Bruker DPX-400 (400 MHz) bei Raumtemperatur aufgenommen.

### 9.1.3.2. Größenausschlusschromatographie

Es wurde eine Anlage bestehend aus RI-Detektor  $\Delta n$  (WGA Dr. Bures), Autosampler AS 3000 (Spectra-Physics) und Pumpe Q 1001 (WGE Dr. Bures) verwendet. Die Messungen erfolgten bei 30 °C mit 0.2 molarer  $\text{NaNO}_3$  und 0.01 molarer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  als Eluent unter Zusatz von 10 ppm Natriumacid bei einer Flussgeschwindigkeit von  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$ . Es wurde eine PSS Suprema-Guard 100 Säule ( $300 \times 8 \text{ mm}$ , Fa. PSS) mit der Porengröße  $100 \text{ \AA}$  verwendet. Jeweils  $100 \text{ }\mu\text{L}$  einer 0.15 Gew.-% Polymerlösung wurde injiziert. Standard-Eichkurven wurden unter Verwendung von PEO-Standards (Fa. PSS) erstellt, die Auswertung erfolgte mit der Software PSS WinGPC 7.

### 9.1.3.3. Dynamische Lichtstreuung

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung wurde mit einem Malvern HPPS-ET 5002 durchgeführt (He-Ne-Laser,  $\lambda = 632.2 \text{ nm}$ ,  $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ , Detektion in Rückstreuung bei  $173^\circ$ ).  $40 \text{ }\mu\text{L}$  der zu vermessenden Probe wurden mit  $1000 \text{ }\mu\text{L}$  filtriertem Wasser ( $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter) verdünnt und in einer  $10 \times 10 \text{ mm}$  Polystyrol-Küvette vermessen.

Als hydrodynamischer Durchmesser  $D_H$  ist der intensitätsgewichtete mittlere Durchmesser der Partikel (*z-average*) angegeben.

### 9.1.3.4. Zetapotential

Das Zetapotential der Partikel wurde mit einem Zetamaster der Firma Malvern bestimmt.  $400 \text{ }\mu\text{L}$  der zu vermessenden Proben wurden mit  $4.6 \text{ ml}$  einer  $10^{-3}$  molaren Natriumchlorid-Lösung (pH-Wert 7.4) verdünnt und sofort vermessen.

## 9.1.4. Herstellung der Proben

Alle Mengen an verwendeten Feststoffen, Flüssigkeiten und Lösungen wurden über ihre Masse bestimmt, das heißt, alle benötigten Mengen wurden bei Raumtemperatur eingewogen.

Für unbeschichtete und beschichtete Partikeldispersionen beziehen sich alle Konzentrationsangaben auf  $1 \text{ g}$  der Partikeldispersion. Daraus ergibt sich bei Umrechnung der Masse  $m$  eines eingewogenen Feststoffes in seine Stoffmenge  $n$  die Angabe von Konzentrationen in den Einheiten  $[\text{mol g}^{-1}]$ , das heißt, Stoffmenge pro  $1 \text{ g}$  Partikeldispersion.

Für Lösungen bedeutet dann die folgende Konzentrationsangabe für eine wässrige PEO-Lösung mit  $c_{\text{PEO}} = 0.5 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$ , das in  $1 \text{ g}$  fertiger Lösung  $0.5 \times 10^{-5} \text{ mol}$  PEO enthalten ist.

Es wurden für jedes Polymer beschichtete Maghemit-Partikel mit unterschiedlichen Polymer-Mengen in Wasser bei pH 3, in Wasser bei pH 7.4 sowie in 0.154 molarer Natriumchlorid-Lösung bei pH 7.4 untersucht.

Alle stabilen Proben, d.h., nicht sedimentierte Proben, wurden mittels dynamischer Lichtstreuung vermessen. Für in Wasser bei pH 7.4 stabile Proben wurde zusätzlich das Zetapotential bestimmt.

#### 9.1.4.1. Unbeschichtete Maghemit-Nanopartikel

Unbeschichtete Maghemit-Nanopartikel wurden mit Reinstwasser auf einen Feststoffgehalt von  $c_{\text{Maghemit}} = 2 \text{ mg g}^{-1}$  verdünnt (entspricht 2 mg Maghemit-Feststoff in 1 g wässriger Partikeldispersion). Der resultierende pH-Wert der Dispersion betrug 2.7. Der pH-Wert wurde unter Rühren mit einem Magnetrührer durch Zugabe von Natronlauge schrittweise erhöht. Nach jeder Zugabe von Natronlauge wurde der pH-Wert mittels einer pH-Elektrode bestimmt und 0.5 ml der Partikel-Lösung für die Messung des hydrodynamischen Durchmessers entnommen.

#### 9.1.4.2. Maghemit-Nanopartikel mit PEO

Unbeschichtete Maghemit-Nanopartikel wurden mit Reinstwasser verdünnt und unter Rühren mit 2 g einer wässrigen PEO-Lösung ( $c_{\text{PEO}} = 0.5 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$ ) versetzt. Der Feststoffgehalt an Maghemit der resultierenden Dispersion betrug  $c_{\text{Maghemit}} = 2 \text{ mg g}^{-1}$ , die PEO Konzentration  $c_{\text{PEO}} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1}$  und der pH-Wert der Dispersion 4. Ein Teil der Dispersion wurde mit HCl auf pH 2 eingestellt, zur restlichen Dispersion wurde unter Rühren mit einem Magnetrührer schrittweise Natronlauge hinzugegeben. Nach jeder Zugabe der Natronlauge wurde der pH-Wert mittels einer pH-Elektrode bestimmt und 0.5 ml für die Messung des hydrodynamischen Durchmessers entnommen.

#### 9.1.4.3. Maghemit-Nanopartikel mit Copolymeren

Die Beschichtungen der Maghemit-Partikel mit den unterschiedlichen Polymeren wurden immer nach der gleichen Methode durchgeführt. Die Endkonzentration an Maghemit betrug bei allen Proben von beschichteten Partikeln  $c_{\text{Maghemit}} = 2 \text{ mg g}^{-1}$ . Für jedes Polymer wurde eine Reihe beschichteter Partikel hergestellt mit gleich bleibender Maghemit-Konzentration und ansteigender Polymer-Konzentration über mehrere Größenordnungsbereiche.

Das jeweilige Polymer wurde in Wasser gelöst ( $c_{\text{Polymer}} = 30 \text{ g l}^{-1}$ ) und der pH-Wert auf 8 mit 1 N Natronlauge eingestellt. Die zu beschichtenden Maghemit-Partikel wurden in ein Becherglas eingewogen und mit Reinstwasser verdünnt. Unter Rühren mit einem Magnetrührer wurde die Polymer-Lösung dazugegeben

und nach 3 Minuten die Menge an zugegebener Polymer-Lösung ausgewogen. Nach weiteren 15 Minuten Rühren wurden die nun beschichteten Maghemit-Partikel zu gleichen Teilen auf 3 Gefäße aufgeteilt. Im ersten Gefäß wurde der pH-Wert mit 1 N Natronlauge auf pH 7.4 eingestellt, beim zweiten Gefäß wurde der pH ebenfalls mit 1 N Natronlauge auf pH 7.4 eingestellt und darin zusätzlich unter Rühren eine entsprechende Menge Natriumchlorid aufgelöst, so dass eine 0.154 molare Natriumchlorid-Lösung entstand. Im dritten Gefäß wurden die Partikel unverändert belassen und nur der pH-Wert gemessen, der bei allen Proben pH 2.5 bis 3 betrug.

#### 9.1.4.4. Maghemit-Nanopartikel mit PEO-*b*-poly-(glutaminsäure) mit unterschiedlicher Anzahl Glutaminsäure-Einheiten

Die Beschichtung der Maghemit-Partikel erfolgte mit vier Blockcopolymeren, bestehend aus jeweils einem PEO-Block ( $M_n = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ ) und einem Glutaminsäure-Block unterschiedlicher Länge. Die Anzahl der Glutaminsäure-Monomere war dabei 2, 6, 10 und 25. Bei allen beschichteten Partikeln betrug die Maghemit-Konzentration  $c_{\text{Maghemit}} = 2 \text{ mg g}^{-1}$  und die Polymer-Konzentration  $c_{\text{Polymer}} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1}$ .

Das Polymer wurde in Wasser gelöst ( $c_{\text{Polymer}} = 30 \text{ g l}^{-1}$ ) und der pH-Wert auf 8 mit 1 N Natronlauge eingestellt. Die zu beschichtenden Maghemit-Partikel wurden in ein Becherglas eingewogen und mit Reinstwasser verdünnt. Unter Rühren wurde die Polymer-Lösung zugegeben. Nach weiteren 15 Minuten Rühren wurde der pH-Wert mit 1 N Natronlauge auf 7.4 eingestellt und die Partikelgröße mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt.

## 9.2. Stabilisierung von Maghemit-Nanopartikeln mit Poly-(ethylenimin) und Poly-(ethylenoxid)-*block*-poly-(glutaminsäure)

### 9.2.1. Materialien

Eisen(III)chloridhexahydrat, Eisen(II)chloridtetrahydrat, Ammoniumhydroxid, Triphosgen,  $\gamma$ -Benzyl-L-glutaminsäure, Natriumbicarbonat, Magnesiumsulfat, Salpetersäure, Methanol, Diethylether, Hexan, Chloroform und Tetrahydrofuran wurden von Firma Fluka bezogen,  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-polyethylenoxid ( $M_w = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $M_w/M_n = 1.05$ ) von der Firma Rapp. N,N-Dimethylformamid (wasserfrei), Ethylacetat (wasserfrei) und Palladium-Aktivkohle (10 Gew.-%) stammten von der Firma Aldrich. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Hochverzweigtes Polyethylenimin (PEI), von der BASF bezogen ( $M_w = 2.5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ ), wurde vor der Verwendung durch

Ultrafiltration gereinigt (*molecular weight cut-off* der Membran  $10^4 \text{ g mol}^{-1}$ ) und gefriergetrocknet. Nach der Reinigung wurde das Molekulargewicht des PEI mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt, es betrug  $M_w = 4 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  bei einer Polydispersität von  $M_w/M_n = 1.5$ . Das molare Verhältnis der Aminogruppen betrug 34:40:13 (primäre:sekundäre:tertiäre Aminogruppen).

### 9.2.2. Synthese

Die Synthese der Poly-(ethylenoxid)-*b*-poly-(glutaminsäure) erfolgte über eine ringöffnende Polymerisation des *N*-Carboxyanhydrids des  $\gamma$ -Glutaminsäurebenzylesters (BGlu) mit  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-poly(ethylenoxid) (PEO) als Makroinitiator und anschließender Abspaltung der Benzylschutzgruppen.

Zuerst wurde das Monomer NCA-BGlu durch Phosgenierung des BGlu mit Triphosgen synthetisiert.<sup>3</sup> BGlu (25 g, 0.1 mol) wurde in 350 ml Ethylacetat suspendiert und auf  $96^\circ \text{C}$  erhitzt. Eine Lösung von Triphosgen in Ethylacetat (12.3 g, 0.04 mol) wurde über eine Zeit von 4 Stunden kontinuierlich dazu getropft. Die Reaktion ist beendet, wenn aus der Suspension eine klare Lösung wird. Die Lösung wurde auf  $0^\circ \text{C}$  abgekühlt und  $5 \times$  mit 50 ml einer Natriumbicarbonat-Lösung (10 Gew.-%) bei  $0^\circ \text{C}$  gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Zum Filtrat wurde Hexan dazugegeben bis die Kristallisation des NCAs einsetzte, danach die Mischung über Nacht bei  $-20^\circ \text{C}$  gelagert und dann auskristallisiertes NCA-BGlu abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Alle Schritte der NCA-BGlu Synthese wurden wasserfrei unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt.

Für die Polymerisation des NCA-BGlu wurde unter Schutzgasatmosphäre  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-polyethylenoxid (3.0 g,  $7.2 \times 10^{-4} \text{ mol}$ ) in 140 ml DMF aufgelöst und NCA-BGlu (2.36 g,  $9 \times 10^{-3} \text{ mol}$ ) dazugegeben. Die Lösung wurde 5 Tage bei  $35^\circ \text{C}$  gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Produkt in 50 ml Chloroform gelöst. Das Polymer wurde durch zweimaliges Ausfällen in Diethylether isoliert und im Vakuum getrocknet. Die Zusammensetzung des Poly-(ethylenoxid)-*b*-poly-(glutaminsäure-5-benzylester) (PEO-BGlu) wurde über das Verhältnis der Signalintensitäten für PEO und die Benzylaminosäuren berechnet. Dafür wurden die Signalintensitäten in den Bereichen von  $\delta = 3.42$  bis  $3.52 \text{ ppm}$  (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, 4 Protonen, Ethylenoxid-Einheit des PEO),  $\delta = 4.8$  bis  $5.2 \text{ ppm}$  (-CH<sub>2</sub>-, 2 Protonen der Benzylgruppe) und  $\delta = 7.0$  bis  $7.4 \text{ ppm}$  (5 aromatische Protonen der Benzylgruppe) bestimmt.

Die Benzylschutzgruppen wurden durch Hydrierung des Blockcopolymers für 24 Stunden mit Palladium-Aktivkohle und Wasserstoff in einer Tetrahydrofuran-Methanol-Mischung bei Raumtemperatur entfernt. Danach wurde die Palladium-

Aktivkohle abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde in destilliertem Wasser gelöst und 4 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das Blockcopolymer Poly-(ethylenoxid)-*b*-poly(glutaminsäure) (PEO-*b*-Glu<sub>13</sub>) wurde durch Gefriertrocknung isoliert. Die Zusammensetzung des Polymers und die vollständige Entfernung der Benzylschutzgruppen wurde mit <sup>1</sup>H-NMR untersucht (400 MHz in D<sub>2</sub>O bei 25° C). Der Polymerisationsgrad DP (*degree of polymerisation*) betrug 13. Da keine aromatischen Gruppen nachgewiesen werden konnten, wurden die Schutzgruppen vollständig entfernt.

Superparamagnetische Nanopartikel wurden nach der Methode von Bee *et al.* hergestellt.<sup>4</sup> Ammoniumhydroxid wurde zu einer Lösung aus Eisen(II)chlorid und Eisen(III)chlorid gegeben (Gesamtkonzentration an Eisen  $c_{Fe} = 0.13 \text{ mol l}^{-1}$ , molares Verhältnis  $Fe^{2+}:Fe^{3+} = 0.5$ ). Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation isoliert, zweimal durch Rühren in destilliertem Wasser (50 ml) gewaschen und erneut durch Zentrifugation isoliert (15 Minuten bei 2500 Umdrehungen pro Minute). Danach wurde der Niederschlag in Salpetersäure (40 ml,  $2 \text{ mol l}^{-1}$ ) für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, erneut zentrifugiert und durch Rühren in 50 ml destilliertem Wasser suspendiert. Der pH-Wert der resultierenden Partikel-Suspension betrug 2. Der Feststoffgehalt der Suspension wurde gravimetrisch zu 1.95 Gew.-% bestimmt.

Für die Beschichtung der magnetischen Partikel mit der ersten Schicht Polymer, bestehend aus PEI, wurden 1.24 g der Partikel-Suspension mit 5.22 g destilliertem Wasser unter Rühren verdünnt und 0.42 g einer PEI-Lösung (5 Gew.-% in Wasser) dazugegeben. Die Suspension wurde für 10 Minuten gerührt. Um die Partikel anschließend mit dem zweiten Polymer zu beschichten, wurden unter Rühren 5.14 g einer Lösung aus PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> (3 Gew.-% in Wasser) zu 6.88 g der mit PEI beschichteten Partikel-Suspension gegeben. Der pH-Wert der resultierenden Suspension wurde mit 1 M HCl auf pH 7.4 eingestellt.

### 9.2.3. Charakterisierungsmethoden

#### 9.2.3.1. Dynamische Lichtstreuung

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung wurde mit einem Malvern HPPS-ET 5002 durchgeführt (He-Ne-Laser,  $\lambda = 632.2 \text{ nm}$ ,  $25 \pm 0.1 \text{ °C}$ , Detektion in Rückstreuung bei  $173^\circ$ ). 40  $\mu\text{L}$  der zu vermessenden Probe wurden mit 1000  $\mu\text{L}$  filtriertem Wasser (0.45  $\mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter) verdünnt und in einer 10 x 10 mm Polystyrol-Küvette vermessen.

### 9.2.3.2. Zetapotential

Das Zetapotential der Partikel wurde mit einem Zetamaster der Firma Malvern bestimmt. 400  $\mu\text{L}$  der zu vermessenden Proben wurden dabei mit 4.6 ml einer  $10^{-3}$  molaren Natriumchlorid-Lösung bei pH 7.4 verdünnt.

### 9.2.3.3. Röntgendiffraktometrie

Für die Röntgendiffraktometrie wurde ein Siemens D-5000 Diffraktometer verwendet (Co  $K\alpha$  Röntgenstrahlung mit  $\lambda = 0.178892$  nm). Die Proben wurden für die Untersuchung bei  $50^\circ\text{C}$  im Vakuum auf einem Glasträger getrocknet. Der Vektor der Streuung wird beschrieben durch  $q = 4 \pi/\lambda \sin(\theta)$ .

### 9.2.3.4. Mössbauer-Spektroskopie

Für die Mössbauer-Spektroskopie wurden die gleichen Proben wie für die Röntgendiffraktometrie verwendet. Die Spektren wurden bei 293 K und 78 K mit einem *constant-acceleration*-Mössbauer-Spektrometer und einer  $^{57}\text{Co}$ -Strahlungsquelle mit einer Aktivität von 0.3 GBq aufgenommen. Ein Proportionalzähler mit einer Spannung von 1800 V wurde zur Detektion der Spektren benutzt. Die Proben (100 mg) befanden sich in einem verschließbaren Zylinder aus Polyethylen mit einem inneren Durchmesser von 19 mm. Die Mössbauer-Spektren wurden mit einer maximalen Geschwindigkeit von 3.1 mm pro Sekunde aufgenommen, als Referenz zur Auswertung diente Standard-Folie aus  $\alpha$ -Eisen.

### 9.2.3.5. Raman-Spektroskopie

Raman-Spektren wurden in Rückstreuung mit einem Dilor-Detektor bei Raumtemperatur durch einen stickstoffgekühlten Multikanal-Detektor aufgenommen. Die Proben wurden mit einem Argon-Ionen-Laser ( $\lambda = 514.4$  nm) angeregt. Der Laserstrahl wurde auf die Oberfläche der Proben mit einem Durchmesser von  $2 \mu\text{m}$  fokussiert. Zur Anregung der Proben wurde eine Energie von 2 mW bis 10 mW verwendet, was eine Energiedichte von 0.2 bis  $1.0 \text{ mW cm}^{-2}$  ergab. Die Spektren wurden mit einer Integrationszeit von 100 Sekunden (2- bis 10-fache Akkumulation) und einer Auflösung von  $1 \text{ cm}^{-1}$  aufgenommen.

### 9.2.3.6. Magnet-Resonanz-Tomographie

Die beschichteten Nanopartikel wurden *in vivo* auf ihre Verwendbarkeit als Kontrastmittel in der Magnet-Resonanz-Tomographie an Ratten untersucht. Dafür wurden männlichen anästhesierten Wistar-Ratten (250 bis 300 g Körpergewicht, Harlan-Winkelmann, Borcheln) die beschichteten Nanopartikel (Dosierung: 0.6 mg Fe / kg Körpergewicht) intravenös appliziert. Die Anästhesie

erfolgte durch intraperitoneale Applikation eines Gemisches von Ketaminhydrochlorid (90 mg / kg Körpergewicht; Serumwerk Bernburg) und Xylazinhydrochlorid 2 % (10 mg / kg Körpergewicht; Bayer). Die Tiere wurden in einem 3 Tesla Magnet-Resonanz-Scanner untersucht (Signa<sup>®</sup> 3T, General Electric Healthcare, Milwaukee). Axiale Aufnahmen der Leber der Ratten wurden mit einer Kniespule (General Electric Healthcare, Milwaukee) vor und 10 Minuten nach intravenöser Applikation der Nanopartikel gemacht.

Die verwendeten Messparameter zur hochauflösenden Darstellung der Leber (6 axiale Leberschnitte) sind aus Tabelle 9.1 ersichtlich.

Wichtung	T2
Sequenz	Gradient echo sequence
Repetition time	3500 ms
Echo train length	12 ms
Effective echo time	80 ms
Field of view	10 × 6 cm
Slice thickness	3 mm
Scan time	4 min 37 s
In plane resolution	0.25 × 0.16 mm

Tabelle 9.1 Messparameter der Magnet-Resonanz-Tomographie Untersuchungen an Ratten.

## 9.3. Komplexe aus Diminazen und Poly-(ethylenoxid)-poly-(glutaminsäure)

### 9.3.1. Materialien

$\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-poly-(ethylenoxid), Diminazenaceturat und Tris-HCl (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol-hydrochlorid) wurden von Fa. Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die Synthese der Poly-(ethylenoxid)-*b*-poly-(glutaminsäure) erfolgte über eine ringöffnende Polymerisation der N-Carboxyanhydride der  $\gamma$ -Benzylglutaminsäure mit  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-poly-(ethylenoxid) als Makroinitiator<sup>5</sup> und anschließender Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen.<sup>6</sup> Das Molekulargewicht des Makroinitiators betrug für alle synthetisierten Polymere  $M_n = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ , das entspricht etwa 110 Monomer-Einheiten Ethylenoxid. Es wurden Polymere mit unterschiedlicher Anzahl Glutaminsäure-Einheiten synthetisiert. Die Anzahl der Glutaminsäure-Einheiten waren dabei 6 (PEO-*b*-Glu<sub>6</sub>), 10 (PEO-*b*-Glu<sub>10</sub>), 16 (PEO-*b*-Glu<sub>16</sub>), 20 (PEO-*b*-Glu<sub>20</sub>) und 25 (PEO-*b*-Glu<sub>25</sub>). Die Herstellung einiger in diesem Kapitel verwendeter Polymere und eine Veröffentlichung zu deren Synthese,

Charakterisierung und Anwendung als Additive für die Biomineralisierung erfolgte durch Kasparova *et al.*<sup>7</sup>

## 9.3.2. Methoden

### 9.3.2.1. UV-VIS-Differenz-Spektren

UV-VIS-Spektren wurden an einem Cary 1 UV-VIS-Spektrometer der Fa. Varian gemessen. Die Messungen erfolgten in Doppelkammer-Küvetten (Suprasil, Fa. Helma) mit  $2 \times 4.375$  mm Lichtweg bei  $25 \pm 1$  °C (Lauda Thermoregulator). Die Messungen der Proben erfolgten durch Aufnahme von UV-Differenz-Spektren.

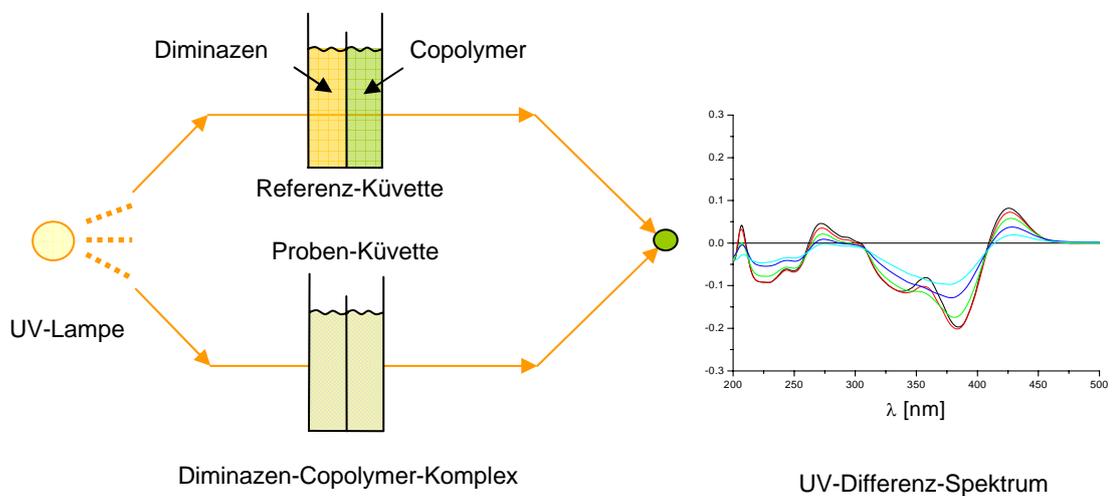


Abbildung 9.2 Schema der Messanordnung der UV-Differenz-Messungen. Der Strahl der UV-Lampe wird geteilt und durch zwei Doppelkammer-Küvetten geleitet. In der Referenz-Küvette befindet sich in der ersten Kammer eine Diminazen-Lösung und in der zweiten Kammer eine Lösung des Blockcopolymer PEO-*b*-Glu. In der Proben-Küvette werden beide Lösungen zur Komplexbildung miteinander vermischt.

Für die Aufnahme einer Basislinie wurde sowohl in die Proben- als auch in die Referenz-Doppelkammer-Küvette eine Diminazen-Lösung (erste Kammer) und eine PEO-*b*-Glu-Lösung (zweite Kammer) eingefüllt und in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 500 nm vermessen.

Das so erhaltene Spektrum wurde als Basislinie verwendet. Danach wurden die beiden Lösungen der Proben-Küvette durch starkes Schütteln miteinander vermischt. Dadurch bildete sich in der Proben-Küvette ein Diminazen-PEO-*b*-Glu-Komplex, der in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 500 nm vermessen wurde. Das so erhaltene Spektrum wurde um die vorher

aufgenommene Basislinie korrigiert. Eine schematische Darstellung der Messanordnung ist in Abbildung 9.2 zu sehen.

### 9.3.2.2. Circular dichroismus

Circular dichroismus-Spektren wurden mit einem Spektrometer J715 der Fa. Jasco im fernen UV (190 nm bis 260 nm) aufgenommen, um die Elliptizität  $\theta$  der Diminazen-PEO-*b*-Glu-Komplexe zu bestimmen.

### 9.3.2.3. Dynamische Lichtstreuung

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung erfolgte an einem HPPS 3.3-ET der Fa. Malvern bei 25 °C.

### 9.3.2.4. Komplexierung

Die Löslichkeit von PEO-*b*-Glu in wässriger Lösung sinkt mit steigender Kettenlänge des Glutaminsäure-Blocks. Bei pH 7 bilden sich ab einer Länge von 10 Glutaminsäure-Einheiten opake Lösungen in Wasser. Aus diesem Grund wurden alle Messungen in einem 25 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7.4 durchgeführt. In diesem Puffer waren alle Blockcopolymere klar löslich.

Das UV-Spektrum von Diminazen zeigt eine starke Absorption mit einem Maximum bei 368 nm (Abbildung 5.2, gestrichelte Linie). Der Extinktionskoeffizient von Diminazen wurde in destilliertem Wasser bei 368 nm bestimmt und betrug  $\varepsilon = (26500 \pm 2300) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Der durchschnittliche Extinktionskoeffizient in physiologischer Kochsalzlösung ( $c_{\text{NaCl}} = 0.154 \text{ mol l}^{-1}$ ) und in 25 mM Tris-HCl-Puffer besitzt dieselbe Größe innerhalb der Grenzen des Messfehlers. Die starke Absorption von Diminazen beschränkte die zur Komplexbildung verwendete Konzentration an Diminazen bei Aufnahme der UV-Spektren. Um die erste Kammer der Proben-Küvette zu füllen, wurde eine 0.1 mM Diminazen-Lösung verwendet, die zweite Kammer wurde mit PEO-*b*-Glu-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen gefüllt. Nach Mischen der beiden Lösungen zur Bildung des Diminazen-PEO-*b*-Glu-Komplexes ergab sich daraus eine Konzentration von 0.05 mM Diminazen. Durch die Verwendung von unterschiedlichen PEO-*b*-Glu-Konzentrationen ergaben sich die folgenden Verhältnisse an Glutaminsäure-Einheiten zu Diminazen ( $n_{\text{Glutaminsäure}} : n_{\text{Diminazen}}$ ) von 8, 4, 2, 1 und 0.5.

Der mittlere Extinktionskoeffizient von PEO-*b*-Glu wurde in 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) bei 206 nm mit  $\varepsilon = (2210 \pm 140) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für eine Glutaminsäure-Einheit bestimmt. In Abbildung 5.2 ist zu erkennen, dass es keine Überschneidung der Absorptionsbanden von Diminazen und PEO-*b*-Glu gibt und dass die Absorption des Tris-HCl-Puffers in diesem Bereich vernachlässigbar ist.

## 9.4. Synthese von Blockcopolymeren durch Polymerisation von N-Carboxyanhydriden

### 9.4.1. Materialien

$\gamma$ -Benzylglutaminsäure,  $\beta$ -Benzylasparaginsäure und Triphosgen wurden von Fluka bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die N-Carboxyanhydride der Aminosäuren wurden in THF aus  $\gamma$ -Benzylglutaminsäure und  $\beta$ -Benzylasparaginsäure mittels Phosgenierung mit Triphosgen synthetisiert.<sup>10</sup>  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-poly-(ethylenoxid) (PEO) wurde von Fluka oder der Fa. Rapp Polymere GmbH bezogen ( $M_n = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ ). Vor Verwendung wurde das PEO in einer THF-Wasser-Mischung gelöst und unter Zugabe von HCl das entsprechende Ammoniumchlorid gebildet.<sup>15</sup> Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das isolierte Polymer nach erneutem Lösen in Benzol gefriergetrocknet.

### 9.4.2. Methoden

#### 9.4.2.1. NCA-Polymerisation

Der Makroinitiator  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-poly-(ethylenoxid) (PEO) wurde in DMF gelöst. Danach wurde das in DMF gelöste NCA der Benzylaminosäure hinzugegeben und die Mischung einige Tage gerührt (genaue experimentelle Bedingungen siehe Tabelle 6.1). Alle Schritte der Polymerisation müssen unter wasserfreien Bedingungen und Schutzgas-Atmosphäre ablaufen. Nach Beendigung der Polymerisation wurde die Lösung unter Hochvakuum konzentriert und das Polymer zweimal in Petrolether ausgefällt. In einigen Fällen enthielt das Produkt geringe Mengen des Homopolymers Poly-(BGLu) bzw. Poly-(BAsp) verursacht durch Spuren von Wasser. Diese Homopolymere wurden durch selektives Ausfällen der Diblock-Copolymere in kaltem DMF bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  abgetrennt.<sup>8</sup>

#### 9.4.2.2. Größenausschluss-Chromatographie

Es wurde eine Anlage der Fa. Thermo Separation Products (TSP) mit UV-Detektor (TSP UV1000) und RI-Detektor (Shodex RI-71) verwendet. Die Messungen erfolgten bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  mit N-Methylpyrrolidon und Zusatz von  $0.5 \text{ } \%$  (m/m) LiBr als Eluent bei einer Flussgeschwindigkeit von  $0.8 \text{ ml min}^{-1}$ . Es wurden zwei PSS-Gram<sup>®</sup>-Säulen ( $300 \times 8 \text{ mm}$ , Fa. PSS) mit den Porengrößen  $100 \text{ \AA}$  und  $1000 \text{ \AA}$  verwendet. Jeweils  $100 \text{ } \mu\text{L}$  einer  $0.15 \text{ Gew.-%}$  Polymer-

lösung wurde injiziert. Standard-Eichkurven wurden unter Verwendung von PEO-Standards (Fa. PSS) erstellt.

#### 9.4.2.3. <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden in DMSO-*d*<sub>6</sub> mit einem Bruker DPX-400 (400 MHz) aufgenommen. Die Zusammensetzung der Copolymere wurde durch das Verhältnis der Signalintensitäten für PEO und die Benzylaminosäuren berechnet. Dafür wurden die Signalintensitäten in den Bereichen von  $\delta = 3.42$  bis 3.52 ppm (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, 4 Protonen, Ethylenoxid-Einheit des PEO),  $\delta = 4.8$  bis 5.2 ppm (-CH<sub>2</sub>-; 2 Protonen der Benzylgruppe) und  $\delta = 7.0$  bis 7.4 ppm (5 aromatische Protonen der Benzylgruppe) bestimmt.

#### Referenzen

- <sup>1</sup> Penczek, S., *Models of Biopolymers by Ring-Opening Polymerization*. CRC Press: Boca Raton **1990**, 388.
- <sup>2</sup> Bee, A.; Massart, R.; Neveu, S., Synthesis of very fine maghemite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1995**, 149, 6-9.
- <sup>3</sup> Penczek, S., *Models of Biopolymers by Ring-Opening Polymerization*. CRC Press: Boca Raton, 1990, p.388.
- <sup>4</sup> Bee, A.; Massart, R.; Neveu, S., Synthesis of very fine maghemite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1995**, 149, 6-9.
- <sup>5</sup> Yotzoyama, M.; Inue, S.; Kataoka, K.; Yui, N.; Sakurai, Y. *Makromol. Chem., Rapid. Comm.* **1987**, 8, 431
- <sup>6</sup> Yang, J.-Z.; Autoun, S.; Ottenbrite, R. M.; Milstein, S. *J. Bioactive and Compatible Polym.* **1996**, 11, 219
- <sup>7</sup> Kasparova, P.; Antonietti, M.; Cölfen, H. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Surfaces* **2004**, 250, 153-162
- <sup>8</sup> Hruska, Z.; Riess, G.; Goddard, P. *Polymer* **1993**, 34, (6), 1123-1344.