

Moderne Analysemethoden zur Charakterisierung funktioneller Nanomaterialien

Dissertation

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

dem
Fachbereich Chemie
der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

M. Sc. René Riedel
geboren in Köln

Marburg an der Lahn 2020

Die vorliegende Dissertation wurde vom 26. November 2015 bis 25. Januar 2020 an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. N. Hampp angefertigt.

Hochschulkennziffer:	1180
Eingereicht am:	30. Januar 2020
Eröffnung des Prüfungsverfahrens am:	7. Februar 2020
Vom Fachbereich Chemie der Philipps- Universität als Dissertation angenommen am:	17. April 2020
Tag der mündlichen Prüfung:	15. Mai 2020
Erstgutachter:	Prof. Dr. N. Hampp
Zweitgutachter:	Prof. Dr. L.-O. Essen

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Marburg, den _____

(René Riedel)

Meiner Mutter

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Norbert Hampp für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation in seinem Arbeitskreis durchzuführen. Seinetwegen konnte ich sehr viel wertvolle Erfahrung im selbstständigen, wissenschaftlichen Arbeiten sowie im Umgang mit moderner Rasterkraftmikroskopie in interessanten, anwendungsgerichteten Projekten gewinnen. Obwohl er besonders in seiner Zeit als Dekan des Fachbereichs Chemie sehr beschäftigt war, nahm er sich stets Zeit für die Betreuung der wissenschaftlichen Arbeiten seiner Doktoranden und die Veröffentlichung wissenschaftlicher Ergebnisse.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. F. Yang bedanken, der mich sowohl in die Methodik der Rasterkraftmikroskopie als auch in die Thematik der Krebsbehandlung über Nanopartikel eingeführt und dafür begeistert hat. Darüber hinaus stand er mir immer mit gutem Rat zur Seite und war ein innovativer, zuverlässiger Kooperationspartner.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Prof. Dr. A. Götzhäuser und seiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung im Purpurmembran -Projekt sowie die Bereitstellung von Substraten. Ebenso danke ich Prof. Dr. D. Rhinow für seine Ratschläge im Purpurmembran -Projekt sowie seine Beratung und elektronenmikroskopischen Aufnahmen der synthetisierten Nanopartikel.

Zudem danke ich Prof. Dr. L. Essen und Prof. Dr. U. Tallarek für die Bereitschaft, Teil der Prüfungskommission zu sein.

Anschließend möchte ich mich bei den Personen bedanken, mit denen ich gemeinsam geforscht habe und die mich mit wertvollen Ergebnissen unterstützt und inspiriert haben. Besonderem Dank gilt dabei Yiyi Xu, Lukas Hellweg und Nora Mahr; letzterer vor allem für ihren wertvollen, arbeitsintensiven Beitrag in der Messung der mechanischen Eigenschaften der synthetisierten Nanopartikel, aber auch für ihre psychische Unterstützung, Inspiration und wertvolle Freundschaft.

Spezieller Dank gilt ferner der Elektronik- sowie der Feinmechanik-Werkstatt des Fachbereichs Chemie für den wertvollen Beitrag zum Versuchsaufbau im Nanopartikel-Projekt. Außerdem danke ich Herrn Hellwig für seine Unterstützung im Umgang mit den Elektronenmikroskopen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Menschen des Fachbereichs Chemie bedanken, die die Zeit der Promotion zu einer sehr angenehmen gemacht haben.

Zum Schluss bedanke ich mich herzlichst bei meiner Mutter Gabriele Helene Schneider, die mich auf meinem Lebensweg trotz einiger Rückschläge stets unterstützt und gefördert hat, obwohl sie oft genug selbst dafür zurückstecken musste.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	I
Zusammenfassung.....	II
Abstract.....	IV
Einheiten- und Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Rasterkraftmikroskopie.....	1
1.1. Einleitung.....	1
1.2. Messprinzip	2
1.3. Wechselwirkungen	6
1.4. Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe.....	11
1.5. Messmethoden	12
1.5.1. Kalibrierung des Cantilevers	12
1.5.2. Aufnahme einer Topografie	15
1.5.3. Untersuchung der Probeneigenschaften	18
1.6. Auswahl des Cantilevers	23
1.7. Artefakte	25
1.8. Auswertung von Kraft-Abstands-Kurven	27
1.8.1. Adhäsionskraft	28
1.8.2. Dissipation.....	28
1.8.3. Deformation	29
1.8.4. Elastizitätsmodul	29
2. Elektronenmikroskopie.....	37
2.1. Einleitung.....	37
2.2. Aufbau eines Elektronenmikroskops.....	38
2.3. Wechselwirkung der Elektronen mit der Probe	40
2.4. Betriebsmodi.....	42
2.4.1. Rasterelektronenmikroskopie.....	42
2.4.2. Transmissionselektronenmikroskopie.....	43
2.5. Linsenfehler	44
2.6. Elektronenmikroskopie vs. Rasterkraftmikroskopie	44

3. Weitere Messmethoden	46
3.1. Zeta-Potenzial	46
3.2. UV-VIS Messungen	48
3.3. Zellviabilitätstests	51
3.3.1. Einleitung	51
3.3.2. Resazurin-Test.....	51
3.3.3. Echt-Zeit Viabilitäts-Test.....	52
4. Nanopartikel-Synthese per Laserablation	55
4.1. Einleitung.....	55
4.2. Theoretischer Hintergrund.....	57
4.2.1. Eigenschaften von Nanomaterialien.....	57
4.2.2. Herstellung von Nanopartikeln	58
4.2.3. Pulsed Laser Ablation in Liquids	62
4.2.4. Anforderungen an Nanopartikel im nanomedizinischen Bereich	66
4.2.5. Photothermale Therapie	68
4.2.6. Bioverfügbarkeit, Biologische Abbaubarkeit und Toxizität	72
4.3. Motivation	74
4.4. Experimenteller Aufbau, Methoden und Materialien	75
4.4.1. Allgemeine Herangehensweise	75
4.4.2. Verwendete Materialien	76
4.4.3. Synthese der Nanopartikel	77
4.4.4. UV/VIS und ζ -Potenzial-Messungen.....	78
4.4.5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen	79
4.4.6. Messung der mechanischen Eigenschaften	79
4.4.7. Praktische Berechnung	80
4.4.8. Verschiebung der Oberflächenplasmonenresonanz-Frequenz	84
4.4.9. Reinigung der Targets	84
4.4.10. Berechnung der Nanopartikel-Konzentration	85
4.4.11. Albumin-Ummantelung	85
4.4.12. <i>In vitro</i> -Messungen	85
4.4.13. Realzeitbestimmung der Nanopartikeltoxizität	86
4.4.14. Resazurin-Tests an HeLa -Zellen	86
4.4.15. MTT-Tests an MCF-7 -Zellen.....	87
4.4.16. Echt-Zeit-Beobachtung der Zellviabilität.....	87
4.4.17. <i>In vitro</i> Photothermale Therapie -Tests.....	87
4.4.18. <i>in vivo</i> -Studien.....	88
4.5. Ergebnisse und Diskussion.....	89
4.5.1. Charakterisierung der Gold-Nanopartikel	89
4.5.2. Optimierung der Systemparameter.....	95
4.5.3. Nanomechanische Eigenschaften – Auswahl der Verfahrensmethode	101
4.5.4. BSA Coating	109

4.5.5.	Photothermische Energie-Konvertierung.....	111
4.5.6.	SPR-Verschiebung durch Einbau einer TiO ₂ -Schicht.....	114
4.5.7.	<i>In vitro</i> Zellviabilitätstests.....	117
4.5.8.	<i>In vitro</i> photothermische Konvertierung.....	118
4.5.9.	<i>In vivo</i> Zelldistribution.....	120
4.6.	Fazit.....	123
4.6.1.	Interpretation der mechanischen Eigenschaften.....	123
4.6.2.	Interpretation der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> -Messungen.....	124
4.7.	Ausblick.....	128
5.	Konstruktion einer PM-Monoschicht.....	130
5.1.	Einleitung.....	130
5.2.	Theoretischer Hintergrund.....	131
5.2.1.	Purpurmembran.....	131
5.2.2.	Selbstorganisierende Monoschichten.....	135
5.2.3.	Selbstassemblierte Monolagen als Substrate.....	137
5.3.	Motivation.....	139
5.4.	Experimenteller Aufbau, Methoden und Materialien.....	139
5.4.1.	Allgemeine Herangehensweise.....	139
5.4.2.	Verwendete Materialien.....	142
5.4.3.	Ansetzen der Puffer.....	143
5.4.4.	Rasterkraftmikroskopische Messungen.....	143
5.4.5.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	144
5.4.6.	Bestimmung der Konzentration der Purpurmembran.....	144
5.4.7.	Feldloses Abscheiden der WT PM auf verschiedenen Substraten.....	144
5.4.8.	Elektrosedimentation der WT PM.....	146
5.4.9.	Elektrophoretische Sedimentation der WT PM.....	146
5.4.10.	Elektrophoretische Sedimentation der c-His PM.....	147
5.4.11.	Mechanismus der elektrophoretischen Sedimentation der c-His PM.....	147
5.4.12.	Verwendete Geräte und Chemikalien.....	148
5.4.13.	Berechnung der Belegungsdichte.....	148
5.5.	Ergebnisse und Diskussion.....	149
5.5.1.	Feldloses Abscheiden der WT PM auf verschiedenen Substraten.....	149
5.5.2.	Elektrosedimentation.....	154
5.5.3.	Elektrophoretische Sedimentation.....	159
5.5.4.	Elektrophoretische Sedimentation mit c-His PM.....	161
5.5.5.	Mechanismus der elektrophoretischen Sedimentation der c-His PM.....	163
5.6.	Fazit.....	170
5.7.	Ausblick.....	170
6.	Referenzen.....	171

Vorwort

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von November 2015 bis Februar 2019 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Norbert Hampp angefertigt. Eine Liste an Fachartikeln, die im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation veröffentlicht wurden, sind im Folgenden aufgelistet. Es wurde außerdem ein Bericht für die Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V. bezüglich des auf Seite 135 beschriebenen Themas verfasst. Die vorliegende Arbeit behandelt außerdem die folgend unter [1] aufgeführte Forschung genauer.

Im Rahmen dieser Dissertation veröffentlichte Fachartikel:

- [1] R. Riedel, N. Mahr, C. Yao, A. Wu, F. Yang, N. Hampp, *Nanoscale* **2020**, DOI 10.1039/C9NR07129F.
- [2] L. Sun, R. Riedel, S. G. Stanciu, F. Yang, N. Hampp, L. Xu, A. Wu, *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 2960–2971.
- [3] H. Reinhardt, P. Peschke, R. Riedel, N. Hampp, *Nanotechnology* **2018**, *29*, 305303.
- [4] P. Nürnberger, H. M. Reinhardt, D. Rhinow, R. Riedel, S. Werner, N. A. Hampp, *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *420*, 70–76.
- [5] M. Schmid, S. R. Kachel, B. P. Klein, N. Bock, P. Müller, R. Riedel, N. Hampp, J. M. Gottfried, *J. Phys. Condens. Matter* **2019**, *31*, 94002.

Zusammenfassung

Diese Dissertation befasst sich im Kern mit den verschiedenen Messmethoden zur Charakterisierung synthetisierter Nanopartikel und -filme, allem voran mit dem Rasterkraftmikroskop. Bei letzterem handelt es sich um ein beliebtes und nützliches Werkzeug zur Bestimmung der elektrischen, elektrostatischen, magnetischen, mechanischen und topographischen Eigenschaften einer Probe oder eines gewählten Probenbereichs mit bis zu 150 μm Kantenlänge. Mit dem Rasterkraftmikroskop ist es zudem möglich, Auflösungen im Sub-Nanometerbereich zu erreichen und somit einzelne Atome abbilden zu können. Das Messprinzip dieses Mikroskops bildet eine spitze Nadel, die in geringem Abstand über die Probenoberfläche gefahren und aufgrund von Wechselwirkungen mit dieser Oberfläche aus ihrer vertikalen Ruheposition ausgelenkt wird. Diese Auslenkung wird beispielsweise über einen auf der Rückseite des Cantilevers reflektierten Laser detektiert. Aus dem Messsignal kann auf die wirkenden Kräfte zwischen Probe und Spitze geschlossen werden. Die einfache Probenvorbereitung sowie die Möglichkeit, in Vakuum, an Luft und in Flüssigkeit messen zu können, machen die Rasterkraftmikroskopie zu einem vielfältigen Werkzeug in der Nanotechnologie und der Bionanotechnologie.

Daneben werden weitere Messverfahren vorgestellt, darunter das Elektronenmikroskop, das komplementär zur Rasterkraftmikroskopie Informationen über das Aussehen und die Zusammensetzung einer Probe liefert.

Aus mehreren wissenschaftlichen Arbeiten, die im Laufe der Promotionszeit entstanden sind, wird hier auf zwei Projekte näher eingegangen. In einem ersten Projekt wurden Nanopartikel synthetisiert, indem ein gepulster Laserstrahl auf ein Metallstück (*Target*) geschossen wurde, das sich in einer Flüssigkeit befand. In der Folge entstanden Nanopartikel, die sich in der Flüssigkeit lösten. Diese Methode zur Synthese von löslichen Nanopartikeln ist als *Pulsed Laser Ablation in Liquids (PLAL)* bekannt. Die Nanopartikel bestehen letztendlich aus Bestandteilen des Targets und der Lösungsmittelmatrix. Konkret wurde als Target Gold verwendet, während die Flüssigkeit aus destilliertem Wasser, geringen Mengen an Natriumchlorid und geringen Mengen an Natronwasserglas bestand. Die Nanopartikel konnten als Kern-Schale-Partikel (*Core-Shell-Partikel*) charakterisiert werden, wobei der Goldkern mit einer dünnen Silikatschale überzogen war. Die Synthese der Nanopartikel wurde mittels Screening-Verfahrens über Laserpuls-Eigenschaften und Zusammensetzung der Lösung optimiert. Anschließend wurden die Nanopartikel auf ihre elektrostatischen, topographischen

und mechanischen Eigenschaften sowie ihre Zusammensetzung untersucht. Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften wurde im Rahmen dieser Dissertation eine Software entwickelt, die aufgenommene Kraft-Abstands-Kurven unter Einbeziehung aktueller Kontaktmechanik-Modelle auswertet. Anschließend wurde die Toxizität der Partikel auf verschiedene Zellarten *in vitro* untersucht. An der Chinese Academy of Sciences, Ningbo, Volksrepublik China, wurden mit diesen Partikeln außerdem sowohl die Zelltoxizität *in vitro* an weiteren Zellen untersucht als auch eine Histologie und eine Bestimmung der Biodistribution der Nanopartikel *in vivo* an einer Maus durchgeführt. Außerdem wurde die Effektivität der Umwandlung der Laserstrahlung in Wärme bestimmt.

Aus den Ergebnissen ließen sich wertvolle Informationen bezüglich der Anwendung der Nanopartikel in der photothermalen Krebstherapie gewinnen. Sie können zukünftig als Ausgangspunkt für weitere Arbeiten dienen. Außerdem konnte das Potenzial dieser Synthesemethode für medizinische Anwendungen bestätigt werden.

Im zweiten Projekt, das hier näher beschrieben wird, wurde versucht, eine Monoschicht an Purpurmembran (*PM*) auf einem dünnen Substrat zu erzeugen. Dabei handelt es sich um eine Membran, die lichtgetrieben Protonen von einer Seite auf die andere Seite pumpen kann. Eine einheitlich orientierte Monoschicht könnte als große, dünne Protonenpumpe dienen. Die Proben wurden mittels Rasterkraftmikroskopie und Elektronenmikroskopie charakterisiert. Dabei wurde die Purpurmembran zuerst in Puffer bzw. in destilliertem Wasser verdünnt und auf verschiedenen Substraten trocknen gelassen. Es wurden sowohl Topografie als auch elektrostatische Eigenschaften zur Bestimmung der Orientierung der Membran bestimmt. Zur Verbesserung des Ergebnisses wurde ein elektrisches Feld angelegt, um die *PM* über Elektrosedimentation und elektrophoretische Sedimentation auf dem Substrat abzuscheiden. Nach Wechseln vom Wildtyp der *PM* zu einer *his*-getaggten Variante entstanden durch die elektrophoretische Sedimentation große Felder, in denen die *PM* fusioniert ist. Die Bildung dieser Felder wurde unter Variation der experimentellen Bedingungen untersucht. Aus diesen Messungen wurde ein möglicher Mechanismus abgeleitet.

Abstract

The core of this dissertation is concerned with the various measurement methods for the characterization of synthesized nanoparticles and nanofilms, above all with the atomic force microscope. The latter is a popular and useful tool for determining the electrical, electrostatic, magnetic, mechanical and topographic properties of a sample or a selected sample range with an edge length of up to 150 μm . Using the atomic force microscope, it is furthermore possible to achieve resolutions in the sub-nanometer range and thus to visualize individual atoms. The measuring principle of this microscope consists of a sharp tip which is moved over the sample surface at a small distance and deflected from its vertical rest position due to interactions with this surface. This deflection is detected, for example, by a laser reflected on the back of the cantilever. The measurement signal can be used to determine the forces acting between the sample and the tip. Simple sample preparation and the possibility of measuring in vacuum, air and liquid make atomic force microscopy a versatile tool in nanotechnology and bionanotechnology.

In addition, other measuring methods will be presented, including the electron microscopy, which provides information on the shape and composition of a sample complementary to that obtained by atomic force microscopy.

Two projects from several scientific papers that were developed in the course of the doctoral period are described in more detail here. In a first project, nanoparticles were synthesized by directing a pulsed laser beam at a piece of metal (*target*) located in a liquid. As a result, nanoparticles were formed which dissolved in the liquid. This method for the synthesis of soluble nanoparticles is known as *Pulsed Laser Ablation in Liquids (PLAL)*. The nanoparticles are composed of components of the target and the solvent matrix. Concretely, gold was used as target, while the liquid consisted of distilled water, small amounts of sodium chloride and small amounts of sodium water glass. The nanoparticles could be characterized as core-shell nanoparticles, whereby the gold core was coated with a thin silicate shell. The synthesis of the nanoparticles was optimized by screening the laser pulse properties and composition of the solution. Subsequently, the electrostatic, topographic and mechanical properties and composition of the nanoparticles were investigated. In order to determine the mechanical properties, a software was developed within the scope of this dissertation which evaluates the recorded force-distance curves using current contact mechanics models. Afterwards, the toxicity of the particles to different cell types was investigated *in vitro*. At the Chinese Academy

of Sciences, Ningbo, People's Republic of China, these particles were furthermore used to investigate cell toxicity *in vitro* on other types of cells as well as histology and determination of the biodistribution of nanoparticles *in vivo* on a mouse. In addition, the effectiveness of the conversion of laser radiation into heat was determined.

The results provided valuable information on the application of nanoparticles in photothermal cancer therapy. They could serve as a starting point for further work in the future. In addition, the potential of this synthesis method for medical applications has been confirmed.

In the second project, described in more detail here, an attempt was made to produce a monolayer of purple membrane (*PM*) on a thin substrate. The membrane can pump protons light-driven from one side to the other. A uniformly oriented monolayer could serve as a large, thin proton pump. The samples were characterized by atomic force microscopy and electron microscopy. The purple membrane was first diluted in buffer or distilled water and allowed to dry on various substrates. Both topography and electrostatic properties were analysed to determine the orientation of the membrane. To improve the result, an electric field was applied to deposit the PM on the substrate via electrosedimentation and electrophoretic sedimentation. After changing from the wild type of PM to a *his*-tagged variant, the electrophoretic sedimentation produced large fields in which the PM merged. The formation of these fields was investigated under variation of the experimental conditions. A possible mechanism was derived from these measurements.

Einheiten- und Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μA	Mikroamper
μm	Mikrometer
A	Amplitude einer Schwingung <i>oder</i> Absorption
A_0	Anfängliche Amplitude einer Schwingung
α	Polarisierbarkeit
α'	Polarisierbarkeitsvolumen
α_i	Vom Schwingungsmodus i abhängige Konstante nach Butt und Jaschke
α_K	Kontaktfläche zwischen zwei Körpern
\AA	Angström
AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>engl. Atomic Force Microscope</i>)
Au	Gold
Au@SiO₂	Nanopartikel mit Goldkern und Silikat-Beschichtung
B	Koeffizient im Mie-Potenzial zweier Teilchen <i>oder</i> B -Faktor
β	Konstante zur allgemeinen Beschreibung des Kontaktwinkel-Problems nach Hertz
BPT	1,1'-biphenyl-4-thiol
BR	Bacteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl. Bovine Serum Albumine</i>)
C	Dispersionskonstante der beteiligten Materialien <i>oder</i> Proportionalitätskonstante zwischen Potential und inversem Abstand zweier Teilchen
c	Lichtgeschwindigkeit <i>oder</i> Konzentration
CeB₆	Cerhexaborid
CL-BPT	Vernetztes 1,1'-biphenyl-4-thiol
CL-NBPT	Vernetztes 4'-nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol
cm	Zentimeter
CNM	Carbonanomembran
cos	Cosinus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Durchmesser einer harten Kugel <i>oder</i> Probendicke

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
δ	Eindringtiefe eines Körpers in einen anderen
DLS	Dynamische Lichtstreuung (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (<i>Zellmedium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Derjaguin, Muller und Toporov
DNS	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. DNA</i>)
e	Elektrische Elementarladung
E	Elastizitätsmodul <i>oder</i> Extinktion
E^*	Effektives Elastizitätsmodul
\vec{E}	Elektrisches Feld
E_{el}	Elektrische Energie, die einem Elektron während einer Beschleunigung zugeführt wird
E_{kin}	Kinetische Energie
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EPR	Erhöhte Permeabilität und Retention (<i>engl. Enhanced Permeability and Retention</i>)
ε	Minimale Energie zwischen zwei Teilchen im Lennard-Jones-Potenzial
ϵ	Permittivität eines Mediums
ϵ_0	Permittivität des Vakuums
η	Dynamische Viskosität eines Lösungsmittels <i>oder</i> Photothermale Konversionseffizienz
eV	Elektronenvolt
f	Frequenz eines Photons
F	Kraft <i>oder</i> Zielfläche einer Bestrahlung
F_{adh}	Adhäsionskraft
FBS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
γ	Grenzflächenenergie
GC	Gaschromatographie
GPa	Gigapascal
h	Planck'sches Wirkungsquantum
H_A	Hamaker-Konstante
H₂O	Wasser

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
HeLa	Henrietta Lacks (<i>Bez. für menschliche Zervixkarzinom-Zellen</i>)
HepG2	humane Leberkrebs-Zelllinie
his	Histidin
HOMO	Höchstes durch Elektronen besetztes Molekülorbital (<i>engl. Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl. High Performance Liquid Chromatography</i>)
Hz	Hertz
<i>I</i>	Intensität einer Strahlung <i>oder</i> Ionisierungsenergie
<i>I</i>₀	Anfängliche Intensität einer Strahlung vor Extinktion
ICP-OES	Induktiv gekoppeltes Plasma – Optische Emissions-Spektroskopie (<i>Analysemethode</i>)
Im()	Imaginärteil einer komplexen Zahl
IR	Infrarot
ITO	Indiumzinnoxid (<i>engl. Indium Tin Oxide</i>)
J	Joule
JKR	Johnson, Kendall und Roberts
K	Kelvin
<i>k</i>	Federkonstante
<i>k_B</i>	Boltzmann-Konstante
K562	Leukämie-Zelllinie
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
kJ	Kilojoule
KPFM	Kelvin Probe Force Microscopy
<i>l</i>	Koeffizient im Mie-Potenzial zweier Teilchen
<i>L</i>	Länge
<i>L</i>₀	Länge zum Startpunkt der Beobachtung
LaB₆	Lanthanhexaborid
λ	Wellenlänge
λ_e	Wellenlänge eines Elektrons

Abkürzung	Bedeutung
λ_K	Konstante zur allgemeinen Beschreibung des Kontaktwinkel-Problems nach Hertz
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>engl. Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
m	Masse <i>oder</i> Koeffizient im Mie-Potenzial zweier Teilchen
m	Meter
M	Lokale Kapazität in einem parallelen Plattenkondensator
m_e	Masse eines Elektrons
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7 (<i>Bez. für menschliche Brustkrebs-Linie</i>)
ml	Milliliter
mol	Molar
MPa	Megapascal
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
$\vec{\mu}$	Elektrisches Dipolmoment
$\vec{\mu}^*$	Induziertes Dipolmoment
μ_T	Tabor-Parameter
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
n	Hauptquantenzahl
N	Newton
n_B	Brechungsindex eines Mediums
N_T	Anzahl der in einer bestrahlten Fläche enthaltenen Teilchen
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NBPT	4'-nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP	Nanopartikel
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
ω	Schwingungsfrequenz

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
ω_0	Resonanzfrequenz eines schwingenden Systems/Körpers
Pa	Pascal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl. Phosphate-Buffered Saline</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PEG-SH	Polyethylenglykol mit endständiger Thiol-Gruppe
PF	PeakForce™
φ	Phasenverschiebung einer Schwingung
ϕ	Spitzenhalbwinkel der Spitze
ϕ_P	Austrittsarbeit der Probe
ϕ_S	Austrittsarbeit der Spitze
π	Kreiszahl Pi
PLAL	Pulsed Laser Ablation in Liquids
PM	Purpurmembran
pN	Pikonewton
ps	Picosekunden
PTT	Photothermale Therapie
q	Punktladung
QNM	Quantitatives Nanomechanisches Mapping (<i>engl. Quantitative Nanomechanical Mapping</i>)
r	Abstand
r_0	Teilchenabstand, bei dem das Lennard-Jones-Potenzial eine Nullstelle besitzt
R	Kugelradius einer Halbkugel, die mit einer Probe wechselwirkt
R_{eff}	Effektiver Kugelradius
REM	Rasterelektronenmikroskop
q	Dämpfungskonstante
ρ_P	Teilchendichte der Probe
ρ_S	Teilchendichte der Spitze
s	Sekunde
S_0	Querdurchschnittsmesser eines unbelasteten Stabs
SAM	Selbstorganisierende Monoschicht (<i>engl. Self-Assembled Monolayer</i>)
SCM-PIT	Bezeichnung für bestimmten Cantilever von Bruker®

Abkürzung	Bedeutung
ζ	Durchbiegungsempfindlichkeit eines Cantilevers
σ	Spannung <i>oder</i> Wirkungsquerschnitt
σ_{abs}	Absorptionsquerschnitt
σ_{ext}	Extinktionsquerschnitt
σ_{str}	Streuungsquerschnitt
SK-BR-3	humane Brustkrebs-Zelllinie
SNL-10	Bezeichnung für bestimmten Cantilever von Bruker®
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>engl. Surface Plasmon Resonance</i>)
SEM	Rasterelektronenmikroskopie (<i>engl. Scanning Electron Microscopy</i>)
sin	Sinus
STEM	Raster-Transmissionselektronen-Mikroskopie
t	Zeitpunkt in Sekunden
t_{puls}	Dauer eines Laserpulses
T	Temperatur <i>oder</i> Transmission, je nach Kontext
tan	Tangens
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie (<i>engl. Transmission Electron Microscopy</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Potenzielle Energie in einem parallelen Plattenkondensator
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>engl. United States of America</i>)
UV	Ultraviolett
ν	Poissonzahl eines Materials
V	Volt
v_e	Geschwindigkeit eines Elektrons
V_{AC}	Wechselspannung
V_{DC}	Gleichspannung
V_{KP}	Kontaktpotenzial
V_{RP}	Extern angelegtes Potenzial an System Probe – Spitze
ΔV_{Vert}	Spannungsänderung des vertikalen Messsignals auf der Photodiode
VIS	Sichtbares Licht (<i>engl. Visible Light</i>)
w	Wahrscheinlichkeit, mit der ein einfallendes Teilchen mit einer Zielfläche in Wechselwirkung tritt

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
W	Koeffizient im Mie-Potenzial zweier Teilchen
WT PM	Wildtyp der Purpurmembran
Δx	Auslenkung aus der aktuellen Position/aus der Ruheposition
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat
z_0	Startpunkt der Spitze bei Aufnahme einer Kraft-Abstands-Kurve
$\langle z_c^2 \rangle$	Mittlere, quadratische Auslenkung des Cantilevers
z_{KP}	Kontaktpunkt zwischen Spitze und Probe
ζ	Zeta

Physikalische Konstanten

Konstante	Symbol	Wert
Boltzmann-Konstante	k_B	$1,380649 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$
Permittivität des Vakuums	ϵ_0	$8,854188 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$
Planck'sches Wirkungsquantum	h	$6,626070 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$
Elektrische Elementarladung	e	$1,602176 \cdot 10^{-19} \text{ C}$
Elektronenmasse	m_e	$9,109384 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$
Lichtgeschwindigkeit (Vakuum)	c	$2,997925 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$

1. Rasterkraftmikroskopie

1.1. Einleitung

Im Jahre 1982 gelangen G. Binning und H. Rohrer mit der Erfindung des Rastertunnelmikroskops^[1] ein Meilenstein in der Oberflächenanalytik. Bei dieser Messmethode wird eine atomar endende, elektrisch leitende Spitze nahe an eine elektrisch leitende Oberfläche bewegt. Über Piezosteuererelemente lässt sich der Abstand zwischen Spitze und Probe im Å-Bereich variieren. Wird nun eine Spannung zwischen Spitze und Oberfläche angelegt, so fließt ein Tunnelstrom, der stark vom Abstand zwischen Probe und Spitze abhängt. Auf diese Art und Weise lässt sich eine Probenoberfläche abscannen und aus den erhaltenen Daten eine Topografie mit atomarer Auflösung darstellen. Des Weiteren ist es möglich, einzelne Atome auf der Probe zu verschieben. So gelang der International Business Machines Corporation (IBM) die Aufnahme des kleinsten Videos der Welt.^[2] Eine weitere Anwendung der Rastertunnelmikroskopie ist die Untersuchung von Orbitalenergien einzelner Atome und Moleküle.^[3-7]

Ein großer Nachteil dieser Messmethode ist die Beschränkung auf elektrisch leitende Proben. Da viele Metalle außerdem dazu neigen, an Luft eine Oxidschicht zu bilden, ist häufig das Messen in Ultrahochvakuum nötig, was einen erhöhten apparativen Aufbau bedeutet. Mit der Entwicklung des Rasterkraftmikroskops (engl. *AFM* von *Atomic Force Microscope*) gelangen Binning und Rohrer 1986 der nächste große Fortschritt in der Oberflächenanalytik.^[8] Hierbei wird eine an einem Federbalken befestigte Spitze über eine Probenoberfläche gerastert. Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze verbiegt sich die Blattfeder. Diese Auslenkung wird detektiert und direkt oder indirekt in eine Höheninformation umgerechnet.

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an Informationen, die man anhand dieser Messtechnik über eine Probe gewinnen kann. Zu ihnen zählen unter anderem elektrische Leitfähigkeit sowie magnetische, mechanische und elektrostatische Eigenschaften.^[9-11] Außerdem ist die Manipulation der Probe (Nanolithografie) möglich.^[12] Rasterkraftmikroskopie lässt sich sowohl im Vakuum als auch an Luft und in Flüssigkeit betreiben. Die Auflösung reicht bis zu weniger als 1 Å lateral und 0,1 Å vertikal und übertrifft damit bei weitem die durch Lichtbeugungseffekte und Wellenlänge begrenzte Auflösung optischer Mikroskope.^[13] Diese Eigenschaften haben die Rasterkraftmikroskopie seit ihrer Erfindung zu einem mächtigen Werkzeug in der Nanobiotechnologie werden lassen.

1.2. Messprinzip

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird eine am Ende eines Federbalkens, des *Cantilevers*, befestigte Spitze bis auf einige Å an die zu untersuchende Probenoberfläche herangeführt. Ein typisches Rasterkraftmikroskop und das Messprinzip sind in Abbildung 1 dargestellt. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Probe und Spitze kommt es zur Biegung des Cantilevers, welche als Messgröße dient. Die gängigste Methode zur Bestimmung dieser Durchbiegung ist die optische Detektion mittels Lasers.^[8] Hierbei wird ein Laserstrahl auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert. Der reflektierte Laserstrahl wird über einen Spiegel auf eine viergeteilte Photodiode gelenkt. Durch Wechselwirkungen zwischen Probe und Spitze kommt es zu einer Auslenkung des Cantilevers aus seiner Ruheposition und somit zu einer Positionsänderung des Lasers auf der Photodiode. Letztere dient als Messsignal und lässt bei bekannter Durchbiegungsempfindlichkeit und Federkonstante des Cantilevers (s. Kapitel 1.5.1) auf die zwischen Probe und Spitze wirkenden Kräfte schließen. Wird die Spitze nun Linie für Linie über die Probe gefahren, so kann die Auslenkung des Cantilevers in Höheninformationen umgerechnet und so die Topografie der Probe dargestellt werden. Daneben können mittels dieser Methode auch andere Eigenschaften der Probenoberfläche analysiert werden.

In vielen Systemen wird der Einfachheit halber die Probe unter der Spitze verschoben, während sich die Spitze nicht bewegt. Um die Probe im sub-Nanometer-Maßstab nach Wunsch zu positionieren, dienen Scanner, die mit Piezo-Elementen ausgestattet sind. Abbildung 2 zeigt als Beispiel einen Rohrscanner, wie er auch in dem in dieser Arbeit genutzten System verwendet wurde. Der Scanner enthält sogenannte *Piezoelemente*. Diese besitzen eine Kristallstruktur, die unter mechanischer Beanspruchung eine Änderung des Dipolmoments erzwingen. Das führt zu einer elektrischen Spannung im Bauteil (*Piezoelektrischer Effekt*).^[14] In Scannern, die in der Rasterkraftmikroskopie verwendet werden, wird der *inverse piezoelektrische Effekt* ausgenutzt. Bei Anlegung einer elektrischen Spannung an das Bauteil kommt es zu einer mechanischen Längenveränderung. Diese kann bis in den sub-Nanometer-Bereich kontrolliert werden. Mittig im Rohrscanner befindet sich das z-Piezoelement, mit dem die Probe hoch- und runtergefahren werden kann. Um dieses Element herum liegen vier weitere Piezoelemente, von denen sich jeweils zwei gegenüberstehen. Dank dieser Elemente gelingt die Ansteuerung in x- und y-Richtung. Je nach Scanner kann die Probe bis zu 150 µm horizontal und 20 µm lateral (d.h. in z-Richtung) bewegt werden. Dabei werden Spannungen von bis zu 440 V pro Piezoelement angelegt. Die an einem magnetischen Metallplättchen aufgeklebte Probe haftet auf der magnetischen Oberfläche des Scanners. Der Cantilever wird über der Probe befestigt.

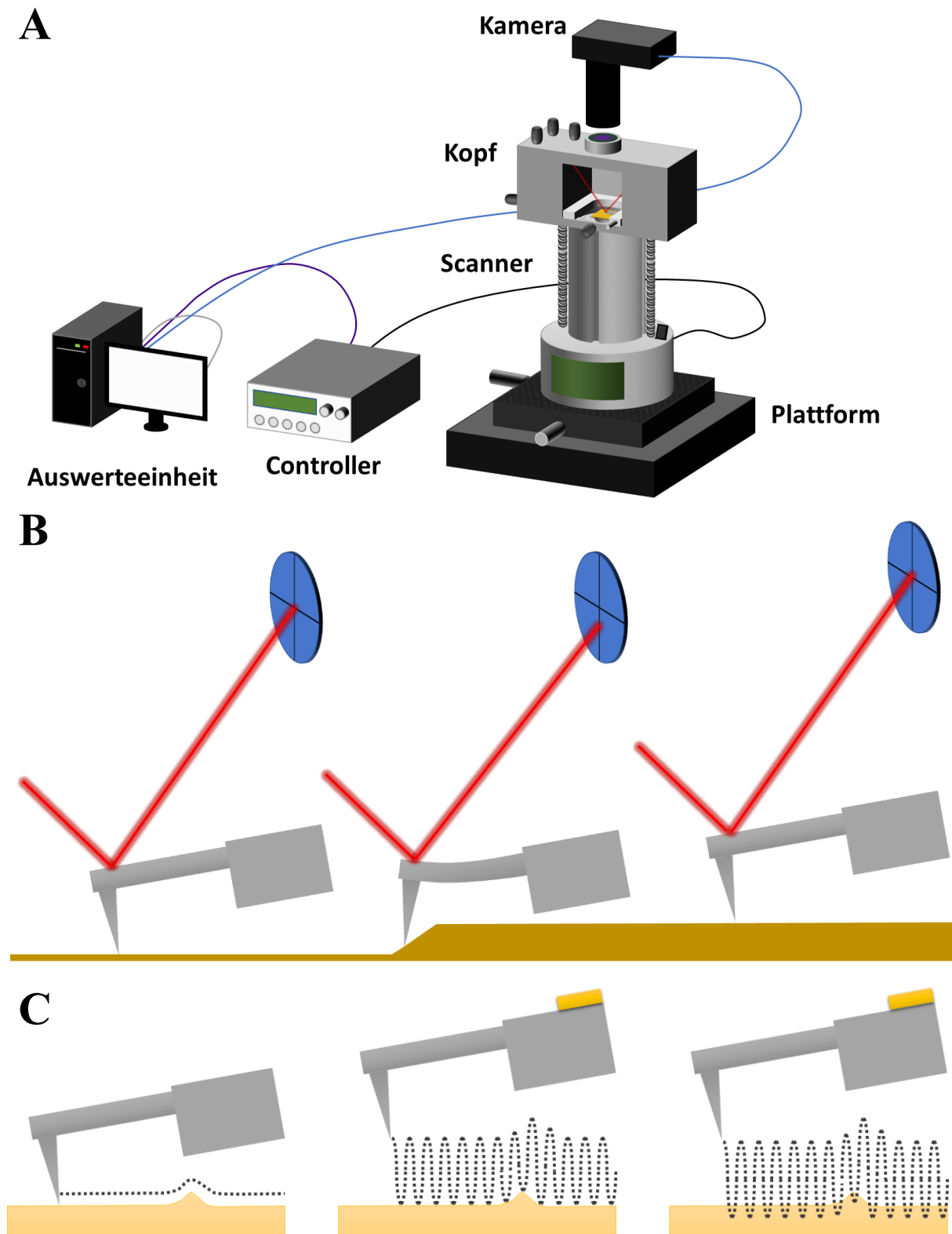


Abbildung 1 – Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops. A) Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Das Herzstück des Mikroskops bildet der Kopf, in den der Cantileverhalter gelegt wird. An letzterem wird der Cantilever befestigt. Der Laser wird auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert und anschließend auf eine Photodiode reflektiert. Die zu untersuchende Probe wird magnetisch auf dem Scanner befestigt. Anschließend wird der Kopf des Mikroskops mittels Federn auf dem Scanner festgemacht. Der Cantilever befindet sich infolgedessen genau über der Probe. Durch Hoch- und Runterfahren des Scanners kann die Probe an den Cantilever angenähert werden. Das komplette Mikroskop steht auf

Rasterkraftmikroskopie

einer beweglichen Plattform mit Mikrometerschrauben. Über dem Mikroskop ist eine Kamera installiert, die eine Aufsicht der Probe und des Cantilevers bietet. So kann sowohl der Laser auf dem Cantilever als auch der Cantilever auf der gewünschten Probestelle positioniert werden. Das Mikroskop ist an eine Kontrolleinheit, den Controller, angeschlossen. Dieser regelt die piezoelektrische Steuerung des Cantilevers, meist als Reaktion auf das Signal der Photodiode (Feedback Loop). Außerdem können hier Signale importiert und exportiert werden. Der Controller und die Kamera sind an eine Auswerteeinheit angeschlossen (Computer). B) Unterschiedliche Messmodi. Im Kontakt-Modus (links) steht die Messspitze in Kontakt mit der Probe, während sie diese abrastert. Im intermittierenden Modus (Mitte) führt die Spitze eine sinoidale Grundbewegung aus, was zu einer Verringerung der Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze, verglichen mit dem Kontaktmodus, führt. Im PeakForce Tapping™ führt die Messspitze ebenfalls eine sinoidale Grundbewegung aus, drückt bei jedem Umlauf aber einmal in die Probe rein und nimmt dabei eine Kraft-Abstands-Kurve auf (siehe Kapitel 1.5.3.2). C) Allgemeines Messprinzip. Die Messspitze rastert die Probe ab. Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze biegt sich der Cantilever. Dies hat zur Folge, dass sich die Position des reflektierten Lasers auf der Photodiode verschiebt. Diese Verschiebung wird als Messsignal verwendet. Zur Aufnahme einer Topografie wird die Probe üblicherweise hoch- oder runtergefahren, bis die Position des Lasers auf der Photodiode mit seiner Ausgangsposition übereinstimmt.

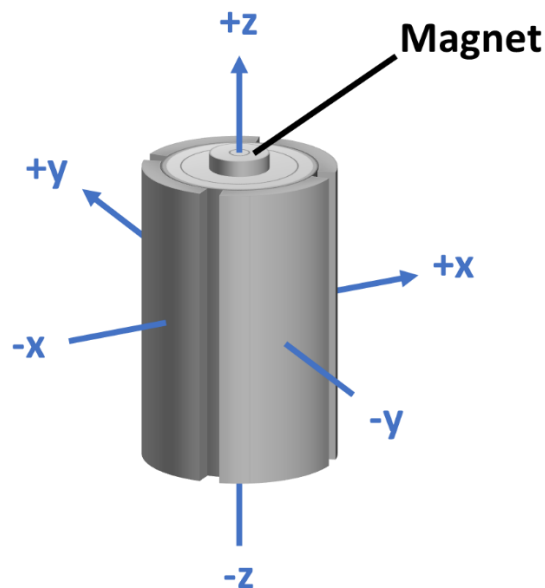


Abbildung 2 - Rohrscanner für die Rasterkraftmikroskopie. Der Körper des Scanners ist von einem Piezo-Element, das sich durch angelegte Spannung in z-Richtung dehnen lässt. Er ist von vier Piezo-Elementen umgeben, die eine Bewegung der Probe in x- und y-Richtung ermöglichen. Das obere Ende des Scanners ist magnetisch, sodass eine auf einem Magneten befestigte Probe auf ihm befestigt werden kann. Der Scanner wird auf eine Mikrometerschraube geschraubt, um ihn grob in z-Richtung bewegen zu können (hier nicht gezeigt).

Mittels Stellschrauben kann der Cantilever über der Probe auf die zu untersuchende Stelle positioniert werden. Dabei dient ein Lichtmikroskop der Aufsicht auf Cantilever und Probe. Die Fokussierung des Lasers auf dem Cantilever erfolgt hier ebenfalls über Stellschrauben und die Ausrichtung des Spiegels. Ist der Laser ausgerichtet und eine entsprechende zu messende Stelle gefunden, so kann die Probe über eine Stellschraube grob an die Spitze rangefahren werden. Das Aufsetzen der Spitze auf der Probe wird über den Controller gesteuert. Dabei wird die Probe in μm -Schritten rangefahren, bis der Laser auf der Photodiode soweit aus seiner Ruheposition gebracht wird, dass die Differenz zu dieser einen vorher festgelegten Wert erreicht.

Zur Untersuchung einer Oberflächenstruktur existieren verschiedene Messmethoden, die in Kapitel 1.5 näher erläutert werden. Des Weiteren gibt es unterschiedliche Cantilever, die sich u.a. in Federkonstante, Geometrie, Spitzenradius und Material voneinander unterscheiden. Die Wahl der Messmethode und des Cantilevers ist essenziell für die Qualität der Aufnahmen und muss vor der Messung behutsam getroffen werden.

Eine Messung an Luft erfordert keine spezielle Vorrichtung. Bei einer Messung in Vakuum steht das Mikroskop in einer luftdichten Box, in die ein Vakuum gezogen wird. Abbildung 3 (links) zeigt den Cantileverhalter für Messungen an Luft und im Vakuum schematisch. Abbildung 3 (rechts) zeigt einen Cantileverhalter für die Messung in Flüssigkeit. Der Cantilever ist hier von einem Abdichtring umgeben, der die Flüssigkeit am Auslaufen hindert. Die Flüssigkeit wird durch eine Öffnung eingeschleust und legt sich zwischen Cantilever und Probe.

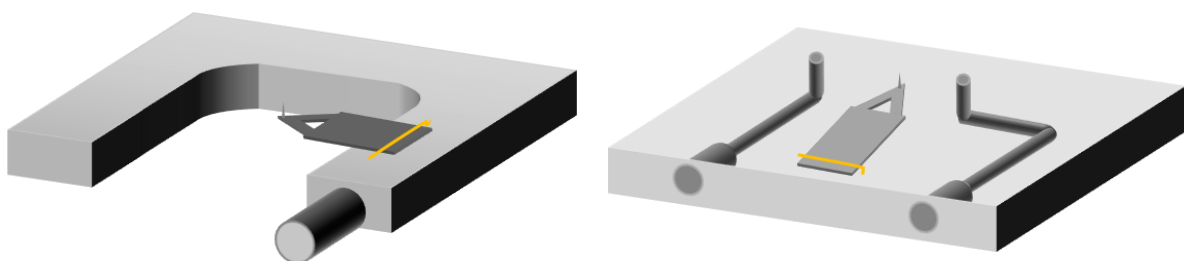


Abbildung 3 - Cantileverhalter für Messungen an Luft und in Vakuum (links) sowie für Messungen in Flüssigkeit (rechts). Der Cantilever wird in eine Feder eingespannt, sodass die Spitze vom Cantileverhalter weg zeigt. Der Cantileverhalter für Flüssigkeitsmessungen verfügt außerdem über zwei Röhren, durch die die Flüssigkeit gegeben werden kann. Diese bildet dann einen Tropfen um die Spitze des Cantilevers herum. Zum Abdichten kann außerdem ein ringförmiges Gummi auf dem Cantileverhalter befestigt werden.

1.3. Wechselwirkungen

Die Auslenkung des Cantilevers bei geringem Abstand zwischen Spitze und Probe beruht auf den Wechselwirkungen zwischen den Spitzen- und den Probenatomen. Diese beruhen wiederum auf dem physikalischen Grundgesetz, dass sich zwei entgegengesetzt geladene Teilchen anziehen (attraktive Wechselwirkung), während sich gleich geladene Teilchen abstoßen (repulsive Wechselwirkung). Das Potenzial V zwischen zwei Punktladungen q_1 und q_2 mit Abstand r zueinander wird durch das Coloumbsche Gesetz beschrieben (s. Gleichung 1).^[15]

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{q_1 q_2}{r^2} \quad (1)$$

Dabei ist ϵ_0 die *Permittivität des Vakuums*. Das Potenzial ist negativ, wenn die Ladungen unterschiedliche Vorzeichen haben. In diesem Fall wirkt zwischen den Punktladungen eine Kraft zum Mittelpunkt ihrer Verbindungsstrecke hin. Ein positives Potenzial wirkt vom Mittelpunkt der Verbindungsstrecke weg. Zwei betragsgleiche, starre, entgegengesetzte Punktladungen q_1 und q_2 , die in einem Abstand r voneinander getrennt sind, bilden ein *elektrisches Dipol*, das durch das *elektrische Dipolmoment* $\vec{\mu}$ nach Gleichung 2 beschrieben werden kann.^[16] Das elektrische Dipolmoment wächst mit steigendem Betrag der Ladung sowie mit steigendem Abstand zwischen den Ladungen. Es deutet von der negativen zur positiven Punktladung hin.

$$\vec{\mu} = q \cdot \vec{r} \quad (2)$$

Ein Molekül besitzt ein elektrisches Dipolmoment, wenn der Ladungsschwerpunkt der Elektronen nicht mit dem der Atomkerne zusammenfällt. In dem Fall handelt es sich um ein *polares* Molekül. Das elektrische Dipolmoment wird dann durch den Vektor zwischen den Ladungsschwerpunkten der Elektronen und dem der Atomkerne charakterisiert. Es ist ein Maß für die Polarität des Moleküls, aus dem sich viele seiner Eigenschaften ableiten lassen, und bestimmt unter anderem die Wechselwirkungen mit anderen Molekülen so wie die Löslichkeit des Moleküls in einem Lösemittel.

Das elektrische Dipolmoment kann durch ein äußeres elektrisches Feld \vec{E} beeinflusst werden. Die Veränderung des Dipolmoments durch das elektrische Feld wird als induziertes

Dipolmoment $\overline{\mu}^*$ bezeichnet (s. Gleichung 3). Es ist proportional zum angelegten Feld. Der Proportionalitätsfaktor ist die *Polarisierbarkeit* α . Auch bei unpolaren Molekülen kann durch ein äußeres elektrisches Feld ein Dipolmoment induziert werden.

$$\overline{\mu}^* = \alpha \cdot \vec{E} \quad (3)$$

Der Einfachheit halber wird die Polarisierbarkeit α häufig durch das *Polarisierbarkeitsvolumen* α' ersetzt (s. Gleichung 4).

$$\alpha' = \frac{\alpha}{4\pi\epsilon_0} \quad (4)$$

Das in Gleichung 1 beschriebene Coloumb-Potenzial gilt nur im Vakuum. Befinden sich die zwei Punktladungen in einem Medium, so muss die Permittivität des Vakuums ϵ_0 durch die Permittivität des Mediums ϵ ersetzt werden. Diese steigt mit der Größe und der Polarisierbarkeit eines Moleküls stark an. Sie kann nach Maxwell über die Messung des Brechungsindex n des Mediums nach Gleichung 5 bestimmt werden.^[17]

$$n = \left(\frac{\epsilon_0}{\epsilon}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

Auch bei einem Atom kann durch ein äußeres elektrisches Feld ein Dipolmoment induziert werden, da sich Elektronen und Atomkern teilweise im Feld ausrichten und der Ladungsschwerpunkt der Elektronen nicht mehr auf den Atomkern fallen. Große Atome besitzen hohe Polarisierbarkeiten.

Das Coloumb-Potenzial nach Gleichung 1 ist proportional zu den Ladungen der beteiligten Teilchen. Die potenzielle Energie einer Wechselwirkung zwischen zwei Ionen liegt typischerweise im Bereich von $250 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ^[17] und ist damit etwa um eine Größenordnung stärker als Wasserstoffbrückenbindungen und Interaktionen zwischen einem Ion und einem Dipol. Zwei polare Atome oder Moleküle erfahren ein um eine weitere Größenordnung kleineres Coloumb-Potenzial. Dabei lässt sich generell zwischen starren und rotierenden Dipolen unterscheiden. Polare Moleküle in einem Festkörper haben eine eingeschränkte Bewegungsfreiheit, was die Berechnung des Potenzials komplexer macht. In Flüssigkeit und Gasen drehen sich die Dipole so, dass zwischen gleichgroßen Partialladungen ein

Rasterkraftmikroskopie

größtmöglicher und zwischen entgegengesetzten Partialladungen ein möglichst geringer Abstand herrscht. Das mittlere Potenzial zweier rotierender Dipole ist durch Gleichung 6 gegeben und wird auch als *Keesom-Wechselwirkung* bezeichnet.^[18]

$$V = -\frac{2\mu_1^2\mu_2^2}{3(4\pi\epsilon_0)^2k_B T} \cdot \frac{1}{r^6} \quad (6)$$

Das Potenzial ist sowohl abhängig von der Temperatur T als auch vom Kehrwert der sechsten Potenz des Abstands r der Dipole. k_B bezeichnet die Boltzmann-Konstante.

Ein Dipol kann in einem unpolaren Atom oder Molekül ein Dipolmoment induzieren, indem es Elektronendichte des Moleküls verschiebt.^[19] Das Potenzial dieser Wechselwirkung ist abhängig vom Dipolmoment des polaren Teilchens sowie von der Polarisierbarkeit des unpolaren Teilchens und ist durch Gleichung 7 gegeben. Interessanterweise zeigt es keine Abhängigkeit von der Temperatur.

$$V = -\frac{\mu_1^2\alpha'_2}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{1}{r^6} \quad (7)$$

Auch hier ist es umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands r . Nähern sich zwei unpolare Atome oder Moleküle einander an, so können in beiden Dipolmomente induziert werden. Grundlage dieser Wechselwirkung ist die Fluktuation der Ladungsdichte der Teilchen. Nach der Born-Oppenheimer-Näherung^[20] bewegen sich Elektronen sehr viel schneller als die zugehörigen Atomkerne. Wenn der Ladungsschwerpunkt der Elektronen durch ihre Bewegung aus dem Ladungsschwerpunkt der Atomkerne austritt, bewegen sich die Atomkerne nicht schnell genug, um dieser Verschiebung entgegenzuwirken. Dadurch treten immer wieder Dipolmomente in den Teilchen auf und ermöglichen eine Wechselwirkung zwischen Atomen und Molekülen, die im Mittel unipolar sind. Das Potenzial wird in diesem Fall durch Gleichung 8 beschrieben.^[19] Es ist abhängig von der Polarisierbarkeit der beteiligten Teilchen sowie ihren Ionisierungsenergien I_1 und I_2 . Außerdem besteht auch hier eine Proportionalität des Potenzials zum Kehrwert der sechsten Potenz des Abstands zwischen den Teilchen.

$$V = -\frac{3}{2}\alpha'_1\alpha'_2 \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \cdot \frac{1}{r^6} \quad (8)$$

Die in Gleichung 6 bis Gleichung 8 gezeigten Potenziale weisen alle eine Proportionalität zu r^{-6} auf. Sie bilden die Van-der-Waals-Wechselwirkungen^[19] und lassen sich zu einer Gesamtwechselwirkung nach Gleichung 9 zusammenfassen.

$$V = -C \cdot \frac{1}{r^6} \quad (9)$$

Dabei ist die Proportionalitätskonstante C abhängig von den Eigenschaften der beteiligten Teilchen. Es muss jedoch beachtet werden, dass sich die Gültigkeit der Gleichungen lediglich auf Teilchen beschränkt, die frei rotieren können. Außerdem beziehen sie sich nur auf die Wechselwirkung zwischen zwei Teilchen. Es handelt sich also um eine starke Vereinfachung.

Abstoßende Wechselwirkungen zwischen Atomen sind schwieriger zu beschreiben. Sie gewinnen an Bedeutung, wenn der Abstand zwischen den Atomen so klein wird, dass sich die Orbitale der Atome überlappen. Da das Pauli-Prinzip eingehalten werden muss und auch die Repulsion zwischen den Atomkernen stark zunimmt, steigt das Potenzial mit abnehmendem Abstand sehr stark an. Zur Beschreibung des Potenzialverlaufs in Abhängigkeit vom Abstand r der Atomkerne wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen. Eines ist das *Harte-Kugel-Modell*^[21], bei dem die Atome als unelastische Kugeln mit Radius $\frac{1}{2}d$ dargestellt werden. Ist der Abstand der Kugelschwerpunkte größer als d , dann ist das Potenzial null. Ist es kleiner als d , dann ist das Potenzial unendlich groß. Es handelt sich hierbei allerdings um eine grobe Vereinfachung, da die Kompressibilität der Teilchen vernachlässigt wird.

Eine bessere Beschreibung der Abstandsabhängigkeit des Potenzials liefert das *Mie-Potenzial*.^[22] Es berücksichtigt sowohl repulsive als auch attraktive Wechselwirkung und ist durch Gleichung 10 gegeben.

$$V = \frac{W}{r^l} - \frac{B}{r^m} \quad (10)$$

Die Koeffizienten W , B , l und m sind abhängig von den Eigenschaften der Atome oder Moleküle. Der erste Term beschreibt die Abstoßung, während der zweite Term für die Anziehung steht. Einen Spezialfall dieser Formel stellt das Lennard-Jones-Potenzial^[23,24] dar (s. Gleichung 11).

$$V = 4\varepsilon \left\{ \left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right\} \quad (11)$$

Rasterkraftmikroskopie

Dabei ist ε die minimale Energie und r_0 der Teilchenabstand, bei dem das Lennard-Jones-Potenzial eine Nullstelle besitzt. Der Teilchenabstand, in dem das Potenzial minimal wird ($V = \varepsilon$), liegt bei $r = \sqrt[6]{2} \cdot r_0$. Abbildung 4 zeigt den schematischen Verlauf des Potenzials zwischen zwei Teilchen in Abhängigkeit ihres Abstands r nach dem Lennard-Jones-Potenzial. Mit steigendem Abstand geht das Potenzial gegen null, während die Repulsion das Potenzial bei geringem Abstand sehr schnell wachsen lässt. Bei Abstand r_0 und einem Potenzial $-\varepsilon$ befindet sich das Molekül in einer Potenzialmulde und somit im stabilen Gleichgewicht. Zwar stellt das Lennard-Jones-Potenzial eine gute Annäherung, jedoch hat sich gezeigt, dass die Repulsion besser durch den exponentiellen Ausdruck $e^{-\frac{r}{r_0}}$ beschreibbar ist.^[25]

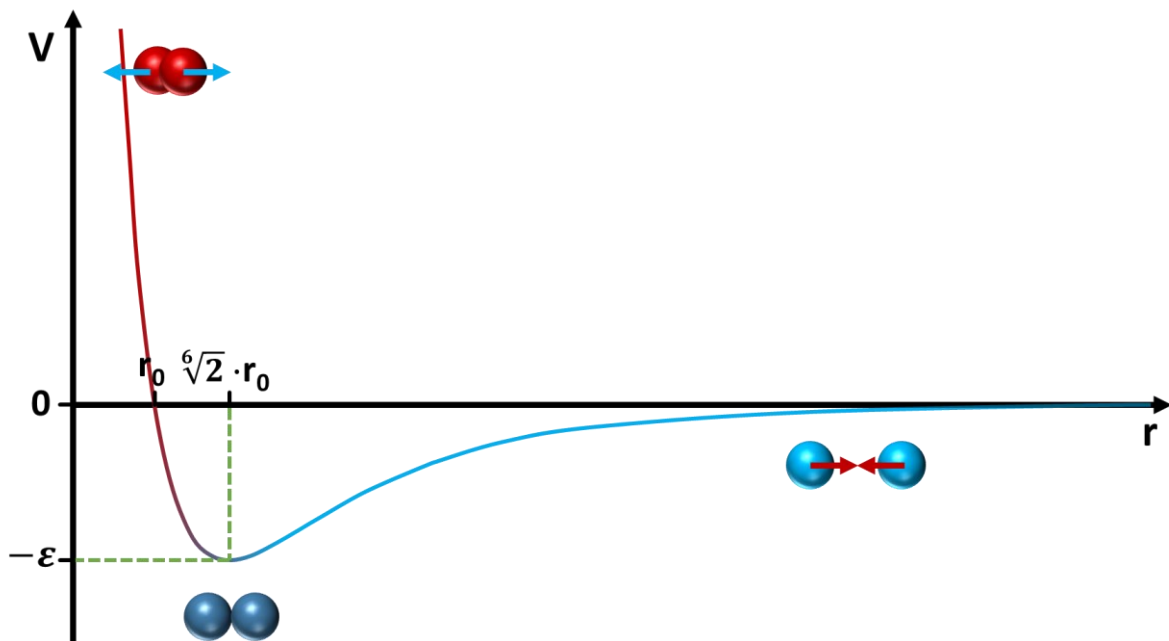


Abbildung 4 - Auftragung der potenziellen Energie V zwischen zwei Teilchen in Funktion des Abstands r ihrer Mittelpunkte nach dem Lennard-Jones-Potenzial. Bei weitem Abstand dominieren anziehende Wechselwirkungen und das Potenzial ist negativ mit einem Minimum bei $-\varepsilon$. Bei geringem Abstand dominieren die abstoßenden Wechselwirkungen. Geht der Abstand gegen null, so steigt das Potenzial Richtung unendlich.

1.4. Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe

Die oben beschriebenen Wechselwirkungen sind nicht direkt auf das System Spitze-Probe anwendbar. Die Geometrie der Spitze kann durch eine Halbkugel mit Kugelradius R angenähert werden, während die Probe näherungsweise eben ist. Bei sehr kleinem Abstand zwischen Spitze und Probe erfahren die ersten Spitzenatome Repulsion, während die dahinter liegenden eine anziehende Wechselwirkung erfahren. Ebenso verhält es sich für die Atome der Probe. Um die attraktiven Wechselwirkungen besser beschreiben zu können, muss das Van-der-Waals-Potenzial aus Gleichung 9 über die Geometrien der Spitze und der Probe integriert werden. Es ergibt sich eine Proportionalität des Potenzials zum Kehrwert des Abstands r nach Gleichung 12.^[26]

$$V = -\frac{\pi^2 \rho_S \rho_P C R}{6} \cdot \frac{1}{r} = -\frac{H_A R}{6} \cdot \frac{1}{r} \quad (12)$$

ρ_S und ρ_P sind dabei die Teilchendichte der Spitze und der Probe, die Hamaker-Konstante H_A und die Dispersionskonstante C beschreiben materialabhängige Konstanten. Bei Einbeziehung der repulsiven Kräfte nach dem Lennard-Jones-Potenzial (s. Gleichung 11) lässt sich ein Gesamt-Potenzial zwischen Spitze und Probe bei Annahme einer Kugel- und Ebenengeometrie nach Gleichung 13 aufstellen.^[26]

$$V = -\frac{H_A R}{6} \cdot \frac{1}{r} = -B \cdot \frac{1}{r^{12}} \quad (13)$$

Durch den sehr starken Anstieg der Anziehungskräfte bei Kontakt zwischen Spitzen- und Probenatomen lässt sich atomare Auflösung erreichen. Da allerdings stets mehr als ein Spitzenatom mit mehr als einem Probenatom wechselwirkt, handelt es sich nicht um echte atomare Auflösung. So werden beispielsweise null-dimensionale Oberflächendefekte rausgemittelt und können nicht dargestellt werden. Abhilfe schaffen hier aufwändigere Methoden wie das Anbringen eines einzelnen Kohlenmonoxid-Moleküls an das Spitzenende^[27] oder einschränkende Methoden wie die Rastertunnelmikroskopie.

1.5. Messmethoden

Das Rasterkraftmikroskop bietet verschiedene Messmethoden an, die je nach Art der Probe Vor- und Nachteile haben. Neben der Aufnahme der Topografie ist es möglich, die Probe auf ihre elektrischen, magnetischen und mechanischen Eigenschaften zu untersuchen. Dazu wird häufig der *Interleave Modus* verwendet, der in diesem Kapitel beschrieben wird. Eine bewährte Methode zur Bestimmung mechanischer Eigenschaften einzelner Probenpunkte bietet die Kraftspektroskopie, bei der die Spitze in die Probe eingedrückt wird. PeakForce Tapping®^[28,29] stellt eine moderne Alternative dar. Die in dieser Arbeit genutzten Messmodi sollen im Folgenden vorgestellt werden.

1.5.1. Kalibrierung des Cantilevers

Vor einer Messung sollte das System kalibriert werden. Wird nur eine Topografie aufgenommen, so ist eine Kalibrierung nicht unbedingt notwendig, da die Messdaten aus der Position des z-Piezos entnommen werden. Sie ist dennoch empfehlenswert. Das Verhältnis von Positionsänderung des Lasers auf der Photodiode zur Auslenkung des Cantilevers wird als *Durchbiegungsempfindlichkeit* ζ bezeichnet. Die Auslenkung hat dabei eine Längeneinheit. Das Messsignal der Photodiode wird in Volt aufgezeichnet. Für die Durchbiegungsempfindlichkeit ergibt sich folglich die Einheit nm/V.

$$\zeta = \frac{\text{Auslenkung des Cantilevers [nm]}}{\text{Positionsänderung des Lasers auf Photodiode [V]}} \quad (14)$$

Die Durchbiegungsempfindlichkeit ist abhängig von der Position des Lasers auf der Photodiode und dem Cantilever, sowie der Position des Spiegels. Sie muss neu berechnet werden, sobald der Laser auf dem Cantilever neu fokussiert oder der Spiegel gedreht wird. Mittels der Durchbiegungsempfindlichkeit lässt sich die Auslenkung des Cantilevers in einer Längeneinheit angeben.

Zur Messung der Durchbiegungsempfindlichkeit des Cantilevers wird die Spitze in ein sehr hartes Substrat eingedrückt und eine Kraft-Abstands-Kurve aufgenommen (s. auch Kapitel 1.5.3.2).^[30] Es wird davon ausgegangen, dass das Substrat beim Eindrücken der Spitze nicht nachgibt. Die Auslenkung des Cantilevers in Gleichung 14 wird näherungsweise mit der

Bewegung des Scanners in z-Richtung gleichgestellt. Diese ist eine Funktion der am Piezoelement angelegten Spannung und daher genau bekannt. Die Positionsänderung des Lasers auf der Photodiode wird über den eingedrückten Bereich direkt gemessen. Die Auftragung der Position des Lasers auf der Photodiode über die Position des z-Piezos zeigt einen linearen Anstieg, dessen Steigung der Durchbiegungsempfindlichkeit entspricht.

Die Federkonstante ist ein Maß für die Rückstellkraft einer Feder, nachdem sie um den Weg Δx aus der Ruheposition x_0 ausgelenkt wurde. Diese Kraft wirkt der Auslenkung entgegen und wird durch das Hook'sche Gesetz (s. Gleichung 15) beschrieben.^[31]

$$F = k \cdot \Delta x \quad (15)$$

Die Proportionalitätskonstante k ist die *Federkonstante* der Feder. Ein Cantilever zeigt federähnliche Eigenschaften und kann als eine solche beschrieben werden. Durch auf den Cantilever wirkende Kräfte kann dieser aus seiner Ruheposition ausgelenkt werden. Die Auslenkung ist gerade so groß, dass die Rückstellkraft denselben Betrag wie die für die Auslenkung verantwortliche Kraft hat. Die beiden Kräfte sind gegeneinander gerichtet. Bei bekannter Federkonstante kann über die Auslenkung auf die auf den Cantilever wirkende Kraft geschlossen werden.

Zur genauen Bestimmung der Federkonstante k des Cantilevers existieren mittlerweile viele Verfahren, die alle ihre Vor- und Nachteile haben. Eines der gebräuchlichsten ist das *Thermal Tune*-Verfahren^[32], das auch in dieser Arbeit genutzt wurde. Es basiert auf der Annahme, dass der Cantilever als ein harmonischer Oszillator wirkt. Hutter und Bechhoefer^[30] nutzten das Äquipartitionstheorem^[33], um die Brown'sche Molekularbewegung^[34] des Grundschwingungsmodus des Cantilevers nach Gleichung 16 in Relation zu seiner thermischen Energie, $k_B T$, zu stellen.

$$k = \frac{k_B T}{\langle z_c^2 \rangle} \quad (16)$$

Dabei ist k_B die Boltzmann-Konstante^[35], T die Temperatur in Kelvin und $\langle z_c^2 \rangle$ die mittlere quadratische Auslenkung des Cantilevers. Über die Analyse des Leistungsdichtespektrums der Cantileverschwingung und anschließender Integrierung der Fläche unter dem Peak des Grundschwingungsmoduses kann $\langle z_c^2 \rangle$ ausgerechnet werden. Diese Methode hat den Vorteil,

Rasterkraftmikroskopie

Rauschen zu minimieren, da in einer generell rauscharmen Frequenz gemessen wird. Äußere Einflüsse können hier größtenteils durch Basislinienkorrektur entfernt werden.

Da die Cantileverschwingung entgegen obiger Annahme jedoch nicht perfekt harmonisch ist, führten Butt und Jaschke eine Korrektur ein, die die verschiedenen Schwingungsmodi des Cantilevers berücksichtigt (s. Gleichung 17).^[36] Der Wert α_i ist dabei eine vom Schwingungsmodus i abhängige Konstante. Für $i = 1$ im Grundmodus beträgt sie $\alpha_1 = 1,8751$. Somit ergibt sich ein Korrekturfaktor von 0,971.

$$k = \frac{12 k_B T}{\alpha_i^4 \langle z_i^2 \rangle} \quad (17)$$

$$k = 0,971 \cdot \frac{k_B T}{\langle z_1^2 \rangle} \quad (18)$$

Weitere Korrekturen müssten vorgenommen werden, die allerdings nicht praktikabel sind. So gibt es Korrekturfaktoren für die Geometrie des Cantilevers, den Durchmesser des Laserstrahls, seiner Position auf dem Cantilever und den Fakt, dass die Auslenkung des Cantilevers nicht exakt mit der Bewegung des z-Piezos übereinstimmt, da sich der Cantilever in einem Winkel bewegt.^[37] Letzteres trifft vor allem auch die Berechnung der Durchbiegungsempfindlichkeit zu. Es wird aber angenommen, dass die Auswirkungen dieser zuletzt genannten Punkte auf die Durchbiegungsempfindlichkeit und die Federkonstante so klein sind, dass sie diese Werte kaum beeinflussen.

Ist neben der Durchbiegungsempfindlichkeit des Systems die Federkonstante des Cantilevers bekannt, so kann aus der Auslenkung des Lasers auf der Photodiode die auf den Cantilever wirkende Kraft berechnet werden. Dazu wird die Differenz des Signals der Photodiode zur ursprünglichen Position mit der Durchbiegungsempfindlichkeit und der Federkonstante multipliziert.

1.5.2. Aufnahme einer Topografie

Zur Aufnahme einer Topografie wird die Spitze nah an die Probe rangefahren. Durch Abrastern der Probenoberfläche und Auswertung der Cantileverauslenkung kann auf die Probenstruktur geschlossen werden. Generell existieren drei mögliche Messmodi zur Aufnahme einer Topografie. Im *Kontaktmodus*^[8,13] (auch *Auflagemodus* genannt) steht die Spitze in Kontakt zur Probe, so dass abstoßende Kräfte dominieren. Im *Kontaktlosen Modus*^[38] hingegen bewegt sich die Spitze in einem Abstand von 10 bis 100 nm zur Probe. Hier dominieren die Anziehungskräfte. Daneben existiert ein *Intermittierender Modus*^[39,40], bei dem der Cantilever in Schwingung gebracht und die Änderung von Frequenz oder Amplitude durch Wechselwirkungen mit der Probe ausgewertet wird.

1.5.2.1. Kontaktmodus

Im Kontaktmodus wird die Probe so nah an die Spitze herangefahren, bis die abstoßenden Kräfte zwischen Probe und Spitze einer vorher festgelegten *Auflagekraft* (engl. *Deflection Setpoint*) entsprechen. Die Auflagekraft wird in Volt angegeben und entspricht der Differenz des vertikalen Messwerts der Photodiode zum *Nullmesswert*, also dem vertikalen Messwert auf der Photodiode, der ohne Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze gegeben ist (siehe Abbildung 1 c). Sie kann über die Durchbiegungsempfindlichkeit und die Federkonstante k in eine Kraft umgerechnet werden (s. Kapitel 1.5.1).

Die Auflagekraft hat typischerweise einen Wert von 1,000 V, was bei einer durchschnittlichen Federkonstante und Auslenkungsempfindlichkeit einer Kraft von etwa 10 nN entspricht. Meist kann sie von 0,001 V bis 10,000 V variiert werden, wobei Werte zwischen 0,200 V und 2,000 V gebräuchlich sind. Sie sollte so gewählt werden, dass die Kraft zwischen Probe und Spitze minimal ist, ohne dass es zu einem großen Qualitätsverlust der Aufzeichnung kommt.

Der Kontaktmodus kann auf zwei unterschiedliche Arten betrieben werden. Im Modus der *Konstanten Höhe* wird die Spitze schnell über die Probe gerastert. Aufgrund der Rauigkeit der Probe wird die Spitze von ihrer ursprünglichen Biegung ausgelenkt. Diese Auslenkung wird über die Auslenkungsempfindlichkeit in eine Höheninformation umgerechnet. Eine Topografie kann somit in der Regel mit Geschwindigkeiten von etwa 80 $\mu\text{m/s}$ aufgenommen werden. Bei sehr rauen Proben können die starken Kräfte, die bei hoher Durchbiegung des Cantilevers entstehen, jedoch schädigend für Cantilever und Probe sein. Daher eignet sich diese Methode nur für sehr ebene Proben und kleine Flächen.

Rasterkraftmikroskopie

Im Modus der *Konstanten Kraft* wird jede Durchbiegungsänderung des Cantilevers durch Änderung der Probenhöhe ausgeglichen. Fährt die Spitze beim Abrastern über eine Probenkante, so wird die Probe anhand des Piezo-Scanners in z-Richtung hoch- oder runtergefahren, bis der Messwert an der Photodiode wieder der eingestellten Auflagekraft entspricht. Die Bewegung des Scanners in z-Richtung wird dabei als Höheninformation der Probe verwertet. Die Messung dauert zwar etwas länger als im Modus der konstanten Höhe, jedoch sind dank moderner Technik heutzutage Messgeschwindigkeiten von 40 $\mu\text{m/s}$ ohne großen Qualitätsverlust üblich. Der große Vorteil dieser Methode ist die geringere Kraft zwischen Spitze und Probe, die die Beschädigung an Spitze und Probe verringert. So sind auch die Messungen biologischer Proben ohne weiteres möglich.

1.5.2.2. Kontaktloser Modus

Beim *kontaktlosen Modus* wird die Spitze in einem Abstand von 10 bis 100 nm zur Probe gehalten. Attraktive Wechselwirkungen dominieren hier. Da das Potenzial zwischen Spitzenende und darunterliegender Probenfläche jedoch umgekehrt proportional zur Distanz zwischen Spitze und Probe ist, ist dieser Modus nicht sehr empfindlich und bringt kaum zufriedenstellende Ergebnisse.^[41] Heutzutage wird er nur noch sehr selten angewendet, vielmehr wurde er durch den intermittierenden Modus ersetzt.

1.5.2.3. Intermittierender Modus

Beim *intermittierenden Modus* wird der Cantilever in Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz versetzt. Als Oszillator dient ein Piezo-Element, das am anderen Ende des Cantilevers befestigt ist (siehe Abbildung 1 b)). Der Cantilever dient als Resonator und besitzt die Resonanzfrequenz ω_0 die sich anhand seiner Masse m und bei bekannter Federkonstante k durch Gleichung 19 berechnen lässt.^[42] Bei Schwingung nahe der Resonanzfrequenz steigt die Amplitude des Cantilevers stark an.

$$\omega_0 = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (19)$$

Gleichung 20 beschreibt den Verlauf der Auslenkung A des Cantilevers in Abhängigkeit seiner Amplitude A_0 , seiner Phasenverschiebung φ zur Erregerschwingung und der Zeit t .^[42]

$$A = A_0 \cdot \sin(\omega_0 \cdot t + \varphi) \quad (20)$$

Die Schwingung des Cantilevers läuft der des Erregers hinterher. Die Phasenverschiebung φ lässt sich durch Gleichung 21^[42] bestimmen und ist abhängig von der Dämpfungskonstante ϱ und der Frequenz ω der Cantileverschwingung. Bei Resonanzfrequenz $\omega = \omega_0$ beträgt die Phasenverschiebung $\varphi = \frac{1}{2}\pi$.

$$\varphi = \arctan \frac{2\varrho\omega}{\omega_0^2 - \omega^2} \quad (21)$$

Steht der Cantilever in Wechselwirkung mit der Probe, so wirken sich diese äußeren Kräfte auf die Kraftkonstante k des Cantilevers aus und ändern nach Gleichung 19 seine Resonanzfrequenz auf einen kleineren Wert. Somit verändern sich nach Gleichung 20 und Gleichung 21 auch die Amplitude und Phase der Cantileverschwingung. Beide Änderungen werden von der Kontrolleinheit des Rasterkraftmikroskops erfasst und dienen als Referenzwert zur Berechnung der zwischen Spitze und Probe wirkenden Kräfte.

Der intermittierende Modus kann bei *konstanter Amplitude* oder bei *konstanter Phase* betrieben werden. Vorteil dieses Modus gegenüber dem Kontaktmodus ist die geringere Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe. Da beide nicht in dauerhaftem direktem Kontakt stehen, können auch sehr empfindliche Proben mit einer hohen Auflösung untersucht werden. Im hier verwendeten System wird bei konstanter Amplitude gemessen. Diese liegt typischerweise zwischen 30 nm und 1000 nm. Die Erregerfrequenz wird vor der Messung bestimmt und während der Messung konstant nahe der Resonanzfrequenz des Cantilevers gehalten. Letztere ist außerdem stark vom den Cantilever umgebenden Medium abhängig. So liegt sie bei Messungen in Wasser im Bereich zwischen 5 und 20 kHz, an Luft kann sie bis zu 450 kHz erreichen.

1.5.3. Untersuchung der Probeneigenschaften

1.5.3.1. Magnetische und elektrostatische Eigenschaften

Sowohl magnetische als auch elektrostatische Kräfte haben eine hohe Reichweite. Zur qualitativen Charakterisierung hat sich der sogenannte *Interleave Modus* bewährt. In diesem Modus wird die Spitze im intermittierenden Modus über die Probe gefahren, um eine topographische Aufnahme zu machen. Nachdem eine Linie gescannt wurde, wird die Spitze wieder an den Anfang der Linie gefahren. Der Abstand der Probe zur Spitze wird auf 20 bis 120 nm erhöht. Hier findet sich der Cantilever in einer Region, in der magnetische und elektrostatische Kräfte dominieren. Die gleiche Linie wird nun nochmal abgefahren, ohne dass der Cantilever in Schwingung versetzt wird. Auf Grundlage des zuvor gemessenen Höhenprofils wird der Versatz beibehalten, sodass sich Auslenkungen des Cantilevers nur aufgrund weitreichender Wechselwirkungen ergeben. So kann eine Mappe der magnetisch und elektrostatisch unterschiedlichen Domänen der Probe erfasst werden. Um die beiden Kräfte auseinanderzuhalten, kann die magnetische Wechselwirkung durch Nutzen eines magnetisierbaren Cantilevers deutlich erhöht werden. Andererseits wird zur Messung der elektrostatischen Kräfte eine elektrisch leitfähige Spitze verwendet. Hier lässt sich die Wechselwirkung durch Anlegen einer Spannung von bis zu 10 Volt verstärken.

Eine quantitative Bestimmung der wirkenden Kräfte ist durch diese Messmodi sehr kompliziert und kaum möglich.^[41] Abhilfe schafft eine modernere Technologie, die *Kelvin Probe Force Microscopy (KPFM)*.^[43] Bei geringem Abstand kann die Spitze und die vertikal unter ihr stehende Probenfläche näherungsweise als Plattenkondensator betrachtet werden. Haben beide Seiten dieses Kondensators unterschiedliche Austrittsarbeit und werden elektrisch in Kontakt gebracht, so fließen Elektronen von der Seite mit der geringeren Austrittsarbeit zur anderen, bis sich die Fermi-Niveaus beider Seiten ausgleichen. Dadurch entsteht zwischen den Platten ein Spannungsgradient V_{KP} , der auch als *Kontaktpotenzial* bezeichnet wird und nach Gleichung 22 von den Austrittsarbeiten ϕ_S und ϕ_P der Spitze und der Probe sowie der elektrischen Elementarladung e abhängt. Beide Seiten sind betragsgleich entgegengesetzt geladen.

$$V_{KP} = \frac{\phi_S - \phi_P}{-e} \quad (22)$$

Durch Anlegen eines externen Potentials V_{RP} am System kann die Spannung V_{KP} ausgeglichen werden. Bei $V_{RP} = -V_{KP}$ verschwindet das elektrische Feld. Durch dieses extern angelegte Potential kann auf das elektrostatische Potential der Probe geschlossen werden.

Die potenzielle Energie in einem parallelen Plattenkondensator ist durch Gleichung 23 gegeben.^[44]

$$U = \frac{1}{2}M(\Delta V)^2 \quad (23)$$

Hierbei ist M die lokale Kapazität und ΔV die Spannungsdifferenz zwischen Kontaktspannung V_{KP} und angelegter Rückspannung V_{RP} . Die Kraft, die auf Spitze und Probe wirkt, ist das Verhältnis der Änderung der Energie dU bei sich ändernder Kondensatordistanz dZ nach Gleichung 24.

$$F = -\frac{dU}{dZ} = -\frac{1}{2}\frac{dC}{dZ}(\Delta V)^2 \quad (24)$$

An die Spitze wird neben der Gleichspannung V_{RP} noch eine Wechselspannung V_{AC} angebracht, um die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Die oszillierende Wechselspannung kann als $V_{AC} \cdot \sin \omega t$ ausgedrückt werden, wobei ω die Resonanzfrequenz des Cantilevers und t die Zeit ist. Die Spannungsdifferenz ΔV zwischen Spitze und Probe kann in Form von Gleichung 25 geschrieben werden.

$$\Delta V = \Delta V_{DC} + V_{AC} \cdot \sin \omega t \quad (25)$$

Durch Einsetzen der Gleichung 25 in Gleichung 24 und Umformen über die Beziehung $2 \sin^2 x = 1 - \cos(2x)$ ergibt sich schließlich Gleichung 26.

$$F = -\frac{1}{2}\frac{dC}{dZ}\left(\Delta V_{DC}^2 + \frac{1}{2}V_{AC}^2\right) - \frac{dC}{dZ}\Delta V_{DC}V_{AC} \sin(\omega t) + \frac{1}{4}\frac{dC}{dZ}V_{AC}^2 \cos(2\omega t) \quad (26)$$

Die oszillierende elektrische Kraft um ω agiert als sinusoidale Triebkraft und setzt den Cantilever in Bewegung. Der Cantilever reagiert allerdings hauptsächlich auf Kräfte nahe seiner Resonanzfrequenz, weswegen der zweite Term der rechten Seite in Gleichung 26 dominant

Rasterkraftmikroskopie

wirkt, während der dritte Term kaum zum Tragen kommt. Die Auswirkung dieser Kraft kann anhand seiner Amplitude nach Gleichung 27 bestimmt werden.

$$\text{Amplitude von } F_{\omega} = \frac{dC}{dZ} \Delta V_{DC} V_{AC} \sin(\omega t) \quad (27)$$

Ziel der Messmethode ist es, die Spannung an der Spitze V_{RP} so anzupassen, dass die Amplitude von F_{ω} null wird, d.h. $\Delta V_{DC} = 0$. Bei einer Amplitude größer als 0 ist nicht bekannt, ob die angelegte Spannung V_{RP} zu hoch oder zu gering ist, denn beide Fälle führen zu einer oszillierenden Auslenkung nach Gleichung 27. Durch Betrachtung der Phasenverschiebung der Oszillation kann darauf geschlossen werden, ob V_{RP} erhöht oder gesenkt werden muss. Anhand dieser Methode ist eine quantitative Aussage zum elektrostatischen Potenzial der Probe möglich.

1.5.3.2. Mechanische Eigenschaften

Es gibt unterschiedliche Verfahren zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften einer Probe. Zu den bekanntesten zählen *Force Volume*^[45], *Kraftspektroskopie*^[45,46] und *PeakForce Tapping*^[29]. Allen gemein ist, dass Kraft-Abstands-Kurven durch Nanoindentation (Eindrückung der Spitze in die Probe) aufgenommen und aus ihnen mechanische Eigenschaften extrahiert werden. Dazu wird die Spitze aus einer Ruheposition, bei der sie nicht im Kontakt mit der Probe steht, der Probe vertikal, also in z-Richtung, angenähert. Die Auslenkung des Cantilevers wird über die Distanz des Cantilevers Z zum Ausgangspunkt der Messung aufgetragen und bildet somit eine Kraft-Abstands-Kurve. Abbildung 5 zeigt eine typische Kraft-Abstands-Kurve. Die blaue Linie zeigt die Annäherung von Spitze und Probe, während die rote Linie das Rückfahren aufzeigt.

In ihrer Ausgangsposition (1) ist der Abstand der Spitze zur Probe so groß, dass die Auslenkung der Spitze zu vernachlässigen ist. Nähert sich die Spitze der Probe an (*Extension*), so werden die attraktiven Wechselwirkungen immer dominanter (2). Ab einer bestimmten Distanz übersteigt die anziehende Kraft die Rückstellkraft des Cantilevers und der Cantilever wird zur Probe hin gebeugt (3). Dieser Effekt wird als *Snap-On* bezeichnet. Die wirkende Kraft zwischen Spitze und Cantilever ist hier negativ. Wird der Cantilever nun weiter der Probe angenähert, so gewinnen die repulsiven Kräfte mehr und mehr an Bedeutung. Die Kraft steigt in den positiven

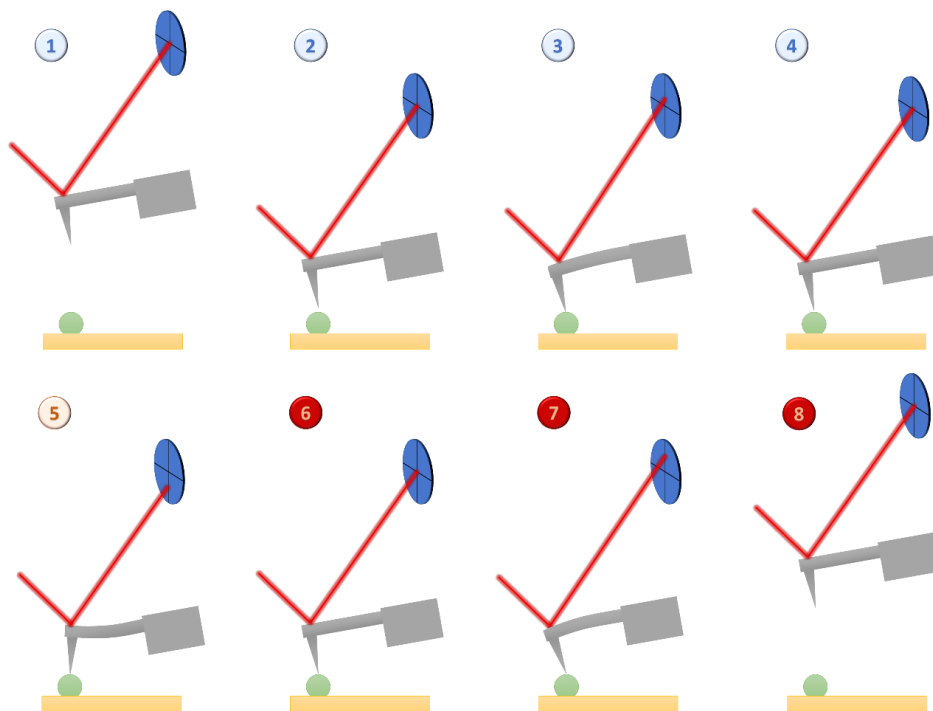
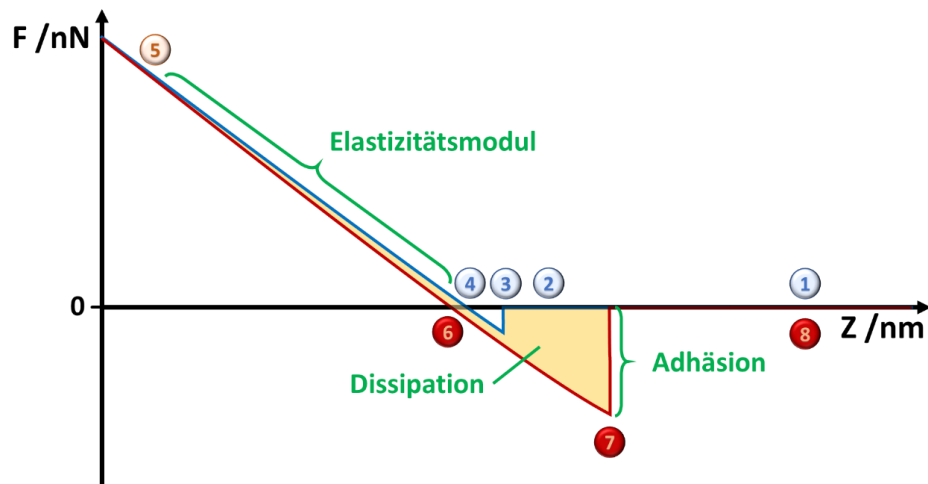


Abbildung 5 - Entstehung einer Kraft-Abstands-Kurve. Die Spitze wird über der zu untersuchenden Probenstelle positioniert (1). Daraufhin wird sie angenähert (blaue Linie, 2). Übertrifft die anziehende Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze die Rückstellkraft des Cantilevers, so biegt sich letzter zur Probe hin (Snap-On, 3). Die auf den Cantilever wirkende Kraft ist nun negativ. Mit weiterer Annäherung der Spitze zur Probe nehmen die abstoßenden Kräfte immer mehr zu, schließlich gleichen sich attraktive und repulsive Kräfte aus (4). Die auf den Cantilever wirkende Kraft steigt linear mit fortlaufender Annäherung an. An einem gewissen Punkt wird die Annäherung gestoppt, damit die Spitze nicht beschädigt wird (5). Die Spitze wird nun zurückgezogen (rote Linie). Die Kraft zwischen Spitze und Probe nimmt linear ab und fällt auf null (6). Wird die Spitze weiter zurückgezogen, überwiegen die attraktiven Wechselwirkungen. Hinzu kommen Adhäsionskräfte. Sobald die Rückstellkraft des Cantilevers die Adhäsionskräfte übersteigt, springt die Kraft schlagartig auf null. Die minimale Kraft entspricht der Adhäsionskraft zwischen Probe und Spitze (7). Letztlich ist die Kraft wieder null (8). Die Adhäsionskraft lässt sich aus dem Minimum der Retraktionskurve ablesen, das Elastizitätsmodul der Probe aus der linearen Steigung des Kontaktbereichs. Der Energieverlust durch Verformung und Wärmeerzeugung (Dissipation) wird aus der Fläche zwischen Extinktions- und Retraktionskurve berechnet. Das Aussehen der Kurve kann variieren (siehe Abbildung 7).

Rasterkraftmikroskopie

Bereich (4). Die Steigung der Kraft ist hier näherungsweise linear und hängt von den mechanischen Eigenschaften der Probe ab. Eine zu hohe Kraft kann zur Beschädigung des Cantilevers führen. Ab einer zuvor festgelegten Position der Spitzenhöhe (5) wird der Cantilever zurückgezogen (Retraktion). Dabei sinkt die Kraft wieder (6). Wird während der Indentation viel Energie durch Verformung der Probe oder ähnliche Effekte umgewandelt, so können die beiden Steigungen sehr unterschiedlich sein. Erreicht die Spitze den Bereich, in dem die attraktiven Kräfte dominieren, so ist die Kraft wieder negativ (7). Neben diesen Kräften wirkt außerdem eine Adhäsionskraft, die abhängig von der Beschaffenheit der Probe ist. Diese kann die Haftung der Spitze an der Probe deutlich erhöhen und spielt eine große Rolle in der Berechnung des Elastizitätsmoduls der Probe (s. Kapitel 1.8.4). Überwiegt die Rückstellkraft des Cantilevers die attraktiven Kräfte und Adhäsionskräfte, so kommt es zu einer Loslösung von der Probe (*Snap-Off*). Die Cantilever-Auslenkung befindet sich nun wieder nahe seines Ausgangszustands (8).

Die Kraftspektroskopie ist die gebräuchlichste Methode. Hier wird zuerst eine Topografie der Probe aufgenommen. Danach werden an ausgesuchten Punkten Kraftkurven aufgenommen, die dann im Nachhinein ausgewertet werden können (s. Kapitel 1.8).

2010 stellte die Firma *Bruker Corporation* die Methode *PeakForce Tapping*[®] vor.^[28] Es handelt sich um eine abgewandelte Art des intermittierenden Modus. Die Spitze wird hier jedoch in einer Frequenz angeregt, die weit unter ihrer Resonanzfrequenz liegt (bei 1 – 10 kHz), um die Filterwirkung zu minimieren. Während jedes Zyklus der sinusoidalen Cantilever-schwingung drückt die Spitze mit einer geringen Kraft im unteren pN-Bereich in die Probe rein und nimmt eine Kraft-Abstands-Kurve auf. Im Gegensatz zu einer normalen Kraft-Abstands-Kurve verläuft die Messung jedoch nicht mit konstanter Indentationsgeschwindigkeit, da die Bewegungsform der Spitze kreisförmig ist. Die maximale Kraft, mit der die Spitze in die Probe gedrückt wird, heißt *PeakForce* und ist durch den Benutzer anpassbar. Eine größere *PeakForce* führt zu besseren Ergebnissen, allerdings auch zu höherer Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze und einhergehender Beschädigung oder Verschleppung der Probe.

Aus den Kraftkurven werden die mechanischen Eigenschaften extrahiert und neben der Topografie als Karte dargestellt. So wird eine komplette Übersicht der mechanischen Eigenschaften im gemessenen Bereich erhalten. Dadurch, dass die auf die Probe angewandte Kraft um 2 bis 3 Größenordnungen kleiner ist als im konventionellen intermittierenden Modus, eignet sich dieser Modus besonders auch für biologische Proben.

PeakForce Tapping® löst den im Jahre 1992 eingeführten *Force Volume Modus* ab, bei dem über einen gewählten Probenbereich mit eingestellter Auflösung an jedem Punkt eine Kraft-Abstands-Kurve aufgenommen und gespeichert wurde. Aus diesen wurden nicht nur mechanische Eigenschaften, sondern auch das Höhenprofil der Probe berechnet. Nachteil dieser Messung ist der hohe Zeitaufwand. So kann eine Messung bei einer Auflösung von 486 mal 486 Datenpunkten knapp drei Tage dauern. Daneben wirken große Kräfte zwischen Probe und Spitze, was nicht nur zu Schädigung, sondern auch zur Verschleppung der Probe führen kann.

Die Auflösung im PeakForce Tapping® und in der Kraftspektroskopie kann in dem in dieser Arbeit verwendeten System bis zu 4096 mal 4096 Datenpunkte betragen und dauert so üblicherweise etwa 4,5 Stunden. Der Vorteil des PeakForce Tappings® ist dabei vor allem die synchrone Messung der mechanischen Eigenschaften. Bei der Kraftspektroskopie kann es aufgrund der sequentiellen Messung vorkommen, dass nicht vollkommen immobilisierte Proben, wie zum Beispiel Nanopartikel, nach der Messung der Topografie nicht mehr an der zuvor gemessenen Stelle liegen und bei der Aufnahme einer Kraft-Abstands-Kurve das Partikel nicht genau getroffen wird. Der gleiche Effekt kann bei einer ungenauen Kalibrierung der Scanner-Piezoelemente auftreten. PeakForce Tapping® hat jedoch den Nachteil, dass die aufgenommenen Kraft-Abstands-Kurven nicht gespeichert werden. Sie können daher nicht zur nachträglichen Auswertung über mechanische Modelle verwendet werden, die die Software des Systems nicht unterstützt.

1.6. Auswahl des Cantilevers

Cantilever werden mittels Ätztechnik hergestellt und bestehen aus einer dicken Substratfläche, an der sich eine oder mehrere Biegefeder befinden.^[47] Diese können unterschiedliche Geometrien aufweisen. Am freien Ende der Biegefeder ist auf der unteren Seite eine Messspitze angebracht, die bei der Messung hauptsächlich an der Wechselwirkung mit der Probe beteiligt ist. Die Biegefeder ist auf der Rückseite oftmals mit Gold beschichtet, um die Reflektion des einfallenden Lasers zu verbessern. Häufig wird die Biegefeder selbst vereinfacht als Cantilever bezeichnet.

Jede zu untersuchende Probe stellt andere Bedingungen an Messumgebung, Messmethode und Eigenschaften des Cantilevers. Seine Auswahl muss daher sehr bedacht getroffen werden. Die generellen Anforderungen an einen Cantilever beziehen sich auf seine chemische Inertheit und

Rasterkraftmikroskopie

mechanische Beständigkeit. Das vorzugsweise reaktionsträge Material wird während der Messung meist stark mechanisch beansprucht und sollte daher eine hohe Härte haben. Außerdem darf es nicht elastisch sein, da es sonst das Messergebnis verändern könnte. Ein Material, das häufig verwendet wird, ist ein Silizium/Siliziumnitrid-Gemisch.^[48] Siliziumnitrid weist wenig Defekte bei hoher Bruchzähigkeit auf und besitzt somit eine der höchsten Festigkeiten unter den ingenieurkeramischen Werkstoffen. Daneben hat es einen geringen Wärmeausdehnungskoeffizienten und einen kleinen Elastizitätsmodul. Ähnliche Eigenschaften mit einer noch höheren Festigkeit zeigen Diamant-Spitzen.^[49,50] Allerdings sind diese schwieriger zu verarbeiten und teurer als Si/Si₃N₄-Spitzen. Speziell dotierte oder beschichtete Spitzen können dem Cantilever weitere nützliche Eigenschaften wie Magnetisierbarkeit oder elektrische Leitfähigkeit verleihen.

Eines der wichtigsten Kriterien bei der Auswahl des richtigen Cantilevers ist seine Federkonstante. Diese wird durch die Geometrie des Cantilevers bestimmt und kann zwischen 0,01 und mehreren 100 N/m liegen.^[51,52] Je höher die Federkonstante ist, desto steifer ist der Cantilever, da nach dem Hook'schen Gesetz (s. Gleichung 15) mehr Kraft für eine bestimmte Auslenkung benötigt wird. Cantilever mit kleinen Federkonstanten sind sehr empfindlich gegenüber wirkenden Kräften. Sie werden oft für die Untersuchung biologischer Proben genutzt.^[53-55] Hohe Federkonstanten sind beispielsweise für die Charakterisierung von Höhenunterschieden im pm-Bereich an einer harten Probe sinnvoll.^[56-58]

Die Spitzen der Cantilever haben meist die Form eines abgestumpften Kreiskegels. Die Abstumpfung wird näherungsweise als kugelförmig betrachtet und hat einen Spitzenradius R_s im unteren nm-Bereich. Diese Form der Spitze führt dazu, dass gewisse Probenstrukturen nicht richtig dargestellt werden können (s. Kapitel 1.7). Für spezifische Anforderungen gibt es spezielle Spitzen, die beispielsweise verbreitert flach oder atomar enden.

1.7. Artefakte

Das Messprinzip der Rasterkraftmikroskopie ermöglicht dreidimensionale Probencharakterisierung mit höchster Auflösung. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch Vorsicht geboten. Es sollte das Messprinzip stets im Hinterkopf behalten werden, da regelmäßig Fehlabbildungen, sogenannte *Artefakte*, unterlaufen können. Ein häufig auftretendes Artefakt ist die Abbildung der Messspitze anstelle der Probe. Dieser Effekt wird als *Filterwirkung* bezeichnet. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 6 A) eine Probe gezeigt, bei der auf ebener Grundfläche eine atomar dünne Schicht aufgestapelt ist. Rastert nun die Spitze über diese Schicht, so ist es für die Spitze aufgrund ihrer Geometrie nicht möglich, diese scharfe Kante abzubilden. Stattdessen fährt sie entlang ihrer eigenen Geometrie darüber. Das Bild, das als Messergebnis erscheint, zeigt aufgrund dessen die Form der Spitzenoberfläche. Eine andere Betrachtungsweise dieses Vorgangs ist das Abrastern der atomaren Probenschicht über die Spitze. Beides führt physikalisch gesehen zum gleichen Ergebnis. Dieses Phänomen tritt relativ häufig auf und führt beispielsweise zu einer verbreiterten Ansicht gemessener Nanopartikel. Dem kann mittels Messung der Spitzengeometrie oder Benutzen einer geeigneten Spitze entgegengewirkt werden.

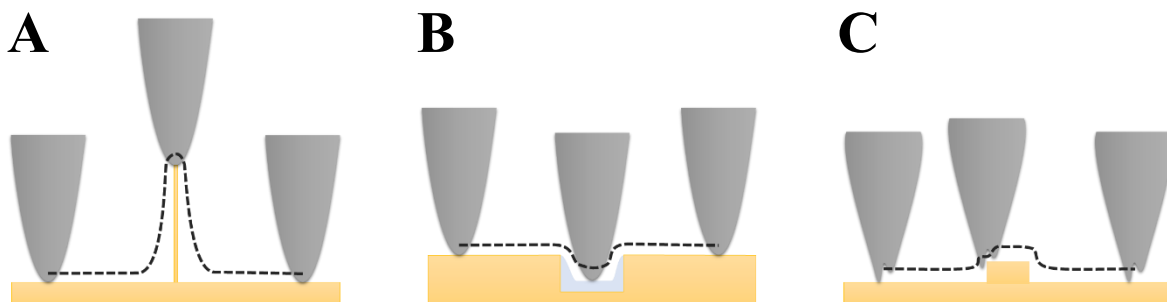


Abbildung 6 - Mögliche Artefakte bei Rasterkraftmikroskopie-Messungen. A) Eine theoretische, einatomige, vertikale Wand wird von der Spitze fehlerhaft abgebildet, da diese den Weg ihrer Spitzengeometrie entlangfährt. B) Kapillarkräfte können den Kontakt der Spitze zur Probe beeinträchtigen. C) Eine Doppelspitze führt zur doppelten Abbildung von Kanten.

Ein weiteres Artefakt kann auftreten, wenn durch Reibung elektrostatische Abstoßung zwischen Spitze und Probe auftreten. Besonders im Kontaktmodus und bei schneller Bewegung kann dieses Phänomen zu veränderten Messergebnissen führen. Hier ist es sinnvoll, die Probe zu erden.

Ebenso können Kapillarkräfte verfälschte Messdaten verursachen. Bei der Messung hydrophiler Probenoberflächen an Luft legt sich ein Wasserfilm über die Probe und in Löcher

Rasterkraftmikroskopie

oder an Kanten. Abbildung 6 B) zeigt den von der Spitze zurückgelegten Weg. Je nach eingestellter Kraft, die zwischen Spitze und Probenoberfläche wirken soll, kann der Wasserfilm fälschlicherweise als Probenoberfläche scheinen. Doch selbst mit höherer Kraft beeinflussen diese kapillaren Wechselwirkungen das Messergebnis. Besonders im intermittierenden Modus oder PeakForce Tapping®, wo die Spitze ständig in den Wasserfilm hinein und wieder austritt, ist das Messergebnis häufig nicht brauchbar. Wenn möglich kann hier komplett in Wasser gemessen werden. Ist dies nicht möglich, so sollte in Vakuum, bei höherer Temperatur oder in der Nähe eines Trockenmittels gemessen werden, um die Bildung eines Flüssigkeitsfilms zu minimieren.

Ein deutlich sichtbares Artefakt ist die doppelte Abbildung von Kanten (s. Abbildung 6 C). Diese kann zwei Ursachen haben. Bei zu häufigem Gebrauch einer Messspitze kann es zu ihrer Beschädigung kommen. In manchen Fällen bildet sich eine Doppelspitze. Beim Abrastern einer Probenkante fahren beide Spitzen der Messspitze über die Kante. Folglich wird eine doppelte Kante dargestellt. In diesem Fall ist das Auswechseln des Cantilevers erforderlich.

Ein anderer Grund kann die unzureichende Fokussierung des Laserstrahls auf dem Cantilever sein. Bei stark reflektierenden Probenoberflächen (zum Beispiel durch Goldbeschichtung) kann die Probe den Laserstrahl reflektieren, wenn dieser nicht gut genug ausgerichtet ist. Fällt die Reflektion des Strahls von der Probe auf die Photodiode, dann kommt es zu zwei Messsignalen auf der Diode, die das Ergebnis verfälschen können. Häufig kommt es auch hier zu einer doppelten Abbildung von Kanten. Die Ausrichtung des Laserstrahls mit Minimierung der Standardabweichung der auf der Photodiode gemessenen Laserposition behebt das Problem.

1.8. Auswertung von Kraft-Abstands-Kurven

Aus aufgenommenen Kraft-Abstands-Kurven lässt sich auf einige mechanische Charakteristika der Probe schließen.^[9,46,59,60] Abbildung 7 zeigt typische Kraft-Abstands-Kurven unterschiedlicher Arten von Proben.

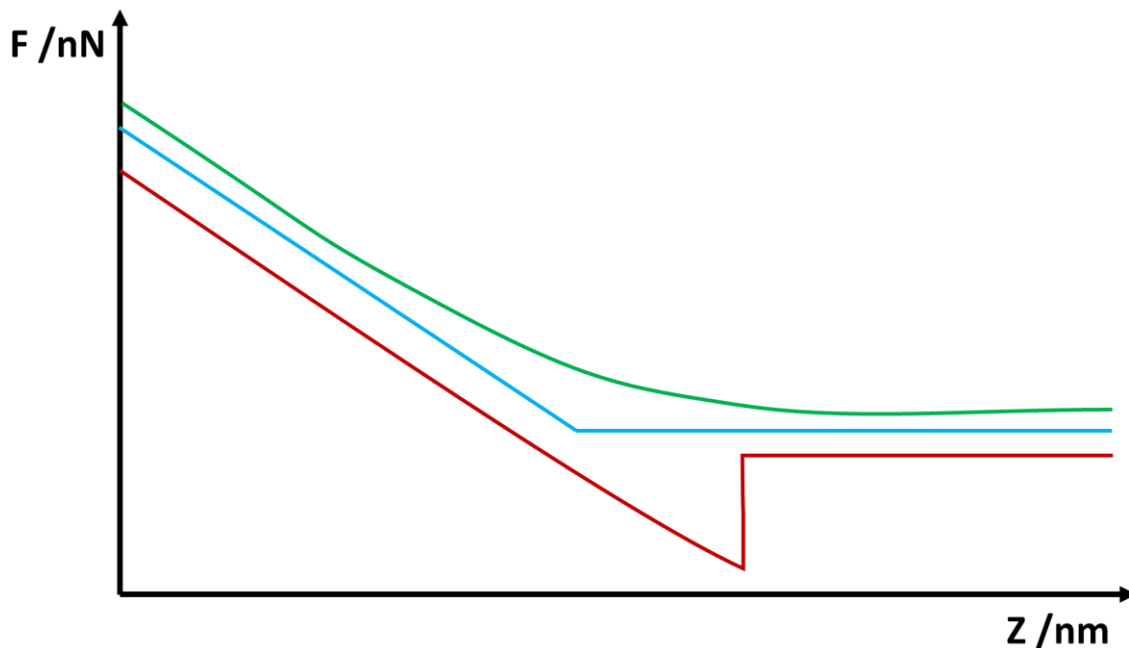


Abbildung 7 - Retraktionskurven unterschiedlicher Proben. Die rote Linie zeigt Adhäsionskräfte zwischen Probe und Spitze, die blaue zeigt eine Probe ohne Adhäsionskräfte. Die grüne Kurve zeigt eine Probe mit weitreichenden attraktiven Kräften und elastischem Verhalten der Probe.

Sowohl Adhäsionskräfte als auch Energiedissipation und Deformation der Probe sind relativ leicht zu berechnen. Für die Untersuchung von Elastizitätsmoduln bedarf es dagegen theoretischer Kontaktmechanismus-Modelle, die von den Umständen der Messung abhängig sind. Vereinfacht wird bei allen Modellen, die hier erwähnt werden, ein symmetrischer, geometrischer Körper vorausgesetzt, der auf eine ebene Fläche drückt. Dies ist insofern annehmbar, als dass es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Cantilevern um kegelförmige Messspitzen handelt, die am Spitzenende abgerundet sind und in Annäherung eine Symmetrieachse aufweisen. Der Krümmungsradius der Spitze ist außerdem meist um ein Vielfaches kleiner als der mögliche Krümmungsradius der Probe, weshalb die Probenoberfläche näherungsweise als eben gesehen werden kann.

1.8.1. Adhäsionskraft

Die Adhäsionskraft beschreibt die Kraft, mit der die Grenzschichten zweier Körper zusammenhalten.^[61] Sie ist nicht völlig auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen zurückzuführen und bis heute noch nicht ganz verstanden. Es existieren verschiedene Theorien über die Adhäsion. So besagt die Theorie der mechanischen Adhäsion, dass sich Moleküle ineinander verhaken und beim Trennen der Körper erst entknotet werden müssen. Dies erklärt jedoch nicht die Adhäsionswechselwirkung bei sehr glatten Körpern. De Bruyne^[62] führte Adhäsionskräfte auf den Dipolcharakter der Moleküle zurück. Diese Theorie ist jedoch wiederum auf polare Substanzen beschränkt. Auch die von Derjagin vorgeschlagene elektrostatische Theorie beschränkt sich nur auf gewisse Proben, bei denen Ladungsträger anwesend sind, um eine elektrische Doppelschicht um die Körper zu bilden. Daneben existiert die Adsorptions- und Benetzungstheorie von Zisman et al.^[63,64], nach der feste Körper durch einen Flüssigkeitsfilm bedeckt werden. Die Adhäsionskräfte zwischen zwei Körpern hängen demnach vom Bedeckungsverhalten der Flüssigkeitsfilme zwischen ihnen ab. Die Diffusionstheorie von Voyutskij^[65] legt die Brownsche Molekularbewegung zugrunde. Demnach diffundieren zwei Körper ineinander. Die vorgeschlagenen Theorien ergänzen sich gegenseitig. Adhäsionskräfte bestehen wahrscheinlich aus der Summe dieser ganzen Effekte und führen dazu, dass zwei Körper über ihre üblichen Van-der-Waals-Wechselwirkungen hinaus aneinanderhaften können.

Wird eine Kugel in eine ebene Oberfläche eingedrückt, so wirken zuerst attraktive Wechselwirkungen, bevor die Repulsion dominiert. Im Zuge der Abstoßung wird der Cantilever aus seiner Ruheposition ausgelenkt. Wird die Spitze zurückgezogen, so wird sie den Kontakt zur Probe bei Vernachlässigung der Adhäsionskräfte bei etwa der gleichen anziehenden Kraft verlieren, bei der sie in Kontakt zur Probe getreten ist. Wirken jedoch Adhäsionskräfte, dann ist die Kraft, die infinitesimal vor Kontaktverlust auf die Spitze wirkt, größer als die beim Ranfahren der Spitze gemessene attraktive Wechselwirkung. Die Adhäsionskraft, die zwischen Spitze und Probe wirkt, ist gleich der Summe der anziehenden Wechselwirkungen kurz vor Kontaktverlust. Sie kann nach Basislinienkorrektur der Kraft-Abstands-Kurve aus dem Minimum der Retraktionskurve abgelesen werden.^[46,59,60]

1.8.2. Dissipation

Als Dissipation wird der Übergang von Energie in eine andere Energieform, meist thermische Energie, bezeichnet.^[66] Sie kann bei der der Indentation verschiedene Ursachen haben, darunter Reibung und Verformung der Probe. Die Dissipation berechnet sich aus der Differenz der

Arbeit, die während der Extension verrichtet wird, zu der, die während der Retraktion verrichtet wird. Dazu werden die Integrale der Kraft-Abstands-Kurve für die Extension und die Retraktion voneinander subtrahiert. Die Differenz entspricht der Dissipation.

1.8.3. Deformation

Die Deformation der Probe ist ihre Verformung aufgrund einer äußeren Kraft.^[67,68] Sie ist bei elastischen Proben reversibel. Bei unelastischen Proben kann sie unter Dissipation zu dauerhafter Änderung der Form führen. Ihr Wert beträgt die Weglänge vom Kontaktpunkt der Spitze zur Probe bis zur maximalen Indentation. Die Bestimmung des Kontaktpunkts ist jedoch nicht immer eindeutig und mit Schwierigkeiten verbunden.

1.8.4. Elastizitätsmodul

1.8.4.1. Der Elastizitätsmodul

Der *Elastizitätsmodul* ist ein Materialkennwert, der das Verhalten eines Werkstoffs in seinem elastischen Bereich beschreibt.^[69] Bei makroskopischen Materialien wird er im sogenannten *Zugversuch* geprüft. Dabei wird ein Stab, der aus diesem Werkstoff besteht und dessen geometrische Abmessungen bekannt sind, in eine Zugprüfmaschine eingespannt, die eine Kraft entlang seiner Hauptachse auf ihn ausübt und ihn zu beiden Seiten hin auseinanderzieht. Im *Spannungs-Dehnungs-Diagramm*^[70] wird die Spannung σ über die Dehnung ε aufgetragen. Die Spannung berechnet sich durch Dividieren der angelegten Kraft F durch den Querschnittsdurchmesser S_0 des Stabs vor Belastung. Zur Bestimmung der Dehnung wird die durch die angewandte Kraft resultierende Längenänderung ΔL des Stabs entlang seiner Hauptachse durch die Länge L_0 des Stabs vor Belastung geteilt. Abbildung 8 zeigt ein typisches Spannungs-Dehnungs-Diagramm. Im ersten Teil verhalten sich Spannung und Dehnung proportional zueinander. Dieser Bereich wird als *linear-elastischer Bereich* bezeichnet. Hier ist die Verformung des Stabs noch reversibel. Ein Lösen der Kraft führt also dazu, dass der Stab wieder seine ursprüngliche Form annimmt. Die Proportionalitätskonstante zwischen Spannung und Dehnung, also die Steigung des linearen Bereichs, entspricht dem Elastizitätsmodul E (s. Gleichung 28). Er hat die Einheit Pascal.

$$E = \frac{\varepsilon}{\sigma} = \frac{L/L_0}{F/S_0} \quad (28)$$

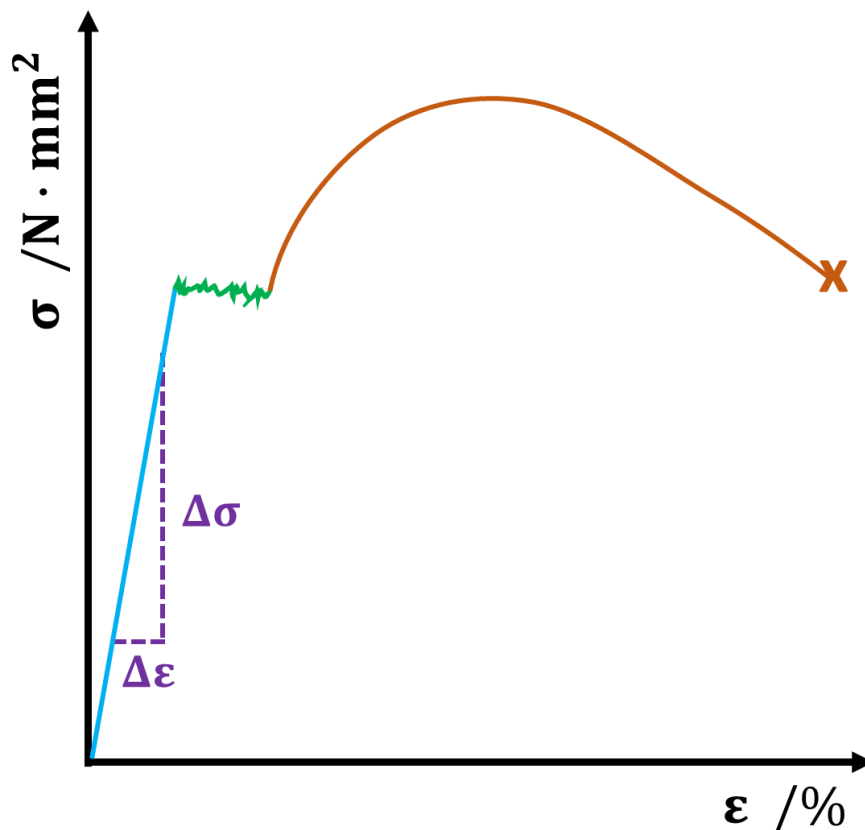


Abbildung 8 - Spannungs-Dehnungsdiagramm nach Zugversuch. Beim Zug an einem Werkstoff verhält sich die Spannung vorerst linear zur Dehnung. Dieser Bereich wird als Hook'scher Bereich oder linear-elastischer Bereich bezeichnet (blaue Linie). Hier zeigt der Werkstoff komplett elastisches Verhalten. Werden die Kräfte wieder gelöst, so kehrt der Werkstoff wieder in seinen Ursprungszustand zurück. Wird er jedoch über den linear-elastischen Bereich hinaus gedehnt, kommt es zu Deformierungen, die nicht mehr reversibel sind. Der Werkstoff befindet sich zunächst in einem Fließbereich (grün, gilt nicht für alle Werkstoffe). Danach steigt die Spannung wieder an, fällt aber im weiteren Verlauf ab. Irgendwann bricht der Werkstoff.

Bei Nanomaterialien ist es meist nicht möglich, einen Zugversuch durchzuführen. Stattdessen lässt sich der Elastizitätsmodul aus Kraft-Abstands-Kurven extrahieren (s. Kapitel 1.8.4). Auch hier dient der lineare Anstieg der Kurve der Auswertung des Elastizitätsmoduls. Allerdings muss die Kurve zuvor modifiziert werden. Im Folgenden sollen die verschiedenen Modelle, die es zur Berechnung von Kraft-Abstands-Kurven gibt, erläutert werden.

1.8.4.2. Theoriemodelle

i. Nicht-adhäsive Kontaktmodelle

Bereits im Jahr 1880 beschrieb Heinrich Hertz^[71] das mechanische Verhalten zweier Kugeln oder einer Kugel und eines Halbraums, die aufeinandergedrückt werden. Dabei verbleiben beide Körper im linear-elastischen Bereich. Abbildung 9 A) zeigt diesen Fall schematisch.

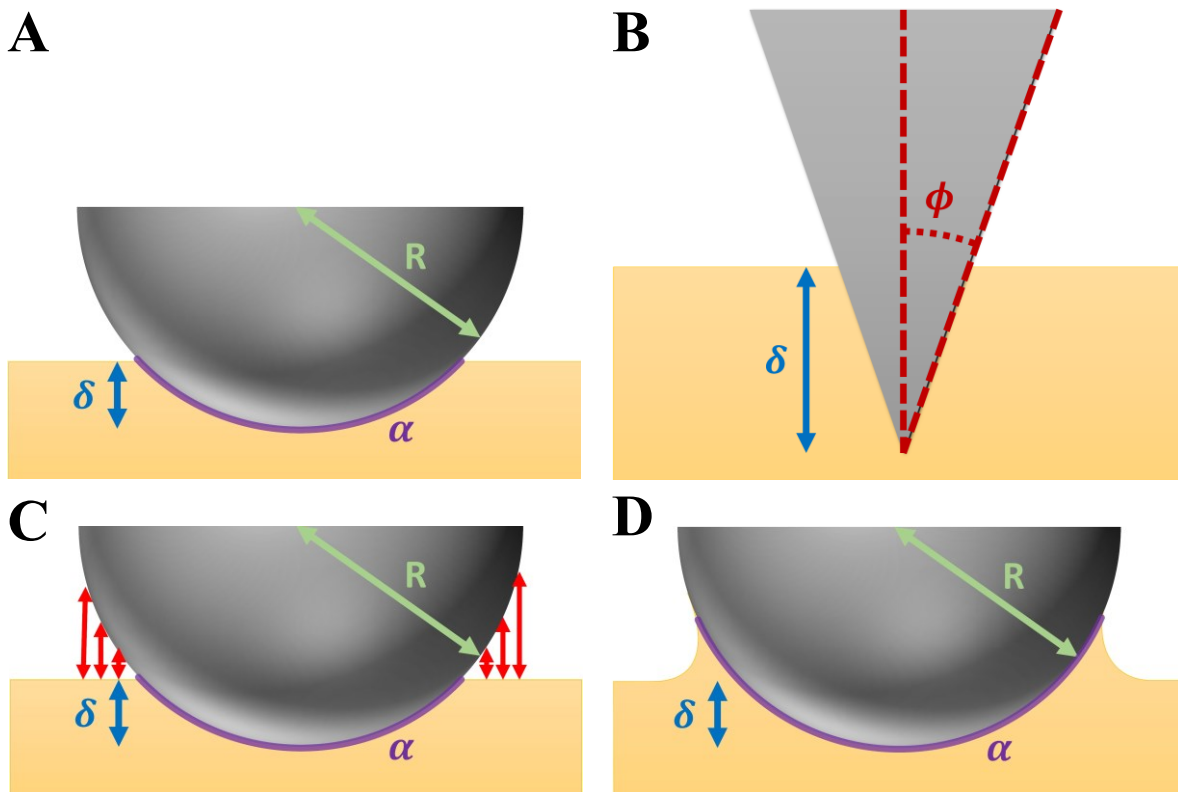


Abbildung 9 - Kontakt-Mechanik-Modelle. A) Hertz-Modell: Ein runder Prüfkörper wird in einen Halbraum gedrückt. Durch die Abhängigkeit der Eindringtiefe von der aufgewendeten Kraft lässt sich über den Radius R des Eindringkörpers, seine Eindringtiefe δ und die Kontaktfläche α berechnen bei Vernachlässigung der Adhäsionskräfte. B) Sneddon-Modell: Lösung des Kontakt-Mechanik-Modells nach Hertz für einen pyramidalen Prüfkörper bei Vernachlässigung der Adhäsionskräfte. C) DMT Modell: Lösung nach Hertz bei Berücksichtigung der Adhäsionskräfte. Dieses Modell gilt als Grenzfall bei geringer Adhäsion und vernachlässigbarer Verformung der Probe. D) JKR Modell: Lösung nach Hertz bei Berücksichtigung der Adhäsionskräfte und Verformung der Probe einschließlich wachsender Kontaktfläche.

Werden die zwei Kugeln mit Radius R_1 und R_2 mit einer Kraft F aufeinandergedrückt, so bildet sich eine Kontaktfläche α_K , die mit größer werdender Eindringtiefe δ ansteigt. Es gelten für Kontaktfläche und Eindringtiefe die Gleichungen 29 und 30.

$$\alpha = \left(\frac{3FR_{eff}}{4E^*} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (29)$$

$$\delta = \frac{\alpha_K^2}{R_{eff}} = \left(\frac{9F^2}{16R_{eff}E^{*2}} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (30)$$

Dabei sind E^* der effektive Elastizitätsmodul und R_{eff} der effektive Radius nach Gleichungen 31 und 32.

$$E^* = \left(\frac{1-v_1^2}{E_1} + \frac{1-v_2^2}{E_2} \right)^{-1} \approx \left(\frac{1-v_1^2}{E_1} \right)^{-1} \quad (31)$$

$$R_{eff} = \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^{-1} \quad (32)$$

Der Term $\frac{1-v_2^2}{E_2}$ ist in der Praxis meist viel kleiner als $\frac{1-v_1^2}{E_1}$, weshalb der zweite Term in Gleichung 31 meist in Näherung wegfällt. v ist die Poissonzahl der Materialien. Die Indices 1 und 2 zeigen die Zugehörigkeit der Eigenschaft zu Körper 1 bzw. Körper 2. Die Gleichungen 29 bis 32 sind sowohl für das Aufeinanderpressen zweier Kugeln als auch für das einer Kugel auf einen elastischen Halbraum mit ebener Oberfläche und für Kugeln mit negativem Krümmungsradius gültig. Die Abhängigkeit der Eindringtiefe von der angewandten Kraft lässt sich somit für diese Fälle durch Gleichung 33 beschreiben.^[59] Anhand dieser Beziehung lässt sich der Elastizitätsmodul aus der Steigung der Kraft-Abstands-Kurve berechnen.

$$F = \frac{4}{3} E^* R^{\frac{1}{2}} \delta^{\frac{3}{2}} \quad (33)$$

Hertz machte allerdings bei der Herleitung seines Kontaktmodells einige Annahmen:^[59,71]

1. Beide Körper sind homogen und isotrop, d.h. aus monolithischem Material ohne Oberflächenbeschichtung.
2. Die Materialien weisen linear-elastisches Verhalten auf und werden auch nur im linear-elastischen Bereich beansprucht.
3. Es wirken keine Kräfte parallel zur Oberfläche der Körper, d.h. Reibungskräfte.
4. Die Körper sind viel größer als ihre Kontaktfläche.
5. Die Körper sind viel größer als ihre Deformation.
6. Die Oberflächen weisen keine Rauigkeiten auf.
7. Es wirken keine Adhäsionskräfte zwischen den Körpern.

Obwohl in der Praxis nie alle Bedingungen erfüllt sind, stellt das Hertz-Modell für viele Fälle eine gute Näherung dar. Auf Basis dieses Modells wurden viele weitere Kontaktmodelle erarbeitet, die die Fehler, die durch die oben aufgezählten Annahmen entstehen, mehr oder weniger behandeln.

Gleichung 33 entspricht der Form der unter Hertz'schen Bedingungen allgemeingültigen Gleichung 34. Die Konstanten λ_K und β können für verschiedene Spitzengeometrien gelöst werden.^[59]

$$F = \lambda_K \delta^\beta \quad (34)$$

So löste Sneddon^[72] im Jahre 1965 die Konstanten für den Fall eines scharfen kegelförmigen Körpers mit Spitzenwinkel 2ϕ , der in einen elastischen Halbraum eindringt. Obwohl hier eine große Eindringtiefe und eine nicht abgestumpfte Messspitze vorausgesetzt werden, ist dieses Modell aufgrund der Ähnlichkeit der Messspitze zur hier verwendeten Geometrie sehr beliebt für die Extraktion des Elastizitätsmoduls aus Kraft-Abstands-Kurven. Weitere Beispiele für Lösungen von λ_K und β sind in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1 – Beispiele für Lösungen der Gleichung 34 für verschiedene Spitzengeometrien.

Modell	λ_K	β
Kugel in Halbraum (Hertz)	$\frac{1}{4R^2} \frac{1}{e(1-v^2)}$	$\frac{3}{2}$
Scharfe Kegel in Halbraum (Sneddon)	$\frac{2E \tan \phi}{\pi(1-v^2)}$	2
Scharfe pyramidale Spitze in Halbraum (Bilodeau)^[73]	$\frac{1,4906E \tan \phi}{2(1-v^2)}$	2
Abgestumpfte Pyramide (Rico et al.)^[74]	$\frac{E \tan \phi}{2^{1/2}(1-v^2)}$	2

ii. Adhäsive Kontaktmodelle

Zwar stellt das Modell nach Hertz eine gute Annäherung für viele Proben dar, jedoch weichen die Voraussetzungen für dieses Modell besonders im mikro- und nanometer-Bereich teilweise stark von der Realität ab.^[75,76] Allem voran sind es aufgrund der kleinen Kontaktflächen Adhäsionskräfte, die zwischen zwei Körpern wirken und die die Messwerte erheblich beeinflussen, wenn sie ignoriert werden. Es gibt verschiedene Modelle, die die Adhäsion zwischen zwei Körpern miteinbeziehen. Im Jahre 1975 entwickelten Derjaguin, Muller und Toporov^[77] ein Modell, das auf dem Hertz'schen Kontaktmodell basiert und in Anlehnung an ihre Namen als *DMT Modell* bezeichnet wird (Abbildung 9 C)). Um die Adhäsionskraft mit einzuberechnen, addierten sie diese zur im Hertz-Modell beschriebenen Kraft hinzu. Sie nahmen dabei an, dass sich die Adhäsionskräfte nur innerhalb der Kontaktfläche α_{DMT} und parallel zur Indentation ausbilden, während außerhalb der Kontaktfläche keine Adhäsion stattfindet. Die Kontaktfläche entspricht der Kontaktfläche, die durch Hertz beschrieben wird, und wird somit nur durch den eindringenden Körper und die Indentationstiefe δ bestimmt. So ergeben sich bei Ergänzen der Auflagekraft F um eine Adhäsionskraft $F_{adh,DMT}$ aus den Gleichungen 29 bis 33 die in den Gleichungen 35 bis 37 beschriebenen Formulierungen.

$$\alpha_{DMT} = \left(\frac{3(F + F_{adh,DMT})R}{4E^*} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (35)$$

$$\delta_{DMT} = \frac{\alpha_{DMT}^2}{R} \quad (36)$$

$$F_{adh,DMT} = 2\pi\gamma R \quad (37)$$

Hier ist γ die Grenzflächenenergie des Materials.

Fast zur gleichen Zeit stellten Johnson, Kendall und Roberts^[78] ein anderes Modell vor, das *JKR Modell* (Abbildung 9 D)). Sie gingen davon aus, dass die Kontaktfläche größer ist als die durch Hertz und DMT prognostizierte Fläche. Dies begründeten sie mit einer lokalen Deformation der Fläche nahe der Kontaktzone, die durch Adhäsionskräfte mit dem eindringenden Körper zustande kommt. Dadurch ist die Kontaktfläche α_{JKR} größer als bei Hertz oder DMT, was sich auf die Adhäsionskraft $F_{adh,JKR}$ auswirkt. Eindringtiefe δ und Kontaktfläche α_{JKR} stehen zum effektiven Elastizitätsmodul E^* und der Auflagekraft F sowie der Adhäsionskraft $F_{adh,JKR}$ in den in Gleichungen 38 bis 40 gezeigten Beziehungen.

$$\alpha_{JKR} = \left[\frac{3R}{4E^*} \left((F_{adh,JKR})^{\frac{1}{2}} + (F + F_{adh,JKR})^{\frac{1}{2}} \right)^2 \right]^{\frac{1}{3}} \quad (38)$$

$$\delta_{DMT} = \frac{\alpha_{JKR}^2}{R} - \frac{4}{3} \left(\frac{3 \cdot F_{adh,JKR}}{4E^*R} \right) \quad (39)$$

$$F_{adh,JKR} = \frac{3}{2} \pi \gamma R \quad (40)$$

Lange Zeit galten DMT und JKR als gegensätzliche Theorien, die miteinander nicht vereinbar sind, da sich die mit ihnen berechneten Werte alle unterscheiden. Tabor^[79] prognostizierte und Maugis^[80] bewies einige Jahre später, dass sowohl DMT als auch JKR für die getroffenen Voraussetzungen korrekte Theorien sind, die verschiedene Grenzfälle für unterschiedliche Probeneigenschaften darstellen. So tendieren weichere, nachgiebigere Materialien eher zu Deformation der Fläche nahe der Kontaktzone, was die Kontaktfläche erhöht. Steifere Materialien hingegen sträuben sich gegen die Verformung ihrer Oberfläche, sodass die Kontaktfläche fast ausschließlich aus direktem geometrischen Kontakt der Körper besteht. Das JKR Modell stellt also den Grenzfall einer leicht deformierbaren Oberfläche dar, bei dem starke, kurzreichende Adhäsionskräfte wirken, während DMT den Grenzfall eines sehr steifen Materials mit schwächeren Adhäsionskräften beschreibt. Die meisten Materialien fallen

allerdings zwischen die Werte aus JKR Modell und DMT Modell. Der *Tabor-Parameter* μ_T ^[79] ist ein Maß für den DMT- bzw. JKR-Charakter einer Probe. Er lässt sich nach Gleichung 41 berechnen. Das DMT-Modell ist anwendbar bei $\mu_T \leq 0,1$. Bei Werten von $\mu_T \geq 5$ ist das JKR Modell passend. Werte dazwischen haben sowohl DMT- als auch JKR-Charakter, wobei mit steigenden Werten der JKR-Charakter steigt und der DMT-Anteil sinkt.

$$\mu_T = \left(\frac{R(\Delta\gamma)^2}{E^*2r_0^3} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (41)$$

Hier ist r_0 der Gleichgewichtsabstand zwischen den Oberflächen in Kontakt. Dieser ist leider nicht direkt messbar und kann nur über das Lennard-Jones-Potenzial (s. Kapitel 1.4) abgeschätzt werden. Ebenso sind die Grenzflächenenergien nicht immer bekannt. Dennoch kann auch ohne diese Kenntnisse abgeschätzt werden, ob der Wert des Elastizitätsmoduls eher am JKR- oder am DMT-Wert liegt:

1. Nachgiebigere Materialien wie Polymere oder biologische Materialien widersetzen sich einer Deformation kaum und sind besser durch das JKR Modell untersuchbar.
2. Für adhäsivere Substanzen wie Kleber bietet sich das JKR Modell an, während bei weniger adhäsiven Substanzen wie Teflon das DMT-Modell die genaueren Ergebnisse liefert.

Aus diesen Modellen wurden noch weitere entwickelt, die sich neben der Adhäsionskraft mit weiteren Voraussetzungen des Hertz'schen Kontakts befassen.^[81–83] Diese sind jedoch eher analytischer Natur und in der Praxis kaum anwendbar, da zur Berechnung viele Materialeigenschaften bereits bekannt sein müssen.

2. Elektronenmikroskopie

2.1. Einleitung

Mit der Entwicklung des Lichtmikroskops, die besonders im 17. Jahrhundert einen großen Aufschwung erfuhr^[84], kam eine Vielfalt mikroskopischer Entdeckungen zustande. Die Erforschung der damals größtenteils unbekannten Welt der Mikroskala brachte einen großen wissenschaftlichen Fortschritt mit sich. Auch heute noch wird an der Verbesserung von Lichtmikroskopen und ihrer Kombination mit anderen Messmethoden geforscht. Jedoch schränken physikalische Naturgesetze die erreichbare Auflösung ein; sie ist durch die Wellenlänge des Lichts begrenzt. Die maximale Auflösung liegt daher bei etwa 300 nm^[85], es können also im optimalen Fall zwei Punkte voneinander unterschieden werden, die einen Abstand von 300 nm haben.

Mit der Entwicklung des ersten Elektronenmikroskops durch Ernst Ruska und Max Knoll im Jahre 1932^[86] konnte diese Grenze durchbrochen werden. Elektronenmikroskope funktionieren nach dem gleichen Grundprinzip wie Lichtmikroskope. Jedoch werden anstatt Photonen Elektronen genutzt, die aufgrund des Wellen-Teilchen-Dualismus photonenähnliche Welleneigenschaften besitzen. Der Zusammenhang zwischen der Wellenlänge λ_e eines Elektrons und seiner Masse m_e und Geschwindigkeit v_e ist nach De Broglie in Gleichung 43 gegeben.^[87]

$$\lambda_e = \frac{h}{m_e \cdot v_e} \quad (43)$$

Dabei ist h das Planck'sche Wirkungsquantum mit dem Wert $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$. Die kinetische Energie E_{kin} des Elektrons kann durch Gleichung 44 erhalten werden, wenn von nicht-relativistischen Geschwindigkeiten $v_e \ll c$ ausgegangen wird, wobei c die Lichtgeschwindigkeit ist.

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m_e v_e^2 \quad (44)$$

Wird ein Elektron in einem elektrischen Feld mit der Spannung U_e beschleunigt, so ist seine kinetische Energie nach der Beschleunigung gleich der ihm zugeführten elektrischen

Elektronenmikroskopie

Energie E_{el} , die sich aus dem Produkt von Ladung des Elektrons e und Spannung des elektrischen Felds ergibt.

$$E_{el} = e \cdot U \quad (45)$$

Aus $E_{el} = E_{kin}$ folgt Gleichung 46.

$$v_e = \sqrt{2e \cdot \frac{U}{m_e}} \quad (46)$$

Die Wellenlänge eines Elektrons bei angelegter Spannung U ist durch Kombinieren der Gleichungen 45 und 46 nach Gleichung 47 berechenbar.

$$\lambda_e = \frac{h}{\sqrt{2e \cdot U \cdot m_e}} \quad (47)$$

Die Masse m_e eines Elektrons beträgt $9,109 \cdot 10^{-31}$ kg, die Elementarladung beträgt $e = -1,602 \cdot 10^{-19}$ C.^[35] Die Wellenlänge des Elektrons ist somit umgekehrt proportional zur Wurzel der Beschleunigungsspannung. Schon bei einer Spannung von 5,00 V erreicht ein Elektron eine Geschwindigkeit von 1326 km/s bei einer Wellenlänge von 0,55 nm. Heutzutage werden in Elektronenmikroskopen Hochspannungen angelegt, die, abhängig von der Bauart des Mikroskops, zu atomarer Auflösung führen können.

2.2. Aufbau eines Elektronenmikroskops

Der Aufbau des Elektronenmikroskops ähnelt dem des Lichtmikroskops. Ein Elektronenstrahl wird über Linsen auf die Probe fokussiert. Die Elektronen wechselwirken mit der Probe, geeignete Detektoren messen den Eingang transmittierender Elektronen, rückgestreuter Elektronen oder anderer Messsignale. Allerdings benötigt ein Elektronenmikroskop andere Bauteile als ein Lichtmikroskop, die prinzipiell aber die gleichen Aufgaben erfüllen. Die komplette Apparatur eines Elektronenmikroskops befindet sich in Ultrahochvakuum, damit keine Schäden an der Elektronenkanone (z. B. durch Oxidation) auftreten können und die

Elektronen im Strahl nicht mit Atomen und Partikeln der Luft wechselwirken. Zum Erzeugen des Ultrahochvakuums wird eine Turbopumpe benötigt. Die gesamte Apparatur wird auch bei Nichtgebrauch des Mikroskops unter Ultrahochvakuum gehalten.

Zur Erzeugung des Elektronenstrahls bedarf es einer *Elektronenkanone*.^[86] Freie Elektronen werden in einer Elektronenquelle vom Material gelöst und in Richtung einer ringförmigen Anode beschleunigt. Der Elektronenstrahl wird durch das Loch in der Ringanode geleitet und weitergeführt. Die Elektronenquelle besteht meist aus einem dünnen Draht aus einer Wolframlegierung, der aufgrund seiner Form auch als *Haarnadelkathode*^[88] bekannt ist. Durch Erwärmen dieser Kathode wird die Austrittsarbeit der Elektronen aus dem Material überwunden. Alternativ existieren LaB₆- oder CeB₆-Kathoden, die eine niedrigere Austrittsarbeit aufweisen.^[89] Für einen kleineren Elektronenstrahl und einer damit verbundenen höheren Auflösung bieten sich Feldemissionskathoden an. Hier werden Elektronen nur durch eine Spannung aus einer kalten sehr feinen monokristallinen Nadel rausgezogen. Nachteil dieser Methode ist der niedrige Strahlstrom.

Die Fokussierung des Elektronenstrahls funktioniert nicht über optische Linsen, da die Elektronen von den Atomkernen in der Linse gebremst und abgelenkt werden würden. Bereits im Jahre 1926 führte Hans Busch die ersten Berechnungen und Pläne zum Bau magnetischer und elektrischer Linsen ein.^[90,91] Dazu werden Windungen aus leitfähigem Material genutzt, durch deren Loch der Elektronenstrahl verläuft. Läuft ein Strom durch diese Windungen, so entsteht ein elektrisches und ein magnetisches Feld, dessen Stärke von der Stromstärke abhängt.

Durch diese Felder werden Elektronen im Elektronenstrahl gebündelt (*Kondensorlinsen*) und abgelenkt (*Ablenkspulen*). Elektrische Felder wirken aufgrund der elektrostatischen Anziehung, während ein magnetisches Feld die Elektronen aufgrund der Lorentzkraft senkrecht zum Feld ablenkt. Auf diesen Prinzipien gibt es in der *Elektronenoptik* Äquivalente zu den lichteoptischen Elementen. Zylindersymmetrische magnetische oder elektrische Felder entsprechen Linsensystemen, parallele, elektrisch geladene Platten entsprechen Prismen und auch Spiegel sind durch spezielle Platten realisierbar.^[89] Im Elektronenmikroskop werden Lochblenden als Linsen genutzt, die den Elektronenstrahl gezielt ablenken und fokussieren. Die Brennweite einer Linse ist dabei durch die eingestellte Feldstärke regelbar, sodass Linsen im Gegensatz zu optischen Linsen nicht gewechselt werden müssen, um die Brennweite zu ändern.

Die Probe muss fest im Probenhalter verankert sein. Da häufig bei sehr hohen Auflösungen gemessen wird, darf es keinen Bewegungsfreiraum geben. Zusätzlich muss es das Probenhaltersystem ermöglichen, die Probe von außen in das Ultrahochvakuum einzubringen.

Elektronenmikroskopie

Dies wird beispielsweise durch eine kleine Vorkammer ermöglicht, in die die Probe gestellt wird. Des Weiteren können Probehälter weitere Funktionen aufweisen. So können sie rotieren, beheizbar sein und vieles mehr.

Zur Erfassung eines Messsignals dienen verschiedene Detektoren, die je nach Art, Betriebsmodus des Mikroskops und Ort des Detektors verschiedene Signale detektieren können. Detektoren fangen Elektronen durch eine angelegte Spannung ein. Beim Aufprall der Elektronen auf die Detektorplatte werden weitere Elektronen aus der Platte rausgelöst und auf eine nächste Platte gelenkt. Durch einen Spannungsgradienten werden somit immer mehr Elektronen beschleunigt, bis das Signal messbar wird. Ähnlich kann auch Strahlung detektiert werden. Hier werden beim Aufprallen der Strahlung auf die äußere Detektorplatte Elektronen freigesetzt.^[89]

2.3. Wechselwirkung der Elektronen mit der Probe

Trifft der primäre Elektronenstrahl gebündelt auf die Oberfläche der zu untersuchenden Probe, so erzeugen Wechselwirkungen zwischen Elektronen und Atomen der Probe eine Vielzahl unterschiedlicher Signale.^[89] Durch Streuung der Atome im Festkörper werden sie entweder abgelenkt oder abgebremst. Grundsätzlich wird zwischen *elastischer* und *inelastischer Streuung* unterschieden.

Bei der elastischen Streuung wird ein Elektron durch das elektrische Feld eines Atoms auf seiner Bahn abgelenkt. Dabei verliert es (nahezu) keine Energie. Elektronen aus dem Primärstrahl, die elastisch zurück in den Raum gestreut werden, werden als *Rückstreuelektronen* bezeichnet.

Bei der unelastischen Streuung tritt das Elektron in Wechselwirkung mit dem Atomkern oder mit anderen Elektronen, was dazu führt, dass ein Teil der kinetischen Energie des Elektrons auf das Atom übertragen wird. Je nach kinetischer Energie des Elektrons können bei einer Wechselwirkung mit einem Atom verschiedene Phänomene auftreten.

Geringe Energien des Elektrons bis zu 1 eV führen zu Anregung von Schwingungen in Molekülen oder Atomen. Bei höherer Energie bis 30 eV werden kollektive Schwingungen im Valenz- oder Leitungsband des Festkörpers angeregt, die *Plasmonen*^[92] heißen. Wird die Energie weiter erhöht, so kommt es zu Übergängen eines Elektrons des Atoms in ein höheres

Energieniveau, bei über 150 eV auch zur Ionisierung des Atoms. Durch Übertragung eines Teils der kinetischen Energie der Primärelektronen, also der Elektronen aus dem primären Elektronenstrahl, auf die inneren Elektronen des Probenatoms kann es zwischen 50 eV und 100 keV zur Entstehung von Augerelektronen^[93,94] kommen. Eine für das Atom charakteristische Röntgenstrahlung ist messbar.

Wird das Elektron hingegen nur durch das elektrische Feld des Kerns abgebremst, so emittiert es die überschüssige Energie in Form von Röntgenbremsstrahlung. Elektronen, die aus der Probe gelöst und in dem Raum entlassen werden, heißen *Sekundärelektronen*. Die Detektion von Sekundärelektronen ist eine gebräuchliche Methode zur Bildgebung. Bei genügend geringer Probendicke können Primärelektronen die Probe durchlaufen und in Detektoren unterhalb der Probe eingefangen werden. Diese Elektronen werden als *transmittierte Elektronen* bezeichnet. Die verschiedenen messbaren Signale, die durch Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe entstehen, sind in Abbildung 10 zusammengefasst.

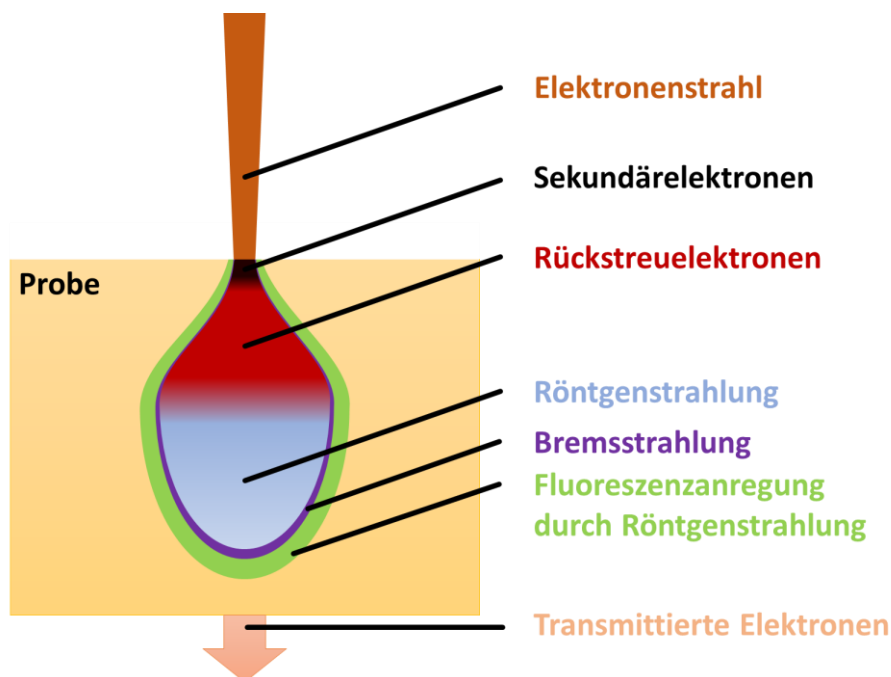


Abbildung 10 - Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probenoberfläche. Je nach Stärke der Spannung kommt es zu unterschiedlichen Wechselwirkungen. Dabei werden verschiedene detektierbare Signale freigesetzt.

2.4. Betriebsmodi

Der Bestrahlung einer Probe mit einem Elektronenstrahl können verschiedene Geräteaufbauten zugrunde liegen.

2.4.1. Rasterelektronenmikroskopie

Beim *Rasterelektronenmikroskop*^[95] (*SEM*) wird der Elektronenstrahl mittels Kondensorlinse auf einen kleinen Punkt der Probe fokussiert, woraufhin Elektronen oder Strahlung als Messsignal auftreten. Diese werden an Detektoren gesammelt, um die Wechselwirkung mit dem bestrahlten Punkt der Probe zu charakterisieren. Die Eindringtiefe der Primärelektronen in die Probe hängt hauptsächlich von der angelegten Beschleunigungsspannung ab und ist essenziell für die Oberflächensensitivität. Hochauflösende SEM-Aufnahmen sind nur durch Detektion von Sekundärelektronen möglich, die nahe der Probenoberfläche erzeugt wurden.^[96] Daher ist bei solchen Aufnahmen eine richtig eingestellte Beschleunigungsspannung von hoher Bedeutung. Durch Abrastern der Probe mit dem Primärelektronenstrahl, der über Ablenkspulen gesteuert wird, kann das Messsignal ortsabhängig ausgewertet werden. Somit entsteht beispielsweise ein Oberflächenbild. Die Rasterelektronenmikroskopie wird meist für die Untersuchung der Oberfläche dickerer Proben genutzt.

Das Eindringen der Primärelektronen in die Probe schafft ein Wechselwirkungsvolumen, das mit abnehmender Ordnungszahl der Probenatome und steigender Beschleunigungsspannung des Primärelektronenstrahls größer wird. Die maximale Eindringtiefe kann zwischen 100 nm und mehreren μm betragen.^[96] Sekundärelektronen werden nur von Atomen nahe der Oberfläche (bis etwa 10 nm Eindringtiefe) in den Vakuumraum freigesetzt. Rückstreuелеktronen hingegen können eine Eindringtiefe erreichen, die 30 % der maximalen Eindringtiefe beträgt, bevor sie durch elastische Ablenkung wieder in den Vakuumraum gelangen. Charakteristische Röntgenstrahlung und Bremsstrahlung können aus dem ganzen Wechselwirkungsvolumen heraus ausgestrahlt werden. Bei Bestrahlung der Probe in einem Winkel, der nicht senkrecht zur Oberfläche ist, nimmt die Anzahl der detektierbaren Rückstreu- und Sekundärelektronen mit dem Neigungswinkel zu. Stark geneigte Flächen weisen also eine hohe Bildhelligkeit auf. Neben dem Neigungswinkel wird der Bildkontrast aber auch durch die Position des Detektors relativ zur Probe bestimmt (s. Abbildung 11). Die Bildhelligkeit ist an der zum Detektor zeigenden Seite höher als an der von ihm abgeneigten Seite, da die Elektronen

aus der abgeneigten Seite einen längeren Weg zum Detektor haben, weniger stark angezogen werden und die Probe zwischen den Elektronen und dem Detektor stehen kann.

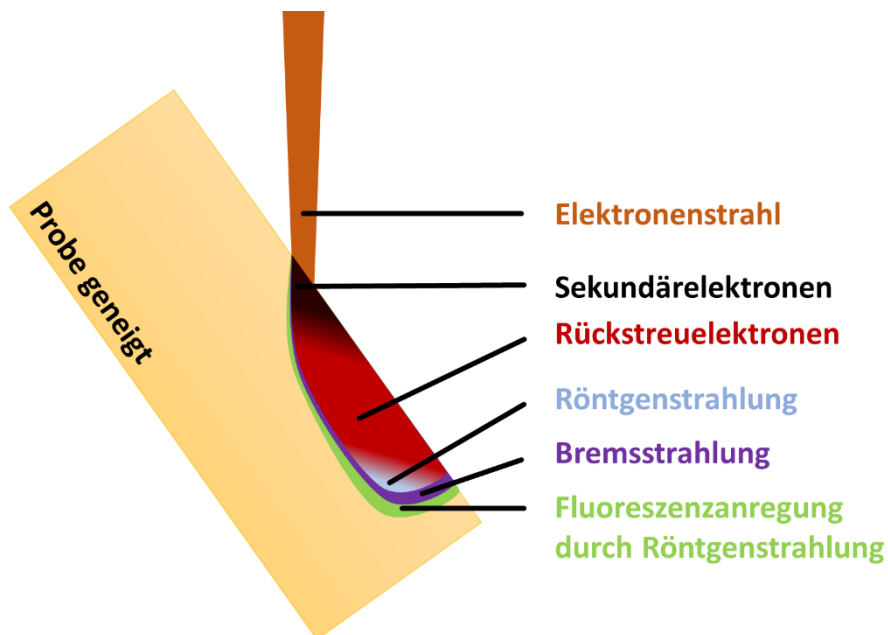


Abbildung 11 - Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit einer geneigten Probenoberfläche. Je nach Stärke der Spannung kommt es zu unterschiedlichen Wechselwirkungen. Dabei werden verschiedene detektierbare Signale freigesetzt. Durch die Neigung ist die Wechselwirkungsbirne nicht symmetrisch.

Ein weiterer den Bildkontrast beeinflussender Effekt ergibt sich aus der Ordnungszahl des Probenmaterials. Während für Sekundärelektronen eine komplizierte Abhängigkeit von Bindungsverhältnissen und Atomenergien zur Beschleunigungsspannung und weiteren Probeparametern besteht, steigt für rückgestreute Primärelektronen das Signal mit steigender Ordnungszahl Z der Atome an. Allerdings müssen hier auch die anderen Kontrasteffekte berücksichtigt werden.

2.4.2. Transmissionselektronenmikroskopie

Beim *Transmissionselektronenmikroskop*^[86,96] (TEM) werden Elektronen erfasst, die durch eine ausreichend dünne Probe transmittiert sind. Das erforderliche Maximum der Probendicke sinkt dabei mit steigender Ordnungszahl der Probenatome sowie mit abnehmender Beschleunigungsspannung der Primärelektronen. Zur Bestimmung der Elemente sowie ihrer Konzentration und Verteilung in der Probe lassen sich hier weitere Detektoren sinnvoll anbringen, wie zum

Elektronenmikroskopie

Beispiel ein EDX-Detektor für die energiedispersive Röntgenanalyse.^[96] Ein TEM kann so gebaut werden, dass es, ähnlich wie beim SEM, den Elektronenstrahl fokussiert und die Probe abrastert. Diese Apparatur wird dann als *Scanning TEM*, kurz *STEM*, bezeichnet.^[85]

Durch Transmissionselektronenmikroskopie lassen sich unter optimalen Voraussetzungen sehr hohe Auflösungen von wenigen hundertstel Nanometern erreichen. Der Probenkontrast lässt dabei auf die Dicke und Dichte der Probenposition schließen. So lassen dichtere, dickere Stellen weniger Elektronen transmittieren, was zu einem dunkleren Bild führt.

2.5. Linsenfehler

Eine falsche Einstellung der Linsen kann bei der Elektronenmikroskopie zu einer fehlerhaften Bilddarstellung führen. *Sphärische Aberration*^[97] tritt auf, wenn achsennahe Primärelektronen eine andere Brennweite haben als achsenferne Primärelektronen. Folglich weichen ihre Foki voneinander ab. Elektronen, die unterschiedliche Energien haben, unterscheiden sich ebenfalls in ihrer Brennweite. Dieser Effekt ist als *chromatische Aberration*^[96,98–100] bekannt. Blenden können in beiden Fällen helfen, um bestimmte Elektronen abzuschirmen.

Dadurch, dass rotationssymmetrische Spulenkörper immer leicht von ihrer Idealform abweichen, kann es vorkommen, dass der Fokus der horizontalebene der Linse nicht mit dem ihrer Vertikalebene übereinstimmt. Abhilfe schaffen hier zwei zueinander senkrecht stehende Zylinderlinsen.

2.6. Elektronenmikroskopie vs. Rasterkraftmikroskopie

Sowohl mit der Elektronen- als auch Rasterkraftmikroskopie existieren Messmethoden, mit denen Auflösungen bis in den atomaren Bereich möglich sind. Beide Methoden beschränken sich dabei nicht auf die Abbildung einer Oberfläche, sondern bieten die Möglichkeit, weitere Eigenschaften der Probe zu erkunden.

Beide Mikroskopiemethoden unterscheiden sich wesentlich in ihren Möglichkeiten und ihrem Arbeitsaufwand. In der Rasterkraftmikroskopie gibt es nur wenige Anforderungen an die Probe.

So darf sie eine gewisse Rauigkeit nicht überschreiten (abhängig vom Scanner). Außerdem muss, je nach Probenbeschaffenheit, auf die Wahl der richtigen Spitze geachtet werden. Proben können im Vakuum, in Flüssigkeit und an Luft untersucht werden.

Beim Elektronenmikroskop hingegen ist die Probenvorbereitung etwas komplizierter. Um Aufladungen zu vermeiden, muss die Probe elektrisch kontaktiert werden. So können Elektronen abgeleitet werden. Die Probe muss trocken sein und stabil im Ultrahochvakuum. Außerdem darf sie nicht oder nur sehr gering magnetisch sein, da sonst eine Anziehungskraft zur magnetischen Linse entstehen kann. Die Probenvorbereitung kann daher kompliziert werden. Zwar ist es möglich, biologische Proben mit dem Elektronenmikroskop zu untersuchen, jedoch können diese durch den Elektronenstrahl zerstört werden oder im Vakuum nicht stabil sein. Eine Möglichkeit, biologische Proben zu messen, bietet das Kryo-SEM^[96], bei dem die Probe in Stickstoff gefroren wird. Dies ist allerdings mit viel Arbeitsaufwand verbunden. Auch der Geräteaufwand ist beim Elektronenmikroskop komplexer, da das Mikroskop im Ultrahochvakuum betrieben wird.

Mittels Rasterkraftmikroskopie können mechanische, elektrostatische und magnetische Aufnahmen gemacht werden. Außerdem werden die Messungen in drei Dimensionen unternommen. Weitere Möglichkeiten bieten sich durch Manipulation der Probe und Nanolitografie. Auch lässt sich bei geeignetem Aufbau Leitfähigkeit messen. Leider fehlt hier die Möglichkeit der Bestimmung der in der Probe enthaltenen Elemente, die beim Elektronenmikroskop gegeben ist. Mit geeigneten Röntgenstrahldetektoren lässt sich eine Elementanalyse der Probe durchführen, der Materialkontrast der Rückstreuielektronen gibt Hinweise auf die relative Ordnungszahl der Atome.

Ein großer Vorteil der Elektronenmikroskopie ist die relativ schnelle Bildaufnahme. So lassen sich detaillierte Bilder mit Flächen bis zu über einem mm² in wenigen Minuten erhalten, während Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskopie mit geeigneten Scannern eine maximale Größe von 22.500 µm² haben und dazu mehrere Stunden brauchen können.

Rasterkraftmikroskopie und Elektronenmikroskopie sollten als komplementäre Untersuchungsmethoden verstanden werden. Aus beiden lassen sich unterschiedliche Erkenntnisse über eine Probe gewinnen, so dass zusammen eine sehr detaillierte Charakterisierung dieser Probe möglich ist.

3. Weitere Messmethoden

3.1. Zeta-Potenzial

Geladene Partikel, die in einem flüssigen Medium eine Suspension bilden, werden von entgegengesetzt geladenen Atomen oder Molekülen in dieser Suspension umgeben, die die Oberflächenladungen der Partikel auszugleichen versuchen. Zur Beschreibung dieses Verhaltens und der Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht wurden verschiedene Theorien entwickelt. Hermann von Helmholtz beschrieb 1853^[101–103] die Anlagerung der gelösten, entgegengesetzt geladenen Teilchen an ein Partikel. Demnach können sich solche Teilchen direkt an die Partikeloberfläche legen. Alternativ können Teilchen samt ihrer Hydrathülle an der Partikeloberfläche adsorbieren. Teilchen, die an der Oberfläche einer geladenen Ebene adsorbieren und sich dabei von ihrer Hydrathülle lösen, bilden eine Ebene, die als *Innere Helmholtzschicht* bekannt ist. Die Teilchen sind dann *spezifisch adsorbiert*. Teilchen, die samt ihrer Hydrathülle an einer solchen Oberfläche adsorbieren, bilden die *äußere Helmholtzschicht*. Das elektrische Potenzial ändert sich linear mit dem Abstand zur geladenen Oberfläche. Die Helmholtzschicht wird als *starre Schicht* bezeichnet. Dabei sind die geladenen Teilchen keineswegs immobilisiert, sondern bewegen sich parallel zur Oberfläche entlang der Helmholtzschicht.

Eine Erweiterung dieses Modells bildet das *Stern-Modell*.^[104] Demnach bildet sich um die Helmholtzschicht eine diffuse Ansammlung an Teilchen, die entgegengesetzt der Helmholtzschicht geladen sind. Diese Schicht ist sehr beweglich, ihre Wechselwirkung mit den Teilchen der Helmholtzschicht ist relativ schwach und nimmt mit der Distanz zu dieser ab. Stern schlug vor, dass das Potenzial in dieser Schicht exponentiell mit der Distanz abnimmt und bei unendlicher Entfernung gegen null geht.

Diese Schichten gleichen die Ladung der Partikel aus. Das Partikelsystem ist daher, aus weiter Entfernung betrachtet, neutral. Durch Bewegung des Partikels, beispielsweise durch ein elektrisches Feld, wirken Scherkräfte auf seine diffuse Sternschicht. Dies führt zur Abreibung dieser Schicht. Das ζ -Potenzial beschreibt das elektrische Potenzial an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in Suspension.^[105,106] Es ist ein Maß dafür, welche Kraft ein Partikel auf ein anderes ausüben kann. Partikel mit sehr hohem oder sehr niedrigem ζ -Potenzial stoßen einander ab, wenn das Vorzeichen ihrer ζ -Potenziale gleich ist, und sind daher in Lösung stabil. Eine Agglomeration findet somit nicht statt oder dauert sehr lange.

Zur Messung des ζ -Potenzials wird an die Suspension eine Spannung angelegt. Die Partikel werden entsprechend ihrer Ladung im elektrischen Feld bewegt. Mittels eines Lasers wird die elektrophoretische Mobilität U_e des Partikels, also seine Geschwindigkeit, gemessen. Dabei wird der Doppler-Effekt^[107,108] ausgenutzt. Die Beziehung zwischen elektrophoretischer Mobilität und ζ -Potenzials eines Partikels ist durch Gleichung 48 gegeben.

$$U_E = \frac{2}{3} \cdot \frac{\varepsilon \zeta \cdot f(K, a)}{\eta} \quad (48)$$

Hierbei sind ε die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und η seine dynamische Viskosität. Der Term $f(K, a)$ beschreibt die Henry-Funktion^[109-111], die eine Funktion des Partikelradius a und des reziproken Durchmessers K der elektrischen Doppelschicht ist. Nach der Smoluchowski-Näherung^[112] beträgt $f(K, a)$ maximal 1,5 (Wert für ein polares Lösungsmittel), nach der Hückel-Näherung^[113] liegt das Minimum bei 1 (Wert für ein unpolares Lösungsmittel).

Eine kolloide Suspension an Partikeln gilt generell als sehr stabil, wenn der Betrag ihres ζ -Potenzials mindestens 30 mV beträgt.^[114] Partikel mit einem ζ -Potential nahe an 0 mV neigen zur Agglomeration, also einer gegenseitigen Adsorption, um das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis zu erhöhen. Dies ist allerdings auch von anderen Faktoren wie dem pH-Wert der Lösung abhängig.^[115]

3.2. UV-VIS Messungen

Die Absorption von Strahlung bestimmter Frequenzen führt bei Atomen und Molekülen dazu, dass Elektronen, die sich in den energetisch höchstbesetzten Orbitalen befinden (bei Atomen *Valenzelektronen*, bei Molekülen Elektronen aus den *Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO)*), in das energetisch nächsthöhere, unbesetzte Orbital angeregt werden. Dieser Vorgang wird als *elektronische Anregung* bezeichnet. Die Energie des absorbierten Photons entspricht dabei der Energiedifferenz des Ausgangszustands des Elektrons und seines Zustands nach Anregung.^[116] Die Energie E_n , die ein Elektron mit *Hauptquantenzahl* n und Masse m hat, wird durch Gleichung 49 beschrieben.

$$E_n = \frac{n^2 h^2}{8mL^2} \quad (49)$$

Dabei ist h das Planck'sche Wirkungsquantum mit dem Wert $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ^[35] und L die Länge des Bewegungsfreiraums des Elektrons (abgeleitet aus dem *eindimensionalen Teilchen-im-Kasten-Modell*^[116], das hier nicht besprochen wird). Die Frequenz f , die von einem Atom oder Molekül absorbiert wird, lässt sich somit durch Gleichung 50 annähern.

$$f = (2n + 1) \cdot \frac{h}{8mL^2} \quad (50)$$

Die Frequenz liegt bei den meisten Atomen und Molekülen im ultravioletten oder sichtbaren Bereich. Gleichung 50 stellt nur eine Annäherung dar, weil sie auf dem vereinfachten Modell des Teilchens im Kasten basiert und beispielsweise Einflüsse aus der Umgebung des Atoms oder Moleküls vernachlässigt.

Mittels UV/VIS-Spektroskopie wird die Absorption eines Feststoffs oder einer Flüssigkeit, in seltenen Fällen auch eines Gases, über einen gewählten Frequenzbereich gemessen. Dazu wird annähernd monochromatische Strahlung mit einer Intensität I_0 durch die Probe geführt und trifft dann auf einen Detektor, der die Intensität I der auftreffenden Strahlung registriert. Absorbiert die Probe bei einer bestimmten Frequenz, so ist I kleiner als I_0 . Die Transmission T spiegelt das Verhältnis I/I_0 wider. Die Absorption A beträgt dementsprechend $1 - T$. Eine Absorption von $A = 0,4$ zeigt also, dass bei der gemessenen Frequenz 40 % der Strahlung von der Probe absorbiert werden. Dementsprechend erreicht 60 % der Strahlung den Detektor und die Transmission beträgt $T = 0,6$. Dabei werden Effekte wie Beugung und Reflektion der

Strahlung vernachlässigt. Bei Berücksichtigung dieser Phänomene wird der Begriff *Extinktion* E anstelle von der Absorption A verwendet. In der Chemie, besonders bei flüssigen Proben, wird aber $A \approx E$ angenommen.

Anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes^[17] (s. Gleichung 51) lässt sich durch die Absorption auf die Konzentration c eines Stoffs in der Probe schließen. Der *Extinktionskoeffizient* ϵ_λ ist dabei eine materialspezifische Konstante für die gemessene Wellenlänge λ . Sie muss vorher durch Messungen der Probe mit einer bekannten Konzentration des Analyten bestimmt werden. d steht für die Weglänge, die der Strahl durch die Probe zurücklegt. Das Lambert-Beer'sche Gesetz hat allerdings nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich der Probe Gültigkeit.

$$\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = -\epsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (51)$$

Die Aufnahme eines UV/VIS-Spektrums erfordert eine Strahlungsquelle, einen Monochromator, die Probe und einen Detektor. Als Strahlungsquelle wird für den ultravioletten Bereich meist eine Wasserstoff- oder Deuterium-Lampe verwendet, im sichtbaren Bereich bietet sich eine Wolframlampe an. Als Monochromator dient ein Prisma mit anschließender Blende mit Eintrittsspalt. Der Strahl passiert die Probe und fällt auf einen Detektor, häufig ein Photomultiplier. Anhand des Monochromators wird die Absorption über ein Spektrum an Frequenzen gemessen. Abbildung 12 zeigt ein typisches Zwei-Strahl-Spektrometer. Hier sind ein Strahlteiler sowie eine Referenzprobe und ein zweiter Detektor im Einsatz. Die Referenzprobe besteht, so gut wie möglich, aus der Matrix des zu messenden Analyten der Probe. Soweit es keinen speziellen Analyten gibt oder die Matrix zu komplex ist, wird das Lösungsmittel als Referenz genutzt. Die gemessene Absorption der Referenzprobe wird von der Absorption der Probe subtrahiert, sodass mögliche Störeffekte, die durch Matrix oder Lösungsmittel der Probe auftreten können, weitestgehend eliminiert werden. In UV/VIS-Spektren wird meist die bestimmte Absorption über die Wellenlänge aufgetragen. Moderne Spektrometer ermöglichen das Messen in Bereichen von 200 nm bis zu 1000 nm und mehr. Spezielle UV/VIS/IR-Spektrometer decken außerdem einen Großteil des Infrarotbereichs ab und ermöglichen somit die Aufnahme eines UV/VIS-Spektrometers in Verbindung mit der Untersuchung funktionaler Gruppen.

Weitere Messmethoden

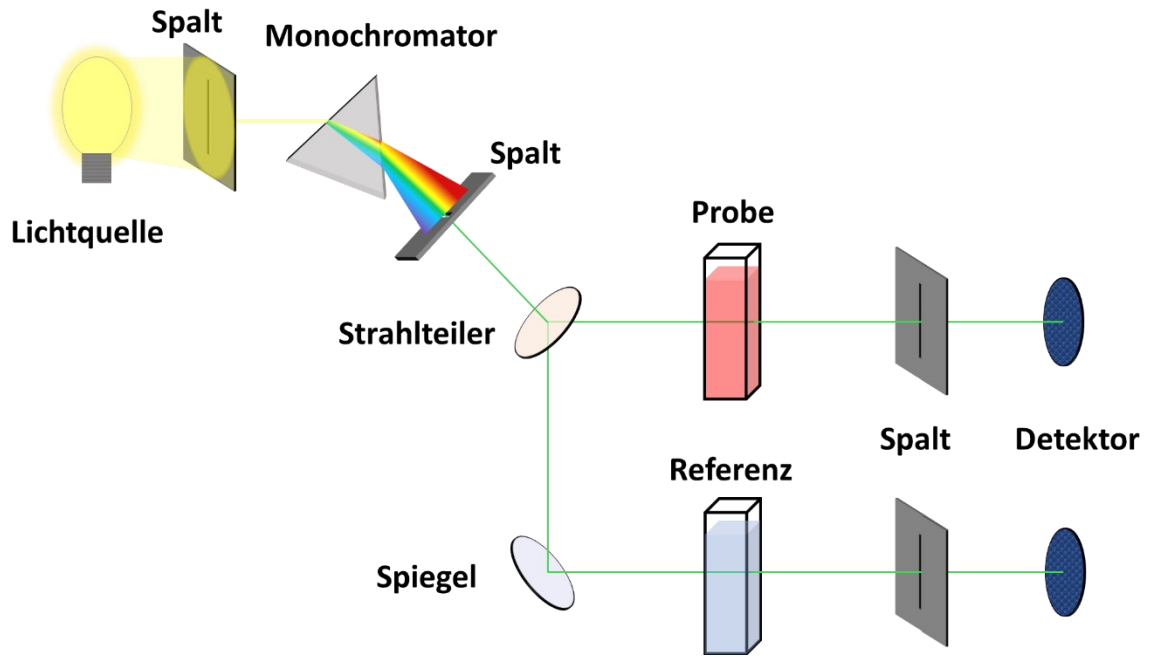


Abbildung 12 - Aufbau eines UV/Vis-Spektrometers. Das Licht der Strahlungsquelle wird über Spalte und einen Monochromator in einzelne Frequenzen aufgeteilt, die nach und nach durch Probe und eine Referenz, die die Probenmatrix erhält, geschickt. Die anschließenden Detektoren registrieren die Intensität in Abhängigkeit der Wellenlänge und berechnen dadurch die Extinktion der Probe.

3.3. Zellviabilitätstests

3.3.1. Einleitung

Bevor ein medizinischer Wirkstoff als Medikament am Menschen angewendet werden kann, muss er ein umfassendes Prüfprogramm bestehen.^[118] So muss er unter anderem auf Toxikologie (und mortale Konzentration), erbgutverändernde oder krebserregende Effekte und Embryonenschädigung getestet werden. Bevor jedoch an Lebewesen ausprobiert wird (*in vivo*), finden Prüfungen an Zellen (*in vitro*) statt. Zur *in vitro*-Überprüfung der Toxizität einer chemischen Substanz existieren verschiedene Prüfverfahren, die meist die *Zellviabilität*, also den Anteil lebender Zellen in einer Zellpopulation, direkt oder indirekt messen.

3.3.2. Resazurin-Test

Eine sehr gebräuchliche Variante ist der *Resazurin-Test*.^[119] Resazurin ist ein blauer, nicht fluoreszierender Farbstoff, der als Redoxindikator oder auch als pH-Indikator eingesetzt wird (s. Abbildung 13). Metabolisch aktive Zellen wandeln ihn durch Dehydrogenasen irreversibel in die pinkfarbige, stark fluoreszierende Substanz *Resorufin* um. Das Anregungssignal für die Fluoreszenz liegt zwischen 530 nm und 560 nm, die Emission folgt bei etwa 590 nm. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Metabolismusaktivität der Probe, welche stark mit der Zellviabilität korreliert.

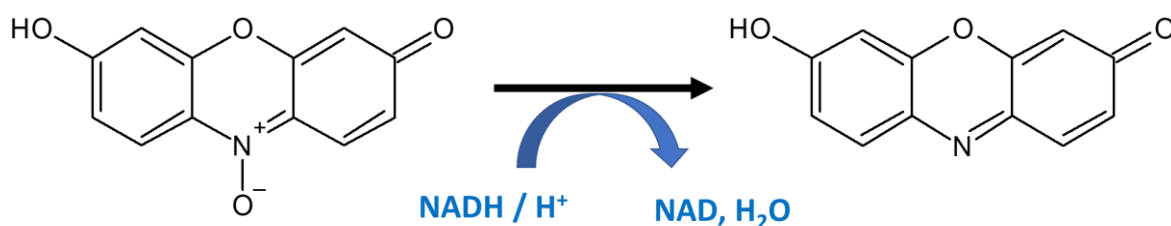


Abbildung 13 – Umwandlung des blauen Resazurins in pinkfarbenes Resorufin durch Zellmetabolismus. Die quantitative Farbänderung der Lösung lässt auf die metabolische Aktivität der Zellen schließen und somit auf ihre Vitalität.

Nachdem der zu untersuchende Wirkstoff der Zellpopulation zugefügt wurde, wird er während eines bestimmten Zeitraums einwirken gelassen. Nach diesem Wirkungszeitraum, der oft etwa 24 Stunden beträgt, wird Resazurin hinzugefügt. Nach einer weiteren Wartezeit von mehreren

Weitere Messmethoden

Stunden, während der Resazurin von den lebendigen Zellen metabolisiert wird, wird die Fluoreszenzintensität gemessen, welche Aufschluss über die Zellviabilität und somit die Toxizität der chemischen Substanz gibt.

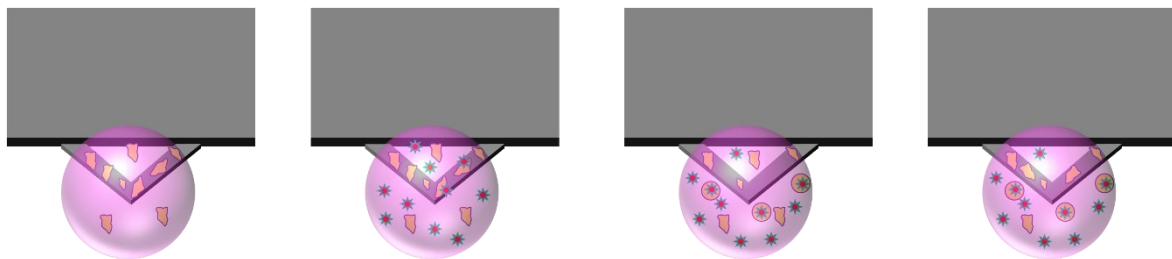
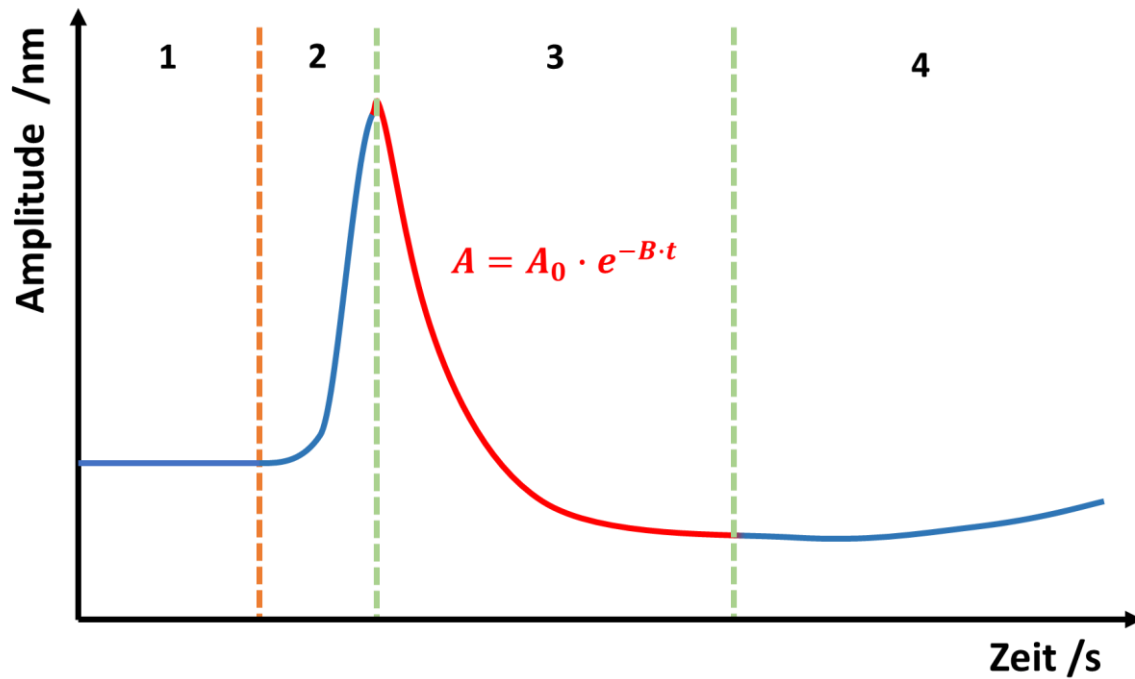
3.3.3. Echt-Zeit Viabilitäts-Test

Ein weiterer Zellviabilitäts-Test, der 2016 von Fang et al.^[120] entwickelt wurde, nutzt das Rasterkraftmikroskop, um die toxische Wirkung chemischer Substanzen in Echtzeit zu verfolgen. Hintergrund ist das Verhalten von Zellen, die nach der Apoptose, also dem selbstinduzierten, programmierten Zelltod, ihre Form verändern und sphärisch werden.^[121] Zellen, die an einer Oberfläche adsorbieren, verlieren dadurch ihren Halt an der Oberfläche und desorbieren. Die Amplitude eines bei konstanter Frequenz schwingenden Cantilevers hängt von der schwingenden Gesamtmasse sowie dem Massenschwerpunkt ab.^[122] Hängen nun vitale Zellen an der Cantileveroberfläche, so hat dieser bei einer bestimmten Frequenz f eine Amplitude A_0 . Die Gesamtmasse des schwingenden Systems besteht aus der Summe der Masse des Cantilevers und der Masse der haftenden Zellen. Toxische Substanzen führen zur Apoptose der Zellen, wodurch sie sphärisch werden und vom Cantilever desorbieren. Aus der resultierenden Änderung der Gesamtmasse des schwingenden Systems folgt die Änderung dessen Amplitude, die mit kleiner werdender Masse sinkt. Wird die Amplitude nun über die Zeit aufgezeichnet, so lässt sich anhand ihres Verlaufs auf die toxische Wirkung zu einem gewissen Zeitpunkt schließen. Abbildung 14 zeigt das Messprinzip schematisch. Die Messung findet in Lösung statt, es befindet sich keine Probe unter dem Cantilever. Zuvor werden die Zellen inkubiert, das heißt, der Cantilever oszilliert nicht und ein Tropfen, der die Zellen enthält, umhüllt den Cantilever. Nach einer Zeit werden die Zellen, die nicht adsorbiert sind, mit Medium weggespült. Die Cantileverschwingung wird eingeleitet und es wird die Amplitude des Cantilevers über einen gewissen Zeitraum gemessen (Bereich 1 in Abbildung 14). Daraufhin wird die zu untersuchende Substanz hinzugegeben (Grenze Bereich 1 zu Bereich 2). Aufgrund der Aufnahme durch die Zellen kann die Gesamtmasse des schwingenden Systems kurz ansteigen (Bereich 2). Bei toxischen Substanzen fällt die Gesamtmasse danach exponentiell ab (Bereich 3). Der Verlauf der Amplitude in diesem Bereich ähnelt dem einer gedämpften Schwingung und kann durch Gleichung 52 beschrieben werden.^[123]

$$A = A_0 \cdot e^{-B \cdot t} \quad (52)$$

Hier ist A der Wert der Amplitude zum Zeitpunkt t und A_0 der Wert bei $t = 0$. Der Zeitpunkt $t = 0$ wird per Definition auf die maximale Amplitude nach Zugabe der toxischen Substanz (bei Dämpfung der Kurve) oder direkt auf den Zeitpunkt der Zugabe (bei steigender Amplitude über die ganze Restmessung) gelegt. Der Wert für B beschreibt die Intensität der Amplitudenabnahme. Eine schnelle Abnahme der Amplitude hat hohe B -Werte zur Folge, wohingegen eine langsame Abnahme der Amplitude in kleinen B -Werten resultiert. Da mit der Abnahme der Amplitude die Zellviabilität sinkt, bedeuten große B -Werte eine hohe Toxizität.

Bislang ist es noch nicht möglich, der Verdunstung der Flüssigkeit entgegenzuwirken, ohne die Messung zu beeinflussen. Daher ist die Messspanne auf maximal 150 Minuten begrenzt. Zellen können sich von einer akuten toxischen Wirkung auch wieder erholen, was aufgrund dieser maximalen Zeitspanne nicht mit dieser Methode erfasst werden kann. Sie bietet dennoch eine Möglichkeit zur Beobachtung der toxischen Wirkung einer Substanz innerhalb der ersten Stunden. In Kombination mit Resazurin- oder MTT-Test^[119] ergibt sich somit eine umfassende Bewertungsmöglichkeit der *in vitro*-Toxizität einer Substanz.



-  Zellen
-  Nanopartikel

Abbildung 14 - Real-Time Viability Zelltest. HeLa-Zellen werden auf den Cantilever aufgetragen. Nach einer Wartezeit werden die Zellen, die sich nicht am Cantilever festgesetzt haben, vorsichtig weggespült. Ein Tropfen mit Nährmedium wird durch die Flüssigzelle gegeben, sodass dieser den Cantilever umgibt. Daraufhin wird dieser in Schwingung versetzt und die Amplitude seiner Oszillation auf die Zeit aufgetragen. Die Amplitude bleibt nahezu konstant (Bereich 1). Nach einer weiteren Wartezeit werden die Nanopartikel zur Lösung hinzugefügt. Die Amplitude steigt kurzzeitig an, da sich die Nanopartikel an die Zellen hängen, und erreicht ein Maximum (Bereich 2). Daraufhin setzt die Wirkung der Nanopartikel ein. Die Zellen betreiben aufgrund der toxischen Wirkung Apoptose und lösen sich dabei vom Cantilever. Dies hat eine Verringerung der schwingenden Gesamtmasse und somit eine Abnahme der Schwingungsamplitude zur Folge (Bereich 3). Je höher die Toxizität, desto schneller fällt die Kurve über die Zeit. Letztlich können sich die Zellen aber von dieser Wirkung erholen (Bereich 4).

4. Nanopartikel-Synthese per Laserablation

4.1. Einleitung

Bereits vor mehreren tausend Jahren wurden Nanofasern in Keramiken eingebaut, um diese zu stärken.^[124] Die alten Ägypter nutzten vor etwa 4000 Jahren Bleisulfid-Nanopartikel, um sich die Haare zu färben.^[124] Obgleich die ersten chemisch synthetisierten Nanopartikel schon 1200 Jahre vor Beginn unserer Zeitrechnung in Gläser eingebaut wurden, um diese zu färben, ist wohl das bekannteste Beispiel für metallische Nanopartikel die Tasse von Lykorgos, die im 4. Jahrhundert im römischen Reich entstand.^[125] Sie besteht aus einer Gold- und Silber-Nanopartikel-Legierung, die dazu führt, dass die Tasse je nach Beleuchtung rot oder grün erscheint. Weiter wurden Nanopartikel außerdem in Kirchen- und anderem Glas verbaut.

In den letzten Jahrzehnten ist die Entwicklung im Bereich der Nanotechnologie enorm vorangeschritten.^[126–129] Inzwischen gibt es zahllose Anwendungen für Nanoteilchen.^[130–133] So werden sie beispielsweise in der Verarbeitung von Textilien^[130,134,135] sowie beim Sintern von Materialien^[136,137] genutzt, um die Materialeigenschaften an Bedürfnisse anzupassen. Aus Kosmetikprodukten sind sie kaum wegzudenken.^[138–141] Daneben werden ihre katalytischen Eigenschaften in der Produktherstellung^[142], aber auch in der Wasseraufbereitung^[137,143] genutzt. Ein weiterer vielversprechender Bereich stellt die sogenannte *nano-Medizin* dar, der zum größten Teil jedoch noch in der Entwicklung steht und bislang nur wenige Anwendungen hat.^[144] Ein großes Ziel dieser Forschung ist es, Nanoteilchen zur Frühdiagnose oder zum selektiven Behandeln verschiedener Krankheiten zu nutzen, letzteres entweder als Transportmittel für die zielgesteuerte Freigabe bestimmter Medikamente (*Targeted Drug Carriage*) oder durch selektives Abtöten von Organismen, wie zum Beispiel Krebszellen, durch die Nanoteilchen selbst (siehe Kapitel 4.2.5).^[131,145,146]

Die Vorsilbe *nano* (Griech. *Zwerg*) bezieht sich auf Objekte, deren Abmessungen in mindestens einer Dimension auf den nanometer-Bereich (nm-Bereich) beschränkt sind. Der nm-Bereich liegt dabei zwischen 1 und 100 nm. Damit ist er nicht nur nach oben, sondern auch nach unten begrenzt und schließt einzelne Atome sowie kleinste Atomcluster aus. Die Nomenklatur ist offiziell in der ISO/TS 27687:2015^[147] festgelegt und unterscheidet zwischen Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen. Nanoplättchen sind Objekte, die in einer Dimension durch den nm-Bereich begrenzt sind, in den beiden anderen diesen Bereich jedoch überragen. Beispiele hierfür sind extrem dünne Folien oder Filme. Liegen zwei Abmessungen eines Materials im nm-Bereich und die dritte nicht, so ist die Sprache von *Nanofasern*. Hierunter fallen weitere

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Subkategorien, die abhängig von Aufbau der Nanofaser sind. Als *Nanokabel* gelten gemeinhin Nanofasern, die elektrischen Strom leiten können. *Nanoröhrchen* sind zylindrische Nanofasern und somit im Inneren hohl. Ihr wohl bekanntester Vertreter ist das Kohlenstoffnanoröhrchen, das entweder ein- oder mehrwandig vorliegen kann und extrem hohe Zugfestigkeiten bei sehr geringem Gewicht aufweist.^[148] Daneben besitzt es eine gute Leitfähigkeit. Als *Nanostäbchen* hingegen werden feste Nanofasern bezeichnet, wie zum Beispiel Gold-Nanostäbchen. Objekte, bei denen die Abmessungen in allen drei Dimensionen im nm-Bereich liegen, werden als *Nanopartikel* bezeichnet. Abbildung 15 zeigt einen schematischen Überblick der Begriffe.

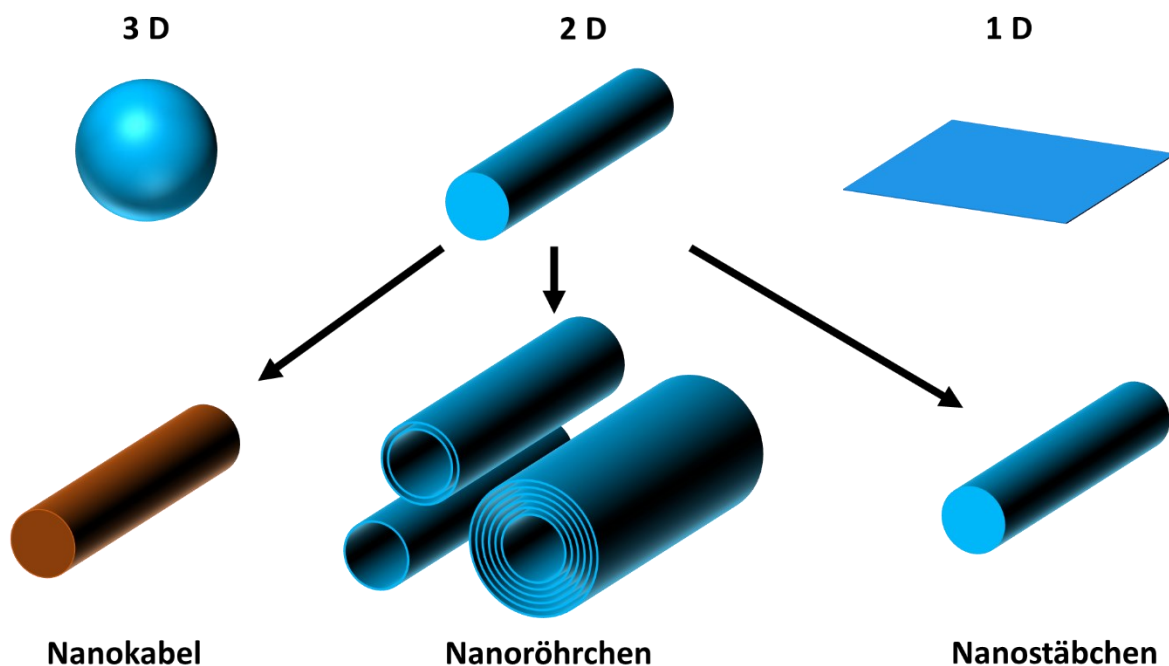


Abbildung 15 - Unterschiedliche Nanokörper. Eindimensionale Nanopartikel sind Folien, deren Abmessung in eine Richtung maximal 100 nm beträgt, während die Abmessungen in die anderen beiden Raumrichtungen diesen Wert übersteigen. Zweidimensionale Körper hingegen besitzen genau zwei Raumrichtungen, die Abmessungen von maximal 100 nm haben. Je nach Form wird zwischen Nanokabel, Nanoröhrchen und Nanostäbchen unterschieden. Dreidimensionale Körper, Nanopartikel, sind in allen Raumrichtungen kleiner als 100 nm.

Das große Interesse an Nanomaterialien begründet sich in den besonderen Eigenschaften, die Nanoobjekte von Bulkmaterial unterscheiden. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an möglichen Synthesewegen für Nanopartikel, die eine vollkommene Kontrolle über Größe, Form, Zusammensetzung, Beschichtung und den daraus resultierenden physikochemischen Eigenschaften ermöglichen. Allerdings ergeben sich aus diesem Potenzial auch Gefahren für

Mensch und Umwelt, weshalb eine Bewertung der ökotoxikologischen Eigenschaften der hergestellten Nanomaterialien vor ihrer industriellen Anwendung unerlässlich ist.

4.2. Theoretischer Hintergrund

4.2.1. Eigenschaften von Nanomaterialien

Die Eigenschaften von Nanomaterialien unterscheiden sich von denen des Bulkmaterials. Ein Grund dafür ist das sehr hohe Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis der Nanoteilchen. So hat ein kugelförmiges Partikel mit einem Durchmesser von 1 m eine Oberfläche von 3,142 m². Wird diese Kugel aber in kleine Kugeln mit Durchmessern von 100 nm zerteilt, ergibt sich eine Oberfläche von $3,142 \cdot 10^7$ m² und somit eine um den Faktor 10^7 erhöhte Oberfläche im Vergleich zum Bulkmaterial. Die Atome an Oberflächen sind sehr reaktiv, da ihnen meist ein Bindungspartner fehlt. Es ergeben sich daher zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten als chemischer Katalysator. Aufgrund dieses hohen Oberflächenpotenzials neigen Nanoobjekte jedoch dazu, einander zu adsorbieren (*Agglomeration*) oder kovalent zu binden, um ein größeres Partikel zu formen und somit das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu minimieren (*Aggregation*).^[149–151] In Lösung kann dies durch Hinzufügen von Stabilisatoren (meist Tenside) oder durch hohe Ladungen der Nanoteilchen verhindert werden.

Eine weitere Eigenschaft ergibt sich aus dem Phänomen der sogenannten *Oberflächen-Plasmonen-Resonanz*, das erstmals durch Gustav Mie^[152] beschrieben wurde. Ein sich auf einer sinusförmigen Bahn fortbewegendes Photon erzeugt durch seine Bewegung ein elektrisches Feld, das mit Abstand zur Bewegungsachse stärker wird (s. Abbildung 16). Trifft das Photon nun auf ein Nanopartikel, das freie Oberflächenelektronen besitzt (z B. Gold), so werden diese Elektronen durch das vom Photon erzeugte elektrische Feld aus ihrer Gleichgewichtslage ausgelenkt und zu einer Schwingung angeregt, die in Resonanz mit der Schwingung des Photons ist. Es kommt somit zu einer Ladungstrennung im Nanopartikel. Die quantisierte Schwankung der Ladungsträgerdichte im Festkörper wird als *Plasmaschwingungsquantum* oder kurz als *Plasmon* bezeichnet.^[153] Für kugelförmige Nanopartikel, die kleiner sind als die Wellenlänge des einfallenden Photons, kann dieses Plasmon näherungsweise als elektrischer Dipol betrachtet werden. Sein Dipolmoment lässt sich dann anhand Gleichung 53 berechnen.^[152]

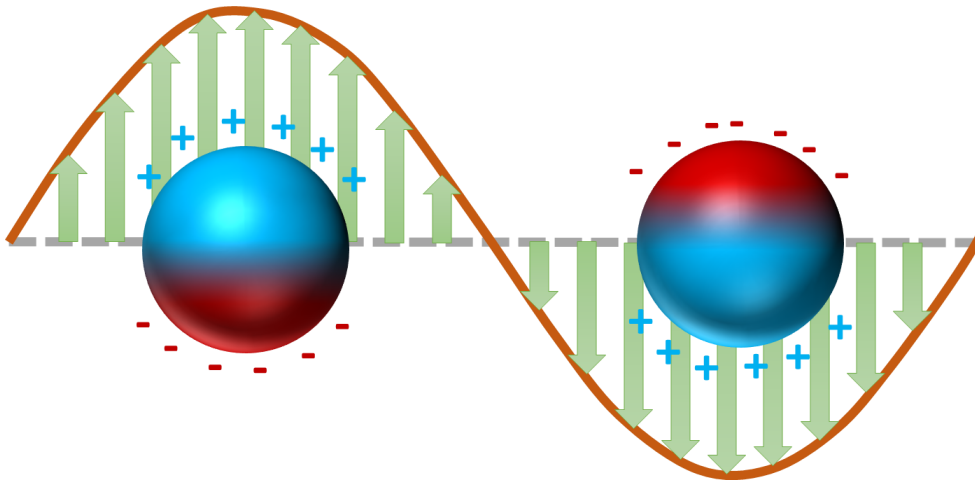


Abbildung 16 - Oberflächenplasmonenresonanz. Bei entsprechender Größe des Nanopartikels regt das elektrische Feld der Strahlung einer bestimmten Frequenz die Oberflächen-Elektronen des Nanopartikels zur kollektiven Oszillation an. Dies führt zu einer starken Absorption.

$$p = 4\pi\epsilon_0\epsilon_m R^3 \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \quad (53)$$

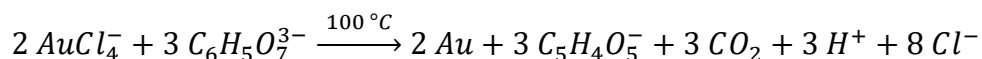
Dabei ist p das Dipolmoment, ϵ_0 die Permittivität des Vakuums, ϵ_m die Permittivität des umgebenden Mediums, ϵ die Permittivität des Nanopartikels und R sein Radius. Die Absorption und Streuung von Strahlung hängt vom Dipolmoment bzw. der Polarisierbarkeit des Partikels ab und somit auch von seinem Radius und der Permittivität des Partikels sowie des umgebenden Mediums.

4.2.2. Herstellung von Nanopartikeln

Die Synthese von Nanopartikeln hat in den letzten Jahrzehnten einen immensen Fortschritt erfahren.^[154–157] Mittlerweile können Nanopartikel in vielen verschiedenen Formen, wie Kugeln, hohle Kugeln, Sterne, Stäbchen, etc. und unterschiedlichen Größen sowie Kompositen aus den verschiedensten Materialien gewonnen werden. Zur Produktion von Nanopartikeln gibt es diverse Möglichkeiten, die sich grob in zwei Kategorien einteilen lassen. Im *Top-Down-Verfahren*^[158–160] werden die Nanopartikel aus dem Bulkmaterial hergestellt. Hierzu gehören etwa die Abtragung durch Laserstrahlung (*Laserablation*)^[161] oder das Mahlen des Materials, beispielsweise in speziellen Mühlen mit Zirkoniumoxid-Kugeln als Mahlkörper. Im *Bottom-Up-Verfahren*^[158–160,162] hingegen liegen Atome oder Moleküle als Ausgangsmaterial vor, die

dann zu Nanopartikeln zusammengefügt werden. Dazu zählen chemische Methoden, aber auch die Herstellung im Plasma, durch selbstorganisiertes diffusionsbegrenztes Wachstum auf Oberflächen, der Aerosolprozess, Elektrosinnen und weitere.

Die am besten untersuchte Methode ist zweifelsfrei die chemische Synthese der Nanopartikel.^[154,155] Es lässt sich nahezu jede Nanopartikelform in gut kontrollierbarer Größe mit schmaler Größendistribution herstellen. Die Eigenschaften der Nanopartikel können somit individuell an Materialanforderungen angepasst werden. Von besonderem Interesse sind metallische Nanopartikel, weil diese meist katalytische^[163,164] und/oder plasmonische^[165–167] Besonderheiten aufweisen. Klassischerweise besteht die Synthese im flüssigen Medium aus der Reduktion eines Salzes des Metalls, aus dem das Nanopartikel bestehen soll. Stabilisierende Agenzien liegen dabei schon in Lösung vor. Diese begrenzen einerseits das Wachstum, andererseits verhindern sie Agglomeration und Aggregation der Nanopartikel. Die mittlere Größe kann durch die Konzentration an stabilisierenden Substanzen verändert werden. Ein bekanntes Beispiel ist die Herstellung von Goldnanopartikeln aus Goldsäure nach Turkevich et al.^[168,169] Dazu wird Natriumcitrat in doppelt deionisiertem Wasser gelöst und zum Sieden erhitzt. Unter Rühren wird Tetrachlorgoldsäure hinzugegeben. Ein Farbumschlag von Gold auf Rot zeigt die Entstehung von Nanopartikeln nach folgender Reaktionsgleichung^[170]:



Es gibt jedoch viele weitere oft ähnliche Synthesewege. Die Zusammensetzung, Form und sonstigen Eigenschaften der Nanopartikel hängen letztendlich vom Reduktionsmittel, metallischen Salz, den stabilisierenden Agenzien, dem umgebenden Medium, der Reaktionsbedingungen und den Konzentrationen der beteiligten Substanzen ab. Die Syntheseroute kann entsprechend komplex sein, mehrere Syntheseschritte beinhalten und einige Tage dauern. Jedoch lassen sich so Nanopartikel in industriellem Maßstab produzieren.

Obwohl die Möglichkeit der individuellen Einstellung der Nanopartikel-Eigenschaften vielversprechend für biomedizinische Anwendungen ist, weist die chemische Syntheseroute einige Defizite für diesen Bereich auf.^[171] Wie oben erwähnt, kann es zu langen Synthesewegen kommen, die viele Zwischenprodukte beinhalten. Außerdem werden stabilisierende Agenzien hinzugesetzt, um Agglomeration und Aggregation zu verhindern. Oft handelt es sich dabei um Substanzen, die toxisch wirken und die somit vor der medizinischen Anwendung entfernt werden müssen. Dies ist allerdings meist komplex oder nicht möglich.

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Als *Grüne Synthesemethoden* werden Synthesemethoden bezeichnet, die umweltfreundlich und zuverlässig verlaufen und somit ohne stabilisierende Agenzien oder Zugabe anderer Substanzen, die sich letztendlich nicht mehr extrahieren lassen, auskommen.^[157,172] Solche Methoden sind leider oft in ihren Möglichkeiten beschränkt und genießen daher bislang neben den Hauptmethoden wie der chemischen Synthese ein Nischen-Dasein. Zu den grünen Methoden gehören vor allem biologische Methoden, in denen Bakterien von Natur aus biokompatible Nanopartikel erzeugen.^[171] Eine künstliche grüne Synthesemethode ist die Nanopartikel-Produktion durch gepulste Laser-Ablation in flüssigem Medium^[173-177], die im folgenden Kapitel näher erläutert wird. Abbildung 17 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Syntheserouten.

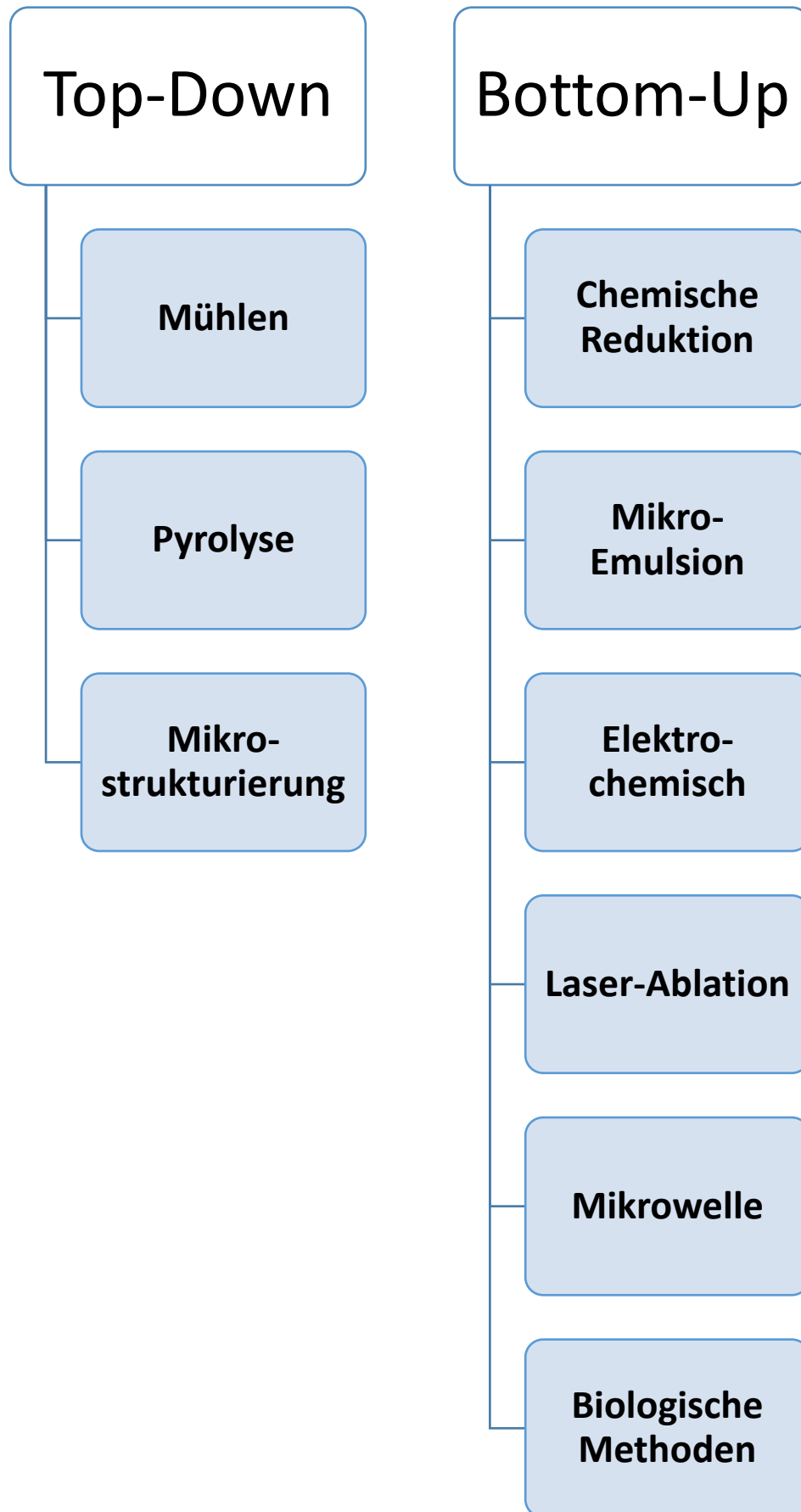


Abbildung 17 – Systematische Einteilung der Synthesarten von Nanopartikeln.

4.2.3. Pulsed Laser Ablation in Liquids

4.2.3.1. Einleitung

Die ersten Versuche, mit einem Laser auf ein sich in Lösung befindliches Objekt zu schießen und damit Nanopartikel zu erzeugen, wurden im Jahre 1991 von Lida et al.^[178] vollzogen. Große Pionierarbeit in diesem noch relativ jungem Forschungsgebiet leisteten die Teams um Prof. Dr. Anton Fojtik und Prof. Dr. Arnim Henglein^[179] ab 1993. Seitdem ist die Anzahl der Veröffentlichungen im Gebiet der *Pulsed Ablation in Liquids (PLAL)* stark angestiegen. Ein Großteil der Forschung beschäftigt sich mit der Untersuchung des Mechanismus der Nanopartikelentstehung.^[174,180–186] Viele Forscher entwickeln außerdem Strategien zur Bekämpfung der Schwachstellen dieser Syntheseart. Dazu gehören insbesondere die geringen Ausbeute^[187–189], die breite Größenverteilung^[190] und die beschränkten Möglichkeiten der Form^[191,192] und Zusammensetzung der Nanopartikel. Die Nachteile gegenüber anderen Syntheseverfahren führten dazu, dass die gepulste Laserablation in Flüssigkeiten bislang wenig Potenzial für praktische Applikationen hatte.

Auch in der nanomedizinischen Forschung ist diese Syntheseroute noch nicht weit verbreitet. Hier allerdings überwiegen ihre Vorteile: Es werden keine zusätzlichen Substanzen wie Stabilisierer gebraucht, was die Toxizität der Nanopartikel drastisch senkt.^[193] Daher ist diese Methode sowohl zur Grundlagenforschung, wie die Erforschung der Interaktion reiner Nanopartikel mit Zellen, als auch zur Synthese von Nanopartikeln für die tatsächliche Applikation bestens geeignet.

4.2.3.2. Mechanismus

Der Mechanismus des PLAL-Phänomens ist noch nicht vollkommen aufgeklärt, jedoch sind die Untersuchungen bereits vorangeschritten.^[194] Wird ein Laserpuls auf einen sich in Lösung befindlichen Festkörper (*Target*) gelenkt, so kommt es, soweit die Pulsenergie einen bestimmten Schwellwert (*Ablationsschwellwert*) übersteigt, zur Ablation von Festkörpermateriale. Der materialabhängige Ablationsschwellwert liegt typischerweise um 20 J/cm². Meist werden Laser mit Pulsenergien um 30 J/cm² verwendet. Aus dem ablatierten Festkörpermateriale und den Bestandteilen der Lösung entstehen Nanopartikel, die daraufhin in der Lösung vorliegen.

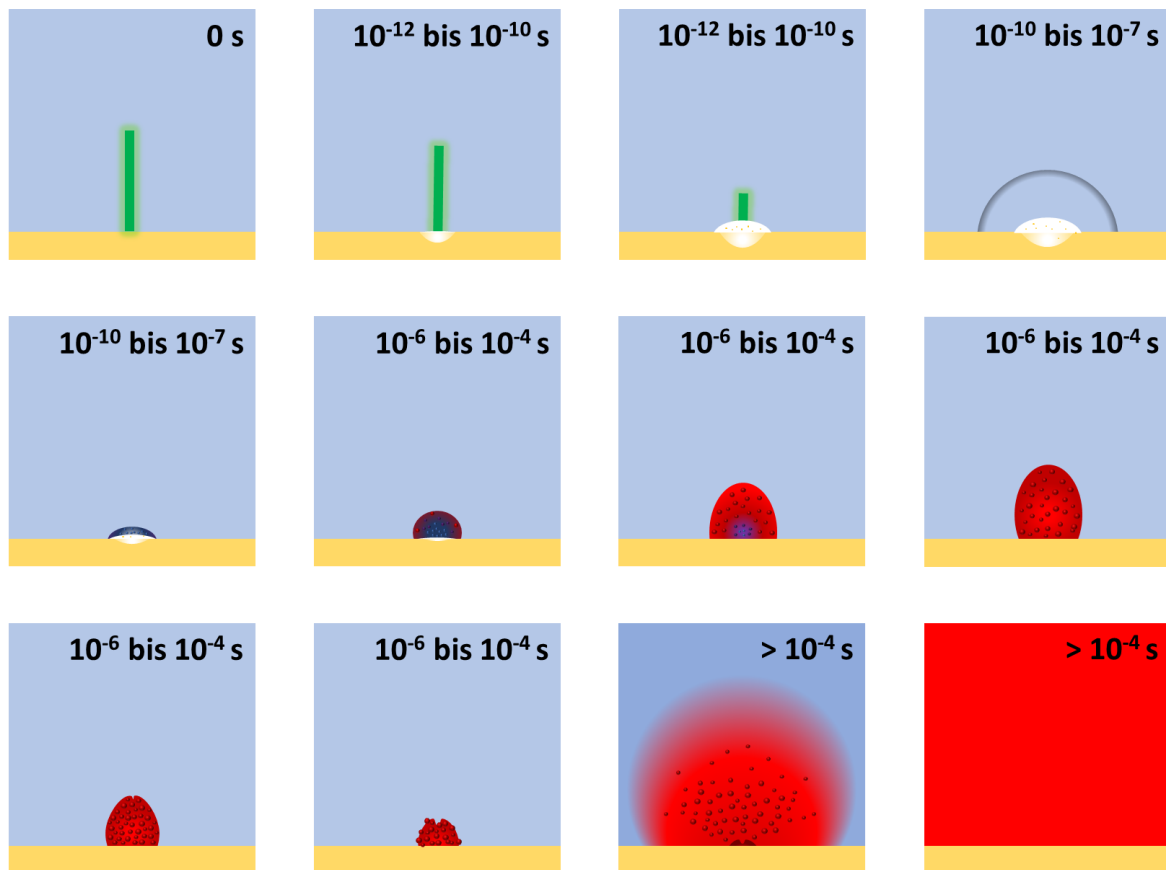


Abbildung 18 – Synthesemechanismus der Nanopartikel über gepulste Laserablation in Lösung. Der Laserpuls überträgt seine Energie auf das Target. Es entsteht daraufhin ein Plasma an der Targetoberfläche, das Elemente und Cluster aus dem Target enthält. Die Ausbreitung des Plasmas führt zur Aussendung eines kurzen akustischen Signals, der sogenannten Schockwelle. Das Plasma überträgt Energie auf die umgebende Lösung, dadurch verdampft die Lösung und es entsteht die sogenannte Kavitationsblase. Durch diesen Energietransfer schrumpft das Plasma. In der Kavitationsblase, die neben Elementen aus dem Target auch Elemente, Radikale und Verbindungen aus dem flüssigen Medium enthält, wachsen Nanopartikel aus den Clustern des Targets. Der Aufbau der Nanopartikel hängt schließlich von den Substanzen ab, die in der Kavitationsblase enthalten sind, und von der Lebensdauer der Kavitationsblase. Das Wachstum der Kavitationsblase wird durch den Druck der Flüssigkeit auf die Blase eingeschränkt. Nach Erreichen der maximalen Größe schrumpft die Blase zusammen und entlässt dabei die Nanopartikel in die Lösung. Die Lebensdauer der Kavitationsblase ist etwa 100 mal größer als die des Plasmas, die genauen Zeiten hängen jedoch von den experimentellen Umständen ab.

Abbildung 18 zeigt schematisch den zeitlichen Verlauf der Nanopartikel-Entstehung.^[175,181,194]

Das Target befindet sich in einem Behälter und ist dort in flüssiges Medium getaucht. Ein Laserpuls mit Pulslänge t_{puls} bewegt sich senkrecht auf das Target zu und wird durch eine Linse auf dieses fokussiert. Der Zeitpunkt, an dem der Laserpuls das Target erreicht, wird als Zeit $t_0 = 0$ definiert. Es wird davon ausgegangen, dass die Flüssigkeit im Bereich der Wellenlänge des Laserpulses nicht absorbierend und der Streuanteil zu vernachlässigen ist.

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Der Eintritt des Laserpulses in die Flüssigkeit geschieht bei $t < t_0$. An der Grenzschicht zur Flüssigkeit kann es hier zu Energieverlust durch Streuung und Reflexion kommen. Weiterhin kann sich aufgrund der Lichtbrechung der Fokus verschieben. Bei Laserpulsen mit Pulsdauern t_{Puls} im ps- und fs-Bereich muss die Flüssigkeitsschicht klein gehalten werden, um den Energieverlust durch die Flüssigkeit gering zu halten. Bei Laserpulsen im ns-Bereich ist dieser Effekt nicht so bedeutend.

Erreicht der Laserpuls das Target ($t_0 \leq t \leq t_{Puls}$), so wird ein Großteil der Pulsenergie vom Target absorbiert. Die Übertragung der Energie von den durch die Photonen angeregten Elektronen auf die Atomrümpfe beträgt etwa 10^{-12} s. Ist die Pulsdauer geringer als diese Übertragungsrate, so kann die Energie nicht schnell genug abgeführt werden und die komplette Pulsenergie liegt am ablatierten Punkt vor. Die maximale Temperatur des Targets wird allein durch die Pulsenergie und die Größe des Laserspots bestimmt. Es kommt zu direktem Übergang des Festkörpers in die Gasphase und zur Ausbildung eines Plasmas. Bei ns-Pulsen ($t_{Puls} \approx 10^{-9}$ s) kann es neben der Fotoionisation außerdem zu weiteren Effekten kommen, wie der thermischen Emission, Verdampfung, Sieden und Schmelzen. Somit wird ein größeres Volumen ablatiert als durch die Laserspotfläche vorgegeben ist. Noch höhere Pulsdauern führen zum Erhitzen und zur Materialablösung durch Verdampfen und Sieden im thermodynamischen Gleichgewicht.

Die hohe Energie an der Target-Oberfläche führt zur Ausbildung eines Plasmas an dieser Stelle. Dabei wird eine Schockwelle erzeugt, die deutlich hörbar ist. Das Plasma besteht aus ionisierten Partikeln und Fragmenten des Targets, es herrscht kein thermodynamisches Äquilibrium. Es nährt sich aus der Energie des Targets, verliert aber gleichzeitig Energie an die umgebende Flüssigkeit und durch seine Expansion. Seine maximale Temperatur beträgt etwa 10^3 K bei einem Druck von circa $10^9 - 10^{10}$ Pa. Das Plasma bildet sich bereits bei $t = 10^{-11}$ s. Bei Pulsdauern höher als $t_{Puls} = 10^{-11}$ s kommt es daher bereits während der Ablation des Pulses zur Ausbildung des Plasmas. Dies führt dazu, dass bei Pulslängen $t_{Puls} > 10^{-11}$ s Pulsenergie direkt in das Plasma eingeschleust wird und dieses weiter erwärmt. Das Plasma schirmt den Laserpuls vom Target ab, es wird folglich weniger Material ablatiert.

Die Lebenszeit des Plasmas ist auf einige 10 ns beschränkt. In den ersten Nanosekunden strahlt es ein kontinuierliches Spektrum ohne definierte Emissionsbanden ab, das vor allem durch Bremsstrahlung und Strahlungsrekombination zustande kommt. Mit der Zeit nehmen die Rekombinationen und Relaxationen angeregter Zustände zu und es kommt zur vermehrten Ausbildung diskreter Emissionslinien. Im Plasma bilden sich erste kleine Atomcluster (*Seeds*).

Das Wachstum des Plasmas ist auf einer Seite durch das Target, auf der anderen Seite durch die Flüssigkeit begrenzt. Der kontinuierliche Energietransfer zur Flüssigkeit führt einerseits dazu, dass das Plasma eine maximale Ausbreitung erreicht, andererseits führt es zur Verdampfung der Flüssigkeit an der Grenzphase und zur Ausbildung einer Gasblase, der sogenannten *Kavitationsblase*.^[194] In dieser liegen Spezies aus dem Lösungsmittel als Atome, Moleküle, meist aber als Ionen und Radikale vor. Während das Plasma wieder schrumpft, wächst die Kavitationsblase. Die Cluster und Nuklei des ablatierten Materials verbleiben vorerst noch im Plasma, bis dieses so klein ist, dass sie in die Kavitationsblase freigegeben werden. Dort wachsen sie dann mit den restlichen Bestandteilen der Kavitationsblase zu meist kugelförmigen Nanopartikeln heran, da dies die thermodynamisch stabilste Form ist. Die Größe der Nanopartikel wächst mit der Lebensdauer und der Größe der Kavitationsblase. Diese kann bis zu ein paar Millimetern groß werden und expandiert bis etwa $t = 1,50 \cdot 10^{-4}$ s.^[175,176,181] Sobald der innere Druck der Blase durch den äußeren Druck, der von der umgebenden Flüssigkeit auf die Kavitationsblase ausgeübt wird, übertrumpft wird, schrumpft sie wieder und setzt die gebildeten Nanopartikel in die Lösung frei. Im Anschluss können noch kleine Änderungen an den Nanopartikeln auftreten. So kann es zu Oberflächenoxidation oder zur Kondensation kleiner Restsubstanzen kommen. Über lange Zeit sind außerdem Agglomeration und Aggregation möglich.^[195]

Die Art des Lösemittels bestimmt die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel. So kommt es in organischen Lösemitteln, die kein Sauerstoff enthalten, beispielsweise zur Ausbildung einer Graphitschicht um die Partikel herum.^[196,197] In wässrigen Lösungen werden unedle Metalle meist oxidiert. Häufig weisen die in wässriger Lösung entstandenen Nanopartikel ein starkes ζ -Potenzial auf.^[198-200] Die starke negative oder positive Ladung führt zu einer gegenseitigen Repulsion, die die Nanopartikel über lange Zeit, oft mehrere Wochen, stabilisiert. Wassermoleküle und Ionen lagern sich durch die starke Ladung an der Nanopartikeloberfläche an und bilden eine starre Schicht (siehe auch Kapitel 3). Dadurch ist die effektive Größe des Nanopartikels größer als nur das Nanopartikel selbst. Der hydrodynamische Radius setzt sich aus dem Radius des Nanopartikels und der starren Sternschicht zusammen und ist für das Verständnis vieler Beobachtungen essentiell.

Die entstandenen Nanopartikel haben die thermodynamisch stabilste Form, sind also kugelförmig. Vereinzelt kam es zu Beobachtungen andersförmiger Partikel, beispielsweise durch Anlegen eines elektrischen Felds.^[192] Die optischen Eigenschaften der Nanopartikel können neben der Partikelform auch über die Partikelzusammensetzung optimiert werden.

4.2.4. Anforderungen an Nanopartikel im nanomedizinischen Bereich

Nanopartikel sind aufgrund ihrer Eigenschaften und ihrer geringen Größe Gegenstand vieler Forschungsbereiche. Besonders in der medizinischen Forschung wird große Hoffnung auf Nanopartikel als Wirkstoffträger, Kontrastmittel oder Wirkstoff selbst gesetzt.^[131,145,146,201,202] Sie gelten als eines der vielversprechendsten Hilfsmittel gegen Krebs. Dabei gilt es, die Nanopartikel spezifisch in Tumorzellen einzuschleusen, um sie dort zu detektieren oder zu aktivieren. Dazu müssen allerdings verschiedene Bedingungen erfüllt sein. So muss das Nanopartikel hydrophil und biokompatibel sowie biologisch abbaubar sein, letzteres aber erst, nachdem es in der Tumorzelle gewirkt hat. Außerdem sollte es eine lange Halbwertszeit im Blut haben, damit es die Zielzellen erreichen kann. Es soll also unsichtbar gegenüber dem Immunsystem sein. Trotzdem darf es keine sekundäre Toxizität, also beispielsweise Agglomeration in einem Organ, aufweisen. Die Nebeneffekte sollten auf ein Minimum gesenkt werden. Als Kontrastmittel oder Wirkstoff sollte ein Nanopartikel entsprechende Eigenschaften wie Oberflächenplasmonenresonanz oder Magnetismus mitbringen, um es detektieren bzw. aktivieren zu können.

Die Strukturierung des Nanopartikels sollte so gewählt werden, dass es die oben genannten Bedingungen erfüllt. Die Basis stellt der Partikelkern, der aus Metallen, aber auch aus Keramik, Liposomen, Polymer-Mizellen oder anderen Stoffen bestehen kann. Dieser Kern wird meist funktionalisiert. Es werden also Moleküle kovalent oder elektrostatisch angebunden, die ihm bestimmte Eigenschaften verschaffen. Oft sind dies Polymere wie Polyethylenglykol, das dem Nanopartikel einerseits Löslichkeit verleiht, ihm andererseits Schutz vor Aussortierung durch das Immunsystem bietet. Des Weiteren werden häufig Tumorzellen-spezifische Rezeptoren angehängt, um entsprechende Selektivität zu erwirken. Außerdem kann zusätzlich ein spezifischer Wirkstoff angebunden werden.^[203] Wirkstoff-funktionalisierte Nanopartikel haben gegenüber dem reinen Wirkstoff bedeutende Vorteile, vor allem gibt es weniger Nebenwirkungen. Beispielsweise ist es gelungen, den Wirkstoff 5-Fluorouracil an Goldnanopartikel zu binden und dieses System erfolgreich zur *in vivo* -Bekämpfung von Tumorzellen einzusetzen.^[204] Die Nebenwirkungen hielten sich dabei auf einem Minimum. 5-Fluorouracil wird seit über 40 Jahren als Arzneistoff in der Chemotherapie angewendet, hat dabei aber erhebliche Nebenwirkungen.^[205]

Als Nanopartikel-Kern wird häufig Gold verwendet, da es relativ biokompatibel und inert ist und ausgeprägte Oberflächenplasmonenresonanz zeigt.^[204,206] Des Weiteren sind die Synthese-

wege sehr gut untersucht und es ist möglich, Gold-Nanopartikeln in allen Formen und Größen sowie mit einer Vielzahl an Beschichtungen im Gramm-Maßstab herzustellen.

Um die Wellenlänge, bei der das Nanopartikel zu Oberflächenplasmonenschwingung angeregt wird, in das biologische Fenster^[207] zu verschieben, in dem andere biologische Moleküle in der Regel nicht oder nur wenig absorbieren, bieten sich zwei Möglichkeiten an: Entweder wird die Form des Nanopartikels so eingestellt, dass es in mindestens einer Dimension Plasmonenschwingung mit Frequenz im Bereich des biologischen Fensters zeigt (beispielsweise Nanostäbchen), oder der Kern wird mit einem Material mit hohem Brechungsindex beschichtet, sodass die Absorptionswellenlänge nach Gleichungen 54 bis 58 verschoben wird.^[208,209]

$$\sigma_{ext} = \frac{8\pi^2 r_2^3 \sqrt{\epsilon_h}}{\lambda} \text{Im}(\alpha) \quad (54)$$

Dabei ist σ_{ext} der Extinktionsquerschnitt und α die Polarisierbarkeit des Nanopartikels.

$$\alpha = \frac{\epsilon_s \epsilon_a - \epsilon_h \epsilon_b}{\epsilon_s \epsilon_a + 2\epsilon_h \epsilon_b} \quad (55)$$

$$\epsilon_a = \epsilon_c(3 - 2P) + 2\epsilon_s P \quad (56)$$

$$\epsilon_b = \epsilon_c + \epsilon_c(3 - P) \quad (57)$$

$$P = 1 - \left(\frac{r_c}{r_s}\right)^3 \quad (58)$$

Hier sind ϵ_h , ϵ_c und ϵ_s die dielektrischen Permittivitäten des Mediums, Kerns und der Schale. r_s ist der Radius der Schale und λ die Wellenlänge der Strahlung. Plasmonen-Resonanz tritt dort auf, wo die Polarisierbarkeit des Nanopartikels null wird. Durch Beschichtung des Nanopartikels mit einem Material, dessen Permittivität und somit Brechungsindex (nach

Gleichung 58) verschieden von dem des Kernmaterials ist, lässt sich somit das Absorptionsmaximum verschieben.

4.2.5. Photothermale Therapie

Die Hyperthermische Therapie ist eine Methode zur Zerstörung von Zellen, vor allem von Tumorzellen, durch Überhitzung.^[210] Dabei wird das Zytoplasma auf den klinisch relevanten Temperaturbereich^[204] von 41 °C bis 48 °C erhitzt, in dem zelleninterne Prozesse ablaufen, die heutzutage noch nicht vollständig verstanden sind. Es ist bekannt, dass Zellen bis zu einer Temperatur von etwa 39 °C stabil sind. Ab 39 °C beginnen Proteine zu Denaturieren.^[204,211] Dadurch aggregieren sie und stören somit die normalen Zellabläufe. Bei einer Temperatur ab 41 °C wird die Zelle inaktiv. Diesen Zustand kann sie über mehrere Stunden aufrechterhalten. Zur Desaktivierung der Zelle kommt es auch, wenn sie einer Temperatur von 40 °C über mehrere Stunden ausgesetzt ist. In dem Fall, dass die Zelle diese Temperaturänderung überlebt, entwickelt sie eine Hyperthermieresistenz für diesen Temperaturbereich, die auf die Bildung von Hitzeschock-Proteinen zurückzuführen ist.^[204] Diese Resistenz kann durch weiteres Aufheizen auf 42 °C überwunden werden. Temperaturen ab 43 °C führen zu Langzeit-Desaktivierung der Zellen.^[212-214] Hier nimmt die Reaktionsrate der in der Zelle enthaltenen Substanzen stark zu, was zu oxidativem Stress führt.^[212,215] Die Entstehung oxidierender Substanzen resultiert in der Denaturierung biologischer Bestandteile und führt letztendlich zum Zelltod. Einige Krebszellen weisen eine höhere Resistenz gegen erhöhte Temperatur auf. In diesem Fall führen Temperaturen von 45 bis 48 °C zu Nekrose.^[216-219]

Neben den konservativen hyperthermischen Behandlungsmethoden, bei denen entweder das Blut durch Zugabe von Chemikalien erhitzt wird oder bestimmte Regionen durch Antennen abgesteckt und aufgeheizt werden, kann eine Therapie mithilfe von Tumorzellen-selektiven Nanopartikeln weitaus wirksamer, selektiver und somit schonender sein.^[220] Hierzu gibt es zwei Behandlungsansätze. Magnetische Nanopartikel haben den Vorteil, dass sie durch ein äußeres Wechselfeld nicht-invasiv aktiviert werden können. Durch die Bewegung im Wechselfeld entsteht Wärme, die an die Umgebung freigegeben wird. Eine effektivere Alternative bietet die *Photothermale Therapie*, bei der Strahlung durch Nanopartikel absorbiert und in Wärme umgewandelt wird. Hierzu eignen sich besonders Nanopartikel, die Oberflächenplasmonenresonanz aufweisen. Auch hier haben Gold-Nanopartikel aufgrund ihrer ausgeprägten Oberflächenplasmonenresonanz und der damit verbundenen Effektivität beim Umwandeln von Strahlung in Wärmeenergie sowie wegen ihrer hohen Biokompatibilität und Funkionali-

sierungsmöglichkeiten große Vorteile gegenüber allen anderen Nanopartikeln.^[221] Bei der Absorption im SPR-Bereich der Gold-Nanopartikel mittels kontinuierlichen Lasers werden Oberflächenelektronen im Plasmonenband des Partikels zur Oszillation angeregt.^[222] Die Oszillation der Elektronen wird jedoch aufgrund der Wechselwirkung mit dem Atomgitter mit der Zeit gedämpft, dessen Schwingung so zunimmt (Elektronen-Phononen-Wechselwirkung). Das Nanopartikel kann dabei innerhalb nur einer Pikosekunde auf mehrere tausend Kelvin aufgeheizt werden. Durch Phononen-Phononen-Wechselwirkungen erfolgt ein Energietransfer

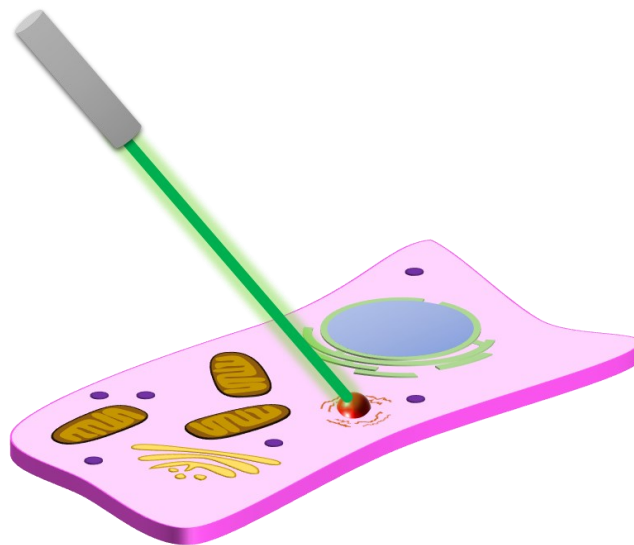


Abbildung 19 - Photothermale Therapie. Nachdem speziell entworfene Nanopartikel selektiv in Zellen eingebracht wurden, werden diese mit Laserstrahlung im Bereich der Oberflächenplasmonenresonanz bestrahlt. Durch das hohe Absorptionsvermögen der Nanopartikel heizen sich diese schnell auf und geben die Wärme an die Umgebung ab. Ab einer Temperatur von 43 Grad Celsius stirbt die Zelle ab.

vom Nanopartikel an die Umgebung, was etwa 100 ps dauert. Der Prozess ist schematisch in Abbildung 19 dargestellt. Die Effektivität, mit der ein Nanopartikel mit Photonen wechselwirken kann, wird durch seinen *Wirkungsquerschnitt* σ charakterisiert. Dieser bestimmt durch Gleichung 59 die Wahrscheinlichkeit w , mit der ein einfallendes Teilchen, hier ein Photon, mit einer Zielfläche F , in diesem Fall die bestrahlte Fläche, in Wechselwirkung tritt.^[223]

$$w = \sigma \frac{F}{N_T} \quad (59)$$

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Dabei ist N_T die Anzahl der in der bestrahlten Fläche enthaltenen Teilchen. Der Wirkungsquerschnitt zeigt also, auf welche Fläche ein Nanopartikel eine Wirkung auf ein eintreffendes Partikel hat. Analog dazu existieren weitere Bezeichnungen. So ist der *Extinktionsquerschnitt* σ_{ext} , der die Extinktion von Photonen an Teilchen beschreibt, die Summe aus *Absorptionsquerschnitt* σ_{abs} für die Absorption eines Photons und des *Streuquerschnitts* σ_{str} , der die Ablenkung des einfallenden Photons beschreibt.

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{str} \quad (60)$$

Der Absorptionsquerschnitt σ_{abs} ist ein wichtiger Faktor für die Bewertung eines Nanopartikels bezüglich der photothermischen Anwendung. Gold-Nanopartikel haben generell hohe Wirkungsquerschnitte. Je nach Größe variiert der Anteil an Streuungs- und Absorptionsquerschnitt. Größere Gold-Nanopartikel weisen eine höhere Streuung auf als kleine.^[224] So ist der Streuquerschnitt für Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10 nm bei SPR Frequenz nahezu bei null, während er bei 100 nm Gold-Nanopartikeln in etwa doppelt so hoch wie der Absorptionsquerschnitt ist. Allerdings nimmt die Extinktion mit kleiner werdender Partikelgröße ab.^[225] Daher wird die Effizienz eines Nanopartikels, mit der Strahlung zu Wärme konvertiert wird, oft durch die *Photothermale Konversionseffizienz* η ausgedrückt. Diese gibt das Verhältnis von Absorption zu Extinktion an.

$$\text{Photothermale Konversionseffizienz } \eta = \frac{\sigma_{abs}}{\sigma_{ext}} \quad (61)$$

η ist maximal bei kugelförmigen 20 nm Gold-Nanopartikeln und einer Wellenlänge von etwa 530 nm.^[226] Die Photothermale Konversionseffizienz hängt von der Form, Größe und Beschichtung bzw. Funktionalisierung der Nanopartikel sowie der Wellenlänge und Intensität der eingehenden Strahlung ab. Obwohl es viele Untersuchungen zur Formabhängigkeit des Absorptionsquerschnitts gibt^[227–233], konnte bislang noch kein Trend gefunden werden.^[193] Dies kann allerdings auch an den verschiedenen Versuchsbedingungen liegen. Eine Polymerbeschichtung kann beispielsweise die Photothermale Konversionseffizienz erhöhen oder stark einschränken, je nachdem, wie viele Wassermoleküle sich im Polymer einlagern können.^[234]

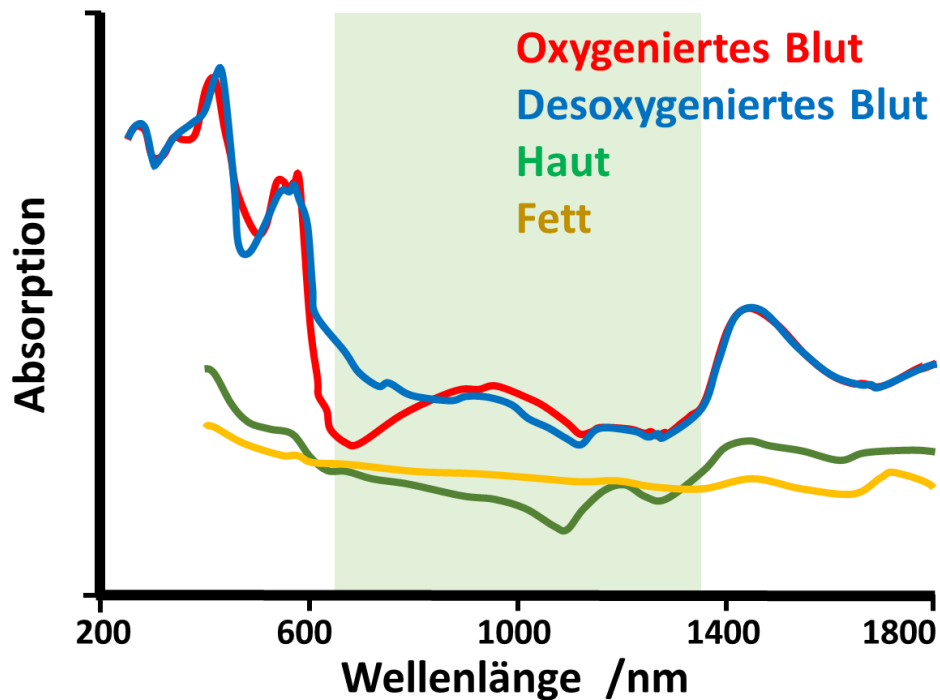


Abbildung 20 - Biologisches Fenster. Das biologische Fenster (grün hinterlegt) zeigt die Absorption der Bestandteile der Haut und des Bluts in Abhängigkeit der Wellenlänge. Im nahen Infrarot-Bereich ist die Absorption sehr gering, weshalb eine Anregung in diesem Bereich optimal wäre.

Die Photothermale Therapie ist in ihrer Anwendung beschränkt. Die hohe Absorption der Haut und anderer biologischen Bestandteile des Körpers resultiert in einer geringen Eindringtiefe für Strahlung im sichtbaren Bereich. Sie senkt außerdem die Selektivität. Abbildung 20^[207] zeigt die Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge der eingesetzten Laserstrahlung. Der Bereich zwischen 700 und 1300 nm wird als *Biologisches Fenster* bezeichnet, da Biomoleküle hier ein Absorptionsminimum aufweisen. Sphärische Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 20 nm haben ein Absorptionsmaximum bei etwa 520 nm. Gerade hier sind allerdings auch Blut, Haut und Körperbestandteile undurchlässig. Die Anwendung eines Lasers beschränkt sich somit auf eine Eindringtiefe von höchstens ein paar Zentimetern und einer sehr geringen Leistung, die ausreicht, um die Nanopartikel entsprechend zu erwärmen, jedoch nicht so stark ist, dass andere, gesunde Bestandteile zerstört werden. Zur Umgehung dieser Einschränkungen bieten sich zwei Lösungen an. Zu einem kann ein Lichtwellenleiter in die Nähe des Tumors gebracht werden, um mit der Strahlungsquelle näher an die Tumorzellen zu kommen. Dieser Eingriff kann bestenfalls minimalinvasiv erfolgen. Zum anderen kann die SPR-Wellenlänge in den infraroten Bereich verschoben werden. Hierzu kann die Form der Nanopartikel angepasst werden, um die SPR-Wellenlänge mindestens einer Dimension in den Bereich des biologischen Fensters zu verschieben. Nanostäbchen können beispielsweise so synthetisiert werden, dass sie

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

eine SPR-Wellenlänge im biologischen Fenster haben. Das Längen-zu-Breiten-Verhältnis ist mittlerweile bei chemischer Synthese genau einstellbar.^[235–237] Alternativ dazu lässt sich die SPR-Wellenlänge über die Beschichtung der Gold-Nanopartikel verändern.^[152] Eine dünne Beschichtung mit hohem Brechungsindex führt zu einer bathochromen Verschiebung des SPR-Peaks, die abhängig von Größe des Nanopartikels und der Beschichtung ist und, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, berechnet werden kann.

4.2.6. Bioverfügbarkeit, Biologische Abbaubarkeit und Toxizität

Der vielversprechenden Idee der Anwendung von Nanopartikeln für verschiedene Diagnostik- und Therapieverfahren steht die Komplexität biologischer Systeme von Lebewesen gegenüber. Anhand von *in vitro*-Tests lassen sich nur geringfügig Aussagen über das Verhalten *in vivo* machen. Im Blut eines Lebewesens erwartet das Nanopartikel eine Unmenge an biologischen Komponenten, die alle mit ihm in Wechselwirkung treten können. So liegt ein Nanopartikel nicht frei im Blut vor, sondern wird von einer Proteincorona umgeben, deren Größe von seinen Eigenschaften abhängt.^[238] Diese Corona spielt eine große Rolle bei der Inkubation der Nanopartikel. Hinzu kommen Makrophagen des Immunsystems, die die Halbwertszeit von Nanoteilchen im Blut meist geringhalten.^[239] Hohe Halbwertszeiten sind jedoch eine Voraussetzung für das Erreichen der Nanopartikel an der Zielstelle. Das Verhalten der Nanopartikel im Lebewesen hängt sowohl von ihrer Größe, Form, Materialeigenschaften, ihren elektrischen Eigenschaften, als auch von ihrer Funktionalisierung und Beschichtung ab. Nanopartikel werden durch die Nieren und durch Makrophagen in Leber und Milz aussortiert und aus dem Körper ausgeschieden. Je nachdem können sie im Körper agglomerieren und dadurch an Toxizität gewinnen.

Neben der Größe der Nanopartikel spielen weitere Faktoren eine Rolle, insbesondere die Funktionalisierung. Gänzlich unbeschichtete Nanopartikel neigen häufig zu Aggregation. Allerdings lässt sich auch das nicht für jeden Fall vorhersagen, da die Wechselwirkungen und Mechanismen im Blut sehr komplex sind.^[239]

PEG-funktionalisierte Gold-Nanopartikel galten aufgrund der hohen Biokompatibilität lange Zeit als vielversprechendes System für die photothermale Therapie. Bergen et al.^[240] injizierten Gold-Nanopartikel verschiedener Größen unbeschichtet, mit PEG beschichtet und mit PEG und Galaktose beschichtet in Mäuse. Die Untersuchung der Nanopartikel ergab, dass unbeschichtete

Gold-Nanopartikel im Blut von einer Corona aus Albumin und anderer Plasmaproteine stabilisiert werden. Nach 2 Stunden war ihr Blutlevel jedoch sehr viel kleiner als bei Gold-Nanopartikeln, die mit PEG beschichtet waren. Letztere waren hauptsächlich im Blut zu finden, jedoch nicht in Organen. Gold-Nanopartikel, die mit PEG und Galaktose beschichtet waren, konnten hingegen hauptsächlich in Leberzellen festgestellt werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass Galaktose ein Zielligand für Leberzellen ist und somit vermehrt von diesen aufgenommen wird. Zhang et al.^[241] zeigten dagegen, dass mit PEG beschichtete Gold-Nanopartikel nach nur wenigen Minuten aus dem Blut verschwunden und in Leber und Milz zu finden waren. Nur wenige Nanopartikel konnten im Tumor der Maus gefunden werden, wahrscheinlich haben sich diese dort aufgrund der brüchigen, durchlässigen Zellwände des Tumorgewebes passiv angereichert (*EPR-Effekt*^[242]). Auch Geol et al.^[243] machte die Entdeckung, dass mit speziellen Liganden ausgestattete, PEG-beschichtete Gold-Nanopartikel kaum in Tumorzellen zu finden waren, weil sie durch Niere, Leber und Milz zuvor aus dem Blut entnommen wurden. Weitere Untersuchungen belegten dieses Verhalten auch für Gold-Nanopartikel mit anderen Formen, wie beispielsweise Gold-Nanostäbchen.^[244–247] Es stellte sich außerdem heraus, dass die Bluthalbwertszeit der Nanopartikel deutlich gesteigert werden kann, wenn das Verhältnis von PEG-Molekülen pro Nanopartikel erhöht wird.^[246] Ab einem Verhältnis von 1,5 lassen sich demnach mehr Gold-Nanostäbchen im Tumor und der Lunge finden als in Milz und Leber. Diese Untersuchungen belegten zwar die Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit PEG-funktionalisierter Gold-Nanopartikel, zeigten aber auch die Grenzen ihrer Effektivität auf. Alternative Funktionalisierungen wiesen ähnliche Schwierigkeiten auf.^[248–250] Der winzige Grat zwischen Biokompatibilität, Bluthalbwertszeit und biologischer Abbaubarkeit erfordert einen großen Forschungsaufwand im Nanopartikel-Design. Zur Bewertung müssen sowohl die Eigenschaften der Nanopartikel als auch ihre Syntheseroute, Konzentration und Verabreichung einbezogen werden.

Silizium-Nanopartikel zeigen ein ähnliches Verhalten wie Gold-Nanopartikel. Ihre Wirkung auf den Lebensmechanismus hängt ebenfalls stark von ihren Stabilisierungsagenzien ab.^[251] Per PLAL fabrizierte Silizium-Nanopartikel weisen aber ohne Stabilisierer eine hohe Biokompatibilität sowie einen schnellen Transfer von den Kupfferzellen aus dem Körper raus auf.^[252]

4.3. Motivation

Krebs ist nach Herz-/Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Europa.^[253] Dass die Tendenz der absoluten Sterbefälle in Deutschland in den letzten 30 Jahren immer noch steigend ist, ist irreführend. Tatsächlich stehen die Heilungschancen mittlerweile viel besser als noch vor 30 Jahren, und auch die Wahrscheinlichkeit einer Neuerkrankung hat sich aufgrund erhöhter Präventionsmaßnahmen deutlich verringert. Im Laufe seines Lebens erkrankt ein Mensch mit hoher Wahrscheinlichkeit an Krebs, wenn er nicht zuvor an einer anderen Krankheit stirbt. Der Grund im scheinbaren Anstieg der Neuerkrankungen und Sterbefälle liegt im Fortschritt der Behandlung anderer Krankheiten, die vor 30 Jahren noch tödlich waren, heutzutage jedoch geheilt werden können. Mittlerweile liegt die Überlebensrate nach einer Krebserkrankung in Deutschland für Frauen ebenso wie für Männer bei über 50 % (10-Jahres-Überlebensrate).^[254]

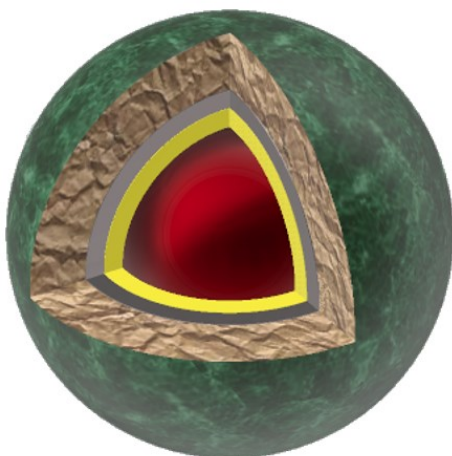
Trotzdem bleibt die Krebsbehandlung eine der größten Herausforderungen der Forschung. Die Behandlung mithilfe von Nanopartikeln stellt eine der vielversprechendsten Methoden dar, um Tumorzellen gezielt und selektiv zu zerstören. Bei der Synthese müssen jedoch viele Parameter betrachtet werden, da sich jeder von ihnen auf das Verhalten des Nanopartikels *in vivo* sowie auf die Wirksamkeit seiner Aktivierung auswirkt. Um Nanopartikel bezüglich der Effektivität bewerten zu können, muss seine Charakterisierung möglichst vollständig und unabhängig von anderen Substanzen sein.

Hier sollten biokompatible Nanopartikel in reinster Form hergestellt werden, die zur selektiven Behandlung von Tumorzellen über Photothermale Therapie dienen. Die Nanopartikel sollten auf ihre physiko-chemischen sowie auf ihre mechanischen Eigenschaften untersucht werden. Außerdem sollte ihr Verhalten *in vitro* und *in vivo* getestet werden, um ihre Biokompatibilität zu belegen und die praktische Anwendung zu ermöglichen.

4.4. Experimenteller Aufbau, Methoden und Materialien

4.4.1. Allgemeine Herangehensweise

Um möglichst reine Nanopartikel zu fabrizieren, die frei von Substanzen sind, welche die Messungen auf ihre Eigenschaften sowie ihre Biokompatibilität und Wirkungsweise beeinflussen könnten, sollte die *Pulsed Laser Ablation in Liquids*-Methode verwendet werden. Der Kern des Nanopartikels sollte aus Gold bestehen, da dieses einen sehr edlen Charakter besitzt und eine starke Oberflächenplasmonenresonanz aufweist.^[221] Um die Biokompatibilität und Stabilität der Nanopartikel zu erhöhen und den Nanopartikeln Bindungsstellen an der Oberfläche zu verleihen, sollte der Kern mit Siliziumdioxid beschichtet werden. Da mit PLAL aufgrund ihrer thermodynamischen Stabilität grundsätzlich kugelförmige Nanopartikel entstehen, wäre die SPR-Wellenlänge wahrscheinlich im Bereich von 525 nm, daher sollte dem Nanopartikel eine Schicht hinzugefügt werden, die sich zwischen Gold und Siliziumdioxid legt und den SPR-Bereich bathochrom verschiebt. Dazu sind nach Gleichung 58 Substanzen mit hohem Brechungsindex, wie Titandioxid, erforderlich. Zuletzt sollte Bovines Serumalbumin^[255] an die Nanopartikel gebunden werden, um einerseits ihre Bindungsfähigkeit zu erhöhen und andererseits die Wahrscheinlichkeit einer Aufnahme durch Tumorzellen zu steigern.^[256,257] Abbildung 21 fasst das Nanopartikel-Design zusammen.



Kern für Absorption (SPR)

Beschichtung für SPR-Modifizierung

Beschichtung für Biokompatibilität

Funktionalisierung für Bioverfügbarkeit

Abbildung 21 - Nanopartikel-Design. Der Kern mit Fähigkeit zur Oberflächenplasmonen-Resonanz (rot) wird mit einer Schutzschicht zur Erhaltung der Biokompatibilität (grau) umhüllt. Dazwischen liegt die Schicht eines Materials mit hohem Brechungsindex (gelb), um das Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen hin zu verschieben. Zum Schutz vor Immunsystem und/oder Verbesserung der Selektivität wird das Nanopartikel funktionalisiert oder von Polymer umgeben (grün).

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Zuerst sollte der Einfluss der verschiedenen Syntheseparameter auf die physikalischen Eigenschaften der Nanopartikel untersucht werden. Die optimierten Nanopartikel sollten dann *in vitro* auf Biokompatibilität geprüft werden. Außerdem sollten sie auf physiko-chemische und mechanische Eigenschaften untersucht werden. Bei schlechter Biokompatibilität *in vitro* sollten Parameter überarbeitet werden, bei guter Biokompatibilität sollten die Nanopartikel in der Chinese Academy of Sciences, Ningbo, Volksrepublik China, auf Wirksamkeit und *in vivo*-Biokompatibilität getestet werden. Außerdem sollte die Biodistribution in der Maus begutachtet werden.

4.4.2. Verwendete Materialien

Eine komplette Auflistung aller verwendeten Chemikalien und Gerätschaften ist in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2 – Verwendete Geräte und Chemikalien für Nanopartikel-Synthese per PLAL.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Rasterkraftmikroskop	Multimode® 8	BRUKER
Elektronenmikroskop		JEOL
Laser	Quanta Ray	COHERENT
UV-Vis-Spektrometer	Lambda 35	PERKINELMER
Nanosizer	Delsa™ Particle Analyzer	COULTER
Oszilloskop	2000 Digital Multimeter	KEITHLEY
Sputterer	Sputter Coater 108auto	CRESSINGTON
Chemikalie		HERSTELLER
Gold-Target	5 g	DEGUSSA
Natronwasserglas		CARLROTH
Natriumchlorid	> 99 % rein	CHEMSOLUTE
Titantetrachlorid		SIGMA-ALDRICH

4.4.3. Synthese der Nanopartikel

Die Synthese der Nanopartikel erfolgte über die Methode der Laserablation in Flüssigkeiten.^[175,258] Dazu wurde ein Nd:YAG-Laser genutzt, der Laserpulse mit einer Pulslänge von 8 ns und Pulsenergie von bis zu 40 J/cm² in einer Frequenz von 10 Hz emittierte. Die Wellenlänge der emittierten Laserstrahlung betrug 266 nm, wurde aber anhand frequenzhalbierender Kristalle auf 532 nm oder 1064 nm gesteigert. Abbildung 22 zeigt schematisch den experimentellen Aufbau. Die Laserpulse wurden mittels einer optischen Linse mit einer Brennweite von 100 mm auf einen 5 g Goldbarren (*Target*) fokussiert, der sich in einem Behälter aus Quarzglas befand. Dabei lag der Linsenfokus wenige Millimeter hinter der Targetoberfläche. In den Behälter wurden 10 ml des flüssigen Mediums gegeben. Die Höhe des Targets und des Behälters wurden so angepasst, dass der Laserpuls das Target in Flüssigkeit trifft und der Abstand von Einschlagpunkt zur Oberfläche mindestens 1 cm betrug. Das Target wurde mechanisch rotiert, um zu verhindern, dass die Pulse stets auf demselben Punkt einschlugen. Hierzu wurde ein Motor über einen programmierbaren Mikrocontroller angeschlossen. Zusätzlich wurde ein magnetischer Rührfisch am Boden des Behälters betrieben, um die erzeugten Nanopartikel in der Flüssigkeit zu verteilen und somit den Effekt der Abschwächung des Laserpulses durch bereits hergestellte Nanopartikel in der Lösung zu reduzieren. Zur Sicherheit wurde die ganze Apparatur blickdicht mit Metallplatten abgeschirmt, um einem unbeabsichtigten Austreten der Laserstrahlung vorzubeugen.

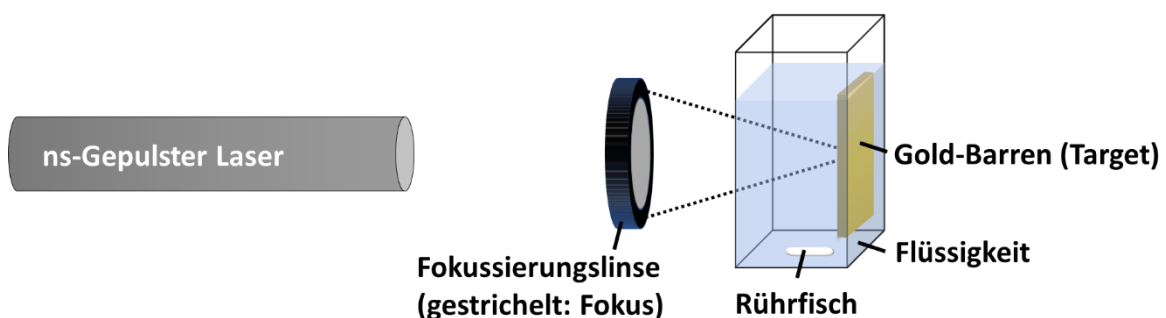


Abbildung 22 - Experimenteller Aufbau zur Nanopartikel-Synthese über PLAL. Laserpulse werden mittels einer Fokussierungslinse auf einen Goldbarren fokussiert, der sich in Flüssigkeit befindet. Ein Rührfisch dient der Durchmischung der Flüssigkeit.

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Die Lösung bestand aus destilliertem Wasser, Natriumchlorid und Natronwasserglas. Natriumchlorid diente hierbei dem Einengen der Größenverteilung der Nanopartikel. Natronwasserglas mit der chemischen Formel $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3,4 \text{SiO}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ diente als Siliziumquelle. Zur Optimierung der Nanopartikelsynthese wurden sowohl die Wellenlänge des Lasers als auch die Pulsenergie variiert. Die Pulsenergien betragen dabei 20 J/cm^2 , 30 J/cm^2 oder 40 J/cm^2 bei einer Wellenlänge von 532 nm oder 1064 nm. Als zusätzlicher Parameter wurde der Einfluss der Konzentration an Natronwasserglas in der Flüssigkeit geändert. Die Ablationszeit wurde konstant bei 15 Minuten gehalten.

Nach der Ablation war eine Färbung der zuvor klaren Flüssigkeit zu erkennen, die, je nach Parameter, von blau und violett zu tiefrot reichte. Die Flüssigkeit wurde entnommen und aufgereinigt. Dazu wurde sie während 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Das Zentrat wurde entnommen und für weitere Untersuchungen genutzt.

4.4.4. UV/VIS und ζ -Potenzial-Messungen

Die Absorption jeder Probe wurde mittels Zwei-Strahl-Photometers in einem Bereich von 400 nm bis 1050 nm untersucht. Dazu wurde die Probe mit destilliertem Wasser so weit verdünnt, dass sie nahezu farblos war. Bei einer Messung, bei der die Absorption den Wert 1 überstieg, wurde die Lösung erneut mit destilliertem Wasser verdünnt und nochmal gemessen. Es wurde 1 ml der Probe in ein Polymethylmethacrylat-Gefäß gegeben und in den Strahlengang gestellt. Als Referenzlösung wurde 1 ml destilliertes Wasser genutzt. Vor jeder Messung wurde die Wolframlampe des Spektrometers 20 Minuten lang aufgewärmt, um sie thermisch zu stabilisieren. Die Messdaten wurden anhand einer selbst programmierten Software ausgewertet. Hierbei wurden bei eventuell auftretenden SPR-Peaks sowohl Position als auch relative Breite bestimmt.

Das ζ -Potenzial wurde mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht. 1 ml der Probe wurde dazu in ein Quarzglas-Gefäß gegeben und in die entsprechende Vorrichtung des Analysegeräts *Delsa Nanosizer* gesetzt. Bei zu hoch abfallender Intensität der Laserstrahlung durch die Probe wurde die Probe verdünnt. Pro Probe wurden 210 Messdaten aufgenommen, die letztendlich zu einem Wert gemittelt wurden.

4.4.5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Probe wurde mit destilliertem Wasser so verdünnt, dass ihre Farbe mit dem bloßen Auge kaum noch erkennbar war. Für Messungen mit dem Sekundärelektronenmikroskop wurde 1 μl der Probe auf ein zuvor mit Ethanol und Wasser im Ultraschallbad gereinigtes, quadratisches Edelstahlplättchen mit einer Kantenlänge von 10 mm getropft und eintrocknen gelassen. Das Edelstahlplättchen wurde daraufhin mit leitfähigem Kohlenstoff auf dem Probenträger befestigt. Die Messungen wurden bei einer Spannung von 10 keV und einem Strom von etwa 10 μA aufgenommen. Die Vergrößerungen variierten. Von jeder Probe wurden mehrere aussagekräftige Bilder aufgenommen, um die Größenverteilung möglichst exakt darstellen zu können. Daneben wurden Aufnahmen mit dem Rückstrahldetektor aufgenommen, um die Beschaffenheit der Nanopartikel zu verdeutlichen. Zur Bestimmung der Größenverteilung der Nanopartikel wurden in den Aufnahmen manuell mithilfe einer Grafiksoftware die Kerndurchmesser sowie die eventuellen Schalendicken eingezeichnet. Anschließend wurden die Bilder mittels selbstprogrammierter Software ausgewertet und eine Größenverteilung erstellt.

Zur Aufnahme transmissions-elektronenmikroskopischer Bilder wurde 1 μl der Lösung auf spezielle Kohlenstoffsubstrate (*TEM Grids*) aufgetragen und eingetrocknet. Diese wurden daraufhin vermessen.

4.4.6. Messung der mechanischen Eigenschaften

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der Probe wurde das Rasterkraftmikroskop herangezogen. Die Probe wurde verdünnt, bis sie vollkommen transparent war (ca. Faktor 10^7). Daraufhin wurde 1 μl der Probe auf ein Silizium-Wafer getropft und eintrocknen gelassen. Der Wafer bestand aus monolithischem Silizium und wies eine sehr hohe Härte auf, sodass die mechanischen Messungen der Nanopartikel dadurch nicht verfälscht werden konnten. Das Substrat wurde daraufhin auf ein magnetisches Plättchen geklebt, um es auf dem Scanner des Rasterkraftmikroskops befestigen zu können. Es wurden drei verschiedene Messmethoden genutzt, um die für die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften notwendigen Kraft-Abstands-Kurven aufzunehmen. Diese drei Methoden wurden bereits in Kapitel 1.5.3.2 beschrieben. Es wurden jeweils SNL-10(B) -Spitzen von Bruker verwendet, die einen nominalen Radius von 2 nm und eine nominale Federkonstante von 0,12 N/m haben. Vor jeder

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Messserie wurden Durchbiegungsempfindlichkeit und Federkonstante des Cantilevers bestimmt. Für die Durchbiegungsempfindlichkeit wurde eine Kraftkurve auf einem Silizium-Wafer aufgenommen. Die Kraft-Konstante wurde mittels Thermal Tuning bestimmt (s. Kapitel 1.5.1).

Zum einen wurde im *Force Volume* -Modus gezielt an 496 äquidistanten Punkten pro Linie über 496 äquidistanten Linien Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen. Die Kantenlänge der quadratischen Aufnahme betrug dabei 2,5 μm . Mechanische Eigenschaften und Topografie der Probe wurden dabei aus den Kraft-Abstands-Kurven extrahiert. Die Kraft-Abstands-Kurven wurden im Nachhinein extrahiert und konnten über eine eigens entwickelte Software ausgewertet werden.

Zum anderen wurde die konventionelle Kraft-Spektroskopie-Methode angewandt. Dazu wurde zuerst eine Topografie der Probe im Tapping Mode™ aufgenommen (512 x 512 Datenpunkte). Daraufhin wurde die Nanoindentation gezielt auf den Nanopartikeln ausgeübt und die Kraft-Abstands-Kurven gespeichert. Diese wurden im Nachhinein ebenfalls über die eigens entwickelte Software ausgewertet.

Zusätzlich wurden Aufnahmen im *Peak Force Tapping Mode*™ gemacht. Die Kraft-Abstands-Kurven wurden direkt durch die Messsoftware extrahiert und bildlich dargestellt. Die Möglichkeit eines Speicherns der einzelnen Kraft-Abstands-Kurven war durch die Messsoftware leider nicht gegeben.

4.4.7. Praktische Berechnung

4.4.7.1. Vorbereitung der Kraft-Abstands-Kurve

Bevor Kraft-Abstands-Kurven ausgewertet werden konnten, mussten sie bearbeitet werden. Dazu gehörten eine Basislinienkorrektur, das Anpassen der Achsen und das Finden des Kontaktpunkts. Erst dann konnten die mechanischen Eigenschaften aus der Kurve extrahiert werden. Abbildung 23 zeigt die Anpassung einer Kraft-Abstands-Kurve. Zu Beginn der Messung einer Kraft-Abstands-Kurve befand sich die Messspitze in einem vertikalen Abstand zur Probe, der so groß war, dass die auf die Spitze wirkende Kraft, die von der Probe ausging, in Annäherung null war. Der Cantilever war hier in seiner Ruheposition, in der die Kraft $F_0 = 0 \text{ N}$ auf ihn wirkte. In der Praxis wich die Position des Lasers auf der Photodiode aber auch in der Ruheposition des Cantilevers vom absoluten Mittelpunkt ab, so dass das vertikale

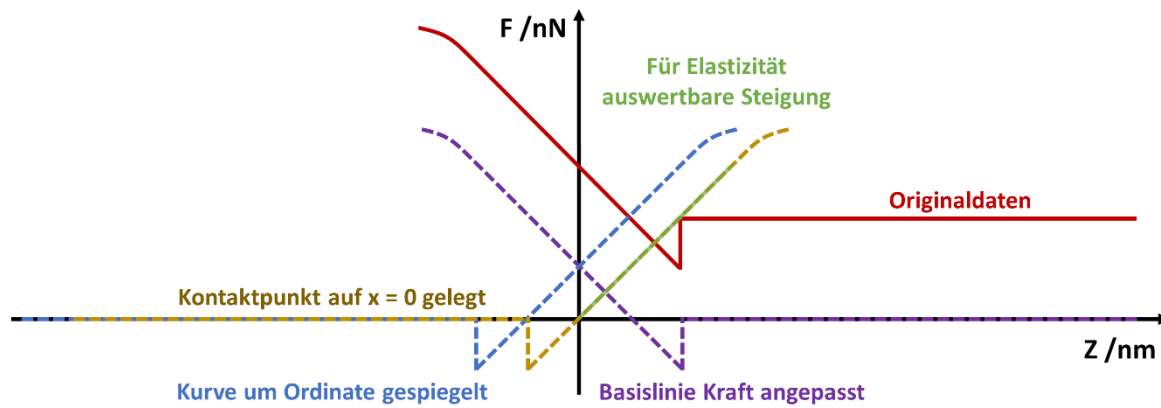


Abbildung 23 - Bearbeitung der Kraft-Abstands-Kurven zur Extrahierung der mechanischen Eigenschaften der Nanopartikel. Die Originaldaten (rot) werden basislinienkorrigiert, indem eine Regressionsfunktion ersten Grades durch den horizontalen Teil der Kurve, in dem keine Kraft auf den Cantilever wirkt, von der Kraft-Abstands-Kurve ab (violett). Zur besseren Berechnung wird die Kurve an der y-Achse gespiegelt (blau). Als Kontaktpunkt wird der Punkt gewählt, an dem die Steigung der Kurve die x-Achse schneidet. Die Kraft-Abstands-Kurve wird so verschoben, dass dieser Kontaktpunkt den Nullpunkt des Koordinatensystems bildet (gold). Zur Berechnung des Elastizitätsmoduls werden die Daten der Steigung zwischen Kontaktpunkt und Endpunkt gewählt. Dabei werden die letzten 10 % der Datenpunkte ausgelassen, da hier die Steigung oft nicht mehr linear ist.

Messsignal unterschiedlich von null war. Da die Messsoftware das Signal der Photodiode über die Multiplikation mit der Durchbiegungsempfindlichkeit und der Federkonstante aber direkt in die Kraft F umwandelte, war auch diese in der Ruheposition meist von null verschieden. Näherte sich die Messspitze der Probe an, so blieb die gemessene Kraft F in etwa gleich der Kraft F_0 , bis die Messspitze eine Wechselwirkung durch die Probe erfuhr. Dieser erste Bereich, in dem die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe vernachlässigbar war, bildete die Basislinie der Kraft-Abstands-Kurve. Der Versatz zur Abszisse wurde von jedem Punkt der Kurve abgezogen. Dazu wurde eine Ausgleichsfunktion ersten Grades über lineare Regression in diesem ersten Bereich ermittelt und von jedem Messpunkt subtrahiert. Somit spiegelte die Ordinate auch die tatsächlich auf die Messspitze wirkenden Kraftwerte wider. Gleiches wurde mit der Retraktionskurve gemacht.

Vor Beginn der Messung stand der Cantilever an seiner Startposition z_0 . Während der Messung war die Position des Cantilevers aufgrund der genauen Ansteuerbarkeit des z -Piezoelements stets bekannt. Aufgezeichnet wurde der zurückgelegte Weg, ausgehend von der Startposition $z_0 = 0$ nm und zur Probe hin steigend. Die theoretischen Modelle zur Auswertung des Elastizitätsmoduls verlangten jedoch, dass die Position der Spitze am Kontaktpunkt z_{KP} null beträgt.^[59,60] Nach Auffinden des Kontaktpunkts (s. folgendes Kapitel)

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

wurde die Abszisse also so angepasst, dass der Nullpunkt im Kontaktpunkt lag und die Werte mit steigender Indentation größer wurden.

Bei Indentation der Messspitze in die Probe übte letztere einen Widerstand gegen das Eindringen aus. Daraufhin wurde der Cantilever ausgelenkt. Im Bereich des linearen Anstiegs spiegelte der Wert auf der Abszisse somit nicht wie Eindringtiefe δ wider, sondern die Position des z-Piezoelements des Scanners. Abbildung 24 zeigt schematisch die Problematik. Die Differenz zwischen Position des z-Scanners (in Referenz zum Kontaktpunkt als $z_{KP} = 0$) und der Eindringtiefe entsprach näherungsweise der Auslenkung des Cantilevers. Letztere konnte anhand der vertikalen Positionsänderung des Laserstrahls auf der Photodiode gemessen und mittels Durchbiegungsempfindlichkeit des Cantilevers in ein Längenmaß umgewandelt werden. Somit ließ sich die Eindringtiefe δ anhand der Position z des Scanners, der Spannungsänderung ΔV_{Vert} des vertikalen Messsignals auf der Photodiode und der Durchbiegungsempfindlichkeit ζ ermitteln (s. Gleichung 62).

$$\delta = z - \Delta V_{Vert} \cdot \zeta \quad (62)$$

Die Werte im linear ansteigenden Bereich der Kraft-Abstands-Kurve, ausgehend vom Kontaktpunkt z_{KP} , wurden aus der Kurve extrahiert und mittels Gleichung 62 umgerechnet. Zur Vereinfachung wurden außerdem Ordinaten- und Abszissenwerte miteinander getauscht, damit die Auftragung die Werte δ als Funktion von F darstellten. Somit waren sie direkt für die verschiedenen theoretischen Modelle berechenbar.

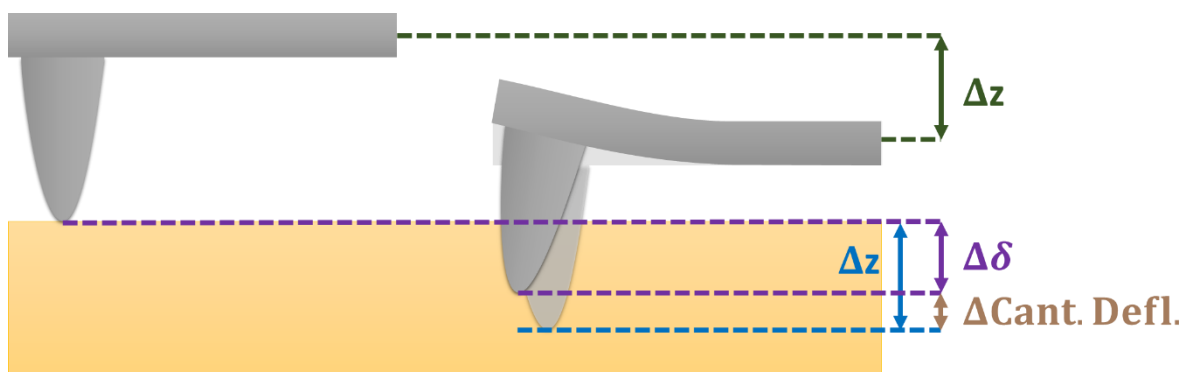


Abbildung 24 - Schema zur Berechnung der Eindringtiefe. Die Eindringtiefe der Spitze unterscheidet sich vom zurückgelegten Weg durch die Biegung des Cantilevers.

4.4.7.2. Das Kontaktpunktproblem

Die Suche nach dem genauen Kontaktpunkt zwischen Messspitze und Probe ist eine der größten Herausforderungen bei der Berechnung des Elastizitätsmoduls, da die Festlegung das Ergebnis deutlich beeinträchtigen kann.^[59,60] Der Kontaktpunkt wird üblicherweise so gewählt, dass die Messspitze mit der Probenoberfläche in Kontakt steht, sich die attraktiven und repulsiven Kräfte jedoch ausgleichen und die auf den Cantilever wirkende Nettokraft null beträgt. Nicht immer ist dieser Punkt Teil der Messkurve. Abbildung 7 zeigt verschiedene Kraft-Abstands-Kurven, die an unterschiedlichen Materialien aufgenommen wurden. Besonders an Kurven, die kein Snap-On oder Snap-Off-Verhalten aufweisen, ist es oft schwer, einen Kontaktpunkt festzumachen.

Die hier aufgenommenen Kurven wiesen typischerweise Adhäsionseffekte auf. Der Kontaktpunkt lag daher auf der Messkurve. Der Punkt, an dem die Kraft F nach Kontakt mit der Probe (bzw. bei der Retraktionskurve vor Lösen der Spitze von der Probe) wieder bei null lag, wurde als Kontaktpunkt festgelegt (s. Abbildung 23). Hier waren anziehende und abstoßende Wechselwirkungen im Gleichgewicht.

Oft wird der Suche nach dem Kontaktpunkt besonders bei nicht-adhäsiven Kraft-Abstands-Kurven zu wenig Beachtung geschenkt. Ein falscher Kontaktpunkt kann die Messung deutlich verändern.^[59,60]

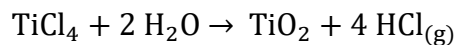
4.4.7.3. Extrahieren des Elastizitätsmoduls

Nach Vorbereiten der Kraft-Abstands-Kurve und Lokalisierung des Kontaktpunkts z_{KP} wurden die Gleichungen der theoretischen Modelle auf die extrahierte Auftragung von δ als Funktion von F angewendet. Wichtig war hier die Wahl des Kontaktmechanikmodells. Ausgewertet wurde die Retraktionskurve, da diese bei vorhandener Adhäsion genauere Ergebnisse lieferte und sie gegenüber der Extensionskurve keine unelastische Verformung beinhaltete. Analysen wurden nach Hertz, DMT und JKR erstellt. Hierbei waren neben der Spitzengeometrie die Abmessungen der Messspitze und der Probe sowie die Eindringtiefe zu berücksichtigen.

4.4.8. Verschiebung der Oberflächenplasmonenresonanz-Frequenz

Um die Oberflächenresonanz der Nanopartikel in den infraroten Bereich zu verschieben, sollte eine Schicht in das Nanopartikel eingebaut werden, die zwischen Kern (Gold) und Mantel (Siliziumdioxid) sitzt und sich durch einen hohen Brechungsindex ausweist. Als Substanz wurde Titandioxid mit einem Brechungsindex von 2,5 bis 2,69 (je nach Modifikation)^[259] gewählt. Dazu wurden mehrere Ansätze erarbeitet:

- a) Als Target diente ein Titanbarren, die Lösung bestand aus wässriger Goldsäure und Natronwasserglas.
- b) Als Target diente ein Goldbarren, die Lösung bestand aus destilliertem Wasser und Natriumchlorid. In einem zweiten Schritt wurde der Lösung Titantetrachlorid hinzugegeben, die sich nach folgender Reaktion exotherm in Titandioxid umwandelt.^[260]



- c) Als Target diente ein Goldbarren, die Lösung bestand aus destilliertem Wasser und Natriumchlorid. In einem zweiten Schritt wurde die entstandene Lösung als flüssiges Medium für einen weiteren Ablationsprozess genutzt. Als Target diente hier ein Titanbarren.

In den Schritten b) und c) wurde Natronwasserglas der Einfachheit halber weggelassen und sollte nach Erfolg der Synthese in einem Wiederholungsversuch hinzugefügt werden. Die entstandenen Nanopartikel wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie sowie mit einem Sekundärelektronenmikroskop untersucht. Die Vorbereitung dazu verlief analog zu den oben erwähnten Proben.

4.4.9. Reinigung der Targets

Die Targets wurden vor jedem Gebrauch gereinigt. Dazu wurden sie zuerst mit Wasser und Aceton abgespült. Daraufhin wurden sie abgeschmirgelt und erneut mit Wasser und Aceton abgespült. Das Target wurde anschließend in einer Mischung aus Wasser und Aceton (1:1 Vol.) 15 Minuten lang im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurde es mit destilliertem Wasser abgespült und bei 90 °C getrocknet. Vor Verwendung wurde es auf Raumtemperatur abgekühlt.

4.4.10. Berechnung der Nanopartikel-Konzentration

Zur Berechnung der Nanopartikelkonzentration wurde das Gold-Target gereinigt und anschließend, nachdem es Raumtemperatur angenommen hatte, gewogen. Daraufhin wurde es in einer Lösung aus destilliertem Wasser, in der $1 \cdot 10^{-5}$ M Natronwasserglas und $1 \cdot 10^{-6}$ M Natriumchlorid gelöst waren, zur Ablation gebracht. Die Dauer des Ablationsprozesses betrug 150 Minuten, wobei die Lösung nach jeweils 30 Minuten ersetzt wurde. Anschließend wurde das Target aufgereinigt, jedoch ohne es abzuschmirgeln, und nach Erreichen der Raumtemperatur erneut gewogen. Die Differenz der Masse wurde über die mittlere Nanopartikelgröße in eine Nanopartikelkonzentration umgerechnet. Die Konzentration der Nanopartikel wurde nur für die optimierte Methode (mit optimalen Parametern) durchgeführt. Durch Verdünnung der Nanopartikel-Lösung mit destilliertem Wasser wurden Lösungen mit Konzentrationen von 15 nM, 30 nM, 60 nM und 120 nM erhalten, mit denen weitere Tests durchgeführt wurden.

4.4.11. Albumin-Ummantelung

Um Rinderserumalbumin (BSA) als Protein-Corona an die Nanopartikel zu binden, wurde eine Nanopartikel-Lösung mit bekannter Konzentration verwendet. Es wurden mehrere Verdünnungen dieser Nanopartikel-Lösung in Salzsäure verschiedener Konzentrationen erstellt, um Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten (3; 4; 4,5; 5, 6 und 7) zu erhalten. Anschließend wurde ein 10-facher (mol-)Überschuss an BSA zu den Lösungen gegeben. Sie wurden 30 Minuten geschüttelt und daraufhin 5 Minuten lang bei 5.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Analog zu den anderen Proben wurden AFM, SEM, TEM und UV/Vis-Messungen aufgenommen.

4.4.12. *in vitro*-Messungen

Für *in vitro*-Messungen, also Messungen an Zellen, wurden sowohl HeLa-Zellen als auch MCF-7-Zellen genutzt. HeLa-Zellen sind menschliche Zervixkarzinom-Zellen.^[261] Bei MCF-7 handelt es sich um eine menschliche Brustkrebs-Zelllinie.^[262] Versuche mit HeLa-Zellen wurden an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, Deutschland, durchgeführt. Versuche mit MCF-7 wurden an der Academy of Science in Ningbo, Volksrepublik China, unternommen. Zur Bestimmung der toxikologischen Wirkung der Nanopartikel auf die Zellen

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

wurden Resazurin-Tests, MTT-Tests sowie eine Realzeit-Bestimmung mittels Rasterkraftmikroskop durchgeführt.

4.4.13. Realzeitbestimmung der Nanopartikeltoxizität

Mithilfe einer von Fang et al. entwickelten Methode^[120] ist es möglich, die toxische Wirkung von Nanopartikeln oder anderen Substanzen auf Zellen in Echtzeit zu beobachten. Die Methode wurde in Kapitel 3.3.3 näher beschrieben. 100 µl einer HeLa-Zellen-Lösung wurden so auf den Cantileverhalter gegeben, dass der Cantilever von der Lösung umgeben war. Es wurde eine halbe Stunde gewartet, um den HeLa-Zellen die Möglichkeit zu bieten, sich adhäsiv auf dem Cantilever abzusetzen. Der Cantilever wurde folglich bei einer Frequenz von 22 kHz zur Schwingung angeregt. Nachdem die Auslenkung des Cantilevers während 30 Minuten gemessen wurde (9 Datenpunkte pro Sekunde), wurde der Tropfen vorsichtig entfernt und ein Tropfen (100 µl) der zu untersuchenden Nanopartikel-Lösung wurde aufgegeben. Die Messkurve wurde anschließend ausgewertet.

4.4.14. Resazurin-Tests an HeLa -Zellen

10.000 HeLa-Zellen pro Well wurden in 200 µl 10 %-igem FBS DMEM gesät und 23 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Die Kohlenstoffdioxid-Konzentration wurde dabei bei 4 % gehalten. Anschließend wurden aus jedem Well 110 µl entfernt, die restlichen 90 µl wurden mit 10 µl einer 120 nM Nanopartikel-Lösung versetzt, sodass in der Lösung eine Konzentration von 12 nM vorlag, und zehn Mal in einem 50 µl Multichannel vermischt. Nach 23-stündiger Inkubation bei 37 °C und 4 % CO₂ wurden 20 µl Resazurin hinzugefügt. Die Viabilität wurde anschließend 4 Stunden lang fluorometrisch bei 590 nm bestimmt. Die Messungen fanden halbstündlich statt.

Analog zu dieser Messung wurden Untersuchungen mit anderen finalen Nanopartikel-Konzentrationen (6 nM, 3 nM, 1,5 nM) vorgenommen. Als Referenz wurde eine Lösung ohne Nanopartikel vermessen. Zu jeder Konzentration sowie zur Referenz wurden sechs Wells getestet.

4.4.15. MTT-Tests an MCF-7 -Zellen

Die Zellviabilität von MCF-7-Zellen wurden mittels MTT-Tests überprüft. Dazu wurden 100 μl einer Zelllösung, die 10^5 Zellen pro ml enthielt, in einem Well für 24 Stunden inkubiert. Das Kultiviermedium wurde daraufhin durch 100 μl DMEM ersetzt, das verschiedene Nanopartikel-Konzentrationen (12 nM, 6 nM, 3 nM, 1,5 nM) enthielt. Daraufhin wurde es für weitere 23 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 10 μl MTT (5 mg/ml in PBS-Puffer) hinzugefügt und während 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 -Gehalt wirken gelassen. Das Kulturmedium wurde anschließend vorsichtig entfernt und mit 150 μl DMSO versehen. Die optische Dichte wurde bei 490 nm bestimmt. Diese Tests wurden an der Academy of Science, Ningbo, Volksrepublik China durchgeführt.

4.4.16. Echt-Zeit-Beobachtung der Zellviabilität

Ein SNL-10(B) Cantilever mit einer nominellen Federkonstante von $k = 0,12 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ wurde in eine Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz bei etwa 22 kHz versetzt. Seine Durchbiegungsempfindlichkeit und seine genaue Federkonstante wurden in destilliertem Wasser bestimmt. Die Durchbiegungsempfindlichkeit wurde gegen einen harten Silizium-Wafer gemessen. Daraufhin wurde das Wasser entfernt und 100 μl einer HeLa Zelllösung um den Tropfen gegeben, sodass die Zellen am Cantilever adsorbieren konnten. Die Auslenkung der Cantilever-Schwingung wurde mit 9 Hertz gemessen. Nach 30 Minuten wurde die Zelllösung durch eine Mischung von Nanopartikel-Lösung und Zellmedium vorsichtig ersetzt. Die Nanopartikel-Konzentrationen in dieser Mischung betragen 12 nM, 6 nM, 3 nM oder 1,5 nM. Daraufhin wurde die Amplitude noch etwa 2,5 Stunden lang gemessen. Der B -Wert wurde durch eine selbstprogrammierte Software, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, aus der Dämpfung der Amplitude berechnet.

4.4.17. *In vitro* Photothermale Therapie -Tests

Zur Untersuchung der Effektivität der synthetisierten Nanopartikel mittels Photothermaler Therapie wurden 100 μl MCF-7 -Zellen (10^5 Zellen/ml) bei 37 °C und 5 % CO_2 -Gehalt der Luft 24 Stunden lang gehalten. Daraufhin wurde das Kulturmedium durch eine Mischung von Kulturmedium und Nanopartikel-Lösung ersetzt. Die finale Nanopartikel-Lösung betrug 12 nM, der Versuch wurde für Nanopartikel-Konzentrationen von 6 nM, 3 nM, 1,5 nM und ohne Nanopartikel wiederholt. Die Nanopartikel wurden 12 Stunden lang inkubiert.

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Anschließend wurden die Zellen mit PBS Puffer mehrfach gewaschen. Danach wurde 100 µl frisches Medium hinzugegeben. Folglich wurden die Zellen mit einem kontinuierlichen Laser bei 532 nm und Laser-Leistungen von 100 bis 400 mW/cm² 30 Minuten lang bestrahlt. Daraufhin wurden die MCF-7 -Zellen weitere 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Ihre Viabilität wurde schließlich durch einen MTT-Test bestimmt. Diese Tests wurden an der Academy of Science, Ningbo, Volksrepublik China durchgeführt.

4.4.18. *in vivo* -Studien

Zur Überprüfung des *in vivo* -Verhaltens der synthetisierten Nanopartikel wurden diese nach Aufreinigung intravenös in Lebewesen injiziert. Dazu wurden weibliche BALB/c -Mäuse im Alter zwischen 4 und 6 Wochen von der Nanjing Cavins Biotechnology Co., Ltd (Nanjing, China) gekauft und nach dem Protokoll des regionalen Ethik-Komitees für Tierexperimente an der Ningbo University, China (Permit No. SYXK (Zhe) 2019-0005) behandelt. Zum Testen der Toxizität wurden den Versuchsmäusen 100 µl 12 nM Nanopartikel-Lösung in PBS intravenös in den Schwanz injiziert. Einer Kontrollgruppe wurde 100 µl PBS injiziert. Nach 14 Tagen wurden die Hauptorgane (Herz, Leber, Niere, Lunge und Milz) mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologisch untersucht.

Zur Untersuchung der Verteilung der Nanopartikel in den Hauptorganen wurden gesunden Versuchsmäusen 100 µl 12 nM Nanopartikel-Lösung in PBS injiziert. Nach unterschiedlichen Zeiten (12 Stunden, 24 Stunden und 72 Stunden) wurden die Hauptorgane (Herz, Leber, Lunge, Milz, Niere und Hirn) in 50 ml Zentrifugen-Tubes gelegt und mit 2 ml Salpetersäure sowie 6 ml Salzsäure versetzt. Die Tubes wurden 12 Stunden lang in einem Wasserbad bei 100 °C gelagert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Lösungen durch 0,22 µm -Membranen gespeist. Die Lösungen wurden daraufhin mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Gold-Konzentration in den Lösungen wurden per induktiv-gekoppeltem optischem Emissions-Spektrometer (ICP-OES) gemessen.

Diese Tests wurden an der Academy of Science, Ningbo, Volksrepublik China durchgeführt.

4.5. Ergebnisse und Diskussion

4.5.1. Charakterisierung der Gold-Nanopartikel

Die erste Synthese der Gold-Nanopartikel wurde bei einer Laser-Leistung von 30 J/cm^2 durchgeführt. Die Lösung hatte dazu eine Natron-Wasserglas-Konzentration von 10^{-5} M und eine Natrium-Chlorid-Konzentration von 10^{-6} M . Während des Ablations-Prozesses war die Schock-Welle der Ablation akustisch deutlich vernehmbar. Schon nach 30 Sekunden färbte sich die Lösung rosa, was auf eine erfolgreiche Synthese von Gold-Nanopartikeln hinwies. Nach 15 Minuten war die Lösung tiefrot.

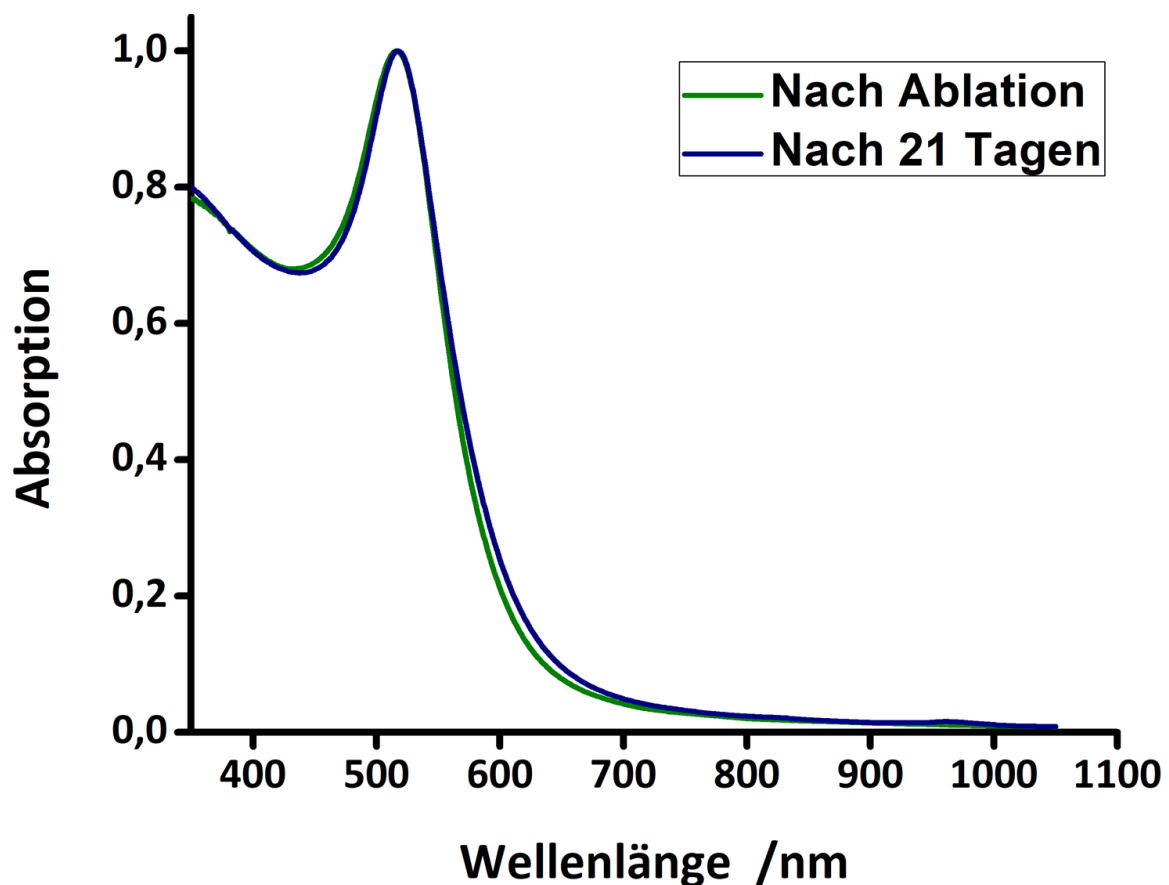


Abbildung 25 - UV/Vis-Spektrum der per PLAL synthetisierten Gold-Nanopartikel nach Ablation und 21 Tage später. Die Ablation bei 518 nm ist typisch für Gold-Nanopartikel. Die Ähnlichkeit der beiden Kurven deutet auf eine hohe Stabilität der Nanopartikel hin. Agglomeration und Aggregation sind nicht erkennbar.

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Abbildung 25 zeigt ein UV/Vis-Spektrum einer 1:10-Verdünnung dieser Lösung in destilliertem Wasser. Die Wellenlänge der Oberflächenresonanz lag bei 518 nm, was typisch ist für Gold-Nanopartikel mit einer Größe von 10 nm bis 100 nm. Auffällig war außerdem der starke Anstieg der Absorption in Richtung sinkender Wellenlängen. Abbildung 26 zeigt zum

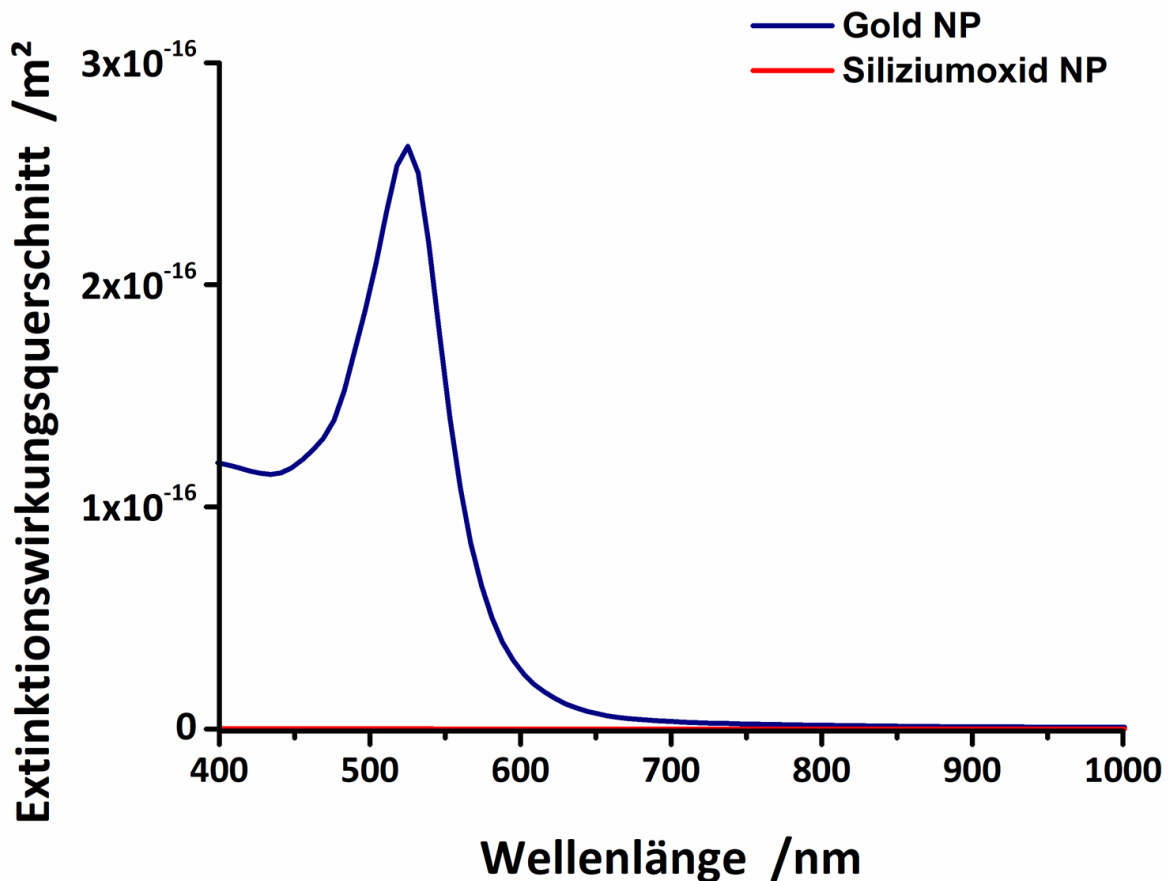


Abbildung 26 - Theoretisches UV/Vis-Spektrum von Gold-Nanopartikeln und Silikat-Nanopartikeln. Die Absorption der Silikat-Nanopartikel ist vernachlässigbar, die der Gold-Nanopartikel ähnelt dem gemessenen Spektrum aus Abbildung 25.

Vergleich schematisch ein UV/Vis-Spektrum von Siliziumdioxid-Nanopartikeln und reinen Gold-Nanopartikeln, jeweils mit 15 nm Durchmesser.^[263] Die Absorption von Siliziumdioxid-Nanopartikeln ist im gemessenen Bereich sehr viel geringer als die der Gold-Nanopartikel und kann vernachlässigt werden. Silizium ließ sich somit nicht durch das UV/Vis-Spektrum allein nachweisen.

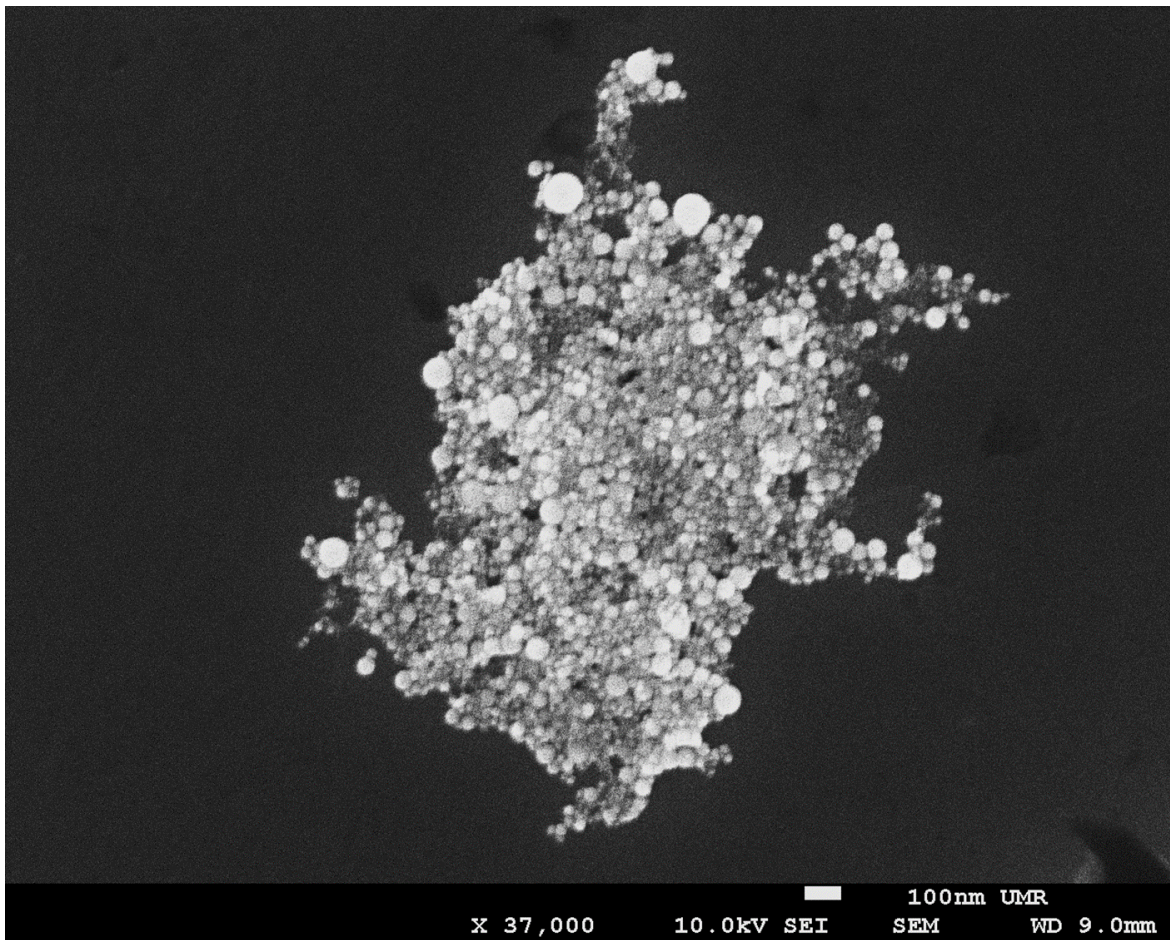


Abbildung 27 - Elektronenmikroskopische Aufnahme der synthetisierten Nanopartikel. Die Helligkeit ließ auf Gold schließen. Die Größe der Nanopartikel lag meist unter 100 nm.

Weitere Strukturaufklärungen wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie (SEM) unternommen. Abbildung 27 zeigt Aufnahmen der Nanopartikel. Es ist deutlich zu sehen, dass eine Core-Shell-Struktur vorlag, wobei der innere Kern mit einem Durchmesser von etwa 15 nm aufgrund seines hellen Signals wahrscheinlich aus einem schweren Metall bestand, während die Schale, die eine Dicke von etwa 2 nm aufwies, aus leichteren Atomen aufgebaut war. Die Lösung, in der ablatiert wurde, war aus Natrium, Chlor, Silizium, Wasserstoff, Sauerstoff und Verbindungen dieser Elemente zusammengesetzt; die Ablation fand auf reinem Gold statt. Es ist generell davon auszugehen, dass Natrium und Chlor im Mechanismus der Nanopartikel-Entstehung zwar eine größenlimitierende Rolle spielten, jedoch nicht Bestandteil der entstehenden Nanopartikel waren. Der schwere Kern bestand vermutlich aus Gold, während die Schale aus dem leichteren Silizium oder Siliziumoxiden gebildet war. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden an der Academy of Science, Ningbo, Volksrepublik China, SEM-EDX - Untersuchungen vorgenommen. Eine Aufnahme ist in Abbildung 28 zu sehen.

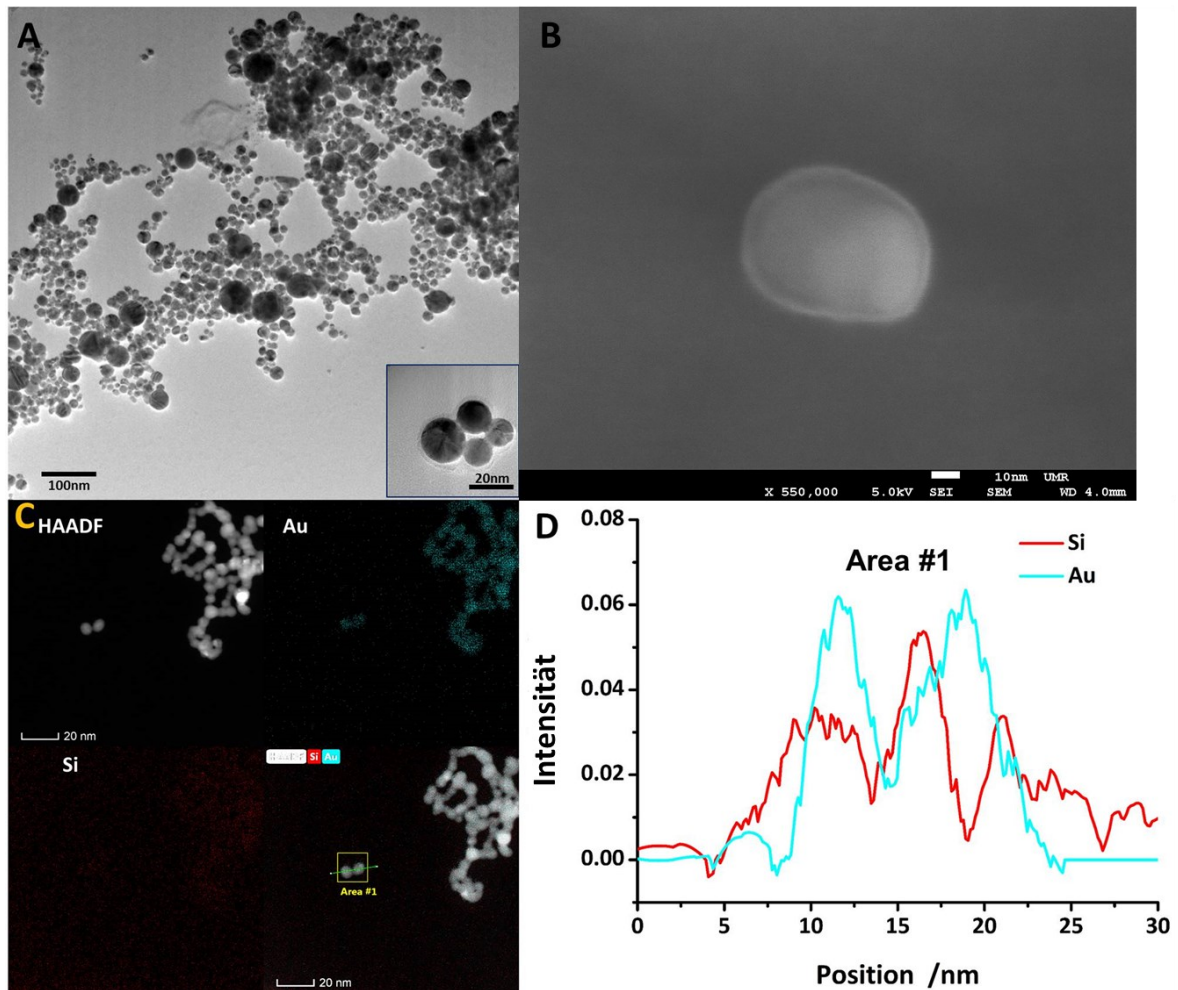


Abbildung 28 - Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nanopartikel. Sowohl im TEM (A) als auch im SEM (B) war der Schale-Kern-Charakter der Nanopartikel deutlich erkennbar. Eine SEM-EDX-Aufnahme (C, D) über zwei Nanopartikel zeigte einen Gold- sowie Siliziumanteil. Letzterer war zwischen den Nanopartikeln am höchsten, lag aber auch außerhalb des Goldanteils noch über null. Dies ließ darauf schließen, dass es sich um Gold-Nanopartikel mit Silikat-Schale handelte. Die Aufnahmen in (A) und (B) bekräftigten diese Annahme.

Abbildung 28 B) zeigt eine Elementanalyse als Querschnitt durch zwei Nanopartikel. Es ist erkennbar, dass die Dichte an Goldatomen im Kern der Partikel hoch war, während sich die Dichte an Silizium über den Kern raus erstreckte und seinen Höchstwert zwischen den beiden Nanopartikel-Kernen erreichte. Die Aufnahme bestätigte somit die Vermutung, dass der Kern aus Gold bestand, während die Schale aus Silizium oder einer Silizium-Verbindung gebildet war. Wahrscheinlich handelte es sich hier um Siliziumoxide, die sich bei den hohen Temperaturen, die bei der Ablation entstanden, aus den reaktiven Spezies des Natronwasserglases und des Wassers bildeten. Das stabilste und somit wahrscheinlichste Siliziumoxid ist Siliziumdioxid. Es handelte sich also wahrscheinlich um Nanopartikel mit einem Gold-Kern und einer Siliziumdioxid-Schale, kurz bezeichnet als $Au@SiO_2$ -NP.

Abbildung 29 zeigt Transmissions-Elektronenmikroskopie-Bilder, die die Kern-Schale-Struktur verdeutlichen. Der dunkle Kern zeugt von dichten Materialien, die Elektronen schlecht oder gar nicht passieren ließen. Die Annahme eines Goldkerns wurde auch hier bestätigt, während die Schale kaum vom Kohlenstoffsubstrat zu unterscheiden war.

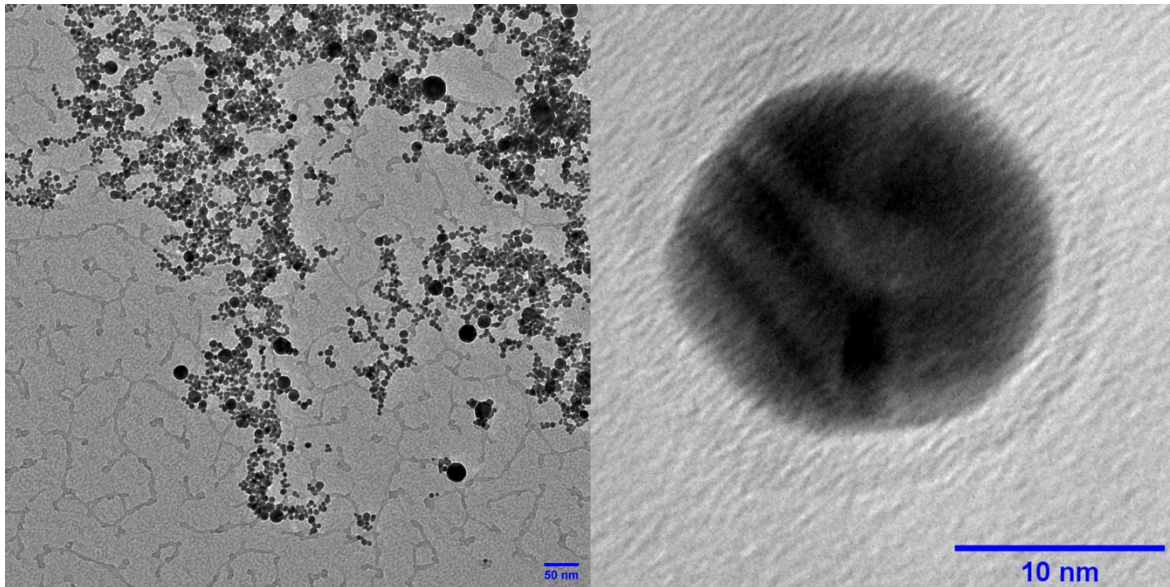


Abbildung 29 - Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nanopartikel. Auch hier war der Kern-Schale-Charakter deutlich erkennbar.

Die entstandenen Nanopartikel hatten die Form einer Kugel, wie es meistens bei der Synthese über gepulste Laserablation in Flüssigkeiten der Fall ist. Die Kugel ist die thermodynamisch günstigste Form, da sie das geringste Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis aufweist.

Aus den Erkenntnissen über den strukturellen Aufbau der Nanopartikel und dem bisherigen Kenntnisstand bezüglich der Entstehung von Nanopartikeln aus der Ablation heraus ließ sich ein Mechanismus zur Synthese der Au@SiO₂-Nanopartikel ableiten. Durch den eintreffenden Laserpuls wurde das Target aufgewärmt. Atome und Cluster wurden aus dem Goldbarren rausgelöst und lagen im entstehenden Plasma als Seeds vor, die folglich in die Kavitationsblase entlassen wurden. Hier bildeten sich aus den höchstreaktiven Spezies durch Rekombination stabilere Substanzen, bevorzugt aber Verbindungen aus Silizium und Sauerstoff. Verbindungen aus Gold und Sauerstoff waren hingegen weniger wahrscheinlich. Die Silizium-Oxid-Verbindungen beschränkten das Wachstum der Gold-Nanopartikel, indem sie eine Schale ausbildeten. Folglich kam es zu einer relativ geringen Größenverteilung, wie in Kapitel 4.5.2.3

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

gezeigt wird. Abbildung 30 zeigt diesen Vorgang schematisch. Den Au@SiO₂ -Nanopartikeln konnte dank Dynamic Light Scattering (DLS) -Messungen ein sehr negatives ζ -Potenzial von -58,7 mV (\pm 13,9 mV) nachgewiesen werden. Aufgrund dieser großen Oberflächenladung kam es zu einer hohen Repulsion zwischen den einzelnen Nanopartikeln. Dies führte zu einer Langzeitstabilität, die ganz ohne stabilisierende Additive gegeben war.

Abbildung 25 zeigt das UV/Vis-Spektrum der Au@SiO₂ -Lösung (1:10 verdünnt) direkt nach der Ablation sowie 21 Tage später. Die sehr geringe Differenz zwischen den beiden Linien deutete auf eine große Konsistenz der Lösung hin. Die fehlende Peak-Vergrößerung und Peak-Verschiebung ließen eine Agglomeration der Partikel ausschließen.

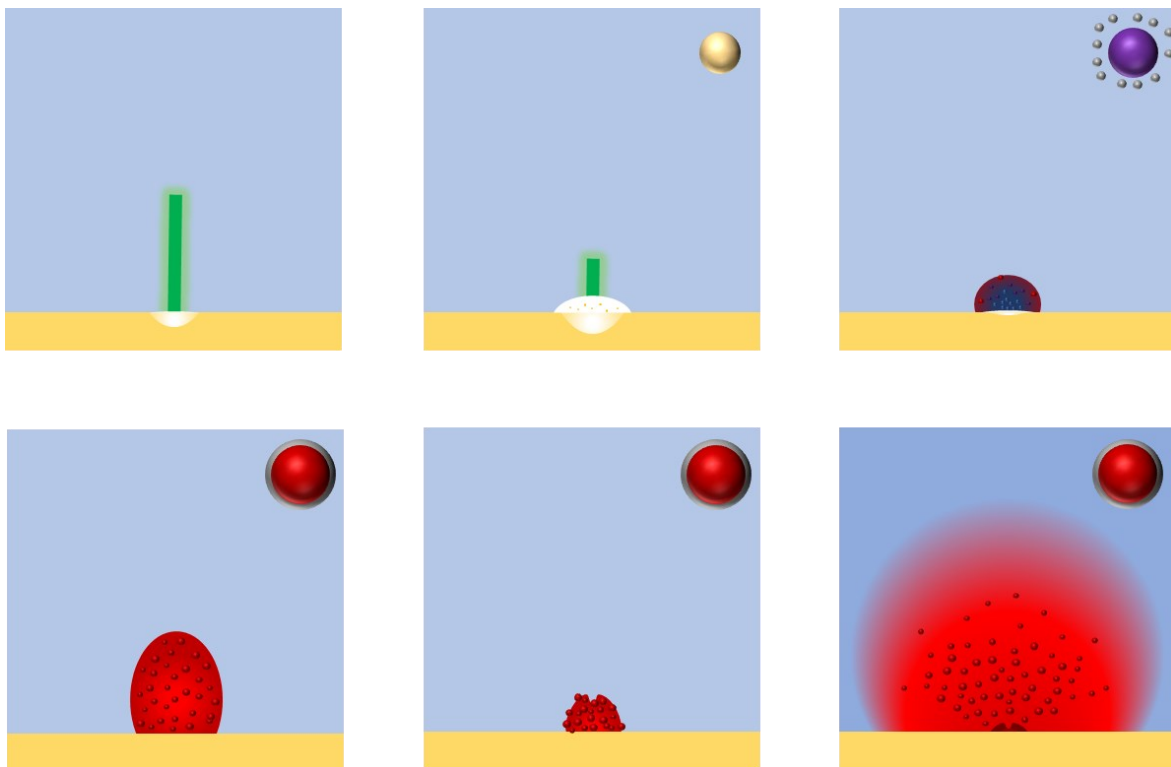


Abbildung 30 - Synthese der Nanopartikel. Der Laserpuls führte zur Abtragung einzelner Atome und Fragmente des Gold-Targets, die folglich im Plasma vorlagen und in danach in die Kavitationsblase übertragen wurden. Wegen seines edlen Charakters entstand zuerst der Gold-Kern, der danach von Silizium-Sauerstoff-Verbindungen umgeben wurde. Die Silikatschicht schränkte das weitere Wachstum der Nanopartikel ein, was zu kleinen Nanopartikeln führte.

4.5.2. Optimierung der Systemparameter

4.5.2.1. Übersicht der Ergebnisse nach Laserablation bei 532 nm

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Systemparameter auf die Eigenschaften der synthetisierten Nanopartikel wurden diese Parameter variiert und die Nanopartikel auf Größe und Zusammensetzung erprobt. Zusätzlich wurden ζ -Potenzial und UV/Vis-Spektren aufgenommen. Eine Übersicht der Kern- und Schalengrößen bei verschiedenen Pulsenergien und Konzentrationen an Natronwasserglas ist in Abbildung 31 zu sehen. Abbildung 32 zeigt eine Übersicht der UV/Vis-Spektren und des ζ -Potenzials.

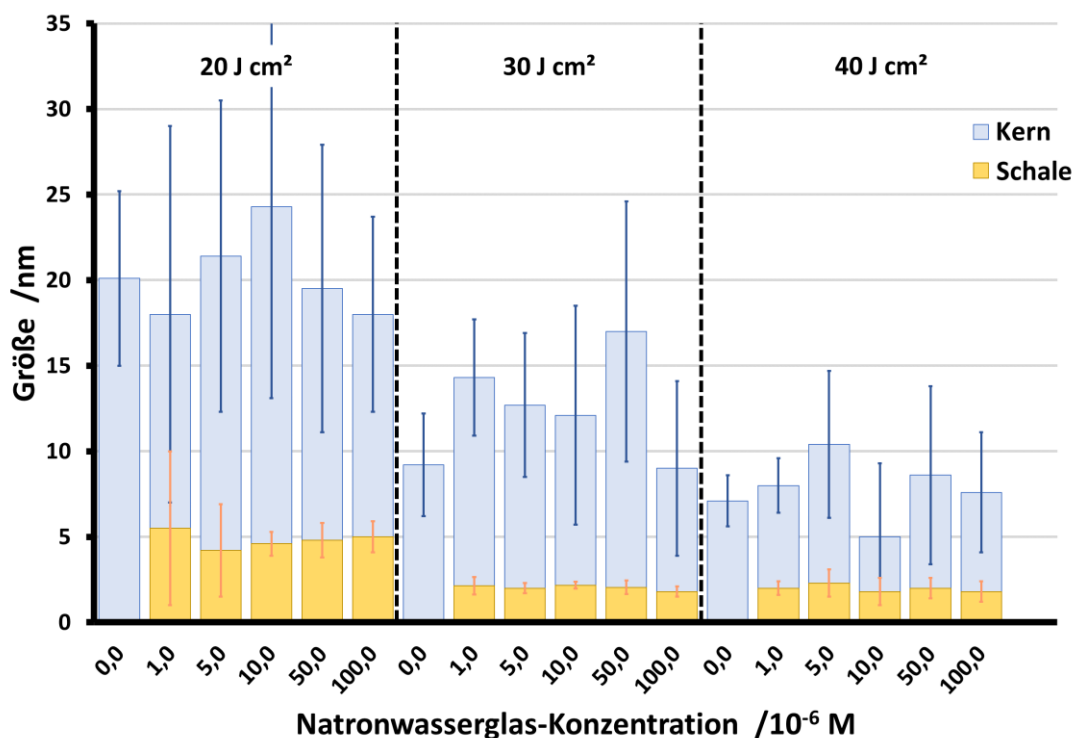


Abbildung 31 - Übersicht der Größe des Kerns und der Schale der Nanopartikel mit Standardabweichung in Abhängigkeit der Natronwasserglas-Konzentration und der Pulsenergie. Mit steigender Pulsenergie wurden die Nanopartikel im Schnitt kleiner. Auch ihre Größenverteilung wurde enger. Die Konzentration an Natronwasserglas beeinflusste die Dicke der Kernschale interessanterweise nicht. Bei $30 J/cm^2$ sowie bei $40 J/cm^2$ lag sie konstant um 2 nm.

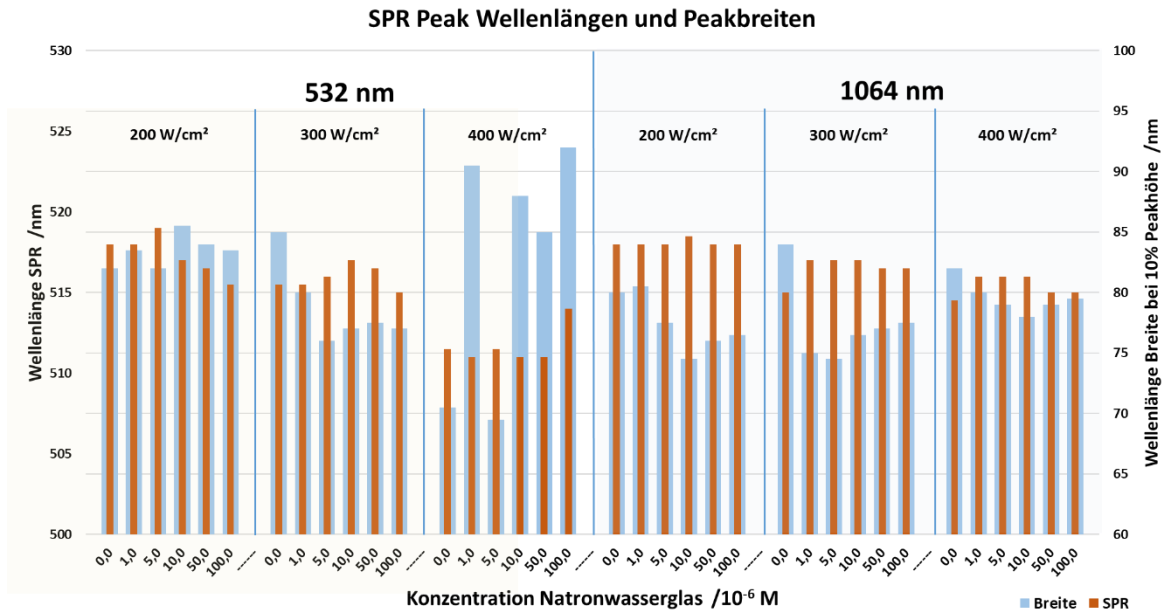


Abbildung 32 - Vergleich Oberflächenplasmonen-Wellenlänge und Breite des Peaks im UV/Vis-Spektrum. Auffällig ist die breite Größenverteilung bei kleiner SPR-Wellenlänge für 532 nm und 40 J/cm².

Die Energie des eintreffenden Pulses beeinflusste sowohl Größe als auch Temperatur des Plasmas und der entstehenden Kavitationsblase. Bei höheren Pulsenergien konnte einerseits mehr Material abgetragen werden, andererseits konnten auch mehr reaktive Spezies im Plasma entstehen. Die Rekombination konnte länger dauern als bei kleineren Pulsenergien. Das wirkte sich auf die Zusammensetzung und Größenverteilung der Nanopartikel aus. Auch ihr ζ-Potenzial konnte sich dadurch ändern.

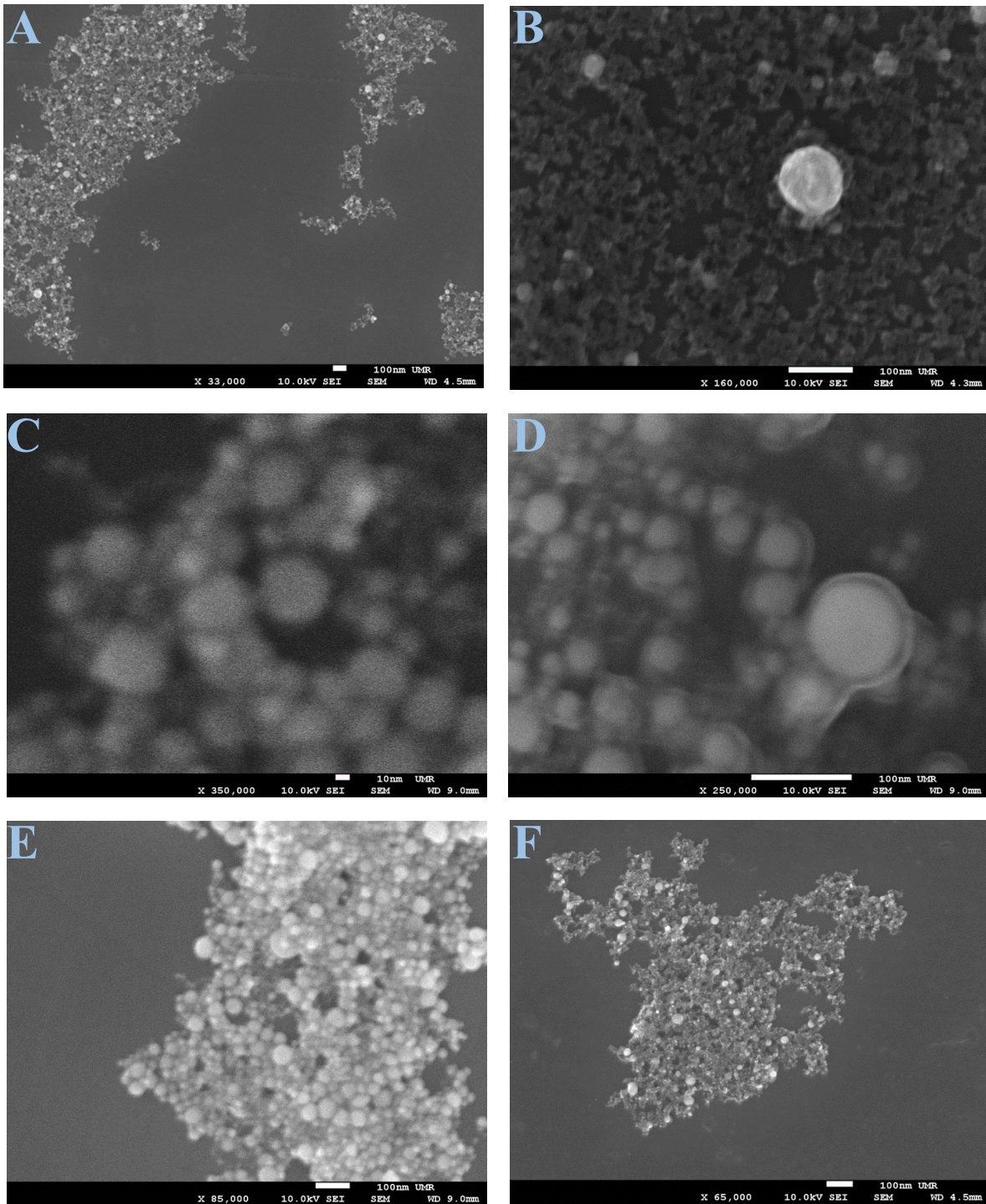


Abbildung 33 - SEM-Aufnahmen der per PLAL synthetisierten Nanopartikel bei verschiedenen Pulsstärken. A+B) 20 J/cm^2 C+D) 30 J/cm^2 E+F) 40 J/cm^2 .

Im Versuch wurden drei verschiedene Laserenergien untersucht. Abbildung 33 zeigt SEM-Bilder ausgewählter Proben. Es ist ersichtlich, dass sich die Zusammensetzung der Nanopartikel nicht durch die Pulsenergie änderte. In allen Fällen bestand der Kern aus einem schweren Metall, hier also vermutlich Gold, und einer leichteren Schicht, hier vermutlich ein Silikat. Die Größe der Nanopartikel hingegen sank mit größer werdender Pulsenergie. Dies

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

kann damit zusammenhängen, dass durch höhere Energien kleinere Fragmente und Cluster aus dem Target ablatiert wurden. Neben dem geringeren Durchmesser der Nanopartikel nahm auch ihre Größenverteilung mit größer werdender Pulsenergie leicht ab, die Nanopartikel waren also weniger dispers. Bemerkenswert ist, dass die Schalendicke bei einer Pulsenergie von 30 J/cm^2 in etwa die Größe hatte wie bei einer Pulsenergie von 40 J/cm^2 . Ab einer Pulsenergie von 30 J/cm^2 hatte die Pulsenergie also keinen Einfluss mehr auf die Dicke der Schale, obgleich der Gesamtdurchmesser des Nanopartikels sank.

Die Konzentration an Natronwasserglas in der Lösung hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Größe der Nanopartikel. Es ist kein Trend erkennbar. War bei einer Pulsenergie von 20 J/cm^2 noch eine Beeinflussung des Nanopartikeldurchmessers durch die Silikatschicht vermutbar, so hatten die Nanopartikel bei Pulsenergien von 30 J/cm^2 und 40 J/cm^2 unabhängig vom Vorhandensein von Natronwasserglas und folglich von der Silikatschicht einen relativ konstanten Kerndurchmesser. Nur bei einer Pulsenergie von 20 J/cm^2 schien die Silikatschicht dazu zu führen, dass der Kerndurchmesser ohne Natronwasserglas deutlich höher lag. Allerdings lag bei dieser Pulsenergie die Standardabweichung der Messungen (und somit die Breite der Größenverteilung) im Mittel am Höchsten. Auch war das akustische Geräusch der Schockwelle nicht so deutlich. Vermutlich wurde hier nur knapp über dem Schwellwert ablatiert.

4.5.2.2. Vergleich mit Ablation bei 1064 nm

Ein weiterer zu untersuchender Parameter war der Einfluss der Wellenlänge der Laserpulse. Da sich das Absorptionsmaximum von Gold-Nanopartikeln um etwa 522 nm verteilte (Oberflächenplasmonenresonanz), absorbierten bereits in Lösung befindliche Gold-Nanopartikel einkommende Photonen des Laserpulses und schwächten den Ablationseffekt am Target somit ab. Dies konnte mit einer Umstellung der Laser-Wellenlänge auf 1064 nm umgangen werden. Die Transmission für Photonen mit 1064 nm Wellenlänge lag in der Nanopartikel-Lösung beinahe bei 1, am Target selbst jedoch bei 0. Abbildung 34 zeigt eine Übersicht der Messungen bei 1064 nm . Eben wie die Nanopartikel nach Ablation bei 532 nm besaßen auch diese Nanopartikel ein negatives ζ -Potenzial. Jedoch waren sie generell größer und hatten eine breitere Größenverteilung. Dies lag vor allem daran, dass die Nanopartikel nach der Ablation fast unbeeinflusst in der Lösung vorlagen. Nachfolgende Laserpulse hatten keinen Einfluss mehr. Bei 532 nm hingegen führte die Ablation der Laserstrahlung zu einer

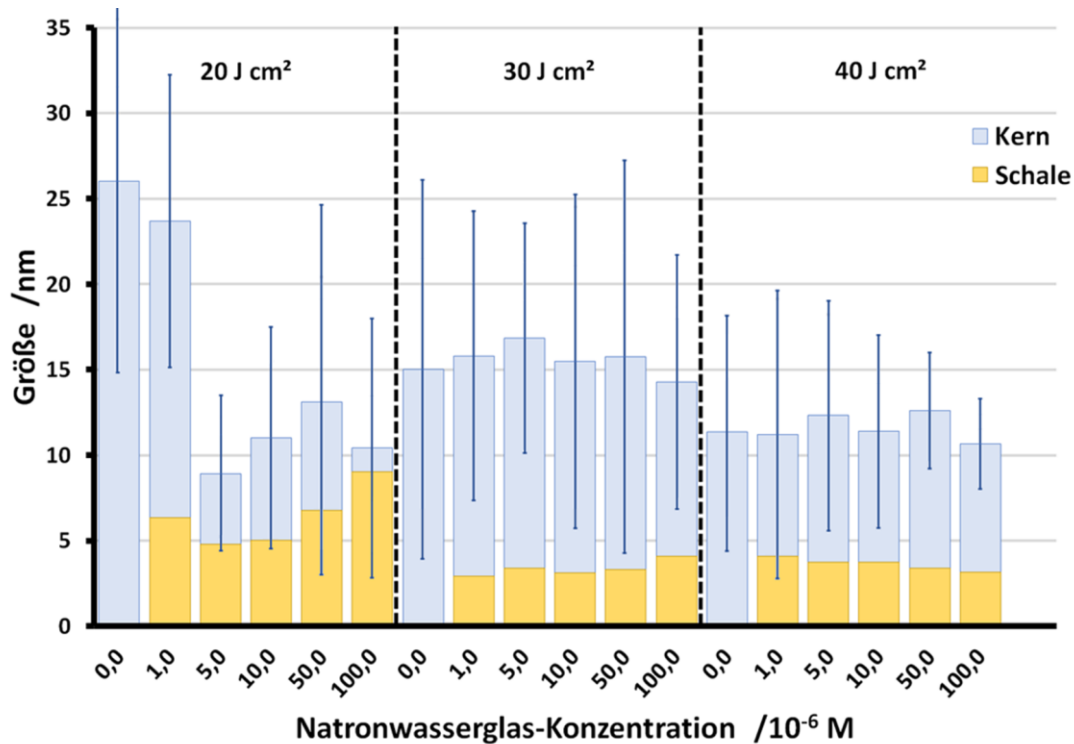


Abbildung 34 - Übersicht der Größe des Kerns und der Schale der Nanopartikel mit Standardabweichung in Abhängigkeit der Natronwasserglas-Konzentration und der Pulsenergie nach Ablation bei 1064 nm. Im Vergleich zur Ablation bei 532 nm ist kein eindeutiger Größentrend zu sehen. Außerdem ist die Größenverteilung deutlich breiter.

Fragmentierung und teilweise Neu-Formatierung der vorhandenen Nanopartikel. Dies machte die Nanopartikel generell kleiner und monodisperser. Eine geringe Breite in der Nanopartikelverteilung ist wichtig für biomedizinische Anwendungen, vor allem aber für eine grundlegende Charakterisierung bestimmter Nanopartikel, da sowohl Eigenschaften als auch daraus resultierendes Verhalten *in vitro* und vor allem *in vivo* stark davon abhängen. Daher wurde die Synthese per Laser-Ablation bei einer Wellenlänge von 1064 nm verworfen.

4.5.2.3. Auswahl und Charakterisierung der Nanopartikel für weitere Verfahren

Bei Pulsenergien von 40 J/cm² lagen viele Nanopartikel-Durchmesser bei unter 10 nm (s. Abbildung 31). Da Nanopartikel mit einem Durchmesser von unter 10 nm direkt durch die Niere ausgeschieden werden, wurde die Methode mit solchen Pulsenergien verworfen. Andererseits sollte der Goldkern relativ klein sein, um eine maximale Absorptionsrate zu gewährleisten. Aufgrund dieser Kriterien wurde sich für weitere Arbeiten für eine Pulsenergie von 30 J/cm² bei einer Natronwasserglas-Konzentration von $1,00 \cdot 10^{-5}$ Mol entschieden. Es wurden insgesamt 3386 Nanopartikel auf verschiedenen SEM-Bildern einer Probe mit den

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

optimierten Parametern aufgenommen. Abbildung 35 zeigt die Größenverteilung der Nanopartikel in Form eines Histogramms. Sie war vergleichbar mit der Größenverteilung nach chemischer Synthese von Nanopartikeln.^[264] Die Durchschnittliche Größe der Nanopartikel lag bei 13,0 nm ($\pm 6,0$ nm), davon 9 nm Kern und 4 nm Schale (2 nm Radius). Abbildung 35 zeigt außerdem die Verteilung des ζ -Potenzials der Nanopartikel (aus 208 Messungen) sowie die hydrodynamische Größe. Das ζ -Potenzial hatte einen Mittelwert von -58,7 mV ($\pm 13,9$ mV) und lag bei jeder Messung unter -30 mV. Dies sprach, wie oben bereits geschrieben, für eine zuverlässige Synthese sehr stabiler Nanopartikel, die dafür keiner Stabilisatoren bedurften. Die hydrodynamische Größe lag bei durchschnittlich 28,3 nm ($\pm 9,5$ nm) und somit über dem Größenschwellwert für die Passage durch die Blut-Hirn-Schranke.^[265] Die hydrodynamische Größe der Nanopartikel setzte sich aus dem Nanopartikel selbst zusammen sowie aus Lösungsmittelmolekülen und -atomen, die sich zu einer starren Schicht an das Nanopartikel gelagert haben. Aufgrund der hohen Ladungsdichte in den Nanopartikeln haben sich wahrscheinlich Wassermoleküle und im Wasser befindliche Natriumionen an die Nanopartikel gelagert. Der hydrodynamische Durchmesser stieg mit der Ladungsdichte. Auffällig ist jedoch, dass die Gauß-förmige Verteilung des hydrodynamischen Durchmessers nicht der Verteilung des Nanopartikeldurchmessers entsprach, welche in Richtung größer werdenden Durchmessers auslief. Eine mögliche Erklärung kann die geringere Ladungsdichte größerer Nanopartikel sein, die dadurch weniger Wassermoleküle banden als kleinere Nanopartikel mit einer höheren Ladungsdichte. Die Verteilung des ζ -Potenzials sprach nicht dagegen, jedoch ließ sich diese Vermutung durch diese Messungen nicht beweisen.

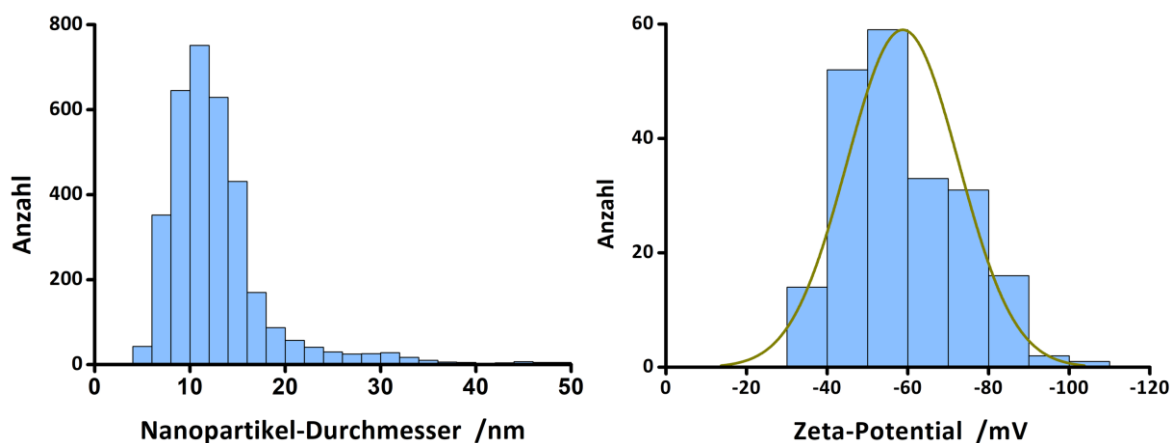


Abbildung 35 - Durchmesser und Zeta-Potenzial der Nanopartikel. Der Durchmesser der Nanopartikel betrug 13,0 nm \pm 6,0 nm (3386 Messungen). Das Zeta-Potenzial betrug -58,7 mV \pm 13,9 mV. Es handelte sich dabei um Nanopartikel mit negativer Oberflächenladung, welche sie vor Agglomeration schützte.

4.5.3. Nanomechanische Eigenschaften – Auswahl der Verfahrensmethode

Die unter den optimierten Systemparametern synthetisierten Au@SiO₂ -Nanopartikel wurden auf ihre nanomechanischen Eigenschaften geprüft. Dazu wurden drei verschiedene Methoden getestet und verglichen.

4.5.3.1. Force Volume

Force Volume ist die älteste Methode aus dem Jahre 1992.^[46] Der genaue Vorgang der Messung ist in Kapitel 1.5.3.2 erklärt. Abbildung 36 zeigt eine Topografie sowie verschiedene nanomechanische Eigenschaften der untersuchten Fläche. Die Nanopartikel waren deutlich erkennbar, allerdings musste bei Betrachtung der Größe auf die Spitzegeometrie Rücksicht genommen werden (s. Kapitel 1.7). Hier konnte es zu Artefakten kommen. Auffällig war das Rauschen, das sich in einer Vielzahl hoher Peaks bemerkbar machte und in jeder Aufnahme von oben nach unten größer wurde. Dieses Rauschen machte einen Großteil des Bildes nicht auswertbar. Eine Auswertung der mechanischen Eigenschaften beinhaltete daher immer einen Fehler. Zu den Nachteilen dieser Methode gehörten außerdem die lange Messzeit (72 Stunden pro Aufnahme) sowie die geringe Auflösung (496 x 496 Pixel bei 3 µm). Nichtsdestotrotz wurden die Kraftkurven aus drei Aufnahmen exportiert und mittels eigens programmierter Software ausgewertet (vgl. Kapitel 4.4.7). Elastizitätsmoduln mit Werten von über 30 GPa wurden nicht in die Berechnung einbezogen, da sie dem Substrat zugerechnet wurden. Analog verhielt es sich für die Auswertung der anderen Eigenschaften und Aufnahmen. Tabelle 3 fasst die Ergebnisse zusammen.

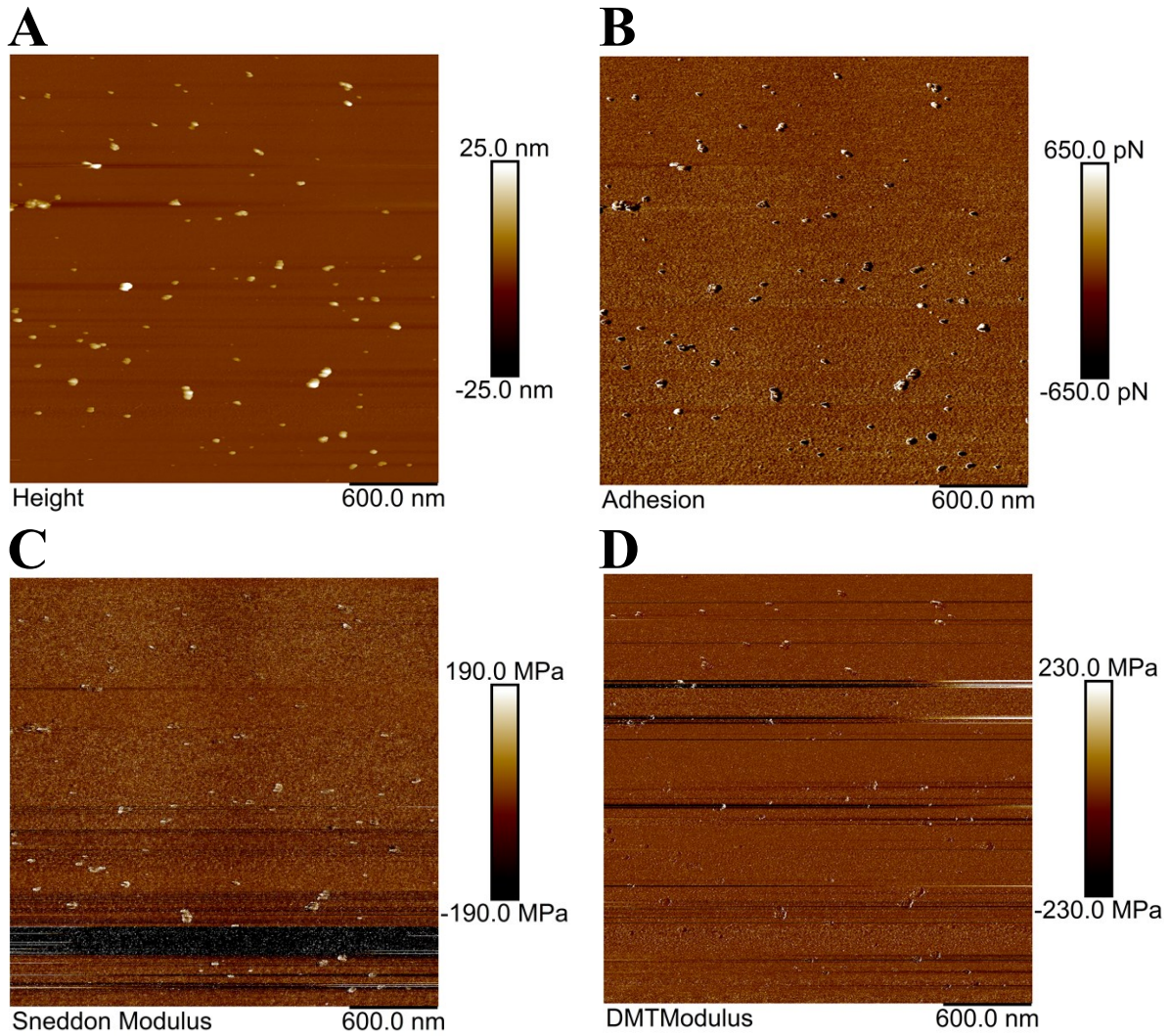


Abbildung 36 - Übersichtsbilder der Messungen mittels Force Volume Modus. Die Topografie (A) zeigt klar die Nanopartikel. Sowohl das Mapping der Adhäsion (B) als auch das der Elastizitätsmoduln nach Sneddon (C) und nach DMT (D) weisen Rauschen auf. Die Messdauer betrug 3 Tage.

4.5.3.2. Kraftspektroskopie

Um Kraft-Abstands-Kurven spezifisch an Nanopartikeln aufzunehmen, musste zuerst eine Topografie aufgenommen werden. Auf dieser wurden dann die Stellen ausgewählt, an denen Kraftspektroskopie betrieben werden sollte. Abbildung 37 zeigt Topografien der Nanopartikel.

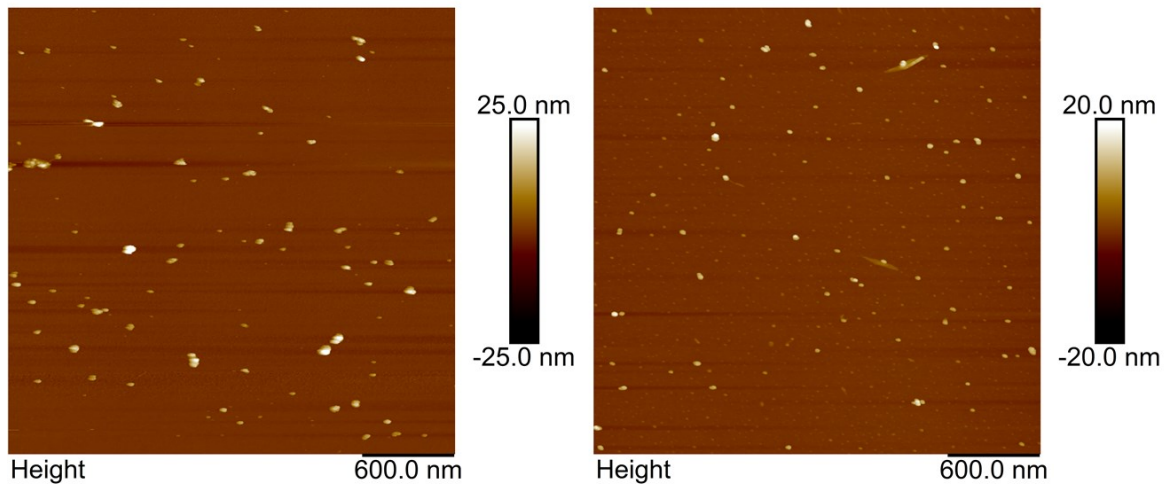


Abbildung 37 - Topographische Aufnahmen der Nanopartikel für konventionelle Kraftspektroskopie. Die Nanopartikel sind deutlich erkennbar.

Obwohl bei dieser Methode nur Nanopartikel vermessen werden sollten, kam es beim Auftragen der Elastizitätsmoduln zu einer bimodalen Verteilung. Dies lag einerseits an der Ungenauigkeit, mit der die Spitze nach Aufnahme der Topografie über einer angezielten Probenstelle positioniert wurde. Andererseits konnte es passieren, dass ein Nanopartikel nicht mehr auf der Stelle saß, auf der es zuvor topographisch erfasst wurde. Es war allerdings davon auszugehen, dass die wenigsten Aufnahmen auf reinem Substrat stattfanden. Die Werte, die der kleineren Verteilung zuzuordnen waren, wurden daher nicht in weitere Berechnungen einbezogen. Vorteile dieser Methode waren sowohl die im Vergleich zum *Force Volume* - Modus erhöhte Geschwindigkeit als auch die größere Auflösung, mit der Topografien aufgenommen wurden. Nachteil war allerdings, dass diese Methode kein Mapping erlaubte. So konnte nicht garantiert werden, dass die Spitze mittig auf ein Nanopartikel traf. Das führte neben der Größenverteilung der Nanopartikel zu einer breiteren Verteilung der Elastizitätsmoduln.

4.5.3.3. PeakForce™ Quantitative Nanomechanical Mapping

Die relativ neue Methode des PeakForce™ Quantitative Nanomechanical Mappings (PF-QNM) vereinte die Vorteile der Kraftspektroskopie und des Force Volume Modus, indem während der Messung der Topografie ein Mapping der nanomechanischen Eigenschaften stattfand. Nachteil dieser Methode war allerdings, dass nur die gängigsten Kontaktmechanismus-Modelle auswertbar waren. So war es beispielsweise nicht möglich, die gemessenen Kraftkurven nach dem JKR-Modell auszuwerten. Die einzelnen Kraft-Abstands-Kurven ließen sich auch leider nicht nachträglich aus den Aufnahmen extrahieren. Für die auswertbaren Modelle waren die Werte demnach aber umso zuverlässiger und auch auf kleinen Nanopartikeln aussagekräftig, da über jedem Nanopartikel mehrere Kraftkurven aufgenommen wurden. Abbildung 38 zeigt Topografie, Adhäsion, sowie die Elastizitätsmoduln nach DMT und einen Querschnitt davon. Die nach dem DMT Modell berechneten Elastizitätsmoduln der Nanopartikel unterschieden sich deutlich von den sehr hohen Elastizitätsmoduln des Substrats.

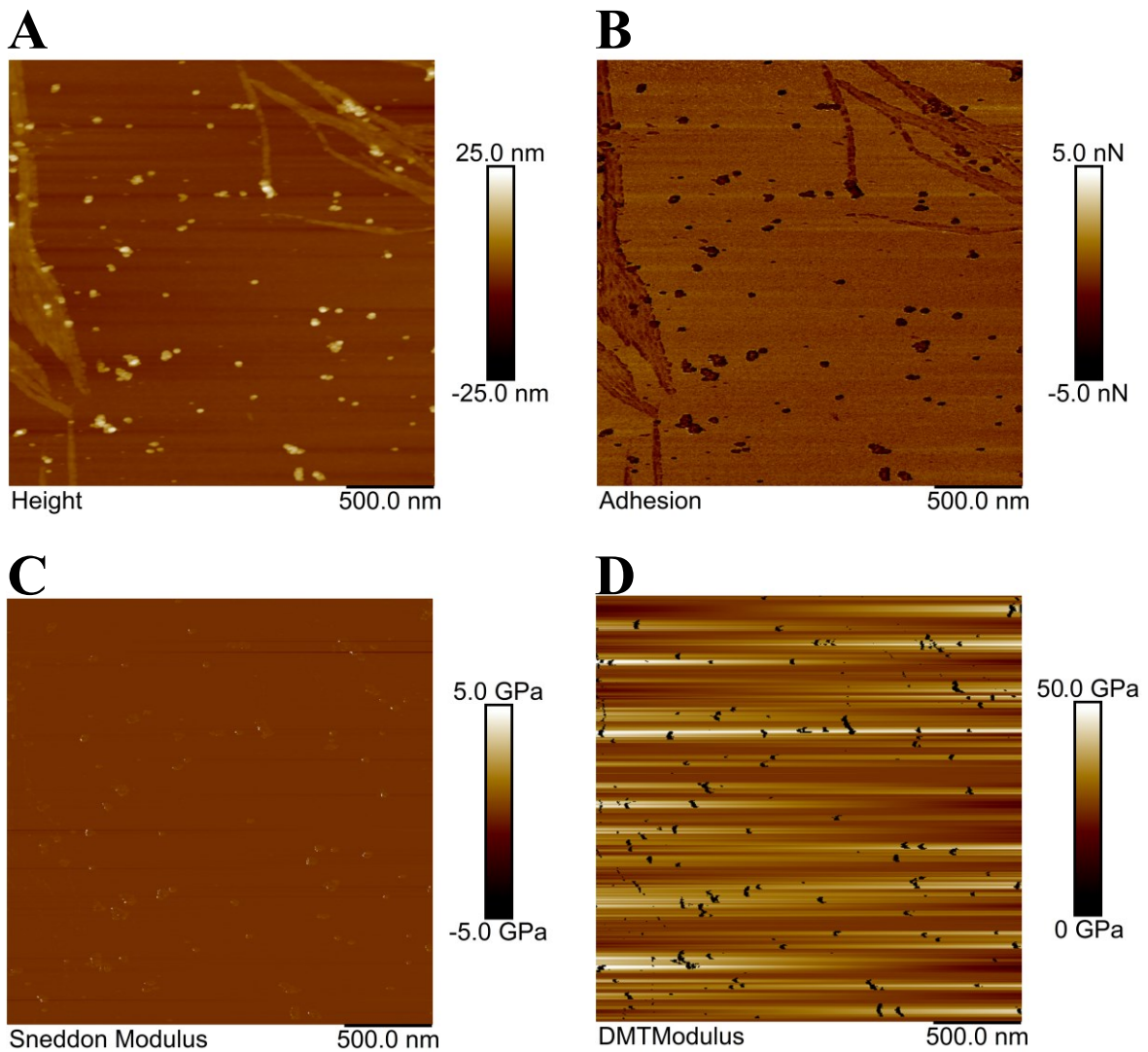


Abbildung 38 - Aufnahmen der Nanopartikel über PeakForce Tapping™. Die Nanopartikel sind deutlich in der Topografie erkennbar, und zeigen Adhäsionskräfte. Die Berechnung des Elastizitätsmoduls nach Sneddon zeigt deutlich kleinere Werte als nach DMT. Die Auswertung nach dem JKR-Modell war hier nicht möglich.

Tabelle 3 – Berechnete Elastizitätsmoduln nach ersten Messungen mit verschiedenen Messmethoden.

	Force Volume		PeakForce QNM®		Kraftspektroskopie	
	EL. /MPa	Ab. /MPa	EL. /MPa	Ab. /MPa	EL. /MPa	Ab. /MPa
Hertz	1595,8	± 484,6	-	-	-	-
Sneddon	22823,4	± 8534,6	375,5	± 651,3	87191,5	± 800,3
DMT	1507,8	± 517,6	512,8	± 535,0	366,2	± 54,0
JKR	9831,1	± 11177,4	-	-	485,1	± 26,2

4.5.3.4. Auswertungen

Da die *Force Volume* -Methode zu rausch- und zeitintensiv war, wurde diese verworfen. Aufgrund der Möglichkeit, Kraftkurven zu extrahieren und manuell auszuwerten, wurde schließlich die konventionelle Kraftspektroskopie der PF-QNM -Methode bevorzugt. Um zu unterscheiden, welche Werte der bimodalen Verteilung zum Substrat gehörten und welche den Nanopartikeln zuzuordnen waren, wurden die Aufnahmen der PF-QNM -Methode herangezogen. Hier war deutlich zu sehen, dass das Substrat ein viel höheres Elastizitätsmodul hatte (etwa 50 GPa) verglichen mit den Nanopartikeln (bis zu 1000 MPa).

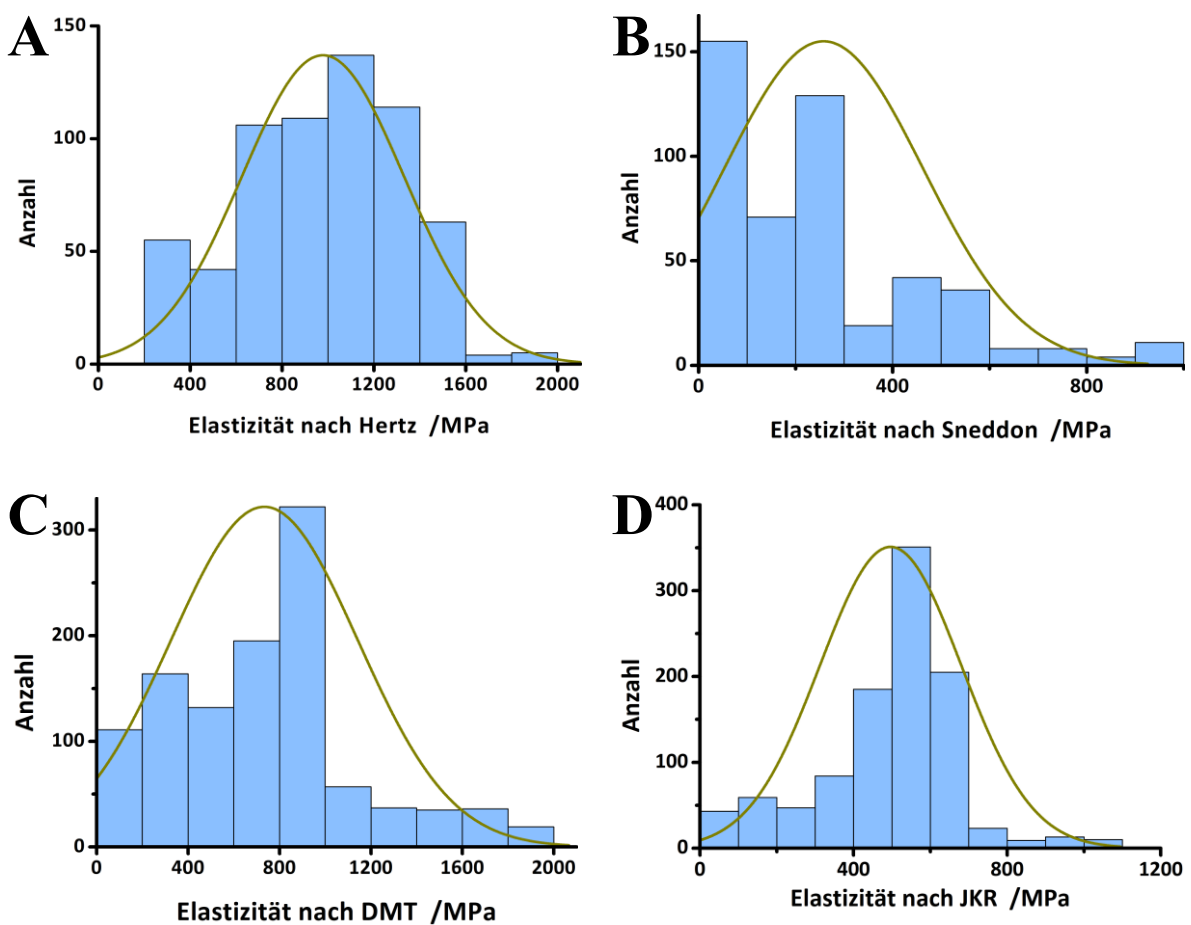


Abbildung 39 - Übersicht der Elastizitätsmoduln berechnet nach Hertz, Sneddon, DMT und JKR. Die Abweichung von einer perfekten Gauß-Form ist einerseits darauf zurückzuführen, dass die Nanopartikel unterschiedliche Größen haben, andererseits darauf, dass sie von der Spitze nicht immer mittig getroffen wurden. Weitere Faktoren ergeben sich aus sich verändernder Spitzengeometrie und der Dicke der Schale im Verhältnis zum Kerndurchmesser.

Eine umfassende Messung mit 1852 Kraft-Abstands-Kurven wurde mittels Kraftspektroskopie durchgeführt, wie in Kapitel 4.4.7 beschrieben modifiziert und ausgewertet. Werte des Substrats wurden entfernt. Die restlichen Werte wurden zu Histogrammen zusammengefasst. Es wurden sowohl Mittelwerte als auch Medianwerte berechnet. Abbildung 39 zeigt die ausgewerteten Histogramme. Die hohe Standardabweichung resultierte aus der Größenverteilung der Nanopartikel sowie aus der ungenauen Positionierung der Spitze über den Partikeln. Zur Bewertung dieser Resultate war die Auswahl des richtigen Kontaktmechanismus-Modells essenziell. Abbildung 40 zeigt eine typische Kraft-Abstands-Kurve. Der Verlauf der Retraktionslinie zeigte eindeutig, dass Adhäsionskräfte vorlagen, da das Minimum der Retraktionslinie im angepassten Bezugssystem signifikant unter 0 nN lag. Die Adhäsionskräfte sind in Abbildung 39 aufgetragen. Für die Extraktion der Elastizitätsmoduln kamen somit nur Kontaktmechanismus-Modelle in Frage, die Adhäsionskräfte miteinbeziehen. Durch DMT und JKR lassen sich gegensätzliche Grenzfälle betrachten, wobei der wahre Wert der Elastizität zwischen diesen beiden Fällen liegt. Die Auswertung nach JKR ergab ein Elastizitätsmodul von 496,5 MPa ($\pm 184,1$ MPa), nach DMT ergaben sich 733,9 MPa ($\pm 409,6$ MPa). DMT gibt den Grenzfall harter Proben wieder, die sich wenig deformieren lassen, während JKR den Grenzfall weicherer, deformierbarer Proben zeigt. In diesem Fall besaßen die Nanopartikel eine weiche, deformierbare Silikatschicht. Der Kontaktradius änderte sich also während der Messung vermutlich aufgrund der Deformierung des Partikels auf der Nanoskala (siehe Abbildung 41). Es konnte folglich erwartet werden, dass sich der Elastizitätsmodul der Au@SiO₂-Nanopartikel näher am Wert nach JKR als nach DMT befand. Eine Übersicht der Elastizitätsmoduln nach verschiedenen Kontaktmodellen ist in Tabelle 4 gegeben.

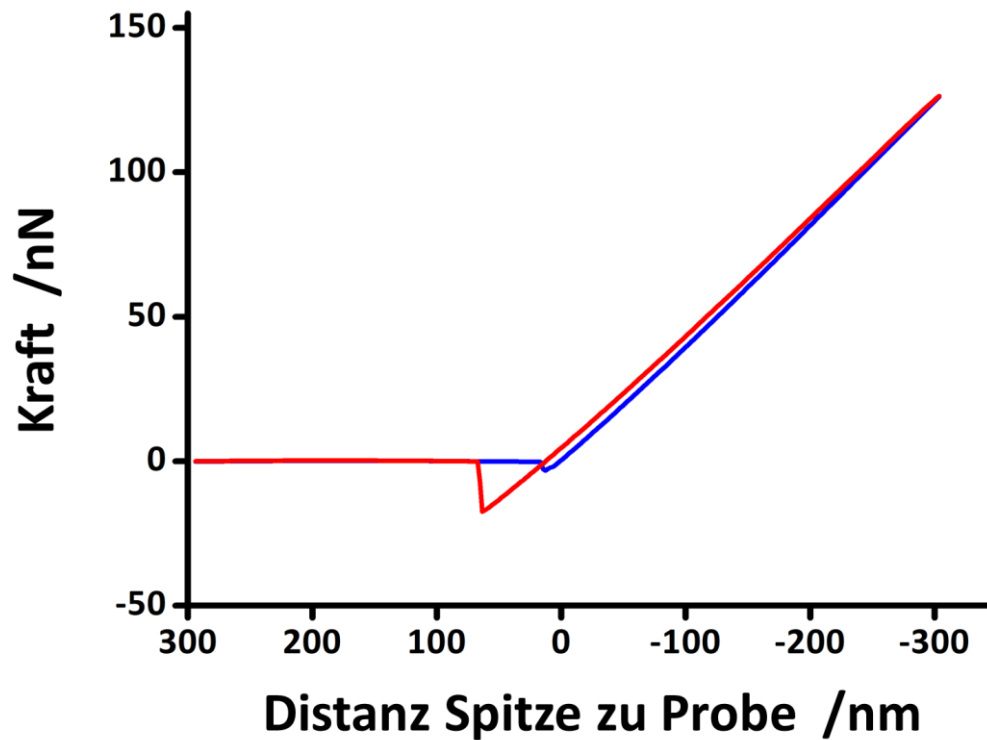


Abbildung 40 - Typische korrigierte Kraft-Abstands-Kurve eines Gold-Nanopartikels. Die Retraktionslinie (rot) wurde zur Berechnung der Elastizitätsmoduln herangezogen. Sie zeigt durch das niedrige Minimum eindeutig das Vorhandensein von Adhäsion.

Tabelle 4 – Übersicht der Elastizitätsmoduln nach verschiedenen Modellen

Model	Elastizitätsmodul /MPa	Abweichung /MPa	Anzahl analysierter Nanopartikel
Hertz	978,2	± 353,8	635
Sneddon	255,8	± 205,3	483
JKR	496,5	± 184,1	1029
DMT	733,9	± 409,6	1108

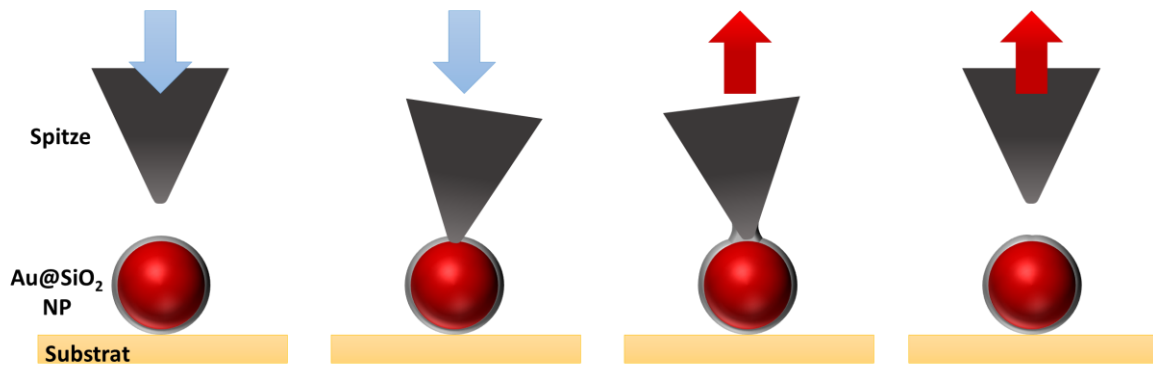


Abbildung 41 - Aufnahme einer Kraft-Abstands-Kurve an einem Au@SiO₂-Nanopartikel. Beim Zurückziehen der Spitze kann es zu leichter Verformung der weicheren Nanopartikel-Schale kommen (hier überdeutlich dargestellt), zu sehen durch Adhäsionskräfte. Der wahre Wert des Elastizitätsmoduls ist wohl näher an JKR als an DMT zu erwarten.

4.5.4. BSA Coating

Die selektive Inkubation der Nanopartikel durch einen bestimmten Zellstamm wird durch die Modifizierung der Oberfläche des kompletten Zellkomplexes (inklusive Corona) erreicht. Aus den bisherigen Untersuchungen lässt sich ableiten, dass die hier synthetisierten Nanopartikel aus einem Goldkern bestanden, der mit Glas, also Siliziumdioxid, ummantelt war (s. Abbildung 42). Die Oberfläche bestand daher vermutlich aus funktionellen Gruppen, an die eine Anbindung weiterer Moleküle stattfinden kann. Als Beispiel für eine einfache Ummantelung sollte die Anbindung von Bovinem Serumalbumin (BSA) dienen.

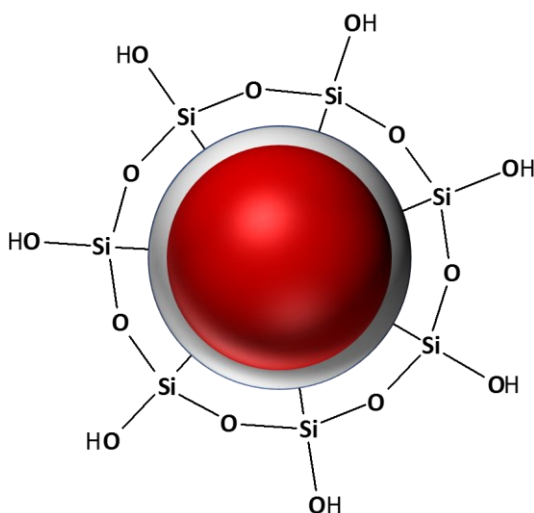


Abbildung 42 - Oberfläche des Au@SiO₂-Nanopartikels..

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

In den elektronen- sowie rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen der BSA-ummantelten Au@SiO₂ Nanopartikel bei pH 3 sind vor allem schlierenartige Strukturen zu erkennen (s. Abbildung 43). Diese kamen vermutlich durch Reste an Natronwasserglas zustande.

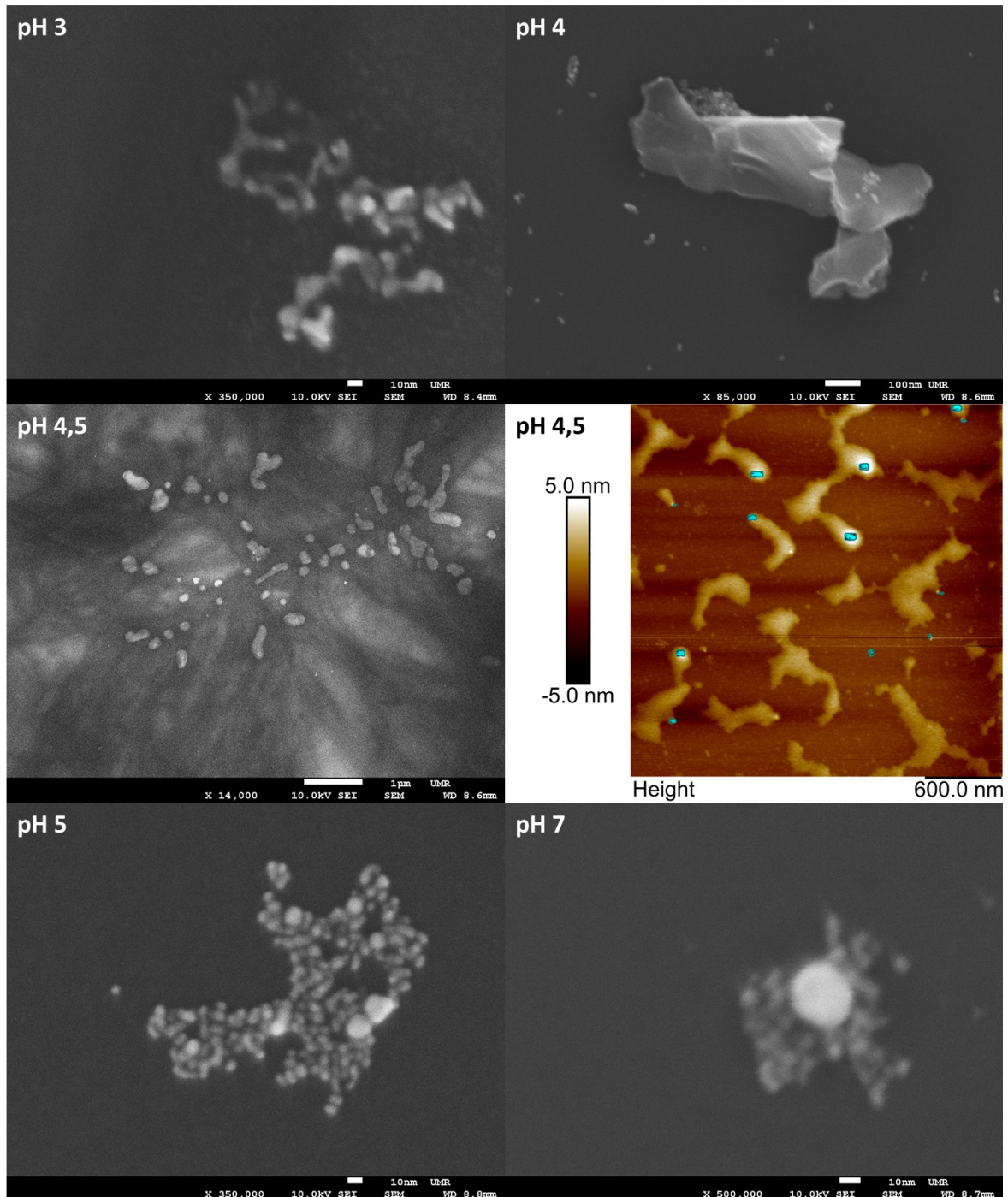


Abbildung 43 - Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nanopartikel nach Ummantelungsversuchen mit BSA bei verschiedenen pH-Werten. Während bei pH-Werten unter und über 4,5 keine Ummantelung stattfand, konnte diese bei pH 4,5 sowohl im SEM als auch im AFM gesehen werden. Die türkisenen Punkte in der rasterkraftmikroskopischen Aufnahme zeigen Stellen, an denen das Elastizitätsmodul geringer war als auf umliegendem Substrat. Dies ließ auf Anwesenheit von Nanopartikeln an diesen Stellen schließen.

Einzelne ummantelte Nanopartikel konnten nicht nachgewiesen werden. Bei der Steigerung des pH-Werts um eine Größenordnung konnten, wie in Abbildung 43) zu erkennen ist, definierte Nanopartikel, wenn auch vermehrt Agglomerate, nachgewiesen werden. Diese waren jedoch erneut von Natronwasserglas umschlossen. Entsprechend des isoionischen Punkts von BSA (5,2^[266]) bestätigte sich die Annahme, die besten Ergebnisse bei einem pH von 4,5 zu erhalten.

Abbildung 43 zeigt außerdem eine elektronenmikroskopische Abbildung der BSA-ummantelten Au@SiO₂ Nanopartikel bei pH 4,5. Hierbei wurde die mittels BSE sowie SE-Detektor aufgenommenen Bilder überlagert. Die Überlagerung ermöglicht die visuelle Unterscheidung des harten Goldkerns vom weichen BSA-Mantel. Das identische Resultat konnte mittels Rasterkraftmikroskopie erzielt werden. Bei einem pH-Wert oberhalb des isoelektrischen Punktes konnten hauptsächlich Agglomerate nachgewiesen werden. Abbildung 43 zeigt ebenfalls SEM- sowie AFM-Aufnahmen der BSA-ummantelten Nanopartikel bei pH 5 und pH 7.

4.5.5. Photothermische Energie-Konvertierung

Zu Zwecken der Hyperthermie-Behandlung ist es Bedingung, dass die Nanopartikel genügend Laserenergie in Wärme konvertieren. Die Effektivität dieser Konvertierung wurde in Abhängigkeit der Laserleistung bei 12 nM Konzentration sowie der Nanopartikel-Konzentration bei 400 mW Laserleistung getestet und ist in Abbildung 44 aufgetragen. Durch die Datenpunkte einer Messreihe wurde eine exponentielle Funktion nach Gleichung 63 gelegt, die das kleinste Fehlerquadrat zu ihren Datenpunkten aufwies. C , D und k waren dabei Konstanten, t ist die Bestrahlungszeit und T die Temperatur. Dabei wurden die ersten 2 Minuten für die Funktion ignoriert. Durch Extrapolieren dieser Funktionen ließen sich die maximal erreichbaren Temperaturen bei unendlicher Bestrahlungszeit ermitteln. Außerdem konnte berechnet werden, ab wie viel Minuten die erforderliche Temperatur von 43 °C erreicht werden würde und welche Laserleistung mindestens dafür notwendig wäre. Tabelle 5 gibt Aufschluss über die Ergebnisse. Die photothermale Konversionseffizienz η lag hier wahrscheinlich sehr hoch, da die Nanopartikel relativ klein waren.

$$T = C + D \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (63)$$

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Weitere theoretische Berechnungen ermöglichten es, eine optimale Konzentration an Au@SiO₂-Lösung vorherzusagen, bei der eine PTT-Behandlung erfolgreich wäre und doch die Bestrahlungsdauer und die Laserleistung möglichst so gering sind, dass Zellgewebe geschützt

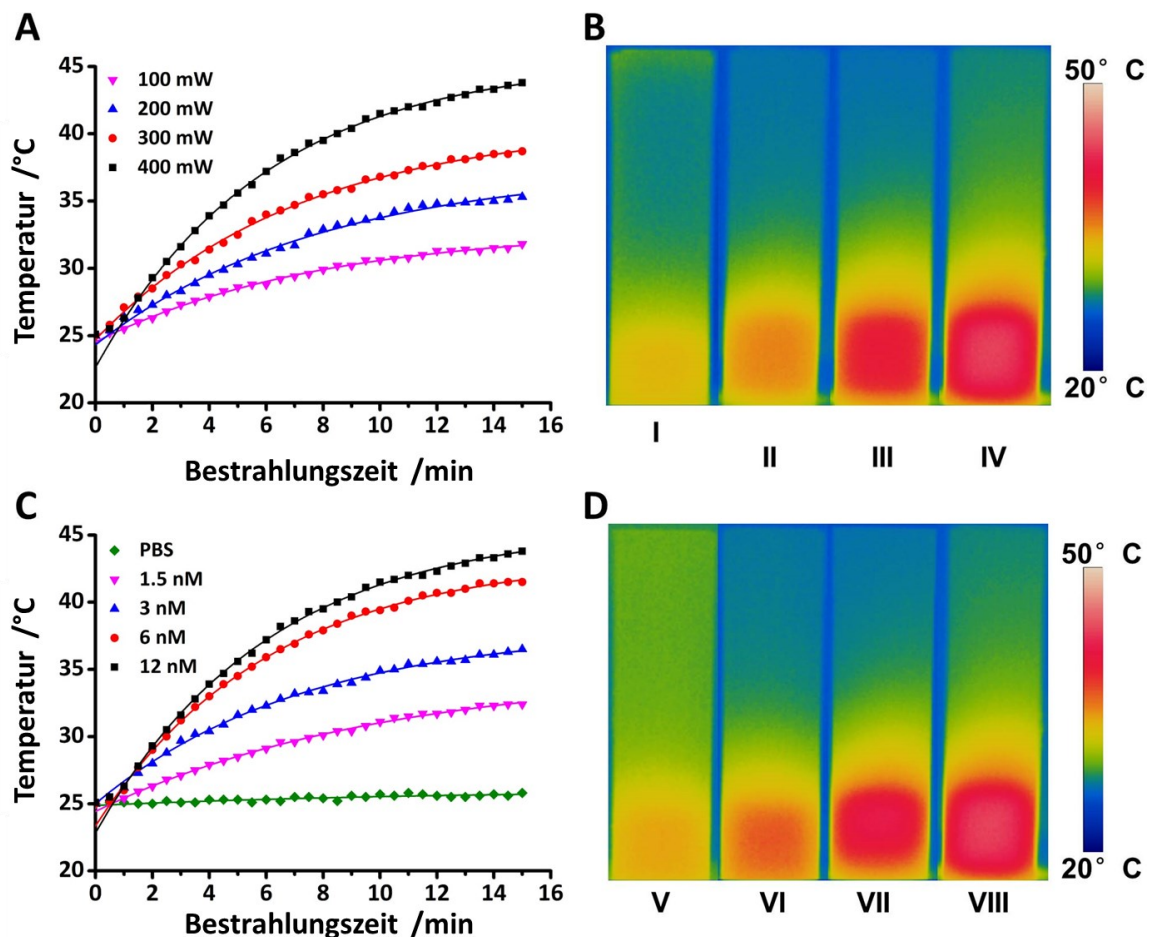


Abbildung 44 - Temperaturentwicklung der Au@SiO₂ Nanopartikel nach Bestrahlung mit einem 520 nm Laser. Getestet wurde eine 12 nM Au@SiO₂-Lösung bei verschiedenen Laserenergien (A) sowie bei 400 mW und verschiedenen Nanopartikel-Konzentrationen (C). (B) und (D) zeigen die zu (A) und (C) gehörigen NIR-Bilder.

werden kann. Die maximale Temperatur, die bei einer Laserenergie von 300 mW hätte erreicht werden können bei unendlicher Bestrahlungszeit, lag bei 40,8 °C. Eine photothermale Therapie wäre somit nur mit einer Laserenergie von mindestens 400 mW gegeben. Sowohl mit einer Nanopartikel-Konzentration von 6 nM als auch mit 12 nM ließ sich eine Temperatur von über 43 °C erreichen. Allerdings brauchte es bei doppelter Nanopartikel-Konzentration fast nur die Hälfte der Zeit. Außerdem war die maximale Temperatur höher. Eine weitere Erhöhung der Nanopartikel-Konzentration könnte zu einer höheren Effektivität führen und somit eine sanftere Behandlung ermöglichen.

Tabelle 5 – Werte der Koeffizienten C , D und K nach Gleichung 63 sowie Zeit $t_{43\text{ }^\circ\text{C}}$, bei welcher die Temperatur $43\text{ }^\circ\text{C}$ erreicht, und maximal erreichbare Temperatur T_{Max} bei unendlicher Bestrahlungszeit.

Konzentration	C	D	K	$t_{43\text{ }^\circ\text{C}}$ /Min	T_{Max} / $^\circ\text{C}$
0 nM	24,8690	1,1955	0,0809	-	26,06
1,5 nM	24,4353	10,4740	0,0993	-	34,91
3 nM	25,0106	13,0558	0,1369	-	38,07
6 nM	23,3492	20,0259	0,1644	24,19	43,38
12 nM	22,4033	22,9983	0,1715	13,17	45,40

Laserenergie	C	D	K	$t_{43\text{ }^\circ\text{C}}$ /Min	T_{Max} / $^\circ\text{C}$
100 mW	24,5269	8,4335	0,1269	-	32,96
200 mW	24,3229	13,1376	0,1266	-	37,46
300 mW	24,7084	16,0668	0,1384	-	40,78
400 mW	22,6416	22,9062	0,1684	13,04	45,55

4.5.6. SPR-Verschiebung durch Einbau einer TiO₂-Schicht

Sowohl die Ablation an einem Titantarget in Goldsäure und Natronwasserglas als auch die Verschmelzung von Gold- und Titandioxid-Nanopartikeln per Laser führten nicht zu einer Verbindung von Gold und Titandioxid. Im ersten Fall entstanden Titandioxid-Nanopartikel, die oft eine hexagonale Struktur aufwiesen, teilweise aber auch eine andere Form hatten. Abbildung 45 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der Partikel. Ein UV/Vis-Spektrum ist ebenfalls in Abbildung 45 zu sehen. Der typische Oberflächenresonanz-Peak war dabei nicht erkennbar, was darauf hinwies, dass keine Gold-Nanopartikel entstanden sind. Die SEM-Bilder unterstützten diese Annahme. Das Verschmelzen der Nanopartikel im zweiten Versuch war ebenfalls nicht erfolgreich (s. Abbildung 46).

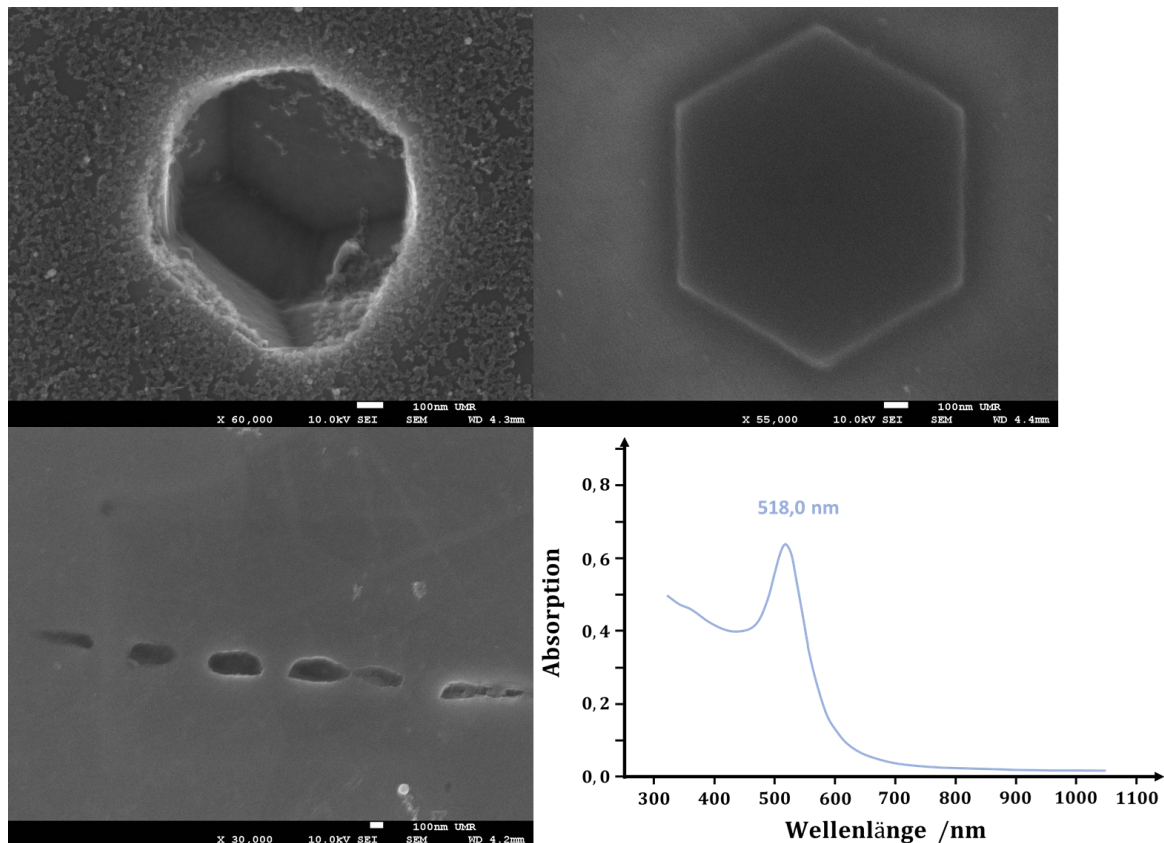


Abbildung 45 - SEM-Aufnahmen nach Versuch der Verschmelzung der Titandioxid- mit den Gold-Nanopartikeln. Die Wirkung des Lasers führte lediglich zur Verschmelzung der 25 nm großen Titandioxid-Nanopartikel untereinander.

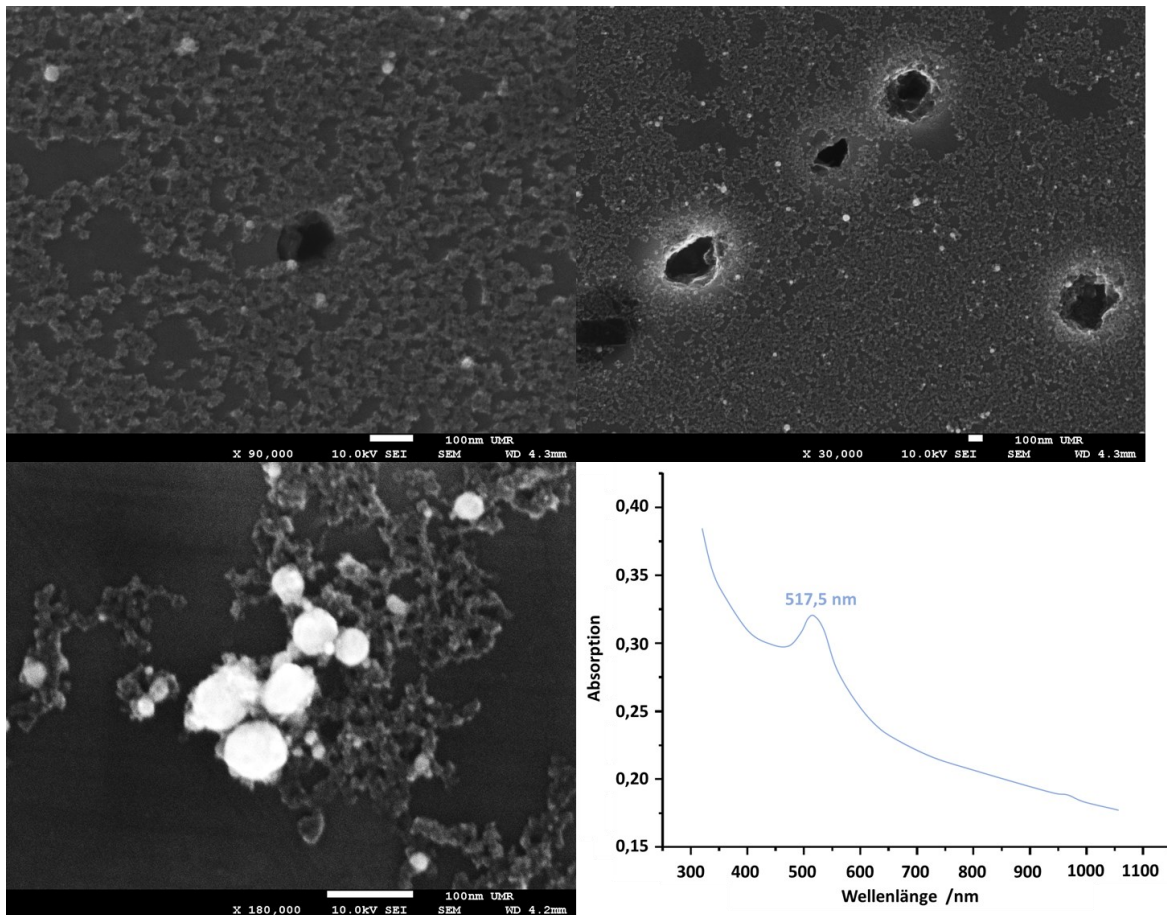


Abbildung 46 – SEM-Aufnahmen und UV/VIS-Spektrum nach Ablation an einem Titan-Target in Goldsäure und Natronwasserglas. Vereinzelt sind Gold-Nanopartikel entstanden, eine Verschmelzung oder Peak-Verschiebung fand nicht statt.

Die Zugabe von Titan-tetrachlorid zu Gold-Nanopartikeln führte hingegen zu einer Verschiebung der Absorptionswellenlänge der Nanopartikel. Der Absorptionspeak verschob sich von 522 nm auf 546 nm. Elektronenmikroskopische Aufnahmen offenbarten eine blumenartige Oberfläche, wie in Abbildung 47 zu sehen ist. Bei der näheren Betrachtung einer dieser Blumen fällt die eckige Bekantung der einzelnen Bestandteile auf, die auf Titandioxid hinweisen. Im Zentrum der Blumen waren kleine Nanopartikel zu erkennen, die aus Gold bestanden. Es schien, als seien die blumenartigen Strukturen aus den Gold-Nanopartikeln rausgewachsen. Ob es sich dabei nur um Trocknungseffekte handelte, konnte nicht geklärt werden. Die Verschiebung des UV/Vis-Spektrums wies zumindest auf eine Anbindung des Titans bzw. des Titandioxids an die Gold-Nanopartikel hin. Die theoretische Wellenlänge konnte jedoch nicht erreicht werden. Weitere Versuche, um die Absorptionswellenlänge zu verschieben, wurden nicht unternommen.

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

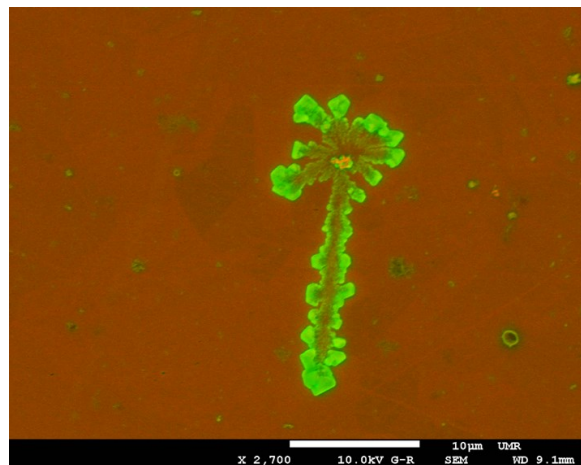
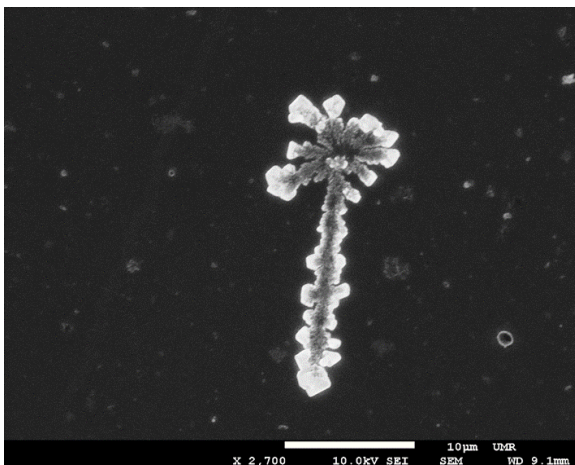
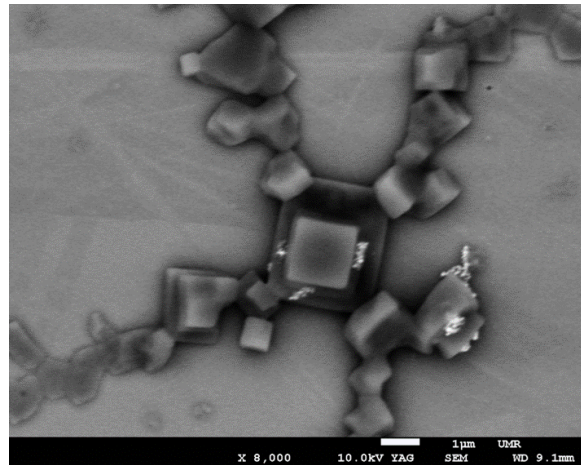
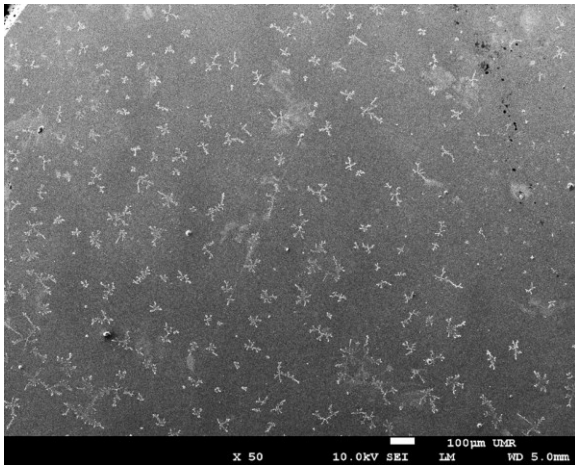
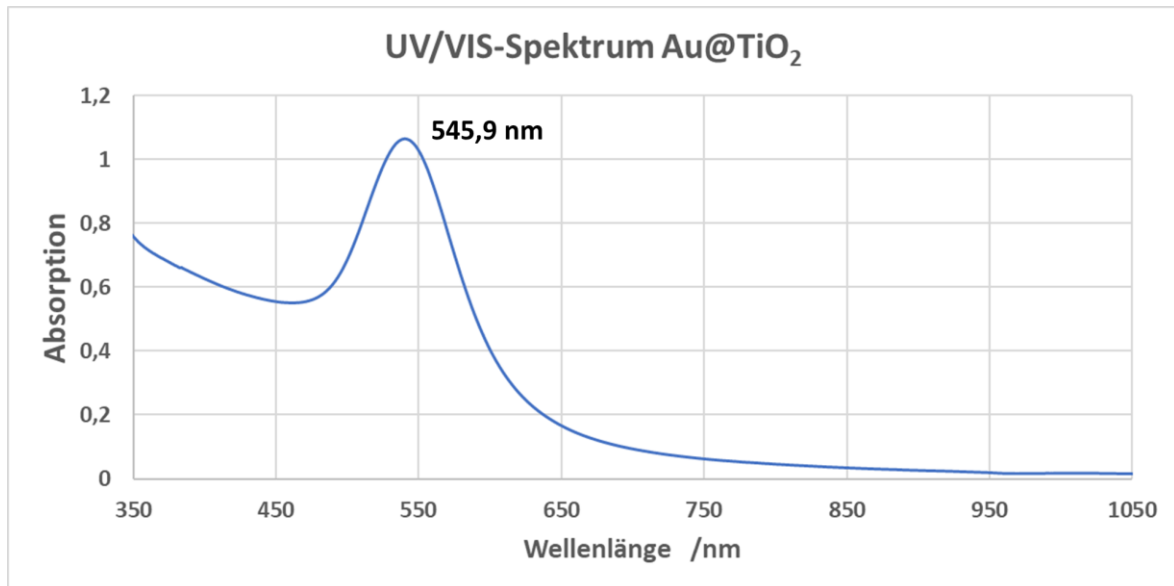


Abbildung 47 - SEM-Aufnahmen der Lösung nach Zugabe von Titan-tetrachlorid zu einer Gold-Nanopartikel-Lösung. Es sind blumenartige Strukturen aus Titandioxid zu erkennen, die in ihrer Wurzel Gold-Nanopartikel tragen (hell bzw. hell-orange). Das UV/Vis-Spektrum zeigt eine Verschiebung des Absorptionspeaks auf 545,9 nm.

4.5.7. *In vitro* Zellviabilitätstests

Um die Toxizität der Nanopartikel an Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Tests gemacht. Dazu wurden jeweils Au@SiO₂-Lösungen mit Endkonzentrationen von 1,5 nM, 3 nM, 6 nM und 12 nM genutzt. Die Viabilität von HeLa-Zellen wurden mittels Resazurin-Tests überprüft. 23 Stunden nach Inkubation der höchstkonzentrierten Au@SiO₂-Nanopartikel-Lösung lag die Viabilität der Zellen bei 87,83 %, was für eine hohe Viabilität und eine geringe Toxizität der Nanopartikel steht.

Die geringe Toxizität der Nanopartikel konnte auch durch die nach Echt-Zeit-Viabilitäts-Messungen an HeLa-Zellen erhaltenen *B*-Werte bestätigt werden. Abbildung 48 zeigt die Messung nach Inkubation der 12 nM Lösung. Die *B*-Werte nach Inkubation mit Au@SiO₂-Nanopartikel-Lösungen lagen zwischen $3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Die *B*-Werte für das toxische CdCl₂ an HeLa-Zellen liegen bei $1,63 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (10 nM), während ungiftige PEG-funktionalisierte Gold-Nanopartikel einen Wert von $2,50 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (10 nM) an HeLa-Zellen aufweisen und somit im etwa gleichen Bereich wie die hier synthetisierten Au@SiO₂-Nanopartikel liegen.^[120]

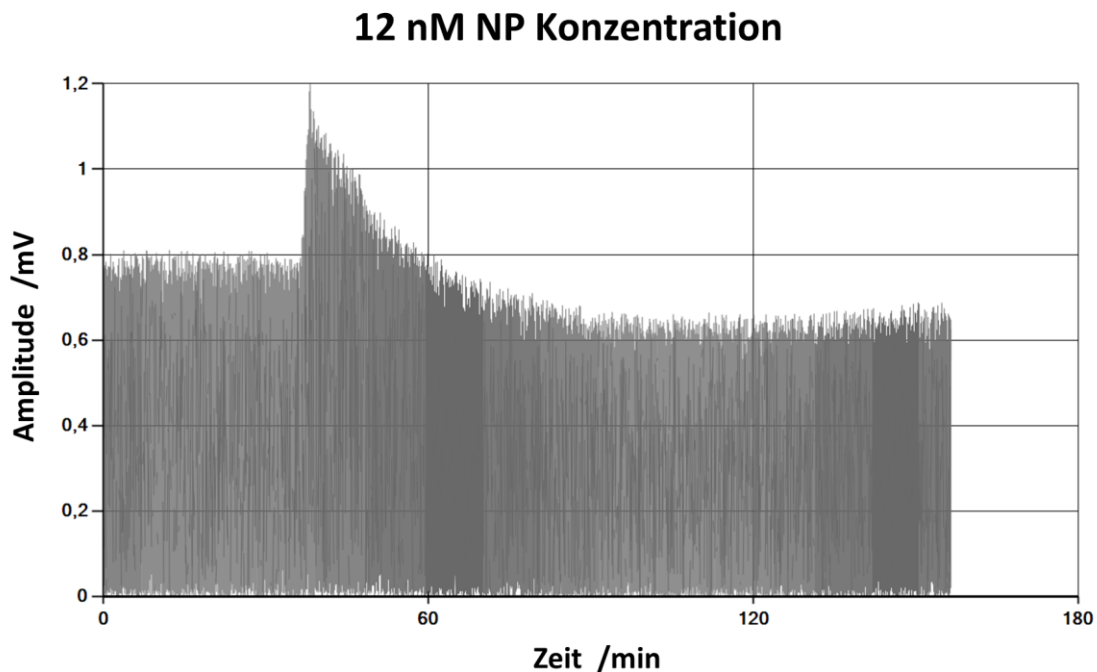


Abbildung 48 - Echtzeit-Viabilitätsmessung einer 12 nM Au@SiO₂-Lösung an HeLa-Zellen. Nach 37 Minuten wurden die Nanopartikel hinzugegeben, was an einem Anstieg der Amplitude erkennbar war. Daraufhin sank die Amplitude exponentiell ab. Die Dämpfung der Konstante lieferte Hinweise auf die Toxizität der Nanopartikel.

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Resazurin-Test und Echt-Zeit-Viabilitäts-Messung sind komplementär und geben eine Auskunft über Anfangszeit der Inkubation und Langzeitwirkung (etwa 1 Tag). In beiden Fällen ist auch bei 12 nM nur eine geringe toxische Wirkung vorhanden. Tabelle 6 zeigt die Messergebnisse für HeLa-Zellen in der Übersicht.

Tabelle 6 – Berechnete B-Werte und Zellviabilität von HeLa-Zellen in Abhängigkeit der Nanopartikelkonzentration.

NP Konzentration	B-Wert	Zellviabilität
1,5 nM	$3,423 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	94,81 %
3 nM	$4,001 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	93,26 %
6 nM	$4,988 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	90,96 %
12 nM	$6,945 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	87,83 %

4.5.8. *In vitro* photothermische Konvertierung

Um die Effektivität der Energieumwandlung der Nanopartikel zu testen, wurden diese in MCF-7 -Zellen inkubiert und anschließend mit Laserstrahlung unterschiedlicher Energien bestrahlt. Abbildung 49 zeigt die Viabilität der Zellen in Abhängigkeit der Laserleistung und Bestrahlungszeit. Als Referenz dienten Zellen, die nicht mit Nanopartikeln behandelt wurden. Die Konzentration der Nanopartikellösung war 12 nM. Es war ersichtlich, dass eine Laserleistung von 400 mW zu einer Abtötung der Zellen schon ohne Nanopartikel führte, obgleich die Nanopartikel selbst einen verstärkenden Effekt hatten. Bei 100 mW Laserleistung hingegen sank die Viabilität der Zellen nur sehr langsam, während die Nanopartikel den Effekt deutlich verstärkten. Das relative Verhältnis berechnete sich aus der Differenz eines Messwerts mit und ohne Nanopartikelzusatz dividiert durch den Wert der Messung ohne Nanopartikel. Es zeigt, wie hoch der Einfluss der Nanopartikel auf das Sterben der Zellen war und stellt somit ein Maß für die Selektivität dar, mit der Zellen abgetötet wurden. Es war möglich, eine Regressionsgerade durch die Messwerte beider Laserenergien zu ziehen. Dabei waren die letzten beiden Messwerte der 400 mW-Reihe jedoch zu niedrig, um sie mit einzubeziehen. Ein Vergleich der beiden Regressionsgeraden zeigt, dass die Selektivität, mit der Zellen mithilfe von Nanopartikeln abgetötet worden sind, im relativen Verhältnis bei 400 mW weitaus höher lag als bei 100 mW. Jedoch muss beachtet werden, dass die absolute Viabilität der Zellen nach Bestrahlung bei 400 mW zu niedrig war für eine praktische medizinische Applikation.

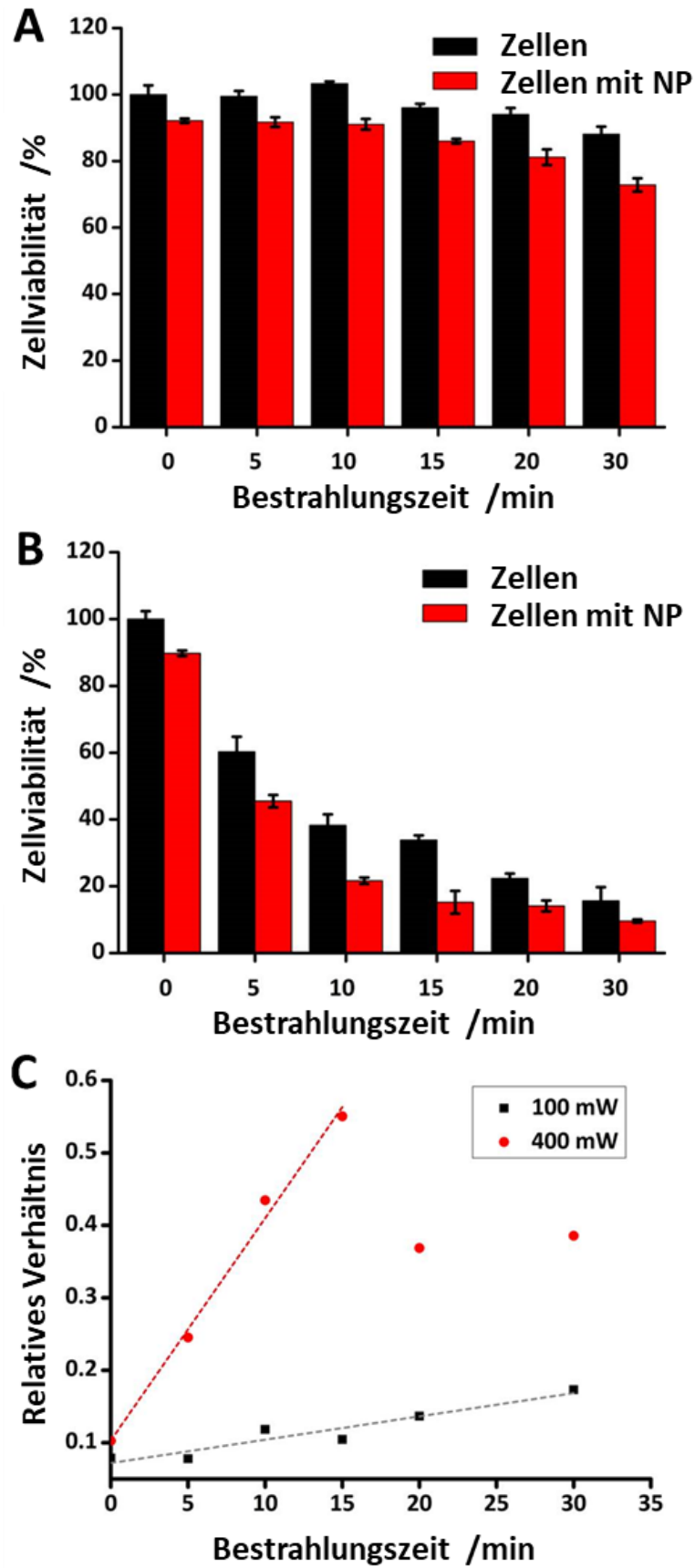


Abbildung 49 - Aufzeichnung der Zellviabilität nach Bestrahlung mit einem 100 mW (A) und einem 400 mW (B) CW Laser, jeweils mit und ohne Nanopartikel. Bei 100 mW haben die Au@SiO₂-Nanopartikel eine Wirkung nach längerer Bestrahlungszeit.

4.5.9. *In vivo* Zelldistribution

Zur Bestimmung der Verteilung der Au@SiO₂-Nanopartikel *in vivo* wurden diese an weiblichen BALB/c -Mäusen untersucht. Die Nanopartikel wurden intravenös injiziert, indem sie in den Schwanz der Maus gespritzt wurden. Die Untersuchung der Organe nach unterschiedlichen Zeiträumen ergab die in Abbildung 50 gezeigten Werte. Die meisten Nanopartikel wurden in Leber und Milz gefunden, einige konnten jedoch auch nach 12 Stunden in Herz, Lunge und den Nieren lokalisiert werden. Dies zeugte davon, dass die Nanopartikel eine ausreichende Blutzirkulationszeit hatten, um nicht direkt durch das Immunsystem aussortiert zu werden. Abbildung 50 zeigt außerdem schematisch den Verlauf der Nanopartikel durch eine Maus, wenn sie im Schwanz intravenös injiziert wurden. Ein Teil der Nanopartikel passierte die Leber und Niere und daraufhin die restlichen Organe, von denen sie teilweise aufgenommen wurden. Sie verblieben eine Weile in den Organen, wurden aber letztendlich ausgeschieden.

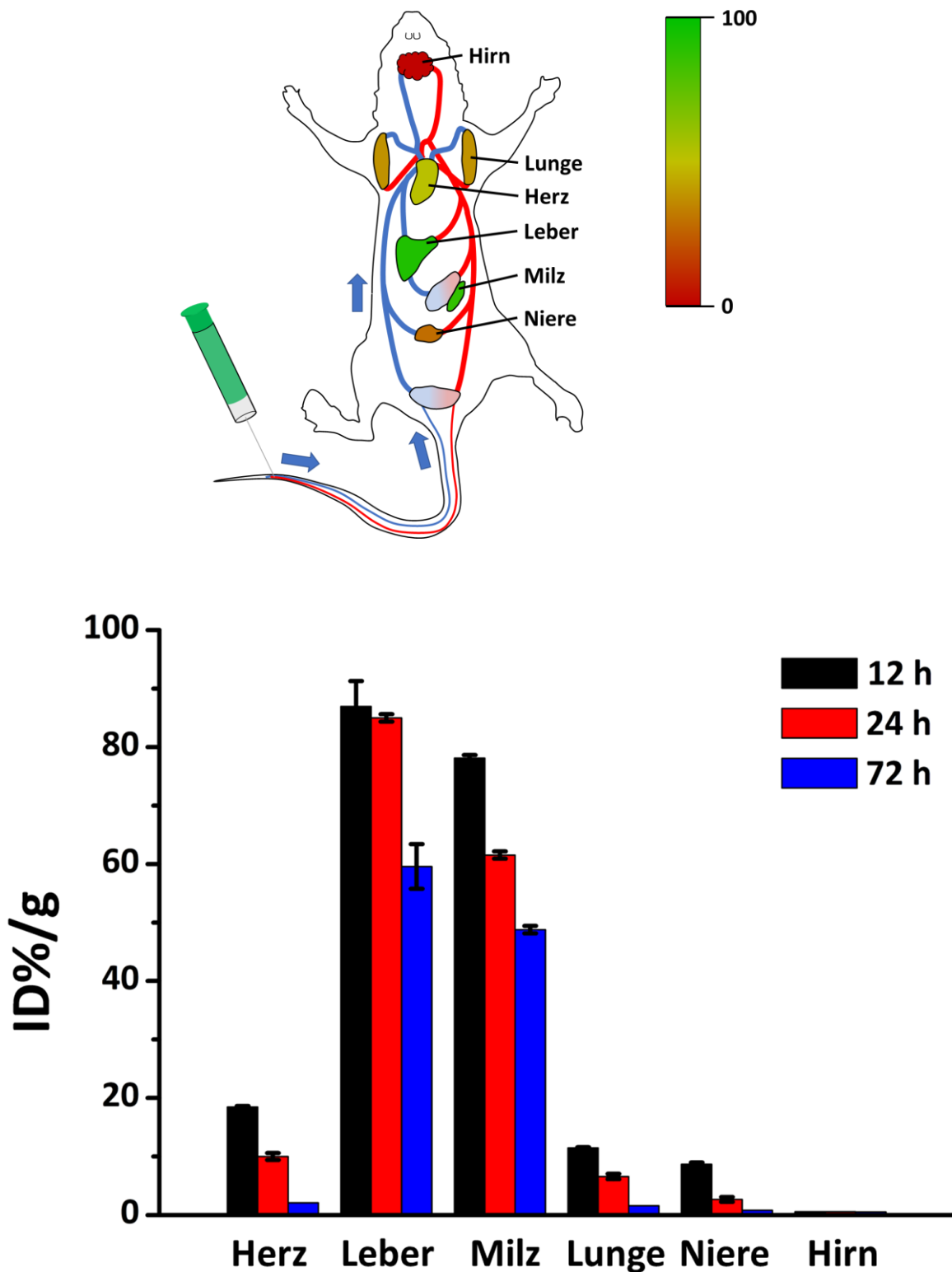


Abbildung 50 - Verteilung der Nanopartikel in den Organen nach intravenöser Injektion einer 12 nM Nanopartikel-Lösung in den Schwanz einer Maus. Die meisten Nanopartikel sammeln sich in Leber und Milz. Jedoch sind auch in Herz, Lunge und Niere Nanopartikel zu finden. Im Gehirn tauchen keine Nanopartikel auf, was dafürspricht, dass die Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke nicht durchbrochen haben. Der Bestand der Nanopartikel baut in allen Organen nach 72 Stunden ab, was für eine Ausscheidung aus dem Körper spricht. Der hohe Anteil der Nanopartikel in der Leber nach 24 Stunden deutet auf eine Ausscheidung über die Leber hin. Die Verteilung der Nanopartikel ist außerdem bildlich dargestellt.

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

Abbildung 51 zeigt die Histologie der untersuchten Organe nach Injektion verschiedener Nanopartikel-Konzentrationen. Verglichen mit der Kontrollgruppe war keine Beschädigung des Gewebes zu erkennen. Diese Beobachtung stand im Einklang mit den *in vitro*-Messungen.

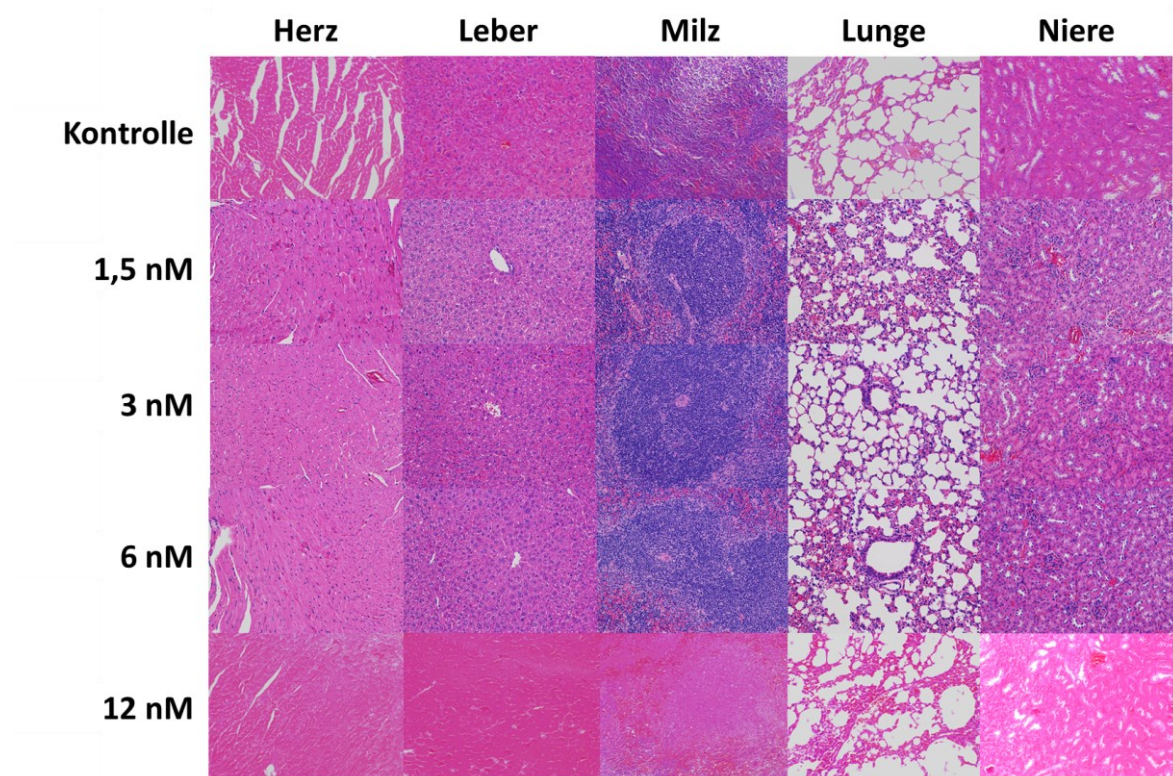


Abbildung 51 - Histologie der Zellgewebe nach Injektion der Nanopartikel in verschiedenen Konzentrationen. Der Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigt keine Änderungen im Gewebe auf.

4.6. Fazit

4.6.1. Interpretation der mechanischen Eigenschaften

Die Wechselwirkung zwischen Nanopartikel und Zelle wird durch viele Faktoren beeinflusst. Nicht zuletzt spielen die nanomechanischen Eigenschaften der Nanopartikel eine große Rolle.^[267–269] In einem theoretischen Modell konnte die Wechselwirkung zwischen einem weichen Nanopartikel mit einer Zellmembran und einem harten Nanopartikel und einer Zellmembran durch Liu et al.^[270] simuliert werden. Demnach werden härtere Nanopartikel schneller von der Zellmembran umhüllt, während sich weichere Partikel an der Membran entlang bewegen. Ein Einschließen eines weichen Nanopartikels wäre viel zeit- und energieintensiver als bei einem harten Nanopartikel. Dies mag ein Grund sein, weshalb PEG-funktionalisierte Nanopartikel weniger gut durch Zellen aufgenommen werden als reine Gold-Nanopartikel.^[240] Daneben wurde gezeigt, dass weiche Nanopartikel nur schlecht durch Makrophagen entdeckt und phagozytiert werden können.^[271,272] Sie versprechen daher eine längere Blutzirkulationszeit.

Reines Gold hat ein Elastizitätsmodul von 78 GPa.^[273] Bei Goldnanopartikeln wurden noch höhere Elastizitätsmoduln gemessen, die abhängig von Größe und Form waren. Ramos et al. konnten beispielsweise Werte um 100 GPa für sechsfach ikosaedrische Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 22 nm messen.^[274] Dahingegen sinkt die Elastizität rapide herab, wenn Gold-Nanopartikel mit Polyethylenglykol beschichtet werden. Pablo et al. maßen einen Wert von etwa 20 MPa.^[275] Zum Vergleich haben Hydrogel-Nanopartikel einen Elastizitätsmodul von unter 2 MPa.^[276] Die Elastizität kann also durch Beschichtung des Gold-Nanopartikels gesenkt werden. Die Elastizitätsmoduln der hier synthetisierten Au@SiO₂-Nanopartikel lagen mit ca. 550 MPa ebenfalls weit unter denen von reinen Gold-Nanopartikeln, waren jedoch noch etwa 30 mal so groß wie PEG-funktionalisierte Gold-Nanopartikel mit ähnlicher Größe. Es war daher zu erwarten, dass die Inkubationsrate der Au@SiO₂-Nanopartikel höher war als für PEG-funktionalisierte Gold-Nanopartikel, der Widerstand gegen Phagozytose durch Makrophagen aber noch hoch genug wäre, um eine längere Blutzirkulationszeit als für reine Gold-Nanopartikel zu gewährleisten.

Die Beschreibungen der Beobachtungen vernachlässigen allerdings die Lipid- und Proteinanbindung, die *in vivo* stattfindet. Dadurch käme es nicht zu einem direkten Kontakt zwischen Nanopartikel und Zellwand. Vielmehr wäre es die Nanopartikel-Corona, die die Inkubation bestimmen und gegebenenfalls Signale an die Zellen weiterleiten würde. So werden Nanopartikel mit hohen Adhäsionskräften zwar *in vitro* besser in Zellen inkubiert, auf ihr

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

in vivo -Verhalten hat dies allerdings keine Auswirkungen. Dennoch spielen physikochemische Eigenschaften der Nanopartikel eine große Rolle, da sie hauptsächlich die Zusammensetzung der Corona beeinflussen.^[270] Die Zellwand identifiziert die Nanopartikel somit über diese Protein- und Lipidcorona.

4.6.2. Interpretation der *in vitro* und *in vivo* -Messungen

In der Literatur werden *in vitro* -Untersuchungen generell als erste Bewertung der Toxizität einer Substanz herangezogen. Die am Häufigsten verwendeten Tumorzellen sind dabei HeLa-Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms), K562-Zellen (Leukämie-Zelllinie), HepG2-Zellen (humane Leberkrebs-Zelllinie) und SK-BR-3-Zellen (humane Brustkrebs-Zelllinie). Meist wird die MTT- oder Resazurin-Methode angewendet. Eine Vielzahl verschiedener Nanopartikel wurde bereits auf *in vitro*-Toxizität geprüft, dabei kam es zu sehr vielen Widersprüchen, die vor allem mit unterschiedlichen Nanopartikelsynthesen und den damit verbundenen Substanzen in der Lösung zusammenhingen. Die Toxizität hing vor allem vom verwendeten Stabilisierer ab. So waren Gold-Nanopartikel, die mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) stabilisiert wurden, immer toxisch. Diese Toxizität verschwand allerdings, wenn CTAB vorher ersetzt und weggespült wurde.^[277] Mit PEG funktionalisierte Nanopartikel waren generell ungiftig. Sehr kleine Nanopartikel unter 2 nm waren allgemein toxisch, da sie beinahe ungestört in den Zellkern eindringen und die vorhandene DNS in ihrer Funktion stören konnten.^[278] Es wurde bislang keine Toxizität festgestellt, die sich auf Gold als Nanopartikel-Kern bei Partikeln ab 10 nm Kerndurchmesser begründete.^[279] Bei sehr hoher Konzentration konnte es allerdings zur Veränderung der Zellmorphologie kommen. Infolgedessen wurden sowohl Beweglichkeit und Funktion der Zelle gestört.^[278,280-286] Die genaue Bestimmung der lateralen Konzentration war allerdings wiederum form-, größen- und beschichtungsabhängig. Außerdem hing sie von der Art der Zelle ab. In Annäherung lässt sich feststellen, dass Gold-Nanopartikel bis zu einer Konzentration von 10^{12} Nanopartikeln/ml nicht toxisch sind.^[238] Das gilt nicht für Nanopartikel mit einem Durchmesser unter 5 nm, da diese in den Zellkern eindringen und die DNS beschädigen oder in ihrer Funktion beeinflussen können. Diese Feststellungen wurden durch die hier synthetisierten atoxischen Nanopartikel bekräftigt. Ihre Konzentration lag bei $1,067 \cdot 10^{13}$ Nanopartikeln/ml bei einem Durchmesser von 13 nm. Die Messung erfolgte dabei ohne den Einfluss von Stabilisatoren, jedoch mit einer Silikat-Beschichtung. *In vitro* -Untersuchungen durch die Gruppe um Lin et al. mit Silikat-Nanopartikeln an A549-Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Toxizität.^[287] Lag die

Viabilität der Zellen nach 48 Stunden Inkubation der Nanopartikel bei einer Konzentration von 10 µg/ml bei etwa 95 %, so sank sie bei 50 µg/ml auf etwa 85 % und bei 100 µg/ml auf etwa 81 %. Diese Ergebnisse wurden sowohl für Nanopartikel mit einem Durchmesser von 15 nm als auch für 46 nm große SiO₂-Nanopartikel erhalten.

Das Verhalten von Nanopartikeln im lebenden Organismus ist nur schwer vorherzusagen. Trotz einer Vielzahl an *in vivo*-Experimenten mit Nanopartikeln sind umfangreiche Erkenntnisse bislang noch rar. Das liegt vor allem daran, dass die Untersuchungen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt oder Details zu den Bedingungen gar nicht erst erwähnt wurden.^[238] So hat sich beispielsweise auch *in vivo* herausgestellt, dass mit CTAB stabilisierte Gold-Nanopartikel nicht biokompatibel waren, da sich CTAB im Blut vom Partikel ablöste und dort toxisch wirkte.^[245,277,288,289] Besser war ein Coating mit Polyethylenglykol mit Thiolgruppe (PEG-SH).^[245,279,290] Die PEG-Ummantelung führte dazu, dass die Nanopartikel schlechter von den Makrophagen erkannt wurden. Dies erhöhte die Blutzirkulationszeit. Allerdings drangen sie mit reiner PEG-Beschichtung auch nicht mehr in Zellen ein.^[240,241,243] Die in dieser Arbeit synthetisierten Nanopartikel wiesen eine fest angebundene Silikatschicht auf, die sich auch im Blutstrom nicht vom Kern löste. Da keine stabilisierenden Substanzen nötig waren, konnte die Toxizität der reinen Nanopartikel gemessen werden. Bei den *in vivo*-Untersuchungen konnten die meisten Nanopartikel in Leber und Milz gefunden werden, einige konnten jedoch auch nach 12 Stunden in Herz, Lunge und den Nieren lokalisiert werden. Sie hatten also eine Grundresistenz gegen Makrophagen. Andererseits zeigte es auch, dass sie von den Zellen absorbiert wurden. Sie vereinten somit die Vorteile geringer Toxizität, langer Blutzirkulationszeit, Absorptionsrate in Organen sowie eines letztlichen Ausscheidens aus dem Körper, ohne das Gewebe zu beschädigen.

Im menschlichen sowie im tierischen Körper werden größere (> 150 nm) und kleinste (< 10 nm) Partikel aussortiert.^[265,291] Dazu dienen hauptsächlich die Niere, die Leber und die Milz. Die Niere reguliert unter anderem den Wasser- und Elektrolytbestand im Lebewesen. Sie beeinflusst außerdem den Blutdruck. Dies geschieht in zwei Stufen. Das Blut durchläuft vorerst die Nierenkörperchen, die eine Größe von etwa 200 µm haben. Hier wird das Blutgefäß in kleine Kapillare aufgeteilt und an der Blut-Harn-Schranke vorbeigeführt. Diese enthält Filterstrukturen, die negativ geladen sind und daher nur Substanzen passieren lassen, die nicht negativ geladen sind und einen Durchmesser von maximal 8 nm haben. Wasser und andere Substanzen, die nicht ausgeschieden werden sollen, werden nach der Blut-Harn-Schranke resorbiert. Pro Minute durchläuft etwa 1 Liter die Nieren, wovon letztendlich 8 ml als Urin ausgeschieden werden. Eine injizierte Nanopartikelösung durchläuft somit etwa alle 6 Minuten

Nanopartikel-Synthese per Laserablation

die Nieren. Kleinste, nicht negativ geladene Nanopartikel werden hier ausgeschieden. Es war daher zu erwarten, dass die hier synthetisierten Au@SiO₂ Nanopartikel nicht durch die Niere ausgeschieden wurden. Folglich findet sich auch nur ein kleiner Anteil der Nanopartikel in den Nieren wieder. Vermutlich handelte es sich hierbei um die kleinsten Partikel, die laut der gemessenen Größenverteilung (s. Abbildung 35) einen Durchmesser von unter 10 nm hatten. Unklar ist allerdings noch, weshalb die Partikel trotz negativer Ladung und hydrodynamisch größerem Durchmesser von der Niere aufgenommen und durch sie ausgeschieden wurden.

Ein Mechanismus zur Aussortierung größerer Partikel im Blut befindet sich in der Leber.^[238] Hier befinden sich *Kupfferzellen*, die nach ihrem Entdecker Karl Wilhelm von Kupffer benannt sind und die Makrophagen der Leber sind. Diese nehmen Gold-Nanopartikel aus dem Blut auf und sekretieren sie in Gallensaft, woraufhin sie im Kot ausgeschieden werden. Bevor sie ausgeschieden werden, können sie allerdings mehrere Monate lang in den Kupfferzellen überleben.^[292] Die meisten Nanopartikel, die von der Niere nicht ausgeschieden werden, werden in Milz und Leber detektiert. Auch hier ist eine Verallgemeinerung allerdings nicht möglich, da sich die Vielzahl an Experimenten wiederum in ihren Ausführungen unterscheiden. Vereinzelt zeigen Studien auch eine Akkumulation der Nanopartikel im gastrointestinalen Bereich oder der Lunge.^[293,294] Allgemein steigt die Aufnahmerate von Nanopartikeln in Kupfferzellen und Makrophagen der Milz mit der Größe der Gold-Nanopartikel.^[293] Bei Partikeln mit einer Größe von über 100 nm verläuft die Aufnahme meist direkt, es ist somit kein ausreichender Umlauf im Blutkreislauf möglich. Die optimale Gold-Nanopartikel-Größe, um eine hohe Halbwertszeit im Blut zu erzielen, liegt demnach zwischen 10 und 100 nm. Die in dieser Arbeit hergestellten Au@SiO₂ Nanopartikel lagen mit etwa 13 nm Durchmesser am unteren Rand dieses Bereichs. Die beobachtete lange Blutzirkulationszeit deckt sich mit den wissenschaftlichen Kenntnissen aus der Literatur. Allerdings wurden die Nanopartikel relativ schnell aus der Leber ausgeschieden, was für eine erhöhte biologische Abbaubarkeit sprach. Durch die geringe Größe der Nanopartikel dominiert Absorption gegenüber der Streuung, was zu einer erhöhten Effizienz der photothermalen Therapie führen sollte.

Literaturbekannte *in vivo* -Experimente zeigten außerdem eine Konzentrationsabhängigkeit der toxischen Wirkung von Nanopartikeln. So kam es bei Injizieren hoher Dosen an PEG-beschichteten Nanopartikeln (0,17 – 4,26 mg/kg) mit einem Durchmesser von 13 nm in eine Maus zwar zu den erwarteten langen Bluthalbwertszeiten und Anreicherungen in Leber und Milz, jedoch wurden auch Entzündungen und Apoptose in der Leber festgestellt.^[290] Auch bei stufenweiser Verabreichung kam es zu ähnlichen Ereignissen.^[295] Die Abhängigkeit der letalen Dosis *LD*₅₀, bei der die Hälfte der Versuchsmäuse nach Injektion der Gold-Nanopartikel

sterben, von der Partikelgröße zeigt, dass Partikel mit einer Größe von 3, 5, 50 und 100 nm keine Toxizität aufwiesen, wohingegen Mäuse, denen Gold-Nanopartikeln mit 8, 12, 17 und 37 nm Durchmesser verabreicht wurden, nach etwa 21 Tagen gestorben sind.^[296] Dazu resultierten diese Nanopartikel in der Ausbildung eines kamelartigen Rückens und einer schiefen Wirbelsäule. Die Zahl der Kupfferzellen war stark gestiegen. Darüber hinaus war die strukturelle Integrität der Lunge stark gestört. Hier stellt sich die Frage nach dem Grund für den großen Unterschied zwischen den 5 nm und den 8 nm großen Partikeln bzw. den 37 nm und den 50 nm großen Partikeln, die eine ähnliche Biodistribution aufweisen. Vermutlich ist aber auch hier die Konzentration von mehreren μM einfach zu hoch gewählt. Bei 30-fach niedrigeren Konzentrationen an 13 nm PEG-beschichteten Gold-Nanopartikeln (0,04 – 0,4 mg/(kg · Tag), 8 Tage lang) konnte keine Toxizität aufgewiesen werden.^[297] Es kam weder zu Missbildungen noch zu seltsamen Verhalten der Mäuse. Die Konzentration der Nanopartikel im Blut war konstant. Mit steigender Verabreichung erhöhte sich ihre Konzentration nur in den Organen. Die gute Biokompatibilität von Gold-Nanopartikeln gilt somit für bestimmte Stabilisierer sowie Konzentrationen. Vergleichbare Silber-Nanopartikel zeigen beispielsweise bei jeder Größe Toxizität.^[298] Durch Injektion einer 12 nM Lösung an hier synthetisierten Au@SiO₂ -Nanopartikeln in den Schwanz der untersuchten Mäuse kam es nicht zu einer sichtbaren Veränderung ihrer Morphologie. Auf den histologischen Aufnahmen ist keine Veränderung des Zellgewebes ersichtlich. Die hier applizierte Konzentration von 0,42 ng/kg ist relativ gering und kann wahrscheinlich zur Erhöhung der PTT-Effektivität noch gesteigert werden, ohne dass die Toxizität stark zunimmt oder sich die Morphologie der Versuchstiere sichtbar ändert.

Untersuchungen haben auch gezeigt, dass Partikel, die größer als 20 nm sind, nicht ins Hirn gelangen, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren.^[299] Der Grund dafür ist noch nicht ganz verstanden, eine Erklärung könnten die Astrozyten sein, sternförmige Zellen, die unter anderem den Durchtritt von Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke regeln. In letzterer beträgt ihr Abstand zur Kapillarwand der Blutgefäße 20 nm, weshalb Nanopartikel bis zu einer Größe von 20 nm wohl passieren können.^[265] Sehr kleine Nanopartikel können ebenfalls ins Hirn gelangen, indem sie eingeatmet und über den geruchsneuronalen Weg geleitet werden.^[300] Die Biodistribution der hier erzeugten Nanopartikel wies jedoch keinen Befund im Hirn der Versuchstiere auf, obwohl die Nanopartikel einen Durchmesser von unter 20 nm hatten. Mögliche Ursachen sind der hydrodynamische Durchmesser der Partikel sowie eine starke Bindung an der Protein-Corona, die aus der hohen Oberflächenladung rührt.

4.7. Ausblick

Die Eigenschaften der hier synthetisierten Au@SiO₂-Nanopartikel deckten sich mit den bisher in der Literatur bekannten Untersuchungen. *In vitro*- und *in vivo*-Messungen zeigten eine geringe Toxizität, eine hohe Bioverfügbarkeit sowie eine gute biologische Abbaubarkeit. Lediglich das Ausbleiben der Nanopartikel im Hirn kann noch nicht erklärt werden. Die dünne Silikatschicht, mit der der Goldkern fest umzogen ist, verbessert nicht nur die Eigenschaften des Gold-Nanopartikels und sorgt für seine erhöhte Biokompatibilität, sondern bietet auch die Möglichkeit einer kovalenten Anbindung weiterer Moleküle an die Nanopartikeloberfläche. Die Nanopartikel erhalten somit eine große Stabilität, außerdem kann ihre Selektivität erhöht werden. Abbildung 52 zeigt ein Beispiel für die Anbindung eines Moleküls per Silanisierung. Dies ist ein einfacher Prozess, mit dem die Eigenschaften des Nanopartikels genauestens eingestellt werden können.

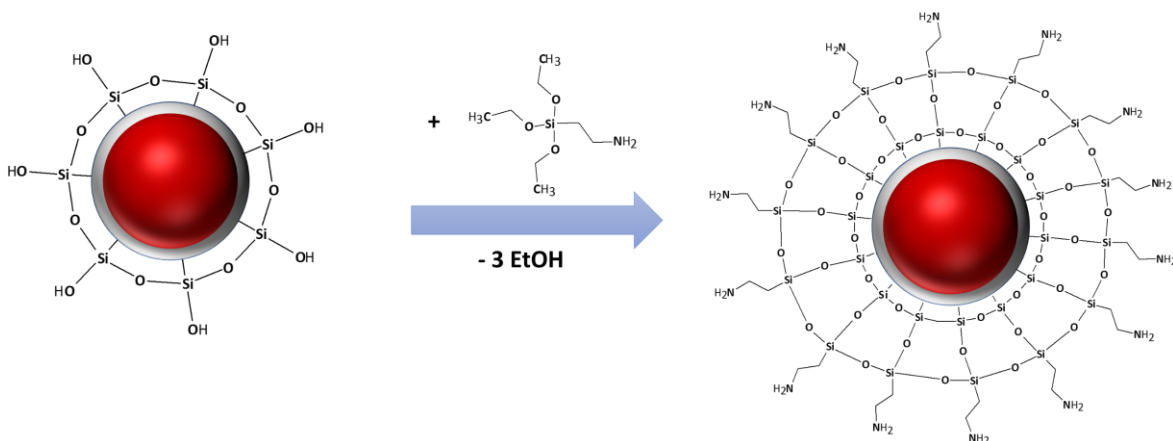


Abbildung 52 - Weiterverarbeitung der Nanopartikel. Durch Silanisierung der Nanopartikel können funktionelle Gruppen kovalent an die Oberfläche gebracht werden. Daraufhin kann hier weitere Chemie betrieben werden. Die Darstellung ist nicht proportional.

Die größte Schwachstelle des Systems ist die Wellenlänge der Oberflächenresonanz. Bei 522 nm absorbieren viele Moleküle der Haut und des Bluts. Es werden also während der Behandlung gesunde Zellen aufgeheizt, das Verfahren ist somit nicht selektiv. Die Wellenlänge kann durch Einlagerung eines Materials mit hohem Brechungsindex zwischen Goldkern und Silikatschicht in Richtung höherer Wellenlängen verschoben werden. Die Einbindung von TiO₂ verlief jedoch erfolglos. Alternativ kann eine Funktionalisierung mit Molekülen vollzogen werden, die ein konjugiertes Elektronensystem besitzen. Dies steigert jedoch voraussichtlich die Toxizität der Nanopartikel. Eine andere Möglichkeit bietet der Einbau magnetischer

Materialien in den Kern. Wenn möglich könnte der Kern ganz durch magnetisches Material ersetzt werden. So könnte die Therapie per Magnetresonanz erfolgen. Es ist fraglich, ob die Synthese eines magnetischen Materials mit biokompatibilisierender Silikatschicht per PLAL unter normalen Bedingungen erfolgen kann. Gold ist sehr edel und bildet stets den Kern. Magnetische Materialien sind vor allem Legierungen aus Eisen, Nickel und Cobalt, die während des Mechanismus vermutlich aber, ebenso wie Silizium, oxidieren würden. Der Idee, Seltenerden als Aktivierungselement zu nutzen, steht ihre schlechte Quantenausbeute sowie ihre geringe Verfügbarkeit gegenüber.

Durch Optimierung des Aktivierungssystems, also des Kerns des Nanopartikels, und Anfügen von Molekülen an die Glas-Oberfläche des Nanopartikels können biokompatible, selektive und reinste Nanopartikel auf einfache und günstige Art und Weise gewonnen werden. Wichtig für das Verständnis des Verhaltens der Nanopartikel *in vitro* und *in vivo* ist eine vollständige Charakterisierung. Die hier synthetisierten Au@SiO₂-Nanopartikel dienen dabei als Grundlage für die Herstellung geeigneter Nanopartikel. Die Herstellung Laser-produzierter Nanopartikel im Gramm-Bereich wurde bereits gezeigt.^[188,189] Es ist also möglich, mit einem geeigneten System bestimmte Nanopartikel in einer Masse und Reinheit zu erzeugen, die für eine selektive, kostengünstige Behandlung von Tumorzellen zur Verfügung stehen.

5. Konstruktion einer PM-Monoschicht

5.1. Einleitung

Die Gewinnung nutzbarer Energie ist eine der größten Herausforderungen der Zukunft. Obwohl elektrische Geräte und Maschinen immer effizienter und stromsparender werden, stieg der Energiebedarf in den letzten Jahrzehnten stets an.^[301] Mit dem Ausstieg aus Atom- und Kohleenergie^[302] ist die Erforschung umweltfreundlicher Energiesysteme eine Notwendigkeit. Bislang stecken die Alternativen jedoch noch in den Kinderschuhen. So wird mit Photovoltaikanlagen noch eine zu geringe Ausbeute erzielt, während Windkraftanlagen einen negativen Einfluss auf Natur und Panorama ausüben. Ein weiteres großes Problem stellt die Energiespeicherung dar.^[303] In Akkumulatoren sind meist Materialien verbaut, deren Vorrat auf der Erde knapp ist. Neben der verbesserungswürdigen Effizienz sind Nachhaltigkeit, Lebensdauer und Ladezeiten weitere Nachteile.

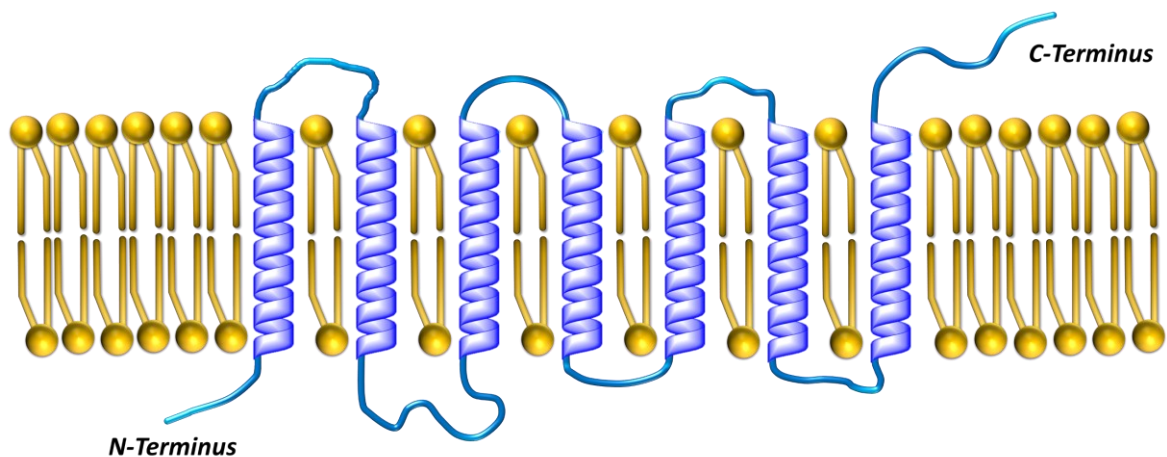
In der Natur hingegen gibt es verschiedene Arten der Energiespeicherung. Im Zuge der Photosynthese, beispielsweise, erzeugen Pflanzen mittels Strahlung, Kohlenstoffdioxid und Wasser Energie in Form von Traubenzucker. Ein anderes Beispiel ist das Halobakterium, dessen Membran das integrale Protein *Bacteriorhodopsin*^[304] (BR) enthält, welches Protonen mittels Strahlung von einer Seite auf die andere Seite seiner Membran pumpt und somit ein Protonenpotenzial zwischen äußerer und innerer Seite der Membran aufbaut. Letzteres ist seit Jahrzehnten Bestandteil intensiver Forschung und wurde für eine Vielzahl technischer Anwendungen vorgeschlagen. Bislang ist die praktische Umsetzung für Applikationen leider rar. Es bedarf weiterer Forschung und kreativer Ideen, um die Vorteile dieser biologisch wertvollen Ressource in energiegewinnende Technik umzumünzen.

5.2. Theoretischer Hintergrund

5.2.1. Purpurmembran

Bacteriorhodopsin ist eines der interessantesten photochromen Membranproteine für biotechnische Anwendungen. Es wird durch das Halobakterium (*Halobacterium Salinarum*) produziert und kann in Form von Purpurmembran (PM)-Blättern extrahiert werden.^[305,306] Diese PM-Blätter haben einen Durchmesser von bis zu 5 μm und bestehen aus Lipiden und BR im absoluten Verhältnis 1:10. Die Dicke der PM-Blätter beträgt zwischen 4,8 und 5,2 nm.

Extrazelluläre Seite



Zytoplasmatische Seite

Abbildung 53 - Zwei-Dimensionale Ansicht des Bakteriorhodopsin in der Purpurmembran. Sieben α -Helices durchkreuzen die Membran, der C-Terminus liegt auf der extrazellulären Seite.

Struktur und Funktionsweise des BR wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht und sind mittlerweile bis in die molekulare Ebene bekannt.^[304,307–310] Es handelt sich damit um das momentan am besten analysierte Protein. Die Struktur eines BR-Proteins ist in Abbildung 53 schematisch zwei-dimensional dargestellt.^[310] Es besteht aus sieben transmembranen α -Helices, die durch verschiedene Aminosäuren verbunden sind. Diese ordnen sich in der Membran so an, dass sie eine Einbuchtung bilden. Ein photochromes Retinal-Molekül sitzt innerhalb dieser Einbuchtung an der Aminosäure Lysin 216 und spielt die Schlüsselrolle im Protonen-Pump-Prozess. Dieses Retinal-Molekül liegt im Dunkeln in zwei möglichen Konfigurationen vor, die in Abbildung 54 gezeigt sind. Die thermodynamisch stabilere Kon-

Konstruktion einer PM-Monoschicht

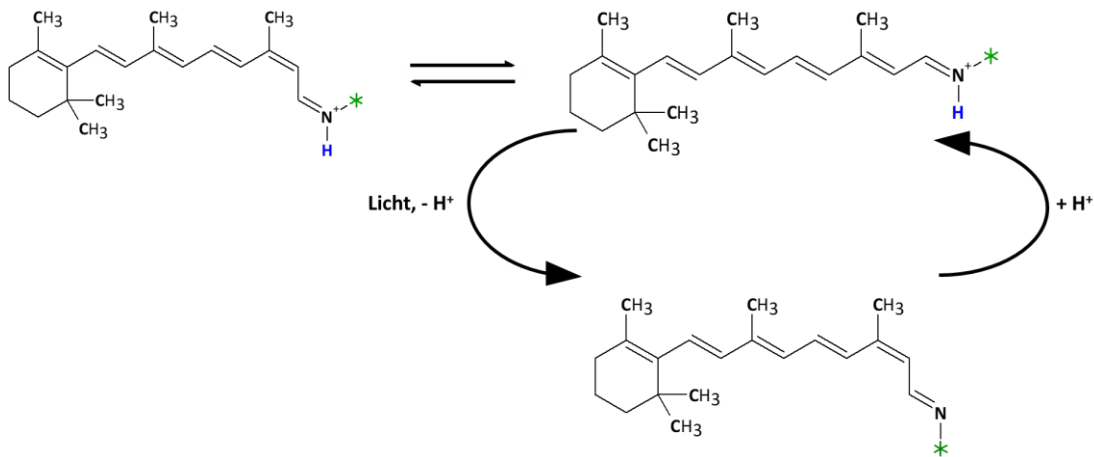


Abbildung 54 - Absorption eines Photons durch das Retinalmolekül. Im Dunkeln liegt es hauptsächlich in der all-trans-Konfiguration vor. Nach Absorption eines Photons wird es deprotoniert und liegt folglich in der cis-Konfiguration vor.

figuration bildet das *all trans*-Retinal, die daher im Dunkeln hauptsächlich vorliegt. Fällt nun Strahlung auf das Protein, so wird das Retinalmolekül durch Absorption der Strahlung isomerisiert. Daraufhin liegt fast ausschließlich die *cis*-Konfiguration vor. Die räumliche Veränderung des Retinalmoleküls führt zu einer strukturellen Änderung des Proteins. Das Proton der Schiff'schen Base, in Abbildung 54 blau eingefärbt, befindet sich nun in einer energetisch ungünstigen Umgebung und wird in extrazelluläre Richtung an die in der Nähe liegende Aminosäure Asparagin an Stelle 85 abgegeben. Es folgen weitere unidirektionale Protonenverschiebungen. Letztlich wird der Ausgangszustand des Proteins wiederhergestellt und ein neuer Zyklus kann durchlaufen werden. Jeder dieser Schritte hat verschiedene Zustände des Proteins zufolge, die alle spektroskopisch unterscheidbar sind (*Photozyklus*).^[311] Das Durchlaufen dieses Photozyklus erzeugt Absorptionsmaxima im Bereich von 410 nm bis 570 nm. Der komplette Prozess dauert etwa 15 ms.

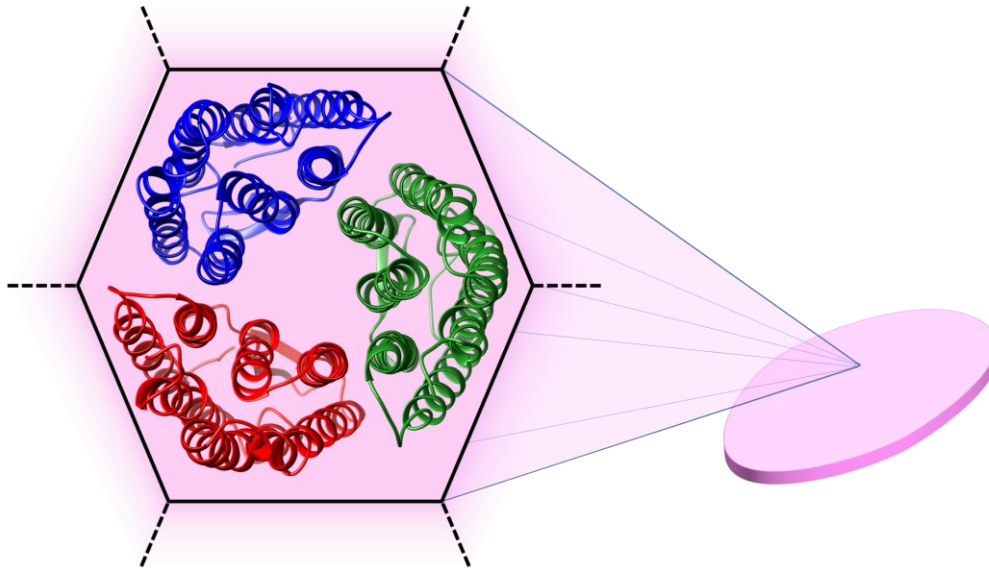


Abbildung 55 - Strukturelle Anordnung des Bakteriorhodopsins in der Purpurmembran. BR ist als Trimer hexagonal angeordnet. Eine hexagonale Anordnung beinhaltet lediglich zehn Lipide. Der große Anteil an BR in der Purpurmembran führt zu einer hohen Kristallinität und folglich einer sehr hohen Stabilität der Membran gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen.

Die Membran selbst ist undurchlässig für Protonen. Daher baut sich beim Protonentransfer ein Gradient zwischen beiden Seiten der Membran auf. BR ordnet sich als Trimer in der Membran an (s. Abbildung 55). Diese hexagonale Struktur verleiht der Membran eine hohe Kristallinität von etwa 80 %, was in einer immensen Stabilität gegenüber chemischen, physikalischen und thermischen Einflüssen resultiert.^[304] Das Halobakterium ist fähig unter extremen Bedingungen zu überleben. PM ist stabil bei Temperaturen von bis zu über 80 °C in Wasser und 140 °C an Luft bei pH-Werten von 0 bis 12 und Ionenstärken bis zu 3 M Natriumchlorid. Die Fähigkeit des Protonenpumpens, die hohe Stabilität auch in Umgebungen mit sehr geringem Wassergehalt und die leichte Verfügbarkeit machen Purpurmembran interessant für eine Vielzahl technischer Anwendungen. Viele Forscher beschäftigten sich in den letzten Jahrzehnten mit der Herstellung orientierter PM-Filme, um Protonen von einer auf die andere Seite des Films zu pumpen.^[312–315] Anwendung fanden diese Membranen beispielsweise in der Energiegewinnung, Wasserentsalzung und weiteren Bereichen. Einige Techniken zur Erstellung von PM-Filmen wurden entwickelt, bislang mit mäßigem Erfolg. Beispiele sind die Langmuir-Blodgett-Abscheidung^[316] und die Abscheidung mittels elektrischer Felder^[317].

In diesem Projekt sollte eine Methode gefunden werden, um einen möglichst dünnen Film der PM zu erzeugen. Dazu wurde sowohl mit dem Wildtyp der PM (*WT PM*) gearbeitet, der oben beschrieben ist, als auch mit einer Mutante, die im Vergleich zum Wildtyp noch 7 weitere

Konstruktion einer PM-Monoschicht

Histidine-Gruppen am c-Terminus trägt (*c-His* $PM^{[318]}$, siehe Abbildung 56). Dies führt zu einer hohen positiven Ladung auf der extrazellulären Seite der Membran. Während der Wildtyp ein elektrisches Potenzial von -20 mV auf der zytoplasmatischen Seite und ein -30 mV auf der extrazellulären Seite aufweist, ist die extrazelluläre Seite der *c-His* PM stark positiv geladen. Dieser Ladungsunterschied führt dazu, dass die Membran in Flüssigkeit gebogen vorliegt (s. Abbildung 57).

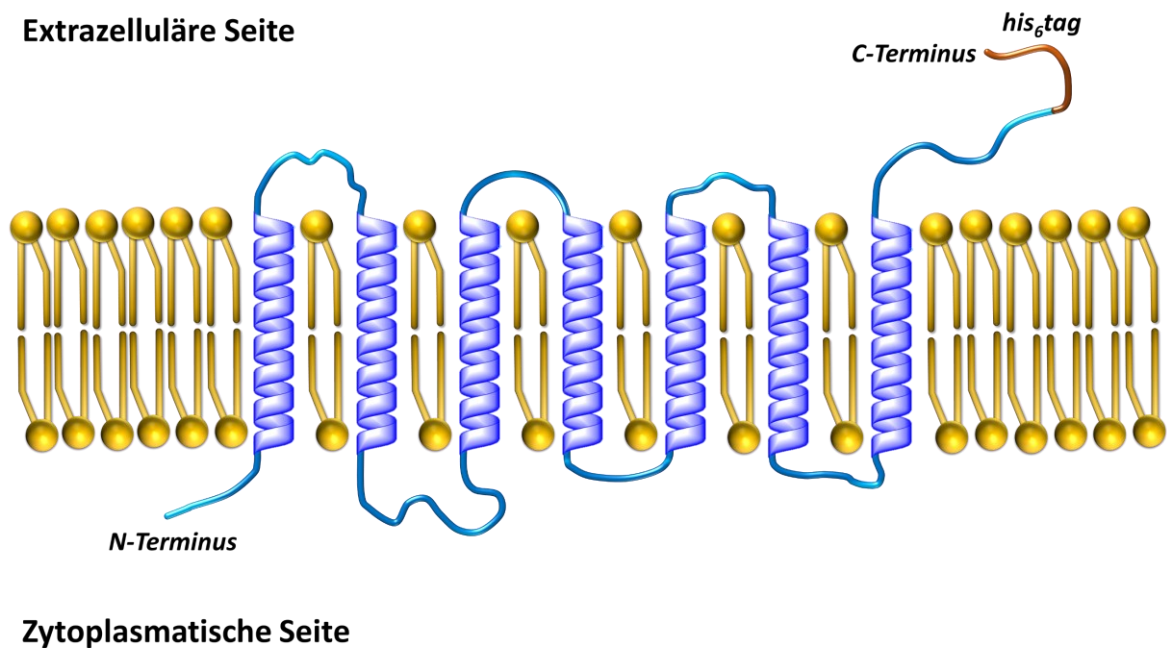


Abbildung 56 - Zwei-Dimensionale Ansicht des Bakteriorhodopsin in der Purpurmembran. Sieben alpha-Helices durchkreuzen die Membran, der C-Terminus liegt auf der extrazellulären Seite und ist durch mehrere his-Tags erweitert, was der Purpurmembran eine hohe positive Ladungsdichte auf der extrazellulären Seite verleiht.



Abbildung 57 - Biegung der Wildtyp PM (links) und der *c-His* PM (rechts). Während der Wildtyp der Purpurmembran beidseitig negativ geladen ist, führen die positiven Ladungen der *c-His* PM dazu, dass sie gebogen vorliegt.

5.2.2. Selbstorganisierende Monoschichten

Bei einer selbstorganisierenden Monoschicht (*engl. SAM für Self-Assembled Monolayer*) handelt es sich um einzelne Moleküle, die sich spontan auf einer Oberfläche anordnen und eine hochstrukturierte, einzelne Molekülschicht bilden. Diese adsorbierten Moleküle stammen entweder aus dem Gasraum, der das Substrat umgibt, oder waren in einem flüssigen Medium gelöst, in das das Molekül eingetaucht wurde. Grundlage der orientierten Adsorption ist eine präferierte Wechselwirkung zwischen der Oberfläche mit einem bestimmten Teil des SAM-Moleküls. Dies kann ein einzelnes Atom oder aber eine funktionelle Gruppe sein. Eines der bekanntesten und am besten untersuchten Beispiele für eine selbst-organisierte Monoschicht sind schwefelhaltige Moleküle, die auf einem Gold-Substrat adsorbieren.^[319] Hier kommt es zu einer quasi-kovalenten Bindung zwischen den Schwefel- und den Goldatomen. Neben Gold haben auch Silber, Kupfer, Platin, Quecksilber, Gallium und Arsen eine starke Schwefelaffinität.^[320] Selbst-organisierte Monoschichten können aber auch beispielsweise auf Graphit entstehen, wenn sich der hydrophobe Teil amphiphiler Moleküle an das Graphitgerüst lagern.^[321] Silane mit verschiedenen Restgruppen können Monoschichten auf Glasoberflächen bilden. Auch in der Natur existieren selbstorganisierende Monoschichten wie beispielsweise Vesikel. Der Mechanismus der Funktionalisierung von Nanopartikeln rührt aus der Selbst-Organisierung der Funktionalisatoren.

Die Beschichtung der Substratoberfläche mit selbstorganisierenden Molekülen bietet eine einfache Möglichkeit, die Eigenschaften der Oberfläche nach Belieben anzupassen. Beispielsweise werden Säulen in der GC und HPLC mit bestimmten Molekülen silanisiert, um die Trennungseigenschaften zu verbessern.^[322] Oberflächen können hydrophob oder hydrophil gestaltet werden. Nanopartikel können stabilisiert oder für bestimmte Zellen empfänglich gemacht werden.

Daneben bieten Moleküle mit funktionellen Gruppen, die nicht am Substrat binden, Bindungsstellen, an denen weitere Chemie betrieben werden kann. So können beispielsweise Inhibitoren an die Oberfläche gebunden werden, um gezielt bestimmte Enzyme, Bakterien oder Zellen aus einer Lösung zu entfernen (s. Abbildung 58). Diese Technik wird unter anderem in Biosensoren genutzt.^[323]

Konstruktion einer PM-Monoschicht

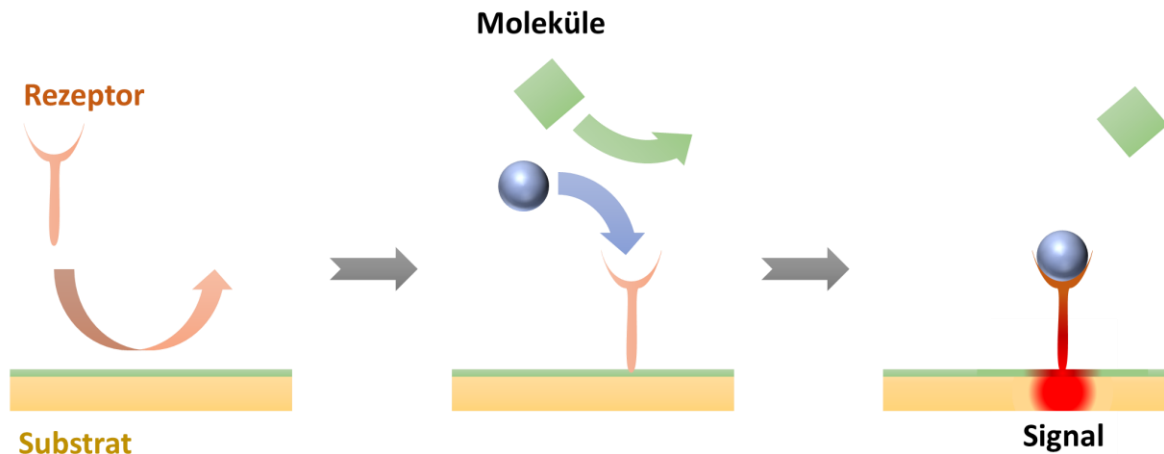


Abbildung 58 - Beispiel für einen Biosensor. Auf das Substrat wird eine selbst-assemblierte Monoschicht eines Moleküls aufgebracht, welche fähig ist, einen spezifischen Rezeptor zu binden. Dieser kann spezielle Biomoleküle selektiv binden. Diese Bindung kann beispielsweise voltammetrisch detektiert werden.

Abbildung 59 zeigt den zeitlichen Ablauf des Aufbaus einer Monoschicht.^[324] Das Substrat wird dazu in eine Lösung gelegt, die das SAM-Molekül enthält. Die Moleküle adsorbieren durch Physisorption, gegebenenfalls mit anschließender Chemisorption, an der Oberfläche. Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Oberflächenatomen und den anbindenden Atomen der SAM-Moleküle sowie wegen der Wechselwirkungen zwischen den Molekülresten kommt es bei höheren Moleküldichten auf der Oberfläche zu einer strukturierten Anordnung. Alkanthiole mit einer Kettenlänge von 10 bis 20 Kohlenstoffatomen liegen in der Monoschicht hochgeordnet in einem Winkel von etwa 30 Grad zur Oberfläche vor.

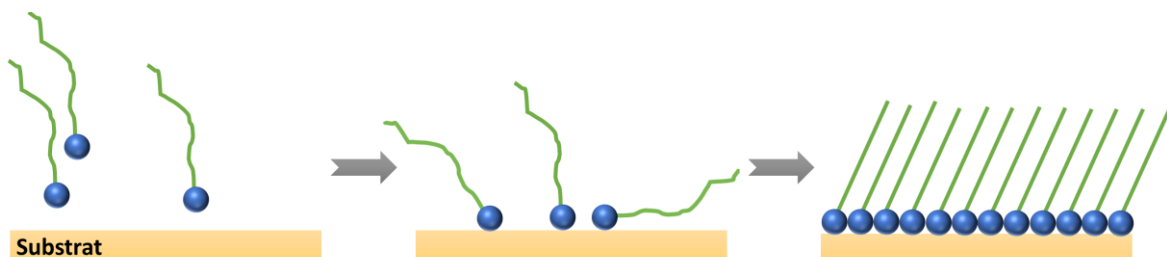


Abbildung 59 - Bildung einer Monoschicht. Die Moleküle binden spontan an das Substrat. Nach wenigen Sekunden ist ein Großteil der Fläche belegt. Bis zur vollständigen Ausbildung der Monoschicht kann es allerdings einige Stunden dauern. Mit wachsender Belegungsrate steigt der Ordnungsgrad. Die Schwanzgruppen der Moleküle ordnen sich in einem Winkel von etwa 30 Grad an.

Die Einfachheit dieser Methode macht sie zu einem sehr beliebten Instrument der Oberflächenmodifizierung. Die vollständige Benetzung einer Goldoberfläche, die in einer 1 μ M bis 1 mM konzentrierten Alkylthiol-Lösung liegt, ist nach einigen Stunden abgeschlossen. Ein Großteil der Fläche ist allerdings schon nach wenigen Minuten belegt.^[325] Das Substrat kann danach mit Lösemittel gewaschen werden, um nichtgebundene Moleküle zu entfernen. Daraufhin kann gegebenenfalls weitere Chemie an der modifizierten Oberfläche betrieben werden.

5.2.3. Selbstassemblierte Monolagen als Substrate

Die Arbeitsgruppe Gölzhäuser an der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld hat eine Methode entwickelt, um eine nur wenige Nanometer dünne Membran zu erzeugen und vom Substrat zu entfernen.^[326] Die Methode basiert auf der Erzeugung einer selbstassemblierten Monoschicht. Dazu wurde in einem ersten Schritt ein mit Gold besputtertes Glimmer-Substrat in eine 4'-nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol (NBPT)-Lösung eingelegt. Die Thiolgruppen adsorbierten an das Goldsubstrat und ordneten sich nebeneinander an. Die Aminogruppe zeigte dabei vom Substrat weg und war somit für weitere Chemie zugänglich. Durch Beschuss mit Elektronen bildete NBPT ein zweidimensionales Netzwerk aus, indem sich die aromatischen Ringe öffneten und untereinander Bindungen eingingen (s. Abbildung 60). Infolge des Elektronenbeschusses entfernten sich außerdem die Sauerstoffatome aus den Aminogruppen und wurden durch Wasserstoffatome ersetzt. Diese sogenannte Carbonanomembran (CNM) bot somit die Möglichkeit der weiteren Oberflächenmodifizierung. Um gezielt Purpurmembran an die CNM anzubringen, sollte ein Nitrilotriessigsäure (NTA)-Derivat angebunden werden, das in Anwesenheit von Nickel mit Histidin-getaggt (*his-Tag*) Proteinen einen stabilen Komplex eingeht. Dazu sollten die NTA-Gruppen beweglich genug sein, um die getaggtten Proteine zu erreichen. Um dies zu gewährleisten, wurde ein NTA-Derivat mit einer langen Seitenkette ausgewählt, die als Spacer, also Abstandshalter, diente. Als Linker, also Verbindungsmolekül zwischen NTA-Derivat und modifizierter Substratoberfläche, wurde maleoyl-N-Succinimid (maleoyl-NHS) genutzt. Dieses wurde auf das Substrat getropft und während 30 Minuten wirken gelassen. Daraufhin wurde das NTA-Derivat aufgetropft und für weitere 240 Minuten ruhen gelassen.

Konstruktion einer PM-Monoschicht

Abbildung 60 schematisiert den Prozess der hier betriebenen Oberflächenmodifizierung. Im Anschluss war die Oberfläche nach Aufbringen durch Ausbildung eines Nickel-NTA-Komplexes fähig, an Histidin zu binden.^[327]

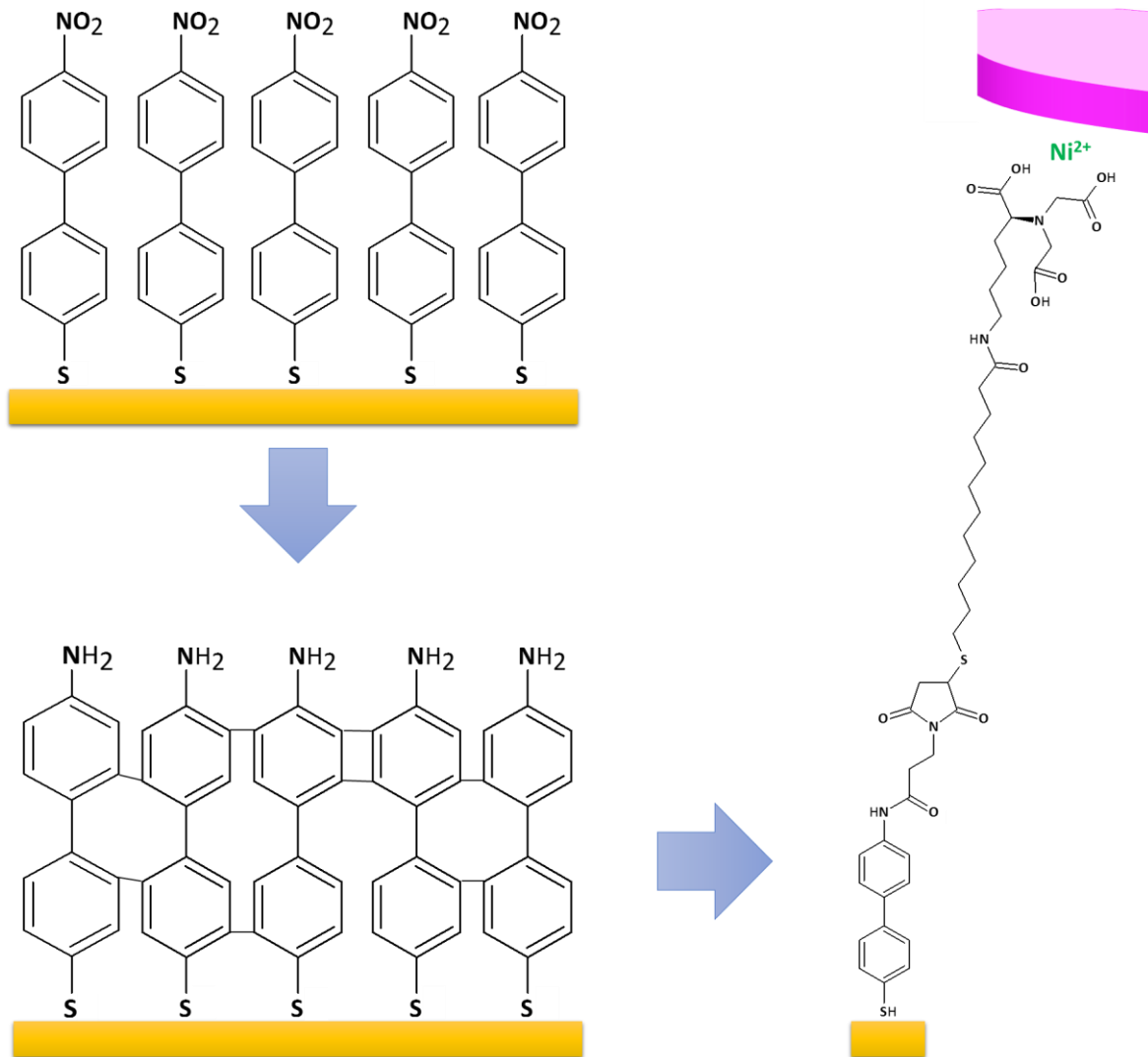


Abbildung 60 - Bildung einer Carbonanomembran (CNM). 4*-nitro-1,1*-biphenyl-4-thiol (NBPT) bildet durch die quasi-kovalente Bindung der Schwefel-Atome zur Gold-Oberfläche eine Monoschicht aus. Nach Beschuss mit Elektronen entstehen intermolekulare Bindungen zwischen den aromatischen Ringen. Im Anschluss werden die Aminogruppen genutzt, um mittels maleoyl-NHS als Linker ein NTA-Derivat mit einer langen Restkette als Spacer zu binden. Ziel war es, die c-His PM über einen Nickel-NTA-Komplex zu binden.

5.3. Motivation

Ziel des Projekts war es, eine Monoschicht einer orientierten Purpurmembraan an ein ultradünnas Substrat zu befestigen, um eine bewegliche Membran zu erhalten, die als strahlungsgesteuerte Protonenpumpe dient.

5.4. Experimenteller Aufbau, Methoden und Materialien

5.4.1. Allgemeine Herangehensweise

Purpurmembraan sollte einheitlich orientiert und möglichst als Monolage auf einer ultradünnen Monoschicht abgelagert werden. Dazu wurden verschiedene Methoden getestet, unterschiedliche Puffer benutzt und sowohl Substrate als auch Art der Purpurmembraan variiert. Tabelle 7 gibt eine Übersicht der genutzten Purpurmembraanen, Puffer und Substrate. Außerdem zeigt sie die im Folgenden gebrauchten Abkürzungen.

In einem ersten Schritt wurde versucht, den Wildtyp der Purpurmembraan (*WT PM*) auf den verschiedenen Substraten abzuschneiden. Die *WT PM* lag zu diesem Zwecke entweder in destilliertem Wasser oder in Puffern mit unterschiedlichen Stärken und pH-Werten vor. Daraufhin wurden die Belegungsrate verglichen. Unter Belegungsrate war hier das Verhältnis von belegter zu nichtbelegter Substratfläche zu verstehen. Die Ionen der Puffer sollten sich an die Oberflächen der *PM* legen, um ein Agglomerieren der einzelnen *PM*-Blätter zu unterbinden. Allerdings konnten die Ionen ebenfalls die Anbindung der *PM* an das Substrat beeinträchtigen.

Nach Optimierung der Pufferstärke und des Substrats wurden die Konzentration der *PM* sowie ihre Inkubationszeit variiert. Die Konzentration konnte anhand der Verdünnung, aber auch der Tropfengröße beeinflusst werden. Es sollte versucht werden, eine bestenfalls gänzlich bedeckende und möglichst dünne Schicht auf dem Substrat abzuschneiden. Um die *WT PM* einheitlich zu orientieren, sollte *WT PM* unter den im ersten Schritt optimierten Bedingungen bei Wirken eines elektrischen Felds auf dem Substrat abgeschieden werden (*Elektrosedimentation*). Hierzu wurde das Substrat als Kondensatorplatte genutzt und einer parallel zu dieser angeordnete ITO-Platte als Gegenelektrode gegenübergestellt. Um zu verhindern, dass das elektrische Feld die Abscheidung der *PM* auf dem Substrat beschleunigt und somit eine gleichmäßige Verteilung der *WT PM* auf dem Substrat behindert, wurde das zu

Konstruktion einer PM-Monoschicht

beschichtende Substrat über der ITO-Elektrode installiert, sodass die WT PM entgegen der Schwerkraft an das Substrat adsorbierte. Abbildung 61 verdeutlicht den Aufbau.

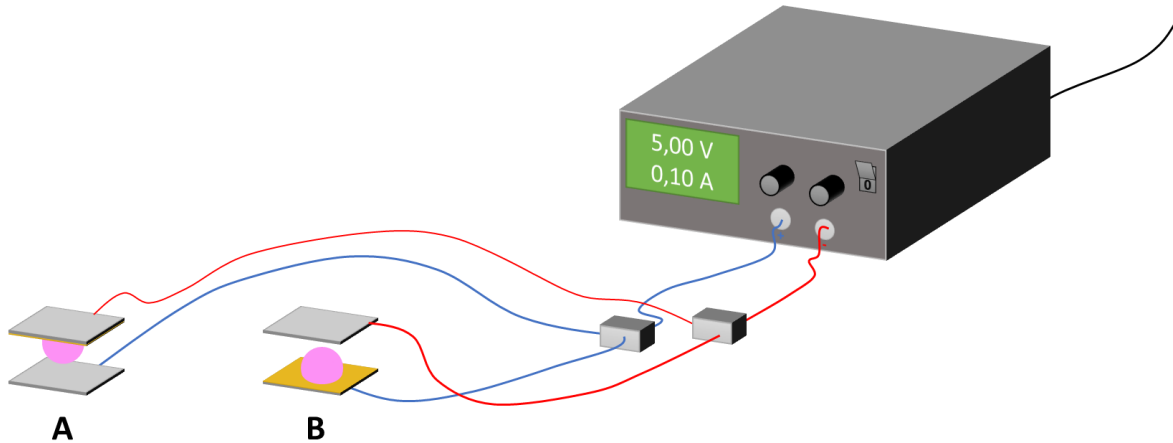


Abbildung 61 – Experimenteller Aufbau. Zwei Kondensatorplatten werden an eine Spannungsquelle angeschlossen. Zwischen den Kondensatorplatten wird die Purpurlösung gegeben. Dabei kann das Substrat, auf das die PM abgeschieden werden soll, entweder oben (A) oder unten (B) sein. Je nach PM kann die Richtung des elektrischen Kondensatorfelds nach oben oder nach unten geschaltet sein. Die PM richtet sich nach diesem Feld aus. Verbindet der Tropfen die beiden Platten, so kann ein elektrischer Strom fließen und die PM wird elektrophoretisch abgeschieden.

Nebst richtiger Orientierung der WT PM hatte das elektrische Feld einen weiteren Vorteil. Das elektrische Feld wirkt homogen zwischen beiden Elektroden. Die Feldlinien stehen in erster Annäherung senkrecht zu den Kondensatorplatten. In einem ersten Schritt richten sich die Purpurlösungen entsprechend der Feldlinien aus. Da die Feldstärke aber überall gleich ist, sind sie in dieser Ausrichtung frei in der Flüssigkeit beweglich. Im Mittel sind die PM-Blätter also gleichmäßig in der Lösung verteilt. Adsorbiert nun ein PM-Blatt am Substrat, so wird dieses immobilisiert und schwächt das elektrische Feld an dieser Stelle ab. Sich noch in Lösung befindliche PM-Blätter bewegen sich folglich in Richtung der höheren elektrischen Feldstärke und decken somit die noch nicht bedeckten Stellen des Substrats ab. Dieser Prozess wurde bei verschiedenen Feldstärken sowie mit unterschiedlichen WT PM -Konzentrationen untersucht. Außerdem wurde die Orientierung der WT PM bestimmt.

Im Folgeschritt wurden beide Elektroden des Kondensators mittels des Tropfens verbunden, so dass der Transport elektrischer Ladungen zwischen den Elektroden möglich war. Somit sollte die WT PM gezielt auf das Substrat zu bewegen (*Elektrophoretische Sedimentation*). Die Vorteile der Elektrosedimentation blieben dabei erhalten. Die Lösung wurde eine variable Zeit

im Kondensator gehalten (*Inkubationszeit*) und daraufhin abgezogen. Das elektrische Feld wurde für eine weitere, variable Zeit aufrechterhalten. Daraufhin wurde es ausgeschaltet und die Probe untersucht. Neben Inkubationszeit und Sedimentationszeit wurden Konzentration der WT PM in der Lösung sowie die angelegte Spannung verändert.

Um den Vorgang zu optimieren, wurde die elektrophoretische Sedimentation mit c-His PM wiederholt. Aufgrund des *His*-Tags trugen beide Seiten des Blatts dieser PM-Mutante unterschiedliche Ladungen. Dadurch sollte die Orientierung der PM sowie die elektrophoretische Bewegung effektiver ablaufen. Zusätzlich sollte die Möglichkeit bestehen, c-His PM über Ni-NTA-Komplexe an das Substrat zu binden. Abermals wurden Inkubationszeit, Sedimentationszeit, Konzentration der c-His PM in der Lösung und die angelegte Spannung variiert und optimiert. Außerdem wurde die Orientierung der PM auf dem Substrat bestimmt.

Schließlich brachte die elektrophoretische Sedimentation der WT PM unerwartete Ereignisse zum Vorschein, die in einem letzten Schritt noch weiter untersucht wurden.

Konstruktion einer PM-Monoschicht

5.4.2. Verwendete Materialien

Tabelle 7 gibt eine Übersicht der verwendeten Materialien. Das Ansetzen der Puffer wird im Detail in Kapitel 5.4.3 erläutert.

Tabelle 7 – Verwendete Purpurmembranen, Substrate und Puffer.

Purpurmembranen (PM)	Beschreibung
WT PM	Wildtyp der Purpurmembran
c-His PM	Mutante des Wildtyps, die einen <i>his6tag</i> am c-Terminus enthält.
Substrate	
BPT	1,1'-biphenyl-4-thiol als Monoschicht auf Goldsubstrat
BPT vernetzt	Quervernetztes 1,1'-biphenyl-4-thiol als Monoschicht auf Goldsubstrat
NBPT	4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol als Monoschicht auf Goldsubstrat
NBPT vernetzt	Quervernetztes 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol als Monoschicht auf Goldsubstrat
Puffer	
Dest. Wasser	Destilliertes Wasser
Puffer 50	KCl/TRIS-Puffer mit pH-Wert 8,2, 50 mM KCl
Puffer 100	KCl/TRIS-Puffer mit pH-Wert 8,0, 100 mM KCl
Puffer 150	KCl/TRIS-Puffer mit pH-Wert 8,0, 150 mM KCl
Puffer 300	KCl/TRIS-Puffer mit pH-Wert 7,8, 300 mM KCl

5.4.3. Ansetzen der Puffer

Es wurden insgesamt 4 verschiedene Puffer angesetzt, die in Tabelle 7 aufgelistet sind. Zum Ansetzen der Puffer wurden 6,1 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (*TRIS-Puffer*) in ein 5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. In ein 1000 ml Gefäß wurden daraufhin 900 ml destilliertes Wasser und 1 ml der Puffer-Stammlösung gegeben. Außerdem wurden je nach Puffer 3,7, 7,5, 11,2 oder 22,4 g Kaliumchlorid zugefügt. Der pH-Wert wurde mit verdünnter Salzsäure auf die in Tabelle 7 angegebenen Werte eingestellt. Dazu wurde eine pH-Elektrode genutzt. Letztlich wurde das Gefäß mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

5.4.4. Rasterkraftmikroskopische Messungen

Nach Vorbereitung der Proben wurden diese an der Luft bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Anschließend wurden sie auf ein Magnetplättchen geklebt. Nach Trocknung des Klebers konnten die Proben vermessen werden. Zur Messung der Topografie wurde eine SNL-10 (B)-Spitze von Bruker verwendet (Spitzenradius 2 nm, nominelle Federkonstante $0,12 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$). Zur Messung der elektrischen Eigenschaften wurde der PF-KPFM -Modus verwendet (siehe Kapitel 1.5.3.1). Hierzu wurde eine leitfähige SCM-PIT -Spitze von Bruker benutzt (Spitzenradius 12 nm, nominelle Federkonstante $2,8 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$). Sowohl Federkonstante als auch Durchbiegungsempfindlichkeit wurden vor jeder Messung experimentell bestimmt. Zur Bestimmung der Durchbiegungsempfindlichkeit wurde ein Silizium-Wafer als Substrat benutzt. Die Abweichung der experimentell bestimmten Federkonstante vom nominellen Wert lag stets unter 10 %.

Zur Aufnahme größerer Topografien wurde der PicoForce-Scanner genutzt mit einem maximalen Scanbereich von etwa $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. Der Messung elektrischer Eigenschaften hingegen diente der E-Scanner (Multimode 8 10364EVL, Bruker) mit einem maximalen Scanbereich von $13,9 \times 13,9 \mu\text{m}^2$. Mit beiden Scannern konnte eine Auflösung von maximal 4096×4096 Messpunkten erreicht werden. Große Aufnahmen wurden im Tapping Modus mit einer Geschwindigkeit von 0,1 Hz aufgenommen. Elektrische Eigenschaften wurden im PF-KPFM-Modus gemessen. In beiden Fällen wurden, wenn auf dem Lichtmikroskop des Rasterkraftmikroskops ersichtlich, mögliche interessante Bereiche vorausgewählt. Die Feinauswahl einer repräsentativen oder interessanten Stelle wurde mittels Topografieaufnahme mit einer Auflösung von 128×128 Messpunkten getroffen. Erwies sich ein Bereich als informativ, so wurde dieser im Detail mit einer Auflösung von 1024×1024 Messpunkten,

Konstruktion einer PM-Monoschicht

bei einer Scangröße von $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ aber mit mindestens 2048×2048 Messpunkten gemessen. Die meisten Aufnahmen dieser Größe wurden mit 4096×4096 Messpunkten gemessen.

5.4.5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Neben rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen wurde sich auch der Elektronenmikroskopie bedient, um Übersichtsaufnahmen der Probe zu erstellen. Dies war nötig, da die Topografien der Rasterkraftmikroskopie nur einen kleinen Teil der Probe darstellten. Elektronenmikroskopie wurde jedoch als letzte Messung vorgenommen, da der Elektronenstrahl die Membran beschädigen konnte. Es wurde an einem Vega W-REM der Firma Tescan gemessen. Das Substrat wurde auf einen Aluminiumhalter geklebt und in das Elektronenmikroskop eingeschraubt. Daraufhin wurde ein Ultrahochvakuum in der Hauptkammer des Mikroskops gezogen und der Elektronenstrahl eingeschaltet. Die Messspannung betrug 10 keV. Die Probe wurde danach nicht mehr verwendet.

5.4.6. Bestimmung der Konzentration der Purpurmembra

Zur Bestimmung der Konzentration der verdünnten Purpurmembra wurden UV-VIS-Spektren aufgenommen und die Absorption bei einer Wellenlänge von 589 nm bestimmt. Diese wurde näherungsweise der *Optischen Dichte* gleichgestellt. Die optische Dichte der Stammlösungen waren gegeben.

5.4.7. Feldloses Abscheiden der WT PM auf verschiedenen Substraten

Die Stammlösung der WT PM wurde in jeweils verschiedenen Puffern (Puffer 50 und Puffer 300) bzw. destilliertem Wasser auf eine optische Dichte von 0,2 verdünnt. Daraufhin wurden $60 \mu\text{l}$ der WT PM -Lösung auf verschiedene Substraten (BPT, CL-BPT, NBPT und CL-NBPT) getropft. Nach 20 Minuten wurde der Tropfen mit $200 \mu\text{l}$ destilliertem Wasser

abgewaschen. Die Probe wurde sanft in einem leichten Stickstoffstrom getrocknet und danach mittels Rasterkraftmikroskopie vermessen.

Zur Optimierung der Belegungsraten wurden sowohl optische Dichte (0,2 und 1,0) als auch Sedimentationszeit (20 Min, 1 Stunde, 4 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden, Eintrocknen) variiert. Dazu wurden einmal Puffer 50 und einmal Puffer 100 verwendet. Um ein Eintrocknen der Lösung zu verhindern, wurde die Probe in ein Glasgefäß luftdicht eingeschlossen, in der ein weiteres Gefäß mit destilliertem Wasser vorhanden war. So war der Dampfdruck im Gefäß so hoch, dass es nicht zum Eintrocknen kam. Die Messungen fanden auf CL-NPBT-Substrat statt. Letztendlich wurde die Konzentration nochmals runtergefahren auf eine optische Dichte von 0,001. Die Tropfengröße wurde auf 3 μl , 4 μl und 5 μl gesenkt. Abbildung 62 fasst den Bildungsmechanismus schematisch zusammen.

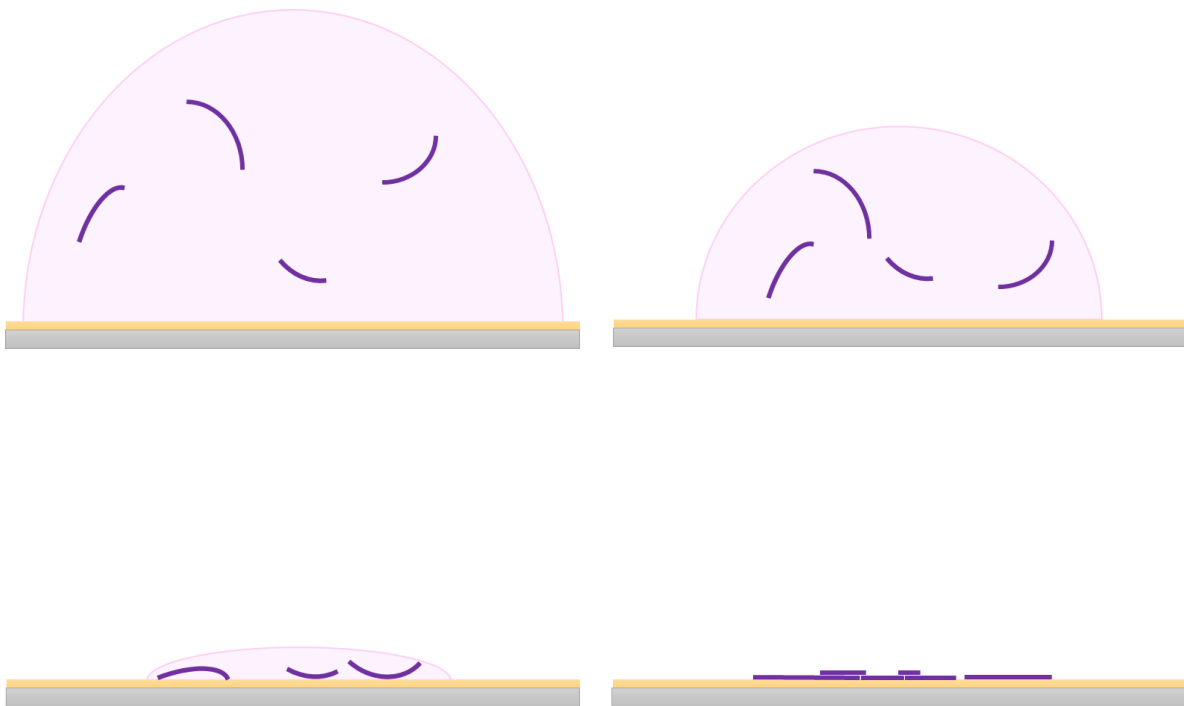


Abbildung 62 – Ablagerung der PM auf dem Boden nach Trocknung des Tropfens.

5.4.8. Elektrosedimentation der WT PM

Zur Abscheidung der PM in einem elektrischen Feld wurde ein Kondensator gebaut. Das Substrat CL-NBPT wurde als obere Kondensatorplatte verwendet, während ein ITO-Plättchen die untere Kondensatorplatte darstellte. Beide Platen wurden an ein Netzteil mit einstellbarem Strom und Spannung angeschlossen. Die positive Elektrode stellte dabei das CL-NBPT-Substrat dar, sodass die WT PM nicht von der Elektrode abgestoßen wurde. Der Tropfen wurde vorsichtig auf das Substrat aufgetragen, daraufhin wurde dieses langsam rumgedreht und auf die Kontaktierung gesetzt. Abbildung 61 zeigt den Versuchsaufbau schematisch. Die Elektroden hatten einen Abstand von 10 mm. Die Sedimentation fand bei optischen Dichten von 0,1 und 0,001 und Spannungen von 1 V, 5 V und 10 V statt. Sie wurde während 20 Minuten vollzogen. Danach wurde das Substrat mit destilliertem Wasser abgewaschen. Die Verdünnungen der WT PM wurden hier sowie auch im folgenden Verlauf mit destilliertem Wasser vollzogen, da es sonst immer wieder zu Kristallbildungen kam. Die Tropfengröße betrug 60 μl .

Zur Optimierung wurde daraufhin die Tropfengröße auf 12 μl , 10 μl und 5 μl gesenkt. Außerdem wurde bei 200 mV und 500 mV gemessen. Die Probe bei 500 mV, einer OD von 0,1 und einer Tropfengröße von 12 μl wurde auf die Orientierung der WT PM auf dem Substrat gemessen. Zum Vergleich wurde die Orientierung der WT PM nach Sedimentation ohne elektrisches Feld bestimmt.

5.4.9. Elektrophoretische Sedimentation der WT PM

Um die Verteilung der WT PM auf dem Substrat zu verbessern, wurde der Tropfen so aufgetragen, dass er sowohl mit dem Substrat als auch mit der Gegenelektrode in Kontakt war. Dazu wurde der Abstand zwischen den beiden Kondensatorplatten auf 2 mm gesenkt, die Tropfengröße betrug fortan 40 μl bei einer optischen Dichte von 1,0. 5 Volt wurden während 5 Minuten angelegt (Inkubationszeit), daraufhin wurde der Tropfen mit einer Spritze abgezogen. Die Spannung wurde für weitere 5 Minuten aufrecht gehalten, um Trocknungseffekten entgegenzuwirken (Trockenzeit). Das Substrat wurde daraufhin vermessen.

5.4.10. Elektrophoretische Sedimentation der c-His PM

Im Folgeschritt wurde die WT PM durch c-His PM ersetzt. Diese besaß auf der zytoplasmatischen Seite starke positive Ladungen, die sich aufgrund der His-Tags ausbildeten. Um den Ni-NTA -Komplex mit dem His-Tag bilden zu können, musste die c-His PM dementsprechend auf dem Substrat orientiert sein. Daher stellte hier das Substrat die negative Elektrode dar.

Ein erster Versuch fand unter denselben Bedingungen wie die elektrophoretische Sedimentation der WT PM statt (5, 5 Minuten Inkubationszeit, 5 Minuten Trocknungszeit, Optische Dichte 1,0). Danach wurde die optische Dichte auf 0,02 gesenkt und die Inkubationszeit auf 3 Minuten beschränkt. PF-KPFM-Messungen wurden vollzogen, um die Orientierung der c-His PM sicherzustellen.

5.4.11. Mechanismus der elektrophoretischen Sedimentation der c-His PM

Um den Mechanismus der Ausbildung von Monoschichten der c-His PM auf CL-NBPT genauer zu untersuchen, wurden die Parameter geändert, um ihre Auswirkung auf die Schicht zu beobachten. Zu diesen Parametern gehörten optische Dichte, Spannung, Inkubationszeit und Trocknungszeit, während Spannung und Kondensatorlücke bei 5 Volt und 2 mm konstant gehalten wurden.

5.4.12. Verwendete Geräte und Chemikalien

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die im Versuch genutzten Geräte und Chemikalien.

Tabelle 8 – Übersicht über in den Versuchen genutzten Geräte und Chemikalien.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Rasterkraftmikroskop	Multimode® 8	BRUKER
Elektronenmikroskop	Vega W-REM	TESCAN
UV-Laser	Avia 355	COHERENT
UV-Vis-Spektrometer	Lambda 35	PERKINELMER
Sputterer	Sputter Coater 108auto	CRESSINGTON
Chemikalien		HERSTELLER
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris, > 99 %	CARLROTH
Salzsäure	0,357 mol/l	TITRIPUR®
Kaliumchlorid	99,999 % rein	SUPRAPUR®

5.4.13. Berechnung der Belegungsdichte

Zur Berechnung der Belegungsrate wurden die aufgenommenen Topografien mit NanoScope Analysis 1.90 (Build R1.135067, Bruker) geglättet. Daraufhin wurden sie gespeichert und mit Gwyddion 2.47 geöffnet. Hier wurde das Substrat mittels Höhenschwellwert weiss, die Purpurnembran schwarz gefärbt. Der Höhenschwellwert betrug dabei 4,5 nm zum Boden, da Purpurnembran eine Höhe von 4,8 bis 5,2 nm aufweist. Das Bild wurde exportiert und in ImageJ 1.51j8 (National Institutes of Health, USA) ausgewertet. Hier wurde das Verhältnis von schwarzer zu weißer Fläche gebildet. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nicht zwischen Mono- und Multilagern unterschieden wurde.

5.5. Ergebnisse und Diskussion

5.5.1. Feldloses Abscheiden der WT PM auf verschiedenen Substraten

Zunächst wurde versucht, durch einfache Sedimentation der WT PM eine Monoschicht der Purpurnmembran auf den verschiedenen Substraten zu erzeugen. Abbildung 63 zeigt eine Übersicht der ermittelten Belegungsraten. Zwei Beobachtungen fallen besonders ins Auge. Zum einen schienen WT PM auf quervernetzten Substraten besser zu haften. Andererseits hatte der verwendete Puffer einen großen Einfluss. Puffer 50 hatte eine deutlich höhere Belegungsrate. Allerdings muss hierbei die Qualität der Beschichtung beachtet werden. Abbildung 64 zeigt die aufgenommenen Topografien. Dort zeigt sich, dass die Clusterbildung mit höherer Ionenstärke des Puffers abnahm. Dies rührte daher, dass sich Ionen zwischen die WT PM -Blätter legten und die einzelnen Blätter somit voneinander abschirmten. Eine zu hohe Ionenstärke konnte aber auch die Haftung zwischen PM-Blatt und Substrat lockern. Die höhere Belegungsrate bei quervernetzten Substraten war vermutlich auf eine Brücke der Ionen zwischen Quervernetzung und der negativ geladenen Purpurnmembran zurückzuführen, die die Anhaftung der PM an das Substrat elektrostatisch unterstützte. Dieser Effekt war nach der Verwendung von destilliertem Wasser nicht zu sehen. Die höchste Belegungsrate kam somit mit Puffer 50 auf quervernetztem NBPT zustande, war mit 32,2 % aber noch weit von einer kompletten Bedeckung entfernt.

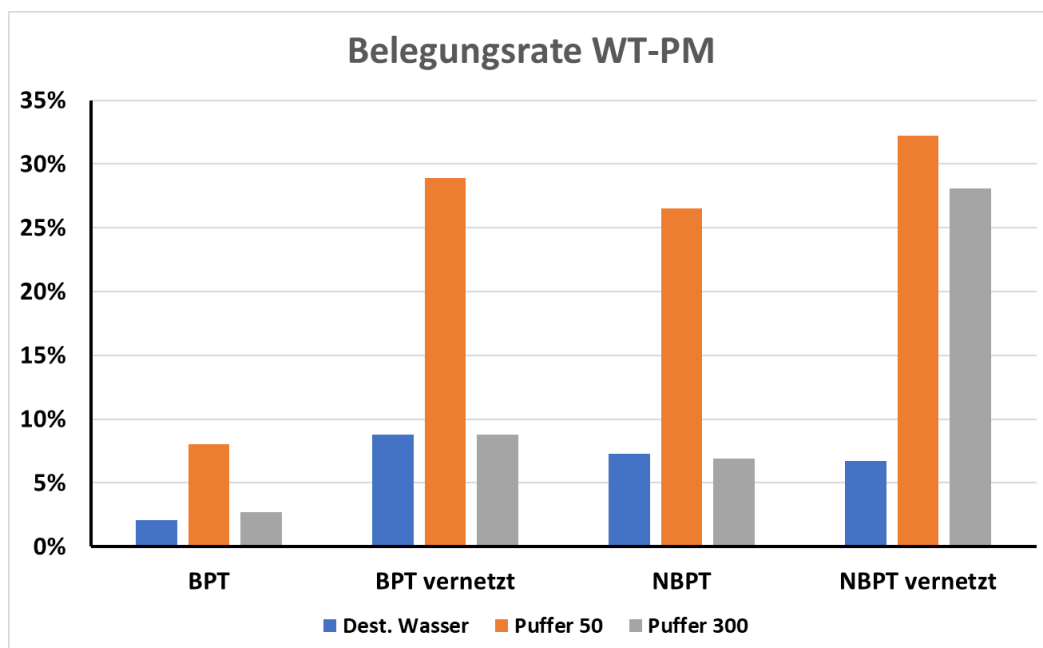
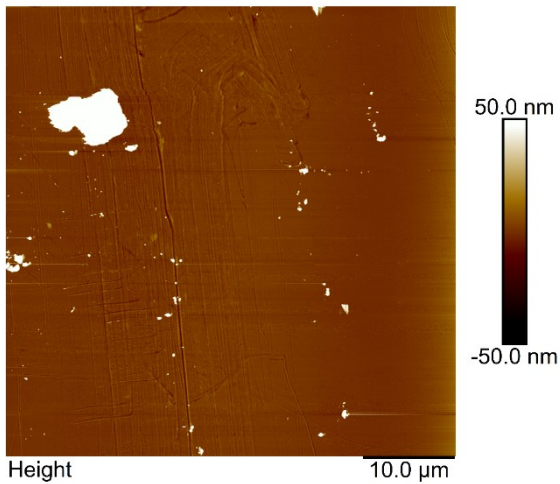


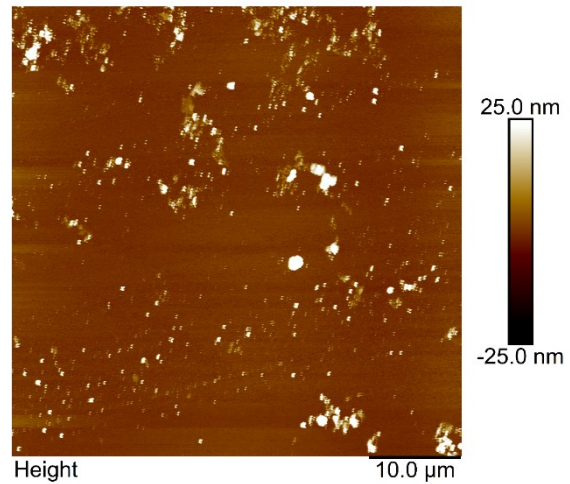
Abbildung 63 - Graphische Darstellung der Belegungsraten auf verschiedenen Substraten.

Konstruktion einer PM-Monoschicht

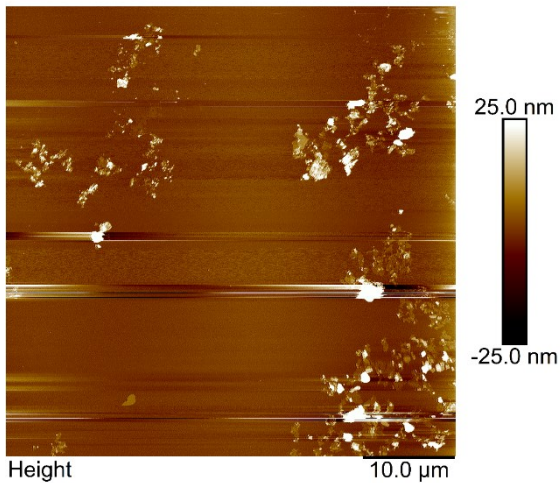
A)



B)



C)



D)

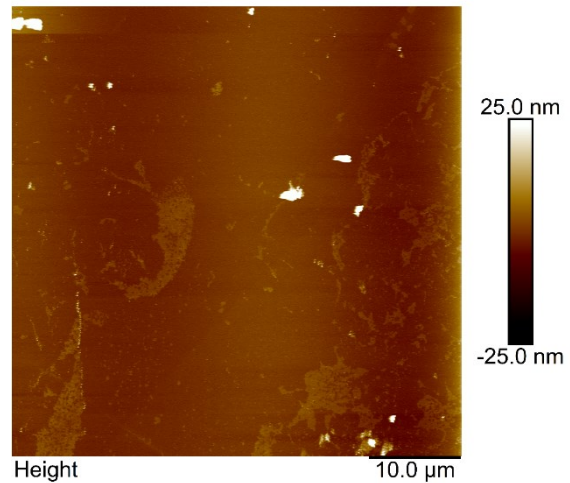


Abbildung 64 - Ablagerung von WT-PM in dest. Wasser. 60 μl WT-PM (OD 0,2) wurden auf verschiedene Substrate gegeben und nach 20 Minuten mit 200 μl dest. Wasser sanft gespült. A) BPT B) BPT vernetzt C) NBPT D) NBPT vernetzt.

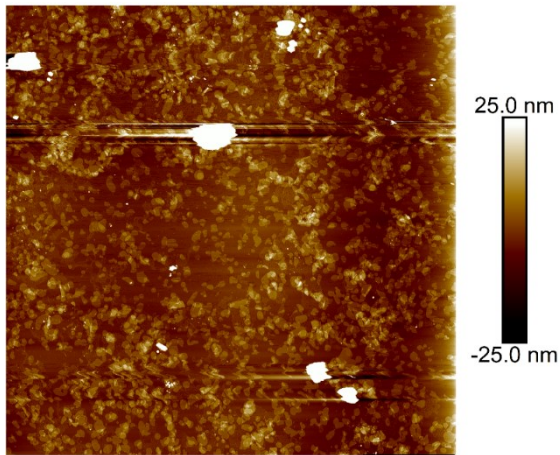
Um die Belegungsrate zu erhöhen, wurden sowohl Inkubationszeit als auch optische Dichte variiert. Außerdem wurde zusätzlich der Puffer 100 verwendet. Das Substrat stand samt Tropfen während der gesamten Inkubationszeit in einem geschlossenen Behälter, in dem ein weiterer Behälter mit dest. Wasser stand. So konnte das frühzeitige Austrocknen des Tropfens verhindert und Inkubationszeiten von bis zu 24 Stunden realisiert werden. Es wurde auch ausprobiert, die Probe auf dem Substrat einzutrocknen. Hierbei wurde der Puffer jedoch weggelassen, da sich ansonsten Salzkristalle auf und unter der getrockneten WT-PM lagerten. Tabelle 9 zeigt eine Übersicht über die Belegungsraten bei verschiedenen Inkubationszeiten und Lösungen. Wie zu erwarten war, stieg die Belegungsrate mit wachsender Inkubationszeit

und optischer Dichte. So konnten Dichten von über 95%, nach Eintrocknen sogar über 99% erzielt werden. Auffällig war jedoch, dass die steigende Belegungsrate dazu führte, dass sich mehrere Lagen WT-PM aufeinandersetzten. Dies war besonders nach Eintrocknen der Probe deutlich erkennbar. Abbildung 65 zeigt die aufgenommenen Topografien. Auch hier führte eine

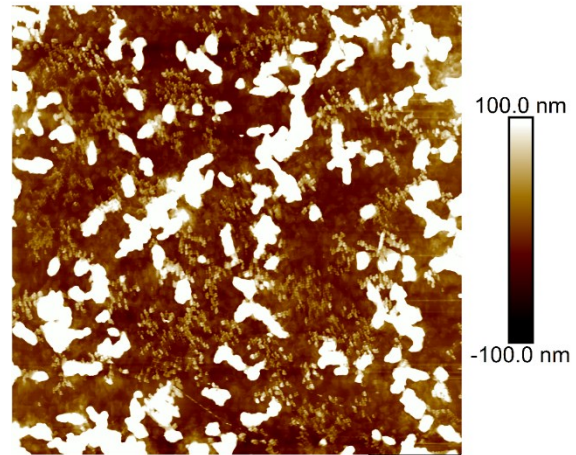
Tabelle 9 – Belegungsraten nach verschiedenen optischen Dichten, Puffern und Inkubationszeiten.

	OD 0,2 Puffer 50	OD 1,0 Puffer 50	OD 0,2 Puffer 100	OD 1,0 Puffer 100
20 Min	26,5 %	38,4 %	10,0 %	28,4 %
1 Stunde	47,2 %	54,5 %	11,1 %	36,4 %
4 Stunden	-	59,9 %	32,9 %	55,6 %
12 Stunden	-	80,9 %	44,1 %	82,8 %
24 Stunden	-	> 95 %	52,3 %	95,6 %
Getrocknet	87,0 %	99,1 %	-	-

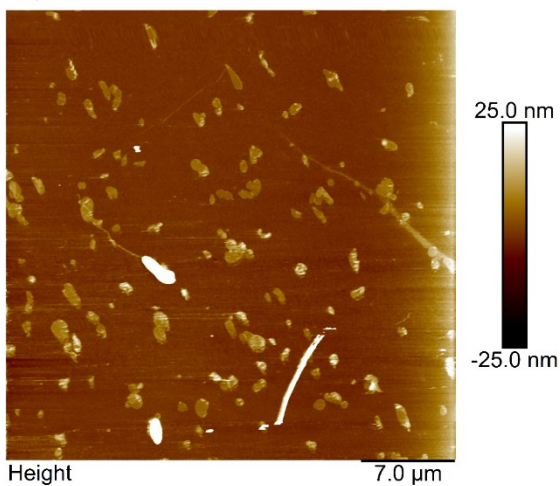
A)



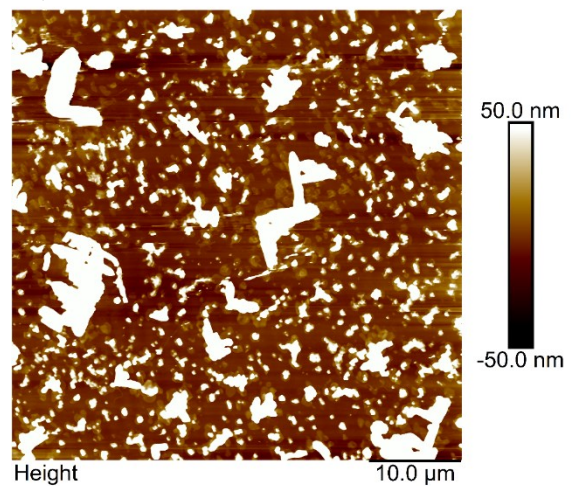
B)



C)

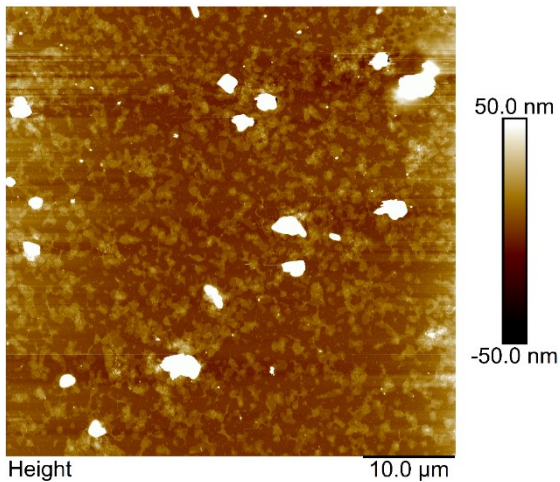


D)

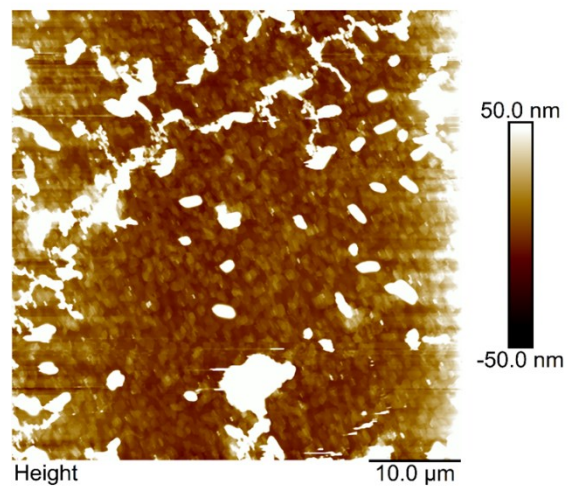


Konstruktion einer PM-Monoschicht

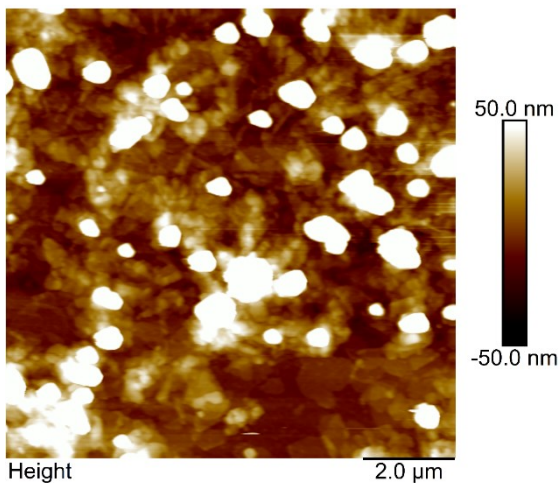
E)



F)



G)



H)

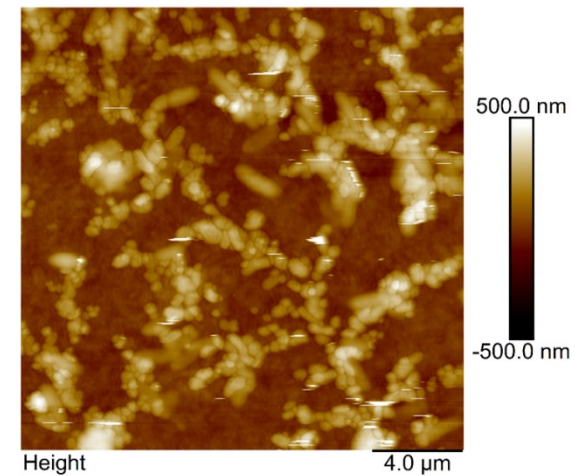


Abbildung 65 - Abscheidung von WT-PM auf NBPT mit verschiedenen Inkubationsparametern. A) OD 1,0, Puffer 50, 60 Minuten Inkubation B) OD 1,0, Puffer 50, 1440 Minuten Inkubation C) OD 0,2, Puffer 100, 20 Minuten Inkubation D) OD 0,2, Puffer 100, 720 Minuten Inkubation E) OD 1,0, Puffer 100, 240 Minuten Inkubation F) OD 1,0, Puffer 100, 720 Minuten Inkubation G) OD 0,2, dest. Wasser, eingetrocknet H) OD 1,0, dest. Wasser, eingetrocknet.

höhere Pufferstärke zu einer verbesserten Verteilung der WT PM, beziehungsweise zu geringerer Ausbildung von Multilagen. Es zeigte sich aber allgemein, dass sich Multilagen bereits bildeten, bevor eine komplette Bedeckung des Substrats zustande kam. Gut zu erkennen war dies bei einer optischen Dichte von 1,0 und unter Verwendung von Puffer 100. Nach 4 Stunden war die Belegung hauptsächlich noch monolagisch bei einer Belegungsrate von 55,6 %. Es war jedoch auch schon die Bildung erster Inseln erkennbar. Nach 12 Stunden erhöhte sich die Belegungsrate zwar auf 82,8 %, die Ausbildung inselförmiger Multilagen stieg jedoch stark an. Auch bei diesem Puffer hatten die PM-Blätter keine hohe Präferenz dazu, erst an das Substrat zu binden, sondern adsorbierten an anderen PM-Blättern.

Eintrocknen des Tropfens brachte große Anhäufungen der WT PM, wobei zu viel Material vorhanden war. Es wurde daher WT PM in geringeren Konzentrationen (Optische Dichte 0,001) auf CL-NBPT eingetrocknet. Außerdem wurde die Tropfengröße von 60 μl auf 3 bis 5 μl verringert. Es zeigte sich, dass mit steigender Tropfengröße die Belegungsrate stiegen. Dies folgte aus dem Fakt, dass die vom Tropfen bedeckte Fläche A auf dem Substrat nach Gleichung 64 vom Volumen V abhängt, unter der Annahme, dass der Tropfen eine perfekte Halbkugel auf dem Substrat bildet. Dies bedeutet, dass das Volumen schneller stieg als die Bedeckungsfläche des Tropfens.

$$A = \pi \cdot \left(\frac{3V}{2\pi}\right)^{\frac{2}{3}} \quad (64)$$

Eine Verdopplung des Tropfenvolumens hätte daher nur eine 1,6-fache Vergrößerung der Bedeckungsfläche zur Folge, jedoch auch eine Verdopplung der absoluten Anzahl der WT PM-Blätter. Daher stieg die Belegungsdichte mit steigender Tropfengröße. Die Ergebnisse führten zwar zu geringer Cluster-Bildung, jedoch nicht zu einer genügend hohen Belegungsrate.

5.5.2. Elektrosedimentation

Um die WT PM weiter über das Substrat zu verteilen und sie auf die freien Stellen im Substrat zu bewegen, wurde ein elektrisches Feld angelegt, wobei das Substrat die eine Elektrode bildete und einer ITO-Gegenelektrode in einem Abstand von 10 mm gegenüberstand. Tabelle 10 zeigt die Belegungsdaten bei Spannungen von 1 V, 5 V und 10 V, sowie optischen Dichten von 0,001 und 0,1. Abbildung 66 zeigt die dazugehörigen Topografien. Auch hier fiel wieder die Clusterbildung auf. Trotz elektrischen Felds war das Ergebnis mit ähnlichen Ergebnissen ohne Feld vergleichbar. Bei 10 V kam es hingegen zu einer vergleichbar hohen Belegungsrate, bei einer optischen Dichte von 1,0 sogar zu hohen WT PM -Lagen.

Tabelle 10 - Belegungsdaten bei verschiedenen Spannungen und optischen Dichten nach Elektrosedimentation der WT PM.

Optische Dichte	Spannung 1 V	Spannung 5 V	Spannung 10 V
0,001	7,2 %	12,6 %	29,8 %
0,1	64,8 %	18,2 %	~100 %

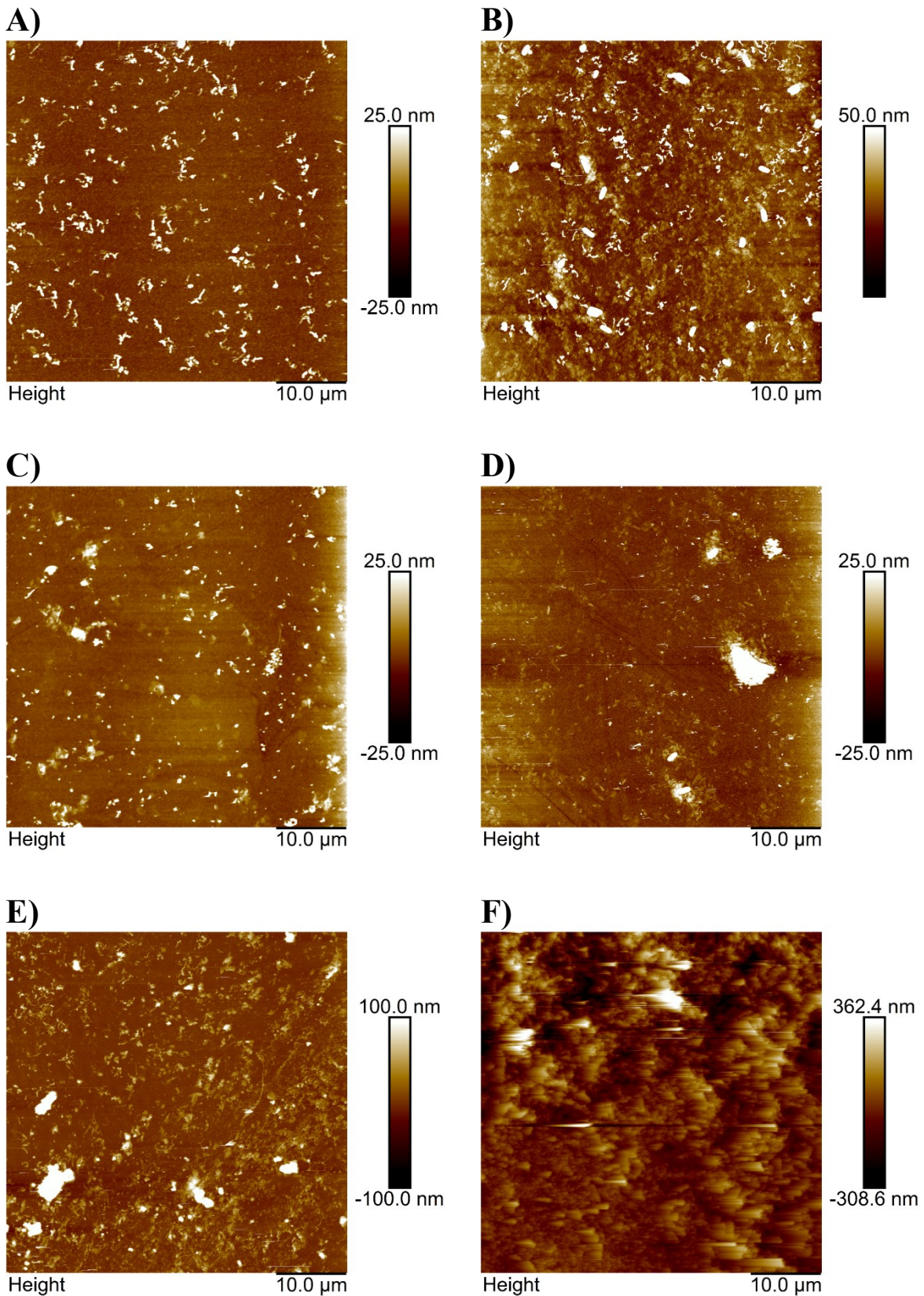


Abbildung 66 - Abscheidung von WT-PM in elektrischem Feld. A) Spannung 1 V, OD 0,001 B) Spannung 1 V, OD 0,1 C) Spannung 5 V, OD 0,001 D) Spannung 5 V, OD 0,1 E) Spannung 10 V, OD 0,001 F) Spannung 10 V, OD 0,1.

Konstruktion einer PM-Monoschicht

Eine geringere Spannung führte zu deutlich zufriedenstellenderen Ergebnissen. Abbildung 67 zeigt Topografien bei einer Spannung von 700 mV und einer optischen Dichte von 0,001, nachdem ein 5 μ l Tropfen auf dem Substrat eingetrocknet wurde. A) zeigt den Rand, während B) eine Stelle im Tropfeninnenteil wiedergibt. Es war eine hohe Bedeckungsrate von 81 % ohne große Clusterbildung zu erkennen. Allerdings zeichnete sich ein Muster in der Aufnahme ab.

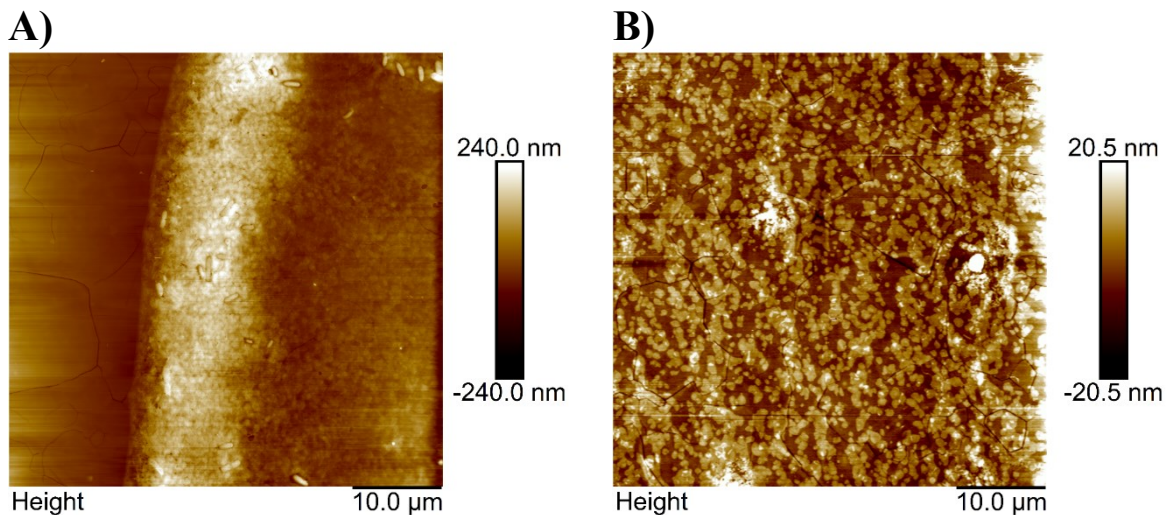


Abbildung 67 - 5 μ l WT-PM (OD 0,001) unter elektrischem Feld (700 mV) eingetrocknet. A) Randbereich B) Mittlerer Tropfenbereich.

Eine genauere Untersuchung dieser Muster durch elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigte bei verschiedenen Spannungen und Tropfengrößen eine in konzentrischen Kreislinien ausgerichtete Anordnung der WT PM-Blätter (siehe Abbildung 68). Dies führte dazu, dass keine 100 %-ige Belegungsrate möglich war, wenngleich auch eine Clusterbildung größtenteils ausblieb.

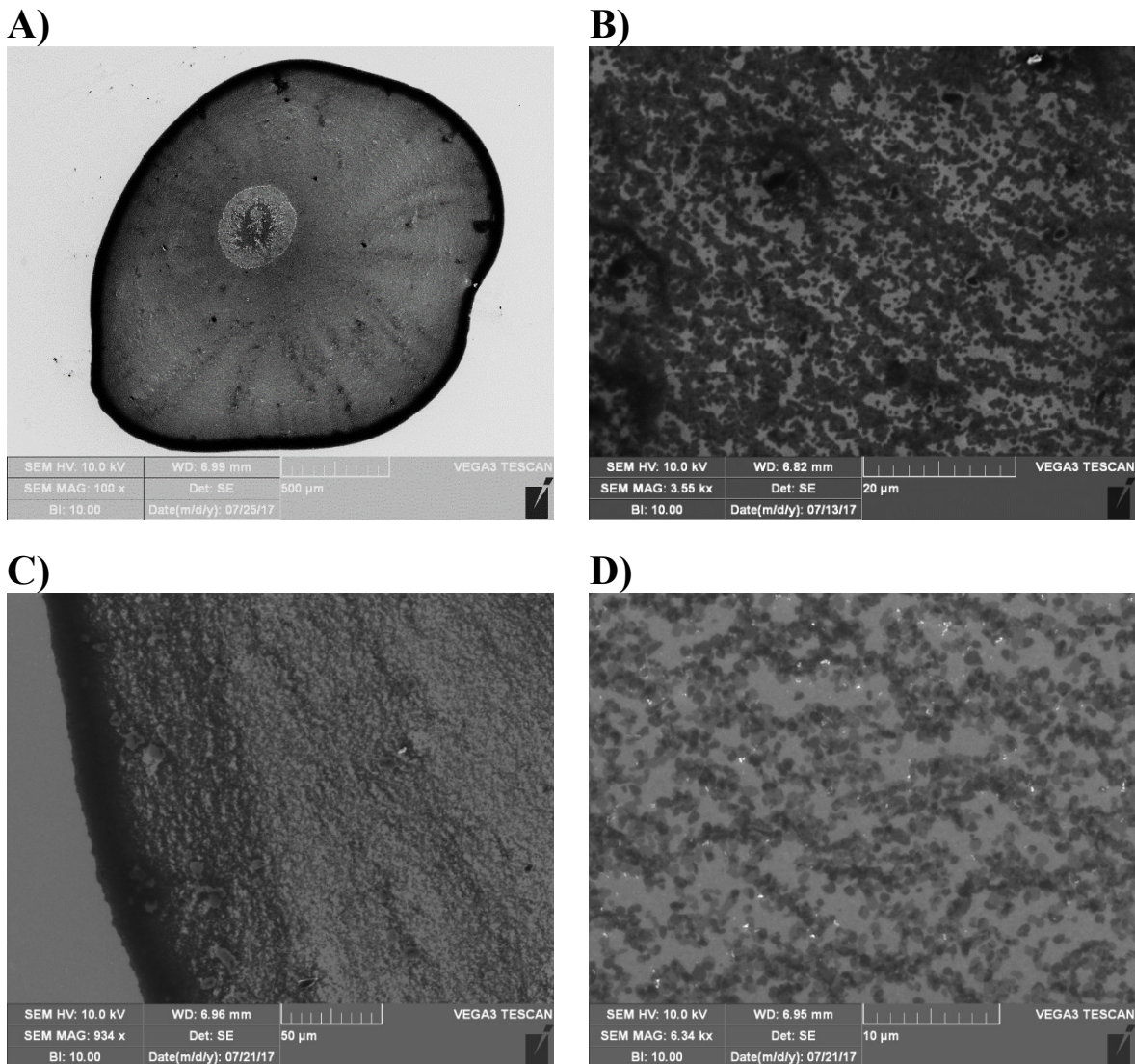


Abbildung 68 - SEM-Aufnahmen in elektrischem Feld abgeschiedener WT-PM-Tropfen. Die optische Dichte betrug jeweils 0,001, die Spannung im Feld betrug 200 mV. A) 12 µl Tropfengröße B) 12 µl Tropfengröße C) 5 µl Tropfengröße D) 5 µl Tropfengröße.

Wahrscheinlich war dies bedingt durch die Trocknung des Substrats. Der Tropfen trocknete von außen nach innen. Durch an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Luft bzw. der Grenzlinie zwischen Flüssigkeit, Luft und Substrat wirkten große Kräfte auf die WT PM, die sie in Richtung Tropfenmitte verschoben.

Konstruktion einer PM-Monoschicht

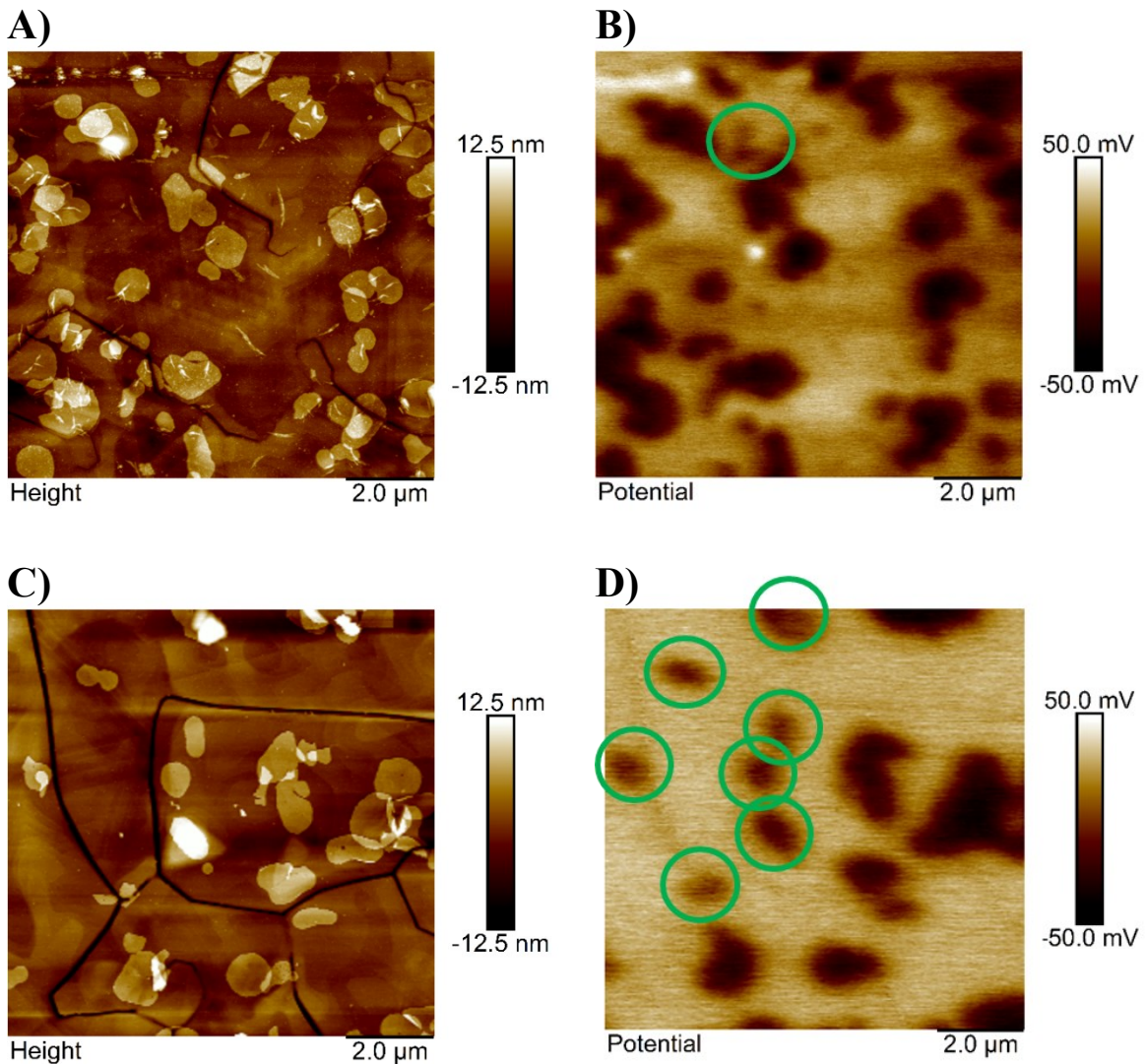


Abbildung 69 - Topografie und elektrostatisches Potential von WT-PM auf NPBT. Grün eingekreist sind die WT-PM, die falsch orientiert sind. A) Topografie nach Abscheidung in elektrischem Feld (500 mV) B) Elektrostatisches Potential nach Abscheidung in elektrischem Feld (500 mV) C) Topografie nach Abscheidung ohne elektrisches Feld D) Elektrostatisches Potential nach Abscheidung ohne elektrisches Feld.

Die Messung des elektrischen Potentials ist in Abbildung 69 gezeigt. B) zeigt das elektrische Potential nach PF-KPFM-Messung der in A) wiedergegebenen Topografie. Die WT PM wurde bei 500 mV abgeschieden. C) und D) zeigen Topografie und elektrisches Potential für die gleiche Probe bei Deposition ohne elektrisches Feld. Es ist erkennbar, dass sich die WT PM ohne Feldeinwirkung zufällig orientierte, während mit elektrischem Feld eine eindeutige Orientierung erkennbar war (erkennbar an einem Potential von -20 mV für die zytoplasmatische Seite und -30 mV für die endoplasmatische Seite, vergleiche Kapitel 5.2.1).

5.5.3. Elektrophoretische Sedimentation

In einem nächsten Schritt wurde der Abstand der Kondensatorplatten auf 2 mm reduziert und die Tropfengröße auf 40 μl gesteigert, damit der Tropfen sowohl Substrat als auch Gegenelektrode bedecken und somit Ladungen leiten konnte. Das sollte die WT PM dazu bringen, sich auf das Substrat, insbesondere die freien Stellen des Substrats, zuzubewegen. Nach 5 Minuten Inkubationszeit, gefolgt von 5 Minuten Trocknungszeit, bei 5 Volt und einer optischen Dichte von 0,2 wurden die in Abbildung 70 gezeigten Aufnahmen erzeugt.

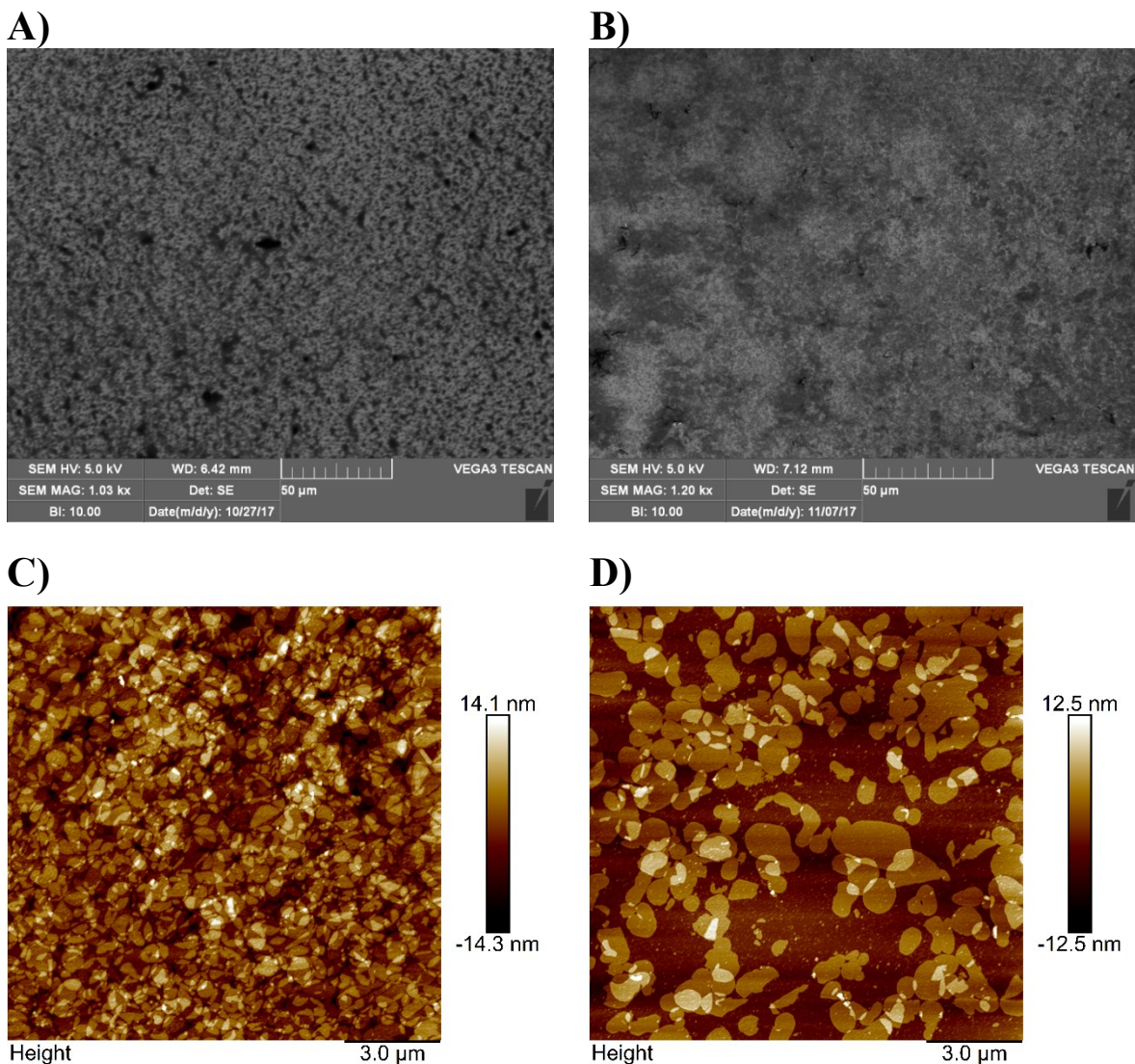


Abbildung 70 – Aufnahmen einer WT PM -Monoschicht nach Abscheidung über elektrophoretische Sedimentation bei 5 Minuten Inkubationszeit und 5 Minuten Trocknungszeit unter 5 Volt und einem Kondensatorplattenabstand von 2 mm. A, B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine homogene Schicht über das ganze Substrat. C, D) Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen bestätigen diese Schicht. Es gab keine sichtbare Faltung der WT PM. Größere Lücken traten nur selten auf (D).

Konstruktion einer PM-Monoschicht

Bei hoher Bedeckungsrate waren keine Cluster und auch kaum Stellen mit mehr als 2 PM-Lagen zu beobachten. Es kam auch nicht zur Faltung eines PM-Blatts. Das in C) gezeigte Bild war für den ganzen Tropfen repräsentativ, wie das elektronenmikroskopische Bild A) zeigt. Einzelne Doppelschichten kamen dadurch zustande, dass sich WT PM-Blätter auf Lücken legten, für die sie zu groß waren. Abbildung 71 fasst den Bildungsmechanismus zusammen.

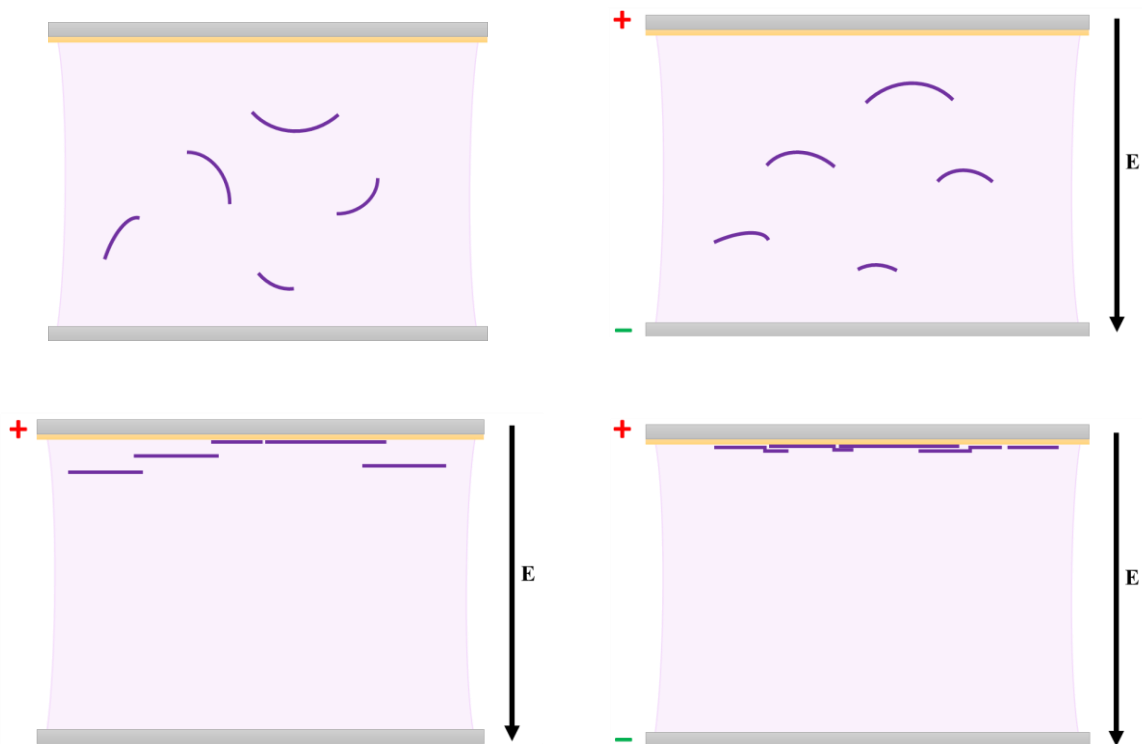


Abbildung 71 – Elektrophoretische Abscheidung der WT PM auf Substrat. Aufgrund der Abschirmung des elektrischen Feldes durch bereits abgeschiedene PM wirkt das elektrische Feld am stärksten dort, wo noch keine PM liegt. Nachkommende PM wird daher in freie Stellen gezogen und es entsteht eine homogene Verteilung der PM auf dem Substrat.

Der Versuch wurde auf einem Silizium-Wafer als Substrat wiederholt, es zeigte sich dasselbe Phänomen. Es konnte eine Monolage über das komplette Substrat erzeugt werden. Abbildung 72 zeigt diese Monolage in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme.

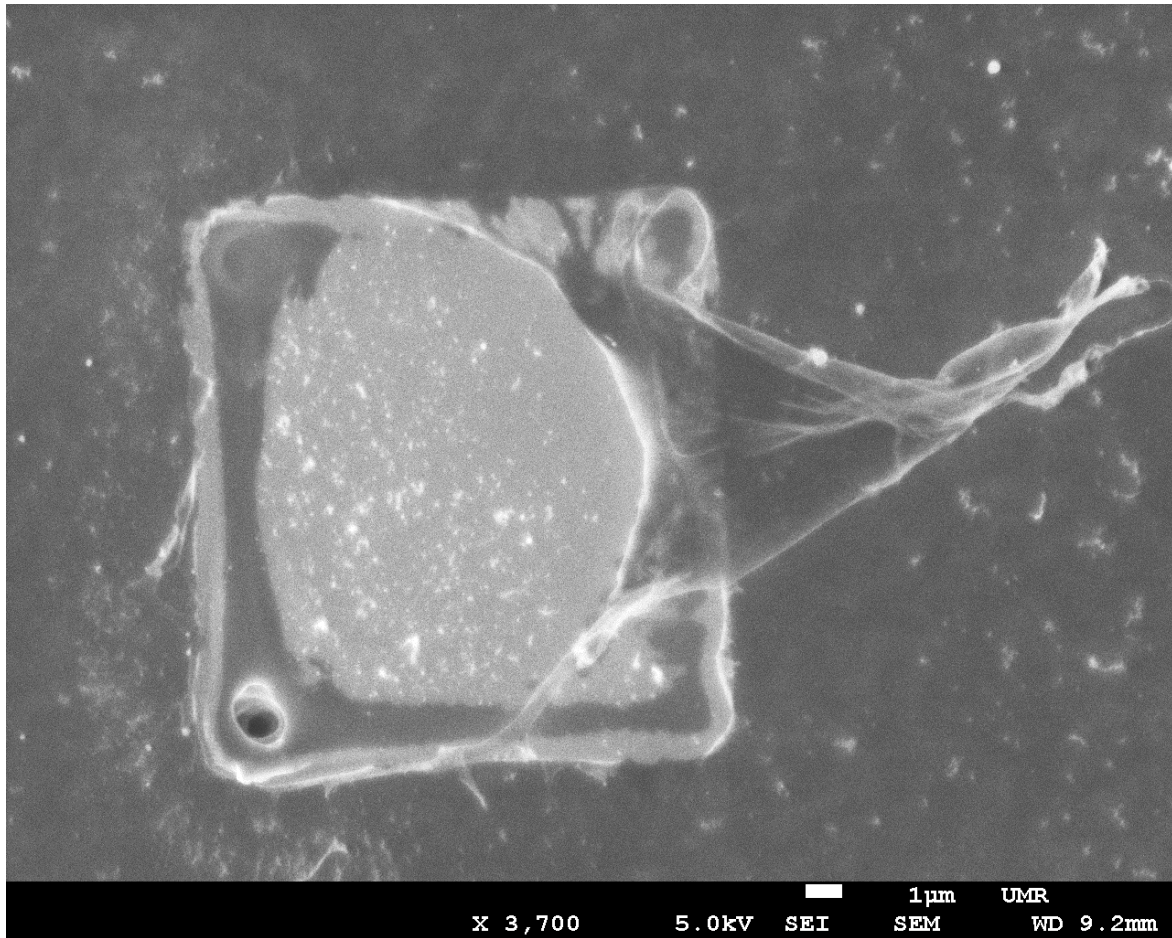


Abbildung 72 – Elektronenmikroskopische Aufnahme einer abgezogenen WT PM -Monoschicht (Aufnahme durch Michael Dasbach).

5.5.4. Elektrophoretische Sedimentation mit c-His PM

Nachdem der Versuch der elektrophoretischen Sedimentation mit WT PM erfolgreich verlief, sollte das System auf c-His PM umgestellt werden. c-His PM hatte den Vorteil, dass eine Seite der Membran negativ geladen war, während die andere durch die eingebauten His-Tags stark positive Ladungen trug. Dies sollte sowohl der Ausrichtung als auch der Positionierung der PM zugutekommen. Nachteil war die starke Wechselwirkung zwischen den Membranen, was zu Clusterbildung führte. So wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen (5 Minuten Inkubationszeit, 5 Minuten Trocknungszeit, 5 Volt, Optische Dichte 0,2) lediglich Cluster beobachtet (siehe Abbildung 73). Daraufhin wurde die Konzentration der c-His PM auf eine optische Dichte von 0,025 gesenkt und die Inkubationszeit auf 3 Minuten verkürzt.

Konstruktion einer PM-Monoschicht

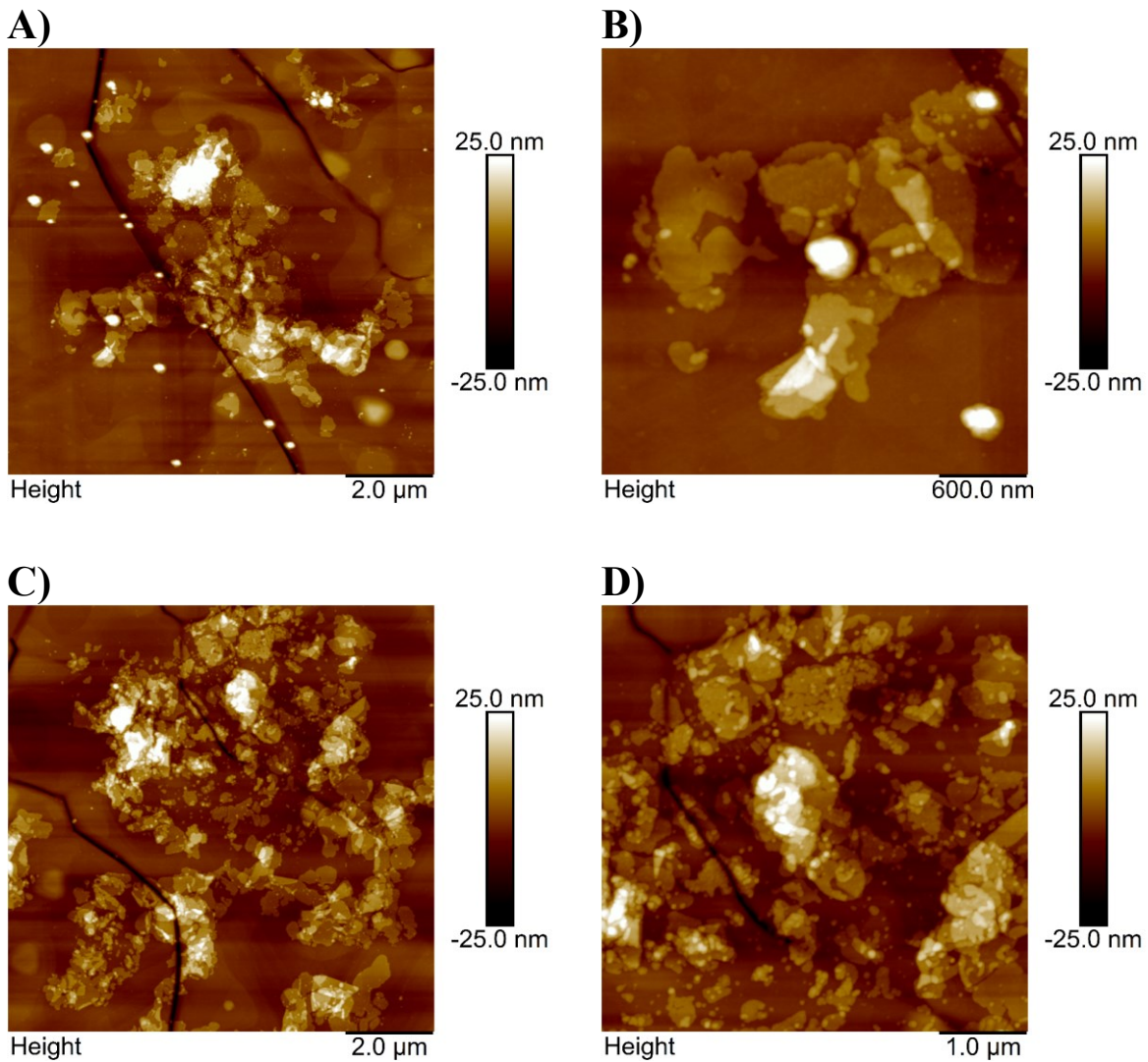


Abbildung 73 – Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Topografien elektrophoretisch abgeschiedener *c*-His PM unter den gleichen Bedingungen wie bei der elektrophoretischen Abscheidung der WT PM als Monolage. Es kam unter diesen Bedingungen nicht zu einer Monolage, sondern zu Haufenbildung.

Infolgedessen traten sehr interessante Phänomene auf. Lokal waren größere Flächen monologisch von *c*-His PM bedeckt. Diese *c*-His PM lag aber nicht mehr nur als einzelnes Fragment vor, vielmehr schien es, als wäre sie fusioniert. Dieses Phänomen trat sowohl auf Siliziumwafer als auch auf Ni-NTA-NBPT auf (siehe Abbildung 74). Es war außerdem reproduzierbar, betraf jedoch nur einzelne Stellen auf dem Substrat.

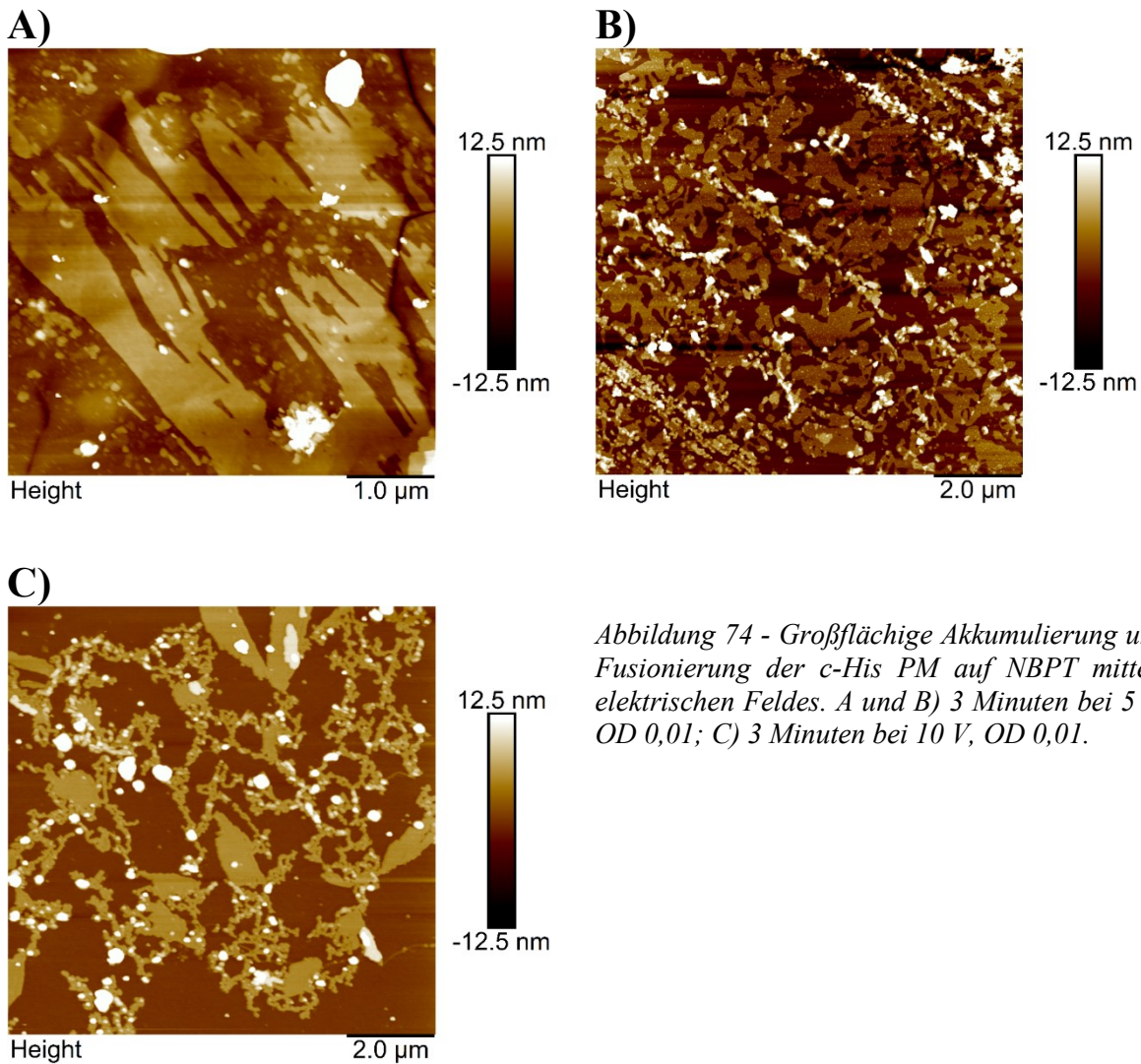


Abbildung 74 - Großflächige Akkumulation und Fusionierung der c-His PM auf NBPT mittels elektrischen Feldes. A und B) 3 Minuten bei 5 V, OD 0,01; C) 3 Minuten bei 10 V, OD 0,01.

5.5.5. Mechanismus der elektrophoretischen Sedimentation der c-His PM

In der Folge wurde versucht, die Entstehung dieser Fusion herzuleiten. Dazu wurde lediglich die Konzentration (Optische Dichte 0,02) und der Elektrodenabstand (2 mm) beibehalten. Die Spannung, Inkubationszeit sowie die Trocknungszeit wurden variiert, um den Prozess besser zu verstehen. Nachdem der Tropfen abgezogen wurde, musste der Rest des Tropfens an der Elektrode noch trocknen. Hier wurde das elektrische Feld noch eine Zeit lang beibehalten. Dies diente vor allem dazu, die c-His PM daran zu hindern, sich mit dem trocknenden Tropfen zu verschieben. Leider war es nicht möglich, eine quantitative Aussage hierüber zu machen, da dieses Phänomen davon abhing, wie viel Restflüssigkeit an der Elektrode blieb, nachdem der Tropfen abgezogen wurde. Dies war wiederum nicht reproduzierbar. Daher kann nur geschlussfolgert werden, dass die Spannung noch eine Zeit lang aufrechterhalten werden

Konstruktion einer PM-Monoschicht

musste, um eine Verschiebung der c-His PM im Nachhinein zu vermeiden (ca. 5 Minuten). Auch der Einfluss der Geschwindigkeit, mit der der Tropfen abgezogen wurde, war nicht erkennbar.

Der Einfluss der Spannung wurde zunächst bei 3 Minuten Inkubationszeit und 5 Minuten Trocknungszeit untersucht. Dazu wurden Proben nach Spannungen von 0,5 Volt, 5 Volt und 10 Volt verglichen. Sie sind in Abbildung 75 dargestellt. Bei niedriger Spannung von 0,5 V konnte keine Fusion beobachtet werden. Stattdessen kam es vermehrt zu Haufenbildung und Faltung der Membran. Bei einer Spannung von 5 V kam es zu Fusionen. Bei 10 V hingegen schien die fusionierte PM wieder zu zerfallen.

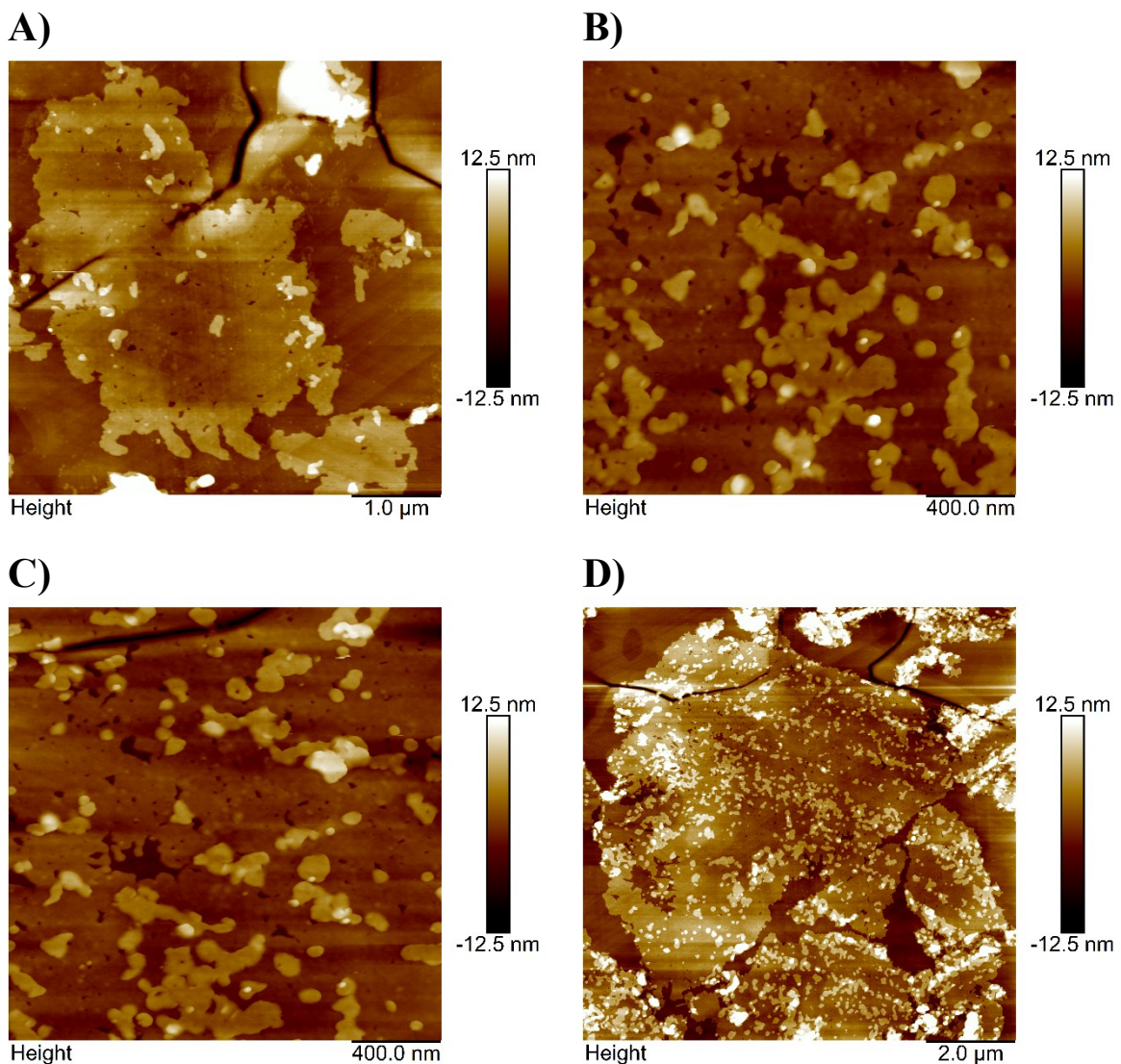


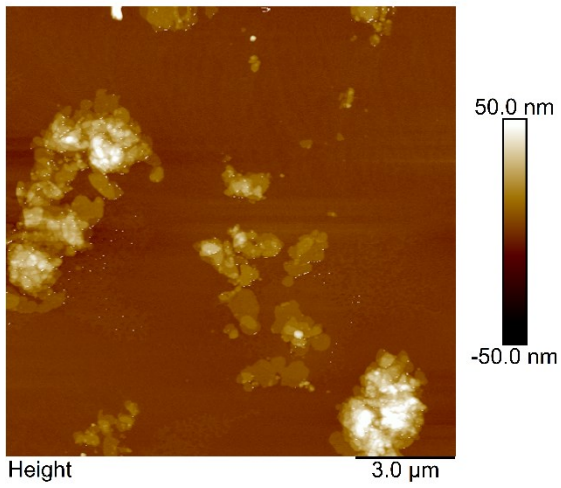
Abbildung 75 – Rasterkraftmikroskopische Topografien elektrophoretisch abgeschiedener und fusionierter c-His PM bei 5 V, 3 Minuten Inkubations- und 5 Minuten Trocknungszeit bei OD 0,02. A) und D) zeigen großflächige Fusionen, B) und C) sind Vergrößerungen der Probenstelle A).

Der Einfluss der Zeit wurde daher vorerst bei einer Spannung von 5 Volt untersucht. Es wurden sowohl Inkubationszeit als auch Trocknungszeit variiert. Die Topografien sind in Abbildung 76 zu sehen. Bei Inkubationszeiten von weniger als 3 Minuten und Trocknungszeiten von 5 Minuten konnte keine Fusion beobachtet werden. Hier bildeten sich erneut Cluster. Bei 3 Minuten Inkubationszeit bildeten sich, wie bereits beschrieben, erste Verknüpfungen unter den Membranen, die schon nach 4 Minuten Inkubationszeit stark anwuchsen. Nach 5 Minuten Inkubationszeit kam es zu elektrolytischen Phänomenen. Es entstanden Blasen an der Anode, die in der Topografie deutlich zu sehen waren. Hier schien die c-His PM förmlich explodiert zu sein, kleine PM-Fragmente sind auf und um diese Stellen herum zu finden. Zum Zwecke einer Fusion sollten 4 Minuten Inkubationszeit also nicht überschritten werden. Dies lag vermutlich an der elektrolytischen Zersetzung des Wassers bei Spannungen über 0,7 Volt. Auch die Trocknungszeit hatte eine Wirkung auf die Ausbildung der Fusionen.

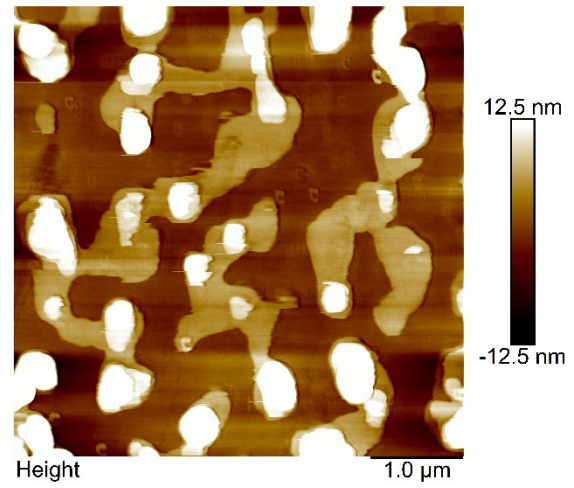
Abbildung 76 C-E) zeigt Aufnahmen bei 4 Minuten Inkubationszeit und 0, 4 und 8 Minuten Trocknungszeit. Fiel die Trocknungszeit weg, so bildeten sich konzentrisch angeordnete PM-Berge, die auf Trocknungseffekte zurückzuführen waren. Dies deutete darauf hin, dass die Fusionierung erst nach der elektrophoretischen Sedimentation stattfand, da es hier noch keine Anzeichen dafür gab. Nach 5 Minuten Trocknungszeit kam es zur Fusion, wie auch bereits oben beschrieben. Nach 10 Minuten und mehr bildeten sich allerdings wieder große Cluster. Daneben lagen große Flächen von lipiden Monoschichten mit einer Höhe von 2,5 nm vor. Es schien, als sei die PM hier mit dem Substrat verbunden, die obere Schicht der lipiden Doppelschicht aber migriert, um Cluster zu bilden. Teilweise lagen auch noch 5,2 nm hohe Doppellipidschichten vor. Alle Beobachtungen konnten auch auf Siliziumwafer als Substrat beobachtet werden.

Konstruktion einer PM-Monoschicht

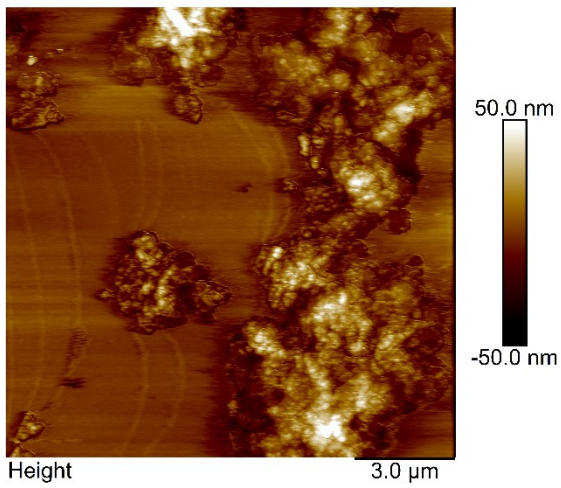
A)



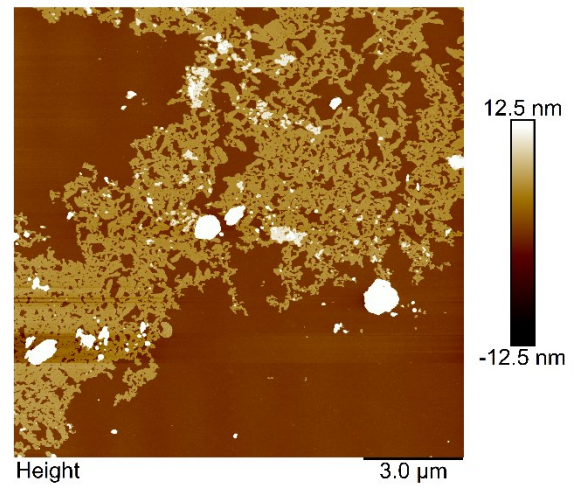
B)



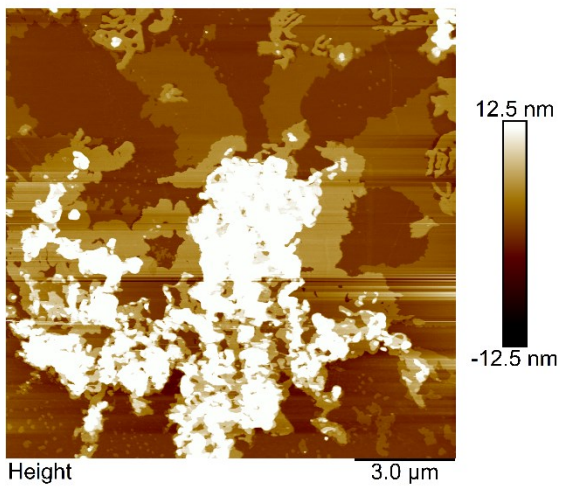
C)



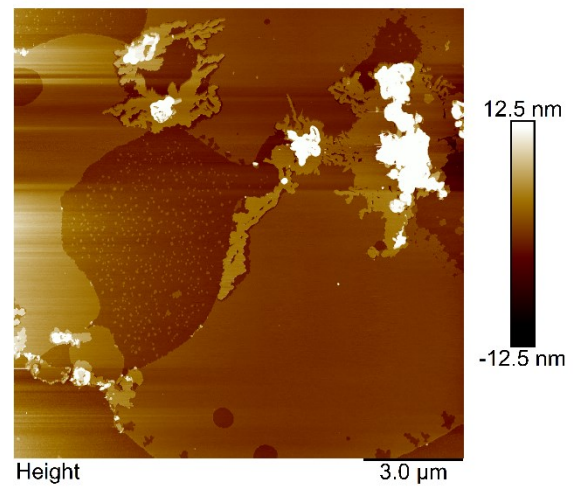
D)



E)



F)



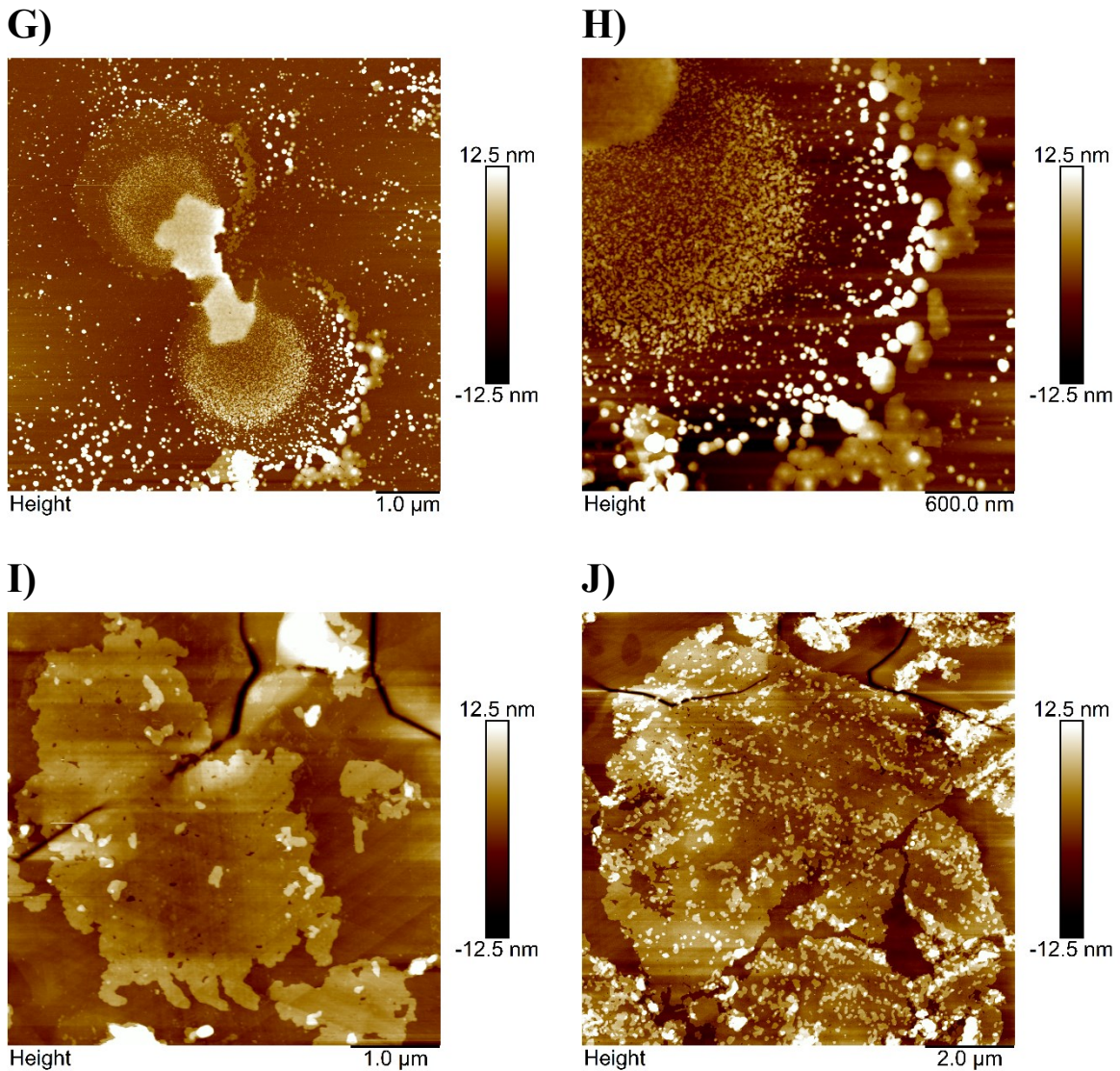


Abbildung 76 - Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Topografien elektrophoretisch abgeschiedener c-His PM. Die Kondensatorspannung lag bei 5 Volt, die optische Dichte betrug 0,02. Im Folgenden werden die Zeiten als Inkubationszeit + Trocknungszeit angegeben. A) 1 + 5 Min; B) 3 + 3 Min; C) 4 + 0 Min; D) 4 + 4 Min; E) 4 + 8 Min; F) 4 + 8 Min; G) 5 + 10 Min; H) 5 + 10 Min; I) 3 + 5 Min; J) 3 + 5 Min. Es ist erkennbar, dass die Fusion mit steigender Inkubationszeit voranschritt (A, I, G). Trocknungszeit war zwar notwendig, um Trocknungseffekten entgegenzuwirken, jedoch führten zu lange Trocknungs-effekten zur Auflösung der bilipiden Monolage unter Haufenbildung. Optimale Ergebnisse wurden bei 4 Minuten Inkubationszeit und 5 Minuten Trockenzeit erzielt.

Konstruktion einer PM-Monoschicht

Aus den Messungen ließ sich eine Hypothese des Bildungsmechanismus aufstellen, die in Abbildung 77 schematisiert ist. Nachdem die c-His PM-Lösung in den Kondensator eingebracht wurde, war die PM homogen in der Lösung verteilt. Das elektrische Feld führte dazu, dass sich die PM-Blätter einerseits entsprechend ihrer elektrischen Eigenschaften im Feld ausrichteten, andererseits bewegten sie sich auf die negativ geladene Elektrode, also das Substrat, zu. Die Anziehung zur negativ geladenen Elektrode überwog der zur positiv geladenen, da die positiven Ladungen, die auf der einen Seite der PM-Blätter aufgrund der his-Tags auftraten, größer waren als die negativen Ladungen auf der anderen Seite der PM-Blätter. Folglich lagerten sich erste Blätter auf dem Substrat ab. Die durch ihre Ladungen normalerweise leicht gebogene c-His PM legte sich dabei flach auf das Substrat. Freie Stellen des Substrats bildeten ein höheres elektrisches Feld aus, wodurch noch nicht adsorbierte PM in Richtung dieser freien Stellen gezogen wurde. Es bildete sich eine Monolage analog zur WT PM (siehe Kapitel 5.5.3). Mit fortlaufender Zeit positionierten sich immer mehr PM-Blätter auf dem Substrat. Dies steigerte die Wahrscheinlichkeit einer Fusion, da sich Grenzflächen zwischen den PM-Blättern im weiteren Verlauf schneller fanden. Bei Inkubationszeiten von mehr als 5 Minuten kam es allerdings zur Elektrolyse des Wassers, die die Bildung von Fusionen störte.

Nachdem der Tropfen entfernt wurde, begann die Fusion der PM. Das elektrische Feld bzw. die elektrischen Ladungen auf dem Substrat führten zu einer Migration der Bestandteile der PM. Zuerst fusionierten die PM-Blätter. Nach etwa 4 Minuten waren schon große fusionierte Lagen zu erkennen, nach 5 Minuten waren die Lücken größtenteils geschlossen. Im weiteren zeitlichen Verlauf aber migrierten die Bestandteile immer weiter aufeinander zu, sodass sich letztendlich Cluster bildeten. Dabei blieb die untere Lipidmonoschicht zwar beweglich auf dem Substrat haften, schaffte es aber nicht, sich davon zu lösen. Die obere Schicht der Lipiddoppelschicht hingegen migrierte, um Cluster zu bilden. Ihre Abkopplung von der Doppelschicht wurde unterstützt von der Abstoßungskraft, die vom negativ geladenen Substrat ausging. Die Lipideinzelschicht blieb großflächig auf dem Substrat zurück. Die besten Bedingungen zur Ausbildung großflächiger Fusionen entstanden nach 3 Minuten Inkubationszeit und 5 Minuten Trockenzeit, bei einer Spannung von 5 Volt und einer optischen Dichte von 0,02.

Die fusionierte PM schien bis zu einem bestimmten Zeitpunkt vollkommen intakt zu sein. Zwar konnte dies nicht mittels molekularer Auflösung bewiesen werden, jedoch war die Höhe der PM mit 5,2 nm ein großer Hinweis darauf. PM, in der Bacteriorhodopsin nicht mehr intakt ist, hat eine geringere Höhe von bis zu 4 nm.^[328] Zu klären wäre noch, wie es zur Fusion kommen konnte. Aufgrund des hohen Bacteriorhodopsin-Anteils der PM von etwa 80 % ist die PM

größtenteils kristallin. Diese Kristallinität musste zum Zwecke der Fusion aufgebrochen und neu angeordnet werden. Hier wären weitere Untersuchungen nötig.

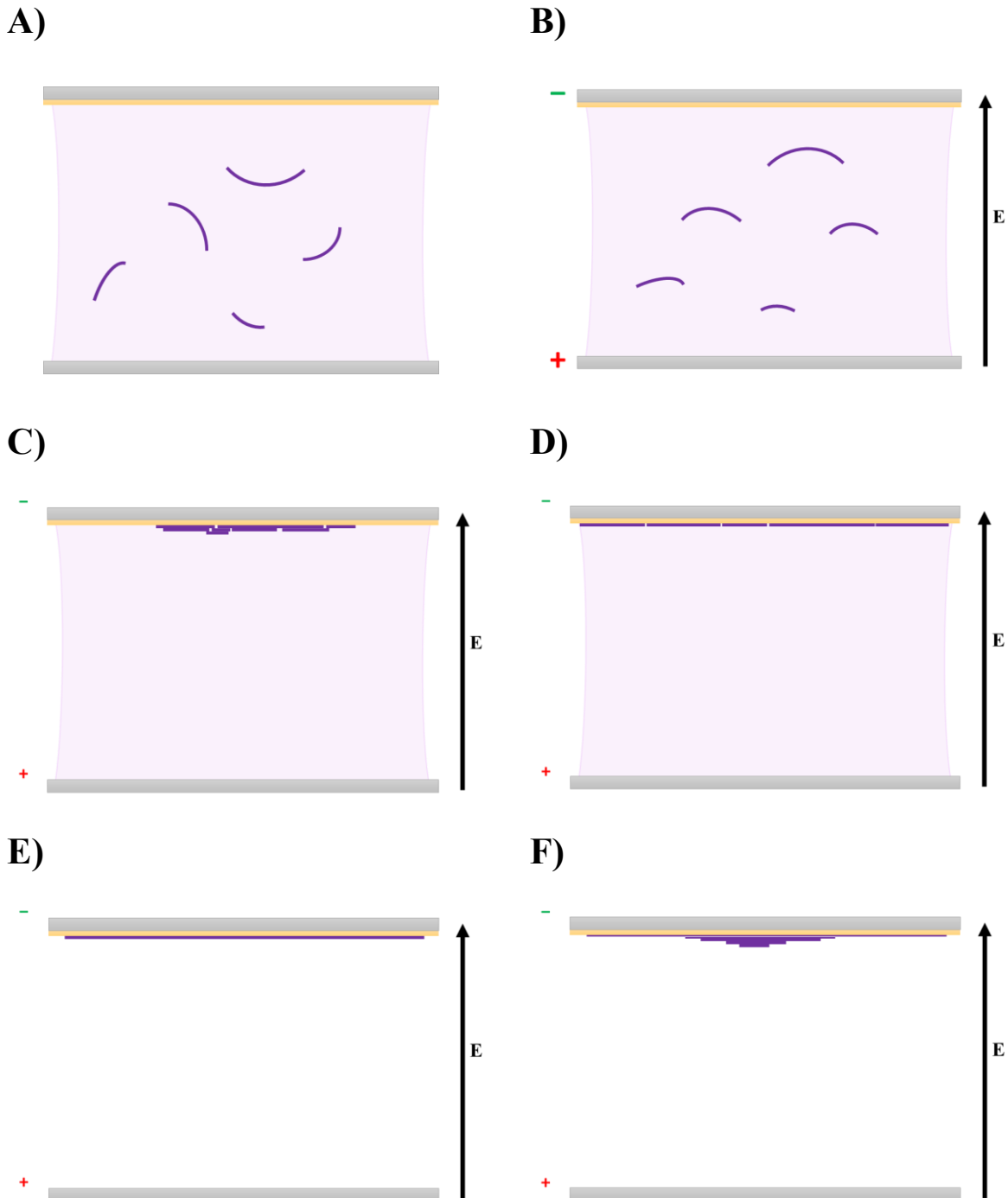


Abbildung 77 – Möglicher Mechanismus der Entstehung großflächiger c-His PM Monolagen. Die c-His PM lag in Lösung vor (A). Durch das elektrische Feld bewegte sich die c-His PM auf das Substrat zu (B) und verteilte sich teilweise auf die freien Stellen im Substrat (C, D). Nachdem der Tropfen abgezogen wurde, fusionierte die c-His PM (E). Bei längerer Trocknungszeit kam es zu Haufenbildung, wobei eine halbe Monolage auf dem Substrat zurückblieb.

5.6. Fazit

Die Abscheidung von WT PM als einzelne Monolage auf dem CL-NPBT-Substrat konnte durch einfache Sedimentation unter keinen Bedingungen erreicht werden. Zwar kam es zu Belegungsraten von 100 %, jedoch stiegen die Anzahl der Lagen mit der Belegungsrate. Bevor freie Stellen auf dem Substrat bedeckt wurden, bildeten sich Cluster. Mittels elektrophoretischer Fusion war es hingegen möglich, eine großflächige quasi-Monolage auf einem Substrat auszubilden, die einheitlich orientiert war. Zwar konnte keine 100 %-ige Bedeckungsrate erreicht werden, die Monolage war aber nahezu geschlossen. C-His PM zeigte hingegen unter bestimmten Bedingungen eine Fusionierung der einzelnen PM-Blätter, was zu großflächigen Monolagen mit eindeutiger Orientierung führte.

5.7. Ausblick

Die quasi-Monolage der WT PM in einem elektrischen Feld ist vielversprechend für eine Großzahl technischer Anwendungen. Zwar traten noch Lücken in der Schicht auf, allerdings könnten diese durch die kontrollierte Bildung weiterer Schichten geschlossen werden. So wäre eine mobile Protonen-Pumpen-Membran denkbar.

Interessant ist außerdem die Fusion der c-His PM. Weitere Untersuchungen zum Bildungsmechanismus, vor allem der kristallinen Umstrukturierung, sowie Feststellung der Beschaffenheit der PM nach der Fusion wären die nächsten Schritte, um die Ausbildung großer Monoflächen zu optimieren. Eine kontrollierte Ausbildung dieser Schichten wäre der optimale Weg, um geschlossene Protonen-Pumpen-Membranen großflächig herzustellen.

6. Referenzen

- [1] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *49*, 57–61.
- [2] IBM, *A Boy and His Atom*, International Business Machines Corporation (IBM), **2013**.
- [3] T. Fujita, H. Nakai, H. Nakatsuji, *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 2410–2417.
- [4] R. A. Wolkow, G. P. Lopinski, D. J. Moffatt, *Surf. Sci.* **1998**, *416*, L1107–L1113.
- [5] D. E. Barlow, L. Scudiero, K. W. Hipps, *Langmuir* **2004**, *20*, 4413–4421.
- [6] J. Repp, G. Meyer, S. M. Stojković, A. Gourdon, C. Joachim, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 26803.
- [7] W.-H. Soe, C. Manzano, A. De Sarkar, N. Chandrasekhar, C. Joachim, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 176102.
- [8] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930–933.
- [9] D. Sarid, R. Coratger, F. Ajustron, J. Beauvillain, *Microsc. Microanal. Microstruct.* **1991**, *2*, 649.
- [10] K. D. Costa, F. C. P. Yin, *J. Biomech. Eng.* **1999**, *121*, 462–471.
- [11] H. K. Wickramasinghe, *Acta Mater.* **2000**, *48*, 347–358.
- [12] A. Majumdar, P. I. Oden, J. P. Carrejo, L. A. Nagahara, J. J. Graham, J. Alexander, *Appl. Phys. Lett.* **1992**, *61*, 2293–2295.
- [13] G. Binnig, C. Gerber, E. Stoll, T. R. Albrecht, C. F. Quate, *Europhys. Lett.* **1987**, *3*, 1281–1286.
- [14] Lord Kelvin, *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1893**, *36*, 331–342.
- [15] C. A. Coulomb, *Collection de Mémoires Relatifs à La Physique*, Gauthier-Villars, **1887**.
- [16] E.-W. Otten, *Repetitorium Exp.* **2009**, DOI 10.1007/978-3-540-85788-4.
- [17] P. W. Atkins, J. de Paula, in *Physical Chem.*, Oxford University Press, **2006**, p. 630.
- [18] W. H. Keesom, *Comm. Leyden* **1828**, *18*, 11–30.
- [19] I. E. Dzyaloshinskii, E. M. Lifshitz, L. P. Pitaevskii, *Sov. Phys. Uspekhi* **1961**, *4*, 153–176.
- [20] M. Born, R. Oppenheimer, *Ann. Phys.* **1927**, *389*, 457–484.
- [21] J.-P. Hansen, I. R. McDonald, *Theory of Simple Liquids: With Applications to Soft Matter*, Academic Press, **2013**.
- [22] G. Mie, *Ann. Phys.* **1903**, *316*, 657–697.
- [23] J. E. Lennard-Jones, *Trans. Faraday Soc.* **1929**, *25*, 668–686.
- [24] J. E. Lennard-Jones, H. H. M. Pike, *Trans. Faraday Soc.* **1934**, *30*, 830–851.
- [25] E. A. Mason, *J. Chem. Phys.* **1954**, *22*, 169–186.
- [26] A. L. Weisenhorn, P. K. Hansma, T. R. Albrecht, C. F. Quate, *Appl. Phys. Lett.* **1989**,

Referenzen

- 54, 2651–2653.
- [27] Z. Sun, M. P. Boneschanscher, I. Swart, D. Vanmaekelbergh, P. Liljeroth, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *106*, 46104.
- [28] B. Pittenger, N. Erina, C. su, *Quantitative Mechanical Property Mapping at the Nanoscale with PeakForce QNM*, **2010**.
- [29] B. Pittenger, in *Nanomechanical Anal. High Perform. Mater.* (Ed.: A. Tiwari), Springer Netherlands, **2014**, pp. 31–51.
- [30] J. L. Hutter, J. Bechhoefer, *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, *64*, 1868–1873.
- [31] R. Hooke, *Lectures de Potentia Restitutiva, Or of Spring Explaining the Power of Springing Bodies*, John Martyn, **1678**.
- [32] S. Belikov, J. Alexander, C. Wall, I. Yermolenko, S. Magonov, I. Malovichko, *Thermal Tune Method for AFM Oscillatory Resonant Imaging in Air and Liquid*, **2014**.
- [33] C. Truesdell, *Essays in the History of Mechanics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1968**.
- [34] R. Brown, *Philos. Mag.* **1828**, *4*, 161–173.
- [35] D. Mende, G. Simon, *Physik: Gleichungen Und Tabellen*, Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, **2016**.
- [36] H.-J. Butt, M. Jaschke, *Nanotechnology* **1995**, *6*, 1–7.
- [37] M.-S. Kim, J.-H. Choi, J.-H. Kim, Y.-K. Park, *Measurement* **2010**, *43*, 520–526.
- [38] S. S. Rekhviashvili, *Tech. Phys. Lett.* **2000**, *26*, 517–519.
- [39] C. Möller, M. Allen, V. Elings, A. Engel, D. J. Müller, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1150–1158.
- [40] P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, et al., *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *64*, 1738–1740.
- [41] F. Moreno-Herrero, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, A. M. Baró, *Phys. Rev. E* **2004**, *69*, 31915.
- [42] R. Abraham, *Leonardo* **1800**, *1400*, 2000.
- [43] M. Nonnenmacher, M. P. O’Boyle, H. K. Wickramasinghe, *Appl. Phys. Lett.* **1991**, *58*, 2921–2923.
- [44] W. J. Gibbs, **1958**.
- [45] G. Žoldák, M. Rief, *BIOspektrum* **2014**, *20*, 33–35.
- [46] B. Cappella, P. Baschieri, C. Frediani, P. Miccoli, C. Ascoli, *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* **1997**, *16*, 58–65.
- [47] T. GGGLLGGGGGG, *Microscope* **1982**, *49*, 57.
- [48] G. Ziegler, J. Heinrich, G. Wötting, *J. Mater. Sci.* **1987**, *22*, 3041–3086.
- [49] A. Lammer, *Mater. Sci. Technol.* **1988**, *4*, 949–955.

- [50] H. Sumiya, N. Toda, S. Satoh, *Diam. Relat. Mater.* **1997**, *6*, 1841–1846.
- [51] J. P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, P. K. Hansma, *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, *64*, 403–405.
- [52] Bruker, “Bruker AFM Probes,” can be found under <https://www.brukerafmprobes.com/p-3611-pdnisp-hs.aspx>, **n.d.**
- [53] D. Fotiadis, S. Scheuring, S. A. Müller, A. Engel, D. J. Müller, *Micron* **2002**, *33*, 385–397.
- [54] J. K. H. Hörber, M. J. Miles, *Science (80-.)*. **2003**, *302*, 1002 LP – 1005.
- [55] D. J. Muller, *Biochemistry* **2008**, *47*, 7986–7998.
- [56] F. Meli, A. Küng, *Meas. Sci. Technol.* **2007**, *18*, 496–502.
- [57] J. J. Roa, G. Oncins, J. Diaz, F. Sanz, M. Segarra, *Recent Pat. Nanotechnol.* **2011**, *5*, 27–36.
- [58] J. J. Roa, G. Oncins, F. T. Dias, V. N. Vieira, J. Schaf, M. Segarra, *Phys. C Supercond.* **2011**, *471*, 544–548.
- [59] D. C. Lin, E. K. Dimitriadis, F. Horkay, *J. Biomech. Eng.* **2006**, *129*, 430–440.
- [60] D. C. Lin, E. K. Dimitriadis, F. Horkay, *J. Biomech. Eng.* **2007**, *129*, 904–912.
- [61] R. Maboudian, R. T. Howe, *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct. Process. Meas. Phenom.* **1997**, *15*, 1–20.
- [62] N. A. De Bruyne, *Aircr. Eng.* **1939**, *18*, 51–54.
- [63] W. A. Zisman, *Ind. Eng. Chem.* **1963**, *55*, 18–38.
- [64] W. A. Zisman, in *Contact Angle, Wettability, Adhes.*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, **1964**, p. 1.
- [65] S. S. Voĩutskĩĩ, *Autohesion and Adhesion of High Polymers*, Wiley, **1963**.
- [66] J. P. Cleveland, B. Anczykowski, A. E. Schmid, V. B. Elings, *Appl. Phys. Lett.* **1998**, *72*, 2613–2615.
- [67] N. A. Burnham, R. J. Colton, *J. Vac. Sci. Technol. A* **1989**, *7*, 2906–2913.
- [68] H.-J. Butt, A. Döppenschmidt, G. Hüttl, E. Müller, O. Vinogradova, *Analysis of Plastic Deformation in Atomic Force Microscopy: Application to Ice*, **2000**.
- [69] J. R. Barber, *Elasticity*, Springer, Dordrecht, **2010**.
- [70] W. D. Callister, D. G. Rethwisch, *Materialwissenschaften Und Werkstofftechnik - Eine Einführung*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2012**.
- [71] H. Hertz, *J. für die reine und Angew. Math. (Crelle’s Journal)* **1882**, *1882*, 156.
- [72] I. N. Sneddon, *Int. J. Eng. Sci.* **1965**, *3*, 47–57.
- [73] G. G. Bilodeau, *J. Appl. Mech* **1992**, *59*, 519–523.
- [74] F. Rico, P. Roca-Cusachs, N. Gavara, R. Farré, M. Rotger, D. Navajas, *Phys. Rev. E* **2005**, *72*, 21914.
- [75] E. Dintwa, E. Tjiskens, H. Ramon, *Granul. Matter* **2008**, *10*, 209–221.

Referenzen

- [76] A. Labuda, M. Kocuń, W. Meinhold, D. Walters, R. Proksch, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2016**, 7, 970–982.
- [77] B. V Derjaguin, V. M. Muller, Y. . Toporov, *J. Colloid Interface Sci.* **1975**, 53, 314–326.
- [78] K. L. Johnson, K. Kendall, A. D. Roberts, *Proc. R. Soc. London* **1971**, 324, 301–313.
- [79] D. Tabor, *J. Colloid Interface Sci.* **1977**, 58, 2–13.
- [80] D. Maugis, *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, 150, 243–269.
- [81] R. Sburlati, *Int. J. Solids Struct.* **2009**, 46, 975–988.
- [82] D. Sohn, H.-S. Won, B. Jang, J.-H. Kim, H.-J. Lee, S. T. Choi, *Int. J. Solids Struct.* **2015**, 71, 244–254.
- [83] G. Stan, G. G. Adams, *Int. J. Solids Struct.* **2016**, 87, 1–10.
- [84] B. Amos, *Nat. Cell Biol.* **2000**, 2, E151.
- [85] A. Bogner, P.-H. Jouneau, G. Thollet, D. Basset, C. Gauthier, *Micron* **2007**, 38, 390–401.
- [86] M. Knoll, E. Ruska, *Zeitschrift für Phys.* **1932**, 78, 318–339.
- [87] L. De Broglie, *Nobel Lect.* **1929**, 12, 244–256.
- [88] R. E. Yeoman, **1937**.
- [89] L. Reimer, *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*, Springer, **2013**.
- [90] H. Busch, *Ann. Phys.* **1926**, 386, 974–993.
- [91] H. Busch, *Arch. für Elektrotechnik* **1927**, 18, 583–594.
- [92] H. Raether, in *Surf. Plasmons Smooth Rough Surfaces Gratings*, Springer, **1988**, pp. 4–39.
- [93] L. Meitner, *Zeitschrift für Phys.* **1922**, 9, 131–144.
- [94] P. Auger, *CR Acad. Sci.(F)* **1923**, 177, 169.
- [95] M. Von Ardenne, *Zeitschrift für Phys.* **1938**, 109, 553–572.
- [96] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, J. R. Michael, N. W. M. Ritchie, J. H. J. Scott, D. C. Joy, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Springer, **2017**.
- [97] G. Litfin, *Technische Optik in Der Praxis*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2005**.
- [98] R. E. Bedford, G. Wyszecski, *JOSA* **1957**, 47, 564_1-565.
- [99] F. W. Campbell, R. W. Gubisch, *J. Physiol.* **1967**, 192, 345–358.
- [100] L. N. Thibos, A. Bradley, D. L. Still, X. Zhang, P. A. Howarth, *Vision Res.* **1990**, 30, 33–49.
- [101] H. von Helmholtz, *Ann. Phys.* **1853**, 165, 211–233.
- [102] H. von Helmholtz, *Ann. Phys.* **1879**, 243, 337–382.
- [103] H. von Helmholtz, *Monatsberichte der Berliner Akad. vom 3. Novemb. 1881*.

- Wissenschaftliche Abhandlungen. Erster Band. 1882, 1, 925–938.*
- [104] O. Stern, *Zeitschrift für Elektrochemie und Angew. Phys. Chemie* **1924**, 30, 508–516.
- [105] B. J. Kirby, E. F. Hasselbrink Jr., *Electrophoresis* **2004**, 25, 187–202.
- [106] R. J. Hunter, R. H. Ottewill, R. L. Rowell, *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*, Elsevier Science, **2013**.
- [107] C. Doppler, *Über Das Farbige Licht Der Doppelsterne Und Einiger Anderer Gestirne Des Himmels*, Calve, **1842**.
- [108] B. Ballot, *Ann. Phys.* **1845**, 142, 321–351.
- [109] D. C. Henry, *Proc. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. Phys. Character* **1931**, 133, 106–129.
- [110] C. G. Sumner, D. C. Henry, *Proc. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. Phys. Character* **1931**, 133, 130–140.
- [111] D. C. Henry, *Trans. Faraday Soc.* **1948**, 44, 1021–1026.
- [112] M. Von Smoluchowski, *Z. Phys.* **1916**, 17, 557–585.
- [113] E. Hückel, in *Ergebnisse Der Exakten Naturwissenschaften*, Springer, **1924**, pp. 199–276.
- [114] V. R. Patel, Y. Agrawal, *Nanosuspension: An Approach to Enhance Solubility of Drugs*, **2011**.
- [115] S. Bhattacharjee, *J. Control. Release* **2016**, 235, 337–351.
- [116] E. Schrödinger, *Ann. Phys.* **1926**, 385, 437–490.
- [117] A. Beer, *Ann. Phys.* **1852**, 162, 78–88.
- [118] N/A, *Gesetz Über Den Verkehr Mit Arzneimitteln*, Bundesrepublik Deutschland, **2018**.
- [119] K. Präbst, H. Engelhardt, S. Ringgeler, H. Hübner, in *Cell Viability Assays*, Springer, **2017**, pp. 1–17.
- [120] F. Yang, R. Riedel, P. del Pino, B. Pelaz, A. H. Said, M. Soliman, S. R. Pinnapireddy, N. Feliu, W. J. Parak, U. Bakowsky, et al., *J. Nanobiotechnology* **2017**, 15, 23.
- [121] S. Arndt, J. Seebach, K. Psathaki, H.-J. Galla, J. Wegener, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 19, 583–594.
- [122] M. N. Hamdan, M. H. F. Dado, *J. Sound Vib.* **1997**, 206, 151–168.
- [123] M. Bartelmann, B. Feuerbacher, T. Krüger, D. Lüst, A. Rebhan, A. Wipf, *Theoretische Physik*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2015**.
- [124] C. Toumey, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 783.
- [125] M. F. Ashby, P. J. S. G. Ferreira, D. L. Schodek, *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design: An Introduction for Engineers and Architects*, **2009**.
- [126] J. W. J. Bergs, M. G. Wacker, S. Hehlhans, A. Piiper, G. Multhoff, C. Roedel, F. Roedel, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Reviews Cancer* **2015**, 1856, 130–143.
- [127] P. Wang, E. Lombi, F.-J. Zhao, P. M. Kopittke, *Trends Plant Sci.* **2016**, 21, 699–712.

Referenzen

- [128] J. Silvestre, N. Silvestre, J. De Brito, *Eur. J. Environ. Civ. Eng.* **2016**, *20*, 455–485.
- [129] R. Prasad, A. Bhattacharyya, Q. D. Nguyen, *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1014.
- [130] R. Dastjerdi, M. Montazer, *Colloids surfaces B Biointerfaces* **2010**, *79*, 5–18.
- [131] R. Misra, S. Acharya, S. K. Sahoo, *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 842–850.
- [132] D. Le Corre, H. Angellier-Coussy, *React. Funct. Polym.* **2014**, *85*, 97–120.
- [133] Z. Hedayatnasab, F. Abnisa, W. M. A. W. Daud, *Mater. Des.* **2017**, *123*, 174–196.
- [134] Y.-W. Mai, Z.-Z. Yu, *Polymer Nanocomposites*, Woodhead Publishing, **2006**.
- [135] M. Norouzi, Y. Zare, P. Kiany, *Polym. Rev.* **2015**, *55*, 531–560.
- [136] R. Chaim, M. Levin, A. Shlayer, C. Estournès, *Adv. Appl. Ceram.* **2008**, *107*, 159–169.
- [137] J. Kim, B. Van der Bruggen, *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 2335–2349.
- [138] E. B. Souto, R. H. Müller, *Int. J. Cosmet. Sci.* **2008**, *30*, 157–165.
- [139] M. Bolzinger, S. Briançon, Y. Chevalier, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2011**, *3*, 463–478.
- [140] L. Calzolari, D. Gilliland, F. Rossi, *Food Addit. Contam. Part A* **2012**, *29*, 1183–1193.
- [141] S. Gajbhiye, S. Sakharwade, *J. Cosmet. Dermatological Sci. Appl.* **2016**, *6*, 48.
- [142] D. Astruc, F. Lu, J. R. Aranzaes, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 7852–7872.
- [143] T. Pradeep, *Thin Solid Films* **2009**, *517*, 6441–6478.
- [144] H. Boulaiz, P. J. Alvarez, A. Ramirez, J. A. Marchal, J. Prados, F. Rodríguez-Serrano, M. Perán, C. Melguizo, A. Aranega, *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 3303–3321.
- [145] R. Bazak, M. Hourri, S. El Achy, S. Kamel, T. Refaat, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2015**, *141*, 769–784.
- [146] K. Haume, S. Rosa, S. Grellet, M. A. Śmiałek, K. T. Butterworth, A. V Solov'yov, K. M. Prise, J. Golding, N. J. Mason, *Cancer Nanotechnol.* **2016**, *7*, 8.
- [147] I. O. for Standardization, **2015**.
- [148] M. J. O'connell, *Carbon Nanotubes: Properties and Applications*, CRC Press, **2006**.
- [149] A. A. Keller, H. Wang, D. Zhou, H. S. Lenihan, G. Cherr, B. J. Cardinale, R. Miller, Z. Ji, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 1962–1967.
- [150] L. Wu, J. Zhang, W. Watanabe, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 456–469.
- [151] M. Sarparanta, L. M. Bimbo, J. Rytönen, E. Mäkilä, T. J. Laaksonen, P. Laaksonen, M. Nyman, J. Salonen, M. B. Linder, J. Hirvonen, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 654–663.
- [152] G. Mie, *Ann. Phys.* **1908**, *330*, 377–445.
- [153] S. Link, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8410–8426.
- [154] A. P. Reverberi, N. T. Kuznetsov, V. P. Meshalkin, M. Salerno, B. Fabiano, *Theor. Found. Chem. Eng.* **2016**, *50*, 59–66.
- [155] A. M. Ealias, M. P. Saravanakumar, in *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2017**, p. 32019.

- [156] G. Sharma, A. Kumar, S. Sharma, M. Naushad, R. P. Dwivedi, Z. A. ALothman, G. T. Mola, *J. King Saud Univ.* **2017**.
- [157] H. M. Fahmy, O. A. Saad, H. A. Rashed, O. E. A. Hessen, K. H. I. Elgamal, M. M. Aboelfetouh, *J. Bionanoscience* **2017**, *11*, 7–16.
- [158] T. J. Merkel, K. P. Herlihy, J. Nunes, R. M. Orgel, J. P. Rolland, J. M. DeSimone, *Langmuir* **2010**, *26*, 13086–13096.
- [159] A. Biswas, I. S. Bayer, A. S. Biris, T. Wang, E. Dervishi, F. Faupel, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, *170*, 2–27.
- [160] V. Pareek, A. Bhargava, R. Gupta, N. Jain, J. Panwar, *Adv. Sci. Eng. Med.* **2017**, *9*, 527–544.
- [161] N. G. Semaltianos, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2010**, *35*, 105–124.
- [162] H.-K. Chan, P. C. L. Kwok, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 406–416.
- [163] A. T. Bell, *Science (80-)*. **2003**, *299*, 1688–1691.
- [164] D. Astruc, *Nanoparticles and Catalysis*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [165] C. Charnay, A. Lee, S.-Q. Man, C. E. Moran, C. Radloff, R. K. Bradley, N. J. Halas, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7327–7333.
- [166] X. Lu, M. Rycenga, S. E. Skrabalak, B. Wiley, Y. Xia, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 167–192.
- [167] M. B. Cortie, A. M. McDonagh, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3713–3735.
- [168] J. Turkevich, *Gold Bull.* **1985**, *18*, 86–91.
- [169] J. Turkevich, *Gold Bull.* **1985**, *18*, 125–131.
- [170] M. Tran, R. DePenning, M. Turner, S. Padalkar, *Mater. Res. Express* **2016**, *3*, 105027.
- [171] K. N. Thakkar, S. S. Mhatre, R. Y. Parikh, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *6*, 257–262.
- [172] G. Benelli, *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *95*, 58–68.
- [173] G. W. Yang, *Prog. Mater. Sci.* **2007**, *52*, 648–698.
- [174] H. Zeng, X. X.-W. Du, S. C. Singh, S. A. Kulinich, S. Yang, J. He, W. Cai, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 1333–1353.
- [175] M. Dell’Aglio, R. Gaudioso, O. De Pascale, A. De Giacomo, M. Dell’Aglio, R. Gaudioso, O. De Pascale, A. De Giacomo, *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *348*, 4–9.
- [176] S. Reich, P. Schönfeld, P. Wagener, A. Letzel, S. Ibrahimkuty, B. Gökce, S. Barcikowski, A. Menzel, T. dos Santos Rolo, A. Plech, et al., *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *489*, 106–113.
- [177] J. Zhang, M. Chaker, D. Ma, *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *489*, 138–149.
- [178] Y. Iida, A. Tsuge, Y. Uwamino, H. Morikawa, T. Ishizuka, *J. Anal. At. Spectrom.* **1991**, *6*, 541–544.
- [179] A. Fojtik, A. Henglein, *Berichte der Bunsen-Gesellschaft* **1993**, *97*, 252–254.

Referenzen

- [180] F. Mafuné, J. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, H. Sawabe, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5114–5120.
- [181] A. Phys, J. Lam, J. Lombard, C. Dujardin, G. Ledoux, S. Merabia, D. Amans, *Appl. Phys. Lett.* **2016**, *108*, 1–6.
- [182] F. Taccogna, M. Dell’Aglío, M. Rutigliano, G. Valenza, A. De Giacomo, *Plasma Sources Sci. Technol.* **2017**, *26*, 45002.
- [183] T. E. Itina, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *115*, 5044–5048.
- [184] S. Ibrahimkuty, P. Wagener, A. Menzel, A. Plech, S. Barcikowski, *Appl. Phys. Lett.* **2012**, *101*, 103104.
- [185] F. Mafuné, J. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, H. Sawabe, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9111–9117.
- [186] A. De Giacomo, M. Dell’Aglío, A. Santagata, R. Gaudio, O. Pascale, P. Wagener, G. Messina, G. Compagnini, S. Barcikowski, *Cavitation Dynamics of Laser Ablation of Bulk and Wire-Shaped Metals in Water during Nanoparticles Production*, **2013**.
- [187] C. L. Sajti, R. Sattari, B. N. Chichkov, S. Barcikowski, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 2421–2427.
- [188] R. Streubel, G. Bendt, B. Gökce, *Nanotechnology* **2016**, *27*, 205602.
- [189] R. Streubel, S. Barcikowski, B. Gökce, *Opt. Lett.* **2016**, *41*, 1486–1489.
- [190] J. Tomko, J. J. Naddeo, R. Jimenez, Y. Tan, M. Steiner, J. M. Fitz-Gerald, D. M. Bubb, S. M. O’Malley, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 16327–16333.
- [191] M. Honda, T. Goto, T. Owashi, A. G. Rozhin, S. Yamaguchi, T. Ito, S. A. Kulinich, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 23628–23637.
- [192] J. Xiao, P. Liu, C. X. Wang, G. W. Yang, *Prog. Mater. Sci.* **2017**, *87*, 140–220.
- [193] N. S. Abadeer, C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 4691–4716.
- [194] V. Amendola, M. Meneghetti, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 3027–3046.
- [195] S. Ibrahimkuty, P. Wagener, T. D. S. Rolo, D. Karpov, A. Menzel, T. Baumbach, S. Barcikowski, A. Plech, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–11.
- [196] V. Amendola, G. A. Rizzi, S. Polizzi, M. Meneghetti, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23125–23128.
- [197] K. Abderrafi, R. García-Calzada, J. F. Sanchez-Royo, V. S. Chirvony, S. Agouram, R. Abargues, R. Ibáñez, J. P. Martínez-Pastor, *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2013**, *46*, 135301.
- [198] H. J. Kim, I. C. Bang, J. Onoe, *Opt. Lasers Eng.* **2009**, *47*, 532–538.
- [199] G. Palazzo, M. Dell’Aglío, G. Valenza, A. De Giacomo, **2017**.
- [200] G. Palazzo, G. Valenza, M. Dell’Aglío, A. De Giacomo, *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *489*, 47–56.
- [201] G. Calixto, J. Bernegossi, L. de Freitas, C. Fontana, M. Chorilli, *Molecules* **2016**, *21*, 342.
- [202] S. Tran, P.-J. DeGiovanni, B. Piel, P. Rai, *Clin. Transl. Med.* **2017**, *6*, 44.

- [203] D. M. Webster, P. Sundaram, M. E. Byrne, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *84*, 1–20.
- [204] M. A. Safwat, G. M. Soliman, D. Sayed, M. A. Attia, *Int. J. Pharm.* **2016**, *513*, 648–658.
- [205] H. Jahangirian, K. Kalantari, Z. Izadiyan, R. Rafiee-Moghaddam, K. Shameli, T. J. Webster, *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 1633.
- [206] H. Daraee, A. Eatemadi, E. Abbasi, S. Fekri Aval, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2016**, *44*, 410–422.
- [207] E. Hemmer, A. Benayas, F. Légaré, F. Vetrone, *Nanoscale Horizons* **2016**, *1*, 168–184.
- [208] C. F. Bohren, D. R. Huffman, Z. Kam, *Nature* **1983**, *306*, 625.
- [209] N. V Nikonorov, A. I. Sidorov, V. A. Tsekhomskii, K. E. Lazareva, *Opt. Spectrosc.* **2009**, *107*, 705.
- [210] N. R. Datta, E. Puric, D. Klingbiel, S. Gomez, S. Bodis, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *94*, 1073–1087.
- [211] J. R. Lepock, H. E. Frey, A. M. Rodahl, J. Kruuv, *J. Cell. Physiol.* **1988**, *137*, 14–24.
- [212] A. J. Welch, M. Motamedi, S. Rastegar, G. L. LeCarpentier, D. Jansen, *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53*, 815–823.
- [213] K. J. Henle, L. A. Dethlefsen, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 1843–1851.
- [214] B. W. Henderson, V. H. Fingar, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 3110–3114.
- [215] S. A. Sapareto, W. C. Dewey, *Int. J. Radiat. Oncol.* **1984**, *10*, 787–800.
- [216] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, H. Riess, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *43*, 33–56.
- [217] G. Hegyi, G. P. Szigeti, A. Szász, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*.
- [218] V. K. Pustovalov, L. G. Astafyeva, W. Fritzsche, *Nano Energy* **2013**, *2*, 1137–1141.
- [219] M. PV Shekhar, *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 613–623.
- [220] D. Jaque, L. Martínez Maestro, B. del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. Martín Rodríguez, J. García Solé, *Nanoscale* **2014**, *6*, 9494–9530.
- [221] S. Eustis, M. A. El-sayed, M. Kasha, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 209–217.
- [222] S. Link, M. A. El-Sayed, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *19*, 409–453.
- [223] H. C. Hulst, H. C. van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles*, Courier Corporation, **1981**.
- [224] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238–7248.
- [225] M. A. Mackey, M. R. K. Ali, L. A. Austin, R. D. Near, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1319–1326.
- [226] B. Jang, Y. S. Kim, Y. Choi, *Small* **2011**, *7*, 265–270.
- [227] P. Huang, P. Rong, J. Lin, W. Li, X. Yan, M. G. Zhang, L. Nie, G. Niu, J. Lu, W.

Referenzen

- Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8307–8313.
- [228] J. Zeng, D. Goldfeld, Y. Xia, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 4169–4173.
- [229] P. Huang, J. Lin, W. Li, P. Rong, Z. Wang, S. Wang, X. Wang, X. Sun, M. Aronova, G. Niu, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 13958–13964.
- [230] G. M. Santos, F. Zhao, J. Zeng, W.-C. Shih, *Nanoscale* **2014**, *6*, 5718–5724.
- [231] J. R. Cole, N. A. Mirin, M. W. Knight, G. P. Goodrich, N. J. Halas, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 12090–12094.
- [232] V. P. Pattani, J. W. Tunnell, *Lasers Surg. Med.* **2012**, *44*, 675–684.
- [233] C. Ayala-Orozco, C. Urban, M. W. Knight, A. S. Urban, O. Neumann, S. W. Bishnoi, S. Mukherjee, A. M. Goodman, H. Charron, T. Mitchell, *ACS Nano* **2014**, *8*, 6372–6381.
- [234] J. Huang, J. Park, W. Wang, C. J. Murphy, D. G. Cahill, *ACS Nano* **2012**, *7*, 589–597.
- [235] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4065–4067.
- [236] B. D. Busbee, S. O. Obare, C. J. Murphy, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 414–416.
- [237] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1870–1901.
- [238] N. Khlebtsov, L. Dykman, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1647–1671.
- [239] B. S. Zolnik, A. Gonzalez-Fernandez, N. Sadrieh, M. A. Dobrovolskaia, *Endocrinology* **2010**, *151*, 458–465.
- [240] J. M. Bergen, H. A. von Recum, T. T. Goodman, A. P. Massey, S. H. Pun, *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 506–516.
- [241] G. Zhang, Z. Yang, W. Lu, R. Zhang, Q. Huang, M. Tian, L. Li, D. Liang, C. Li, *Biomaterials* **2009**, *30*, 1928–1936.
- [242] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Control. release* **2000**, *65*, 271–284.
- [243] R. Goel, N. Shah, R. Visaria, G. F. Paciotti, J. C. Bischof, *Nanomedicine* **2009**, *4*, 401–410.
- [244] L. Wang, Y.-F. Li, L. Zhou, Y. Liu, L. Meng, K. Zhang, X. Wu, L. Zhang, B. Li, C. Chen, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 1105–1114.
- [245] T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome, *J. Control. Release* **2006**, *114*, 343–347.
- [246] B. Kogan, N. Andronova, N. Khlebtsov, B. Khlebtsov, V. Rudoy, O. Dement'eva, E. Sedykh, L. Bannykh, in *NSTI Nanotech 2008, Nanotechnol. Conf. Trade Show, Tech Proc.* **2008**, pp. 65–68.
- [247] T. Niidome, Y. Akiyama, K. Shimoda, T. Kawano, T. Mori, Y. Katayama, Y. Niidome, *Small* **2008**, *4*, 1001–1007.
- [248] N. T. K. Thanh, L. A. W. Green, *Nano Today* **2010**, *5*, 213–230.
- [249] N. Erathodiyil, J. Y. Ying, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 925–935.

- [250] P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 21–23.
- [251] G. Xie, J. Sun, G. Zhong, L. Shi, D. Zhang, *Arch. Toxicol.* **2010**, *84*, 183–190.
- [252] T. Baati, A. Al-Kattan, M.-A. Esteve, L. Njim, Y. Ryabchikov, F. Chaspoul, M. Hammami, M. Sentis, A. V Kabashin, D. Braguer, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25400.
- [253] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424.
- [254] D. B. Benjamin, D. K. Kraywinkel, E. Nowossadeck, I. Schönfeld, A. Starker, A. Wienecke, D. U. Wolf, *Bericht Zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*, Berlin, **2016**.
- [255] A. Bujacz, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 1278–1289.
- [256] A. V. Singh, B. M. Bandgar, M. Kasture, B. L. V. Prasad, M. Sastry, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 5115.
- [257] P. Khullar, V. Singh, A. Mahal, P. N. Dave, S. Thakur, G. Kaur, J. Singh, S. Singh Kamboj, M. Singh Bakshi, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 8834–8843.
- [258] S. Reich, P. Schönfeld, P. Wagener, A. Letzel, S. Ibrahimkutty, B. Gökce, S. Barcikowski, A. Menzel, T. dos Santos Rolo, A. Plech, et al., **2017**, *489*, 106–113.
- [259] T. Radhakrishnan, *Proc. Indian Acad. Sci. - Sect. A* **1952**, *35*, 117.
- [260] H. G. Völz, J. Kischkewitz, P. Woditsch, A. Westerhaus, W.-D. Griebler, M. De Liedekerke, G. Buxbaum, H. Printzen, M. Mansmann, D. Råde, et al., in *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2006**.
- [261] B. P. Lucey, W. A. Nelson-Rees, G. M. Hutchins, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2009**, *133*, 1463–1467.
- [262] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409–1416.
- [263] S. J. Oldenburg, *Light Scattering from Gold Nanoshells*, Rice University, **2000**.
- [264] D. Kumar, B. Meenan, I. Mutreja, R. D'Sa, D. Dixon, *Controlling the Size and Size Distribution of Gold Nanoparticles: A Design of Experiment Study*, **2012**.
- [265] G. Sonavane, K. Tomoda, K. Makino, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, *66*, 274–280.
- [266] F. W. Putnam, *The Plasma Proteins - Structure, Function, and Genetic Control*, Academic Press, **1975**.
- [267] D. Guo, G. Xie, J. Luo, *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2013**, *47*, 13001.
- [268] A. C. Anselmo, M. Zhang, S. Kumar, D. R. Vogus, S. Menegatti, M. E. Helgeson, S. Mitragotri, *ACS Nano* **2015**, *9*, 3169–3177.
- [269] P. Guo, D. Liu, K. Subramanyam, B. Wang, J. Yang, J. Huang, D. T. Auguste, M. A. Moses, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 130.
- [270] Y. Liu, B. Workalemahu, X. Jiang, *Small* **2017**, *13*, 1701815.
- [271] K. A. Beningo, Y. Wang, *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 849 LP – 856.

Referenzen

- [272] S. L. Tao, T. A. Desai, *J. Control. Release* **2005**, *109*, 127–138.
- [273] Q. F. Gu, G. Krauss, W. Steurer, F. Gramm, A. Cervellino, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 45502.
- [274] M. Ramos, L. Ortiz-Jordan, A. Hurtado-Macias, S. Flores, T. J. Elizalde-Galindo, C. Rocha, B. Torres, M. Zarei-Chaleshtori, R. R. Chianelli, *Mater.* **2013**, *6*, DOI 10.3390/ma6010198.
- [275] P. del Pino, F. Yang, B. Pelaz, Q. Zhang, K. Kantner, R. Hartmann, N. Martinez de Baroja, M. Gallego, M. Möller, B. B. Manshian, et al., *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 5483–5487.
- [276] A. C. Anselmo, S. Mitragotri, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *108*, 51–67.
- [277] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* **2005**, *1*, 325–327.
- [278] Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jahnen-Dechent, *Small* **2007**, *3*, DOI 10.1002/sml.200700378.
- [279] I. Fratoddi, I. Venditti, C. Cametti, M. V. Russo, *Nano Res.* **2015**, *8*, 1771–1799.
- [280] W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 145.
- [281] N. Pernodet, X. Fang, Y. Sun, A. Bakhtina, A. Ramakrishnan, J. Sokolov, A. Ulman, M. Rafailovich, *Small* **2006**, *2*, 766–773.
- [282] T. Mironava, M. Hadjiargyrou, M. Simon, V. Jurukovski, M. H. Rafailovich, *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 120–137.
- [283] K. B. Male, B. Lachance, S. Hrapovic, G. Sunahara, J. H. T. Luong, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5487–5493.
- [284] E. Jan, S. J. Byrne, M. Cuddihy, A. M. Davies, Y. Volkov, Y. K. Gun'ko, N. A. Kotov, *ACS Nano* **2008**, *2*, 928–938.
- [285] J. A. Khan, B. Pillai, T. K. Das, Y. Singh, S. Maiti, *Chembiochem* **2007**, *8*, 1237–1240.
- [286] G. Li, D. Li, L. Zhang, J. Zhai, E. Wang, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9868–9873.
- [287] W. Lin, Y. Huang, X.-D. Zhou, Y. Ma, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *217*, 252–259.
- [288] L. A. Dykman, V. A. Bogatyrev, S. Y. Shchegolev, N. G. Khlebtsov, **2008**.
- [289] Y.-Y. Yu, S.-S. Chang, C.-L. Lee, C. R. C. Wang, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 6661–6664.
- [290] W.-. S. Cho, M. Cho, J. Jeong, M. Choi, H.-. Y. Cho, B. S. Han, S. H. Kim, H. O. Kim, Y. T. Lim, B. H. Chung, et al., *Toxicol Appl Pharmacol.* **2009**, *236*, DOI 10.1016/j.taap.2008.12.023.
- [291] A. M. Alkilany, C. J. Murphy, *J. nanoparticle Res.* **2010**, *12*, 2313–2333.
- [292] E. Sadauskas, H. Wallin, M. Stoltenberg, U. Vogel, P. Doering, A. Larsen, G. Danscher, *Part. Fibre Toxicol.* **2007**, *4*, 10.
- [293] J. F. Hillyer, R. M. Albrecht, *Microsc. Microanal.* **1998**, *4*, 481–490.
- [294] J. F. Hillyer, R. M. Albrecht, *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1927–1936.

- [295] A. Y. Pocheptsov, N. I. Mamulaishvili, Z. V Babayeva, Y. I. Velikorodnaya, *T-Press, Moscow* **2009**, 62.
- [296] Y.-S. Chen, Y.-C. Hung, I. Liao, G. S. Huang, *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, 4, 858.
- [297] C. Lasagna-Reeves, D. Gonzalez-Romero, M. A. Barria, I. Olmedo, A. Clos, V. M. S. Ramanujam, A. Urayama, L. Vergara, M. J. Kogan, C. Soto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 393, 649–655.
- [298] O. Bar-Ilan, R. M. Albrecht, V. E. Fako, D. Y. Furgeson, *Small* **2009**, 5, 1897–1910.
- [299] Y. Zhou, Z. Peng, E. S. Seven, R. M. Leblanc, *J. Control. release* **2018**, 270, 290–303.
- [300] G. Oberdörster, Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling, C. Cox, *Inhal. Toxicol.* **2004**, 16, 437–445.
- [301] A. Kander, P. Malanima, P. Warde, *Power to the People: Energy in Europe over the Last Five Centuries*, Princeton University Press, **2015**.
- [302] P. I. der Bundesregierung, “Bundesregierung beschließt Ausstieg aus der Kernkraft bis 2022,” can be found under <https://www.bundesregierung.de/breg-de/suche/bundesregierung-beschliesst-ausstieg-aus-der-kernkraft-bis-2022-457246>, **2019**.
- [303] R. Ashwini, S. Vijayanand, J. Hemapriya, *Curr. Microbiol.* **2017**, 74, 996–1002.
- [304] N. Hampp, D. Oesterhelt, *Protein Sci. Encycl.* **2008**, 146–167.
- [305] W. Stoeckenius, R. Rowen, *J. Cell Biol.* **1967**, 34, 365–393.
- [306] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, in *Methods Enzymol.*, Elsevier, **1974**, pp. 667–678.
- [307] A. E. Blaurock, W. Stoeckenius, *Nat. New Biol.* **1971**, 233, 152–155.
- [308] R. Henderson, P. N. T. Unwin, *Nature* **1975**, 257, 28.
- [309] R. Henderson, J. M. Baldwin, K. H. Downing, J. Lepault, F. Zemlin, *Ultramicroscopy* **1986**, 19, 147–178.
- [310] W. Stoeckenius, *Acc. Chem. Res.* **1980**, 13, 337–344.
- [311] H. Patzelt, B. Simon, A. TerLaak, B. Kessler, R. Kühne, P. Schmieder, D. Oesterhelt, H. Oschkinat, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 9765 LP – 9770.
- [312] C. Bräuchle, N. Hampp, D. Oesterhelt, *Adv. Mater.* **1991**, 3, 420–428.
- [313] J. M. Walter, D. Greenfield, J. Liphardt, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, 21, 265–270.
- [314] B. Mahyad, S. Janfaza, E. S. Hosseini, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, 225, 194–202.
- [315] Y.-T. Li, Y. Tian, H. Tian, T. Tu, G.-Y. Gou, Q. Wang, Y.-C. Qiao, Y. Yang, T.-L. Ren, *Sensors* **2018**, 18, 1368.
- [316] T. Miyasaka, K. Koyama, *Chem. Lett.* **1991**, 20, 1645–1648.
- [317] L. Keszthelyi, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1980**, 598, 429–436.
- [318] I. P. Hohenfeld, A. A. Wegener, M. Engelhard, *FEBS Lett.* **1999**, 442, 198–202.
- [319] J. M. Tour, L. Jones, D. L. Pearson, J. J. S. Lamba, T. P. Burgin, G. M. Whitesides, D. L. Allara, A. N. Parikh, S. Atre, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9529–9534.

Referenzen

- [320] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1170.
- [321] T. Yang, S. Berber, J.-F. Liu, G. P. Miller, D. Tománek, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 124709.
- [322] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Instrumentelle Analytik: Grundlagen-Geräte-Anwendungen*, Springer-Verlag, **2013**.
- [323] Y. Liu, J. Yu, *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 1–19.
- [324] D. K. Schwartz, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52*, 107–137.
- [325] R. F. Debono, G. D. Loucks, D. Della Manna, U. J. Krull, *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 677–688.
- [326] A. Turchanin, A. Götzhäuser, *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 6075–6103.
- [327] J. F. Hainfeld, W. Liu, C. M. R. Halsey, P. Freimuth, R. D. Powell, *J. Struct. Biol.* **1999**, *127*, 185–198.
- [328] R.-P. Baumann, *On the Morphology and Dynamics of Purple Membranes at the Solid-Liquid Junction*, Marburg, **2011**.