

Funktionalisierung von Nanodiamanten für Wirkstofftransport und Knochenersatzmaterialien



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Thilo Waag

aus Würzburg

Würzburg 2013

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

21.11.2013

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: Prof. Anke Krüger
2. Gutachter: Prof. Tanja Schirmeister

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: Prof. Anke Krüger
2. Prüfer: Prof. Tanja Schirmeister
3. Prüfer: Prof. Jürgen Seibel

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

14.03.2014

Doktorurkunde ausgehändigt am

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2009 bis Juni 2013 am
Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Anke Krüger für die Möglichkeit bedanken, ein interessantes, interdisziplinäres Forschungsthema bearbeiten zu dürfen.

Dank geht auch an alle meine Kollegen für das angenehme Arbeitsklima und die vielen lustigen Abende außerhalb des Labors.

Weiterhin danken möchte ich meinem Auszubildenden Nicolas und meinen Bachelor Studenten Lena, Matthias und Martin, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Danken möchte ich auch all meinen Freunden. Sie waren immer für mich da.

Ich danke Franzi für das Korrekturlesen, hast was gut bei mir.

Besonderer Dank geht an meine Eltern.
Ohne ihre Unterstützung wäre das nie was geworden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Nanodiamant	1
1.1.1	<i>Herstellung von Nanodiamant</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Struktur und Eigenschaften von Nanodiamant</i>	<i>3</i>
1.1.3	<i>Übersicht über Funktionalisierungsmöglichkeiten der Diamantoberfläche</i>	<i>6</i>
1.1.4	<i>Medizinische und biologische Anwendungsmöglichkeiten von Nanodiamanten</i>	<i>7</i>
1.2	Nanopartikel-Wirkstoff-Konjugate	10
1.3	Übersicht über verwendete Wirkstoffe	11
1.3.1	<i>Isoniazid</i>	<i>11</i>
1.3.2	<i>Quercetin</i>	<i>12</i>
1.3.3	<i>Curcumin</i>	<i>13</i>
1.3.4	<i>Amphotericin B</i>	<i>13</i>
1.3.5	<i>Aziridinyl-Inhibitoren</i>	<i>14</i>
1.4	Das Vascubone Projekt	16
2	Zielsetzung	18
3	Hauptteil	19
3.1	Immobilisierung von Wirkstoffen	19
3.1.1	<i>Säurelabiles Linker-System</i>	<i>19</i>
3.1.2	<i>Deagglomeration von Nanodiamant</i>	<i>22</i>
3.1.3	<i>Funktionalisierungsreaktionen</i>	<i>23</i>
3.1.4	<i>Immobilisierung von Isoniazid</i>	<i>28</i>
3.1.5	<i>Quercetin</i>	<i>33</i>
3.1.6	<i>Curcumin</i>	<i>37</i>

3.1.7	<i>Amphotericin</i>	39
3.1.8	<i>Aspartatprotease-Inhibitor</i>	43
3.2	Immobilisierung von Proteinen	48
3.2.1	<i>Lysozym</i>	50
3.2.2	<i>Angiopoietin</i>	53
3.2.3	<i>BMP-2</i>	55
3.3	Immobilisierung von Farbstoffen	59
3.3.1	<i>Oregon Green</i>	59
3.3.2	<i>Darstellung mehrfach funktionalisierter Nanodiamanten am Beispiel der Immobilisierung von Oregon Green und TAMRA</i>	63
3.4	Immobilisierung eines Wirkstoffes und eines Farbstoffes ...73	
3.5	Sonstige Funktionalisierungen	81
3.5.1	<i>Amin-Funktionalisierung</i>	81
3.5.2	<i>Funktionalisierung von Nanodiamant mit langen Alkylketten</i>	83
3.5.3	<i>Oxidation von Nanodiamant</i>	86
3.6	Abspaltungsexperimente	88
3.6.1	<i>Isoniazid</i>	89
3.6.2	<i>Curcumin</i>	95
3.6.3	<i>Amphotericin</i>	97
4	Zusammenfassung und Ausblick	101
5	Summary and Outlook	108
6	Experimenteller Teil	114
6.1	Verwendete Chemikalien	114

6.2	Verwendete Geräte und Analysemethoden	115
6.2.1	<i>Arbeitsgeräte</i>	115
6.2.2	<i>Analysegeräte</i>	116
6.2.3	<i>Chromatographische Methoden</i>	118
6.3	Release Experimente	119
6.3.1	<i>Herstellung der PBS-Pufferlösungen</i>	119
6.3.2	<i>Experimente zur Freisetzung von Wirkstoff</i>	119
6.4	Synthese organischer Verbindungen	120
6.5	Herstellung funktionalisierter Nanodiamantpartikel	125
6.5.1	<i>Aufarbeitung von Nanodiamantproben</i>	125
6.5.2	<i>Thermische Behandlung von Nanodiamant</i>	125
6.5.3	<i>Oxidation von Nanodiamant</i>	126
6.5.4	<i>Vermahlung von Nanodiamant</i>	127
6.5.5	<i>Herstellung arylierter Nanodiamantpartikel</i>	128
6.5.6	<i>Herstellung alkylierter Nanodiamanten</i>	131
6.5.7	<i>Herstellung orthogonal funktionalisierter Nanodiamantpartikel</i>	134
6.5.8	<i>Herstellung von Nanodiamantpartikeln mit säurelabilen Linkersystemen</i>	136
6.6	Immobilisierung organischer Substanzen	139
6.6.1	<i>Immobilisierung von Wirkstoffen</i>	139
6.6.2	<i>Immobilisierung von Farbstoffen</i>	147
6.6.3	<i>Immobilisierung von Proteinen</i>	151
7	Abkürzungsverzeichnis	154
8	Literaturverzeichnis	157

1 Einleitung

1.1 Nanodiamant

Nanopartikel verschiedenster Art werden derzeit auf ihre Anwendungsmöglichkeiten im biomedizinischen Bereich hin untersucht. Ein vielversprechender Kandidat für derlei Anwendungen ist der sogenannte Nanodiamant. Im Gegensatz zu vielen anderen Nanomaterialien, besitzt Nanodiamant so gut wie keine toxischen Eigenschaften.^[1,2,3] Zusätzlich erlaubt die reichhaltige Oberflächenchemie von Nanodiamant eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Anbindung von biologisch aktiven Substanzen wie beispielsweise Proteinen, Enzymen oder Wirkstoffen.^[4,5,6] Durch spezielle Behandlungsmethoden können fluoreszierende Defektstellen im Diamantmaterial generiert werden, wodurch sich weitere Anwendungsmöglichkeiten wie z.B. Untersuchungen zur Biodistribution oder Aufnahme in Zellen ergeben.^[7,8] Ein letzter, nicht unwichtiger Vorteil gegenüber anderen Nanomaterialien sind die leichte Verfügbarkeit und die geringen Kosten von Nanodiamant, da dieser inzwischen in großen Mengen industriell hergestellt wird.^[9]

1.1.1 Herstellung von Nanodiamant

Fast alle Herstellungsmethoden von Nanodiamant arbeiten mit hohen Drücken und Temperaturen, um die für die Bildung von Nanodiamant benötigten Bedingungen bereitzustellen.^[10] Da in dieser Arbeit nur Detonationsnanodiamanten verwendet wurden, beschränkt sich dieses Kapitel ausschließlich auf deren Herstellungsmethode.

Bereits in den sechziger Jahren entdeckten russische Wissenschaftler die Möglichkeit, Nanodiamanten mittels kontrollierter Detonation in einem abgeschlossenen Behälter herzustellen.^[11] Abbildung 1 zeigt den typischen Verlauf der Detonationssynthese.

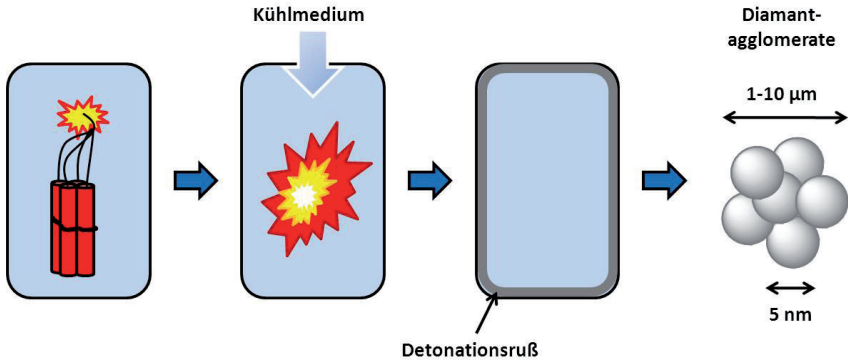


Abb. 1: Schematische Darstellung der Synthese von Detonationsnanodiamant.

Die bei der Detonation innerhalb des Reaktors auftretenden Temperaturen von mehr als 3000 K und Drücken von 20 - 30 GPa schaffen die zur Bildung von Nanodiamantpartikeln nötigen Bedingungen. Da der Explosivstoff selbst als Kohlenstoffquelle dient, benötigt diese Herstellungsmethode keine weiteren Kohlenstoffmaterialien oder Katalysatoren.^[12] Es eignen sich jedoch nur Explosivstoffe mit einer negativen Sauerstoffbilanz, da sonst nicht genügend elementarer Kohlenstoff gebildet würde, um zufriedenstellende Diamantausbeuten zu gewährleisten. Eine weitere Anforderung an den Explosivstoff ist ein hoher Energieinhalt, um die für die Diamantbildung nötigen Temperaturen zu erreichen. Meist wird eine Mischung zweier Explosivstoffe verwendet, z.B. TNT (2,4,6-Trinitrotoluol) wegen seines niedrigen Sauerstoffanteils und Hexogen (Cyclo-1,3,5-trimethylen-2,4,6-trinitramin) wegen seines hohen Energieinhalts.^[13]

Nach der Detonation nimmt die Temperatur im Gegensatz zum Druck nur langsam ab, wodurch sich bereits gebildeter Diamant in thermodynamisch günstigeres graphitisches Material umwandelt. Dieser Prozess wird durch geeignete Kühlmethoden, wie z.B. das Einleiten von Inertgasen (dry synthesis) oder die Zugabe von Eis (wet synthesis), abgemildert.^[14] Bis zu 10 % des eingesetzten Kohlenstoffes kann als Detonationsruß, welcher sich an der Reaktorwand niederschlägt, isoliert werden. Dieser Ruß enthält je nach Reaktionsbedingungen 60-80 % Nanodiamant.^[15] Es folgen nun verschiedene Schritte zur Aufreinigung des gewonnenen Materials, wie z.B.

Sieben, magnetische Separation und Behandlung mit konzentrierten Mineralsäuren, um metallische Verunreinigungen und amorphen Kohlenstoff zu entfernen.^[16]

Die bei dieser Methode hergestellten Nanodiamant-Primärpartikel besitzen eine Größenverteilung von 3 - 5 nm.^[17] Aufgrund der kurzen Dauer der für die Bildung der Diamantpartikel verantwortlichen Druckwelle, ist ein Wachstum zu größeren Kristalliten nicht möglich. Auch die untere Grenze der Partikelgröße wird durch die Bedingungen dieser Synthesemethode vorgegeben, denn unterhalb von 2 nm kommt es zur Regraphitisierung und somit eher zur Bildung von Kohlenstoffzwiebeln und Fullerenen.^[18] Solche künstlich erzeugten Nanodiamantpartikel weisen einzigartige chemische und physikalische Eigenschaften auf, welche im Anschluss genauer erläutert werden sollen.

1.1.2 Struktur und Eigenschaften von Nanodiamant

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Nanodiamant werden, im Gegensatz zu makroskopischem Diamant, hauptsächlich durch dessen Oberflächenbeschaffenheit bestimmt. Bei einer Größe von 3 - 5 nm befinden sich z.B. 20 - 30 % der Kohlenstoffatome an dessen Oberfläche und wirken somit entscheidend auf chemische Reaktivität und Dispersionseigenschaften ein.^[19] Im Folgenden werden nun sowohl die Eigenschaften des Diamantkerns als auch die der Diamantoberfläche und die Wechselwirkung der Partikel untereinander behandelt.

Die sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatome im Diamantkern bilden, genau wie im makroskopischen Diamanten, tetraedrisch umgeben von vier weiteren Kohlenstoffatomen, eine entweder kubische oder hexagonale Gitterstruktur mit einem Atomabstand von 154 pm. Letztere tritt bei Detonationsnanodiamant jedoch nur selten auf.^[20] Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu makroskopischem Diamant, besitzt Nanodiamant einen vergleichbaren, wenn auch etwas geringeren Härtegrad.^[21] Auch die sehr hohe Wärmeleitfähigkeit haben beide Materialien gemeinsam.^[22] Bei der elektrischen Leitfähigkeit gibt es jedoch Unterschiede. Wo makroskopischer Diamant mit einer Bandlücke von 5.5 eV einen hervorragenden Isolator darstellt, zeigt Nanodiamant je nach Beschaffenheit, z.B. Graphitisierungsgrad oder Fremdatomen im Gitter, Bandlücken von etwa 3.5 eV.^[23,24]

Fremdatome und Gitterdefektstellen können ganz allgemein die elektrischen und optischen Eigenschaften von Nanodiamant stark beeinflussen. Ein Beispiel dafür stellt das sog. NV-Zentrum (*nitrogen vacancy centre*) dar. Es besteht aus einem Stickstoffatom, welches den Platz eines Kohlenstoffatoms im Diamantgitter einnimmt, einer benachbarten Fehlstelle und besitzt C_{3v} Symmetrie, mit einer Symmetrieachse entlang der kristallographischen [111] Achse (siehe Abb. 2).^[25,26]

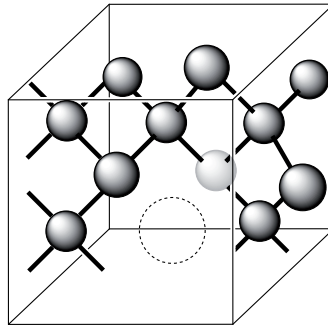


Abb. 2: Teil eines Diamantgitters mit NV-Zentrum. Der Kreis symbolisiert die Fehlstelle, das Stickstoffatom ist hellgrau eingefärbt.

Regt man dieses NV-Zentrum mit Licht einer Wellenlänge von 532 nm an, fluoresziert es im roten und infraroten Bereich. Die ZPL (*zero phonon line*) liegt dabei, im Falle des NV-Zentrums, bei 637 nm.^[27] Im Gegensatz zu gewöhnlichen Farbstoffen zeigt die Fluoreszenz jedoch keinerlei Ausbleichen (bleaching). Dieses Verhalten ist gerade in medizinischen und biologischen Untersuchungen von großem Nutzen, da die konstante Fluoreszenz auch Langzeitexperimente zulässt. Künstlich erzeugt werden diese NV-Zentren durch Bestrahlung des Diamantmaterials mit Elektronen, Protonen oder Ionen und anschließender Erhitzung auf 700 °C und höher.^[28,29] Mit Hilfe der Bestrahlung werden Fehlstellen im Gitter erzeugt, welche unter Erhitzung zu den Stickstoffatomen wandern und das NV-Zentrum bilden. Die Stickstoffatome im Gitter stammen wie der Kohlenstoff auch direkt aus dem Explosivstoff.

Die funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Nanodiamantpartikel können aufgrund verschiedener Herstellungs-, Kühlungs- und Aufreinigungsmethoden mitunter stark variieren, häufig dominieren jedoch sauerstoffhaltige Gruppen

wie z.B. Hydroxyl-, Ether- und Carboxylfunktionen.^[30] Auch Doppelbindungen dienen zur Absättigung der Oberflächenatome.^[31]

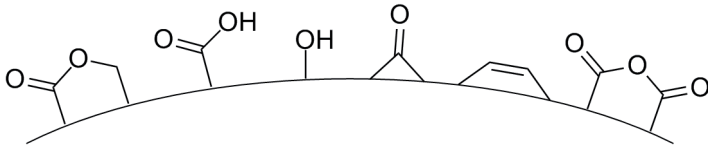


Abb. 3: Schematische Darstellung der inhomogenen Oberflächenfunktionalisierung von Nanodiamant.

Neben elektrostatischen Wechselwirkungen führt die inhomogene Oberflächenfunktionalisierung sowohl durch intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken als auch durch kovalente Bindungen zu einer starken Agglomeratbildung (Abb. 4). Auch graphitisches Material, das bei der Nanodiamantsynthese entsteht, umschließt die Primärteilchen und bildet sog. *core aggregates*.^[32]

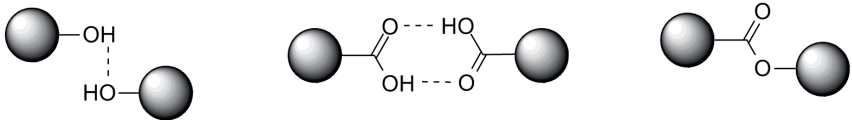


Abb. 4: Entstehung von Nanodiamantagglomeraten durch Wasserstoffbrücken und kovalente Bindungen.

Zur Deagglomeration der Nanodiamanten wurden etliche Verfahren entwickelt. So gelingt eine Deagglomeration durch Vermahlung von Detonationsnanodiamant mit Hilfe einer Rührwerkskugelmühle.^[32] Beim sog. BASD-Verfahren (*bead-assisted sonic disintegration*) werden die Diamantagglomerate durch Behandlung mit intensivem Ultraschall und Zirkoniumdioxid-Mahlkörpern aufgebrochen.^[33] Eine weitere Möglichkeit ist die Behandlung durch Ultraschall mit gleichzeitiger chemischer Funktionalisierung der Diamantpartikel.^[34]

Erst nach einer erfolgreichen Deagglomeration können Nanodiamantpartikel mit Hilfe verschiedener Methoden weiter funktionalisiert werden.

1.1.3 Übersicht über Funktionalisierungsmöglichkeiten der Diamantoberfläche

Das übliche Vorgehen bei der Funktionalisierung von Nanodiamant umfasst zunächst eine Vorbehandlung: die Homogenisierung der Oberfläche. Diese Vorbehandlung beinhaltet z.B. die Oxidation, Reduktion, Halogenierung, Hydrierung oder Graphitisierung der Oberfläche.

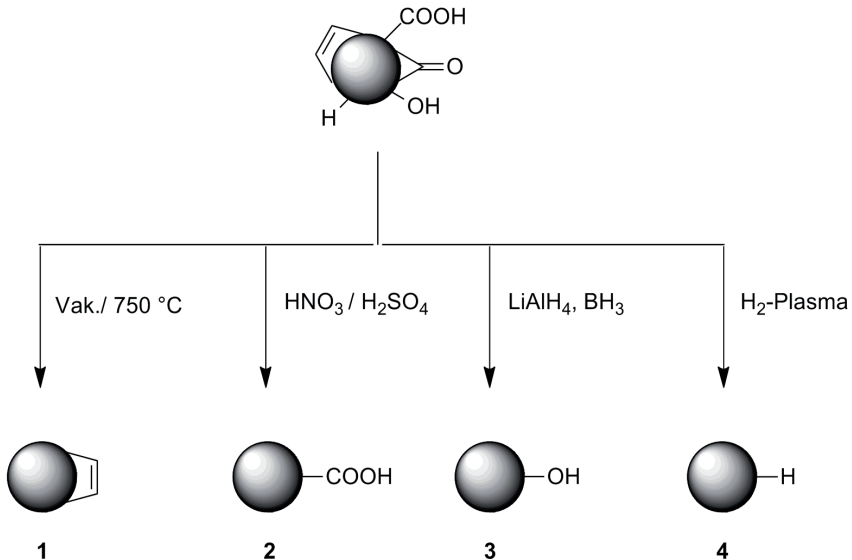


Abb. 5: Verschiedene Methoden zur Homogenisierung der Nanodiamantoberfläche.

So führt das Ausheizen des Diamantmaterials im Vakuum zum Verlust der durch die Diamantsynthese entstandenen sauerstoffhaltigen Gruppen und ermöglicht eine Veränderung der Oberfläche hin zu verschiedenartigen Doppelbindungssystemen.^[35] Diese sp²-hybridisierten Bereiche können sowohl als isolierte Doppelbindungen als auch als gekrümmte, aromatische Systeme bis hin zu graphenartigen Strukturen vorliegen. Je nach Höhe der Temperatur und Dauer der Homogenisierungsmethode kann die Ausdehnung der graphitischen Strukturen stark variieren. So wird bei einer Temperatur von 1400 °C nicht nur die gesamte Oberfläche des Diamanten, sondern auch weiter innen gelegene Schichten graphitisiert. Man spricht bei diesem Material dann von sog. Nanozwiebeln.^[36]

Durch nasschemische Behandlung mit oxidierenden, konzentrierten Mineralsäuren, wie z.B. ein Gemisch aus Salpeter- und Schwefelsäure, kann eine zumindest teilweise homogenisierte Oberfläche mit Carboxylgruppen erhalten werden.^[37]

Die so generierten funktionellen Gruppen können nun genutzt werden, um verschiedene Linkersysteme auf der Nanodiamantoberfläche zu immobilisieren. So können Carboxylgruppen über klassische Amidkupplungsreaktionen mit funktionellen Linkern verknüpft werden.^[38] Auch ist es möglich, die weiter oben bereits erwähnten gekrümmten, sp^2 -hybridisierten Bereiche analog zu den in der Fullerenchemie verwendeten Reaktionen zu funktionalisieren.^[34] Die Fülle der möglichen Funktionalisierungs- und Immobilisierungs-Reaktionen ist dementsprechend umfangreich und wächst beständig weiter. In letzter Zeit steht vor allem die Suche nach Anbindungsmöglichkeiten für biologisch aktive Moleküle im Fokus der Wissenschaft, da die Ansprüche an Materialien für den Einsatz im biologisch medizinischen Bereich immer weiter steigen.

1.1.4 Medizinische und biologische Anwendungsmöglichkeiten von Nanodiamanten

Einer der Hauptgründe für die groß angelegte Suche nach biologisch medizinischen Anwendungsmöglichkeiten von Nanodiamant ist dessen geringe Toxizität. Diese Eigenschaft wurde in den vergangenen Jahren wiederholt in unterschiedlichsten Experimenten bestätigt.

So wurden toxikologische Untersuchungen an Nervenzellen und Makrophagen durchgeführt, die mit verschiedenen funktionalisierten Nanodiamanten inkubiert wurden. Weder Schäden an der mitochondrialen Membran noch an der Cytoskelettstruktur konnten beobachtet werden.^[39] Verschiedene Kohlenstoffnanomaterialien, unter anderem auch Nanodiamant, wurden auf ihre Toxizität gegenüber HeLa Zellen hin untersucht. Nanodiamant wurde nicht nur am besten von den Zellen aufgenommen, sondern zeigte auch die geringste toxische Wirkung.^[40] Auch bei Tierversuchen wurden die biokompatiblen Eigenschaften von Nanodiamant bestätigt. So führte eine mehrmonatige Fütterung einer wässrigen Nanodiamantdispersion bei Ratten weder zu einer erhöhten Sterberate,

noch zu einer Veränderung der inneren Organe.^[41] Die intravenöse Injektion von 50 mg Nanodiamant zeigte bei Hasen nur geringe Veränderung der Blutwerte, die Anzahl der roten Blutkörperchen wurde dabei nicht verringert.^[42] Die geringe Toxizität der Nanodiamanten lässt viele medizinische Anwendungsmöglichkeiten zu, die im Anschluss diskutiert werden.

Durch die Immobilisierung eines Muskel Adhesiv Proteins (MAP) auf der Nanodiamantoberfläche gelang es bei Hasen eine Immunantwort zu generieren, welche beim üblichen Vorgehen nach Freund ausbleibt.^[43] MAP kann auf diese Weise durch eine auf Antikörper basierte Methode aufgereinigt werden und anschließend in der Chirurgie als Adhesiv eingesetzt werden. Jedoch lässt sich diese Technik auch auf andere Antigene übertragen, die normalerweise keine Immunantwort auslösen und könnte so eines Tages neuartige Impfungen ermöglichen.

Verschiedene Untersuchungen bestätigen die nützlichen Eigenschaften von Nanodiamant in medizinischen Implantaten. So zeigen z. B. Nervenzellen auf mit Nanodiamant beschichteten Substraten nicht nur ein gutes Wachstum, sondern auch die Ausbildung eines funktionalen, neuronalen Netzwerkes.^[44] Die Einbettung von Nanodiamanten in eine biologisch abbaubare PLLA Matrix (poly-L-Lactonsäure) erhöht dessen Härte und Zugfestigkeit, die dann mit natürlichem Knochenmaterial vergleichbar ist.^[45] Diese Eigenschaften können durch die Reichhaltigkeit der Oberflächenchemie der Nanodiamantpartikel noch weiter verbessert und auf das jeweilige Gebiet angepasst werden.

Großes Interesse besteht auch an der möglichen Verwendung von Nanodiamantpartikeln als Wirkstofftransporter. Auch hier stehen wieder ihre biokompatiblen Eigenschaften, aber auch ihre gute Dispergierbarkeit und chemische Funktionalisierbarkeit im Vordergrund. Die Möglichkeit, nicht nur den Wirkstofftransport zu übernehmen, sondern auch wegen der vorher erwähnten Fluoreszenz, durch optische Bildgebung die genauen Aufenthaltsorte der Partikel zu bestimmen, macht Nanodiamant besonders interessant. Über Adsorption mit dem Krebsmedikament Doxorubicin beladene Nanodiamantpartikel zeigten im Mausmodell eine bessere Wirkung an Brust- und Lebertumoren als der freie Wirkstoff. Außerdem wurden weit weniger toxische Folgen wie z.B. Myelosuppression

beobachtet, welche bei dieser Art von Krebstherapie normalerweise festgestellt werden.^[46] Aber auch kovalent an Nanodiamantpartikel angebundene Wirkstoffe wurden auf ihre Anwendungsmöglichkeit hin untersucht. So zeigte das oft in der Krebs-Chemotherapie eingesetzte Medikament Paclitaxel, über Amidbindung verknüpft mit der Diamantpartikeloberfläche, eine gute Wirkung gegen menschliche Lungentumorzellen, ebenfalls mit einer höheren Effektivität als der freie Wirkstoff.^[47] Eine Vielzahl weiterer Wirkstoffe, Anbindungsarten und Einsatzgebiete können noch untersucht und eingesetzt werden.

1.2 Nanopartikel-Wirkstoff-Konjugate

Neben Liposomen, Emulsionen und Dendrimeren eignen sich Nanopartikel hervorragend als Wirkstofftransport-Systeme. Der Vorteil gegenüber anderen Systemen ist die hohe Wirkstoffbeladung, Langzeitstabilität, sowie kostengünstige Produktion der Partikel.^[48] Dabei werden die Wirkstoffe entweder eingekapselt, auf der Partikeloberfläche adsorbiert oder fest angebunden. Der Vorteil dieser Art der Applikation ist die bessere Löslichkeit und Adressierung (*targeting*) der Wirkstoffe hervorgerufen durch die Nanosysteme.

Gerade im Bereich der Krebstherapie wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl an Nanopartikel-Wirkstoff-Konjugaten entwickelt. Zum Beispiel zeigten mit Doxorubicin beladene Siliciumpartikel (240-360 nm)^[49] und Goldpartikel (30 nm)^[50] eine gute Wirkung gegen multiresistente MCF-7 Tumorzellen. Durch den Transport mit Hilfe der Nanopartikel wird der Mechanismus der Zellen ausgehebelt, welcher normalerweise zu einer schnellen Wiederausscheidung der Wirkstoffe führt.^[50]

Aber auch auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten werden inzwischen verschiedene Nanopartikel-Wirkstoff-Systeme entwickelt. So wurden beispielsweise mit Pentamidin beladene Polymethylacrylat-Nanopartikel erfolgreich auf deren Wirkung gegen Leishmanien getestet.^[51] Dabei wurden die Nanopartikel von vorher mit *Leishmania major* Erregern infizierten Kupferzellen über Phagozytose aufgenommen. Die in diesem Prozess entstehenden Phagosomen verschmelzen anschließend mit parasitären Nahrungsvakuolen. So gelangen die mit Pentamidin beladenen Nanopartikel zu den Erregern und können ihre Wirkung entfalten.

Viele weitere Nanopartikel-Wirkstoff-Systeme werden zur Zeit entwickelt und untersucht.

1.3 Übersicht über verwendete Wirkstoffe

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und auf ihre Eignung hin untersuchten Wirkstoffe beschränken sich zum Großteil auf bereits in der Medizin etablierten Medikamente und Naturstoffe. Die adressierten *targets* umfassen eine Reihe von Erregern von Infektionskrankheiten, wie z. B. die der Tuberkulose, Leishmaniose oder der Schlafkrankheit.

1.3.1 Isoniazid

Gegen Ende des letzten Jahrhunderts kam es aufgrund explodierender Bevölkerungszahlen und der damit verbundenen Armut und des resultierenden Hygienemangels zu einer starken Erhöhung der Ansteckungszahlen und Todesraten durch die Infektionskrankheit Tuberkulose. Geschätzte Todesfälle summieren sich inzwischen auf fast drei Millionen, die der Neuansteckungen auf über acht Millionen pro Jahr.^[52] Eines der am häufigsten verwendeten Medikamente zur Bekämpfung der oft tödlich verlaufenden Krankheit ist Isoniazid oder Isonikotinsäurehydrazid (INH), welches erstmals 1912 hergestellt wurde und seit Ende des zweiten Weltkriegs für seine antibakteriellen Eigenschaften bekannt ist.

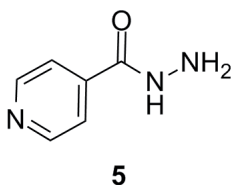


Abb. 6: Das Tuberkulose-Medikament Isoniazid.

Die Wirkung von Isoniazid basiert auf der Hemmung einer bestimmten Protease, welche für die Produktion langkettiger Mykolsäuren für den Zellwandaufbau des Erregers zuständig ist.^[53] Ohne die schützende Mykolsäurewachsschicht werden die Tuberkel, die in den Lysosomen der Makrophagen leben, durch das saure Milieu sofort abgetötet.

1.3.2 Quercetin

Die beiden durch Parasiten hervorgerufenen Infektionskrankheiten Trypanosomiose und Leishmaniose, sind vor allem in den südlich des Äquators liegenden Ländern zu finden. Die afrikanische Trypanosomiose, auch Schlafkrankheit genannt, wird durch die Erreger *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma brucei gambiense* ausgelöst und ist in 36 afrikanischen Ländern weit verbreitet.^[54] *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der amerikanischen Trypanosomiose, auch Chagas Krankheit genannt, kommt vor allem in Latein Amerika vor. Schätzungen zufolge beträgt die Anzahl der Infizierten 16–18 Millionen.^[55] Verschiedene Formen der Leishmaniose betreffen 72 Entwicklungsländer, wobei die schwerste Form, ausgelöst durch den Erreger *Leishmania donovani*, 12 Millionen Menschen infiziert.^[56] Die etablierten Wirkstoffe für die Bekämpfung sowohl für Trypanosomiose als auch Leishmaniose werden aufgrund der hohen Dosierungen mit schweren Nebenwirkungen in Verbindung gebracht. Eine Gruppe von Naturstoffen wird zurzeit auf ihre mögliche Wirkung gegen beide Krankheiten hin untersucht, die Flavonoide. Diese polyphenolischen Verbindungen bestehen aus zwei aromatischen Ringen, verbunden durch ein Tetrahydropyranring. Sie kommen in vielen Früchten oder Gemüsesorten vor und sind seit langem bekannt für ihre biologische Aktivität als Antioxidantien.^[57]

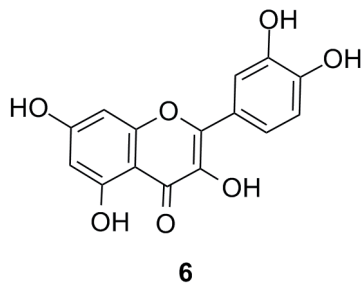


Abb. 7: Das Flavonol Quercetin.

Eines dieser Flavonoide ist das Quercetin, welches ebenfalls in vielen Pflanzen, wie z. B. der Färberische, dem Apfel oder der Traube, gefunden werden kann. Es zeigt IC_{50} Werte von 1.0 $\mu\text{g/ml}$ gegen *L. donovani* und 8.3 $\mu\text{g/ml}$ ge-

gen *T. rhodesiense*.^[57] Es wird angenommen dass die Wirkung auf Parasiten wie den Leishmanien auf die Eisen entziehende Eigenschaft des Quercetins zurückzuführen ist.^[58]

1.3.3 Curcumin

Das entzündungshemmende, antioxidative und antivirale Curcumin wird aus der Wurzel der Kurkuma-Pflanze (*Curcuma longa*) gewonnen und ist Bestandteil der Gewürzmischung Curry.^[59] Jüngste Untersuchungen zeigten die mögliche Verwendung von Curcumin gegen den parasitären Erreger *Schistosoma mansoni*.^[60]

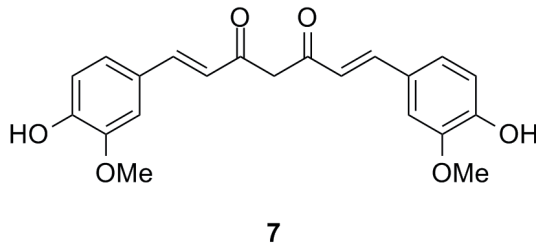


Abb. 8: Die Keto-Form von Curcumin.

Die Schistosomiose, auch bekannt als Bilharziose, ist eine vor allem in den Tropen und Subtropen vorkommende parasitäre Erkrankung, ausgelöst von Würmern der Gattungen *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* und *S. mekongi*. Weltweit sind geschätzte 200 bis 300 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen, die jährlichen Todesfälle belaufen sich auf etwa 280 000. Die Wirkung von Curcumin gegen den Schistosomiose-Erreger wird sowohl einer direkten Toxizität, als auch einer Stimulation des Immunsystems zugesprochen.

1.3.4 Amphotericin B

Das Polyen-Makrolacton Amphotericin B, ein Antimykotikum gewonnen aus *Streptomyces nodosum*, einem Actinobakterium, wurde erstmals 1955 beschrieben und ist eines der wichtigsten Medikamente gegen Pilzinfektionen.^[61]

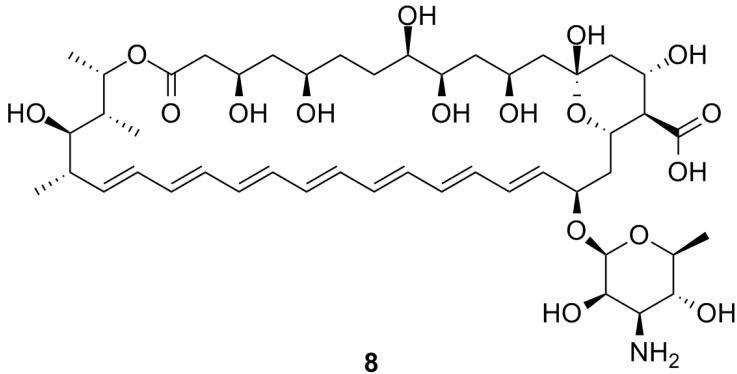


Abb. 9: Das Polyen-Makrolakton Amphotericin B.

Amphotericin B lagert sich über verschiedene Wechselwirkungen an Sterole in der Zellmembran und bildet dabei Kanäle in der Phospholipidschicht, die zu einer erhöhten Permeabilität führen. Dadurch kommt es zum Verlust wichtiger Metabolite und Salze.^[62] Untersuchungen mit radioaktiv markierten Zuckern zeigten deren Austreten aus dem Zellinneren in das umgebende Medium.

Aufgrund gewisser Ähnlichkeiten zwischen Pilzen und einigen Parasiten im Hinblick auf den Aufbau ihrer Zellmembran, wird Amphotericin B auch erfolgreich gegen Leishmaniose eingesetzt. So gelang es z.B. 1981, viscerale Leishmaniose erfolgreich, mit in Liposomen eingeschlossenem Amphotericin B zu behandeln.^[63]

1.3.5 Aziridinyl-Inhibitoren

Aspartatproteasen gehören zu einer eher kleinen Gruppe von Enzymen, die jedoch einige wichtige physiologische und pathophysiologische Prozesse steuern und deshalb in den letzten Jahren als mögliche *targets* in den Fokus gerückt sind.^[64] Gefunden wurden sie sowohl in Bakterien als auch in Viren, Parasiten, Pilzen, Tieren und auch im Menschen.^[65] So spielen die Aspartatproteasen Plasmeypsin I, II und IV eine wichtige Rolle bei der Nahrungsaufnahme des Parasiten *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria.^[66] Auch der eigentlich harmlose Hefepilz *Candida albicans*, welcher jedoch bei Menschen mit geschwäch-

tem Immunsystem lebensbedrohliche, systemische Infektionen auslösen kann, ist auf mehrere Aspartatproteasen (SAP 1-10) angewiesen.^[67,68]

Cis-konfigurierte Epoxide und Aziridine hemmen Aspartatproteasen irreversibel, wobei der Vorteil der Aziridine deren etwas geringere Reaktionsfreudigkeit ist.^[69] So kommt es unter physiologischen Bedingungen kaum zu unerwünschten Nebenreaktion und der jeweilige Inhibitor kann selektiver wirken. Von den in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Schirmeister synthetisierten *cis*-konfigurierten Aziridinen zeigten die Inhibitoren **9** und **10** die beste Wirkung gegen SAP 2.

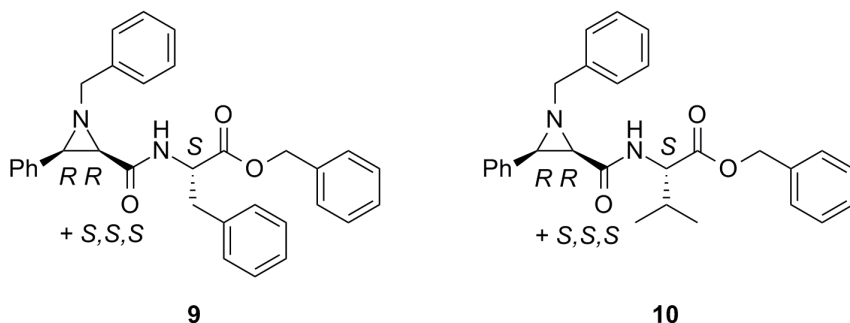


Abb. 10: Die *cis*-konfigurierten Aziridine **9** und **10**.

Diese beiden Verbindungen dienen in der vorliegenden Arbeit als Leitstrukturen für die Synthese eines eigenen, *cis*-konfigurierten Aziridins für die kovalente Anbindung an Nanodiamanten.

1.4 Das Vascubone Projekt

Das Vascubone-Projekt ist ein von der EU gefördertes, internationales Forschungsprojekt zur Entwicklung neuartiger Knochenersatzmaterialien. Obwohl der menschliche Knochen das einzige Gewebe im Körper ist, das sich vollständig und narbenfrei regenerieren kann, gibt es auch dort Defekte, sog. *critical size defects*, die ohne künstliches Eingreifen nicht mehr ausheilen.^[70] Durch das sog. *tissue engineering*, der Entwicklung von biokompatiblen Materialien, um krankes Gewebe zu ersetzen, könnte es möglich sein, solche Defekte erfolgreich zu behandeln. Dafür ist es jedoch notwendig, ein Material zu finden, das sich gut bearbeiten lässt, um aus dem Rohling, dem sog. *scaffold*, ein passgenaues Implantat zu fertigen. Auch sind eine hohe mechanische Belastbarkeit und eine gute Biokompatibilität wichtig. Außerdem sollte das Material nach einer gewissen Zeit vollkommen physiologisch abbaubar sein, damit neu gebildetes Gewebe dessen Platz einnehmen kann.^[71]

Ein möglicher Ansatz, um all diese Anforderungen zu gewährleisten, wird zurzeit innerhalb des Vascubone-Projektes untersucht. Der *scaffold* besteht aus einer physiologisch abbaubaren, dem Knochengewebe sehr ähnlichen β -Tricalciumphosphat- oder Polymermatrix. Um eine bessere Anhaftung von Zellen und deren Wachstum zu stimulieren, werden Nanodiamanten auf die *scaffold* Oberfläche aufgebracht. Mit Nanodiamanten beschichtete Oberflächen zeigten bei vorherigen Untersuchungen eine verbesserte Proliferation von Zellen.^[72] Außerdem können auf funktionalisierten Nanodiamanten sog. Wachstumsfaktoren, wie z.B. Angiopoietin oder BMP-2, immobilisiert werden, um Wachstum und Differenzierung weiter zu unterstützen. Nach dem Aufbringen bestimmter Zellen, z. B. mesenchymaler Stammzellen, auf den *scaffold* kann dieser anschließend chirurgisch in die Knochendefektstelle implantiert werden. Im Laufe des Heilprozesses soll der *scaffold* langsam vom körpereigenen Gewebe durchdrungen und letztendlich vollständig assimiliert werden.

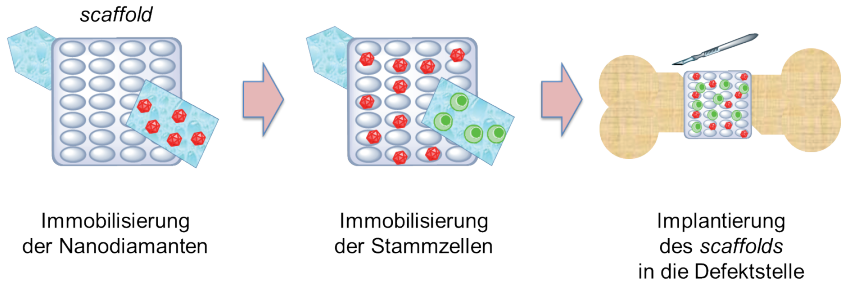


Abb. 11: Schematische Darstellung der Präparation und anschließende Implantierung des *scaffolds* in die Knochendefektstelle.

Das Vascubone-Projekt befindet sich derzeit in der Tierversuchsphase, in welcher herausgefunden werden muss, wie biokompatibel sich die so funktionalisierten *scaffolds* verhalten und in wie weit die gewünschten Eigenschaften der Knochenregeneration zu Tage treten.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist das Design, die Synthese und das anschließende Testen von Nanodiamant-Wirkstoff-Konjugaten. Dafür müssen zunächst Nanodiamanten mit geeigneten Linkersystemen funktionalisiert werden, um anschließend verschiedene pharmazeutische Wirkstoffe auf der Diamantoberfläche zu immobilisieren. Die Wirksamkeit der so angebondenen Inhibitoren auf die verschiedenen Erreger muss anschließend *in vitro* und *in vivo* getestet werden. Auch die Art der Aufnahme der Nanodiamanten in die verschiedenen Zellen muss untersucht werden. Dazu sollen Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Oregon Green 488, auf der Diamantoberfläche immobilisiert werden.

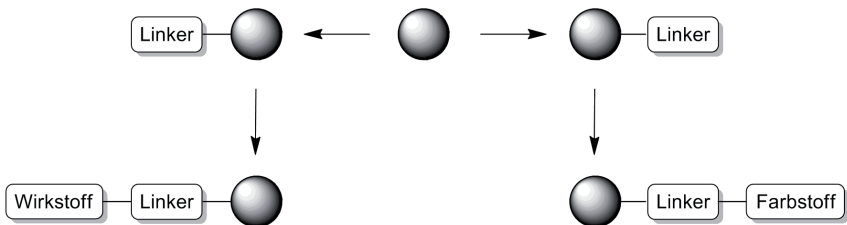


Abb. 12: Schematische Darstellung der Funktionalisierung der Nanodiamanten und anschließende Immobilisierung von Wirk- und Farbstoffen.

Eine weitere Aufgabe im Rahmen des Vascubone-Projektes ist es, verschiedene Nanodiamantsuspensionen zur Aufbringung auf die Knochenersatzmaterialien zu entwickeln und herzustellen sowie geeignete Nanodiamantfunktionalisierungen für die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren zu finden.

3 Hauptteil

3.1 Immobilisierung von Wirkstoffen

3.1.1 Säurelabiles Linker-System

Das Konzept der *drug delivery*, des gezielten Transports von pharmazeutischen Wirkstoffen durch geeignete Träger-Systeme zum Krankheitsherd, ist nicht neu. Einer der Pioniere auf diesem Gebiet war Professor Peter Speiser der schon in den frühen Siebzigerjahren Nanopartikel als geeignete Transportvehikel vorschlug.^[73] *Drug delivery* bietet viele Vorteile gegenüber der üblichen Chemotherapie. Durch das „Verpacken“ eines Wirkstoffes kann dessen Bioverfügbarkeit, z.B. durch verbesserte Löslichkeit, stark erhöht werden. Durch spezielles Design des Transportvehikels kann auch ein sog. *targeting* erreicht werden, also die bevorzugte Anreicherung des transportierten Wirkstoffes am gewünschten Ort im Körper. So können Transportvehikel mit spezifischen Liganden versehen werden, um die Aufnahme in die speziellen Zellen oder Gewebearten zu beschleunigen.^[74] Im kranken Gewebe kommt es dann zum sog. *drug release*, also der Freisetzung des Wirkstoffes. Durch diese gezielte Verabreichung und die verbesserte Bioverfügbarkeit sind wesentlich geringere Mengen an Wirkstoff für eine erfolgreiche Therapie notwendig, was eine Verringerung von möglichen Nebenwirkungen zur Folge hat.^[75]

Die Anforderungen an einen geeigneten Wirkstofftransporter sind vielfältig: er muss ein gutes Löslichkeitsverhalten besitzen, darf nicht toxisch sein und muss chemisch funktionalisierbar sein, um ihn auf die jeweiligen Bedingungen optimal auszurichten. Nanodiamant erfüllt all diese Anforderungen (siehe Kapitel 1.1.3 und 1.1.4).

Wie bereits erwähnt, muss der jeweilige Wirkstoff am richtigen Ort freigesetzt werden, wofür es verschiedene Ansätze gibt. Eines dieser Konzepte nutzt die unterschiedlichen pH-Werte in den verschiedenen Gewebesorten oder Zellkompartimenten aus. So beträgt der pH-Wert im Blut konstant 7.4, während z.B. der pH-Wert in Krebszellen auf bis zu 6, in Lysosomen, den Verdauungs-

kompartimenten der körpereigenen Makrophagen (Fresszellen), auf bis zu 4 fallen kann.^[76] Bindet man nun Wirkstoffe über spezielle, säurelabile Linkersysteme an die Transportvehikel, lösen diese sich erst ab, wenn jene Vehikel die jeweiligen infizierten Zellkompartimente erreicht haben. Eine weitere Möglichkeit Wirkstoffe kovalent zu immobilisieren und unter spezifischen Bedingungen abzuspalten ist die Anbindung über enzymatisch abbaubare Tetrapeptid-Linker.^[77] Die in den Lysosomen vorkommenden Enzyme spalten die Aminosäuresequenz Gly-Phe-Leu-Gly spezifisch. So kann nach Eintritt in die Zelle der angebundene Wirkstoff freigesetzt werden.

Für diese Arbeit wurden für die Immobilisierung auf Nanodiamant diejenigen Wirkstoffe gewählt, welche Erreger zum Ziel haben, die die Makrophagen (Fresszellen) des menschlichen Immunsystems infizieren. Makrophagen als Ziel der Nanodiamant-*carrier* bringen zwei Vorteile mit sich: erstens werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Nanopartikel sehr schnell von Makrophagen erkannt und phagozytiert.^[76] Zweitens eignet sich der bereits erwähnte niedrige pH-Wert der Verdauungskompartimente der Makrophagen gut für den Einsatz eines säurelabilen Linkersystems.

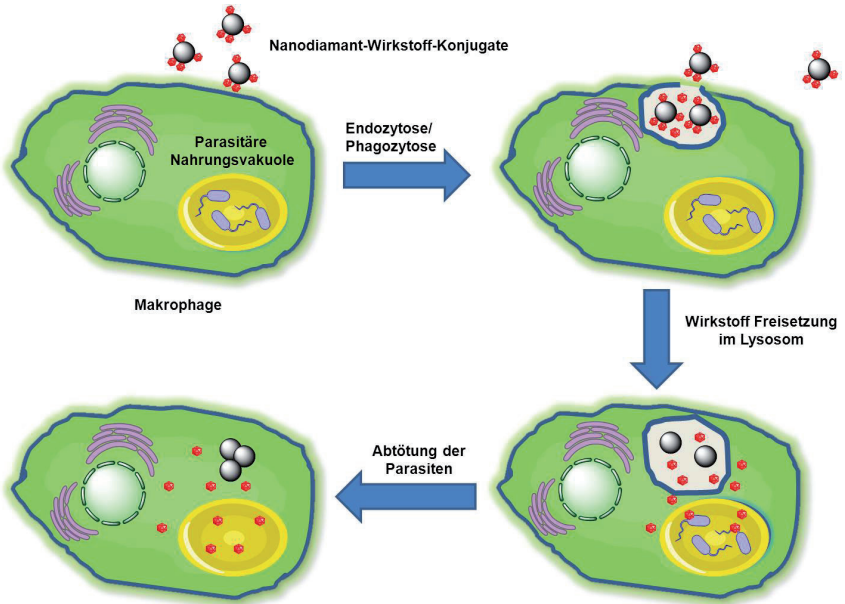


Abb. 13: Schematische Zeichnung des Prinzips der Nanodiamant *drug delivery*.

Die in dieser Arbeit synthetisierten säurelabilen Linkersysteme auf Nanodiamanten, gehören zur Gruppe der sog. Hydrazone und wurden schon Anfang der 1990iger Jahre verwendet, um Krebsmedikamente an monoklonale Antikörper zu binden.^[78]

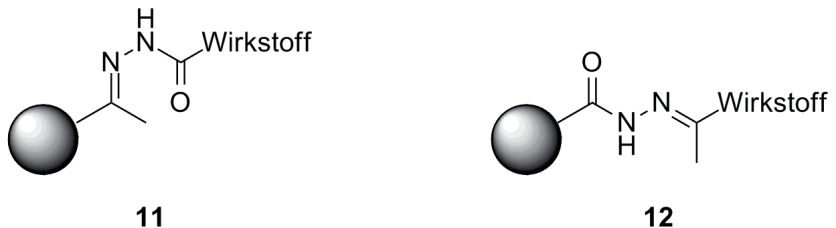


Abb. 14: Nanodiamant-Wirkstoff-Konjugate mit säurelabilem Hydrazonlinker.

Die Anbindung eines Wirkstoffes über einen Hydrazonlinker kann über zwei verschiedene Wege erreicht werden. Die Funktionalisierung des Nanodiamanten

mit einer Keto- oder Aldehydgruppe, welche anschließend mit Hydrazin zum Hydrazon umgesetzt wird und dann mit Hilfe einer Amidkupplungsreaktion an den Wirkstoff gebunden wird, ergibt das Nanodiamant-Wirkstoff-Konjugat **11**. Bei der Bildung des Konjugats **12** wird zunächst der Nanodiamant mit einer Säuregruppe funktionalisiert. Anschließend wird diese mit Hydrazin zum Hydrazid umgesetzt, welches mit einer Keto- oder einer Aldehydgruppe des Wirkstoffes das Hydrazon bilden kann. Je nach Beschaffenheit des Wirkstoffes kann nun die erste oder die zweite Methode gewählt werden. Der erste Schritt ist jedoch immer die Deagglomeration und anschließende Funktionalisierung des Nanodiamanten.

3.1.2 Deagglomeration von Nanodiamant

Wie bereits erwähnt, beträgt die Größe der Nanodiamantprimärpartikel aus der Detonationssynthese 3 – 5 nm.^[17] Aufgrund der Tendenz, durch starke intramolekulare Wechselwirkungen Agglomerate zu bilden, ist es nötig, diese vor der eigentlichen Funktionalisierung aufzubrechen. 2005 gelang das erstmals Ōsawa und Mitarbeitern durch Vermahlung der Diamanten mit Hilfe von Zirkoniumdioxid Mahlkörpern in einer Rührwerkskugelmühle.^[32]

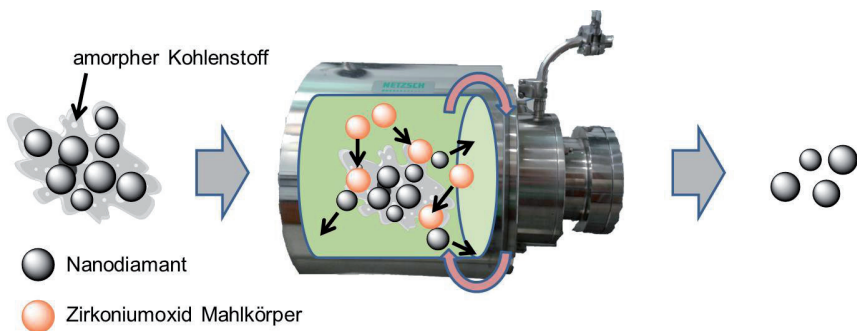


Abb. 15: Mechanische Deagglomeration mit Hilfe einer Rührwerkskugelmühle.

Die in Wassersuspendierten Diamantagglomerate werden von den starken Scherkräften der Mahlkörper aufgebrochen, wobei stabile, wässrige Primärpartikkolloide entstehen. Der mit dieser Technik mechanisch deagglomerierte Nanodiamant diente als Ausgangsmaterial für die in dieser Arbeit vorgestellten Diamantreaktionen.

Dabei wurden für weitere Funktionalisierungsreaktionen sowohl die durch das Mahlverfahren entstandenen sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffbereiche, als auch die entstandenen Hydroxylgruppen ausgenutzt.^[79]

3.1.3 Funktionalisierungsreaktionen

3.1.3.1 Thermische Graphitisierung von Nanodiamant

Neben dem mechanisch deagglomerierten Nanodiamant wurde auch thermisch graphitisierter Nanodiamant in dieser Arbeit verwendet. Die thermische Behandlung bei 750 °C im Vakuum erfüllt dabei zwei Aufgaben. Erstens wird durch das Erhitzen amorphes Kohlenstoffmaterial, dass mitverantwortlich für die starke Agglomeration ist, entfernt. Zweitens kommt es bei den bei dieser Behandlung vorherrschenden Bedingungen zur fast vollständigen Desorption der auf der Diamantoberfläche gebundenen sauerstoffhaltigen Gruppen.^[80] Dabei bilden sich, mehr noch als beim mechanisch deagglomerierten Nanodiamant, sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffbereiche, welche für weitere Funktionalisierungsreaktionen ausgenutzt werden können.^[80]

3.1.3.2 Arylierung mit aromatischen Diazoniumsalzen

Aus der Fülle an möglichen Funktionalisierungsmethoden für die kovalente Anbindung von Wirkstoffen an Nanodiamant, wurde für diese Arbeit die Arylierung mit aromatischen Diazoniumsalzen gewählt. Die dabei gebildeten C-C-Verknüpfungen können unter physiologischen Bedingungen nicht gespalten werden. Ein weiterer Vorteil ist die Vielfalt an funktionellen Gruppen, die mit dieser Methode eingeführt werden können.^[34]

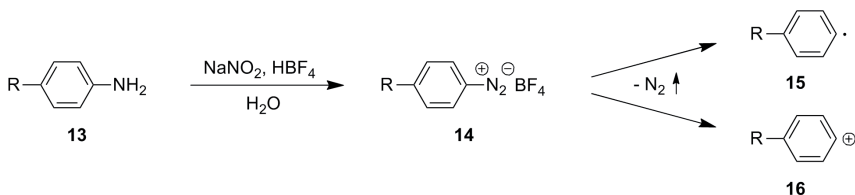


Abb. 16: Herstellung von Diazoniumtetrafluoroboraten und deren Zersetzungsprodukte.

Die durch die Umsetzung von aromatischen Aminen und Natriumnitrit in Tetrafluorborsäure entstehenden Diazoniumtetrafluorboratsalze **14**, können sich thermisch aber auch durch Anregung mit Ultraschall zu Arylkationen **16** oder Arylradikalen **15** zersetzen.^[81]

Diese hochreaktiven Zerfallsspezies können nun mit sp^2 -hybridisierten Bereichen der Nanodiamantoberfläche reagieren, wobei C-C-Bindungen geknüpft werden.^[82]

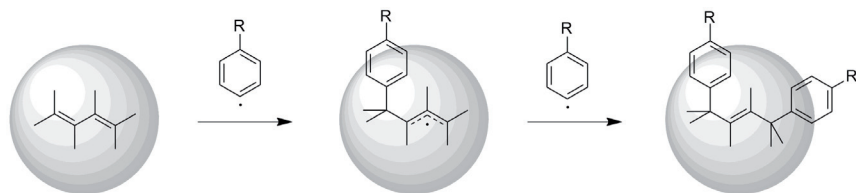


Abb. 17: Reaktion der aus den Diazoniumsalzen entstehenden Arylradikale mit der sp^2 -hybridisierten Nanodiamantoberfläche.

Obwohl noch nicht genau geklärt ist, ob die obige Reaktion kationisch oder radikalisch abläuft, wird zur Veranschaulichung ein Radikalmechanismus angenommen. Nach der Anbindung eines Arylradikals kann das entstandene Radikal auf der Diamantoberfläche über das gesamte konjugierte Doppelbindungssystem delokalisiert werden. Dieses kann nun mit einem weiteren Arylradikal abgesättigt werden wobei eine neue Doppelbindung entsteht.

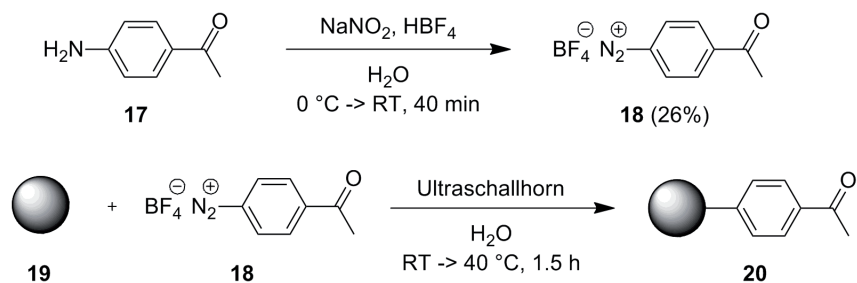


Abb. 18: Synthese des Diazoniumtetrafluorborats **18** und anschließende Umsetzung mit mechanisch deagglomerierten ND **19**.

Für die Funktionalisierung der Nanodiamantpartikel mit einem säurelabilen Linkersystem wurde zunächst das 4-Acetylbenzoldiazoniumtetrafluorborat (**18**) nach Literaturvorschrift synthetisiert.^[83] Um die Zersetzung zu der reaktiven Spezies zu erreichen und um eine Reagglomeration zu verhindern, wurde die Reaktion der Diazoniumsalzverbindung **18** mit den Nanodiamantpartikeln unter Wasserkühlung und Verwendung eines Ultraschallhorns durchgeführt.

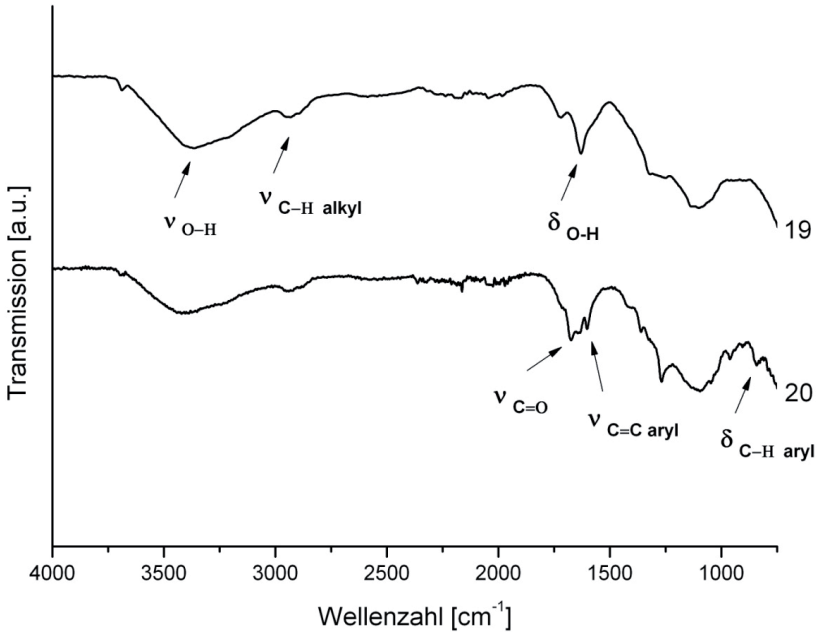


Abb. 19: IR-Spektren von gemahlenem ND **19** und Acetophenon-funktionalisiertem ND **20**.

Der isolierte Nanodiamant **20** zeigt im IR-Spektrum die üblichen Signale der sp^3 -hybridisierten C-H-Streckschwingung bei 2970 cm^{-1} , sowie die Signale der O-H-Streckschwingung bei 3330 cm^{-1} und der O-H-Deformationsschwingung bei 1629 cm^{-1} des auf der Diamantoberfläche adsorbierten Wassers. Im Folgenden wird auf diese drei Signale nicht mehr eingegangen. Charakteristisch für die Arylierung mit einer Acetophenon-Einheit sind die Signale der C=O-Streckschwingung bei 1676 cm^{-1} , der aromatischen C=C-Streckschwingung bei 1603 cm^{-1} und der aromatischen C-H-De-

formationsschwingung bei 840 cm^{-1} . Laut thermogravimetrischer Analyse beträgt die Oberflächenbelegung 0.40 mmol g^{-1} . Der erfolgreich funktionalisierte ND **20** wurde unter anderem dazu verwendet den Wirkstoff Isoniazid **5** zu immobilisieren.

3.1.3.3 Arylierung mit Pentadion

1993 gelang *Bingel* die Funktionalisierung von C_{60} Fullerenen über eine basenkatalysierte, nucleophile Cyclopropanierung. Dabei reagiert eine α -Halo-CH-acide Verbindung, z.B. Brommalonsäure-diethylester, in Gegenwart geeigneter Basen, mit dem Doppelbindungssystem des Fullerenens bei Raumtemperatur.^[84]

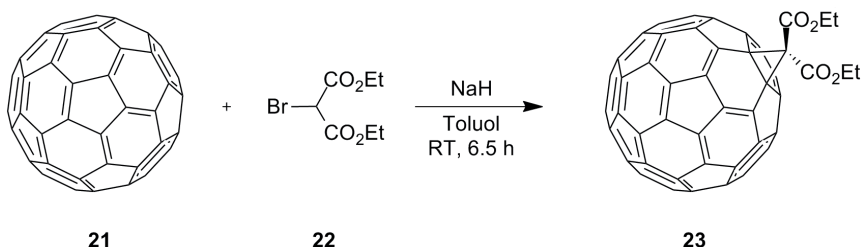


Abb. 20: Mittels *Bingel-Hirsch*-Reaktion funktionalisiertes C_{60} Fulleren.

Einige Jahre später gelang mit Hilfe einer modifizierten Variante, der *Bingel-Hirsch*-Reaktion, auch die Funktionalisierung von Kohlenstoffnanoröhren.^[85] Die für die Immobilisierung von Isoniazid auf Nanodiamant benötigten Keto-Funktionen sollten nun, mit der in der Arbeitsgruppe bereits etablierten *Bingel-Hirsch*-Reaktion, auf der Nanodiamantoberfläche aufgebracht werden.^[86]

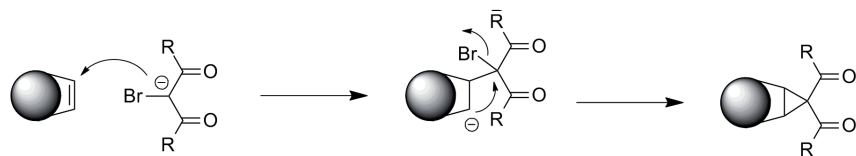


Abb. 21: Mechanismus der Diamantfunktionalisierung mittels *Bingel-Hirsch*-Reaktion.

Bei der Variante der *Bingel-Hirsch*-Reaktion wird das Diketon mit Tetrabrom-

methan in Anwesenheit einer Base umgesetzt. Die Bildung des halogenierten Anions des Diketons erfolgt *in situ*. Dieses greift nun die Doppelbindung nucleophil an, wobei das dadurch entstehende Carbanion wiederum das Bromid substituiert und einen Cyclopropanring bildet.^[87]

Für die *Bingel-Hirsch*-Funktionalisierung wurde aufgrund seiner erhöhten Dichte von sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffbereichen, thermisch graphitisierter ND **24** verwendet. Die Umsetzung mit 2,4-Pentadion (**25**) in Toluol ergab das Nanodiamant-Pentadion-Konjugat **26**.

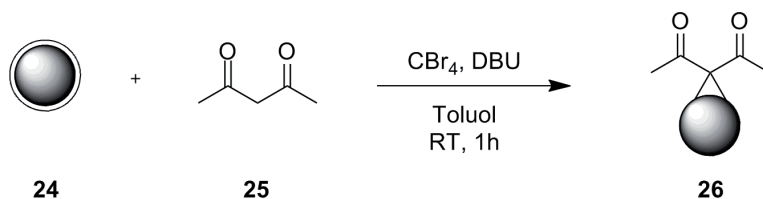


Abb. 22: Funktionalisierung von thermisch graphitisertem ND mit Pentadion.

Im IR-Spektrum (Abb. 22) gut zu erkennen, neben den für den Diamanten üblichen Schwingungen, ist die C=O-Streckschwingung bei 1703 cm^{-1} des ND **26**, welche auch beim Edukt **25** zu sehen ist. Das breite Signal bei 1627 cm^{-1} kann der O-H-Deformationsschwingung von adsorbiertem Wasser zugeordnet werden. Das intensive, breite Signal der C=O-Streckschwingung bei 1610 cm^{-1} des Pentadion-Eduktes **25**, ist auf die Keto-Enol-Tautomerie zurückzuführen, welche nach der Anbindung an den Diamanten über einen Cyclopropanring, nicht mehr vorliegen kann.

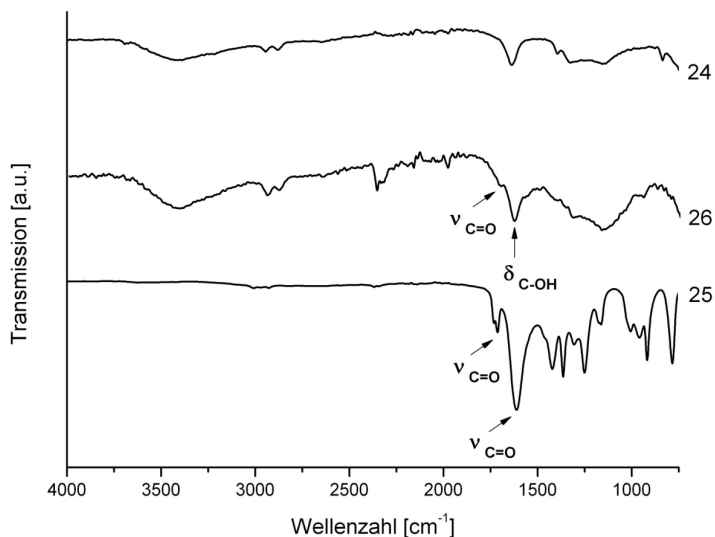


Abb. 23: IR-Spektren (ATR) von graphitisiertem ND **24**, mit Pentadion-funktionalisiertem ND **26** und 2,4-Pentadion (**25**).

Laut thermogravimetrischer Analyse beträgt die Oberflächenbelegung der eingeführten Pentadion-Einheit 0.28 mmol g⁻¹. Der Vorteil bei der *Bingel-Hirsch*-Funktionalisierung gegenüber der bereits vorgestellten Arylierung zum Acetophenon-Addukt **20**, ist die doppelte Anzahl an funktionellen Gruppen pro eingeführter Einheit. Genau wie der Acetophenon-funktionalisierte ND **20**, soll auch der Pentadion-funktionalisierte ND **26** mit dem Wirkstoff Isoniazid **5** umgesetzt werden.

3.1.4 Immobilisierung von Isoniazid

Isoniazid **5** besitzt bereits die für die Bildung eines säurelabilen Hydrazon-Linkersystems nötige Hydrazid-Funktion. Deshalb müssen die beiden ND **20** und **26** nicht mehr weiter funktionalisiert, sondern können sofort mit dem Wirkstoff umgesetzt werden.

3.1.4.1 Immobilisierung von Isoniazid mit Acetophenon-funktionalisiertem ND

Die Umsetzung des Keto-funktionalisierten ND **20** mit Isoniazid **5** in Ethanol ergab, unter Bildung des säurelabilen Hydrason-Linkers, das ND-Isoniazid-Konjugat **27**. Die Wahl der Reaktionsbedingungen und des Lösungsmittels erfolgte nach Literaturvorschrift.^[88]

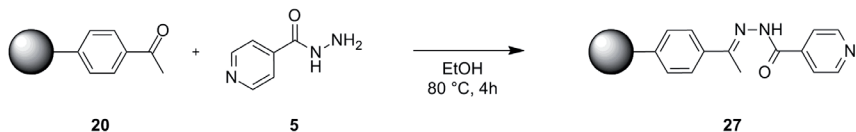


Abb. 24: Immobilisierung von Isoniazid **5** auf Acetophenon-funktionalisiertem ND **20**.

Im IR-Spektrum des isolierten ND-Isoniazid-Konjugats **27** in Abbildung 25 ist eine leichte Verschiebung und eine starke Verbreiterung des Signals der C=O-Streckschwingung bei 1664 cm⁻¹ zu erkennen. Ein Grund für das breite Signal ist vermutlich die Überlagerung der beiden ähnlich verschobenen Signale für die Amid C=O-Streckschwingung und der C=N-Streckschwingung des Hydrazons. Ein schwaches Signal für die Amid N-H-Deformationsschwingung liegt bei 1525 cm⁻¹. Die beiden Signale der aromatischen C=C-Streckschwingung bei 1602 cm⁻¹ und der aromatischen C-H-Deformationsschwingung bei 842 cm⁻¹ sind ebenfalls deutlich zu beobachten.

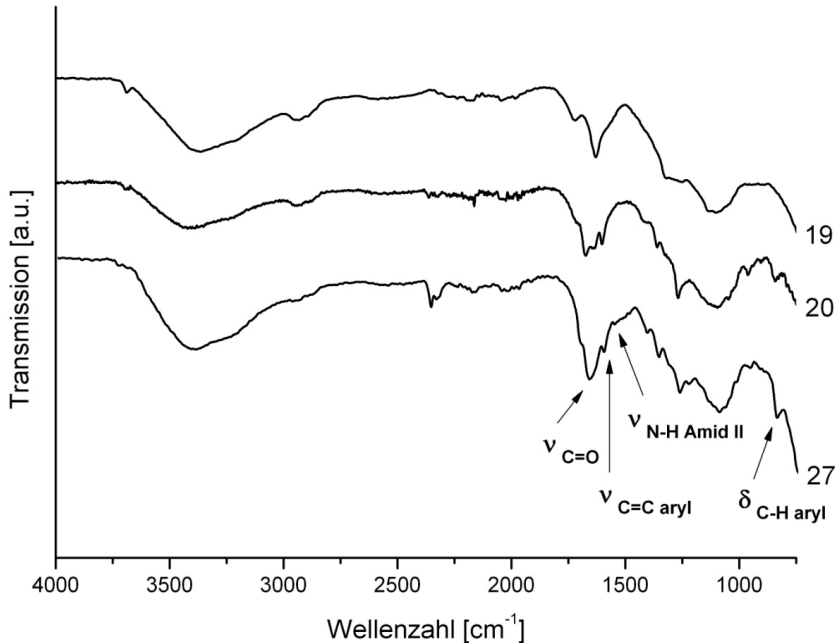


Abb. 25: IR-Spektren (ATR) von gemahlenem ND **19**, Acetophenon-funktionalisiertem ND **20** und dem ND-Isoniazid-Addukt **27**.

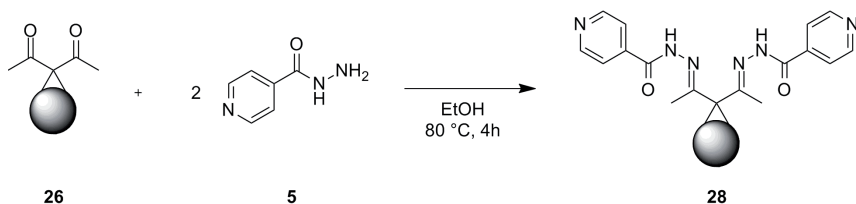
Ein weiteres Indiz für die erfolgreiche Umsetzung ist der Anstieg des Stickstoffgehalts des ND-Isoniazid-Addukts **27** auf 3 %; ermittelt durch die Elementaranalyse. Die durch die Thermogravimetrische Analyse (TGA) berechnete Oberflächenbelegung beläuft sich auf 0.18 mmol g^{-1} . Die Kenntnis der Stoffmenge des immobilisierten Wirkstoffs pro Gewichtseinheit ND-Wirkstoffkonjugat ist wichtig für die spätere Auswertung der Freisetzungsexperimente unter physiologischen Bedingungen. Die erhaltenen Nanodiamantpartikel besitzen eine Größenverteilung zwischen 45 und 130 nm. Tabelle **1** zeigt eine Übersicht der analytischen Daten der synthetisierten ND Vorstufen **19**, **20** und des ND-Isoniazid-Addukts **27**.

Tabelle 1: Analytische Daten der Nanodiamanten **19**, **20** und **27**.

ND	Stickstoffgehalt [%]	Oberflächenbelegung [mmol g ⁻¹]	Zeta-Potential [mV]
19	2.21	-	41.0 (pH = 5.8)
20	2.00	0.40	39.5 (pH = 4.25)
27	3.01	0.18	-27.0 (pH = 4.6)

3.1.4.2 Immobilisierung von Isoniazid mit Pentadion-funktionalisiertem ND

Um eine höhere Oberflächenbelegung mit Isoniazid **5** als beim ND-Wirkstoff-Konjugat **27** zu erreichen, wurde der mit zwei Ketogruppen funktionalisierte ND **26** mit dem Wirkstoff umgesetzt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen dabei den für die Synthese von ND **27** benutzten.

**Abb. 26:** Immobilisierung von Isoniazid **5** auf Pentadion-funktionalisiertem ND **26**.

Bei der Betrachtung der IR-Spektren in Abbildung 27 fällt zunächst das Fehlen des Signals der C=O-Streckschwingung bei 1703 cm⁻¹ im ND-Isoniazid-Konjugat **28** auf, was auf eine erfolgreiche Umsetzung der Ketogruppen mit Isoniazid zurückzuführen ist. Das Signal der O-H-Deformationsschwingung bei 1627 cm⁻¹ des Pentadion-funktionalisierten ND **26** ist im ND-Isoniazid-Konjugat **28** nun leicht verschoben und verbreitert bei 1639 cm⁻¹ zu finden. Ein Grund dafür könnte die Überlagerung mit der Amid C=O-Streckschwingung sein, welche normalerweise in diesem Bereich zu finden ist. Ein neues Signal, das der N-H-Deformationsschwingung des Amid-Stickstoffs zugeordnet werden kann befindet sich bei 1546 cm⁻¹.

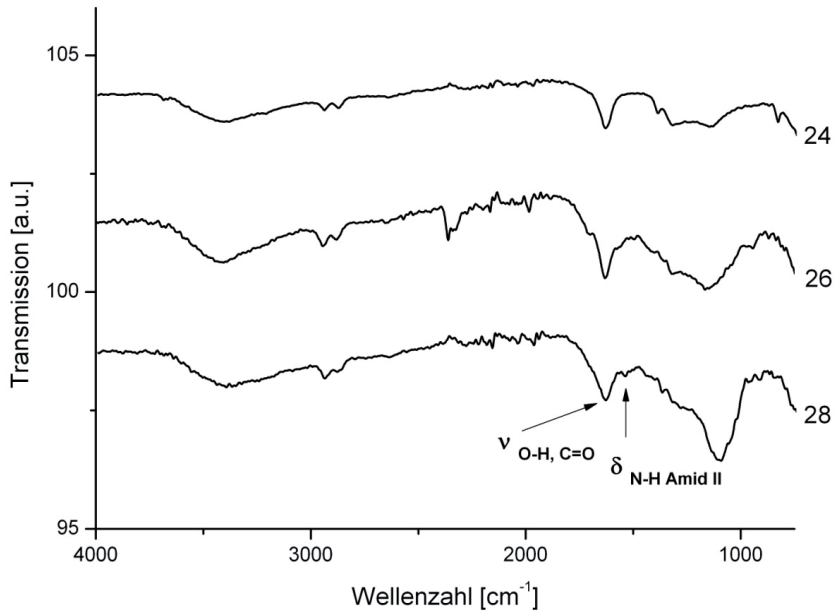


Abb. 27: IR-Spektren (ATR) von thermisch graphitisiertem ND **24**, Pentadion-funktionalisiertem ND **26** und dem ND-Isoniazid-Addukt **28**.

Der Stickstoffgehalt steigt auch bei dieser Immobilisierung von Isoniazid, aufgrund der sechs neu hinzugekommenen Stickstoffatome pro Funktionalisierung, stark an (siehe Tabelle 2). Die Oberflächenbelegung beträgt 0.16 mmol g^{-1} , also eine Verringerung gegenüber dem Vorgänger Diamant **26**. Bedenkt man jedoch die zweifache Immobilisierung von Isoniazid pro Linker-Einheit, muss die Oberflächenbelegung des Wirkstoffes für die spätere Auswertung der Freisetzungsexperimente, als doppelt so hoch angenommen werden.

Tabelle 2: Analytische Daten der Nanodiamanten **24**, **26** und **28**.

ND	Stickstoffgehalt [%]	Oberflächenbelegung Linker/Wirkstoff [mmol g^{-1}]	Zeta-Potential [mV]
24	1.82	-	44.4 (pH = 7.0)
26	2.38	0.28	47.0 (pH = 4.6)
28	2.64	0.16 / 0.32	36.2 (pH = 6.4)

Die Nanodiamant-Isoniazid-Addukte **27** und **28** wurden in den Freisetzungsexperimenten auf ihr Vermögen der Wirkstoffabspaltung hin untersucht. *In vitro* oder *in vivo* Tests zur Wirkung auf Tuberkulose Erreger wurden jedoch bisher nicht durchgeführt. Diese sollen in Zukunft in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern erfolgen.

3.1.5 Quercetin

Für die Immobilisierung von Quercetin **6** auf Nanodiamant muss aufgrund der auf dem Wirkstoff verfügbaren funktionellen Gruppen, eine andere Syntheseroute gewählt werden. Da Quercetin keinerlei Säurefunktionen aufweist, muss der Hydrazid-Teil des säurelabilen Hydrazon-Linkersystems von der Seite des Diamanten kommen. Dieses Hydrazid kann dann mit der Keto-Funktion des Quercetins reagieren. Nach der Abspaltung im sauren Milieu wird durch den Angriff von Wasser die Keto-Funktion des Wirkstoffes wiederhergestellt.

Für die Säure-Funktionalisierung des gemahlene Nanodiamanten **19** muss zunächst das Diazoniumtetrafluorborat **30** aus der Umsetzung von 4-Aminobenzoessäure mit Tetrafluorborssäure und Natriumnitrit nach Literaturangaben synthetisiert werden.^[83]

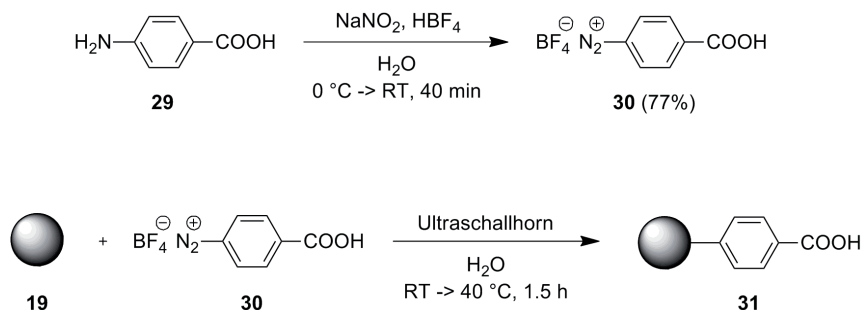


Abb. 28: Synthese des Diazoniumtetrafluorborats **30** und anschließende Umsetzung mit mechanisch deagglomeriertem ND **19**.

Die Säure-Funktionalisierung des gemahlene ND **19** erfolgte analog zu der Acetophenon-Funktionalisierung in Wasser durch Behandlung mit einem Ultra-

schallhorn. Der isolierte ND **31** zeigt im IR-Spektrum das charakteristische Signal der C=O-Streckschwingung der Säurefunktion bei 1707 cm^{-1} , sowie die Signale der aromatischen C=C-Streckschwingung bei 1603 cm^{-1} und der aromatischen C-H-Deformationsschwingung bei 860 cm^{-1} . Die Oberflächenbelegung beträgt laut thermogravimetrischer Analyse 0.47 mmol g^{-1} .

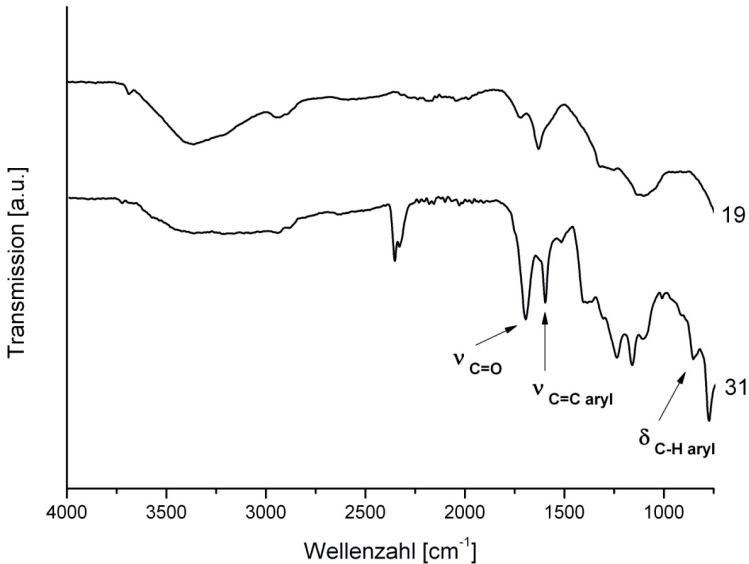


Abb. 29: IR-Spektren (ATR) von gemahlenem ND **19** und Benzoessäure-funktionalisiertem ND **31**.

Um eine säurelabile Anbindung von Quercetin **6** an den Nanodiamanten zu ermöglichen, muss zunächst noch dessen Säure-Gruppe in eine Hydrazid-Gruppe konvertiert werden. Dazu wurde die Säure-Funktion des ND **31** mit den Kuppelungsreagenzien EDC und NHS aktiviert und anschließend mit Hydrazin umgesetzt.

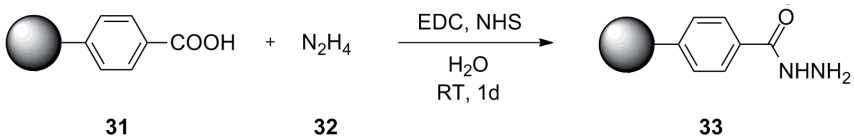


Abb. 30: Umsetzung des säurefunktionalisierten ND **31** mit Hydrazin **32** zum hydrazid-funktionalisierten ND **33**.

Die erfolgreiche Umsetzung zum hydrazidfunktionalisierten ND **33** kann im IR-Spektrum durch die Abnahme der Intensität des Signals der C=O-Streckschwingung 1707 cm^{-1} und dem neu hinzugekommenen Signal der C=O-Streckschwingung des Amids bei 1640 cm^{-1} bestätigt werden. Das Signal der Amid II N-H-Deformationsschwingung bei 1550 cm^{-1} wird ebenfalls beobachtet. Auch der Anstieg des Stickstoffgehalts von 1.75 % des Benzoessäure-funktionalisierten ND **31** auf 2.77 % des Hydrazidfunktionalisierten ND **33** deutet auf eine erfolgreiche Umsetzung hin. Die Oberflächenbelegung beträgt laut thermogravimetrischer Analyse 0.37 mmol g^{-1} .

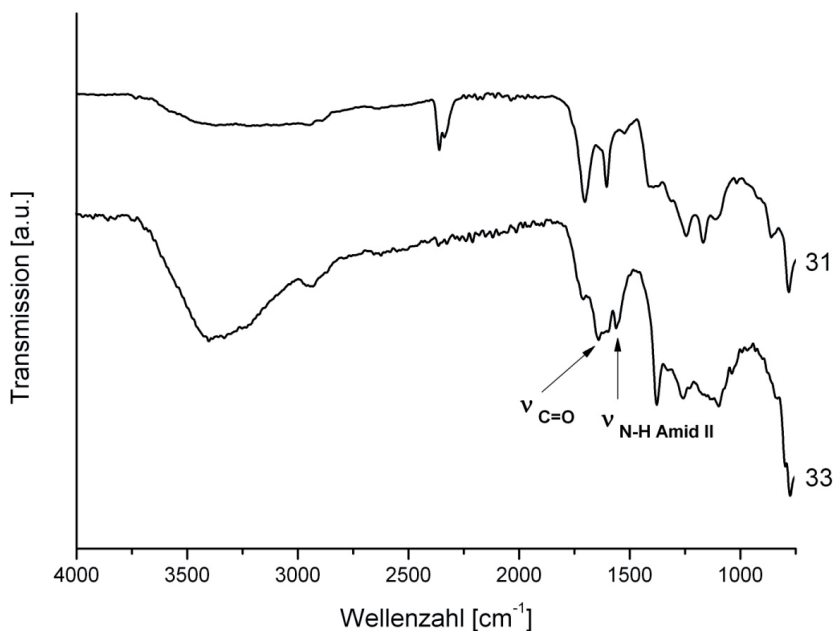


Abb. 31: IR-Spektren (ATR) von Benzoessäure-funktionalisiertem ND **31** und hydrazidfunktionalisiertem ND **33**.

Der letzte Schritt ist nun die Immobilisierung von Quercetin **6** auf dem Hydrazidfunktionalisierten ND **33**. Die Reaktion findet in Ethanol bei 80 °C statt, wobei die Aminofunktion des Hydrazids mit der Ketogruppe des Quercetins unter Abspaltung von Wasser zum säurelabilen Hydrazon reagiert.^[88]

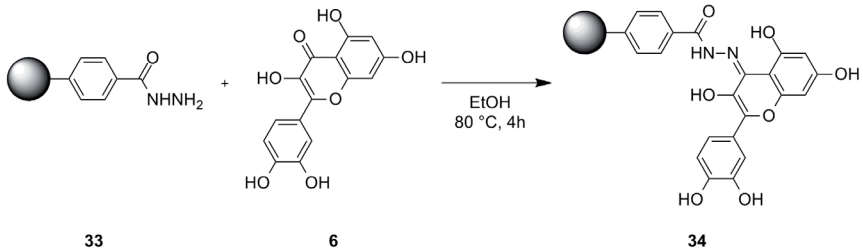


Abb. 32: Immobilisierung von Quercetin **6** auf hydrazidfunktionalisiertem ND **33**.

Hinweise auf die erfolgreiche Immobilisierung des Quercetins können aus dem IR-Spektrum entnommen werden. Auffällig ist zunächst das extrem breite Signal der überlagernden C=O- und C=N-Streckschwingungen, welches sich über einen Bereich von 1640 bis 1616 cm^{-1} erstreckt. Die Signale der aromatischen C-O-Streck- und O-H-Deformationsschwingungen befinden sich bei 1267, 1170 und 1095 cm^{-1} .

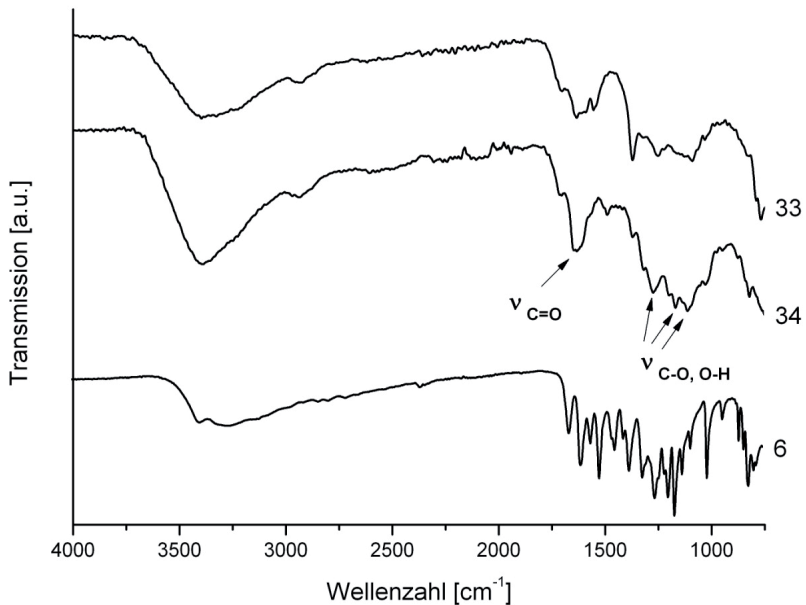


Abb. 33: IR-Spektren (ATR) von hydrazidfunktionalisiertem ND **33**, Quercetin-funktionalisiertem ND **34** und Quercetin **6**.

Die über die thermogravimetrische Analyse berechnete Oberflächenbelegung von Quercetin auf dem ND beträgt 0.19 mmol g^{-1} . Dieser Wert wird für die spätere Auswertung der Freisetzungsexperimente benötigt. Die Teilchengrößen befinden sich in einem Bereich zwischen 50 und 155 nm. Einige analytische Daten des Quercetin-funktionalisierten ND und dessen Vorstufen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Analytische Daten der Nanodiamanten **31**, **33** und **34**.

ND	Stickstoffgehalt [%]	Oberflächenbelegung [mmol g ⁻¹]	Zeta-Potential [mV]
31	1.75	0.47	-8.2 (pH = 4.5)
33	2.77	0.37	17.1 (pH = 5.2)
34	2.00	0.19	-25.1 mV (pH = 6.0)

Der Quercetin-funktionalisierte ND **34** wurde im Rahmen der Freisetzungsexperimente auf seine *release*-Eigenschaften hin untersucht. Untersuchungen zur Wirksamkeit gegen Trypanosomen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Engstler, der Zell- und Entwicklungsbiologie an der Universität Würzburg, ergaben bisher keine schlüssigen Ergebnisse.

3.1.6 Curcumin

Wie auch Quercetin **6**, besitzt Curcumin **7** Ketogruppen, welche mit der Hydrazid-Funktion des ND **33** die gewünschte säurelabile Hydrazon-Anbindung bilden können. Die Umsetzung des Wirkstoffs mit ND **33** erfolgt unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie die Anbindung von Quercetin.

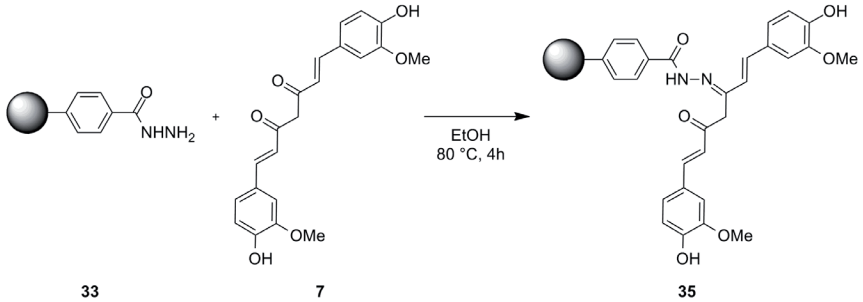


Abb. 34: Immobilisierung von Curcumin **7** auf hydrazidfunktionalisiertem ND **33**.

Im IR-Spektrum des isolierten ND **35** kann man wieder eine Verbreiterung der überlagernden Signale C=O- und C=N-Streckschwingungen bei 1644 cm^{-1} erkennen. Die intensiven Signale bei 1224 und 1153 cm^{-1} können den C-O-Streckschwingung und der O-H-Deformationsschwingung der Ether- und Alkoholgruppen zugeordnet werden.

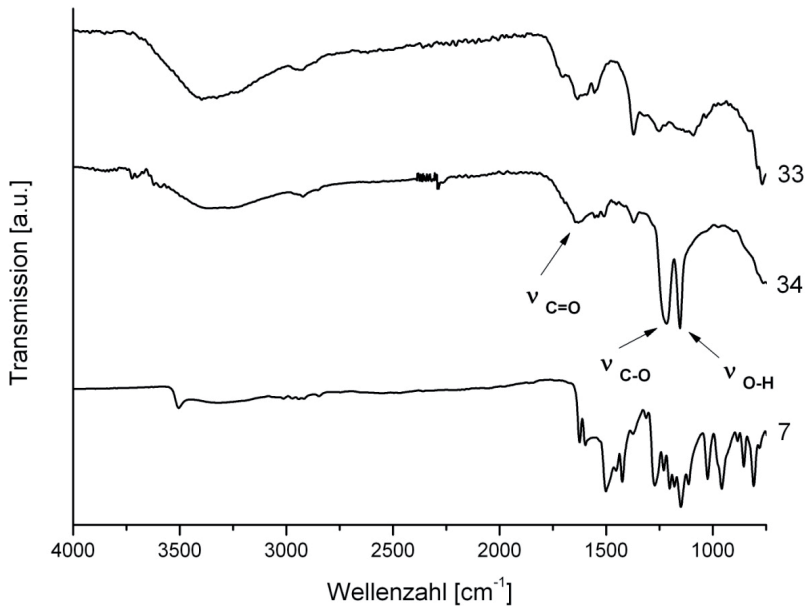


Abb. 35: IR-Spektren (ATR) von hydrazidfunktionalisiertem ND **33**, Curcumin-funktionalisiertem ND **35** und Curcumin **7**.

Die Oberflächenbelegung des Curcumin-funktionalisierten ND **35** beträgt 0.47 mmol g^{-1} . Die Messung der Teilchengrößen ergeben Werte zwischen 497 und 751 nm. Die starke Agglomeratbildung könnte dadurch erklärt werden dass bis zu zwei Nanodiamantpartikel mit einem Curcumin-Molekül reagieren können. So können durch Vernetzung größere Agglomerate entstehen. Außerdem könnten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den phenolischen Hydroxyl-Funktionen und den Ether-Funktionen des Curcumins und sauerstoffhaltigen Gruppen auf der Diamantoberfläche zu einer Agglomeratbildung führen. In Tabelle 4 sind einige Analysenwerte des Curcumin-funktionalisierten ND **35** und dessen Vorstufen angegeben.

Tabelle 4: Analytische Daten der Nanodiamanten **31**, **33** und **35**.

ND	Stickstoffgehalt [%]	Oberflächenbelegung [mmol g^{-1}]	Zeta-Potential [mV]
31	1.75	0.47	-8.2 (pH = 4.5)
33	2.77	0.37	17.1 (pH = 5.2)
35	1.79	0.47	9.1 (pH = 5.5)

Die Abspaltung des Wirkstoffs vom ND **35** wurde in den Freisetzungsexperimenten untersucht; eine *in vivo* oder *in vitro* Untersuchung zur Wirksamkeit gegen Schistosomiasis Erreger fand bisher nicht statt, soll aber in Zukunft im Rahmen einer Kooperation erfolgen.

3.1.7 Amphotericin

Um die Immobilisierung von Amphotericin B **8** über einen säurelabilen Hydrazon-Linker zu erreichen, muss im Gegensatz zu der Immobilisierung von Isoniazid **5** der Acetophenon-Linker vorher weiter funktionalisiert werden. Durch die Umsetzung des Acetophenon-funktionalisierten ND **20** mit Hydrazin in Ethanol, wird der hydrazonfunktionalisierte ND **36** erhalten.

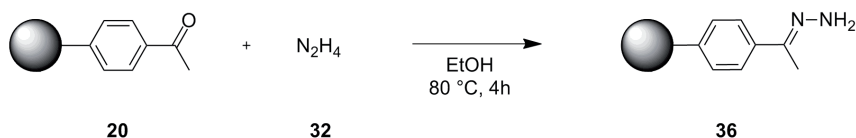


Abb. 36: Umsetzung des Acetophenon-funktionalisierten ND **20** mit Hydrazin zum hydrazonfunktionalisierten ND **36**.

Die erfolgreiche Umsetzung kann im IR-Spektrum (Abb. 37) beobachtet werden. Nach der Reaktion des Hydrazins mit der Ketogruppe des ND kann man im IR-Spektrum kein Signal mehr für die C=O-Streckschwingung bei 1676 cm^{-1} erkennen. Auch der Stickstoffgehalt steigt von 2.00 % für den Acetophenon-funktionalisierten ND **20** auf 3.63 % für den hydrazonfunktionalisierten ND **36** an. Die Oberflächenbelegung beträgt laut TGA 0.14 mmol g^{-1} , während die Berechnung über die Elementaranalysendaten eine Belegung von 0.6 mmol g^{-1} ergibt. Der tatsächliche Wert liegt wahrscheinlich zwischen beiden Werten.

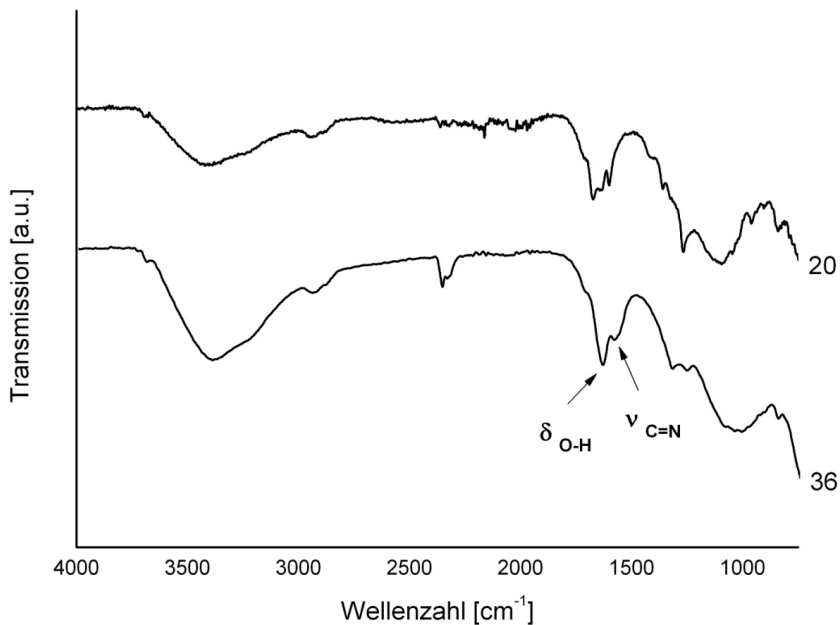


Abb. 37: IR-Spektren (ATR) von Acetophenon-funktionalisiertem ND **20** und hydrazonfunktionalisiertem ND **36**.

Die freie Aminogruppe des Hydrazons kann nun eine Amidbindung mit der Säuregruppe des Amphotericins eingehen und so die säurelabile Anbindung ausbilden. Nach der Abspaltung unter physiologischen Bedingungen entsteht zunächst das Amphotericin-Hydrazid, welches zum ursprünglichen Säurederivat weiter metabolisiert wird.^[89]

Für die Aktivierung der Säuregruppe über die Bildung eines Aktivesters, werden die Kupplungsreagenzien EDC und NHS benutzt.^[90]

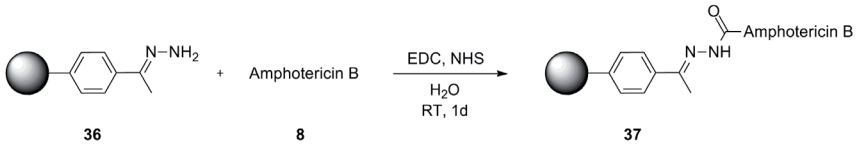


Abb. 38: Immobilisierung von Amphotericin B **8** auf hydrazonfunktionalisiertem ND **36**.

Im IR-Spektrum können einige neue Signale für die C=O-Streckschwingung des Lactons bei 1712 cm⁻¹ und für die C=O-Streckschwingung des Amids bei 1654 cm⁻¹ beobachtet werden. Auch die C=C-Streckschwingung des konjugierten Doppelbindungssystems bei 1531 cm⁻¹ kann man gut erkennen. Des Weiteren sind die beiden Signale der C-O-Streck- und der O-H-Deformationsschwingungen der Alkohol- und Ethergruppen beobachtbar.

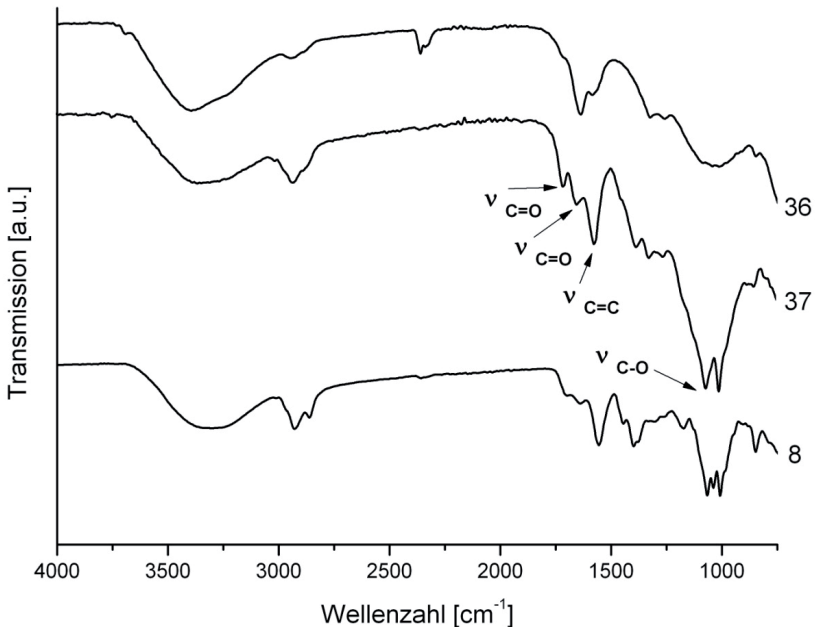


Abb. 39: IR-Spektren (ATR) von hydrazonfunktionalisiertem ND **36** Amphotericin B-funktionalisiertem ND **37** und Amphotericin B **8**.

Die Partikelgrößen des Amphotericin B-funktionalisierten ND **37** bewegen sich in einem Bereich von 64 – 187 nm. Die Oberflächenbelegung fällt, wie bei der Immobilisierung von größeren Molekülen üblich, mit 0.07 mmol g⁻¹ vergleichsweise niedrig aus. Durch ihre Größe neigen diese dazu, weitere freie funktionelle Gruppen auf der Diamantoberfläche abzuschirmen. So ist die mögliche Beladung mit weiteren Molekülen stark eingeschränkt. In Tabelle 5 sind einige weitere analytische Daten des ND **37** und seiner Vorstufen angegeben.

Tabelle 5: Analytische Daten der Nanodiamanten **20**, **36** und **37**.

ND	Stickstoffgehalt [%]	Oberflächenbelegung [mmol g ⁻¹]	Zeta-Potential [mV]
20	2.00	0.40	39.5 mV (pH = 4.25)
36	3.66	0.14	44.1 mV (pH = 7.1)
37	5.28	0.07	12.8 mV (pH = 7.44)

Die Wirkstoff-Freisetzung aus ND **37** wurde in den Freisetzungsexperimenten untersucht. *In vitro* Tests an Leishmanien-Amastigoten der Gattung *Leishmania major*, durchgeführt von Dr. Uta Schurig aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Moll in der Infektionsbiologie der Universität Würzburg, zeigten die hemmende Wirkung des Nanodiamant-Wirkstoff-Konjugats (siehe Tab. 6).

Tabelle 6: IC₅₀ Werte und Selektivitätsindex der ND **36**, **37** und Amphotericin B in Bezug auf *L. major* Amastigoten. Gemessen von Martina Schultheis, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Uta Schurig, Infektionsbiologie, Uni Würzburg.

Substanz	IC ₅₀	IC ₅₀ [μmol g ⁻¹]	Selektivitätsindex
36	100 μg/ml	>100	-
37	0.0092 μM	0.0085	978.4
Amphotericin B	0.0428 μM	0.0396	466.7

Die mittlere, inhibitorische Konzentration (IC₅₀) gibt an, bei welcher Wirkstoffkonzentration eine 50%ige Inhibition des jeweiligen Erregers stattfindet. Der IC₅₀-Wert wurde im Falle des Amphotericin B-funktionalisierten ND **37**, über dessen gemessene Oberflächenbelegung berechnet. Wie man aus Tabelle 6 klar erkennen kann, genügt eine etwa viermal geringere Konzentration an Wirkstoff,

wenn dieser über einen Nanodiamant-Träger verabreicht wird. Eine zusätzliche hemmende Wirkung des Nanodiamanten selbst, kann aufgrund des IC_{50} Wertes der ND **36** Vorstufe ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser ersten Tests scheinen die postulierten Vorteile der Nanodiamant-Wirkstoff-Träger zu bestätigen. Die Nanopartikel werden gut von den infizierten Makrophagen aufgenommen.^[76] Die dabei entstehenden Endosome verschmelzen zunächst zu Lysosomen die ihrerseits mit parasitären Vacuolen verschmelzen.^[51] Während dieses Vorgangs wird der Wirkstoff von der Partikeloberfläche abgespalten und kann seine Wirkung entfalten. Allerdings muss der genaue Aufnahmemechanismus in das Zellinnere noch geklärt werden.

3.1.8 Aspartatprotease-Inhibitor

Cis-konfigurierte Aziridine sind potentielle Aspartatprotease-Inhibitoren und sollten daher an Nanodiamanten gekoppelt werden und in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Schirmeister von der Universität Mainz, auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden.

Über die Cromwell-Synthese können racemische Gemische eines *cis*-konfigurierten Aziridins z.B. aus Zimtsäuremethylester synthetisiert werden. Dieser wird zunächst in die entsprechende Dibromverbindung umgesetzt.^[91] Dann erfolgt der Ringschluss zum Aziridin durch Eliminierung von Bromwasserstoff und anschließender Michael-Addition des primären Amins, gefolgt von einer intramolekularen nucleophilen Substitution, wobei das zweite Bromid abgespalten wird.^[92]

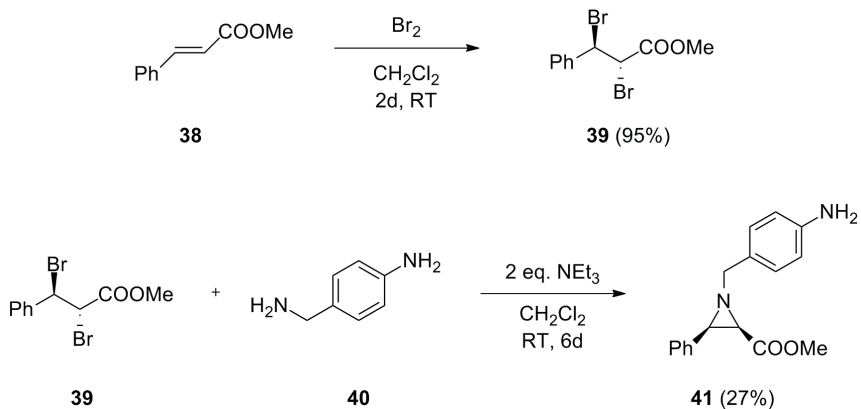


Abb. 40: Umsetzung des Zimtsäuremethylesters **38** mit Brom und Darstellung des Aziridins **41** durch Umsetzung von Dibromzimtsäuremethylester **39** mit 4-Aminobenzylamin (**40**).

Anhand der NMR-Daten sind *cis*-konfigurierte Aziridine einfach zu identifizieren. Man beobachtet für die beiden Protonen am Aziridinring jeweils ein Dublett mit Kopplungskonstanten von $J = 6.8$ bis 7.1 , zwischen 2.5 und 3.1 ppm, wenn diese *cis* zueinander angeordnet sind.

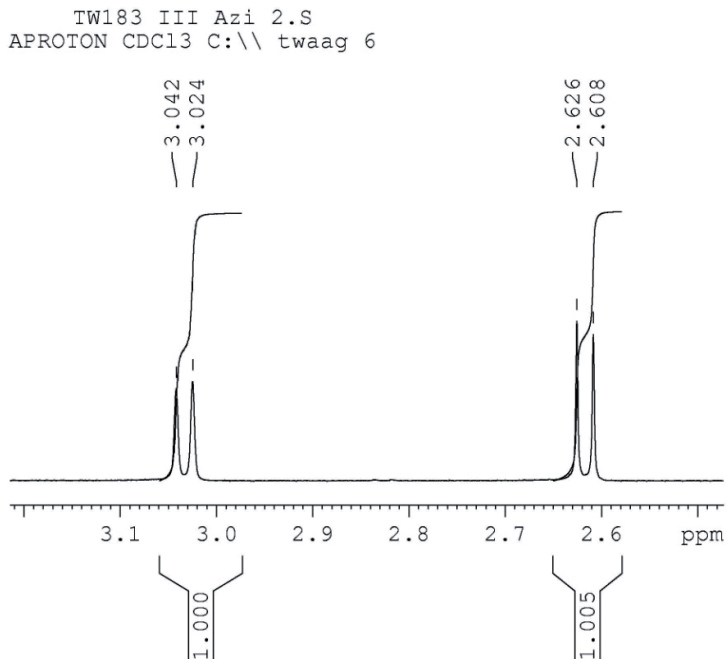


Abb. 41: Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von Aziridin **41**, mit den charakteristischen Signalen der *cis*-ständigen Protonen.

Das Aziridin **41** wird nun über eine Amidknüpfung auf dem Benzoessäure-funktionalisierten ND **31** immobilisiert. Die Reaktionsbedingungen gleichen dabei jenen für die Darstellung des hydrazidfunktionalisierten **ND 33**.

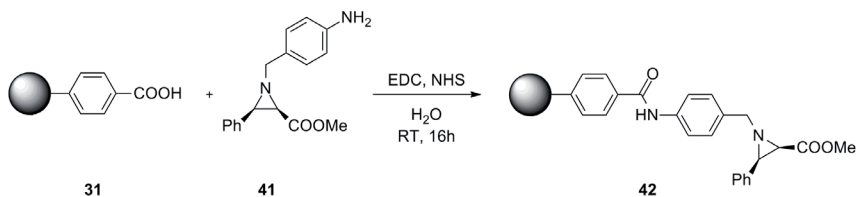


Abb. 42: Immobilisierung des Aziridins **41** auf Benzoessäure-funktionalisiertem ND **31**.

Vergleicht man die beiden IR-Spektren der ND **31** und **42**, fallen im Carbonylbe-
reich zwei neue Signale auf. Zum einen das Signal für die C=O-Streckschwingung
der Estergruppe des Aziridins bei 1740 cm^{-1} und zum anderen das Signal für
C=O-Streckschwingung der Amidbindung zwischen Diamant und Inhibitor. Auch
das Signal der N-H-Deformations-schwingung des Amids bei 1542 cm^{-1} ist gut zu
erkennen.

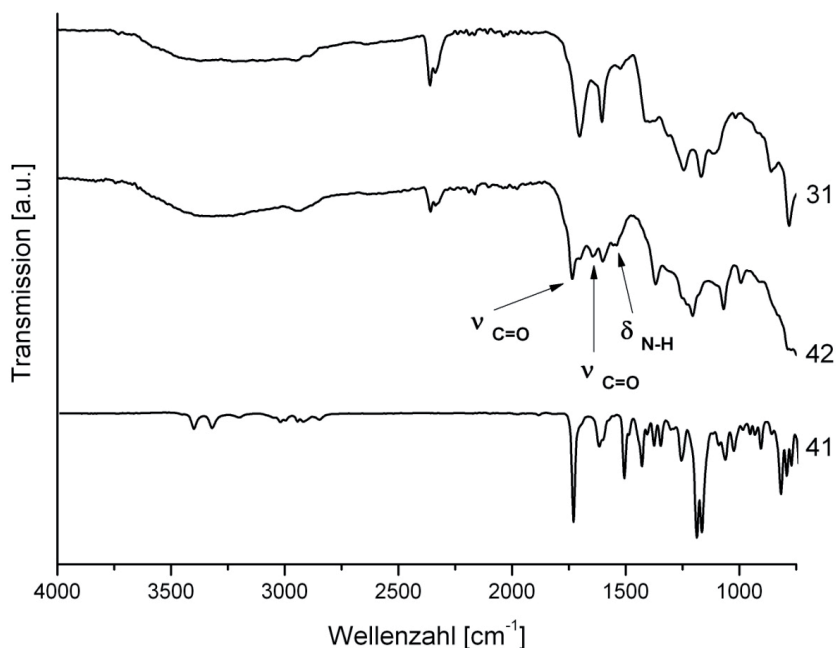


Abb. 43: IR-Spektren (ATR) von Benzoessäure-funktionalisiertem ND **31**, Aziridin-funktio-
nalisiertem ND **42** und Aziridin **41**.

Die Elementaranalyse belegt die Immobilisierung des Aziridins auf dem Ben-
zoessäure-funktionalisierten ND **31**. Der Stickstoffgehalt steigt von 1.75 % auf
2.62 %. Die Oberflächenbelegung beträgt laut TGA 0.17 mmol g^{-1} , nach der Be-
rechnung über Elementaranalysendaten jedoch 0.24 mmol g^{-1} . Der tatsächliche
Wert liegt vermutlich zwischen beiden Werten. Einige der analytischen Daten
des ND **42** und dessen Vorstufen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Analytische Daten der Nanodiamanten **19**, **31** und **42**.

ND	Stickstoffgehalt [%]	Oberflächenbelegung [mmol g ⁻¹]	Zeta-Potential [mV]
19	2.21	-	41.0 (pH = 5.8)
31	1.75	0.42	-8.2 (pH = 4.5)
42	2.62	0.17	-10.7 mV (pH = 5.5)

Der ND **42** sollte anschließend in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Schirmeister mit Hilfe von *in vitro* Tests auf seine Aktivität gegen Aspartat Proteasen hin getestet werden. Jedoch wurde festgestellt, dass schon mechanisch deagglomerierter Nanodiamant **19** sich hemmend auf verschiedene Enzymassays auswirkt. Dabei ist momentan noch unklar ob Nanodiamant die Enzymstruktur z.B. durch Adsorption negativ beeinflusst oder die gemessenen Werte durch Lichtstreuung verfälscht werden, da es sich um fluorimetrische Assays handelt.

3.2 Immobilisierung von Proteinen

Wie bereits erwähnt beschäftigt sich das Vascubone-Projekt mit der Erforschung neuer Knochenersatzmaterialien. Die aus β -Tricalciumphosphat oder verschiedenen Polymeren aufgebauten *scaffolds* werden dabei durch ein spezielles Verfahren mit Nanodiamanten versehen. Um die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen zu verbessern und somit die Knochendefektstelle schneller ausheilen zu lassen, sollen die Nanodiamanten mit Wachstumsfaktoren funktionalisiert werden. Als Wachstumsfaktoren werden in der Biologie Proteine bezeichnet, welche als Signalgeber fungieren und verschiedene zelluläre Prozesse regeln oder auslösen. Diese Proteine werden auf der Zelloberfläche erkannt, wobei eine Konformationsänderung des Rezeptors weitere Signale auslöst, die anschließend zu einer Aktivierung oder Deaktivierung von Genen führen.

Proteine sind aufgrund ihres komplizierten räumlichen Aufbaus, der sog. Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur, empfindlich gegenüber drastischen pH-Wertänderungen, organischen Lösungsmitteln oder physikalischen Einwirkungen wie Hitze. Es muss daher ein möglichst schonendes Verfahren gefunden werden, um die Wachstumsfaktoren auf der Nanodiamantoberfläche kovalent anzubinden. Purtoy *et al.* übertrugen 2010 die in der Biochemie bereits etablierte Methode der Proteinanbindung mit Benzochinon auf Nanodiamant.^[93] Erstmals beschrieben wurde diese Methode der Proteinanbindung 1975 von Brandt *et al.*^[94]

Diese Methode setzt eine bereits mit Hydroxylgruppen modifizierte Substratoberfläche voraus. Die Hydroxylgruppen reagieren in einer Art Michael-Addition mit *p*-Benzochinon, wobei das entstehende Dihydrochinon von weiterem, im Überschuss eingesetzten *p*-Benzochinon zum entsprechenden Benzochinon zurückoxidiert wird. Die so mit Benzochinon funktionalisierte Oberfläche kann nun ohne Zugabe weiterer Kupplungsreagenzien mit Thiolen oder Aminen eines zugesetzten Proteins reagieren. Beide Schritte finden unter moderaten pH-Werten in einem wässrigen Puffersystem statt.

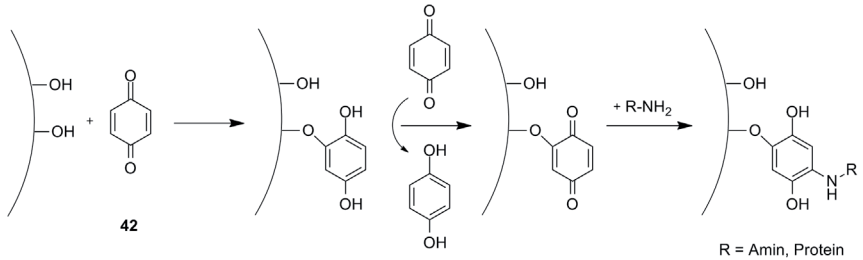


Abb. 44: Schematische Darstellung der *p*-Benzochinon Methode zur Anbindung von Proteinen.

Für die Funktionalisierung mit *p*-Benzochinon wurde aufgrund seiner verfügbaren Hydroxylgruppen mechanisch deagglomerierter Nanodiamant **19** verwendet. Die Reaktion findet bei RT in PBS-Pufferlösung bei einem pH-Wert von 8 statt.

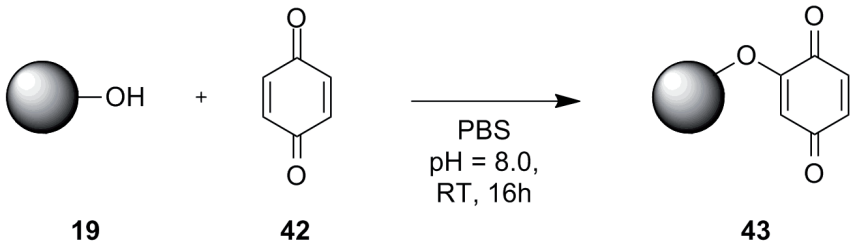


Abb. 45: Funktionalisierung von mechanisch deagglomeriertem ND **19** mit Benzochinon **42**.

Nach erfolgter Reaktion kann man im IR-Spektrum für den isolierten ND **43** zwei neue Banden erkennen: das charakteristische Signal der C=O-Streckschwingung der beiden Ketogruppen des Benzochinons bei 1650 cm^{-1} und das Signal der C-O-Streckschwingung bei 1197 cm^{-1} .

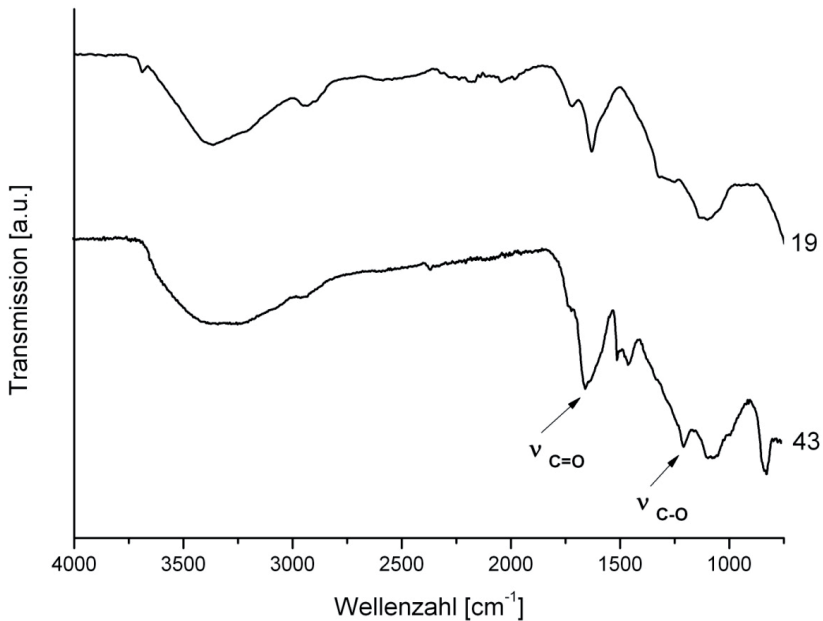


Abb. 46: IR-Spektren (ATR) von mechanisch deagglomeriertem ND **19** und Benzochinon-funktionalisiertem ND **43**.

Laut thermogravimetrischer Analyse beträgt die Oberflächenbelegung 0.43 mmol g^{-1} . Die Teilchengrößenmessung ergab Partikel zwischen 94 und 242 nm.

Der Benzochinon-funktionalisierte ND **43** kann anschließend unter moderaten Bedingungen, ohne Zusatz weiterer Kupplungsreagenzien mit aminhaltigen Proteinen oder Enzymen umgesetzt werden.

3.2.1 Lysozym

Aufgrund der hohen Kosten und der geringen Verfügbarkeit der beiden für das Projekt eingesetzten Wachstumsfaktoren Angiopoietin und BMP-2, wurde zunächst eine Testreaktion mit dem kommerziell gut erhältlichen und kostengünstigen Enzym Lysozym durchgeführt. Lysozym ist eines der am besten untersuchten Enzyme überhaupt.^[95] Es war das zweite Protein sowie das erste Enzym, dessen

Struktur mit Hilfe von Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte.^[95]

Am wahrscheinlichsten greift das Lysozym mit einer seiner sechs freien Lysin-Aminogruppen das Benzochinon-System unter Bildung eines Dihydrochinons nucleophil an. Die Reaktion findet bei RT und einem pH-Wert von 6.0 in PBS-Pufferlösung statt.

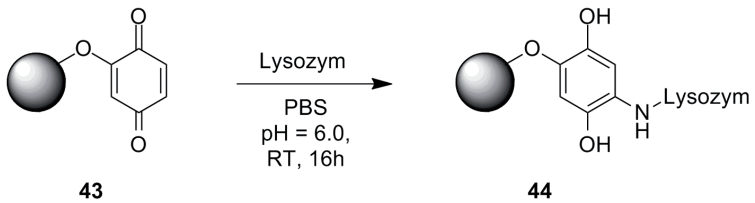


Abb. 47: Immobilisierung von Lysozym auf Benzochinon-funktionalisierten ND **43**.

Im IR-Spektrum des isolierten ND **44** kann man ein sehr intensives Amid I Signal der C=O-Streckschwingung der Amidgruppen des Enzyms bei 1648 cm^{-1} erkennen. Auch das Amid II Signal der N-H-Deformationsschwingung bei 1524 cm^{-1} ist gut zu sehen. Die Breite der beiden Signale ist auf die hohe Anzahl der verschiedenen substituierten Amidbindungen zurückzuführen.

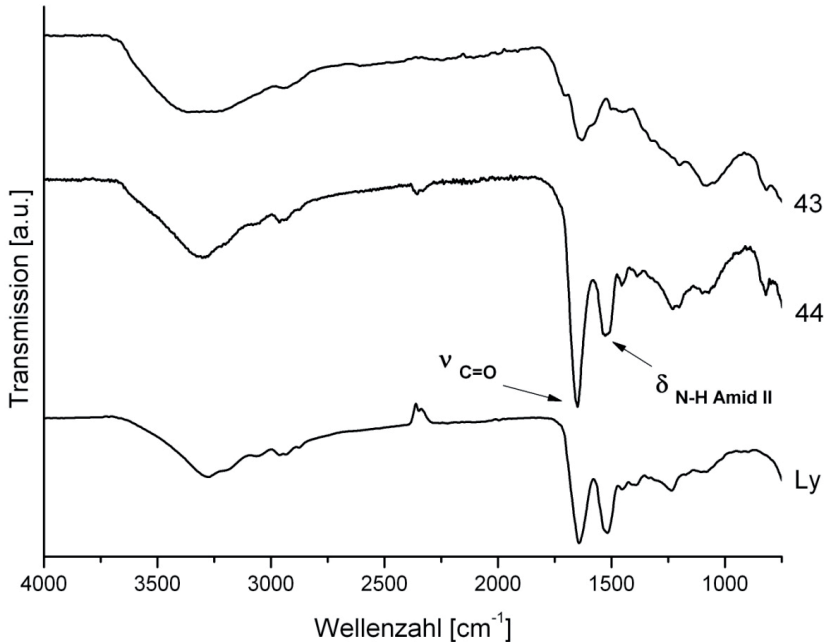


Abb. 48: IR-Spektren (ATR) von Benzochinon-funktionalisiertem ND **43**, Lysozym-funktionalisiertem ND **44** und Lysozym.

Die Elementaranalyse ergibt sowohl eine Erhöhung des ursprünglichen Stickstoffgehalts der ND **43** Vorstufe von 1.98 % auf 5.56 %, als auch das Hin-zukommen von Schwefel (0.74 %) welcher aus den schwefelhaltigen Amino-säuren des Lysozyms stammt. Der Gewichtsverlust bei der thermogravimet-rischen Analyse beläuft sich auf 20.80 % was für ein immobilisiertes Molekül mit einem Molekulargewicht von 14.3 kDa, eine Oberflächenbelegung von 0.01 mmol g⁻¹ ergibt. In Tabelle 8 sind einige der analytischen Daten des Lysozym-funktionalisierten Nanodiamanten **44** und dessen Vorstufen ange-gaben. So kann von einer erfolgreichen Umsetzung ausgegangen werden; eine Anbindung von Proteinen oder Enzymen an Nanodiamant ist folglich möglich und kann auf die Anbindung von Wachstumsfaktoren übertragen werden.

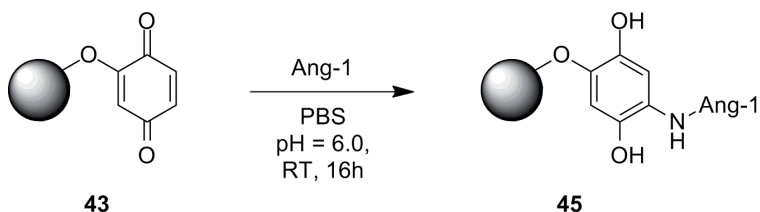
Tabelle 8: Analytische Daten der Nanodiamanten **19**, **43** und **44**.

ND	Stickstoffgehalt [%]	Oberflächenbelegung [mmol g ⁻¹]	Zeta-Potential [mV]
19	2.21	-	41.0 (pH = 5.8)
43	1.98	0.43	-30.8 mV (pH = 6.3)
44	5.56	0.01	9.4 mV (pH = 5.8).

3.2.2 Angiotensin II (Angiotensin II)

Das Wachstum neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden wird Angiogenese genannt. Dieser Vorgang ist, neben der Osteogenese, essentiell für das Ausheilen eines Knochendefekts. Ang-1 und Ang-2, die beiden wichtigsten Vertreter der Angiotensin Familie, scheinen beim Vorgang der Angiogenese eine große Rolle zu spielen.^[96] Um eine Ausheilung eines kritischen Knochendefektes zu ermöglichen, sollen mit Angiotensin II (Ang-1) funktionalisierte Nanodiamanten auf *scafolds* aufgebracht werden.

Für die Immobilisierung von Ang-1 auf Nanodiamant wurde, wie bei Lysozym, Benzochinon-funktionalisierter Nanodiamant **43** benutzt. Die Reaktion findet unter analogen Bedingungen statt.

**Abb. 49:** Immobilisierung von Angiotensin II auf Benzochinon-funktionalisiertem ND **43**.

Im IR-Spektrum des Angiotensin II-funktionalisierten ND **45** erkennt man, wie auch schon beim Lysozym-funktionalisierten ND **44**, eine Verschiebung des Signals der C=O-Streckschwingung von 1650 cm⁻¹ des Benzochinon-funktionalisierten ND **43**, hin zu 1629 cm⁻¹. Auch hier ist die Breite des

Signals auf die hohe Zahl der verschiedenen Amidgruppen des Proteins zurückzuführen.

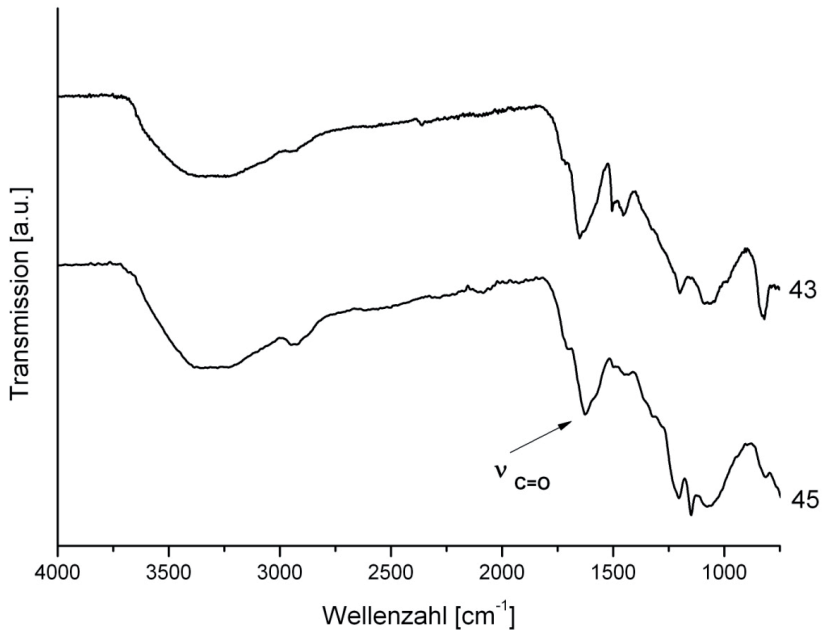


Abb. 50: IR Spektren (ATR) von Benzochinon-funktionalisiertem ND **43** und Angiotensin-funktionalisiertem ND **45**.

Weitere analytische Daten des Angiotensin-funktionalisierten ND **45** und dessen Vorstufe sind in Tabelle 9 am Ende dieses Kapitels angegeben. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors Angiotensin, wurde auf weitere Analysen mit hohem Substanzverbrauch verzichtet.

Mit Angiotensin funktionalisierte Nanodiamantproben wurden in Knochenersatzmaterialien der Marken Cerasorb und ChronOS eingebettet. In Tierversuchen an der Medizinischen Universität Innsbruck wurden sie auf ihren angiogenen Effekt hin untersucht.

Hauptaugenmerk dabei war die Anzahl der neugebildeten Blutgefäße im Zentrum des Defektes. Cerasorb und ChronOs wurden jeweils unbehandelt, mit Na-

nodiamant und physisorbiertem Angiopoietin und mit Nanodiamant und kovalent gebundenem Angiopoietin untersucht. Der signifikanteste Unterschied bei der Bildung neuer Gefäße konnte für das Cerasorb-Material festgestellt werden (Abb. 51). Die Anzahl der neugebildeten Gefäße für Cerasorb mit Nanodiamant und kovalent angebindenem Angiopoietin übertraf dabei die von reinem Cerasorb um ein Vielfaches.

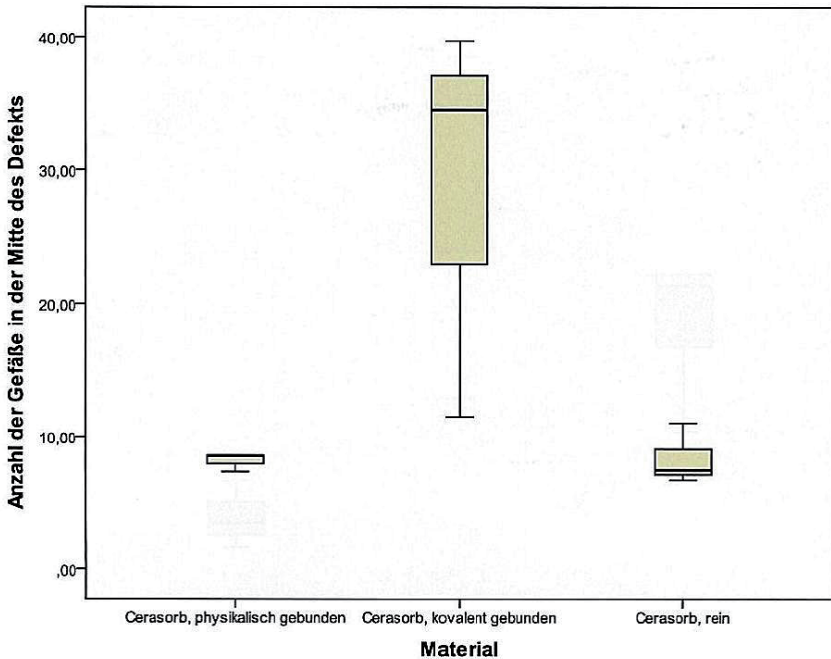


Abb. 51: Anzahl der neugebildeten Blutgefäße in der Mitte des Knochendefekts für Cerasorb nach drei Monaten. Proben ausgewertet von Alexander Gruber, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Michael Rasse, Universitätsklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Innsbruck.

3.2.3 BMP-2

Der Vorgang zur Bildung von Knochen wird Osteogenese genannt. Dabei differenzieren mesenchymale Stammzellen zu Osteoblasten, welche durch Mineralisierung das anorganische Knochengrundgerüst bilden und sich anschließend zu

Osteozyten umwandeln. BMP-2, einer der am besten charakterisierten Vertreter der sog. *bone morphogenetic proteins*, zeigt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine besonders starke osteoinduktive Wirkung.^[97] Um das Knochenwachstum zu beschleunigen und so die Defektheilung nach dem operativen Einsatz des Implantats zu verbessern, sollen Nanodiamanten vor dem Aufbringen auf das Trägermaterial mit BMP-2 funktionalisiert werden.

Die Immobilisierung des Wachstumsfaktors BMP-2 auf Nanodiamant fand analog zur Immobilisierung von Angiopoietin und Lysozym statt.

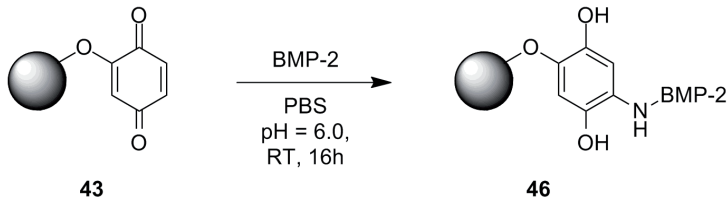


Abb. 52: Immobilisierung von BMP-2 auf Benzochinon-funktionalisiertem ND **43**.

Auch bei der Funktionalisierung mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 ist im IR-Spektrum eine Verschiebung des Signals der C=O-Streckschwingung von 1650 cm^{-1} des Benzochinon-funktionalisierten ND **43** hin zu 1636 cm^{-1} zu erkennen. Die Breite des Signals ist ebenfalls durch die hohe Anzahl verschiedener Amidgruppen des Proteins zu erklären. Das Signal der N-H-Deformationsschwingung (Amid II) ist nicht zu erkennen und liegt vermutlich unter dem breiten Signal zwischen 1650 und 1550 cm^{-1} .

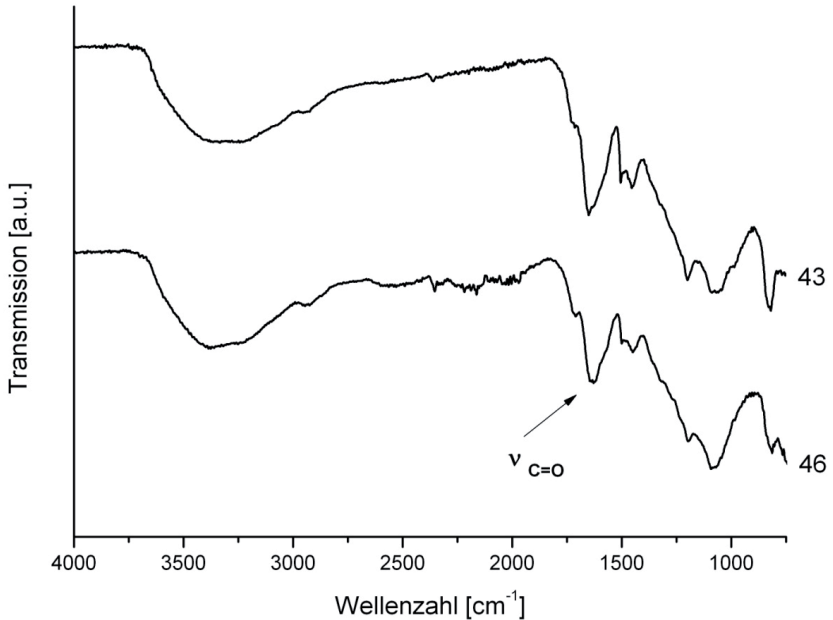


Abb. 53: IR Spektren (ATR) von Benzochinon-funktionalisiertem ND **43** und BMP-2-funktionalisiertem ND **46**.

Weitere analytische Daten des BMP-2-funktionalisierten ND **46** sowie dessen Vorstufen ND **43** sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Auf weitere Analysen mit hohem Substanzverbrauch, z.B. TGA und Elementaranalyse, wurde aufgrund der geringen Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors verzichtet.

Tabelle 9: Analytische Daten der Nanodiamanten **43**, **45** und **46**.

ND	Teilchengröße [nm]	Zeta-Potential
43	10 % ≤ 94, 50 % ≤ 90, 90 % ≤ 242	-30.8 mV (pH = 6.3)
45	10 % ≤ 48, 50 % ≤ 239, 90 % ≤ 683	16.0 mV (pH = 4.16)
46	10 % ≤ 36, 50 % ≤ 55, 90 % ≤ 100	-35.2 mV (pH = 6.3)

BMP-2-funktionalisierter ND **46** wurde von Salwa Suliman von der Universität Bergen im Tiermodell auf seine osteoinduktiven Eigenschaften hin getestet werden. Kovalent angebundenes BMP-2 scheint im Gegensatz zu adsorbiertem Wachstumsfaktor keine osteoinduktive Aktivität aufzuweisen. Scheinbar muss das Protein von der Diamantoberfläche und vom Implantat freigesetzt werden um wirken zu können.

3.3 Immobilisierung von Farbstoffen

Für Nanodiamanten mit immobilisierten Fluoreszenzfarbstoffen gibt es mehrere biologische und medizinische Anwendungsmöglichkeiten. Beispielsweise kann man das Verhalten und den Verbleib von Nanodiamanten im Gewebe, z.B. die Aufnahme in Zellen oder die Biodistribution, untersuchen. Im Rahmen des Vascubone-Projektes war es notwendig, das Eindringverhalten der mit Fluoreszenzfarbstoff funktionalisierten Nanodiamanten in die verschiedenen *scaffolds* zu untersuchen.

3.3.1 Oregon Green

Für die Immobilisierung des Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green 488 wurde, wie auch schon für die Immobilisierung verschiedener Proteine, Benzochinon-funktionalisierter ND **43** verwendet. Die Reaktion findet ebenfalls in PBS-Pufferlösung, bei einem pH-Wert von 6.0 statt. Das mit einer primären Aminogruppe derivatisierte Oregon Green 488 Cadaverin kann so ohne Zusatz weiterer Kuppelungsreagenzien an den Benzochinon-funktionalisierten ND **43** gekuppelt werden.

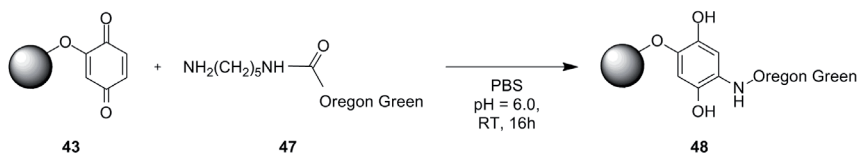


Abb. 54: Immobilisierung von Oregon Green auf Benzochinon-funktionalisiertem ND **43**.

Das IR-Spektrum des Oregon Green-funktionalisierten ND **48** zeigt ein Signal bei 1633 cm^{-1} , das sowohl der C=O-Streckschwingung der Amidgruppe des Oregon Greens als auch der O-H-Deformationsschwingung der Hydroxylgruppen zugeordnet werden kann. Das Signal der C-O-Streckschwingung kann bei 1150 cm^{-1} detektiert werden.

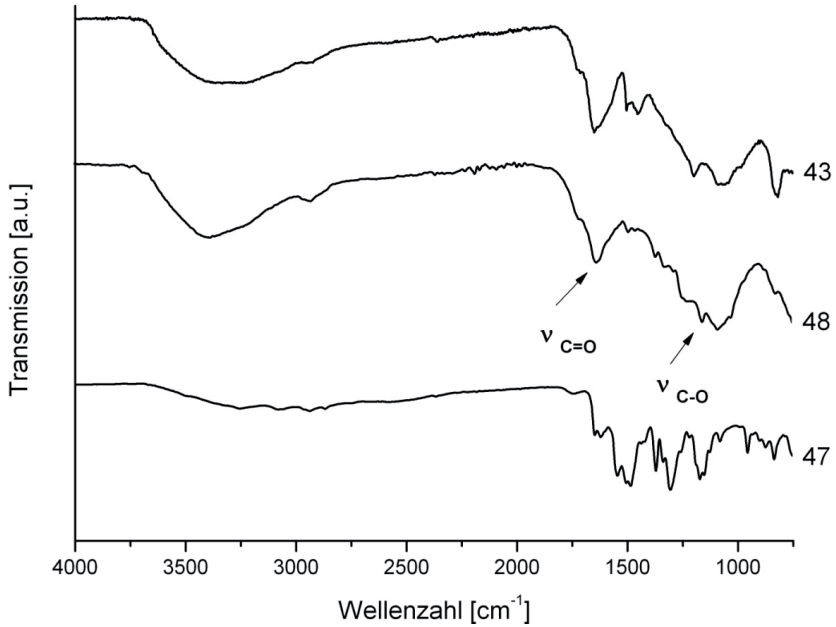


Abb. 55: IR Spektren (ATR) von Benzochinon-funktionalisiertem ND **43**, Oregon Green-funktionalisiertem ND **48** und Oregon Green **47**.

Mit Fluoreszenzfarbstoffen funktionalisierter Nanodiamant lässt sich auch gut über UV/Vis-Spektroskopie untersuchen. Abbildung 56 zeigt die Absorptionsspektren des Benzochinon-funktionalisierten ND **43**, des Oregon Green-funktionalisierten ND **48** und des freien Farbstoffes **47**. Es fällt auf, dass ND **48**, im Gegensatz zu ND **43**, die für Oregon Green typische Absorption aufweist.

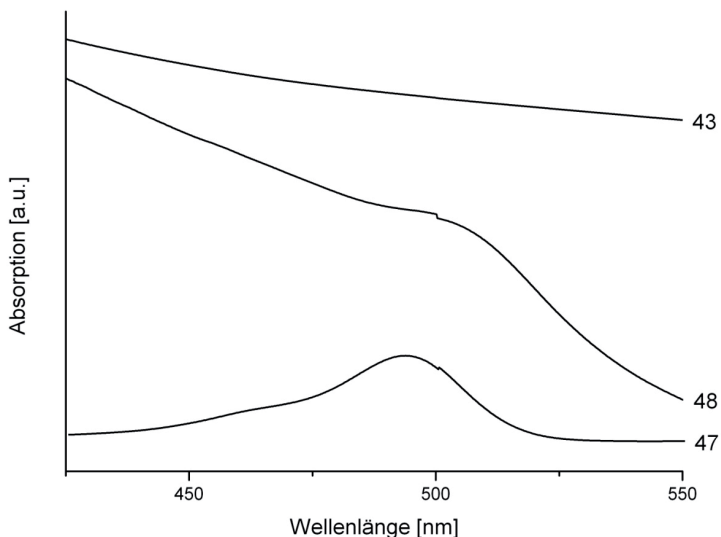


Abb. 56: UV/Vis-Spektren (DMF/H₂O 3:1) von Benzochinon-funktionalisiertem ND **43**, Oregon Green-funktionalisiertem ND **48** und freiem Oregon Green **47**.

Nach der Umsetzung mit dem Farbstoff steigt laut Elementaranalyse der Stickstoffgehalt des Produktdiamanten von 1.98 % auf 2.36 % an. Die Oberflächenbelegung fällt, wie oft bei der Immobilisierung solch großer Moleküle, mit 0.07 mmol g⁻¹ eher gering aus. In Tabelle 10 sind die wichtigsten analytischen Daten des Oregon Green-funktionalisierten ND **48** und dessen Vorstufen angegeben.

Tabelle 10: Analytische Daten der Nanodiamanten **19**, **43** und **48**.

ND	Stickstoffgehalt [%]	Oberflächenbelegung [mmol g ⁻¹]	Zeta-Potential [mV]
19	2.21	-	41.0 (pH = 5.8)
43	1.98	0.43	-30.8 mV (pH = 6.3)
48	2.36	0.07	40.1 mV (pH = 5.8)

Um herauszufinden, ob sich das von der Rhobest GmbH für das Vascubone-Projekt entwickelte Perfusionsverfahren für die Belegung der *scaffolds* mit

Nanodiamanten für die vollständige Imprägnierung eignet, wurde ND **48** verwendet und Schnittproben der *scaffolds* anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die *scaffolds* (Kantenlänge 1 cm) wurden von der Rhobest GmbH bei einem Druck von 1.5 bar und einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml s^{-1} mit der Nanodiamantsuspension (20 mg ml^{-1}) imprägniert und anschließend im Vakuum getrocknet. In Abbildung 57 sind Fluoreszenzbilder der Schnittproben zweier verschiedener *scaffolds* (Cerasorb und ChronOs) zu sehen. Die beiden Bilder rechts zeigen deutlich, dass sich der Oregon Green-funktionalisierte Nanodiamant **48** gleichmäßig über die *scaffold* Struktur verteilt. Links daneben zum Vergleich der unfunktionalisierte ND **19**.

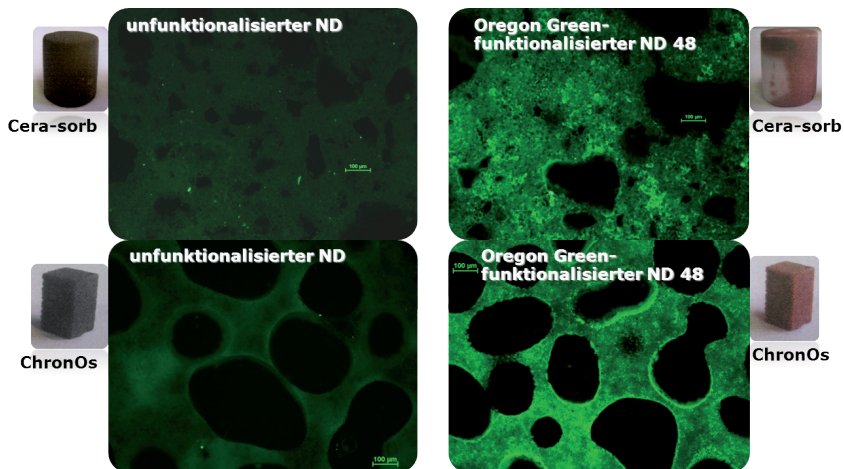


Abb. 57: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier verschiedener *scaffolds* mit Nanodiamanten. Aufgenommen von Frau Mag. Michela Bruschi, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Doris Steinmüller (Rhobest GmbH, Innsbruck).

Für beide untersuchten Träger-Varianten eignet sich das Perfusionsverfahren folglich, um Nanodiamant gleichmäßig aufzubringen. Für die spätere Belegung mit Stammzellen ist jedoch ein anderes Verfahren nötig, welches zur Zeit am Lehrstuhl für Tissue Engineering an der Universität Würzburg entwickelt wird.

3.3.2 Darstellung mehrfach funktionalisierter Nanodiamanten am Beispiel der Immobilisierung von Oregon Green und TAMRA

Um die Art der Aufnahme von Nanodiamanten in Makrophagen genauer zu untersuchen, sollten zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe auf Nanodiamant immobilisiert werden. Dabei muss ein Farbstoff fest, der zweite säurelabil angebunden werden. Wird der Nanodiamant über Phagozytose aufgenommen, ändert sich der pH-Wert des ihn umgebenden Mediums und der säurelabil angebundene Farbstoff sollte sich ablösen. Finden sich in den Zellen nur noch Nanodiamanten mit dem fest angebundenen Farbstoff, ist dies ein Zeichen für den Aufnahmeweg über Phagozytose. Kommt es zu einer passiven Aufnahme, z.B. Diffusion, sollten sich, da es zu keiner starken Änderung des pH-Wertes kommt, hauptsächlich Nanodiamanten mit beiden Farbstoffen im Zellinneren finden lassen.

Zunächst muss Nanodiamant orthogonal funktionalisiert werden. Hierzu müssen zwei verschiedene funktionelle Gruppen eingeführt werden. Für die feste Anbindung wurde die Funktionalisierung mit einer Dreifachbindung und anschließender Click-Reaktion mit dem Farbstoff gewählt.^[98] Der dadurch entstehende Triazol-Linker ist unter physiologischen Bedingungen nicht spaltbar. Die säurelabile Anbindung soll über die Funktionalisierung mit einer Acetophenon-Einheit stattfinden. Von beiden Linker-Systemen müssen zunächst die entsprechenden Diazoniumsalze hergestellt werden und anschließend auf der Diamantoberfläche immobilisiert werden. Um Agglomeration der Diamantpartikel zu vermeiden, wurde die Reaktionsmischung mit Ultraschall (Sonotrode) behandelt.

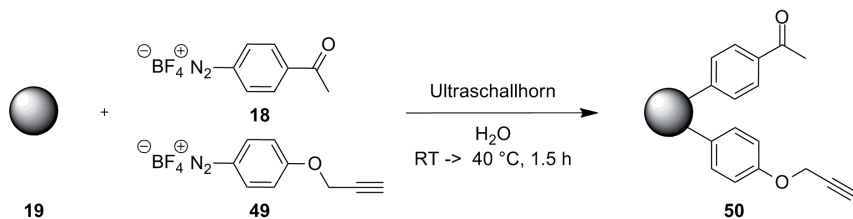


Abb. 58: Orthogonale Funktionalisierung von mechanisch deagglomeriertem ND **19** mit Acetophenon- und Alkin-Einheiten.

Die erfolgreiche Umsetzung zum orthogonal funktionalisierten ND **50** ist im IR-Spektrum gut zu erkennen (Abb. 59). Zunächst kann das charakteristische Signal der C-C-Streckschwingung des Alkins bei 2117 cm^{-1} detektiert werden. Auch die Signale der C=O-Streckschwingung der Acetophenon-Einheit bei 1680 cm^{-1} , der aromatischen C=C-Streckschwingung bei 1600 cm^{-1} und der aromatischen C-H-Deformationsschwingung bei 835 cm^{-1} sind gut zu erkennen.

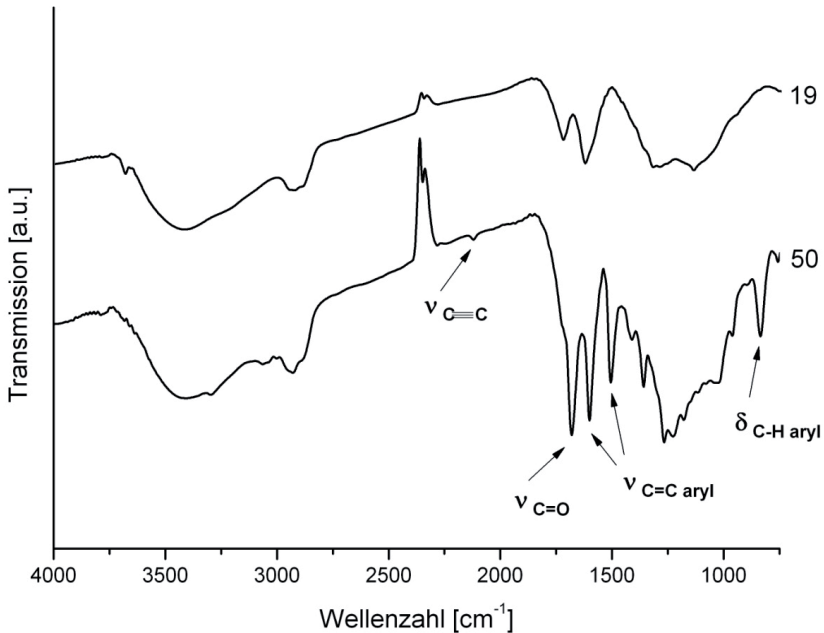


Abb. 59: IR-Spektren (KBr-Pellet) des mechanisch deagglomerierten ND **19** und des orthogonal funktionalisierten ND **50**.

Die thermogravimetrische Analyse ergab eine Oberflächenbelegung von 0.27 mmol g^{-1} , wobei schwer zu bestimmen ist, in welchem Verhältnis die beiden unterschiedlichen Linker vorliegen.

Für eine säurelabile Anbindung eines Farbstoffes muss nun die Acetophenon-Einheit weiter zum Hydrazon transformiert werden. Dies geschieht wie bei der Synthese des hydrazonfunktionalisierten ND **36** durch die Zugabe von Hydrazin in Ethanol.

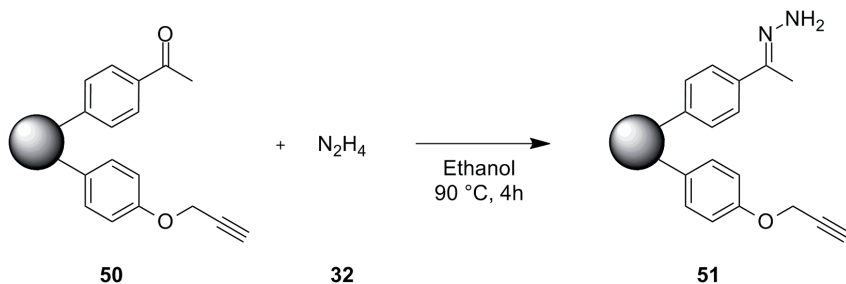


Abb. 60: Umsetzung von ND **50** mit Hydrazin (**32**) zum hydrazonfunktionalisierten ND **51**.

Im IR-Spektrum des isolierten ND **51** fällt zunächst das Fehlen des für die Acetophenon-Einheit charakteristischen Signals für die C=O-Streckschwingung bei 1680 cm^{-1} auf. Die Umsetzung der Acetophenon-Einheit zum entsprechenden Hydrazon scheint folglich quantitativ abzulaufen. Das Signal für die C=N-Streckschwingung des gebildeten Hydrazons kann bei 1631 cm^{-1} detektiert werden.

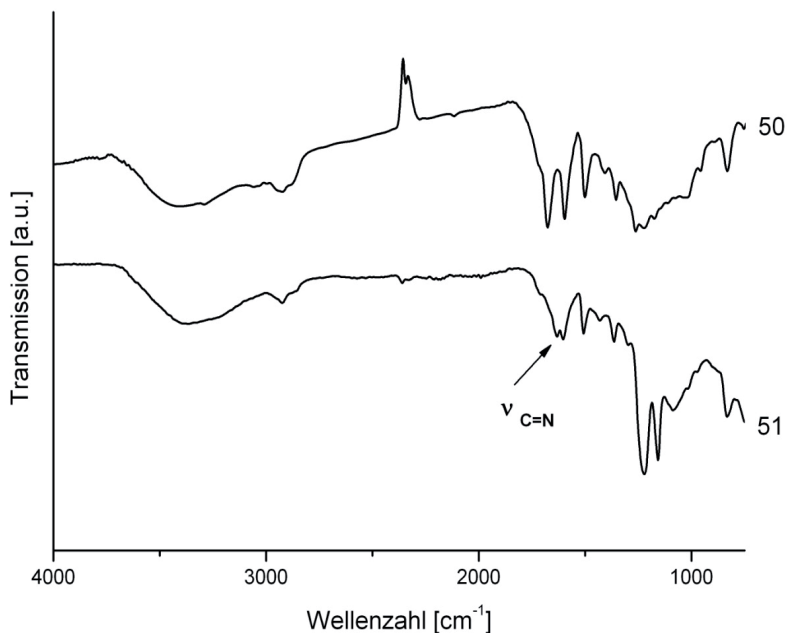


Abb. 61: IR-Spektren (ATR) des orthogonal funktionalisierten ND **50** und des hydrazonfunktionalisierten ND **51**.

Ein weiterer Hinweis für eine erfolgreiche Umsetzung zum entsprechenden Hydrazon ist der Anstieg des Stickstoffgehalts von 2.53 % für den orthogonal funktionalisierten ND **50** auf 3.42 % für den hydrazonfunktionalisierten ND **51**. Die durch die thermogravimetrische Analyse berechnete Oberflächenbelegung beträgt 0.33 mmol g^{-1} .

Die Alkin-Funktion des ND **51** kann nun genutzt werden, um den azidfunktionalisierten Farbstoff TAMRA via Click-Reaktion auf der Nanodiamantoberfläche zu immobilisieren. Als Kupferkatalysator wird Kupfer(II)sulfat und als Reduktionsmittel um *in situ* Kupfer(I)-Ionen zu erzeugen Natriumascorbat verwendet. Als Lösungsmittel dient ein Gemisch aus Wasser und DMF. Wasser wird zur Beschleunigung dieser Art von Reaktionen oft beigemischt.^[99]

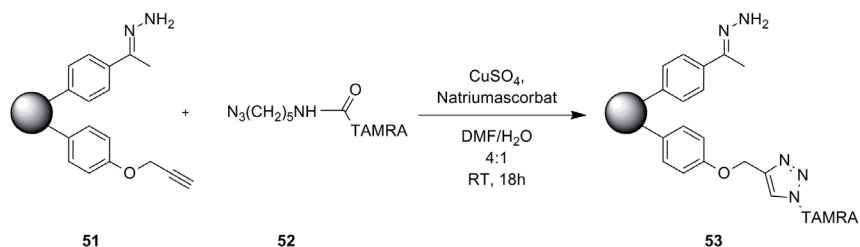


Abb. 62: Immobilisierung von TAMRA auf ND **51** via Click-Reaktion.

Im IR-Spektrum des TAMRA-funktionalisierten ND **53** kann man ein neues Signal für die C=O-Streckschwingung der Amidgruppe des TAMRA Farbstoffes bei 1677 cm^{-1} erkennen. Die aromatischen Banden der C=C-Streckschwingung bei 1600 cm^{-1} und der aromatischen C-H-Deformationsschwingung bei 835 cm^{-1} sind weiterhin gut zu erkennen.

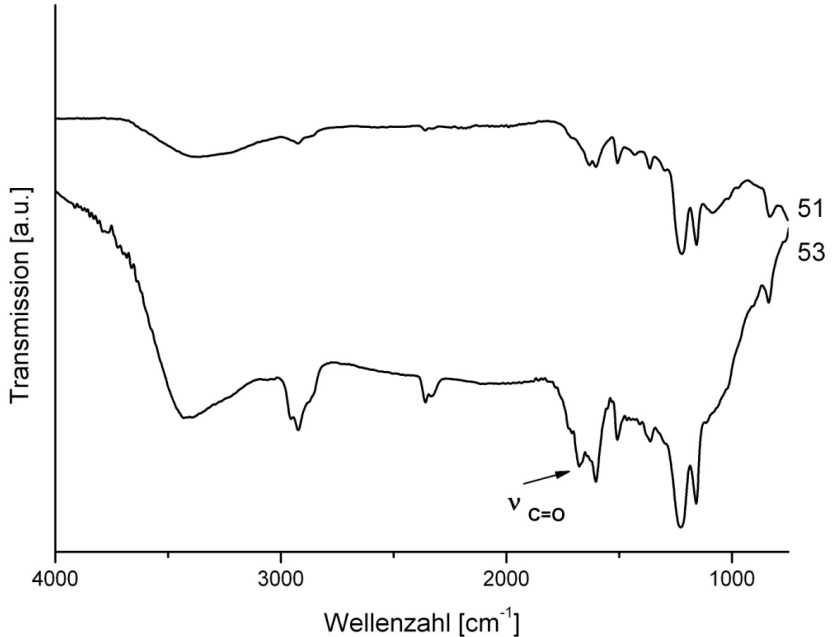


Abb. 63: IR-Spektren des mit Hydrazon- und Alkin-Einheiten funktionalisierten ND **51** und des mit TAMRA-funktionalisierten ND **53**.

Die aufgenommenen UV/Vis-Spektren zeigen ebenfalls die erfolgreiche Umsetzung. So ist für den ND **53**, im Gegensatz zum mechanisch deagglomerierten ND **19**, eine Absorptionsbande im Bereich der Absorption des freien TAMRA Farbstoffes **52** zu erkennen. Die leichte Verschiebung der Absorption hin zu höheren Wellenlängen kann durch die unterschiedlichen pH-Werte der reinen Farbstofflösung und der Nanodiamantsuspension erklärt werden.^[100,101] Wie auch schon bei den Absorptionsspektren des Oregon Green-funktionalisierten ND **48**, ist auch hier ein starker Anstieg der Basislinie hin zu den niedrigeren Wellenlängen zu beobachten, was auf die starke Streuung der Diamantpartikel zurückzuführen ist.^[102]

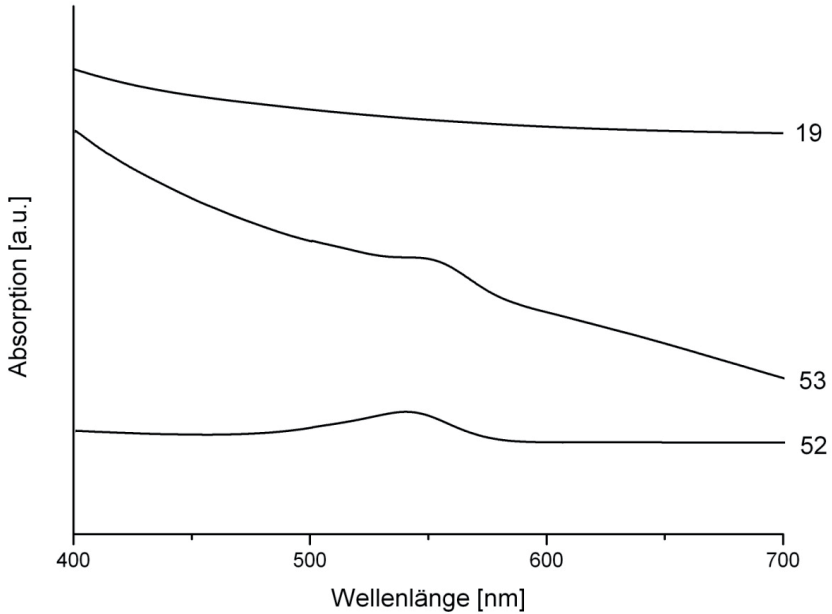


Abb. 64: UV/Vis-Spektren (DMF/H₂O 3:1) von mechanisch deagglomeriertem ND **19**, TAMRA-funktionalisiertem ND **53** und freiem TAMRA **52**.

Nach der erfolgreichen Funktionalisierung mit TAMRA erfolgt im nächsten Schritt die säurelabile Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green. Dafür soll, wie auch schon bei der Immobilisierung des Wirkstoffes Amphotericin B, das Hydrazon des ND **53** mit der Säuregruppe des Farbstoffes durch Knüpfung einer Amid-Bindung reagieren.

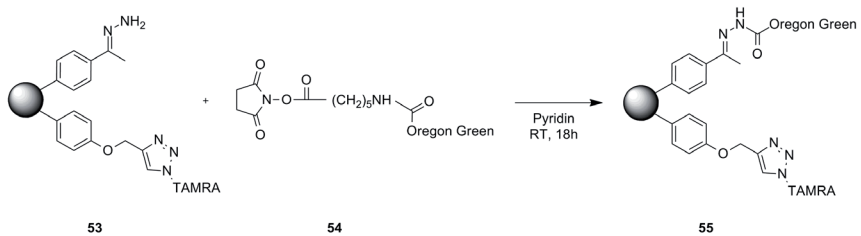


Abb. 65: Immobilisierung von Oregon Green auf TAMRA-funktionalisiertem ND **53**.

Im IR-Spektrum des isolierten ND **55**, sind lediglich im Fingerprint-Bereich neue Signale zu detektieren (Abb. 66, mit Pfeilen gekennzeichnet). So befinden sich neue Banden für die C-O-Streckschwingungen der Ether- und Alkohol-Funktionen des Oregon Greens im Bereich zwischen 1000 und 1100 cm^{-1} . Das Signal bei 958 cm^{-1} kann der C-H-*out of plane*-Schwingung des Vinylethers oder Vinylketons des Oregon Greens zugeordnet werden.

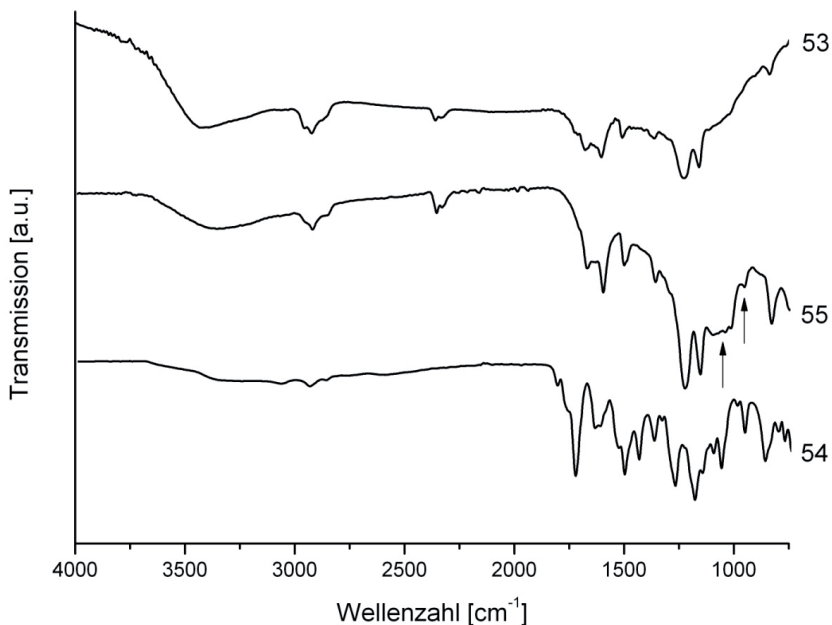


Abb. 66: IR-Spektren des TAMRA-funktionalisierten ND **53**, des TAMRA- und Oregon Green-funktionalisierten ND **55** und Oregon Green **54**.

Abbildung 67 zeigt die UV/Vis-Spektren des TAMRA- und Oregon Green-funktionalisierten ND **55** sowie der beiden freien Farbstoffe. Auch hier beobachtet man eine Verschiebung der Absorption in den langwelligeren Bereich, welche auf die verschiedenen pH-Werte (pH 6.4 für Farbstofflösung in DMF/ H_2O und pH 6.9 für Nanodiamantsuspension) der Lösungen zurückzuführen ist.^[100, 101] Die für TAMRA typische Absorption lässt sich jedoch nur erahnen. Möglicherweise überlagert die stärkere Absorption des immobilisierten Oregon Greens,

die des TAMRA Farbstoffes. Es ist anzunehmen, dass die Oberflächenbelegung nicht gleichmäßig erfolgt, sondern die Anbindung der Acetophenon-Einheit bevorzugt abläuft. Das daraus resultierende Missverhältnis der beiden Farbstoffe könnte die schlechte Erkennbarkeit der TAMRA Absorption erklären.

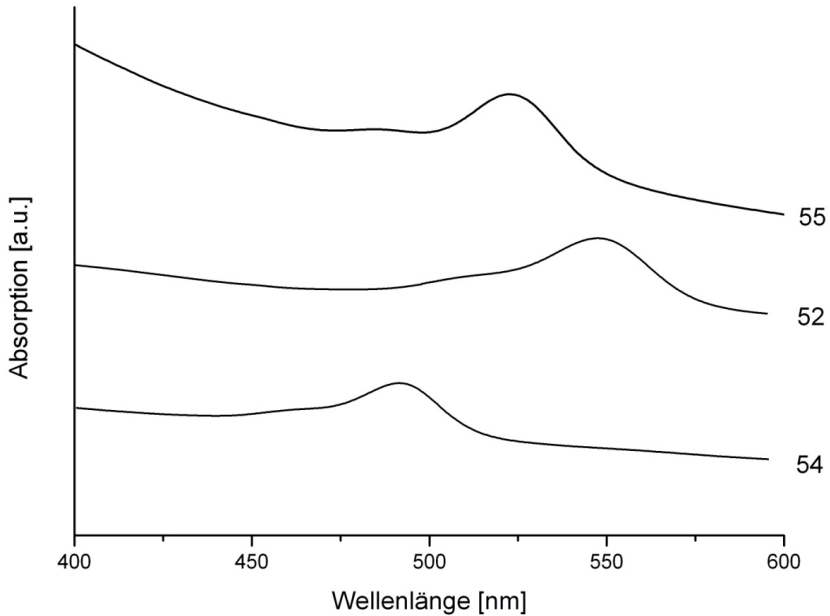


Abb. 67: UV/Vis-Spektren (DMF/H₂O 3:1) von TAMRA- und Oregon Green-funktionalisiertem ND **55**, freiem TAMRA (**52**) und freiem Oregon Green (**54**).

Anhand der Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 68 lässt sich jedoch deutlich die Anwesenheit beider Farbstoffe erkennen. Der Nanodiamant **55** wurde hierfür in Aceton suspendiert, getrocknet und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

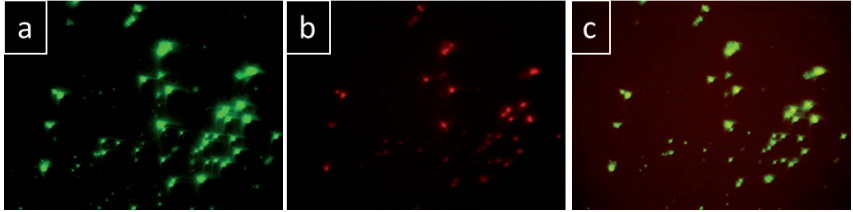


Abb. 68: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des TAMRA- und Oregon Green-funktionalisierten ND **55**. a) grüne Fluoreszenz, b) rote Fluoreszenz, c) Überlagerung beider Fluoreszenzfarben. Aufnahmen gemessen von Anja Hirmer, AG Fischer, Biozentrum, Universität Würzburg.

Für die Untersuchung der Aufnahmewege der Nanodiamanten in Makrophagen muss der Farbstoff Oregon Green im sauren pH-Bereich von der Diamantoberfläche abgespalten werden. Um dies zu verifizieren wurde ND **55** in zwei verschiedenen PBS-Pufferlösungen (pH 4.6 und pH 7.4) zwei Stunden inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die obere Reihe der Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 69 zeigt ND **55**, welcher bei pH 4.6 inkubiert wurde. Es ist sowohl grüne (Bild a), als auch rote Fluoreszenz (Bild b) zu beobachten. Bei der Überlagerung (Bild c) dieser Aufnahmen sind auch rot fluoreszierende Diamantpartikel zu erkennen (gekennzeichnet mit Pfeilen), obwohl diese in den doppelt funktionalisierten Proben normalerweise von der grünen Fluoreszenz überlagert werden. Die bei der Überlagerung rot erscheinenden Diamantpartikel sind somit nur noch mit TAMRA funktionalisiert, angebundenes Oregon Green muss also abgespalten worden sein. Die zweite Reihe der Fluoreszenzaufnahmen zeigt ND **50** welcher bei pH 7.4 inkubiert wurde. Auch hier kann man die zweifache Funktionalisierung mit Farbstoffen erkennen (Bild d und e). Bei der Überlagerung jedoch sind keine rot fluoreszierenden Partikel zu erkennen, was bedeutet dass keine Nanodiamanten vorliegen die nur noch den TAMRA Farbstoff tragen. Eine Abspaltung des Oregon Green Farbstoffes findet demnach nicht statt. Allerdings zeigen die Fluoreszenzaufnahmen nur Ausschnitte der Probe und sind für eine Quantifizierung der Farbstoffabspaltung nicht geeignet.

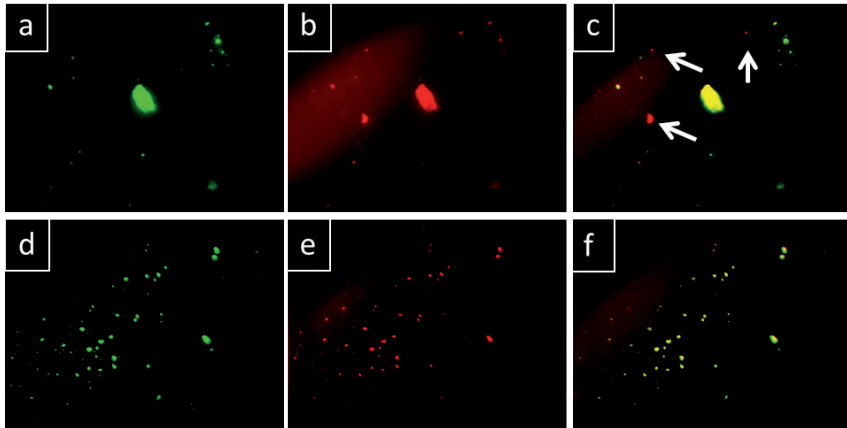


Abb. 69: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des TAMRA- und Oregon Green-funktionalisierten ND 55. a) grüne Fluoreszenz bei pH 4.7, b) rote Fluoreszenz bei pH 4.7, c) Überlagerung beider Fluoreszenzfarben bei pH 4.7, d) grüne Fluoreszenz bei pH 7.4, e) rote Fluoreszenz bei pH 7.4, f) Überlagerung beider Fluoreszenzfarben bei pH 7.4. Aufnahmen gemessen von Anja Hirmer, AG Fischer, Biozentrum, Universität Würzburg.

Die Ergebnisse zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, Nanodiamant mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen zu generieren. Dabei kann einer der Linker, hier die Alkin-Einheit, für eine besonders stabile, unter physiologischen Bedingungen nicht spaltbare Anbindung benutzt werden. Der zweite Linker kann so gewählt werden, dass eine zweite Substanz, z.B. Farb- oder Wirkstoff, säurelabil angebunden wird.

3.4 Immobilisierung eines Wirkstoffes und eines Farbstoffes

Ausgehend von den Ergebnissen in 3.3 wurde die gleichzeitige Immobilisierung von Wirk- und Farbstoff auf Nanodiamant untersucht. Auf diese Weise können mit Hilfe von *in vitro*-Tests sowohl die Wirksamkeit des Nanodiamanten als Wirkstofftransporter, als auch der genaue Aufenthaltsort der Partikel in den Zellen untersucht werden. Dabei ist vor allem wichtig, ob die Partikel überhaupt in das Zellinnere aufgenommen werden oder den Wirkstoff lediglich an der Zelloberfläche freisetzen.

Für die Immobilisierung zweier Substanzen, hier Wirkstoff und Farbstoff, muss mechanisch deagglomerierter ND **19** erneut mit zwei verschiedenen Linkern funktionalisiert werden. Der Wirkstoff soll säurelabil über einen Acetophenon-Linker, der Farbstoff stabil über eine Amidbindung angebunden werden, was die Etablierung einer Keto- und einer Carboxylfunktion erfordert. Die Umsetzung mit den beiden Diazoniumsalzen **18** und **31** findet analog zur Synthese des ND **50** statt. Auch hier werden beide Edukte im Verhältnis 1:1 eingesetzt und bei RT mit dem Ultraschallhorn behandelt.

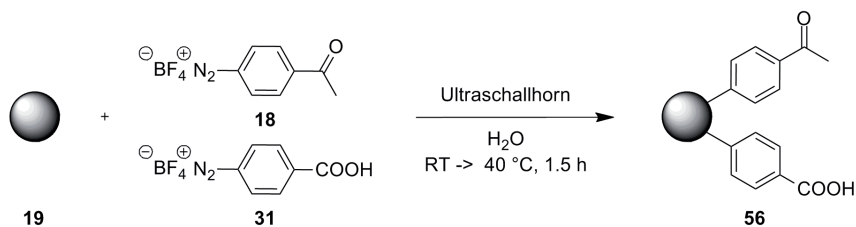


Abb. 70: Orthogonale Funktionalisierung von mechanisch deagglomeriertem ND **19** mit Acetophenon- und Benzoesäure-Einheiten.

Im IR-Spektrum des isolierten ND **56** kann man mehrere neue Signale im Carbonyl-Bereich erkennen. So befindet sich das Signal für die C=O-Streckschwingung der Säuregruppe bei 1706 cm⁻¹, das der C=O-Streckschwingung der Acetophenon-Einheit bei 1677 cm⁻¹. Auch die aromatischen Signale der C=C-Streckschwingung bei 1606 cm⁻¹ und der aromatischen C-H-Deformationsschwingung bei 850 cm⁻¹ werden detektiert. Die Oberflächenbelegung beträgt laut TGA 0.13 mmol g⁻¹.

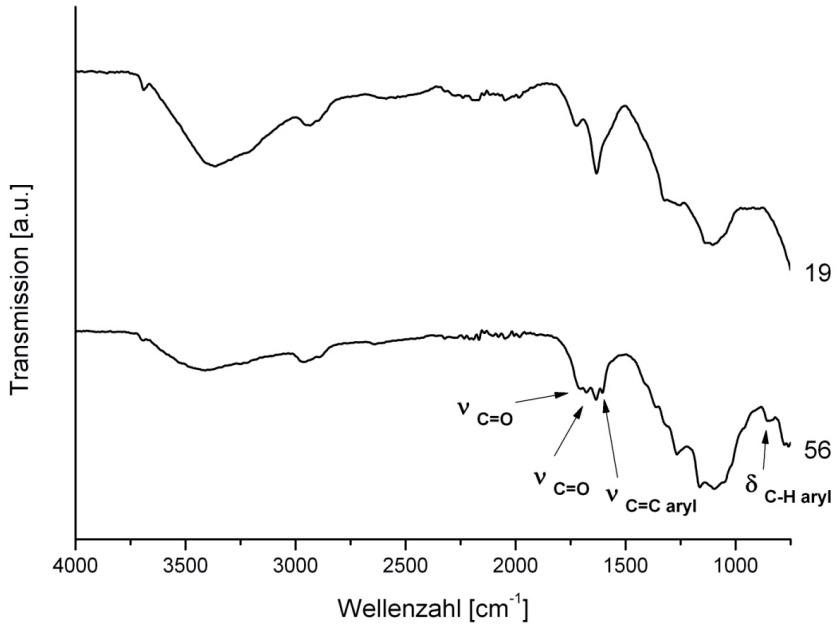


Abb. 71: IR-Spektren des mechanisch deagglomerierten ND **19** und des ND **56** mit Acetophenon- und Benzoesäure-Einheiten.

Aufgrund der Empfindlichkeit des Oregon Green Farbstoffes gegenüber Licht und Hitze muss zunächst der Wirkstoff, in diesem Fall Isoniazid, immobilisiert werden. Die Reaktion läuft analog zu der Synthese des Isoniazid-funktionalisierten ND **27** ab. Die Reaktionsmischung wird dabei vier Stunden in Ethanol unter Rückfluss erhitzt. Das Isoniazid bildet dabei mit dem Acetophenon das säurelabile Hydrason.

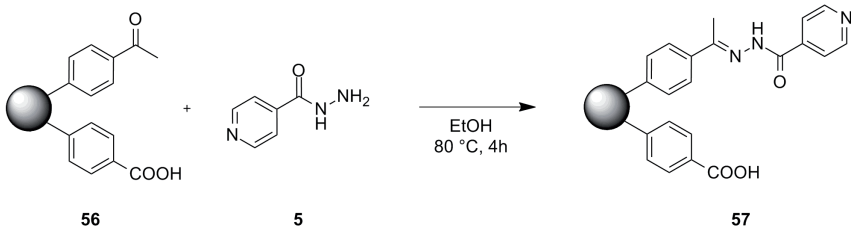


Abb. 72: Umsetzung des orthogonal funktionalisierten ND **56** mit Isoniazid.

Im IR-Spektrum (Abb. 73) des ND **57** ist weiterhin das Signal der Säurefunktion bei 1702 cm^{-1} zu erkennen. Die Bande der C=O-Streckschwingung der Acetophenon-Einheit (markiert mit einem Pfeil im Spektrum von ND **56**) ist nicht mehr detektierbar, was auf eine erfolgreiche Umsetzung hindeutet. Ein weiterer Hinweis auf eine gelungene Anbindung des Isoniazids ist die Amid II Bande der N-H-Deformationsschwingung bei 1548 cm^{-1} . Das Signal der C=O-Streckschwingung des Isoniazids (Amid I) kann aufgrund der Überlagerung mit weiteren Signalen im selben Bereich ($1670\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$) nicht detektiert werden.

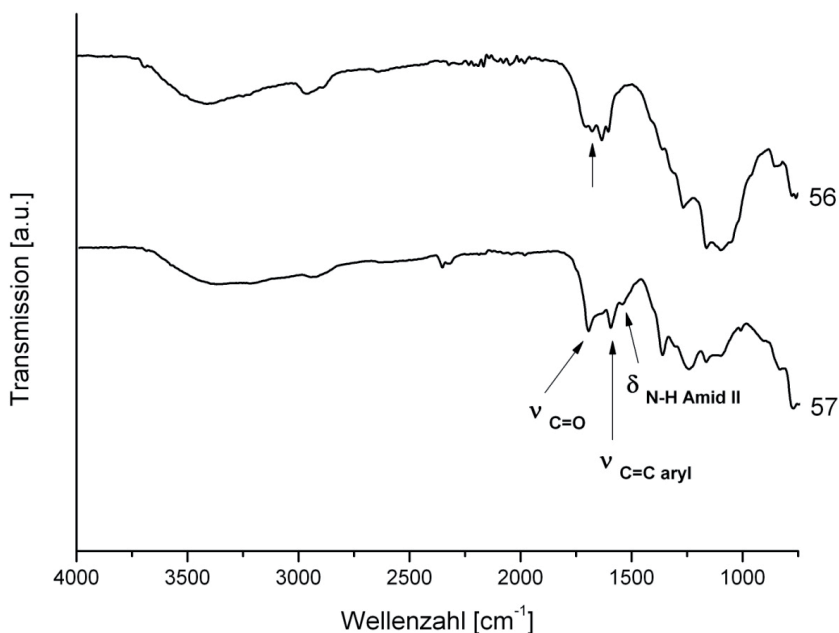


Abb. 73: IR-Spektren des mit Acetophenon- und Benzoesäure-Einheiten funktionalisierten ND **56** und des Isoniazid-funktionalisierten ND **57**.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse unterstützen die Hypothese einer erfolgreichen Umsetzung. Der Stickstoffgehalt steigt von 1.39 % für den orthogonal funktionalisierten ND **56** auf 3.02 % für den Isoniazid-funktionalisierten ND **57**. Laut thermogravimetrischer Analyse beträgt die Oberflächenbelegung 0.16 mmol g^{-1} .

Anschließend erfolgt die Immobilisierung des Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green, der in diesem Fall als Cadaverin-Derivat vorliegt und mit dessen terminaler NH_2 -Gruppe mit der Säuregruppe des Diamanten unter Knüpfung einer Amidbindung reagiert. Dafür werden die Edukte in Pyridin umgesetzt, als Kupplungsreagenz wird 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolon (EEDQ) zugegeben.

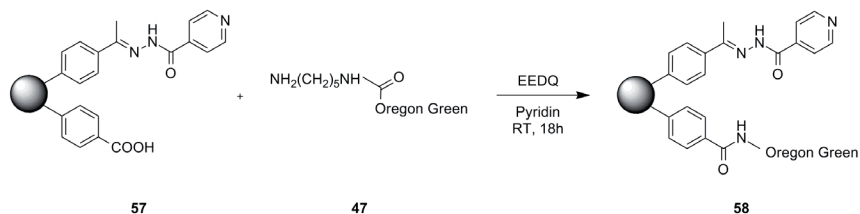


Abb. 74: Immobilisierung von Oregon Green **47** auf Isoniazid-funktionalisiertem ND **57**.

Hinweise für eine erfolgreiche Umsetzung können aus dem IR-Spektrum (Abb. 75) des isolierten ND **58** entnommen werden. So verschwindet das Signal der Säurefunktion der Benzoesäure-Einheit und wird durch ein neues Signal der C=O-Streckschwingung der neugeknüpften Amidbindung bei 1654 cm^{-1} ersetzt. Auch das Amid II Signal der N-H-Deformationsschwingung bei 1488 cm^{-1} und das Signal der C-O-Streckschwingung der Ether- und Alkohol-Funktionen des Oregon Greens können detektiert werden. Das Amid II Signal des angebundenen Isoniazids wird von den neu hinzugekommenen Signalen überlagert.

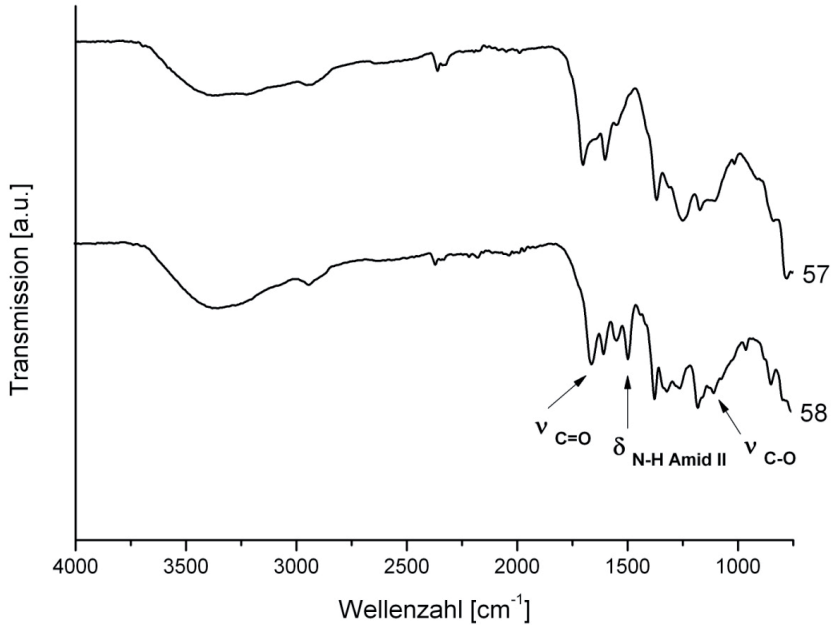


Abb. 75: IR-Spektren des Isoniazid-funktionalisierten ND **57** und des Isoniazid- und Oregon Green-funktionalisierten ND **58**.

Die Absorptionsmaxima des ND **58** im UV/Vis-Spektrum unterscheiden sich nur wenig von denen des freien Oregon Green Farbstoffes. Die leichte Verschiebung ist vermutlich, wie bei den anderen mit Farbstoffen funktionalisierten Diamantproben auch, auf die unterschiedlichen pH-Werte der Nanodiamant-Suspension (pH 8.2) und Farbstofflösung (pH 6.3) zurückzuführen.

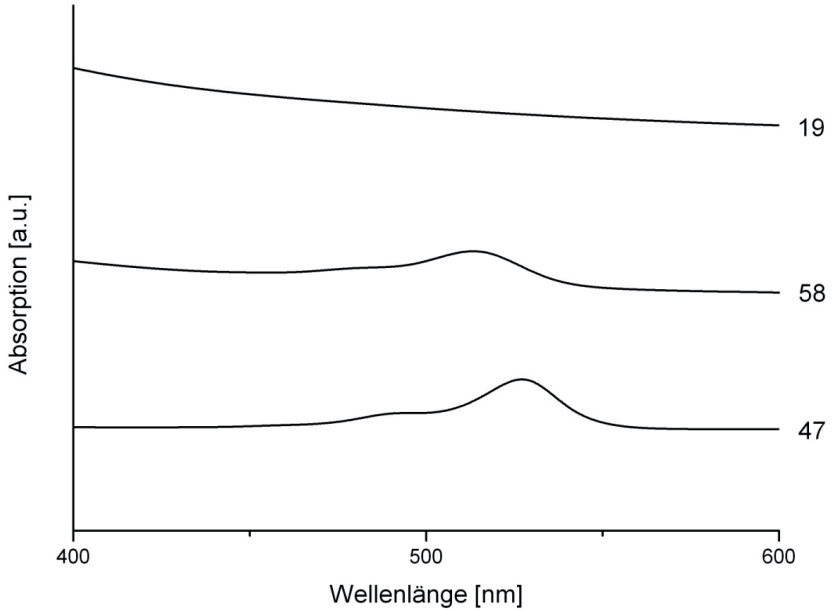


Abb. 76: UV/Vis-Spektren (DMF/H₂O 3:1) von mechanisch deagglomeriertem ND **19**, Isoniazid- und Oregon Green-funktionalisiertem ND **58** und freiem Oregon Green **47**.

In DMF/H₂O (3:1) lässt sich ND **58** gut suspendieren (bis zu 5 mg ml⁻¹) und zeigt Teilchengrößen zwischen 60 und 160 nm. Abbildung 77 zeigt drei Suspensionen von ND **58** in verschiedenen Konzentrationen.

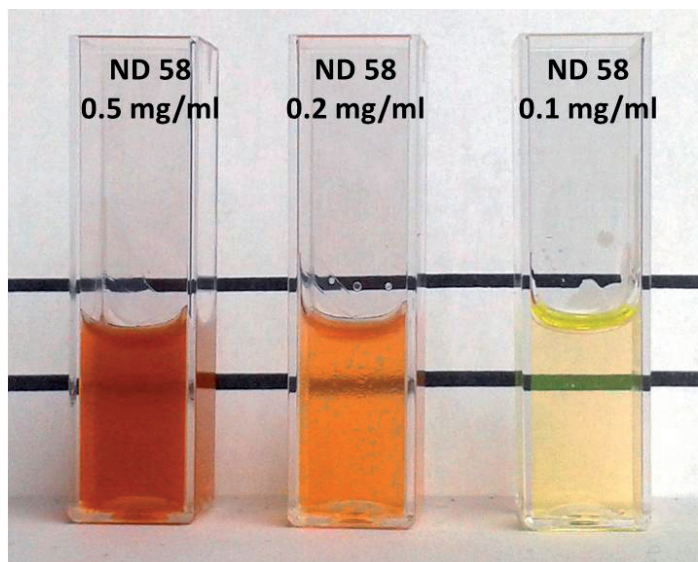


Abb. 77: Nanodiamant **58**. Suspensionen verschiedener Konzentrationen in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ 3:1.

Laut Elementaranalyse steigt der Stickstoffgehalt von 3.02 % des mit Isoniazid-funktionalisierten ND **57**, auf 3.17 % des Isoniazid- und Oregon Green-funktionalisierten ND **58**, was ebenfalls auf eine erfolgreiche Umsetzung hindeutet. Die Oberflächenbelegung beträgt laut TGA 0.07 mmol g^{-1} während sich durch die Elementaranalyse eine Belegung von 0.16 mmol g^{-1} ergibt. Tabelle 11, zeigt die Zusammenfassung analytischer Daten des Isoniazid- und Oregon Green-funktionalisierten ND **58** und dessen Vorstufen.

Tabelle 11: Analytische Daten der Nanodiamanten **19**, **56**, **57** und **58**.

ND	Teilchengröße [nm]	Zeta-Potential
19	10 % ≤ 5, 50 % ≤ 7, 90 % ≤ 10	41.0 mV (pH = 5.8)
56	10 % ≤ 13, 50 % ≤ 22, 90 % ≤ 53	31.9 mV (pH = 4.0)
57	10 % ≤ 28, 50 % ≤ 41, 90 % ≤ 67	10.5 mV (pH = 5.9)
58	10 % ≤ 61, 50 % ≤ 93, 90 % ≤ 160	7.2 mV (pH = 5.5)

Mit der erfolgreichen Synthese des ND **58** konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Nanodiamant sowohl mit einem Wirk- als auch mit einem Farbstoff zu funktionalisieren, was mehrere Vorteile mit sich bringt. So kann untersucht werden, ob die Diamantpartikel von den unterschiedlichen Zellen aufgenommen werden oder auf der Zelloberfläche verweilen. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops könnte man die genauen Aufenthaltsorte der Nanodiamanten in den Zellen bestimmen. Auch wäre es möglich, nach *in vivo* Tests das Schicksal der fluoreszierenden Nanopartikel in lebendem Gewebe aufzuklären, wobei jedoch die eher geringe Stabilität der meisten Fluoreszenzfarbstoffe beachtet werden muss. Hier bieten sich dann ND-Partikel mit inhärenten Lumineszenz-Zentren im Gitter an, da deren Emission nicht bleicht.

3.5 Sonstige Funktionalisierungen

Für weitere biologische und medizinische Anwendungen, sowohl im Rahmen des Vascubone Projektes als auch für andere Experimente, wurden weitere Diamantfunktionalisierungen vorgenommen.

3.5.1 Amin-Funktionalisierung

Mit Hilfe eines Amin-Linkers ist es nicht nur möglich, carboxäurefunktionalisierte Wirk- und Farbstoffe sowie Proteine über Amidknüpfungsreaktionen an Nanodiamant anzubinden. Auch eine säurelabile Immobilisierung keton- oder aldehydfunktionalisierter Moleküle ist über die Bildung eines Imins möglich. Will man diese Anbindung säurestabil gestalten, kann sie zum entsprechenden Amin reduziert werden.

Wie auch bei der Funktionalisierung mit Acetophenon- und Benzoesäure-Einheiten, wird zunächst das 4-Cyanobenzoldiazoniumtetrafluorborat (**60**) aus 4-Aminobenzoesäurenitril (**59**) hergestellt und mit mechanisch deagglomeriertem ND **19** unter Ultraschallbehandlung (Sonotrode) umgesetzt. Anschließend wird ND **61** mit Boran-THF-Komplex-Lösung nach Literaturvorschrift zum entsprechenden aminfunktionalisierten ND **62** reduziert.^[103]

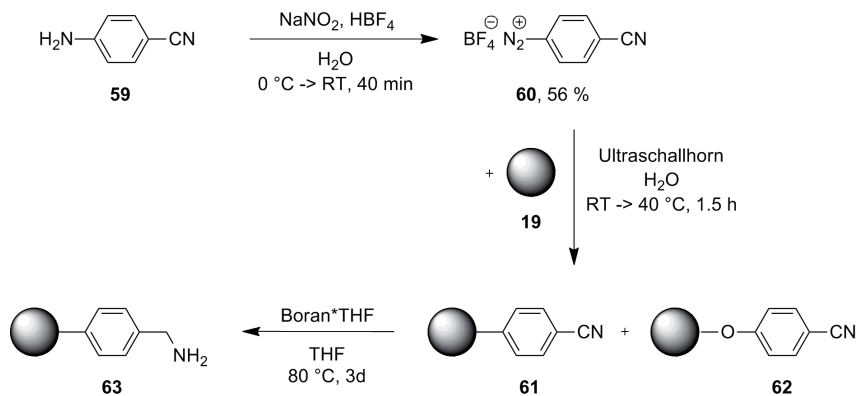


Abb. 78: Darstellung des aminfunktionalisierten ND **63**.

Im IR-Spektrum des nitrilfunktionalisierten ND **61** fällt zunächst das Signal der CN-Streckschwingung der Nitrilgruppe bei 2227 cm^{-1} auf. Ebenfalls zu detektieren sind die Banden der aromatischen C=C- und C-H-Schwingungen bei 1602 und 842 cm^{-1} . Nach der Reduktion zum ND **63** ist das Verschwinden des Signals für die Nitrilfunktion zu beobachten (siehe gestrichelte Linie in Abbildung 79). Auch ist eine Abnahme des Signals bei 1722 cm^{-1} , sowie eine Zunahme der Bande bei 1022 cm^{-1} zu verzeichnen. Daraus kann gefolgert werden, dass die neben den Alkohol-Funktionen auf Nanodiamantoberfläche befindlichen Säure-Funktionen zu den entsprechenden Alkoholen reduziert wurden.

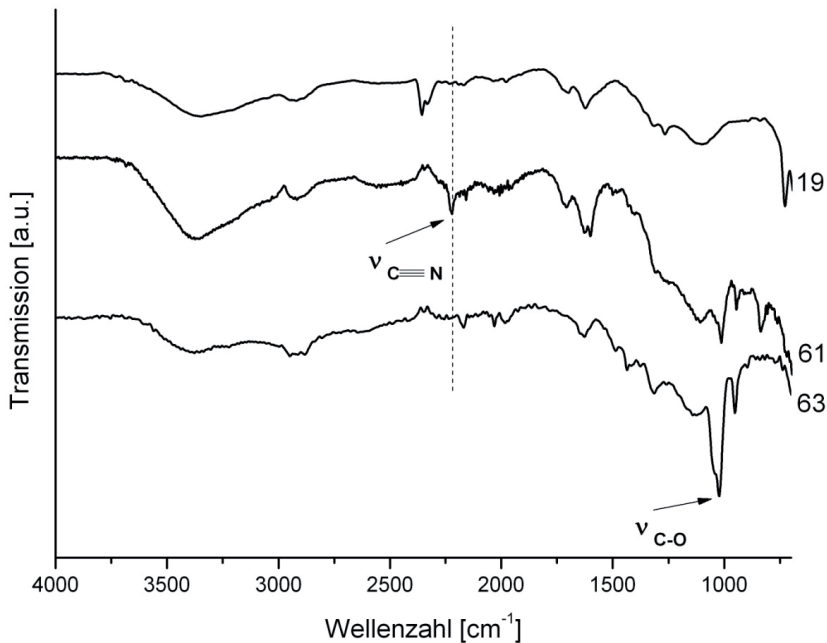


Abb. 79: IR-Spektren von mechanisch deagglomeriertem ND **19**, nitrilfunktionalisiertem ND **61** und aminfunktionalisiertem ND **63**.

Laut Elementaranalyse steigt der Stickstoffgehalt von 2.21 für den mechanisch deagglomerierten Ausgangsdiamant **19**, auf 3.77 % für den nitrilfunktionalisierten ND **61** an, fällt anschließend jedoch für den aminfunktionalisierten ND **63** wieder auf 2.63 % ab. In Tabelle 12 sind die wichtigsten analytischen Daten der ND **19**, **61** und **63** zusammengefasst.

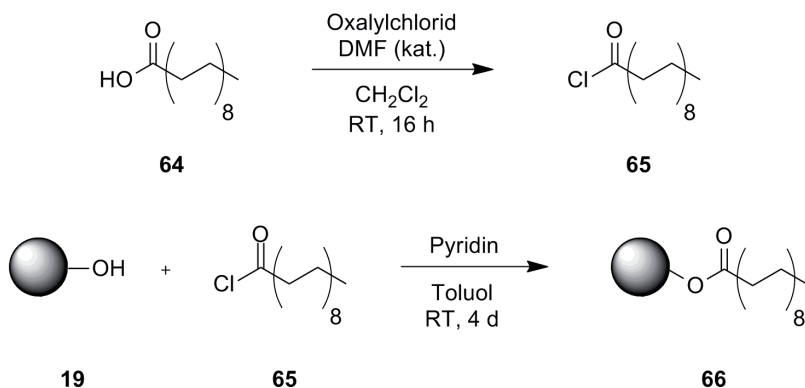
Tabelle 12: Analytische Daten der Nanodiamanten **19**, **61** und **63**.

ND	Stickstoffgehalt [%]	Oberflächenbelegung [mmol g ⁻¹]	Zeta-Potential [mV]
19	2.21	-	41.0 (pH = 5.8)
61	3.77	0.46	34.4 (pH = 4.04)
63	2.63	0.40	30.2 (pH = 4.13)

3.5.2 Funktionalisierung von Nanodiamant mit langen Alkylketten

Für das Vascubone Projekt sollten für die Einbettung in polymere Trägermaterialien Diamantnanopartikel entwickelt werden, welche in THF stabile Suspensionen bilden. Laut Khabashesku *et al.* führt die Funktionalisierung von Nanodiamant mit langen Alkylketten zu einer verbesserten Dispergierbarkeit in organischen Lösungsmitteln wie THF, Aceton, Chloroform, Ethanol und 2-Propanol.^[104]

Für die Alkylierung von Nanodiamant wird zunächst das Stearinsäurechlorid aus Stearinsäure nach Standardvorschrift hergestellt.^[105] Die freien Hydroxylgruppen des mechanisch deagglomerierten ND **19** können nun nucleophil am Carbonylkohlenstoff des Säurechlorids angreifen und den entsprechenden Ester bilden.^[106]

**Abb. 80:** Reaktionsschema für die Darstellung von Stearinsäure-funktionalisiertem ND **65**.

Wie man im IR-Spektrum des Stearinsäure-funktionalisierten ND **66** erkennen kann, gewinnt das Signal der C=O-Streckschwingung bei 1722 cm^{-1} an Intensität. Auch die Signale der C-H-Streckschwingungen bei 2952 cm^{-1} nehmen aufgrund der Funktionalisierung der Nanodiamantoberfläche mit Alkylketten zu.

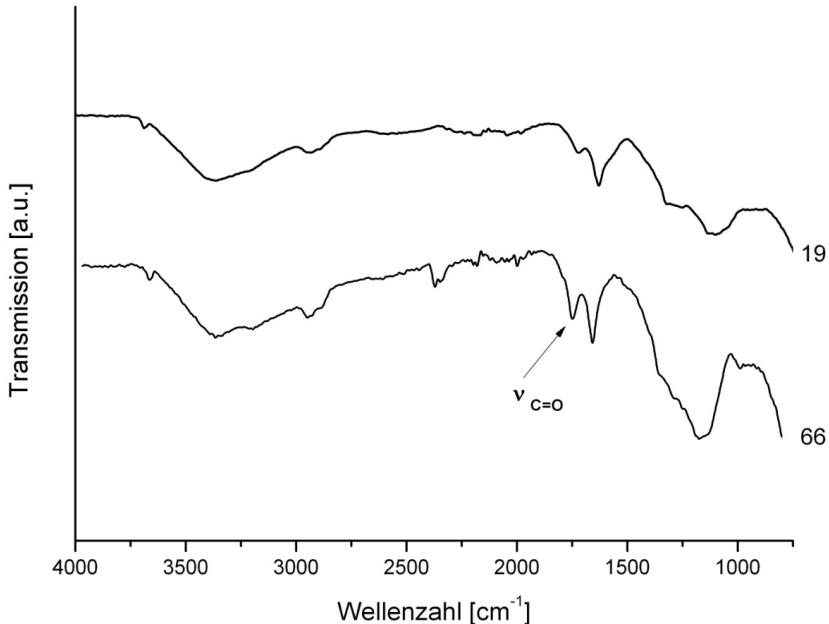


Abb. 80: IR-Spektren von mechanisch deagglomeriertem ND **19** und Stearinsäure-funktionalisiertem ND **66**.

Um das Dispergierungsverhalten des Stearinsäure-funktionalisierten ND **66** zu untersuchen, wird dieser mit Hilfe von Ultraschall (10 min.) in THF suspendiert (0.5 mg ml^{-1}). Nach 20 min. wird eine Teilchengrößenmessung vorgenommen. Der Stearinsäure-funktionalisierte ND **66** zeigt jedoch keine gute Dispergierbarkeit in THF. Er bildet keine transparente Dispersion und beginnt schon nach wenigen Minuten zu sedimentieren. Andere, ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Nanodiamanten zeigen eine bessere Dispergierbarkeit. So bilden sowohl Pentadion-funktionalisierter ND **28**, als auch Benzochinon-funktionalisierter ND **43** klare und stabile Suspensionen (siehe Abbildung 81).

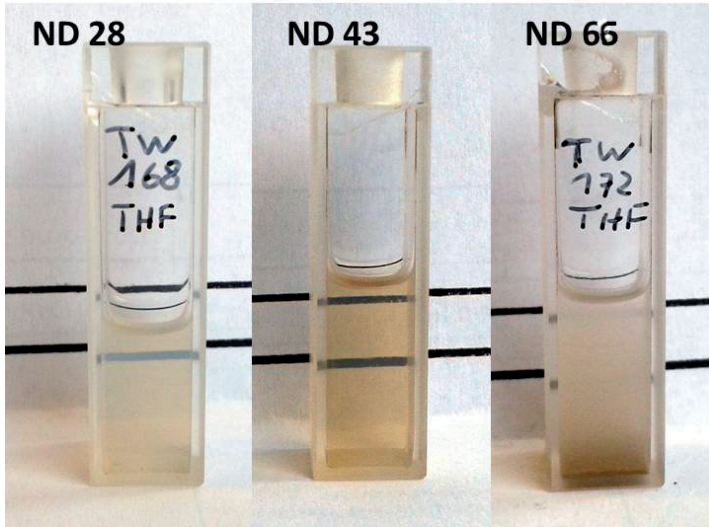


Abb. 81: Nanodiamantsuspensionen in THF (0.5mg ml^{-1}). Von links nach rechts: Pentadion-funktionalisierter ND **28**, Benzochinon-funktionalisierter ND **43** und Stearinsäure-funktionalisierter ND **66** nach 15 min. Absetzzeit.

Für die Einarbeitung funktionalisierter Nanodiamantpartikel in ein unter physiologischen Bedingungen abbaubares Polymer wurde aufgrund seiner einfachen und kostengünstigen Herstellung der Benzochinon-funktionalisierte ND **43** gewählt. Ergebnisse der Messungen der Teilchengrößen aller drei untersuchten Nanodiamanten sind in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Teilchengrößen der Nanodiamanten **28**, **43** und **66** in THF (0.5mg ml^{-1}).

ND	Teilchengröße [nm]
28	10 % \leq 119, 50 % \leq 193, 90 % \leq 306
43	10 % \leq 65, 50 % \leq 85, 90 % \leq 155
66	10 % \leq 1610, 50 % \leq 2100, 90 % \leq 2800

Für erste Untersuchungen an der Königlichen Technischen Hochschule (Fibre and Polymer technology) in Stockholm, Schweden, wurde ein Liter einer Suspension von Nanodiamant **43** in THF (6 mg ml^{-1}) hergestellt. Die folgenden Ergebnisse wurden von Yang Sun im Rahmen des Vascubone Projektes erarbeitet.

Die auf der Diamantoberfläche verbliebenen Hydroxyl-Gruppen wurden genutzt um ND **43** in einer Polymerisationsreaktion mit Lactid umzusetzen. Das dabei entstehende ND-Polylactid (ND-PLA) besitzt einen Nanodiamant-Anteil von 20 Gewichtsprozent und wird zu unterschiedlichen Anteilen in Poly-L-Lactid-co-Caprolacton (PLLA-CL) eingblendet. Wie aus Abbildung 82 entnommen werden kann, ist der E-Modul des Blends mit 10 % ND-PLA-Anteil etwa sechsmal größer als der des reinen PLLA-CL-Copolymers. Der E-Modul ist ein Materialkennwert und beschreibt den Zusammenhang zwischen Dehnung und Spannung bei der Verformung eines Materials.^[107] Je größer der Wert des E-Moduls, desto höher der Widerstand den das jeweilige Material seiner Verformung entgegensetzt.

Das biokompatible und physiologisch abbaubare Polymer PLLA weist eine zu geringe mechanische Steifigkeit für den Einsatz als Knochenersatzmaterial auf. Wie aus den vorliegenden Daten hervorgeht, können die mechanischen Eigenschaften des Polymers durch die Beimischung von ND-PLA stark verbessert werden.

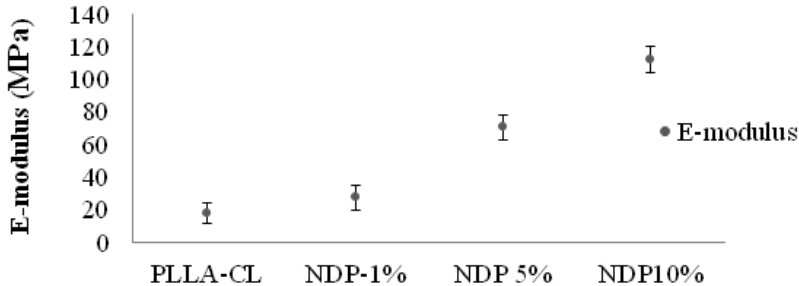


Abb. 82: E-modul des PLLA-CL Copolymers und unterschiedlicher Blends mit ND-PLA. Gemessen von Yang Sun, Königliche Technische Hochschule (Fibre and Polymer technology) Stockholm, Schweden.

3.5.3 Oxidation von Nanodiamant

Für verschiedene Experimente, wie z.B. Homogenisierungs- und Immobilisierungsversuche wird luftoxidiertes Nanodiamant **67** aus Detonationsdiamant **19** nach Standardvorschrift hergestellt.^[108] Der Diamant wird hierfür 2 h bei einer Temperatur von 425 °C in einem Muffelofen erhitzt.

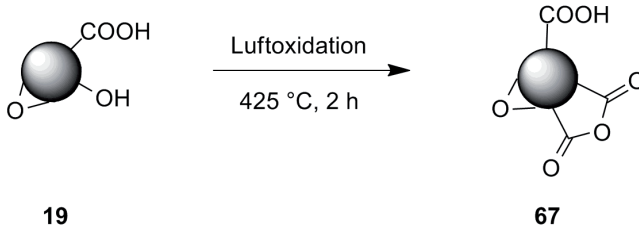


Abb. 83: Schema für die Darstellung von luftoxidiertem ND **67**.

Auffällig im IR-Spektrum des luftoxidierten ND **67** ist vor allem das besonders breite Signal der C=O-Streckschwingung bei 1799 cm^{-1} . Die starke Verschiebung in den hohen Wellenzahlenbereich deutet nicht nur auf die Bildung von Säure- sondern vor allem auf Anhydridfunktionen auf der Diamantoberfläche hin. Ebenfalls charakteristisch für den luftoxidierten Nanodiamanten **67** ist sein stark negatives Zeta-Potential von -30.0 mV ($\text{pH} = 7.7$).

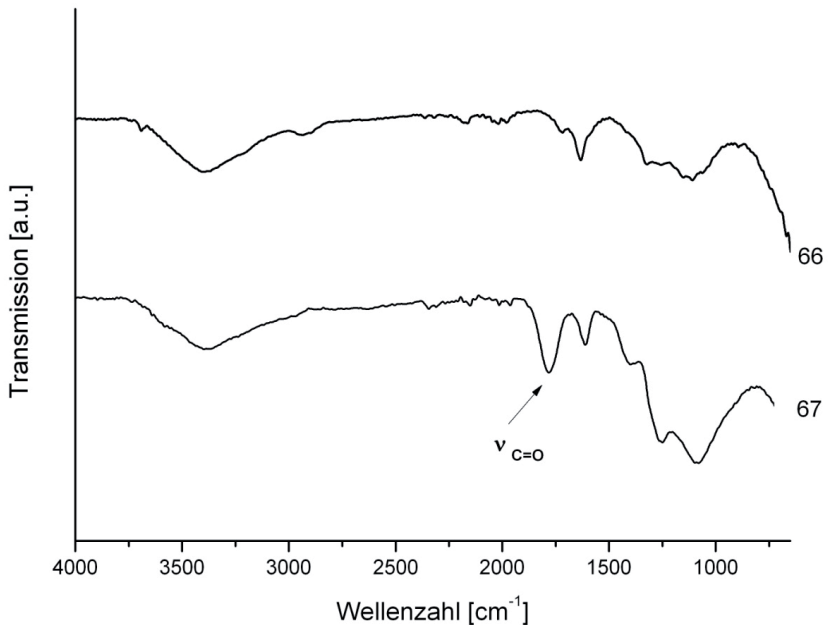


Abb. 84: IR-Spektren von Detonationsnanodiamant ND **19** und luftoxidiertem ND **67**.

3.6 Abspaltungsexperimente

Die in Kapitel 3.1 synthetisierten Nanodiamant-Wirkstoff-Konjugate müssen auf ihre Eignung geprüft werden den Wirkstoff unter sauren Bedingungen wieder abzuspalten. Hierfür werden bekannte Mengen des jeweiligen Nanodiamanten in zwei verschiedenen PBS-Pufferlösungen (pH 4.6 und pH 7.4) bei 37 °C inkubiert. Nach bestimmten Zeitabständen werden die Überstände der Nanodiamant-Suspensionen nach der Zentrifugation UV-spektroskopisch untersucht, um die Konzentration von freiem Wirkstoff zu messen. Anschließend wird über die vorher durch die thermogravimetrische Analyse bestimmte theoretische Oberflächenbelegung, die prozentuale Menge an abgespaltenem Wirkstoff berechnet und gegen die Zeit aufgetragen.

In Abb. 84 ist der Mechanismus der hydrolytischen Spaltung des säurelabilen Hydrazon-Linkers beschrieben. Unter sauren Bedingungen wird der Hydrazon-Stickstoff protoniert, Wasser kann nun nucleophil am Hydrazon angreifen und unter Bildung des Ketons den Hydrazid-Rest abspalten. Schema I (Abb. 85) zeigt die Anbindung bzw. Abspaltung eines Wirkstoffes mit für die Immobilisierung verfügbaren Säuregruppen, während Schema II die Abspaltung von Wirkstoffen mit Ketonen behandelt.

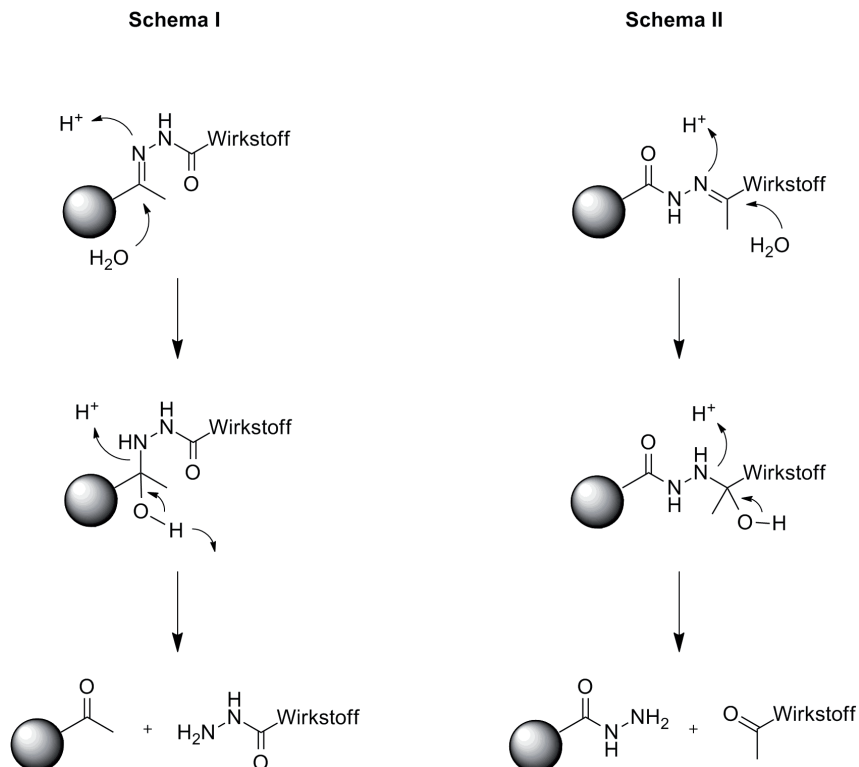


Abb. 85: Mechanismus der hydrolytischen Spaltung des säurelabilen Hydrazon-Linkers.

Untersucht wurde das Freisetzungs-Verhalten der Isoniazid-funktionalisierten ND **27** und **28**, sowie des Curcumin-funktionalisierten ND **35** und des Amphotericin B-funktionalisierten ND **37**. Dabei ist es von großem Interesse, über welchen Zeitraum sich der jeweilige Wirkstoff abspaltet und welche Mengen sich dabei von der Nanodiamantoberfläche ablösen.

3.6.1 Isoniazid

Für die Untersuchung zur Abspaltung von Isoniazid wurden nicht nur Nanodiamantproben mit kovalent angebundenem Wirkstoff, sondern auch Nanodiamant mit adsorbiertem Isoniazid verwendet. Dessen Herstellung erfolgt nach der Standardvorschrift zur Wirkstoffadsorption auf Nanodiamant von Dean Ho

et al.^[109] Dabei wird nach der Zugabe des Wirkstoffes zu einer Suspension von mechanisch deagglomerierten ND **19** in Wasser unter Ultraschallbehandlung der pH-Wert auf 7.7 mit 2.5 mM NaOH-Lösung eingestellt.

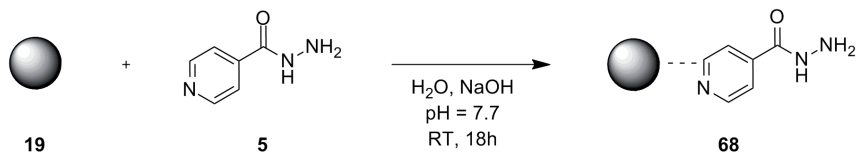


Abb. 86: Adsorption von Isoniazid **5** auf mechanisch deagglomeriertem ND **19**.

Im IR-Spektrum des ND **68** kann man, bis auf ein intensives Signal der C-N-Streckschwingung der Hydrazidfunktion des Isoniazids bei 1151 cm^{-1} , kaum eine Veränderung der Signale feststellen. Die durch die thermogravimetrische Analyse berechnete Oberflächenbelegung durch den adsorbierten Wirkstoff beträgt 0.25 mmol g^{-1} .

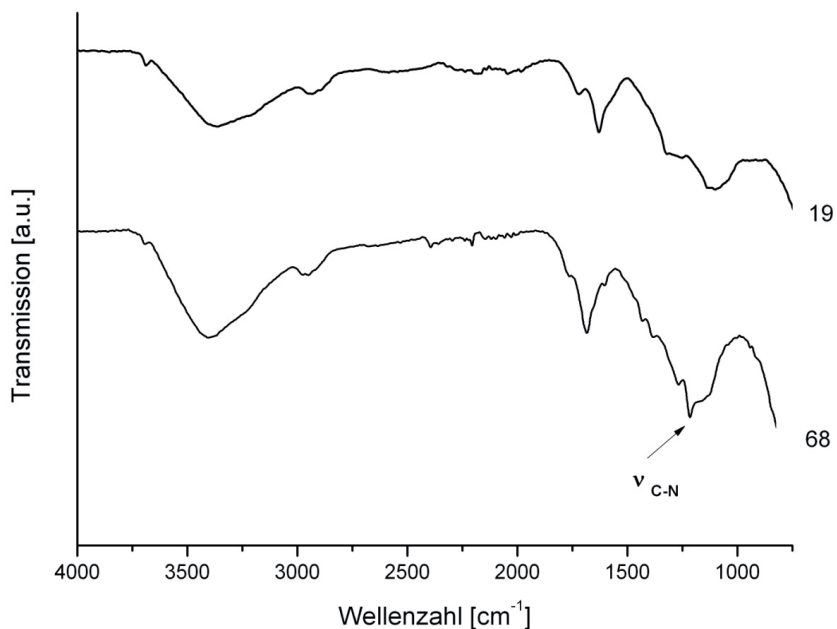


Abb. 87: IR-Spektren von mechanisch deagglomeriertem ND **19** und ND **68**, nach der Adsorption von Isoniazid.

Für die Berechnung der Menge an freigesetztem Wirkstoff, wird zunächst eine Eichgerade aus den Messungen der Absorptionsmaxima bei 263 nm bei verschiedenen Konzentrationen erstellt (siehe Abbildung 88). Mit der Geradengleichung kann nun anhand der gemessenen Intensitäten der Absorptionsmaxima in den ND-Isoniazid-Systemen, die jeweilige Konzentration und somit die abge-spaltene Stoffmenge berechnet werden.

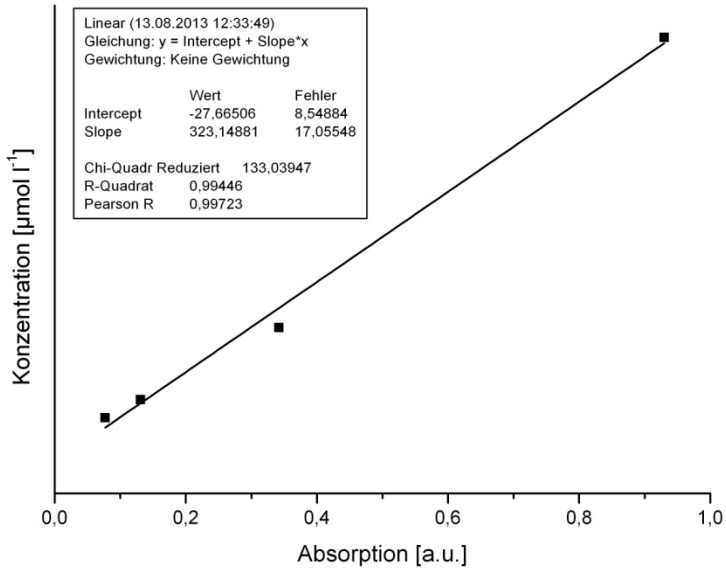


Abb. 88: Eichgerade aus den Absorptionen verschieden konzentrierter Isoniazidlösungen.

In Abbildung 89 sind einige UV/Vis-Spektren der Nanodiamantüberstände von ND **27** (NDAcetophenon-Isoniazid-Addukt) nach dem Inkubieren angegeben. Wie man erkennen kann, zeigt der Überstand der bei pH 4.6 1 h inkubierten Diamantprobe, die intensivste Absorption und damit die höchste Konzentration an freigesetztem Isoniazid. Die zweithöchste Konzentration von Wirkstoff ist nach einer Stunde bei einem pH-Wert von 7.4 zu verzeichnen. Bei pH = 4.6 nimmt nach 24 Stunden die abgespaltene Menge an Wirkstoff ab. Ebenfalls nach 24 h ist bei pH = 7.4 jedoch kaum noch Wirkstofffreisetzung zu erkennen.

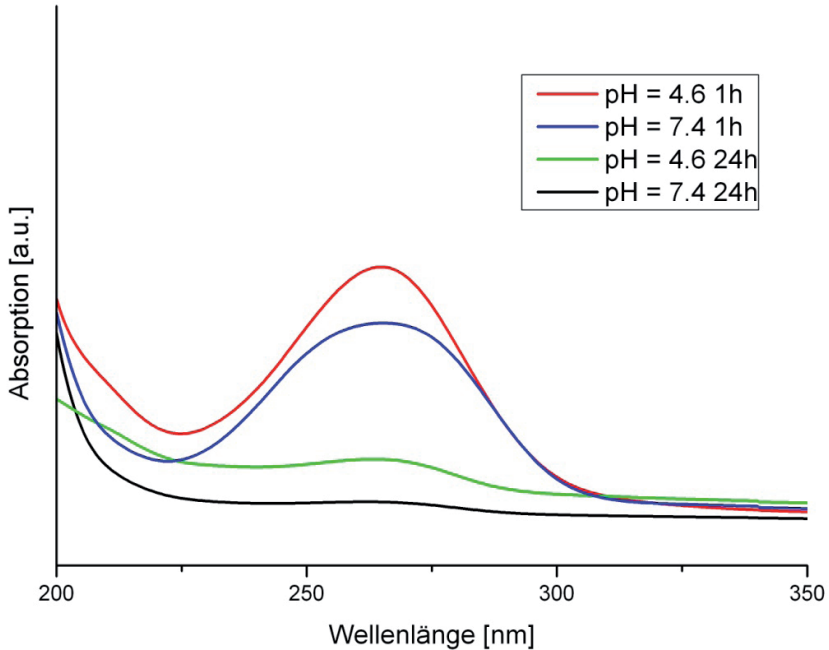


Abb. 89: UV/Vis-Spektren Isoniazid-funktionalisierter ND **27** (kovalent angebundenes Isoniazid) Überstände. Der Nanodiamant wurde in PBS-Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten inkubiert.

Wie man in Abbildung 90 erkennen kann, kommt es sowohl bei ND **27** (kovalent angebundenes Isoniazid) als auch bei ND **68** (adsorbiertes Isoniazid) zu einer Freisetzung des Wirkstoffes. Wobei jedoch zu beachten ist, dass die Abspaltung im Falle des kovalent angebundenes Isoniazids zu einer zwei bis dreimal höheren Wirkstoffkonzentration im Überstand führt als beim adsorbierten Isoniazid. Wichtiger noch: die Wirkstofffreisetzung ist kontinuierlicher. Beim adsorbierten Isoniazid kann nach zwei Stunden Inkubation kein Wirkstoff mehr im Überstand nachgewiesen werden.

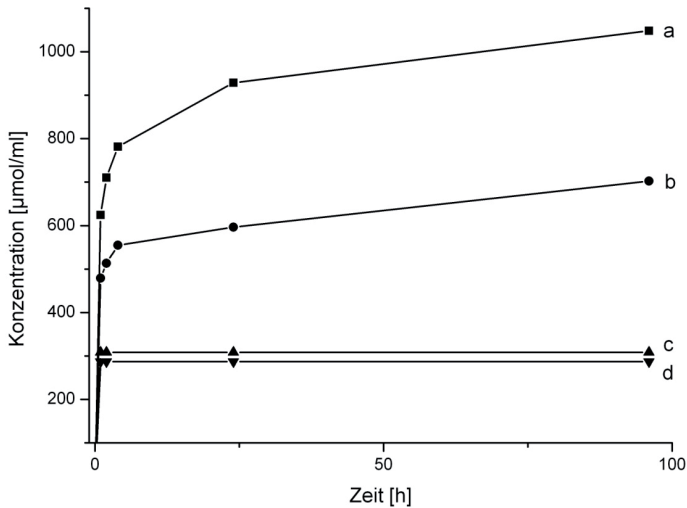


Abb. 90: Isoniazidkonzentration in ND-Überständen. a, ND 27 bei pH 4.6; b, ND 27 bei pH 7.4; c, ND 68 bei pH 7.4 und d, ND 68 bei pH 4.6.

Deutlicher wird die komplette Abspaltung des adsorbierten Isoniazids in Abbildung 91, welche die prozentuale Freisetzung des Wirkstoffes aufzeigt. Während ND 27 kovalent angebundenes Isoniazid kontinuierlich über den gesamten Zeitraum von 96 Stunden freisetzt, kommt es beim adsorbierten Isoniazid zum sog. *burst*, also zu einer kompletten Abspaltung des Wirkstoffes innerhalb der ersten Stunde. Dieses Ergebnis zeigt deutlich die Vorteile der kovalenten Anbindung von Wirkstoffen an Nanodiamant über einen säurelabilen Hydrasonlinker. Für geeignete Therapien ist es nötig, dass der jeweilige Wirkstoff allmählich von dem verwendeten Nanomaterial freigesetzt wird, um eine möglichst lang anhaltende und gleichmäßige Wirkung zu erzielen.

Die Messungen der Isoniazidabspaltung von ND 27 wurden von Lena Winner im Rahmen dieser Promotionsprojektes betreuten Bachelorarbeit vorgenommen.

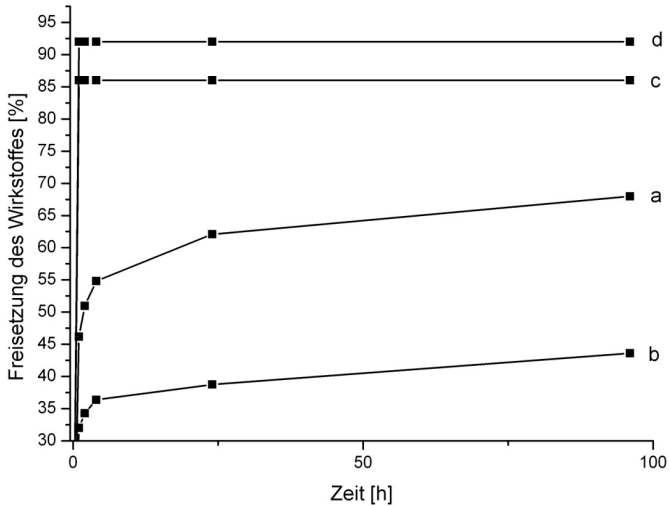


Abb. 91: Prozentuale Wirkstofffreisetzung von Isoniazid. a, ND **27** bei pH 4.6; b, ND **27** bei pH 7.4; c, ND **68** bei pH 4.6 und d, ND **68** bei pH 7.4.

Neben dem Acetophenon-Isoniazid-funktionalisierten ND **27**, wurde auch der Pentadion-Isoniazid-funktionalisierte ND **28** auf sein Vermögen hin untersucht, unter physiologischen Bedingungen den Wirkstoff freizusetzen. Bei pH = 7.4 kann jedoch keine eindeutige Absorption für freies Isoniazid im Überstand nachgewiesen werden. Lediglich nach einer und 24 Stunden kann bei pH = 4.6 freigesetztes Isoniazid detektiert werden. Die über die Intensität der Absorptionen berechnete prozentuale Abspaltung beträgt nach einer Stunde 16%, nach 24 Stunden 36 %.

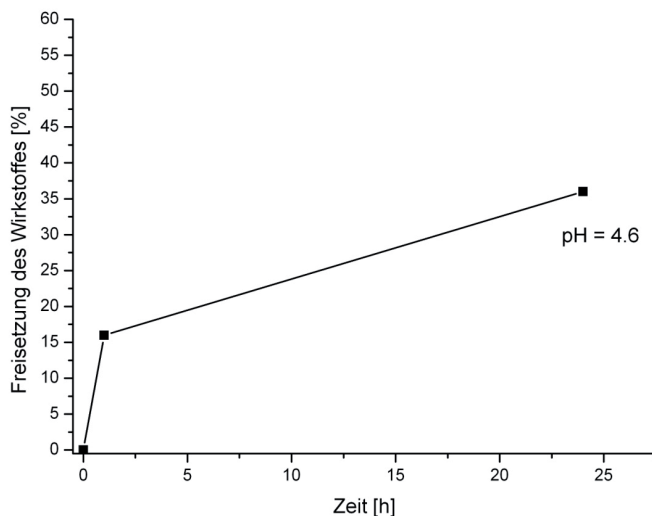


Abb. 92: Prozentuale Isoniazidfreisetzung von ND **28** bei pH 4.6.

Da jedoch ND **28** eine höhere Oberflächenbelegung besitzt (0.32 mmol g^{-1} für ND **28**, 0.18 mmol g^{-1} für ND **27**), können mit dem Pentadion-Isoniazid-funktionalisierten ND **28** höhere Wirkstoffkonzentrationen in der Lösung erreicht werden.

3.6.2 Curcumin

Das Vorgehen zur Untersuchung zur Freisetzung des Wirkstoffes Curcumin von der Nanodiamantoberfläche, folgt den gleichen Schritten wie in Kapiteln 3.6 und 3.6.1 beschrieben. In diesem Fall ist es jedoch schwierig, konkrete Aussagen zu machen, da wie in Abbildung 93 zu sehen ist, Absorptionen bei der für Curcumin charakteristischen Wellenlänge nur schwer zu erkennen sind. Eindeutig identifizierbare Absorptionsmaxima sind dabei nur bei pH = 4.6 zu verzeichnen.

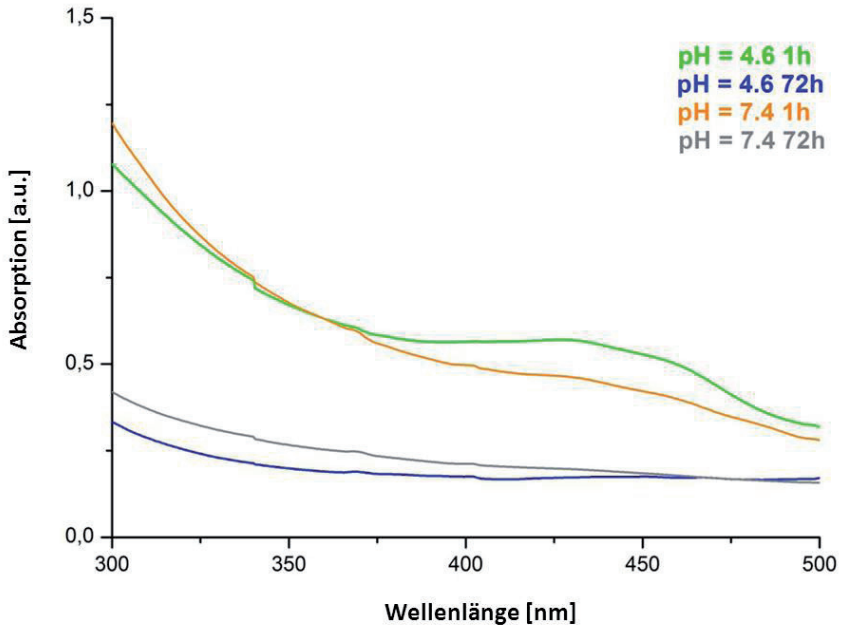


Abb. 93: UV/Vis-Spektren Curcumin-funktionalisierter ND 35 Überstände. Der Nanodiamant wurde in PBS-Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten inkubiert.

Die aus den gemessenen Absorptionen resultierende prozentuale Freisetzung von Curcumin fällt entsprechend gering aus. Nach 72 Stunden werden lediglich 4 % des auf der Nanodiamantoberfläche immobilisierten Curcumins abgespalten. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Art der Hydrazoneanbindung sein. Während bei der Immobilisierung von Isoniazid das hydrazonebildende Keton am Linker des Nanodiamanten sitzt, befindet es sich in diesem Fall auf der Seite des Wirkstoffes. Möglicherweise führt diese Orientierung zu einer Stabilisierung der Bindung zwischen Diamant und Wirkstoff. Es ist auch möglich, dass der Wirkstoff sich zwar abspaltet, jedoch eine gewisse Affinität zur Adsorption auf der Nanodiamantoberfläche aufweist und somit nur in geringen Mengen freigesetzt wird.

Die Messungen der Curcuminabspaltung von ND 35 wurden von Lena Winner im Rahmen ihrer Bachelorarbeit vorgenommen.

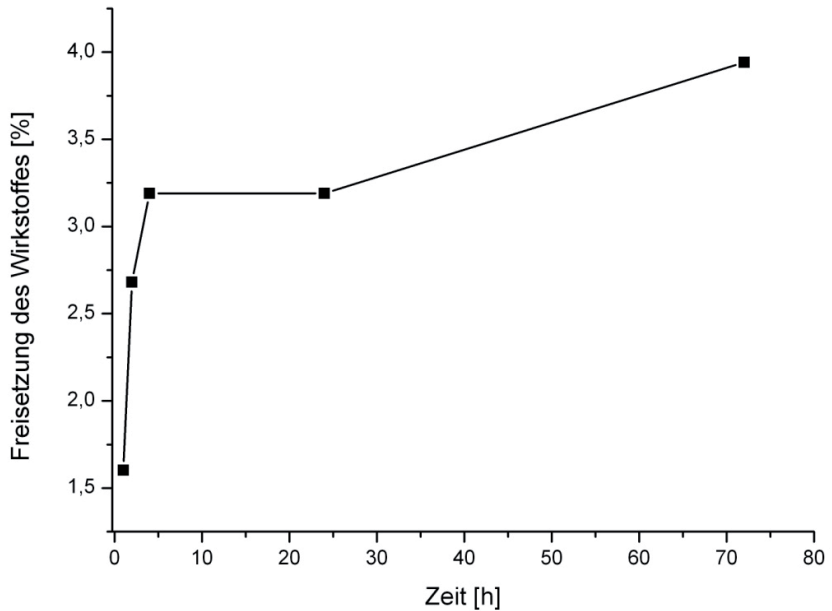


Abb. 94: Prozentuale Wirkstofffreisetzung von Curcumin bei pH 4.6.

3.6.3 Amphotericin

Auch von Amphotericin B wurde nach der Immobilisierung eine Untersuchung zur Abspaltung des Wirkstoffes von der Nanodiamantoberfläche durchgeführt. Abbildung 95 zeigt die charakteristischen Absorptionen von Amphotericin B (388 und 415 nm) im Überstand der Nanodiamantproben von ND 37 nach der Inkubation. Schon dieses Kurzzeitexperiment zeigt die unterschiedliche Menge an Wirkstoff die bei verschiedenen pH-Werten innerhalb der ersten 4 Stunden freigesetzt werden.

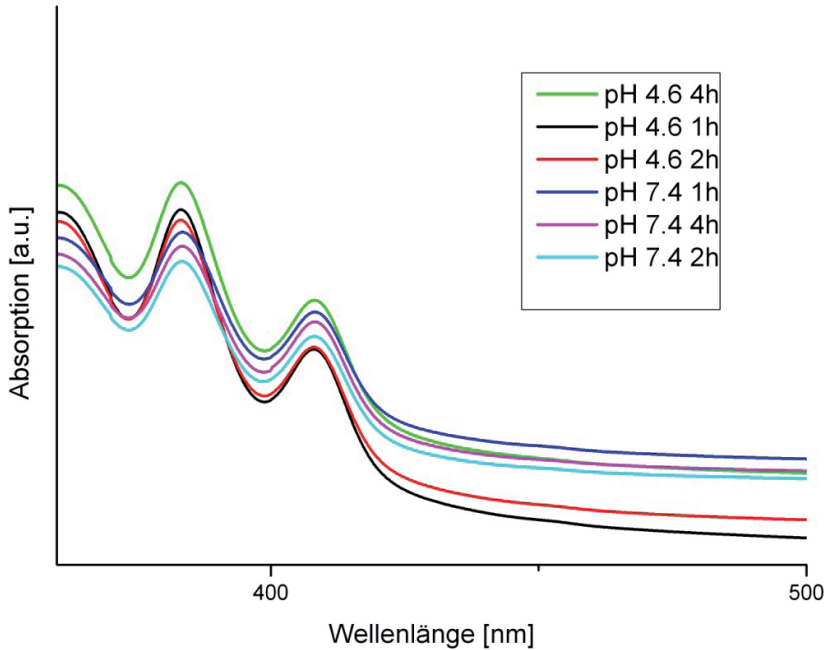


Abb. 95: UV/Vis-Spektren Amphotericin B-funktionalisierter ND **37** Überstände. Der Nanodiamant wurde in PBS-Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten inkubiert.

Innerhalb der ersten Stunde wird bei pH = 4.6 fast doppelt soviel (ca. 7%) Amphotericin B abgespalten als bei pH = 7.4 (ca. 4%). Nach vier Stunden werden 12 % (pH = 4.6) bzw. 8 % (pH = 7.4) freigesetzt. Nach dem ersten Kurzzeitexperiment muss die Wirkstoffabspaltung über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

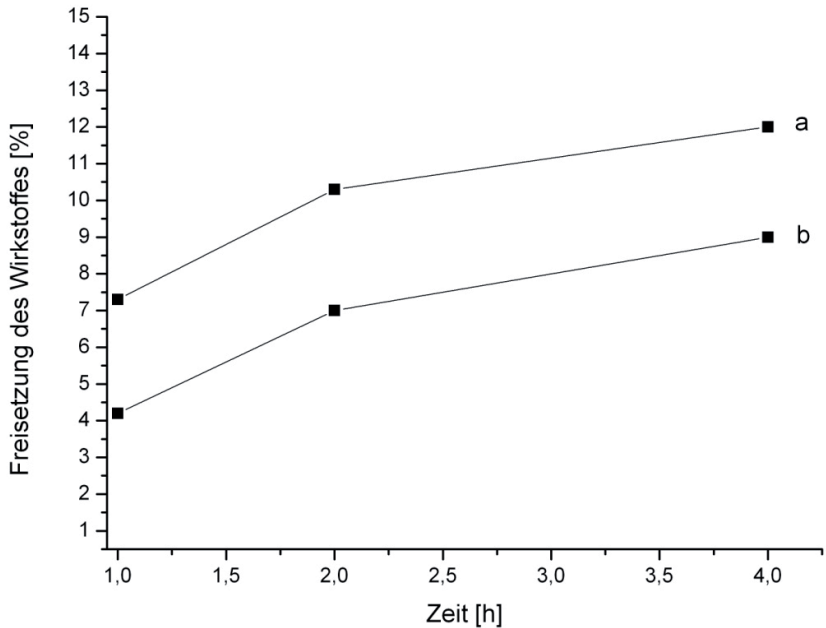


Abb. 96: Prozentuale Wirkstofffreisetzung von Amphotericin B. a) bei pH 4.6; b) bei pH 7.4.

Es fällt auf, dass die Freisetzung des angebondenen Amphotericin B langsamer vonstatten geht als die des ähnlich immobilisierten Isoniazids. Während nach 24 Stunden annähernd 65 % Isoniazid abgespalten werden, können im Falle des Amphotericin B-funktionalisierten ND **37** nur knapp 19 % des Wirkstoffes im Überstand nachgewiesen werden (pH = 4.6). Eine langsamere Freisetzung bedeutet jedoch nicht unbedingt einen Nachteil. Wird z.B. ein Großteil eines Wirkstoffes innerhalb der ersten 24 h von seinem Trägermaterial freigesetzt, sind für eine kontinuierliche Therapie tägliche Applikationen notwendig.

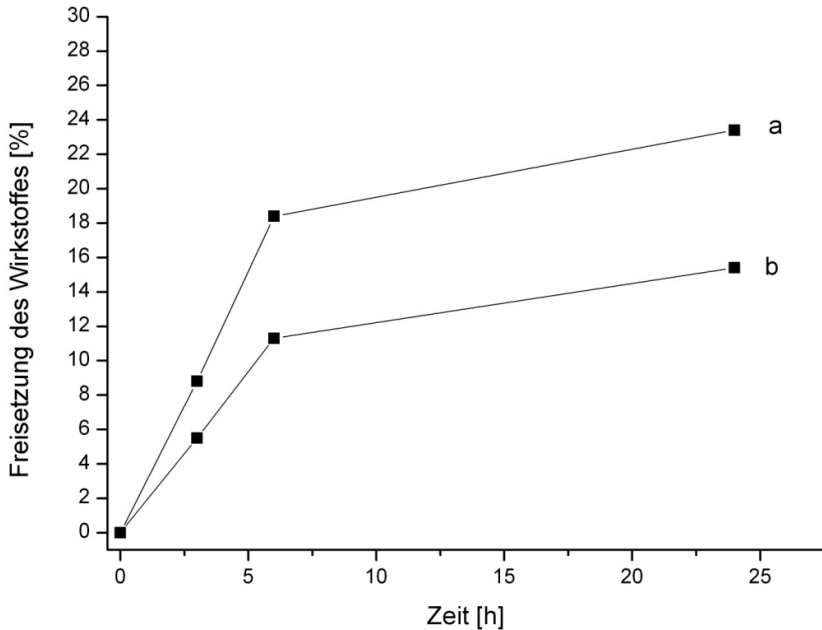


Abb. 97: Prozentuale Wirkstofffreisetzung von Amphotericin B (24h Experiment). a) bei pH = 4.6, b) bei pH = 7.4.

Die Ergebnisse der Abspaltungsexperimente können zum großen Teil als vielversprechend gewertet werden. Während adsorbierter Wirkstoff zu einer raschen Freisetzung von der Diamantoberfläche führt, gelingt durch die kovalente Anbindung von Wirkstoff über einen Hydrazon-Linker, eine mehr oder weniger kontinuierlichen Abspaltung. Das geringe Vermögen von ND 35 Curcumin freizusetzen deutet entweder auf die Wichtigkeit der richtigen Orientierung des Hydrazon-Linkers hin, oder lässt sich durch eine nach der Abspaltung eintretende Adsorption erklären.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Nanodiamanten eignen sich aufgrund ihrer geringen Toxizität und umfangreichen Oberflächenchemie hervorragend für verschiedene Anwendungen im Bereich der Biologie oder Medizin.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung verschiedener Nanodiamant-Konjugate für den Einsatz als Wirkstofftransporter und für die Entwicklung neuartiger Knochenersatzmaterialien.

Abbildung 98 zeigt eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit dargestellten Nanodiamant-Wirkstoff-Konjugate. Bis auf den Protease-Inhibitor **41** wurden vor allem bereits etablierte und in der Medizin zur Therapie weit verbreiteter Infektionskrankheiten eingesetzte Wirkstoffe verwendet.

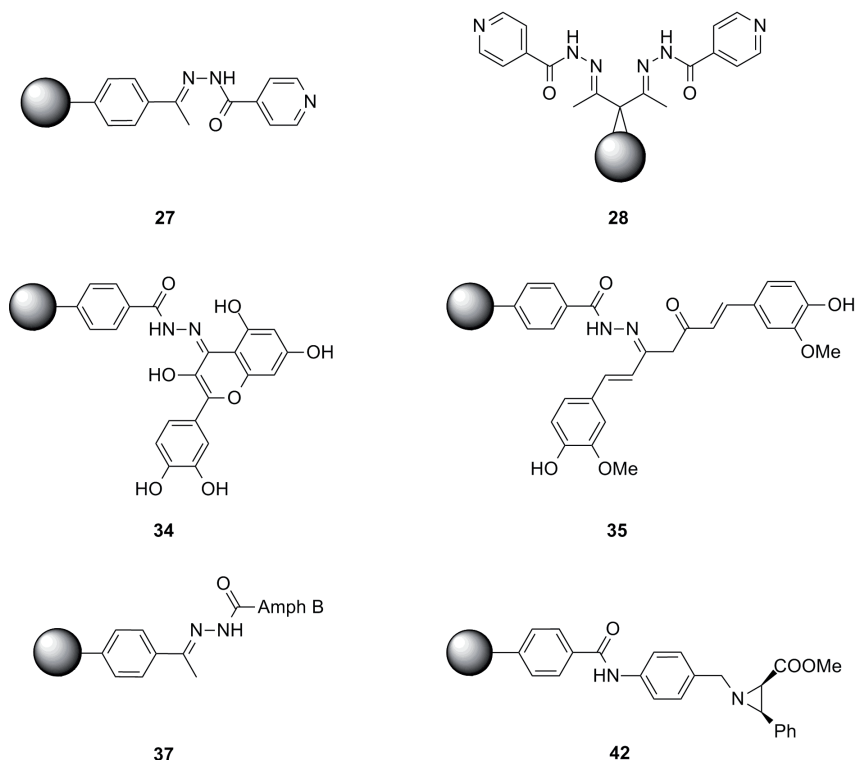


Abb. 98: Übersicht über die in dieser Arbeit dargestellten Nanodiamant-Wirkstoff-Konjugate.

Vor der Immobilisierung der Wirkstoffe war es jedoch notwendig, die Nanodiamanten mit verschiedenen Linkersystemen zu funktionalisieren. Die Linker wurden zunächst als Diazoniumtetrafluoroboratsalz isoliert und anschließend mit mechanisch deagglomeriertem ND **19** umgesetzt.

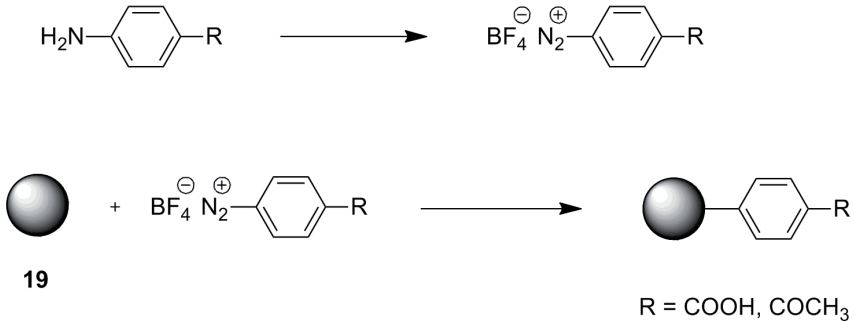


Abb. 99: Synthese eines Diazoniumtetrafluoroborats und anschließende Umsetzung mit mechanisch deagglomeriertem ND **19**.

Die so dargestellten Linkersysteme wurden mit Hydrazin im Falle des Acetophenon-Linkers zum Hydrazon, im Falle des Benzoesäure-Linkers zum Hydrazid weiter funktionalisiert.

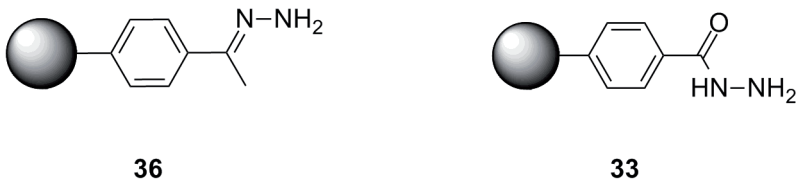


Abb. 100: Nanodiamanten mit säurelabilen Linkern, ND **36** mit Hydrazonefunktion und ND **33** mit Hydrazidfunktion.

Nach der Immobilisierung der Wirkstoffe wurden die Isoniazid-funktionalisierten Nanodiamanten **27** und **28**, der Curcumin-funktionalisierte ND **35** und der Amphotericin B-funktionalisierte ND **37** auf das Verhalten hin untersucht, unter physiologischen Bedingungen die jeweiligen Wirkstoffe wieder freizusetzen. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der säurelabile Hydrazone-Linker für

eine kontinuierliche Freisetzung von Wirkstoffen von der Nanodiamantoberfläche geeignet ist. Dabei ist die Menge an abgespaltenem Wirkstoff bei pH = 4.6 höher als bei pH = 7.4, was für den Einsatz gegen Infektionskrankheiten, deren Erreger die menschlichen Makrophagen befallen, von großem Nutzen ist.

Auch konnte im Falle des Isoniazids gezeigt werden, dass die kovalente Anbindung des Wirkstoffes über den Hydrazon-Linker ein deutlich günstigeres Freisetzungsprofil zeigt als bei dessen Adsorption auf der Diamantoberfläche.

In vitro-Tests mit Amphotericin B-funktionalisiertem ND **37** an Leishmanien ergaben eine etwa viermal höhere Wirkung im Vergleich zum freien Wirkstoff.

Für verschiedene Zelltests und Untersuchungen zur Nanodiamantbelegung von porösen Knochenersatzmaterialien war es notwendig, Nanodiamanten mit verschiedenen Farbstoffen zu funktionalisieren. So wurde beispielsweise mechanisch deagglomerierter Nanodiamant zunächst mit Benzochinon funktionalisiert, um dann anschließend den Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green mit Hilfe eines Cadaverin-Linkers auf der Diamantoberfläche zu immobilisieren.



Abb. 101: Immobilisierung von Oregon Green auf Benzochinon-funktionalisiertem ND **43**.

Diese Oregon Green-funktionalisierten Nanodiamanten wurden unter anderem zur Untersuchung des Eindringverhaltens der Partikel in Cerasorb- und ChronOs-*scaffolds* verwendet. Wie in Abbildung 102 gut zu erkennen ist, wird durch das von der Rhobest GmbH entwickelte Perfusionsverfahren, eine gleichmäßige Verteilung der Nanodiamanten auf der *scaffold*-Oberfläche erreicht.

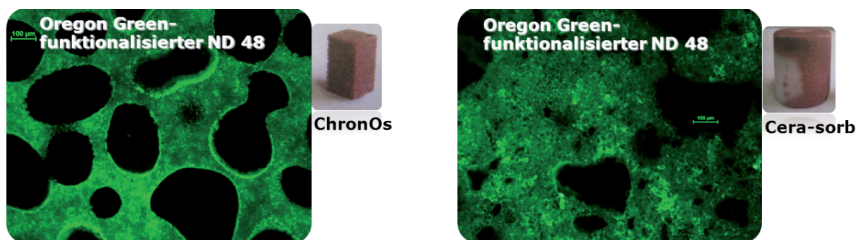


Abb. 102: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen zweier verschiedener *scaffolds* mit Nanodiamanten. Aufgenommen von Frau Mag. Michela Bruschi, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Doris Steinmüller (Rhobest GmbH, Innsbruck).

Für zukünftige Untersuchungen zur Aufnahme von Nanodiamanten in Makrophagen wurde ein Nanodiamant-Farbstoff-System entwickelt, welches einen fest angebondenen und unter physiologischen Bedingungen nicht abspaltbaren sowie einen säurelabil angebondenen Farbstoff aufweist. Der säurelabil angebundene Farbstoff sollte bei einer Aufnahme über Phagozytose von der Nanodiamantoberfläche abgespalten werden. Findet man im Inneren der Makrophagen Nanodiamanten, welche nur noch über TAMRA-Farbstoff verfügen, deutet das auf eine Aufnahme über Phagozytose hin. Für die orthogonale Funktionalisierung wurde mechanisch deagglomerierter ND **19** mit einer Acetophenon- und einer Alkin-Einheit versehen.

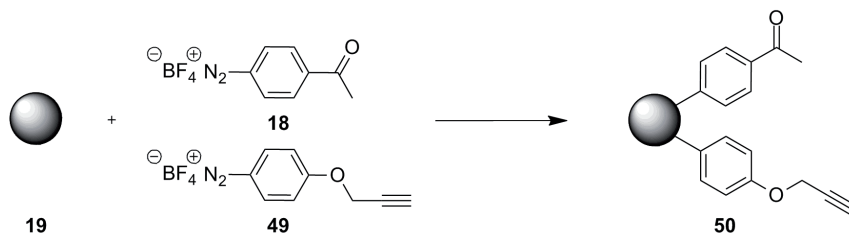


Abb. 103: Orthogonale Funktionalisierung von mechanisch deagglomeriertem ND **19** mit Acetophenon- und Alkin-Einheiten.

Das Keton der Acetophenon-Einheit wurde durch Umsetzung mit Hydrazin in das säurelabile Hydrazon konvertiert. Anschließend wurde TAMRA via Click-Reaktion an der Alkin-Funktion und Oregon Green über die Bildung eines Amids an der Hydrazon-Einheit angebunden.

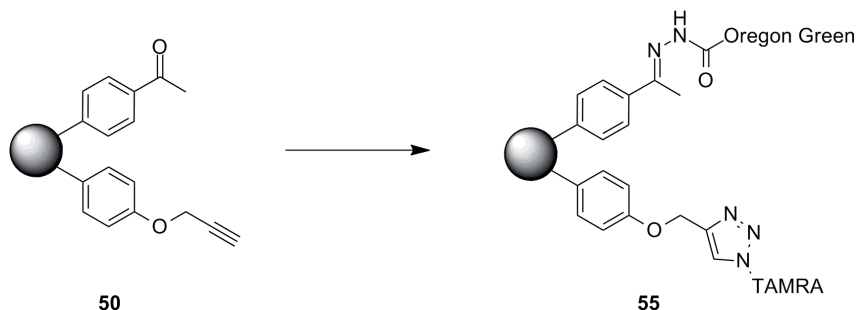


Abb. 104: Immobilisierung von TAMRA und Oregon Green auf orthogonal funktionalisiertem ND **50**.

Der mit beiden Farbstoffen funktionalisierte ND **55** wurde anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Nach der Inkubation in PBS-Pufferlösung bei pH = 4.6 kann man nach zwei Stunden erste Nanodiamanten beobachten, die kein Oregon Green mehr tragen. Partikel die lediglich Fluoreszenz des Oregon Greens zeigen können nicht beobachtet werden.

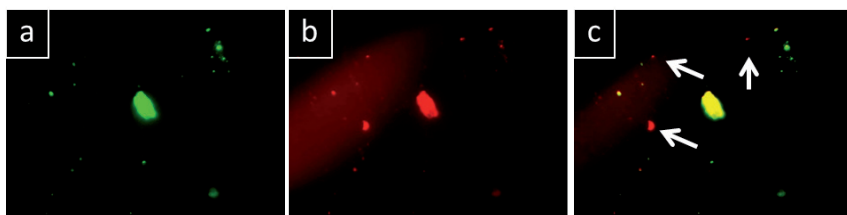


Abb. 105: Fluoreszenzbilder von ND **55** nach zwei Stunden Inkubation in PBS Puffer bei pH = 4.6. a) grüne Fluoreszenz, b) rote Fluoreszenz, c) Überlagerung beider Fluoreszenzfarben.

Für verschiedene *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wurden Nanodiamant-Protein-Konjugate hergestellt. Die für die Immobilisierung solcher empfindlicher Verbindungen nötige Funktionalisierung mit Benzochinon-Einheiten gelang durch die Umsetzung von mechanisch deagglomeriertem ND **19** mit Benzochinon in PBS-Pufferlösung bei pH = 8. Die anschließende Anbindung des jeweiligen Proteins erfolgte ebenfalls in PBS-Pufferlösung bei pH = 6. Als Proteine werden Lysozym, Angiopoietin und BMP-2 verwendet.

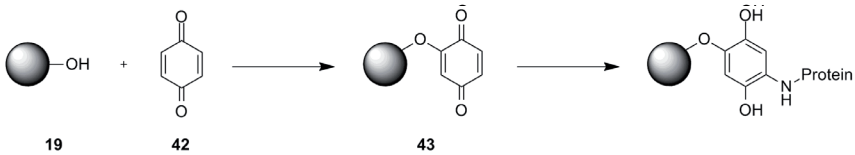


Abb. 106: Allgemeines Schema der Immobilisierung von Proteinen auf Benzochinon-funktionalisiertem ND **43**.

Die Tierversuche mit Nanodiamanten mit kovalent angebenen Wachstumsfaktoren kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Im Falle des Angiopoietins konnte nach drei Monaten eine signifikante Erhöhung der neugebildeten Blutgefäße in den Knochendefektstellen nachgewiesen werden. An Nanodiamant kovalent gebundenes BMP-2 zeigte jedoch keine nennenswerte Verbesserung der Knochenbildung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Grundlage für die weitere Forschung auf dem Gebiet der biologischen und medizinischen Anwendungsmöglichkeiten für Nanodiamant dienen. Viele weitere Tests sind jedoch nötig, um Nutzen und Risiken von medizinisch eingesetztem Nanodiamant abschätzen zu können.

So muss für den Einsatz der Nanodiamanten als Wirkstofftransporter die genaue Biodistribution und der Verbleib der Partikel im lebenden Organismus geklärt werden. Neue Verfahren hierfür werden zur Zeit in Kooperation mit weiteren Arbeitsgruppen entwickelt. Auch sind noch *in vitro* und anschließend *in vivo* Tests nötig, um die Wirksamkeit der Nanodiamant-Isoniazid-Konjugate **27** und **28** zu untersuchen und gegebenenfalls Verbesserungen und Ergänzungen an diesen Transportsystemen vorzunehmen.

Vor den ersten klinischen Tests der *Vascubone-scaffolds* muss zunächst noch geklärt werden ob sich unter physiologischen Bedingungen Nanodiamantpartikel von der Implantatoberfläche ablösen. Wenn dies der Fall ist, müssen Möglichkeiten gefunden werden die Partikel fester auf der *scaffold*-Oberfläche zu immobilisieren. Das kann z.B. durch eine kovalente Anbindung erreicht werden.

Insgesamt zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse das große Potential auf, das Nanodiamanten im Bereich der biologischen und medizinischen Anwendungen besitzen.

5 Summary and Outlook

Because of its low toxicity and rich surface chemistry nanodiamond is well suited for the application in the fields of biology and medicine.

The aim of this work was the development of various nanodiamond conjugates as drug delivery systems and components of bone replacement materials.

Figure 107 pictures a summary of nanodiamond-drug-conjugates synthesized during this work. Apart from the protease-inhibitor **41** all of the used drugs are already established in therapies of common infectious diseases.

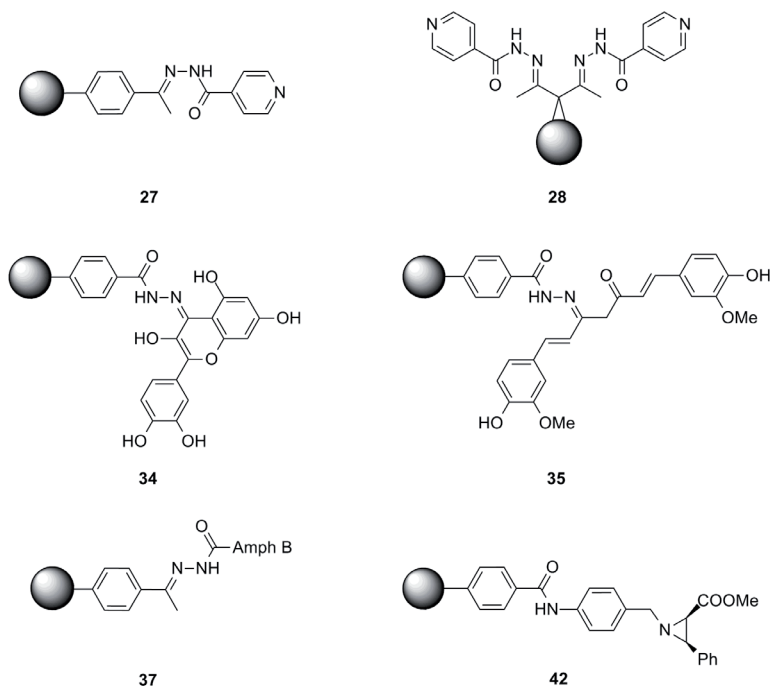


Fig. 107: Summary of synthesized nanodiamond-drug-conjugates.

Prior to the immobilization of drugs it was necessary to functionalize nanodiamonds with various linker systems. First of all, the linkers were isolated as diazonium-tetrafluoroborates and after that immobilized on mechanically deagglomerated nanodiamond **19**.

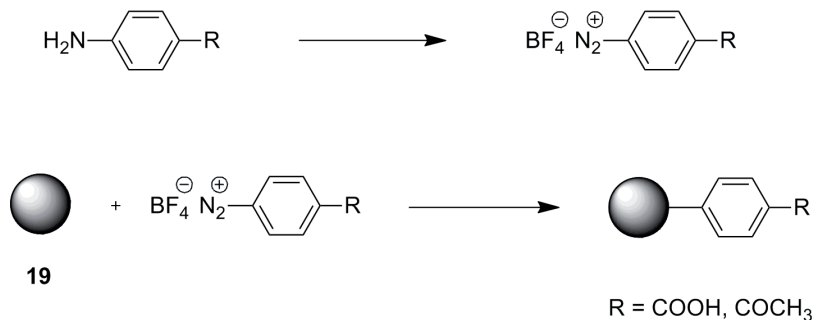


Fig. 108: Synthesis of diazonium-tetrafluoroborates and subsequent immobilization on mechanically deagglomerated ND **19**.

The linker systems were then converted with hydrazine to the corresponding hydrazone **36** or to the corresponding hydrazide **33**.

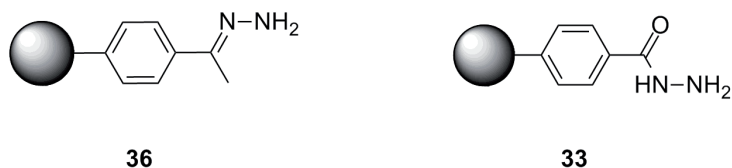


Fig. 109: Nanodiamonds with acid labile linker systems.

After the immobilization of the inhibitors the Isoniazid-functionalized nanodiamonds **27** and **28**, the Curcumin-functionalized ND **35** and the Amphotericin B-functionalized ND **37** were tested for their capability to release the respective drugs under physiological conditions. The results show that the hydrazone linker system is well suited for the continuous release of drugs from the particle surface. The amount of released drug is higher for a pH of 4.6 than for a pH of 7.4, so these systems exhibit great potential to target pathogens infesting human macrophages.

It was also demonstrated that the covalently bound Isoniazid showed a better release performance than the adsorbed drug.

In vitro tests of Amphotericin B-functionalized ND **37** on *Leishmania* showed a four times better inhibition compared to the free drug.

For various cell tests and studies on the seeding of porous alternative bone material it was necessary to functionalize nanodiamond with different fluorescent dyes. For example, mechanically deagglomerated nanodiamond **19** was first functionalized with benzoquinone and then the fluorescent dye Oregon Green was immobilized on the diamond surface via a cadaverine linker.



Fig. 110: Immobilization of Oregon Green on benzoquinone functionalized ND **43**.

These Oregon Green-functionalized nanodiamonds were used to investigate the coating behaviour and penetration depth of the particles on Cerasorb and ChronOs-scaffolds. Figure 111 shows the homogeneous distribution of nanodiamond on the scaffold surface, obtained by the perfusion process at Rhobest GmbH.

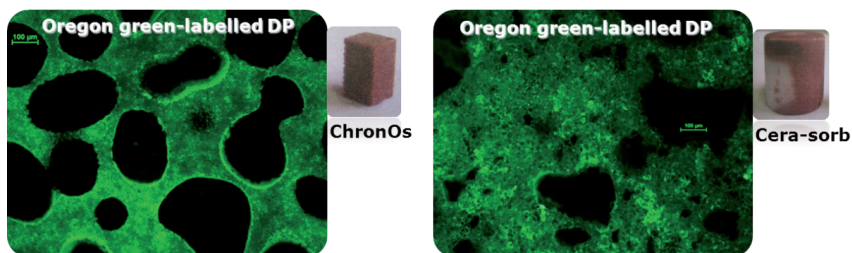


Fig. 111: Fluorescence microscope images of two different *scaffolds* seeded with nanodiamonds. Images taken by Frau Mag. Michela Bruschi, with permission from Dr. Doris Steinmüller (Rhobest GmbH, Innsbruck).

For future investigations on the uptake mechanism of nanodiamond into macrophages a nanodiamond-fluorescence-dye-system was developed

consisting of the nanodiamond core bearing a stable and an acid labile immobilized dye. After uptake via phagocytosis the acid labile immobilized dye should be released from the nanodiamond surface. So particles showing only fluorescence of TAMRA dye must then have been internalized via phagocytosis. For the orthogonal functionalization acetophenone- and alkyne-units were added to mechanically deagglomerated ND **19**.

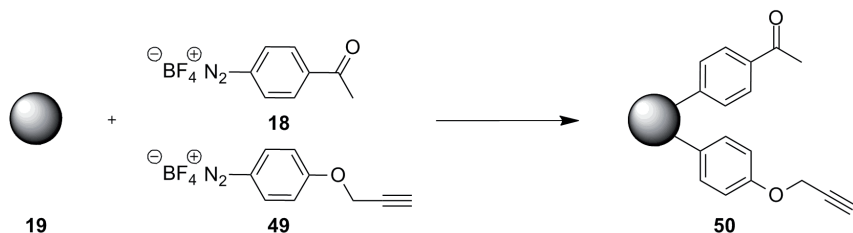


Fig. 112: Orthogonal functionalization of mechanically deagglomerated ND **19** with acetophenone- und alkyne-units.

The acetophenone was converted with hydrazine to the corresponding acid labile hydrazone. The fluorescence dye TAMRA was immobilized via click-reaction at the alkyne site while Oregon Green was immobilized at the hydrazone-site through amide bond formation.

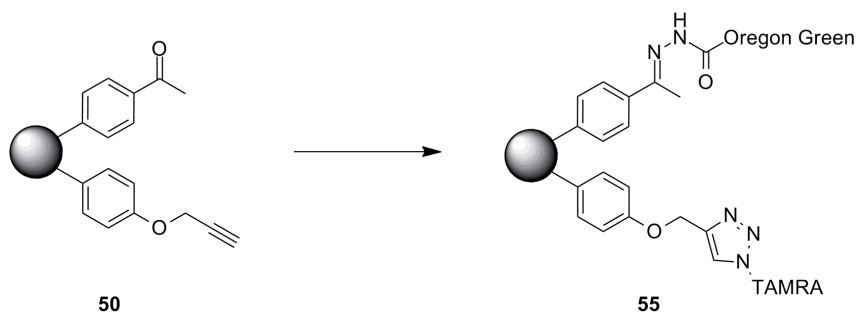


Fig. 113: Immobilization of TAMRA and Oregon Green on orthogonal functionalized ND **50**.

After the functionalization with both, Oregon Green and TAMRA, ND **55** was analyzed with a fluorescence microscope. After incubation in PBS-buffer solution at pH 4.6 for two hours, nanodiamond particles without Oregon Green but still carrying TAMRA can already be observed. On the other hand no particles showing only the fluorescence of Oregon Green can be found.

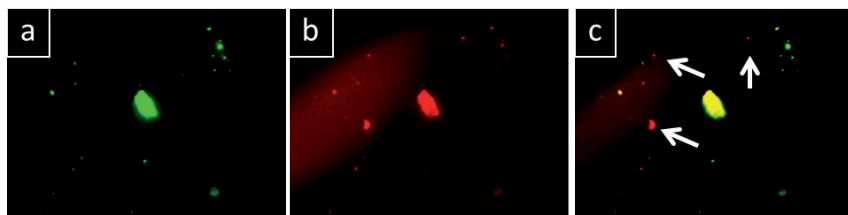


Fig. 114: Fluorescence images of ND **55** after two hours of incubation in PBS buffer solution at pH 4.6. a) green fluorescence, b) red fluorescence, c) fluorescence overlay.

Various nanodiamond-protein-conjugates were synthesized for *in vitro* and *in vivo* tests. The benzoquinone-functionalization for the immobilization of such sensitive molecules like proteins worked with the reaction of mechanically deagglomerated ND **19** with benzoquinone in PBS buffer solution at a pH of 8. Subsequent coupling of the respective protein took place in PBS buffer solution at a pH of 6.

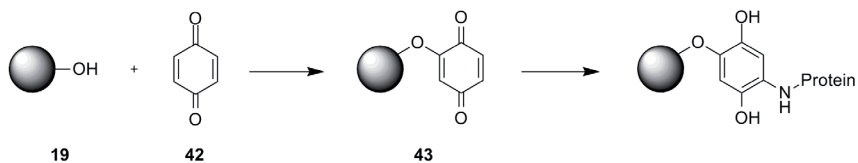


Fig. 115: Immobilization of proteins on benzoquinone functionalized ND **43**.

Animal testing of the covalently bound growth factors led to ambiguous results. In the case of Angiopoietin, a significant increase of blood vessel generation was observed after three months. On the other hand, BMP-2-functionalized nanodiamond did not lead to enhanced bone regeneration.

The outcome of this work can be considered as a basis of further investigations in the field of biological and medical applications of nanodiamond. Further tests are necessary though to fully explore the possibilities and risks of nanodiamond in medical use.

For the use of nanodiamond as drug delivery system the biodistribution and fate of the particles in the body has to be clarified. New techniques for this purpose are being developed in cooperation with other working groups. Also testing of the efficacy of the Isoniazid-functionalized nanodiamonds **27** and **28** is necessary for further improvement of these delivery systems.

Before entering clinical trials the bone replacements materials have to be tested upon their behaviour to release nanodiamond particles under physiological conditions. If that is the case, procedures have to be established to immobilize the particles on the scaffold surface permanently. This could be achieved e.g. by covalent immobilization.

In summary, the results acquired in the context of this work show the great potential of nanodiamond for biological and medical applications.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden kommerziell erworben und, wenn nicht weiter angegeben, ohne zusätzliche Aufreinigung eingesetzt.

Alle Lösungsmittel wurden zuvor durch Destillation gereinigt. Absolute Lösungsmittel wurden durch mehrstündiges Refluxieren über geeigneten Trockenmitteln (z.B. P_4O_{10}) hergestellt und anschließend über Molekularsieb 4Å gelagert. Als Schutzgas wurde Stickstoff verwendet.

Der Nanodiamant (Detonationssynthese) wurde von der *Gansu Lingyun Corp.* aus Lanzhou (China) bezogen.

Die Wachstumsfaktoren BMP-2 und Angiopoietin wurden von Dr. Joachim Nickel, Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Ehrlich's Reagenz: Sprühreagenz aus 1 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml konz. Salzsäure/Methanol (1:1); Detektion durch Erhitzen auf 130 °C.

Ninhydrin Lösung: Sprühreagenz aus 0.3 g Ninhydrin und 3 ml Eisessig in 100 ml *iso*-Propanol; Detektion durch Erhitzen auf 130 °C.

4-(Prop-2-in-1-yloxy)benzoldiazoniumtetrafluoroborat wurde von Martina Amend hergestellt.

6.2 Verwendete Geräte und Analysemethoden

6.2.1 Arbeitsgeräte

Ultraschallbad:

Bandelin Sonorex Digitec Typ DT52 (max. 80 W, 35 kHz)

Ultraschallhorn:

Branson Sonifier 450 102C (max. 400 W, 19850-20050 Hz) mit Titan-Mikrospitze, (5mm, konisch)

Zentrifuge:

Hettich EBA 21 Typ 1004

Ultrazentrifuge:

Thermo Scientific Sorvall MTX 150 mit Ausschwingrotor (max. 275458 g)

Vakuumpumpen:

Vacuubrand Membranpumpen verschiedener Art

Leybold Ölpumpen verschiedener Art

Röhrenofen:

Carbolite STF 16/450

Muffelofen:

Thermoconcept, Modell KL 04/12M (max. 1200 °C)

Rührwerkskugelmühle:

Netzsch MiniCer

6.2.2 Analysegeräte

Schmelzpunktbestimmung:

Reichert Kofler-Heiztisch

Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

FT-IR Spektrometer:

Jasco FT-IR-430 mit ATR-Aufsatz oder Vakuumzelle

Wurden Proben mit Hilfe der Vakuumzelle vermessen, wurde dazu das Nanodiamantmaterial auf die KBr Presslinge aufgebracht, nochmals gepresst (2t, 5min.) und 2 h ausgeheizt (80-110 °C, Vak. 10^{-2} mbar), um adsorbiertes Wasser zu entfernen. Die Messung erfolgte unter Aufrechterhaltung des Vakuums.

Folgende Abkürzungen für die Signalintensitäten werden verwendet: s = strong (stark), m = medium (mittel), w = weak (schwach).

UV/Vis-Spektrometer:

Jasco V-630 Spectrophotometer

Für die Vermessungen der Nanodiamantproben wurde der Diamant in den angegebenen Konzentrationen in den angegebenen Lösungsmitteln dispergiert und kurz zentrifugiert, um die größten Partikel zu entfernen.

Elementaranalyse:

Elementar „Vario Micro“

Thermogravimetrische Analyse:

Perkin Elmer STA 6000

Alle Messungen wurden mit folgender Methode durchgeführt:

($T_{\text{end}} = 900 \text{ °C}$, $k = 10 \text{ °C min}^{-1}$)

Zeta-Potential / Teilchengröße:

Malvern Zetasizer Nanoseries Nano-ZS

Für die Messungen der Teilchengrößen wurden die Diamantproben in den angegebenen Konzentrationen in den angegebenen Lösungsmitteln dispergiert (Ultraschallbad, 10 min.). Auf eine vorherige Zentrifugation wurde verzichtet. Für pH-abhängige Zetapotentialmessungen (Titrationsen) wurden die wässrigen Nanodiamantsuspensionen mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 ml verdünnt. Aufgrund der starken Agglomeration beim Trocknen der Nanodiamantproben wurden für die Messungen der Teilchengröße und des Zetapotentials stets kolloidale Lösungen verwendet.

Kernresonanzspektroskopie:

Bruker AVANCE 400 FT-NMR (^1H : 400 MHz, ^{13}C :100 MHz)

Verwendete Lösungsmittel: CDCl_3 (^1H -Resonanzsignal $\delta = 7.26$, ^{13}C -Resonanzsignal $\delta = 77.16$), DMSO (^1H -Resonanzsignal $\delta = 2.5$, ^{13}C -Resonanzsignal $\delta = 39.52$) und D_2O (nicht referenziert). Die Messtemperatur betrug 25 bzw. 27 °C. Die Multiplizität der Signale wird in folgenden Abkürzungen angegeben: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, br = breit. Die Zuordnung der Signale erfolgte über 2D Korrelationspektren.

Hochauflösende Massenspektrometrie:

Bruker Daltonic micrOTOF Focus (ESI)

Fluoreszenzmikroskop:

Zeiss Axiovert 200M

6.2.3 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie:

Es wurden Fertigfolien aus Aluminium, beschichtet mit 0.2 mm Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* verwendet. Zur Detektion der Substanzen diente deren Fluoreszenzlöschung bei 254 nm bzw. das Anfärben mit Ioddampf, Ninhydrinlösung oder *Ehrlich's Reagenz*.

Säulenchromatographie:

Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel der Firmen *Machery und Nagel* bzw. *Merck* (0.040-0.063 mm) verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Laufmittelzusammensetzungen sowohl für DC als auch für die Säulenchromatographie sind in Volumenprozent angegeben. Es wurden je nach Substanzmenge Säulen verschiedener Dicken und Längen verwendet.

6.3 Release Experimente

6.3.1 Herstellung der PBS-Pufferlösungen

Zunächst wurden zwei Stammlösungen **A** und **B** hergestellt:

A: KH_2PO_4	9.078 g	66.70 mmol	Mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen
B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.876 g	66.70 mmol	Mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen

Für die Herstellung der PBS-Pufferlösungen mit den gewünschten pH-Werten wurden die in Tabelle x.x angegebenen Volumina der Stammlösung **B** mit Stammlösung **A** auf 100 ml aufgefüllt. Zur genauen Einstellung der jeweiligen pH-Werte wurden die Pufferlösungen bei Bedarf entweder mit verdünnter Salzsäure oder verdünnter Natriumhydroxidlösung versetzt.^[110]

Tabelle X: pH-Werte und Volumina der für verschiedene Experimente notwendigen PBS Lösungen.

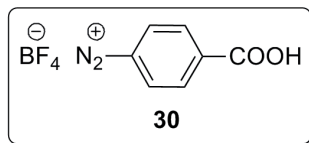
pH-Wert	V Stammlösung B [ml]
4.6	0.6
6.0	12.1
7.4	81.8
8.0	96.9

6.3.2 Experimente zur Freisetzung von Wirkstoff

Die zuvor eingewogenen Nanodiamantproben wurden jeweils mit Hilfe von Ultraschall in 1.5 ml PBS-Pufferlösung (pH=4.6 und pH=7.4) suspendiert und 96 h bei 37°C inkubiert. Nach 1, 2, 4, 24 und 96 Stunden wurden die Suspensionen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Nanodiamantproben mit frischer PBS-Pufferlösung befüllt. Anschließend wurde der Nanodiamant wieder mit Hilfe von Ultraschall suspendiert und weiter bei 37 °C inkubiert. Die gesammelten Überstände wurden mit Hilfe von UV/Vis-Spektroskopie auf die Freisetzung der jeweiligen Wirkstoffe hin untersucht.

6.4 Synthese organischer Verbindungen

6.4.1.1 Synthese von 4-Carboxybenzoldiazoniumtetrafluorborat^[111]



1.0 g (7.3 mmol) 4-Aminobenzoesäure (**29**) wurden in 6 ml Wasser und 5 ml Tetrafluorborsäure gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und 0.5 g (7.3 mmol) Natriumnitrit, gelöst in 1 ml Wasser, hinzugegeben. Nach 20 min Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung wieder auf 0 °C abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit 20 ml kaltem Wasser und 20 ml Diethylether gewaschen.

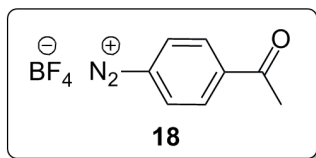
Ausbeute: 1.33 g (5.64 mmol, 77 %, Lit. 89 %)^[111] farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 101 °C (Lit. 103-104 °C)^[112]

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.68 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, Ar-3-H, Ar-4-H), 8.43 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, Ar-1-H, Ar-2-H) ppm.

FT-IR (ATR): = 3280 (s), 3501 (s), 2305 (m), 1727 (m), 1622 (s), 1584 (s), 1421 (s), 1306 (m), 1287 (s), 1225 (m), 1041 (vs), 826 (m), 761 (s), 699 (m) cm⁻¹.

6.4.1.2 Synthese von 4-Acetylbenzoldiazoniumtetrafluorborat^[82]



1.0 g (7.3 mmol) 4-Aminoacetophenon (**17**) wurden in 6 ml Wasser und 5 ml Tetrafluorborsäure gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und 0.5 g (7.3 mmol) Natriumnitrit, gelöst in 1 ml Wasser, hinzugegeben. Nach

20 min Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung wieder auf 0 °C abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit 20 ml kaltem Wasser und 20 ml Diethylether gewaschen.

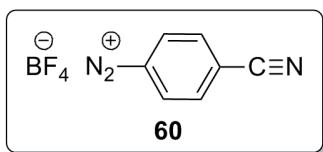
Ausbeute: 0.4 g (1.92 mmol, 26 %, Lit. 68 %)^[82] farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 92 °C (Lit. 94-95 °C)^[82]

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.69 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, Ar-1-H, Ar-2-H), 8.40 (d, ³J = 9.2 Hz, 2H, Ar-3-H, Ar-4-H) ppm.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3497 (w), 3296 (w), 2307 (w), 1714 (s), 1305 (s), 1024 (s), 863 (s), 766 (s), 701 (s) cm⁻¹.

6.4.1.3 Synthese von 4-Cyanobenzoldiazoniumtetrafluorborat^[112]



3.0 g (25.4 mmol) 4-Aminobenzoesäurenitril (**59**) wurden in 20 ml Tetrafluorborosäure gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit 1.7 g (25.4 mmol) Natriumnitrit, gelöst in 5 ml Wasser, versetzt. Nach 20 min Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung wieder auf 0 °C abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und in 10 ml Aceton gelöst. Nach Zugabe von 20 ml kaltem Diethylether fiel das Produkt als Feststoff aus, welcher mit 20 ml kaltem Wasser und 20 ml Diethylether gewaschen wurde.

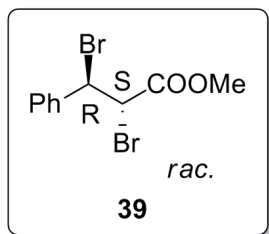
Ausbeute: 3.1 g (14.2 mmol, 56 %, Lit. 97 %)^[112] farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 145 °C (Lit. 150 °C)^[112]

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.82 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, Ar-3-H, Ar-4-H), 8.39 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, Ar-1-H, Ar-2-H) ppm.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3118 (m), 2289 (m), 1589 (m), 1415 (m), 1295 (m), 1039 (s), 971 (m), 838 (m) cm^{-1} .

6.4.1.4 Synthese von (2R,3S)+(2S,3R)-2,3-Dibromzimtsäuremethylester^[91]



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 10.0 g Zimtsäure **38** (61.1 mmol) in 100 ml Dichlormethan wurden 3.5 ml Brom (67.8 mmol) hinzuge tropft und zwei Tage bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml 2 M Natriumthiosulfatlösung versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

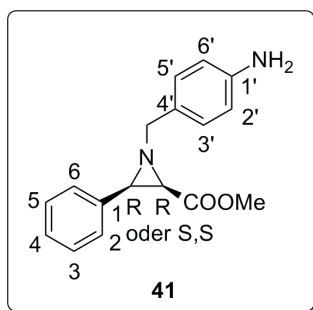
Ausbeute: 18.8 g (58.3 mmol, 95 %, Lit. 97 %)^[91] farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 114 °C (Lit.: 117 °C).^[91]

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.34 (m, 5H Ar-H), 5.29 (d, ³J = 11.4 Hz, 1H, Ph-CH-Br), 4.81 (d, ³J = 11.6 Hz, 1H, Br-CH-COOMe), 3.86 (s, 3H, COOMe) ppm.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[91]

6.4.1.5 Synthese von (2*R*,3*R*)-methyl-1-(4-aminobenzyl)-3-phenylaziridin-2-carboxylat



2.3 g 4-Aminobenzylamin (**40**) wurden in 50 ml Methanol vorgelegt. Bei 0 °C wurden 5.3 g 2,3-Dibromzimsäuremethylester (**39**), gelöst in 50 ml Methanol, hinzugegeben. Nach Zugabe von 3 ml Triethylamin wurde die Reaktionsmischung 7 d bei RT gerührt. Das Solvens wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Solvens wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.27 g (4.50 mmol, 27 %) gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 102 °C

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.35-6.63 (m, 9H, Ar-H), 3.85 (d, ³J = 13.1 Hz, 1H, CH₂-Ph), 3.64 (s, 2H, NH₂), 3.52 (d, ³J = 13.2 Hz, 1H, CH₂-Ph), 3.46 (s, ³J = 6.8 Hz, 3H, COOCH₃), 3.01 (d, ³J = 6.8 Hz, 1H, CH-Ph), 2.61 (d, 1H, CHCOOMe) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 145.6 (Aryl-C-1'), 135.2 (Aryl-C-1), 129.4 (Aryl-C-3', Aryl-C-5'), 127.8 (Aryl-C-2,3,4,5), 127.3 (Aryl-C-4'), 115.0 (Aryl-C-2',Aryl-C-6'), 62.9 (CH₂-Ph), 51.7 (COOCH₃), 47.4 (CHPh), 45.3 (COOCH₃) ppm.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3409 (m), 3328 (m), 1737 (s), 1625 (m), 1513 (s), 1436 (s), 1384 (m), 1353 (m), 1263 (s), 1195 (s), 1174 (s), 1070 (m), 1033 (m), 914 (m), 825 (s), 800 (s), 779 (s) cm⁻¹.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{17}H_{18}N_2NaO_2$ [$M + Na^+$]: 305.129; gef.: 305.126.

MS (EI, 70 eV): $m/z = 282$ (1), 194 (7), 121 (10), 106 (100).

UV/Vis (Acetonitril): $\lambda_{max} = 291, 618$ nm.

EA: ber.: C: 72.32 %, H: 6.43 %, N: 9.92 %; gef.: C: 72.11 %, H: 6.13 %, N: 9.95 %.

6.4.1.6 Synthese von Stearinsäurechlorid



2.0 g (7.73 mmol) Stearinsäure **64** und 6.86 g (54.11 mmol) Oxalylchlorid wurden in 100 ml Dichlormethan gelöst und 6 Tropfen DMF dazugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend 16 h bei RT gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde ein dunkelgelbes Öl erhalten, das ohne Aufreinigung weiter umgesetzt wurde.

Ausbeute: 2.1 g (6.9 mmol, 90 %, Lit. 80-90 %)^[113] dunkelgelbes Öl.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2884$ (m), 2829 (m), 2744 (m), 1801 (m), 1662 (s), 1455 (m), 1390 (m), 1305 (m), 1201 (m), 1159 (s), 1035 (s), 910 (s), 802 (s) cm^{-1} .

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[113]

6.5 Herstellung funktionalisierter Nanodiamantpartikel

6.5.1 Aufarbeitung von Nanodiamantproben

Nach erfolgter Umsetzung wurden die jeweiligen Nanodiamantsuspensionen in Zentrifugengefäße (Tischzentrifuge: 1,5 ml Fassungsvermögen, ca. 10 mg ND pro Gefäß; Ultrazentrifuge: 4 ml Fassungsvermögen, ca. 20 mg ND pro Gefäß) überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und der Nanodiamant in frischem Lösungsmittel mit Hilfe von Ultraschall resuspendiert. Nach dem Abzentrifugieren der Suspensionen wurde der weiter oben beschriebene Vorgang wiederholt durchgeführt. Nachfolgend sind die Anzahl der Waschzyklen und das jeweilige verwendete Lösungsmittel angegeben. Für analytische Untersuchungen wurden die DND-Proben zusätzlich mit Aceton und Dichlormethan gewaschen.

6.5.2 Thermische Behandlung von Nanodiamant



1.0 g unbehandelter DND **19** wurde auf Keramikscheibchen im Röhrenofen bei einer Heizrate von 70 °C / min und bei einem Druck von 10^{-3} mbar auf 750 °C erhitzt. Die Temperatur wurde 2 h konstant gehalten. Das Abkühlen auf RT erfolgte bei Aufrechterhaltung des angegebenen Drucks. Es wurde ein dunkelgraues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3409 (s), 2946 (m), 2879 (m), 1637 (s), 1394 (m), 1326 (s), 1143 (s), 836 (m) cm^{-1} .

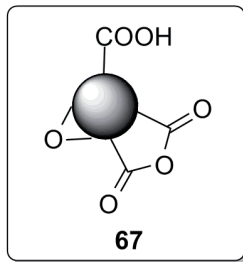
EA: C: 89.82 %, H: 0.48 %, N: 1.82 %.

Oberflächenbelegung (TGA): keine funktionellen Gruppen nachweisbar.

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): $10 \% \leq 104 \text{ nm}$, $50 \% \leq 189 \text{ nm}$, $90 \% \leq 349 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 44.4 mV ($\text{pH} = 7.0$).

6.5.3 Oxidation von Nanodiamant



1.0 g unbehandelter DND **19** wurde in einer Porzellanschale im Muffelofen bei einer Heizrate von $30 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ auf $425 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Die Temperatur wurde 2 h konstant gehalten. Nach dem Abkühlen wurde ein hellgraues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3403 \text{ (s)}$, 1799 (s) , 1627 (s) , 1421 (s) , 1268 (s) , $1103 \text{ (s)} \text{ cm}^{-1}$.

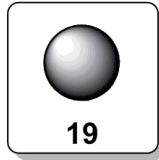
EA: C: 87.87% , H: 0.88% , N: 2.80% .

Oberflächenbelegung (TGA): keine funktionellen Gruppen nachweisbar.

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): $10 \% \leq 78 \text{ nm}$, $50 \% \leq 802 \text{ nm}$, $90 \% \leq 1840 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: -30.0 mV ($\text{pH} = 7.7$).

6.5.4 Vermahlung von Nanodiamant



12.5 g unbehandelter DND **19** wurde mit Hilfe von Ultraschall in 200 ml bidest. Wasser suspendiert. Die Suspension wurde mit weiteren 255 ml bidest. Wasser in der Rührwerkskugelmühle vermahlen. Nach Erreichen der gewünschten Teilchengröße wurde die fertige Suspension abgepumpt und mit weiteren 45 ml bidest. Wasser nachgespült. Erhalten wurde eine stabile, wässrige Nanodiamant-Suspension mit einer Konzentration von 29 mg/ml.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3370 (s), 2935 (m), 1722 (m), 1631 (s), 1320 (s), 1259 (s), 1137 (s), 1101 (s) cm^{-1} .

EA: C: 85.42 %, H: 1.71 %, N: 2.21 %.

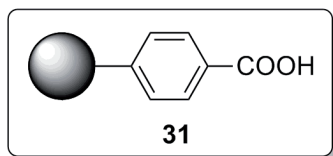
Oberflächenbelegung (TGA): keine funktionellen Gruppen nachweisbar.

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): 10 % $\leq 5 \text{ nm}$, 50 % $\leq 7 \text{ nm}$, 90 % $\leq 10 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 41.0 mV (pH = 5.8).

6.5.5 Herstellung arylierter Nanodiamantpartikel

6.5.5.1 Funktionalisierung mit Benzoesäure



108.0 mg gemahlener DND (suspendiert in 4.0 ml) wurde mit 104.0 mg 4-Carboxybenzoldiazoniumtetrafluoroborat (**30**) (0.44 mmol) versetzt und 1.5 h bei RT mit Ultraschall behandelt (Ultraschallhorn, output = 1.5, constant). Nach Beenden der Reaktion wurde der ND zunächst mit bidest. Wasser und anschließend mit DMSO gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3419 (s), 2974 (m), 1707 (s), 1603 (s), 1250 (s), 1172 (s), 1106 (s), 860 (s) cm^{-1} .

EA: C: 70.41 %, H: 1.00 %, N: 1.75 %.

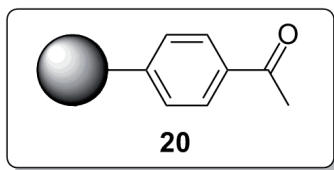
Oberflächenbelegung (TGA): 0.47 mmol g^{-1}

$(\Delta m (180 \text{ °C} - 500 \text{ °C}) = -5.39 \text{ \%}, \text{ Fragment: } \text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2 (121.11 \text{ g mol}^{-1}))$.

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): $10 \% \leq 50 \text{ nm}$, $50 \% \leq 77 \text{ nm}$, $90 \% \leq 144 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: -8.2 mV ($\text{pH} = 4.5$).

6.5.5.2 Funktionalisierung mit Acetophenon



108.0 mg gemahlener DND **19** (suspendiert in 4.0 ml) wurde mit 100.0 mg 4-Acetylbenzoldiazoniumtetrafluoroborat (**18**) (0.46 mmol) versetzt und 1.5 h bei RT mit Ultraschall behandelt (Ultraschallhorn, output = 1.5, constant). Nach Beenden der Reaktion wurde der ND zunächst mit bidest. Wasser und anschließend mit DMSO gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3330 (s), 2970 (m), 1676 (s), 1603 (m), 1359 (s), 1267 (s), 1089 (s), 962 (s), 840 (s) cm^{-1} .

EA: C: 88.44 %, H: 1.28 %, N: 2.00 %.

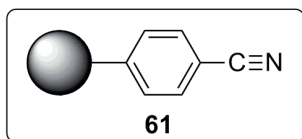
Oberflächenbelegung (TGA): 0.40 mmol g^{-1}

(Δm (150 °C – 500 °C) = -4.72 %, Fragment: $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}$ (119.14 g mol^{-1}))

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % \leq 7 nm, 50 % \leq 44 nm, 90 % \leq 192 nm.

Zeta-Potential: 39.5 mV (pH = 4.25).

6.5.5.3 Funktionalisierung mit Benzonitril



108.0 mg gemahlener DND (suspendiert in 4.0 ml) wurde mit 100.0 mg 4-Cyanobenzoldiazoniumtetrafluorborat (**60**) (0.42 mmol) versetzt und 2.5 h bei RT mit Ultraschall behandelt (Ultraschallhorn, output = 1.5, constant). Nach dem Zentrifugieren der Reaktionsmischung wurde der ND zunächst zweimal mit bidest. Wasser und anschließend fünfmal mit DMSO gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3363 (s), 2917 (s), 2227 (s), 1722 (m), 1677 (m), 1602 (s), 1504 (m), 1407 (s), 1309 (s), 1178 (s), 1143 (s), 1049 (s), 950 (s), 842 (s) cm^{-1} .

EA: C: 87.42 %, H: 1.33 %, N: 3.77 %.

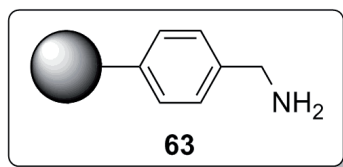
Oberflächenbelegung (TGA): 0.46 mmol g^{-1}

(Δm (100 °C – 300 °C) = -4.73 %, Fragment: $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}$ (102.11 g mol^{-1}))

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % \leq 22 nm, 50 % \leq 35 nm, 90 % \leq 67 nm.

Zeta-Potential: 34.4 mV (pH = 4.04).

6.5.5.4 Funktionalisierung mit Benzylamin



30.0 mg ND (**61**) wurden zunächst zweimal mit trockenem THF gewaschen und anschließend unter Stickstoffatmosphäre in 50 ml trockenem THF suspendiert. Nach der Zugabe von 15 ml Boranlösung (THF Komplexlösung 1M) wurde die Reaktionsmischung 72 h bei 80 °C gerührt. Um Reste des Borans abzureagieren zu lassen, wurden nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung 10 ml verdünnte HCl dazugetropft. Anschließend wurde der abzentrifugierte ND dreimal mit DMSO gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3374$ (s), 2950 (s), 1627 (m), 1488 (s), 1436 (s), 1311 (s), 1139 (s), 1022 (s), 952 (s), 898 (s) cm^{-1} .

EA: C: 88.58 %, H: 1.23 %, N: 2.63 %.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.40 mmol g^{-1}

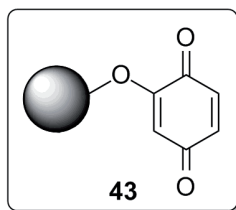
(Δm (100 °C – 480 °C) = -4.33 %, Fragment: $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}$ (106.15 g mol^{-1}))

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % ≤ 7 nm, 50 % ≤ 12 nm, 90 % ≤ 25 nm.

Zeta-Potential: 30.2 mV (pH = 4.13).

6.5.6 Herstellung alkylierter Nanodiamanten

6.5.6.1 Herstellung Benzochinon-funktionalisierter Nanodiamantpartikel



189.0 mg gemahlener DND **19** (7.0 ml) wurden mit 0.5 ml halbgesättigter NaCl-Lösung versetzt und bei 15000 RPM 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die ND in 20 ml PBS-Pufferlösung (pH = 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 150.0 mg Benzochinon **42** (1.38 mmol) wurde die Suspension 24 h bei RT gerührt. Der ND wurde anschließend achtmal mit PBS-Pufferlösung (pH = 7.4) und zweimal mit bidest. Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein rotbraunes Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3349$ (s), 2935 (m), 1718 (m), 1650 (s), 1623 (s), 1502 (s), 1452 (s), 1197 (s), 1095 (s), 821 (s) cm^{-1} .

EA: C: 84.40 %, H: 1.74 %, N: 1.98 %.

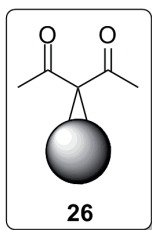
Oberflächenbelegung (TGA): 0.43 mmol g⁻¹.

(Δm (180 °C - 425 °C) = -5.63 %, Fragment: C₆H₃O₃ (123.09 g mol⁻¹)).

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % ≤ 94 nm, 50 % ≤ 90 nm, 90 % ≤ 242 nm.

Zeta-Potential: -30.8 mV (pH = 6.3).

6.5.6.2 Herstellung Pentadion-funktionalisierter Nanodiamantpartikel



100.00 mg graphitisierter DND **24** wurde mit Hilfe von Ultraschall in 20 ml abs. Toluol suspendiert und mit 331.00 mg (1.0 mmol) Tetrabrommethan und 770.00 mg DBU versetzt. Nach der Zugabe von 50.00 mg 2,4-Pentadion (**25**) wurde die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt. Der abzentrifugierte ND wurde anschließend viermal mit Aceton, viermal mit DMSO und zweimal mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3411 (s), 2942 (m), 2877 (m), 1703, (m), 1627 (s), 1438 (m), 1357 (m), 1095 (s), 966 (m), 948 (m), 871 (m) cm⁻¹.

EA: C: 92.00 %, H: 0.93 %, N: 2.38 %.

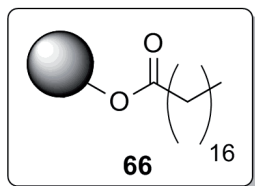
Oberflächenbelegung (TGA): 0.28 mmol g⁻¹.

(Δm (140 °C - 480 °C) = -2.84 %, Fragment: C₅H₆O₂ (98.10 g mol⁻¹)).

Partikelgröße (DMSO, $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): $10 \% \leq 65 \text{ nm}$, $50 \% \leq 113 \text{ nm}$, $90 \% \leq 251 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 47.0 mV ($\text{pH} = 4.6$).

6.5.6.3 Herstellung Stearinsäure-funktionalisierter Nanodiamantpartikel



100.00 mg gemahlener DND **19** wurde im Ultraschallbad in 10 ml Pyridin suspendiert und mit 50.00 mg (0.16 mmol) Stearinsäurechlorid **65**, gelöst in 10 ml abs. Toluol, versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend 4 d unter Rückfluss erhitzt. Der abzentrifugierte ND wurde anschließend viermal mit Aceton und viermal mit DMSO gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3376 \text{ (s)}$, 2952 (m) , 1722 (s) , 1629 (s) , 1253 (s) , 1213 (s) , 1135 (s) , 1105 (s) , $946 \text{ (s)} \text{ cm}^{-1}$.

EA: C: 80.07 %, H: 1.40 %, N: 2.23 %.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.10 mmol g^{-1} .

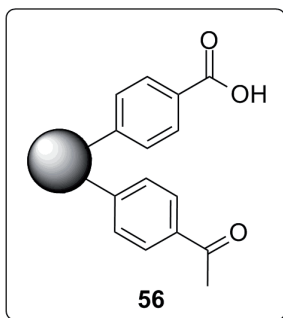
(Δm ($180 \text{ }^\circ\text{C} - 450 \text{ }^\circ\text{C}$) = -2.83 %, Fragment: $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2$ ($283.47 \text{ g mol}^{-1}$)).

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): $10 \% \leq 20 \text{ nm}$, $50 \% \leq 31 \text{ nm}$, $90 \% \leq 1190 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 42.1 mV ($\text{pH} = 5.3$).

6.5.7 Herstellung orthogonal funktionalisierter Nanodiamantpartikel

6.5.7.1 Funktionalisierung mit Acetophenon- und Benzoessäureeinheiten



100.00 mg (3.5 ml) gemahlener Nanodiamant **19**, 50.00 mg (0.21 mmol) 4-Carboxybenzoldiazoniumtetrafluoroborat (**30**) und 50.00 mg (0.21 mmol) 4-Acetylbenzoldiazoniumtetrafluoroborat (**18**) wurden zusammengegeben und mit Wasser-badkühlung 1.5 h mit Ultraschall behandelt (Ultraschallhorn, output = 1.5). Der Diamant wurde abzentrifugiert und anschließend zweimal mit bidest. Wasser, dreimal mit DMSO, viermal mit Aceton und zweimal mit Dichlormethan gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3423 (s), 2967 (m), 1706 (s), 1677 (s), 1637 (s), 1606 (s), 1267 (s), 1160 (m), 1095 (s), 850 (s) cm^{-1} .

EA: C: 90.47 %, H: 1.14 %, N: 1.39 %.

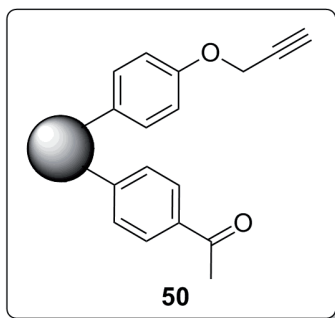
Oberflächenbelegung (TGA): 0.13 mmol g^{-1} .

(Δm (150 °C - 550 °C) = -3.19 %, Fragment: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3$ (240.25 g mol^{-1})).

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % \leq 13 nm, 50 % \leq 22 nm, 90 % \leq 53 nm.

Zeta-Potential: 31.9 mV (pH = 4.0).

6.5.7.2 Funktionalisierung mit Acetophenon- und Alkineinheiten



100.00 mg (0.42 mmol) 4-Acetylbenzoldiazoniumtetrafluoroborat (**18**) und 103.00 mg (0.42 mmol) 4-(Prop-2-in-1-yloxy)benzoldiazoniumtetrafluoroborat (**49**) wurden in 3 ml Wasser gelöst und zu 200.00 mg ND **19** gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1.5 h mit Ultraschall behandelt (Ultraschallhorn, output = 1.5) wobei mit einem Wasserbad gekühlt wurde. Der abzentrifugierte Diamant wurde einmal mit Wasser, fünfmal mit DMSO und dreimal mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graubraunes Pulver erhalten.

FT-IR (KBr-Pellet): $\tilde{\nu}$ = 3403 (s), 2929 (m), 2117 (w), 1680 (s), 1600 (s), 1506 (s), 1409 (m), 1359 (s), 1267 (s), 1224 (s), 1178 (s), 1024 (s), 962 (m), 835 (m) cm^{-1} .

EA: C: 87.65 %, H: 1.79 %, N: 2.53 %.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.27 mmol g^{-1} .

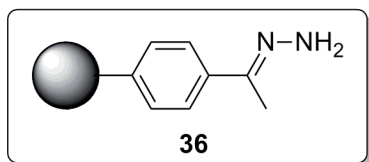
(Δm (100 °C - 500 °C) = -6.83 %, Fragment: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_2$ (250.29 g mol^{-1})).

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % \leq 177 nm, 50 % \leq 281 nm, 90 % \leq 441 nm.

Zeta-Potential: 34.0 mV (pH = 5.4).

6.5.8 Herstellung von Nanodiamantpartikeln mit säurelabilen Linkersystemen

6.5.8.1 Herstellung hydrazonfunktionalisierter Nanodiamantpartikel



50.0 mg ND **20** wurden mittels Ultraschall in 2.0 ml Ethanol suspendiert. Nach der Zugabe von 2.0 ml Hydrazinhydrat **32** wurde die Suspension 4h bei 90 °C refluxiert. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung wurde der Nanodiamant viermal mit DMF und viermal mit bidest. Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3384 (s), 2950 (m), 1704 (m), 1633 (m), 1587 (m), 1363 (m), 1257 (m), 1091 (m), 842 (m), 734 (m) cm^{-1} .

EA: C: 87.70 %, H: 1.54 %, N: 3.63 %.

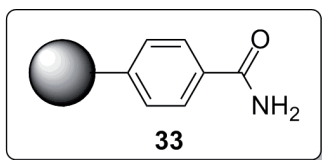
Oberflächenbelegung (TGA): 0.14 mmol g^{-1} .

(Δm (180 °C - 425 °C) = -1.92 %, Fragment: $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2$ (133.17 g mol^{-1})).

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): 10 % $\leq 45 \text{ nm}$, 50 % $\leq 73 \text{ nm}$, 90 % $\leq 160 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 44.1 mV (pH = 7.1).

6.5.8.2 Herstellung hydrazidfunktionalisierter Nanodiamantpartikel



160.0 mg ND **31** wurden mittels Ultraschall in 10.0 ml Cyclohexan suspendiert und mit 110.0 mg EDC (0.57 mmol) und 69.0 mg (0.59 mmol) NHS versetzt und 4 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von 0.1 ml (2.00 mmol) Hydrazinhydrat **32** wurde die Reaktionsmischung weitere 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Nanodiamant sechsmal mit bidest. Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3391 (s), 2358 (m), 1640 (m), 1550 (m), 1374 (m), 1254 (m), 1077 (m) cm^{-1} .

EA: C: 85.13 %, H: 1.18 %, N: 2.77 %.

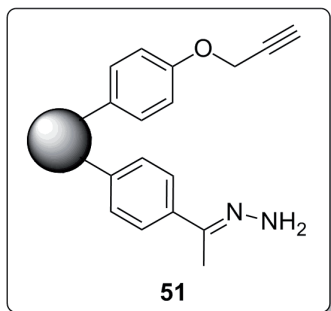
Oberflächenbelegung (TGA): 0.37 mmol g^{-1} .

(Δm (180 °C - 425 °C) = -5.25 %, Fragment: $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{O}$ (135.15 g mol^{-1})).

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % \leq 49 nm, 50 % \leq 207 nm, 90 % \leq 286 nm.

Zeta-Potential: 17.1 mV (pH = 5.2).

6.5.8.3 Herstellung von Nanodiamantpartikeln mit Hydrazon- und Alkineinheiten



160.0 mg ND **50** wurden mittels Ultraschall in 20.0 ml Cyclohexan suspendiert und unter Rühren auf 50 °C erwärmt. Nach der Zugabe von 1 ml (20.00 mmol) Hydrazinhydrat **32** wurde die Reaktionsmischung 4 h bei 90 °C refluxiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Nanodiamant fünfmal mit Ethanol, zweimal mit Aceton und zweimal mit DMF gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graubraunes Pulver erhalten.

FT-IR (KBr-Pellet): $\tilde{\nu}$ = 3363 (s), 2921 (m), 1631 (s), 1603 (s), 1508 (s), 1432 (m), 1365 (s), 1299 (s), 1220 (s), 1157 (s), 1085 (m), 835 (s) cm^{-1} .

EA: C: 82.23 %, H: 2.09 %, N: 3.42 %.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.33 mmol g^{-1} .

(Δm (140 °C - 550 °C) = -8.79 %, Fragment: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ (264.32 g mol^{-1})).

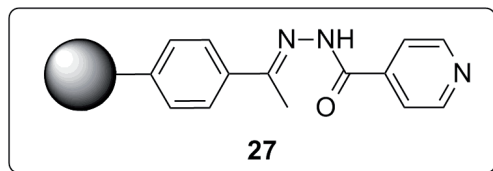
Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): 10 % $\leq 73 \text{ nm}$, 50 % $\leq 114 \text{ nm}$, 90 % $\leq 204 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 33.8 mV (pH = 5.3).

6.6 Immobilisierung organischer Substanzen

6.6.1 Immobilisierung von Wirkstoffen

6.6.1.1 Immobilisierung von Isoniazid



27.00 mg (0.20 mmol) Isoniazid **5** wurden in 2 ml Ethanol gelöst und zu einer Suspension von 100.00 mg ND **20** in 10 ml Ethanol getropft. Die Suspension wurde 10 min mit Ultraschall behandelt und anschließend 4 h bei 80 °C refluxiert. Nachdem die Suspension abgekühlt war, wurde sie abzentrifugiert und der Nanodiamant siebenmal mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3400 (m), 2934 (m), 1664 (s), 1602 (m), 1552 (w), 1411(m), 1361 (s), 1268 (s), 1228 (s), 1095 (s), 842 (s) cm^{-1} .

EA: C: 81.36 %, H: 2.21 %, N: 3.01 %.

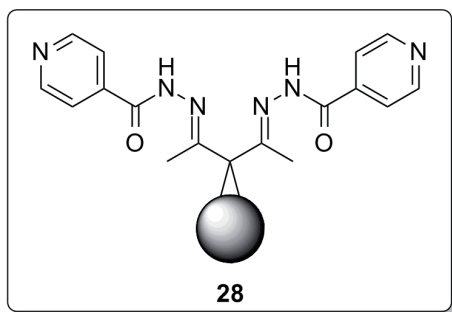
Oberflächenbelegung (TGA): 0.18 mmol g^{-1} .

(Δm (150 °C - 500 °C) = -4.30 %, Fragment: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}$ (238.26 g mol^{-1})).

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.5 \text{ mg/ml}$): 10 % $\leq 45 \text{ nm}$, 50 % $\leq 75 \text{ nm}$, 90 % $\leq 130 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: -27.0 mV (pH = 4.6).

6.6.1.2 Doppelte Immobilisierung von Isoniazid



60.00 mg ND **26** wurden mit Hilfe von Ultraschall in 15 ml Ethanol suspendiert. Nach der Zugabe von 150.00 mg (1.09 mmol) Isoniazid **5**, gelöst in 2 ml Ethanol, wurde die Reaktionsmischung 4 h bei 90 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Suspension wurde diese abzentrifugiert und der Nanodiamant siebenmal mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3394 (m), 2942 (m), 1639 (s), 1546 (m), 1374 (s), 1288 (s), 1103 (s), 971 (m), 921 (m) cm^{-1} .

EA: C: 89.50 %, H: 0.92 %, N: 2.64 %.

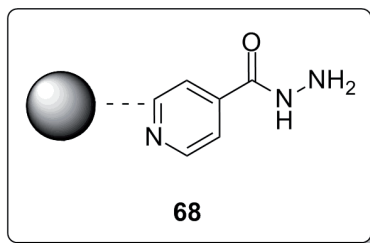
Oberflächenbelegung (TGA): 0.16 mmol g^{-1} .

(Δm (150 °C - 500 °C) = -5.31 %, Fragment: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2$ (363.35 g mol^{-1})).

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.5 \text{ mg/ml}$): 10 % $\leq 51 \text{ nm}$, 50 % $\leq 147 \text{ nm}$, 90 % $\leq 451 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 36.2 mV (pH = 6.4).

6.6.1.3 Adsorption von Isoniazid



27.00 mg mechanisch deagglomerierter ND **19**, suspendiert in 10 ml H₂O wurden unter Ultraschallbehandlung mit 1.00 mg Isoniazid **5** (7.29 μmol) versetzt. Durch Zugabe von verdünnter NaOH-Lösung (2.5 mmol l⁻¹) wurde die Nanodiamantsuspension auf einen pH-Wert von 7.74 eingestellt. Nach 18 h Rührens bei RT, wurde der Nanodiamant achtmal mit Aceton gewaschen.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3386 (m), 2933 (m), 1631 (s), 1546 (m), 1373 (s), 1322 (s), 1205 (s), 1151 (s) cm⁻¹.

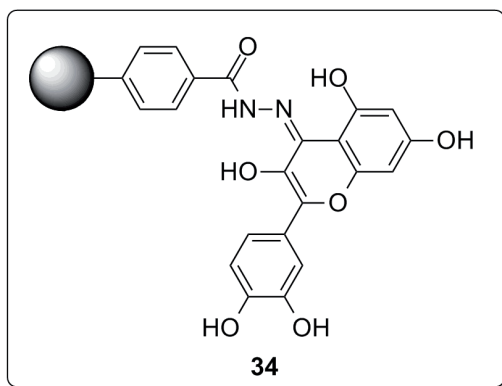
Oberflächenbelegung (TGA): 0.25 mmol g⁻¹.

(Δ m (240 °C - 480 °C) = -3.43%, Fragment: C₆H₇N₂O (137.14 g mol⁻¹)).

Partikelgröße (H₂O, c = 0.5 mg/ml): 10 % ≤ 55 nm, 50 % ≤ 94 nm, 90 % ≤ 629 nm.

Zeta-Potential: 36.4 mV (pH = 6.3).

6.6.1.4 Immobilisierung von Quercetin



163.00 mg ND **30** wurden in 12 ml Ethanol mittels Ultraschall suspendiert. Nach der Zugabe von 220.00 mg (0.72 mmol) Quercetin **6** wurde die Reaktionsmischung 4 h bei 90 °C unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der ND abzentrifugiert und siebenmal mit DMSO und zweimal mit H₂O gewaschen. Es wurde ein gelbes Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3342 (s), 2935 (m), 1704 (s), 1646 (s), 1602 (s), 1556 (m), 1494 (m), 1425 (m), 1373 (s), 1319 (s), 1267 (s), 1170 (s), 1095 (s), 837 (m) cm⁻¹.

EA: C: 78.86 %, H: 1.77 %, N: 2.00 %.

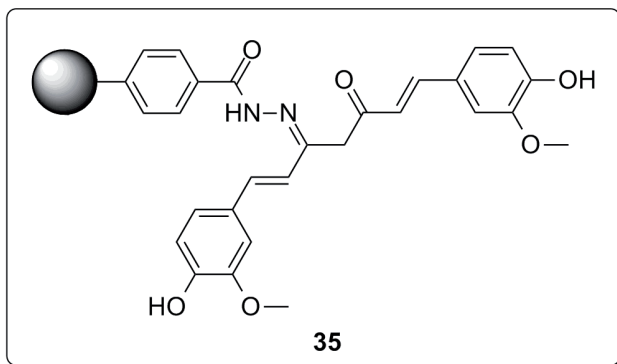
Oberflächenbelegung (TGA): 0.19 mmol g⁻¹.

(Δ m (150 °C - 500 °C) = -8.09 %, Fragment: C₂₂H₁₆N₂O₇ (419.36 g mol⁻¹)).

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % ≤ 55 nm, 50 % ≤ 83 nm, 90 % ≤ 150 nm.

Zeta-Potential: -25.1 mV (pH = 6.0).

6.6.1.5 Immobilisierung von Curcumin



160.00 mg ND **33** und 87.00 mg (0.23 mmol) Curcumin **7** wurden 10 min mittels Ultraschall in 20 ml Cyclohexan suspendiert und anschließend 4 h bei 90 °C refluxiert. Die Reaktionsmischung wurde abzentrifugiert und der ND sechsmal mit Ethanol gewaschen. Es wurde ein gelbes Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3347 (s), 2921 (m), 1644 (m), 1556 (m), 1546 (m), 1508 (m), 1454 (w), 1376 (m), 1224 (s), 1153 (s), 671 (s) cm^{-1} .

EA: C: 65.55 %, H: 1.57 %, N: 1.79 %.

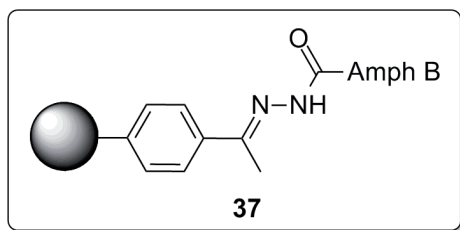
Oberflächenbelegung (TGA): 0.47 mmol g^{-1} .

(Δm (150 °C - 550 °C) = -17.44 %, Fragment: $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_9$ (485.58 g mol^{-1})).

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % \leq 356 nm, 50 % \leq 497 nm, 90 % \leq 751 nm.

Zeta-Potential: 9.1 mV (pH = 5.5).

6.6.1.6 Immobilisierung von Amphotericin



50.00 mg ND **36** wurden mittels Ultraschall in 20 ml H₂O suspendiert. Nach der Zugabe von 20.00 mg (0.02 mmol) Amphotericin B **8**, gelöst in 1.5 ml Methanol, wurde die Suspension weitere 5 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden 20.00 mg (0.10 mmol) EDC und 10 mg (0.10 mmol) NHS, gelöst in 1.5 ml Methanol, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde weitere 5 min mit Ultraschall behandelt und anschließend 20 h bei RT gerührt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der ND fünfmal mit Wasser, zehnmal mit Methanol gewaschen. Es wurde ein gelbes Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3393 (s), 2943 (m), 1712 (s), 1654 (s), 1598 (s), 1531 (m), 1435 (m), 1369 (s), 1267 (s), 1182 (s), 1066 (s), 1010 (s), 840 (s) cm⁻¹.

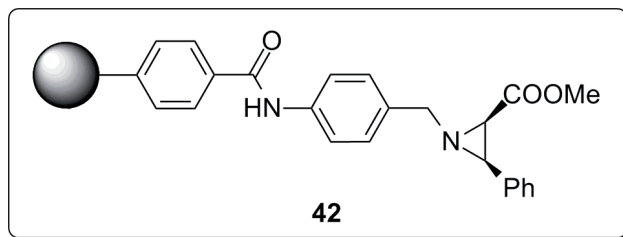
EA: C: 75.08 %, H: 2.77 %, N: 5.28 %.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.07 mmol g⁻¹.

(Δm (150 °C - 500 °C) = -7.74 %, Fragment: C₅₅H₈₁N₂O₁₇ (1039.25 g mol⁻¹)).

Partikelgröße (H₂O, c = 0.2 mg/ml): 10 % ≤ 64 nm, 50 % ≤ 100 nm, 90 % ≤ 187 nm.

Zeta-Potential: 12.8 mV (pH = 7.44).

6.6.1.7 Immobilisierung von (2*R*,3*R*)-methyl-1-(4-aminobenzyl)-3-phenylaziridin-2-carboxylat

30.00 mg ND **31** wurden mittels Ultraschall in 20 ml H₂O suspendiert. Nach der Zugabe von 20.00 mg (0.07 mmol) (2*R*,3*R*)-methyl-1-(4-aminobenzyl)-3-phenylaziridin-2-carboxylat (**41**), wurde die Suspension weitere 5 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden 20.00 mg (0.10 mmol) EDC und 10 mg (0.10 mmol) NHS, gelöst in 1.5 ml H₂O, zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde weitere 5 min mit Ultraschall behandelt und anschließend 16 h bei RT gerührt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der ND fünfmal mit Wasser, fünfmal mit Aceton gewaschen. Es wurde ein graubraunes Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3316 (m), 2938 (m), 1740 (s), 1705 (s), 1648 (s), 1602 (s), 1542 (s), 1369 (s), 1207 (s), 1070 (s), 995 (s) cm⁻¹.

EA: C: 85.50 %, H: 1.39 %, N: 2.62 %.

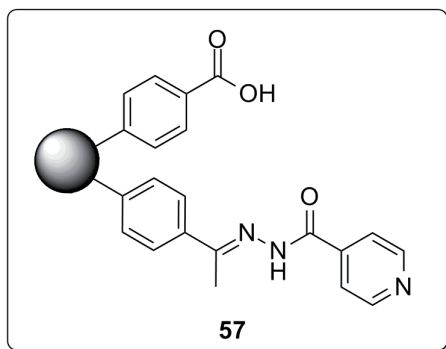
Oberflächenbelegung (TGA): 0.17 mmol g⁻¹.

(Δm (150 °C - 550 °C) = -6.80 %, Fragment: C₂₄H₂₁N₂O₃ (385.44 g mol⁻¹)).

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % ≤ 50 nm, 50 % ≤ 78 nm, 90 % ≤ 157 nm.

Zeta-Potential: -10.7 mV (pH = 5.5).

6.6.1.8 Immobilisierung von Isoniazid auf Acetophenon- und Benzoessäure-funktionalisiertem ND



80.00 mg ND **56** wurden mittels Ultraschall in 20 ml Ethanol suspendiert. Nach der Zugabe von 27.00 mg Isoniazid **5** (0.20 mmol) wurde die Reaktionsmischung 4.5 h bei 80 °C unter Rückfluss erhitzt. Der isolierte Diamant wurde siebenmal mit Ethanol, zweimal mit Aceton und zweimal mit DMF gewaschen. Es wurde ein dunkelgraues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3386 (m), 2944 (m), 1702 (s), 1602 (s), 1550 (s), 1369 (s), 1251 (s), 1172 (s), 1101 (s), 1018 (s), 840 (s) cm^{-1} .

EA: C: 87.43 %, H: 1.57 %, N: 3.02 %.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.16 mmol g^{-1} .

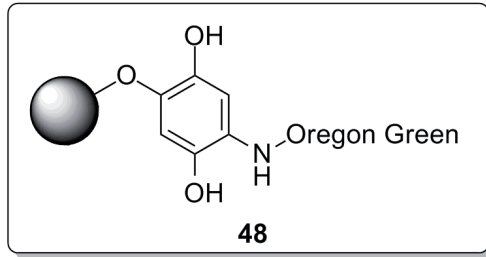
(Δm (150 °C - 550 °C) = -5.73 %, Fragment: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ (359.38 g mol^{-1})).

Partikelgröße (DMF, c = 0.2 mg/ml): 10 % \leq 28 nm, 50 % \leq 41 nm, 90 % \leq 67 nm.

Zeta-Potential: 10.5 mV (pH = 5.9).

6.6.2 Immobilisierung von Farbstoffen

6.6.2.1 Herstellung Oregon Green-funktionalisierter Nanodiamantpartikel



14.00 mg ND **43** wurden mittels Ultraschall in 5 ml PBS (pH=6) suspendiert, mit 0.50 mg Oregon Green 488 Cadaverin **47** (1.00 μmol) versetzt und unter Lichtausschluß 24 h bei RT gerührt. Nach Zentrifugation wurde der Diamant achtmal mit halbgesättigter NaCl-Lösung, dreimal mit bidest. Wasser, dreimal mit Aceton und zweimal mit Dichlormethan gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein rot-braunes Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3392 (s), 2933 (m), 1633 (s), 1492 (m), 1369 (s), 1324 (s), 1286 (s), 1155 (s), 1083 (s), 1025 (s), 823 (s) cm^{-1} .

EA: C: 85.73 %, H: 1.25 %, N: 2.36 %.

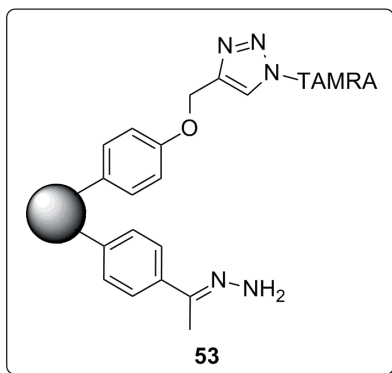
Oberflächenbelegung (TGA): 0.07 mmol g^{-1} .

(Δm (150 °C - 500 °C) = -4.55 %, Fragment: $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_9$ (619.55 g mol^{-1})).

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): 10 % $\leq 35 \text{ nm}$, 50 % $\leq 53 \text{ nm}$, 90 % $\leq 237 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 40.1 mV (pH = 5.8).

6.6.2.2 Herstellung TAMRA-funktionalisierter Nanodiamantpartikel



30.00 mg ND **51** wurden mit Hilfe von Ultraschall in 10 ml DMF/H₂O (4:1) suspendiert. Anschließend wurden 0.25 mg TAMRA-Azid **52** (0.45 μmol), 57.00 mg Natriumascorbat (0.28 mmol) und 23.00 mg Kupfersulfat (0.14 mmol) hinzugegeben und weitere 5 min im Ultraschallbad suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde unter Lichtausschluss 18 h bei RT gerührt und anschließend abzentrifugiert. Der niedergeschlagene ND wurde sechsmal mit verdünnter Ammoniaklösung, zweimal mit DMF, und sechsmal mit bidest. Wasser gewaschen. Erhalten wurde ein rotes Pulver.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3409 (m), 2901 (m), 1714 (m), 1677 (s), 1604 (s), 1508 (m), 1365 (m), 1232 (s), 1159 (s), 836 (m) cm⁻¹.

EA: C: 82.58 %, H: 1.72 %, N: 3.13 %.

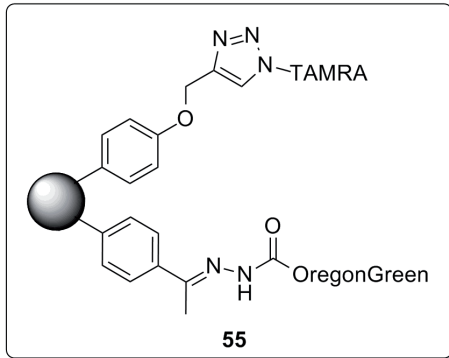
Oberflächenbelegung (TGA): 0.15 mmol g⁻¹.

(Δm (130 °C - 550 °C) = -12.63 %, Fragment: C₄₈H₄₉N₈O₅ (818.79 g mol⁻¹)).

Partikelgröße (H₂O, c = 0.2 mg/ml): 10 % ≤ 113 nm, 50 % ≤ 259 nm, 90 % ≤ 564 nm.

Zeta-Potential: 42.3 mV (pH = 6.7).

6.6.2.3 Herstellung Oregon Green- und TAMRA-funktionalisierter Nanodiamantpartikel



50.00 mg ND **53** wurden zunächst mittels Ultraschall in 10 ml Pyridin suspendiert und anschließend unter weiterer Ultraschallbehandlung mit 0.25 mg Oregon Green 488 Succinimidylester **54** (0.40 μmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend 16 h bei RT gerührt. Der isolierte ND wurde zwölfmal mit DMSO, zweimal mit Ethanol und viermal mit Aceton gewaschen. Erhalten wurde ein rotes Pulver.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3343 (m), 2935 (m), 1666 (3), 1641 (s), 1600 (s), 1492 (s), 1434 (m), 1367 (s), 1330 (s), 1303 (s), 1245 (s), 1174 (s), 1014 (s), 958 (s), 877 (s), 835 (s) cm^{-1} .

EA: C: 82.99 %, H: 2.16 %, N: 3.48 %.

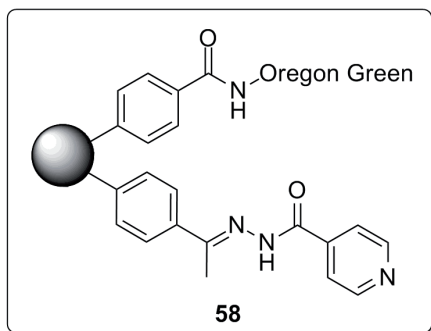
Oberflächenbelegung (TGA): 0.08 mmol g^{-1} .

(Δm (120 $^{\circ}\text{C}$ - 550 $^{\circ}\text{C}$) = -11.59 %, Fragment: $\text{C}_{69}\text{H}_{58}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_{11}$ (1214.27 g mol^{-1})).

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): 10 % $\leq 101 \text{ nm}$, 50 % $\leq 188 \text{ nm}$, 90 % $\leq 392 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 22.5 mV (pH = 7.5).

6.6.2.4 Immobilisierung von Oregon Green auf Isoniazid- und Benzooesäure-funktionalisiertem ND



60.00 mg ND **57** wurden mittels Ultraschall in 20 ml DMF suspendiert. Unter weiterer Ultraschallbehandlung wurden 40.00 mg EEDQ (0.16 mmol), gelöst in 1 ml DMF, hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde weitere fünf min mit Ultraschall behandelt und anschließend 0.50 mg Oregon Green 488 Cadaverin **47**, gelöst in 1 ml DMF, hinzugegeben. Die Suspension wurde 16 h bei RT gerührt. Der abzentrifugierte ND wurde anschließend zwölfmal mit DMF und viermal mit Aceton gewaschen. Erhalten wurde ein rotes Pulver.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3345 (m), 2938 (m), 1654 (s), 1600 (s), 1540 (s), 1488 (s), 1369 (s), 1313 (s), 1255 (s), 1172 (s), 1101 (s), 954 (s), 842(s) cm^{-1} .

EA: C: 87.83 %, H: 1.50 %, N: 3.17 %.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.07 mmol g^{-1} .

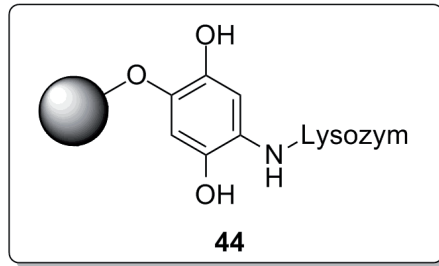
(Δm (150 °C - 550 °C) = -6.11 %, Fragment: $\text{C}_{38}\text{H}_{37}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_5$ (837.59 g mol^{-1})).

Partikelgröße (DMSO, c = 0.2 mg/ml): 10 % ≤ 61 nm, 50 % ≤ 93 nm, 90 % ≤ 160 nm.

Zeta-Potential: 7.2 mV (pH = 5.5).

6.6.3 Immobilisierung von Proteinen

6.6.3.1 Immobilisierung von Lysozym auf Nanodiamant



100.00 mg ND **43** wurden mittels Ultraschall in 20 ml PBS (pH=6) suspendiert, mit 5.00 mg Lysozym versetzt und 24 h bei RT gerührt. Nach Zentrifugation wurde der Diamant fünfmal mit halbgesättigter NaCl-Lösung, fünfmal mit bidest. Wasser, dreimal mit Aceton und zweimal mit Dichlormethan gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein graues Pulver erhalten.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3289 (m), 2961 (m), 1648 (s), 1524 (s), 1455 (s), 1382 (s), 1230 (s), 1201 (s), 1099 (s), 1071 (s), 820 (s) cm^{-1} .

EA: C: 72.15 %, H: 3.11 %, N: 5.56 %, S: 0.74 %.

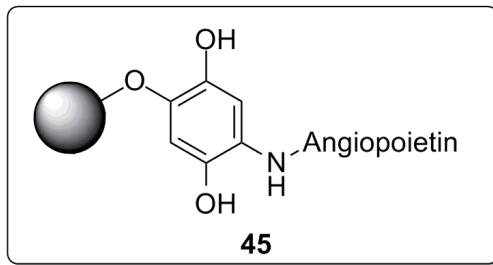
Oberflächenbelegung (TGA): 0.01 mmol g^{-1} .

(Δm (150 °C - 500 °C) = -20.80 %, Fragment: (14.3 kDa)).

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): 10 % $\leq 85 \text{ nm}$, 50 % $\leq 147 \text{ nm}$, 90 % $\leq 306 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: 9.4 mV (pH = 5.8).

6.6.3.2 Immobilisierung von Angiotensin auf Nanodiamant



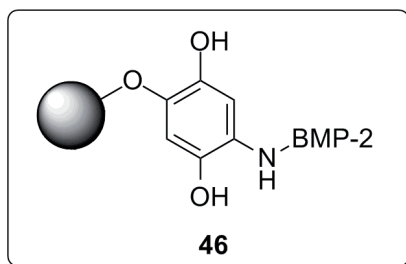
40.00 mg ND **43** wurden mittels Ultraschall in 20 ml PBS (pH=6) suspendiert, mit 25.00 µg Angiotensin versetzt und 72 h bei RT gerührt. Nach Zentrifugation wurde der Diamant sechsmal mit bidest. Wasser gewaschen.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3311 (s), 2938 (m), 1706 (m), 1627 (s), 1502 (m), 1454 (m), 1326 (s), 1211 (s), 1151 (s), 1079 (s), 817 (s) cm^{-1} .

Partikelgröße (RPMI-Medium, c = 0.25 mg/ml): 10 % ≤ 48 nm, 50 % ≤ 239 nm, 90 % ≤ 683 nm.

Zeta-Potential: 16.0 mV (pH = 4.16).

6.6.3.3 Immobilisierung von BMP-2 auf Nanodiamant



20.00 mg ND **43** wurden mittels Ultraschall in 15 ml PBS (pH=6) suspendiert, mit 10.00 µg BMP-2 versetzt und 24 h bei RT gerührt. Nach Zentrifugation wurde der Diamant dreimal mit halbgesättigter NaCl-Lösung, sechsmal mit bidest. Wasser gewaschen.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3311 (s), 2239 (m), 1718 (m), 1636 (s), 1504 (s), 1454 (s), 1200 (s), 1097 (s), 820 (s) cm^{-1} .

Partikelgröße (H_2O , $c = 0.2 \text{ mg/ml}$): 10 % $\leq 36 \text{ nm}$, 50 % $\leq 55 \text{ nm}$, 90 % $\leq 100 \text{ nm}$.

Zeta-Potential: -35.2 mV (pH = 6.3).

7 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolutiert
ATR	<i>attenuated total reflection</i> (abgeschwächte Totalreflektion)
a. u.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
BASD	<i>bead-assisted sonic disintegration</i> (Mahlkörper-unterstützte Deagglomeration durch Schallwellen)
ber.	berechnet
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein</i> (Knochenwachstumsfaktor)
DC	Dünnschichtchromatographie
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undecan-7
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DND	Detonations-Nanodiamant
EA	Elementaranalyse
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EEDQ	<i>N</i> -Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FT	Fourier-Transformation
gef.	gefunden

ges.	gesättigt
IR	Infrarot
i. Vak.	im Vakuum
konz.	konzentriert
MS	Massenspektrometrie
ND	Nanodiamant
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NV	<i>nitrogen-vacancy</i> (Stickstoff Fehlstelle)
quant.	quantitativ
org.	organisch
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
RPM	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
sog.	sogenannten
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TGA	Thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
UV	Ultraviolett

Abkürzungsverzeichnis

verd.

verdünnt

ZPL

zero phonon line (Null-Phononen-Linie)

8 Literaturverzeichnis

- [1] A. M. Schrand, *Safety of Nanoparticles. From Manufacturing to Medical Applications. Nanostructure Science and Technology*, Springer Verlag, **2009**, S. 159-187.
- [2] A. M. Schrand, S. A. C. Hens, O. A. Shenderova, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2009**, *34*, 18–74.
- [3] A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Osawa, S. M. Hussain, L. Dai, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2–7.
- [4] R. A. Shimkunas, E. Robinson, R. Lam, S. Lu, X. Xu, X. Zhang, H. Huang, E. Osawa, D. Ho, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5720–5728.
- [5] K. V. Purto, A. I. Petunin, A. E. Burov, A. P. Puzyr, V. S. Bondar, *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, *5*, 631–636.
- [6] A. Alhaddad, M. Adam, J. Botsoa, G. Dantelle, S. Perruchas, T. Gacoin, C. Mansuy, S. Lavielle, C. Malvy, F. Treussart, J. Bertrand, *Small* **2011**, *7*, 3087–3095.
- [7] Y. R. Chang, H. Y. Lee, K. Chen, C. C. Chang, D. S. Tsai, C. C. Fu, T. S. Lim, Y. K. Tzeng, C. Y. Fang, C. C. Han, H. C. Chang, W. Fann, *Nature Nanotech.* **2008**, *3*, 284–288.
- [8] V. N. Mochalin, Y. Gogotsi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4594–4595.
- [9] S. Osswald, G. Yushin, V. Mochalin, S. O. Kucheyev, Y. Gogotsi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11635–11642.
- [10] F. P. Bundy, *Physica A* **1989**, *156*, 169-178.
- [11] O. A. Shenderova, D. M. Gruen, *Ultrananocrystalline Diamond: Synthesis, Properties and Applications*, 1. Aufl., William Andrew Publishing, New York, **2006**, S. 9.
- [12] O. A. Shenderova, V. V. Zhirnov, D. W. Brenner, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2002**, *27*, 227-356.

- [13] V. M. Titov, V. F. Anisichkin, I. Y. Mal'kov, *Combust., Explos., Shock Waves* **1989**, 25, 372-379.
- [14] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., Teubner Verlag, Wiesbaden, **2007**, S. 344.
- [15] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., Teubner Verlag, Wiesbaden, **2007**, S. 343.
- [16] O. A. Shenderova, D. M. Gruen, *Ultrananocrystalline Diamond: Synthesis, Properties and Applications*, 1. Aufl., William Andrew Publishing, New York, **2006**, S. 368-371.
- [17] A. M. Schrand, S. A. C. Hens, O. A. Shenderova, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2009**, 34, 18-74.
- [18] A. S. Barnard, S. P. Russo, I. K. Snook, *J. Chem. Phys.* **2003**, 118, 5094-5097.
- [19] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., Teubner Verlag, Wiesbaden, **2007**, S. 334.
- [20] O. A. Shenderova, V. V. Zhirnov, D. W. Brenner, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2002**, 27, 227-356.
- [21] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., Teubner Verlag, Wiesbaden, **2007**, S. 384.
- [22] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., Teubner Verlag, Wiesbaden, **2007**, S. 366.
- [23] H. Hirai, M. Terauchi, M. Tanaka, K. Kondo, *Diamond Relat. Mater.* **1999**, 8, 1703-1706.
- [24] A. V. Okotrub, L. G. Bulusheva, V. L. Kuznetsov, D. V. Vyalikh, M. V. Poyguin, *Eur. Phys. J. D* **2005**, 34, 157-160.
- [25] A. Gruber, A. Dräbenstedt, C. Tietz, L. Fleury, J. Wrachtrup, C. von Borczyskowski, *Science* **1997**, 276, 2012-2014.
- [26] A. A. Kaplyanskii, *Optica Spectrosk.* **1964**, 16, 602.
- [27] M. Barth, S. Schietinger, T. Schröder, T. Aichele, O. Benson, *J. Lumin.* **2010**, 130, 1628-1634.

- [28] J. Tisler, G. Balasubramanian, B. Naydenov, R. Kolesov, B. Grotz, R. Reuter, J.-P. Boudou, P. A. Cumi, M. Sennour, A. Thorel, M. Börsch, K. Aulenbacher, R. Erdmann, P. R. Hemmer, F. Jelezko, J. Wrachtrup, *ACS Nano* **2009**, *3*, 1959-1965.
- [29] Y.-R. Chang, H.-Y. Lee, K. Chen, C.-C. Chang, D.-S. Tsai, C.-C. Fu, T.-S. Lim, Y.-K. Tzeng, C.-Y. Fang, C.-C. Han, H.-C. Chang, W. Fann, *Nature Nanotech.* **2008**, *3*, 284-288.
- [30] A. Krüger, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1382-1390.
- [31] A. Krüger, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1485-1492.
- [32] A. Krüger, F. Kataoka, M. Ozawa, T. Fujino, Y. Suzuki, A. E. Aleksenskii, A. Y. Vul, E. Ōsawa, *Carbon* **2005**, *43*, 1722-1730.
- [33] M. Ozawa, M. Inaguma, M. Takahashi, F. Kataoka, A. Krüger, E. Ōsawa, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1201-1206.
- [34] Y. Liang, T. Meinhardt, G. Jarre, M. Ozawa, P. Vrdoljak, A. Schöll, F. Reinert, A. Krüger, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *354*, 23-30.
- [35] Y. V. Butenko, V. L. Kuznetsov, E. A. Paukshtis, A. I. Stadnichenko, I. N. Mazov, S. I. Moseenkov, A. I. Boronin, S. V. Kosheev, *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostruct.* **2006**, *14*, 557-564.
- [36] Z. Qiao, J. Li, N. Zhao, C. Shi, P. Nash, *Scripta Materialia* **2006**, *54*, 225-229.
- [37] V. F. Loktev, V. I. Makal'skii, I. V. Stoyanova, A. V. Kalinkin, V. A. Likholobov, *Carbon* **1991**, *29*, 817-819.
- [38] P. Zhang, J. Yang, W. Li, W. Wang, C. Liu, M. Griffith, W. Liu, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 7755-7764.
- [39] A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Osawa, S. M. Hussain, L. Dai, *J. Phys. Chem. Lett.* **2007**, *111*, 2-7.
- [40] X. Zhang, W. Hu, J. Li, L. Taob, Y. Weib, *Toxicol. Res.* **2012**, *1*, 62-68.
- [41] A. P. Puzyr, V. S. Bondar, Z. Y. Selimkhanova, A. G. Tyan, E. V. Bortnikov, E. V. Inzhevatkin, *Siberian Med. Rev.* **2004**, *33*, 19.

- [42] A. P. Puzyr, A. V. Baron, K. V. Purtov, E. V. Bortnikov, N. N. Skobelev, O. A. Mogilnaya, V. S. Bondar, *Diamond & Related Materials* **2007**, *16*, 2124–2128.
- [43] N. Kossovsky, A. Gelman, H. J. Hnatyszyn, S. Rajguru, R. L. Garrell, S. Torbati, S. S. F. Freitas, G.-M. Chows, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 507-511.
- [44] A. Thalhammer, R. J. Edgington, L. A. Cingolani, R. Schoepfer, R. B. Jackman, *Biomaterials* **2010**, *31*, 2097–2104.
- [45] Q. Zhang, V. N. Mochalin, I. Neitzel, K. Hazeli, J. Niu, A. Kontsos, J. G. Zhou a, P. I. Lelkes, Y. Gogotsi, *Biomaterials* **2012**, *33*, 5067-5075.
- [46] E. K. Chow, X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, D. Schaffer, E. Ōsawa, A. Goga, D. Ho, *Sci. Transl. Med.* **2011**, *73*, 1-10.
- [47] K.-K. Liu, W.-W. Zheng, C.-C. Wang, Y.-C. Chiu, C.-L. Cheng, Y.-S. Lo, C. Chen, J.-I. Chao, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 1-14.
- [48] O. Kayser, A. F. Kiderlen, *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *12*, 197-2007.
- [49] H. Meng, M. Liang, T. Xia, Z. Li, Z. Ji, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2010**, *4*, 4539–4550.
- [50] F. Wang, Y.-C. Wang, S. Dou, M.-H. Xiong, T.-M. Sun, J. Wang, *ACS Nano*, **2011**, *5*, 3679-3692.
- [51] M. Paul, R. Durand, Y. Boulard, T. Fusai, C. Fernandez, D. Rivollet, M. Deniau, A. Astier, *Journal of Drug Targeting*, **1998**, *5*, 481-490.
- [52] Bericht der WHO (World Health Organization) auf der internationalen Tuberkulose Tagung, Genf **1998**.
- [53] D. A. Rozwarski, G. A. Grant, D. H. R. Barton, W. R. Jacobs Jr., J. C. Sacchettini, *Science* **1998**, *279*, 98-102.
- [54] P. G. E. Kennedy, *J. Clin. Investig.* **2004**, *113*, 496–504.
- [55] J. C. P. Dias, A. C. Silveira, C. J. Schofield, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 603–612.

- [56] P. Desjeux, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *27*, 305–318.
- [57] D. Tasdemir, M. Kaiser, R. Brun, V. Yardley, T. J. Schmidt, F. Tosun, P. Rüedi, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2006**, *50*, 1352-1364.
- [58] G. Sen, S. Mukhopadhyay², M. Ray, T. Biswas, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2008**, *61*, 1066–1075.
- [59] J. Hübner, *Komplementäre Onkologie*, Schattauer, Augsburg **2007**, 80-83.
- [60] G. Allam, *Immunobiology* **2009**, *214*, 712–727.
- [61] J. Brajtburg, W. G. Powderly, G. S. Kobayashi, G. Medoff, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 183-188.
- [62] A. K. Saha, T. Mukherjee, A. Bhaduri, *Molecular and Biochemical Parasitology* **1986**, *19*, 195-200.
- [63] R. R. C. New, M. L. Chance, S. Heath, *J. Antimicrobial Chemother.* **1981**, *8*, 371-381.
- [64] C. Dash, A. Kulkarni, B. Dunn, M. Rao, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *38*, 89-119.
- [65] J. Hill, L. Phylip, *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 357-360.
- [66] T. Luksch, N.-S. Chan, S. Brass, C. A. Sotriffer, G. Klebe, W. E. Diederich, *Chem-MedChem* **2008**, *3*, 1323-1336.
- [67] F. Staib, *Sabouraudia* **1965**, *4*, 187-193.
- [68] J. R. Perfect, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1577-1583.
- [69] B. Degel, P. Staib, S. Rohrer, J. Scheiber, E. Martina, C. Büchold, K. Baumann, J. Morschhäuser, T. Schirmeister *ChemMedChem* **2008**, *3*, 302-315.
- [70] J. Glowacki, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1998**, *355*, 82-89.
- [71] S. Mitragotri, J. Lahann, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 15-23.

- [72] A. Thalhammer, R. J. Edgington, L. A. Cingolani, R. Schoepfer, R. B. Jackman, *Biomaterials* **2010**, *31*, 2097–2104.
- [73] G. Birrenbach, P. P. Speiser, *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 1763–1766.
- [74] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 206212.
- [75] R. Singh, J.W. Lillard Jr., *Experimental and Molecular Pathology* **2009**, *86*, 215–223.
- [76] P. Rejmanova, J. Kopecek, J. Pohl, M. Baudys, V. Kostka, *Makromol. Chem.* **1983**, *184*, 2009–2020.
- [77] A. Malugin, P. Kopečková, J. Kopeček, *Journal of Controlled Release* **2007**, *124*, 6–10.
- [78] R. S. Greenfield, T. Kaneko, A. Daves, M. A. Edson, K. A. Fitzgerald, L. J. Olech, J. A. Grattan, G. L. Spitalny, G. R. Braslawsky, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6600–6607.
- [79] E. Ōsawa, *Diamond Relat. Mater.* **2007**, *16*, 2018–2022.
- [80] G. Jarre, Y. Liang, P. Betz, D. Lang, A. Krüger, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 544–546.
- [81] D. Rehorek, E. Janzen, *J. prakt. Chem.* **1984**, *326*, 935–940.
- [82] C. A. Dyke, M. P. Stewart, F. Maya, J. M. Tour, *Synlett* **2004**, *1*, 155–160.
- [83] P. Hanson, J. R. Jones, A. B. Taylor, P. H. Walton, A. W. Timms, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2002**, *2*, 1135–1150.
- [84] C. Bingel, *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 1957–1959.
- [85] K. S. Coleman, S. R. Bailey, S. Fogden, M. L. H. Green, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8722–8723.
- [86] P. Betz, A. Krueger, *Chem. Phys. Chem.* **2012**, *13*, 2578–2584.
- [87] X. Camps, A. Hirsch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1995–1996.

- [88] E. Enders, *Methoden der Organischen Chemie* Stroh, Thieme: Stuttgart, **1967**, 10, 410-497.
- [89] L. B. Colvin, *Journal of Pharmaceutical Science* **1996**, 58, 1433-1443.
- [90] D. Sehgal, I. K. Vijay, *Analytical Biochemistry* **1994**, 218, 87-91.
- [91] A. Michael, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, 3640-3666.
- [92] P. Davoli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, G. Torre *Tetrahedron* **2001**, 57, 1801-1812.
- [93] K. V. Purtov, A. I. Petunin, A. E. Burov, A. P. Puzyr, V. S. Bondar, *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, 5, 631-636.
- [94] J. Brandt, L. O. Andersson, J. Porath, *Biochim Biophys Acta* **1975**, 386, 196-202.
- [95] C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, *Nature* **1965**, 206, 757-761.
- [96] S. Loughna, T. N. Sato, *Matrix Biol* **2001**, 20, 319-325.
- [97] B. L. Hogan, *Genes Dev.* **1996**, 10, 1580-1594.
- [98] T. Meinhardt, D. Lang, H. Dill, A. Krueger, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, 21, 494-500.
- [99] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1, 51-68.
- [100] J. Han, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2709-2728.
- [101] A. A. Waheed, K. Sridhar Rao, P. T. Gupta, *Analytical Biochemistry* **2000**, 287, 73-79.
- [102] A. Y. Vul, E. D. Eydelman, L. V. Sharonova, A. E. Aleksenskiy, S. V. Konyakhin, *Diamond Relat. Mater.* **2011**, 20, 279-284.
- [103] A. Krüger, Y. Liang, G. Jarre, J. Stegk, *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 2322-2328.
- [104] V. N. Khabashesku, Y. Liu, Z. Gu, J. L. Margrave, *Chem. Mater.* **2004**, 16, 3924-3930.

- [105] H. Becker, W. Becker, G. Domschke, *Organikum*, 21. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **2001**, 215-217.
- [106] A. Krueger, T. Boedeker, *Diamond Relat. Mater.* **2008**, *17*, 1367-1370.
- [107] D. R. Askeland, P. P. Phule, *The science and engineering of materials*, 5. Aufl., Nelson Publishing, Toronto, **2006**, S. 198.
- [108] O. Shenderova, I. Petrov, J. Walsh, V. Grichko, V. Grishko, T. Tyler, G. Cunningham, *Diamond & Related Materials* **2006**, *15*, 1799-1803.
- [109] E. K. Chow, X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, D. Schaffer, E. Osawa, A. Goga, D. Ho, *Science Translational Medicine* **2011**, *73*, 1-11.
- [110] B. Romeis, *Mikroskopische Technik* (16. Aufl.), R. Oldenbourg Verlag, München **1968**.
- [111] H. McNab, L. C. Monahan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, *3*, 419-424.
- [112] M. Kizil, E. I. Yilmaz, N. Pirinccioglu, C. Aytakin, *Turk. J. Chem.* **2003**, *27*, 539-544.
- [113] J. Hwa, Y. Do, Y. Lee, T. Shimizu *Chem. Eur.* **2005**, *11*, 5538-5544.

