

Multifunktionale Magnetische Kern-Schale-Nanopartikel für Biomedizinische Anwendungen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von

Thorsten Gelbrich

aus Hilden

Oktober 2009

Aus dem Institut für Organische Chemie und Makromolekulare
Chemie
der Heinrich-Heine-Universität

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Heinrich-Heine-Universität

Referent: Dr. Annette M. Schmidt
Korreferent: Prof. Dr. Helmut Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2009

**Multifunktionale Magnetische
Kern-Schale-Nanopartikel für
Biomedizinische Anwendungen**

Dissertation

von

Thorsten Gelbrich

Danksagung

Frau Dr. Annette M. Schmidt danke ich für die interessante Themenstellung und die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Ich habe während meiner Promotion sehr viel von ihr gelernt und abgeguckt, was mir auf meinem weiteren wissenschaftlichen Weg sicherlich von großem Nutzen sein wird. Dafür möchte ich mich besonders bedanken. Auch für Hilfestellungen und konstruktive Diskussionen zu jedem Zeitpunkt dieser Arbeit sowie die Möglichkeit auf internationalen Tagungen meine Arbeit präsentieren zu können danke ich ihr sehr.

Prof. Dr. Helmut Ritter danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und die stete Gastfreundschaft in seinem Institut.

Mein besonderer Dank geht raus an alle meine Kollegen und Freunde des Instituts und der Fakultät. Ohne ihre Unterstützung sowohl in fachlichen Fragen, als auch abseits der Chemie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dazu gehören die „Schmidtis“ und die Crew des Labors 35 und des Büros 27, sowie: Patricia Bach, Dr. Mina Tabatabai, Dr. Jens Bietz, Dr. Alenka Dimec, Gernot U. Marten, Bernd Müller, Dr. Sebastian Sinnwell, Dr. Andrew J. Smith, Dr. Christopher Steffens und Dr. Andreas Kaiser. Den Doktoren Sinnwell und Kaiser bin ich dabei zu besonderem Dank verpflichtet, da sie zu jeder Tages und Nachtzeit ein offenes Ohr für mich hatten und ich ohne den ein oder anderen kaiserlichen Rat nicht weiter gekommen wäre, also Danke Jungs! Ansonsten Danke ich Allen für tolle Abende voll frittierter Leckereien.

Die Entstehung dieser Arbeit wurde praktisch von vielen fleißigen Studentenhänden begleitet, denen ich an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte, namentlich waren das: Moritz Winkler, Gernot U. Marten, Mathias Feyen, Rene Barkschat, Ayse Oezbas, Philip Bialach, Yixian Chen und Arkus Maciollek. Moritz Winkler (HIWI Nr. 1) und Gernot Ulf Marten (HIWI Nr. 2) haben in besonderer Weise Strich für Strich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen, dabei konnte Gernot oftmals durch seine dimensional Vorteile gegenüber der Nanowelt zum Gelingen der Experimente beitragen. Herzlichen Dank für Euren Einsatz.

Über die letzten Jahre habe ich mit verschiedenen Arbeitsgruppen zusammengearbeitet und möchte mich hiermit für die guten und konstruktiven Kooperatio-

nen bedanken. Prof. Dr. Jürgen Schrader, Dr. Michael Reinartz und Dr. Barbara Emde, Universität Düsseldorf, danke ich sehr für die biomedizinische Testung meiner Materialien. Ich danke Christian Schlemmer, IMTEK Freiburg, für das Anfertigen von TEM-Aufnahmen und Prof. Dr. Walter Frank, Universität Düsseldorf, für das zur Verfügungstellen des HF-Generators. Den Kooperationspartnern und Kollegen des SPP 1104 der DFG und dabei vor allem Dr. Silvio Dutz, Dr. Robert Müller, Dr. Konstanze Aurich, danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung, die offenen Ohren und die guten Ratschläge über die gesamte Zeit meiner Ausbildung. Ich weiss, dass das nicht selbstverständlich ist. Meiner Freundin Agnes danke ich zu tiefst für die Geduld und Motivation in den letzten Monaten, auch wenn es nicht immer einfach war. Ihre unterstützenden Worte und Taten haben massgeblich zum erfolgreichen Beenden dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank!

Abstract

Within this thesis nanoscaled, hydrophilic, magnetic polymer hybrid materials have been synthesized and tested for their use in biomedical application.

Magnetic magnetite nanoparticles were surrounded by polymeric shells composed of different methacrylates via surface initiated ATRP. Due to the anchoring of the polymer chains on the particle surface and the high grafting density, brush-like architectures could be obtained. The thickness of the polymer shell and therefore the hydrodynamic diameter of the particles was tailorable by the molar mass of the surface immobilized polymer chains.

For poly(methoxyethyl methacrylate) coated nanoparticles an upper critical dispersion behavior was found in methanol, leading to the thermoreversible agglomeration of the magnetic brush-particles in the carrier medium below a critical temperature. In the agglomerated state, the particles can be separated easily by low magnetic field gradients. The critical temperature was adjusted by the molar mass of the polymer chains. By copolymerization of methoxyethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol)methyl ether methacrylate magnetic polymer brushes were obtained, showing a lower critical dispersion behavior in water. The critical temperature for this system is tailorable by the copolymer composition.

Magnetic carrier for the effective separation of biomedical interesting target molecules were realized by functionalization of magnetic brush particles with active-ester binding sites. In model experiments, a high binding capacity for amino-functional molecules and the facile separation of the nanocarriers were demonstrated.

The immobilization of trypsin on the particle surface led to magnetic biocatalysts. In kinetic studies on a model system, the high catalytic activity of the obtained magnetic trypsin catalysts were shown. Furthermore magnetic polymer brushes were successfully used for the intrinsic heating of liquids by application of suitable oscillating magnetic field.

Beside the polymer brush particles magnetic nanoclusters covered by a carboxymethyl dextrane shell were investigated. The clusters were separated into different samples according to their size by fractionated centrifugation. Each obtained size fraction was subsequently investigated by dynamic light scattering to detect the average hydrodynamic diameter. As a result a linear relationship

between the cluster size and the G force given during centrifugation was found. Furthermore, in heating experiments it was shown that the nanoclusters could be used to transform magnetic energy applied by an oscillating magnetic field effectively in heat energy. Thus the clusters may contribute to basic developments in the field of hyperthermia.

„I am just a chap who messes around in the lab.“

Frederick Sanger, Konversation mit Max Perutz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	MNP und ihr Potenzial für Biomedizinische Anwendungen	2
1.1.1	Magnetische Separation	3
1.1.2	Hyperthermie	7
1.1.3	Magnetic Resonance Imaging (MRI)	10
1.1.4	Wirkstofffreisetzung und Wirkstoffpositionierung	12
1.2	Besondere Anforderung an MNP in biologischen Systemen . . .	14
1.3	Herstellung und Stabilisierung von hydrophilen MNP	16
1.3.1	Stabilisierung von MNP	20
1.4	Multifunktionale MNP	25
2	Aufgabenstellung	29
3	Überblick über die veröffentlichten Arbeiten	31
3.1	Synthese magnetischer Polymerhybridmaterialien	32
3.1.1	Synthese und Oberflächenfunktionalisierung magnetischer Nanopartikel	33
3.1.2	Oberflächeninitiierte ATRP	37
3.1.3	Magnetische Polymercluster	41
3.2	Thermoresponsives Dispersionsverhalten	42
3.2.1	UCST-Verhalten	43
3.2.2	LCST-Verhalten	45
3.3	Potentielle Biomedizinische Anwendung	47
3.3.1	Magnetische Separation	48
3.3.2	Magnetische Zellmarkierung und -separation	51
3.3.3	Biokatalyse	53
3.3.4	Magnetische Erwärmung	55
4	Zusammenfassung	59

Inhaltsverzeichnis

Literaturverzeichnis	63
Abbildungsverzeichnis	75
Symbolverzeichnis	77
Anhang	81

1 Einleitung

Mit Ende des zwanzigsten und Beginn des einundzwanzigsten Jahrhunderts ist eine fächerübergreifende Forschungsrichtung in vielen akademischen und industriellen Instituten in den Vordergrund getreten, die als Nanotechnologie bezeichnet wird. Hinter diesem Begriff verbirgt sich die Technologie, die die Größendimension der Nanometer (10^{-9} m) betrachtet. Das rasant wachsende Forschungsinteresse auf diesem Gebiet basiert auf der Tatsache, dass sich durch Reduktion der Dimension vieler Materialien auf eine Größe von 1 - 100 nm die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften z. T. dramatisch ändern.^[1] Es können so neuartige Materialeigenschaften erzeugt werden, die sowohl akademisch als auch wirtschaftlich von großem Interesse sind.

Die Nanotechnologie ist das Resultat der konsequenten Miniaturisierung, die in den 1970er Jahren mit der Mikroelektronik begann und die nach der Mikrosystemtechnik in den 1980ern und der Biotechnologie in den 1990ern zu den größten Trends in der modernen Forschung zählt.^[2] Der Nanotechnologie wird ein ähnlich großer Einfluß auf Wirtschaft und Gesellschaft vorhergesagt, wie der der Halbleiter- und Informationstechnologie oder der Zell- und Molekularbiologie. Viele Forscher sind sogar der Ansicht, dass die Nanotechnologie eine nächste industrielle Revolution auslösen wird.^[1]

Der Beginn der Nanotechnologie wird allgemein auf einen Vortrag des Nobelpreisträgers Richard Feynman im Jahr 1959 an der Universität Berkeley datiert.^[3] Feynman skizzierte in seinem Vortrag mit dem Titel *There 's Plenty of Room at the Bottom* die Vision, dass Physiker durch Manipulation einzelner Atome chemische Substanzen Atom für Atom so aufbauen können, wie es Chemiker vorgeben. Er stellte darüber hinaus die Frage an sein Auditorium, wie es möglich gemacht werden könne, die gesamten 24 Bände der Encyclopaedia Britannica auf einen Stecknadelkopf zu drucken. Zum Zeitpunkt des Vortrages gab es jedoch kein Werkzeug, um einzelne Atome oder Moleküle abzubilden oder zu manipulieren. Erst mit der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops (RTM) durch Heinrich Rohrer und Gerd Binnig 1981, 1986 mit dem Nobelpreis

1 Einleitung

für Physik ausgezeichnet, konnte ein solches Werkzeug erhalten werden.^[4-6] Mit dem RTM war es erstmals möglich, durch Abtasten von Oberflächen einzelne Atome sichtbar zu machen und sogar zu manipulieren, wie es Don Eigler und Erhard Schweizer 1989 demonstrierten.^[7] Sie erzeugten durch kontrolliertes Verschieben von Xenonatomen auf einer Nickeloberfläche den Schriftzug *IBM* (s. Abb. 1.1). Seit diesem Meilenstein in der Nanotechnologie

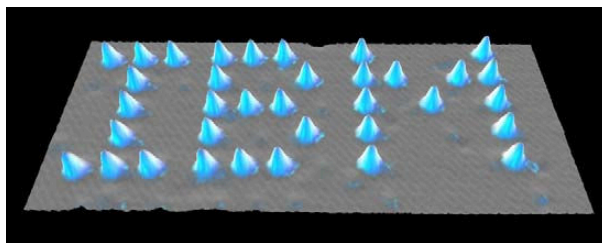


Abb. 1.1: IBM Schriftzug erhalten durch Manipulation von 35 Xenonatomen auf einer Nickeloberfläche; Quelle:www.ibm.com

ist die Entwicklung und Erforschung nanoskaliger Materialien rasant voran geschritten. Mittlerweile sind große Industriezweige, von der Halbleiter- und Automobilindustrie, bis hin zur Kosmetik- und Lebensmittelindustrie auf die neuartigen Materialien aufmerksam geworden. In vielen Anwendungen finden dabei anorganische Nanopartikel ihren Einsatz z.B. als Additive in Lacken, Farben oder Treibstoffen, als Katalysatoren, als Beschichtungsmaterialien z.B. für Scheiben und als UV-Absorber in Sonnencremes.^[8] Auch in der medizinischen Forschung werden Nanomaterialien und dabei besonders magnetische Nanopartikel (MNP) als zukunftsweisende Materialien für die Entwicklung neuer Therapie- und Diagnoseverfahren diskutiert.

1.1 MNP und ihr Potenzial für Biomedizinische Anwendungen

Mit der rasanten Entwicklung der Nanotechnologie innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte wurde auch die Synthese, Charakterisierung und Modifikation von Nanopartikeln vorangetrieben. Damit wurden Materialien zugänglich, die für biomedizinische und diagnostische Anwendungen von großem Interesse sind.^[9-14]

Anorganische Nanopartikel können aufgrund ihrer Größe als Intermediate zwischen dem molekularen und dem makroskopischen Zustand beschrieben werden. Sie kombinieren die chemische Zugänglichkeit von Molekülen in Lösung mit den physikalischen Eigenschaften von Feststoffen und können daher als Basis für den Aufbau von nanostrukturierten Materialien mit einstellbaren physikalischen und chemischen Eigenschaften dienen.^[12]

Magnetische Nanopartikel (MNP) wurden erstmals 1957 zur *in vitro* Diagnostik verwendet und sind seit dem für die Forschung von wachsendem Interesse.^[15] Besonders superparamagnetische Nanopartikel werden intensiv untersucht, da diese praktisch keine magnetische Remanenz aufweisen und nur in einem externen Magnetfeld eine Magnetisierung zeigen. Durch geeignete Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche können die magnetischen Kerne für verschiedene biomedizinische Anwendung maßgeschneidert werden. Vier wichtige Anwendungsgebiete in der biomedizinischen Forschung werden in den folgenden Abschnitten betrachtet.

1.1.1 Magnetische Separation

Das Prinzip der magnetischen Separation basiert auf der Abtrennung von magnetischen von nicht magnetischen Komponenten aus einer Mischung durch Anlegen eines magnetischen Feldes. Dieses Prinzip wird in industriellen Anwendungen schon lange genutzt, um z.B. Eisenerze anzureichern.^[16] Die Nutzung der magnetischen Separation für biologische Systeme ist jedoch schwierig, da die meisten biologisch interessanten Komponenten, wie z.B. Proteine, nicht magnetisch sind. Erst mit der Verwendung von magnetischen Partikeln als Fänger für diese Zielkomponenten in den 1970er Jahren konnte die magnetische Separation effektiv genutzt werden.^[16] Mittlerweile stellt die Separation mit magnetischen [Nano- und] Mikropartikeln eine einfache, schnelle und leistungsfähige Aufreinigungstechnik dar, um Biomoleküle (Antikörper, Peptide, Nukleinsäuren, Enzyme) und sogar Zellen, Bakterien und Viren aus komplexen Biologischen Systemen (z.B. Blut, Plasma, Zellysat) zu separieren. Dabei werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Anwendungen verfolgt.

Als magnetische Fänger werden magnetische Partikel eingesetzt, die aus superparamagnetischen Nanopartikelkernen (5 nm - 15 nm) und einer Polymerhülle zusammengesetzt sind. Für die Separation werden überwiegend Multikernpar-

tikel ($0,5\ \mu\text{m} - 10\ \mu\text{m}$) verwendet, bei denen mehrere superparamagnetische Primärpartikel in einer Polymermatrix verteilt vorliegen. Darüber hinaus werden anorganisch umhüllte Partikel, auf Basis von Metallen (z.B. Au) oder Silica, als magnetische Fänger eingesetzt.^[12]

Die Effektivität der verwendeten magnetischen Partikel für Separationsanwendungen hängt von zwei Faktoren ab. Auf der einen Seite sollen die Partikel ein möglichst hohes magnetisches Moment aufweisen, um mit möglichst kleinen magnetischen Feldgradienten abgetrennt werden zu können, und auf der anderen Seite soll eine möglichst große Anzahl an Bindungsstellen für Zielkomponenten vorhanden sein. Viele der kommerziell erhältlichen Partikel zur magnetischen Separation basieren auf den erwähnten Multikernpartikeln. Diese weisen, aufgrund der Verteilung vieler Primärpartikel innerhalb einer Polymermatrix, eine starke Wechselwirkung mit äußeren Magnetfeldern auf und lassen sich sehr leicht abtrennen. Andererseits zeigen sie gegenüber kleineren Nanopartikeln ein kleineres Verhältnis der Oberfläche zum Volumen, was die maximale Anzahl an Bindungsstellen limitiert. Desweiteren neigen diese Partikel zur schnellen Sedimentation, was das effektive Anbinden von Zielobjekten erschwert.

Dem gegenüber stehen kleinere einzeln umhüllte Partikel; diese haben eine sehr große Oberfläche im Verhältnis zum Volumen, so dass eine hohe effektive Funktionalisierungsdichte ermöglicht wird. Gleichzeitig sedimentieren diese Partikel sehr viel langsamer ohne magnetisches Feld. Für die magnetische Separation müssen jedoch aufgrund des geringeren magnetischen Momentes hohe Feldgradienten verwendet werden, um die Partikel vom Trägermedium zu trennen. Oftmals muss bei der Anwendung ein Kompromiss zwischen der leichten Abtrennbarkeit und der Funktionalisierungsdichte eingegangen werden.

Für eine effektive magnetische Separation ist neben der Anzahl der Bindungsstellen auch ihre chemische Funktionalität entscheidend. Primäre Amine (NH_2), Carbonsäuren (COOH) oder Hydroxylgruppen (OH) werden häufig als funktionelle Gruppen in die Polymerhüllen der magnetischen Fänger eingebracht, da sie auf der einen Seite selbst für die Separation genutzt werden können und auf der anderen Seite mit einfachen chemischen Synthesen (z.B. Amidreaktion über Aktivester) für spezielle Anwendungen funktionalisiert werden können. Im Folgenden wird die Separation von verschiedenen biologischen Spezies näher betrachtet:

Separation von Nukleinsäuren Die magnetische Isolierung von DNA und RNA wird auf unterschiedliche Weise erreicht, welche von der Funktionalität der Nanopartikeloberfläche abhängt. Bei Verwendung von silicaumhüllten Partikeln fällt man die DNA oder RNA auf der Partikeloberfläche durch den Einsatz von Puffern mit hohen Salzkonzentrationen, unter sog. chaotropen Bedingungen, aus.^[17–19] Die Wechselwirkung der Silicapartikeloberfläche mit dem Rückgrat der DNA führt zu einer ausreichenden Bindungsstärke, um die DNA zu separieren und zu waschen. Bei COOH-funktionalisierten magnetischen Partikeln werden für eine effektive Adsorption von DNA und RNA auf der Partikeloberfläche Puffersysteme mit Natriumchlorid und Poly(ethylenglykol) (PEG) verwendet.^[20–24] Das PEG verändert die Sekundärstruktur der DNA, so dass eine reversible Bindung an die oberflächengebundenen Säuregruppen möglich wird. Aminofunktionale magnetische Fänger werden ebenfalls zur Bindung von DNA eingesetzt.^[10, 23] Hierbei werden durch geeignete Wahl des pH-Wertes die NH_2 -Gruppen protoniert und dadurch positiv geladen. Das leicht negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA/RNA wird elektrostatisch angezogen und gebunden. Durch Änderung des pH-Wertes können die Nukleinsäuren anschließend wieder von der Oberfläche der Partikel abgelöst werden.

Eine selektive Methode zur Separation von DNA und RNA wird durch Bindung von kurzen Oligonukleotiden an die Partikeloberfläche erreicht.^[25–27] Auf diese Weise kann durch Hybridisierung DNA mit einer zum oberflächenimmobilisierten Nukleotid komplementären Sequenz gebunden werden. Damit können bei bekannter Sequenz gezielt bestimmte Nukleinsäuresequenzen aus biologischen Systemen entfernt werden. Für eine weitere Variante der selektiven DNA-Separation wird Streptavidin auf der Oberfläche von magnetischen Partikeln angebunden.^[10] Die Zielnukleinsäuren werden mit Biotin modifiziert und reagieren selektiv unter Komplexbildung mit dem partikelgebundenen Streptavidin. Durch geeignete Bedingungen, wie die Salzkonzentration oder der pH-Wert, kann nach der magnetischen Aufreinigung die DNA/RNA wieder von den Partikel abgelöst werden und steht dann für analytische Methoden, wie der Polymerasekettenreaktion (PCR), zur Verfügung.

Separation von Proteinen Zur magnetischen Aufreinigung von Proteinen werden magnetische Partikel verwendet, die mit Farbstoffliganden, Chelatkomplexen von Übergangsmetallen oder anderen Affinitätsliganden funktionalisiert sind.^[13, 28]

1 Einleitung

Als reaktive Farbstoffe werden z.B. Cibachrom Blue F3GA oder Procion Red an die Oberfläche von magnetischen Partikeln gebunden und können für die Bindung und Aufreinigung von Lysozym, Albumin, Alkoholdehydrogenase und Lactatdehydrogenase verwendet werden.^[10]

Chelatkomplexe von Übergangsmetallen wie Nickel (Ni^{2+}), Eisen (Fe^{3+}) oder Kupfer (Cu^{2+}), immobilisiert auf magnetischen Partikeln, werden benutzt um histidinmarkierte Proteine oder chelatierende Proteine wie Katalase, Ferritin oder Cytochrom C zu binden und zu isolieren. Weitere Affinitätsliganden, auf Basis von oberflächenimmobilisierten Proteinen, sind Streptavidin zur Bindung von biotinylierten Proteinen oder Protein A oder G zur Separation von Immunglobulin. Auch Proteininhibitoren werden zur reversiblen Bindung von Proteinen verwendet.^[10, 28]

Separation von Zellen Die magnetische Zellseparation ist eine etablierte Methode in der *in vitro* Diagnostik, um nicht gesunde Zellen von gesunden Zellen zu trennen.^[10, 12, 14, 16] Besonders in der Tumorthherapie wird als ein vielversprechender Ansatz die gezielte Isolierung von Tumorzellen aus der Blutbahn verfolgt, um so der Metastasenbildung vorzubeugen.^[29]

Die magnetische Separation von Zellen ist normalerweise nicht ohne eine magnetische Markierung durch z.B. magnetische Nanopartikel möglich. In der Natur finden sich jedoch zwei Zellsorten, die ein intrinsisches magnetisches Moment besitzen und somit direkt mit äußeren Magnetfeldern wechselwirken. Rote Blutzellen (Erythrocyten) beinhalten eine hohe Konzentration an paramagnetischem Hämoglobin, und magnetotaktische Bakterien enthalten Magnetit-Nanopartikel, sog. Magnetosomen. Alle anderen Zellsorten müssen für die Separation magnetisch modifiziert werden.^[16]

Allgemein werden zwei Wege beschritten, um lebende Zellen magnetisch zu markieren. Zum einen werden die Partikel in das innere der Zellen eingeschleust und zum anderen werden magnetische Nanopartikel an die Oberfläche von Zellen gebunden.

Für den ersten Weg werden Zellen mit biokompatibel beschichteten Nanopartikeln (s. Abschnitt 1.2) inkubiert. Durch natürliche Phagozytose der Zellen werden die Partikel in das Innere der Zellen eingeschleust. Anschließend können die markierten Zellen magnetisch separiert werden.^[12] Über die Einstellung der Bedingungen (pH-Wert, Pufferzusammensetzung) während der Inkubation

kann die selektive Markierung von Tumorzellen erreicht werden.^[29, 30] Auch die verwendete Beschichtung der Nanopartikel spielt dabei eine Rolle.^[31, 32]

Durch Funktionalisierung der magnetischen Nanopartikel mit Liganden, wie Transferrin, Albumin oder Insulin, ist es möglich, bei der Aufnahme der Partikel die rezeptorvermittelte Endocytose auszunutzen.^[12] Hierbei werden spezifische Zellrezeptoren, die auf der Oberfläche der zu markierenden Zellen vorhanden sind, genutzt, um die Aufnahme der Nanopartikel zu erleichtern. Die oberflächengebundenen Liganden wechselwirken mit den Rezeptoren und ermöglichen so eine schnelle Aufnahme der Partikel in das Zellinnere. Das Einschleusen magnetischer Nanopartikel ist nur mit kleinen Nanopartikeln (< 200 nm) möglich, so dass für eine effektive Magnetisierbarkeit und Abtrennbarkeit möglichst viele Nanopartikel in eine Zelle gebracht werden müssen.

Für den zweiten Weg werden magnetische Nanopartikel mit monoclonalen Antikörpern funktionalisiert.^[16, 33] Die Antikörper sind speziell auf Antigene, die an den Zelloberflächen lokalisiert sind, abgestimmt. Die magnetischen Partikel werden aufgrund der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung an die Zelloberfläche gebunden. Diese Bindung ist selektiv und kann sehr effektiv zur Separation von kranken Zellen aus biologischen Proben genutzt werden. Ein Einschleusen der Partikel findet nicht statt, da die Endocytose inhibiert ist. Es ist eine Vielzahl von Antikörpern erfolgreich auf magnetischen Partikeln immobilisiert worden, was zahlreiche kommerzielle Anwendungen zur Folge hatte.^[16]

1.1.2 Hyperthermie

Die Hyperthermie ist eine Therapieform in der Medizin, bei der Gewebe künstlich erwärmt wird. Die Erhöhung der Temperatur kann dabei im gesamten Körper durch Bäder oder wärmende Wickel erfolgen, oder sie wird lokal, nur in der Region des betroffenen Gewebes angewendet. Die lokale Hyperthermie von Tumorgeweben hat sich zu einer effektiven Therapieform oder als Ergänzung zu klassischen Methoden, wie der Chemotherapie und der Radiotherapie, in der Behandlung von Krebserkrankungen entwickelt.^[34–36]

Das grundsätzliche Ziel der Hyperthermie in der Krebstherapie ist es, das Tumorgewebe bzw. Tumorzellen irreversibel durch Überhitzung zu schädigen. Dabei wird ausgenutzt, dass Tumorzellen, aufgrund des im Tumor nicht vollständig ausgebildeten Gefäßsystems, anfälliger für die Wärmebehandlung sind als gesunde Zellen. Man unterscheidet allgemein zwei Strategien bei der

Überhitzung von Zellen:^[36]

1. Behandlung bei Temperaturen zwischen 42 °C und 45 °C für einen Zeitraum von mehreren Stunden.
2. Thermoaplation: Kurzeitige (Minuten) Überhitzung des Gewebes auf Temperaturen von 50 °C.

Um diese Temperaturen lokal zu erreichen werden z.B. Laser, Ultraschall, Mikrowellen oder implantierte Elektroden, die mit Radiowellen angeregt werden, verwendet.^[34] Eine Alternative hierzu, die in neuerer Zeit große Aufmerksamkeit erregt hat, stellt der Einsatz magnetischer Nanopartikel dar. Magnetische Nanopartikel verfügen über die Eigenschaft, magnetische Energie, die in Form elektromagnetischer Wechselfelder auf sie einwirkt, in Wärme umzuwandeln. Werden MNPs in erkranktes Gewebe injiziert, kann durch Anlegen eines hochfrequenten magnetischen Feldes geeigneter Feldstärke eine Erwärmung der Partikel erreicht werden, die zur Zerstörung des Gewebes ausreicht. Seit 1957 Gilchrist et. al. das Prinzip erstmals zur *in vitro* Erwärmung von Lymphknoten zeigte^[15], wurden viele Arbeiten auf diesem Gebiet publiziert,^[37-43] und eine erste klinische Studie zur magnetischen Partikel Hyperthermie wurde durchgeführt.^[44, 45]

Als magnetische Materialien werden vor allem magnetische Eisenoxidpartikel verwendet, da diese biokompatibel sind. Es kommen sowohl superparamagnetische Eindomänpartikel mit Durchmessern < 15 nm, als auch ferromagnetische Multidomänpartikel mit Größen > 100 nm zum Einsatz.^[36]

Die Transformation elektromagnetischer Energie in Wärme wird für magnetische Nanopartikel durch Hystereseverluste und Relaxationsprozesse erklärt. Werden magnetische Nanopartikel einem elektromagnetischen Wechselfeld ausgesetzt, können zwei Relaxationsprozesse beobachtet werden. Beim Néel'schen Prozess orientiert sich das magnetische Moment der MNPs gegen die Anisotropiebarriere innerhalb des Kristallgitters um,^[46] während beim Brown'schen Mechanismus der gesamte Partikel rotiert, um sich mit dem äußeren Magnetfeld auszurichten.^[47] Beide Mechanismen sind von der Aktivierungs- und thermischen Energie abhängig.

Die Energie, die beim Prozess nach Néel aufgewendet werden muss, um eine Reorientierung des magnetischen Momentes zu erreichen, hängt von der Anisotropiekonstante K_{eff} des kristallinen Materials und vom Partikelvolumen V_c ab. Die Relaxationszeit τ_N , die daraus für einen Partikel resultiert, lässt sich

mit Gleichung 1.1 berechnen.

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left[\frac{K_{eff} V_c}{k_B T}\right] \quad \text{Gl. (1.1)}$$

- τ_N : Relaxationszeit nach Néel
- τ_0 : $1/f_0$; mit f_0 : Lamour-Frequenz
- K_{eff} : Anisotropiekonstante
- k_B : Boltzmann-Konstante
- T : abs. Temperatur

Bei der Reorientierung des gesamten Partikels durch Rotation nach dem Brownschen Relaxationsmechanismus sind die Viskosität des umgebenden Mediums η und der hydrodynamische Radius r_h bestimmend für die Relaxationszeit (s. Gl. 1.2).

$$\tau_B = \tau_0 \frac{4\pi\eta r_h^3}{k_B T} \quad \text{Gl. (1.2)}$$

Beide Prozesse treten in realen Systemen auf und bestimmen die Relaxation der magnetischen Partikel. Der schnellere Prozess dominiert jedoch grundsätzlich die Remagnetisierung. Für die effektive Relaxationszeit τ_{eff} gilt:

$$\tau_{eff} = \frac{\tau_N \tau_B}{\tau_N + \tau_B} \quad \text{Gl. (1.3)}$$

Neben der schon erwähnten Anisotropie und der Partikelgröße wird die Wärmeerzeugung durch magnetische Nanopartikel in realen Systemen zusätzlich von der Partikelgrößenverteilung und den äußeren Feldparametern, wie der Feldstärke und der Frequenz, beeinflusst.^[34, 35] Für medizinische Anwendungen hat sich ein magnetisches Wechselfeld mit einer Frequenz von 400 kHz und einer Feldstärke von $10 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ als schadlos für humanes und tierisches Gewebe auch bei längerer Exposition gezeigt.^[36] Um das Erwärmungsverhalten magnetischer

Nanopartikel charakterisieren zu können und um ein Maß für die Effektivität der Wärmeerzeugung zu haben, wurde die spezifische Heizleistung (SHP) definiert.^[34] Die SHP beschreibt die Temperaturänderung des betrachteten Systems mit der Zeit (dT/dt), unter Berücksichtigung der Wärmekapazität des Systems c_p und dem spezifischen Gehalt der eingesetzten MNP $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ (s. Gl. 1.4).

$$SHP = \frac{c_p \left(\frac{dT}{dt} \right)}{\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}} \quad \text{Gl. (1.4)}$$

Die SHP wurde für verschiedene MNP bestimmt, dabei wurden für die meisten synthetischen MNP auf Basis von Magnetit Werte zwischen $40 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ und $100 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ gefunden. Für Cobaltnanopartikel wurden Werte bis zu $770 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ detektiert. Die bislang effektivsten Nanopartikel zur Wärmeerzeugung sind jedoch die in Abschnitt 1.1.1 schon erwähnten Magnetosomen. Für diese bakteriell erzeugten Magnetitnanopartikel werden SHP-Werte von $1000 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ gefunden.^[48] Der Grund hierfür wird in der sehr einheitlichen Größenverteilung und einer hohen Anisotropie vermutet. Der große Nachteil dieser Partikel besteht jedoch in der Zugänglichkeit, da die bakterielle Erzeugung nur zu Mengen im Milligrammmaßstab führt. Darüber hinaus umhüllen die Bakterien die Partikel mit einer Monoschicht aus Phospholipiden und Proteinen, die eine weitere Funktionalisierung erschwert.

Für die effektive magnetische Hyperthermie ist es wünschenswert Partikel zu haben, die an die Heizeigenschaften der Magnetosomen heranreichen, um mit möglichst wenig Material schon ausreichend hohe Temperaturen erreichen zu können. Aus diesem Grund ist es notwendig die strukturellen Vorteile der Magnetosomen zu verstehen und im Labor durch geeignete Synthesebedingungen nachzuahmen.

1.1.3 Magnetic Resonance Imaging (MRI)

MRI oder auch Kernresonanztomographie ist ein bildgebendes Diagnoseverfahren, um Gewebe und Organe und deren krankhafte Schädigung sichtbar zu machen. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der NMR-Spektroskopie und wird im Folgenden kurz erläutert.

1.1 MNP und ihr Potenzial für Biomedizinische Anwendungen

Durch Anlegen eines starken statischen Magnetfeldes werden die Drehimpulse der Atomkerne (meistens Protonen) des betrachteten Gewebes im Magnetfeld ausgerichtet. Aufgrund der Richtungsquantelung des Kernspins und der unterschiedlichen Besetzung der resultierenden Energiezustände entsteht eine makroskopische Magnetisierung M_0 in Richtung des angelegten Magnetfeldes. Durch Einwirkung eines Hochfrequenzimpulses geeigneter Frequenz auf die ausgerichteten Atomkerne kann eine Auslenkung von M_0 erreicht werden, die zu einer Quermagnetisierung führt. Die Quermagnetisierung wird als Messsignal detektiert. Ist der Hochfrequenzimpuls beendet, findet eine Relaxation von M_0 zurück zur parallelen Ausrichtung gegenüber dem äußeren Magnetfeld statt. Die Zeit, die das System hierfür benötigt, wird als longitudinale Relaxationszeit T_1 bezeichnet. Gleichzeitig löst sich die Phasenkohärenz der Quermagnetisierung auf, was innerhalb der transversalen Relaxationszeit T_2 geschieht. Die Quermagnetisierung und damit die Intensität des Messsignals ist direkt proportional zur Konzentration der angeregten Atomkerne im untersuchten Gewebe und hängt ebenfalls von T_1 und T_2 ab.^[49] Durch orts aufgelöste Messungen der Quermagnetisierung und ihrer Relaxation erhält man lokale Signalintensitäten, die in Grauwerte übersetzt werden und so ein Bild des betrachteten Körperbereichs ergeben. Üblicherweise werden Schnittbilder der zu untersuchenden Körperregion aufgenommen (s. Abb. 1.2). Die Kontrastierung der Bilder ergibt sich durch die

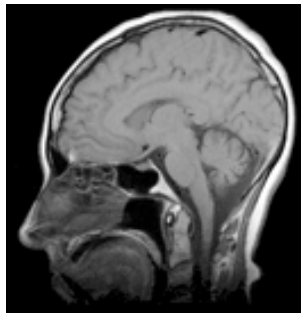


Abb. 1.2: MRI-Aufnahme eines menschlichen Kopfes; Copyright © 1996-2008 J.P. Hornak; Quelle: www.cis.rit.edu/htbooks/mri

unterschiedlichen Relaxationszeiten der verschiedenen Gewebearten. Daneben ist auch der unterschiedliche Gehalt an Wasserstoff-Atomen in verschiedenen Geweben (z. B. Muskel, Knochen) für den Bildkontrast verantwortlich.^[49]

Durch geeignete Kontrastmittel kann man gezielt den Kontrast in interessanten Regionen erhöhen. Neben den klassischen Kontrastmitteln basierend auf Gadolinium-Chelaten werden superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel

(SPIO) vermehrt in der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik eingesetzt.^[50, 51] SPIO generieren in einem äußeren Magnetfeld eigene Magnetfelder, die als magnetische Störfelder wirken und direkten Einfluss auf die Relaxationzeiten des Gewebes haben. Durch gezielte Markierung des zu untersuchenden oder des umgebenden Gewebes kann Einfluß auf den Kontrast genommen werden. Gewöhnlich bewirken SPIO als Kontrastmittel eine Verkürzung von T_2 , was eigentlich zu einer Verschlechterung der Signalintensität und damit auch des Kontrastes führt.^[52] Diese negative Kontrastierung wird jedoch gezielt genutzt, z.B. um Gewebe in der Umgebung eines Tumor kontrastarm abzubilden, und dadurch das Tumorgewebe im Vergleich besser sichtbar zu machen. In einigen Arbeiten wird darüber hinaus eine Verkürzung von T_1 zur direkten Erhöhung des Kontrastes ausgenutzt.^[53, 54]

SPIO sind aufgrund der Vielzahl an Funktionalisierungsmöglichkeiten für unterschiedlichste MRI-Untersuchungen geeignet. Sie wurden bereits erfolgreich zur Abbildung der Leber, des Magen-Darm-Traktes, von Lymphknoten und Gehirntumoren eingesetzt. Weiteren werden SPIO zum MRI-basierten Verfolgen von magnetisch markierten Zellen (z.B. Makrophagen) oder Molekülen verwendet.^[49, 52, 55]

1.1.4 Wirkstofffreisetzung und Wirkstoffpositionierung

Eine klassische und wirksame Methode der Krebsbehandlung ist die Chemotherapie. Jedoch sind die eingesetzten Chemotherapeutika in den meisten Fällen relativ unspezifisch und zerstören neben den Krebs- bzw. Tumorzellen auch gesunde Zellen, was zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie z. B. Haarausfall, führt. Um diese Nebenwirkungen zu minimieren und die Wirkstoffe möglichst gezielt und lokal einsetzen zu können, werden MNP als Träger zur Wirkstoffpositionierung und -freisetzung untersucht.^[12, 14, 49] Hierfür werden MNP überwiegend mit Polymerhüllen versehen, die die Möglichkeit bieten, Wirkstoffe reversibel einzuschließen oder zu binden. Diese magnetischen Träger werden dann in die Blutbahn injiziert und mittels äußerer Magnetfelder in der betroffenen Region, z. B. einem Tumor, aufkonzentriert. Dann wird durch Änderung des pH-Wertes, der Osmolarität, der Temperatur oder durch enzymatische Aktivität die Wirkstofffreisetzung induziert.^[14] Durch die gezielte Freisetzung des Wirkstoffes im Bereich der erkrankten Zellen, wird eine systemische Belastung des Körpers und somit gesunder Zellen minimiert. Ebenso kann die Dosierung

des Wirkstoffs, aufgrund der effektiveren Wirksamkeit, gegeben durch die höhere lokale Wirkstoffkonzentration, herabgesetzt werden.

Als magnetische Träger werden ebenso wie für die Separation (s. Abschnitt 1.1.1) hauptsächlich Magnetitpartikel unterschiedlicher Größe verwendet. Als optimal für intravenöse Injektion haben sich Partikel einer Größe von 10 nm-100 nm herausgestellt.^[12, 37] Partikel in diesem Größenbereich erreichen auch kleine Kapillargefäße und entgehen dem retikuloendothelialen System (RES), das für die Beseitigung von Fremdstoffen verantwortlich ist. Als polymere Hüllen werden Polysaccharide und synthetische Polymere verwendet (s. Abschnitt 1.3.1), die mit Carboxygruppen, Biotin, Avidin, Carbodiimiden und anderen Gruppen funktionalisiert sind.^[56-58] Darüber hinaus werden nanopartikelbeladene Liposomen als magnetische Träger verwendet.^[59-62]

Als Wirkstoffe finden oftmals klassische Zytostatika, wie Doxorubicin, 5-Fluoruracil, Etoposid, Methotrexat und Paclitaxel Anwendung. Darüber hinaus werden Proteine, Peptide oder Nukleinsäuren als Therapeutika untersucht.^[49]

Widder et. al. zeigten 1978 erstmals den Einsatz magnetischer Träger zur *in vitro* und *in vivo* Wirkstoffpositionierung und -freisetzung.^[63, 64]

Anschließend wurden zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, die in Modellversuchen an Tieren wie Schweinen,^[65, 66] Hasen^[67-69] oder Ratten^[70-72] die erfolgreiche Wirkstofffreisetzung und den Tumorrückgang beschreiben. In einer ersten klinischen Studie konnten Lübke et. al. demonstrieren, dass magnetische Träger beladen mit Epirubicin durch magnetische Felder zu den Tumoren der Patienten dirigiert werden können, ohne eine damit verbundene Organtoxizität auszulösen.^[73-75]

Alle 14 betrachteten Patienten vertrugen die Injektion der dispergierten MNP gut. Obwohl die Ergebnisse der Studie vielversprechend waren, existieren Probleme bei der magnetischen Wirkstoffpositionierung und -freisetzung, die schwerwiegende Folgen für Patienten haben können. Diese Folgen sind in jedem Fall zu vermeiden. Eine der wichtigsten Probleme ist, dass die injizierten Partikel Gefäße verstopfen und somit Embolien auslösen können. Daneben können aufgrund der größeren Distanzen im Körper die erfolgreichen Tierversuche nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden. Weiterhin gestaltet sich eine Diffusionkontrolle der freigesetzten Wirkstoffe schwierig.^[14]

1.2 Besondere Anforderung an MNP in biologischen Systemen

MNP sind aufgrund ihrer Größe und Eigenschaften von großem Interesse für unterschiedlichste biomedizinische Anwendungen (s. Abschnitt 1.1). Um jedoch in biologischen Systemen eingesetzt werden zu können, müssen die Nanomaterialien bestimmte Anforderungen erfüllen, die im folgenden erläutert werden.

Grundlegende Anforderungen, die besonders bei der Synthese und Funktionalisierung der MNP berücksichtigt werden müssen, sind die Einheitlichkeit und Reproduzierbarkeit. MNP sollten möglichst einheitliche physikalische, biologische und chemische Eigenschaften haben, um möglichst gleich mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung zu treten. Da die Eigenschaften der Nanopartikel stark von ihrer Größe abhängen, ist es wichtig eine monodisperse Größenverteilung der Partikel anzustreben.^[37, 38] Monodisperse Partikel haben darüber hinaus den Vorteil in Flüssigkeiten eine geringere Neigung zur Agglomeration zu zeigen.^[10] Es müssen Synthesestrategien verwendet werden, die eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleisten, denn nur so können verlässliche Eigenschaften für biomedizinische Anwendungen erhalten und garantiert werden. Gleichzeitig ist die Langzeitstabilität der Nanomaterialien wichtig.

Die Form der MNP spielt ebenfalls eine große Rolle für ihre Anwendbarkeit. Am besten geeignet für praktische Anwendungen sind sphärische Partikel, da diese, im Vergleich zu stabförmigen oder irregulär geformten Partikeln, die besten hydrodynamischen Eigenschaften in den vorliegenden wässrigen Dispersionen aufweisen.^[10]

Für die magnetischen Eigenschaften wird für Separationsanwendungen eine möglichst hohe Sättigungsmagnetisierung der MNP in äußeren magnetischen Feldgradienten gefordert. Außerdem werden superparamagnetische Nanopartikel bevorzugt, da diese ausserhalb eines magnetischen Feldes keine Magnetisierung aufweisen und somit aufgrund der fehlenden magnetischen Anziehung nicht so stark zur Agglomeration neigen.^[12, 52]

Um MNP erfolgreich in biologischen Systemen einsetzen zu können, dürfen die verwendeten Materialien, aus denen die Partikel aufgebaut sind, keinen negativen Einfluss auf das System ausüben, das heißt die Materialien müssen biokompatibel sein und nicht toxisch. Darüber hinaus sollten die Nanomaterialien bioabbaubar sein.^[37, 38]

MNP haben aufgrund ihrer Größe eine hohe Oberflächenenergie, die aus einem

großen Verhältnis der Oberfläche zum Partikelvolumen resultiert.^[49] Eine hohe Oberflächenenergie ist jedoch thermodynamisch ungünstig, so dass die Partikel bestrebt sind die Energie zu verringern. Das passiert überwiegend durch Agglomeration, da hierbei größere Partikel mit einer kleineren effektiven Oberfläche entstehen. Um diesen natürlichen Prozess zu unterbinden, müssen die Partikel gegenüber der Agglomeration stabilisiert werden (s. Abschnitt 1.3). Eine große effektive Oberfläche ist Voraussetzung für eine hohe Funktionalisierungsdichte mit aktiven Substanzen (Affinitätsliganden, Wirkstoffen, usw.) und funktionellen Gruppen, und damit für die Effektivität der Nanopartikel in biomedizinischen Anwendungen.^[10, 12]

Die in Abschnitt 1.1 beschriebenen Applikationen magnetischer Nanopartikel werden allgemein in *in vivo* und *in vitro* Anwendungen unterteilt, für die, neben den bereits erwähnten Anforderungen, spezielle Anforderungen an die MNP gestellt werden:

in vivo Werden MNP *in vivo* angewendet, werden sie üblicherweise in den Blutkreislauf injiziert. Hierfür müssen die Nanopartikel stabil dispergiert in wässrigen Trägermedien vorliegen. Anschließend sollten die Partikel auch im Blutfluß eine ausreichend hohe Stabilität gegenüber Agglomeration zeigen, da sonst das Risiko von Gefäßverschlüssen und Embolien steigt.

Ein Problem bei *in vivo* Anwendungen ist das Erreichen einer ausreichend hohen Zirkulationszeit der Nanopartikel innerhalb des Organismus. Denn nur wenn die Partikel lang genug im Organismus verbleiben, können Ziele, wie Tumore, von Partikeln erreicht werden. Gewöhnlich werden die injizierten Nanopartikel innerhalb kurzer Zeit mit Komponenten des Blutkreislaufs, z. B. Plasmaproteinen, umhüllt.^[76] Dieser als Opsonisation bezeichnete Prozess führt dazu, dass die Immunabwehr, vor allem das RES, die Partikel wahrnimmt und mittels Macrophagen der Leber, der Milz und der Lymphknoten aus dem Blutkreislauf entfernt. Um die Zirkulationszeit in der Blutbahn zu erhöhen, werden daher die Nanopartikel mit hydrophilen Hüllen versehen, die die Opsonisation verhindern und somit die Nanopartikel gegenüber dem RES stabilisieren (s. Abschnitt 1.3.1). Die Oberflächenladung der MNP hat ebenfalls Einfluss auf die Zirkulationszeit der Partikel in der Blutbahn.^[49, 52]

Für den Transport von MNP innerhalb des Körpers und in das zu untersuchende Gewebe ist die Partikelgröße ein entscheidender Faktor. Große Partikel (> 200 nm) werden von der Milz heraus gefiltert, und kleine Nanopartikel

(< 5 nm) von den Nieren.^[12, 37] Partikelgrößen zwischen 5 nm und 100 nm sind für intravenöse Injektionen am besten geeignet. Partikel mit einer Größe von 50 nm - 100 nm werden innerhalb des Gefäßsystems mit dem Blutkreislauf verteilt, sie können die Gefäße jedoch nicht verlassen und bleiben teilweise an der Gefäßwandung haften.^[77] Um Gewebe ausserhalb der Blutgefäße homogen mit Nanopartikeln zu markieren, müssen die Partikel eine Größe von 5 nm - 10 nm aufweisen, da sie dann in der Lage sind, in die Zellzwischenräume zu diffundieren.^[77]

in vitro Bei *in vitro* Anwendungen spielt die Partikelgröße, ausser für die Phagozytose von Zellen (s. Abschnitt 1.1.1), eine untergeordnete Rolle. Partikel mit Durchmessern von einigen Nanometern bis hin zu Mikrometern finden hierbei Verwendung für Separationszwecke. Viel wichtiger in diesem Applikationsbereich sind die Sedimentationseigenschaften in Abwesenheit eines magnetischen Feldes. Die Nanopartikel sollten möglichst stabil gegenüber Sedimentation in Trägermedien suspendiert vorliegen, wenn kein äußeres Magnetfeld vorhanden ist.^[38] Dadurch kann eine höchstmögliche Homogenität der Nanopartikelverteilung innerhalb des Mediums erreicht werden, was die Effektivität von Reaktionen, wie die Anbindung von Zielmolekülen, erhöht (s. Abschnitt 1.1.1).

Materialien, die die erwähnten Anforderungen erfüllen, basieren überwiegend auf superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln (SPIO), bestehend aus Magnetit oder Maghemit, die mit biokompatiblen synthetischen oder natürlichen Polymeren umhüllt sind. Magnetit wird bevorzugt verwendet, da es bei 300 K mit $92 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$, im Vergleich zu Maghemit ($78 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$), eine höhere Sättigungsmagnetisierung aufweist.^[52] Die Synthese und Funktionalisierung von SPIO ist im nächsten Kapitel näher beschrieben.

1.3 Herstellung und Stabilisierung von hydrophilen MNP

Zur Herstellung magnetischer Nanopartikel wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, die eine Vielzahl von Materialien beschreiben.

MNP wurden beispielsweise aus Metallen wie Eisen und Cobalt, Legierungen wie FePt und CoPt₃ und spinellartigen Ferromagneten wie MgFe₂O₄, MnFe₂O₄ und CoFe₂O₄, hergestellt.^[78] Für biomedizinische Anwendungen haben sich aufgrund ihrer Biokompatibilität und -abbaubarkeit vor allem MNP aus Magnetit Fe₃O₄ und Maghemit γ -Fe₂O₃ durchgesetzt.^[79–81] Aus diesem Grund wird im Folgenden auf die Darstellung und Funktionalisierung von MNP auf Basis dieser Eisenoxide eingegangen.

Magnetit Fe₃O₄, auch Magnet Eisenstein genannt, gehört zur Stoffklasse der Ferrite und kristallisiert als inverser Spinell. Die Sauerstoffanionen bilden eine kubisch dichteste Kugelpackung, in deren Tetraeder- und Oktaederlücken die Eisenionen (Fe³⁺, Fe²⁺) lokalisiert sind. Die Fe³⁺-Ionen besetzen ein Achtel der Tetraederlücken und gleichzeitig mit den Fe²⁺-Ionen die Hälfte der Oktaederlücken. Durch Ladungsaustausch der Ionen in den Oktaederlücken resultiert die Leitfähigkeit des Magnetits. Für die ferrimagnetischen Eigenschaften des Magnetits sind die Fe²⁺-Ionen verantwortlich, da sich die Spins der Fe³⁺-Ionen durch antiferromagnetische Kopplung (Superaustausch) kompensieren.^[82]

Maghemit γ -Fe₂O₃ ist die kubische Modifikation des Eisen(III)-oxids und bildet defekte Spinell-Strukturen. Die Kationen sind dabei statistisch auf die sechzehn oktaedrischen und acht tetraedrischen Lücken der Spinellstruktur verteilt. Maghemit ist genau wie Magnetit ferrimagnetisch.^[82]

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit dieser beiden Eisenoxide können sie leicht ineinander überführt werden.^[82] Diese Tatsache wird bei der Synthese von Maghemit-Nanopartikeln gezielt ausgenutzt, indem Magnetit-Partikel als Vorstufe synthetisiert und dann oxidiert werden. Die Oxidation kann z.B. durch Dispergieren der Magnetit-Partikel in einem sauren Medium und Zugabe von Eisen(III)-nitrat erreicht werden.^[78]

Für Eisenoxid-Nanopartikel sind unterschiedlichste Synthesewege bekannt. Methoden wie Mitfällung, thermische Zersetzung, mizellare Synthese, Hydrothermalsynthese, Sol-Gel-Reaktion, Laserpyrolyse, Polyol-Methoden und elektrochemische Reaktionen sind in der Literatur zu finden. Nachfolgend werden die drei meist genutzten und am besten untersuchten Synthesewege vorgestellt.^[37, 78]

Mitfällung Die Mitfällung ist eine klassische Methode, um Magnetit-Nanopartikel darzustellen und findet auch in dieser Dissertation Anwendung.

Hierbei werden aus einer Eisen(II)- und Eisen(III)-Salzlösung unter Zugabe einer Base (oder umgekehrt) in einer Inertgasatmosphäre Magnetit-Nanokristalle ausgefällt. Die Reaktionsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke des Mediums und die Art der Eisensalze (z.B. Chloride, Sulfate, Nitrate) sowie ihr stöchiometrisches Verhältnis haben Einfluss auf die Form, Größe und Sättigungsmagnetisierung der entstehenden Partikel. Gewöhnlich werden Partikelgrößen von 2 nm - 17 nm erhalten.^[37, 78]

Bereits 1938 verwendete Elmore erstmals die Mitfällung im alkalischen Medium zur Synthese von Magnetit-Kolloiden.^[83] Massart und Cabuil entwickelten die Methode weiter, und gelangten in den 1980er Jahren zu einem robusten Verfahren zur reproduzierbaren Herstellung von Magnetit-Nanopartikeln im Gramm-Maßstab.^[84, 85] Die relativ einfache Reaktionsführung und die großen Mengen an magnetischen Nanopartikeln, die durch die Mitfällung erhalten werden können, sind die großen Vorteile dieser Methode. Ein Nachteil ist jedoch, dass die anfallenden Partikel eine relativ breite Größenverteilung aufweisen. Eine Strategie, um eine engere Größenverteilung zu erhalten, ist die Verwendung organischer Additive (Polymere, Citronensäure, Ölsäure) während der Fällungsreaktion.^[86-88] Die Additive wirken als Stabilisatoren auf die Partikel im Medium (s. Abschnitt 1.3.1) und nehmen Einfluß auf das Kristallwachstum und die Kristallbildung. Eine andere Strategie besteht darin, stabile Dispersionen der Nanopartikel durch Zugabe von geeigneten Elektrolyten (NaCl, Salpetersäure) fraktionierend zu fällen, um so größere Partikel von kleineren zu trennen.^[87-89]

Thermische Zersetzung Eisenoxid-Nanopartikel können mit steuerbarer Größe und Form durch thermische Zersetzung von organometallischen Vorstufen und anschließender Oxidation erhalten werden. Die resultierenden Partikel sind im Vergleich zur Mitfällung annähernd monodispers. Während des Zersetzungsprozesses werden Tenside, wie Fettsäuren,^[90, 91] und/oder Hexadecylamin^[92] zur Stabilisierung der entstehenden Nanopartikel eingesetzt. Die Synthese wird gewöhnlich in hochsiedenden Lösemitteln durchgeführt.

Hyeon et al. konnten Eisenpentacarbonyl in einer Mischung aus Octylether und Ölsäure bei 100 °C zersetzen.^[93] Die entstandenen Eisennanopartikel wurden sofort mit Trimethylaminoxid ((CH₃)₃NO) zu γ -Fe₂O₃-Nanopartikeln oxidiert. Die Partikel zeigten Durchmesser von 13 nm.

Werden kationische Metallzentren, wie Eisenacetylacetonat (Fe(acac)₃), als Vorstufe für die Zersetzung gewählt können Fe₃O₄-Nanopartikel direkt erzeugt

werden.^[94, 95]

Eine weitere Möglichkeit stellt die Pyrolyse von Eisenfettsäuresalzen in Anwesenheit der entsprechenden Fettsäuren (z. B. Decansäure, Laurinsäure, Stearinsäure) in Octadecan oder Tetracosan dar.^[90] Hierbei werden nahezu monodisperse Fe_3O_4 -Nanopartikel erhalten, deren Größe zwischen 3 nm und 50 nm einstellbar ist. Sowohl die Größe als auch die Form können über Variation der Reaktivität und Konzentration der Eisensalzvorstufe beeinflusst werden.

Eine ähnliche thermische Zersetzung zur Herstellung von Nanopartikeln basiert auf der *in situ* Erzeugung eines Eisenoleatkomplexes aus Fe(III)-chlorid und Natriumoleat, der anschließend bei 240 °C bis 320 °C in Lösemitteln wie Octylether, 1-Hexadecan oder Trioctylamin zu Fe_3O_4 -Nanokristallen zersetzt wird.^[96]

Die bisher erwähnten Synthesewege der thermischen Zersetzung haben den Nachteil, dass aufgrund der eingesetzten Tenside hydrophobe Nanopartikel entstehen, die für Anwendungen in wässrigen Medien ungeeignet sind. Durch Liganden- bzw. Tensidaustausch auf der Oberfläche der Partikel oder Erzeugung einer Doppelschicht durch Zugabe eines weiteren Tensids kann dieser Nachteil jedoch überwunden werden.^[97]

Li et al. konnten mit Hilfe des koordinierenden Lösemittels 2-Pyrrolidon unter Rückflußbedingungen bei 245 °C Fe(III)-chlorid-Hexahydrat zu Fe_3O_4 -Nanopartikeln zersetzen und so hydrophile Partikel erhalten.^[98–100] Die Größe der Partikel kann dabei auf 2 nm, 4 nm und 60 nm eingestellt werden. Durch Zugabe von α, ω -Dicarboxypoly(ethylenglykol), als stabilisierendes Agens, konnten diese Partikel in Wasser stabil dispergiert werden.^[101]

Reaktion in beschränkten Reaktionsräumen Eine weitere Möglichkeit, eng verteilte Eisenoxid-Nanopartikel zu erhalten, ist die Reaktion in eingeschränkten Umgebungen. Hierfür macht man sich Mizellare Strukturen, Cyclodextrin, Proteine und auch Phospholipidmembranen als Nanoreaktoren zur Nutzung. Die Nanoreaktoren bilden eine abgeschirmte Umgebung definierter Größe, in dessen Inneren die Nanopartikel entstehen.

Das Protein Ferritin ist ein sphärisches Protein, das eine innere Kavität mit einem Durchmesser von 6 nm aufweist. Meldrum et al. nutzten Ferritin als Proteinkäfig, um in der Kavität Eisen(II)-Salze zu annähernd monodisperse Magnetit und Magnetit-Nanopartikel zu oxidieren.^[102] Die entstandenen Partikel waren sphärisch und hatten einen der Kavität entsprechenden Durchmesser von 6 nm. In gleicher Weise kann die Kavität von γ -Cyclodextrin zur Synthese kleiner

Nanopartikel verwendet werden. Durch basische Hydrolyse von Fe^{2+} -Ionen in Anwesenheit von γ -Cyclodextrin entstehen γ - Fe_2O_3 -Nanopartikel mit Durchmessern von 1,8 nm.^[103, 104]

Die Eigenschaft von Tensidmolekülen, sich zu mizellaren Strukturen zu organisieren, kann ausgenutzt werden, um wässrige Nanotropfen unterschiedlicher Größe in organischen Lösemitteln zu erzeugen. Innerhalb dieser inversen, (Wasser-in-Öl) Emulsionen sind die Nanotropfen durch die Tenside von der organischen Phase getrennt und bilden Nanoreaktoren zur Partikelsynthese, die die Größe der entstehenden Nanopartikel limitiert. Erstmals oxidierten Inouye et al. Fe^{2+} -Salze innerhalb von Mizellen zu γ - Fe_2O_3 - und Fe_3O_4 -Nanopartikeln.^[105] Es wurden Partikel erhalten, deren Größe durch die Temperatur und die Tensidmenge bestimmt wurden. Seit dem sind viele Arbeiten zur Synthese von Eisenoxidpartikeln mittels Mizell- oder Emulsionstechniken veröffentlicht worden, die zeigen, dass durch Wahl und Konzentration der Tenside, durch Variation der organischen Phase und der Reaktionsbedingungen eine große Vielfalt von Nanopartikeln möglich ist.^[10, 12, 37, 78]

Nachteile dieser Methode stellen die häufig geringe Ausbeute und die benötigte große Menge an organischem Lösemittel dar.^[78]

1.3.1 Stabilisierung von MNP

MNP zeigen die Tendenz zur Agglomeration. Verantwortlich hierfür sind van-der-Waals-Wechselwirkungen, magnetische Wechselwirkungen und induzierte Dipole. Neben diesen attraktiven Kräften unterliegen die MNP auch repulsiven Kräften, die durch elektrostatische und sterische Abstoßung, die durch Oberflächenmodifikation erreicht wird, verursacht werden.^[37]

Für die Stabilisierung von MNP gegen Agglomeration und Sedimentation müssen die repulsiven gegenüber den attraktiven Kräften überwiegen und daher maximiert werden. Um eine effektive Stabilisierung erreichen zu können werden Funktionalisierungsagenzien eingesetzt, die entweder Oberflächenladungen erzeugen, die die elektrostatische Abstoßung der Partikel bewirken, oder es werden raumerfüllende Liganden (z. B. Polymere) gewählt, die sterisch anspruchsvoll sind.

Die Oberflächenatome von Eisenoxid-Nanopartikeln können als Lewis-Säuren angesehen werden, die Moleküle koordinieren, die freie Elektronenpaare haben.^[37] Dementsprechend werden Wassermoleküle koordiniert, wenn die Par-

tikel in wässrigen Medien vorliegen. Die Wassermoleküle dissoziieren und hinterlassen auf der Nanopartikeloberfläche Hydroxidfunktionen. Die Hydroxidgruppen sind amphoter und können daher mit Säuren und Basen reagieren.^[89] Je nach pH-Wert des umgebenden Mediums entstehen negative oder positive Oberflächenladungen. Der isoelektrische Punkt liegt bei $\text{pH} = 6,8$.^[106] Neben Wassermolekülen werden vor allem Carboxylate, Phosphate und Sulfate an die Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel gebunden.^[78, 107, 108]

Elektrostatische Stabilisierung Eines der am häufigsten verwendeten Funktionalisierungsreagenzien zur elektrostatischen Stabilisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln ist Citronensäure.^[87, 109] Die dreiwertige Säure wird je nach Oberflächenkrümmung und Funktionalisierungsdichte mit einer oder zwei Carboxy-Funktionen auf der Partikeloberfläche koordiniert. Die dritte Carboxyl-Gruppe bildet in wässrigen Trägermedien mit geeignetem pH-Wert ($\text{pH} > 8$) eine negative Ladung aus, die zur Aufladung der Partikeloberfläche und so zur Stabilisierung führt.^[37]

Citronensäure wird überwiegend zur Stabilisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln genutzt, die durch Mitfällung erzeugt wurden. Hierbei wurde festgestellt, dass die Säure einen signifikanten Einfluss auf die Größe und die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel hat, wenn die Fällung in Gegenwart von Citronensäure durchgeführt wird.^[86, 110]

Weitere Reagenzien, die zur elektrostatischen Stabilisierung von MNP eingesetzt werden, sind Weinsäure^[111], Dimercaptobernsteinsäure^[112] oder Glukonsäure^[113].

Alginat, ein in Braunalgen vorkommendes Polysaccharid mit vielen Carboxyl-Gruppen, wird als polymerer elektrostatischer Stabilisator eingesetzt. Bei der Stabilisierung wechselwirken die COOH-Gruppen des Alginats mit der Eisenoxid-Partikeloberfläche und bilden gleichzeitig im Basischen negative Ladungen aus. Der resultierende Polyelektrolyt führt, aufgrund der vielen im Molekül gebundenen Ladungen, zu einer effektiven elektrostatische Stabilisierung ^[114-117]

Die elektrostatische Stabilisierung ist sehr stark von Parametern wie der Ionenstärke und dem pH-Wert des Trägermediums abhängig. Aus diesem Grund ist ihr Einsatz in komplexen biologischen Systemen wie dem Blut, wo die Anwesenheit von Salzen die Oberflächenladung der Partikel und damit ihre Stabilisierung

aufheben können, nur eingeschränkt möglich.^[49] Für solche Systeme eignen sich sterisch stabilisierte MNP besser.

Sterische Stabilisierung Die sterische Stabilisierung von MNP basiert auf der Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche mit langkettigen, sterisch anspruchsvollen Molekülen. Hierfür werden auf der einen Seite oberflächenaktive Moleküle, z. B. Tenside, verwendet und auf der anderen Seite kommen Polymere zum Einsatz.^[10, 12, 37, 38, 78]

Ein klassisches Tensid zur sterischen Stabilisierung von MNP ist die Ölsäure.^[108] Diese ungesättigte Fettsäure wird über die Carboxylgruppe auf der Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel gebunden und bietet mit einer Molekülgröße von achtzehn C-Atomen, bei ausreichend hoher Belegungsdichte, eine sehr gute sterische Abschirmung der magnetischen Kerne. Verantwortlich hierfür ist die *cis*-Doppelbindung in der Mitte des Moleküls, die zu einem „Knick“ führt.^[118] Ölsäure wird entweder während der Partikelsynthese zur Stabilisierung zugesetzt, oder anschließend nach der Partikelbildung. Ölsäuremodifizierte Partikel können in unpolaren Lösemitteln wie Toluol, Hexan oder Hexadecan stabil dispergiert werden.

Neben anderen Fettsäuren wie Ricinolsäure und Dodecansäure wurden auch Phosphonsäuren wie Dodecylphosphonsäure und Hexadecylphosphonsäure zur sterischen Stabilisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln eingesetzt.^[108]

Jedoch sind die meist verwendeten langkettigen Kohlenwasserstoffanker hydrophob und eignen sich daher nicht für die Stabilisierung von MNP in wässrigen Systemen.

Hier bieten Polymere eine vielfältige Auswahl an hydrophilen Strukturen, die zur Stabilisierung genutzt werden können. Polymere können grundsätzlich in natürliche und synthetische Polymere unterteilt werden.

Natürliche Polymere Das am häufigsten genutzte natürliche Polymer für die sterische Stabilisierung von MNP ist das Dextran und seine Modifikationen (z. B. Carboxymethyldextran (CMD)).^[37]

Dextran ist ein Polysaccharid und ist aus α -D-Glucopyranosyl-Einheiten aufgebaut. Es gibt Dextrane in einer großen Anzahl von Kettenlängen. Die Wechselwirkung der Dextranmoleküle mit der Eisenoxid-Nanopartikeloberfläche verläuft über die Hydroxid-Gruppen der Zuckermoleküle, wobei angenommen

wird, dass mehrere Segmente eines Moleküls mit der Partikeloberfläche interagieren.^[119] Durch die große Anzahl der Hydroxid-Gruppen sind die entstehenden Bindungen stabil und können erst durch Erwärmen über 120 °C gebrochen werden. Dextrane werden genau wie die Tenside nach oder *in situ* während der Partikelsynthese eingesetzt. Bei der *in situ* Verwendung wird eine Reduktion der Partikelgröße, im Vergleich zu Partikeln, die in Abwesenheit von Dextran hergestellt wurden, beobachtet.^[120]

Chitosan gehört genau wie Dextran zu den Zuckern und ist als Polyamino-saccharid ein natürlich vorkommendes Biopolymer. Es ist alkalisch, hydrophil, nicht toxisch, biokompatibel und bioabbaubar. Chitosan ist ein verbreitetes Material in der Pharmazie, Medizin und Biotechnologie. Es wurde in verschiedenen Arbeiten bereits zur sterischen Stabilisierung von MNP genutzt.^[121–124]

Synthetische Polymere Die sterische Stabilisierung von MNP wurde für zahlreiche synthetischen Polymermaterialien beschrieben. Diese Arbeiten sind in verschiedenen Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[10, 55, 125–127] Die Verwendung von Polymeren bietet den großen Vorteil, dass eine Vielfalt von funktionellen Polymeren bekannt ist, die über die reine Stabilisierung der Nanopartikel hinaus eine manigfaltige Funktionalisierung ermöglicht.

Die Modifizierung der Partikeloberfläche erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. Zum einen können vorsynthetisierte Polymere in einem *grafting-to* Prozess auf der Oberfläche verankert werden, und entweder zur *in situ* Stabilisierung der magnetischen Kerne oder von separat synthetisierten Partikeln dienen. Hierfür werden Polymere verwendet, die eine oder mehrere funktionelle Gruppen wie OH, COOH, NH₂ oder PO(OH)₂ zur Bindung an die Oberfläche tragen,^[107] oder die über Silane auf der Oberfläche immobilisiert werden.^[128]

Zum anderen ist die Polymerumhüllung von MNP durch die Polymerisation geeigneter Monomere in Anwesenheit der Partikel möglich. Polymerisationsverfahren die dabei Anwendung finden sind Suspensions-, Dispersion- und Emulsionspolymerisationen, insbesondere Micro- und Miniemulsionspolymerisationen. Darüber hinaus werden oberflächeninitiierte Polymerisationen benutzt. Partikelmorphologien, die durch die unterschiedlichen Methoden erreicht werden sind in Abbildung 1.3 gezeigt.^[10]

Die Polymerisation initiiert von der Oberfläche der Nanopartikel führt zu Polymerbürstenpartikeln. Für diese Form der Polymerisation werden Nanoparti-

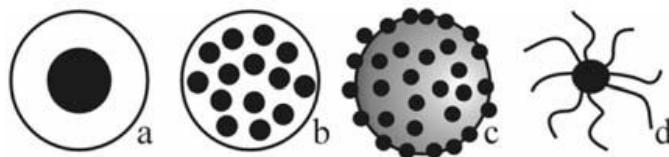


Abb. 1.3: Morphologie von magnetischen Polymernanopartikeln: a) Einkernpartikel mit kompakter Polymerhülle; b) Multikernpartikel homogen verteilt innerhalb einer Polymermatrix; c) Nanopartikel auf der Oberfläche eines Polymerkerns (Erdbeermorphologie), d) Bürstenmorphologie^[10] ©2007 WILEY-VCH

kel benötigt, die mit geeigneten Initiator-molekülen oberflächenfunktionalisiert sind. Diese können über Gruppen wie COOH, OH, usw. an die Oberfläche der Partikel gebunden werden. Darüber hinaus ist die Immobilisierung von Silanen mit Initiatorfunktionen als monolagige vernetzte Oberflächenbeschichtung möglich.^[129, 130]

Für die oberflächeninitiierte Polymerisation werden viele bekannte Polymerisationsmechanismen angewendet, wie z.B. die freie radikalische Polymerisation (FRP),^[131–133] die „lebende“ radikalische Polymerisation (LRP),^[134–142] die anionische^[143–145] und kationische Polymerisation,^[146, 147] sowie die ringöffnende (ROP)^[148, 149] und die ringöffnende Metathese-Polymerisation (ROMP). Von besonders großem Interesse sind hierbei die „lebenden“ Mechanismen, da diese eine hohe Strukturkontrolle der Polymere ermöglichen. Für diese Dissertation wurde die oberflächeninitiierte *atom transfer radical polymerization* (ATRP) als Methode gewählt, die der „lebenden“ Radikalik zugeordnet wird.

Für biomedizinische Anwendungen werden Polymere benötigt, die neben einer hohen Wasserlöslichkeit biokompatibel sein müssen. Das am häufigsten verwendete synthetische Polymer ist Polyethylenglykol.^[150, 151]

Polyethylenglykol (PEG) PEG-modifizierte Nanopartikel sind für *in vivo* Anwendungen sehr gut geeignet, da sie eine hohe Zirkulationszeit im Blutkreislauf zeigen.^[152] Verantwortlich hierfür ist die Verringerung der Plasma-Proteinadsorption aus dem Blut durch die PEG-Ketten, woraufhin die Partikel nicht von Makrophagen aufgenommen werden, da sie unsichtbar für das RES sind.^[153–156] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PEG-umhüllte Nanopartikel im Vergleich zu unmodifizierten Partikeln besser in Krebszellen aufgenommen werden.^[157]

Weitere Polymere, die eingesetzt werden, sind Polyvinylalkohol (PVA), Polyvi-

nylpyrrolidon (PVP), Poly(acrylsäure), Poly(methacrylsäure), Polyethylenimin und Polyethylenoxid-Derivate.^[37]

1.4 Multifunktionale MNP

Für einen effektiven Einsatz magnetischer Nanopartikel in biomedizinische Anwendungen ist neben den magnetischen Eigenschaften der Nanomaterialien die Funktionalität der Partikeloberfläche entscheidend (s. Kapitel 1.1).

Die Einführung von funktionellen Gruppen auf Nanopartikeloberflächen erfolgt häufig durch funktionale Polymerhüllen. Diese werden entweder mittels funktionaler Monomere aufgebaut, oder die gewünschten Funktionen werden über polymeranaloge Reaktionen eingeführt. Polymeranaloge Reaktionen werden üblicherweise für Moleküle wie Affinitätsliganden, Antikörper, Proteinen oder Nukleinsäuren verwendet.

Als Ausgangsmaterial zur polymeranalogen Anbindung solcher Funktionsliganden können polymerumhüllte Partikel genutzt werden, die Amino- oder Carboxygruppen in der Polymerhülle tragen. Für die Anbindungsreaktion müssen carboxy-modifizierte Nanopartikel gewöhnlich zunächst aktiviert werden. Hierbei stellt die Reaktion von Carboxylgruppen mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC) zu Succinimidyl-Aktivestern, die am meisten genutzte Aktivierungsmethode dar. Nach der Aktivierung werden die Nanopartikel mit Funktionsliganden umgesetzt, die neben der einzuführenden Funktion auch eine oder mehrere Aminogruppen als Bindungsstellen tragen. Die Amine reagieren mit den Aktivestern zu Amidien und fixieren so die Funktionsliganden irreversibel auf den Nanopartikeln. Die Anbindung von funktionalen Molekülen an amino-funktionale Partikel wird analog durchgeführt, nur dass hierbei die Funktionsliganden Succinimidylestergruppen als Bindungsstelle tragen.

Durch hochfunktionale Polymerhüllen kann eine Vielzahl an modifizierten MNP für unterschiedliche Anwendungen generiert werden. Besonders interessant sind multifunktionale MNP, die eine Kombination verschiedener Funktionen auf einer Partikeloberfläche aufweisen und so gleichzeitig für unterschiedliche Aufgaben in z. B. komplexen biologischen Systemen genutzt werden können. Im Folgenden werden an ausgewählten Beispielen solche multifunktionalen Nanopartikel vorgestellt.

Ein Beispiel für multifunktionale MNP präsentieren Lee et al. in ihrer

1 Einleitung

Arbeit.^[158] Sie kombinieren vier unterschiedliche Funktionen mit Manganferrit-Nanopartikeln (MnFe_2O_4) und erhalten so Materialien, die simultan zur Wirkstofffreisetzung und zur multimodalen Bildgebung eingesetzt werden können.

Als MNP dienen eng verteilte (MnFe_2O_4)-Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 15 nm. Diese werden so modifiziert, dass zwei Funktionsliganden über Disulfidbrücken auf der Partikeloberfläche fixiert werden können. Der erste Ligand (PEG-RGD) ist aus einem PEG-Derivat ($M_W=3400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und einem cyclischen Peptid mit der Sequenz Arginin-Glycin-Aspartat (Arg-Gly-Asp) (RGD) zusammengesetzt. Den zweiten Liganden bildet eine *small interfering RNA* (siRNA), die zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy5) modifiziert ist. Der Funktionsligand PEG-RGD dient durch die PEG-Einheit zum einen der Stabilisierung der Nanopartikel in der biologischen Umgebung, und zum anderen bindet das Peptid RGD spezifisch an einen Rezeptor ($\alpha_v\beta_3$ integrin), der in metastatischen Tumorzellen und Tumroendothelzellen überexprimiert wird und für die rezeptorvermittelte Endocytose zuständig ist. Damit können die Partikel spezifisch in Tumorzellen eingeschleust werden (s. Abb. 1.4). Der zweite Funktionsligand (siGFP-Cy5) ist mit einer siRNA

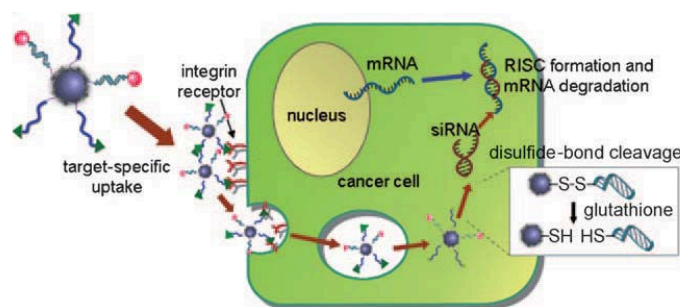


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der spezifischen Aufnahme von multifunktionalen MNP von Lee et al. in Zellen und die Freisetzung und Wirkung von siRNA auf die Proteinexpression^[158], ©2009 WILEY-VCH

(siGFP) ausgestattet. siRNA-Moleküle sind in der Lage spezifisch die Expression von Genen bzw. Proteinen zu minimieren, was für die Behandlung von Erbkrankheiten intensiv untersucht wird.^[159–161] Im Fall des siGFP wird die Expression des Grünfluoreszierenden Proteins (GFP) inhibiert, was als Modellsystem genutzt wird, um die Wirksamkeit der siRNA nachzuweisen. An das siGFP-Molekül ist zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff (C5y) gekoppelt. Dieser macht die Abbildung und Lokalisierung der multifunktionalen MNP innerhalb von Zellen durch Konfokale Laserscanningmikroskopie möglich.

Lee et al. demonstrieren, dass ihre multifunktionalen MNP genutzt werden können, um selektiv Zellen zu markieren, spezifisch die Proteinexpression zu inhibieren und gleichzeitig die Nanopartikel im Zellinneren mit bildgebenden Verfahren zu verfolgen.

Durch die Funktionalisierung von MNP mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Peptid erhalten Kelly et al. Nanomaterialien zur selektiven Verfolgung und Abbildung von Prostatakarzinomen.^[162] In ihrer Arbeit wird ein Peptid identifiziert, das selektiv und mit hoher Affinität an Hepsin (HPN) bindet. Hepsin ist ein Oberflächenprotein, das in Prostatakrebszellen überexprimiert wird und nur in sehr geringen Konzentrationen auf gesunden Prostatazellen zu finden ist. Dem entsprechend dient Hepsin als Biomarker für die Anbindung von fluoreszierenden MNP. In Zellexperimenten und in einem *in vivo* Tierversuch wird die selektive Bindung der peptidfunktionalisierten Nanopartikel demonstriert. Die multifunktionalen MNP werden spezifisch an die HPN-Biomarker der Prostatazellen gebunden, und ermöglichen über den Fluoreszenzfarbstoff Tumore durch fluoreszenzvermittelte Tomographie zu identifizieren und zu lokalisieren.

Ein Ansatz zur Funktionalisierung von MNP, der neben der Verwendung funktioneller Molekülgruppen, immer mehr in den Vordergrund tritt, ist die Verwendung von stimuliresponsiven Polymerhüllen. Besonders thermoresponsive Polymere finden hierbei Anwendung. Die Arbeitsgruppe um Rinaldi präsentiert in ihrer Arbeit copolymerumhüllte Magnetit-Nanopartikel, die sowohl ein kritisches Lösungsverhalten in Wasser zeigen, als auch fluoreszieren.^[163] Zur Realisierung dieses Systems wurden durch Mitfällung erzeugte Fe_3O_4 -Nanopartikel mit Copolymeren, bestehend aus N-isopropylacrylamid (NIPAAm) und einem fluoreszenz-modifizierten Acrylamid (FMA), durch freiradikalische Dispersionspolymerisation eingekapselt. Poly(NIPAAm) weist in wässriger Lösung eine untere kritische Lösungstemperatur (lower critical solution temperature, LCST) von 32 °C auf, bei der die Polymere von einem hydrophilen solvatisierten Zustand in einen hydrophoben kollabierten Zustand übergehen. Dieses Verhalten wird ausgenutzt, um eine Größenänderung der erzeugten Kern-Schale-Partikel thermisch zu induzieren. Mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) wird nachgewiesen, dass sich der hydrodynamische Durchmesser d_h von 100 nm auf 50 nm im Bereich der Übergangstemperatur von PNIPAAm verringert. Die Fluoreszenz der magnetischen Nanopartikel in Dispersion steigt hingegen signifikant mit der Temperatur an. Die duale Antwort der Partikel auf

Temperaturänderung ist für die lokalisierte Wirkstofffreisetzung von Interesse. Ohnishi et al. stellen ebenfalls thermoresponsive MNP dar und nutzten diese zur selektiven Separation von Zellen und Biomolekülen.^[164] In einer dreistufigen Synthese werden Magnetit-Nanopartikel, die durch Mitfällung erhalten wurden, mittels radikalischer Polymerisation mit einem Copolymer aus N-Acryloylglycinamid (NAGAM) und einem Biotinmonomer N-(3-biotinamidpropyl)methacrylat (NBPMA) umhüllt. Das Copolymer zeigt eine obere kritische Lösungstemperatur (upper critical solution temperature, UCST) von 18 °C in phosphathaltigen Salzpuffern. Dieses hat zur Folge, dass die Nanopartikel oberhalb von 18 °C, aufgrund der guten Löslichkeit der Copolymerhülle, stabil dispergiert im Trägermedium vorliegen. Bei Temperaturen < 18 °C agglomerieren und sedimentieren die Partikel, da die Polymerhüllen im Trägermedium unlöslich werden. Dieses Verhalten wird für Separationsanwendungen ausgenutzt. Die Biotinkomponente ermöglicht darüber hinaus die Funktionalisierung der Nanopartikel mit Avidin, das zur selektiven Bindung von biotinylierten Zielkomponenten genutzt wird. Die dargestellten thermoresponsiven MNP tragen den Namen Therma-Max und werden von der Firma Magnabeat Inc. vertrieben. Magnabeat Inc. bietet auch Nanopartikel auf Basis von LCST-Polymeren an, die von Fukuda et al. zur einfachen und schnellen Selektion von Hefezellen genutzt wurden.^[165]

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Darstellung hydrophiler magnetischer Polymerhybridmaterialien und deren Einsatz in biomedizinischen Anwendungen. Es sollen magnetische Fänger für Separationsanwendungen entwickelt werden, die eine hohe Bindekapazität für Zielkomponenten aufweisen und sich mit kleinen magnetischen Feldgradienten abtrennen lassen. Desweiteren sollen magnetische Biokatalysatoren auf Basis eines Proteins dargestellt werden.

Die Hybridsysteme sollen eine Kern-Schale-Struktur aufweisen, wobei der Kern aus einem magnetischen Magnetit-Nanopartikel gebildet und die Schale aus einer funktionellen hydrophilen Polymerhülle aufgebaut werden soll.

Die Polymerhüllen sollen auf eine definierte Weise an die Nanopartikeloberfläche gebunden werden. Die Zusammensetzung und die Dicke der stabilisierenden Polymerhülle soll steuerbar sein. Die Polymere sollen so gewählt werden, dass sie eine thermoreversible Stabilisierung der magnetischen Nanopartikel in Wasser und polaren Medien möglich machen.

Die erhaltenen Hybridbürstenpartikel sollen mittels physikalischer und chemischer Methoden charakterisiert werden. Neben der Zusammensetzung und den magnetischen Eigenschaften der Partikel soll die Architektur der Kern-Schale-Materialien betrachtet werden. Das Dispersionverhalten der synthetisierten magnetischen Polymerbürsten soll in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht werden. Desweiteren soll die Fähigkeit der erhaltenen magnetischen Nanopartikel zur Transformation von magnetischer Energie in Wärme untersucht werden. Zur Anbindung von Zielkomponenten sollen geeignete funktionelle Gruppen in die Polymerhüllen eingebracht werden. Durch Anbindung eines Proteins an die Polymerbürstenpartikel sollen magnetische Biokatalysatoren synthetisiert werden. In Modellversuchen soll das Potential der magnetischen Polymerbürstenpartikel für den Einsatz in biomedizinischen Anwendungen bestimmt werden.

3 Überblick über die veröffentlichten Arbeiten

Fokus dieser Dissertation ist die Synthese von nanoskaligen magnetischen Polymerhybridmaterialien und ihre Verwendung in biomedizinischen Anwendungen.^[166, 167]

Durch die Kombination von superparamagnetischen Nanopartikeln mit unterschiedlichen Polymeren werden Kern-Schale Materialien erzeugt, die aufgrund der magnetischen Eigenschaften zur magnetischen Separation und zur intrinsischen Erwärmung genutzt werden können. Die Polymereigenschaften der Hülle führen zu einem thermoresponsiven Dispersionsverhalten der Hybridpartikel in wässrigen Trägermedien und zu hochfunktionalen Trägern von Bindungsstellen für aminofunktionale Zielobjekte.

Es werden Ergebnisse zur Oberflächenmodifikation der verwendeten magnetischen Nanopartikel und zum Aufbau von thermoresponsiven Polymerhüllen vorgestellt. Das Dispersionsverhalten der dargestellten Materialien und das Potential zur Nutzung in biomedizinischen Anwendungen findet dabei besondere Beachtung.

Im Rahmen dieser Arbeit werden naßchemisch hergestellte Magnetit (Fe_3O_4) Nanopartikel als Ausgangsmaterial verwendet und mit Carboxymethyldextran (CMD)^[168] oder synthetischen Polymeren, basierend auf unterschiedlichen Methacrylaten^[166, 167, 169, 170], umhüllt. Die Polymerhülle dient dabei als Stabilisator der Partikel in Trägerflüssigkeiten gegen Agglomeration und Sedimentation, wodurch stabile magnetische Flüssigkeiten erhalten werden. Für die Darstellung der synthetischen Polymerhüllen wird die Verwendung einer oberflächeninitiierten ATRP als Methode zum kontrollierten Aufbau von Hybridbürstenstrukturen untersucht.^[169]

Die dargestellten magnetischen Flüssigkeiten werden in Bezug auf ihre magnetischen Eigenschaften charakterisiert. Basierend auf Oligo(ethylenglykol)methylethermethacrylaten (OEGMA) werden Bürstenpartikel

präsentiert, die ein thermoresponsives Dispersionsverhalten in Methanol^[169] bzw. Wasser^[167] zeigen. Aufgrund des kritischen Löseverhaltens der oberflächenfixierten Polymere kann die Agglomeration und Sedimentation der Partikel thermisch induziert werden. Das thermoresponsive Dispersionsverhalten wird mittels optischer Methoden in Abhängigkeit von der Zusammensetzung und der Molmasse der Polymerhülle untersucht.

Zur Funktionalisierung der Polymerhülle für magnetische Separationsanwendungen werden durch Copolymerisation Aktivesterfunktionen in die Polymerarme eingebracht, die als Bindestellen für aminofunktionale Zielmoleküle dienen.^[166, 167] Die erhaltenen magnetischen Träger weisen aufgrund der Bürstenstruktur eine hohe Funktionalisierungsdichte auf und können durch Ausnutzen der LCST der Polymerhülle leicht vom Trägermedium separiert werden. Anhand von Benzylamin als Modellverbindung werden die guten Binde- und Separationseigenschaften der magnetischen Bürstenpartikel demonstriert. Analog kann gezeigt werden, dass die Immobilisierung von Trypsin an die aktivesterfunktionalen Kern-Schalepartikel zu magnetisch geträgerten Biokatalysatoren führt.^[166]

Die hohe Bindungskapazität der aktivesterfunktionalen magnetischen Polymere wird in Zellexperimenten ausgenutzt, um die Oberfläche von humanen Endothelzellen magnetisch zu markieren.

Aufgrund der Biokompatibilität der dargestellten POEGMA funktionalisierten Bürstenpartikel und CMD stabilisierten Partikelclustern können Krebszellen erfolgreich magnetisch markiert und separiert werden.^[168]

In Erwärmungsexperimenten wird das Verhalten der synthetisierten magnetischen Flüssigkeiten in hochfrequenten magnetischen Wechselfeldern untersucht. Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse zusammenfassend vorgestellt und in einem gesamtwissenschaftlichen Kontext erläutert.

3.1 Synthese magnetischer Polymerhybridmaterialien

Die für diese Arbeit zentralen magnetischen Polymerhybridpartikel lassen sich als Kombination aus anorganischen magnetischen Nanopartikeln und organischen Polymeren beschreiben. Der Aufbau erfolgt so, dass die Nanopartikel als Kerne eingesetzt werden und eine Polymerhülle darum generiert wird. Die Po-

lymerhülle hat drei wesentliche Funktionen: Zum einen schirmt sie die magnetischen Nanopartikeln von einander ab und verringert auf diese Weise die interpartikulären Wechselwirkungen, zum anderen führt sie zur thermoresponsiven Stabilisierung der Partikel in Trägermedien und so zu magnetischen Flüssigkeiten und zum dritten dient sie als Träger für funktionelle Gruppen.

In den folgenden Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 werden die Synthese und Oberflächenfunktionalisierung der magnetischen Nanopartikel beschrieben und die oberflächeninitiierte ATRP als Methode zum kontrollierten Aufbau von magnetischen Bürstenpartikeln präsentiert.

3.1.1 Synthese und Oberflächenfunktionalisierung magnetischer Nanopartikel

Synthese von Magnetit-Nanopartikeln

Die nasschemische Synthese von Fe_3O_4 -Nanopartikeln erfolgt durch alkalische Fällung. Hierfür wird eine Eisen(II)- und Eisen(III)chloridlösung zu einer ammoniakalischen Lösung getropft^[169]. Bei der Reaktion, die mittels der Reaktionsgleichungen 3.1 beschrieben werden kann, entstehen nanokristalline magnetische Partikel, die einen Niederschlag bilden.



Die erhaltenen Partikel werden gründlich gewaschen und anschließend mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Röntgendiffraktometrie (XRD) im trockenen Zustand untersucht. Abbildung 3.1 zeigt eine TEM-Aufnahme von frisch gefällten Fe_3O_4 -Nanopartikeln. Es sind magnetische Kerne zu erkennen, deren Durchmesser zwischen 5 nm und 20 nm liegen. Als anzahlgemittelten Durchmesser erhält man durch Ausmessen der Partikel Werte zwischen 10 nm und 11 nm. Mittels XRD-Analyse kann aus der Signallage und -intensität auf die Struktur der Kristallite geschlossen werden. Für die synthetisierten Nanopartikel werden spinellartige Eisenoxid-Phasen gefunden, die auf Magnetit und Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), als magnetische Eisenoxidmodifikationen, schließen lassen. Weitere kristalline Phasen werden nicht gefunden. Über die Scherrer-Gleichung kann aus der Signaltbreite auf die Größe der Kristallite geschlossen

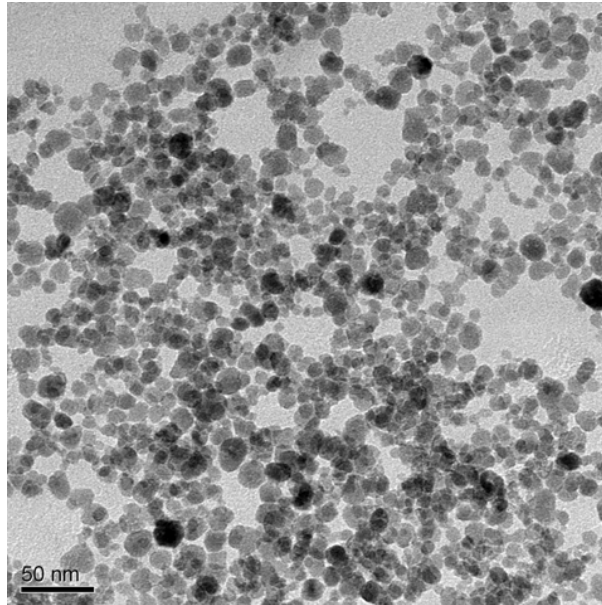


Abb. 3.1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Fe_3O_4 -Nanopartikeln.^[171]

werden.^[172] Hierbei ergeben sich volumenmittlere Werte zwischen 12 nm und 14 nm für den Durchmesser, die mit den aus TEM bestimmten Werten gut übereinstimmen.^[169]

Die magnetische Charakterisierung der Fe_3O_4 -Nanopartikel erfolgt mittels quasistatischer *vibrating sample magnetometry* (VSM). Hierbei werden von den, durch elektrostatische Stabilisierung (s. Abschnitt 3.1.1) oder Polymerfunktionalisierung (s. Abschnitt 3.1.2) erhaltenen, stabilen magnetischen Flüssigkeiten Magnetisierungskurven aufgenommen (s. Abb. 3.2). Die Magnetisierungskurven für die dargestellten Dispersionen der magnetischen Nanopartikel weisen eine sigmuidale Form mit Koerzivitäten $< 0,6 \text{ kAm}^{-1}$ auf, was charakteristisch für superparamagnetisches Verhalten ist. Aus der Anfangsuszeptibilität werden mittlere Kerndurchmesser von 11,8 nm - 12,9 nm berechnet, die mit den aus TEM und XRD bestimmten Werten sehr gut übereinstimmen und darauf hinweisen, dass die magnetischen Nanopartikel einzeln auf das angelegte Magnetfeld reagieren.^[171]

Die alkalische Fällung von Magnetit stellt für diese Arbeit eine robuste und wenig aufwändige Methode dar, reproduzierbar magnetische Eisenoxidpartikel im Gramm-Maßstab herzustellen.

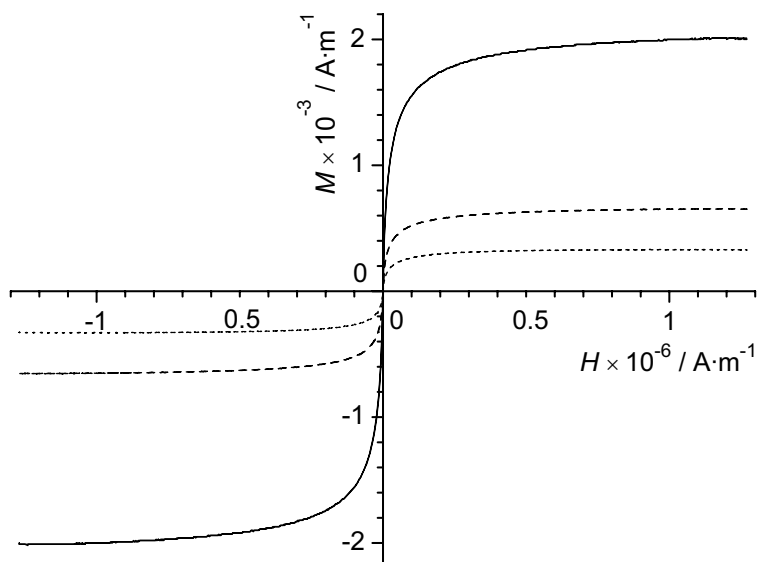


Abb. 3.2: Magnetisierungskurven (VSM) von gesättigten Dispersionen auf Basis von Polymethoxyethylmethacrylat umhüllten Fe_3O_4 -Nanopartikeln; $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 2,9$ Massen-% (durchgezogene Linie), $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 1,0$ Massen-% (gestrichelte Linie), $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,48$ Massen-% (gepunktete Linie),^[169] ©2006 ACS

Elektrostatische Stabilisierung von Magnetit-Nanopartikeln

Die elektrostatische Stabilisierung von frisch gefällten Magnetit-Nanopartikeln erfolgt durch Oberflächenfunktionalisierung der magnetischen Kolloide mit Citronensäure.^[171] Die dreiwertige Citronensäure chemisorbiert dabei auf der Fe_3O_4 -Nanopartikeloberfläche, was durch ATR-IR-Spektroskopie nachgewiesen werden kann, und führt in wässrigen Medien zu einer Stabilisierung der Partikel gegenüber Agglomeration und Sedimentation, so dass stabile magnetische Flüssigkeiten entstehen. Die Chemisorption der Citronensäure führt zu einer pH-Wert abhängigen negativen Aufladung der Partikeloberfläche, die durch das Zetapotential angezeigt wird. Die Ergebnisse der Zetapotentialmessungen belegen eine exzellente kolloidale Stabilität der Fe_3O_4 -Nanopartikel im betrachteten pH-Wertbereich ($3,5 < \text{pH} < 9$). Der isoelektrische Punkt (PZC) der Partikel liegt unterhalb von pH 3,5.

Mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) kann der hydrodynamische Durchmesser d_h der dispergierten Partikel im Trägermedium bestimmt werden. Es wird reproduzierbar ein Wert von 19 nm für den anzahlgemittelten d_h gefunden. Unter Berücksichtigung der aus TEM und XRD-Analysen erhaltenen Werte für den Kerndurchmesser von 11 nm kann davon ausgegangen werden, dass die

elektrostatisch stabilisierten Fe_3O_4 -Nanopartikel einzeln dispergiert vorliegen und größere Agglomerate auszuschließen sind.

Die erhaltenen magnetischen Flüssigkeiten sind über Monate stabil und dienen als Basis für die Funktionalisierung mit Alkoxysilanen (s. Abschnitt 3.1.1).

Oberflächenmodifikation

Die Funktionalisierung der frisch gefällten Nanopartikeloberfläche dient der Fixierung von Initiatoren, um die im nächsten Abschnitt thematisierte ATRP von der Oberfläche der Partikel zu starten. Im Rahmen dieser Arbeit werden hierfür zwei unterschiedliche Wege beschrieben. Es werden Carbonsäurederivate verwendet, die aufgrund der hohen Affinität der Carboxylgruppe zu Fe_3O_4 -Oberflächen an der Partikeloberfläche chemisorbiert werden.

Obwohl festgestellt wurde, dass diese Anbindung in organischen Lösemitteln eine hohe Stabilität aufweist, wurde in wässriger Umgebung mit der Zeit eine Hydrolyse der Oberflächenbindung beobachtet. Daher kommt darüber hinaus ein zweites Verfahren zum Einsatz, in dem Alkoxysilane als Funktionalisierungsreagenzien verwendet werden, um so zu irreversiblen Modifikationen der Partikeloberflächen zu gelangen.^[171]

Um einen ATRP-Initiator auf der Oberfläche der magnetischen Nanopartikel zu fixieren wird 2-Brom-2-methylpropionsäure (BIB) verwendet.^[167, 170] Diese Säure wird auf der einen Seite durch die Carboxyfunktion auf der Partikeloberfläche chemisorbiert und verfügt auf der anderen Seite über ein Bromatom, das homolytisch abgespalten werden kann und ein tertiäres Radikal zum Start der ATRP hinterläßt. Durch Rühren der frisch gefällten Partikel in einer methanolischen BIB Lösung bei 50 °C wird die Partikeloberfläche funktionalisiert. Die erfolgreiche Anbindung der Säure wird qualitativ durch ATR-IR-Spektroskopie und quantitativ durch Elementaranalyse (EA) sowie Thermogravimetrie (TGA) nachgewiesen. Für die Funktionalisierungsdichte des Initiators f_{Ini} auf der Oberfläche werden Werte von $0,33 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (EA) bzw. $0,26 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (TGA) gefunden.^[169]

Für die zweite Methode zur Oberflächenfunktionalisierung von Fe_3O_4 -Nanopartikel werden Alkoxysilane als Reagenzien eingesetzt.^[171] Alkoxysilane sind aufgrund ihrer Struktur in der Lage unter Abspaltung von Alkoholen und Wasser zu polymeren Molekülen und auch dreidimensional vernetzten Strukturen zu kondensieren. Diese Eigenschaft wird bei der Oberflächenmodifikation

der Nanopartikel ausgenutzt. Als Ausgangsmaterial dienen hierfür die zuvor erwähnten Fe_3O_4 @CS-Nanopartikel (s. Abschnitt 3.1.1). Diese werden in Ethanol suspendiert und mit Alkoxysilanen versetzt. Im Reaktionsverlauf reagieren die Alkoxysilane zu einem monolagigen Käfig, der sich um die einzelnen Partikel legt. Diese Form der Umhüllung ist irreversible und dadurch für die Anwendung der Partikel in wässrigen Medien sehr gut geeignet. Die Methode hat sich als geeignet erwiesen, um Fe_3O_4 -Nanopartikel mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalitäten (Doppelbindungen, Epoxide, Alkane und Initiatoren) zu versehen, die sich für Folgereaktionen (Polymerisationen) oder als funktionale Agenzien (Vernetzer, Initiatoren) eignen.^[171]

Im Folgenden wird jedoch nur auf 4-Chlormethylphenyltrimethoxysilan (CIPTS) näher eingegangen. CIPTS stellt genau wie BIB einen ATRP-Initiator dar, da bei homolytischer Spaltung der Cl-C-Bindung ein für die Initiation geeignetes mesomeriestabilisiertes Radikal entsteht. Die Fe_3O_4 @CS Nanopartikel werden mit CIPTS umgesetzt und die erfolgreiche Oberflächenfunktionalisierung wird mittels ATR-IR qualitativ nachgewiesen. Die EA der Partikel ergibt eine Funktionalisierungsdichte von $f = 0,48 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. Nach der Funktionalisierung lassen sich die CIPTS umhüllten Partikel homogen in DMSO dispergieren. DLS-Messungen dieser DMSO-Dispersionen ergeben für den hydrodynamischen Durchmesser d_h einen anzahlgemittelten Wert von 26 nm, der gegenüber dem Wert von Fe_3O_4 @CS Partikeln nur geringfügig gewachsen ist und somit von weitgehend individuell funktionalisierten separaten Partikeln ausgegangen werden kann. Durch die hohe Dispersionsstabilität der CIPTS funktionalisierten Partikel (Fe_3O_4 @CIPTS) kann für die Initiation der ATRP von quasi-homogenen Reaktionsbedingungen ausgegangen werden, so dass die Partikel als effektive Makroinitiatoren eingesetzt werden können (s. Abschnitt 3.1.2).

3.1.2 Oberflächeninitiierte ATRP

Die Verwendung der oberflächeninitiierten ATRP als Polymerisationsmethode ist ein zentraler Punkt dieser Arbeit und bildet den Schwerpunkt des Syntheseweges für viele der dargestellten Materialien.^[166, 167, 169, 170, 173] Der grafting-from-Ansatz wurde gewählt, um eine möglichst hohe Belegungsdichte mit Polymeren auf der Partikeloberfläche zu erreichen, und so Bürstenarchitekturen zu generieren. Diese zeichnen sich durch eine exzellente sterische Abschirmung der magnetischen Kerne aus, wodurch stabile magnetische Flüssigkeiten erhalten werden.

3 Überblick über die veröffentlichten Arbeiten

Der "lebende" Mechanismus der ATRP wird darüber hinaus ausgenutzt um die Molmasse und Molmassenverteilung der oberflächenfixierten Polymerarme zu kontrollieren und gezielt einzustellen. Zusätzlich kann durch ATR Copolymerisation die Zusammensetzung der Polymerhüllen gezielt variiert werden, um z.B. Aktivester als funktionelle Gruppen in die Polymerhülle der magnetischen Nanopartikel einzubringen. Aufgrund der Bürstenstruktur können so hochfunktionale Nanoreaktoren erhalten werden.

Als Makroinitiatoren für die ATRP dienen die im Abschnitt 3.1.1 beschriebenen BIB und CIPTS funktionalisierten Fe_3O_4 -Nanopartikel. Für den Aufbau von polymeren Hüllen, die zu magnetischen Flüssigkeiten in organischen LösemitteIn führen, wird Methoxyethylmethacrylat (MEMA) verwendet.^[169, 173] Oligo(ethylenglykol)methylethermethacrylat (OEGMA) bildet Polymerhüllen zur Stabilisierung der resultierenden Partikel in Wasser und wird außerdem als Comonomer zusammen mit MEMA eingesetzt.^[167] Succinimidylmethacrylat (SIMA) stellt einen aktiven Ester dar, der unter Amidbildung mit primären Aminen reagiert und daher als potentielle Bindungsstelle für Biomoleküle wie Proteine in die Polymerhülle mit eingebracht wird.^[166]

Die Polymerisation wird entweder in Masse (MEMA) oder in Suspension bzw.

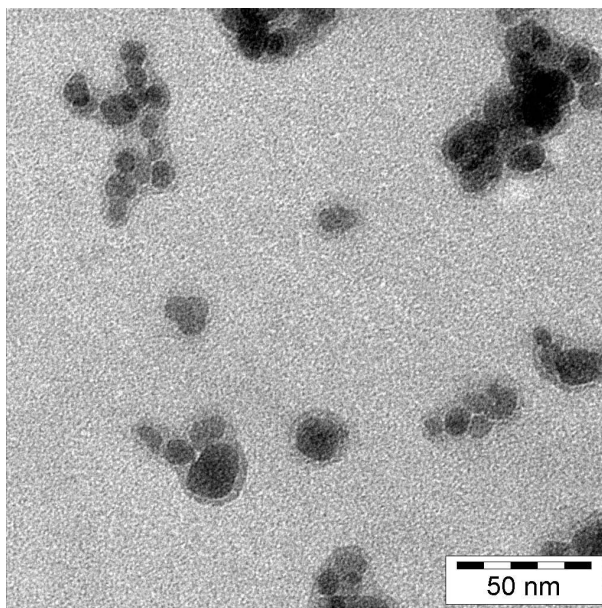


Abb. 3.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von PMEMA umhüllten Fe_3O_4 -Nanopartikeln,^[169] ©2006 ACS

Dispersion in DMSO (OEGMA, SIMA) durchgeführt. Als Katalysator dient Kupfer(I)bromid (CuBr), das durch 2,2'-Bipyridin (bpy) komplexiert und damit

3.1 Synthese magnetischer Polymerhybridmaterialien

in organischen Lösemitteln löslich wird. Nach Durchführung der Polymerisation werden die erhaltenen kolloidalen Systeme mittels verschiedener Methoden analysiert, um die angenommene Bürstenarchitektur zu bestätigen. Exemplarisch werden im Folgenden die Ergebnisse zur Synthese von $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PMEMA}$ vorgestellt.

Abbildung 3.3 zeigt eine TEM-Aufnahme von PMEMA gecoateten Fe_3O_4 -Nanopartikeln. Es sind stark kontrastierende, annähernd spherische Magnetitkerne zu erkennen, die sich deutlich von der weniger kontrastreichen Polymerhülle unterscheiden. In den sichtbaren Agglomeraten, die vermutlich während der Probenvorbereitung entstanden sind, sind die Fe_3O_4 -Partikel einzeln von einer PMEMA-Hülle ummantelt. Es kann eine Hülldicke, unabhängig von der Kerngröße, von 3 nm bis 5 nm ermittelt werden.

Zur Bestimmung des Verhältnisses von PMEMA zu Magnetit $\mu_{\text{PMEMA}}/\mu_{\text{M}}$

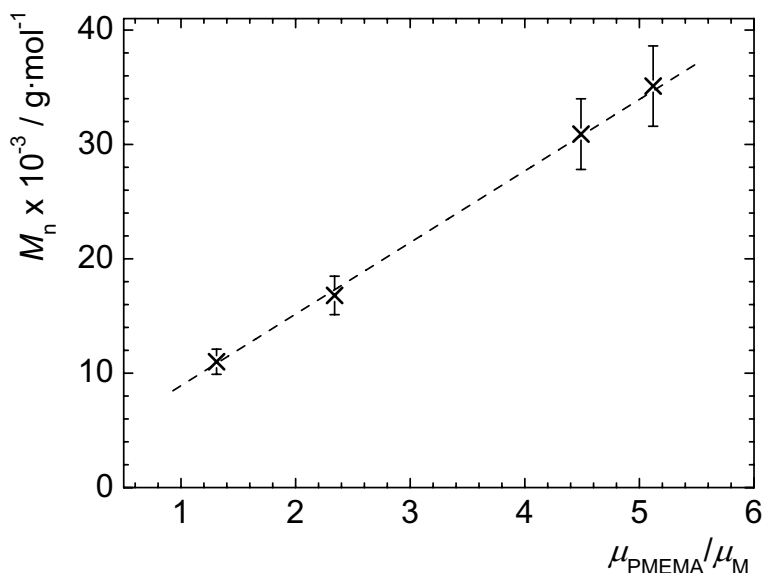


Abb. 3.4: Auftragung der Molmasse M_n gegen das Verhältnis $\mu_{\text{PMEMA}}/\mu_{\text{M}}$ (TGA) von getrockneten $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PMEMA}$ -Nanopartikeln,^[169] ©2006 ACS

werden die erhaltenen Hybridpartikel thermogravimetrisch untersucht. Desweiteren werden die Polymerarme nach Acidolyse der Kerne mit Salzsäure isoliert und aufgereinigt. Anschließend können die Polymerketten mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) analysiert werden. Die gefundenen Werte für die zahlenmittleren Molmassen M_n liegen zwischen $11000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $35000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ein direkter linearer Zusammenhang zwischen der Polymerkettenlänge gegeben durch M_n und $\mu_{\text{PMEMA}}/\mu_{\text{M}}$ (s. Abbildung 3.4) macht deutlich, dass ein oberflächeninitiiertes Kettenwachstum vorliegt. Aus der Steigung

3 Überblick über die veröffentlichten Arbeiten

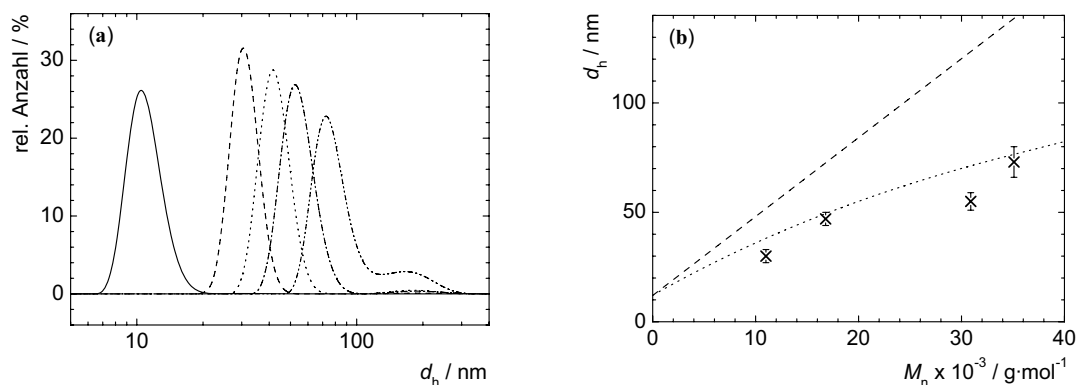


Abb. 3.5: (a) Verteilung des hydrodynamischen Durchmessers d_h von Fe_3O_4 @PMEMA-Nanopartikeln mit unterschiedlichen Molmassen M_n in DMF;^[170] ©2006 Oldenbourg Wissenschaftsverlag (b) Auftragung von d_h gegen M_n . Die gestrichelte Linie repräsentiert die Konturlänge von vollständig gestreckten Polymerketten. Die gepunktete Linie zeigt den Zusammenhang für das von Biver^[174] erweiterte „blob“-Modell von Alexander^[175] und de Gennes^[176, 177].

ergibt sich ein Wert für die Polymerkettendichte f_s von $0,26 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. Hieraus kann unter Berücksichtigung eines mittleren Kerndurchmessers von 12 nm eine Belegungsdichte der Partikeloberfläche von 1,4 Ketten pro nm^2 berechnet werden, was etwa 500 Ketten pro Partikel entspricht.

Die weitere Charakterisierung der magnetischen Polymerbürstenpartikel erfolgt in Dispersion mittels DLS. Abbildung 3.5 (a) stellt die erhaltenen Verteilungen von d_h der dargestellten Fe_3O_4 @PMEMA-Partikel mit den oben erwähnten Molmassen dar.^[170] Es wird ein Anstieg des hydrodynamischen Partikeldurchmessers d_h mit wachsender Molmasse der Polymerarme beobachtet. Für die Materialien mit hohem Polymergehalt und langen Polymerketten sind Schultern in den Partikelgrößenverteilungen zu erkennen. Diese werden auf einen kleinen Anteil an Agglomeraten zurückgeführt, die vermutlich durch Nebenreaktionen wie Verschlaufung der Polymerarme oder Partikelvernetzung zu erklären sind. Ein Vergleich der experimentellen Werte mit theoretischen Werten, die unter Berücksichtigung des von Alexander^[175] und de Gennes^[176, 177] beschriebenen und durch Biver^[174] erweiterten „blob“ Modells berechnet wurden, zeigt eine gute Übereinstimmung. Aufgrund dieses Ergebnisses und der hohen Polymerbelegungsdichte von 1,4 Ketten pro nm^2 kann von einer Bürstenarchitektur der synthetisierten Partikel gesprochen werden.

Die erhaltenen hydrophilen Polymerhüllen sorgen für eine effektive sterische Repulsion der magnetischen Kerne untereinander, woraus die hohe Stabilität der

Kern-Schale-Partikel in Trägermedien wie DMF oder DMSO resultiert.

Neben der Zusammensetzung und Architektur sind insbesondere die magnetischen Eigenschaften der dargestellten Hybridpartikel von Bedeutung für ihre Anwendbarkeit. Mittels VSM werden die erhaltenen Fe_3O_4 @PMEMA-Nanopartikeldispersionen, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, magnetisch charakterisiert. Die resultierenden Magnetisierungskurven (s. Abb. 3.2) enthalten neben dem Hinweis auf superparamagnetisches Verhalten und dem Kerndurchmesser den Gehalt an magnetischem Material $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$. Aus der Sättigungsmagnetisierung M_s für hohe Feldstärken wird über die Langevin-Gleichung $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ berechnet. Für magnetische Flüssigkeiten basierend auf Fe_3O_4 @PMEMA-Partikeln in DMF ergeben sich Werte von bis zu 2,9 Massen-%.^[169, 173] Für POEGMA und P(OEGMA-*co*-MEMA) stabilisierte Partikel werden 2,5 Massen-% in DMSO und auch in Wasser erreicht.^[167]

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass es möglich ist kleine magnetische Nanopartikel (12 nm) individuell mit einer Polymerhülle zu versehen, woraus Hybridmaterialien mit definierter Bürstenarchitektur resultieren. Als Methode ist hierfür die oberflächeninitiierte ATRP etabliert worden.

Im nächsten Abschnitt wird eine zweite Methode zur Stabilisierung magnetischer Fe_3O_4 -Nanopartikel mit einer polymeren Hülle dargestellt. Die resultierenden Materialien weisen, anders als die Bürstenpartikel, Kerne aus Partikelagglomeraten auf, die im folgenden als Cluster bezeichnet werden.

3.1.3 Magnetische Polymercluster

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den magnetischen Polymerbürsten magnetische Polymercluster untersucht. Diese sind aus einem magnetischen Kern und einer Carboxymethyldextran-Hülle (CMD) zusammengesetzt.

CMD stellt ein Polysaccharid dar, ist biologisch abbaubar und biokompatibel, was es für den Einsatz in biomedizinischen Anwendungen prädestiniert (s. Abschnitt 1.3.1). Die magnetischen Kerne bestehen aus Magnetit-Clustern, die aus agglomerierten Primärpartikeln (12 nm - 14 nm) gebildet werden (s. Abbildung 3.6 (a)). Die Agglomeration geschieht während der nasschemischen Synthese und führt zu Clustern mit einer breiten Größenverteilung. Die CMD-Hülle, die anschließend auf die Clusteroberfläche aufgebracht wird, stabilisiert diese sterisch in wässrigen Medien. Mittels DLS wird ein mittlerer hydrodynamischer Durchmesser d_h von 158 nm ermittelt. Um die Breite der Clustergrößenverteilung

3 Überblick über die veröffentlichten Arbeiten

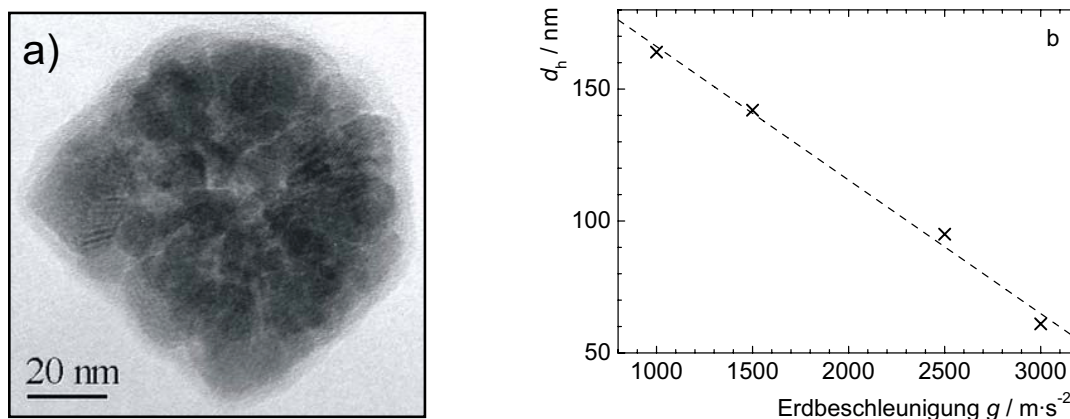


Abb. 3.6: Magnetische Polymercluster: (a) TEM-Aufnahme, ©2009 Elsevier; (b) Zusammenhang der Erdbeschleunigung g bei der fraktionierenden Zentrifugation mit dem hydrodynamischen Durchmesser der erhaltenen Größenfraktionen.^[168]

lung zu verringern wird eine wasserbasierte Dispersion mit unterschiedlichen Umdrehungszahlen zentrifugiert. Auf diese Weise werden unterschiedliche Größenfraktionen erhalten, die ebenfalls mittels DLS untersucht wurden. Die ermittelten hydrodynamischen Durchmesser der Fraktionen sind in Abbildung 3.6 (b) gegen die Erdbeschleunigung, die bei der Zentrifugation auftritt, aufgetragen. Der hydrodynamische Durchmesser sinkt annähernd linear mit steigender Erdbeschleunigung, was durch Dichteunterschiede zwischen den verschiedenen großen Clustern zu erklären ist.

Die erhaltenen Größenfraktionen haben eine engere Clustergrößenverteilung als die unzentrifugierte Probe und zeigen ein ausgesprochen interessantes Verhalten in Bezug auf die induktive Erwärmbarkeit, das in Abschnitt 3.3.4 betrachtet wird.

3.2 Thermoresponsives Dispersionsverhalten

Die Dispersionseigenschaften sind für magnetische Nanopartikel ein entscheidendes Merkmal für ihre Anwendbarkeit. Die in dieser Arbeit synthetisierten magnetischen Polymerbürstenpartikel sind in Wasser und unterschiedlichen polaren organischen Trägermedien dispergierbar. Darüber hinaus wurde die Zusammensetzung der Polymerhülle so gewählt, dass sie ein temperaturabhängiges Löseverhalten in Wasser oder MeOH aufweist, woraus ein thermoresponsives Dispersionsverhalten der Kern-Schale-Nanopartikel resultiert. In den folgenden

Abschnitten wird dieses thermisch steuerbare Dispersionsverhalten der magnetischen Polymerbürsten anhand von PMEMA und Poly(OEGMA-*co*-MEMA) umhüllten Fe₃O₄-Nanopartikeln dargestellt und diskutiert.

3.2.1 UCST-Verhalten

Fe₃O₄@PMEMA-Nanopartikel sind wie zuvor (s. Abschnitt 3.1.2) beschrieben individuell umhüllte Kern-Schale-Partikel, die sich in Lösemitteln wie DMF und DMSO einzeln dispergieren lassen. Im dispergierten Zustand sind die jeweiligen Polymerketten auf der Partikeloberfläche einzeln solvatisiert, sie versuchen den größtmöglichen Raum für sich zu beanspruchen und bilden aus diesem Grund die schon erwähnte Bürstenstruktur aus (s. Abschnitt 3.1.2; s. Abb. 3.7 rechts). In Nichtlösemitteln für die Polymerhülle findet keine ausreichende Solvatation der Polymerketten statt. Die Polymerarme kollabieren auf der Partikeloberfläche, um möglichst wenig in Kontakt mit dem Trägermedium zu kommen. Damit sinkt die sterische Abstoßung gegenüber den benachbarten Partikeln und es kommt zur Agglomeration und Sedimentation (s. Abb. 3.7 links). Für Fe₃O₄@PMEMA-Nanopartikel sind solche Nichtlösemittel unpolare Medien wie Diethylether oder Hexan.

In Methanol (MeOH) hingegen werden beide Zustände in Abhängigkeit von der Temperatur beobachtet. Die Fe₃O₄@PMEMA-Nanopartikel zeigen eine upper critical solution temperature (UCST) in MeOH^[169, 173]. Unterhalb einer kritischen Temperatur T_{crit} liegen die Partikel kollabiert und agglomeriert vor. Bei Überschreiten von T_{crit} ändert sich das Löseverhalten der Polymerarme in MeOH und die Polymere werden löslich. Daraus resultiert die sterische Stabilisierung der Partikel und die Bildung einer magnetischen Flüssigkeit. Abbildung 3.7 stellt diesen Prozeß sowohl schematisch (a) als auch anhand von Fotografien (b) dar. Der Phasenübergang ist vollständig reversibel.

Mittels Messungen in einem Trübungsphotometer läßt sich T_{crit} bestimmen. Dabei wird die Transmission τ durch die Partikeldispersion in Abhängigkeit von der Temperatur T aufgezeichnet. In Abbildung 3.8 sind die erhaltenen Meßkurven für PMEMA gecoatete Fe₃O₄-Nanopartikel dargestellt. Es sind sigmoidale Kurven zu erkennen, deren Wendepunkte T_{crit} entsprechen. Für T_{crit} werden Werte zwischen 20,7 °C und 39,1 °C aus den Meßkurven extrahiert. Dabei ist ein linearer Anstieg von T_{crit} mit der Molmasse der Polymerarme zu registrieren.

3 Überblick über die veröffentlichten Arbeiten

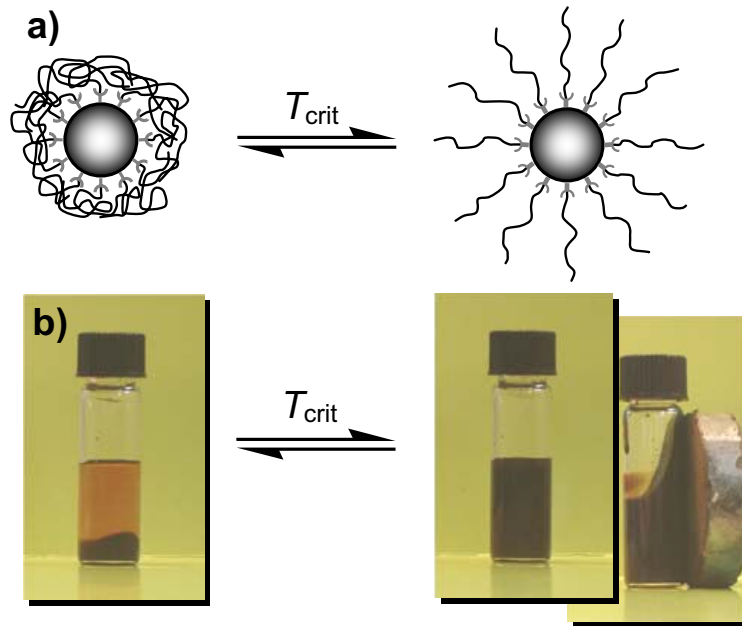


Abb. 3.7: (a) Schematische Darstellung des Phasenverhaltens von Fe_3O_4 @PMEMA-Partikeln in Methanol, kollabierter Zustand (links), solubilisierter Zustand (rechts); (b) Fotos von Fe_3O_4 @PMEMA-Partikeln in Methanol unterhalb T_{crit} (links) und oberhalb T_{crit} (rechts).^[169] ©2006 ACS

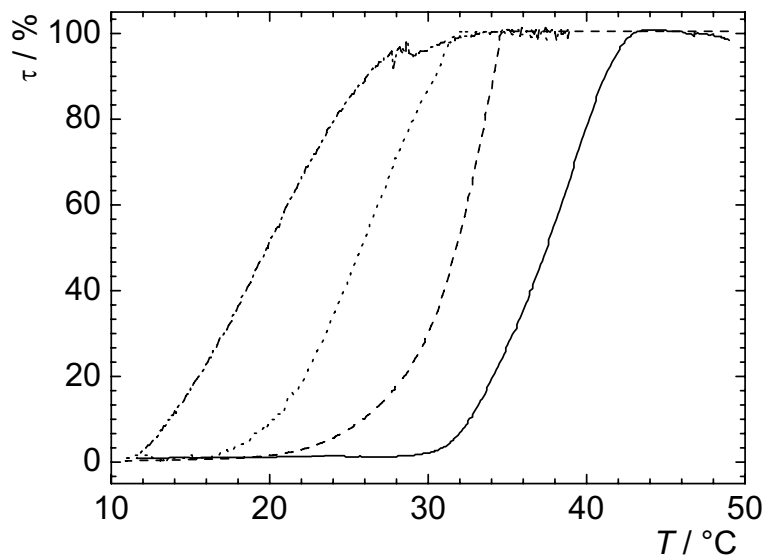


Abb. 3.8: Auftragung τ gegen T für Fe_3O_4 @PMEMA-Partikel in MeOH; $M_n = 11000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (gepunktstrichelte Linie), $M_n = 16800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (gepunktete Linie), $M_n = 30900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (gestrichelte Linie), $M_n = 35100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (durchgezogene Linie).^[169] ©2006 ACS

3.2.2 LCST-Verhalten

Ein weiteres System, das in dieser Arbeit Anwendung findet, basiert auf statistischen Copolymeren, zusammengesetzt aus MEMA und einem Oligo(ethylenglykol)methylethermethacrylat (OEGMA), als stabilisierende Hülle für Kern-Schale-Partikel.^[167] Das verwendete OEGMA besitzt eine Oligo(ethylenglykol)kette mit ca. 4,4 Wiederholungseinheiten. Durch die im Vergleich zu MEMA verlängerte Seitenkette sind OEGMA-Polymere wesentlich hydrophiler und zeigen ein ausgeprochenes thermoresponsives Lösungsverhalten in wässrigen Medien. POEGMA weist in Wasser eine untere kritische Lösungstemperatur (lower critical solution temperature LCST) auf, das heißt die Polymere zeigen eine konzentrationsabhängige kritische Lösungstemperatur T_{crit} unterhalb derer sie sehr gut wasserlöslich und einzeln solvatisiert sind. Bei Erwärmen und Überschreiten von T_{crit} werden die Polymere unlöslich, agglomerieren und fallen aus. Durch Copolymerisation von OEGMA mit MEMA ist es darüber hinaus möglich die kritische Temperatur über einen großen Temperaturbereich einzustellen.^[167, 178] Der molare MEMA-Anteil $\chi_{exp.}(\text{MEMA})$ der Copolymerhüllen wird zwischen 0 und 52,7% variiert.

Die erhaltenen Hybridnanopartikel werden bei RT in Wasser dispergiert und anschließend mittels Trübungsphotometrie und temperaturabhängiger DLS untersucht. Abbildung 3.9 stellt die erhaltenen Meßkurven für die DLS und die Trübungsmessungen im direkten Vergleich dar.

Beide Methoden belegen mit sehr guter Übereinstimmung das LCST-Verhalten der magnetischen Copolymerbürstenpartikel. Bei RT liegen die Hybridnanopartikel einzeln dispergiert vor, was an einer klaren Dispersion und einem hydrodynamischen Durchmesser d_h von ca. 100 nm ersichtlich ist. Bei Erwärmung und Überschreitung der kritischen Lösungstemperatur T_{crit} wird in den DLS-Messungen ein schneller Anstieg von d_h registriert, der auf Partikelagglomerate zurückgeführt werden kann, die durch kollabieren der Polymerhülle auf der Partikeloberfläche verursacht werden. Ähnlich verursachen Agglomerate das Absinken der Transmission in diesem Temperaturbereich, wie in den Trübungsmessungen beobachtet werden kann. Der Phasenübergang verläuft innerhalb eines engen Temperaturbereichs und ist reversibel. Aus den Wendepunkten der Trübungsmessungen werden kritische Temperaturen T_{crit} zwischen 36,6°C und 61,2°C für die untersuchten Materialien bestimmt. Diese unterscheiden sich vor allem in der Zusammensetzung der Polymerhülle. Mit steigendem MEMA-Anteil $\chi_{exp.}(\text{MEMA})$ steigt T_{crit} linear an, was in Abbildung 3.10 verdeutlicht wird.

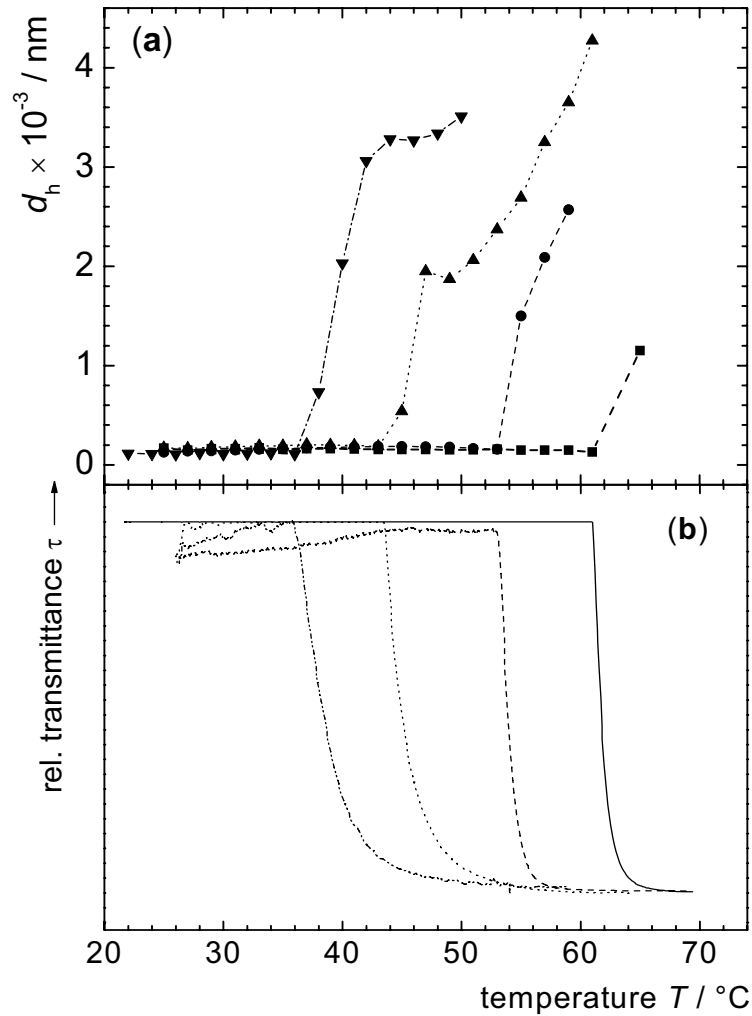


Abb. 3.9: (a) Auftragung von d_h gegen die Temperatur und (b) Auftragung von τ gegen T für $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-co-MEMA})$ -Partikel in Wasser; $\chi_{exp.}(\text{MEMA}) = 52,7 \text{ mol-\%}$ (punkt-gestrichelte Linie), $\chi_{exp.}(\text{MEMA}) = 36,2 \text{ mol-\%}$ (gepunktete Linie), $\chi_{exp.}(\text{MEMA}) = 17,8 \text{ mol-\%}$ (gestrichelte Linie), $\chi_{exp.}(\text{MEMA}) = 0 \text{ mol-\%}$ (durchgezogene Linie).^[167]

3.3 Potentielle Biomedizinische Anwendung

Damit ist es möglich T_{crit} genau vorherzusagen und über die Monomermischung einzustellen.

Diese Möglichkeit der thermisch induzierten Partikelfällung eröffnet ein weites Feld der Anwendungen und kann speziell in der magnetischen Separation ausgenutzt werden, um die Partikel für ganz unterschiedliche Separationsprobleme einzustellen (s. Abschnitt 3.3.1).

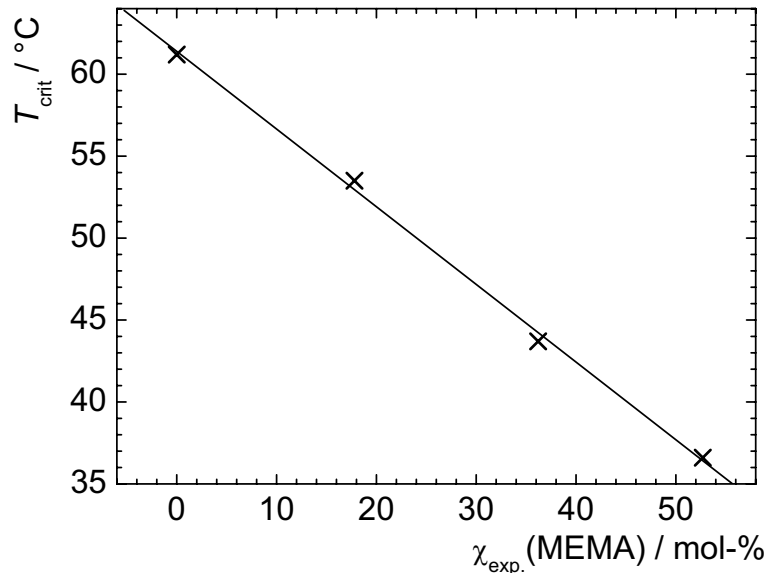


Abb. 3.10: Abhängigkeit von T_{crit} vom molaren MEMA-Anteil $\chi_{exp.}(MEMA)$ in der Copolymerhülle von $Fe_3O_4@P(OEGMA-co-MEMA)$ -Partikeln.^[167]

3.3 Potentielle Biomedizinische Anwendung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden magnetische Polymere dargestellt, die aufgrund ihres kontrollierten büstenartigen Aufbaus, der magnetischen Eigenschaften sowie dem thermoresponsiven Dispersionsverhalten für verschiedene biomedizinischen Anwendungen von großem Interesse sind. Im folgenden Kapitel wird daher das Potential der Kern-Schale-Partikel als Träger in der magnetischen Separation präsentiert,^[166, 167] Ergebnisse zur magnetischen Zellmarkierung und -abtrennung vorgestellt,^[168] die Synthese und Verwendung von magnetisch geträgerten Biokatalysatoren thematisiert^[166] und die Anwendung der synthetisierten Partikel in der magnetischen Erwärmung dargestellt.^[166, 168, 173]

3.3.1 Magnetische Separation

In der magnetischen Separation sind zwei Parameter entscheidend für die Effektivität magnetischer Träger. Zum einen sollen die Materialien eine hohe Anzahl von Bindungsstellen für Zielkomponenten aufweisen und zum anderen ist eine möglichst hohe Sedimentationsstabilität, bei gleichzeitig einfacher Separation mit kleinen magnetischen Feldgradienten gefordert.

Um effektive magnetische Träger für Separationsanwendungen zu erhalten, wurden während dieser Dissertation magnetische Polymerbürsten, bestehend aus Fe_3O_4 -Kernen und einer Poly(OEGMA-*co*-SIMA) Hülle, entwickelt. SIMA ist ein Methacrylatmonomer, das einen Succimidylester trägt. Succimidylester werden allgemein zur Aktivierung von Carboxylgruppen genutzt. Die Aktivierung ermöglicht die Amidierung der Carbonsäuren mit primären Aminen unter milden Bedingungen. Die SIMA-Einheiten werden in die Polymerhülle der synthetisierten Bürstenpartikel eingebracht, um irreversible Bindungsstellen für aminofunktionale Zielkomponenten zu generieren. Der molare SIMA-Anteil der oberflächenimmobilisierten Copolymere wurde zwischen 5 mol-% und 25 mol-% variiert. Darüber hinaus zeigen die Kern-Schale-Partikel aufgrund des OEGMA-Anteils in der Polymerhülle ein LCST-Verhalten in Wasser oder Puffersystemen und lassen sich daher oberhalb einer kritischen Temperatur mit einfachen Stabmagneten abtrennen (s. Abschnitt 3.2.2).

Zur Quantifizierung der Bindungskapazität der $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})$ -Nanopartikel für Zielmoleküle wird ein Test etabliert, der auf der Farbreaktion von Ninhydrin mit primären Aminen basiert. Als Modellsubstanz wird Benzylamin (BzA) verwendet. Für den Test wird BzA mit den $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-}$

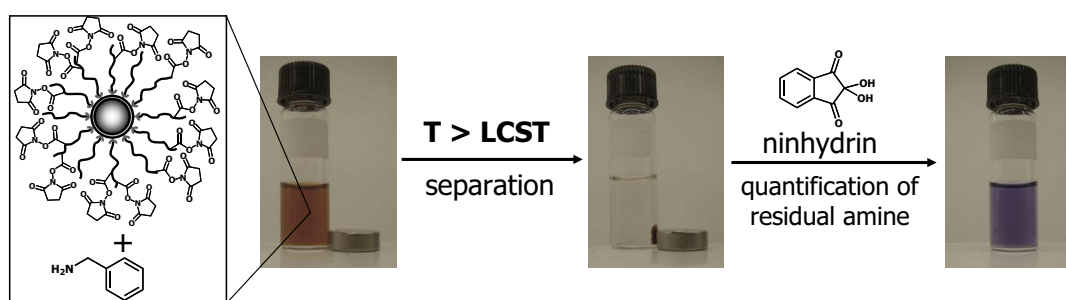


Abb. 3.11: Reaktionsschema des BzA-Kapazitätstests von $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})$ -Nanopartikel und quantitativem Ninhydrin Nachweis des ungebundenen BzAs [167]

co-SIMA)-Nanopartikeln zur Reaktion gebracht. Anschließend werden die Par-

tikel oberhalb der LCST vom Überstand getrennt. Im Überstand kann durch Reaktion von Ninhydrin mit dem verbliebenen BzA Ruthmanns Violett erzeugt und quantitativ nachgewiesen werden. Aus dem so ermittelten BzA-Anteil, der nicht gebunden wurde, kann auf den gebundenen Anteil geschlossen werden. Abbildung 3.11 stellt den BzA-Bindungstest schematisch dar. Zur Bestimmung der maximalen BzA-Belegung wird für drei Partikelchargen, die einen SIMA-Anteil in der Polymerhülle von 5 mol-%, 10 mol-% bzw. 15 mol-% aufweisen, der BzA-Bindungstest für fünf unterschiedlich konzentrierte BzA-Ausgangslösungen durchgeführt. Werte für die im Überstand vorhandene BzA-Konzentration $c_{r,BzA}$ werden ermittelt und gegen den Quotient der BzA-Ausgangskonzentration $c_{0,BzA}$ und der eingesetzten Magnetitkonzentration $c_{Fe_3O_4}$ aufgetragen (s. Abb. 3.12). Für kleine BzA-Konzentrationen ist

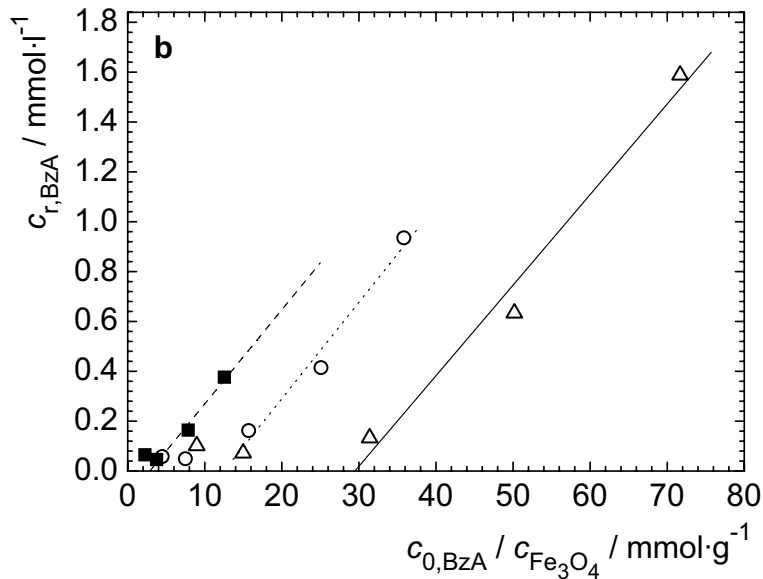


Abb. 3.12: Auftragung der im Überstand vorhandenen BzA-Konzentration $c_{r,BzA}$ gegen den Quotient aus der BzA-Ausgangskonzentration $c_{0,BzA}$ und der eingesetzten Magnetitkonzentration $c_{Fe_3O_4}$; 5 mol-% SIMA (Quadrate, gestrichelte Linie), 10 mol-% SIMA (Punkte, gepunktete Linie), 15 mol-% SIMA (Dreiecke, durchgezogene Linie). ^[167]

annähernd kein freies BzA im Überstand nachweisbar, was darauf hindeutet, dass unterhalb einer Sättigungskonzentration das gesamte BzA an die Partikel gebunden wird. Bei Erhöhung der BzA-Menge über die Sättigungskonzentration kommt es zu einem linearen Anstieg von $c_{r,BzA}$ mit $c_{0,BzA}/c_{Fe_3O_4}$. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse ergibt die Sättigungskonzentration an partikelgebundenem BzA und damit der Funktionalisierungs-

3 Überblick über die veröffentlichten Arbeiten

dichte f_{BzA} . Mit steigendem SIMA-Anteil, gebunden in der Polymerhülle der $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-co-SIMA})$ -Nanopartikel, werden steigende Werte für f_{BzA} von $2,87 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, $12,5 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ und $29,5 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ erhalten. Die gefundenen Werte sind bis zu dreißigfach höher als die Werte von kommerziell erhältlichen Multikernpartikeln und sind auf die Bürstenarchitektur der $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-co-SIMA})$ -Nanopartikel zurückzuführen.

Die Anwendbarkeit der synthetisierten Partikel in komplexen biologischen Systemen wird anhand der Oberflächenmodifikation von humanen Endothelzellen gezeigt. Die Fähigkeit der Partikel aminofunktionale Moleküle zu binden führt dazu, dass oberflächenständige Zellmembrankomponenten mit den magnetischen Polymerbürsten gelabelt werden. Abbildung 3.13 zeigt TEM-Aufnahmen der oberflächenmodifizierten Zellen.

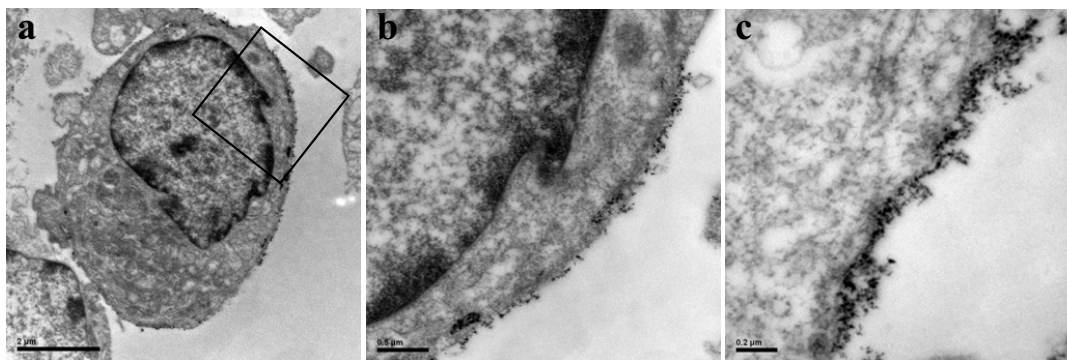


Abb. 3.13: TEM-Aufnahmen von einer Endothelzellen inkubiert mit $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-co-SIMA})$ -Nanopartikeln (a); (b) und (c) Ausschnittsvergrößerung von (a).^[166]

Die Aufnahmen belegen sehr deutlich die erfolgreiche und dichte Beschichtung der Zellmembranen mit $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-co-SIMA})$ -Nanopartikeln. Nach dem Zellaufschluß können die magnetischen Partikel und die daran gebundenen Spezies magnetisch separiert und so auf einfache Weise vom restlichen biologischen Material abgetrennt werden. Anschließend stehen sie der weiteren Untersuchung zur Verfügung.

Die hohe Funktionalisierungsdichte zusammen mit dem thermoresponsiven Dispersionsverhalten belegen das große Potential der $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-co-SIMA})$ -Nanopartikeln für die magnetische Separation. Die Forderungen einer hohen Dichte von Bindungsstellen und der Abtrennbarkeit mit kleinen magnetischen Feldgradienten sind erfüllt.

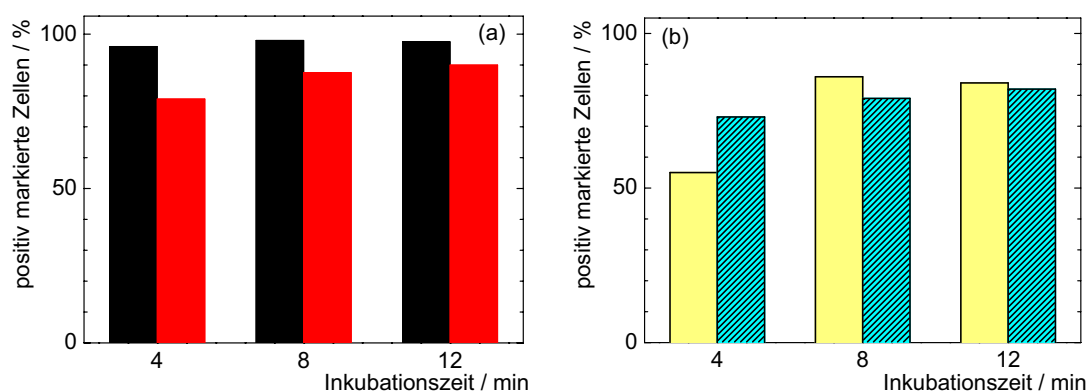


Abb. 3.14: Aufnahme von $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA})$ -Bürstenpartikel in Brustkrebszellen (K562, schwarz), Blutkrebszellen (MCF-7, rot) (a) und CMD funktionalisierten Nanoclustern (gelb) im Vergleich zu CMD funktionalisierten Primärpartikeln (cyan, schraffiert)(b).^[168] ©2009 Elsevier

3.3.2 Magnetische Zellmarkierung und -separation

In der magnetischen Zellseparation ist es entscheidend, dass die verwendeten magnetischen Nanopartikel schnell und in hoher Anzahl von den zu markierenden Zellen aufgenommen werden, um eine möglichst effektive magnetische Abtrennbarkeit zu gewährleisten.

In *in vitro* Experimenten mit lebenden Zellen wird das Potential von magnetischen Polymerbürsten auf Basis von $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA})$ -Nanopartikeln und den in Abschnitt 3.1.3 vorgestellten CMD funktionalisierten Nanoclustern zur magnetischen Zellmarkierung und Zellseparation getestet. Die Nanocluster werden dabei im Vergleich zu mit CMD umhüllten Primärpartikeln (10 nm) untersucht. Für den Test werden die Nanopartikel mit Brustkrebszellen (MCF-7) bzw. Blutkrebszellen, einer Chronisch-Myeloischen-Leukämie (K562) inkubiert. Anschließend werden die markierten Zellen durch eine magnetische Säule von den nicht markierten Zellen getrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Die $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA})$ -Nanopartikel werden unspezifisch in beide Zelllinien sehr schnell aufgenommen. Abhängig von der Inkubationszeit werden bis zu 98 % der angebotenen Zellen magnetisch markiert. Die markierten Zellen lassen sich anschließend sehr gut magnetisieren und separieren, was dafür spricht, dass viel magnetisches Material ins innere der einzelnen Zellen eingeschleust wird.

Beim Vergleich von CMD funktionalisierten Nanoclustern (s. Abschnitt 3.1.3) und CMD umhüllten Primärpartikeln (10 nm) kann kein wesentlicher Unterschied bei der Aufnahme der Partikel in das Zellinnere beobachtet werden (s. Abb. 3.14 (b)). Sowohl die kleinen CMD stabilisierten Primärpartikel, als auch

3 Überblick über die veröffentlichten Arbeiten

die größeren Fe_3O_4 @CMD Cluster werden schnell und in großer Zahl aufgenommen.

Auch der Vergleich zwischen den Polymerbürsten und den Clustern kann kein gravierender Unterschied bei der Zellmarkierung festgestellt werden. Damit sind beide Materialien für eine effektive, unspezifische, magnetische Markierung von lebenden Krebszellen geeignet.

Darüber hinaus wird in einem Wachstumstest der Einfluß der magnetischen Markierung auf das Wachstumsverhalten der Zellen getestet. Dazu werden die Zellen für eine Dauer von einer Woche beobachtet und zu verschiedenen Zeiten die Zellanzahl überprüft. Abbildung 3.15 zeigt die erhaltenen Wachstumskurven.

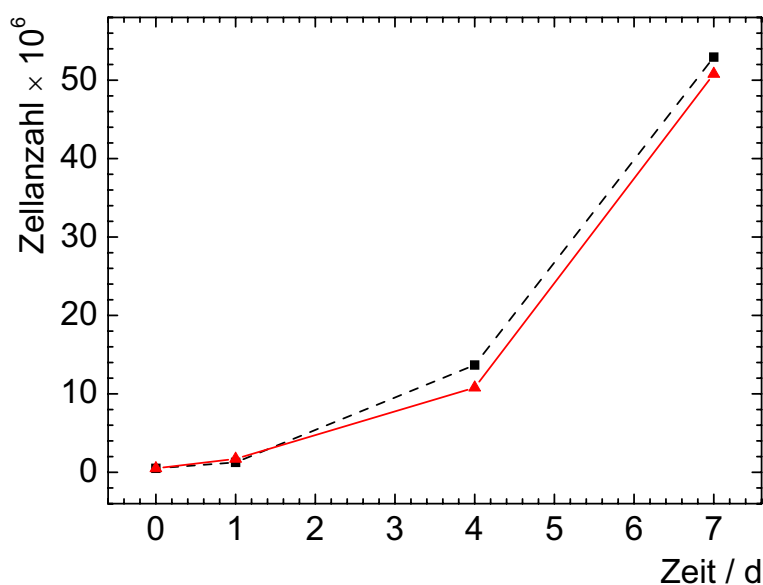


Abb. 3.15: Wachstumstest von Fe_3O_4 @P(OEGMA)-Bürstenpartikel markierten K562 Zellen (Dreiecke, rot) im Vergleich zu unmarkierten K562 Zellen (Quadrate, schwarz).

Es wird deutlich, dass die magnetische Markierung keine Beeinträchtigung des Wachstum zeigt. Dem entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Fe_3O_4 @POEGMA-Bürstenpartikel im Rahmen dieses Tests nicht zelltoxisch wirken.

Zu Beginn des Wachstumstests sind 85 % der Zellen magnetisch markiert und nach sieben Tagen sind es noch 64 % bei einer Verhundertfachung der Zellzahl. Daraus kann geschlußfolgert werden, dass die Partikel in großer Anzahl in die Zellen aufgenommen wurden, da es beim Zellwachstum durch die Zell-

teilung zu einer natürlichen Ausverdünnung des magnetischen Materials kommt.

3.3.3 Biokatalyse

Zur Darstellung von magnetischen Biokatalysatoren wird Trypsin an $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-co-SIMA})$ -Nanopartikel gebunden. Trypsin ist eine Endopeptidase und ist damit in der Lage, die Spaltung von Peptiden zu katalysieren. Die Sequenzierung der Eiweiße erfolgt dabei nach den Aminosäuren Arginin oder Lysin. Die irreversible Anbindung von Trypsin an die magnetischen Nanopartikel wird auf die Reaktion der partikelgebundenen polymeren Aktivester mit aminofunktionalen Aminosäuren aus der Trypsinsequenz zurückgeführt. Mittels ATR-IR-Spektroskopie wird die erfolgreiche Immobilisierung des Proteins qualitativ nachgewiesen und via EA kann ein Wert für die Menge an gebundenem Trypsin von $1,1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ermittelt werden, woraus sich eine Funktionalisierung von etwa 13 Molekülen pro Fe_3O_4 -Kern ergibt.

Neben der erfolgreichen Anbindung des Trypsins ist entscheidend, dass die katalytische Aktivität auch nach der Immobilisierung erhalten bleibt. Aus diesem Grund wird die Peptidaseaktivität des partikulär gebundenen Trypsins im Vergleich zu frei in Lösung vorliegendem Trypsin bestimmt. Als Nachweisreaktion dient hierfür die trypsin-katalysierte Spaltung von N_α -Benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid (BAPNA) in N_α -Benzoyl-D,L-arginin und 4-Nitroanilin (s. Abb. 3.16). Durch kinetische Untersuchungen dieser Reaktion kann auf die Enzy-

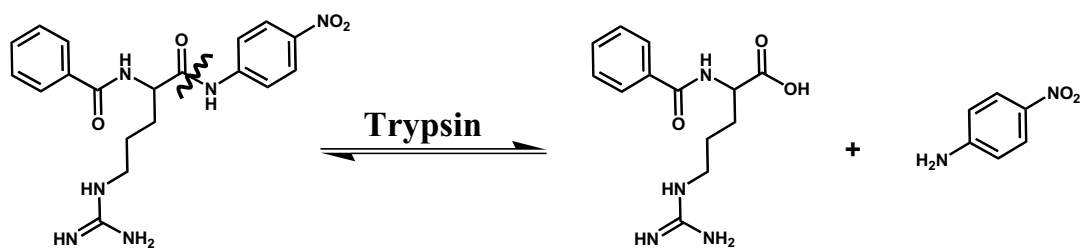


Abb. 3.16: Reaktionsschema der trypsin-katalysierten BAPNA-Spaltung.^[166]

maktivität geschlossen werden.

Für kinetische Messungen werden unterschiedlich konzentrierte BAPNA-Lösungen mit einer konstanten Menge freiem Trypsin oder $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-co-SIMA})$ -Trypsin-Nanopartikeln zu Reaktion gebracht. Die Entstehung von 4-Nitroanilin

3 Überblick über die veröffentlichten Arbeiten

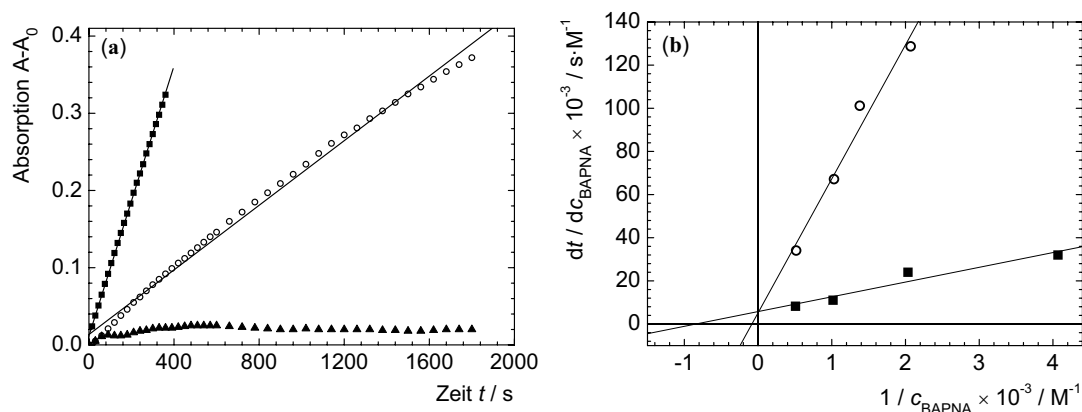


Abb. 3.17: (a) Änderung der UV-Absorption mit der Zeit während der Reaktion zwischen BAPNA und $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@POEGMA}$ -Trypsin (Kreise) im Vergleich zu freiem Trypsin (Quadrate) und $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@P(OEGMA-co-SIMA)}$ -Nanopartikeln (Dreiecke);^[166] (b) Doppeltreziproke Auftragung der Geschwindigkeit dc_{BAPNA}/dt der trypsin-katalysierten BAPNA Spaltung und der BAPNA-Konzentration c_{BAPNA}

wird UV/VIS-spektroskopisch in Abhängigkeit von der Zeit t gemessen. Abbildung 3.17 (a) zeigt das Ergebnis einer solchen Messung für eine BAPNA-Lösung (2,0 mM) katalysiert durch freies Trypsin und immobilisiertes Trypsin im Vergleich zur Kontrollreaktion. Diese wurde mit $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@P(OEGMA-co-SIMA)}$ -Nanopartikeln durchgeführt, die nicht Trypsin funktionalisiert sind. Für Trypsin enthaltene Reaktionsmischungen wird ein linearer Anstieg der Absorption mit der Zeit registriert, während das Kontrollexperiment ohne Trypsin wie erwartet keine nennenswerte Absorptionsänderung zeigt. Aus der Steigung der Regressionsgeraden wird die Anfangsgeschwindigkeit dc_{BAPNA}/dt der trypsin-katalysierten BAPNA Spaltung erhalten.

Mit steigender BAPNA-Konzentration c_{BAPNA} wird ein hyperbolischer Anstieg der Anfangsgeschwindigkeit gefunden, was auf eine Michaelis-Menten-Kinetik hindeutet. Die Auswertung des erhaltenen Zusammenhangs zwischen dc_{BAPNA}/dt und c_{BAPNA} , und die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m (Michaeliskonstante) und v_{max} (maximale Anfangsgeschwindigkeit) erfolgt mittels bekannter Linearisierungsmethoden nach Lineweaver und Burk, bzw. nach Eadie und Hofstee. Die doppeltreziproke Auftragung von dc_{BAPNA}/dt gegen die BAPNA-Konzentration c_{BAPNA} nach Lineweaver und Burk ist in Abbildung 3.17 (b) dargestellt. Sowohl für das immobilisierte, als auch für das freie Trypsin wird ein linearer Zusammenhang gefunden, der bestätigt, dass die trypsin-katalysierte Spaltung von BAPNA einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Für

die Michaeliskonstante K_m wird für Fe_3O_4 @POEGMA-Trypsin ein Wert von $2,10 \times 10^{-4}$ M ermittelt und für freies Trypsin resultiert $K_m = 1,39 \times 10^{-4}$ M. Die im Vergleich zu freiem Trypsin erhöhte Michaeliskonstante für partikulär gebundenes Trypsin wird auf die verringerte Zugänglichkeit der in der Polymerhülle immobilisierten Trypsinmoleküle zurückgeführt.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird v_{max} verwendet. Der Quotient aus v_{max} und der eingesetzten Trypsinkonzentration $c_{Trypsin}$ ergibt die spezifische Aktivität act_{spez} des Proteins. Diese hat einen Wert von $92,2 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ für freies Trypsin und von $89,1 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ für immobilisiertes Trypsin. Daraus resultiert, dass die Trypsinaktivität nach der Anbindung an die magnetischen Nanopartikel nahezu vollständig erhalten geblieben ist.

Somit wurden magnetische Biokatalysatoren erzeugt, die eine sehr hohe Aktivität aufweisen und zudem mittels magnetischer Felder manipulierbar sind. Ihre einfache Abtrennbarkeit und thermoresponsive Einsetzbarkeit aufgrund des LCST-Verhaltens der Partikel macht sie sehr interessant für biologische Systeme. Darüber hinaus können weitere Enzyme oder aminofunktionale Katalysatoren immobilisiert werden, und so ist eine große Vielfalt an möglichen Anwendungen denkbar.

3.3.4 Magnetische Erwärmung

Die Eigenschaft magnetischer Nanopartikel, elektromagnetische Energie in Wärmeenergie umwandeln zu können, stellt für verschiedene biomedizinische Anwendungen eine interessante Alternative zu herkömmlichen Methoden (Laser-Bestrahlung) dar, Wärme gezielt und berührungslos zu generieren und einzusetzen. Verantwortlich für diese Eigenschaft sind Relaxationsprozesse und Hystereseeffekte, die auftreten, wenn magnetische Nanopartikel einem hochfrequenten elektromagnetischen Wechselfeld ausgesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Verhalten magnetischer Dispersionen, basierend auf Fe_3O_4 @PMEMA- und Fe_3O_4 @POEGMA-Nanopartikeln und CMD-Nanoclustern in hochfrequenten Wechselfeldern untersucht. Ziel ist es, die spezifische Heizleistung (SHP), die ein Maß für die Effektivität der Energieumwandlung darstellt, von Dispersionen basierend auf den dargestellten magnetischen Polymerbürsten und CMD-umhüllten Nanoclustern in Erwärmungsexperimenten zu bestimmen.

Die Erwärmungsexperimente der Fe_3O_4 -Bürstenpartikel werden in einem vakuumummantelten Probengefäß, das mit einem Alkoholthermometer bzw. einem

3 Überblick über die veröffentlichten Arbeiten

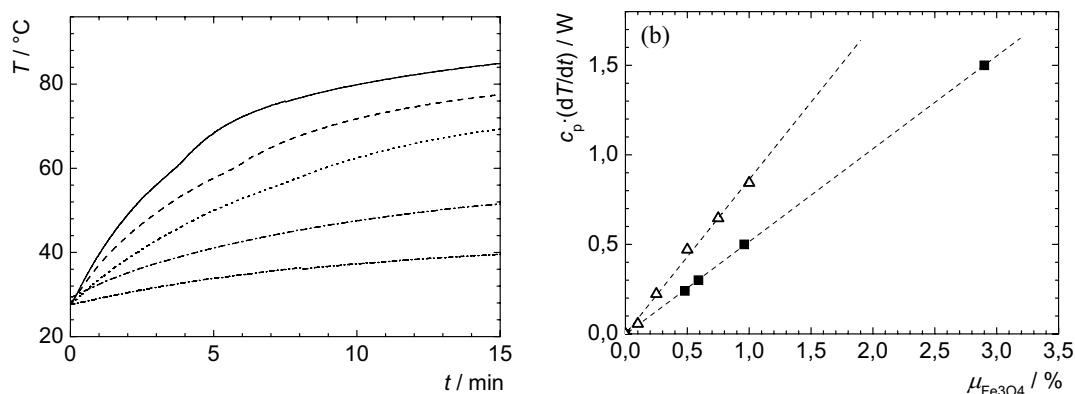


Abb. 3.18: (a) Änderung der Temperatur T von $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA})$ -Nanopartikeldispersionen in Wasser mit der Zeit t in einem magnetischen Wechselfeld (250 kHz , $31,5 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$); ($\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 1,0$ Massen-%, durchgezogene Linie); ($\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,75$ Massen-%, gestrichelte Linie); ($\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,5$ Massen-%, gepunktete Linie); ($\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,25$ Massen-%, punkt-gestrichelte Linie); ($\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,1$ Massen-%, doppel-punkt-gestrichelte Linie);^[167] (b) Zusammenhang der Heizleistung $c_p \cdot dT/dt$ und dem Magnetitgehalt $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ für Dispersionen basierend auf $\text{Fe}_3\text{O}_4@PMEMA$ - und $\text{Fe}_3\text{O}_4@POEGMA$ -Nanopartikeln,^[167, 173] ©2006 IOP Publishing Ltd

fiberoptischen Temperatursensor ausgestattet ist, durchgeführt. Das magnetische Wechselfeld mit einer Frequenz f von 250 kHz und einer Feldstärke von $31,5 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ wird mit einem Hochfrequenzgenerator innerhalb einer Kupferspule erzeugt. In diese Spule wird der Probenbehälter platziert, und nach Einschalten des magnetischen Wechselfeldes wird die Temperatur der Dispersion mit der Zeit aufgenommen. Abbildung 3.18 (a) stellt die erhaltenen Meßkurven für $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA})$ -Nanopartikeldispersionen mit unterschiedlichem Magnetitgehalt $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ in Wasser dar. Nach dem Einschalten des Wechselfeldes steigt die Temperatur zunächst schnell und linear mit der Zeit an, dann flachen die Kurven ab, was auf den Wärmeaustausch mit der Umgebung zurückzuführen ist. Die Steigung dT/dt des linearen Kurventeils ergibt unter Berücksichtigung der Wärmekapazität des Gesamtsystems c_p die Heizleistung. Trägt man die Heizleistung gegen den Magnetitgehalt $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ auf, erhält man den in Abbildung 3.18 (b) (Dreiecke) gezeigten linearen Zusammenhang. Für Dispersionen von PMEMA umhüllten Kern-Schale-Nanopartikeln in DMF, die auf die gleiche Weise intrinsisch erwärmt wurden, wächst $C_p \cdot dT/dt$ ebenfalls linear mit $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ an (s. Abbildung 3.18 (b) (Quadrate)). Die Steigung der beiden Ausgleichsgeraden entspricht der spezifischen Heizleistung SHP. Für die

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{P}(\text{OEGMA})$ -Nanopartikel ergibt sich eine SHP von $86,5 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$, während sich für die $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMEMA}$ -Bürstenpartikel eine SHP von $51,9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ ergibt.^[173] Die unterschiedlichen SHP-Werte sind auf unterschiedliche Partikelchargen zurückzuführen und können vermutlich mit unterschiedlichen Größenverteilungen der Nanopartikel erklärt werden.

Es wird kein Einfluß der Hülldicke auf die SHP gefunden, was darauf schließen läßt, dass die Transformation der magnetischen Energie in Wärme überwiegend durch die Umorientierung des magnetischen Momentes im Kristallgitter und damit durch den Néelschen Mechanismus erfolgt.

Für Dispersionen basierend auf CMD-umhüllten Fe_3O_4 -Nanoclustern in wässrigen Medien erhält man bei Betrachtung der in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen unzentrifugierten magnetischen Flüssigkeit eine SHP von $60 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ ($f = 400 \text{ kHz}$; $H = 11 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$). Betrachtet man jedoch die unterschiedlichen Größenfraktion nach der Zentrifugation, werden Werte für die SHP zwischen $53 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ und $332 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ gefunden, abhängig vom hydrodynamischen Durchmesser der Cluster.^[168] Dabei erreicht die Fraktion mit einem d_h von 82 nm den höchsten Wert. Die Verfünffachung der SHP für diese Fraktion, im Vergleich zur unzentrifugierten Dispersion ist auf die Verringerung der Breite der Clustergrößenverteilung zurückzuführen. Größere und kleinere $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CMD}$ -Cluster, die magnetische Energie nicht so effektiv in Wärme umwandeln können, sind in dieser Fraktion nach der Zentrifugation nicht mehr enthalten.

Es konnte sowohl für die magnetischen Flüssigkeiten basierend auf Fe_3O_4 -Polymerbürsten als auch für Dispersionen von $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CMD}$ -Nanoclustern gezeigt werden, dass magnetische Energie in Wärme umgewandelt wird und somit die synthetisierten Partikel potentiell für biomedizinische Erwärmungsanwendungen von Interesse sind.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden nanoskalige, hydrophile, magnetische Polymerhybridmaterialien dargestellt und ihr Potential für den Einsatz in biomedizinischen Anwendungen getestet.

Dazu wurde ein Syntheseweg entwickelt, der einen kontrollierten Aufbau von multifunktionalen Kern-Schale-Partikeln ermöglicht. Als Methode wurde hierfür die oberflächeninitiierte ATRP etabliert, so dass über einen dreistufigen Syntheseprozess magnetische Polymerbürstenpartikel zugänglich wurden. Als magnetisches Ausgangsmaterial dienten durch Mitfällung erhaltene Magnetit-Nanopartikel mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 12 nm. Diese wurden mit geeigneten Initiatoren oberflächenfunktionalisiert und anschließend als Starter für die oberflächeninitiierte ATRP eingesetzt.

Die Verwendung von hydrophilen Methacrylatmonomeren führte zu Polymerhüllen, die die magnetischen Nanopartikel durch sterische Repulsion in polaren Medien wie Wasser, Methanol, DMSO, usw. stabilisieren. Es wurden magnetische Flüssigkeiten mit bis zu 2,9 Massen-% an magnetischen Kern-Schale-Partikeln erhalten. Mittels TEM-Aufnahmen, GPC-Analyse der Polymerarme und Bestimmung des hydrodynamischer Durchmesser der Partikel mittels DLS-Messung in Dispersion konnte die Bürstenarchitektur der erhaltenen Hybridnanopartikel nachgewiesen werden. Der hydrodynamische Durchmesser lässt sich über die Molmasse der Polymerarme gezielt einstellen und liegt in guter Übereinstimmung mit dem erweiterten „Blob“-Modell für Polymere, die auf gekrümmten Oberflächen immobilisiert wurden. Es wurde eine Funktionalisierungsdichte von $0,26 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ermittelt, die typisch für dichte Polymerbürsten sind. Daraus ergibt sich eine Polymerkettendichte von etwa 1,4 Ketten pro nm^2 bzw. von 500 Polymerketten pro Partikel.

Für PMEMA umhüllte MNP wurde mittels DLS und Trübungsphotometrie das Dispersionsverhalten in MeOH in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Für diese Polymerbürsten wurde ein oberes kritisches Dispersionsverhalten gefunden, dass zur thermoreversiblen Agglomeration der Nanopartikel im Träger-

medium unterhalb einer kritischen Temperatur T_{crit} führt. Im agglomerierten Zustand lassen sich die Nanopartikel einfach mit kleinen magnetischen Feldgradienten separieren. T_{crit} ist über die Molmasse der PMEMA-Arme und somit über die Synthesebedingungen einstellbar.

Durch oberflächeninitiierte Copolymerisation von MEMA und OEGMA konnten magnetische Polymerbürsten erhalten werden, die ein LCST-Verhalten in Wasser aufweisen. Die Partikel liegen unterhalb der kritischen Temperatur stabil dispergiert vor und agglomerieren schnell oberhalb von T_{crit} . Durch temperaturabhängige DLS- und trübungsphotometrische Messungen konnte T_{crit} für Partikel mit unterschiedlich zusammengesetzten Polymerhüllen bestimmt werden. Es wurde eine lineare Verringerung von T_{crit} mit dem Anteil an MEMA-Einheiten in der Copolymerhülle registriert. Damit ist es möglich über die kontrollierte Copolymerisation T_{crit} gezielt einzustellen.

Zur Funktionalisierung der magnetischen Polymerbürsten mit Bindungsstellen für biomedizinisch interessante Zielmoleküle wurde SIMA als Comonomer verwendet. Durch Copolymerisation mit OEGMA konnten thermoresponsive Kern-Schale-Bürstenpartikel realisiert werden, die in wässrigen Medien ein LCST-Verhalten zeigen und gleichzeitig Aktivester zur irreversiblen Anbindung von aminofunktionalen Zielkomponenten tragen. Die Bindekapazität der erzeugten Nanopartikel für Aminofunktionen wurde mit Benzylamin als Modellamin bestimmt. Als quantitativer Nachweis wurde die Farbreaktion von primären Aminen mit Ninhydrin genutzt. Abhängig vom SIMA-Anteil in der Copolymerhülle können bis zu $29,5 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ Benzylamin an die aktivesterfunktionalen Hybridnanopartikel gebunden werden. Im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Multi-kernpartikeln für Separationsanwendungen ist die Bindekapazität um den Faktor dreißig erhöht, was auf die Bürstenarchitektur der Partikel zurückgeführt wird. In Kombination mit dem thermoresponsiven Dispersionsverhalten eignen sich die Partikel sehr gut für magnetische Separationsanwendungen.

Um dieses Ergebnis für ein komplexes biologisches System zu bestätigen, wurden Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnur mit $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{OEGMA-co-SIMA})$ inkubiert. Ziel war es aminofunktionale Komponenten in der Zelloberfläche zu markieren. Durch TEM-Aufnahmen wurde die dichte und effektive Anbindung der Nanopartikel an die Zelloberfläche deutlich nachgewiesen.

In weiteren Zellexperimenten wurden POEGMA umhüllte Nanopartikel in Tumorzellen eingeschleust. Die verwendeten Brust- und Blutkrebszellen nehmen die magnetischen Polymerbürsten durch Phagozytose in großer Zahl in ihr In-

neres auf und lassen sich anschließend magnetisch von unmarkierten Zellen separieren. In einem Wachstumstest konnte gezeigt werden, dass die Partikel keinen Einfluß auf das Zellwachstum haben und im Rahmen dieses Tests nicht zelltoxisch sind.

Die Darstellung von magnetischen Biokatalysatoren gelang durch die Anbindung der Endopeptidase Trypsin an $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{P}(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})$ -Nanopartikel. Mittels Elementaranalyse wurde die Funktionalisierungsdichte zu $1,1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ bestimmt, was etwa 13 Trypsinmolekülen pro magnetischem Kern entspricht. Das partikelimmobilisierte Trypsin wurde anschließend als Biokatalysator zur Spaltung von Peptidbindungen eingesetzt. Hierbei wurde anhand von BAPNA als Modellsubstanz in kinetischen Messungen die Peptidaseaktivität des geträgerten Trypsins im Vergleich zu freiem Trypsin gemessen. Die gefundenen Kinetiken lassen sich sowohl für das immobilisierte Trypsin, als auch für das freie Trypsin durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben. Die berechneten spezifischen Aktivitäten belegen, dass die Aktivität des Trypsins nach der Anbindung an die Partikeloberflächen zu 96% erhalten bleibt. Die erhaltenen Biokatalysatoren lassen sich magnetisch manipulieren und aufgrund des LCST-Verhaltens der Nanopartikel einfach vom Trägermedium abtrennen.

Um das Potential der magnetischen Polymerbürsten für die Hyperthermie zu untersuchen, wurden Erwärmungsexperimente mit POEGMA und MEMA stabilisierten Fe_3O_4 -Nanopartikeln durchgeführt. Im verwendeten magnetischen Wechselfeld (250 kHz , $31,5 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$) erwärmen die Nanopartikel das gesamte Trägermedium innerhalb von wenigen Minuten auf Temperaturen bis $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Die spezifische Heizleistung der magnetischen Polymerbürsten wird auf $86,5 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ für $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{POEGMA}$ -Partikel und auf $51,9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ für $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMEMA}$ -Partikel bestimmt. Es wird beobachtet, dass die spezifische Heizleistung von der Hüllstärke der Partikel unabhängig ist, was auf einen durch Néélsche Relaxation bestimmten Erwärmungsmechanismus hindeutet.

Über die magnetischen Polymerbürsten hinaus wurden innerhalb dieser Dissertation auch Carboxymethyl-dextran-umhüllte Nanopartikelcluster verwendet. Hierfür konnte mit Hilfe von DLS-Messungen gezeigt werden, dass durch fraktionierende Zentrifugation Größenfraktionen mit mittleren hydrodynamischen Durchmessern von 50 nm bis 164 nm aus einer ursprünglichen magnetischen Flüssigkeit erhalten werden. Die Nanocluster wurden erfolgreich zur Markierung und Separation von Krebszellen eingesetzt. Die Cluster werden genau wie die Polymerbürsten in das Innere der Brustkrebszellen aufgenommen und machen

dadurch eine effektive magnetische Separation der Zellen möglich. Die CMD umhüllten Nanocluster eignen sich besonders gut zur Hyperthermie. Ein Grund hierfür ist die Agglomeratstruktur der magnetischen Kerne. In Erwärmungsexperimenten wurde gezeigt, dass die einzelnen durch Zentrifugation erhaltenen Größenfraktionen eine von ihrer Größe abhängige spezifische Heizleistungen aufweisen. Die Heizleistung für CMD-Cluster mit einer mittleren Größe von 82 nm ist mit $332 \text{ W} \cdot \text{g}^{-1}$ besonders hoch. Als Erklärung hierfür dient die nach der Fraktionierung erhaltene enge Größenverteilung und die besonders günstige Dimension der Cluster magnetische Energie in Wärme umzuwandeln.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse belegen das große Potential der magnetischen Polymerbürstenpartikel und der Polymercluster für den Einsatz in biomedizinischen Anwendungen. Die Kombination des thermoresponsiven Dispersionsverhaltens mit einer sehr hohen Dichte an aktiven Estergruppen in der Polymerhülle der Hybridbürstenpartikel, erlaubt einen effektiven Einsatz in der magnetischen Separation und die Darstellung von magnetischen Biokatalysatoren. Außerdem können die Kern-Schale-Partikel in einem magnetischen Wechselfeld erwärmt werden. Die Polymercluster wandeln dabei besonders effektiv magnetische Energie in Wärme um. Die untersuchten Partikel können damit zum grundlegenden Verständnis der intrinsischen Erwärmung von Zellen oder Geweben in der Hyperthermie beitragen.

Darüber hinaus sind die aktivesterfunktionalen magnetischen Polymere geeignet, um selektive Affinitätsliganden wie, z. B. Antikörper und eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen auf der Partikeloberfläche zu immobilisieren, was zu einer großen Anzahl von interessanten Anwendungen führen kann.

Die in dieser Dissertation hergestellten magnetischen Nanopartikel bilden eine multifunktionale Basis zur Entwicklung und Erforschung von neuartigen *in vitro* Diagnostik- und Therapieanwendungen.

Literaturverzeichnis

- [1] *Handbook of Nanotechnology*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2 Aufl., **2007**.
- [2] M. Wautelet, *Nanotechnologie*, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München, 1 Aufl., **2008**.
- [3] R. Feynman, *Engeneering and Science* **1960**, **20**.
- [4] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, *Applied Physics Letters* **1982**, **40**, 178–180.
- [5] G. Binnig, H. Rohrer, *Helvetica Physica Acta* **1982**, **55**, 128–128.
- [6] G. Binnig, H. Rohrer, *Helvetica Physica Acta* **1982**, **55**, 726–735.
- [7] D. M. Eigler, E. K. Schweizer, *Nature* **1990**, **344**, 524–526.
- [8] S. P. Section, *Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties*, *Techn. Ber.*, Royal Society & The Royal Academy of Engineering, **2004**.
- [9] K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, **48**, 872–897.
- [10] D. Horak, M. Babic, H. Mackova, M. J. Benes, *Journal of Separation Science* **2007**, **30**, 1751–1772.
- [11] H. W. Gu, K. M. Xu, C. J. Xu, B. Xu, *Chemical Communications* **2006**, S. 941–949.
- [12] A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, **26**, 3995–4021.
- [13] I. Safarik, M. Safarikova, *BioMagnetic Research and Technology* **2004**, **2:7**.

- [14] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *Journal of Physics D-Applied Physics* **2003**, **36**, R167–R181.
- [15] R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, C. B. Taylor, *Annals of Surgery* **1957**, **146**, 596–606.
- [16] I. Safarik, M. Safarikova, *Journal of Chromatography B* **1999**, **722**, 33–53.
- [17] R. Boom, C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheimvandillen, J. Vandernoordaa, *Journal of Clinical Microbiology* **1990**, **28**, 495–503.
- [18] K. A. Melzak, C. S. Sherwood, R. F. B. Turner, C. A. Haynes, *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, **181**, 635–644.
- [19] H. J. Tian, A. F. R. Huhmer, J. P. Landers, *Analytical Biochemistry* **2000**, **283**, 175–191.
- [20] T. L. Hawkins, T. Oconnormorin, A. Roy, C. Santillan, *Nucleic Acids Research* **1994**, **22**, 4543–4544.
- [21] J. Prodelalova, B. Rittich, A. Spanova, K. Petrova, M. J. Benes, *Journal of Chromatography A* **2004**, **1056**, 43–48.
- [22] A. Spanova, B. Rittich, M. J. Benes, D. Horak, *Journal of Chromatography A* **2005**, **1080**, 93–98.
- [23] B. Rittich, A. Spanova, D. Horak, M. J. Benes, L. Klesnilova, K. Petrova, A. Rybnikar, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2006**, **52**, 143–148.
- [24] B. Rittich, A. Spanova, P. Salek, P. Nemcova, S. Trachtova, D. Horak, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, **321**, 1667–1670.
- [25] C. Albretsen, K. H. Kalland, B. I. Haukanes, L. S. Havarstein, K. Kleppe, *Analytical Biochemistry* **1990**, **189**, 40–50.
- [26] E. Hornes, L. Korsnes, *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering* **1990**, **7**, 145–150.
- [27] J. Georgieva, A. Milling, C. E. Orfanos, C. C. Geilen, *Melanoma Research* **2002**, **12**, 309–317.
- [28] M. Franzreb, M. Siemann-Herzberg, T. J. Hobley, O. R. T. Thomas, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, **70**, 505–516.

- [29] J. H. Clement, M. Schwalbe, N. Buske, K. Wagner, M. Schnabelrauch, P. Görnert, K. O. Kliche, K. Pachmann, W. Weitschies, K. Höffken, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **2006**, **132**, 287–292.
- [30] M. Schwalbe, C. Jörke, N. Buske, K. Höffken, K. Pachmann, J. H. Clement, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, **293**, 433–437.
- [31] J. Wotschadlo, T. Liebert, T. Heinze, K. Wagner, M. Schnabelrauch, S. Dutz, R. Müller, F. Steiniger, M. Schwalbe, T. C. Kroll, K. Höffken, N. Buske, J. H. Clement, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, **321**, 1469–1473.
- [32] A. Villanueva, M. Canete, A. G. Roca, M. Calero, S. Veintemillas-Verdaguer, C. J. Serna, M. D. Morales, R. Miranda, *Nanotechnology* **2009**, **20**.
- [33] J. Kandzia, M. J. D. Anderson, W. Müller-Ruchholtz, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **1981**, **101**, 165–170.
- [34] G. Glöckl, R. Hergt, M. Zeisberger, S. Dutz, S. Nagel, W. Weitschies, *Journal of Physics-Condensed Matter* **2006**, **18**, S2935–S2949.
- [35] S. Dutz, R. Hergt, J. Mürbe, J. Töpfer, R. Müller, M. Zeisberger, W. Andra, M. E. Bellemann, *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics* **2006**, **220**, 145–151.
- [36] R. Hergt, S. Dutz, R. Müller, M. Zeisberger, *Journal of Physics-Condensed Matter* **2006**, **18**, S2919–S2934.
- [37] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst, R. N. Muller, *Chemical Reviews* **2008**, **108**, 2064–2110.
- [38] P. Tartaj, M. D. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. Gonzalez-Carreno, C. J. Serna, *Journal of Physics D-Applied Physics* **2003**, **36**, R182–R197.
- [39] R. Hiergeist, W. Andrä, N. Buske, R. Hergt, I. Hilger, U. Richter, W. Kaiser, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, **201**, 420–422.
- [40] I. Hilger, R. Hergt, W. A. Kaiser, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, **293**, 314–319.
- [41] A. Jordan, P. Wust, H. Föhling, W. John, A. Hinz, R. Felix, *International Journal of Hyperthermia* **1993**, **9**, 51–68.

- [42] M. Kettering, J. Winter, M. Zeisberger, S. Bremer-Streck, H. Oehring, C. Bergemann, C. Alexiou, R. Hergt, K. J. Halbhuber, W. A. Kaiser, I. Hilger, *Nanotechnology* **2007**, **18**.
- [43] K. Maier-Hauff, A. Jordan, D. Nestler, R. Scholz, R. Rothe, A. Feussner, U. Gneveckow, P. Wust, R. Felix, *Strahlentherapie Und Onkologie* **2005**, **181**, 44–44.
- [44] U. Gneveckow, A. Jordan, R. Scholz, V. Bruss, N. Waldofner, J. Rieke, A. Feussner, B. Hildebrandt, B. Rau, P. Wust, *Medical Physics* **2004**, **31**, 1444–1451.
- [45] M. H. Falk, R. D. Issels, *International Journal of Hyperthermia* **2001**, **17**, 1–18.
- [46] L. Neel, *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences* **1949**, **228**, 64–66.
- [47] W. F. Brown, *Journal of Applied Physics Supplement* **1959**, **30**, 130.
- [48] R. Hergt, S. Dutz, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, **311**, 187–192.
- [49] C. Sun, J. S. H. Lee, M. Q. Zhang, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, **60**, 1252–1265.
- [50] D. L. Buckley, P. J. Drew, S. Mussurakis, J. R. T. Monson, A. Horsman, *Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging* **1997**, **7**, 461–464.
- [51] J. L. Bridot, A. C. Faure, S. Laurent, C. Riviere, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Jossierand, J. L. Coll, L. Vander Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat, O. Tillement, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, **129**, 5076–5084.
- [52] C. Corot, P. Robert, J. M. Idee, M. Port, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, **58**, 1471–1504.
- [53] C. Chambon, O. Clement, A. Leblanche, E. Schoumanclaeys, G. Frija, *Magnetic Resonance Imaging* **1993**, **11**, 509–519.
- [54] E. Canet, D. Revel, R. Forrat, C. Baldyporcher, M. Delorgeril, L. Sebbag, J. P. Vallee, D. Didier, M. Amiel, *Magnetic Resonance Imaging* **1993**, **11**, 1139–1145.

- [55] C. S. Brazel, *Pharmaceutical Research* **2009**, **26**, 644–656.
- [56] R. V. Mehta, R. V. Upadhyay, S. W. Charles, C. N. Ramchand, *Biotechnology Techniques* **1997**, **11**, 493–496.
- [57] M. Koneracka, P. Kopcansky, M. Antalík, M. Timko, C. N. Ramchand, D. Lobo, R. V. Mehta, R. V. Upadhyay, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, **201**, 427–430.
- [58] M. L. Hans, A. M. Lowman, *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2002**, **6**, 319–327.
- [59] S. Pauser, R. Reszka, S. Wagner, K. J. Wolf, H. J. Buhr, G. Berger, *Anti-Cancer Drug Design* **1997**, **12**, 125–135.
- [60] K. Hirao, T. Sugita, T. Kubo, K. Igarashi, K. Tanimoto, T. Murakami, Y. Yasunaga, M. Ochi, *International Journal of Oncology* **2003**, **22**, 1065–1071.
- [61] S. W. Choi, W. S. Kim, J. H. Kim, *Journal of Dispersion Science and Technology* **2003**, **24**, 475–487.
- [62] T. Kubo, T. Sugita, S. Shimose, Y. Nitta, Y. Ikuta, T. Murakami, *International Journal of Oncology* **2000**, **17**, 309–315.
- [63] K. J. Widder, A. E. Senyei, D. G. Scarpelli, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1978**, **158**, 141–146.
- [64] A. Senyei, K. Widder, G. Czerlinski, *Journal of Applied Physics* **1978**, **49**, 3578–3583.
- [65] S. Goodwin, C. Peterson, C. Hoh, C. Bittner, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, **194**, 132–139.
- [66] S. C. Goodwin, C. A. Bittner, C. L. Peterson, G. Wong, *Toxicological Sciences* **2001**, **60**, 177–183.
- [67] C. Alexiou, W. Arnold, R. J. Klein, F. G. Parak, P. Hulin, C. Bergemann, W. Erhardt, S. Wagenpfeil, A. S. Lübke, *Cancer Research* **2000**, **60**, 6641–6648.
- [68] C. Alexiou, R. J. Schmid, R. Jurgons, M. Kremer, G. Wanner, C. Bergemann, E. Huenges, T. Nawroth, W. Arnold, F. G. Parak, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2006**, **35**, 446–450.

- [69] C. Alexiou, R. Jurgons, C. Seliger, B. Schick, S. Kolb, H. Iro, *Laryngo-Rhino-Otologie* **2006**, **85**, 857–859.
- [70] A. S. Lübbe, C. Bergemann, J. Brock, D. G. McClure, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, **194**, 149–155.
- [71] S. K. Pulfer, S. L. Ciccotto, J. M. Gallo, *Journal of Neuro-Oncology* **1999**, **41**, 99–105.
- [72] S. K. Pulfer, J. M. Gallo, *Journal of Drug Targeting* **1998**, **6**, 215–227.
- [73] A. S. Lübbe, C. Bergemann, H. Riess, F. Schriever, P. Reichardt, K. Possinger, M. Matthias, B. Dörken, F. Herrmann, R. Gürtler, P. Hohenberger, N. Haas, R. Sohr, B. Sander, A. J. Lemke, D. Ohlendorf, W. Huhnt, D. Huhn, *Cancer Research* **1996**, **56**, 4686–4693.
- [74] A. S. Lübbe, C. Bergemann, W. Huhnt, T. Fricke, H. Riess, J. W. Brock, D. Huhn, *Cancer Research* **1996**, **56**, 4694–4701.
- [75] A. S. Lübbe, C. Alexiou, C. Bergemann, *Journal of Surgical Research* **2001**, **95**, 200–206.
- [76] S. S. Davis, *Trends in Biotechnology* **1997**, **15**, 217–224.
- [77] C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *Journal of Physics D-Applied Physics* **2003**, **36**, R198–R206.
- [78] A. H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, **46**, 1222–1244.
- [79] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, *Journal of Materials Chemistry* **2004**, **14**, 2161–2175.
- [80] U. Schwertmann, R. M. Cornell, *Iron Oxides in the laboratory: preparation and characterization*, VCH, Weinheim Cambridge, **1991**.
- [81] E. Schulze, J. T. Ferrucci, K. Poss, L. Lapointe, A. Bogdanova, R. Weissleder, *Investigative Radiology* **1995**, **30**, 604–610.
- [82] C. Janiak, T. M. Klapötke, H.-J. Meyer, *Moderne Anorganische Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin New York, **1999**.
- [83] W. C. Elmore, *Physical Review* **1938**, **54**, 309.
- [84] R. Massart, *Ieee Transactions on Magnetics* **1981**, **17**, 1247–1248.

- [85] R. Massart, V. Cabuil, *Journal De Chimie Physique Et De Physico-Chimie Biologique* **1987**, **84**, 967–973.
- [86] A. Bee, R. Massart, S. Neveu, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1995**, **149**, 6–9.
- [87] R. Massart, E. Dubois, V. Cabuil, E. Hasmonay, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1995**, **149**, 1–5.
- [88] V. Cabuil, E. Dubois, S. Neveu, J. C. Bacri, E. Hasmonay, R. Perzynski, *Progress in Colloid and Polymer Science* **1995**, **98**, 23.
- [89] S. Lefebure, E. Dubois, V. Cabuil, S. Neveu, R. Massart, *Journal of Materials Research* **1998**, **13**, 2975–2981.
- [90] N. R. Jana, Y. F. Chen, X. G. Peng, *Chemistry of Materials* **2004**, **16**, 3931–3935.
- [91] A. C. S. Samia, K. Hyzer, J. A. Schlueter, C. J. Qin, J. S. Jiang, S. D. Bader, X. M. Lin, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, **127**, 4126–4127.
- [92] Y. Li, M. Afzaal, P. O'Brien, *Journal of Materials Chemistry* **2006**, **16**, 2175–2180.
- [93] T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, H. Bin Na, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, **123**, 12798–12801.
- [94] S. H. Sun, H. Zeng, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, **124**, 8204–8205.
- [95] S. H. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, G. X. Li, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, **126**, 273–279.
- [96] J. Park, K. J. An, Y. S. Hwang, J. G. Park, H. J. Noh, J. Y. Kim, J. H. Park, N. M. Hwang, T. Hyeon, *Nature Materials* **2004**, **3**, 891–895.
- [97] C. J. Xu, S. H. Sun, *Polymer International* **2007**, **56**, 821–826.
- [98] Z. Li, Q. Sun, M. Gao, *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, **44**, 123–6.
- [99] Z. Li, H. Chen, H. B. Bao, M. Y. Gao, *Chemistry of Materials* **2004**, **16**, 1391–1393.

- [100] Z. Li, Q. Sun, M. Y. Gao, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, **44**, 123–126.
- [101] F. Q. Hu, L. Wei, Z. Zhou, Y. L. Ran, Z. Li, M. Y. Gao, *Advanced Materials* **2006**, **18**, 2553–+.
- [102] F. C. Meldrum, B. R. Heywood, S. Mann, *Science* **1992**, **257**, 522–523.
- [103] D. Bonacchi, A. Caneschi, D. Dorignac, A. Falqui, D. Gatteschi, D. Rovai, C. Sangregorio, R. Sessoli, *Chemistry of Materials* **2004**, **16**, 2016–2020.
- [104] D. Bonacchi, A. Caneschi, D. Gatteschi, C. Sangregorio, R. Sessoli, A. Falqui, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **2004**, **65**, 719–722.
- [105] K. Inouye, R. Endo, Y. Otsuka, K. Miyashiro, K. Kaneko, T. Ishikawa, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, **86**, 1465–1469.
- [106] J. C. Bacri, R. Perzynski, D. Salin, V. Cabuil, R. Massart, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1990**, **85**, 27–32.
- [107] R. M. Cornell, U. Schwertmann, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*, VCH, Weinheim Cambridge, **1996**.
- [108] Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried, D. Golodnitsky, L. Burstein, C. N. Sukenik, G. Markovich, *Langmuir* **2001**, **17**, 7907–7911.
- [109] Y. Sahoo, A. Goodarzi, M. T. Swihart, T. Y. Ohulchanskyy, N. Kaur, E. P. Furlani, P. N. Prasad, *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, **109**, 3879–3885.
- [110] K. Kandori, Y. Kawashima, T. Ishikawa, *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, **152**, 284–288.
- [111] C. K. Huang, C. H. Hou, C. C. Chen, Y. L. Tsai, L. M. Chang, H. S. Wei, K. H. Hsieh, C. H. Chan, *Nanotechnology* **2008**, **19**.
- [112] N. Fauconnier, J. N. Pons, J. Roger, A. Bee, *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, **194**, 427–433.
- [113] N. Fauconnier, A. Bee, R. Massart, F. Dardoize, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **1996**, **19**, 783–797.
- [114] Y. Nishio, A. Yamada, K. Ezaki, Y. Miyashita, H. Furukawa, K. Horie, *Polymer* **2004**, **45**, 7129–7136.

- [115] F. Llanes, D. H. Ryan, R. H. Marchessault, *International Journal of Biological Macromolecules* **2000**, **27**, 35–40.
- [116] P. V. Finotelli, M. A. Morales, M. H. Rocha-Leao, E. M. Baggio-Saitovitch, A. M. Rossi, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2004**, **24**, 625–629.
- [117] E. Kroll, F. M. Winnik, R. F. Ziolo, *Chemistry of Materials* **1996**, **8**, 1594.
- [118] R. Tadmor, R. E. Rosensweig, J. Frey, J. Klein, *Langmuir* **2000**, **16**, 9117–9120.
- [119] C. W. Jung, *Magnetic Resonance Imaging* **1995**, **13**, 675–691.
- [120] H. Pardoe, W. Chua-anusorn, T. G. St Pierre, J. Dobson, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2001**, **225**, 41–46.
- [121] P. Sipos, O. Berkesi, E. Tombacz, T. G. St Pierre, J. Webb, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, **95**, 55–63.
- [122] S. R. Bhattarai, K. C. R. Badahur, S. Aryal, M. S. Khil, H. Y. Kim, *Carbohydrate Polymers* **2007**, **69**, 467–477.
- [123] D. J. Kim, S. M. Kang, B. Kong, W. J. Kim, H. J. Paik, H. Choi, I. S. Choi, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, **206**, 1941–1946.
- [124] H. S. Lee, E. H. Kim, H. P. Shao, B. K. Kwak, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, **293**, 102–105.
- [125] J. Pyun, *Polymer Reviews* **2007**, **47**, 231–263.
- [126] A. M. Schmidt, *Colloid and Polymer Science* **2007**, **285**, 953–966.
- [127] A. H. Latham, M. E. Williams, *Accounts of Chemical Research* **2008**, **41**, 411–420.
- [128] N. Kohler, C. Sun, J. Wang, M. Q. Zhang, *Langmuir* **2005**, **21**, 8858–8864.
- [129] E. Marutani, S. Yamamoto, T. Ninjbadgar, Y. Tsujii, T. Fukuda, M. Takanano, *Polymer* **2004**, **45**, 2231–2235.
- [130] T. Ninjbadgar, S. Yamamoto, T. Fukuda, *Solid State Sciences* **2004**, **6**, 879–885.
- [131] O. Prucker, J. R uhe, *Macromolecules* **1998**, **31**, 592–601.

- [132] O. Prucker, J. R uhe, *Macromolecules* **1998**, **31**, 602–613.
- [133] O. Prucker, J. R uhe, *Langmuir* **1998**, **14**, 6893–6898.
- [134] J. Pyun, S. Jia, T. Kowalewski, G. D. Patterson, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2003**, **36**, 6952–6952.
- [135] C. R. Vestal, Z. J. Zhang, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, **124**, 14312–14313.
- [136] S. M. Gravano, R. Dumas, K. Liu, T. E. Patten, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2005**, **43**, 3675–3688.
- [137] T. von Werne, T. E. Patten, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, **123**, 7497–7505.
- [138] J. D. Jeyaprakash, S. Samuel, R. Dhamodharan, J. Ruhe, *Macromolecular Rapid Communications* **2002**, **23**, 277–281.
- [139] J. Parvole, G. Laruelle, C. Guimon, J. Francois, L. Billon, *Macromolecular Rapid Communications* **2003**, **24**, 1074–1078.
- [140] J. B. Kim, M. L. Bruening, G. L. Baker, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, **122**, 7616–7617.
- [141] M. Baum, W. J. Brittain, *Macromolecules* **2002**, **35**, 610–615.
- [142] W. C. Wang, K. G. Neoh, E. T. Kang, *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, **27**, 1665–1669.
- [143] R. Jordan, A. Ulman, J. F. Kang, M. H. Rafailovich, J. Sokolov, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, **121**, 1016–1022.
- [144] Q. Y. Zhou, S. X. Wang, X. W. Fan, R. Advincula, J. Mays, *Langmuir* **2002**, **18**, 3324–3331.
- [145] R. Advincula, Q. G. Zhou, M. Park, S. G. Wang, J. Mays, G. Sakellariou, S. Pispas, N. Hadjichristidis, *Langmuir* **2002**, **18**, 8672–8684.
- [146] R. Jordan, N. West, A. Ulman, Y. M. Chou, O. Nuyken, *Macromolecules* **2001**, **34**, 1606–1611.
- [147] B. Zhao, W. J. Brittain, *Progress in Polymer Science* **2000**, **25**, 677–710.
- [148] M. Husemann, D. Mecerreyes, C. J. Hawker, J. L. Hedrick, R. Shah, N. L. Abbott, *Angewandte Chemie-International Edition* **1999**, **38**, 647–649.

- [149] A. M. Schmidt, *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, **26**, 93–97.
- [150] R. Gref, M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Müller, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2000**, **18**, 301–313.
- [151] M. Q. Zhang, T. Desai, M. Ferrari, *Biomaterials* **1998**, **19**, 953–960.
- [152] R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetsky, V. Torchilin, R. Langer, *Science* **1994**, **263**, 1600–1603.
- [153] G. Storm, S. O. Belliot, T. Daemen, D. D. Lasic, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, **17**, 31–48.
- [154] L. X. Tiefenauer, A. Tschirky, G. Kühne, R. Y. Andres, *Magnetic Resonance Imaging* **1996**, **14**, 391–402.
- [155] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **2001**, **18**, 527–550.
- [156] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray, *Pharmacological Reviews* **2001**, **53**, 283–318.
- [157] Y. Zhang, N. Kohler, M. Q. Zhang, *Biomaterials* **2002**, **23**, 1553–1561.
- [158] J.-H. Lee, K. Lee, S. H. Moon, Y. Lee, T. G. Park, J. Cheon, *Angewandte Chemie* **2009**, **121**, 4238–4243.
- [159] D. M. Dykxhoorn, D. Palliser, J. Lieberman, *Gene Therapy* **2006**, **13**, 541–552.
- [160] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Kotliansky, S. Limmer, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, *Nature* **2004**, **432**, 173–178.
- [161] P. Kumar, H. Q. Wu, J. L. McBride, K. E. Jung, M. H. Kim, B. L. Davidson, S. K. Lee, P. Shankar, N. Manjunath, *Nature* **2007**, **448**, 39–U2.
- [162] K. A. Kelly, S. R. Setlur, R. Ross, R. Anbazhagan, P. Waterman, M. A. Rubin, R. Weissleder, *Cancer Research* **2008**, **68**, 2286–2291.

- [163] A. P. Herrera, M. Rodriguez, M. Torres-Lugo, C. Rinaldi, *Journal of Materials Chemistry* **2008**, **18**, 855–858.
- [164] N. Ohnishi, H. Furukawa, H. Hideyuki, J.-M. Wang, C.-I. An, E. Fukusaki, K. Kataoka, K. Ueno, A. Kondo, *NanoBiotechnology* **2006**, **2**, 43–49.
- [165] N. Fukuda, J. Ishii, T. Tanaka, H. Fukuda, N. Ohnishi, A. Kondo, *Biotechnology Progress* **2008**, **24**, 352–357.
- [166] T. Gelbrich, A. Schmidt, *Macromolecules* **2009**, **eingereicht**.
- [167] T. Gelbrich, A. Schmidt, *Polymer* **2009**, **eingereicht**.
- [168] S. Dutz, J. H. Clement, E. Eberbeck, T. Gelbrich, R. Hergt, R. Müller, J. Wotschadlo, M. Zeisberger, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, **321**, 1501–1504.
- [169] T. Gelbrich, M. Feyen, A. M. Schmidt, *Macromolecules* **2006**, **39**, 3469–3472.
- [170] T. Gelbrich, M. Feyen, A. M. Schmidt, *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry and Chemical Physics* **2006**, **220**, 41–49.
- [171] N. Frickel, R. Messing, T. Gelbrich, A. Schmidt, *Macromolecules* **2009**, **eingereicht**.
- [172] P. Scherrer, *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math. Phys.* **1918**, **2**, 98.
- [173] A. Kaiser, T. Gelbrich, A. M. Schmidt, *Journal of Physics-Condensed Matter* **2006**, **18**, S2563–S2580.
- [174] C. Biver, R. Hariharan, J. Mays, W. B. Russel, *Macromolecules* **1997**, **30**, 1787–1792.
- [175] S. Alexander, *Journal De Physique* **1977**, **38**, 983–987.
- [176] P. G. de Gennes, *Macromolecules* **1980**, **13**, 1069–1075.
- [177] P. G. de Gennes, *Journal De Physique* **1976**, **37**, 1445–1452.
- [178] J. F. Lutz, A. Hoth, *Macromolecules* **2006**, **39**, 893–896.

Abbildungsverzeichnis

1.1	IBM-Schriftzug	2
1.2	MRI-Aufnahme eines menschlichen Kopfes	11
1.3	Morphologie von magnetischen Polymernanopartikeln	24
1.4	Schema der Zellaufnahme und Wirkstofffreisetzung von multifunktionalen Nanopartikeln von Lee et al.	26
3.1	TEM Aufnahme von Fe_3O_4 -Partikeln	34
3.2	VSM Messung von Fe_3O_4 @PMEMA-Nanopartikeln	35
3.3	TEM-Aufnahme von Fe_3O_4 @PMEMA	38
3.4	M_n vs. μ_{PMEMA}/μ_M	39
3.5	d_h Verteilung von Fe_3O_4 @PMEMA-Nanopartikeln und Auftragung d_h vs M_n	40
3.6	Magnetische Polymercluster	42
3.7	Schematisches Phasenverhalten von Fe_3O_4 @PMEMA-Nanopartikeln in Methanol	44
3.8	Trübungsmessungen von Fe_3O_4 @PMEMA-Partikeln in MeOH	44
3.9	Trübungs und DLS-Messungen von Fe_3O_4 @P(OEGMA-co-MEMA)-Partikeln Wasser	46
3.10	Abhängigkeit von T_{crit} von der Copolymerzusammensetzung	47
3.11	Reaktionsschema des BzA-Kapazitätstests von Fe_3O_4 @P(OEGMA-co-SIMA)-Nanopartikel	48
3.12	Auftragung $c_{r,BzA}$ gegen den Quotient aus $c_{0,BzA}$ und $c_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$	49
3.13	TEM von Endothelzellen	50
3.14	Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen	51
3.15	Zellwachstumstest	52
3.16	Reaktionsschema der trypsin-katalysierten BAPNA-Spaltung	53
3.17	Absorptionsänderung mit der Zeit für trypsin-katalysierte BAPNA-Spaltung und Lineweaver-Burk-Auftragung	54
3.18	Induktive Erwärmbarkeit	56

Symbolverzeichnis

ATRP	atom transfer radical polymerization
BAPNA	N _α -Benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid
BIB	2-Brom-2-methylpropionsäure
bpy	2,2'-Bipyridin
BzA	Benzylamin
CIPTS	4-Chlormethylphenyltrimethoxysilan
CMD	Carboxymethyldextran
CS	Citronensäure
CuBr	Kupfer(I)bromid
Cy5	Fluoreszenzfarbstoff
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EA	Elementaranalyse
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid
Fe(acac) ₃	Eisenacetylacetonat
FMA	fluoreszenz-modifiziertes Acrylamid
FRP	freie radikalische Polymerisation
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPN	Hepsin
K562	Blutkrebszellen
LCST	lower critical solution temperature
LRP	lebende radikalische Polymerisation
Fe ₃ O ₄	Magnetit

Symbolverzeichnis

$\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$	Maghemit
$((\text{CH}_3)_3\text{NO})$	Trimethylaminoxid
MCF-7	Brustkrebszellen
MEMA	Methoxyethylmethacrylat
MeOH	Methanol
MnFe_2O_4	Magnanferrit
MNP	magnetische Nanopartikel
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NAGAM	N-Acryloylglycinamid
NBPMA	N-(3-biotinamidpropyl)methacrylat)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIPAAm	N-isopropylacrylamid
OEGMA	Oligo(ethylenglykol)methylethermethacrylat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Poly(ethylenglykol)
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PZC	isoelektrischer Punkt
RES	retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
ROMP	ringöffnende Metathese-Polymerisation
ROP	ringöffnende Polymerisation
RTM	Rastertunnelmikroskop
SHL	spezifischer Hystereseverlust pro Zyklus
SHP	spezifische Heizleistung
SIMA	Succinimidylmethacrylat
siRNA	small interfering Ribonucleinsäure
SPIO	superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGA	Thermogravimetrie
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid

UCST	upper critical solution temperature
VSM	vibrating sample magnetometry / quasistatische Magnetometrie
XRD	Röntgendiffraktometrie
act_{spez}	spezifische Aktivität
$\chi_{\text{exp}}(\text{MEMA})$	experimentell bestimmter molarer MEMA-Anteil
c_P	Wärmekapazität des Systems
$c_{0,\text{BzA}}$	Benzylamin-Ausgangskonzentration
c_{BAPNA}	BAPNA-Konzentration
$c_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$	eingesetzte Magnetitkonzentration
c_{Trypsin}	Trypsinkonzentration
$c_{r,\text{BzA}}$	Benzylaminkonzentration im Reaktionsüberstand
d_h	hydrodynamischer Durchmesser
dc_{BAPNA}/dt	Anfangsgeschwindigkeit der trypsinkatalysierten BAPNA-Spaltung
η	Viskosität eines Mediums
f	Frequenz
f_s	Polymerkettendichte
f_{BzA}	Benzylamin-Funktionalisierungsdichte
g	Erdbeschleunigung
H	magnetische Feldstärke
k_B	Boltzmann-Konstante
K_m	Michaeliskonstante
K_{eff}	Anisotropiekonstante
$\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$	spezifischer Gehalt an magnetischen Nanopartikel
M_0	makroskopische Magnetisierung
M_n	zahlengemittelte Molmasse
r_h	hydrodynamischer Radius
τ	Transmission
τ_0	$1/f_0$; mit f_0 : Lamour Frequenz
τ_B	Relaxationszeit nach Brown
τ_N	Relaxationszeit nach Néel

Symbolverzeichnis

τ_{eff}	effektive Relaxationszeit
T_1	longitudinale Relaxationszeit
T_2	transversale Relaxationszeit
T_{crit}	kritische Temperatur
T	Temperatur
t	Zeit
v_{max}	maximale Anfangsgeschwindigkeit
V_c	Partikelvolumen

Anhang

Kumulierte Veröffentlichungen

- A. Kaiser, T. Gelbrich, A. M. Schmidt „Thermoresponsive Magnetic Fluids“
J. Phys. Cond. Matter **18** (2008) 2211
- T. Gelbrich, M. Reinartz, A. M. Schmidt „Active Ester Functional Single Core Magnetic Nanostructures as a Versatile Immobilization Matrix for Effective Bioseparation and Catalysis“
Biomacromolecules eingereicht
- T. Gelbrich, M. Feyen, A. M. Schmidt "Magnetic Thermoresponsive Core-Shell Nanoparticles“
Macromolecules **39** (2006) 3469
- T. Gelbrich, M. Feyen, A. M. Schmidt "Magnetic Polymer Brushes: Towards Tailor-Made Stabilization of Magnetic Fluids by Surface-Initiated Polymerization“
Z. Phys. Chem. **220** (2006) 41
- N. Frickel, R. Messing, T. Gelbrich, M. Feyen, A. M. Schmidt "Functional Silanes as Surface Modifying Primers for the Preparation of Highly Stable and Well-Defined Magnetic Polymer Hybrids“
Langmuir akzeptiert DOI:10.1021/la902904f
- T. Gelbrich, G. U. Marten, A. M. Schmidt "Reversible Thermoflocculation of Magnetic Core-Shell Particles Induced by Remote Magnetic Heating“
Polymer eingereicht
- S. Dutz, J. H. Clement, D. Eberbeck, T. Gelbrich, R. Hergt, R. Müller, J. Wotschadlo, M. Zeisberger "Ferrofluids of magnetic multicore nanoparticles for biomedical applications“
J. Magn. Magn. Mater. **321** (2009) 1501

Thermosensitive magnetic fluids

Andreas Kaiser, Thorsten Gelbrich and Annette M Schmidt

Institute for Organic Chemistry and Macromolecular Chemistry, Heinrich Heine University of
Duesseldorf, UniversitaetsstraÙe 1, D-40225 Duesseldorf, Germany

E-mail: schmidt.annette@uni-duesseldorf.de

Received 2 May 2006, in final form 7 July 2006

Published 8 September 2006

Online at stacks.iop.org/JPhysCM/18/S2563

Abstract

Magnetic core–shell particles were synthesized by the attachment of a polymeric brush on the surface of magnetite nanoparticles. The hybrid particles are well dispersible in good solvents for the polymeric shell and form thermoreversible magnetic fluids in carrier fluids with a critical solution behaviour. The thermoresponsive effect can be activated by the application of a high frequency electromagnetic field and may be useful for magnetic separation, recoverable catalysts and for drug release purposes.

1. Introduction

1.1. Background

Magnetic materials are key components in modern technology, with applications ranging from data storage to magnetic resonance imaging contrast agents. In this context, magnetic nanoparticles represent a critical link between current technology and future applications due to their unique size-dependent properties [1].

Dispersions of superparamagnetic particles in different carrier fluids, known as magnetic fluids [2], behave as liquids whose physical properties and flow behaviour can be controlled by external magnetic fields. Magnetic fluids are of high interest for basic research as well as for various applications. To date, they are in use for example as magnetically controlled seals and bearings and in loudspeaker coolings. A high potential for applications of magnetic fluids based on iron oxides is promised in the biomedical field [3]. Their use as improved MRI diagnostic contrast agents [4] and as a positioning tamponade for retinal detachment repair in eye surgery [5] has been reported. Ferrofluids are of high interest concerning magnetic drug targeting [6] and for cell separation methods [7].

In separation applications, magnetic fluids are of interest as they offer high surface area and can be functionalized to selectively discriminate between different molecular or cellular species. Present suggestions for nonmedical applications of magnetic fluids include the use of magnetic fluids as magnetically separable nanocatalytic systems that combine the advantages

of homogeneous and heterogeneous catalysis [8]. In these applications, a small particle size and effective dispersion stability by a suitable stabilization mechanism is required in order to achieve an optimum of specific binding or catalytic activity. In the same direction, however, these parameters complicate the magnetic separation of the particles.

The ability of ferrofluids to convert magnetic energy into heat by relaxational and hysteresis effects [9] has been known for a long time and has recently gained much attention for tumour therapy by magnetic hyperthermia [3].

Commonly used and commercially available magnetic fluids are dispersions of magnetic nanoparticles that are often stabilized by surface-active agents, acid and polymeric stabilizers. The steric stabilization mechanism involved is often of a dynamic nature, making it difficult to control the hydrodynamic diameter of the dispersed objects, and to prevent the formation of medium-sized (200–500 nm) agglomerates. In contrast, the functionalization of inorganic nanoscopic features with an irreversibly attached, covalently bound polymeric shell is a recent promising approach for the design of well-defined composite materials and dispersions [10], as this offers the opportunity to tailor dispersion properties like the minimum particle distance and the hydrodynamic particle volume. Additionally, an enhanced stability of such dispersions upon dilution, concentration or compositional changes of the dispersions may be expected.

A straightforward strategy for the synthesis of polymer-coated inorganic nanoparticles is the ‘grafting-from’ approach applied here by initiating the polymerization directly from the particle surface, resulting in a high number of end-attached polymer chains, often referred to as a polymeric brush [11]. Surface-initiated polymerization has been applied to various polymerization methods, including radical [12], cationic [13], anionic [14], ring-opening metathesis [15], and ring-opening polymerization (ROP) [16], and has been proved to be efficient in the coating of nanoparticles such as silica [17], starch granules [18], carbon nanotubes [19] and maghemite [20].

For the preparation of magnetic fluids, magnetic core/polymeric brush hybrid particles have the advantage to be instantly dispersible in good solvents for the polymeric shell without the addition of ancillary stabilizers [21–23]. In lieu thereof, the polymer arms serve as an irreversible attached steric stabilizer, leading to well-defined properties of the surfactant-free dispersion.

Our novel synthetic approach results in magnetic core–shell nanoparticles with a magnetite (Fe_3O_4) core and a covalently attached, stabilizing polymeric shell [22–24]. By dispersion of the hybrid particles in suitable nonpolar solvents, magnetic fluids are obtained without the use of stabilizing additives.

1.2. Motivation and scope

A number of polymeric materials are known for their ability to show a discontinuous change of properties due to temperature changes [25]. Some of these systems, e.g. thermoresponsive hydrogels and membranes, are based on the existence of critical solution temperatures (UCST or LCST) [26]. At a critical solution temperature, the solvation of polymer segments in a certain solvent is suddenly changed strongly due to the inversion of the free energy of mixing in the polymer/solvent system at that temperature. This may be due to entropic or enthalpic effects. The critical solution temperature is closely related to the theta temperature T_Θ of a polymer/solvent system, where the polymer–solvent interaction forces are just compensating those between the polymer segments, resulting in a coil-to-globule transition of the polymer chains at that temperature.

We present results on the synthesis and characterization of novel thermoreversible magnetic fluids based on magnetite (Fe_3O_4) coated with a covalently anchored, polymeric

shell of polystyrene (PS). The core-shell particles form stable dispersions in cyclohexane at temperatures above an upper critical solution temperature (UCST), while the particles precipitate below that temperature and can easily be separated by a magnet.

Thermoreversible stabilization of the particles offers an opportunity to combine dispersibility and quasi-homogeneous conditions for specific binding and catalytic activity, and easy magnetic separation at temperatures beyond the stabilizing conditions.

It is shown that it is possible to apply an alternating magnetic field as the trigger to induce thermal effects like solubility and/or permeability changes in the shell. This behaviour is of interest as well for medical applications in triggered drug release and may lead to a better understanding of the heat transfer mechanisms involved.

2. Experimental part

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fluka) and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Baker) were used as received. 25% NH_3 aq. (Baker) and 37% HCl aq. (Riedel-de Haën) are of p. a. quality. Copper(I) bromide (CuBr, 98%), 4,4'-dinonyl-2,2' bipyridine (dNbpy, 97%) and 2-bromo-2-methylpropionic acid (BMPA, 98%) were obtained from Sigma Aldrich and were used without purification. Styrene from Merck-Schuchardt was freshly distilled. Methanol was obtained in technical grade and used after distillation. Other solvents (toluene, benzene, cyclohexane, tetrahydrofurane) were purchased in analytical grade or higher. Toluene (p.a.) was dried over a molecular sieve (4 Å). All synthetic procedures were performed under inert (N_2 or Ar) atmosphere.

2.1. Synthesis

Fe_3O_4 nanoparticles were prepared by alkaline hydrolysis of ferrous and ferric chloride (molar ratio 1:2) aqueous solution using Cabuil and Massart's method [27]. The particles were washed several times with ammonium hydroxide solution (1.3%) and methanol. The freshly prepared particles were surface-functionalized by the addition of BMPA (1.67 mmol per gram Fe_3O_4) and stirring for 30 min at 50 °C. To remove untethered acid, the particles were washed extensively with methanol and degassed toluene. After adding an adequate amount of styrene and CuBr/dNbpy (1:2 mol mol⁻¹) as the catalytic system, the polymerization was started by heating the reaction mixture at 70 °C for 5 d under an argon atmosphere.

To obtain dispersions of the particles, toluene was added to the mixture and the resulting dispersions were centrifuged (2 min at 2000 r min⁻¹; relative centrifugative force: 380 g) to remove agglomerated material. Afterwards, the ferrofluids remained stable for several weeks and did not show any flocculation upon centrifugation or dilution. The ferrofluids were stored under argon in order to prevent the magnetite cores from oxidation to maghemite.

To investigate the composition of the hybrid particles by TGA, toluene was removed in vacuo, and the residue was dried carefully *in vacuo* to remove solvent and monomer residuals. To separate the polymeric arms from the magnetic core, a 10% dispersion in toluene was stirred vigorously with 1.0 M HCl aq. at room temperature until the black colour had changed to bright yellow. The organic phase was washed with brine and the polymer was isolated by precipitation in methanol. The polymeric fraction was dried and characterized by gel permeation chromatography (GPC).

For the preparation of thermosensitive magnetic fluids, Fe_3O_4 @PS particles were transferred to cyclohexane by precipitation in methanol and washing several times with cyclohexane in order to remove residues of methanol.

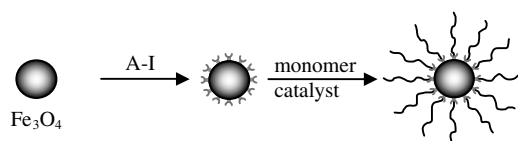
2.2. Instrumentation

X-ray powder diffractograms were collected on a Huber G600 powder diffractometer (Cu $K\alpha_1$, quartz monochromator). Crystallite sizes have been calculated from line broadening according to the Scherrer equation [32] after correction for apparatus parameters. Elemental analysis (EA) of washed and carefully dried functionalized particles was carried out with a Perkin Elmer 2400 (series 2) CHN analyser. The degree of functionalization was calculated from the carbon content. Attenuated total reflection-infrared (ATR-IR) spectra were measured on a Nicolet FT-IR-55XB spectrometer equipped with a Specac Golden Gate Heated Diamond ATR Top Plate. Thermogravimetric analysis (TGA) experiments were performed with a Netzsch STA 449C. The samples were measured with a heating rate of 5 K min^{-1} under a nitrogen atmosphere in the temperature range 20–650 °C. The mass composition of dried hybrid particles was determined based on the weight loss by thermal decomposition of the polymer fraction in the temperature range 200–550 °C. The polymeric shell of the core shell particles was characterized by gel permeation chromatography (GPC) in tetrahydrofuran. The measurement system is based on a Waters 510 pump, three (300×8) mm² MZ Gel SDplus columns and a Waters 410 differential refractometer calibrated with polystyrene standards. Vibrating sample quasi-static magnetometry (VSM) was performed on a Micro Mag vibrating sample magnetometer from Princeton Measurements Corporation, with a field maximum of $1.3 \times 10^6 \text{ A m}^{-1}$. Induction heating experiments were performed on a Huettinger High Frequency Generator TIG 5,0/300 equipped with a copper inductor ($l = 50 \text{ mm}$, $d_I = 35 \text{ mm}$, $n = 5$) and operating at 300 kHz. The maximum induction power was 5.0 kW. Dynamic Light Scattering (DLS) experiments were carried out with a Malvern HPPS-ET in the temperature range 17–75 °C. Hellma Suprasil precision cells 110-QS were used. The particle size distribution was derived from a deconvolution of the measured intensity autocorrelation function of the sample by the *general purpose mode* algorithm included in the *DTS* software. Each experiment was performed three times.

3. Synthesis of magnetic core–shell nanoparticles

In this work, we report the synthesis of hybrid core–shell particles with inorganic cores consisting of magnetite (Fe_3O_4) surface-functionalized by carboxylic acid-terminated polystyrene (PS) oligomers. The cores are selected to possess superparamagnetic behaviour, while the polymeric shell serves as a stabilizing layer and affords the preparation of stable particle dispersions. By choosing cyclohexane as the dispersion medium, magnetic fluids are obtained that possess a critical solution temperature leading to a thermoreversible volume transition of the hybrid particles. The UCST behaviour is attributed to the well-investigated presence of a theta temperature of PS in cyclohexane at 34.5 °C [28].

Surface-initiated polymerization is a relatively new pathway for the preparation of functional coatings and it has recently received much attention [21]. This technique is based on the growth of polymer molecules at the surface of a substrate *in situ* from surface-bound initiators. Consequently, covalently anchored end-tethered polymeric chains with a high grafting density on the particle surface are formed, commonly referred to as a polymeric brush [21]. For the presented hybrid particles, we chose the atom transfer radical polymerization (ATRP) for the surface-initiated polymerization of styrene from colloidal Fe_3O_4 particles [29], as it offers the advantage of a ‘living’/controlled mechanism leading to ideally linear chains with low polydispersity (meaning uniform chain length of the individual chains) and good control on the molecular weight, combined with vast tolerance towards the reaction conditions [30].



Scheme 1. Synthesis scheme of magnetite-cored polymer brushes.

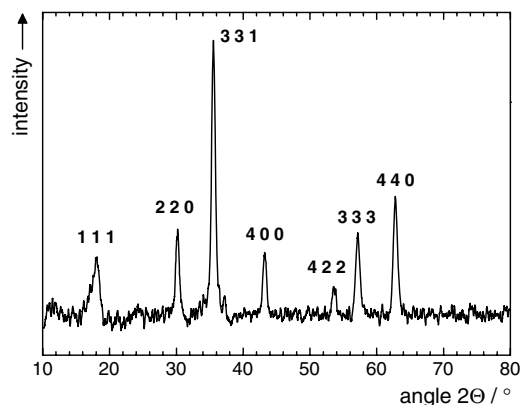


Figure 1. X-ray diffractogram of bare magnetite nanoparticles and correlated hkl -indices.

For the preparation of magnetic particle-cored polymeric brushes, we developed a three-step process. It consists of the precipitation of magnetite nanoparticles with a volume-average diameter of about 12 nm, the chemical modification of the particle surface by chemisorption of a functional carboxylic acid bearing a polymerization initiator, and finally grafting polymeric arms from the particle surface by the polymerization of a suitable monomer (see scheme 1).

To indicate the success of the synthetic pathway, careful characterization of the particles at different stages of the process was required. After alkaline precipitation, the Fe_3O_4 nanoparticles cores obtained were analysed by x-ray diffraction (XRD) analysis (see figure 1). No crystalline phase other than Fe_3O_4 was detected [31]. Using the Scherrer equation [32], we reproducibly calculated mean crystallite sizes of 12–13 nm from the line broadening of the signals. The value corresponds well with volume-average core size calculated from VSM of hybrid particle dispersions (see table 1). Furthermore, it was shown that the crystallite size does not change significantly upon functionalization or polymerization.

A surface functionalization of the particles with an ATRP initiator is achieved by heating the freshly prepared particle suspension in the presence of BMPA in order to chemisorb the acid on the particle surface.

The successful functionalization can be demonstrated by ATR-IR (see figure 2). Spectra of dried functionalized Fe_3O_4 nanoparticles show several characteristic peaks in the fingerprint region ($\nu = 1465, 1402, 1375, 1107 \text{ cm}^{-1}$) also found in ATR-IR spectra of the free acid. In accordance with literature observations [33] we find a shift of 154 cm^{-1} of the vibrational absorption of the carbonyl double bond to lower wavenumbers and a decrease in intensity in comparison to the spectrum of the free acid ($\nu = 1702 \text{ cm}^{-1}$) while the deformational stretching absorption of the (CO)–O–H group ($\nu = 1292 \text{ cm}^{-1}$) vanishes, both indicating bidentate chemisorption via the carboxylate group [33].

Quantification of the particle surface functionality is possible by means of elemental analysis (EA) indicating a functionality f_{ini} of 0.33 mmol g^{-1} .

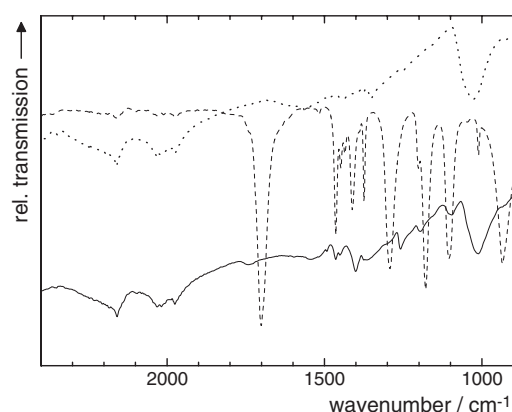


Figure 2. IR spectra of as-precipitated Fe_3O_4 particles (dotted line), BMPA (dashed) and surface-functionalized Fe_3O_4 particles (compact line).

Table 1. Composition of investigated Fe_3O_4 @PS core-shell nanoparticles.

Sample ^a	$\mu_{\text{M}}^{\text{b}}$ (mass%)	d_{c} (nm)	M_{n}^{d} (g mol^{-1})	$M_{\text{w}}/M_{\text{n}}^{\text{e}}$	$\mu_{\text{MF}}^{\text{f}}$ (mass%)	d_{h}^{g} (nm)	SLP^{h} (W g^{-1})
Fe_3O_4 @PS59	59	11.7	6 110	1.33	1.5	54 ± 7	47.4
Fe_3O_4 @PS52	52	11.6	6 400	1.42	0.67	59 ± 6	44.1
Fe_3O_4 @PS49	49	11.5	10 300	1.36	0.97	77 ± 5	36.5
Fe_3O_4 @PS37	37	13.3	10 800	1.72	0.46	82 ± 4	37.8
Fe_3O_4 @PS25	25	13.4	22 200	1.58	0.76	87 ± 6	45.4
Fe_3O_4 @PS23	23	11.5	27 800	1.18	0.41	103 ± 7	46.5

^a Sample denotations: Fe_3O_4 @PS μ_{M} .

^b Fe_3O_4 content of dry hybrid particles (TGA).

^c Core diameter (VSM) derived from initial susceptibility.

^d Number-average molecular weight of polymer arms (GPC).

^e Polydispersity index of polymer arms (GPC).

^f Fe_3O_4 content in toluene-based magnetic fluids (VSM).

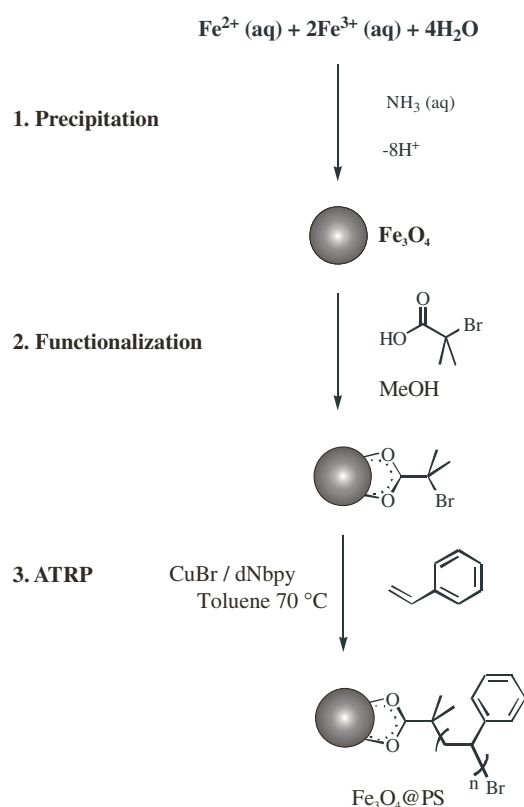
^g Hydrodynamic diameter of the core-shell particles in toluene (DLS).

^h Specific loss power in toluene at 300 kHz, 5.0 kW.

For the preparation of the stabilizing polymer arms via surface-initiated ATRP the freshly synthesized and surface-functionalized nanoparticles are used as macroinitiators (see scheme 2). Grafting from ATRP of styrene is used to form a polymeric shell around the magnetic particles. The system used consists of CuBr as a catalyst and 4, 4'-dinonyl-2,2'-bipyridine as a ligand. Polymerization is carried out for 5 d at 70 °C in toluene.

The composition of the hybrid core-shell particles was investigated by means of thermogravimetric analysis (TGA), giving the mass ratio of thermally decomposable polymeric fraction and Fe_3O_4 cores (see table 1). Thereafter, the hybrid particles contain up to 59 mass% of Fe_3O_4 .

Additionally, the polymeric fraction was investigated by gel permeation chromatography (GPC) after acidolysis of the magnetic core. Biphasic conditions were chosen to prevent the polymeric chains from degradation by acidolysis, and linear PS was treated by the same method to ensure no significant change of the molecular weight by the treatment. The number-average molecular weights M_{n} range from 6 100 to 27 800 g mol^{-1} and show an increase with higher polymer content of the hybrid particles, showing the potential to alter the chain length by



Scheme 2. Synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{PS}$ magnetic nanoparticles by surface-initiated ATRP of styrene.

varying the amount of added monomer. The polymer fractions showed polydispersity indices M_w/M_n of 1.2–1.7, in agreement with a fairly good control on the surface-initiated ATRP polymerization.

Figure 3 shows the dependence of M_n on the mass ratio of PS and Fe_3O_4 content. A linear relationship is obtained, demonstrating that the functional particles serve as the initiating species for the polymerization. From the slope of the graph, the efficient initiation functionality f_s of the particles is calculated as $(0.13 \pm 0.02) \text{ mmol g}^{-1}$. Compared to the result for f_{ini} as obtained by EA (see above), it can be concluded that not all of the surface-attached tertiary bromine groups are involved in the initiation process. At the same time, the axis intersection of the linear fit is close to zero, indicating the absence of significant amounts of initiating species in the crude monomer/solvent/catalyst mixture.

Taking into account the average surface area of approximately 470 nm^2 of an ideal spherical particle with a diameter of 12 nm, the result indicates a chain density of $0.8 \text{ chains nm}^{-2}$ or approximately 400 polymer chains per particle.

4. Magnetic fluids based on $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{polystyrene}$

The hybrid particles obtained, consisting of a Fe_3O_4 core and a grafted polymeric shell, are well dispersible in toluene and benzene and are stable for several weeks. It is assumed that the grafted arms serve as the stabilizing component that prevents the particles from agglomeration

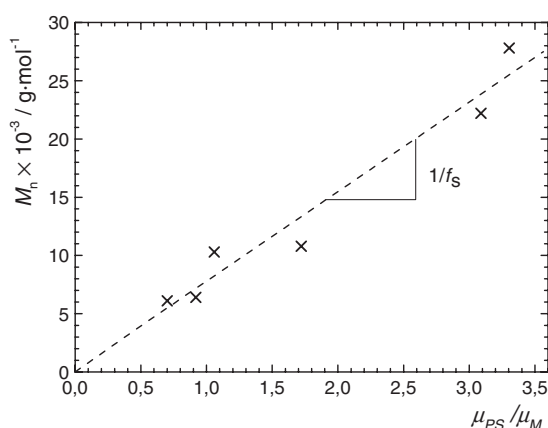


Figure 3. Molecular weight M_n of polymer arms versus mass ratio polystyrene/magnetite ($\mu_{PS} = 100\% - \mu_M$) of dry nanoparticles. The slope of the linear fit gives the chain density f_s per gram Fe_3O_4 with $f_s = (0.13 \pm 0.02) \text{ mmol g}^{-1}$.

due to van der Waals and magnetic dipole–dipole attractive forces. A thermoreversible dispersibility of the particles is detected in cyclohexane due to a critical solution behaviour of the polymeric shell (see below).

To support the architecture of the hybrid particles sketched in scheme 1, comparative experiments were carried out by polymerizing styrene in similar conditions, but in the presence of unfunctionalized Fe_3O_4 nanoparticles with and without the addition of 1,1-dimethylethyl (2-bromo-2-methylpropionate) as an alternative initiator. No peptization of the particles could be achieved in these experiments, showing the essential surface attachment of the polymer arms for effective stabilization.

The presented magnetic fluids are carefully characterized by quasi-static vibrating sample magnetometry (VSM), dynamic light scattering (DLS) and experiments on magnetic heatability.

The dispersions show superparamagnetic behaviour in VSM experiments with low coercitivity values ($<0.6 \text{ kA m}^{-1}$) (figure 4) [34]. The saturation magnetization and initial susceptibility obtained from the experiments give information on the Fe_3O_4 content and the volume-average magnetite core size, respectively (see table 1). Fe_3O_4 contents between 0.41 mass% and 1.5 mass% are detected for the magnetic fluids in toluene. The good agreement with the core diameter of about 12 nm with XRD results indicates that the particle cores respond individually to the magnetic field.

In order to obtain more information on the hydrodynamic behaviour of the particle dispersions and to investigate the role of the stabilizing shell, DLS experiments were carried out in dilute toluene dispersions. We observed an increase of the hydrodynamic particle diameter d_h of $\text{Fe}_3\text{O}_4@PS$ hybrid particles dispersed in toluene with the polymeric arm length given by M_n (figure 5). Compared to the theoretical relationship given by the simple model of ideally stretched polymer chains [26]

$$l_{\max} = d_c + 2 \left(\frac{M_n}{M_{\text{Mono}}} l_{\text{Mono}} \right) \quad (1)$$

with l_{\max} : particle diameter according to the contour model, d_c : core diameter, M_n : number-average molecular weight of the polymer arms, M_{Mono} : molecular weight of the monomer unit, l_{Mono} : length contribution of a monomer unit according to the contour model, represented by

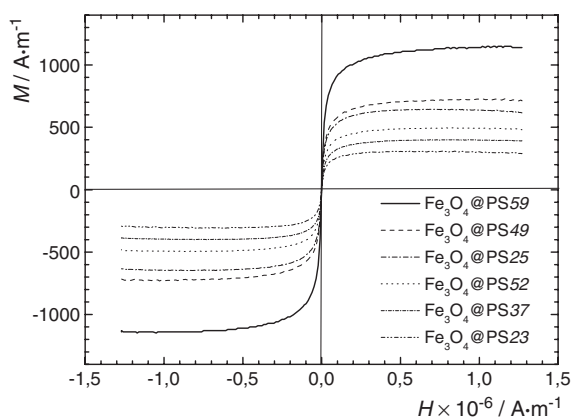


Figure 4. Magnetization curves of Fe_3O_4 @PS-based magnetic fluids in toluene.

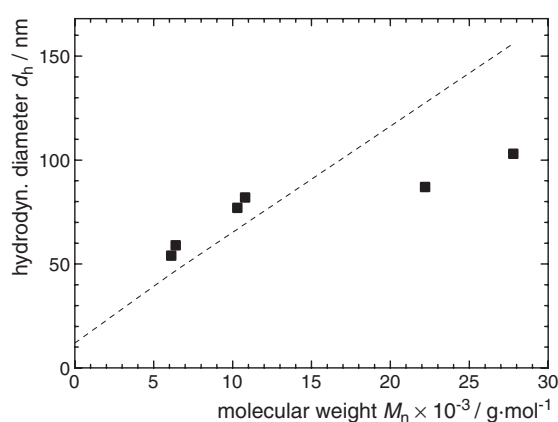


Figure 5. Hydrodynamic diameter d_h (DLS) versus molecular weight M_n of the polymer arms (GPC) for Fe_3O_4 @PS hybrid particles in toluene (■), compared to theoretical values for fully stretched polymer chains (dotted line).

the dotted line in figure 5, it is found that the discrepancy between experimental and theoretical values is smaller for Fe_3O_4 @PS particles with short polymer chains, indicating that the chains are indeed in a highly stretched state. In comparison, the higher discrepancy for Fe_3O_4 @PS hybrid particles leads to the assumption that a more coiled state is found for longer chains [11].

As pointed out above, the dispersibility of the hybrid brush particles is mainly ruled by the quality of the solvent used as the carrier fluid. If a solvent with lower solubility for the PS arms is chosen, a poor dispersibility is observed. Of particular interest are carrier fluids with a thermoreversible solubility with the polymeric shell, as is the case for cyclohexane with its theta temperature T_Θ for PS at 34.5 °C. Below T_Θ , the particles show a poor dispersibility due to the formation of polymer-mediated aggregates, whereas by rising the temperature above T_Θ , the polymer arms become more strongly solvated and act as effective steric stabilizers against the agglomeration of particles. A fully reversible upper critical solution behaviour (UCST) is observed. Consequently, the hybrid particles form stable magnetic dispersions in cyclohexane above a critical solution temperature T_c . As seen in figure 6, we observe the typical response of a magnetic fluid under the influence of a permanent magnet above T_c .

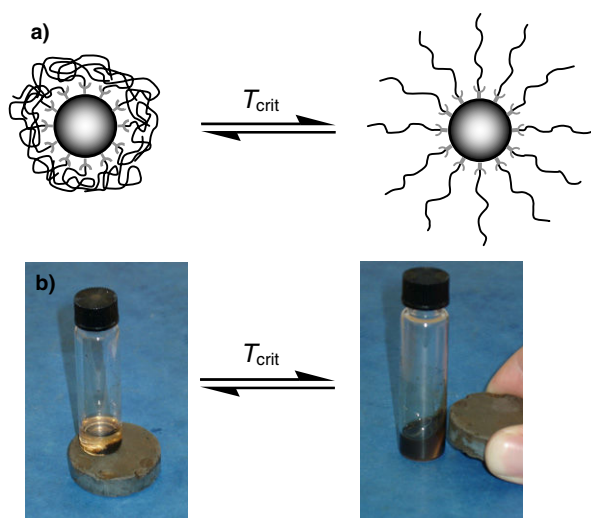


Figure 6. (a) Schematic behaviour of polymer brush particles in thermoreversible magnetic fluids. (b) Photographs of $\text{Fe}_3\text{O}_4@PS37$ in cyclohexane. The particles precipitate below T_c (at 20°C , left-hand side). A particle dispersion is formed above T_c (at 50°C , right-hand side) that reacts collectively under the influence of a permanent magnet.

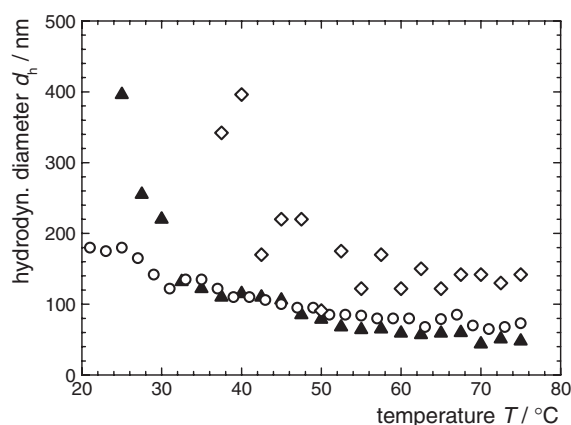


Figure 7. Hydrodynamic diameters versus temperature for $\text{Fe}_3\text{O}_4@PS$ core-shell nanoparticles in cyclohexane: $\text{Fe}_3\text{O}_4@PS59$ (triangles), $\text{Fe}_3\text{O}_4@PS37$ (circles) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@PS25$ (squares).

The corresponding critical temperature can be investigated in turbidity experiments, and transitions can be observed ranging from 35 up to 60°C . Although it may be concluded that T_c increases with increasing arm length and particle concentration, the exact dependence is under investigation.

For cyclohexane-based dilute particle dispersions of 0.1 mg ml^{-1} , the transition between an agglomerated state and dispersion of single particles upon temperature rise is shown in DLS experiments.

The results of the peak diameter against temperature are presented in figure 7 for three $\text{Fe}_3\text{O}_4@PS$ samples in cyclohexane. Below 30 – 40°C , particle diameters of some hundred nanometres are obtained that can be attributed to the formation of agglomerates. At higher

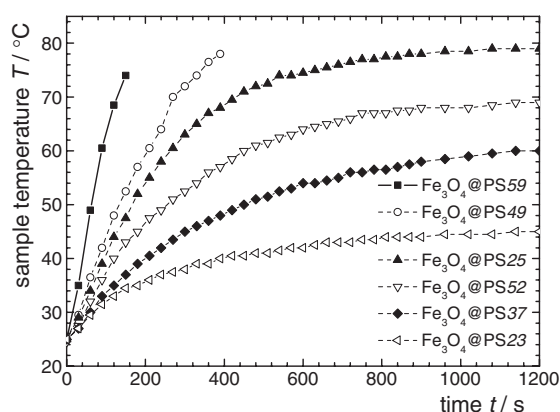


Figure 8. Magnetic heating measurements of magnetic fluids based on Fe_3O_4 @PS hybrid particles in toluene.

temperatures, the diameter decreases until particle sizes are observed which are in agreement with values found in toluene at ambient temperature, or slightly higher in the case of Fe_3O_4 @PS25.

Magnetic fluids hold the potential to convert magnetic energy into heat due to relaxational and hysteresis effects [2, 3]. We are interested in this property, as it offers the opportunity to activate thermal property changes within an accordingly designed materials system. In this context, the specific loss power of Fe_3O_4 @PS dispersions in toluene and cyclohexane are investigated. A vacuum isolated glass sample container is placed in the middle of an induction coil. A high frequency magnetic field of 300 kHz is applied to the sample and the sample temperature versus time is measured (see figure 8). At the beginning of the measurement, a linear relationship between temperature and time is observed. The slope decreases with time due to heat exchange with the environment. Higher mass contents of the fluids lead to faster heating. Taking into account the heat capacity and the magnetite content of the system, the specific loss power (SLP) is calculated from the initial slope. SLP values between 36.5 and 47.4 W g^{-1} are found, with no direct correlation to the shell thickness or the magnetite content of the fluids. This may be attributed to the expected Neelian relaxation mechanism [35], independent from the magnetic core's outer mobility, and thus the hydrodynamic volume of the hybrid particles.

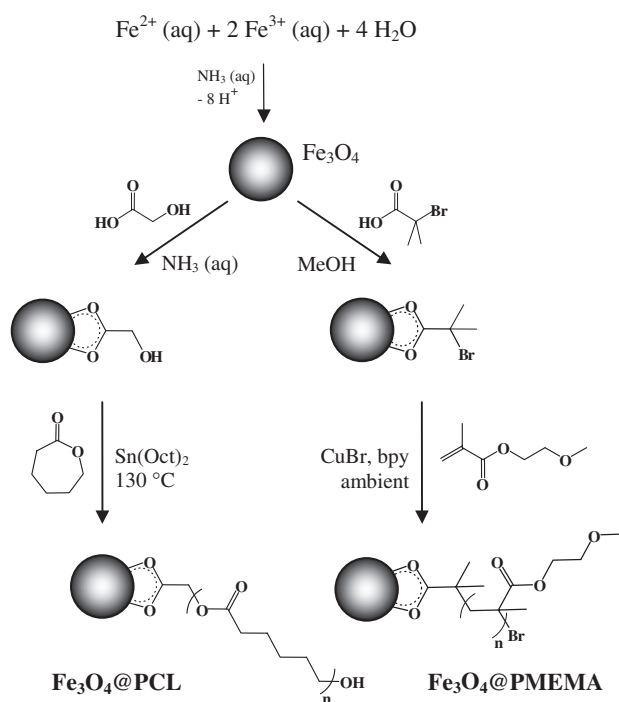
Accordingly magnetic heating curves are obtained for particle dispersions in cyclohexane, with no influence of the thermal transition on the curve being observed. It may be assumed that the magnetic heatability of the particles is not affected by the state of the polymeric shell.

Future experiments on the incorporation of catalytically active groups to the polymeric shell will show if magnetic dispersions based on Fe_3O_4 @PS hybrid particles can be of use in switchable catalytic systems.

5. Recent achievements in thermosensitive magnetic fluids

5.1. Shell polymers and polymerization mechanisms

Our former works [22–24] show that by applying the synthetic pathway to other polymeric systems, magnetic nanoparticles with a tailored polymeric shell concerning composition and thickness are accessible. We realized hybrid magnetic particles with shells composed of poly(2-methoxyethyl methacrylate) (PMEMA), being dispersible in polar solvents like DMF



Scheme 3. Synthetic pathways for the preparation of $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCL$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@PMEMA$ magnetic polymer brushes. Reproduced with permission from reference [24]. Copyright 2006 Oldenbourg.

and DMSO, and of poly(ϵ -caprolactone) (PCL), dispersible in less polar organic solvents like toluene and chloroform (see scheme 3).

PCL-coated magnetite nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4@PCL$) were prepared by surface-initiated ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone monomer [22]. PCL was chosen as the shell material due to its solution properties and the well-known polymerization behaviour allowing direct control of the polymeric arm length. An additional feature is the good biocompatibility of PCL, being attractive for biomedical applications.

For the preparation of magnetite particles coated with PMEMA ($\text{Fe}_3\text{O}_4@PMEMA$), a synthetic route via ATRP was applied [23]. PMEMA shows solubility in polar solvents like DMF and DMSO, and MEMA is copolymerizable by ATRP with various (meth)acrylates and (meth)acrylamides.

Careful characterization of the particles at different stages of the process by XRD, ATR-IR, TGA, VSM and TEM has been described in detail recently [22, 23], together with the results of the investigation of the polymeric fraction by analytical methods in solution ($^1\text{H-NMR}$ and GPC) after acidolysis of the magnetic core. Table 2 summarizes the composition of various core-shell particles with a Fe_3O_4 mass fraction μ_M between 10% and 40%. The findings indicate a direct linear correlation between the polymer arm length as given by the molecular weight and the polymer-to-magnetite ratio that can be assigned to the surface-initiated growth of the chains for both types of hybrid particle. The slope of the linear plot μ_{PCL}/μ_M against M_n leads to a chain density f_s of 0.83 mmol g^{-1} for particles of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@PCL$ -type, while for $\text{Fe}_3\text{O}_4@PMEMA$ particles, a chain density of 0.26 mmol g^{-1} is calculated.

TEM images of DMF-cast $\text{Fe}_3\text{O}_4@PMEMA$ particles (see figure 9) confirm the architecture of the obtained core-shell particles. Strongly contrasting, nearly spherical

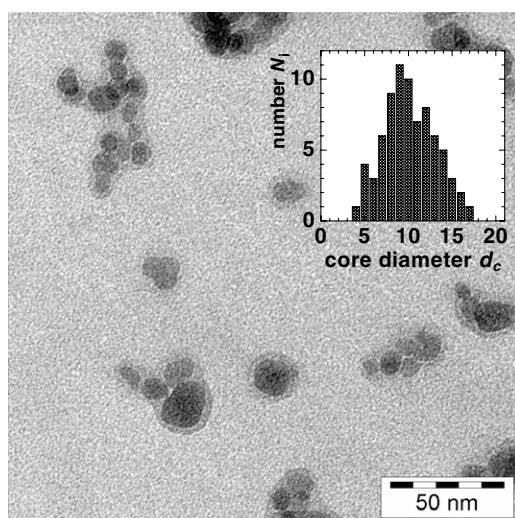


Figure 9. TEM image of Fe_3O_4 @PMEMA18 hybrid particles. Inset: core size distribution (TEM, $n = 76$). Reproduced with permission from reference [23]. Copyright 2006 American Chemical Society.

Table 2. Composition of investigated Fe_3O_4 @PCL and Fe_3O_4 @PMEMA core–shell nanoparticles.

Sample ^a	μ_M^b (mass%)	d_c^c (nm)	M_n^d (g mol ⁻¹)	M_w/M_n^e	μ_{MF}^f (mass%)
Fe_3O_4 @PCL40	40	12.4	1 500	3.85	3.5
Fe_3O_4 @PCL25	25	12.1	3 500	2.25	1.3
Fe_3O_4 @PCL20	20	12.2	4 900	2.06	0.67
Fe_3O_4 @PCL13	13	11.9	7 100	2.07	0.57
Fe_3O_4 @PCL10	10	12.5	12 300	1.89	0.39
Fe_3O_4 @PMEMA43	43	11.8	11 000	1.85	3.0
Fe_3O_4 @PMEMA30	30	12.9	16 800	3.09	1.0
Fe_3O_4 @PMEMA18	18	n. d.	30 900	2.16	n. d.
Fe_3O_4 @PMEMA16	16	12.2	35 100	2.15	0.48

^a Sample denotations: Fe_3O_4 @polymer μ_M .

^b Fe_3O_4 content of dry hybrid particles (TGA).

^c Core diameter (VSM) derived from initial susceptibility.

^d Number-average molecular weight of polymer arms (GPC).

^e Polydispersity index of polymer arms (GPC).

^f Fe_3O_4 content in toluene-based magnetic fluids (VSM).

magnetite cores with a number-average diameter of 10.8 nm can be clearly distinguished from a closed polymeric shell. Within the observed small particle aggregates that are possibly formed during sampling, the single magnetite cores are mostly visibly separated by a PMEMA shell. We estimate a polymer layer thickness of 3–5 nm, independent of the individual core size.

The dispersion properties of the magnetic fluids obtained were studied by DLS [24], and we found an increase of the hydrodynamic particle diameter with the polymeric arm length for both types of magnetic brush particle in dispersion (see figure 10). While the main peak of the number-average diameter distribution can be assigned to particularly dispersed particles, a considerable amount of agglomerates is detected as a shoulder or high diameter fraction for particles with high polymer content and long chains. This is predominantly the case in

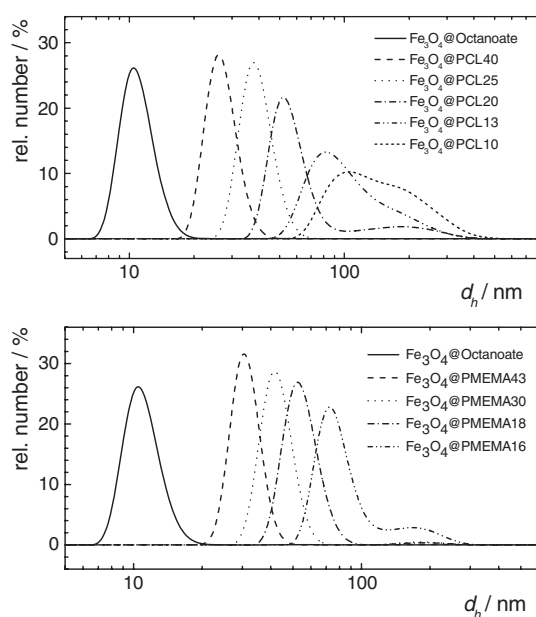


Figure 10. Hydrodynamic particle diameter d_h distribution of Fe_3O_4 @PCL particles dispersed in toluene (a) and Fe_3O_4 @PMEMA particles in DMF (b). Reproduced with permission from [24]. Copyright 2006 Oldenbourg.

dispersions of Fe_3O_4 @PMEMA16, Fe_3O_4 @PCL13 and Fe_3O_4 @PCL10. It can be assumed that the agglomeration occurred due to entanglement of the polymeric arms and/or partial crosslinking reactions between individual particles during polymerization at high monomer conversions.

5.2. Magnetic heating

In magnetic heating experiments, a similar behaviour was observed as described for Fe_3O_4 @PS dispersions in toluene (see section 3). From the initial slope, dT/dt is determined and plotted against the magnetite content of the fluids (see figure 11).

A linear relationship between the loss power $c_p \cdot dT/dt$ and μ_M is observed. The slope of the graphs is the specific loss power (SLP). For Fe_3O_4 @PMEMA-based fluids, the SLP of the magnetite cores is calculated to be 51.9 W g^{-1} and for the Fe_3O_4 @PCL-based fluids 27.5 W g^{-1} is found. These values are independent of the shell thickness, indicating a Néelian relaxation mechanism [35]. The difference between the SLP of PMEMA- and PCL-based materials may be attributed to different core batches used in the synthesis of the two systems.

5.3. Magneto- and thermoresponsive effects

Thermoreversible magnetic fluids are obtained by dispersing Fe_3O_4 @PMEMA particles in methanol, and similarly of Fe_3O_4 @PCL in dimethylsulfoxide (DMSO). A similar behaviour is observed as for Fe_3O_4 @PS particles in cyclohexane due to the existence of a UCST.

For the PMEMA-capped particles an inverse dependence of T_c on the molecular weight can be detected. T_c varies between 21 and 39 °C. Figure 12 shows the corresponding turbidity experiments.

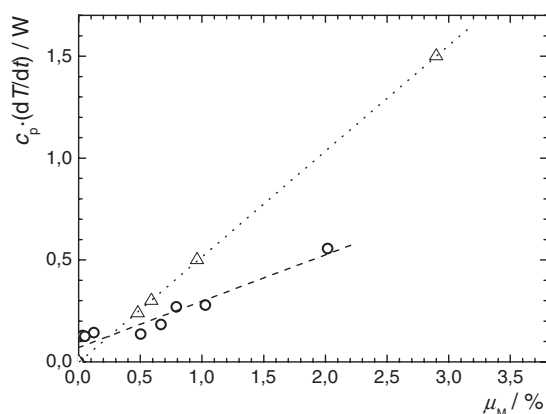


Figure 11. Magnetic heating of magnetic fluids: dotted line (triangle) Fe_3O_4 @PMEMA nanoparticles in DMF; dashed line (circles): Fe_3O_4 @PCL in toluene.

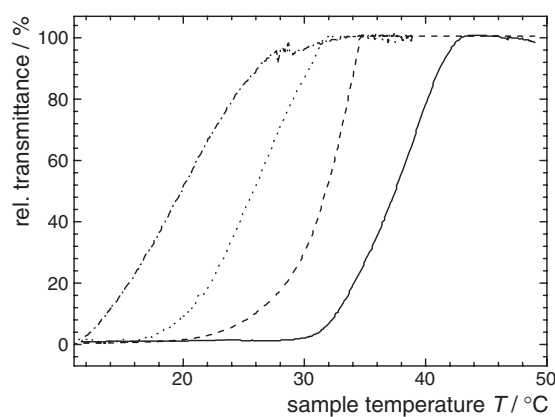


Figure 12. Relative transmittance versus sample temperature T of Fe_3O_4 @PMEMA suspensions in methanol in turbidity experiments; compact line: Fe_3O_4 @PMEMA43, dashed: Fe_3O_4 @PMEMA30, dotted: Fe_3O_4 @PMEMA18, dash-dotted: Fe_3O_4 @PMEMA16. Reproduced with permission from [23]. Copyright 2006 American Chemical Society.

A proof of concept, that it is possible to induce the release of a probe from suspensions of loaded particles by magnetic heating, is given for Fe_3O_4 @PCL particle dispersions in DMSO. This is shown in figure 13 for Fe_3O_4 @PCL10 (1 mass% in DMSO) loaded with the solvatochromic dye 1-methyl-4-[2-(4-oxocyclohexa-dienylidene)ethylidene]-1,4-dihydropyridine (p-MOED) (1.7 mass% load). A clear change of colour due to the release of the dye upon passing the UCST is observed between 36 and 42 °C. It is obvious that this concept may be of interest for drug release applications.

6. Summary

This report describes the synthesis of nanoscopic Fe_3O_4 -cored polymeric brushes and the properties of novel thermoreversible magnetic fluids based thereon.

The synthesis has successfully been performed by surface functionalization of Fe_3O_4 nanoparticles and subsequent surface-initiated ATRP of styrene. We verified the synthetic

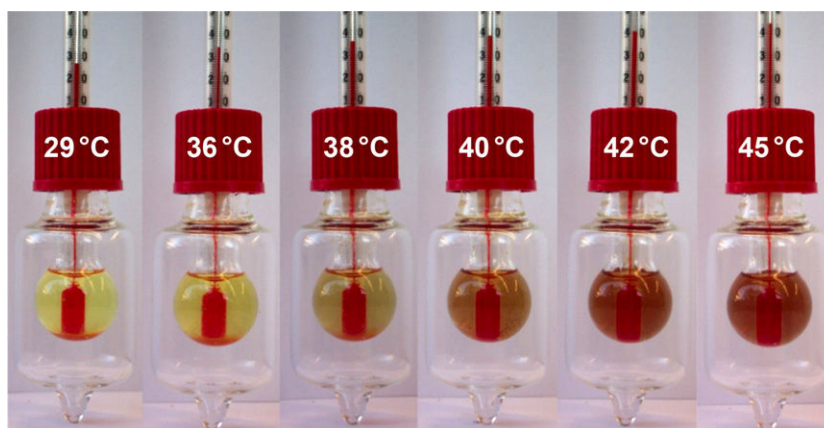


Figure 13. Release of p-MOED from loaded Fe_3O_4 @PCL hybrid particles in DMSO by magnetic heating (see text).

pathway and the proposed architecture of the particles by careful characterization of the hybrid materials. A high grafting density and an adjustable shell thickness given by M_n of the tethered chains are found.

The hybrid particles can be peptized in good solvents for the polymeric shell, like toluene or benzene, up to 1.5 mass%. In these magnetic fluids, the polymeric brush shell serves as stabilizing layer, and no additional stabilizing agent is needed. The hydrodynamic diameter d_h of the 12 nm Fe_3O_4 cores can thus be tailored by the polymer arm length M_n . The resulting ferrofluids show superparamagnetic behaviour in quasi-static magnetization experiments and magnetic heatability in an oscillating magnetic field.

A thermoreversible dispersibility is observed in cyclohexane with a UCST-like behaviour around 34 °C. The thermoreversibility can be attributed to the theta temperature of PS in cyclohexane at 34 °C.

The presented synthetic pathway was recently applied to other monomers suitable for surface-initiated polymerization, and offers a method to prepare ferrofluids with tailored properties by the introduction of a well-defined, surface-attached polymeric stabilization layer. We realized hybrid particles that are well dispersible in DMSO and DMF, or toluene and chloroform, respectively. Thermoreversible dispersibility with UCST behaviour is found for Fe_3O_4 @PMEMA particles in methanol, and for PCL-coated particles in DMSO. The effect has been shown to be useful for the release of a solvatochromic probe from loaded particles by exposition to an alternating magnetic field.

The presented combination of thermoresponsive polymers with the properties of magnetic fluids, together with tailorable hydrodynamic diameter and critical temperature, may contribute to the development of easily recoverable polymer-supported magnetic separation kits and catalytic systems. Additionally, they are of interest as model fluids for the examination of relaxation behaviour and magnetic particle interactions.

Acknowledgments

This work is supported by the DFG (SPP1104, Schm 1747/2). We thank Professor Dr H Ritter for his steady interest and continuous support of this work, and Professor Dr W Frank, HHU Düsseldorf, for x-ray diffractograms and TGA experiments, Professor Dr W Gawalek, IPHT

Jena, for VSM and C Schlemmer, IMTEK Freiburg, for TEM images. AS thanks the Fonds der Chemischen Industrie for a Liebig grant.

References

- [1] Craik D 1995 *Magnetism—Principles and Applications* (Chichester: Wiley)
- [2] Berkovsky B M and Bashtovoy V 1996 *Magnetic Fluids and Applications Handbook* (New York: Begell House)
- [3] Blums E, Cebers A and Mairov M M 1997 *Magnetic Fluids* (Berlin: Walter de Gruyter)
- [4] Andrä W 1998 *Magnetism in Medicine* ed W Andrä and H Nowak (Berlin: Wiley-VCH)
- [5] Pankhurst Q A, Connolly J, Jones S K and Dobson J 2003 *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36** R167–81
- [6] Tartaj P, Morales M P, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreno T and Serna C J 2003 *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36** R182–97
- [7] Berry C C and Curtis A S G 2003 *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36** R198–211
- [8] Babes L, Denizot B, Tanguy G, Le Jeune J J and Jallet P 1999 *J. Colloid Interface Sci.* **212** 474
- [9] Dayley J P, Philipps J P, Li C and Riffle J S 1999 *J. Magn. Magn. Mater.* **194** 140
- [10] Alexiou C, Arnold W, Hulin P, Klein R, Schmidt A, Bergemann C and Parak F G 2001 *Magnetohydrodynamics* **37** 3
- [11] Roath S 1993 *J. Magn. Magn. Mater.* **122** 329
- [12] Lu A H, Schmidt W, Matoussevitch N, Bönnemann H, Spliethoff B, Tesche B, Bill E, Kiefer W and Schüth F 2004 *Angew. Chem.* **116** 4403–6
- [13] Lu A H, Schmidt W, Matoussevitch N, Bönnemann H, Spliethoff B, Tesche B, Bill E, Kiefer W and Schüth F 2004 *Angew. Chem. Int. Edn* **43** 4303–6
- [14] Teunissen W, de Groot F M F, Geus J, Stephan O, Tence M and Colliex C 2001 *J. Catal.* **204** 169–74
- [15] Brown W F Jr 1959 *J. Appl. Phys. Suppl.* **30** 130S
- [16] Carrot G, Rutot-Houze D, Pottier A, Degée P, Hilborn J and Dubois P 2002 *Macromolecules* **35** 8400–4
- [17] El Harrak A, Carrot G, Oberdisse J, Eychenne-Baron C and Boué F 2004 *Macromolecules* **37** 6376
- [18] Pyun J, Shijun J, Kowalewski T, Patterson G D and Matyjaszewski K 2003 *Macromolecules* **36** 5094
- [19] Fendler J H 1996 *Chem. Mater.* **8** 1616
- [20] Rühle J 2004 *Polymer Brushes* ed R C Advincula, W J Brittain, K C Caster and J Rühle (Weinheim: Wiley-VCH) p 18
- [21] Zhao B and Brittain W J 2000 *Prog. Polym. Sci.* **25** 677
- [22] Pyun J, Kowalewski T and Matyjaszewski K 2003 *Macromol. Rapid Commun.* **24** 1043–59
- [23] Prucker O and Rühle J 1998 *Macromolecules* **31** 592
- [24] Jordan R, West N, Ulman A, Chou J M and Nuyken O 2001 *Macromolecules* **34** 1606–11
- [25] Yee C, Scotti M, Ulman A, White H, Rafailovich M and Sokolov J 1999 *Langmuir* **15** 4314
- [26] Weck M, Jackiw J J, Rossi R R, Weiss P S and Grubbs R H 1999 *J. Am. Chem. Soc.* **121** 4088
- [27] Choi I S and Langer R 2001 *Macromolecules* **34** 5361
- [28] Husemann M, Mecerreyes D, Hawker C J, Hedrick L J, Shah R and Abbott N L 1999 *Angew. Chem. Int. Edn* **38** 647
- [29] Yoon K R, Koh Y-J and Choi I S 2003 *Macromol. Rapid Commun.* **24** 207–10
- [30] Joubert M, Delaite C, Bourgeat-Lami E and Dumas P 2004 *J. Polym. Sci. A* **42** 1976–84
- [31] Yoon K R, Lee Y-W, Lee J K and Choi I S 2004 *Macromol. Rapid Commun.* **25** 1510–3
- [32] Dubois P, Krishnan M and Narayan R 1999 *Polymer* **40** 3091
- [33] Flesh C, Delaite C, Dumas P, Bourgeat-Lami E and Duguet E 2004 *J. Polym. Sci. A* **42** 6011
- [34] Vestal C R and Zhang Z J 2002 *J. Am. Chem. Soc.* **124** 14312–3
- [35] Matsuno R, Yamamoto K, Otsuka H and Takahara A 2003 *Chem. Mater.* **15** 3–5
- [36] Schmidt A M 2005 *Macromol. Rapid Commun.* **26** 93–7
- [37] Gelbrich T, Feyen M and Schmidt A M 2006 *Macromolecules* **39** 3469–72
- [38] Gelbrich T, Feyen M and Schmidt A M 2006 *Z. Phys. Chem.* **220** 41–9
- [39] Tanaka T 1978 *Phys. Rev. Lett.* **40** 820
- [40] Aoyagi T, Miyata F and Nagase Y 1994 *J. Control. Release* **32** 87
- [41] Elias H G 2001 *Makromoleküle Band 2: Physikalische Strukturen und Eigenschaften* (Weinheim: Wiley-VCH)
- [42] Massart R and Cabuil V 1987 *J. Chem. Phys.* **84** 967–73
- [43] Saeki S, Kuwahara N, Konno S and Kaneko M 1973 *Macromolecules* **6** 246
- [44] von Werne T and Patten T E 2001 *J. Am. Chem. Soc.* **123** 7497–505
- [45] Ohno K, Koh K, Tsujii Y and Fukuda T 2003 *Angew. Chem.* **115** 2857–60
- [46] Ohno K, Koh K, Tsujii Y and Fukuda T 2003 *Angew. Chem. Int. Edn* **42** 2751–4

- Duan H, Kuang M, Wang D, Kurth D G and Möhwald H 2005 *Angew. Chem.* **117** 1745–8
- Duan H, Kuang M, Wang D, Kurth D G and Möhwald H 2005 *Angew. Chem. Int. Edn* **44** 1717–20
- Chen X, Randall D P, Perruchot C, Watts J F, Patten T E, von Werne T and Armes S P 2003 *J. Colloid Interface Sci.* **257** 56–64
- [30] Matyjaszewski K and Davis T P 2002 *Handbook of Radical Polymerization* (New York: Wiley–Interscience)
- [31] Fleet M E 1981 *Acta Crystallogr. B* **37** 917–20
- [32] Scherrer P 1918 *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-Phys. Kl.* **2** 98
- [33] Rocchiccioli-Deltcheff C, Franck R, Cabuil V and Massart R 1987 *J. Chem. Res.* 1209–30
- [34] Rosensweig R E 1985 *Ferrohydrodynamics* (New York: Cambridge University Press)
- [35] Néel M L 1949 *Ann. Geophys.* **5** 99

Active Ester Functional Single Core Magnetic Nanostructures as a Versatile Immobilization Matrix for Effective Bioseparation and Catalysis

Thorsten Gelbrich¹, Michael Reinartz², Annette M. Schmidt^{1,}*

¹Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, ²Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf, Germany

schmidt.annette@uni-duesseldorf.de

RECEIVED DATE (to be automatically inserted after your manuscript is accepted if required according to the journal that you are submitting your paper to)

Phone +49-211-8114820 Fax +49-211-15840.

Multifunctional nanocarriers for amino functional targets with a high density of accessible binding sites are obtained in a single polymerization step by grafting-from copolymerization of an active ester monomer from superparamagnetic cores. As a result of the brush-like structure of the highly dispersed shell, the nano-objects exhibit an available capture capacity for amines that is found to be up to two orders of magnitude higher than for commercial magnetic beads, and the functional brush shell can serve as a template for many types of pendant functional groups and molecules. As comonomer, oligo(ethylene glycol) methacrylate allows for excellent water solubility at room temperature, biocompatibility, and thermoflocculation.

We demonstrate the biorelated applicability of the hybrid nanoparticles by two different approaches.

In the first approach, the immobilization of trypsin to the core-shell nanoparticles results in highly active, nanoparticulate biocatalysts that can easily be separated magnetically. Second, we demonstrate that the obtained nanoparticles are suitable for the effective labeling of cell membranes, opening a novel pathway for the easy and effective isolation of membrane proteins.

Keywords: active ester monomers, biolabelling, thermoflocculation, core-shell nanoparticles; biocatalysis

Introduction

Using colloidal supports for bioactive species has enabled important advances in biotechnology, medical diagnostics, drug screening and other areas of actual interest. In *in vitro* as well as in *in vivo* environments, the substrate can introduce or facilitate the feasibility to detect, quantify, localize or separate biologically active species.

In this respect, superparamagnetic carriers actually attract high attention as they enable the visualization, manipulation and activation of labelled species by the use of properly designed magnetic fields. Examples for the wide applicability of magnetic colloids in the bioscience include contrast agents for MRI, magnetic separation kits, and therapeutic approaches like magnetic fluid hyperthermia and active drug delivery.¹⁻⁶

When designing an immobilization matrix, a range of factors such as density and accessibility of binding sites, their microenvironment and mobility strongly influence the intensity of interaction and the effectiveness of the binding event.⁷ In this respect, the question of size relevance is non-trivial. In general, small carriers in the nanometer range are superior in terms of accessible surface, their mode of interaction with cells and proteins, and higher mobility with respect to diffusion and cell uptake. In contrast, concerning the ease of detection and separation, micrometer-sized solid supports have clear advantages over smaller structures, and show higher effectivity for their isolation by centrifugation or filtering methods. In the case of magnetic structures, micron-sized beads can possess a higher magnetic moment, thus enhancing magnetophoretic mobility, magnetic contrast and heatability in HF fields.

Reversible thermoflocculation of magnetic colloids by encapsulation with thermoresponsive polymers as a strategy to overcome this gap has been proposed already in the 90s.⁸ While latexes or microgels containing magnetic nanoparticles are relatively easy dispersed at the application temperature, they possess agglomeration at a temperature range above or below, caused by a thermosensitive solvation behavior of the polymer component. As the latter, poly(N-isoacrylamide) PNiPAAm is frequently employed,⁸⁻¹⁰ although the LCST-type flocculation temperature of 32 °C does not allow good particle dispersion at body temperature, and furthermore the polymer tends to unspecific protein adsorption. As an alternative, just recently beads based on acryloyl glycinamide copolymers with UCST behavior that flocculate below 10 °C have been developed and commercialized.^{11,12}

In order to provide an increased versatility in terms of protein interaction, thermal behavior, and particle mobility, hydrophilic coatings with controlled polymer architecture and easily tuneable parameters are needed. The formation of a polymer brush on the surface of single nanoparticles has proved to be a valuable tool for the design of single-cored hybrid structures with tailored dispersion behavior.^{9,13-19} The advances of a brush shell architecture are a high density of end-tethered chains, a shell thickness that is adjustable by the polymer arm length, and a greatly increased accessibility of the chains by solvent molecules and reactants as compared to latex beads or crosslinked microgels. Magnetic Polymer brushes with thermoflocculation behavior have been reported for organic solvents by our group.¹⁷⁻¹⁹ Lately, hydrophilic brush shells have been described,^{20,21} for instance prepared by a “grafting to” approach of tailored copolymers from oligo(ethyleneglycol) methacrylates with adjustable and narrow flocculation temperature and low unspecific adsorption.^{22,23}

Here, we report the design and application of single-cored hybrid magnetic core-shell particles that carry a high number of reactive groups in a single polymerization step. The polymer brush shells are prepared by a grafting from (surface-initiated) atom transfer radical polymerization. By copolymerization of a monomer with active ester functionality, we are able to introduce a high density of accessible functional groups that facilitate the nucleophilic attack of amine-terminated moieties. This way, not only is the extra functionalization step avoided, but the polymer becomes a template for many

types of pendant functional groups and molecules. While the controlled polymerization of active ester monomers in solution has frequently been reported, there are few reports of those polymers grafted from solid surfaces.^{24,25} We demonstrate that this strategy results in a high specific number of binding sites, being up to two orders of magnitude higher than for magnetic bead structures.

Their versatile application is demonstrated on two examples. By reacting the active ester-functional moieties with trypsin, we result in magnetically supported biocatalysts for protein scission that provide quasi-homogeneous reaction conditions at body temperature, and easy separation at elevated temperatures. Second, the successful capture of membrane proteins by active-ester bearing particles has been demonstrated for endothelial cells in vitro, being of use for future applications of membrane protein characterization.

Results and discussion

Functional magnetic core-shell nanoparticle synthesis

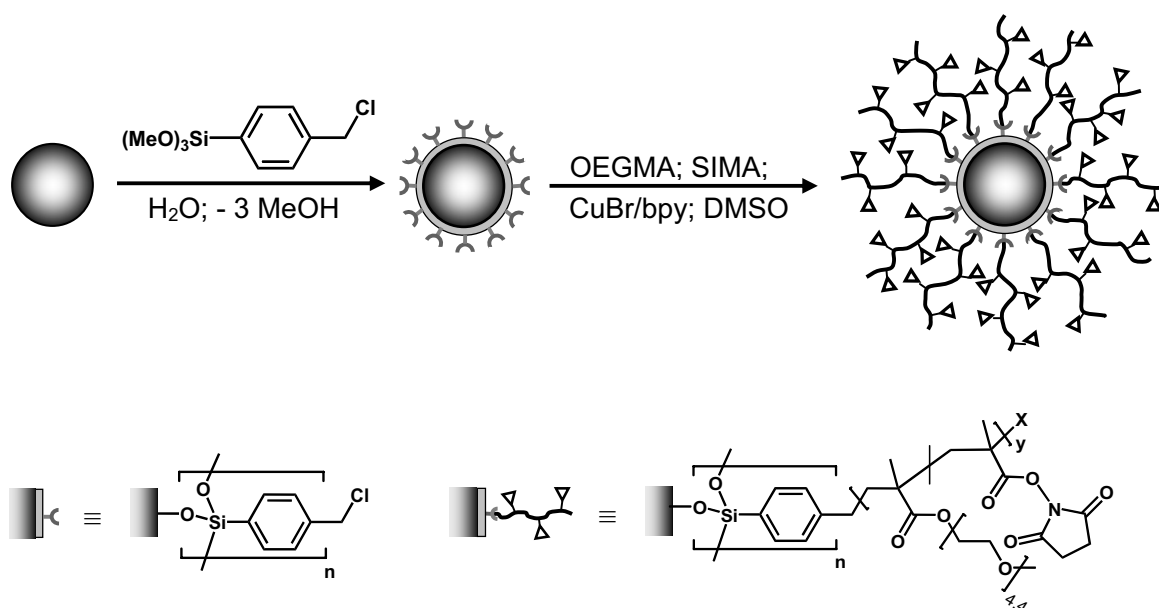
Based on our recent results on the surface-engineering of superparamagnetic nanoparticles with polymer brush shells,^{18,19,26,27} we developed a synthetic pathway to active ester-functional magnetic core shell nanoparticles. Starting from citrate-stabilized, highly magnetic iron oxide particles (FeO_x) in water, we modify the particle surface with an ATRP initiator. These macroinitiators are then used in the following surface initiated ATRP to result in magnetic hybrid particles.

More precisely, the synthesis of FeO_x nanoparticles is carried out by alkaline coprecipitation of iron(II) and iron(III) chloride leading to magnetic colloids with an average diameter of about 11 nm. By surface attachment of citric acid, a stabilization of the nanoparticles in water is obtained due to electrostatic repulsion.²⁸ Figure 1 a shows a TEM image of the obtained small, spherical FeO_x -nanoparticles.

In order to functionalize the nanoparticle surface with benzylic chlorine atoms for the initiation of ATRP, (p-chloromethyl)phenyltrimethoxysilane (CPTMS) is attached via ligand exchange to the particle surface, and a crosslinked silica shell monolayer is formed caging the magnetic core due to

condensation of the silanol groups.²⁸ The initiator density is calculated from elemental analysis (EA) at $0.64 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ indicating good conditions for an effective initiation and high grafting density.

OEGMA with an average number of ethylene glycol repeating units of 4.4 and methoxy end group ($M_n = 290 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) is used as main monomer to generate a hydrophilic polymer shell that shows a critical solution behavior in water leading to magnetic polymer brushes with thermoresponsive dispersion behavior at around $65 \text{ }^\circ\text{C}$. The biocompatibility of poly(ethylene glycol) derivatives is helpful to obtain nanoparticles accepted for use in *in vitro* biological systems.



Scheme 1: Synthesis of $\text{FeO}_x@\text{P}(\text{OEGMA-co-SIMA})$ magnetic polymer brush particles by surface initiated ATRP.

The direct introduction of carboxy functions to the polymer shell by surface-initiated ATRP involving (meth)acrylic acid is hindered by catalyst poisoning, resulting in a loss of reaction control.²⁹ To overcome this, the protection of the carboxy group is useful,²⁹ and in our approach, we employed succinimidyl methacrylate (SIMA) as a methacrylic acid derivative suitable for ATRP.³⁰⁻³² In model copolymerization experiments in solution, we proved the copolymerization behavior of the two monomers by analyzing the comonomer ratio and PDI at different stages of the polymerization. Comonomer conversion during polymerization was normally between 80 % and 100 %. The results of

the copolymerization experiment are particularly important due to the fact that the respective hybrid particles are not accessible to solution NMR. The results are summarized in the supporting informations. We found a constant comonomer ratio throughout the course of the reaction in all runs and a narrow molar mass distribution at SIMA contents < 40 mol-%. The copolymer composition is adjustable by the molar ratio of the monomers (s. supporting information). Furthermore, the succinimidyl ester function remains stable under the conditions of polymerization, as proven by NMR and IR, and can be used as an active ester in the amide formation for the nucleophilic attack of primary amines,³⁰⁻³² while OEGMA as the main comonomer determines the solution properties. For model copolymers up to 30 mol-% SIMA fraction, we have found high water solubility and a lower critical solution behavior, in which the critical solution temperature T_c decreases with increasing SIMA content.

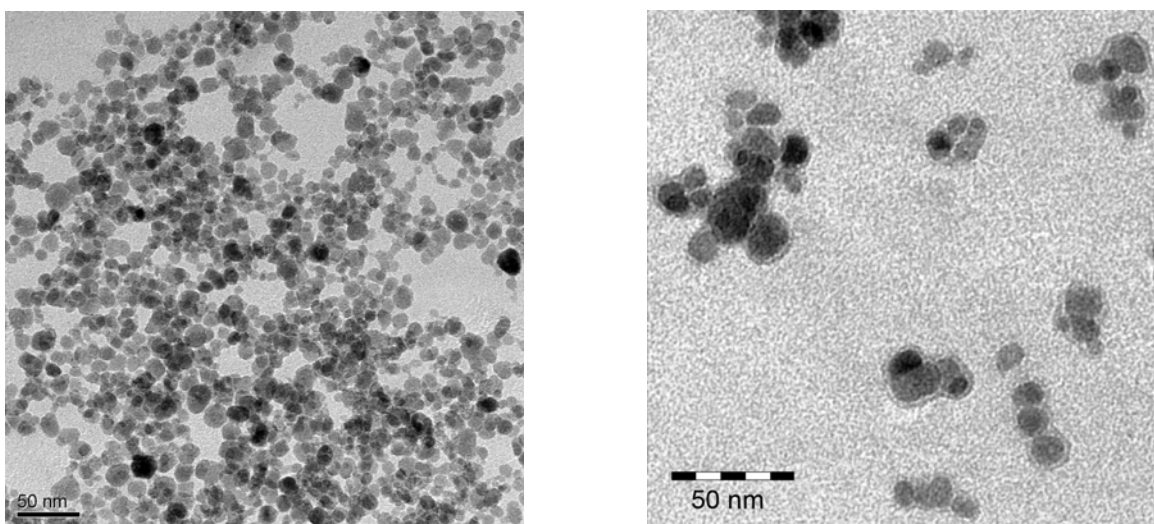


Figure 1. TEM images of a) FeO_x nanoparticles electrostatic stabilized by citric acid; b) FeO_x nanoparticles after surface-initiated ATRP.

Magnetic polymer brush particles containing active-ester units have been prepared by surface-initiated copolymerization of SIMA and OEGMA from CPTMS-modified FeO_x -nanoparticles via ATRP in dimethylsulfoxid (DMSO).

After 24 h, black viscous DMSO-based magnetic fluids are obtained. The success of the surface-initiated ATRP is qualitatively analyzed by transmission electron microscopy (TEM) and ATR-IR

spectroscopy. A TEM image (s. figure 1b) of the obtained nanoparticles visualizes strongly contrasting FeO_x cores surrounded by less contrasting polymer shells. The small nanoparticles are separately covered with a polymer layer of an average thickness of 3 nm independent of the core size.

ATR-IR spectra (s. figure 2) of the dry $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})$ nanoparticles feature signals relating to the vibrational absorption of polymeric methyl and methylene groups ($\nu = 2800 \text{ cm}^{-1} - 3050 \text{ cm}^{-1}$), carbonyl double bond ($\nu = 1722 \text{ cm}^{-1}$), C-O deformation ($\nu = 1099 \text{ cm}^{-1}$) and N-O deformation ($\nu = 1025 \text{ cm}^{-1}$) clearly reveals the presence of $P(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})$. The three distinct peaks at $\nu = 1807 \text{ cm}^{-1}$, 1778 cm^{-1} and 1722 cm^{-1} are characteristic of the vibrational absorption of the three carbonyl double bonds of the SIMA function, indicating that the succinimidyl ester is still existent and neither hydrolyzed nor deactivated.³⁰ From the carbon content obtained by elemental analysis (EA), a mass content of copolymer between 40 mass-% and 52 mass-% is calculated (s. table 1).

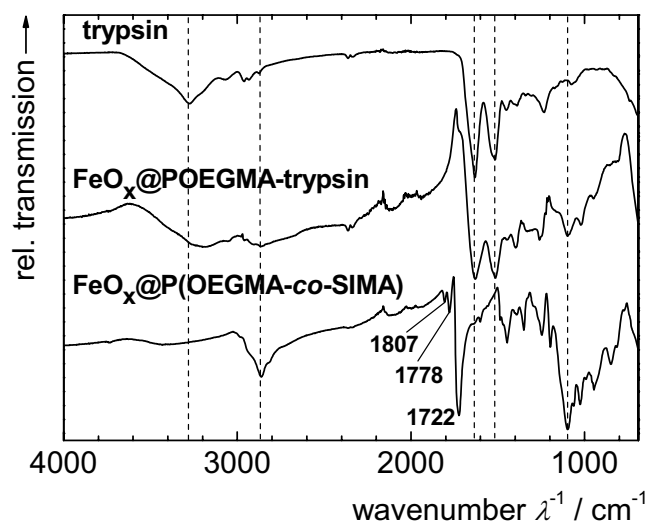


Figure 2. ATR-IR spectra of $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})_{25}$; trypsin, and trypsin-functional core-shell particles $\text{FeO}_x@P\text{OEGMA-trypsin}$ (dry powders).

The hydrodynamic diameter of the core-shell nanoobjects in aqueous dispersion can be detected by dynamic light scattering (DLS). Compared to electrostatic stabilized particles, and to CPTMS functionalized particles with a volume-average hydrodynamic diameter d_h of 19 nm and 26 nm

respectively, the size clearly increases for P(OEGMA-*co*-SIMA) coated nanoparticles to values between 47 nm and 79 nm, resulting from the formation of a polymer brush shell. It strikes that two of the runs, that is FeO_x@P(OEGMA-*co*-SIMA)25 and FeO_x@P(OEGMA-*co*-SIMA)15, show higher values for d_h in comparison to the other investigated samples, although the polymer fraction is not differing too much from the other batches. We assume the reason for that is the employment of different initiator particle batches in these runs, possibly resulting in difference in chain density on the surface.

Table 1. Composition of the investigated FeO_x@P(OEGMA-*co*-SIMA) core-shell nanoparticles^a

sample ^a	μ_P %	M_s A·m ⁻¹	μ_{MF} %	d_c nm	d_h nm	T_c °C
FeO _x @P(OEGMA- <i>co</i> -SIMA)25	40.4	2090	2.14	12.1	79	59.4
FeO _x @P(OEGMA- <i>co</i> -SIMA)20	49.9	1520	1.54	10.3	47	57.8
FeO _x @P(OEGMA- <i>co</i> -SIMA)15	41.3	2280	2.33	12.0	73	60.8
FeO _x @P(OEGMA- <i>co</i> -SIMA)10	52.1	1490	1.51	10.4	49	57.9
FeO _x @P(OEGMA- <i>co</i> -SIMA)5	43.9	1890	1.91	10.4	48	-

^a sample annotations: FeO_x@P(OEGMA-*co*-SIMA)xy, with xy= theoretical molar SIMA content in the copolymeric shell; μ_P = mass content of copolymer in the particles (EA); M_s = saturation magnetization of saturated DMSO particle dispersions (VSM); μ_{MF} = mass content of FeO_x in saturated DMSO dispersion (VSM); d_c = volume average core diameter (VSM); d_h = hydrodynamic diameter (DLS); T_c = critical solution temperature (cloud point photometry, CPP) of partly hydrolyzed particles.

The quasi-static magnetic properties of FeO_x@P(OEGMA-*co*-SIMA) dispersions are investigated by vibrating sample magnetometry (VSM) experiments. Figure 3 shows a characteristic magnetization loop. The sigmoidal shape with low coercivity values (< 0.6 kA·m⁻¹) is attributed to superparamagnetic behavior of the core-shell nanoparticles. The saturation magnetization obtained from the experiments indicates a FeO_x content between 1.5 and 2.3 mass-% according to the Langevin equation, and by using

the initial susceptibility χ_{ini} from the graphs slope at $H = 0$, the volume-average core diameter can be calculated to values between 10.3 nm and 12.1 nm (s. table 1).³³

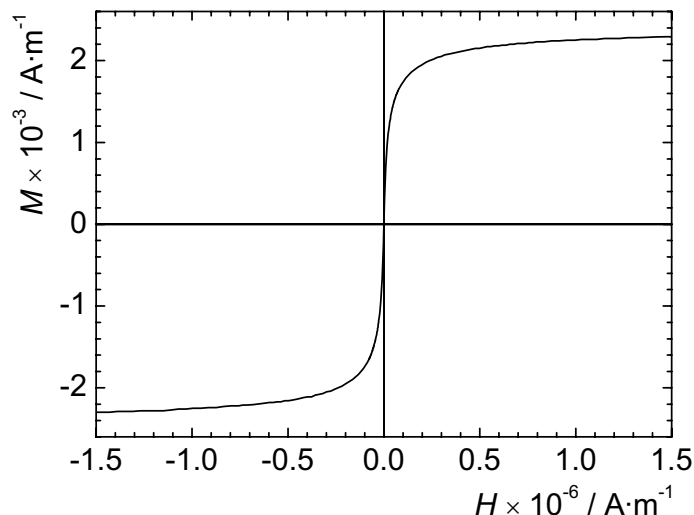


Figure 3. VSM loop of saturated magnetic fluid based on $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA-co-SIMA)15}$ nanoparticles in DMSO ($\mu_{\text{MF}} = 2.33$ mass-%).

Zeta potential measurements on aqueous particle dispersions indicate low surface charges below ± 5 mV in a pH range between 3 and 8, and a poor pH dependence. The results therefore confirm the predominantly unchanged polymer shell in this pH range,. However, when the pH is raised further, the zeta potential drops to -30 mV, indicating a hydrolysis of part of the active ester groups to carboxylate units in accordance to literature reports on the hydrolytic stability of n-succinimidyl esters.^{24,25} (see Supporting Information).

In this context, the results of cloud point experiments performed on more concentrated particle dispersions as shown in Fig. 4 have to be interpreted carefully. A sudden decrease in the relative transmittance τ is detected between 56 °C and 64 °C, caused by the increasing turbidity of the dispersion due to agglomeration and precipitation of the nanoparticles. This process is fully reversible and can be attributed to the lower critical solution temperature (LCST) of the OEGMA units of the polymer shell in water.²² In contrast to what is found for model copolymers (see Supporting Infoemation), the optically

determined critical solution temperature T_c of the phase separation shows only a weak dependence on the initial SIMA content of the copolymer shell (see table 1). As earlier results indicate a similar thermoresponsive solution behavior of POEGMA derivatives immobilized on flat or nanoparticulate surfaces as compared to linear soluted chains,^{22,34,35} we attribute this to the occurrence of hydrolysis of a considerable part of the hydrophobic active ester groups during sample preparation.

In the agglomerated state above the LCST, simple permanent magnets with magnetic field gradients below 50 mT/cm are sufficient to separate the magnetic polymer brush particles from the carrier medium. We show below that this behavior is of use for the easy magnetic separation of amino-functional probes and magnetically labeled biomolecules. In this respect it is of interest to note, that the agglomeration temperature can be adjusted by copolymerization in a wide range including temperatures acceptable for biomolecules and biological species. We focus on this issue in our upcoming paper.

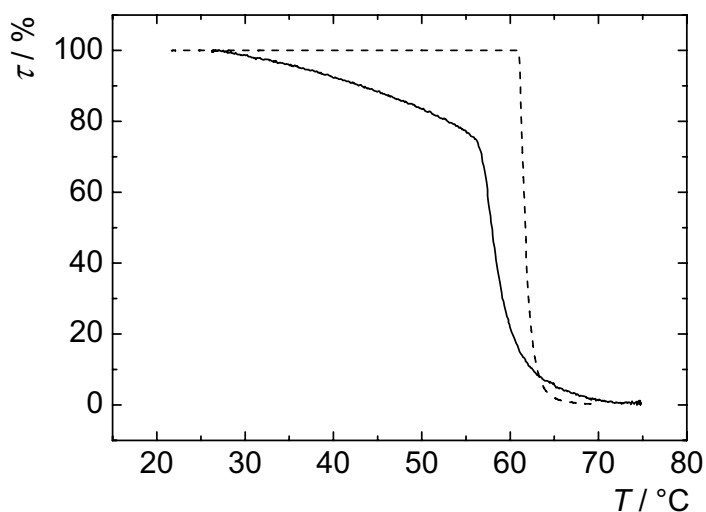
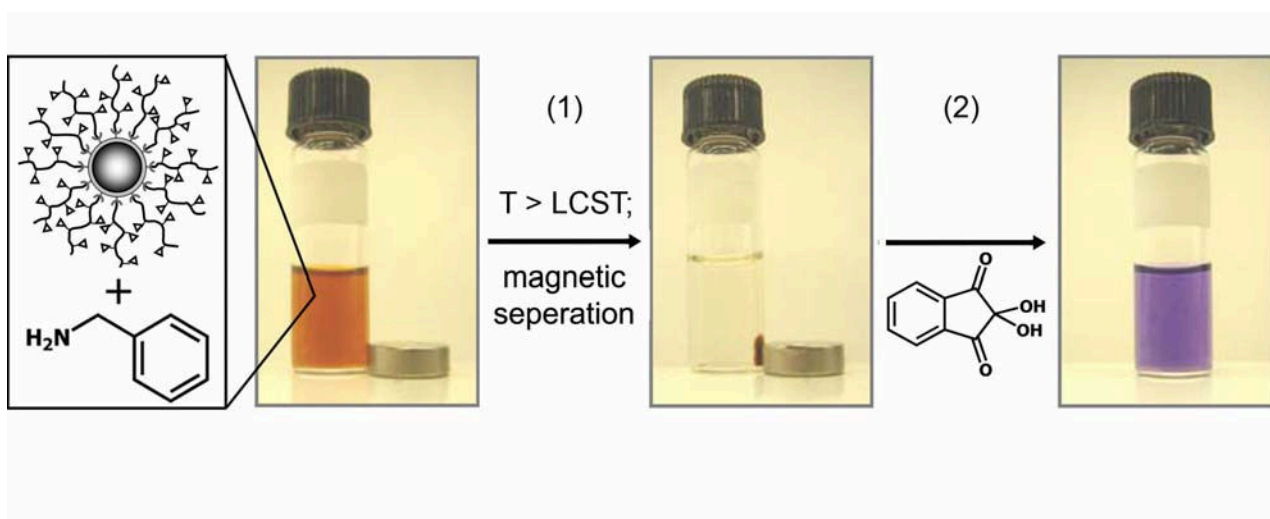


Figure 4. Relative transmittance τ vs temperature T of (partly hydrolyzed) $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})_{20}$ (compact line) and $\text{FeO}_x@POEGMA$ (dashed line) suspensions in water in CPP experiments.

Determination of Particle Functionality by Amination

To investigate the (protected) COOH functionality and the binding capacity of $\text{FeO}_x@\text{P}(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})$ nanoparticles for primary amines, the capture of benzylamine (BzA) as a model substance from aqueous solution is examined. For this purpose, BzA solutions of different concentration are mixed with HEPES-buffered $\text{FeO}_x@\text{P}(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})$ particle dispersions and stirred at room temperature. In addition, a solution of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) is added to reactivate hydrolyzed SIMA functions. On completion of the binding reaction over night, the BzA functionalized nanoparticles are magnetically separated from the carrier medium. The residual BzA in the carrier medium is quantified by ninhydrin reaction to Ruhemanns purple, and subsequent detection by UV spectroscopy (s. Scheme 2).^{36,37}



Scheme 2: Scheme of the quantification of amine separation by $\text{FeO}_x@\text{P}(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})$ particles; (1) separation of magnetic brush particles at $T > \text{LCST}$ after amination, and (2) staining of residual amine in the supernatant with ninhydrin to Ruhemanns purple and quantification by UV spectroscopy.

Figure 5 (a) compares UV spectra of two supernatants and magnetic amine separation by $\text{FeO}_x@\text{P}(\text{OEGMA-}co\text{-SIMA})_{20}$ nanoparticles, and by $\text{FeO}_x@\text{POEGMA}$ nanoparticles without active ester or carboxy groups in the polymeric shell, after ninhydrin reaction. As a reference, the UV spectrum of the basic 2.5 mM BzA solution after ninhydrin reaction without magnetic separation treatment is also shown. All spectra indicate the presence of the adduct by the presence of two absorption maxima at 400 nm and 568 nm for all samples. As evident, the spectra of the reference BzA

solution and the BzA solution after magnetic separation with $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA)}$ nanoparticles are almost matching, indicating a comparable adduct concentration in both samples, and consequently the absence of unspecific binding of BzA to the nanoobjects that do not show active ester groups.

In contrast, when active ester bearing $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA-co-SIMA)20}$ nanoparticles are employed in the separation, the UV absorption after magnetic amine separation and ninhydrin reaction is significantly reduced in comparison to the reference solution.

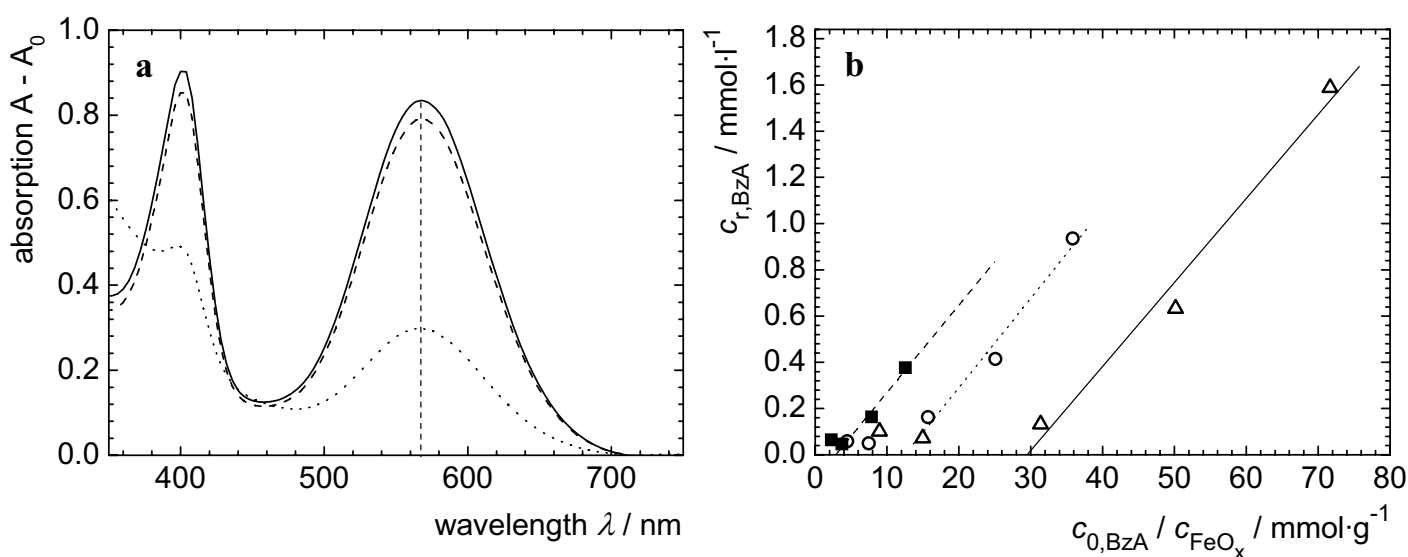


Figure 5. (a) UV spectra of residual BzA solution after ninhydrin reaction and magnetic amine separation by $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA-co-SIMA)20}$ (dotted line) and $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA)}$ (dashed line) nanoparticles in comparison to the primarily 2.5 mM BzA solution (compact line). (b) Concentration of residual BzA in solution $c_{r,BzA}$ after magnetic amine separation vs. quotient of initial BzA concentration $c_{0,BzA}$ and FeO_x concentration c_{FeO_x} ; compact line: $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA-co-SIMA)20}$; dotted line: $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA-co-SIMA)10}$; dashed line: $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA-co-SIMA)5}$.

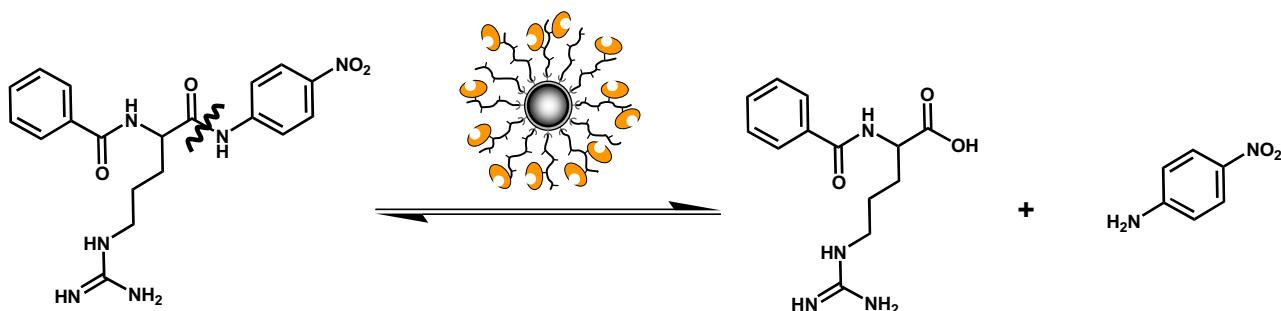
After suitable calibration, the absorption at the peak maximum (568 nm) is used to extract the amount of residual BzA, $c_{r,BzA}$. By plotting $c_{r,BzA}$ versus the initial BzA concentration $c_{0,BzA}$, normalized by the magnetite concentration used for separation, c_{FeO_x} (s. fig. 5 (b)), we observe linear graphs with an onset on the x coordinate that can be used to calculate the particles functionality.

For small initial BzA concentrations $c_{0,BzA}$, virtually no residual agent $c_{r,BzA}$ is detected, indicating that below a certain concentration nearly the full portion of BzA is captured by the particles. For BzA concentrations higher than this value, a sharp transition to a linear increase of $c_{r,BzA}$ with $c_{0,BzA}/c_{FeOx}$, giving c_{FeOx} as the slope, is detected. The intersections of the linear fits with the x-axis give the maximum amount of BzA that can be captured by the given content of hybrid particles. From the observed behavior, we may reasonably consider this value to be connected to the active ester functionality of the core-shell particles. For the investigated samples $FeO_x@P(OEGMA-co-SIMA)20$, $FeO_x@P(OEGMA-co-SIMA)10$ and $FeO_x@P(OEGMA-co-SIMA)5$, values for f of $29.5 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, $12.5 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ and $2.87 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ are obtained, reflecting the differing SIMA content in the polymeric shell resulting from the polymerization conditions. In contrast, commercially available, carboxy- or active ester bearing magnetic beads for magnetic separation typically show functionalities below $1 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$.³⁸ Owing to their brush-like architecture, our hybrid core shell nanoparticles possess a superior binding capacity of up to two scales higher, combined with quasi-homogeneous binding conditions in the highly solvated polymer shell, and easy magnetic separation above the LCST temperature.

Magnetic biocatalysts by enzyme immobilization

The immobilization of biomacromolecules on magnetic carriers is of interest for separable biocatalytic systems. For a proof of principle study, we successfully immobilized trypsin as a model enzyme on the shell of $FeO_x@P(OEGMA-co-SIMA)15$ nanoparticles. Figure 2 compares the ATR-IR spectra of trypsin-functional nanoparticles $FeO_x@POEGMA$ -trypsin to free trypsin. In both samples, we observe similar amide signals ($\nu = 1620, 1578 \text{ cm}^{-1}$), and also the NH-signal ($\nu = 3284 \text{ cm}^{-1}$) of the trypsin peptide sequence is visible in both spectra. From the nitrogen content obtained by EA, the amount of trypsin bound to the polymer surface of the nanoparticles is calculated to $1.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ or $26 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. This loading is higher than that of commercially available magnetic particles for the protein binding with reported capacities between $1.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and $20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.³⁹ On the other hand it is comparably lower than calculated from the active ester functionality of the hybrid particles reported above. We

ascribe this to the different molecules size between BzA, employed for active ester group evaluation, and the protein, compared to the particle size and the proposed free volume between polymer chains. With a molar mass of $23300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ the molecule size of trypsin is in the same order as M_n of the surface immobilized polymer chains. Additionally, trypsin exhibits several amino groups within the protein sequence so that several active ester bearing polymer arms bind one trypsin molecule.



Scheme 3: Reaction scheme of the enzymatic scission of BAPNA catalyzed by magnetically labeled trypsin (🌒). The reaction product nitroaniline can be quantified spectroscopically.

The catalytic activity of trypsin, a protease for hydrolysis of specific peptide bonds (chain scission after the amino acids arginine and lysine), is investigated for the particle-immobilized trypsin compared to free trypsin. For this purpose, we use the release of p-nitroaniline by the trypsin-mediated scission of N_α -benzoyl-D,L-arginine-4-nitroanilide (BAPNA) for the detection of the catalytic properties (scheme 3).⁴⁰

In our kinetic experiments concerning the trypsin-catalysed scission reaction of BAPNA, the concentration of p-nitroaniline is followed throughout the reaction by UV spectroscopy at the absorption maximum of nitroaniline at 410 nm. An analogous set of experiments was carried out with native trypsin solution, as well as with $\text{FeO}_x@\text{POEGMA}$ -trypsin (particle-immobilized trypsin) in aqueous dispersion (for details, see experimental section). As a control experiment the primarily $\text{FeO}_x@\text{P}(\text{OEGMA-co-SIMA})_{15}$ nanoparticle dispersion without trypsin bound to the polymer shell is also used. Respective results for selected experiments are shown in figure 6a.

All runs employing either trypsin or immobilized trypsin, a linear increase of absorption with time can be detected in UV experiments, while the control does not react with BAPNA. To exclude possible trypsin leaching from the carriers, we continued the data collection for a couple of minutes after magnetic separation of FeO_x@POEGMA-trypsin nanoparticles from the BAPNA solution. No further increase in adsorption was detected.

The experiments have been performed with varying BAPNA c_{BAPNA} concentrations in order to obtain quantitative information on the kinetic parameters.⁴¹ In figure 6 (b) a double-reciprocal plot of the rate dc_{BAPNA}/dt is plotted against c_{BAPNA} according to Lineweaver and Burk.⁴² The obtained linear relationship indicates that the trypsin catalyzed scission of BAPNA follows a Michaelis-Menten mechanism for both, free and immobilized trypsin. It is therefore possible to extract the kinetic parameters from the Michaelis-Menten equation:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{eq. 1})$$

with v : conversion rate; v_{\max} : maximum conversion rate (at infinite substrate concentration); K_M : Michaelis-Menten equilibrium constant; $[S]$ substrate concentration (here: c_{BAPNA}).

The determination of K_M and v_{\max} for the two systems is done by the method of Eadie and Hofstee from a single-reciprocal plot of dc_{BAPNA}/dt against the quotient of dc_{BAPNA}/dt divided by c_{BAPNA} .⁴³⁻⁴⁵ For free trypsin, K_M is calculated at 1.39×10^{-3} M and v_{\max} at 2.11×10^{-4} M·s⁻¹, and for FeO_x@POEGMA-trypsin nanoparticles $K_M = 2.10 \times 10^{-2}$ M and $v_{\max} = 3.45 \times 10^{-4}$ M·s⁻¹ for the respective trypsin concentration used in the experiment. In order to compare the enzymatic activity of free and immobilized trypsin, the maximum specific activity act_{spez} , given by the ratio of v_{\max} and the trypsin concentration used in the experiment. We obtain a specific activity act_{spez} of 92.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ for free trypsin, and 89.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ for immobilized trypsin, indicating no significant loss of enzyme activity upon immobilization. A likely explanation for the observed difference in the obtained Michaelis-Menten constant K_M is the

hindered accessibility of the trypsin molecules bound to the polymer brush shell to its substrate molecules.

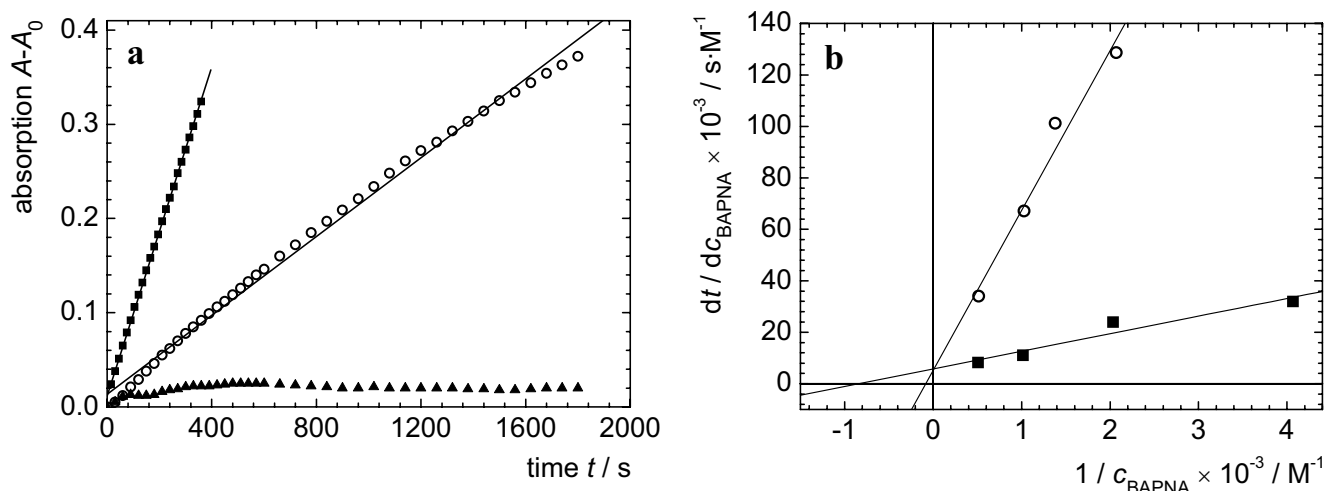


Figure 6. (a) UV absorption ($A-A_0$) at 410 nm over time t during reaction between BAPNA (2.0 mM) and FeO_x@POEGMA-trypsin nanoparticles (circle) compared to free trypsin (square) and FeO_x@P(OEGMA-co-SIMA)15 (triangle) nanoparticles. (b) Double-reciprocal plot of the rate of trypsin catalyzed BAPNA scission dc_{BAPNA}/dt , and the BAPNA concentration c_{BAPNA} according to Lineweaver and Burk; circle: FeO_x@POEGMA-trypsin ($c_{Trypsin} = 1.66 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); square: free trypsin ($c_{Trypsin} = 9.82 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$).

The active ester-functional FeO_x@P(OEGMA-co-SIMA) nanoparticles form covalent amide bonds with primary amines, and can thus be used to selectively label aminofunctional components of the exposed surface of a cell, e. g. membrane proteins, in order to simplify their isolation and identification. In order to verify this concept, we performed labeling experiments of endothelial cell surface membranes. Cultured endothelial cells from human umbilical cord are incubated with FeO_x@P(OEGMA-co-SIMA)25 nanoparticles, and, as a control, with particles without binding sites for amino groups (FeO_x@POEGMA). In figure 7 the successful binding is visualized by transmission electron microscopy (TEM). The surface of endothelial cells that has been exposed to a

$\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})_{25}$ dispersion shows an effective and dense labelling with nanoparticles after several washing steps. In contrast, non-functional $\text{FeO}_x@P\text{OEGMA}$ particles do not attach to the cell surface (s. supporting information).

Recently we have shown that the labeled species can be magnetically separated, and readily isolated after cell lysis. Digestion and identification of the species is subject to ongoing examination and beyond the scope of this paper.

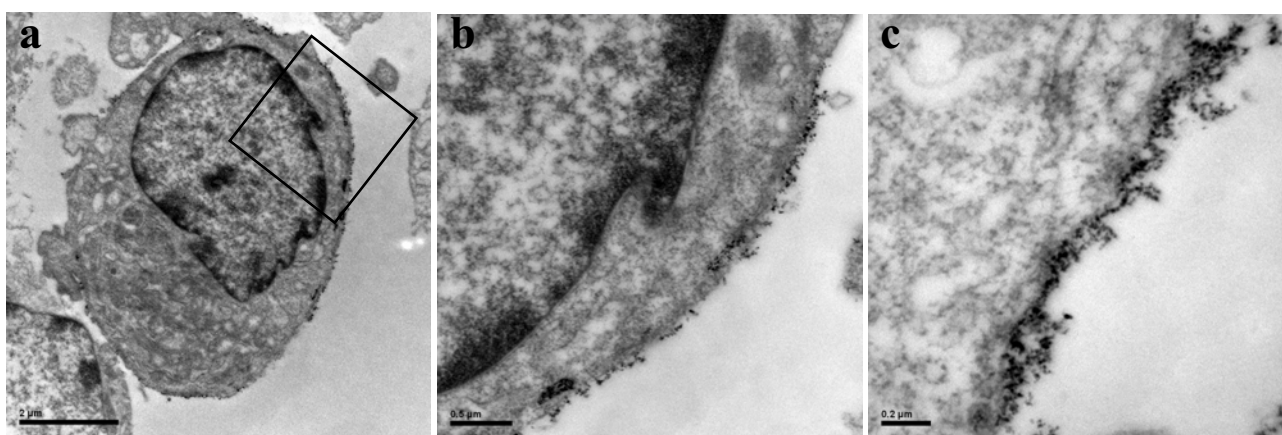


Figure 7. (a) TEM image of a human endothelial cell after incubation with $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})_{25}$ nanoparticles; (b) detail marked in (a) showing nanoparticles attached to the cell surface; (c) magnification of an endothelial cell surface efficiently coated with nanoparticles

Conclusion

The results demonstrate that by single-step surface-initiated copolymerization of active ester monomer SIMA with OEGMA, brush-coated magnetic particles are obtained that possess a high number of accessible carboxy-analogue functional groups that can be further modified with bioactive species with the purpose of their manipulation or isolation. Here, we have shown that functional group densities of up to 30 mmol per gram of magnetite could be achieved that are accessible by small molecule substrates.

The particles are easily dispersed in aqueous media up to 23 mg/ml magnetite. The thermoreversible solvation of the shell is responsible for thermoflocculation, that results in a fast and highly effective magnetic isolation of the hybrid structures above the transition temperature.

As a result of the high functional group density, the particles show superior behavior in in vitro biocatalysis and labeling experiments. By immobilization of trypsin to the polymeric shell of the obtained nanoparticles, magnetically supported biocatalysts are obtained. Kinetic experiments on the catalytic activity via the trypsin mediated scission reaction of BAPNA reveal no loss in specific enzyme activity when compared to soluble trypsin. In addition, we have demonstrated the nanostructures' potential for selective tagging and separation of the exposed surface of endothelia cells in order to facilitate the isolation and identification of membrane proteins. While unspecific adsorption of non-functional particles was not observed, in vitro experiments involving active ester group bearing core-shell particles resulted in a dense population of particles at the exposed cell membrane, attributed to the formation of covalent (amide) bonds.

The principle described here is applicable to the modification with other biologically or catalytically relevant groups, and will therefore open new ways for the design of multifunctional hybrid nanostructures with different property portfolios.

Experimental Section

Analytical Methods and Instrumentation

DLS experiments and zeta potential measurements are performed on a Malvern Zetasizer Nano ZS at 25 °C. ATR-IR spectra are measured on a Nicolet 6700 spectrometer. Vibrating sample magnetometry (VSM) measurements are implemented on an ADE Magnetics vibrating sample magnetometer EV7. For UV/VIS spectroscopy a Nicolet UV 540 spectroscope is used. The phase behavior of aqueous particle dispersions is investigated on a Tepper TP1 cloud point photometer at 1 K·min⁻¹ in HEPES buffer. Elemental analyses are performed on a Perkin-Elmer 2400 CHN analyzer. The polymer content is calculated through C content. TEM pictures are taken on a Hitachi H 600.

Materials

Benzylamine (BzA) (Janssen Chimica), N_α-benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) (Sigma, 98%), 2,2'-bipyridine (Aldrich, 99%), citric acid monohydrate (Grüssing GmbH,

99,5%), copper(I) bromide (Aldrich, 98%), (4-(chloromethyl)phenyl)trimethoxysilane (CPTMS) (ABCR, 95%), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (ABCR, 98 %), iron(III) chloride hexahydrate, iron(II) chloride tetrahydrate (Fluka, 98%), N-hydroxysuccinimide (NHS) (Aldrich, 98 %), ninhydrin (Riedel-de-Haen), oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (OEGMA) (Aldrich; $M_n = 290 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), trypsin type IX-S (Aldrich) are used as received. Ethanol is obtained in technical grade and used after distillation. Dimethylsulfoxide (DMSO) is dried by heating over calcium hydride (Riedel-de-Haen) for two hours, followed by distillation under reduced pressure. Succinimidyl methacrylate (SIMA) is synthesized by a method by Gatz et al.⁴⁶ HEPES buffer: 11 mM HEPES (Sigma), 140 mM NaCl (Merck), 4 mM KCl (Merck), 10 mM D(+)-glucose dissolved in deionized water.

Synthesis of CPTMS-Functionalized FeO_x Nanoparticles

Magnetic FeO_x nanoparticles are obtained by alkaline coprecipitation of iron(II) and iron(III) chloride based on a method of Cabuil and Massart.⁴⁷ The particles are washed several times with de-ionized water and then stirred for 5 min with 420 ml 2 M nitric acid. After three washing steps with nitric acid, the particle precipitate is resuspended in 90 ml 0.01 M citric acid in order to functionalize the particle surface with citric acid. Again the nanoparticles are magnetically separated and redispersed by the addition of in aqueous tetramethyl ammonium hydroxide (pH 7-8). For the surface modification, the magnetic fluid is added dropwise to a stirred 1.8 mM solution of CPTMS in ethanol up to a concentration of $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ FeO_x. After allowing the ligand exchange reaction at ambient temperature overnight, the mixture is concentrated on a rotary evaporator to a tenth of the original volume. The obtained CPTMS functionalized nanoparticles are then magnetically separated from the supernatant and washed five times with a 1:1 mixture of diethyl ether and acetone. Finally the particle precipitate is redispersed in DMSO for the following surface initiated polymerization.

ATR-IR spectra of dried functionalized FeO_x nanoparticles show several characteristic peaks that are also found in the spectrum of free CPTMS. The vibrational absorption at 1604 cm^{-1} , 1480 cm^{-1} ,

1259 cm^{-1} , 1379 cm^{-1} , and a broad signal between 1140 and 850 cm^{-1} confirm the surface functionalization with CPTMS.

Surface Initiated ATR Copolymerization of OEGMA and SIMA

Magnetic $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})$ core-shell nanoparticles are obtained by dissolving CuBr and bpy (1:2.5 mol/mol) in a DMSO-based dispersion of CPTMS functionalized FeO_x nanoparticles (35 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ FeO_x). OEGMA and SIMA (total monomer content 30 mass-%) are added to start the polymerization. The composition of the copolymers is chosen to achieve a SIMA content in the polymer shell of 5, 10, 15, 20 and 25 mol-% (s. table 1). The reaction is carried out for 24 h under stirring at ambient temperature. The obtained core-shell nanoparticles are transferred to buffer-based dispersions by precipitation of the primary DMSO dispersions in diethyl ether, magnetic separation and redispersion in buffer.

Capture of benzylamine

Five BzA solutions in HEPES-buffer are prepared with concentrations between 20 mM and 2.5 mM. For each of the investigated particle samples ($\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})_{20}$, $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})_{10}$ and $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})_5$) HEPES buffer-based dispersions with known particle concentrations ($\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})_{20}$, 34.9 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})_{10}$, 69.8 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-SIMA})_5$, 139.6 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) are prepared. For the binding experiments 0.5 ml of the respective BzA solution is mixed with 1 ml of the particle dispersion and 0.5 ml of an activation solution composed of 18.73 mM EDC and 43.30 mM NHS and shaken over night.

Quantitative Analysis of the BzA Residue by Ninhydrin Reaction

To remove the strongly light-absorbing particles from the reaction mixtures for UV analysis, the hybrids are magnetically separated by a Milteny column or by heating above the LCST and the use of a magnet. For the ninhydrin reaction 1 ml of the respective supernatant is mixed with 1 ml of a 40 mM ethanolic ninhydrin solution in a pressure resistant vial, and closed. The reaction is carried out under stirring at 100 °C for 20 min. After cooling to ambient temperature, the purple colored solutions are

dissolved (1:10 and 1:5 respectively), and the absorption at 568 nm is measured by UV/VIS spectroscopy.

Immobilization of Trypsin

30 mg trypsin are dissolved in 6 ml HEPES buffer and mixed with 6 ml of a HEPES buffer-based $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA-co-SIMA)15}$ particle dispersion ($\mu(\text{FeO}_x) = 0.15$ mass-%). In order to allow reactivation of possibly hydrolyzed active-ester functions, 6 ml of 2.21 μM EDC/NHS solution is added. The binding reaction is carried out for 6 h at ambient temperature on a shaker. The obtained trypsin functionalized particles were separated and washed carefully with water to remove any residues of free trypsin, and redispersed in HEPES buffer.

Determination of immobilized Enzyme Kinetics and Activity

BAPNA is used as the model substrate. Four HEPES buffered BAPNA solutions with concentrations between 2.0 mM and 0.5 mM, and a 6.0 μM trypsin solution are prepared. The respective BAPNA solution is added to a cuvette and mixed with 100 μl of $\text{FeO}_x\text{@POEGMA}$ -trypsin nanoparticle dispersion or 50 μl trypsin solution. The resulting concentrations of trypsin in the two systems are $9.82 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (free trypsin) and $1.66 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($\text{FeO}_x\text{@POEGMA}$ -trypsin particle dispersion). Directly after addition of the enzyme the change in absorption at 410 nm is detected every 15 or 30 s over a period of up to 20 min by UV spectroscopy.

Functionalization of endothelia cell membranes

Cultured endothelial cells (second passage) from human umbilical cord are incubated with a $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA-co-SIMA)25}$ and a $\text{FeO}_x\text{@POEGMA}$ nanoparticle dispersion ($\mu(\text{FeO}_x) = 0.12$ mass-%) for 5 min in HEPES buffer at RT. Afterwards, the cells are washed with HEPES buffer and fixed for TEM imaging with a 1 % paraformaldehyde and 1.25 % glutaraldehyde solution in cacodylate buffer (0.1 M pH 7.4) for one night at 4 °C. Fixation and embedding for TEM is carried out according to standard procedures.⁴⁸

Acknowledgment

We thank Prof. H. Ritter for his steady interest in our studies. Thanks to Dr. B. Emde for her support with biological and technical questions. We thank Dr. Yan Lu University of Bayreuth (Germany) for TEM images of the particles. We gratefully acknowledge DFG for financial support within the Emmy-Noether program and the priority program SPP 1259.

References

- (1) Horák, D.; Babič, M.; Macková, H.; Beneš, M. J. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1751-1772.
- (2) Gu, H.; Xu, K.; Xu, C.; Xu, B. *Chem. Commun.* **2006**, 941-949.
- (3) Franzrep, M.; Siemann-Herzberg, M.; Hobley, T. J.; Thomas, O. R. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 505-516.
- (4) Safarik, I.; Safarikova, M. *BioMagn. Res. Techn.* **2004**, *2*, 1-17.
- (5) Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. *J. Phys. D : Appl. Phys.* **2003**, *36*, R167-R181.
- (6) Safarik, I.; Safarikova, M. *J. Chromatogr. B* **1999**, *722*, 33-53.
- (7) Yalcin, A.; Damin, F.; Ozkumur, E.; di Carlo, G.; Goldberg, B. B.; Chiari, M.; Unlu, M. S. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 625-630
- (8) Kondo, A.; Kamura, H.; Higashitani, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *44*, 99-105.
- (9) Lai, J. J.; Hoffman, J. M.; Ebara, M.; Hoffman A. S.; Estourne`s, C.; Wattiaux, A.; Stayton P. S. *Langmuir* **2007**, *23*, 7385-7391.
- (10) Sun, Y.; Ding, X.; Zheng, Z.; Cheng, X.; Hu, X.; Peng, Y. *Chem. Commun.* **2006**, 2765-2767.

(11) Ohnishi, N.; Furukawa, H.; Hideyuki, H.; Wang, J.-M.; An, C.-I.; Fukusaki, E.; Kataoka, K.; Ueno, K.; Kondo, A. *BioNanotechnol.* **2006**, *2*, 43-49.

(12) http://www.magnabeat.com/e_index.html

(13) Perruchot, C.; Khan, M. A.; Kamitsi, A.; Armes, S. P.; von Werne, T.; Patten, T. E. *Langmuir* **2001**, *17*, 4479-4481.

(14) Chen, X. Y.; Randall, D. P.; Perruchot, C.; Watts, J. F.; Patten, T. E.; von Werne, T.; Armes, S. *P. J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *257*, 56-64.

(15) Li, D.; Sheng, X.; Zhao, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6248-6256.

(16) Li, D.; Jones, G. L.; Dunlap, J. R.; Hua, F.; Zhao, B. *Langmuir* **2006**, *22*, 3344-3351.

(17) Schmidt, A. M. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 93-97.

(18) Gelbrich, T.; Feyen, M.; Schmidt, A. M. *Macromolecules* **2006**, *39*, 3469-3472.

(19) Kaiser, A.; Gelbrich, T.; Schmidt, A. M. *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, *18*, 2563-2580.

(20) Wang, S.; Zhou, Y.; Guan, W.; Ding, B. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *254*, 5170-5174.

(21) Gou, Z.; Chen, Y.; Zhou, W.; Huang, Z.; Hu, Y.; Wan, M.; Bai, F. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 4542-4544

(22) Chanana, M.; Jahn, S.; Georgieva, R.; Lutz, J.-F.; Bäuml, H.; Wang, D. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 1906-1914.

(23) Lutz, J.-F.; Stiller, S.; Hoth, A.; Kaufner, L.; Pison, U.; Cartier, R. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3132-3138.

(24) Murata, H.; Prucker, O.; Rühle, J. *Macromolecules* **2007**, *40*, 5497 – 5503.

(25) Cullen, S. P.; Mandel, I. C.; Gopalan, P. *Langmuir* **2008**, *24*, 13701 – 13709.

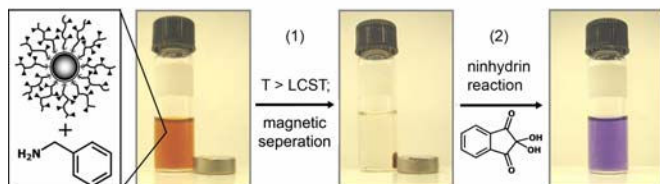
- (26) Kaiser, A.; Schmidt, A. M. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 1894-1998.
- (27) Gelbrich, T.; Feyen, M.; Schmidt, A. M. *Z. Phys. Chem.* **2006**, *220*, 41-49.
- (28) Frickel, N.; Messing, R.; Gelbrich, T.; Schmidt, A. M., submitted.
- (29) Matyjaszewski, K.; Davis, T. P. *Handbook of Radical Polymerization*; WileyInterscience: New York, 2002.
- (30) Rathforn, J. M.; Tew, G. N. *Polymer* **2008**, *49*, 1761-1769.
- (31) Shunmugam, R.; Tew, G. N. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 5831-5843.
- (32) Monge, S.; Haddelton, D. M. *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 37-45.
- (33) Odenbach, S. *Magnetoviscous Effects in Ferrofluids*, Springer-Verlag, 2002.
- (34) Jones, A. M.; Glinel, K.; Oren, R.; Nysten, B.; Huck, W. T. S. *Macromolecules* **2007**, *40*, 4403-4405.
- (35) Lutz, J.-F.; Hoth, A. *Macromolecules* **2006**, *39*, 893-896.
- (36) Sarin, K. V.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 147-157.
- (37) Mc Caldin, D. J. *Chem. Rev.* **1960**, *60*, 39-51.
- (38) www.ademtech.com, adembeads $f = 0.35 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$; www.bangslabs.com, BioMag® $f = 0.24 \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1}$; www.chemagen.de, M-PVA Magnetic beads activated AK11 $f = 0.39 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$; www.invitrogen.com, Dynabeads® MyOne™ $f = 0.4 - 0.8 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$.
- (39) www.chemagen.de, M-PVA Magnetic beads activated AK11 protein binding capacity 8-20 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; www.micromod.de, nanomag®-D (streptavidin) streptavidin functionality 1.5 – 2.0 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.
- (40) Erlanger, B. F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, *95*, 271-278.
- (41) Michaelis, L.; Menten, M. L. *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333-369.

- (42) Lineweaver, H.; Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658-666.
- (43) Hofstee, B. H. J. *Nature* **1959**, *184*, 1296-1298.
- (44) Hofstee, B. H. J. *Science* **1952**, *116*, 329-331
- (45) Eadie, G. S. *J. Biol. Chem.* **1942**, *146*, 85-93.
- (46) Batz, H.-G.; Franzmann, G.; Ringsdorf, H. *Angew. Chem.* **1972**, *24*, 1189-1190.
- (47) Massart, R.; Cabuil, V. *J. Chem. Phys.* **1987**, *84*, 967-973.
- (48) Schimmel, G.; Vogell, W., Eds *Methodensammlung der Elektronenmikroskopie*,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1983.

For Table of Contents use only:

Active Ester Functional Single Core Magnetic Nanostructures as a Versatile Immobilization Matrix for Effective Bioseparation and Catalysis

Thorsten Gelbrich, Michael Reinartz, Annette M. Schmidt



Magnetic Thermoresponsive Core–Shell Nanoparticles

Thorsten Gelbrich, Mathias Feyen, and Annette M. Schmidt*

Institute for Organic Chemistry and Makromolekular Chemistry II, Heinrich Heine University of Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf, Germany

Received January 2, 2006

Revised Manuscript Received February 17, 2006

Introduction

Magnetic fluids¹ achieve growing attraction from the bio-sciences due to numerous present and future applications² including in vitro automated separation and isolation of bio-molecules and cells.³ These dispersions of magnetic nanoparticles are attractive in separation applications as they offer high surface area and can be functionalized to selectively discriminate between different molecular or cellular species. Present suggestions for nonmedical applications of magnetic fluids include the use of magnetic fluids as magnetically separable nanocatalytic systems that combine the advantages of homogeneous and heterogeneous catalysis.⁴ For this purpose, immobilizing sites for catalytically active species like metal complexes or enzymes are included to the stabilizing shell. In these applications, a small particle size and effective dispersion stability by a suitable stabilization mechanism are requested in order to achieve an optimum of specific binding or catalytic activity. In the same direction, however, these parameters complicate the magnetic separation of the particles.

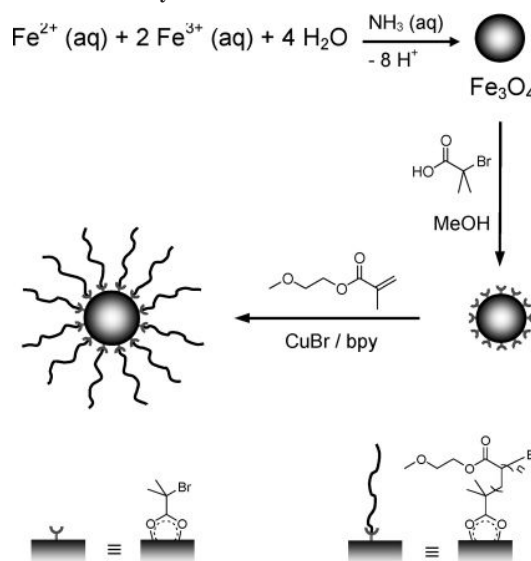
A new strategy to meet this challenge is a thermoreversible stabilization of magnetic particles by the use of a well-defined polymeric shell with a critical solution behavior in the carrier fluid. Thermoreversible stabilization of the particles offers an opportunity to combine dispersibility and quasi-homogeneous conditions for specific binding and catalytic activity and easy magnetic separation at temperatures beyond the stabilizing conditions.

We present the first results on the synthesis and characterization of novel thermoreversible magnetic fluids based on magnetite (Fe₃O₄) coated with a covalently anchored, polymeric shell of poly(2-methoxyethyl methacrylate) (PMEMA). The core–shell particles form stable dispersions in methanol at temperatures above an upper critical solution temperature (UCST), while the particles precipitate below that temperature and can easily be separated by a magnet.

Results and Discussion

The synthetic pathway is composed of alkaline precipitation of magnetite nanoparticles,⁵ followed by surface functionalization of the particles and surface initiated atom transfer radical polymerization (ATRP), as outlined in Scheme 1. ATRP is a preferred “grafting-from” method in surface-initiated polymerization from colloidal particles,⁶ as it offers the advantage of a “living”/controlled mechanism leading to linear chains with low polydispersity and good control on the molecular weight and a fairly good resistance to additional reaction components and impurities. It therefore shows the preconditions required to create

Scheme 1. Synthesis of Fe₃O₄@PMEMA Hybrid Nanoparticles by Surface-Initiated ATRP



a well-defined polymeric shell with linear arms of high grafting density, referred to as a polymeric brush.⁷

Alkaline precipitation of the magnetic cores leads to magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles confirmed by X-ray diffractometry (XRD, see Supporting Information). The volume average core sizes calculated from XRD by the Scherrer method⁸ (11.8 nm) and from VSM of hybrid particle dispersions (Table 1) are in good agreement. The size distribution of the particles can be detected from TEM images (Figure 1b) and gives a number-average core diameter of 10.1 nm.

The functionalization of freshly precipitated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles by chemisorption of 2-bromo-2-methylpropionic acid (BIB) can be verified by ATR–IR spectroscopy⁹ (see Experimental Section) and quantified by thermogravimetric analysis (TGA) and elemental analysis (EA). We find an initiator density f_{ini} of 0.33 mmol (EA) per gram of Fe₃O₄ and 0.26 mmol g⁻¹ (TGA).

Hybrid particles were obtained by surface-initiated ATRP of MEMA catalyzed by a copper(I) bromide/2,2′-bipyridine (bpy) system. Washed and dried samples were analyzed by ATR–IR (see Experimental Section) and TGA. From TGA experiments, a magnetite mass content between 16 and 43 mass % is extracted.

TEM images of Fe₃O₄@PMEMA/8 casted from DMF confirm the architecture of the hybrid particles (Figure 1). Strongly contrasting, nearly spherical magnetite cores can be clearly distinguished from a closed polymeric shell. Within the observed small particle aggregates that are possibly formed during sampling, the single magnetite cores are mostly visibly separated by a PMEMA shell. We estimate a polymer layer thickness of 3–5 nm, independent of the individual core size.

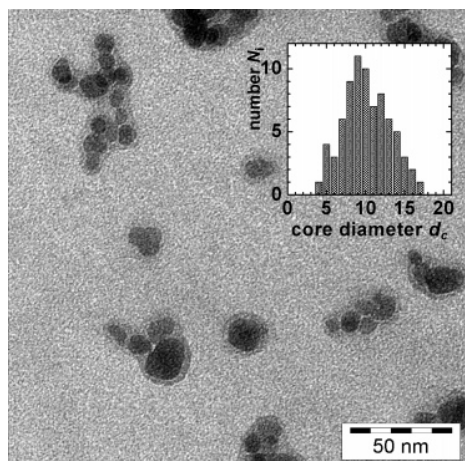
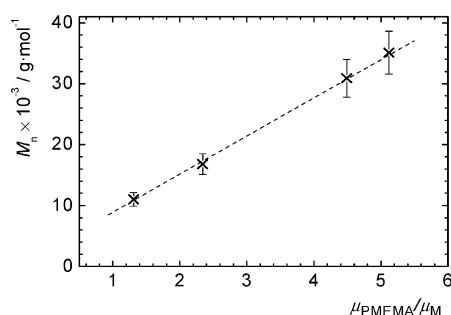
A brief characterization of the polymeric shell is possible after dissolution of the magnetic cores by acidolysis with hydrochloric acid and isolation of the polymeric component by precipitation. GPC analysis results in the calculation of number-average molecular weights M_n of the polymeric arms between 11 000 and 35 100 g mol⁻¹ with a linear relation between $\mu_{\text{PMEMA}}/\mu_{\text{M}}$ and M_n ,¹⁰ leading to a calculated chain density f_s of

* Corresponding author: e-mail schmidt.annette@uni-duesseldorf.de; phone +49-211-8114820; fax +49-211-8115840.

Table 1. Composition of Investigated Fe₃O₄@PMEMA Core–Shell Nanoparticles^a

sample ^b	μ_M^c (%)	d_c^d (nm)	M_n^e (g mol ⁻¹)	M_w/M_n^e	μ_{MF}^f %	d_h^g (nm)
Fe ₃ O ₄ @PMEMA43	43	11.8	11 000	1.85	2.9	30 ± 3
Fe ₃ O ₄ @PMEMA30	30	12.9	16 800	3.09	1.0	47 ± 3
Fe ₃ O ₄ @PMEMA18	18	n.d.	30 900	2.16	n.d.	55 ± 5
Fe ₃ O ₄ @PMEMA16	16	12.2	35 100	2.15	0.48	73 ± 7

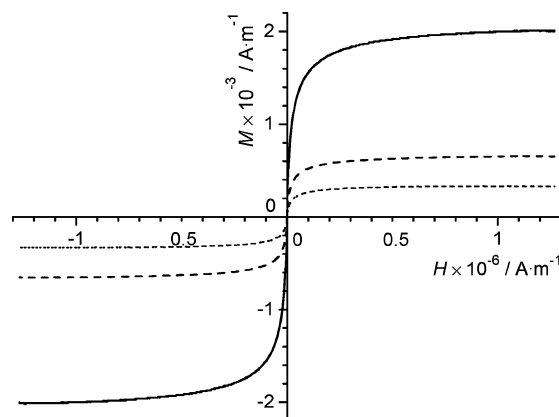
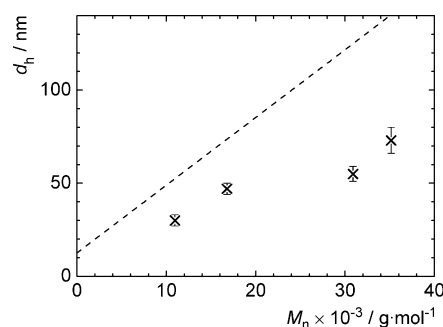
^a μ_M = mass content of Fe₃O₄ in dry particles, d_c = core diameter, M_n = number-average molecular weight of polymeric arms, M_w/M_n = polydispersity index, and μ_{MF} = mass content of Fe₃O₄ in saturated DMF dispersions. ^b Sample denotations: Fe₃O₄@PMEMA μ_M . ^c TGA results. ^d Calculated from initial susceptibility (VSM). ^e GPC results relative to PS and corrected by the Mark–Howink relationship. ^f Calculated from saturation magnetization (VSM). ^g DLS results. n.d. = not determined.

**Figure 1.** TEM image of Fe₃O₄@PMEMA18 hybrid particles. Inset: core size distribution (TEM, $n = 76$).**Figure 2.** Molecular weight M_n vs mass ratio μ_{PMEMA}/μ_M (TGA) of dry Fe₃O₄@PMEMA particles ($\mu_{PMEMA} = 100\% - \mu_M$). The slope gives the chain density f_s per gram of Fe₃O₄.

0.16 mmol per gram of Fe₃O₄ (Figure 2), a value that is lower than the initiator functionality f_{ini} from TGA and EA. The polydispersity indices are found to be around 2, except a value of 3 for sample Fe₃O₄@PMEMA30 (Table 1). The comparably broad molecular weight distribution for ATRP products can be attributed to termination reactions supposed to occur primarily at the beginning of the polymerization. At that time the initial number of radicals generated on the particle surface by bromine transfer to Cu(I) is high compared to the concentration of deactivating Cu(II) species in solution. As a result, the deactivation of the radicals is supposed to be too slow to effectively suppress chain termination by coupling or disproportionation reactions.¹¹

The polymeric shell is predominantly responsible for the dispersibility of the obtained hybrid particles in suitable solvents. We find that freshly prepared PMEMA-capped magnetite nanoparticles instantaneously form stable dispersions (magnetic fluids) in *N,N*-dimethylformamide (DMF) with up to 2.9 mass % of magnetite, which remain stable for months and show a good stability toward dilution.

The dispersions show superparamagnetic behavior in VSM experiments with low coercivity values (<0.6 kA m⁻¹) (Figure

**Figure 3.** VSM loops of saturated magnetic fluids based on Fe₃O₄@PMEMA nanoparticles in DMF: compact line, Fe₃O₄@PMEMA43; dashed line, Fe₃O₄@PMEMA30; dotted line, Fe₃O₄@PMEMA16.**Figure 4.** Hydrodynamic peak diameter d_h (DLS) vs molecular weight M_n (GPC) for Fe₃O₄@PMEMA particles. The dotted line represents the contour length of stretched polymer chains.

3).¹² The saturation magnetization and initial susceptibility obtained from the experiments give information on the magnetite content and the volume average magnetite core size (see Table 1). The good agreement with the core diameter as observed in TEM indicates that the particle cores respond individually to the magnetic field.

In DLS experiments, we observed an increase of the hydrodynamic diameter d_h of Fe₃O₄@PMEMA hybrid particles dispersed in DMF with the polymeric arm length given by M_n by DLS (Figure 4). Compared to the theoretical relationship given by the simple model of ideally stretched polymer chains (dotted line in Figure 4), the obtained hydrodynamic diameters deviate up to 50% to lower values, with a higher deviation for higher M_n . This indicates that the results are within the expected dimension for single particles carrying a polymeric brush of extended chains in a condition between coiled and fully stretched.⁷

Thermoreversible magnetic fluids are obtained by dispersing Fe₃O₄@PMEMA particles in methanol. Below a critical temperature T_{crit} (UCST behavior) that depends on the polymer arm length, the particles show poor dispersibility and precipitate

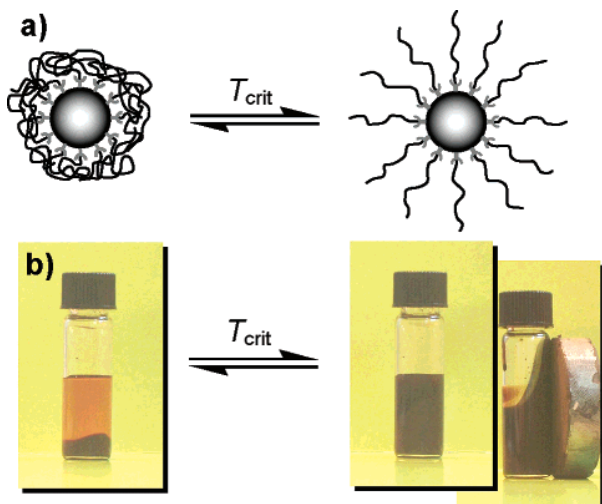


Figure 5. (a) Schematic behavior of the polymer brush shell in thermoreversible magnetic fluids. (b) Photographs of Fe_3O_4 @PMEMA43 in DMF. The particles precipitate below T_c (at 20 °C, left-hand). A particle dispersion is formed above T_c (at 50 °C, right-hand) that reacts collectively under the influence of a permanent magnet.

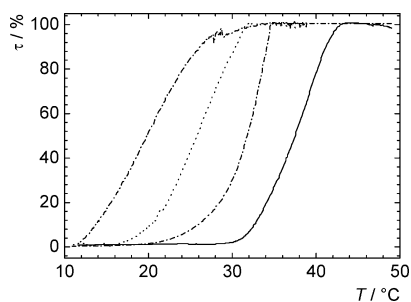


Figure 6. Relative transmittance τ vs temperature T of Fe_3O_4 @PMEMA suspensions in methanol in turbidity experiments: compact line, Fe_3O_4 @PMEMA43; dashed line, Fe_3O_4 @PMEMA30; dotted line, Fe_3O_4 @PMEMA18; dash-dotted line, Fe_3O_4 @PMEMA16.

almost readily, while heating above T_{crit} results in solvation of the polymeric shell (Figure 5a). Consequently, the hybrid particles form a stable dispersion that shows the typical behavior of a magnetic fluid including collective response to a permanent magnet (Figure 5b).

Turbidity experiments (Figure 6) of dilute suspensions indicate a sudden increase of the optical transmittance with increasing temperature while the turbid suspension is converted to a brownish transparent dispersion. Surprisingly, the experiments indicate that the cloud point (defined by the inflection point of the graphs) is lower in dispersions of particles with longer polymer arms, oppositional to what would have been expected. One possible explanation is the surface attachment of the arms, leading to crowded and therefore more or less stretched polymer chains. For this reason the entropic contribution to the solvation process is less beneficial than for free polymer chains. It is expected that this effect is less relevant for long chains, as the free volume of chain segments increases with rising distance to the solid core. In contrast to the hybrid particles, free PMEMA model polymers show good solubility in methanol in the observed range of concentration and temperature.

In summary, we have described the synthesis of nanoscopic magnetite-cored polymeric brushes by surface-initiated ATRP and the properties of novel thermoreversible magnetic fluids based thereon. The presented combination of thermoresponsive polymers with the properties of magnetic fluids, together with

tailorable hydrodynamic diameter and critical temperature, contributes to the development of easily recoverable polymer-supported magnetic separation kits and catalytic systems.

Experimental Section

Analytical Methods and Instrumentation. Elemental analysis (EA) was performed on a Perkin-Elmer 2400 (series 2) CHN analyzer. The functionalization density was calculated on behalf of the C content. ATR-IR spectra were recorded on a Nicolet FT-IR-55XB spectrometer. For the TGA a Netzsch STA 449c in a He atmosphere was used with a heating rate of 10 K min^{-1} between 30 and 600 °C. Weight loss of dry functionalized or hybrid particles between 200 and 410 °C was attributed to the content of BIB or PMEMA, respectively. Gel permeation chromatography (GPC) elugrams were collected in THF (300 \times 8 mm² MZ Gel SDplus columns, Waters 410 RI-detector) relative to polystyrene standards. Results were corrected by the Mark-Houwink relationship.¹³ Vibrating sample quasi-static magnetometry (VSM) was performed on a MicroMag vibrating sample magnetometer from Princeton Measurements Corp. with a field maximum of 1.3×10^6 A m^{-1} . DLS experiments were implemented on a Malvern HPPS-ET at 25 °C. TEM pictures were taken on a Zeiss (LEO) 912 Omega (120 kV) on DMF-casted samples. Turbidity experiments were recorded on a Tepper cloud point photometer.

BIB-Functionalized Fe_3O_4 Nanoparticles. Alkaline precipitation of magnetite nanoparticles was conducted on the basis of the method of Massart and Cabuil.⁵ The aqueous suspension was washed several times with 1.3 vol % ammonium hydroxide solution and methanol. The fresh particle suspension was stirred with 1.67 mmol (277.2 mg) of BIB per gram of magnetite for 30 min, and the particles were washed extensively with methanol.

ATR-IR spectra of dried functionalized Fe_3O_4 nanoparticles show several characteristic peaks in the fingerprint region ($\nu = 1465$, 1402, 1375, and 1107 cm^{-1}) also found in ATR-IR spectra of the free acid. The vibrational absorption of the carbonyl double bond ($\nu = 1548$ cm^{-1}) shows a shift and a dramatic decrease in intensity in comparison to the free BIB ($\nu = 1702$ cm^{-1}) while the deformational stretching absorption of the (CO)-O-H group ($\nu = 1292$ cm^{-1}) vanishes, attributed to the chemisorption via the carboxylate group.⁸

Fe_3O_4 @PMEMA Core-Shell Nanoparticles. Fe_3O_4 @PMEMA hybrid particles were obtained by adding CuBr and bpy (1:2.5 mol/mol) in methanol to the particle suspension in MEMA and stirring at ambient temperature for 48 h. The formed core-shell nanoparticles were dispersed either in DMF or in warm methanol (50 °C). Acidolysis of the magnetite cores occurs by treating the DMF-based magnetic fluids with concentrated hydrochloric acid. Afterward, the polymer component is precipitated in water. Common ATR-IR peaks of dried Fe_3O_4 @PMEMA particles with PMEMA model polymers are found at e.g. $\nu = 1722$, 1241, 1151, 1123, and 865 cm^{-1} .

Acknowledgment. We thank Prof. Dr. H. Ritter for his steady interest and continuous support of this work and Prof. Dr. W. Frank, HHU Düsseldorf, for TGA experiments, Prof. Dr. W. Gawalek, IPHT Jena, for VSM, and Dr. S. Santer, IMTEK Freiburg, for TEM images. A.S. thanks the Fonds der Chemischen Industrie for a Liebig grant. This work is supported by the DFG (SPP1104).

Supporting Information Available: X-ray diffractogram of bare magnetite nanoparticles. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) (a) Berkovsky, B. M.; Bashtovoy, V. *Magnetic Fluids and Applications Handbook*; Begell House: New York, 1996. (b) Blums, E.; Cebers, A.; Mairov, M. M. *Magnetic Fluids*; Walter de Gruyter: Berlin, 1997.

- (2) (a) *Magnetism in Medicine*; Andr a, W., Nowak, H., Eds.; Wiley-VCH: Berlin, 1998. (b) Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R167–R181. (c) Tartaj, P.; Morales, M. P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Gonz ales-Carre o, T.; Serna, C. J. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R182–R197. (d) Berry, C. C.; Curtis, A. S. G. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R198–R181.
- (3) (a) Gu, H.; Ho, P. L.; Tsang, K. W. T.; Wang, L.; Xu, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15702. (b) Patolsky, F.; Weizmann, Y.; Kratz, E.; Willner, I. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2474–2478; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2372. (c) Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. *Science* **2003**, *301*, 1884.
- (4) (a) Lu, A. H.; Schmidt, W.; Matoussevitch, N.; B nnemann, H.; Spliethoff, B.; Tesche, B.; Bill, E.; Kiefer, W.; Sch uth, F. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4403–4406; *Angew. Chem.* **2004**, *43*, 4303–4306. (b) Teunissen, W.; de Groot, F. M. F.; Geus, J.; Stephan, O.; Tence, M.; Colliex, C. *J. Catal.* **2001**, *204*, 169–174.
- (5) Massart, R.; Cabuil, V. *J. Chem. Phys.* **1987**, *84*, 967–973.
- (6) (a) von Werne, T.; Patten, T. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7497–7505. (b) Ohno, K.; Koh, K.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2857–2860; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2751–2754. (c) Duan, H.; Kuang, M.; Wang, D.; Kurth, D. G.; M hwald, H. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1745–1748; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1717–1720. (d) Chen, X.; Randall, D. P.; Perruchot, C.; Watts, J. F.; Patten, T. E.; von Werne, T.; Armes, S. P. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *257*, 56–64.
- (7) *Polymer Brushes*; Advincula, R. C., Brittain, W. J., Caster, K. C., R he, J., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
- (8) Scherrer, P. *Nachr. Ges. Wiss. G ttingen* **1918**, *Math.-Phys. Kl. 2*, 98.
- (9) Rocchiccioli-Deltcheff, C.; Franck, R.; Cabuil, V.; Massart, R. *J. Chem. Res.* **1987**, 1209–1230.
- (10) (a) Schmidt, A. M. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 93–97. (b) Schmidt, A. M. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *289C*, 5–8.
- (11) Matyjaszewski, K.; Davis, T. P. *Handbook of Radical Polymerization*; Wiley-Interscience: New York, 2002.
- (12) Rosensweig, R. E. *Ferrohydrodynamics*, 1st ed.; Cambridge University Press: New York, 1985.
- (13) Schindler, A.; Hibionada, Y. M.; Pitt, C. G. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **1982**, *20*, 319.

MA060006U

Magnetic Polymer Brushes: Towards Tailor-Made Stabilization of Magnetic Fluids by Surface-Initiated Polymerization

By Thorsten Gelbrich, Mathias Feyen, and Annette M. Schmidt*

Institute for Organic and Macromolecular Chemistry II, Heinrich-Heine-University of Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf, Germany

(Received September 4, 2005; accepted in revised form October 15, 2005)

Core-Shell Particles / Dynamic Light Scattering / Nanohybrid Materials / Ferrofluids

Novel surfactant-free magnetic fluids based on magnetite nanoparticles stabilized by a covalently attached polymeric brush were characterized in terms of their dispersion properties by DLS. We found that the molecular weight of the stabilizing surface-tethered polymeric arms has a direct impact on the hydrodynamic diameter d_h of the well-dispersed particles. An increase of d_h from 10 nm (octylcarboxylate-stabilized magnetite particles) to more than 100 nm for similar magnetite cores with a densely grafted poly(ϵ -caprolactone) (PCL) shell of $12\,300\text{ g mol}^{-1}$ is observed. The experimental results are compared to the expected values in the case of completely stretched polymeric chains.

1. Motivation

Magnetic materials are key components in modern technology, with applications ranging from data storage to magnetic resonance imaging contrast agents. In this context, magnetic nanoparticles represent a critical link between current technology and future applications due to their unique size-dependent properties including superparamagnetism [1]. Particle–particle interactions and relaxation processes play a significant role in modulating the magnetic behavior of a collection of particles [2]. The challenge is to understand the fundamental structure-property relationships and to develop methods that allow tailoring these interactions as needed.

A new strategy to tailorize dispersion properties like the minimum particle distance and the hydrodynamic particle volume in magnetic fluids is based on the creation of a well-defined polymeric brush [3] on the particle surface

* Corresponding author. E-mail: schmidt.annette@uni-duesseldorf.de

by suitable surface-initiated polymerization mechanisms. For the preparation of magnetic fluids, magnetic core/polymeric brush hybrid particles have the advantage to be instantly dispersible in good solvents for the polymeric shell without the addition of ancillary stabilizers [4–6]. In lieu thereof, the polymer arms serve as an irreversible attached steric stabilizer, leading to well-defined properties of the surfactant-free dispersion.

The dispersability of the hybrid particles is determined mainly by the solution properties of the polymeric arms and can be adjusted to fit the dispersion medium by the choice of monomers. We have developed protocols for the preparation of magnetic nanoparticles with two chemically different polymeric shells, showing differing solution properties, by the application of surface-initiated polymerization mechanisms like ring-opening polymerization (ROP) [5] and atom transfer radical polymerization (ATRP) [6].

This paper illustrates that the applied synthetic pathways offer the opportunity to adjust the hydrodynamic volume of the hybrid particles in dispersion in wide ranges. The thickness of the anchored stabilizing shell is tuned by the molecular weight of the polymeric arms as is shown by dynamic light scattering (DLS).

2. Experimental part

The synthesis of hybrid particles of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PCL}$ type with a shell composed of poly(ϵ -caprolactone) (PCL), by a three-step process including alkaline precipitation of Fe_3O_4 nanoparticles with a diameter of ~ 12 nm, surface functionalization with glycolic acid and surface-initiated ROP of ϵ -caprolactone (CL) in bulk, catalyzed by tin(II) ethylhexanoate, is described in detail elsewhere [5]. For the preparation of magnetic fluids, toluene was added to the mixture and the resulting dispersion was centrifuged (2 min at 2000 r min^{-1}) to remove agglomerated material.

Similarly, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMEMA}$ hybrid particles with a poly(2-methoxyethyl methacrylate) (PMEMA) shell were prepared, using 2-bromo-2-methylpropionic acid as surface functionalizer and performing a surface-initiated ATRP of 2-methoxyethyl methacrylate (MEMA) by a copper(I) bromide/bipyridine catalytic system [6]. The formed core-shell nanoparticles were dispersed in *N,N*-dimethylformamide and centrifuged.

Acidolysis of the magnetite cores in order to isolate the polymeric fraction was performed by treating particle dispersions with hydrochloric acid. Afterwards the polymer component is precipitated in hexanes (mixture of isomers) in the case of PCL, or in water in the case of PMEMA.

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed on a Netzsch STA 449C in a helium atmosphere with a heating rate of 10 K min^{-1} between 30°C and 600°C . Mass composition of dried hybrid particles was determined based on the weight loss by thermal decomposition of the polymer fraction

in the temperature range of 270 °C–470 °C (PCL) respectively 180 °C–440 °C (PMEMA).

Gel permeation chromatography (GPC) elugrams were collected on a Waters system equipped with three (300 × 8) mm² MZ Gel SDplus colours in THF and a Waters differential refractometer relative to polystyrene standards. Molecular weight distributions were corrected by the Mark–Houwink relationship [7].

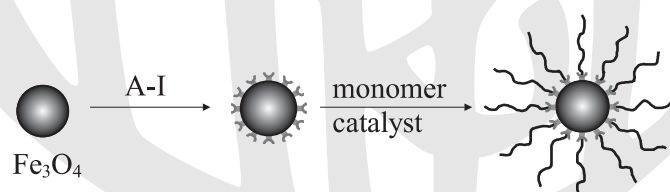
Vibrating sample quasi-static magnetometry (VSM) was performed on a MicroMag vibrating sample magnetometer from Princeton Measurements Corporation, or on a LakeShore VSM 7407 with a field maximum of 1.5×10^6 A m⁻¹. Magnetogranular analysis was performed by fitting the Langevin simulation of a lognormal distributed particle ensemble to the experimental results.

DLS experiments were implemented on a Malvern HPPS-ET on diluted particle dispersions (~ 1 mg/ml). The particle size distribution is derived from a deconvolution of the measured intensity autocorrelation function of the sample by the *General Purpose Mode* algorithm included in the *DTS* software. Each experiment was performed at least five times to obtain statistical information.

3. Results and discussion

Surface-initiated polymerization is a relatively new pathway for the preparation of functional coatings and has recently received much attention [3, 8]. This technique is based on the growth of polymer molecules at the surface of a substrate *in situ* from surface-bound initiators. Consequently, covalently anchored end-tethered polymeric chains with a high grafting density on the particle surface are formed, commonly referred to as a polymeric brush [3]. Suitable polymerization mechanisms include free and controlled radical chain polymerization, cationic polymerization, anionic polymerization and ring-opening polymerization.

For the preparation of magnetic particle-cored polymeric brushes, we developed a three-step process. It consists of the precipitation of magnetite nanoparticles with a volume-average diameter of about 12 nm, the chemical modification of the particle surface by chemisorption of a functional carboxylic acid bearing a polymerization initiator, and finally grafting polymeric arms from the particle surface by the polymerization of a suitable monomer (Scheme 1).

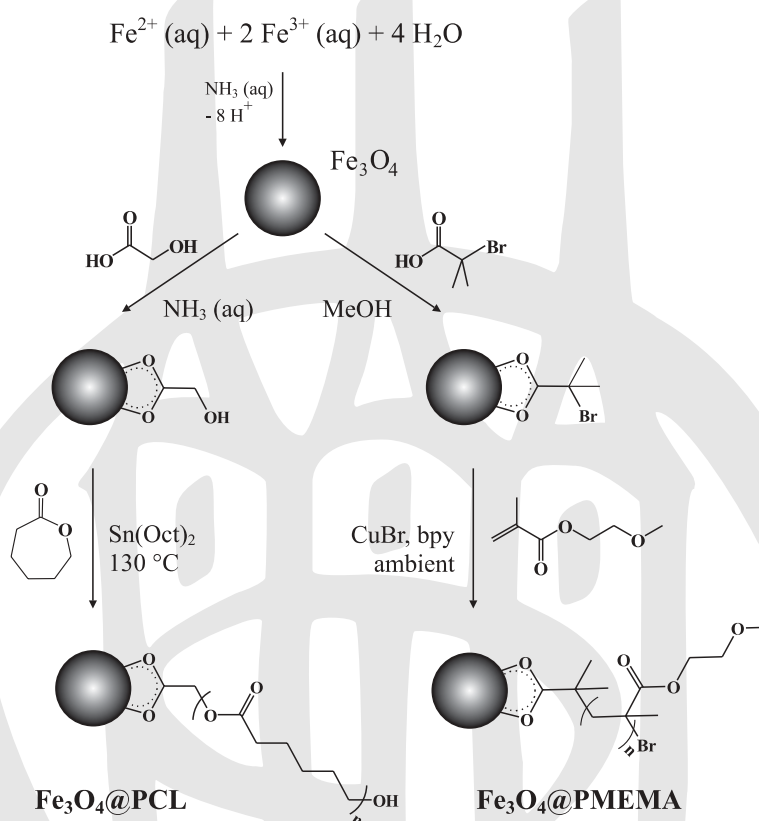


Scheme 1. Synthesis scheme of magnetite-cored polymer brushes.

We realized hybrid magnetic particles with shells composed of poly(2-methoxyethyl methacrylate) (PMEMA), being dispersible in polar solvents like DMF and DMSO, and of poly(ϵ -caprolactone) (PCL), dispersible in less polar organic solvents like toluene and chloroform.

PCL-coated magnetite nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PCL}$) were prepared by surface-initiated ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone monomer [5]. PCL has been chosen as shell material due to its solution properties and the well-known polymerization behavior allowing direct control of the polymeric arm length. An additional feature is the good biocompatibility of PCL, being attractive for biomedical applications.

The synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PCL}$ particles was performed by the synthetic route shown in Scheme 2. Alkaline aqueous precipitation of Fe_3O_4 nanoparticles was followed by chemisorption of glycolic acid to create surface-immobilized hydroxyl groups that served as initiating species in the surface-initiated ROP of ϵ -caprolactone.



Scheme 2. Synthetic pathways for the preparation of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PCL}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMEMA}$ magnetic polymer brushes.

For the preparation of magnetite particles coated with PMEMA ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMEMA}$), a synthetic route via ATRP has been applied (Scheme 2, [6]). PMEMA shows solubility in polar solvents like DMF and DMSO and is poly-

Table 1. Composition of investigated Fe₃O₄@PCL and Fe₃O₄@PMEMA core-shell nanoparticles.

Sample	χ_M^a	d_M^b nm	M_n^c g mol ⁻¹	M_w/M_n^c	χ_{MF}^d
Fe ₃ O ₄ @PCL40	0.40	12.4	1500	3.85	0.035
Fe ₃ O ₄ @PCL25	0.25	12.1	3500	2.25	0.0125
Fe ₃ O ₄ @PCL20	0.20	12.2	4900	2.06	0.0067
Fe ₃ O ₄ @PCL13	0.13	11.9	7100	2.07	0.0057
Fe ₃ O ₄ @PCL10	0.10	12.5	12 300	1.89	0.0039
Fe ₃ O ₄ @PMEMA43	0.43	11.8	11 000	1.85	0.029
Fe ₃ O ₄ @PMEMA30	0.30	12.9	16 800	3.09	0.010
Fe ₃ O ₄ @PMEMA18	0.18	n. d.	30 900	2.16	n. d.
Fe ₃ O ₄ @PMEMA16	0.16	12.2	35 100	2.15	0.0048

^a Fe₃O₄ mass fraction by TGA; ^b core diameter determined from initial susceptibility (VSM); ^c by GPC; ^d Fe₃O₄ mass fraction in saturated magnetic fluids from VSM (see text).

merizable by ATRP with a good control over the molecular weight with no branching reactions.

Freshly precipitated Fe₃O₄ nanoparticles have therefore been functionalized in methanol with 2-bromo-2-methylpropionic acid, bearing a tertiary bromide functionality as a suitable ATRP initiator. Afterwards, polymerization was performed by the addition of the proper amount of monomer and the copper(I) bromide/bipyridine catalytic system leading to Fe₃O₄@PMEMA magnetic brush particles.

Careful characterization of the particles at different stages of the process by X-ray diffraction, ATR-IR, TGA, VSM and TEM is described in detail recently [5, 6], together with the results of the investigation of the polymeric fraction by analytical methods in solution (¹H-NMR and GPC) after acidolysis of the magnetic core. Table 1 summarizes the composition of various core-shell particles with a Fe₃O₄ mass fraction χ_M between 0.10 and 0.40. The findings indicate a direct linear correlation between the polymer arm length as given by the molecular weight and the polymer-to-magnetite ratio that can be assigned to the surface-initiated growth of the chains for both types of hybrid particles. The slope of the linear plot χ_{PCL}/χ_M against M_n leads to a chain density f_s of 0.83 mmol g⁻¹ for particles of the Fe₃O₄@PCL-type, equivalent to 4.5 chains/nm² or 1.400 chains per particle. For Fe₃O₄@PMEMA particles, similarly a chain density of 0.26 mmol g⁻¹ is calculated, corresponding to 1.4 chains/nm² or 500 chains per particle. For an estimation of the specific surface to 100 nm² g⁻¹, core size distribution results from magnetogranular analysis were used [5].

For a polymer brush particle with a high grafting density, the surface-attached chains become crowded and are strongly stretched away from the

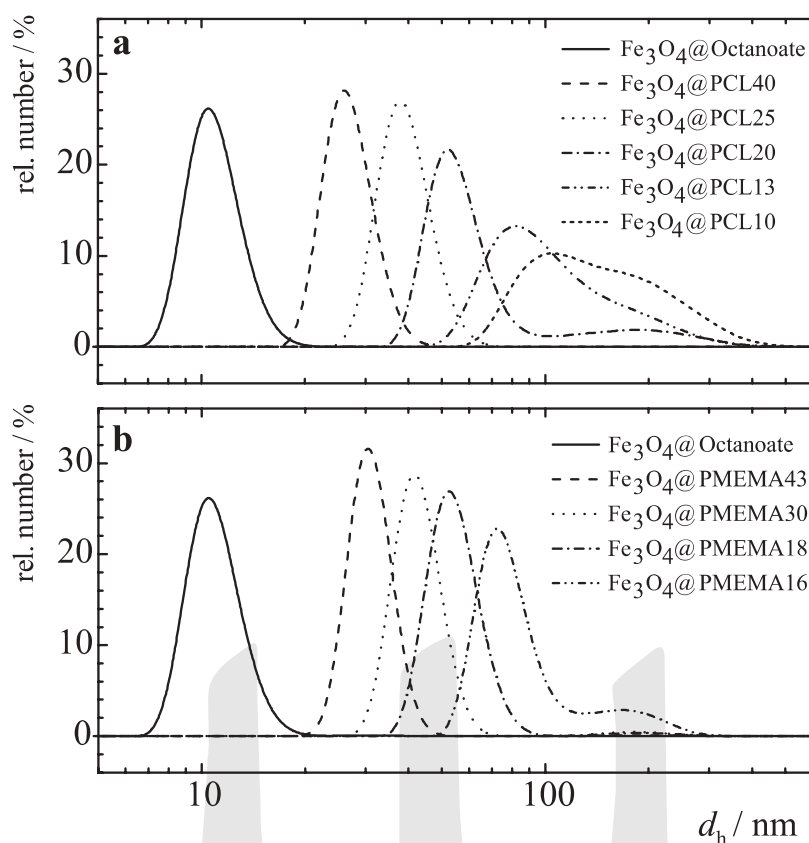


Fig. 1. Hydrodynamic particle diameter d_h distribution of Fe_3O_4 @PCL particles dispersed in toluene (a) and Fe_3O_4 @PMEMA particles in DMF (b).

surface [9], especially when the polymer chains are solvated by a good solvent. It can be attributed to this behaviour, that the investigated magnetic brush particles form stable magnetic dispersions (magnetic fluids) in good solvents for the shell without any additional surfactants. In these dispersions, the grafted arms serve as the stabilizing component that prevents the particles from agglomeration due to van der Waals and magnetic dipole–dipole attractive forces. The obtained magnetic fluids based on toluene (Fe_3O_4 @PCL) or DMF (Fe_3O_4 @PMEMA) contain up to 3.5 mass% (0.7 vol.%) of magnetite (VSM, see Table 1) and remain stable for several weeks. They are readily dilutable with the carrier medium and show superparamagnetic behavior in VSM experiments.

The dispersion properties of the obtained magnetic fluids are studied by DLS, and we found a dependency of the hydrodynamic particle diameter on the polymeric arm length for both types of magnetic brush particles in dispersion (see Fig. 1). It is obvious that the size distribution of the hybrid particles is shifted to higher diameter values as compared to octanoate-stabilized particles, with higher peak values for longer polymer arms (compare to Table 1). While the main peak of the number-average diameter distribution can be assigned to particularly dispersed particles, a considerable amount of agglomerates is

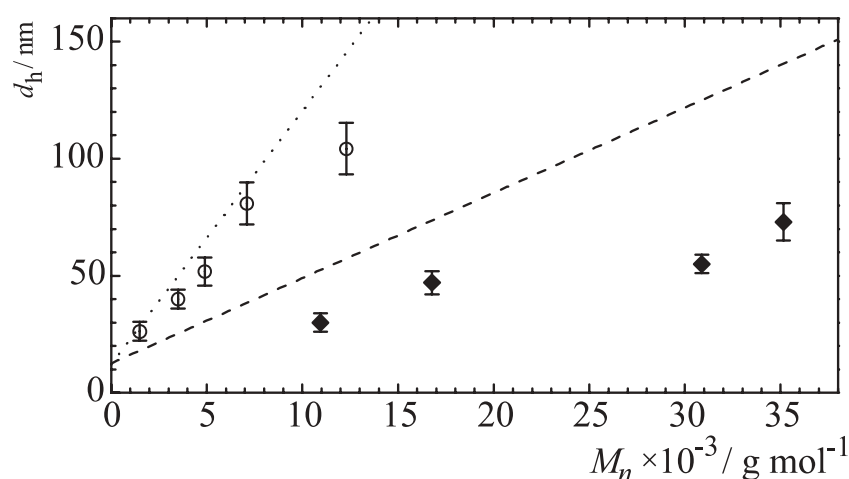


Fig. 2. Dependency of the peak hydrodynamic particle diameter d_h on the molecular weight M_n of the polymeric arms for Fe₃O₄@PCL (circles) and Fe₃O₄@PMEMA (squares) magnetic polymer brushes, compared to theoretical values for fully stretched polymer chains (dotted and dashed line, respectively).

detected as a shoulder or high diameter fraction for particles with high polymer content and long chains. This is predominantly the case in dispersions of Fe₃O₄@PMEMA16, Fe₃O₄@PCL13 and Fe₃O₄@PCL10. It can be assumed that the agglomeration occurred due to entanglement of the polymeric arms and/or partial crosslinking reactions between individual particles during polymerization at high monomer conversions.

If the peak diameter from DLS is correlated to the molecular weight of the arms a nearly linear relationship is obtained (see Fig. 2). Fe₃O₄@PCL particles show a higher diameter compared to Fe₃O₄@PMEMA with comparable molecular weight, as the atoms of the ϵ -caprolactone (CL) repeating unit are predominantly located across the main chain, while the methoxyethyl methacrylate (MEMA) repeating unit includes a weighty side chain that does not directly contribute to the chain length. As a consequence, although the CL and the MEMA repeating unit show comparable molecular weight (144.1 g mol⁻¹ and 145.2 g mol⁻¹, respectively), a single CL unit can contribute a maximum of 0.78 nm to the arm length, while a MEMA unit is utmost 0.26 nm of length.

The results of the particle diameter are compared to the maximum value possible in Fig. 2, applying the simple model of a completely stretched chain with the length of a repeating unit given above. It is found that the discrepancy between experimental and theoretical values is smaller for Fe₃O₄@PCL particles, accounting for the higher grafting density of the chains in these materials, and indicating that the chains are indeed in a highly stretched state. In comparison, the discrepancy for less densely grafted Fe₃O₄@PMEMA hybrid particles is much higher. It may be assumed that a more coiled state is found in the tethered chains.

4. Perspective

The presented results demonstrate that the synthetic pathway to obtain hybrid brush nanoparticles by surface initiated polymerization is suitable to prepare magnetic fluids with a tailored hydrodynamic volume at constant magnetic core diameter of ~ 10 nm. In these magnetic fluids, the polymeric brush shell serves as stabilizing layer, and no additional stabilizing agent is needed. We applied two different polymeric shells with differing solution properties. For both types of hybrid particles it was demonstrated that the hydrodynamic diameter of dispersed particles is directly correlated to the polymeric arm length, which can be adjusted by the polymer-to-magnetite ratio. The observed hydrodynamic diameter of the hybrid particles increases from 10 nm up to 104 nm with rising molecular weight of the polymer arms.

The presented particle dispersions are of interest as model fluids for the examination of relaxation behavior and magnetic particle interactions. Relaxational processes in magnetic fluids include internal (Néel-) relaxation determined by the core material and -volume, while Brownian-mode relaxation is mainly influenced by the hydrodynamic diameter. Magnetic polymer brushes with variable hydrodynamic diameter while keeping the core properties constant may contribute to the investigation of relaxation mechanisms by FMR.

Systematic variation of the hydrodynamic diameter at constant size of the magnetic core offers further on new perspectives to study magnetic interactions, as the interaction between magnetic particles decreases dramatically with spacing. Collective behavior with or without outer fields may therefore be highly influenced by the polymeric shell thickness.

We are looking forward to contribute to a better understanding of the magnetic properties and relaxation processes of magnetic nanoparticles.

Acknowledgement

Thanks to S. Odenbach, ZARM Bremen, and R. Müller, IPHT Jena, for VSM, and to W. Frank, HHU Düsseldorf, for TGA. We gratefully acknowledge DFG (SPP1104) and FCI (A. Schmidt, *Liebig* grant) for financial support!!

References

1. D. Craik, *Magnetism – Principles and Applications*, John Wiley and Sons Ltd., Chichester (1995).
2. R. E. Rosenzweig, *Ferrohydrodynamics*, Cambridge University Press, New York (1985); B. M. Berkovsky and V. Bashtovoy, *Magnetic Fluids and Applications Handbook*, Begell House, Inc., New York (1996); C. R. Vestal, Q. Song, and Z. J. Zhang, *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 8222.
3. R. C. Advincula, W. J. Brittain, K.C. Caster, and J. Rühle (Eds.), *Polymer Brushes*, Wiley-VCH, Weinheim (2004).

4. C. R. Vestal and Z. J. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 14312; R. Matsuno, K. Yamamoto, H. Otsuka, and A. Takahara, *Chem. Mater.* **15** (2003) 3.
5. A. M. Schmidt, *Macromol. Rapid Commun.* **26** (2005) 93.
6. T. Gelbrich, M. Feyen, and A. M. Schmidt, submitted (2005).
7. A. Schindler, Y. M. Hibionada, and C. G. Pitt, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **20** (1982) 319.
8. B. Zhao and W. J. Brittain, *Prog. Polym. Sci.* **25** (2000) 677; J. Pyun, T. Kowalewski, and K. Matyjaszewski, *Macromol. Rapid Commun.* **24** (2003) 1043.
9. P. G. de Gennes, *J. Phys.* **37** (1976) 1445.



Functional Silanes as Surface Modifying Primers for the Preparation of Highly Stable and Well-Defined Magnetic Polymer Hybrids

Natalia Frickel, Renate Messing, Thorsten Gelbrich,[†] and Annette M. Schmidt**Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, D-40225 Düsseldorf, Germany. [†]Current address: Qiagen GmbH, Hilden, Germany.*

Received August 5, 2009. Revised Manuscript Received October 4, 2009

A general and versatile method for the functionalization and subsequent modification of single dispersed magnetite nanoparticles by direct reaction of alkoxy silanes on the particle surface is reported. Our data supports the formation of a dense monolayer that is controlled by sterical needs. By selecting the functionality of alkoxy silanes, the surface properties of the particles can be tailored. Depending on the surface functionality, the modified particles can be used as macrocomonomers or macrocrosslinkers, or as macroinitiators for surface-initiated polymerization and thus enable the covalent attachment of polymers.

Introduction

The creation of well-defined organic–inorganic nanohybrid materials with superparamagnetic properties is of great significance for fundamental research and for their use in numerous potential applications, such as in improved magnetic separation systems for biomolecules and cells, for therapeutic applications like magnetic fluid hyperthermia and magnetic drug targeting, and in nanocatalytic systems.^{1–5} The possibility to functionalize the surface of magnetic nanoparticles and to improve the particles' compatibility with different environments by the proper attachment of organic monomer or polymer groups has therefore attracted much interest. The introduction of covalent linker groups allows the permanent attachment of polymer chains to individual particles. Thus, magnetic polymer nanohybrids with defined architecture become accessible by surface-initiated polymerization or via a grafting-through mechanism.^{3,6} Although effective in several nonaqueous environments, anchoring groups of the chelate type like carboxyl, catechol or oxime groups often fail on metal oxide surfaces in aqueous or protic media due to the hydrolytic instability of the surface attachment and/or the dynamic nature of the interaction. A promising approach is the creation of a Si–O–Si functional monolayer cage around the individual particles.

This study introduces a versatile and simple method for the surface modification of magnetite particles with a functional monolayer by using various alkoxy silanes. Alkoxy silanes are multifunctional molecules with the general chemical formula $X_m\text{-Si(OR)}_{4-m}$, where (OR) is a hydrolyzable group responsible for the surface adhesion and condensation, and X is an organic

functional group that can interact with the environment. Alkoxy silanes with a variety of functionalities X are commercially available, and they are frequently applied as coupling agents, adhesion promoters, cross-linkers, additives, and reactive intermediates.⁷ Their monolayers provide the potential to engineer surface properties such as wettability, adhesion, and adsorption, and to introduce functional chemical groups for subsequent follow-up functionalization.

In particular, alkoxy silanes are frequently applied in the modification of oxidic surfaces such as silicon oxide, titanium oxide, zinc oxide, indium–tin oxide, aluminum oxide and iron oxide surfaces.^{8–16} For extended (flat) surfaces, depending on the reaction conditions, the formation of poly(alkylsiloxane) monolayers has been reported, and the respective surfaces have been extensively studied by atomic force microscopy (AFM), contact angle measurements, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and ellipsometry. It is found that 3-aminopropyl trimethoxysilane and *N*-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl trimethoxysilane form continuous and homogeneous monolayers on silica and titania oxide surfaces.^{8,9} A functionalization density of $2.8 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ on the silica surface, and $3.6 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ on the titanium oxide surface has been found, corresponding to 1.7 and 2.2 molecules/nm², respectively.⁹ Similar results have been found for 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane (GTS)¹⁷ and 3-methacryloxypropyl triethoxysilane

(7) Witucki, G. L. *J. Coat. Technol.* **1993**, 65(822), 57–60.(8) Allen, G. C.; Sorbello, F.; Altavilla, C.; Castorina, A.; Ciliberto, E. *Thin Solid Films* **2005**, 483(1–2), 306–311.(9) Rezanian, A.; Johnson, R.; Lefkow, A. R.; Healy, K. E. *Langmuir* **1999**, 15(20), 6931–6939.(10) Kornherr, A.; French, S. A.; Sokol, A. A.; Catlow, C. R. A.; Hansal, S.; Hansal, W. E. G.; Besenhard, J. O.; Kronberger, H.; Nauer, G. E.; Zifferer, G. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 393(1–3), 107–111.(11) Hatton, R. A.; Day, S. R.; Chesters, M. A.; Willis, M. R. *Thin Solid Films* **2001**, 394(1–2), 292–297.(12) Lazarin, A. M.; Gushikem, Y.; de Castro, S. C. *J. Mater. Chem.* **2000**, 10(11), 2526–2531.(13) Quinton, J.; Thomsen, L.; Dastoor, P. *Surf. Interface Anal.* **1997**, 25(12), 931–936.(14) Campelj, S.; Makovec, D.; Drogenik, M. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, 321(10), 1346–1350.(15) Cao, H.; He, J.; Deng, L.; Gao, X. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, 255(18), 7974–7980.(16) Rahimi, M.; Yousef, M.; Cheng, Y.; Meletis, E. I.; Eberhart, R. C.; Nguyen, K. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, 9, 4128–4134.(17) Nishiyama, N.; Shick, R.; Ishida, H. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 143(1), 146–156.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: schmidt.annette@uni-duesseldorf.de.

(1) Boal, A. K.; Frankamp, B. L.; Uzun, O.; Tuominen, M. T.; Rotello, V. M. *Chem. Mater.* **2004**, 16(17), 3252–3256.(2) Gu, H. W.; Xu, K. M.; Yang, Z. M.; Chang, C. K.; Xu, B. *Chem. Commun.* **2005**, 34, 4270–4272.(3) Lattuada, M.; Hatton, T. A. *Langmuir* **2007**, 23(4), 2158–2168.(4) Lu, H. C.; Yi, G. S.; Zhao, S. Y.; Chen, D. P.; Guo, L. H.; Cheng, J. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14(8), 1336–1341.(5) Zhang, C.; Wangler, B.; Morgenstern, B.; Zentgraf, H.; Eisenhut, M.; Untenecker, H.; Kruger, R.; Huss, R.; Seliger, C.; Semmler, W.; Kiessling, F. *Langmuir* **2007**, 23(3), 1427–1434.(6) Marutani, E.; Yamamoto, S.; Ninjbadgar, T.; Tsujii, Y.; Fukuda, T.; Takano, M. *Polymer* **2004**, 45(7), 2231–2235.

(MTS).¹⁷ The orientation of the organic substituents on the oxide surface may vary from orthogonal to parallel with respect to the surface, and depends on the type and/or the concentration of alkoxyxilanes.^{10,18}

Apart from extended flat surfaces, the modification of nanoparticles by the use of alkoxyxilanes has been reported for particles based on various oxides.^{19–26} However, the formation of a monolayer shell on single particles remains a challenge. One of the phenomena one has to face is particle agglomeration in the presence of the reagents employed, in particular in the case of strongly interacting species, such as magnetic or dipolar particles. In addition, the employment of basic^{19,23,25,27} as well as acidic^{14,22} catalytic conditions has been shown to promote the homocondensation of alkoxyxilanes. This gives rise to secondary nucleation and the formation of silica-based nanoparticles. Other implementations are the agglomeration of the primary particles due to bridging, and the formation of multilayers on the particle surface.^{9,15,16} In order to overcome particle agglomeration, several studies report the initial coating of the primary particles with a silica shell by reaction with tetraethoxysilane (TEOS) prior to functionalization, usually resulting in the inclusion of multiple particles within a silica-coating with a thickness in the order of tens of nanometers (bead-like structure).^{28,29}

Here, a simple method for the surface functionalization of individual iron oxide nanoparticles is described, that is achieved by the formation of siloxane layers using alkoxyxilanes. In order to promote the condensation reaction predominantly on the primary particle surface, the local presence of basic ions present from electrostatic stabilization is exploited for the catalysis. Careful optimization of the reaction conditions delivered a procedure that allows the immobilization of various functional groups to the individual magnetic cores. The versatility of the method is shown by several examples of follow-up modification with polymers.

Experimental Section

The chemicals were of reagent grade from commercial sources. MTS (98%) was purchased from Lancaster. 3-Methacryloxypropyl methylmethoxysilane (MDS, 95%), methacryloxypropyl dimethylmethoxysilane (MMS, 95%), 4-(chloromethyl)phenyl trimethoxysilane (CTS) and GTS were obtained from ABCR. Octyl triethoxysilane (OTS, 97%) was purchased from Merck. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fluka), NH_4OH aq. (Fluka, p.a., 25%), HCl 1 M (p.a., Riedel-de-Haën), and tetramethyl ammoniumhydroxide (aq) (TMAH, Aldrich, 25%) were used as received. Citric acid monohydrate (99.5%) was obtained from

Grüssing GmbH. Methyl methacrylate (MMA) was obtained from Röhm and distilled under reduced pressure. *N*-isopropylacrylamide (NiPAAm) (99%) and 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) (98%) were purchased from Acros. Copper(I) bromide (98%) and oligo(ethyleneglycol) methylether methacrylate (OEGMA, $M = 290 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) were purchased from Aldrich. Ethanol was obtained in technical grade and used after distillation. Dimethylsulfoxide (DMSO) was dried by heating over calcium hydride (Riedel-de-Haën) for two hours, followed by distillation under reduced pressure.

Instrumentation. Quasi-static vibrating sample magnetometry (VSM) was performed on a MicroMag vibration sample magnetometer from Princeton Measurements Corporation, with a field maximum of $1.3 \times 10^6 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1}$. Zeta potential measurements were performed on a Zeta Sizer 2000 (Malvern Instruments). Transmission electron microscopy (TEM) images were taken using a Philipps EM 208S. Attenuated total reflection-infrared (ATR-FTIR) spectra were measured on a Nicolet FT-IR-5SXB spectrometer equipped with a Specac Golden Gate Heated Diamond ATR Top Plate. Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed on a High-Performance Particle Sizer HPP5002 (Malvern Instruments) in ethanol at 20 °C, using $1 \times 1 \text{ cm}^2$ polystyrene cuvettes, unless noted otherwise. The particle size distribution was derived from a deconvolution of the measured intensity autocorrelation function by the non-negative least-squares algorithm included in the DTS software. Elemental analysis (EA) of washed and carefully dried modified particles was carried out with a Perkin-Elmer Analyzer 2400 with an accuracy of measurement of $\pm 0.3\%$.

Synthetic Procedures. The preparation of magnetite nanoparticles was performed under nitrogen atmosphere by alkaline precipitation of ferrous and ferric chloride (molar ratio 1:2), based on the method of Massart and Cabuil,³⁰ and subsequent electrostatic stabilization in aqueous solution by the addition of a 0.01 M solution of citric acid until the particles flocculate, and redispersion by the subsequent addition of tetramethylammonium hydroxide solution.²⁹ A typical procedure results in about 6 g of particles (yield based on iron > 95%) in 75 mL ferrofluid that can be employed in the follow-up experiments.

Surface Modification of Fe_3O_4 Nanoparticles with Alkoxyxilanes. In preliminary experiments, we identified the optimal reaction conditions in terms of solvent, temperature, and procedure as follows. A portion of the electrostatically stabilized, water-based ferrofluid was added to dry ethanol at a concentration of 2.0 mg of magnetite per 1 mL of solution. No additional water or base was added to the reaction mixture. Afterward, a moderate excess (3.6 mmol per 1 g of magnetite, if not stated otherwise) of the respective alkoxyxilane was added dropwise over a period of 10 min, and the reaction mixture was stirred at ambient temperature for 15 h. Condensation of the siloxane groups was promoted by water removal by azeotropic distillation under reduced pressure. The particles were washed repeatedly with wet acetone by magnetic separation to remove any excess of reagent, citric acid, and salts. Afterward, the particles were directly redispersed in ethanol. A small sample was taken from the stock solution and dried under vacuum for analysis (ATR-FTIR, EA).

Preparation of Poly(methyl methacrylate) (PMMA) Magnetic Composites by Covalent Incorporation of Nanoparticles. Fe_3O_4 *PMMA composites were obtained by the incorporation of MTS-modified Fe_3O_4 particles into the polymer matrix of PMMA. A dispersion of MTS-modified Fe_3O_4 particles in ethanol was added to the MMA solution followed by the addition of AIBN (1 mol %), degassing, and purging with argon. The free-radical polymerization was carried out at 40 °C under an argon atmosphere.

Fe_3O_4 @PNiPAAm Nanogels. Fe_3O_4 @PNiPAAm hybrid particles were prepared by a *grafting-through* free radical

(18) Daniels, M. W.; Francis, L. F. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *205*(1), 191–200.

(19) Philipse, A. P.; Vrij, A. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *128*(1), 121–136.

(20) Beck, C.; Hartl, W.; Hempelmann, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*(9), 1297–1300.

(21) Herrera, A. P.; Barrera, C.; Rinaldi, C. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*(31), 3650–3654.

(22) Yamaura, M.; Camilo, R. L.; Sampaio, L. C.; Macedo, M. A.; Nakamura, M.; Toma, H. E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, *279*(2–3), 210–217.

(23) Wagner, J.; Autenrieth, T.; Hempelmann, R. *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, *252*(1–3), 4–6.

(24) Bauer, F.; Ernst, H.; Decker, U.; Findeisen, M.; Glasel, H. J.; Langguth, H.; Hartmann, E.; Mehnert, R.; Peuker, C. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*(18), 2654–2659.

(25) Posthumus, W.; Magusin, P.; Brokken-Zijp, J. C. M.; Tinnemans, A. H. A.; van der Linde, R. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *269*(1), 109–116.

(26) Shen, R.; Camargo, P. H. C.; Xia, Y.; Yang, H. *Langmuir* **2008**, *24*(19), 11189–11195.

(27) van Ewijk, G. A.; Vroege, G. J.; Philipse, A. P. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201*, 31–33.

(28) Bruce, I. J.; Sen, T. *Langmuir* **2005**, *21*(15), 7029–7035.

(29) Deng, Y. H.; Yang, W. L.; Wang, C. C.; Fu, S. K. *Adv. Mater.* **2003**, *15*(20), 1729.

(30) Massart, R.; Cabuil, V. *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* **1987**, *84*(7–8), 967–973.

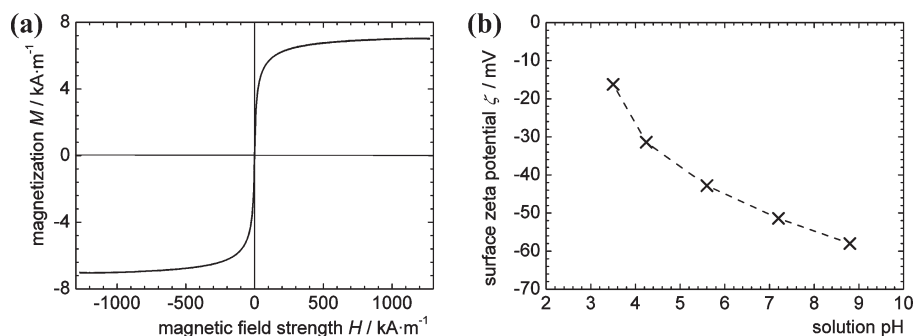


Figure 1. (a) Magnetization curve and (b) zeta potential measurement results for citric acid-modified Fe_3O_4 particles in aqueous dispersion.

polymerization process with NiPAAm. For their synthesis, MTS-modified particles were dispersed in a water/acetone mixture (70:30, $c_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 10.6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) in the presence of NiPAAm (40 mM) and AIBN (1 mol % with respect to monomer), and heated to 70 °C for 1 h while being stirred. After the dispersion was cooled to ambient temperature, acetone was removed by distillation, resulting in an aqueous nanogel dispersion. To remove free PNIPAAm chains and monomer residues, the particles were precipitated by the addition of slightly hydrochloric acidic isopropanol, washed intensively, and redispersed in water by the addition of a few drops of trimethylamine solution.³¹

Fe_3O_4 @POEGMA Brush-Coated Nanoparticles. Silane-modified particles can be used for surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP).^{6,32} For this procedure, the modified particles were dispersed in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of $35 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. After the addition of CuBr/dNBpy (1:2.5 mol·mol⁻¹) as the catalytic system and an adequate amount of OEGMA, the dispersion was stirred at ambient temperature for 24 h under argon atmosphere.³³

Results and Discussion

Synthesis of Surface-Modified Fe_3O_4 Nanoparticles. As a starting material for the surface modification of magnetic nanoparticles, we use Fe_3O_4 nanoparticles obtained from alkaline solution followed by electrostatic stabilization with citric acid and tetramethylammonium hydroxide in water³⁰ leading to a stable ferrofluid of single dispersed Fe_3O_4 . The resulting magnetic dispersion shows practically no hysteresis in VSM experiments, indicating superparamagnetic behavior (Figure 1). Using Chantrell's method³⁵ of using high and low field expansions of the Langevin equation (eq 1), we calculate a Fe_3O_4 concentration of 7.6 mass % from the ratio of the saturation magnetization M_S of the fluid, and the literature value for pure magnetite nanoparticles in this size range, $450 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$.³⁴

$$M = M_S \left(\coth \alpha - \frac{1}{\alpha} \right) \quad \text{with} \quad \alpha = \frac{\mu_0 m H}{k_B T} \quad (1)$$

where M is the sample magnetization, and H is the strength of the applied magnetic field. The effective magnetic moment m of a single particle can be extracted from the initial susceptibility $\chi_{\text{ini}} =$

$(M/H)_{H \rightarrow 0}$. For small fields one gets

$$m = \frac{3}{M_S} \frac{k_B T \chi_{\text{ini}}}{\mu_0} \quad (2)$$

Assuming spherical particles, a volume-average particle diameter d_v of 12.3 nm can be calculated on the basis of the initial susceptibility by using

$$d_v = \sqrt[3]{\frac{6m}{\mu_0 \pi}} \quad (3)$$

TEM images show particles with a size distribution between 5 and 15 nm (Figure 2). No significant difference is found in the size distribution of bare and functional particles. The core diameter extracted from a log-normal fitting of the histogram corresponds to a mean diameter of $d_n = 10.8$ and 10.9 nm for the bare and MTS-functional particles, respectively, and a standard deviation of $\sigma = 0.36$ and 0.38. The values are in good accordance with the volume average diameter obtained from VSM (see above).

The electrophoretic mobility was measured as a function of operational pH (Figure 1). To exclude particle dissolution at lower pH*, the experiments restricted to $\text{pH} > 3$. The mobility is positive at high pH*, and an isoelectric point can be expected at about pH 3. The zeta potential ζ reaches a value of -58 mV at $\text{pH} = 8.8$, indicating an excellent colloidal stability in basic conditions.

The surface modification of the magnetite particles was performed in ethanol by the synthetic route shown in scheme 1. The reaction consists of several subsequent steps: the hydrolysis of part of the alkoxy groups of the siloxane under basic catalysis and in the presence of water in alcoholic media, condensation reactions of highly reactive silicic acid derivatives, and the physisorption of siloxanes or silanols on the particle surface and following condensation with neighboring OH-groups.¹⁹ By azeotropic distillation of water residues, the condensation reaction is driven to high conversions, yielding in a tight inter-cross-linked functional monolayer on the particle surface.

In order to prevent particle agglomeration and to permit a high degree of surface functionalization, it is required that the dispersion stability is not affected or destroyed under the experimental conditions. According to Scheme 1, the presence of water and base is required to promote the reaction.¹⁹ In initial experiments, we investigated the influence of the reaction components on the dispersion stability. While the particles provide a good colloidal stability when added to ethanol, the presence of small traces of additional water and ammonia leads to a quick destabilization of the particle dispersions. In general, the colloidal behavior in ethanol can be assumed to be qualitatively similar to the behavior in water. However, the Debye layer responsible for the electrostatic

(31) Sun, Y. B.; Ding, X. B.; Zheng, Z. H.; Cheng, X.; Hu, X. H.; Peng, Y. X. *Chem. Commun.* **2006**, 26, 2765–2767.

(32) Gill, C. S.; Long, W.; Jones, C. W. *Catal. Lett.* **2009**, 131, 425–431.

(33) Gelbrich, T.; Feyen, M.; Schmidt, A. M. *Macromolecules* **2006**, 39(9), 3469–3472.

(34) Berkovskij, B. M.; G., B. V. *Magnetic Fluids and Applications Handbook*; Begell House, Inc.: New York/Wallingford, U.K., 1996.

(35) Chantrell, R.; Popplewell, J.; Charles, S. *IEEE Trans. Magn.* **1978**, 14(5), 975–977.

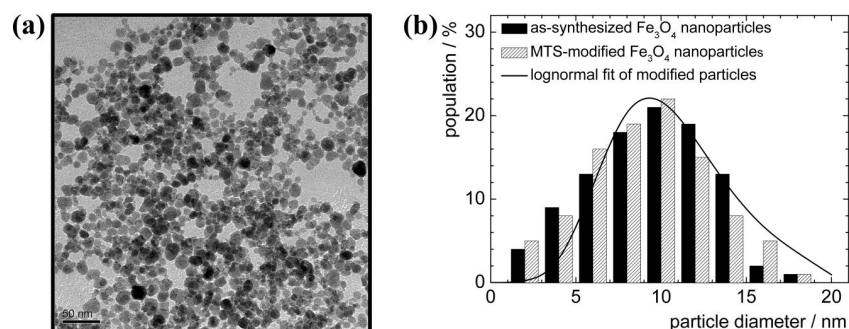
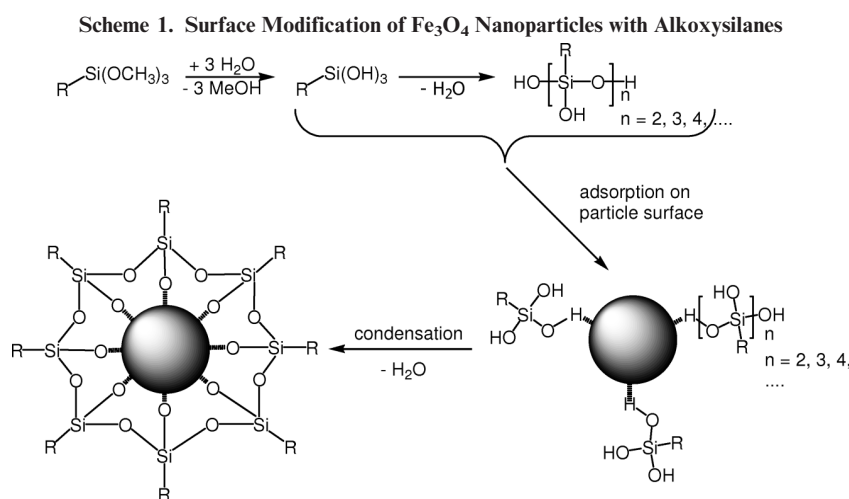


Figure 2. (a) TEM images of as-synthesized Fe_3O_4 nanoparticles; (b) size distribution histogram of as-synthesized and surface-modified Fe_3O_4 nanoparticles. The line graph indicates the best log-normal fit for MTS-modified particles with $d_n = 10.9$ nm and $\sigma = 0.36$.



particle repulsion is much more sensitive to the ionic strength of the medium, and to the amount of present water.³⁶ In combination with the long-range particle interactions resulting from the dipolar character of the magnetic particles, this gives rise to the dispersion destabilization observed.

By carefully adjusting the experimental conditions, we ascertained that basic groups of citrate and hydroxylic ions from the electric double layer on the particle surface can catalyze the hydrolysis of alkoxysilanes. Small quantities of water (about 2% in the final mixture which is an about 50-fold excess with respect to the hydrolyzable siloxane groups) present from the ferrofluid addition are sufficient to promote the hydrolysis/condensation process. The conditions found allow the simple and high density modification of magnetite nanoparticles with various surface groups by a chemically stable monolayer coating of single nanoparticles with alkoxysilanes. Examples for alkoxysilanes employed in this study for the functionalization of Fe_3O_4 particles are shown in Figure 3.

The success of the surface modification can be qualitatively verified by ATR-FTIR spectroscopy, and quantified by EA. In comparison with unmodified particles, the ATR-IR spectra (Figure 4a) of the modified particles show characteristic peaks of the respective modifying reagents. All spectra of modified samples show significant vibrational absorption of the Si-CH₂ bond in the fingerprint region between 1255 cm^{-1} and 1261 cm^{-1} , in agreement with the literature.^{37,38} Another characteristic signal

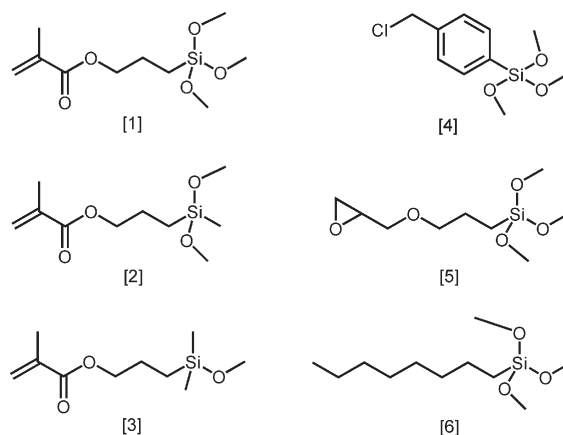


Figure 3. Functional surface-modifying alkoxysilanes employed for Fe_3O_4 nanoparticle functionalization.

can be attributed to the asymmetric $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ vibration between 1133 cm^{-1} and 991 cm^{-1} .^{39,40} Spectra of methacryloxy group-bearing particles show the vibrational absorption of the carbonyl double bond at 1706 cm^{-1} .

The size distribution of the particles remains unchanged after modification, as can be seen in the histogram (Figure 2b) derived from TEM images. No indication of the formation of secondary silica particles, or multilayers, is observed.

(36) Widegreen, J.; Bergström, L. *J. Am. Ceram. Soc.* **2002**, *85*(3), 523–528.

(37) Miller, J. D.; Ishida, H. *J. Chem. Phys.* **1987**, *86*(3), 1593–1600.

(38) Williams, D. H.; Fleming, I. *Strukturaufklärung in der Organischen Chemie. Eine Einführung in die Spektroskopischen Methoden*; Georg-Thieme: Stuttgart, 1991.

(39) Hall, S. R.; Davis, S. A.; Mann, S. *Langmuir* **2000**, *16*(3), 1454–1456.

(40) Miller, J. D.; Ishida, H. *Surf. Sci.* **1984**, *148*(2–3), 601–622.

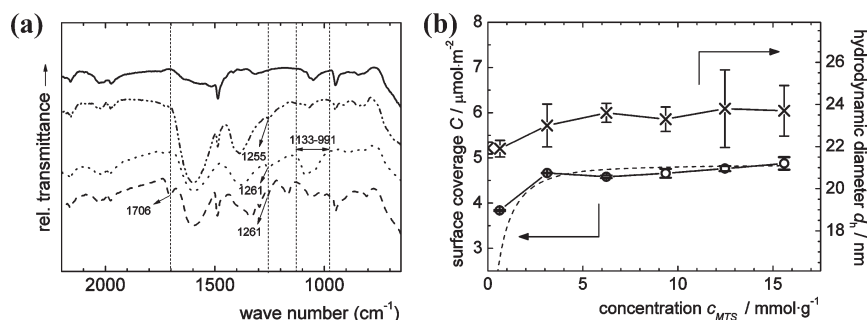


Figure 4. (a) ATR-FTIR spectra of as-synthesized Fe_3O_4 nanoparticles (solid line), MTS-modified particles (dashed line), CTS-modified particles (dotted line), and GTS-modified particles (dashed-dotted line). (b) Surface coverage C (from EA) and Langmuir fit, and hydrodynamic diameter d_h (from DLS) of the resulting particles versus concentration c_{MTS} with respect to Fe_3O_4 content.

To get more information on the layer formation, we performed experiments with different concentrations of the siloxane (Figure 4b). Quantitative information on the layer formation is based on the carbon content of carefully isolated functional particles by EA. It should be stated that the analysis by ^{29}Si NMR is impeded by the magnetic nature of the cores. With results obtained from EA, we extract the functionalization degree f per mass unit of particles. Taking into account the surface average particle diameter $d_A = 12.0$ nm of single unfunctional particles obtained from TEM, and the density of Fe_3O_4 of $5.2 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, a specific surface area of $96 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ is obtained that can be used to calculate the surface coverage C and the number of functional groups per particle n_f . The EA results indicate that the degree of modification with ethanolic MTS solutions of different concentrations shows a Langmuir-like behavior with a maximum surface coverage of $4.8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$. In terms of covered area per molecule, we reach $0.35 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ in the saturation regime. The results can be compared to recent reported similar values for the monolayer formation of trifunctional silanes on different surfaces.^{41,42} They reasonably fit theoretical expectations from space filling projections according to molecular mechanics calculations: for a MTS monolayer formation, the surface functionalization density varies between $2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ and $6.9 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ depending on the molecule orientation with respect to the surface.⁴⁰

DLS measurements of single dispersed MTS-modified magnetite particles (Figure 4b) exhibit an averaged hydrodynamic diameter d_h of 20.3 ± 1.3 nm, and the hydrodynamic diameter of unmodified particles in ethanol was determined to be 22.4 ± 1.2 nm. Similar observations were made for particles with different functional coatings (Table 1). Accordingly, the particle size is not significantly altered in the course of the functionalization process, in agreement with the absence of particle agglomeration, multilayer formation, and secondary particle nucleation. Together with EA results, the data indicate the formation of a reaction-site and monomer size-limited monolayer of MTS on the particle surface.

Accordingly, we analyzed the formation of functional monolayers with alkoxy silanes carrying different organic groups (Table 1). All modified particles show surface coverage values that are in accordance with the formation of a monolayer limited by the number of reaction sites and the steric hindrance of the silane substituents. We can assume that this results in about 1000 functional sites per individual particle from a choice of methacrylic, glycidyl, chlorobenzyl, and alkyl functionalities.

Although MTS, MDS, and MMS (Figure 3) are of structural similarity, EA results (Table 1) reveal that the degree of

Table 1. Functionalization Degree f (from EA), Calculated Surface Coverage C , Average Surface Area A Per Molecule, Number of Functional Groups Per Particle n_f , and the Hydrodynamic Particle Diameter d_h (from DLS) for Surface-Modified Fe_3O_4 Nanoparticles with Different Functional Groups

	f ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	C ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$)	A ($\text{nm}^2/\text{molecule}$)	n_f ($\times 10^3$ p. p.)	d_h (nm)
MMS	0.33	3.43	0.48	0.93	23.6 ± 1.3
MDS	0.38	3.95	0.42	1.07	22.8 ± 1.8
MTS	0.45	4.71	0.35	1.27	20.3 ± 0.7
GTS	0.47	4.88	0.34	1.32	26.4 ± 1.0
CTS	0.48	4.97	0.33	1.35	n. d.
OTS	0.37	3.84	0.43	1.04	25.3 ± 2.1

modification is lower in the case of MMS and MDS, compared to MTS. This can be related to a higher surface area A covered by each molecule, resulting from the higher steric demand of the methyl groups present at the silicon center, and the decreased probability to form $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ bridging bonds.

The degrees of functionalization f of other trifunctional siloxanes (OTS, GTS, and CTS) can be found in the same range as that for MTS. Among those, OTS shows the highest surface area A per molecule, probably due to the presence of the bulky octyl chain.

Follow-Up Modification of Modified Magnetite Particles with Polymers. The modification of the nanoparticle surface with functional alkoxy silanes allows the design and realization of defined polymer hybrid architectures. By the introduction of different chemical groups, a number of follow-up modification reactions by *grafting from* or *grafting through* polymerization become accessible leading to a variety of organic-inorganic structures. Here, we show several examples for the application of silane-modified MNP in the synthesis of magnetic polymer hybrids.

MTS-Modified MNP. The introduction of methacryloxy groups to the particle surface results in multifunctional particulate species that can participate in polymerization reactions under appropriate conditions. Most importantly, the particles must provide sufficient colloidal stability in the polymerization mixture, and the functional surface must be amenable to chemical reactions with monomers and growing chains under the experimental conditions. In the case of copolymerization with methacrylic or methacrylamide comonomers, the latter is facilitated by the chemical similarity of the surface-attached propyl methacrylate groups to the monomers.

In bulk experiments, we demonstrate the incorporation of magnetic nanoparticles into PMMA composites, where they act as a particulate cross-linker and as a functional filler at the same time. We verified the dispersibility of the modified particles in MMA monomer by extracting the particle size distribution by DLS (Figure 5a). The hydrodynamic radius found in MMA

(41) Ishida, H.; Naviroj, S.; Koenig, L. In *Physical Aspects of Polymer Surfaces*; Mittal, K. L., Ed.; Plenum: New York, 1983; Vol. 1, p 91.

(42) Favis, B. D.; Blanchard, L. P.; Leonard, J.; Prud'homme, R. E. *J. Appl. Polym. Sci.* **1983**, *28*(3), 1235–1244.

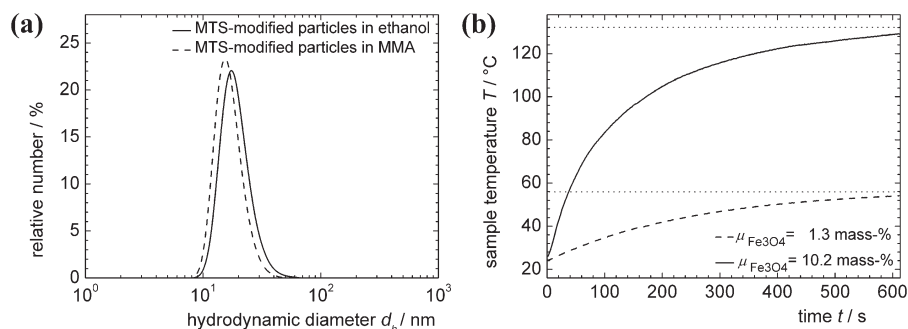
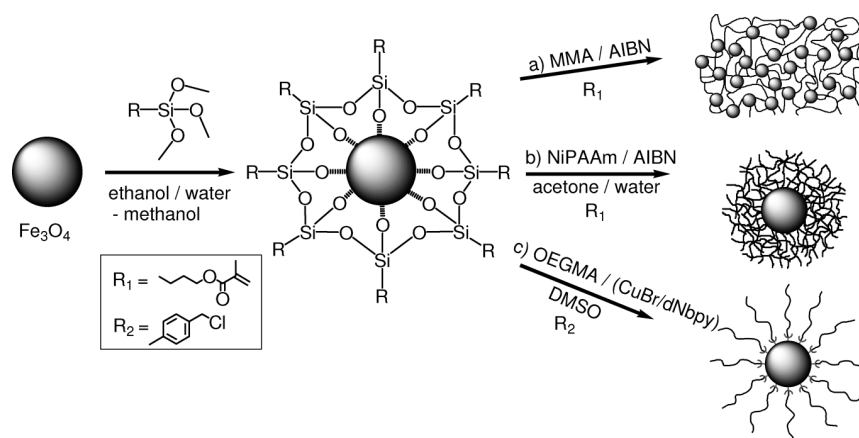


Figure 5. (a) Hydrodynamic particle diameter d_h distribution of MTS-modified Fe_3O_4 particles in ethanol and in MMA. (b) MC heating curves of Fe_3O_4 *PMMA composites with varying magnetite content ($H = 42.6 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$).

Scheme 2. Synthesis of Magnetic Polymer Hybrid Nanocomposites of Different Architecture by Employing Different Surface-Functionalized Fe_3O_4 Nanoparticles As Multifunctional Nanosized Comonomers or Initiators



dispersions is practically unchanged compared to ethanol and water values, indicating an excellent dispersibility of the individual particles in MMA at room temperature. However, in temperature-dependent DLS experiments, we observed a quick destabilization of the dispersions at temperatures higher than 40 °C. Consequently, we carried out the bulk reaction at low temperature.

Fe_3O_4 *PMMA composites are synthesized by a free radical polymerization of MTS-modified Fe_3O_4 nanoparticles dispersed in MMA monomer with AIBN (see Scheme 2a). TEM images of the resulting monoliths show a fine and homogeneous random distribution of single particles and small aggregates (see Figure 6). The nanocomposites are cross-linked networks, as can be demonstrated by swelling in chloroform. The swelling degree in chloroform is found to be between 5 and 10 for networks with magnetite content in the solid between 2 and 10 mass %, and show a dependence on the particle fraction, indicating the contribution of the particles to cross-linking. Analogous experiments on MMA polymerization under the conditions, but performed without particles, respectively with unfunctional particles, did result in polymer materials that are almost fully soluble in toluene and have only low gel content. To our knowledge, this is the first example reported of particulate cross-linked networks with magnetic properties. Mechanical and magnetomechanical properties of these materials are currently investigated.

The resulting Fe_3O_4 *PMMA composites show a considerable temperature rise when subjected to an HF electromagnetic field due to hysteretic and relaxational processes of the superparamagnetic particles. The resulting heat loss is of interest for local heating, e.g., for tumor treatment, hot glue activation, and

mechanical activation.^{43–47} We investigate the magnetic heat-ability of the Fe_3O_4 *PMMA composites in magnetocalorimetric (MC) experiments. In these experiments, the samples are subjected to the field of an induction coil, and the heating process is monitored by a glass fiber optic sensor system.

The MC heating curves show an increasing heating effect with increasing magnetite content (Figure 5b). Temperatures up to 130 °C are reached within the composite containing 10.2 mass-% of magnetite. The specific heating power (SHP) is calculated from the initial slope of the heating curve by taking into account the heat capacity c_p and the magnetite content $\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ of the composite (eq 4).⁴³

$$\text{SHP} = \frac{c_p}{\mu_{\text{Fe}_3\text{O}_4}} \frac{dT}{dt} \quad (4)$$

The SHP values of the investigated samples are calculated to 12.2 and 13.8 $\text{W} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. In comparison, the SHP of the particles in aqueous dispersion is considerably higher, found at about 100 $\text{W} \cdot \text{g}^{-1}$, independent of concentration.⁴⁴ This can be attributed to the fact that a magnetic relaxation of the particles moments by Brownian rotation is possible only for the dispersed

(43) Hergt, R.; Andrä, W. In *Magnetism in Medicine*; Andrä, W., Nowak, H., Eds.; Wiley-VCH: Berlin, 1998; p 550.

(44) Glöckl, G.; Hergt, R.; Zeisberger, M.; Dutz, S.; Nagel, S.; Weitschies, W. *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, *18*(38), S2935–S2949.

(45) Kirsten, C.; Roth, M.; Lammerschop, O.; Sauer, H.-M.; Ger. Patent DE 100 37 883 A1, 2002.

(46) Schmidt, A. M. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*(14), 1168–1172.

(47) Kaiser, A.; Winkler, M.; Krause, S.; Finkelmann, H.; Schmidt, A. M. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*(4), 538–543.

particles, and is suppressed for particles immobilized in the matrix.

A second example of polymeric nanostructures employing MTS functional magnetite nanoparticles are magneto-responsive nanogels of surface-attached poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNiPAAm). They are obtained by the free radical polymerization of NiPAAm in aqueous solution in the presence of MTS-modified Fe_3O_4 nanoparticles by a pathway similar to the one recently reported by Sun et al. (Scheme 2b).³¹

The ATR-FTIR spectrum of dry Fe_3O_4 @PNiPAAm after extensive washing is shown in Figure 7a in comparison to the MTS modified particles and pure PNiPAAm. The characteristic peaks of secondary N–H stretching at 3427 and 3291 cm^{-1} , together with the peaks at 1631 cm^{-1} (C=O) and 1535 cm^{-1} (N–H bending), and the similarity of the fingerprint region are

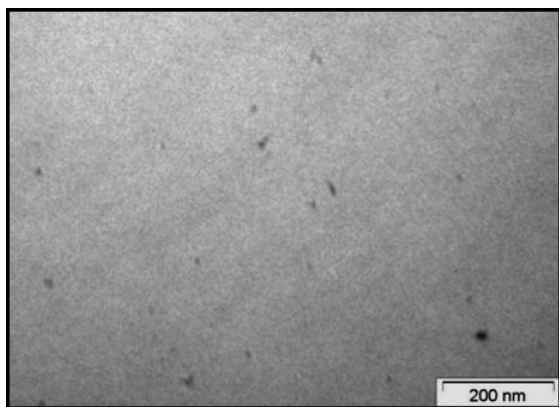


Figure 6. Microtome TEM of Fe_3O_4 *PMMA nanocomposite with 0.5 mass % Fe_3O_4 .

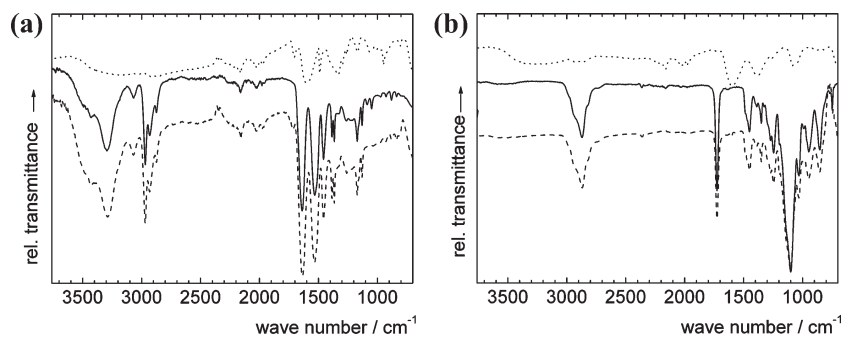


Figure 7. ATR-FTIR spectra of (a) MTS modified Fe_3O_4 particles (dotted line), PNiPAAm (dashed line), and Fe_3O_4 @PNiPAAm particles (solid line); and (b) of CTS modified magnetite particles (dotted line), POEGMA (dashed line), and Fe_3O_4 @POEGMA particles (solid line).

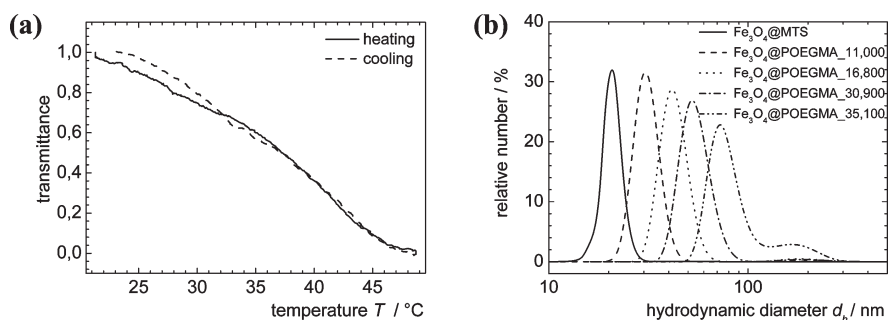


Figure 8. (a) Cloud point photometry experiments of Fe_3O_4 @PNiPAAm dispersions in water. (b) Hydrodynamic particle diameter distribution of CTS-modified particles in water (solid line) and Fe_3O_4 @POEGMA particles in DMSO at different molecular weights of the polymer arms.

clear evidence of the presence of PNiPAAm on the particle surface. The polymer fraction of the materials according to EA is between 10 and 20 mass %, depending on the experimental conditions, and the growth in particle diameter indicated by DLS compared to MTS-functional particles is between 4 and 6 nm.

In cloud point photometry experiments of diluted aqueous Fe_3O_4 @PNiPAAm dispersions, a characteristic increase in turbidity is detected in a temperature range of 30–45 °C (Figure 8a). A reversible agglomeration is accompanied, which is led back to the critical solution behavior (CST) of the PNiPAAm shells. This fully reversible thermoflocculation^{31,33} can be used for particle separation, e.g., for specific magnetic labeling of molecules and cells.

CTS-Modified MNP. By using CTS as the functionalizing agent, chlorobenzyl groups are introduced that show good initiator properties for surface-initiated ATRP^{6,32} and enables the preparation of magnetic core/polymeric brush hybrid particles (Scheme 2). We show the possibility to produce hybrid magnetic particles with shells composed of poly[oligo-(ethyleneglycol)methylether methacrylate] (POEGMA), being dispersible particularly in polar solvents such as dimethylformamide (DMF), DMSO, and water, as well as in chloroform. The successful modification can be demonstrated by ATR-FTIR (Figure 7b). The spectra of carefully washed and dried modified Fe_3O_4 nanoparticles show characteristic peaks for CH_2 (2866 cm^{-1}), C=O (1735 cm^{-1}), and C–O (1099 cm^{-1}) that indicate the presence of POEGMA. In addition, several peaks in the fingerprint region at 1356, 1251, 1196, 1060, and 1022 cm^{-1} are also found in the ATR-IR spectrum of the free polymer.

The dispersion properties of the magnetic fluids obtained were studied by DLS (see Figure 8b) and were compared to the polymer-to-magnetite ratio in the resulting hybrid nanostructures as extracted from thermogravimetric analysis (TGA) and EA.

As expected, the higher the polymer content, the larger the structures are in DMSO, being in accordance with the proposed, brush-like structure.

Conclusion

We describe a straightforward method for the synthesis of modified magnetite nanoparticles by direct surface modification with functional alkoxysilanes in ethanol. By combining analytical methods, we could qualitatively as well as quantitatively demonstrate the irreversible attachment of alkoxysilane monolayers.

Using a choice of alkoxysilanes as modifying agents, we obtain particles with different functional groups on the particle surface, which then allowed different follow-up steps. We have demonstrated the fabrication of magnetic hybrid polymer

nanostructures of various architectures based on organosiloxane-modified Fe_3O_4 nanoparticles. Regarding the great variety of available siloxanes, this method is of use for the design and realization of even more complex structures from organic and inorganic components.

Acknowledgment. We thank Prof. Dr. H. Ritter for his steady interest and continuous support of this work. Furthermore, we acknowledge Prof. Dr. W. Frank, HHU Düsseldorf, for providing the HF generator for MC heating experiments. For TEM we are grateful to Prof. Dr. M. Ballauff und Dr. Y. Lu, Universität Bayreuth, and thanks to Prof. Dr. A. Fery for zeta potential experiments. We thank the DFG (Emmy Noether Program and SPP 1159) and Bayer Material Science for financial support.

Reversible Thermoflocculation of Magnetic Core-Shell Particles Induced by Remote Magnetic Heating

Thorsten Gelbrich,^{†,‡} Gernot U. Marten,[†] Annette M. Schmidt^{*,†}

Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf, Germany

Phone +49-211-8114820, Fax +49-211-15840

* To whom correspondence should be addressed. E-mail:

schmidt.annette@uni-duesseldorf.de.

[†] Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

[‡] Current address: Qiagen GmbH, Hilden, Germany

Abstract

We developed multifunctional magnetic polymer brushes with a tailorable thermoresponsive dispersion behavior that can be activated by AC magnetic fields. Via surface-initiated ATRP, magnetic core-shell nanoparticles are obtained that are composed of nanosized superparamagnetic iron oxide cores and a copolymer shell. The shell consists of oligo(ethylene glycol) methylether methacrylate (OEGMA) and methoxyethyl methacrylate (MEMA) copolymers that show a lower critical solution temperature (LCST) in water.

The hybrid structures are easily dispersible in water at room temperature, and show a reversible thermoflocculation at critical temperatures adjustable by the copolymer composition. The phase separation can alternatively be initiated and recorded by magnetic heating caused by magnetic losses in AC fields. This method offers a convenient way for the remote-controlled heating and agglomeration of disperse systems.

Keywords

Thermoresponsive magnetic nanoparticles; LCST; magnetic heating

1. Introduction

The possibility to control material properties by external stimuli is of considerable importance for the development of novel technologies for actuation, sensing, and pumping, e.g. in microfluidic devices. Recently, thermosensitive polymers have been combined with nanoparticles in order to achieve their reversible phase transition in water and other media leading to flocculation for instance [1-8]. The polymers show a thermoreversible change in solubility in the form of a lower or upper critical solution temperature (LCST/UCST).

By combining thermoresponsive polymers with magnetic nanoparticles, hybrid materials become possible that can be manipulated by two stimuli; temperature and magnetic fields. Such dual responsive materials are of interest for a variety of applications ranging from magnetic separation or drug release systems to sensors and actuation [8,9].

We, and other groups, have demonstrated, that magnetite nanoparticles decorated with a stabilizing shell composed of LCST or UCST polymers lead to nanocomposites that show thermally inducible flocculation behavior in the carrier medium [3,6,10-15]. The single particles agglomerate at a critical temperature resulting in an enhanced magnetic response. Thus the particle agglomerates can be separated easily by low magnetic field gradients, and facilitate, for instance, the separation process in purification applications of biomolecules.

For water-based thermoresponsive magnetic hybrid systems most often poly(N-isopropylacrylamide) (PNiPAAm) is most often chosen as the polymeric stabilizing shell because of its LCST (32 °C) which is near to body temperature and nearly insensitive to environmental conditions such as ionic strength and pH [16,17]. Magnetite (Fe_3O_4) or maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) are predominantly used as magnetic nanoparticles due to their biocompatibility and well understood and easy synthesis. In contrast, Chanana et. al. have recently presented nanocomposites based on magnetite and thermoresponsive poly(oligo(ethylene glycol) methacrylate) (POEGMA) copolymers [18]. The advantage of these polymers compared to PNiPAAm is a LCST in water adjustable by the oligo(ethylene glycol) chain length in a wide temperature

range. Furthermore PEG derivatives are known to be biocompatible and to avoid protein adsorption on surfaces [19,20].

The magnetic interaction of the nanoparticles is not limited to the attractive forces that are used in separation applications. Magnetic nanoparticles can also be used as heat generators. In AC magnetic fields of the kHz range, the nanoparticles transform magnetic energy to heat energy due to relaxation processes and hysteresis losses [21-23]. This remote controlled way of heat generation is under intensive investigation for cancer therapy in *magnetic fluid hyperthermia* [24-25].

In the present report, we discuss the preparation and characterization of magnetic core-shell nanoparticles that show a fully reversible and tailorable thermoflocculation in water. The thermosensitive brush-like polymer shell is obtained via surface-initiated ATRP of methacrylates with hydrophilic side chains. The resulting magnetic polymer brush particles are superparamagnetic, show a high grafting density, and exhibit a thermoresponsive dispersion behavior in water due to a LCST of the polymer arms. By exposure of the obtained nanoparticle dispersions to an AC magnetic field, we are able to heat the fluids by remote control to temperatures above LCST so that the phase transition occurs. From the obtained heating behavior we collect calorimetric data that are compared to conventional DSC results.

2. Experimental Section

2.1. Materials

2,2'-Bipyridine (bpy) (Aldrich, 99 %), 2-bromo-2-methyl-propionic acid tert-butyl ester (Aldrich, 98%), copper(I) bromide (CuBr) (Aldrich, 98%), oligo(ethylene glycol) methylether methacrylate (OEGMA, Aldrich, $M_n = 289.95 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) are used as received without further purification. 2-Methoxyethyl methacrylate (MEMA, Aldrich, 99 %) is distilled under reduced pressure and stored under argon. Dimethylsulfoxide (DMSO) is dried by heating over calcium hydride (Riedel-de-Haen) for two hours, followed by distillation under reduced pressure.

2.2. ATR Copolymerization of OEGMA and MEMA in DMSO solution

Copper(I) bromide (36.5 mg, 0.26 mmol), 2,2'-bipyridine (100.0 mg, 0.64 mmol) and 2-bromo-2-methyl-propionic acid tert-butyl ester (48 μ l, 0.26 mmol) were added to a Schlenk flask. Afterwards, the flask was degassed and subsequently purged with argon three times. Then 5.0 ml degassed DMSO was added for dissolution. The polymerization was started by addition of a degassed mixture of MEMA and OEGMA (20 mmol total monomer content). The reaction was carried out for 72 h at ambient temperature. The polymer fraction was isolated by precipitation with ether/acetone.

2.3. Polymer brush-decorated magnetic particles

The synthesis of the employed FeO_x nanoparticles (with a composition close to Fe₃O₄) and the surface immobilization of 2-bromo-2-methylpropionic acid (BMPA), is described in detail elsewhere [11,12]. The surface-initiated ATRP of MEMA and OEGMA is performed by dissolving 43.0 mg (0.30 mmol) CuBr and 120 mg (0.77 mmol) bpy in 12 ml of a DMSO based FeO_x@BMPA particle dispersion ($c(\text{FeO}_x) = 0.83 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), and heating to 50 °C. To start the polymerization, the respective mixture of the two comonomers MEMA and OEGMA (10 mmol of total monomer) is added. The comonomer ratio is varied to achieve copolymer shells with a MEMA content between 0 and 50 mol-%. The reaction is carried out for 5 d stirring at room temperature. Afterwards, the obtained core-shell nanoparticles are transferred to aqueous carrier media by particle precipitation from DMSO dispersions using diethyl ether, magnetic separation, washing and redispersion in water.

2.4. Core acidolysis of magnetic brush particles

In order to isolate and characterize the polymer arms of the obtained core-shell structures, 1 ml of the obtained DMSO-based FeO_x@P(OEGMA-co-MEMA) particle dispersion is precipitated by adding diethyl ether. After magnetic separation and several washing steps with diethyl ether, the particle precipitate is redispersed in 2 ml of 3 M hydrochloric acid. The FeO_x cores of

the hybrid materials were dissolved under the influence of the acid, resulting in a yellow solution. For the separation of the copolymers, the mixture is heated, resulting in a precipitation of the copolymers above the LCST. The supernatant is decanted, and fresh water is added to the polymer precipitate. This procedure is repeated until the supernatant is practically colorless. The copolymers are analyzed by GPC and NMR.

2.5. Analytic methods and instrumentation

ATR-IR spectra are measured on a Nicolet 6700 spectrometer. Elemental analysis is performed on a Perkin-Elmer 2400 CHN analyzer. For TGA, a Netzsch STA 449c in a He atmosphere is used with a heating rate of $10 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ between 30 and 600 °C. Gel permeation chromatography (GPC) elugrams are collected on THF ($300 \times 8 \text{ mm}^2$ MZ Gel Sdplus columns, Waters 410 RI-detector) relative to polystyrene standards. NMR spectroscopy is performed on a Bruker DRX500 at 500 MHz and ambient temperature. DLS experiments are performed on a Malvern HPPS-ET. The particle size distribution is derived from a deconvolution of the measured intensity autocorrelation function of the sample by the General Purpose Mode (non-negative least-squares) algorithm included in the DTS software. Each experiment is performed at least three times. Turbidity curves are collected on a Tepper TP1 cloud point photometer. From the turning point of the turbidity curves the critical temperature T_c is obtained. Vibrating sample magnetization (VSM) measurements are implemented on a ADE Magnetics vibrating sample magnetometer EV7. Induction heating experiments are performed on a Hüttinger HF generator Axio 5/450T equipped with a copper inductor ($l = 50 \text{ mm}$, $dI = 35 \text{ mm}$, $n = 5$), and operating at 250 kHz and a magnetic field of $31.5 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$. Differential Scanning calorimetry thermograms are collected on a Mettler-Toledo DSC 822° at $5 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$.

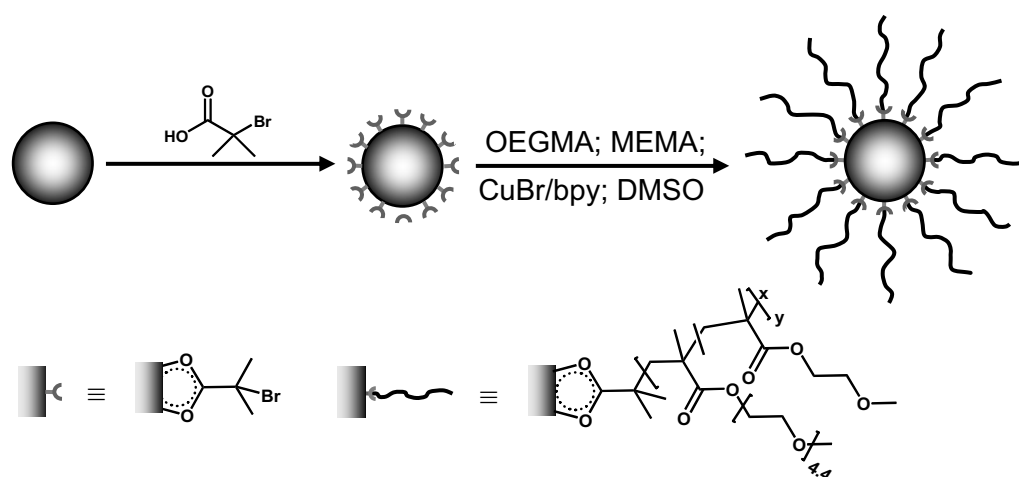
3. Results and discussion

Based on our recent work on the synthesis of magnetic brush particles, and more recent works by others [11,18,20,26,27] we here report the synthesis of water-dispersible nanostructures composed of a magnetic core and P(OEGMA-*co*-MEMA) brush shell. The thermoflocculation behavior of the particles in

water is investigated by different methods using conventional and magnetic heating.

The polymerization behavior of the two comonomers of choice, MEMA and OEGMA (s. figure 1), and the dependence of the critical solution temperature on the composition are analyzed on model copolymers.

Thermoresponsive magnetic polymer brushes are formed by surface initiated copolymerization of MEMA and OEGMA in DMSO by using $\text{FeO}_x\text{@BMPA}$ nanoparticles as macroinitiators (s. scheme 1).



Scheme 1: Synthesis of $\text{FeO}_x\text{@P(OEGMA-co-MEMA)}$ magnetic polymer brush particles by surface initiated ATRP.

3.1 Model Copolymers

In order to investigate the polymerization characteristics of the comonomer system of choice under ATRP conditions, and to validate the reaction conditions as well as the properties of the resulting copolymers, we present results on a series of model copolymers prepared from OEGMA and MEMA in DMSO at 50 °C with CuBr/bpy (1:2) as the catalyst. As initiator, we employed 2-bromo-2-methyl-propionic acid tert.-butyl ester was used as a low molecular analogue for the functionalized particles. While the total monomer-to-initiator ratio was chosen to result in a molecular weight of $20,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, we varied the initial monomer composition between 0 % and 70 % of MEMA. The obtained copolymer composition, molecular weight, and molecular weight distribution are presented in table 1 together with the thermal properties of their aqueous solutions.

Table 1. Molecular weight, composition, and cloud point temperatures of P(OEGMA-*co*-MEMA) model copolymers^a

sample ^a	$\mu_{\text{MEMA,exp}}$ %	M_n $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	M_w/M_n	T_c $^{\circ}\text{C}$
P(OEGMA- <i>co</i> -MEMA)71	71	19,390	1.96	22.8
P(OEGMA- <i>co</i> -MEMA)62	62	19,700	2.03	31.4
P(OEGMA- <i>co</i> -MEMA)57	57	22,860	2.07	36.9
P(OEGMA- <i>co</i> -MEMA)34	34	20,460	1.78	47.2
P(OEGMA- <i>co</i> -MEMA)27	27	18,350	1.71	53.2
P(OEGMA- <i>co</i> -MEMA)5	5	15,860	1.70	56.8
POEGMA	0	11,350	1.40	65.4
POEGMA ^b	0	13,950	1.13	n. b.

^a sample annotations: P(OEGMA-*co*-MEMA)[$\chi_{\text{MEMA,exp}}$]; $\chi_{\text{MEMA,exp}}$: molar fraction of MEMA in copolymers (by ¹H-NMR); M_n : number average molar mass (by GPC), M_w/M_n : polydispersity index (by GPC), , T_c : cloud point temperature (by CPP); ^b prepared by replacing CuBr with CuCl during synthesis.

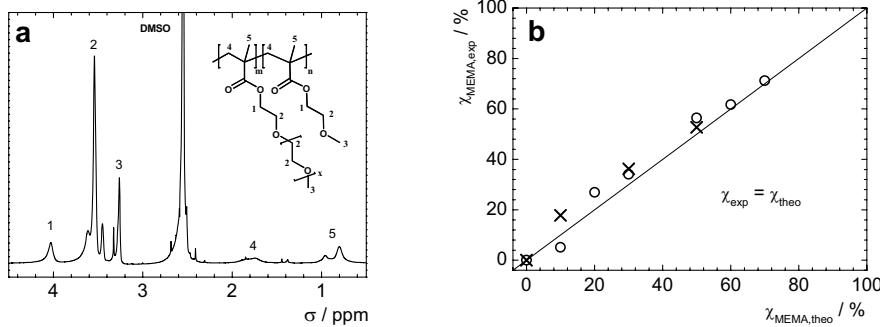


Figure 1. a) ¹H-NMR spectrum of model copolymer P(OEGMA-*co*-MEMA)27; b) experimentally determined molar fraction of MEMA $\chi_{\text{MEMA,exp}}$ in of model poly(OEGMA-*co*-MEMA) copolymers (crosses), and in polymer brush particle shells (circles), vs. initial MEMA fraction $\chi_{\text{MEMA,theo}}$ in the comonomer mixture.

A typical $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the copolymers in D_2O is shown in figure 2a for P(OEGMA-*co*-MEMA)₂₇. The signals of the spectrum can be assigned to the copolymer protons as indicated in the figure inset [28]. The copolymer composition is determined from the spectra from the intensity ratio of signals 1 and 2 as a measure of the average side chain length in the copolymer. From this value, we can easily calculate the molar ratio of the two comonomers and their distinct side chain length.

The obtained values for the molar fraction of MEMA $\chi_{\text{MEMA,exp}}$ in the copolymers correspond well with the MEMA molar fraction $\chi_{\text{MEMA,theo}}$ expected from the monomer feed (figure 2b). This is in agreement with the high conversion ($> 90\%$ in all runs). In addition, the molecular weight determined by GPC are close to the initial monomer-to-initiator ratio of $20,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

However, the molecular weight distribution, as indicated by polydispersity index M_w/M_n of up to 2, is higher than expected for an ideally controlled reaction. This observation is in agreement with reports of others, indicating that a comparably slow initiation process of the BMPM/CuBr/bpy system in methacrylate ATRP [29,30]. We achieved substantial advancement by using CuCl instead of CuBr, thus slowing down the propagation step, and amending the rate of initiation and propagation. However, in the course of the project, the CuCl system proved to be inefficient in the corresponding surface-initiated polymerization protocols. For the preparation of hybrid particles, we therefore stayed with the CuBr/bpy system.

All obtained copolymers with the exception of P(OEGMA-*co*-MEMA)₇₁ are well-dispersible in water at room temperature. Yet, as previously shown for similar copolymers containing oligo(ethylene glycol) methacrylate monomers with different side chain lengths, they possess lower critical solution behavior in water [31,32] that can be adjusted by the copolymer ratio. Below the phase transition temperature, the formation of stabilizing hydrogen bonds between solvating water molecules and ether oxygen atoms of the hydrophilic side chains counteract the hydrophobic effect of the carbon backbone [33], and the polymers exhibit good water solubility. With increasing temperature, thermal fluctuations antagonize the hydrogen bond formation, and at a relatively narrow temperature range depending on the shell composition, flocculation is

observed, and allows the determination of the cloud point temperature T_c by cloud point photometry (CPP) [11,12].

In the series of the presented copolymers, we find an almost linear correlation of T_c with the composition (figure 2a). This can be attributed to the gradual change in the polymer-solvent interaction quality with respect to the composition and is mainly ascribed to the variation in density of the longer side chains along the molecule. We will show below that this behavior can be used to magnetically induce a thermoflocculation of core-shell particles caused by magnetic heating.

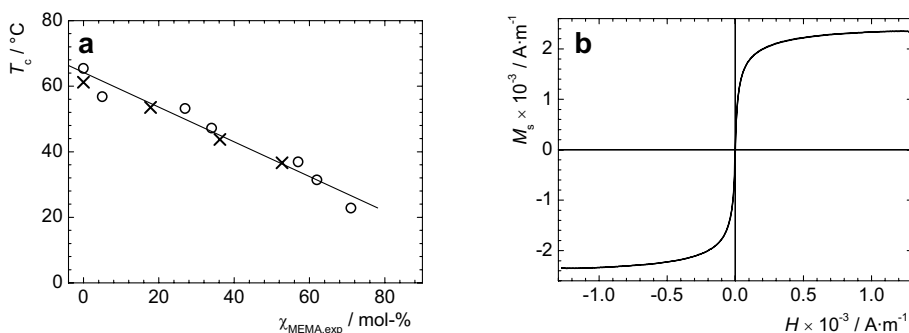


Figure 2. a) Cloud point temperature T_c of P(OEGMA-co-MEMA) model copolymers (circles) and of $FeO_x@P(OEGMA-co-MEMA)$ (crosses) in water in relation to molar fraction of MEMA $\chi_{MEMA,exp}$ in the polymer fraction; b) VSM loop of saturated magnetic fluid based on $FeO_x@P(OEGMA-co-MEMA)$ 36 nanoparticles in DMSO.

3.2 Core-Shell Particle Synthesis and Characterization

For the preparation of hybrid particles, we employed polymerization conditions comparable to model copolymer synthesis in the presence of initiator-functional magnetic particles. We obtained core-shell objects with polymer shells of different copolymer compositions that are easily dispersible in DMSO, DMF, $CHCl_3$, and water.

In the first step, FeO_x nanoparticles are prepared by alkaline precipitation based on a method of Cabuil and Massart [34] and is described, as well as the surface functionalization of FeO_x nanoparticles with 2-bromo-2-methylpropionic acid (BMPA), in detail elsewhere [11,12].

The surface-initiated copolymerization of OEGMA and MEMA was performed with BMPA functionalized magnetite nanoparticles as

macroinitiators suspended in DMSO at 50 °C in the presence of CuBr/bpy. From the obtained black particle dispersions, the core-shell particles were isolated and purified by repeated precipitation, washing, and magnetic separation cycles before redispersion in water. The particles are easily redispersible up to 5 mass-% of solid.

In order to confirm the success of the polymerization, ATR-IR spectra of carefully washed and dried particles were taken. Figure 3a compares the spectrum of $\text{FeO}_x@POEGMA$ to those of BMPA functionalized and bare FeO_x nanoparticles.

We observe intensive peaks that are assigned to the presence of POEGMA or its copolymers with MEMA in the spectra of all polymer-modified particles, including signals assigned to the methyl and methylene groups (2875 cm^{-1} , b), the C=O double bond (1714 cm^{-1} , s), the C-O single bonds 1101 cm^{-1} , b) and several peaks in the fingerprint region at 1356 , 1251 , 1196 , 1060 and 1022 cm^{-1} that are also found in the ATR-IR spectrum of the free polymer. The ATR-IR spectra of $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})$ particles with different shell composition show no qualitative difference.

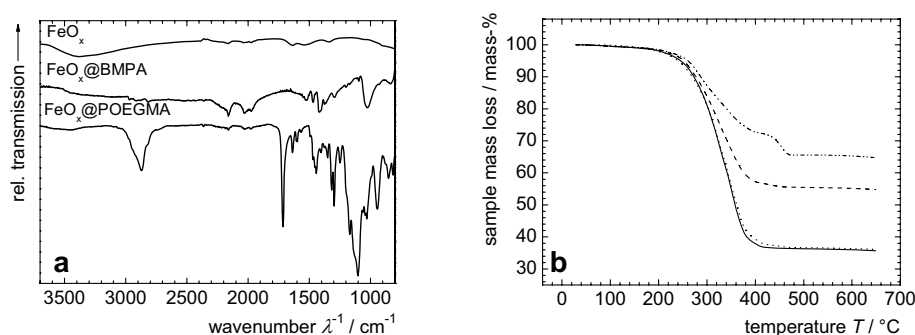


Figure 3: a) ATR-IR spectra of as synthesized FeO_x nanoparticles, BMPA functionalized FeO_x particles and $\text{FeO}_x@OEGMA$ magnetic polymer brushes; b) Sample mass loss vs. sample temperature T in TGA experiments on $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})$: compact line: $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA})$; dotted line: $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})36$; dashed line: $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})18$; dash-dotted line: $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})53$.

The composition of the obtained hybrid materials is analyzed by thermogravimetric measurements. In figure 3b the sample mass loss of dry $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})$ nanoparticles in TGA is shown over the sample

temperature T . A mass loss of 33 % - 63 % is observed between 200 °C and 480 °C that can be attributed to the decomposition of the polymeric shell, with a maximum degradation rate at 300 °C. A two-stage decomposition is observed for the particles with the highest MEMA content. The lower polymer fraction obtained for $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})18$ and $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})53$ can be explained by incomplete conversion during synthesis.

Table 2. Composition of investigated $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})$ core-shell nanoparticles^a

Sample ^a	$\chi_{\text{MEMA,theor}}$ mol-%	$\chi_{\text{MEMA,exp}}$ mol-%	M_n g/mol	M_w/M_n	μ_p wt.-%	$d_{h,n}$ nm	d_c nm	μ_M wt-%	T_c^h °C
$\text{FeO}_x@P\text{OEGMA}$	0	0	67100	1.2	62.9	169	10.2	2.10	61.2
$\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})18$	10	17.8	35900	1.4	43.8	127	10.7	1.91	53.4
$\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})36$	30	36.2	65270	1.8	62.8	171	10.5	2.48	43.7
$\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})53$	50	52.7	36100	1.3	33.8	113	10.3	1.22	36.6

^a $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})[\chi_{\text{MEMA,exp}}]$, μ_p : mass fraction of copolymer in dry particle powder (TGA), μ_{MF} : mass content of FeO_x in saturated DMSO dispersion (VSM), $d_{h,n}$: number average hydrodynamic diameter (DLS), d_c : volume average core diameter (VSM), M_n : number average molar mass (GPC), M_w/M_n : polydispersity index (GPC), $\chi_{\text{MEMA,theor}}$: theoretical MEMA mol content from comonomer ratio, $\chi_{\text{MEMA,exp}}$: obtained MEMA content in copolymers (¹H-NMR), T_c : critical solution temperature (CPP).

The composition of the polymer shell and the molecular weight of the brush arms become accessible after acidolysis of the core for a part of the sample, and isolation of the polymer fraction. The mild conditions of acidolysis have been proven to be harmless to the polymer, as confirmed by control experiments. The isolated polymers are characterized in solution using ¹H-NMR and GPC.

The results can be found in Table 2. The molecular weights are in the range of 30-70,000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, with low polydispersity indices (PDI) between 1.2 and 1.4 (and one exception). As for the composition, we find in all cases an acceptable agreement to the initial comonomer mixture during synthesis. By dynamic light scattering, hydrodynamic diameters between 113 nm and 169 nm are found, which are in agreement with the sizes of single-cored brush particles expected for their respective molecular weight by using a blob model for curved surfaces [35].

By quasi-static magnetization experiments, we obtain information on the magnetic properties of the particle dispersions (s. figure 3b). A sigmoidal field-dependent magnetization curve is obtained, with a negligible coercivity indicating a superparamagnetic behavior. From the saturation magnetization M_s for $H \rightarrow \infty$, the FeO_x mass content is accessible, indicating mass fractions of the magnetic cores between 1.2 mass-% and 2.5 mass.% (s. Table 2). From the initial coercivity $\chi_{\text{ini}} = (M/H)_{H \rightarrow 0}$, we calculate the volume average core diameter d_c according to Chentrell's method, resulting in values between 10.2 nm and 10.7 nm for all samples. This observation indicates an individual response of the single nanoparticles to the magnetic field.

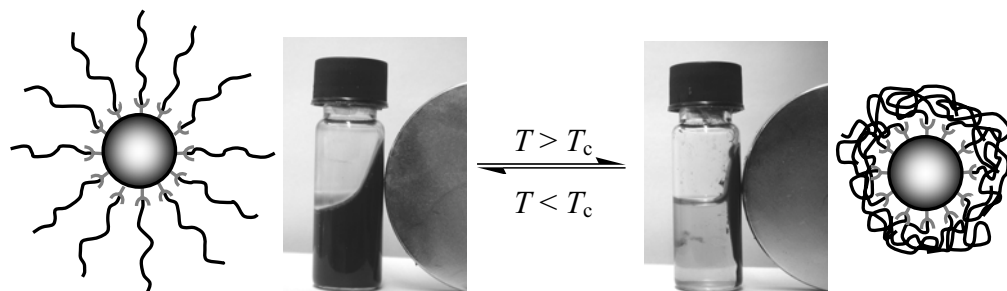
3.3 Thermoflocculation

The polymer brushes on the particle surface serve as dispersion stabilizers when brought to a medium that is a good solvent for the shell. Thus, in aqueous media, the hybrid particles show thermoresponsive behavior: [18] while readily dispersible at low temperature, they reversibly flocculate when the dispersion temperature reaches the T_c of the shell. Phase separation is the consequence.

In Scheme 1, the effect is shown schematically and in photographs of a water-based particle dispersion. Below T_c , the stabilizing effect of the solvated shell is active, and the particles form stable dispersions up to 5 % solid. With strong magnets, the fluid can be manipulated as a whole against gravity, and the particles are not separated from the fluid. In contrast, above the T_c , the shell collapses and leads to particle agglomeration. As a consequence, the particles can be easily separated with a magnet. The phase transition is fully reversible

so that a stable magnetic fluid is reformed after cooling below the LCST of the copolymeric shell.

We determine the cloud point temperatures T_c of the hybrid particles with different shell composition by CPP, and compare the results to the hydrodynamic diameter d_h in water obtained by DLS (s. figure 4).



Scheme 1. Thermoflocculation of magnetic core-shell particles (here: $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA-co-MEMA})_{36}$) in water.

Both methods indicate well-dispersed nanoparticles for all batches at 25 °C. Similar to the model polymers, particle dispersions show a sudden decrease of the transmittance upon heating, while in DLS, we observe a dramatic increase of the hydrodynamic diameter in the same temperature range. Both observations are caused by the agglomeration of the core-shell particles at T_c , and the two methods are in good agreement for all investigated samples.

We extract T_c from the turning points of the CPP graphs, and find a dependence of T_c on the shell composition that is in full accordance to the results of the model polymers (s. Figure 2). A linear relationship between T_c and $\chi_{\text{MEMA,exp}}$ is confirmed, that allows the easy tailoring of the thermoflocculation temperature of core-shell particles by the shell composition.

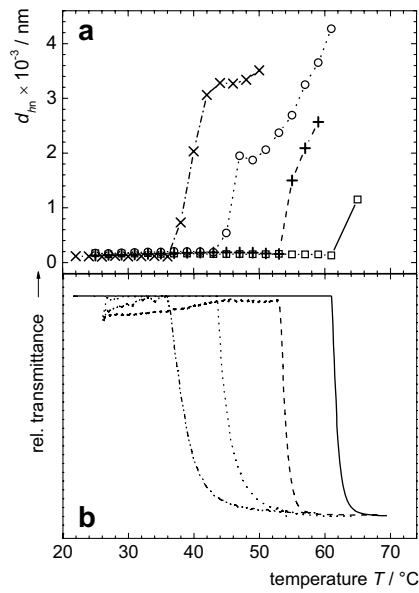


Figure 4. a) Number average hydrodynamic diameter d_n (DLS) vs temperature T ; b) relative transmittance vs temperature T (CPP): compact line: FeO_x@P(OEGMA); dashed line: FeO_x@P(OEGMA-co-MEMA)18; dotted line: FeO_x@P(OEGMA-co-MEMA)36; dashed dotted line, FeO_x@P(OEGMA-co-MEMA)53.

3.4 Behavior in AC Magnetic Fields

The ability of superparamagnetic nanoparticles to locally develop heat when exposed to external AC magnetic fields in the kHz range is of considerable interest to activate physical or chemical processes in the vicinity of the particles, e. g. in hyperthermia [24,25], and for the remote operation of thermoresponsive soft actuators [36]. The heat development occurs due to relaxational processes (Neél and Brown) as well as hysteresis effects that results in considerable losses during the dynamic magnetic response of the materials [21,37,38]

We investigated the behavior of FeO_x@P(OEGMA) dispersions in an oscillating magnetic field (250 kHz, $H = 31.5 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$). The experiments are performed in a vacuum-isolated glass sample container. Different samples with varying magnetite concentrations μ_{FeO_x} of FeO_x@POEGMA nanoparticle based magnetic fluid in water were exposed to the oscillating magnetic field. Via a fiber-optical sensor the fluid temperature T was measured with time t . The resulting heating curves are presented in Figure 5 a.

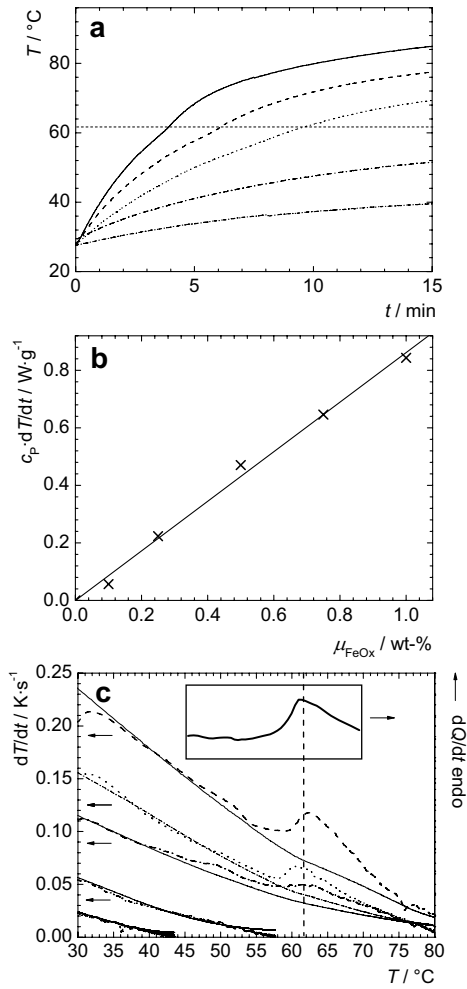


Figure 5. a) Sample temperature T vs. irradiation time t for $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA})$ nanoparticle dispersions in AC magnetic field (300 kHz, $H = 42.6 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$); b) heating power $c_p(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$ from the thermograms vs. FeO_x content of $\text{FeO}_x@P(\text{OEGMA})$ nanoparticle dispersions in water; c) differential magnetocalorimetric thermograms in comparison to logarithmic fits, and to the DSC thermogram. μ_{FeO_x} vs. compact line: $\mu_{\text{FeO}_x} = 1.00 \text{ mass-\%}$; dashed line: $\mu_{\text{FeO}_x} = 0.75 \text{ mass-\%}$; dotted line: $\mu_{\text{FeO}_x} = 0.50 \text{ mass-\%}$; dash-dotted line: $\mu_{\text{FeO}_x} = 0.25 \text{ mass-\%}$; dash-dot-dotted line $\mu_{\text{FeO}_x} = 0.10 \text{ mass-\%}$;

The temperature of all samples increases within minutes to temperatures up to 80 $^{\circ}\text{C}$ depending on the FeO_x content. For each of the resulting thermograms, the early course of the graphs can be sufficiently described as resulting from a heat flux dQ/dt caused by the magnetic particles that is constant over time, and a logarithmic decrease of dT/dt with time due to heat loss to the environment. A higher FeO_x content leads to faster heating.

For each concentration, the heat flux dQ/dt per mass unit of fluid is calculated from the initial slope $(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$

$$\frac{dQ}{dt} = \left(\frac{dT}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \cdot c_p \quad \text{eq. 1}$$

by estimating the specific heat capacity c_p from the composition of the fluid. A graph of dQ/dt over the magnetic mass fraction of the dispersion (by VSM) yields a linear relationship that is in accordance with the heating power as an intrinsic property of the cores for the given field parameters, and a specific heat power $\text{SHP} = 86.5 \text{ W} \cdot \text{g}^{-1}$ of the particle cores can be extracted from the slope.

$$\text{SHP} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{\mu_M} \quad \text{eq. 2}$$

The heat flux generated is strong enough to reach the agglomeration temperature T_c of $61 \text{ }^\circ\text{C}$ in the dispersions at magnetic fractions of $\mu_M = 0.5$ mass-% and higher. In this temperature range, we observe a slight deviation from the expected logarithmic deceleration of the heating rate (figure 5a). We attribute the deviation to the heat consumption caused by the phase transition process. In order to confirm this, we compare the differential thermographs to logarithmic fits (figure 5c). The graphs of two samples with the highest particle content show a distinct deviation from the expected behavior in the temperature range of the LCST, that can be compared to the corresponding DSC thermogram and cloud point photometry of the same material. From DSC, we extract a demixing enthalpy of 5.99 kJ/mol with respect to the monomer units, in agreement with the contribution of one or more H bonds per monomer unit to the thermoreversible solvation process.

The good correspondence of the peak observed in the magnetic thermograms with two independent methods indicates that the energy balance of the phase transition process is of enough impact to be observed in the magnetic heating experiments. Further optimization of this method will give more detailed insight into the processes involved.

4. Conclusion

Multifunctional hydrophilic nanostructures are reported that combine thermoflocculation and magnetic addressability in order to achieve particle dispersions that reversibly flocculate in AC magnetic fields.

The flocculation is due to the LCST behavior of the polymer shell in water, composed of a brush layer of (oligoethylene glycol) methacrylate copolymers. We found that the phase transition temperature depends linearly on the copolymer composition. Therefore the phase transition is predictable and adjustable in a temperature range that is of interest for biomedical applications. Here, it may be of use that the phase separation facilitates the magnetic separation of the nano-objects with low magnetic field gradients.

Under the influence of an AC magnetic field, the aqueous particle dispersions show intrinsic heating, and the enthalpic process of phase transition can be monitored in the magnetic thermograms. By adjusting the transition temperature closer to body temperature, the effect may be used to manipulate particle behavior in biological systems.

5. References

- [1] Bikram M, Gobin AM, Whitmire RE, West JL. *J Controlled Release* 2007; 123(3): 219-227
- [2] Pong FY, Lee M, Bell JR, Flynn NT. *Langmuir* 2006; 22(8): 3851-3857
- [3] Wakamatsu H, Yamamoto K, Nakao A, Aoyagi T. *J Magn Magn Mater* 2006; 302(2): 327-333
- [4] Wang C, Flynn NT, Langer R. *Adv Mater* 2004; 16(13): 1074-1079
- [5] Wang H, Peng M, Zheng J, Li P. *J Colloid Interf Sci* 2008; 326(1): 151-157
- [6] Sun Y, Ding X, Zheng Z, Cheng X, Hu X, Peng Y. *Chem Commun* 2006: 2265-2267
- [7] You Y-Z, Kalebaila KK, Brock SL, Oupicky D. *Chem Mater* 2008; 20(10): 3354-3359

- [8] Edwards EW, Chanana M, Wang D. *J Phys Chem C* 2008; 112(39): 15207-15219
- [9] Schmidt AM. *Colloid Polym Sci* 2007; 285(9): 953-966
- [10] Brazel C. *Pharmaceut Res* 2009; 26(3): 644-656
- [11] Gelbrich T, Feyen M, Schmidt AM. *Macromolecules* 2006; 39(9): 3469-3472
- [12] Kaiser A, Gelbrich T, Schmidt AM. *J Phys: Condens Matter* 2006; 18(38): S2563-S2580
- [13] Schmidt AM. *Macromol Rapid Commun* 2005; 26(2): 93-97
- [14] Ohnishi N, Furukawa H, Hideyuki H, Wang J-M, An C-I, Fukusaki E, Kataoka K, Ueno K, Kondo A. *NanoBiotechnol* 2006; 2: 43-49
- [15] Lai JJ, Hoffman JM, Ebara M, Hoffman AS, Estourne's C, Wattiaux A, Stayton PS. *Langmuir* 2007; 23(13): 7385-7391
- [16] Schild HG, *Porg Polym Sci* 1992; 17(2): 163-249
- [17] Heskins M, Guillet JE. *J Macromol Sci A* 1968; 2(8): 1441-1455
- [18] Chanana M, Jahn S, Georgieva R, Lutz J-F, Bäuml H, Wang D. *Chem Mater* 2009; 21(9): 1906-1914
- [19] Zhang MQ, Desai T, Ferrari M. *Biomaterials* 1998; 19(10), 953-960
- [20] Hu F, Neoh KG, Cen L, Kang E-T. *Biomacromolecules* 2006; 7(3), 809-816

- [21] Hergt R, Dutz S, Müller R, Zeisberger M. *J Phys: Condens Matter* 2006; 18(38): S2919-S2934
- [22] Müller G, Dutz S, Hergt R, Schmidt C, Steinmetz H, Zeisberger M, Gawalek W. *J Magn Magn Mater* 2007; 310(2): 2399-2401
- [23] Glöckel G, Hergt R, Zeisberger M, Dutz S, Nagel S, Weitschies W. *J Phys: Condens Matter* 2006; 18(38): S2935-S2949
- [24] Gneveckow U, Jordan A, Scholz R, Bruss V, Waldofner N, Ricke J, Feussner A, Hildebrandt B, Rau B, Wust P. *Medical Physics* 2004; 31(6): 1444–1451
- [25] Falk MH, Issels RD. *Int J Hyperthermia* 2001; 17(1): 1–18.
- [26] Fan QL, Neoh KG, Kang E-T, Shuter B, Wang S-C. *Biomaterials* 2007; 28(36): 5426-5436
- [27] Lutz J-F, Stiller S, Hoth A, Kaufner L, Pison U, Cartier, R. *Biomacromolecules* 2006; 7(11): 3132-3138
- [28] Lutz J-F, Hoth A. *Macromolecules* 2006; 39(2): 893-896
- [29] Kamigaito M, Ando T, Sawamoto M. *Chem Rev* 2001; 101(12): 3689-3745
- [30] Matyjaszewski K, Shipp DA, Wang J-L, Grimaud T, Patten TE. *Macromolecules* 1998; 31(20): 6836-6840
- [31] Lutz J-F, Weichenhan K, Akdemir Ö, Hoth A. *Macromolecules* 2007; 40(7): 2503-2508
- [32] Becer CR, Hahn S, Fijten MWM, Thijs HM, Hoogenboom R, Schubert US. *J Polym Sci A: Polym Chem* 2008; 46(21), 7138-7147

- [33] Kitano H., Hirabayashi T., Gemmei-Ide M., Kyogoku M. *Macromol Chem Phys* 2004; 205 (12): 1651-1659
- [34] Massart R., Cabuil V. *J. Chem Phys* 1987; 84(7-8): 967-973
- [35] Biver C, Hariharan R, Mays J, Russel WB. *Macromolecules* 1997; 30(6): 1787–1792
- [36] Kaiser A, Winkler M, Krause S, Finkelmann H, Schmidt AM. *J Chem Mater* 2009; 19(4): 538-543
- [37] Neel L, *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences* 1949; 228(1): 64–66
- [38] Brown WF. *J Appl Phys Supplement* 1959; 30: 130



Ferrofluids of magnetic multicore nanoparticles for biomedical applications

Silvio Dutz^{a,*}, Joachim H. Clement^b, Dietmar Eberbeck^c, Thorsten Gelbrich^d, Rudolf Hergt^a, Robert Müller^a, Jana Wotschadlo^b, Matthias Zeisberger^a

^a Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Strasse 9, 07745 Jena, Germany

^b Department Internal Medicine II, University Clinic Jena, Erlanger Allee 101, 07740 Jena, Germany

^c Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Abbestr. 2-12, 10587 Berlin, Germany

^d Institute of Organic Chemistry and Macromolecular Chemistry, Heinrich Heine University, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Available online 21 February 2009

Keywords:

Cellular uptake
Fractionation
Hysteresis
Magnetic loss
Magnetic nanoparticle
Magnetite
Multicore particle
Specific heating power

ABSTRACT

For a variety of magnetically based biomedical applications, it is advantageous to use sedimentation stable suspensions of relatively large ($d > 20$ nm) magnetic core-shell nanoparticles. Water-based suspensions of multicore nanoparticles were prepared by coating of the particles (synthesized by means of a modified alkaline precipitation method) with a carboxymethyl-dextran shell. The resulting ferrofluids were structurally and magnetically characterized. It was found that these fluids show a specific heating power of about 60 W/g ($f = 400$ kHz, $H = 10$ kA/m). This value was increased up to 330 W/g by a simple fractionation method based on centrifugation. Finally, the cellular uptake of the multicore nanoparticles was demonstrated.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

0. Introduction

Magnetic nanoparticles (MNP) are a promising tool for a wide spectrum of magnetically based biomedical applications. For the majority of applications (e.g. hyperthermia, cell separation, and drug targeting), it is advantageous to use aqueous suspensions of relatively large ($d > 20$ nm) magnetic nanoparticles. Unfortunately, MNP of this size show a tendency to form aggregates which results in the sedimentation of the ferrofluid. To solve this problem, so-called multicore nanoparticles (MCNP) were synthesized by a modified alkaline precipitation method. Water-based suspensions of these particles were prepared by coating of the MCNP with a carboxymethyl-dextran (CMD) shell. In a previous work [1] only a weak influence of the CMD shell on the magnetic properties of the coated particles was found. For reasons of biocompatibility only iron-oxide-based MCNP were prepared.

For the medical heating applications of MNP (hyperthermia), the applicable amplitude of the alternating magnetic field is limited to a value of about 15 kA/m due to medical and technical restrictions [2,3]. Therefore, MNP with a comparatively high specific heating power (SHP) at a relatively low field amplitude are needed. It is well known that the SHP is a function of the mean particle diameter of the MNP as well as of the size-distribution width [4,5]. Fractions of different particle diameters were extracted from the prepared fluid by a separation method based

on centrifugation. By this way, for some fractions the SHP could be increased to a higher value than the SHP of the original fluid.

Magnetic core-shell nanoparticles are of growing importance in labelling and separation of cells. Nanoparticles attached to antibodies which are directed against cell surface markers are widely used for magnetic cell separation and allow a specific and high enrichment of the target cells [6,7]. On the other hand, the nanoparticle shell itself could be used for cell-specific interaction [8–10]. Depending on the size of the particles as well as the nature of the shell MNP are attached to the cells or incorporated [11,12]. Small-sized MNP interact with human cells in a cell-type and time-dependant manner, allowing the precise separation of tumor cells from leukocytes [9].

In the present paper, the preparation route of the MCNP is described and structural and magnetic properties of the ferrofluid and the single particles are shown. A fractionation method based on centrifugation as a tool for the increasing of the SHP is investigated. First results for the cellular uptake of the CMD-coated MCNP in tumor cells are given.

1. Methods

1.1. Preparation and fractionation of the ferrofluids

The particles introduced in this paper were prepared similar to the well-known wet chemical precipitation methods [13,14], but using another alkaline medium and a slower reaction velocity.

* Corresponding author. Tel.: +49 3641 206136; fax: +49 3641 206288.
E-mail address: silvio.dutz@ipht-jena.de (S. Dutz).

In detail, a 1 M NaHCO₃ solution was slowly added under permanent stirring to a FeCl₂/FeCl₃ solution (total Fe-concentration: 0.625 M; Fe²⁺/Fe³⁺ ratio = 1/1.3) with a rate of 0.75 ml/min. This procedure was stopped when the pH value reached 8. During this routine, a brownish precipitate was formed. This precipitate was heated to 100 °C for 5 min and iron oxides with a spinel structure were formed under the release of CO₂. To remove excess reaction products from the prepared particles, they were washed with de-ionized water three times.

For the production of sedimentation stable suspensions of the MCNP, the particles were coated with a CMD shell. After washing of the particles the pH value of the dispersed particles was adjusted to pH 2–3 by the addition of diluted HCl. Then the suspension was homogenized by ultrasonic treatment for a few seconds (Sonopuls GM200, Bandelin electronic) and then tempered at 45 °C. An aqueous solution of CMD (initial material: CMD sodium salt, Fluka) with an CMD/MCNP ratio of about $\frac{1}{3}$ was added to the suspension and stirred for 60 min at 45 °C. Finally, the coated particles were washed with de-ionized water to remove the remaining salts.

For the fractionation of the initial MCNP fluid into fractions of different mean particle sizes, 30 ml of this fluid were filled in a cylindrically shaped centrifugation vessel made of glass (sample height \approx 70 mm and diameter \approx 20 mm). The sample was centrifuged in a laboratory centrifuge (Cryofuge 6000, Heraeus Sepatech) at 1000g with a temperature of 20 °C. The sediment was stored and the supernatant was recovered. A portion of the supernatant was centrifuged again with 1500g. This procedure was repeated twice with increasing centrifugal accelerations (2500g, 3000g). In consequence, 4 sediments and 4 supernatants were obtained representing 8 fractions of the MCNP.

1.2. Investigation of cellular uptake

The interaction of the MCNP with human cells was studied with the breast cancer cell line MCF-7. The cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) +10% fetal calf serum. For incubation experiments, adherent cell culture cells were detached with a trypsin/EDTA solution and inoculated with MCNP in PBS/EDTA (2 mmol) for the times indicated. After the treatment, the magnetically labelled cells were separated by MACS (SuperMACS and MS-columns, Miltenyi-Biotec). The efflux was designed as 'negative fraction' and the cells retained in the column as 'positive fraction'. Total cell numbers were estimated by cell counting (Coulter Z2, Beckman-Coulter).

1.3. Structural and magnetic characterization

Hydrodynamic diameters (d_h) of the CMD-coated particles in the ferrofluid were determined by using photon correlation spectroscopy (PCS; HPPS-ET, Malvern Instruments). Dry samples of the fluids were structurally characterized by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM; JSM 6300-F, JEOL), transmission electron microscopy (TEM; JEM 2010FEF, JEOL) and X-ray diffraction (XRD; X'pert-Twin diffractometer, Philips). The mean sizes (d) of the magnetic cores were calculated from measurements of the XRD line width by using the Scherrer method.

For the investigation of the quasistatic parameters, the MCNP in the fluid were immobilized by drying. Minor loops of the dry particles were measured by vibrating sample magnetometry (VSM; Micromag 3900, Princeton Measurement Corporation). By integrating of the area of the measured minor loops, the specific hysteresis losses (SHL) per cycle depending on the field amplitude were calculated. The results were compared with a commercial

sample (iron(III)oxide, gamma, 99+%, AlfaAesar) with high SHL determined in earlier investigations and magnetosomes from magnetotactic bacteria—up till now the particles with the highest SHL at relatively low field amplitudes [15]. The specific heating power was measured by means of magnetic field calorimetry (MFC) at a field amplitude of 10 kA/m and a frequency of 400 kHz. This parameter combination is suitable for hyperthermia treatment [16].

The Brownian relaxation behavior of the MCNP in the fluid was investigated by magneto relaxometry (MRX) [17]. For these measurements, the samples were diluted by de-ionized water (dilution factors from 1:9 to 1:900). A magnetizing field of $H = 1300$ A/m is applied for $t = 1$ s. A total of 450 μ s after switching off the field, a highly sensitive low- T_c -SQUID sensor measures the magnetic induction $B(t)$ at a distance of 10 mm above the sample. The measurement time window is $450 \mu\text{s} \leq t \leq 0.45$ s. From these relaxation curves, the size distribution of hydrodynamic diameters of the CMD-coated particles was calculated by fitting the so-called cluster moment superposition model (CMSM) to the relaxation data [18]. The CMSM describes the relaxation of the magnetic moment of an ensemble of particulate magnetic entities, the magnetic moment of which can relax via the Brownian and Néel mechanism. The distribution $f(d_h, \mu, \sigma)$ of the hydrodynamic diameters d_h with the median diameter μ and the distribution parameter σ is assumed to be a lognormal one. In previous investigations, it was empirically found that the hydrodynamic diameter of the entities with the mean volume is in good agreement with hydrodynamic diameter obtained by PCS [17].

Furthermore, the MCNP were investigated by AC susceptometry (DynoMag, IMEGO) in the frequency range from 1 Hz to 200 kHz at a field amplitude of 0.4 kA/m. The hydrodynamic diameters distribution was determined by fitting the complex susceptibility data to a model that assumes Brownian relaxation of the MCNP.

2. Results

It was found that during the precipitation primary particles with a mean diameter of 14 nm (XRD) were formed. Phase identification by XRD demonstrates that the particles consist of solid solutions (or of a mix) of maghemite and magnetite. These particles form clusters (Fig. 1a) of 40–80 nm (TEM) surrounded by a CMD shell. Clearly, a size distribution of the cluster diameters could be observed (Fig. 1b). The dynamics of the cluster formation as well as their magnetization configuration are yet unknown. For the hydrodynamic diameters of these clusters values of 158 nm (PCS) and 160 nm (AC susceptometry) were determined. These values are affected by a hydrate shell on the CMD layer.

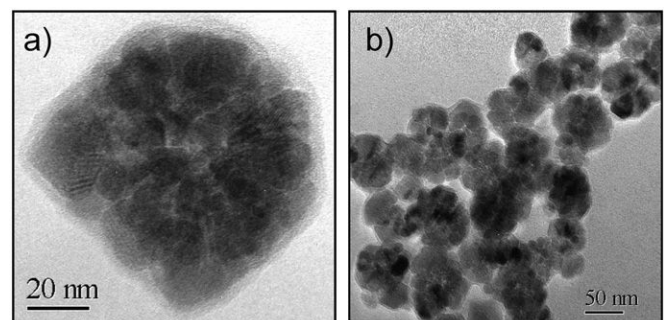


Fig. 1. Typical TEM images of a single cluster (a) and an ensemble of clusters (b). The aggregation of the clusters in Fig. 1b occurs during the sample preparation (drying of the fluid) for TEM imaging.

Immediately after the preparation of the fluid, a sediment consisting of large aggregates is formed. After removal of this sediment, the supernatant shows a high stability against sedimentation over a period of several months.

Due to the size distribution of the clusters, the fractionation of the original fluid based on centrifugation appeared to be useful. Starting from a mean hydrodynamic diameter of 158 nm (PCS) for the original fluid eight fractions with a size range from 50 to 164 nm (PCS) were obtained (Table 1). Because of the very low particle concentration in the fraction with the smallest particles, it was not possible to determine its magnetic parameters. This fraction was excluded from further investigations.

VSM measurements with immobilized particles reveal a thermally blocked behavior of the particles. The clusters of different mean diameters (consisting of primary cores with a nearly constant mean diameter of 14 nm, measured by XRD) show a coercivity depending on the size of the clusters (Table 1). This implies that in this case the magnetic behavior is mainly determined by the cluster size and not by the constant size of the primary cores. As demonstrated earlier [19], the coercivity (H_c) correlates linear with the relative remanence (M_R/M_S). Hence, the applied fractionation method allows the adaption of the relative remanence of the ferrofluid to optimal values for applications based on magnetic attraction, e.g. cell separation or drug targeting.

Table 1
Hydrodynamic diameter (d_h , measured by PCS), fractionation parameters, coercivity (H_c , immobilized particles) and SHP (measured at liquid samples) of the original fluid and of the prepared fractions.

	d_h (nm)	Fractionation parameter	H_c (kA/m)	SHP (W/g)
Original fluid	158	–	3.10	60
Fractions	50	2500 g, supernatant	0.86	–
	61	3000 g, sediment	1.99	274
	82	1500 g, supernatant	2.21	332
	95	2500 g, sediment	2.55	145
	120	1000 g, supernatant	2.60	152
	142	1500 g, sediment	2.68	81
	164	1000 g, sediment	3.33	53

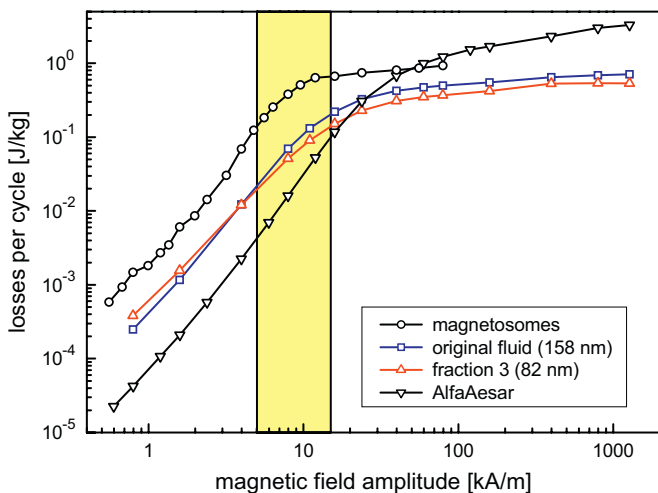


Fig. 2. Dependence of specific hysteresis losses (SHL) of immobilized particles on the field amplitude of minor loops for the original fluid ($d_h = 158$ nm) and the fraction with the highest SHP ($d_h = 82$ nm). For comparison, the curves of magnetosomes and of a commercial sample with high SHL (Iron(III)oxide, gamma, 99%, AlfaAesar) are shown. The marked frame indicates the interesting field range for biomedical heating applications.

In Fig. 2, the field amplitude dependence of SHL per cycle measured by VSM is shown for immobilized particles of the original fluid and the fraction with the highest calorimetrically measured SHP in the interesting field amplitude range from 5 to 20 kA/m. Additionally the curves of magnetosomes [15] and a commercial sample (Alfa Aesar) with high SHL are presented.

The SHP of the fluid particles was determined by the magnetic field calorimetry measurements. The original fluid shows a moderate SHP of about 60 W/g (at 400 kHz and 11 kA/m). This value was increased up to 330 W/g for the fraction with $d_h = 82$ nm (PCS, Table 1). For this fraction, hydrodynamic diameters of 83 and 84 nm were determined by AC susceptometry and MRX, respectively. While the moderate SHP of the original ferrofluid correlates relatively well with the hysteresis losses measured by VSM, the fraction with $d_h = 82$ nm shows much larger losses determined by calorimetry than extrapolated from hysteresis. This may be explained by the high frequency of calorimetric measurements in comparison to the nearly six orders of magnitude slower VSM measurements. The sample with the relatively small mean size probably contains a considerable

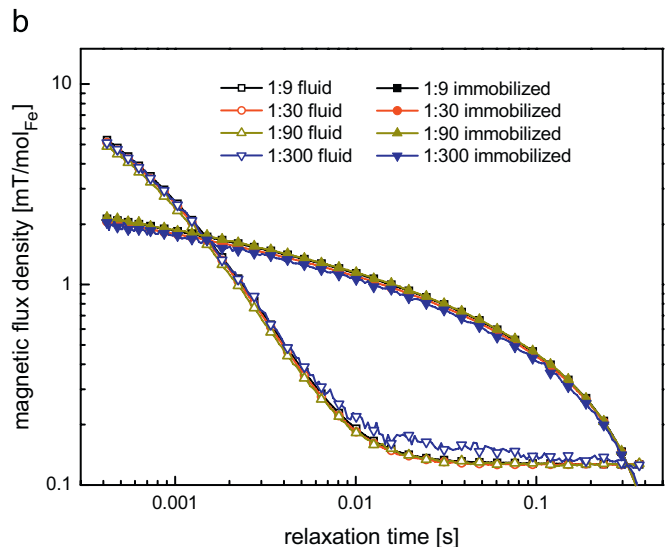
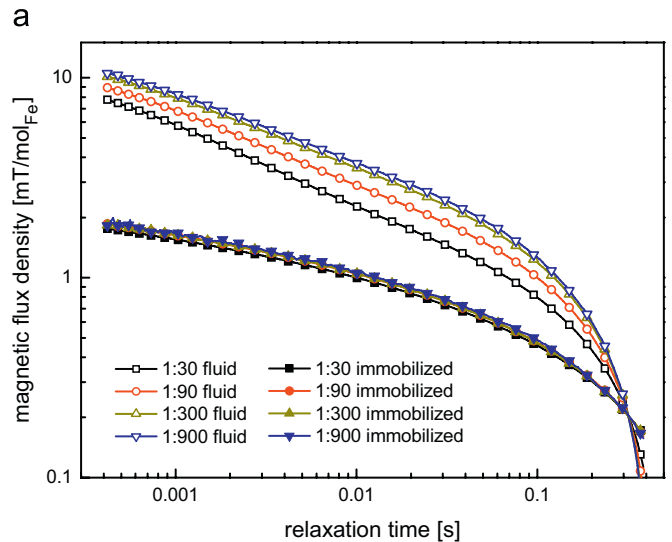


Fig. 3. MRX curves of the original fluid (a) and the sample with the highest SHP (b). Curves for measurements with fluids (open symbols) as well as immobilized particles (full symbols) are shown. The dilution factor ferrofluid to de-ionized water was changed from 1:9 to 1:900.

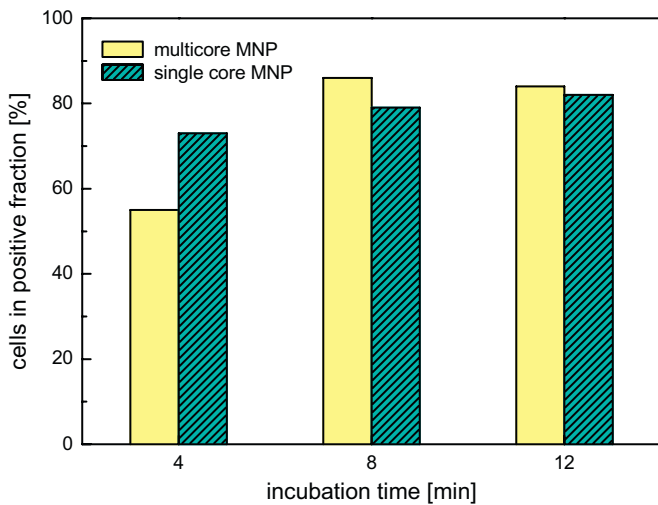


Fig. 4. Uptake of MCNP in MCF-7 tumor cells as a function of the incubation time. For comparison data of single core MNP obtained in an earlier investigation [20] are shown (hatched bars).

amount of smaller particles which relax during the quasistatic VSM measurement contributing negligibly to hysteresis.

After dilution with de-ionized water, the particles of the original fluid show a tendency to aggregation due to the relative high amount of larger particles in the fluid. Accordingly, the relaxation curves in MRX measurements (Fig. 3a) show a shift of the amplitude for different dilutions, but no changes for the investigation of immobilized particles. For the fraction with the highest SHP, no significant changes of their properties after strong dilution by de-ionized water and BSA buffer were found (Fig. 3b). This means a good stability against sedimentation. Due to the wider cluster size distribution and a higher amount of larger clusters in the original fluid, this sample shows a slower Brownian relaxation than the sample with the highest SHP. For both samples, a relatively high relaxation amplitude was determined by MRX compared to the values of commercial ferrofluids.

The interaction of the MCNP with human cells was analyzed with the breast cancer cell line MCF-7. The tumor cells are labelled rapidly with the nanoparticles. Within 4 min more than 50% of the cells are detected in the positive fraction (Fig. 4). Prolonged incubation lead to an increase of cell content in the positive fraction up to 85%. These data are in good correlation to previous results with CMD-coated MNP with a mean diameter of 10 nm [20]. The data show that MCNP are a suitable tool for cell separation.

3. Discussion

In the XRD measurements, the peak position of the (440) reflex was used to distinguish between the magnetic phases maghemite and magnetite. The obtained diffractogram show a relatively broad single peak between the theoretical angles for maghemite and magnetite. This means that the resulting particles presumably consist of solid solutions of both phases (one resulting peak). However, it is also possible that particles consist of a mix of maghemite and magnetite particles (two separated peaks). In principle, a differentiation between these both cases is feasible, but due to the peak broadening of the small particles, a superposition of both peaks is possible. For a better determination of the phase composition, another analytic method is needed, e.g. Moessbauer spectroscopy.

The SHL of the immobilized particles measured by VSM are relatively high in comparison to commercial samples. However, the curves of the original fluid as well as all fractions show a similar course of SHL over the field amplitude which does not reflect the strong differences between the fractions and the original fluid observed for the SHP of the fluid samples. Hence, the SHP values are affected by another relaxation mechanism beside the hysteresis losses—the Brownian relaxation. For heating applications of the MCNP in medicine (hyperthermia), the Brownian losses are mainly suppressed due to a relatively high degree of binding of the particles to the tumor tissue which means a diminishing of the SHP [21] that may result in an insufficient temperature increase in the tumor region [22]. The effect of particle immobilization on the SHP of MCNP has to be investigated in more detail in further experiments.

Investigations on the cellular uptake of the MCNP show that these particles interact with tumor cells in a similar way as single core nanoparticles with similar core diameters do. Initial analysis was carried out with breast cancer cell line cells only, thus further studies with other cell types are needed in order to assess the potential of MNCP for differentiation of tumor cells from other cells, e.g. leukocytes. The amount of adsorbed or incorporated particles and thus the magnetic moment of the magnetic material physically connected to the cell is sufficient for a magnetic separation of the cells with commercial separation units.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FKZ: ZE825/1-1, CL202/1-2, SCHM1747/2-1, TR408/4-1) and by the BMBF (FKZ-13N9150). They thank Ch. Oestreich from the Technical University Bergakademie Freiberg for TEM imaging and Ch. Schmidt from the IPHT Jena for XRD investigations. We highly appreciate the AC susceptometry analysis carried out at the Imego Institute in Goteborg by Ch. Johansson, K. Petterson and A. Prieto Astalan.

References

- [1] S. Dutz, W. Andrä, R. Hergt, et al., *J. Magn. Magn. Mater.* 311 (2007) 51.
- [2] I.A. Brezovich, *Med. Phys. Mon.* 16 (1988) 82.
- [3] R. Hergt, W. Andrä, *Magnetism*, in: W. Andrä, H. Nowak (Eds.), *Medicine—Second Edition*, Wiley-VCH, Berlin, 2007.
- [4] R. Hergt, R. Hiergeist, M. Zeisberger, et al., *J. Magn. Magn. Mater.* 280 (2004) 358.
- [5] G. Glöckl, R. Hergt, M. Zeisberger, et al., *J. Phys.: Condens. Matter* 18 (2006) 2935.
- [6] S. Miltenyi, W. Muller, W. Weichel, et al., *Cytometry* 11 (2) (1990) 231.
- [7] I. Safarik, M. Safarikova, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 722 (1–2) (1999) 33.
- [8] A.K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* 26 (18) (2005) 3995.
- [9] J.H. Clement, M. Schwalbe, N. Buske, et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132 (2006) 287.
- [10] A.H. Lu, E.L. Salabas, F. Schuth, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46 (8) (2007) 1222.
- [11] K. Wagner, A. Kautz, M. Röder, et al., *Appl. Organomet. Chem.* 18 (2004) 514.
- [12] K. Aurich, M. Schwalbe, J.H. Clement, et al., *J. Magn. Magn. Mater.* 311 (2007) 1.
- [13] S.E. Khallafalla, G.W. Reimers, *IEEE Trans. Magn.* 16/2 (1980) 178.
- [14] R. Massart, *IEEE Trans. Magn.* 17 (1981) 1247.
- [15] R. Hergt, R. Hiergeist, M. Zeisberger, et al., *J. Magn. Magn. Mater.* 293 (2005) 80.
- [16] I. Hilger, W. Andrä, R. Hergt, et al., *Radiology* 218 (2001) 570.
- [17] D. Eberbeck, F. Wiekhorst, U. Steinhoff, et al., *J. Phys.: Condens. Matter* 18 (2006) 2829.
- [18] D. Eberbeck, C. Bergemann, F. Wiekhorst, et al., *Magnetohydrodynamics* 41 (2005) 305.
- [19] S. Dutz, R. Hergt, J. Mürbe, et al., *J. Magn. Magn. Mater.* 308 (2007) 305.
- [20] M. Schwalbe, N. Buske, M. Vetterlein, et al., *Z. Phys. Chem.* 220 (2006) 125.
- [21] J.-P. Fortin, F. Gazeau, C. Wilhelm, *Eur. Biophys. J.* 37 (2008) 223.
- [22] R. Hergt, S. Dutz, *J. Magn. Magn. Mater.* 311 (2007) 187.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 02.11.2009

(Thorsten Gelbrich)