

# **Silber-Nanopartikel – Synthese, Stabilität und biologische Wirkungen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften – Doctor rerum naturalium –

vorgelegt von  
Jörg Diendorf

geboren in Duisburg

Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen  
Institut für Anorganische Chemie

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2009 bis April 2012 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Tag der Disputation: 16. Juli 2012

Gutachter: Prof. Dr. Matthias Epple  
Prof. Dr. Christian Mayer  
Vorsitzender: Prof. Dr. Stephan Barcikowski

# Inhalt

1	Einleitung .....	9
2	Theoretische Grundlagen.....	12
2.1	Kolloide.....	12
2.1.1	Einführung.....	12
2.1.2	DLVO-Theorie und die Stabilisierung von Kolloiden.....	13
2.1.3	Alterung von Kolloiden .....	15
2.2	Silber-Nanopartikel.....	16
2.2.1	Allgemeines.....	16
2.2.2	Synthesemöglichkeiten .....	16
2.2.3	Anwendungen von Silber-Nanopartikeln .....	18
3	Geräte und Methoden .....	20
3.1	Rasterelektronenmikroskopie .....	20
3.2	Transmissionselektronenmikroskopie .....	21
3.3	Energiedispersive Röntgenspektroskopie .....	21
3.4	Dynamische Lichtstreuung und Zeta-Potential.....	22
3.5	Analytische Scheibenzentrifugation.....	23
3.6	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> .....	26
3.7	Ultraviolett-spektroskopie .....	28
3.8	Elementaranalyse.....	29
3.9	Atomabsorptionsspektroskopie .....	29
3.10	Röntgenbeugung.....	30
3.11	Lyophilisation.....	32
3.12	Verwendete Geräte .....	33
3.13	Verwendete Chemikalien und Materialien .....	34
4	Experimentelle Durchführung.....	36
4.1	Synthese der Silber-Nanopartikel.....	36

4.1.1	Reduktion mit Glucose .....	36
4.1.2	Reduktion mit Citrat.....	38
4.1.3	Reduktion mit Citrat und Umfunktionalisierung mit TPPTS .....	39
4.1.4	Reduktion mit Citrat und Gerbsäure .....	40
4.1.4.1	Reduktion mit Citrat und Gerbsäure ohne Umfunktionalisierung.....	40
4.1.4.2	Reduktion mit Citrat und Gerbsäure und Umfunktionalisierung mit PVP .....	41
4.1.4.3	Reduktion mit Citrat und Gerbsäure und Umfunktionalisierung mit TPPTS.....	42
4.1.5	Polyol-Prozess .....	43
4.1.5.1	Reduktion mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP.....	43
4.1.5.2	Reduktion mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP .....	44
4.2	Auflösungsuntersuchungen.....	45
4.3	Adsorption von BSA .....	46
4.4	Zellbiologische Untersuchungen .....	47
4.4.1	Zellkultur der humanen mesenchymalen Stammzellen und Inkubation mit Nanopartikeln .....	47
4.4.2	Viabilitätsuntersuchungen und Messung der Cytokin-Freisetzung ....	47
5	Ergebnisse und Diskussion.....	48
5.1	Charakterisierung der Silber-Nanopartikel.....	48
5.1.1	Charakterisierung der mit Glucose reduzierten Silber-Nanopartikel..	48
5.1.2	Charakterisierung der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel .....	62
5.1.3	Charakterisierung der mit Citrat reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel .....	68
5.1.4	Charakterisierung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel .....	73
5.1.5	Charakterisierung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.....	81

5.1.6	Charakterisierung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit den mit PVP und TPPTS umfunktionalisierten Partikeln .....	88
5.1.7	Charakterisierung der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.....	94
5.1.8	Charakterisierung der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel .....	100
5.1.9	Vergleich der verwendeten Messmethoden und Zusammenfassung der Charakterisierung der synthetisierten Silber-Nanopartikel .....	105
5.2	Auflösung von Silber-Nanopartikeln in unterschiedlichen Medien ...	115
5.2.1	Auflösung in Reinstwasser .....	116
5.2.2	Auflösung unter Sauerstoffausschluss .....	118
5.2.3	Auflösung in Sauerstoff-Atmosphäre und unter Zusatz von Wasserstoffperoxid .....	124
5.2.4	Auflösung unter Zusatz von Glucose und Cystein .....	128
5.2.5	Auflösung in Natriumchlorid-Lösung und PBS.....	130
5.2.6	Auflösung von makroskopischem Silber nach unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung in Reinstwasser .....	132
5.2.7	Kinetik der Auflösung .....	138
5.2.8	Zusammenfassung der Auflösungsexperimente .....	140
5.3	Untersuchung der Bildung einer Oberflächenmodifizierung auf Silber-Nanopartikeln durch den Einfluss von Natriumchlorid mittels HR-TEM .....	148
5.4	Konservierung von Silber-Nanopartikeln für die Tiefkühlung und Gefriertrocknung mittels eines Kryoprotektors.....	157
5.4.1	Tiefkühlung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.....	160
5.4.2	Gefriertrocknung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel .....	165

5.4.3	Tiefkühlung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel .....	170
5.4.4	Gefriertrocknung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel .....	174
5.4.5	Tiefkühlung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.....	178
5.4.6	Gefriertrocknung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.....	183
5.4.7	Zusammenfassung der Tiefkühlung und Gefriertrocknung von Silber-Nanopartikeln unter Zusatz von Trehalose als Kryoprotektor ...	188
5.5	Stabilität von Silber-Nanopartikeln in Zellkulturmedien .....	188
5.5.1	Stabilität der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in McCoy's 5A + 10 % FCS.....	189
5.5.2	Stabilität der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in RPMI + 10 % FCS .....	195
5.5.3	Zusammenfassung der Stabilitätsuntersuchungen.....	203
5.6	Adsorption von BSA an Silber-Nanopartikel .....	204
5.6.1	Einfluss von BSA in unterschiedlichen Konzentrationen auf die hydrodynamische Partikelgröße .....	204
5.6.2	Zusammenfassung der Adsorption von BSA an Silber-Nanopartikel .....	216
5.7	Zellbiologische Aktivität von Silber-Nanopartikeln .....	217
5.7.1	Zellbiologische Aktivität der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP bzw. TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel .....	218
5.7.1.1	Einfluss auf die Viabilität von humanen mesenchymalen Stammzellen.....	218
5.7.1.2	Einfluss auf die Cytokin-Freisetzung von humanen mesenchymalen Stammzellen.....	221

5.7.2	Zellbiologische Aktivität der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel .....	223
5.7.2.1	Einfluss auf die Viabilität von humanen mesenchymalen Stammzellen.....	223
5.7.2.2	Aufnahme in Zellen .....	227
5.7.2.3	Einfluss auf die Cytokin-Freisetzung von PBMC .....	231
5.7.3	Zusammenfassung der zellbiologischen Aktivität von Silber-Nanopartikeln.....	232
6	Zusammenfassung.....	234
7	Literaturverzeichnis .....	236
8	Anhang.....	249
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	249
8.2	Publikationsliste.....	250
8.3	Lebenslauf.....	253
8.4	Erklärung .....	254
8.5	Danksagungen .....	255

# 1 Einleitung

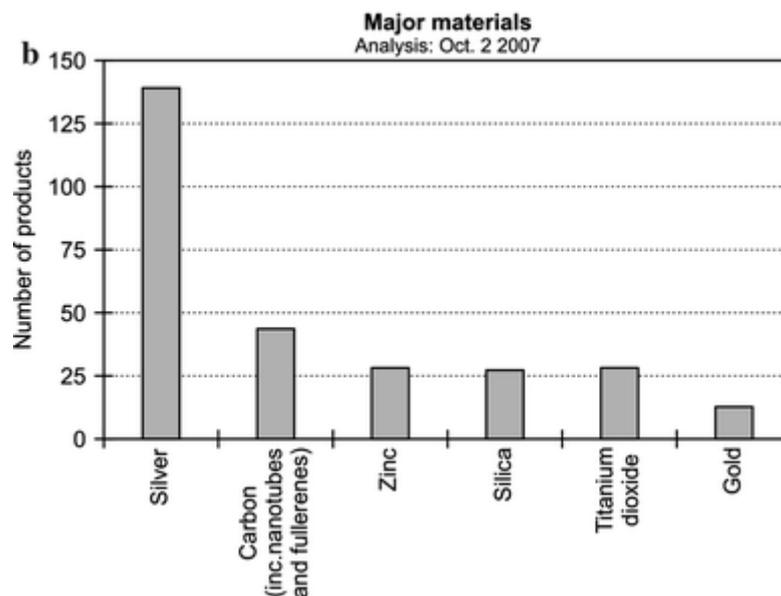
Nanopartikel sind allgegenwärtig und kommen seit langem in der Umwelt vor, beispielsweise in Ruß.<sup>[1]</sup> Auch werden sie schon lange in Gegenständen und Materialien des täglichen Gebrauchs eingesetzt. Schon in der Antike wurde kolloidales Gold zur Rotfärbung von Glas eingesetzt, freilich ohne dass man von der Existenz von Nanopartikeln wusste.<sup>[2]</sup> Die rote Färbung wird durch die Plasmonenresonanz der Gold-Nanopartikel mit einer Größe von 1 nm bis 50 nm verursacht.<sup>[3, 4]</sup> Später wurden diese Nanopartikel gezielt synthetisiert und untersucht und der Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und der Farbe der Gold-Nanopartikel erkannt.<sup>[5, 6]</sup> Seit langem werden Titandioxid- oder Zinkoxid-Nanopartikel industriell in Sonnenschutzmitteln eingesetzt.<sup>[7]</sup> Die Partikel sind dabei so klein, dass sie trotz ihres Reflexionsvermögens für UV-Strahlung in dünner Schicht auf der Haut nicht zu sehen sind.<sup>[8]</sup> Auch in Autoreifen sind Kohlenstoff- und Siliciumdioxid-Nanopartikel enthalten.<sup>[9]</sup>

Neben diesen bereits länger etablierten Anwendungen sind viele weitere mögliche und bereits erfolgreiche Einsatzgebiete für Nanopartikel bekannt oder werden zurzeit erforscht. Flammhemmende Nanopartikel können für die Imprägnierung von Werkstoffen eingesetzt werden,<sup>[10, 11]</sup> in Keramiken können die mechanischen, thermischen und Sintereigenschaften durch den gezielten Einsatz von Nanopartikeln kontrolliert werden.<sup>[12]</sup> Gold- und Silber-Nanopartikel werden in der Biosensorik eingesetzt, um Moleküle, Zellen oder Viren nachzuweisen.<sup>[13-18]</sup> Kohlenstoff-Nanoröhrchen zeigen vielversprechende Eigenschaften bei der Verwirklichung kleinster Halbleiterbauelemente.<sup>[19-21]</sup> Auch Nanopartikel aus Zinkoxid werden als Material für solche Bauteile erforscht.<sup>[22]</sup> Zur Erhöhung des Wirkungsgrades von Solarzellen wird die hohe Beweglichkeit von Elektronen und Ionen in nanopartikulären Materialien ausgenutzt.<sup>[23]</sup> Dabei kommen Nanopartikel aus Titandioxid,<sup>[24-26]</sup> Silicium-Nanopartikel,<sup>[27, 28]</sup>  $\text{CuInS}_2$ <sup>[29]</sup> und  $\text{CdSe}$ <sup>[30, 31]</sup> zum Einsatz.

Das Verhalten von Nanopartikeln in biologischen Systemen und der Umwelt ist bisher jedoch noch ein relativ unerforschtes Gebiet. Ob Nanopartikel generell schädliche Wirkungen auf den menschlichen oder tierischen Organismus oder auf ein Ökosystem haben können, ist in neuerer Zeit, neben den Chancen der neuen Werkstoffe, Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen und öffentlicher Debatten geworden.<sup>[32-35]</sup> Diese Fragestellung steht oftmals noch

exponierter im Fokus des öffentlichen Interesses, wenn über die Perspektiven der Nanotechnologie diskutiert wird, als die möglichen Nutzeffekte.

In dieser Arbeit werden Silber-Nanopartikel, die zu den Nanopartikeln mit der höchsten kommerziellen und industriellen Relevanz gehören (Abbildung 1), untersucht.



**Abbildung 1:** Hauptbestandteile von Nanomaterialien in kommerziellen Produkten im Jahr 2007 (modifizierte Wiedergabe aus<sup>[36]</sup> basierend auf Daten aus<sup>[37]</sup>).

Silber-Nanopartikel werden wegen der antimikrobiellen Eigenschaften des Silbers in zahlreichen Alltagsgegenständen und zu industriellen Zwecken eingesetzt. Dazu zählen Haushaltsgeräte, Funktionskleidung sowie chirurgische Bestecke und Implantate.<sup>[38-40]</sup> Bei vielen Anwendungen der Silber-Nanopartikel ist eine Exposition des Menschen oder der Umwelt mit den Partikeln denkbar. Die Partikel können aus Gegenständen freigesetzt werden und in die Luft oder die Nahrung gelangen und so direkt oder über Umwege wie Abwässer und die Nahrungskette den Weg in den menschlichen Körper finden. Doch was geschieht mit Silber-Nanopartikeln, wenn sie einer biologischen Umgebung oder überhaupt irgendwelchen Umwelteinflüssen außerhalb des chemischen Laboratoriums oder ihrer anderweitigen Produktionsstätte ausgesetzt sind?

Um diese Frage und irgendwann auch den Verbleib der Partikel im Körper oder der Umwelt klären zu können, werden im Rahmen dieser Arbeit Silber-Nanopartikel zunächst auf nasschemischem Wege synthetisiert und umfassend charakterisiert. Zu

den relevanten Eigenschaften von Nanopartikeln in biologischen Umgebungen gehört nicht zuletzt die Stabilität der Partikel in biologischen Medien. Daher wird die kolloidale Stabilität von Silber-Nanopartikeln in entsprechenden Medien untersucht. Auch die Freisetzung von Silber-Ionen aus dispergierten Nanopartikeln wird gemessen, da die Löslichkeit, gerade von fein verteilten, nanopartikulären Stoffen, die in fester oder dispergierter Form dem Körper zugeführt werden, sich unmittelbar und gravierend auf ihr Verhalten und ihre metabolische Aktivität auswirkt.<sup>[41]</sup> Auch zellbiologische Tests mit menschlichen Stammzellen und Blutzellen werden durchgeführt, um die Aufnahme und Auswirkungen von Silber-Nanopartikeln auf Zellen zu untersuchen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Kolloide

#### 2.1.1 Einführung

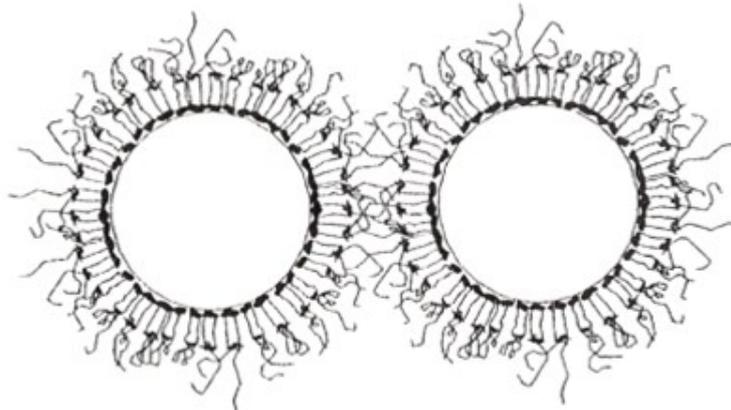
Ein Kolloid ist eine Dispersion sehr kleiner Teilchen eines Stoffes (beispielsweise von Nanopartikeln) in einem anderen Stoff. Charakteristisch für Kolloide ist, dass die dispergierten Teilchen so klein sind, dass sie sich in mancher Hinsicht wie gelöste Moleküle verhalten, zum Beispiel sedimentieren sie nicht. Andererseits haben sie jedoch Eigenschaften diskreter Partikel mit Grenzflächen. Die Kolloidteilchen selber werden als disperse Phase bezeichnet, die umgebende Phase, die die Teilchen aufnimmt, als Dispersionsmittel. Man unterscheidet verschiedene Arten von Kolloiden nach der Art bzw. dem Aggregatzustand der dispergierten Phase und des Dispersionsmittels. Von besonderem Interesse sind Aerosole, die eine Verteilung von flüssigen (Nebel) oder festen (Rauch) dispersen Phasen in einem gasförmigen Dispersionsmittel sind, und so genannte Lyosole. Letztere beinhalten eine flüssige (Emulsion) oder feste (Sol) disperse Phase in einem flüssigen Dispersionsmittel.

Der Durchmesser der suspendierten Teilchen bewegt sich je nach Definition in einer Größenordnung von 1 nm bis 500 nm,<sup>[42]</sup> bzw. 1 nm bis 100 nm,<sup>[43]</sup> d.h. sie sind im Allgemeinen zu klein, um sie mit einem Lichtmikroskop zu beobachten. Die Elektronenmikroskopie mit Auflösungen bis 0,1 nm ist hingegen eine geeignete Methode, um direkt Eigenschaften von kolloidalen Partikeln zu beobachten (z. B. die Form und die Größe). Die Erzeugung von Dispersionen erfolgt entweder durch Aggregation molekularer Teilchen bei chemischen Reaktionen, durch Herabsetzung der Löslichkeit eines Stoffes, oder durch Zerkleinerung fester Stoffe in Gegenwart eines Dispersionsmediums („Kolloidmühlen“).<sup>[44]</sup> Emulsionen werden durch kräftiges Schütteln der zusammengegebenen Komponenten erzeugt, allerdings ist dabei meist die Gegenwart eines Emulgators erforderlich, z. B. von Seifen bzw. Tensiden.

Die Stabilisierung von dispersen Phasen kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Grundsätzlich sind Kolloide wegen ihrer großen Oberfläche gegenüber den entsprechenden Volumenphasen thermodynamisch instabil. Dies bedeutet, dass die Partikel dazu neigen, ihre spezifische Oberfläche durch einen Zusammenlagerungsprozess zu verringern. Die Stabilisierung von Kolloiden ist also die Folge einer kinetischen Hemmung der Koagulation, also der Zusammenlagerung der Kolloidteilchen.

### 2.1.2 DLVO-Theorie und die Stabilisierung von Kolloiden

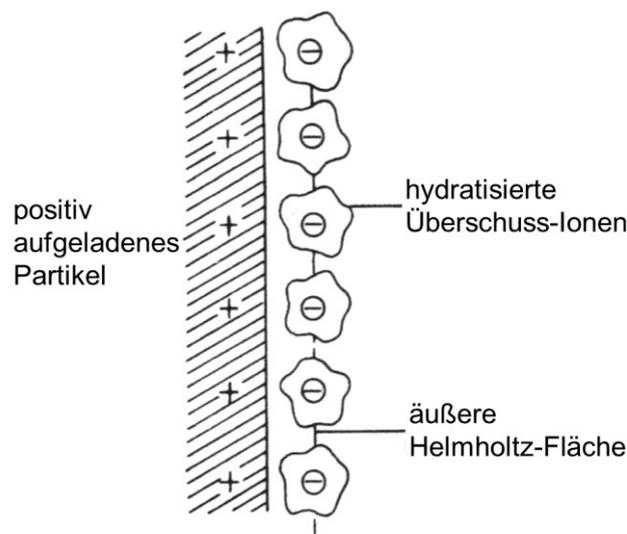
Die DLVO-Theorie, benannt nach den an ihrer Entwicklung beteiligten Forschern Deryagin, Landau, Verwey und Overbeek,<sup>[44]</sup> geht von dem Ansatz aus, dass zwei Arten von Wechselwirkungen zwischen dispersen Teilchen maßgeblich für die Stabilität sind: Zum einen die Van-der-Waals-Wechselwirkung, die zwischen ähnlichen Teilchen anziehend wirkt, zum anderen die elektrostatische Wechselwirkung, die zwischen ähnlichen Teilchen (gleich geladenen Teilchen) abstoßend wirkt. Die elektrostatische Abstoßung muss bei größeren Abständen zwischen den Partikeln stärker sein als die Van-der-Waals-Anziehung, damit die Partikel stabil bleiben. Durch geeignete Maßnahmen kann man diesen Zustand erreichen. Es gibt zwei verschiedene Arten der Stabilisierung von dispersen Teilchen: Bei der sterischen Stabilisierung werden dem Sol Tenside, Polymere oder andere Detergentien zugesetzt. Diese lagern sich als Liganden an die dispergierten Teilchen an und verhindern durch ihren sterisch anspruchsvollen Charakter wie eine Schutzhülle einen Kontakt der dispergierten Phase. Wenn sich zwei derartig geschützte Teilchen nähern und ihre Schutzhüllen sich durchdringen, so ist damit ein Verlust an Beweglichkeit der Schutzteilchen und damit auch ein Entropieverlust verbunden (Abbildung 2). Dies ist thermodynamisch ungünstig.



**Abbildung 2:** Zwei Kolloidteilchen, die durch sterisch anspruchsvolle Liganden-Moleküle stabilisiert sind.<sup>[42]</sup>

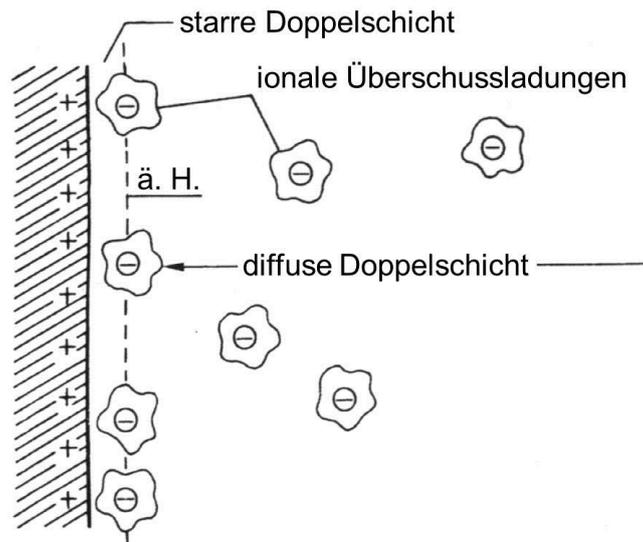
Es ist auch eine elektrostatische Stabilisierung von Kolloiden möglich. Durch Adsorption von Ionen auf der Kolloidteilchenoberfläche bilden sich elektrische Doppelschichten aus. Die daraus folgende Coulombsche Abstoßung zweier solcher Partikel erschwert die Annäherung und somit die Koagulation zweier Partikel in der

Dispersion. Direkt an der Teilchenoberfläche befindet sich eine feste Ionenschicht, deren Radius Scherradius genannt wird. Dieser ist hauptverantwortlich für die Beweglichkeit des Kolloidteilchens. Das elektrische Potential an dieser Kugeloberfläche in Relation zum Potential im Inneren des Lösungsmittels heißt Zetapotential oder elektrokinetisches Potential. Um diese erste Ladungsschicht lagert sich eine bewegliche, diffusere Sphäre von Gegenionen aus dem Dispersionsmittel. Beide Ladungsträgerschichten zusammen werden als elektrische Doppelschicht bezeichnet. Der genauere Aufbau der elektrischen Doppelschicht wurde zuerst durch das Helmholtz-Modell beschrieben (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Starre Doppelschicht nach Helmholtz.<sup>[45]</sup>

Dieses besagt, dass sich die hydratisierten Ionen aus der Lösung an der Oberfläche des Kolloidteilchens anlagern, aber sich durch die Solvathülle in einem gewissen Abstand zur Teilchenoberfläche befinden. Diese so genannte äußere Helmholtz-Schicht ist die Ebene, die durch die Rumpfe der solvatisierten Ionen verläuft. Da das Helmholtz-Modell die thermische Bewegung der Teilchen nicht berücksichtigt, die der starren Anordnung der Ionen um das Kolloidteilchen entgegenwirkt, wurde das Doppelschichtmodell von Gouy und Chapman verfeinert (Abbildung 4).<sup>[46]</sup>



**Abbildung 4:** Überlagerung von starrer Doppelschicht nach Helmholtz und diffuser Doppelschicht nach Gouy-Chapman (ä. H.: äußere Helmholtz-Fläche).<sup>[45]</sup>

Hier wird nun davon ausgegangen, dass sich nicht eine starre Ionenlage um das Kolloidteilchen legt, sondern dass sich eine diffuse Ionenwolke bildet. Dabei nimmt die Konzentration der Ladungsträger und somit auch das Potential gegenüber der Lösung mit steigendem Abstand zum Kolloidteilchen exponentiell ab, während der Potentialverlauf beim Helmholtz-Modell linear sein muss. Die Doppelschicht um das Partikel ist also keine Fläche, sondern eine Raumladungswolke.<sup>[42]</sup> Das Stern-Modell berücksichtigt sowohl den Ansatz nach Helmholtz als auch das Gouy-Chapman-Modell. Es geht von einer starren Helmholtz-Schicht direkt an der Partikeloberfläche aus, an die sich die diffuse Schicht anschließt. Dadurch ergibt sich eine Kombination aus einem linearen und einem exponentiellen Potentialverlauf mit wachsendem Abstand vom Kolloidteilchen.<sup>[42]</sup>

### 2.1.3 Alterung von Kolloiden

Kolloide sind nicht über unbegrenzte Zeit hinweg stabil. Sie neigen dazu, den thermodynamisch ungünstigen Zustand, nämlich dass die Partikel eine große Oberfläche und damit auch eine große Oberflächenenergie besitzen, durch Agglomeration zu verlassen. Dabei trennen sich (im Falle einer fest-in-flüssig-Dispersion) die flüssige und die feste Phase. Dies hängt energetisch mit der Löslichkeit der dispergierten Partikel zusammen, die umso größer ist, je kleiner die Partikel sind. Durch die Agglomeration wird die Partikelgröße vergrößert, sodass die Löslichkeit abnimmt, bis bei der makroskopischen Phase die Löslichkeit am

geringsten ist.<sup>[42]</sup> Wie schnell ein Kolloid altert, es also zur Agglomeration und schließlich zur Ausflockung der dispergierten Partikel kommt, hängt unter anderem von der Löslichkeit der Partikel, der Partikelgröße, der Grenzflächenspannung und der Temperatur ab. Die Agglomeration wird durch beispielsweise durch eine Temperaturerhöhung beschleunigt, weil sie zu einer stärkeren Wärmebewegung (Brownschen Bewegung) der Partikel führt. Dadurch stoßen diese häufiger zusammen, es wird wahrscheinlicher, dass sich zwei Partikel zusammenlagern. Auch ein Zusatz von Elektrolyten kann die Agglomeration erheblich beschleunigen, wenn sie bei einer elektrostatischen Stabilisierung der Partikel die elektrische Doppelschicht zerstört.<sup>[42]</sup>

## **2.2 Silber-Nanopartikel**

### **2.2.1 Allgemeines**

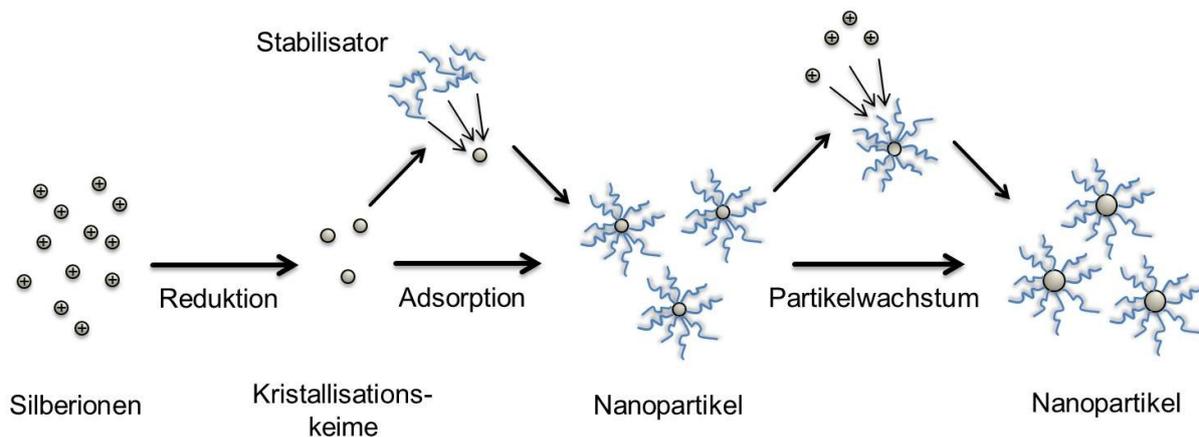
Grundsätzlich ist es schwierig, die Begriffe „Cluster“, „Kolloid“ und Nanopartikel“ voneinander scharf abzugrenzen. Dies wird schon offensichtlich, wenn man sich die abweichenden Definitionen im vorangegangenen Abschnitt ansieht, welche die Größe der dispergierten Teilchen in einer kolloidalen Lösung betreffen. „Nanopartikel“ wird als Überbegriff für Strukturen bis etwa 500 nm verwendet, sowohl für dispergierte, als auch für feste Teilchen. Bis zu einer Größe von ca. 10 nm werden Nanopartikel häufig als Cluster bezeichnet, darüber als Kolloid.<sup>[47]</sup> Ein Kolloid ist jedoch streng genommen eine Dispersion von Nanopartikeln oder Clustern in einem Dispersionsmittel, wie in Kapitel 2.1.1 bereits erwähnt wurde, und kein Begriff für Nanopartikel, die vom Dispersionsmittel abgetrennt wurden. Jedoch werden diese Begriffe in der Literatur häufig synonym gebraucht, sowohl für kolloidale Lösungen als auch für Nanopartikel im Allgemeinen.

### **2.2.2 Synthesemöglichkeiten**

Metallische Nanopartikel lassen sich grundsätzlich auf zwei verschiedene Weisen herstellen. Zum einen kann durch physikalische Methoden ein makroskopisches Metallstück zerkleinert werden (*Top-Down-Prinzip*), bis es den Nanometermaßstab erreicht hat. Hierfür verwendete Methoden sind beispielsweise Laserablation<sup>[48, 49]</sup> und mechanische Mahltechniken.<sup>[50, 51]</sup> Die zweite Möglichkeit, Nanopartikel zu synthetisieren, beruht auf chemischen Methoden, wobei die Partikel nach dem

*Bottom-Up*-Prinzip aus kleineren, atomaren Einheiten aufgebaut werden. Hierbei werden allgemein anorganische oder organische Metallsalze reduziert oder thermisch zersetzt. Zusätzlich können Nanopartikel auch aus der Gasphase abgeschieden werden.<sup>[52, 53]</sup>

Für Silber-Nanopartikel existieren zahlreiche verschiedene publizierte chemische Synthesemethoden. Bei nasschemischen Synthesen, wie sie in dieser Arbeit zur Anwendung kommen, wird ein Silbersalz, häufig Silbernitrat<sup>[54]</sup> oder Silberacetat,<sup>[55]</sup> in einem Lösungsmittel durch ein Reduktionsmittel zu metallischem Silber reduziert. Wenn das Reduktionsmittel nicht gleichzeitig als Stabilisator für die entstehenden Kristallisationskeime bzw. Nanopartikel fungiert, wird im Allgemeinen ein Polymer oder ein anderer Ligand zur kolloidalen Stabilisierung zugesetzt (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Nanopartikel-Synthese mittels nasschemischer Reduktion.

Zunächst wird das ionisch vorliegende Silber durch das Reduktionsmittel zu Kristallisationskeimen reduziert. Diese werden sofort vom vorhandenen Stabilisator umhüllt und wachsen anschließend durch die Anlagerung weiteren Silbers zu Nanopartikeln. Die Form, Größe und Stabilität der Partikel werden von den zugesetzten Stabilisatoren, der Edukt-Konzentration, der Temperatur, der Reaktionszeit und dem pH-Wert bestimmt. So ist es möglich, Silber-Nanopartikel in Form von Kugeln,<sup>[56-58]</sup> Stäbchen,<sup>[59-62]</sup> Drähten,<sup>[63-66]</sup> Würfeln<sup>[67-69]</sup>, Tetraedern<sup>[70]</sup> und Bipyramiden<sup>[71, 72]</sup> zu synthetisieren.

Als Reduktionsmittel werden häufig Natriumcitrat,<sup>[73-75]</sup> Ascorbinsäure,<sup>[76]</sup> Natriumborhydrid,<sup>[77-79]</sup> Zucker,<sup>[80-82]</sup> Hydrazin<sup>[83, 84]</sup> und Alkohole<sup>[85-87]</sup> eingesetzt. Zur letzten Gruppe gehört der sehr verbreitete Polyol-Prozess, bei dem ein Polyol, häufig

Ethylenglycol, zugleich als Lösungsmittel für die Edukte und als Reduktionsmittel für den Silber-Precursor dient.<sup>[88-90]</sup>

Gebräuchliche Stabilisatoren sind Citrat<sup>[91]</sup>, welches häufig gleichzeitig zur Reduktion der Silber-Ionen dient, quartäre Ammoniumverbindungen wie Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB),<sup>[92]</sup> die als klassische Tenside fungieren, und Polymere wie Polyvinylalkohol (PVA)<sup>[93]</sup> und Polyvinylpyrrolidon (PVP).<sup>[94]</sup> Letztgenanntes wird häufig zusammen mit Ethylenglycol im oben erwähnten Polyolprozess eingesetzt.<sup>[95, 96]</sup>

### 2.2.3 Anwendungen von Silber-Nanopartikeln

Die antibakterielle Wirkung von Silber ist seit langem bekannt. Schon im 18. Jahrhundert wurde es in Form von Silbernitrat zur Behandlung von Geschwüren eingesetzt.<sup>[97]</sup> In nanopartikulärer Form wird Silber in neuerer Zeit auf medizinischen Produkten wie Kathetern, orthopädischen Implantaten und Herzklappen aufgebracht.<sup>[98]</sup> Die antibakterielle Aktivität von Silber-Nanopartikeln hängt unter anderem auch von ihrer Form ab.<sup>[99]</sup> Nanokristallines Silber wird auch in Wundauflagen unter anderem zur Abdeckung von Brandwunden verwendet.<sup>[100, 101]</sup> In Salben wird es für die Behandlung von allergischer Kontaktdermatitis untersucht.<sup>[102]</sup> Auch die Anwendung in Filtern zur Reinigung von Trinkwasser von bakteriellen Kontaminationen wird diskutiert.<sup>[103]</sup> In Kleidung, zum Beispiel in Socken, wird nanopartikuläres Silber eingesetzt, um geruchsbildende Bakterien abzutöten.<sup>[104, 105]</sup> Beim Einsatz von Silber-Nanopartikeln zur Abtötung und Bekämpfung von Bakterien muss allerdings beachtet werden, dass in klinischen Studien bereits das Auftreten Silber-resistenter Bakterienstämme beobachtet wurde.<sup>[106]</sup>

Neben der antibakteriellen Wirkung wurden auch eine antivirale<sup>[107]</sup> und eine fungizide<sup>[108]</sup> Wirkung von Silber-Nanopartikeln nachgewiesen. Im Zusammenhang mit der verbreiteten Anwendung von Silber-Nanopartikeln in Gebrauchsgegenständen ist eine Prognose von *Blaser et al.* interessant, in der es 2007 hieß, dass der Anteil von Silber aus solchen Artikeln im Jahr 2010 etwa 15 % der gesamten Silbermenge beträgt, die innerhalb der Europäischen Union in das Abwasser gelangt.<sup>[109]</sup>

Silber-Nanopartikel zeigen eine größen- und formabhängige Oberflächenplasmonenresonanz.<sup>[110, 111]</sup> Dies ermöglicht ihre Anwendung in der Biosensorik.<sup>[112]</sup> In der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie werden Silber-

Nanopartikel neben Gold-Nanopartikeln als Substrat verwendet, um herkömmliche Ramansignale extrem zu verstärken.<sup>[113-115]</sup> Damit ist es möglich, Proteine zu identifizieren,<sup>[116]</sup> die Wechselwirkung von Pharmazeutika mit Proteinen zu untersuchen<sup>[117, 118]</sup> oder DNA bei sehr geringen Konzentration nachzuweisen.<sup>[119]</sup> Silber-Nanopartikel sind auch in der Lage, die Quantenausbeute und die Photostabilität von schwach fluoreszierenden Molekülen zu verbessern (*metal-enhanced fluorescence*).<sup>[120]</sup> Dies bietet zum Beispiel Perspektiven bei der Entwicklung von hochsensitiven Immuntests durch die Verbesserung der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen.<sup>[121]</sup>

## 3 Geräte und Methoden

### 3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Beobachtung kleinster Strukturen, die mit einem Lichtmikroskop nicht mehr aufgelöst werden können, dient ein Rasterelektronenmikroskop (REM, engl. SEM, *scanning electron microscope*). Lichtmikroskope sind durch ihr Funktionsprinzip nur bis zu einer minimalen Größe des betrachteten Objekts von ca. 200 nm verwendbar, was der halben Wellenlänge des sichtbaren Lichts entspricht. Elektronenmikroskope verwenden statt Licht Elektronen, die eine viel kleinere Wellenlänge haben, wodurch Auflösungen bis in den Bereich von 1 nm möglich sind.

Beim Rasterelektronenmikroskop wird die Oberfläche des Untersuchungsobjektes mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgetastet (abgerastert). Die Elektronen werden in einer Glühkathode aus einem hoch schmelzenden Material, z. B. Wolfram, erzeugt und durch eine Hochspannung von mehreren tausend Volt beschleunigt. Ähnlich wie der Lichtstrahl im Lichtmikroskop werden die Elektronen von einem elektromagnetischen Linsensystem fokussiert und auf die Probe gelenkt. Die Probe befindet sich auf einem geeigneten Trägermaterial, beispielsweise einem Silicium-Wafer. Dieser hat neben seiner sehr glatten Oberflächenbeschaffenheit den Vorteil, die auftreffenden Elektronen gut abzuleiten. Letzteres stellt ein Problem bei nichtleitenden Proben dar: Sie laden sich durch den ständigen Beschuss mit Elektronen negativ auf, wodurch sich die Bildqualität stark verschlechtert. Aus diesem Grund werden solche Proben mit einer dünnen Schicht aus Gold, Palladium oder einem anderen Metall bedampft (gesputtert).<sup>[122]</sup>

Die zweite Anforderung an das Untersuchungsobjekt ist die Vakuumfestigkeit. Damit der Elektronenstrahl keiner Wechselwirkung mit den Atomen und Molekülen der Umgebungsluft ausgesetzt ist, wird das Elektronenmikroskop unter Hochvakuum betrieben. Die auf die Probenoberfläche auftreffenden Elektronen werden zum Teil zurückgestreut (Primärelektronen) und setzen zum anderen Teil Elektronen aus der Oberfläche frei (Sekundärelektronen). Je nach der Beschaffenheit der Oberfläche variieren Elektronenausbeute und -streuung, sodass die Elektronen detektiert und die erhaltenen Signale von einem Rechner zu einem Hell-Dunkel-Kontrastbild verarbeitet werden können.<sup>[123, 124]</sup>

### 3.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) verwendet wie das Rasterelektronenmikroskop einen Elektronenstrahl zur Abbildung von Strukturen, für die ein Lichtmikroskop nicht mehr ausreicht. Im Gegensatz zum REM, das die Oberfläche von Materialien abbildet, erhält man einen Einblick in das Innere einer Probe, ähnlich wie bei optischen Durchlichtmikroskopen. Die Elektronen werden durch Glühemission oder Feldemission erzeugt und durch ein elektrisches oder magnetisches Linsensystem fokussiert, beschleunigt und auf die Probe gelenkt. Die Beschleunigungsspannung beträgt üblicherweise zehn bis einige hundert Kilovolt. Aus der angelegten Beschleunigungsspannung ergibt sich über die De-Broglie-Gleichung die Wellenlänge der Elektronenstrahlung (Welle-Teilchen-Dualismus). Die Wellenlänge der beschleunigten Elektronen beträgt beispielsweise bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV 4,2 pm und bei 200 kV nur noch 2,5 pm. Damit erklärt sich das hohe Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops.

Die Elektronen werden durch Wechselwirkung mit den Atomen der Probe elastisch und inelastisch gestreut. Bei elastischer Streuung bleibt die kinetische Energie des gestreuten Elektrons gleich, da die Masse des Atoms, an dem es elastisch gestreut wird, erheblich größer ist. Bei inelastischer Streuung wechselwirken die Elektronen in einer Weise mit der Probe, dass sie verändert wird, sodass sich die Energie der gestreuten Elektronen von der eingestrahelten Elektronen unterscheidet. Die durch die Probe modifizierte Elektronenstrahlung wird durch eine Objektivlinse zu Bildpunkten zusammengesetzt und auf einem Leuchtschirm projiziert, wodurch sich das Abbild der Probe ergibt. Das resultierende Bild kann fotografisch oder elektronisch festgehalten werden. Generell ist die Abbildung von organischen Materialien schwieriger als die von anorganischen Materialien, da der Kontrast mit der Ordnungszahl der enthaltenen Elemente zunimmt.<sup>[125, 126]</sup> Das TEM kann durch eine Manipulation der Objektivlinse auch ein Elektronenbeugungsbild der Kristallstruktur des untersuchten Materials abbilden.<sup>[127]</sup>

### 3.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Der Elektronenstrahl des Elektronenmikroskops kann weiterhin dazu verwendet werden, kleinste Materialbereiche auf ihren Elementgehalt hin zu untersuchen. Diese Methode nennt sich energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX, engl. *energy*

*dispersive X-ray spectroscopy*). Dabei wird ausgenutzt, dass Atome, die mit Elektronen beschossen werden, Röntgenstrahlung emittieren. Durch den Elektronenbeschuss werden Elektronen aus den inneren Schalen der Atome herausgeschlagen. Elektronen aus höheren Schalen, die diese Elektronenlücke auffüllen, geben ihre überschüssige Energie als Röntgenquanten ab. Diese Röntgenstrahlung ist elementspezifisch (charakteristische Röntgenstrahlung). Sie kann detektiert und durch Abgleich mit Datenbanken dem entsprechenden Element zugeordnet werden. Durch den Vergleich von Signalintensitäten kann auf die relative Menge der vorhandenen Elemente geschlossen werden.

### **3.4 Dynamische Lichtstreuung und Zeta-Potential**

Kolloidale Teilchen in einer Dispersion werden ständig von sich in der Lösung thermisch bewegenden Lösungsmittelmolekülen angestoßen. Dies führt zu einer statistischen Bewegung der Teilchen, der so genannten Brownschen Bewegung. Schickt man einen Lichtstrahl durch eine Dispersion, so wird das Licht an den Kolloidteilchen seitlich herausgestreut und man kann den kompletten Verlauf des Strahls durch die Lösung beobachten. Diese Erscheinung wird nach ihrem Entdecker Tyndall-Effekt genannt.

Diese Erscheinung macht man sich bei der Methode der Dynamischen Lichtstreuung (DLS, engl. *dynamic light scattering*) zu Nutze, indem man mit einem Laser Licht durch eine Dispersion strahlt. Das Laserlicht wird an den Kolloidteilchen gestreut und da sich diese bewegen, kommt es je nach der relativen Position der streuenden Teilchen zueinander zu konstruktiven und destruktiven Interferenzen des gestreuten Lichtstrahls. Dies führt zu zeitabhängigen Fluktuationen der Streulichtintensität, die von einem Detektor gemessen werden können. Aus der Korrelation von Zeit und Lichtintensität kann man mit Hilfe einer so genannten Autokorrelationsfunktion die Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen ermitteln, was im Zusammenhang mit der Viskosität des Lösungsmittels wiederum Aufschluss über den Radius der vermessenen Kolloidteilchen gibt.<sup>[42]</sup>

Die Autokorrelationsfunktion hat bei monodispersen Partikeln, d. h. bei einheitlich großen Partikeln in der Dispersion, einen exponentiellen Verlauf. Dieser Verlauf verändert sich mit zunehmender Polydispersität der Partikel. Aus der mathematischen Beschreibung der Funktion wird der Polydispersitätsindex (PDI) ermittelt, der die Größenverteilung der Partikel beschreibt. Im Idealfall eines

monodispersen Kolloids ist der  $PDI = 0$ . Je polydispenser die Partikel sind, desto höher ist der PDI. Bis zu einem Wert von 0,3 kann man von einer monodispersen Größenverteilung der Kolloidteilchen sprechen, ab Werten von 0,5 ist sie als polydispers anzusehen.<sup>[42]</sup>

Die Dynamische Lichtstreuung eignet sich gut zur Größenbestimmung monodisperser Proben. Da die Streulichtintensität allerdings proportional zur sechsten Potenz des Partikeldurchmessers ist, neigt die DLS dazu, den Anteil großer Partikel überzubewerten und damit die mittlere Größe der Partikeln in einer Größenverteilung zu überschätzen.<sup>[128]</sup>

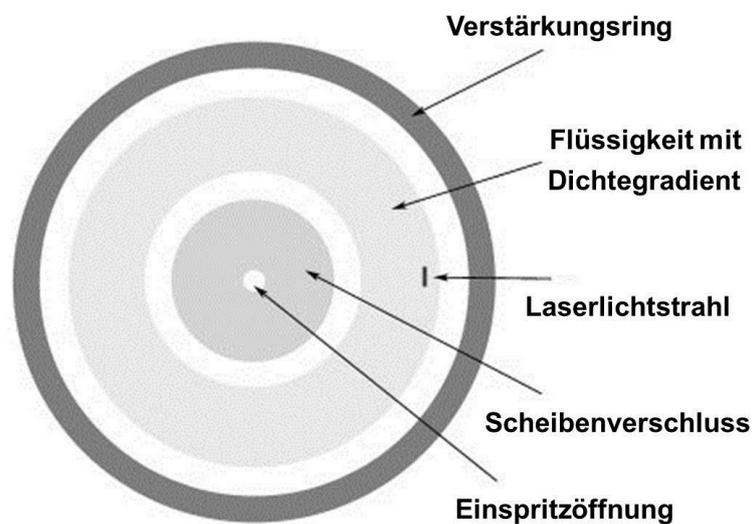
Beim Zeta-Potential handelt sich um das im Vergleich zur Lösungsumgebung auftretende Potential der Abscherschicht bei elektrischen Doppelschichten an Kolloidteilchen (vgl. Kapitel 2.1.2). Dieses sorgt auch bei an sich neutralen Kolloidteilchen dafür, dass sie eine Ladung tragen, was wiederum bedeutet, dass sich die Teilchen in einem angelegten elektrischen Feld bewegen. Die suspendierten Teilchen wandern also entsprechend ihrer Ladung in Richtung einer Elektrode. Dieser Vorgang wird Elektrophorese genannt. Die Wanderungsgeschwindigkeit kann gemessen werden, daraus lassen sich bei Kenntnis der Viskosität des Lösungsmittels und der angelegten elektrischen Feldstärke die Größe eines wandernden Teilchens und die Oberflächenladung bestimmen.<sup>[42, 46]</sup> Das gemessene Zeta-Potential ist ein Kriterium für die elektrostatische Stabilität von Kolloiden. Bei einem Zeta-Potential von weniger als -30 mV oder mehr als +30 mV werden Kolloide als elektrostatisch stabil angesehen.<sup>[129]</sup>

### **3.5 Analytische Scheibenzentrifugation**

Die analytische Scheibenzentrifugation dient zur Größenbestimmung von in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln dispergierter Partikel. Es können Dispersionen von Partikeln im Größenbereich von ca. 5 nm bis 50  $\mu\text{m}$  untersucht werden.

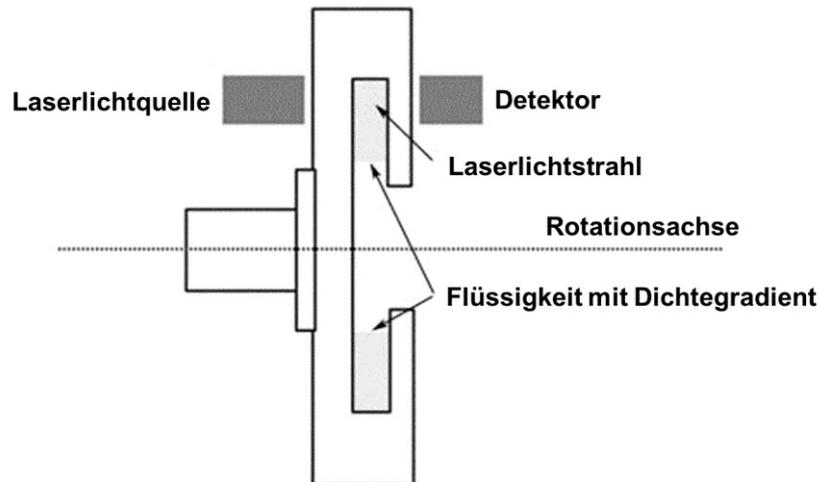
Die Scheibenzentrifuge arbeitet mit der Sedimentation der Partikel nach Stokes. Bei Sedimentationsmethoden wird die Zeit gemessen, die Partikel benötigen, um sich über eine bekannte Strecke hinweg in einem flüssigen Medium abzusetzen. Da die Sedimentationsgeschwindigkeit mit dem Quadrat der Partikelgröße wächst, sind unterschiedlich große Partikel auch bei geringen Größenunterschieden deutlich voneinander unterscheidbar. Unter normalen Bedingungen, also bei einfacher

Erdbeschleunigung (Gravitations-Sedimentation), konkurriert die Sedimentation der Partikel mit der Brownschen Bewegung, wodurch die Sedimentation sehr langsam erfolgt bzw. bei hinreichend kleinen Partikeln gänzlich ausbleibt. Dies ist insbesondere bei Nanopartikeln der Fall, die oftmals kolloidal stabilisiert sind. In der Scheibenzentrifuge wird die Erdbeschleunigung durch die Zentrifugalkraft ersetzt (zentrifugale Sedimentation), indem die zu analysierende Partikeldispersion in eine hohle, rotierende Scheibe gespritzt wird, die mit einer Flüssigkeit gefüllt ist. Den schematischen Aufbau dieser Scheibe zeigt Abbildung 6.<sup>[130]</sup>



**Abbildung 6:** Schematischer Aufbau der rotierenden Scheibe einer Scheibenzentrifuge (Frontalansicht).

Durch die Rotation der Scheibe werden die Partikel zu deren äußerem Rand gedrückt. Dadurch dass alle Partikel gleichzeitig zum Injektionszeitpunkt in der Mitte der Scheibe starten, erreichen Partikel unterschiedlicher Größe zu unterschiedlichen Zeiten den Detektor am Rand der Scheibe. Sie bilden dabei Bänder gleich großer Teilchen, die vom Detektor registriert werden. Den Aufbau der Gesamtapparatur zeigt schematisch Abbildung 7.<sup>[130]</sup>



**Abbildung 7:** Schematischer Aufbau einer Scheibenzentrifuge (Seitenansicht).

Diese Methode der differentiellen Sedimentation erlaubt die Unterscheidung sehr eng zusammenliegender Größenunterschiede der zu analysierenden Partikel. Dies wird durch einen Dichtegradienten der Flüssigkeit in der Scheibe unterstützt, der dafür sorgt, dass die Partikel unterschiedlicher Größe sich weiter auftrennen und nicht gleichzeitig den Detektor erreichen. Der Dichtegradient wird beispielsweise mit unterschiedlich konzentrierten Saccharoselösungen eingestellt. Am Detektor wird die Intensität des Lichts einer monochromatischen Lichtquelle erfasst. Aus der Zeit, die die Partikel zum Erreichen des Detektors benötigen und mit Hilfe der Mie-Theorie kann aus der zeitlich aufgelösten Verminderung der Lichtintensität am Detektor die Partikelgrößenverteilung ermittelt werden.

Den Partikeldurchmesser erhält man nach Formel (1).<sup>[130]</sup>

$$d = \sqrt{\frac{18\eta \cdot \ln \frac{r}{r_0}}{(\rho_P - \rho_F) \cdot \omega^2 \cdot t}} \quad (1)$$

$d$  = Partikeldurchmesser

$\eta$  = Viskosität der Flüssigkeit

$r_0$  = Radius der Scheibe am Beginn der Sedimentationsstrecke (Probeninjektion)

$r$  = Radius der Scheibe am Ende der Sedimentationsstrecke (Detektionspunkt)

$\rho_P$  = Dichte der Partikel

$\rho_F$  = Dichte der Flüssigkeit

$\omega$  = Rotationsgeschwindigkeit der Scheibe

$t$  = Sedimentationszeit der Partikel auf dem Weg von  $r_0$  bis  $r$

Bis auf die Sedimentationszeit  $t$  sind alle Parameter der bei konstanter Rotationsgeschwindigkeit und Temperatur laufenden Scheibe konstant und bekannt. Daher kann man diese Parameter zu einer Konstanten  $K$  zusammenfassen, wodurch sich Formel (1) zu Formel (2) vereinfacht.<sup>[130]</sup>

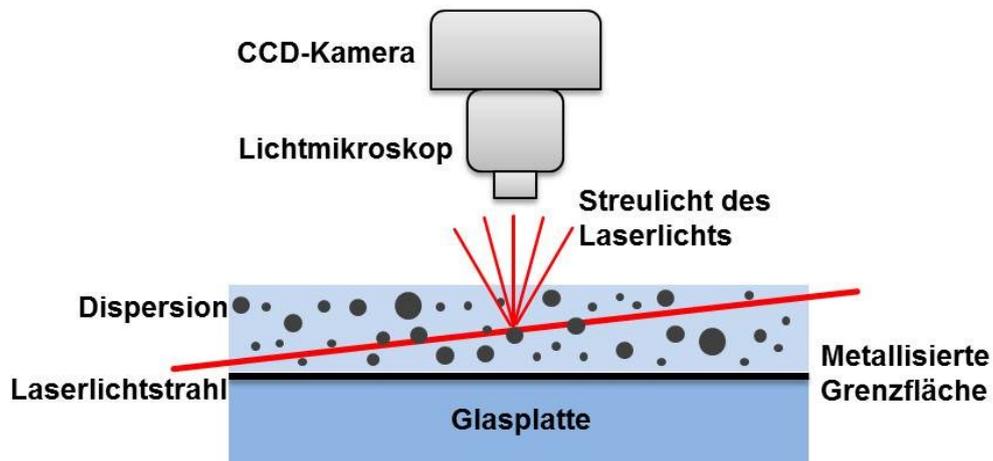
$$d = K \cdot \sqrt{\frac{1}{t}} \quad (2)$$

In der Praxis, wo Schwankungen bei den eigentlich bekannten Parametern auftreten können, oder wenn nicht alle Komponenten von  $K$  bekannt sind, wird mit einem Kalibrationsstandard mit enger Größenverteilung und der dann gemessenen Zeit  $t$  der Wert für  $K$  bestimmt.

### **3.6 Nanoparticle Tracking Analysis**

Mit der *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) können Größenverteilungen von Nanopartikeln in Dispersion gemessen werden. Ähnlich wie bei der Dynamischen Lichtstreuung macht man sich die Brownsche Bewegung der zu untersuchenden Teilchen zu Nutze und wertet die Streuung von Laserlicht an den dispergierten Partikeln aus. Während allerdings bei der Dynamischen Lichtstreuung die Fluktuation

der Lichtstreuungsintensität in der gesamten Probe gemessen wird, werden bei der *Nanoparticle Tracking Analysis* einzelne Partikel in einem kleinen Volumensegment der Probe beobachtet. Die Dispersion befindet sich als dünne Schicht in einer Messkammer, die von einem Laserstrahl durchstrahlt wird (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Schematische Messanordnung bei der *Nanoparticle Tracking Analysis*.

Die Partikel streuen das auf sie treffende Laserlicht seitlich bzw. nach oben aus der Dispersion heraus. Dieses Streulicht kann in Form von Reflexionspunkten durch das Mikroskop direkt beobachtet werden, d.h. die Bewegung der individuellen Partikel wird unmittelbar sichtbar. Die sich bewegenden Streulichtzentren werden von einer an das Mikroskop angeschlossenen CCD-Kamera aufgezeichnet. Aus diesem Video lassen sich die Bewegungen der Partikel mittels einer Software extrahieren. Über die zurückgelegte Wegstrecke pro Zeiteinheit kann dann mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung die Größe der Partikel errechnet werden. Hierfür müssen noch die Temperatur und die Viskosität des Dispersionsmittels bekannt sein.

Mit der *Nanoparticle Tracking Analysis* ist es auch möglich, Partikelkonzentrationen zu bestimmen. Der Bereich der messbaren Partikelgrößen liegt zwischen ca. 10 nm und 1  $\mu\text{m}$ . Die untere Bestimmungsgrenze wird durch die noch mit der CCD-Kamera erfassbare Reflexionsfähigkeit der Partikel bestimmt, wobei nur Partikel aus Materialien mit hohem Brechungsindex wie Gold und Silber bis zur unteren Bestimmungsgrenze messbar sind. Die obere Messgrenze resultiert aus der eingeschränkten Brownschen Bewegung größerer Partikel. Im Gegensatz zur Dynamischen Lichtstreuung können auch polydisperse Proben mit gutem Ergebnis vermessen werden.<sup>[131-133]</sup>

### 3.7 Ultraviolett-spektroskopie

Durch die Bestrahlung eines Teilchens mit elektromagnetischer Strahlung des ultravioletten (200 nm bis 400 nm, UV) oder des sichtbaren Bereiches (400 nm bis 800 nm, Vis) können die Valenzelektronen dieses Teilchens von einem energetischen Grundzustand in einen angeregten und somit energiereicheren Zustand überführt werden. Um ein UV/Vis-Spektrum aufzunehmen, wird ein Lichtstrahl durch die Probe geschickt. Die Wellenlänge wird im erwähnten Bereich kontinuierlich variiert. Das angeregte Elektron fällt nach der Bestrahlung durch spontane oder induzierte Emission in den Grundzustand zurück. Die elektronischen Übergänge werden dann als Absorptionsbanden in Abhängigkeit von der Wellenlänge dargestellt. Für bestimmte funktionelle Gruppen (Chromophore) liegen diese Banden bei charakteristischen Wellenlängen, sodass ihre qualitative Identifikation ermöglicht wird. Durch eine entsprechende Kalibrierung sind auch quantitative Aussagen, z. B. bei Vergleichsmessungen, möglich.

Dabei kommt das Lambert-Beersche Gesetz zur Anwendung, das bei ausreichend niedriger Konzentration  $c$  der untersuchten Substanz und bei der Verwendung monochromatischen Lichts gilt.<sup>[134]</sup>

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3)$$

$E$  = Extinktion

$I_0$  = Intensität des eingestrahnten Lichts

$I$  = Intensität des austretenden Lichts

$\varepsilon$  = substanzspezifischer Extinktionskoeffizient

$c$  = Konzentration

$d$  = Küvettdicke

Dabei ist die Konzentration in  $\text{mol L}^{-1}$  und die Küvetten- bzw. Schichtdicke in cm einzusetzen. Bei der gängigen Küvettdicke von 1 cm vereinfacht sich der Ausdruck zu Formel (4)

$$E = \varepsilon \cdot c \quad (4)$$

Die Konzentration ist also direkt der Extinktion proportional.

### **3.8 Elementaranalyse**

Die Elementaranalyse dient zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel in anorganischen und organischen Verbindungen. Die Probe wird genau eingewogen und katalytisch verbrannt. Die enthaltenen Elemente werden zu ihren Oxiden umgesetzt und die erhaltenen Stickstoffoxide im Gasstrom mittels eines weiteren Katalysators zu molekularem Stickstoff reduziert. Die Auftrennung der Gase erfolgt in einer Chromatographiesäule; als Trägergas dient Helium. Die Detektion kann z. B. mittels Wärmeleitfähigkeitssensoren erfolgen.<sup>[134]</sup>

### **3.9 Atomabsorptionsspektroskopie**

Die Atomabsorptionsspektroskopie dient zur quantitativen Bestimmung einzelner Elemente. Man nutzt dabei die Resonanz-Absorption von Atomen im Grundzustand durch elektromagnetische Strahlung bestimmter Wellenlänge. Die zu untersuchende Probe wird in den gasförmigen Zustand überführt und durch thermische Dissoziation atomisiert, indem sie in gelöster Form in eine Flamme gesprüht wird. Die Atome im Grundzustand absorbieren dann die Resonanzstrahlung, die sie im angeregten Zustand selbst emittieren würden.

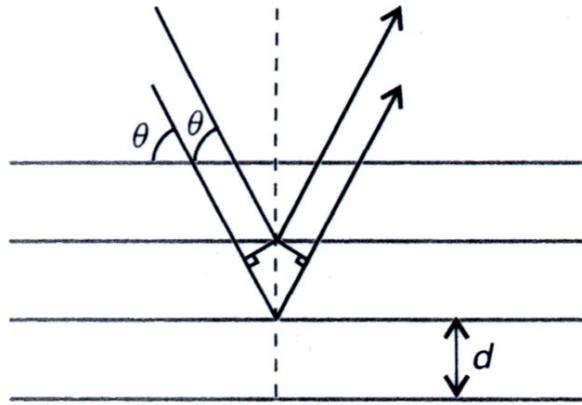
Als Lichtquelle dient eine Hohlkathodenlampe, deren Kathode aus dem zu bestimmenden Element besteht. Zur Messung wird das von der Lampe ausgesandte Licht durch die Flamme geschickt, wo es zum Teil absorbiert wird. Anschließend durchläuft der Lichtstrahl einen Monochromator, der die zur Auswertung benötigte Resonanzstrahlung von der Störstrahlung trennt. Man misst die Schwächung der Lichtintensität durch die Absorption in der Flamme und wertet sie hinsichtlich des Elementgehalts aus.<sup>[134]</sup>

Eine andere Bauform der AAS verwendet ein Graphitrohr statt einer Gasflamme zur Atomisierung der Probe (GF-AAS, Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie). Dabei nutzt man aus, dass Graphit elektrisch leitend ist, und heizt das Rohr durch Anlegen einer Spannung auf. Die Probe, die in das Rohr verbracht wurde, wird zunächst bei niedriger Temperatur getrocknet und dann durch schlagartiges starkes Erhitzen atomisiert. Durch geeignete Aufheizung erreicht man, dass eine

konzentrierte Probenmenge in den Lichtstrahl gelangt, was die Empfindlichkeit gegenüber der normalen AAS steigert. Durch die Aufnahme einer Kalibrierreihe, bei der die gemessenen Intensitäten bekannten Konzentrationen zugeordnet werden, kann dann die Konzentration des Analyten bestimmt werden. Dabei ist gegebenenfalls eine Matrixanpassung vorzunehmen, d. h. Probenbestandteile, die möglicherweise die Bestimmung beeinflussen können, müssen bei der Kalibrierreihe in gleicher Menge zugesetzt werden, um den Effekt dieser Bestandteile auf die Qualität der Messung beurteilen zu können.

### **3.10 Röntgenbeugung**

Die Röntgenbeugung (XRD, engl. *X-Ray Diffraction*) ist eine Analysenmethode für Festkörper. Man erhält durch sie Aussagen über den Aufbau des Festkörpers, namentlich über seine Kristallstruktur. Sie dient häufig zur Identifikation unbekannter Stoffe, zur Strukturaufklärung, zur Bestimmung verschiedener polymorpher Phasen desselben Feststoffes oder auch zur Reinheitskontrolle eines bekannten Stoffes. Bei der Röntgenbeugung wird Röntgenstrahlung auf eine Probe gerichtet und die auftretende Beugung gemessen. Röntgenstrahlung ist eine hochenergetische elektromagnetische Strahlung, deren Wellenlänge von etwa 100 pm ungefähr der Größenordnung der Abstände von Gitterebenen in einem Kristall entspricht. Sie wird durch Beschuss einer Metalloberfläche mit Elektronen erzeugt. Dabei entsteht Bremsstrahlung durch die Abbremsung der Elektronen. Zusätzlich wird eine für das Metall charakteristische Strahlung emittiert, die durch das Herausschlagen von Rumpfelektronen aus einer inneren Schale der Metallatome und deren Rückfall in das Grundniveau entsteht. Bestrahlt man nun einen Kristall mit dieser charakteristischen Röntgenstrahlung, also mit Röntgenstrahlung einer bestimmten Wellenlänge, so wirken die Atome durch ihre regelmäßige Anordnung in den Netzebenen übereinander wie ein dreidimensionales Beugungsgitter (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Reflexion von Röntgenstrahlen an den parallelen Netzebenen.<sup>[46]</sup>

Dadurch, dass die Röntgenstrahlung unterschiedlich lange Wegstrecken zurücklegt, wenn sie entweder von der ersten, der zweiten oder einer anderen Beugungsebene reflektiert wird, kann es zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz der gebeugten Strahlung kommen. Nur wenn sich die Weglängen zweier Strahlen um genau den Abstand der Beugungsebenen oder ein Vielfaches davon unterscheiden, kommt es zu einer konstruktiven Interferenz, was bedeutet, dass man einen Beugungsreflex beobachtet. In allen anderen Fällen löschen sich die Röntgenstrahlen durch destruktive Interferenz gegenseitig aus. Dadurch entsteht ein Punktmuster aus Beugungsreflexen, woraus sich Informationen über den Abstand der Gitterebenen gewinnen lassen. Mathematisch lässt sich die Bedingung für eine konstruktive Interferenz mit Hilfe der Bragg'schen Gleichung ausdrücken:

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (5)$$

$n$  = Beugungsordnung

$\lambda$  = Wellenlänge

$d$  = Netzebenenabstand

$\theta$  = Beugungswinkel

Sie verknüpft den Abstand  $d$  der parallelen Netzebenen mit der Wellenlänge  $\lambda$  der verwendeten Röntgenstrahlung und dem Beugungswinkel  $\theta$  (Bragg'scher Winkel oder Glanzwinkel), unter dem die Röntgenstrahlen von dem Kristall reflektiert werden. In der Gleichung ist die Wellenlänge bekannt, der Winkel wird gemessen,  $n$  ist die Beugungsordnung, also die Größe des Gangunterschiedes durch Beugung an

unterschiedlichen Netzebenen. Man erhält also durch entsprechende mathematische Umformungen den Netzebenenabstand  $d$ , über den man letztlich an die zu Grunde liegende Kristallstruktur gelangt.

### 3.11 Lyophilisation

Zur Konservierung empfindlicher Proben, bedient man sich der Lyophilisation oder Gefriertrocknung. Dabei ist zum einen vorteilhaft, den Wassergehalt der Substanzen zu verringern, um die Haltbarkeit zu verlängern und zum anderen das Material in eine lager- und transportfähige Form zu überführen. Ebenso eignet sich diese Methode, um aus flüssigen Phasen in schonender Weise Feststoffe zu generieren, beispielsweise aus Dispersionen pulverförmige Proben zu gewinnen.

Die zu trocknenden Proben werden eingefroren, um das zu entfernende Wasser zu immobilisieren und Schaumbildung beim folgenden Anlegen des Vakuums zu vermeiden. Bei Dispersionen bietet sich eine Schockgefrierung an, wobei die Proben schlagartig durch Behandlung mit flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Dies verhindert, dass Dispersionsbestandteile ausfrieren oder ausfallen.

Nach dem Einfrieren der Probe erfolgt der eigentliche Trocknungsvorgang. Er besteht aus zwei Phasen. Zunächst erfolgt das primäre Trocknen, bei dem durch das Anlegen eines Vakuums und bei ausreichend niedriger Temperatur die Sublimation des enthaltenden Eises erfolgt. Das Wasser geht also direkt vom festen Zustand in die Gasphase über. Dies ist möglich, weil Eis einen relativ hohen Dampfdruck besitzt. Daran schließt sich die sekundäre Trocknung an, bei der durch weiter erniedrigten Druck und leicht erhöhte Temperatur die Restfeuchte aus dem Material entfernt wird. Um Dispersionen von Nanopartikeln zu lyophilisieren, ist es möglich und erforderlich, einen Kryoprotektor zuzusetzen, der eine Agglomeration der Partikel beim Trocknungsprozess verhindert und damit die Redispergierbarkeit nach der Lyophilisation gewährleistet. Gängige Kryoprotektoren sind Zucker wie Trehalose oder Saccharose, die beim Gefriertrocknen eine Matrix bilden, in der die Partikel eingebettet sind.<sup>[135, 136]</sup>

### 3.12 Verwendete Geräte

Sofern nicht anders angegeben, sind die nachfolgend aufgeführten Geräte verwendet worden:

AAS	Thermo Electron Corporation M-Serie Perkin-Elmer 4110ZL
Elementaranalyse	CE Instruments EA 1110
EDX	Ametek EDAX Genesis Serie ISIS EDX System, Oxford Instruments
Fluoreszenzmikroskop	Olympus MVX10
<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	NanoSight LM 14-HS
Nanosizer (DLS, Zeta-Potential)	Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN 3600
pH-Meter	Hannah Instruments HI 991001
REM	FEI ESEM Quanta 400 FEG FEI Quanta 200 3D
Reinstwasser-Generator	Elga Purelab Ultra Bioscience
Sauerstoff-Messgerät	WTW Oxi3250 mit CelloX 325-Sonde
Scheibenzentrifuge	CPS Instr. Disc Centrifuge DC 24000
TEM	Philips CM 200 FEG Tecnai F20 (HR-TEM) JEOL JEM-3000 F (HR-TEM)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 510
Ultrazentrifuge	Thermo Electron Corporation Sorvall WX Ultra Series;

Ultrazentrifugenrotor:	Type 70 Ti
UV-Vis-Spektrometer	Varian Cary 300 Bio
Zentrifugen	Heraeus Labofuge 300
	Thermo Scientific/Heraeus Fresco 21
	Heraeus Labofuge 300

### 3.13 Verwendete Chemikalien und Materialien

BSA	Fraktion V, proteasefrei, lyophilisiert,  $M_r = 67000 \text{ g mol}^{-1}$ , Serva
Calcein-Acetoxymethylester	Calbiochem
<i>R</i> (+)-Cystein	zur Synthese, Merck-Schuchardt
Dialysemembrane	Celluloseester, MWCO 100000 u, Spectrum Spectra/Por
FITC-BSA	Sigma
FCS	GIBCO Invitrogen
Gerbsäure	95 %, $M = 1701,23 \text{ g mol}^{-1}$ , Acros
D(+)-Glucose, wasserfrei	for microbiology, $\geq 99 \%$ , Fluka
Glutaraldehyd	Fluka
hMSC	Cambrex BioScience, Wakerswill Inc.
McCoy's 5A	GIBCO Invitrogen
Natriumchlorid	suprapur, AnalaR
Natriumhydroxid	Normapur, AnalaR
Natronlauge	p. A., AppliChem
PBS	GIBCO Invitrogen

Polyvinylpyrrolidon K30	purum, mittlere Molmasse: 40000, Fluka
Reinstwasser	18,2 MΩ·cm, Elga Purelab Ultra Bioscience
RPMI	GIBCO, Invitrogen
Salpetersäure	65 % p. a., J. T. Baker
Silberbarren	Feingehalt 999, Masse 1 oz (eine Feinunze), Leipziger Edelmetallverarbeitung, Espenhain
Silbernitrat	p.a., ≥ 99,9 %, Roth
Trinatriumcitrat-Dihydrat	purum, ≥ 99 %, Fluka
Tris(natrium- <i>m</i> -sulfonatophenyl)- phosphan-Hydrat, Natriumsalz	10 % bis 15 % Oxid, Strem Chemicals
Ultrazentrifugenröhrchen	26,6 mL, Polycarbonat, Beckman
Wasserstoffperoxid	Sigma, unstabilisiert

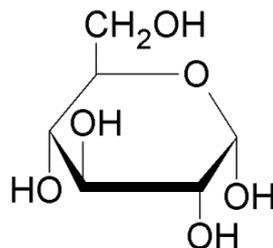
## 4 Experimentelle Durchführung

### 4.1 Synthese der Silber-Nanopartikel

Alle Geräte wurden vor der Verwendung mit halbkonzentrierter Salpetersäure gespült, um anhaftende Silberreste zu lösen. Anschließend wurde mehrmals mit Reinstwasser gespült, um gelöste Silberreste und andere Verunreinigungen zu entfernen.

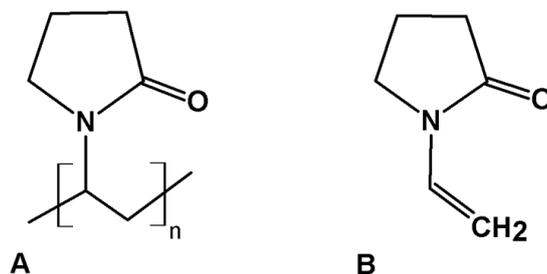
#### 4.1.1 Reduktion mit Glucose

Bei dieser Synthese wird das ionisch in Form eines Silbersalzes vorliegende Silber im wässrigen Medium bei erhöhter Temperatur reduziert.<sup>[137, 138]</sup> Als Reduktionsmittel dient Glucose (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Haworth-Strukturformel von D-(+)-Glucose.

Die kolloidale Stabilisierung und Größenkontrolle der entstehenden Nanopartikel wird durch das Polymer Polyvinylpyrrolidon (PVP, Abbildung 11) gewährleistet. Das hier verwendete PVP hat eine mittlere Molmasse von  $40000 \text{ g mol}^{-1}$ .



**Abbildung 11:** Lewis-Strukturformeln des Polymers PVP (A) und dessen Monomereinheit Vinylpyrrolidon (B).

PVP koordiniert mit den Stickstoff-Atomen an die sich bildenden Silber-Nanopartikel (und bei größeren Partikeln ab einem Durchmesser von 500 nm zusätzlich auch mit den Sauerstoffatomen) und kontrolliert so das Partikelwachstum.<sup>[139]</sup>

2 g Glucose (11,10 mmol) und 1 g Polyvinylpyrrolidon (8,99 mmol bezogen auf die molare Masse des Monomers;  $M_w = 40000 \text{ g mol}^{-1}$ ) werden in 40 mL Reinstwasser gelöst und unter Rühren in einem Erlenmeyerkolben im Wasserbad auf 90 °C erhitzt. Der Kolben wird mit einem Uhrglas abgedeckt, um Verdampfungsverluste zu minimieren. 0,5 g Silbernitrat (2,94 mmol) werden in 2 mL Reinstwasser gelöst und unter kräftigem Rühren schnell zu der heißen Lösung von Glucose und PVP gegeben. Die Reaktionslösung wird für 60 min auf der Reaktionstemperatur von 90 °C gehalten und anschließend mit einem Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Reaktion zu beenden. Während der Erhitzung verändert sich die Farbe der Reaktionslösung von farblos über gelb und grün nach braun und zuletzt grau.

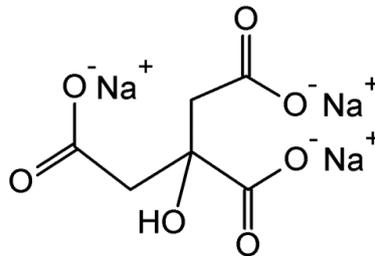
Die Partikel werden zur Reinigung wie folgt ultrazentrifugiert, um überschüssige Edukte und Nebenprodukte der Reaktion zu entfernen.

Die Dispersion wird zunächst in Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat überführt, eventuell verbleibendes Restvolumen in den Röhrchen mit Reinstwasser aufgefüllt und die Partikel dann bei 29400 g ( $20000 \text{ U min}^{-1}$ ) für 20 min abzentrifugiert. Der klare Überstand über den sedimentierten Partikeln wird mit einer Pipette abgesogen. Die im Zentrifugenröhrchen verbleibenden Nanopartikel werden unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbads in Reinstwasser redispergiert. Die Zentrifugenröhrchen werden wieder mit Reinstwasser aufgefüllt und die Dispersion erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Reinigungsschritt wird anschließend noch einmal wiederholt. Zuletzt werden die Partikel in Reinstwasser redispergiert. Hierfür ist gegebenenfalls entgastes und anschließend mit Argon gesättigtes Reinstwasser zu verwenden, um eine Freisetzung von Silberionen aus den Partikeln während der Lagerung zu vermeiden.

Die Nanopartikel werden mittels Rasterelektronenmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie, Energiedispersiver Röntgenspektroskopie, Dynamischer Lichtstreuung, *Nanoparticle Tracking Analysis* und analytischer Scheibenzentrifugation charakterisiert, die Silberkonzentration in der Dispersion wird mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

#### 4.1.2 Reduktion mit Citrat

Bei dieser Synthese dient Trinatriumcitrat (Abbildung 12) in wässriger Lösung sowohl als Reduktionsmittel während der Synthese als auch als kolloidaler Stabilisator der Nanopartikel.<sup>[140]</sup>



**Abbildung 12:** Lewis-Strukturformel von Trinatriumcitrat.

34 mg Silbernitrat (0,20 mmol) werden in 203 mL Reinstwasser gelöst und die Lösung in einem Erlenmeyerkolben unter Rühren zum Sieden erhitzt. 0,206 g Trinatriumcitrat-Dihydrat (0,7 mmol) werden in 20 mL Reinstwasser gelöst und schnell unter starkem Rühren zu der siedenden Silbernitratlösung gegeben. Der Kolben wird zur Vermeidung von Verdampfungsverlusten mit einem Uhrglas abgedeckt. Die Reaktionslösung färbt sich während des Kochens langsam gelb. Sie wird so lange weiter zum Sieden erhitzt, bis sich eine satte goldgelbe Farbe eingestellt hat. Dann wird die Dispersion sofort unter Rühren im Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Reaktion zu unterbrechen. Dabei dunkelt die Farbe leicht nach.

Die Partikel werden zur Reinigung ultrazentrifugiert, um überschüssige Edukte und Nebenprodukte der Reaktion zu entfernen.

Die Dispersion wird in Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat überführt, eventuell vorhandenes Restvolumen in den Röhrchen mit Reinstwasser aufgefüllt und die Nanopartikel bei 29400 g (20000 U min<sup>-1</sup>) für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, und die zurückbleibenden Partikel werden mit Hilfe eines Ultraschallbads in Reinstwasser redispergiert.

Die Nanopartikel werden mittels Rasterelektronenmikroskopie, Dynamischer Lichtstreuung, *Nanoparticle Tracking Analysis*, analytischer Scheibenzentrifugation und UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert, die Silberkonzentration in der Dispersion wird mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

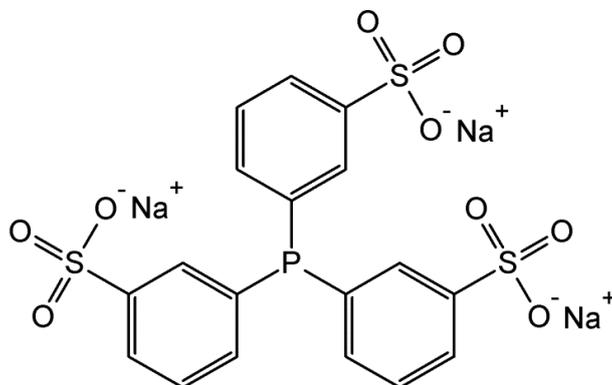
#### 4.1.3 Reduktion mit Citrat und Umfunktionalisierung mit TPPTS

34 mg Silbernitrat (0,20 mmol) werden in 203 mL Reinstwasser gelöst und die Lösung in einem Erlenmeyerkolben unter Rühren zum Sieden erhitzt. In 20 mL Reinstwasser werden 0,206 g Trinatriumcitrat-Dihydrat (0,7 mmol) gelöst und schnell und unter starkem Rühren zu der siedenden Silbernitratlösung hinzugegeben. Zur Verringerung von Verdampfungsverlusten wird der Kolben mit einem Uhrglas abgedeckt. Die Reaktionslösung färbt sich während des Kochens langsam gelb. Es wird so lange weiter zum Sieden erhitzt, bis sich eine goldgelbe Farbe eingestellt hat. Dann wird die Dispersion sofort im Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine Weiterreaktion zu verhindern.

Zur Umfunktionalisierung der Partikel werden zu der abgekühlten Dispersion unter Rühren 40 mg Tris(natrium-*m*-sulfonatophenyl)phosphan (TPPTS, Abbildung 13) gelöst in 10 mL Reinstwasser zugegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Die Partikel werden nach der Umfunktionalisierung zur Reinigung ultrazentrifugiert. Die Dispersion wird in Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat überführt, eventuell vorhandenes Restvolumen in den Röhrchen mit Reinstwasser aufgefüllt und die Nanopartikel bei 29400 g ( $20000 \text{ U min}^{-1}$ ) für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und die zurückbleibenden Partikel werden mit Hilfe eines Ultraschallbads in Reinstwasser redispersiert.

Die Nanopartikel werden mittels Rasterelektronenmikroskopie, analytischer Scheibenzentrifugation und UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert.



**Abbildung 13:** Lewis-Strukturformel von Tris(natrium-*m*-sulfonatophenyl)phosphan (TPPTS).

#### 4.1.4 Reduktion mit Citrat und Gerbsäure

Bei dieser Synthese wird zusätzlich zum reduzierend wirkenden Citrat Gerbsäure (Tannin, Abbildung 14) zugesetzt. Dadurch ist es möglich, die Größe der erhaltenen Nanopartikel erheblich zu verringern.<sup>[141]</sup> Nach der Reduktion können die Nanopartikel zur Erzielung einer höheren kolloidalen Stabilität mit PVP oder TPPTS umfunktionalisiert werden.

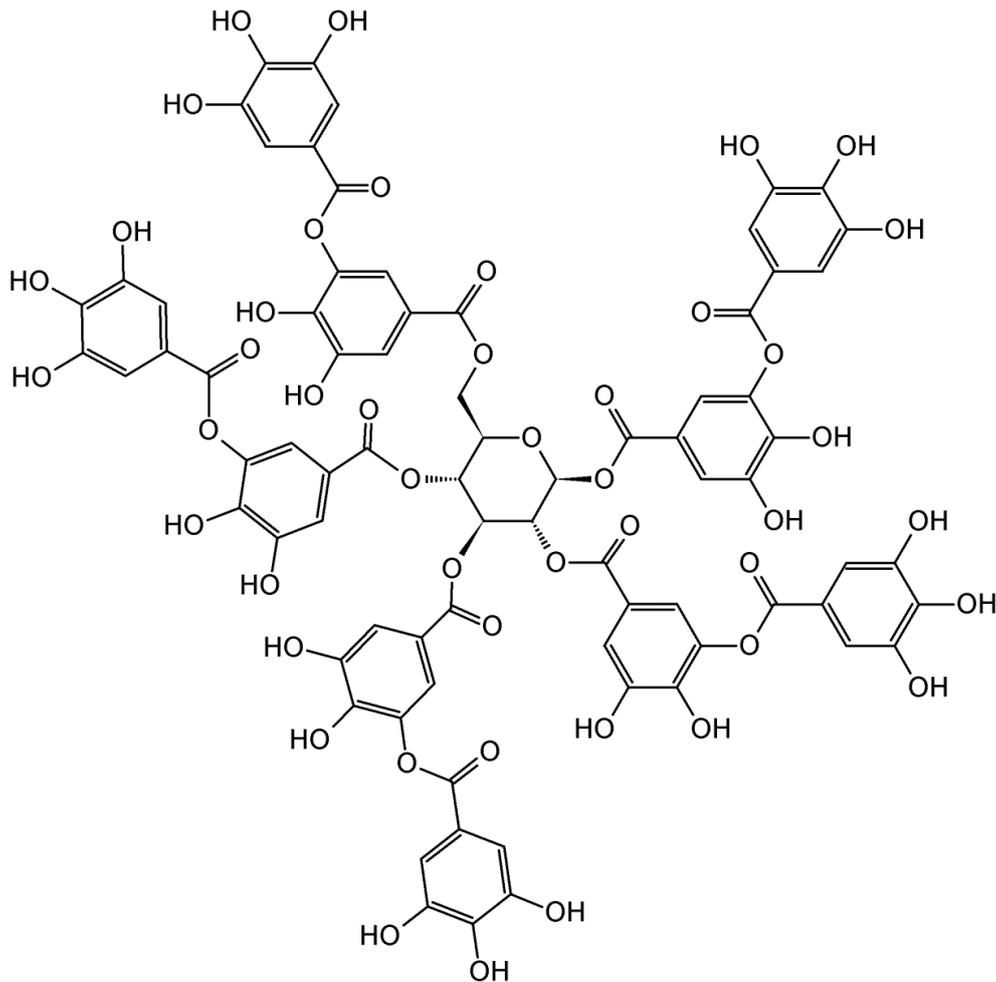


Abbildung 14: Lewis-Strukturformel von Gerbsäure (Tannin).

##### 4.1.4.1 Reduktion mit Citrat und Gerbsäure ohne Umfunktionalisierung

15,75 mg Silbernitrat (0,093 mmol, entspricht 10 mg Silber) werden in 180 mL Reinstwasser gelöst und in einem 250 mL fassenden Becherglas zum Sieden erhitzt. Das Becherglas wird mit einem Uhrglas abgedeckt, um Verdampfungsverluste zu vermeiden. Es werden einzelne Lösungen der Reduktionsmittel Trinatriumcitrat und Gerbsäure angesetzt. Dazu werden 100 mg Trinatriumcitrat-Dihydrat (0,34 mmol) und 25 mg (0,015 mmol) Gerbsäure in jeweils 5 mL Reinstwasser gelöst. Diese

beiden Lösungen werden unmittelbar vor der Zugabe zu der Silbernitratlösung gemischt und dann schnell und unter starkem Rühren zu der siedenden Silbernitratlösung gegeben. Die Reaktionslösung wird für 5 min weiter zum Sieden erhitzt und dann mit einem Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach der Zugabe der Reduktionsmittel wird die Lösung unmittelbar gelblich, und die Farbe intensiviert sich innerhalb weniger Sekunden. Am Ende der Reaktionszeit ist das Reaktionsgemisch gelb-orange.

Die Nanopartikel werden durch Ultrazentrifugation gereinigt. Dafür wird die abgekühlte Dispersion in Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat überführt, eventuell vorhandenes freies Volumen in den Röhrchen mit Reinstwasser aufgefüllt und die Partikel für 20 min bei 29400 g ( $20000 \text{ U min}^{-1}$ ) abzentrifugiert. Der Überstand über den sedimentierten Partikeln wird abpipettiert und verworfen, die Partikel in Reinstwasser redispergiert und die Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wiederholt. Anschließend werden die Partikel in Reinstwasser redispergiert.

Die Nanopartikel werden mittels Rasterelektronenmikroskopie, energiedispersiver Röntgenspektroskopie, UV/Vis-Spektroskopie und analytischer Scheibenzentrifugation charakterisiert.

#### **4.1.4.2 Reduktion mit Citrat und Gerbsäure und Umfunktionalisierung mit PVP**

15,75 mg Silbernitrat (0,093 mmol, entspricht 10 mg Silber) werden in 180 mL Reinstwasser gelöst und in einem 250 mL fassenden Becherglas zum Sieden erhitzt. Um Verdampfungsverluste zu vermeiden, wird das Becherglas mit einem Uhrglas abgedeckt. Es werden einzeln Lösungen der Reduktionsmittel Trinatriumcitrat und Gerbsäure angesetzt. Dazu werden 100 mg Trinatriumcitrat-Dihydrat (0,34 mmol) und 25 mg (0,015 mmol) Gerbsäure in jeweils 5 mL Reinstwasser gelöst. Diese beiden Lösungen werden unmittelbar vor der Zugabe zu der Silbernitratlösung gemischt und dann schnell und unter starkem Rühren zu der siedenden Silbernitratlösung gegeben. Die Reaktionslösung wird für 5 min weiter zum Sieden erhitzt und dann mit einem Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach der Zugabe der Reduktionsmittel wird die Lösung unmittelbar gelblich, und die Farbe intensiviert sich innerhalb weniger Sekunden. Am Ende der Reaktionszeit ist das Reaktionsgemisch gelb-orange.

Nach dem Abkühlen werden 60 mg Polyvinylpyrrolidon (0,54 mmol bezogen auf die molare Masse des Monomers;  $M_w = 40000 \text{ g mol}^{-1}$ ) in 5 mL Wasser gelöst und zu der Dispersion gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.

Anschließend werden die mit PVP umfunktionalisierten Nanopartikel mittels Ultrazentrifugation gereinigt. Hierfür wird die Dispersion in Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat überführt, freies Restvolumen in den Röhrchen mit Reinstwasser aufgefüllt und die Partikel bei 29400 g ( $20000 \text{ U min}^{-1}$ ) für 20 min abzentrifugiert. Der schwach gelb gefärbte Überstand mit den überschüssigen Edukten und den Nebenprodukten der Reaktion wird mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Die abzentrifugierten Partikel werden mit Hilfe eines Ultraschallbads in Reinstwasser redispersiert und die Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wiederholt. Schließlich werden die Partikel in Reinstwasser dispersiert.

Die Nanopartikel werden mittels Rasterelektronenmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie, *Nanoparticle Tracking Analysis*, UV/Vis-Spektroskopie, Energiedispersiver Röntgenspektroskopie und analytischer Scheibenzentrifugation charakterisiert, die Silberkonzentration in der Dispersion wird mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

#### **4.1.4.3 Reduktion mit Citrat und Gerbsäure und Umfunktionalisierung mit TPPTS**

15,75 mg Silbernitrat (0,093 mmol, entspricht 10 mg Silber) werden in 180 mL Reinstwasser gelöst und in einem 250 mL fassenden, mit einem Uhrglas abgedeckten Becherglas zum Sieden erhitzt. 100 mg Trinatriumcitrat-Dihydrat (0,34 mmol) und 25 mg Gerbsäure (0,015 mmol) werden in jeweils 5 mL Reinstwasser gelöst. Beide Lösungen werden unmittelbar vor der Zugabe zur Silbernitratlösung vermischt und dann schnell und unter starkem Rühren zu der siedenden Silbernitratlösung gegeben. Das Gemisch wird für 5 min weiter zum Sieden erhitzt und dann in einem Eisbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Die Lösung wird direkt nach der Zugabe der Reduktionsmittel gelb, und die Farbe intensiviert sich während der Reaktion zu gelborange.

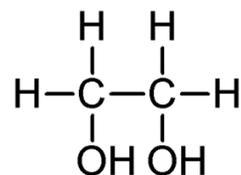
Nach dem Abkühlen werden 30 mg TPPTS (0,053 mmol) gelöst in 5 mL Reinstwasser zu der Dispersion gegeben und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Die Isolierung der Nanopartikel erfolgt durch Ultrazentrifugation. Dazu wird die Dispersion in Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat überführt, das eventuell vorhandene freie Volumen mit Reinstwasser aufgefüllt und die Partikel bei 29400 g (20000 U min<sup>-1</sup>) für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pipette abgesaugt und die Partikel in Reinstwasser redispersiert. Die Zentrifugation wird zur weiteren Reinigung der Partikel noch einmal bei gleichen Bedingungen durchgeführt, und die Partikel werden anschließend in Reinstwasser redispersiert.

Die Nanopartikel werden mittels Rasterelektronenmikroskopie, *Nanoparticle Tracking Analysis*, UV/Vis-Spektroskopie, energiedispersiver Röntgenspektroskopie und analytischer Scheibenzentrifugation charakterisiert, die Silberkonzentration in der Dispersion wird mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

#### 4.1.5 Polyol-Prozess

Beim Polyol-Prozess dient ein Polyol, in diesem Fall Ethylenglycol (Abbildung 15), sowohl als Lösungsmittel für die Edukte und Dispersionsmittel für die entstehenden Nanopartikel, als auch als Reduktionsmittel für das Silbersalz. Die synthetisierten Nanopartikel werden mit dem Polymer Polyvinylpyrrolidon stabilisiert.<sup>[142]</sup>



**Abbildung 15:** Lewis-Strukturformel von Ethylenglycol (Ethan-1,2-diol).

##### 4.1.5.1 Reduktion mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP

In einem 50 mL fassenden Zweihals-Rundkolben mit Rückflusskühler werden 63,8 mg Polyvinylpyrrolidon (0,57 mmol bezogen auf die molare Masse des Monomers;  $M_w = 55000 \text{ g mol}^{-1}$ ) mit 20 mL Ethylenglycol (Ethan-1,2-diol) versetzt. Das Gemisch wird mit einem Ölbad unter kräftigem Rühren auf 100 °C erhitzt. Nach Erreichen dieser Temperatur werden 1,27 mL einer 40 %-igen Lösung von Silbernitrat in Reinstwasser (3 mmol) schnell zugegeben. Das Gemisch wird für 30 min unter starkem Rühren weiter bei 100 °C gehalten und dann sofort mit einem Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Direkt nach der Zugabe der Silbernitrat-

Lösung tritt eine schwache Gelbfärbung auf, die sich im weiteren Verlauf der Reaktion zu einem orangenen Farbton intensiviert.

Die Dispersion wird mittels Ultrazentrifugation gereinigt. Dazu wird sie mit Aceton auf das doppelte Volumen verdünnt und in Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen überführt. Die Dispersion wird bei 66000 g ( $30000 \text{ U min}^{-1}$ ) für 30 min zentrifugiert. Der Überstand über den sedimentierten Partikeln wird mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Die Partikel werden in Reinstwasser redispergiert und zur weiteren Reinigung nochmal bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zuletzt werden die Partikel in Reinstwasser redispergiert.

Die Charakterisierung der Nanopartikel erfolgt mittels Dynamischer Lichtstreuung, analytischer Scheibenzentrifugation, Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie.

#### **4.1.5.2 Reduktion mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP**

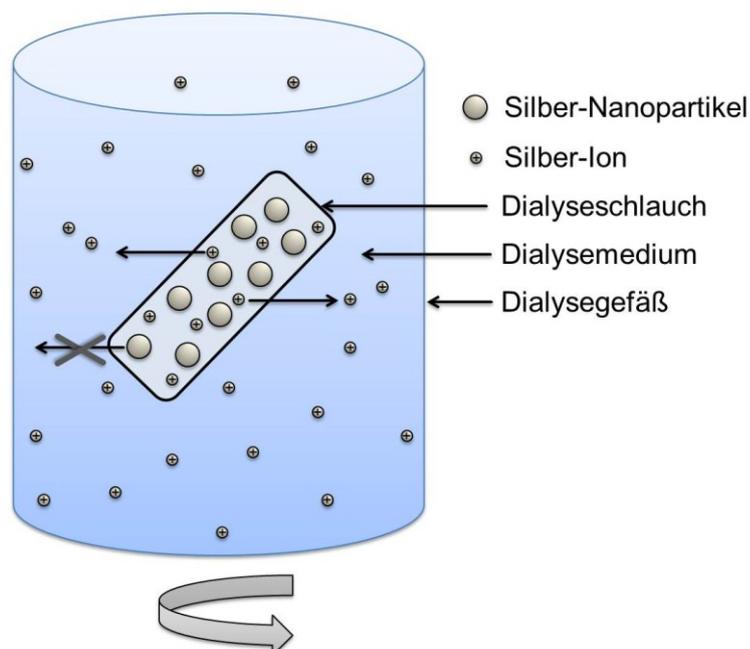
In einem 50 mL fassenden Zweihalsrundkolben mit Rückflusskühler werden 638 mg Polyvinylpyrrolidon (5,74 mmol bezogen auf die molare Masse des Monomers;  $M_w = 55000 \text{ g mol}^{-1}$ ) mit 20 mL Ethylenglycol versetzt. Das Gemisch wird in einem Ölbad unter Rühren auf 50 °C erhitzt, bis sich das Polymer vollständig gelöst hat. Dann wird die Lösung auf 100 °C erhitzt und für 30 min bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend werden 1,27 mL einer 40 %-igen Lösung von Silbernitrat in Reinstwasser (3 mmol) schnell zugegeben und das Gemisch für weitere 30 min unter starkem Rühren auf einer Temperatur von 100 °C gehalten. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Gemisch sofort mit einem Eisbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Nach der Zugabe der Silbernitrat-Lösung wird das Reaktionsgemisch zunächst eine schwach gelbe Farbe, die sich im Laufe der Reaktion zu einem gelb-orangen Farbton intensiviert.

Die Reinigung der Nanopartikel erfolgt durch Ultrazentrifugation. Die Dispersion wird mit Aceton auf das doppelte Volumen aufgefüllt und in Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen überführt. Die Dispersion wird bei 66000 g ( $30000 \text{ U min}^{-1}$ ) für 40 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt und verworfen. Die sedimentierten Nanopartikel werden in Reinstwasser redispergiert und erneut bei 66000 g ( $30000 \text{ U min}^{-1}$ ) für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen und die Partikel in Reinstwasser redispergiert.

Die Charakterisierung der Nanopartikel erfolgt mittels Dynamischer Lichtstreuung, analytischer Scheibenzentrifugation, Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie.

## 4.2 Auflösungsuntersuchungen

Die Auflösung bzw. die Freisetzung von Silberionen aus dispergierten Silber-Nanopartikeln wurde mittels Dialyse untersucht. Dazu wurde die Silber-Konzentration der verwendeten Nanopartikel-Dispersion mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt und die Dispersion in einen Dialyseschlauch aus Celluloseester gefüllt. Der Dialyseschlauch wurde mit Kunststoffklammern an beiden Enden verschlossen, außen von einer möglicherweise vorhandenen Kontamination mit Silber-Nanopartikeln mittels Reinstwasser gereinigt und in das verwendete Dialysemedium gebracht. Das Dialysemedium befand sich dabei entweder in einem 500 mL fassenden Polypropylen-Weithalsgefäß mit Schraubverschluss oder (im Falle von Dialysen unter einer bestimmten, definierten Atmosphäre) in einem 500 mL bis 1000 mL fassenden Stickstoffkolben mit Schliffstopfen. Die Dispersion wurde mittels eines Magnetrührstabes kontinuierlich und langsam gerührt. Den Versuchsaufbau zeigt schematisch Abbildung 16.



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung eines Auflösungsversuchs mittels Dialyse.

Die Nanopartikel werden von der Dialysemembran aufgehalten, während die aus ihnen freigesetzten Ionen ungehindert durch sie hindurch diffundieren können. In regelmäßigen Abständen wurden Proben des Dialysemediums außerhalb des Dialyseschlauches entnommen und mittels Flammen- oder Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie auf den Silbergehalt hin untersucht. Diese Methode zur Untersuchung der Auflösung wurde in früheren Arbeiten bereits validiert, und es wurde gezeigt, dass die Silber-Nanopartikel die Dialysemembran nicht passieren können.<sup>[143, 144]</sup>

### 4.3 Adsorption von BSA

Zur Untersuchung des Einflusses der BSA-Adsorption auf den hydrodynamischen Durchmesser von Nanopartikeln wurden Lösungen von Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) mit den Massenkonzentrationen  $0,01 \text{ g L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$ , und  $10 \text{ g L}^{-1}$  in Reinstwasser angesetzt. Zu diesen BSA-Lösungen wurde jeweils eine Dispersion der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel gegeben. Dabei wurde eine Silberkonzentration von  $61,25 \text{ mg L}^{-1}$  eingestellt. Die Dispersionen wurden nach der Zugabe abgedeckt und für 12 h gerührt, um eine Gleichgewichtseinstellung bei der Adsorption sicherzustellen. Anschließend wurden die Nanopartikel abzentrifugiert (60 min bei  $4000 \text{ U min}^{-1}$ ). Die abgetrennten Partikel wurden redispergiert und unter den gleichen Bedingungen noch einmal gewaschen. Die Größencharakterisierung erfolgte nach der Redispergierung in Reinstwasser in verdünnter Form mittels Dynamischer Lichtstreuung, Zeta-Potential-Messung und analytischer Scheibenzentrifugation (durchgeführt von Sabrina Berger im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit).

Zur Bestimmung des Adsorptionsverhaltens wurde BSA verwendet, das mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) fluoreszenzmarkiert war (FITC-BSA). Von diesem wurden Lösungen in Reinstwasser hergestellt, das mit Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,5 gebracht worden war. Die FITC-BSA-Konzentrationen waren  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $300 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Zu diesen Lösungen wurden Silber-Nanopartikel in einer Konzentration von  $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  zugegeben. Insgesamt wurde jeder Ansatz durch entsprechende Einstellung der Konzentrationen der Stammlösungen auf ein Gesamtvolumen von 1 mL gebracht. Nach Umschütteln wurden die Nanopartikel in den FITC-BSA-Lösungen für 20 h stehen gelassen. Anschließend wurden die Nanopartikel abzentrifugiert (60 min bei

20000 g) und der Überstand mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibriergeraden, die mit reinen FITC-BSA-Lösungen in dem auf pH = 7,5 eingestellten Wasser erstellt wurde.

## **4.4 Zellbiologische Untersuchungen**

### **4.4.1 Zellkultur der humanen mesenchymalen Stammzellen und Inkubation mit Nanopartikeln**

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden in RPMI mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  L-Glutamin bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , erhöhter Luftfeuchtigkeit und in 5 %-iger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre kultiviert. Zum Passagieren wurden die in den Zellkulturbehältern adhären Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von  $0,2 \text{ mL cm}^{-2}$  einer Lösung von 0,25 % Trypsin und 0,05 % EDTA in PBS für 5 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  abgelöst. Die Zellen wurden gesammelt und noch zweimal mit RPMI \* 10 % FCS gewaschen.

Die hMSC wurden bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 24 h oder 7 d in An- oder Abwesenheit von Nanopartikeln unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Nanopartikel wurden in verschiedenen Konzentrationen von  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  bis  $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  zugegeben. Dies geschah durch vorherige Verdünnung einer höher konzentrierten Stammdispersion mit sterilem Wasser. Es wurden jeweils  $50 \text{ } \mu\text{L}$  der Dispersion zu  $1 \text{ mL}$  Zellkulturvolumen zugegeben.

### **4.4.2 Viabilitätsuntersuchungen und Messung der Cytokin-Freisetzung**

Die Viabilität der inkubierten Zellen wurde durch Fluoreszenzfärbung mit Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) und anschließender Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Nach der Inkubation mit Nanopartikeln für 24 h oder 7 d wurden die Zellen zweimal mit RPMI gewaschen und für 30 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Zellkulturbedingungen mit  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  Calcein-AM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit RPMI gewaschen und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Zellmorphologie wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht.

Die Freisetzung der Cytokine IL-6 und IL-8 wurde mittels ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) im Überstand der Zellkulturen nach 24 h Inkubation mit den Nanopartikeln ermittelt. Die Messungen wurden von Dr. Christina Greulich durchgeführt.

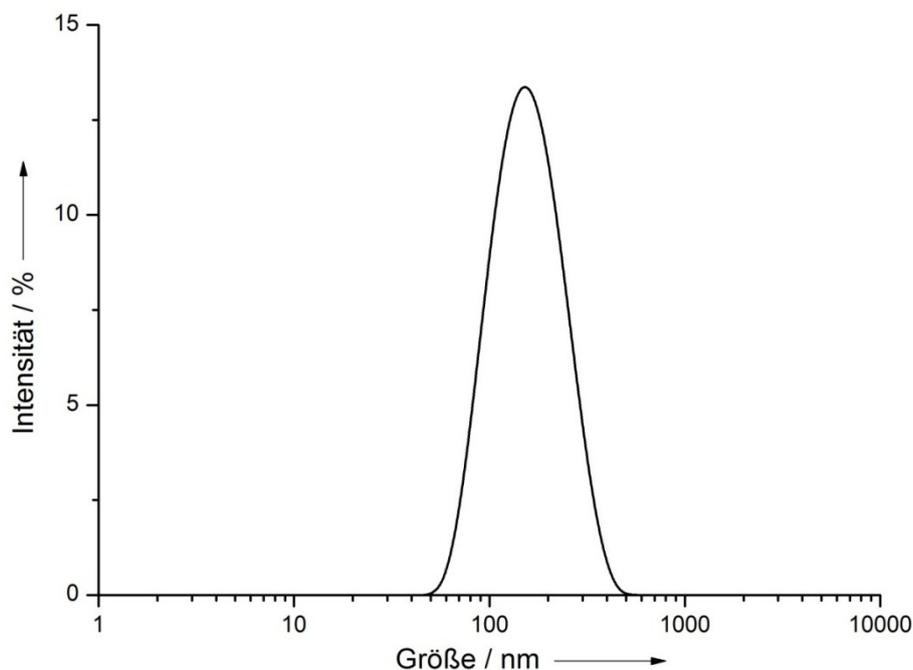
## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der Silber-Nanopartikel

#### 5.1.1 Charakterisierung der mit Glucose reduzierten Silber-Nanopartikel

Die mit Glucose in Anwesenheit von Polyvinylpyrrolidon synthetisierten Silber-Nanopartikel wurden mittels Elektronenmikroskopie und verschiedenen kolloidchemischen Methoden charakterisiert. Alle Messungen wurden mit gereinigten Nanopartikeln durchgeführt.

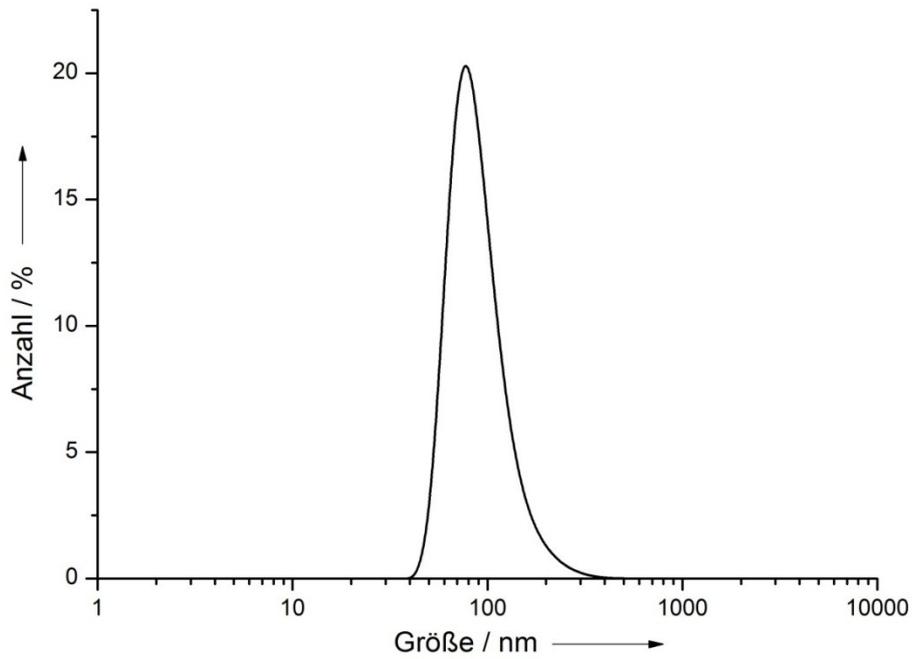
Die Größenanalyse mittels Dynamischer Lichtstreuung zeigt Abbildung 17. Aufgetragen ist die Größenverteilung nach der Streulichtintensität. Die Messung wurde in einer Einwegküvette aus Polystyrol als verdünnte wässrige Dispersion durchgeführt.



**Abbildung 17:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel, Auftragung nach der Streulichtintensität.

Der Z-Average, der eine gewichtete mittlere Partikelgröße auf der Grundlage der Intensitätsverteilung darstellt, beträgt bei dieser Messung 142 nm. Die Dynamische Lichtstreuung spiegelt den hydrodynamischen Durchmesser wider, also die Partikelgröße, die sich aus dem metallischen Kern und der Ligandenhülle, in diesem

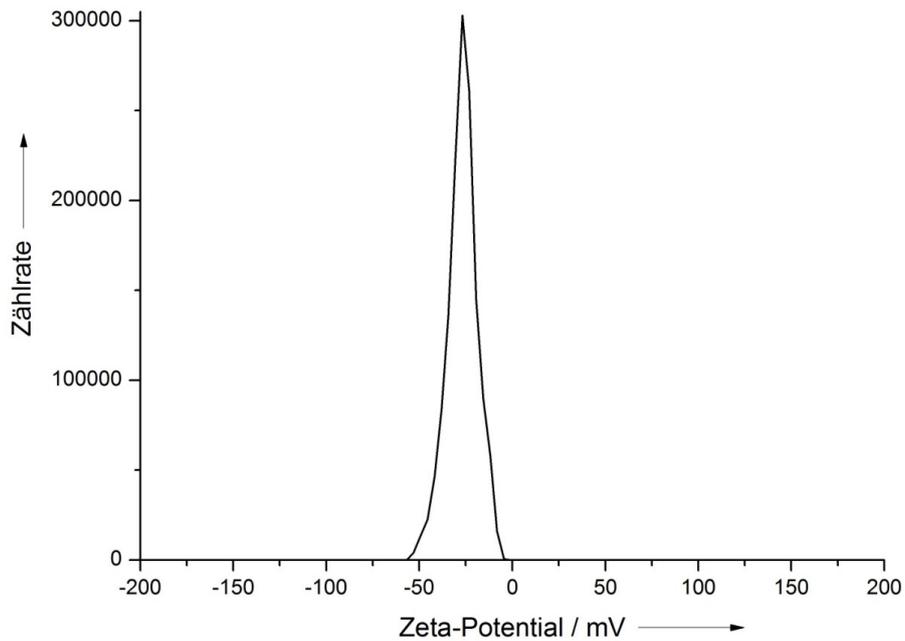
Fall PVP, zusammensetzt. Das Maximum der Größenverteilung liegt bei dieser Auftragung bei etwa 152 nm. Der Polydispersitätsindex beträgt 0,148. Es handelt sich also laut Dynamischer Lichtstreuung um ein monodisperses System. In Abbildung 18 ist die gleiche Messung nach der Partikelanzahl aufgetragen gezeigt.



**Abbildung 18:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel, Auftragung nach der Partikelanzahl.

Das Maximum der Größenverteilung bei dieser Auftragung liegt bei 77 nm. Man erkennt außerdem eine recht enge Größenverteilung,

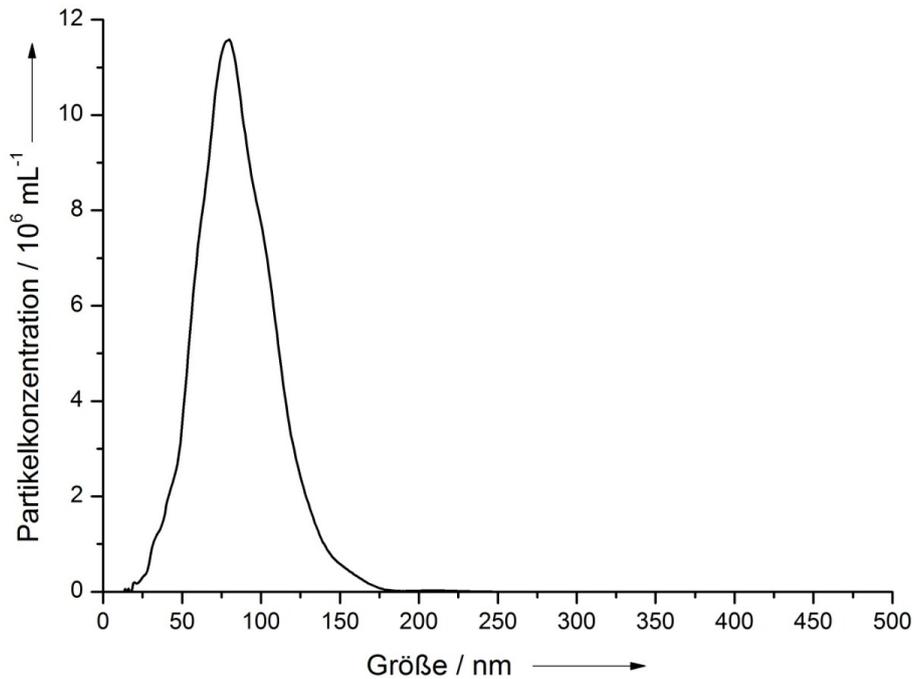
Das Ergebnis der Messung des Zeta-Potentials der Partikel ist in Abbildung 19 dargestellt. Das Zeta-Potential wurde anhand einer verdünnten Dispersion in einer Einweg-Zeta-Potentialküvette aus Polycarbonat gemessen.



**Abbildung 19:** Zeta-Potential der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Das Zeta-Potential beträgt  $-27\text{ mV}$ , was für eine gewisse elektrostatische Stabilisierung spricht. Die Partikel sind durch das Polymer PVP als Ligand zusätzlich sterisch stabilisiert. Insgesamt sind die Partikel also elektrosterisch stabilisiert.

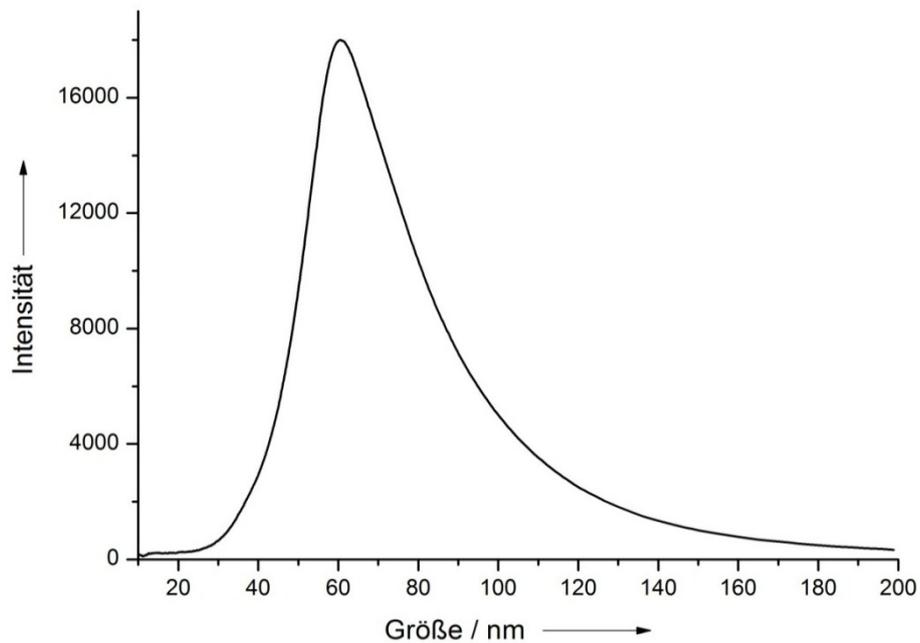
Die Nanopartikel wurden ebenfalls mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* untersucht. Dafür wurde die wässrige Dispersion stark mit Reinstwasser verdünnt. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

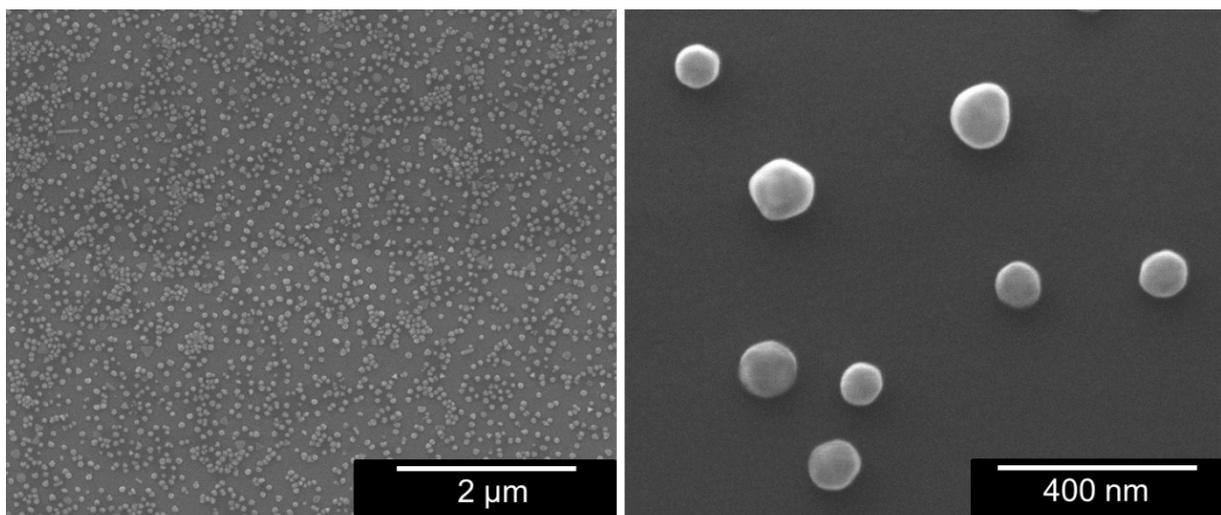
Das Maximum der Größenverteilung laut *Nanoparticle Tracking Analysis* liegt bei 80 nm. Diese Methode gibt ebenfalls den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel wieder.

Das Ergebnis der Partikelgrößenanalyse mit der analytischen Scheibenzentrifugation ist in Abbildung 21 dargestellt. Als Standard für die Kalibrierung des Gerätes wurde eine Dispersion von PVC-Partikeln in Wasser mit einer Größe von 377 nm verwendet. Man erkennt eine Größenverteilung mit einem Maximum bei 60 nm.



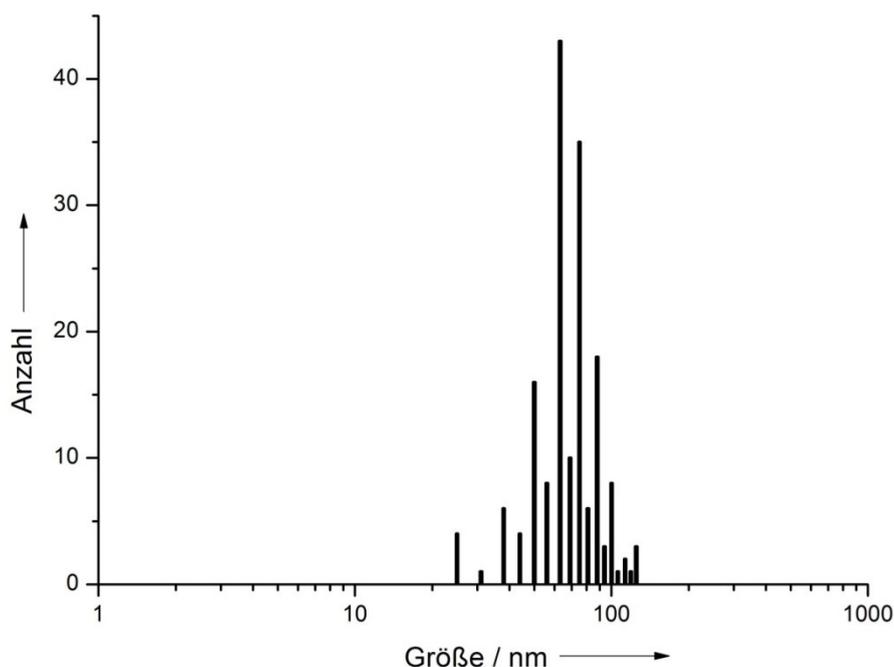
**Abbildung 21:** Mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmte Größenverteilung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Abbildung 22 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mit Glucose reduzierten, PVP-stabilisierten Silber-Nanopartikel. Das linke Bild wurde als Übersichtsaufnahme bei 40000-facher Vergrößerung aufgenommen, das rechte Bild zeigt die Partikel im Detail bei 300000-facher Vergrößerung.



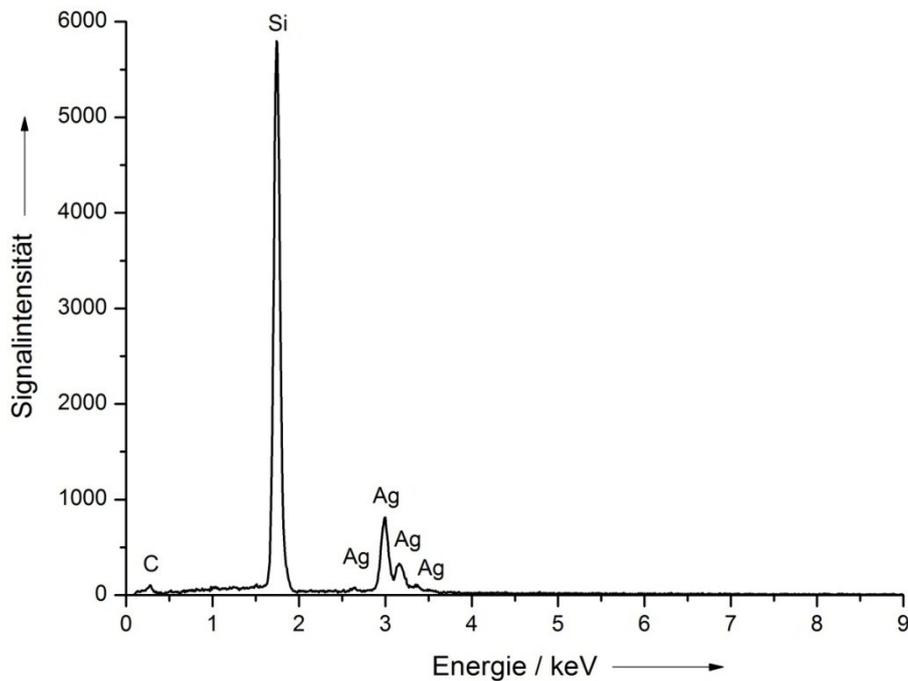
**Abbildung 22:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Für die Probenpräparation wurde ein Tropfen der Nanopartikel-Dispersion auf einem Silicium-Wafer als Probenträger eingetrocknet. Zu erkennen ist, dass die Partikel recht monodispers vorliegen und eine überwiegend homogene, sphärische Morphologie aufweisen. Bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen verschiedener Chargen der Nanopartikel zeigten sich regelmäßig einzelne Partikel mit von der Kugelform abweichender Geometrie wie Dreiecke und andere Polygone. Die mittlere Partikelgröße, entsprechend dem in der Rasterelektronenmikroskopie abgebildeten metallischen Kern ohne Ligandenhülle, beträgt ungefähr 70 nm. Die Partikelgröße, die aus einer typischen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme der Nanopartikel bei geeigneter Vergrößerung durch manuelles Ausmessen der visualisierten Partikel ermittelt wurde, ist in Abbildung 23 in Form eines Histogramms gezeigt.



**Abbildung 23:** Aus einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme ermittelte Größenverteilung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

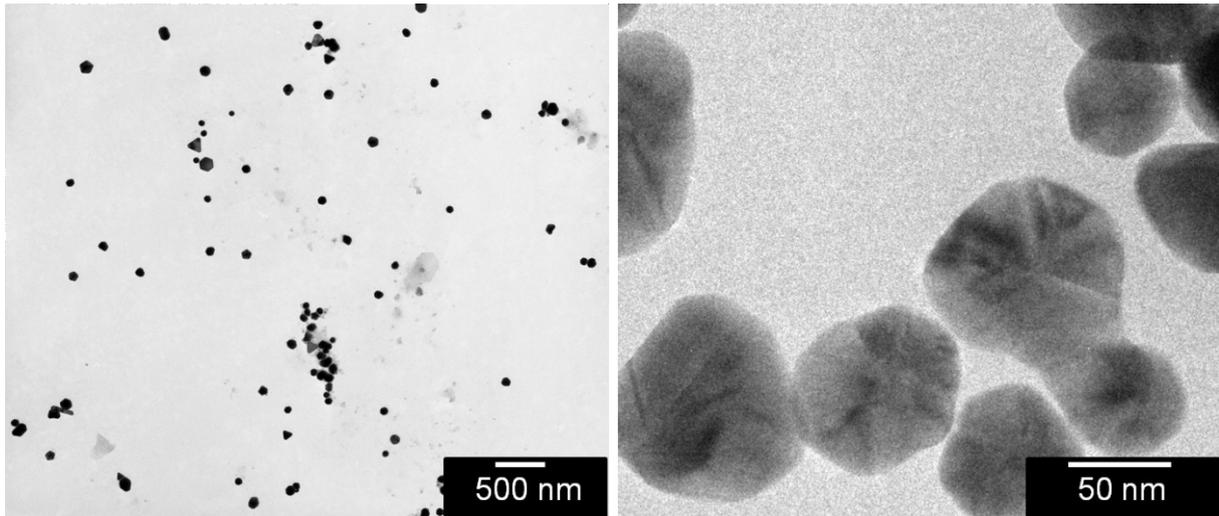
Bei der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme der Partikel wurde auch ein EDX-Spektrum angefertigt (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** EDX-Spektrum der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Gut zu erkennen sind die Signale für Silber bei etwa 3 keV. Ebenfalls sichtbar ist ein kleines Signal für Kohlenstoff nahe 0 keV, das von der Polymerhülle der Nanopartikel herrührt. Das sehr dominante Signal für Silicium rührt von dem Silicium-Trägermaterial her, auf dem die Nanopartikel für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert wurden. Außer diesen erwarteten Signalen sind keine weiteren Signale von Verunreinigungen der Nanopartikel durch andere Elemente zu erkennen. Ebenfalls nicht zu erkennen sind die Signale für Stickstoff und Sauerstoff, die ebenfalls von dem Polymer PVP herrühren würden. Die Menge dieser Elemente ist zu gering, als dass sie in diesem Spektrum erkannt werden könnte.

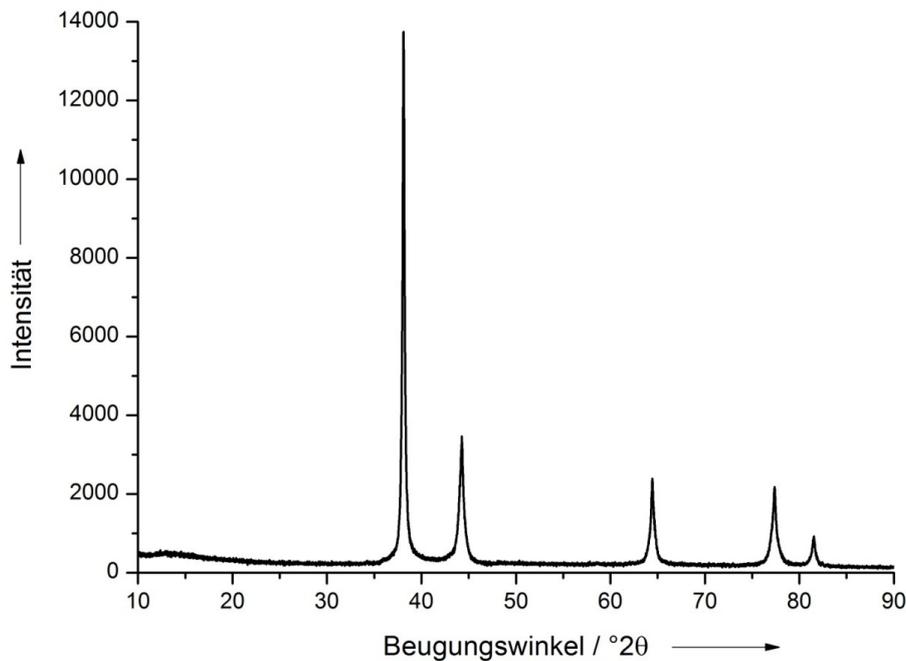
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Nanopartikel sind in Abbildung 25 gezeigt. Links ist eine Übersichtsaufnahme zu sehen, das rechte Bild zeigt eine Detailaufnahme.



**Abbildung 25:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Wie schon bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die transmissionselektronenmikroskopischen Bilder den metallischen Kern der Partikel. Die Polymerhülle ist wegen ihres geringen Kontrastes in der Transmissionselektronenmikroskopie nicht darstellbar. Man erkennt wieder die überwiegend sphärische Morphologie der Partikel und ihren recht monodispersen Charakter. Ebenfalls sind vereinzelte Partikel mit von der sphärischen Form abweichender Geometrie (Dreiecke und andere Polygone sowie längliche Partikel) zu erkennen. Wie auch bei den REM-Aufnahmen wurde hier der Durchmesser der Partikel mit im Mittel ca. 70 nm ermittelt. Auf dem rechten Bild in Abbildung 25 ist an den unterschiedlichen Kontraststufen zu erkennen, dass die Nanopartikel eine mehrfach verzwilligte Struktur besitzen.

Die Nanopartikel wurden auch mittels Röntgenpulverdiffraktometrie untersucht. Dazu wurde eine Dispersion der Partikel ohne weitere Zusätze gefriergetrocknet. Das trockene Pulver wurde mit Ethanol angerührt und auf einen Probenträger aufgebracht. Nach dem Trocknen wurde ein Pulverdiffraktogramm aufgenommen, das in Abbildung 26 abgebildet ist.



**Abbildung 26:** Diffraktogramm der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Es sind Signale für kubisch-flächenzentriertes (fcc) Silber zu erkennen. Die Signale sind recht stark verbreitert, da nanokristallines Material vorliegt. Die Signale des Diffraktogramms stimmen mit den Literaturdaten für kubisch-flächenzentriertes Silber überein.<sup>[145, 146]</sup> Die Reflexlagen des angefertigten Diffraktogramms und die theoretischen Werte für kubisch-flächenzentriertes Silber (JCPDS - PDF # 00-004-0783) sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Gemessene Reflexlagen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit Datenbank-Werten (JCPDS - PDF # 00-004-0783).

Millersche Indizes	111	200	220	311	222
Reflexlage (nach JCPDS)	38,117	44,279	64,428	77,475	81,539
Reflexlage (experimentell)	38,097	44,278	64,411	77,357	81,496

Aus dem Diffraktogramm können der Gitterparameter und das Volumen der Elementarzelle berechnet werden. Der Gitterparameter beträgt  $a = 4,0880(1) \text{ \AA}$  und das Volumen der Elementarzelle beträgt  $V = 68,319(6) \text{ \AA}^3$ . Dies stimmt gut mit den

Literaturwerten von  $a = 4,0855(1) \text{ \AA}$  für den Gitterparameter und  $V = 68,19(1) \text{ \AA}^3$  überein.<sup>[147]</sup>

Aus den Reflexverbreiterungen in dem Diffraktogramm der Silber-Nanopartikel kann man auch die mittlere Kristallitgröße der Partikel berechnen. Dies geschieht mit Hilfe einer Gleichung, die zuerst von Paul Scherrer aufgestellt wurde<sup>[148]</sup>, und deshalb als Scherrer-Gleichung bekannt ist<sup>[149]</sup> (Gleichung 6).

$$d = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (6)$$

$d$  = Kristallitdurchmesser

$K$  = Formfaktor

$\lambda$  = Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung

$\beta$  = Reflexbreite

$\theta$  = Beugungswinkel

Die Gleichung stellt eine Beziehung zwischen der Lage und der Breite der Reflexe im Diffraktogramm und dem Durchmesser der streuenden Kristallite her.

Für die Reflexbreite  $\beta$  kann entweder die Halbwertsbreite (FWHM, engl. *Full Width at Half Maximum*) oder die integrale Breite ( $iB$ ) eingesetzt werden. Es gilt dann bei der Verwendung der Halbwertsbreite

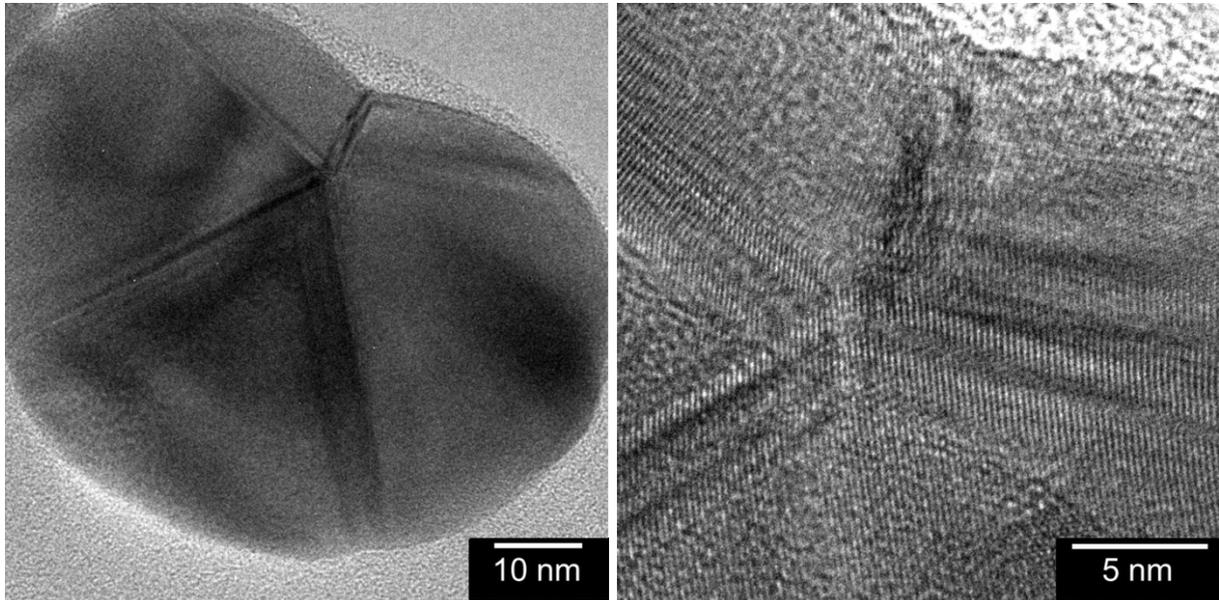
$$d_{FWHM} = \frac{K \cdot \lambda}{(FWHM - B_{instr.}) \cdot \cos\theta} \quad (7)$$

mit einem Formfaktor, der für sphärische Partikel den Wert  $K = 0,89$  hat<sup>[150]</sup>, und bei der Verwendung der integralen Breite

$$d_{iB} = \frac{\lambda}{(iB - B_{instr.}) \cdot \cos\theta} \quad (8)$$

mit dem Formfaktor  $K = 1$ .  $B_{instr.}$  ist die instrumentelle Peakverbreiterung, die von dem verwendeten Diffraktometer verursacht und durch eine interne Korrektur berücksichtigt wird. Die ermittelten Kristallitgrößen betragen  $d_{FWHM} = 26 \text{ nm}$  und

$d_{IB} = 19 \text{ nm}$ . Diese Werte stimmen annähernd mit den Größen der Domänen überein, die in den hochauflösenden transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 27 zu sehen sind.



**Abbildung 27:** Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Auf den Bildern sind die Domänen, also die Kristallbereiche mit unterschiedlicher Orientierung der Netzebenen, gut zu erkennen. Besonders auf dem rechten Bild ist die hervorragende Auflösung der Bilder bis auf fast atomare Ebene bemerkenswert. Die mit der integralen Breite bestimmte Kristallitgröße passt etwas besser zu den Domänen des Nanopartikels, der auf den HR-TEM-Bildern gezeigt ist. Die Scherrer-Gleichung ergibt also nicht den Durchmesser des ganzen Partikels; dies wäre nur bei nicht verzwilligten oder einkristallinen Partikeln der Fall.

Die mit der Röntgenbeugung ermittelten Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der aus den XRD-Daten ermittelten Werte der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit Literaturwerten.

	<b>gemessen</b>	<b>Literatur</b>
<b>Gitterparameter / Å</b>	4,0880(1)	4,0855(1)
<b>Volumen der Elementarzelle / Å<sup>3</sup></b>	68,319(6)	68,19(1)
<b>Größe (Berechnung mit FWHM) / nm</b>	27	-
<b>Größe (Berechnung mit iB) / nm</b>	19	-

Der mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmte Umsatz der Synthese beträgt etwa 5 %, bezogen auf die eingesetzte Masse an Silber in Form von Silbernitrat.

In Tabelle 3 sind alle ermittelten Größen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Zusammenfassung aller ermittelten Größen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

<b>Messmethode</b>	<b>Partikelgröße</b> / nm
Dynamische Lichtstreuung (Z-Average)	142
Dynamische Lichtstreuung (nach Partikelanzahl)	77
<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	80
Analytische Scheibenzentrifugation	60
Rasterelektronenmikroskopie	70
Transmissionselektronenmikroskopie	70
Röntgenbeugung (mit FWHM berechnet)	26
Röntgenbeugung (mit iB berechnet)	19

Es sind zum Teil gute Übereinstimmungen der bestimmten Partikelgrößen zu sehen. Die angegebenen Werte müssen jedoch zunächst danach unterschieden werden, ob sie den hydrodynamischen Durchmesser oder den Durchmesser des metallischen Kerns der Nanopartikel widerspiegeln. Aber auch innerhalb einer dieser beiden Ergebnisgruppen unterscheiden sich die Messwerte zum Teil deutlich. Eine ausführlichere Betrachtung der Ursachen und der Vor- und Nachteile der einzelnen

Messmethoden wird in Kapitel 5.1.9 wiedergegeben. Im Folgenden wird daher nur stark verkürzt auf die zu Grunde liegenden physikalischen und messtechnischen Ursachen eingegangen. Wegen der umfassenden Verwendung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel wird deren Charakterisierung jedoch hier etwas ausführlicher diskutiert.

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ergibt den hydrodynamischen Durchmesser. Die Auftragung nach der Streulichtintensität bzw. der Z-Average ergibt bei dem hier verwendeten Gerät einen erheblich größeren mittleren hydrodynamischen Partikeldurchmesser als die anderen kolloidchemischen Methoden. Dies liegt an der Überbewertung des Streulichtanteils von größeren Partikeln und möglichen Agglomeraten. Der Wert von 142 nm ist daher als zu hoch anzusehen. Bereits eine andere Darstellung der gleichen Messung nach der Anzahl der streuenden Partikel ergibt einen erheblich niedrigeren Wert von 77 nm. Dieser Durchmesser ist in guter Übereinstimmung mit dem Wert von 80 nm aus der *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), die ebenfalls den hydrodynamischen Partikeldurchmesser angibt.

Die Analytische Scheibenzentrifugation (DCS) ergibt zwar im Prinzip ebenfalls den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel, allerdings liegt das Ergebnis gewöhnlich etwas unter den Werten der DLS und der NTA. Dies liegt daran, dass die Dichte der Partikel eine kritische Rolle bei der Größenberechnung aus den Messwerten spielt. Typischerweise kann man lediglich die Dichte des Partikelkerns heranziehen. Eigentlich wäre aber die Angabe einer Mischdichte erforderlich, die sich aus der Dichte des Kernmaterials und der Dichte der Ligandenhülle zusammensetzt. Diese scheinbare Dichte ist im Falle der funktionalisierten Silber-Nanopartikel geringer als die Dichte reinen Silbers. Durch diese geringere Gesamtdichte der Partikel mit der hydrodynamischen Ligandenhülle erscheinen die Partikel in der Scheibenzentrifuge kleiner. Die Messung ergab in diesem Fall einen Wert von 60 nm, was einer Differenz zur DLS und NTA von etwa 20 nm entspricht.

Im Gegensatz zu den bereits angesprochenen Methoden DLS, NTA und DCS erhält man aus der elektronenmikroskopischen Charakterisierung stets den Durchmesser des metallischen Kerns der Partikel. Da die Proben getrocknet und im Hochvakuum untersucht werden, sind im Allgemeinen keine Aussagen über die Größe in Dispersion, also mit Ligandenhülle, möglich. Mit der Rasterelektronenmikroskopie und der Transmissionselektronenmikroskopie wurde übereinstimmend ein

durchschnittlicher Durchmesser des Silberkerns der Nanopartikel von etwa 70 nm festgestellt.

Die aus den Röntgenbeugungsdaten berechneten Durchmesser sind mit den Ergebnissen der anderen Methoden nicht direkt vergleichbar. Es handelt sich dabei um die Größe der streuenden Kristalldomänen innerhalb der einzelnen Nanopartikel. Da die Partikel mehrfach verzwilligt sind, liegen diese Durchmesser erheblich unter den Kerndurchmessern, die mittels Elektronenmikroskopie ermittelt wurden.

Zusammenfassend lässt sich der hydrodynamische Durchmesser der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel bei Berücksichtigung aller etwaiger Schwankungen bei verschiedenen Chargen und unterschiedlichen Messungen derselben Probe im Mittel mit  $75 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$  angeben. Der Kerndurchmesser beträgt bei Berücksichtigung der eben genannten Faktoren im Mittel  $70 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ .

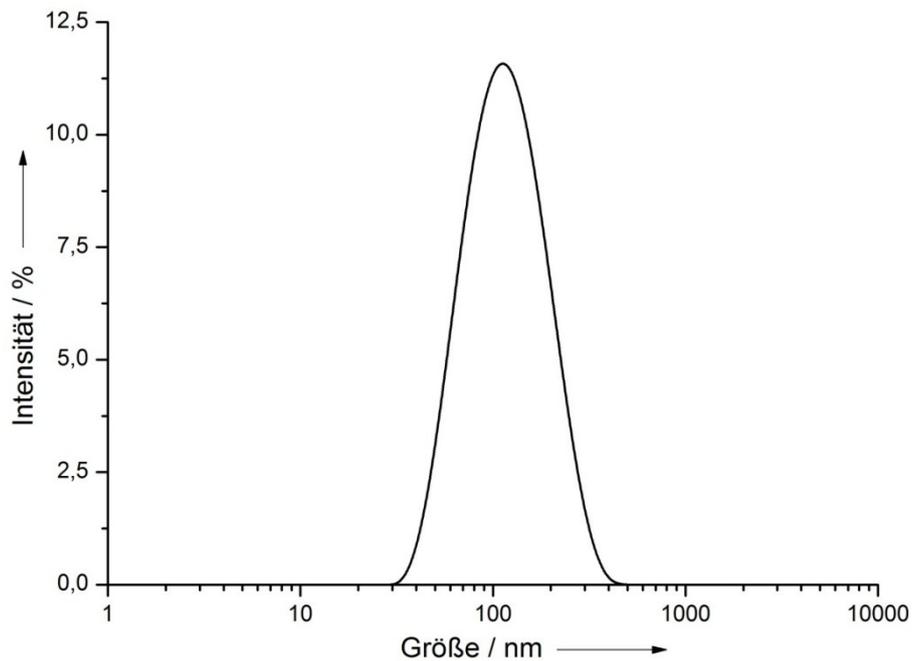
Das Zeta-Potential ist mit  $-27 \text{ mV}$  deutlich negativ und von Null verschieden. Da es sich bei dem stabilisierenden Liganden Polyvinylpyrrolidon um ein neutrales Polymer handelt, wäre eigentlich ein Zeta-Potential um  $0 \text{ mV}$  zu erwarten gewesen. Dies wäre für eine rein sterische Stabilisierung der Partikel typisch. Offenbar kommt allerdings eine elektrostatische Komponente hinzu. Vermutlich adsorbieren auf der Oberfläche der Partikel in geringem Umfang Ionen, die noch von der Synthese stammen und nicht durch das Waschen mittels Ultrazentrifugation entfernt werden konnten.

Die elektrophoretische Mobilität, aus der das Zetapotential, also die Oberflächenladung der Partikel, abgeleitet wird, spiegelt allerdings nicht zwingend die Oberflächenladung wider. *Knecht et al.* beobachteten bei neutralen Öltröpfchen in einer Emulsion eine negative elektrophoretische Mobilität trotz der Abwesenheit von Hydroxyl-Ionen oder anderen Ionen, die eine negative Oberflächenladung erklären könnten.<sup>[151]</sup> Es wurde gezeigt, dass das Oberflächenpotential und die elektrophoretische Mobilität nicht unbedingt zusammenfallen bzw. korrespondieren. Möglicherweise besitzen die PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel also tatsächlich eine annähernd neutrale Oberflächenladung.

Die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden für Auflösungsexperimente in verschiedenen Medien, für zellbiologische Untersuchungen, für die Gefriertrocknung bzw. Tiefkühlung und für Stabilitätsuntersuchungen in biologischen Medien verwendet.

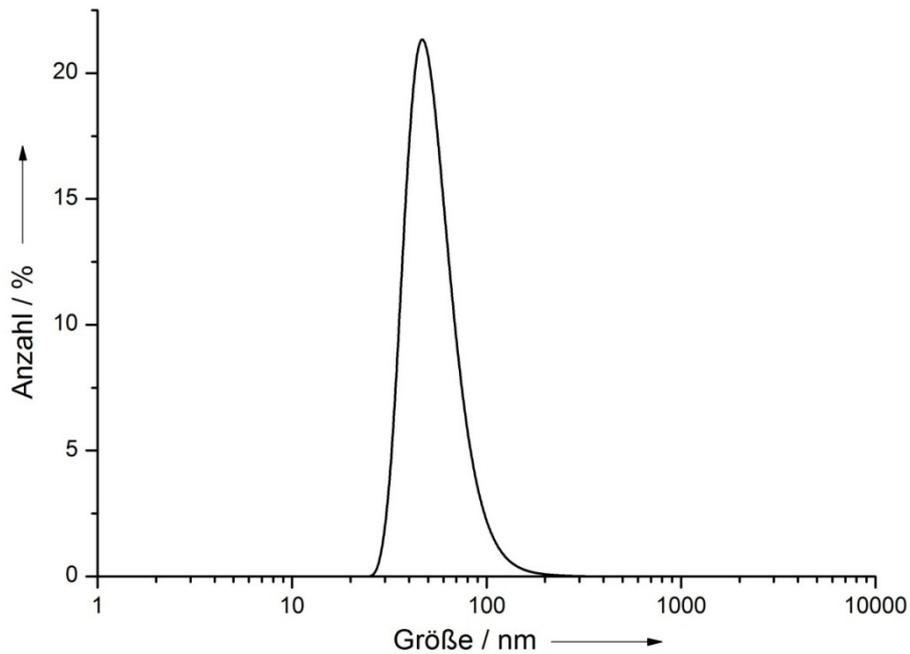
### 5.1.2 Charakterisierung der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel

Die mittels Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel wurden mittels Dynamischer Lichtstreuung, Nanoparticle Tracking Analysis, Analytischer Scheibenzentrifugation und Elektronenmikroskopie untersucht. Alle Charakterisierungen wurden mit gereinigten Partikeldispersionen durchgeführt. Zunächst wurde die Charakterisierung mit Dynamischer Lichtstreuung durchgeführt. Die Partikel wurden als verdünnte wässrige Dispersion in einer Einmalküvette aus Polystyrol gemessen. Abbildung 28 zeigt die Auftragung nach der Streulichtintensität.



**Abbildung 28:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel, Auftragung nach der Streulichtintensität.

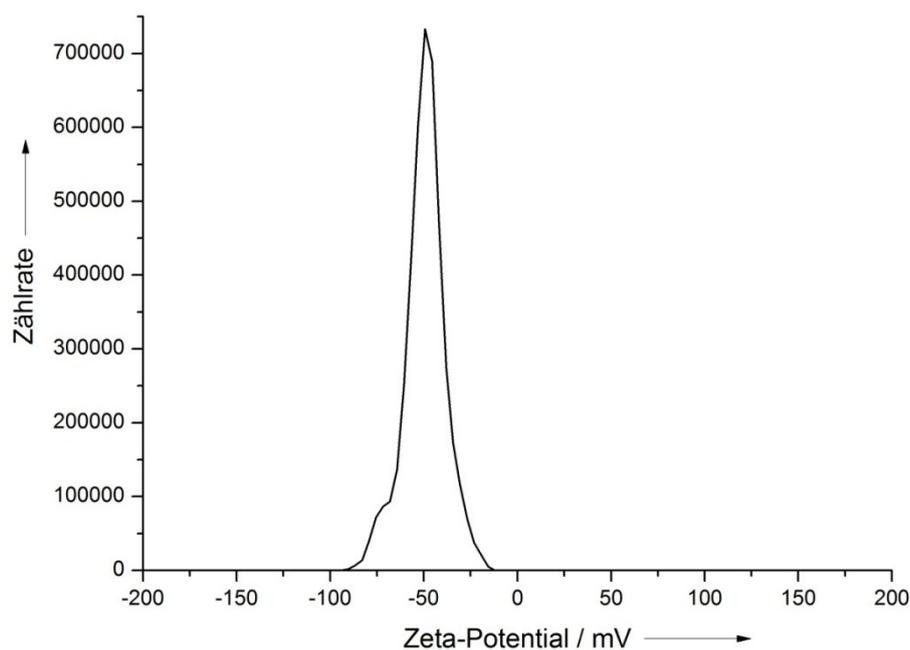
Der ermittelte Z-Average beträgt bei dieser Messung 97 nm und das Maximum der Größenverteilungskurve liegt bei 113 nm. Die DLS ergibt den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel. Der Polydispersitätsindex ist 0,218. Es handelt sich laut der Dynamischen Lichtstreuung also noch um ein monodisperses System. Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der gleichen Messung als Auftragung nach der Anzahl der streuenden Partikel.



**Abbildung 29:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel, Auftragung nach der Partikelanzahl.

Die Kurve stellt bei dieser Darstellungsweise eine recht enge Größenverteilung dar und besitzt ein Maximum bei 47 nm.

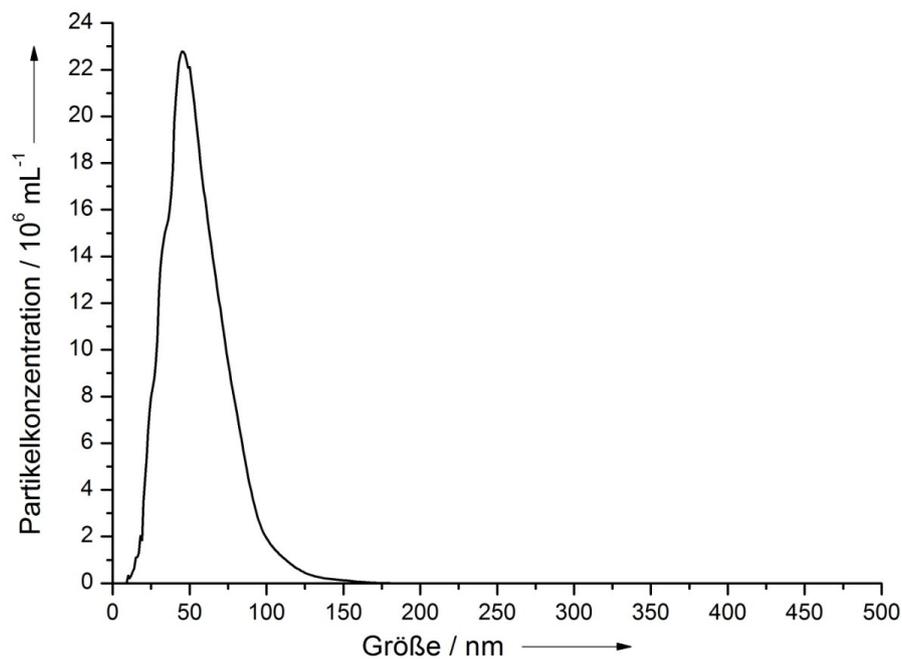
Das Zetapotential der Nanopartikel wurde ebenfalls gemessen. Die Messung erfolgte mit einer verdünnten wässrigen Dispersion in einer Einweg-Zeta-Potentialküvette aus Polycarbonat. Das Ergebnis dieser Messung zeigt Abbildung 30.



**Abbildung 30:** Zeta-Potential der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel.

Das Zeta-Potential beträgt -50 mV. Das stark negative Zeta-Potential weist auf eine elektrostatische Stabilisierung der Partikel durch das negativ geladene Citrat auf der Partikeloberfläche hin. Eine sterische Stabilisierung ist auf Grund der geringen Molekülgröße des Citrat nicht zu erwarten.

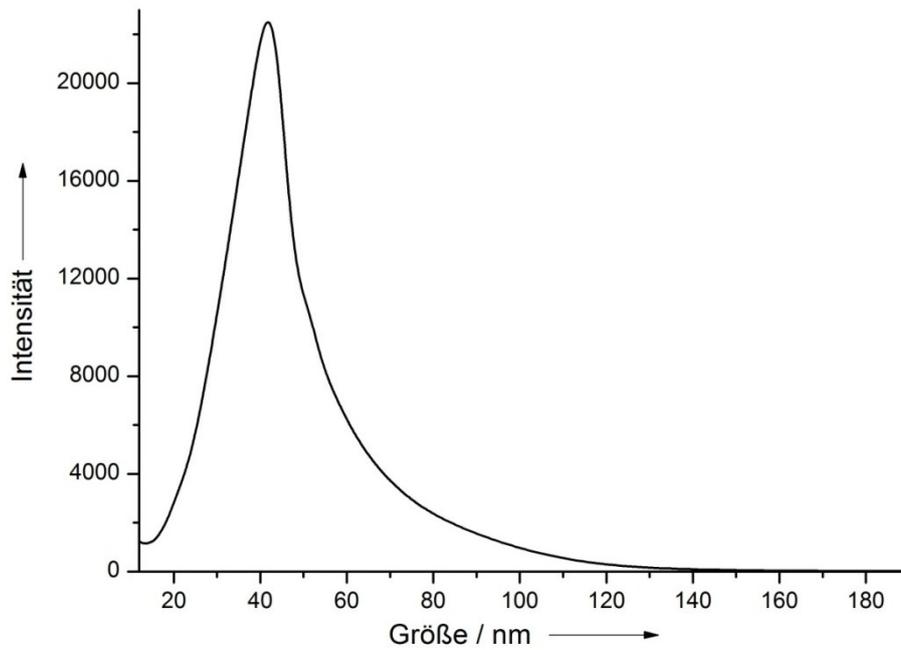
Abbildung 31 zeigt das Ergebnis einer Partikelgrößenmessung mittels *Nanoparticle Tracking Analysis*. Für die Messung wurde die Dispersion mit Reinstwasser stark verdünnt.



**Abbildung 31:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel.

Das Maximum der mittels NTA ermittelten Größenverteilung liegt bei 45 nm und die Kurve zeigt eine recht enge Größenverteilung. Es sind keine Agglomerate bei größeren Durchmessern zu erkennen. Wie bei der Dynamischen Lichtstreuung handelt es sich bei dieser Größe um den hydrodynamischen Partikeldurchmesser.

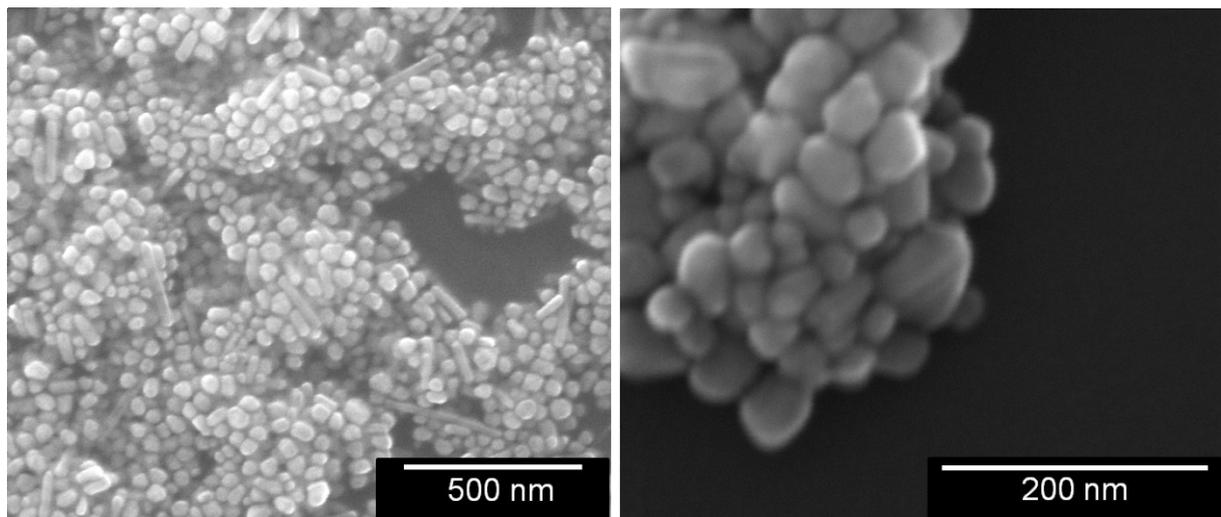
Die Dispersion wurde auch mittels Analytischer Scheibenzentrifugation charakterisiert. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 32 dargestellt.



**Abbildung 32:** Mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmte Größenverteilung der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel.

Die erhaltene Messkurve weist ein Maximum bei 42 nm und eine enge Größenverteilung auf.

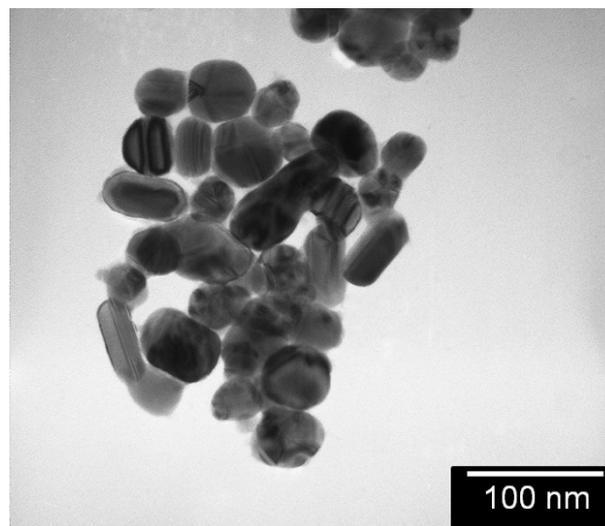
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel auf einem Siliciumwafer als Proben­träger sind in Abbildung 33 zu sehen.



**Abbildung 33:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel.

Das linke Bild zeigt eine Übersichtsaufnahme bei 160000-facher Vergrößerung. Auf dem rechten Bild ist eine Detailaufnahme bei 600000-facher Vergrößerung gezeigt. Man erkennt eine überwiegend sphärische Morphologie der Partikel. Es sind daneben aber auch einige stäbchenförmige und unregelmäßig geformte Nanopartikel vorhanden. Die mittlere Partikelgröße wurde mit etwa 45 nm ermittelt. Dabei handelt es sich um den Durchmesser des metallischen Kerns.

Bei Abbildung 34 handelt es sich um eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Nanopartikel.



**Abbildung 34:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel.

Es werden wie bei der Rasterelektronenmikroskopie nur die metallischen Kerne ohne die Ligandenhüllen abgebildet, da letztere im Hochvakuum bzw. beim Eintrocknen auf dem Probenträger kollabiert sind. Wiederum sind größtenteils sphärische Nanopartikel zu erkennen. Einige Partikel weisen jedoch eine gestreckte bis stäbchenförmige Morphologie auf. Der mittlere Kerndurchmesser beträgt etwa 45 nm. Die unterschiedlichen Kontraststufen legen nahe, dass die Partikel nicht einkristallin vorliegen, sondern eine mehrfach verzwilligte Struktur besitzen.

UV/Vis-Spektren dieser Nanopartikel sind bei der Charakterisierung der mit Citrat reduzierten und anschließend mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel zu finden (Abbildung 38 und Abbildung 39).

Der Umsatz der Synthese wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt und beträgt etwa 15 %, bezogen auf die eingesetzte Masse an Silber.

In Tabelle 4 sind die mit den verschiedenen Methoden ermittelten Durchmesser der Nanopartikel zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Zusammenfassung aller ermittelten Größen der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel.

<b>Messmethode</b>	<b>Partikelgröße</b> / nm
Dynamische Lichtstreuung (Z-Average)	97
Dynamische Lichtstreuung (nach Partikelanzahl)	47
<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	45
Analytische Scheibenzentrifugation	42
Rasterelektronenmikroskopie	45
Transmissionselektronenmikroskopie	45

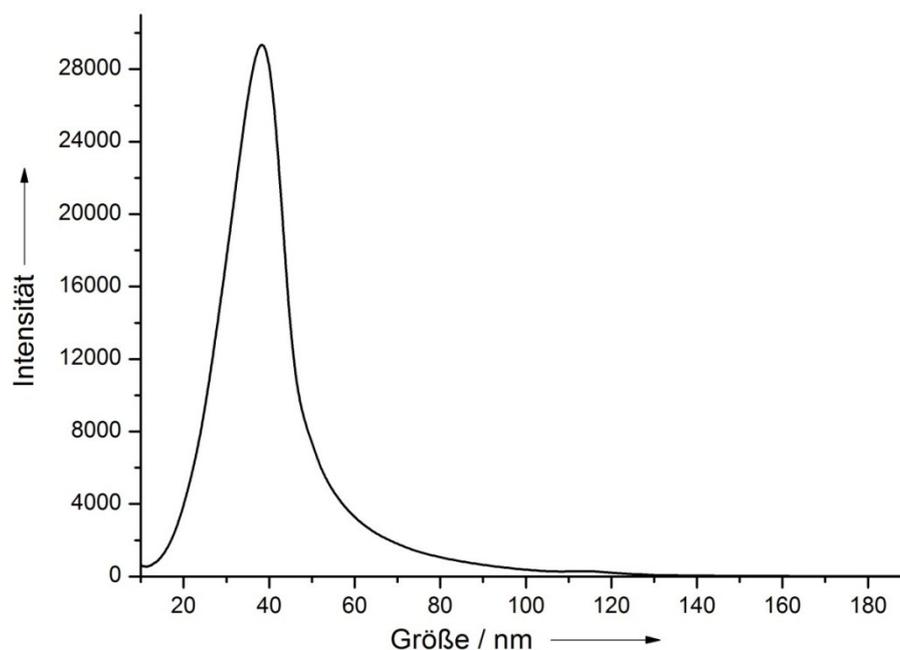
Wie schon bei den mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln ausgeführt wurde, ist der Z-Average, der in diesem Fall 97 nm beträgt, generell als zu hoch anzusehen. Der Z-Average liegt nur bei sehr monodispersen Systemen in der Größenordnung anderer Charakterisierungsmethoden. Bei dem gemessenen Polydispersitätsindex der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel von 0,218 ist zwar noch von einem recht monodispersen System auszugehen, allerdings ist es für eine sinnvolle Aussage des Z-Average bereits zu polydispers. Diese Betrachtung wird durch die Berücksichtigung der mittleren Partikelgröße aus der Auftragung der gleichen DLS-Messung nach der Partikelanzahl gestützt, die einen Wert von 47 nm ergab. Die Messung mit der *Nanoparticle Tracking Analysis*, die wie die DLS den hydrodynamischen Durchmesser ergibt, zeigte ein Größenmaximum bei 45 nm. Dies stimmt mit dem Ergebnis der DLS (nach Partikelanzahl) überein. Ebenfalls im gleichen Größenbereich liegt das Ergebnis der Messung mittels analytischer Scheibenzentrifugation mit einem Wert von 42 nm. Dieser Wert fällt etwas geringer aus als die beiden anderen Methoden, was an dem schon diskutierten Unterschied zwischen der scheinbaren und der in die Berechnung einbezogenen Dichte der Partikel liegt. Die Differenz ist allerdings nicht so groß wie bei den mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln. Dies liegt vermutlich daran, dass bei den mit Citrat reduzierten Partikeln die Ligandenhülle

aus Citrat weniger voluminös ist als die Funktionalisierung mit dem Polymer PVP, und sie daher weniger Einfluss auf die Gesamtdichte der Partikel hat.

Die Größen für den metallischen Kern, die aus den raster- bzw. transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen erhalten wurden, stimmen überein. Generell ist bei diesen Partikeln der Unterschied zwischen dem hydrodynamischen Durchmesser und dem Kerndurchmesser nicht so groß, da, wie schon erwähnt, die Ligandenhülle nicht sehr voluminös ist. Unter Berücksichtigung aller Messwerte und eventueller Schwankungen bei einzelnen Partikelchargen und Messungen ist der hydrodynamische Durchmesser und der Kern-Durchmesser der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel mit etwa 45 nm anzugeben. Die mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel wurden für Auflösungsexperimente verwendet.

### 5.1.3 Charakterisierung der mit Citrat reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel

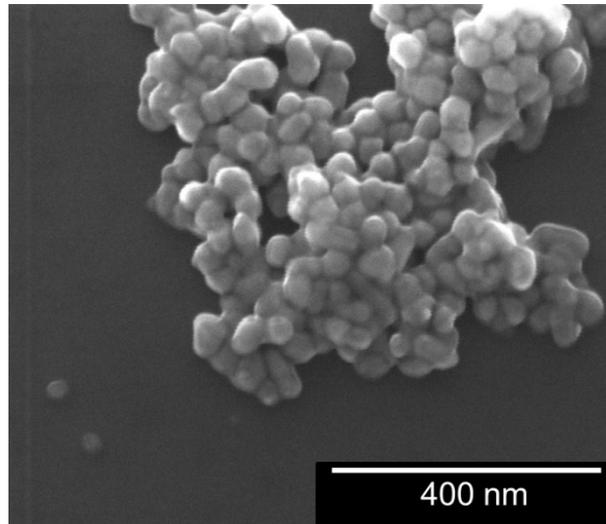
Die mit Citrat reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden zunächst hinsichtlich ihrer Größe mit der analytischen Scheibenzentrifugation untersucht (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmte Größenverteilung der mit Citrat reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Es liegt eine enge Größenverteilung mit einem Maximum bei 38 nm vor.

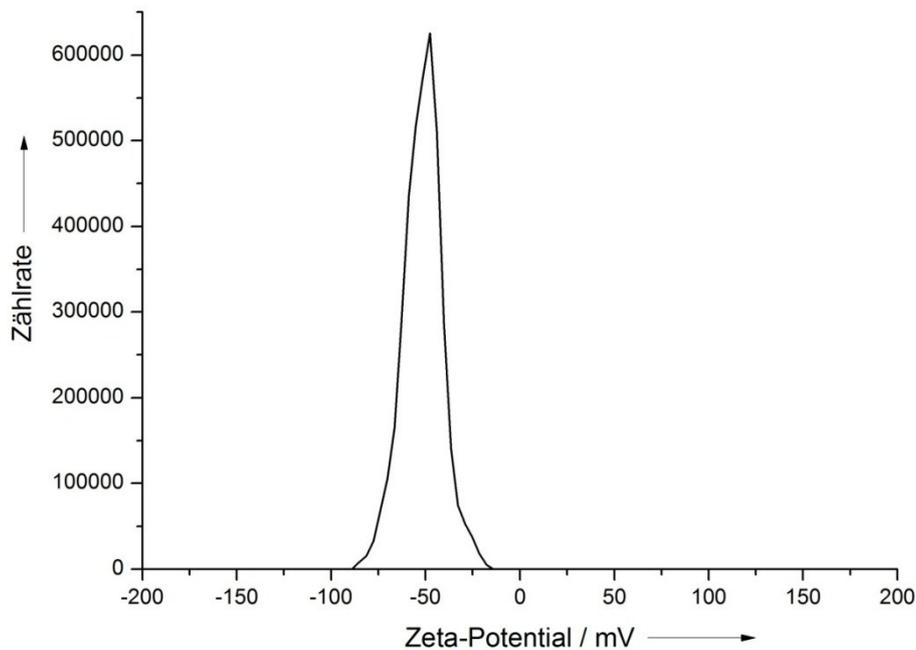
Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Nanopartikel zeigt Abbildung 36.



**Abbildung 36:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Citrat reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Die Aufnahme zeigt die Partikel bei 300000-facher Vergrößerung. Es sind überwiegend sphärische Partikel zu erkennen. Daneben liegen einige Partikel in Stäbchenform oder mit gestreckter Morphologie vor. Die mittlere Größe des metallischen Kerns, die aus dem REM-Bild ermittelt wurde, beträgt etwa 45 nm.

Die Partikel wurden auch hinsichtlich ihres Zeta-Potentials untersucht. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 37 gezeigt.

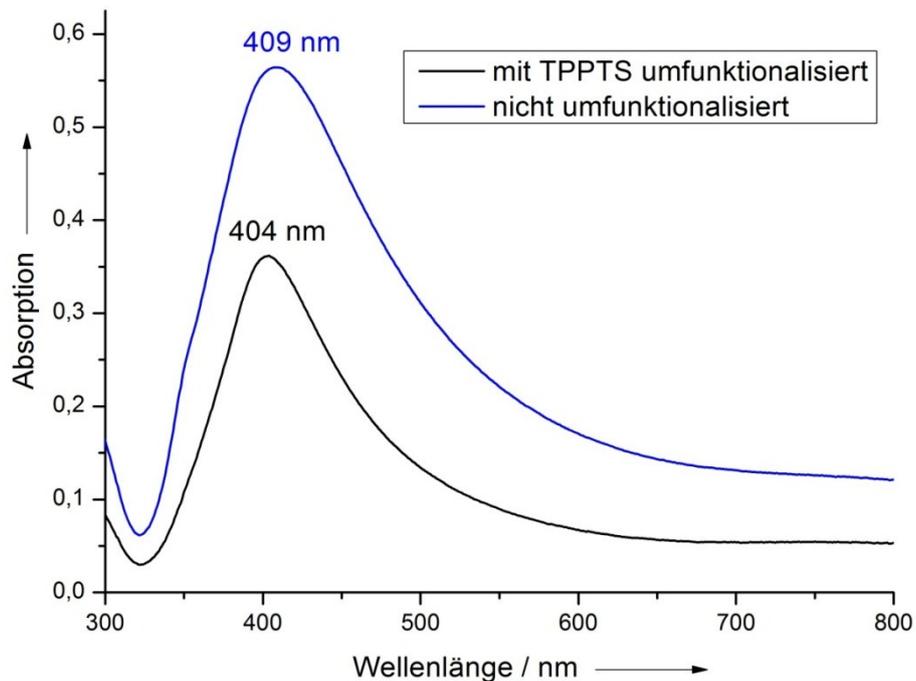


**Abbildung 37:** Zeta-Potential der mit Citrat reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Das Zeta-Potential beträgt -52 mV. Es liegt also eine elektrostatische Stabilisierung der Nanopartikel vor. Der Vergleich mit dem Zeta-Potential der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel, die nicht mit TPPTS umfunktionalisiert wurden (-50 mV, Abbildung 30), zeigt keinen nennenswerten Unterschied. Da beide Oberflächenfunktionalisierungen, sowohl das Citrat als auch das TPPTS, negativ geladen sind, war für beide Partikelsorten ein ähnliches, stark negatives Zeta-Potential zu erwarten gewesen. Diese Daten können also nicht als Hinweis auf die gelungene Umfunktionalisierung dienen.

Hinweise auf die Umfunktionalisierung der Nanopartikel wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie erhalten. Dazu wurden sowohl die mittels Ultrazentrifugation gereinigten Partikel als auch die nicht aufgereinigten Partikel untersucht.

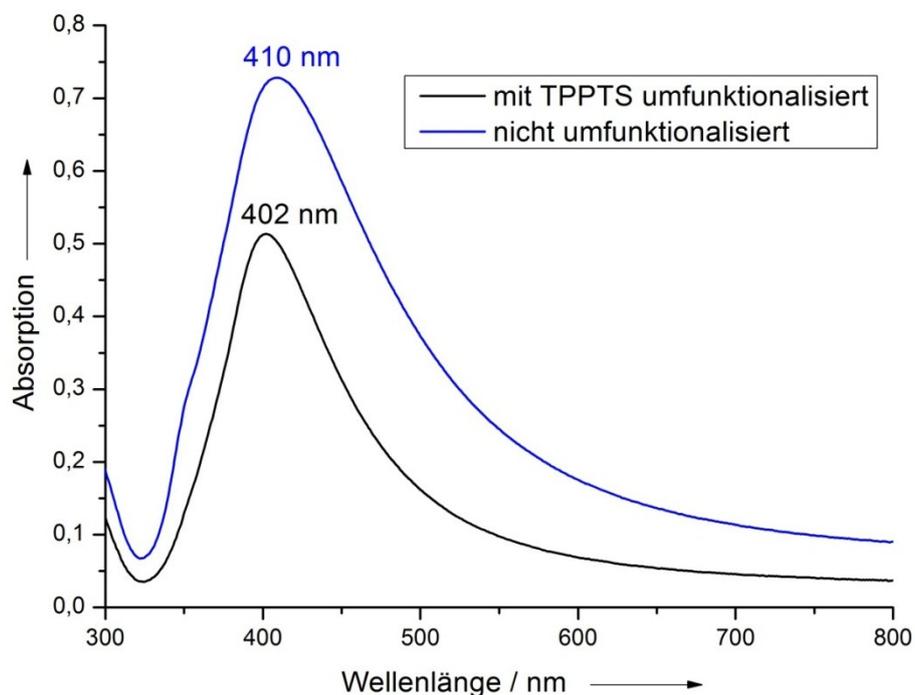
In Abbildung 38 ist zunächst das UV/Vis-Spektrum der aufgereinigten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel zu sehen (schwarze Kurve). Die Partikel wurden entsprechend Kapitel 4.1.3 nach der Zugabe des TPPTS-Liganden und dem Rühren über Nacht abzentrifugiert und in Reinstwasser redispergiert. Zum Vergleich ist das Spektrum der nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel gezeigt, die, abgesehen von der TPPTS-Zugabe, gleich behandelt wurden (über Nacht gerührt, zentrifugiert und redispergiert).



**Abbildung 38:** UV/Vis-Spektrum der mit Citrat reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel (schwarze Kurve) und Vergleich mit dem UV/Vis-Spektrum der nicht umfunktionalisierten, mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel (blaue Kurve), jeweils nach der Aufreinigung durch Ultrazentrifugation.

Die nicht umfunktionalisierten Partikel zeigen ein Absorptionsmaximum bei 409 nm. Dies liegt in der Größenordnung der in der Literatur berichteten Absorptionswellenlänge für Silber-Nanopartikel.<sup>[152-154]</sup> Die mit TPPTS umfunktionalisierten Partikel haben eine leicht zu geringeren Wellenlängen verschobene Absorptionsbande mit einem Maximum bei 404 nm. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die chemische Umgebung des metallischen Nanopartikelkerns durch die Anlagerung des TPPTS-Liganden verändert hat. Allerdings ist es auch möglich, dass die Verschiebung dadurch zustande kommt, dass sich die Partikel mit und ohne TPPTS-Umfunktionalisierung während der Zentrifugation unterschiedlich stark verändert haben. Es könnte zum Beispiel eine geringfügige Agglomeration bei einer der beiden Proben aufgetreten sein, da die mit TPPTS umfunktionalisierten Partikel eine veränderte kolloidale Stabilität aufweisen könnten. Dies wird aber durch das Ergebnis der analytischen Scheibenzentrifugation der TPPTS-funktionalisierten Partikel (Abbildung 35) bzw. der nicht umfunktionalisierten Partikel (Abbildung 32) weitestgehend entkräftet, da der Größenunterschied bei beiden Messungen gering ist. Zur Bestätigung wurden zusätzliche UV/Vis-Spektren von nicht zentrifugierten Dispersionen aufgenommen. Diese wurden nach der Zugabe des Liganden und dem

Rühren über Nacht ohne weitere Aufarbeitung direkt in eine Quarz-Küvette gegeben und vermessen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 39 gezeigt.



**Abbildung 39:** UV/Vis-Spektrum der mit Citrat reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel (schwarze Kurve) und Vergleich mit dem UV/Vis-Spektrum der nicht umfunktionalisierten, mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel (blaue Kurve), ohne Aufreinigung.

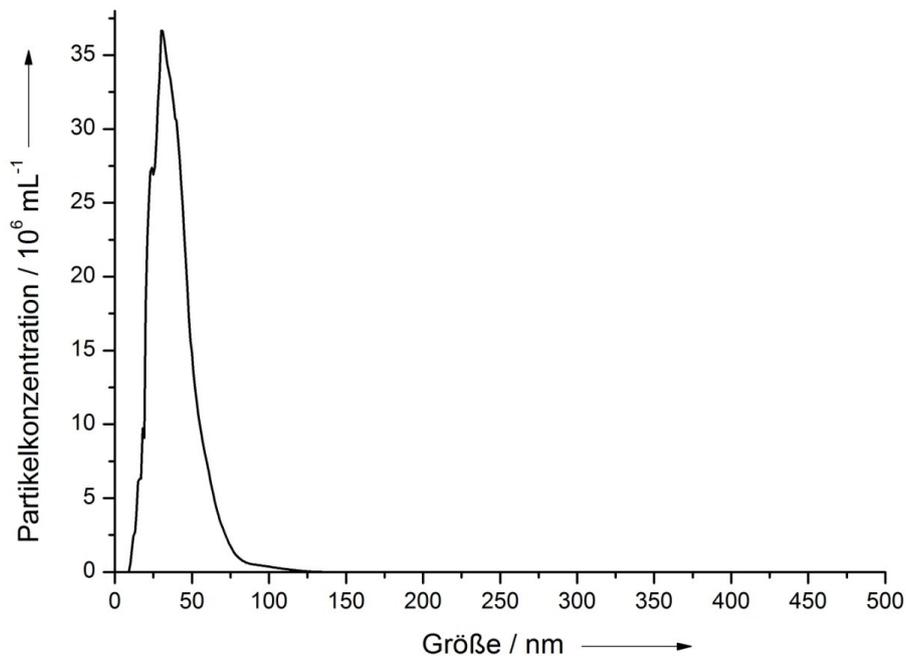
Auch in diesem Fall ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu erkennen. Die mit TPPTS umfunktionalisierten Partikel weisen ein Absorptionsmaximum bei 402 nm auf, die nicht umfunktionalisierten Partikel eines bei 410 nm. Damit ist es wahrscheinlich, dass diese Verschiebung durch die Anlagerung des TPPTS-Liganden an die Nanopartikel hervorgerufen wird. Die Verdrängung von Citrat durch TPPTS an Nanopartikeln wurde auch in der Literatur beschrieben.<sup>[155]</sup>

Der Umsatz der Synthese wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt und beträgt etwa 15 % bezogen auf die eingesetzte Masse an Silber.

Diese Partikel wurden nicht weiter verwendet, da sie keinen nennenswerten Vorteil gegenüber den mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikeln besitzen. Die Möglichkeit der Umfunktionalisierung von Silber-Nanopartikeln ist allerdings von grundlegendem Interesse und wird bei den mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Silber-Nanopartikeln (siehe nachfolgende Kapitel) wieder aufgegriffen.

#### 5.1.4 Charakterisierung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel

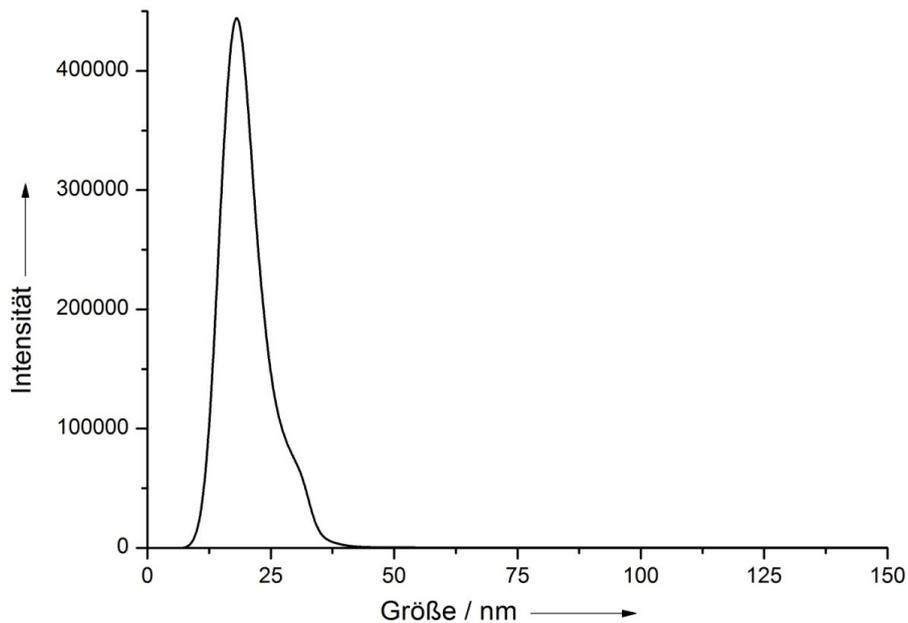
Die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden mittels Nanoparticle Tracking Analysis und analytischer Scheibenzentrifugation hinsichtlich der Größenverteilung ihres hydrodynamischen Durchmessers und mittels Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie hinsichtlich der Größe des metallischen Silberkerns charakterisiert. Alle Messungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit den gereinigten Partikeln durchgeführt. Das Ergebnis der Größenbestimmung mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* ist in Abbildung 40 dargestellt. Die Dispersion wurde für die Messung stark mit Reinstwasser verdünnt.



**Abbildung 40:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

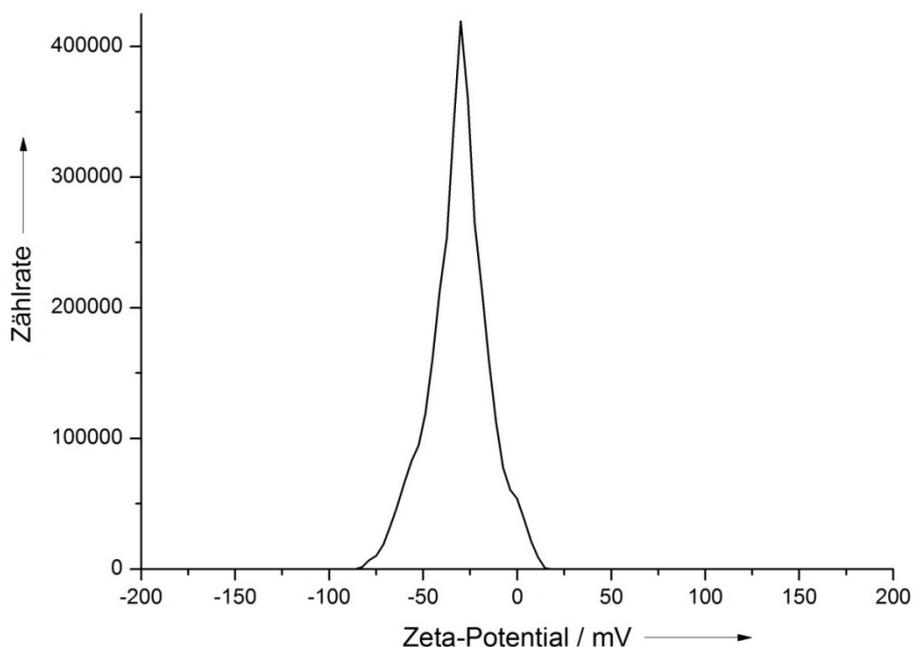
Die Abbildung zeigt eine enge Größenverteilung mit einem Maximum des hydrodynamischen Durchmessers bei 30 nm.

Abbildung 41 zeigt das Ergebnis der Charakterisierung mittels analytischer Scheibenzentrifugation. Das Maximum der Größenverteilung liegt bei 18 nm.



**Abbildung 41:** Mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmte Größenverteilung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

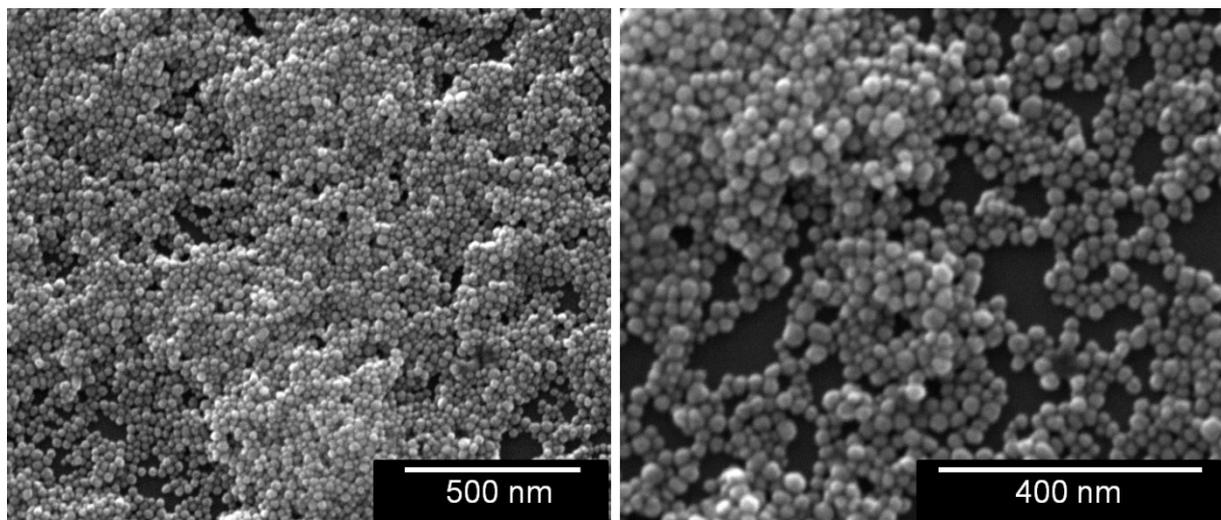
Es handelt sich um eine recht enge Größenverteilung, die allerdings eine kleine Schulter an der rechten Flanke des Graphen (bei größeren Durchmessern) aufweist. Das Zeta-Potential der Nanopartikel wurde ebenfalls bestimmt (Abbildung 42).



**Abbildung 42:** Zeta-Potential der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Das gemessene Zeta-Potential der Nanopartikel beträgt  $-31$  mV. Die Partikel sind also zusätzlich zur sterischen Stabilisierung durch das PVP noch elektrostatisch stabilisiert.

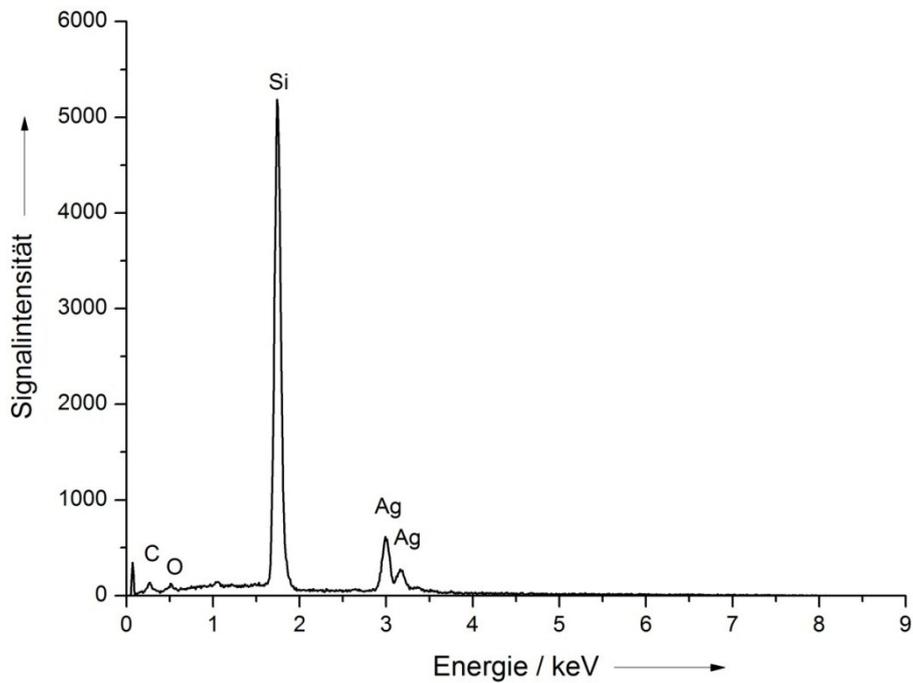
Die Nanopartikel wurden auch mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die Dispersion wurde hierfür auf einem Silicium-Wafer als Probenträger eingetrocknet. In Abbildung 43 ist links eine Übersichtsaufnahme bei 160000-facher Vergrößerung gezeigt. Rechts in der Abbildung ist eine Detailaufnahme bei 300000-facher Vergrößerung zu sehen.



**Abbildung 43:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

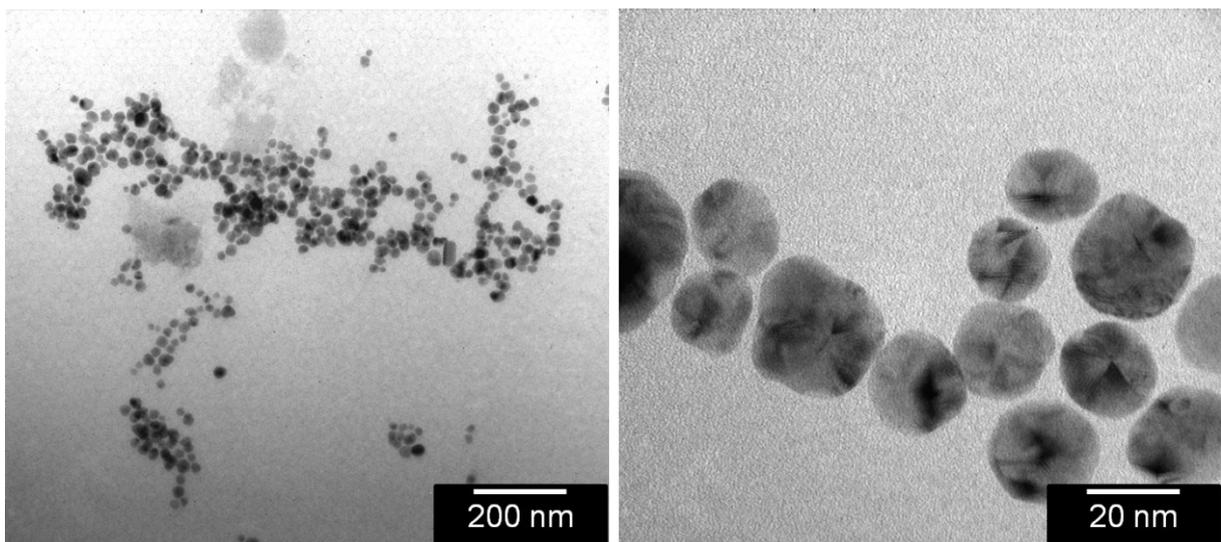
Es sind Nanopartikel mit annähernd sphärischer Morphologie zu erkennen. Die Partikel sind recht monodispers und weisen eine mittlere Größe von etwa 25 nm auf. Dabei handelt es sich um den Durchmesser des metallischen Kerns ohne Ligandenhülle.

Abbildung 44 zeigt ein EDX-Spektrum dieser Partikel, das während der Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen aufgenommen wurde. Neben dem prominenten Signal für Silicium, das von dem verwendeten Probenträger herrührt, sind Signale für Silber bei etwa 3 keV deutlich zu erkennen.



**Abbildung 44:** EDX-Spektrum der Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

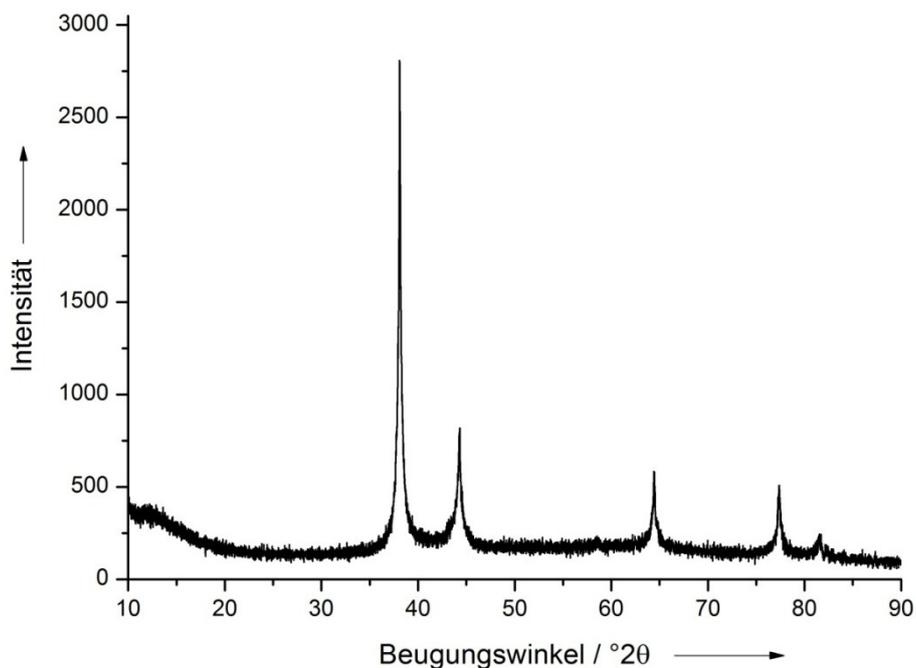
Ebenfalls sind Signale für Kohlenstoff und Sauerstoff bei 0,5 keV und darunter vorhanden, die von der Funktionalisierung der Partikel hervorgerufen werden. Die bei der Untersuchung der Nanopartikel im Transmissionselektronenmikroskop erhaltenen Aufnahmen sind in Abbildung 45 gezeigt.



**Abbildung 45:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Wie schon bei der Rasterelektronenmikroskopie wird hier nur der metallische Kern der Partikel berücksichtigt. Die Partikel erscheinen recht monodispers mit einer mittleren Größe von etwa 20 nm. Die Morphologie ist überwiegend sphärisch. Aus den unterschiedlichen Kontrasten verschiedener Bereiche der Partikel auf den Bildern ist zu schließen, dass es sich um polykristalline, mehrfach verzwilligte Partikel handelt.

Zur weiteren Beurteilung der Kristallinität wurde auch ein Röntgenpulverdiffraktogramm der Partikel aufgenommen. Dazu wurde die wässrige Dispersion ohne weitere Modifikation gefriergetrocknet und der trockene Rückstand mit Ethanol aufgenommen. Diese Suspension wurde auf einem Probenträger eingetrocknet. Das erhaltene Diffraktogramm ist in Abbildung 46 zu sehen.



**Abbildung 46:** Diffraktogramm der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

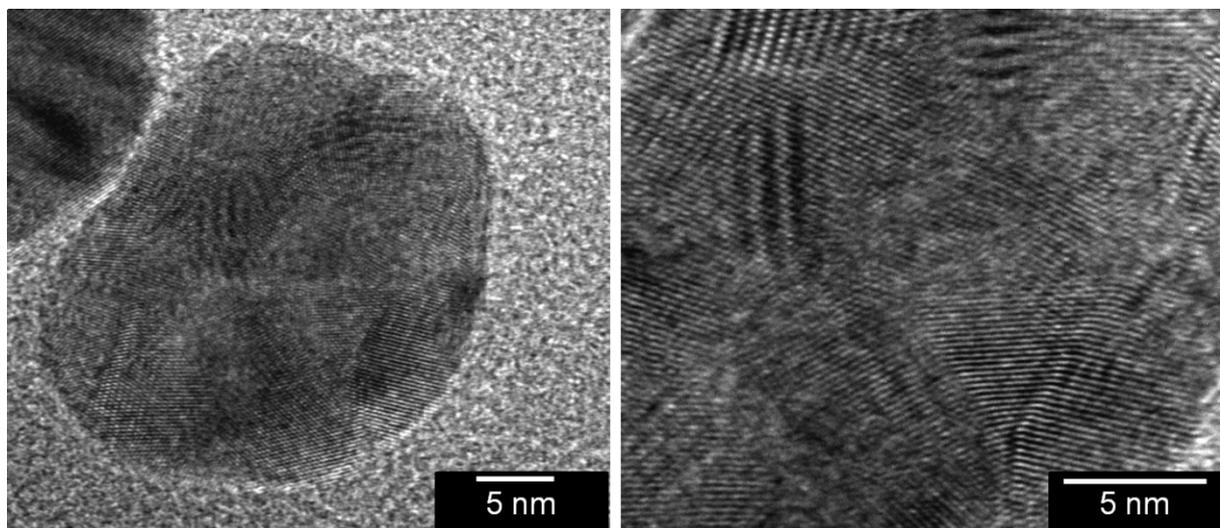
Es sind Signale für kubisch-flächenzentriertes (fcc) Silber vorhanden. Durch den nanokristallinen Charakter der Partikel sind die Reflexe verbreitert, und es ist ein recht hohes Rauschen der Messkurve vorhanden. Die Signale des Diffraktogramms stimmen mit den Literaturdaten für fcc-Silber überein.<sup>[145, 146]</sup> Die Reflexlagen des hier gezeigten Diffraktogramms und die theoretischen Werte (JCPDS - PDF # 00-004-0783) sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Gemessene Reflexlagen der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit Datenbank-Werten (JCPDS - PDF # 00-004-0783).

Millersche Indizes	111	200	220	311	222
Reflexlage (nach JCPDS)	38,117	44,279	64,428	77,475	81,539
Reflexlage (experimentell)	38,097	44,279	64,411	77,357	81,497

Aus dem Diffraktogramm wurden auch die Werte für den Gitterparameter und das Volumen der Elementarzelle errechnet. Diese betragen für den Gitterparameter  $a = 4,0880(3) \text{ \AA}$  und für das Elementarzellvolumen  $V = 68,32(1) \text{ \AA}^3$ . Dies stimmt mit den Literaturwerten von  $a = 4,0855(1) \text{ \AA}$  und  $V = 68,19(1) \text{ \AA}^3$  gut überein.<sup>[147]</sup>

Mit der Scherrer-Gleichung wurde die mittlere Kristallitgröße der Nanopartikel berechnet. Die mit der Halbwertsbreite berechnete Größe beträgt  $d_{FWHM} = 19 \text{ nm}$  und die mit der integralen Breite berechnete Größe  $d_B = 14 \text{ nm}$ . Die ermittelten Werte stimmen in etwa mit der Domänengröße der Partikel überein, die in den hochauflösenden transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der Nanopartikel überein (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

In der Abbildung sind die Domänen als unterschiedlich kontrastierte Bereiche auf dem linken Bild zu erkennen. Generell liegt die berechnete Kristallitgröße leicht über den Größen, die man aus den HR-TEM-Bildern entnehmen kann.

Die mittels Röntgenpulverdiffraktometrie ermittelten Partikelgrößen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der aus den XRD-Daten ermittelten Werte der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit Literaturwerten.

	gemessen	Literatur
<b>Gitterparameter / Å</b>	4,0880(3)	4,0855(1)
<b>Volumen der Elementarzelle / Å<sup>3</sup></b>	68,32(1)	68,19(1)
<b>Größe (Berechnung mit FWHM) / nm</b>	19	-
<b>Größe (Berechnung mit iB) / nm</b>	14	-

Der Umsatz dieser Synthese wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt und beträgt etwa 60 % bezogen auf die eingesetzte Masse an Silber. Ein UV/Vis-Spektrum der Partikel ist in Abbildung 58 gezeigt.

In Tabelle 7 sind zur Übersicht noch einmal alle gemessenen Partikelgrößen der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel wiedergegeben.

**Tabelle 7:** Zusammenfassung aller ermittelten Größen der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Messmethode	Partikelgröße / nm
<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	30
Analytische Scheibenzentrifugation	18
Rasterelektronenmikroskopie	25
Transmissionselektronenmikroskopie	20
Röntgenbeugung (mit FWHM berechnet)	19
Röntgenbeugung (mit iB berechnet)	14

Die Größe, die man mit der *Nanoparticle Tracking Analysis* erhält, liegt mit 30 nm etwas über dem anderen kolloidchemisch bestimmten Wert von 18 nm aus der Scheibenzentrifugation. Dies liegt zum einen daran, dass die NTA bei den vorliegenden Partikelgrößen bereits am Rande ihres Messbereiches operiert. 20 nm große Nanopartikel sind auch bei gut streuenden Materialien wie Gold oder Silber an der Grenze des mit dieser Methode messbaren Größenbereiches. Zum anderen tritt bei der analytischen Scheibenzentrifugation wieder das Phänomen auf, dass eigentlich eine Mischdichte aus dem Material des Partikelkerns und der Ligandenhülle für die Größenberechnung aus den Messdaten herangezogen werden müsste und durch die Verwendung der reinen Silberdichte die berechnete Größe geringer ausfällt.

Der Wert aus der Rasterelektronenmikroskopie gibt den Kerndurchmesser wieder und ist etwas größer als der ebenfalls den Kerndurchmesser ergebenden Wert aus der Transmissionselektronenmikroskopie. Das dürfte ebenfalls daran liegen, dass die 20 nm durchmessenden Partikel schon recht klein für eindeutige Beobachtungen im REM sind und die Größenbestimmung durch die dadurch begründete Unschärfe des aufgenommenen Bildes erschwert wird. Vermutlich wurden also die verschwommenen Randbereiche der Partikel für die Messung auf Grund der Bildunschärfe nicht stets korrekt erfasst.

Für den hydrodynamischen Durchmesser kann bei diesen Partikeln zusammenfassend  $25 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  angegeben werden und für den Kerndurchmesser  $20 \pm 5 \text{ nm}$ . Die Fehlergrenzen schließen Beobachtungen aus unterschiedlichen Chargen und Messungen mit ein.

Ein Mechanismus für die Reduktion von Silberionen mit Gerbsäure wurde von *Bulut et al.* vorgeschlagen.<sup>[156]</sup> Die hohe Dichte von Hydroxyl-Gruppen innerhalb der Gerbsäure-Moleküle (vgl. Abbildung 14) ermöglicht die extensive Bildung von intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und damit die Bildung von supramolekularen Aggregaten. Diese supramolekularen Käfigstrukturen sollen die kontrollierte Passage von Ionen und kleinen Nanopartikeln in die Käfigstruktur hinein bzw. wieder heraus ermöglichen und dadurch die Bildung von Nanopartikeln beeinflussen. Durch die hohe Hydroxylgruppen-Dichte ist innerhalb der Käfigstrukturen ein hydrophiler Bereich vorhanden, in dem Metallionen reduziert werden können und die Oberfläche der entstehenden Silber-Nanopartikel passiviert wird. Es wurde eine Anbindung der Silberionen an Hydroxylgruppen der Gerbsäure

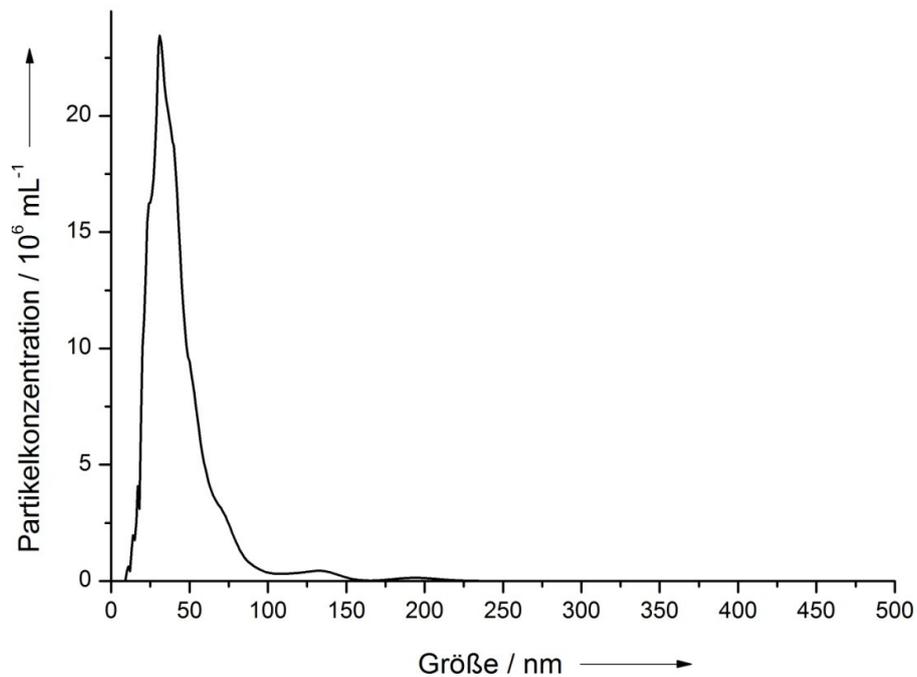
postuliert.<sup>[157-159]</sup> Die Hydroxylgruppen der Gerbsäure werden durch die Anlagerung der Silberionen zu Carboxylgruppen und der entstehende naszierende Wasserstoff reduziert die Silberionen zu Silberatomen.<sup>[156, 160-162]</sup> Durch die Einlagerung in die supramolekularen Käfigstrukturen geschieht diese Reduktion in räumlich getrennten, kleinen Gruppen, wodurch die Bildung der Nanopartikel gesteuert wird. Zusätzlich zu diesem Mechanismus ist auch ein Einfluss des vorhandenen Citrats auf die Reaktion und die letztendliche Funktionalisierung der Silber-Nanopartikel wahrscheinlich.

Die Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden für Auflösungsexperimente, für zellbiologische Untersuchungen, für die Gefriertrocknung bzw. Tiefkühlung und für Stabilitätsuntersuchungen in biologischen Medien verwendet.

#### **5.1.5 Charakterisierung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel**

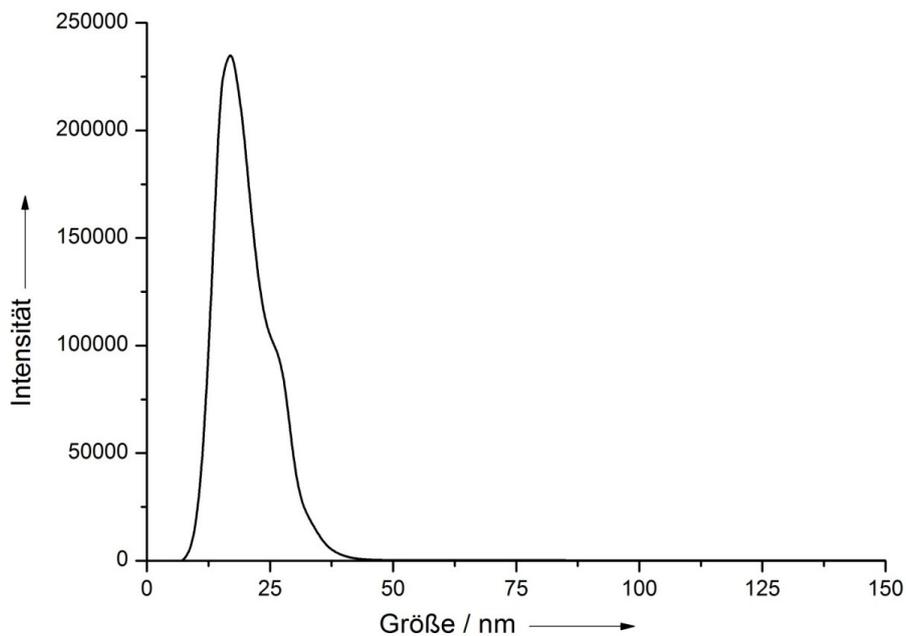
Wie schon die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel, wurden auch die mit TPPTS umfunktionalisierten Partikel mit kolloidchemischen Methoden und Elektronenmikroskopie untersucht.

Zunächst erfolgte die Charakterisierung hinsichtlich des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel mit der *Nanoparticle Tracking Analysis*. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 48 dargestellt. Die Dispersion wurde für die Messung stark mit Reinstwasser verdünnt. Es zeigt sich eine enge Größenverteilung mit einem Maximum bei 31 nm. Es sind kleine Mengen an Agglomeraten bei größeren Durchmessern zu erkennen.



**Abbildung 48:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

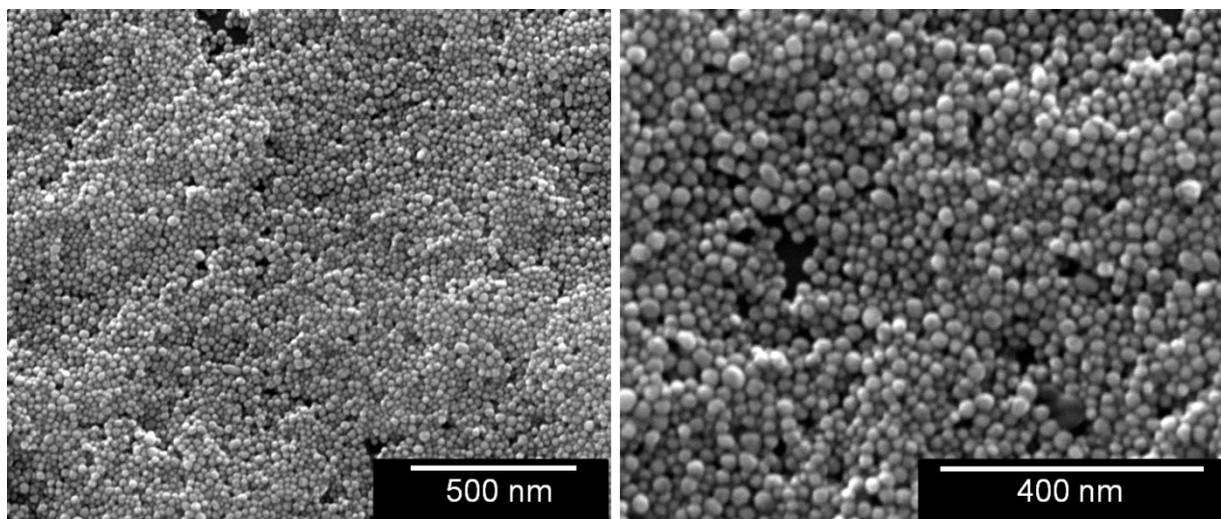
Die Messung mit der analytischen Scheibenzentrifugation zeigt Abbildung 49.



**Abbildung 49:** Mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmte Größenverteilung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

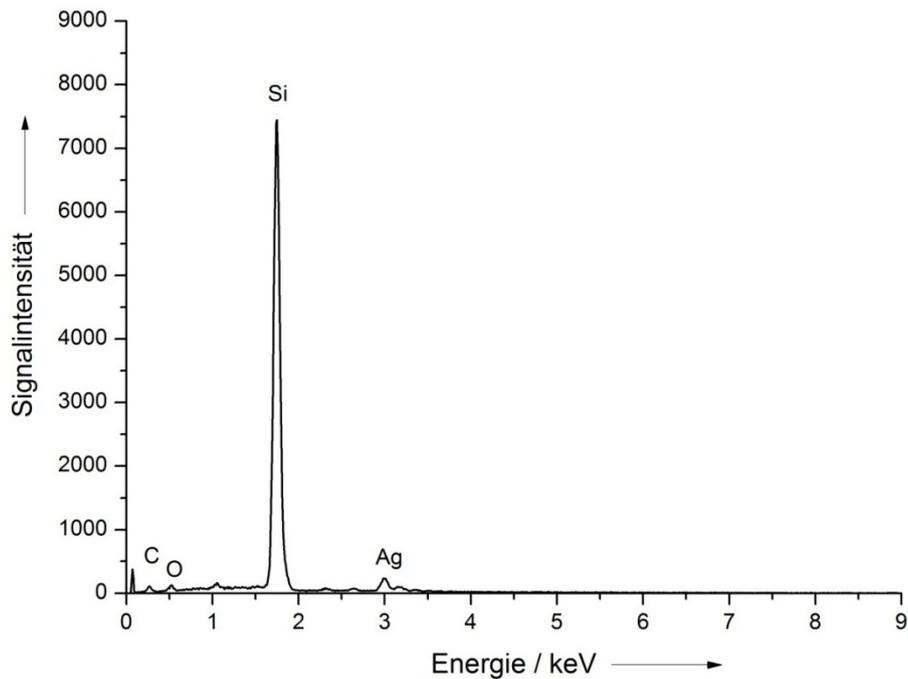
Die erhaltene Größenverteilung ist eng und weist ein Maximum bei 17 nm auf. An der rechten Flanke des Graphen ist eine geringe Schulterbildung zu größeren Durchmessern hin zu beobachten.

Zur Untersuchung des Kerndurchmessers der Partikel wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 50). Links ist eine Übersichtsaufnahme bei 150000-facher Vergrößerung zu sehen, auf dem rechten Bild handelt es sich um eine Detailaufnahme bei 300000-facher Vergrößerung. Zur Probenpräparation wurde ein Tropfen der Dispersion auf einem Probenträger aus Silicium eingetrocknet.



**Abbildung 50:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

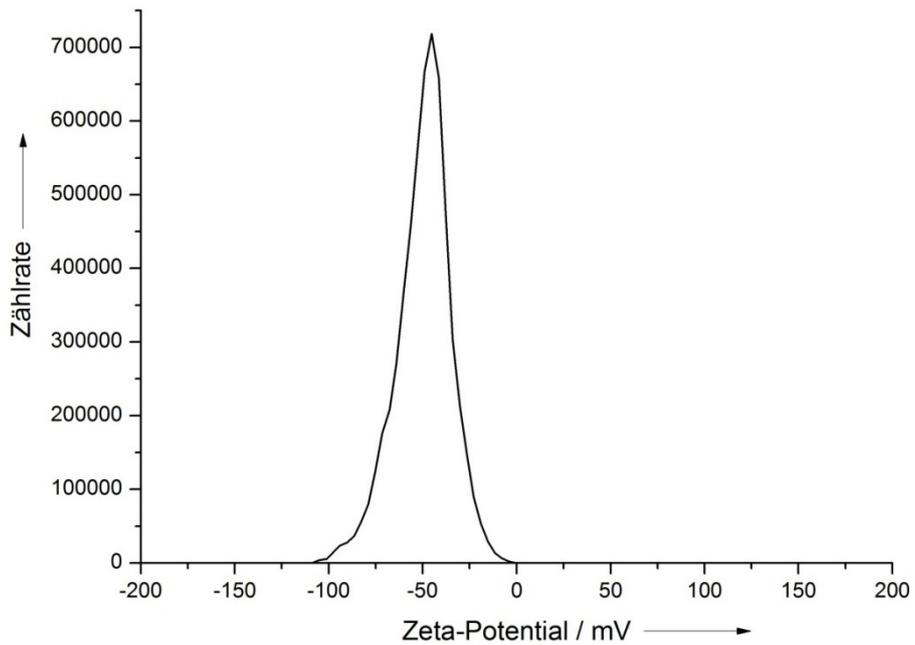
Es sind weitgehend monodisperse Nanopartikel mit sphärischer Morphologie zu erkennen. Der mittlere Durchmesser beträgt etwa 25 nm. Bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde auch ein EDX-Spektrum angefertigt, das in Abbildung 51 gezeigt ist.



**Abbildung 51:** EDX-Spektrum der Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

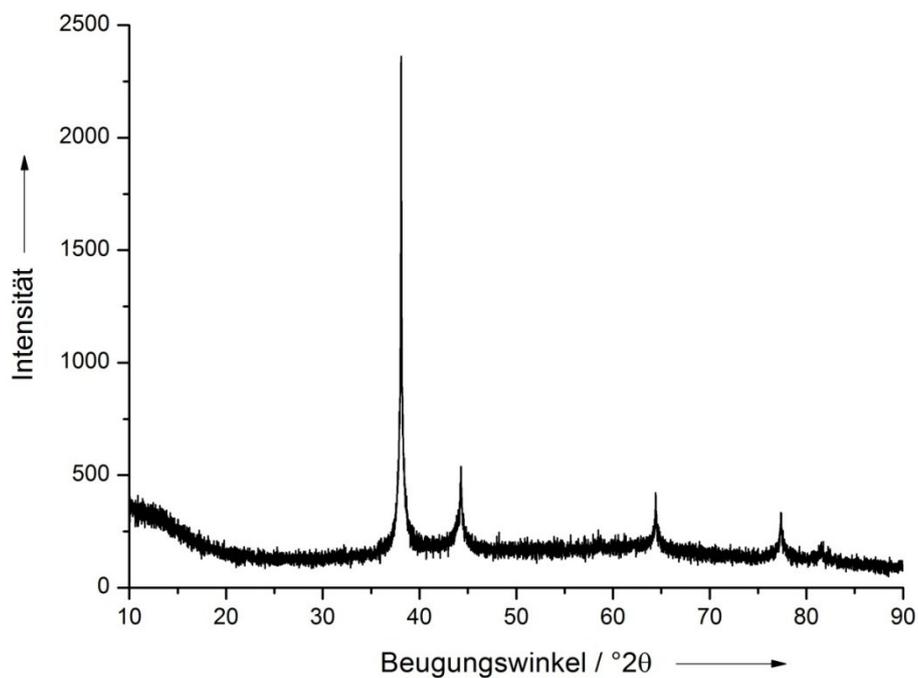
Neben dem von dem Silicium-Trägermaterial stammenden Silicium-Signal sind die Signale für Silber bei etwa 3 keV zu erkennen. Zusätzlich sind noch Signale für Kohlenstoff und Sauerstoff zu sehen. Der kleine Peak bei etwa 1 keV könnte von Natrium stammen, das aus dem zur Umfunktionalisierung verwendeten TPPTS-Natriumsalz stammt.

In Abbildung 52 ist das Ergebnis einer Zeta-Potential-Messung der mit TPPTS umfunktionalisierten Partikel zu sehen. Das gemessene Zeta-Potential beträgt -50 mV. Dies weist auf eine elektrostatische Stabilisierung der Nanopartikel hin.



**Abbildung 52:** Zeta-Potential der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Das von den Partikeln aufgenommene Röntgenpulverdiffraktogramm ist in Abbildung 53 gezeigt.



**Abbildung 53:** Diffraktogramm der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Für die Aufnahme wurde die Partikeldispersion gefrieretrocknet und das trockene Pulver mit Ethanol aufgeschlämmt. Diese Suspension wurde auf einem Probenträger eingetrocknet. Das Diffraktogramm zeigt die typischen Signale für kubisch-flächenzentriertes (fcc) Silber. Durch den nanokristallinen Charakter der Partikel sind die Reflexe verbreitert. Die Signale des Diffraktogramms stimmen mit den Literaturdaten für kubisch-flächenzentriertes Silber überein.<sup>[145, 146]</sup>

Die Reflexlagen des experimentell bestimmten Diffraktogramms und die theoretischen Werte aus der Datenbank (JCPDS - PDF # 00-004-0783) sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

**Tabelle 8:** Gemessene Reflexlagen der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit Datenbank-Werten (JCPDS - PDF # 00-004-0783).

Millersche Indizes	111	200	220	311	222
Reflexlage (nach JCPDS)	38,117	44,279	64,428	77,475	81,539
Reflexlage (experimentell)	38,101	44,283	64,418	77,365	81,506

Aus dem Diffraktogramm wurden auch die Werte für den Gitterparameter und das Volumen der Elementarzelle errechnet. Der Gitterparameter beträgt  $a = 4,0876(4) \text{ \AA}$  und das Volumen der Elementarzelle beträgt  $V = 68,30(2) \text{ \AA}^3$ . Dies stimmt mit den Literaturwerten von  $a = 4,0855(1) \text{ \AA}$  und  $V = 68,19(1) \text{ \AA}^3$  gut überein.<sup>[147]</sup>

Mit Hilfe der Scherrer-Gleichung wurde die mittlere Kristallitgröße der Nanopartikel berechnet. Die mit der Halbwertsbreite berechnete Größe beträgt  $d_{FWHM} = 22 \text{ nm}$  und die mit der integralen Breite berechnete Größe  $d_{iB} = 16 \text{ nm}$ . In Tabelle 9 sind alle aus dem Diffraktogramm berechneten Größen zusammengefasst.

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der aus den XRD-Daten ermittelten Werte der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit Literaturwerten.

	<b>gemessen</b>	<b>Literatur</b>
<b>Gitterparameter / Å</b>	4,0876(4)	4,0855(1)
<b>Volumen der Elementarzelle / Å<sup>3</sup></b>	68,30(2)	68,19(1)
<b>Größe (Berechnung mit FWHM) / nm</b>	22	-
<b>Größe (Berechnung mit iB) / nm</b>	16	-

In Tabelle 10 sind alle gemessenen Partikelgrößen der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel zusammengefasst.

**Tabelle 10:** Zusammenfassung aller ermittelten Größen der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

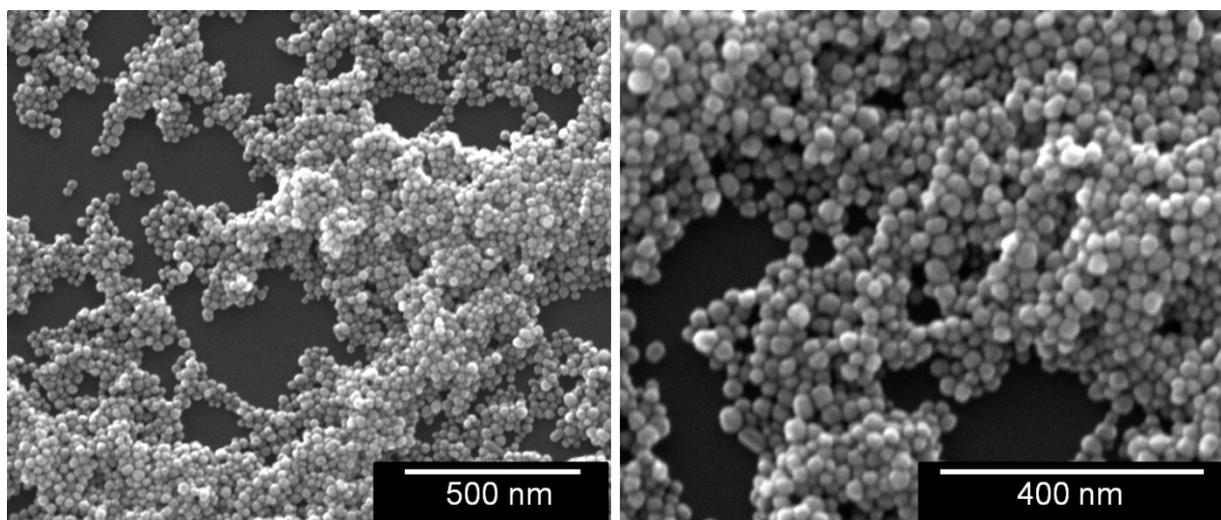
<b>Messmethode</b>	<b>Partikelgröße / nm</b>
<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	31
Analytische Scheibenzentrifugation	17
Rasterelektronenmikroskopie	25
Röntgenbeugung (mit FWHM berechnet)	22
Röntgenbeugung (mit iB berechnet)	16

Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel, der mittels NTA bestimmt wurde, liegt deutlich über dem Messwert der Scheibenzentrifugation. Dies liegt zum einen daran, dass die Partikel eine Größe haben, die für Messungen mit der NTA bereits an der unteren Grenze des Messbereiches liegt. Andererseits tendiert die Scheibenzentrifugation dazu, die hydrodynamische Partikelgröße leicht zu unterschätzen, was an der Beeinflussung der Ligandenhülle im Sedimentationsfeld der Zentrifuge liegt. Die Rasterelektronenmikroskopie ergab einen Kerndurchmesser von etwa 25 nm. Generell unterscheidet sich der metallische Kern der Partikel nicht von dem der mit PVP umfunktionalisierten Nanopartikel, da während der Umfunktionalisierung lediglich die Ligandenhülle verändert wird.

Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Partikel kann unter Berücksichtigung aller Messwertschwankungen und der Untersuchung verschiedener Partikelchargen mit  $25 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  angegeben werden. Der Kerndurchmesser beträgt wie bei den mit PVP umfunktionalisierten Nanopartikeln im Mittel entsprechend  $20 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ .

### 5.1.6 Charakterisierung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit den mit PVP und TPPTS umfunktionalisierten Partikeln

Die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Silber-Nanopartikel, die nicht mit PVP oder TPPTS umfunktionalisiert wurden, wurden ebenfalls charakterisiert, um die Unterschiede zwischen den mit unterschiedlichen Funktionalisierungen versehenen Partikeln zu untersuchen. In Abbildung 54 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel gezeigt. Das linke Bild ist eine Übersichtsaufnahme bei 160000-facher Vergrößerung, das rechte Bild zeigt die Partikel bei 300000-facher Vergrößerung.

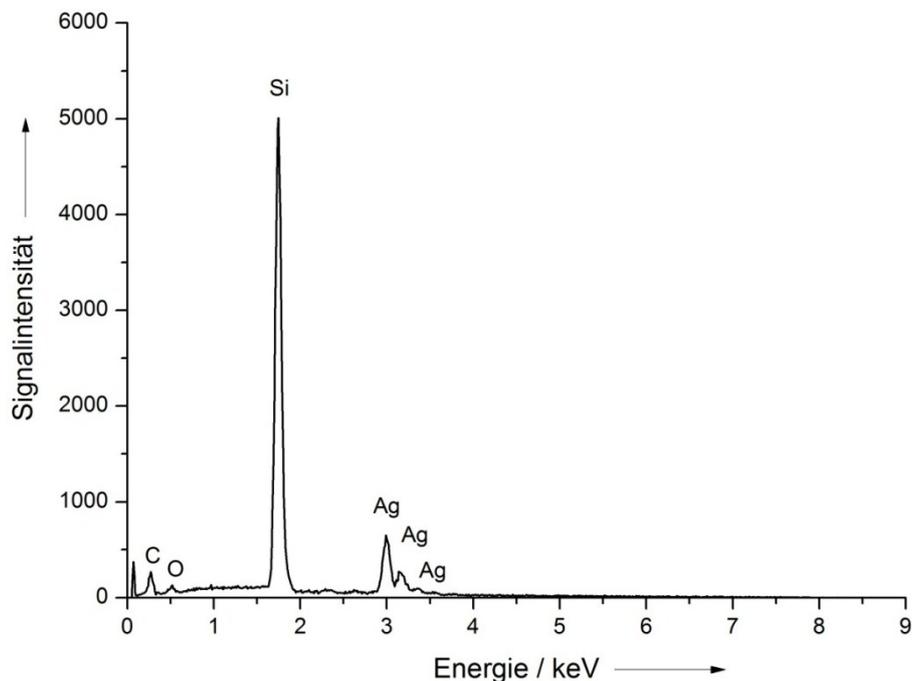


**Abbildung 54:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Es sind monodisperse, sphärische Partikel mit einer Größe von etwa 25 nm zu erkennen. Es sind keine Unterschiede in der Morphologie und Größe des Silberkerns im Vergleich zu den mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Partikeln zu erkennen. Da bei der Umfunktionalisierung nur die Ligandenhülle durch die Anlagerung eines neuen Stabilisators (möglicherweise unter Verdrängung der

ursprünglichen Funktionalisierung) verändert wird, der Silberkern aber nicht beeinflusst wird, war eine Veränderung des Kerns auch nicht zu erwarten, weder in der Größe noch in der Morphologie.

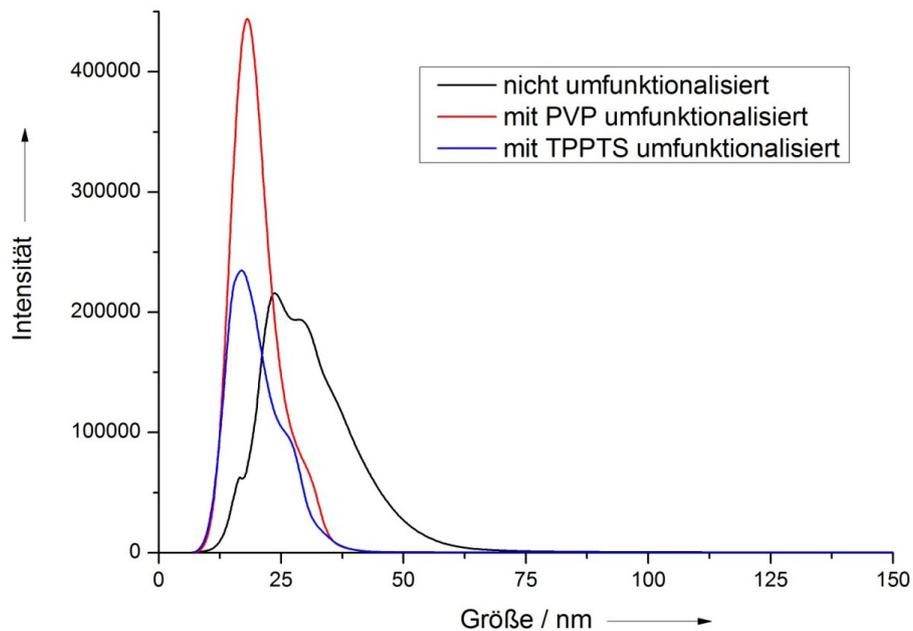
Abbildung 55 zeigt das EDX-Spektrum der nicht umfunktionalisierten Partikel, das während der Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop aufgenommen wurde.



**Abbildung 55:** EDX-Spektrum der Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

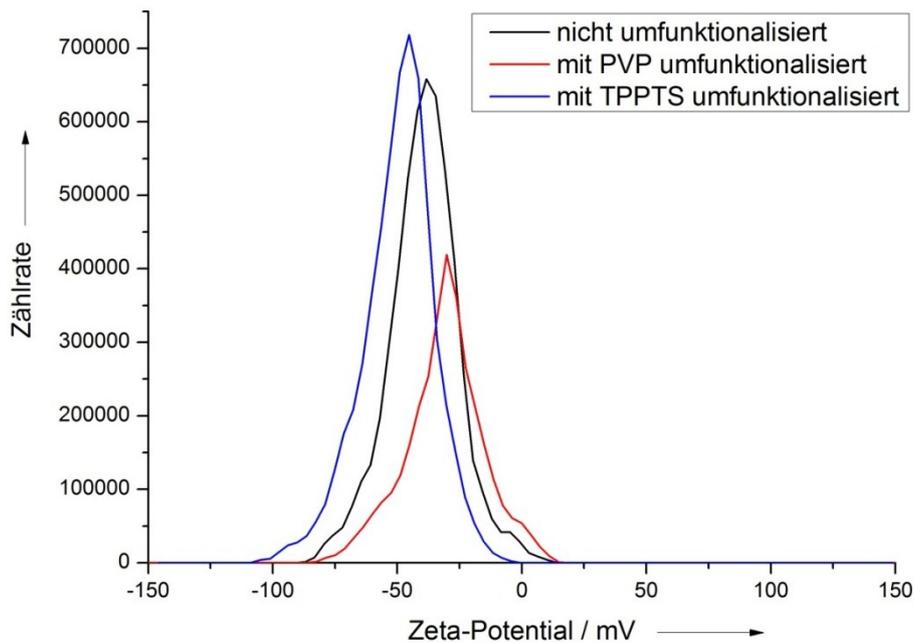
Das Spektrum weist einen großen Peak für Silicium auf, das als Probenträgermaterial diente. Daneben sind die Signale für Silber bei etwa 3 keV und Signale für Kohlenstoff und Sauerstoff bei weniger als 1 keV zu erkennen. Das Spektrum weist keinerlei grundlegende Unterschiede zu den umfunktionalisierten Nanopartikeln auf.

Das Ergebnis der Charakterisierung mittels analytischer Scheibenzentrifugation hinsichtlich des hydrodynamischen Radius nach der Reinigung der Partikel ist in Abbildung 56 dargestellt.



**Abbildung 56:** Vergleich der mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmten Größenverteilungen der jeweils mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten, mit PVP umfunktionalisierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Zum Vergleich sind die in den vorhergehenden Kapiteln gezeigten Größenverteilungen der mit PVP bzw. TPPTS umfunktionalisierten Nanopartikeln gezeigt. Die Kurve der nicht umfunktionalisierten Partikel (schwarze Kurve) zeigt ein Maximum bei 24 nm und eine vergleichsweise breite Größenverteilung. Die mit PVP (rote Kurve) und TPPTS (blaue Kurve) umfunktionalisierten Partikel weisen eine übereinstimmend deutlich geringere Größe auf und besitzen eine erheblich engere Größenverteilung. Dies weist deutlich darauf hin, dass die erfolgte Umfunktionalisierung die kolloidale Stabilität der Partikel merklich erhöht hat, was sich in diesem Fall bei der Belastung der Partikel durch die Reinigung mittels Ultrazentrifugation bemerkbar gemacht hat. Dies ist ein indirekter, aber bemerkenswerter Beweis für die erfolgreiche Umfunktionalisierung der Nanopartikel. Durch die Veränderung des Zeta-Potentials der Nanopartikel kann ebenfalls ein Hinweis auf die Umfunktionalisierung erhalten werden. In Abbildung 57 ist das Zeta-Potential der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel durch die schwarze Kurve dargestellt.



**Abbildung 57:** Zetapotential der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel (schwarze Kurve) und Vergleich mit den mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP (rote Kurve) bzw. TPPTS (blaue Kurve) umfunktionalisierten Silber-Nanopartikeln.

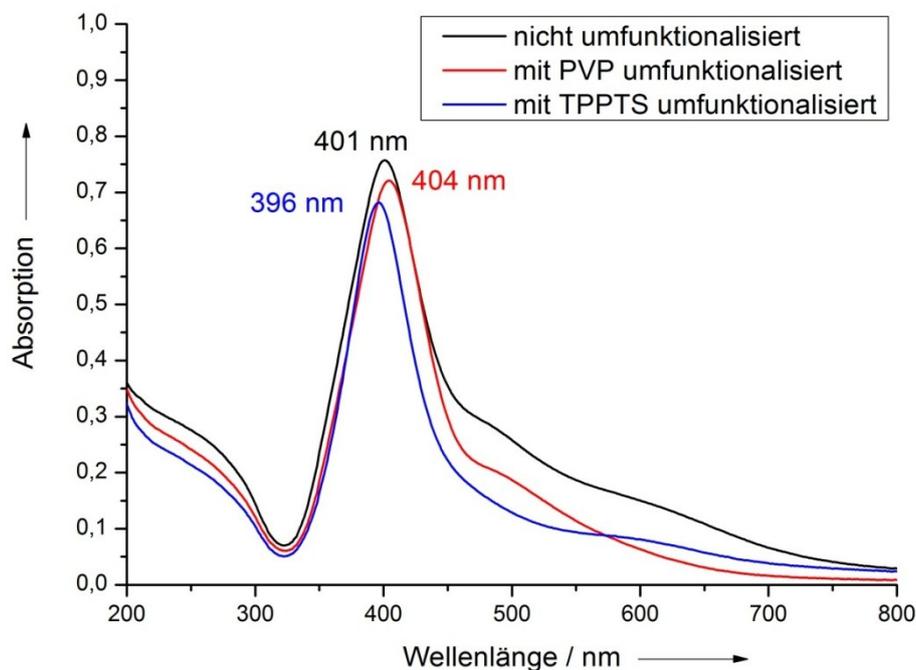
Ebenfalls dargestellt ist die Zeta-Potential-Kurve der mit PVP (rot) und mit TPPTS (blau) umfunktionalisierten Partikel. Das Zeta-Potential beträgt ohne Umfunktionalisierung -39 mV, was für eine elektrostatische Stabilisierung der Partikel spricht. Das Zeta-Potential ist nicht so stark negativ wie das der nur mit Citrat reduzierten Partikel (Abbildung 30). Dies dürfte daran liegen, dass auch die Gerbsäure zur Oberflächenfunktionalisierung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Partikel beigetragen hat und somit eine zusätzliche sterische Stabilisierung bewirkt.

Nach der Funktionalisierung mit PVP stieg das Zeta-Potential auf -31 mV. Dies lässt sich damit erklären, dass sich das neutrale Polymer über die primäre, aus Citrat, Gerbsäure, oder beiden Bestandteilen zusammengesetzte Funktionalisierung gelegt hat. Eine andere Möglichkeit ist die teilweise Verdrängung der primären Funktionalisierung durch das PVP. Das Zeta-Potential der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel (Abbildung 19) betrug -27 mV und war damit geringfügig positiver als die mit PVP umfunktionalisierten Partikel. Dies deutet darauf hin, dass noch geringe Anteile eines negativ geladenen Liganden wie Citrat vorhanden sein dürften.

Nach der Umfunktionalisierung mit dem negativ geladenen TPPTS betrug das Zeta-Potential -50 mV. Diese Verschiebung zu negativen Werten lässt sich auf die gleiche Weise erklären wie die Veränderung durch das PVP, also durch die teilweise oder vollständige Verdrängung der primären Funktionalisierung (insbesondere der Gerbsäure) durch das stark negativ geladene TPPTS.

Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Kurven des Zeta-Potentials bei den mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Nanopartikeln generell eine recht breite Verteilung aufweisen, was die Aussagekraft etwas schmälert.

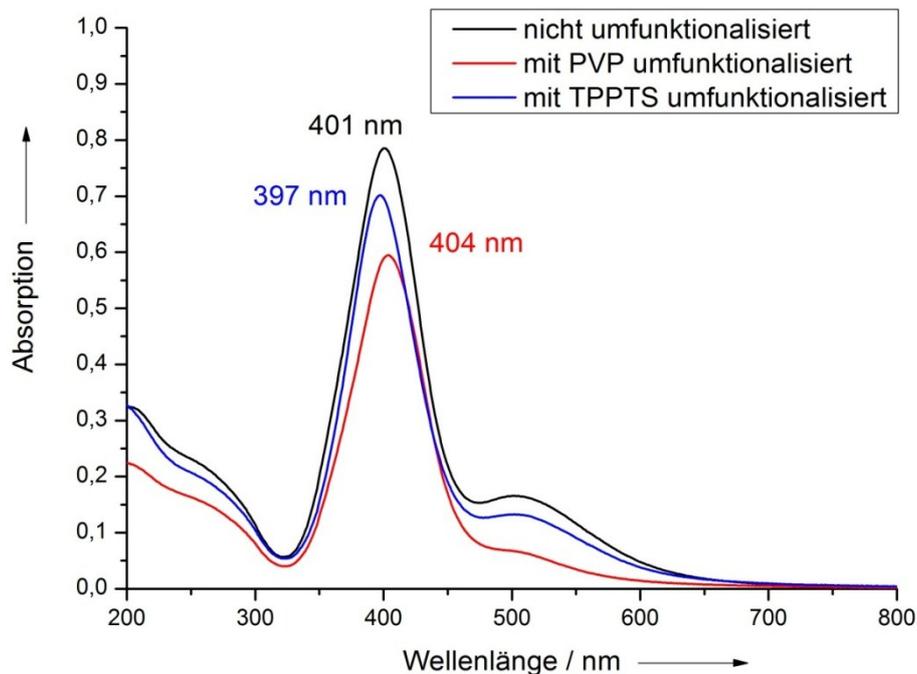
Zur weiteren Untersuchung der Umfunktionalisierung wurde ein UV/Vis-Spektrum der aufgereinigten Partikel angefertigt. Dieses ist in Abbildung 58 gezeigt.



**Abbildung 58:** UV/Vis-Spektren der jeweils mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten (schwarze Kurve), mit PVP umfunktionalisierten (rote Kurve) und mit TPPTS umfunktionalisierten (blaue Kurve) Silber-Nanopartikel, nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.

Neben dem Spektrum der nicht umfunktionalisierten Partikel (schwarze Kurve) sind auch die der mit PVP (rote Kurve) bzw. TPPTS (blaue Kurve) umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel gezeigt. Die Lage der Maxima des Spektrums um 400 nm ist entsprechend der Literatur typisch für die Oberflächenplasmonen-Absorption von Silber-Nanopartikeln.<sup>[163-165]</sup>

Es ist jeweils ein geringfügiger Unterschied zwischen den Maxima der verschiedenen funktionalisierten Silber-Nanopartikeln zu sehen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die chemische Umgebung der Partikel durch die Anlagerung der neuen Liganden verändert hat. Allerdings ist es nicht völlig auszuschließen, dass die Verschiebung des UV/Vis-Maximums durch Agglomerationserscheinungen zu Stande kommt, die durch die Belastung der Partikel bei der Zentrifugation entstehen. Daher wurde auch ein UV/Vis-Spektrum der Partikel ohne Aufreinigung nach der Umfunktionalisierung vorgenommen. Dazu wurden die Dispersionen nach der Zugabe der neuen Liganden und dem Rühren über Nacht ohne weitere Behandlung in eine Quarz-Küvette gegeben und vermessen.



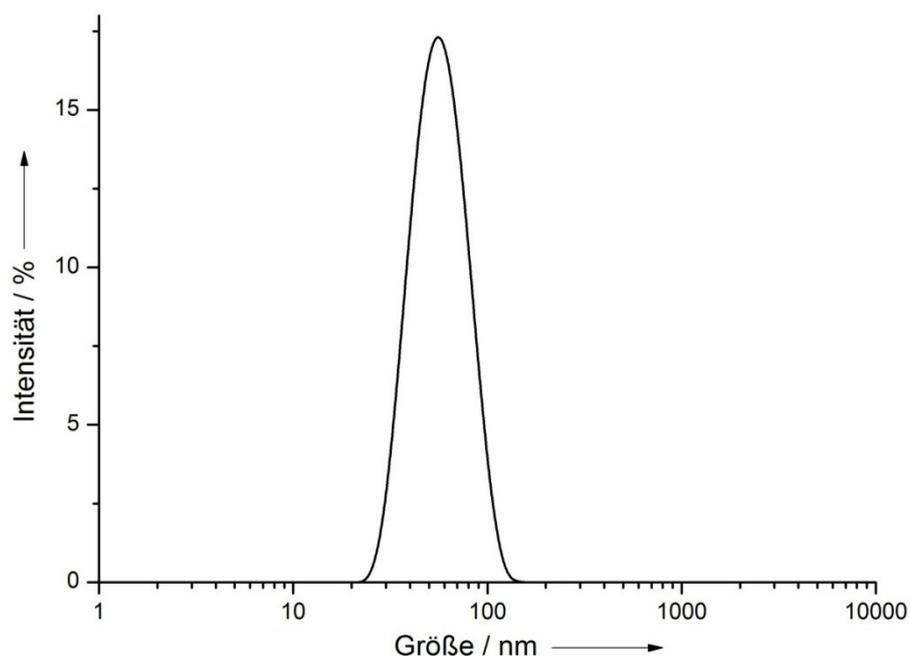
**Abbildung 59:** UV/Vis-Spektren der jeweils mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten (schwarze Kurve), mit PVP umfunktionalisierten (rote Kurve) und mit TPPTS umfunktionalisierten (blaue Kurve) Silber-Nanopartikel, ohne Aufreinigung.

Auch hier ist eine Verschiebung der Absorptionsbande um wenige Nanometer zu erkennen. Da dies nun nicht mehr durch Agglomeration während der Zentrifugation hervorgerufen worden sein kann, ist es wahrscheinlich, dass dieser Effekt tatsächlich durch die Umfunktionalisierung mit PVP oder TPPTS bedingt ist.

Die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden wegen ihrer mit den umfunktionalisierten Partikeln geringeren Stabilität nicht weiter verwendet.

### 5.1.7 Charakterisierung der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel

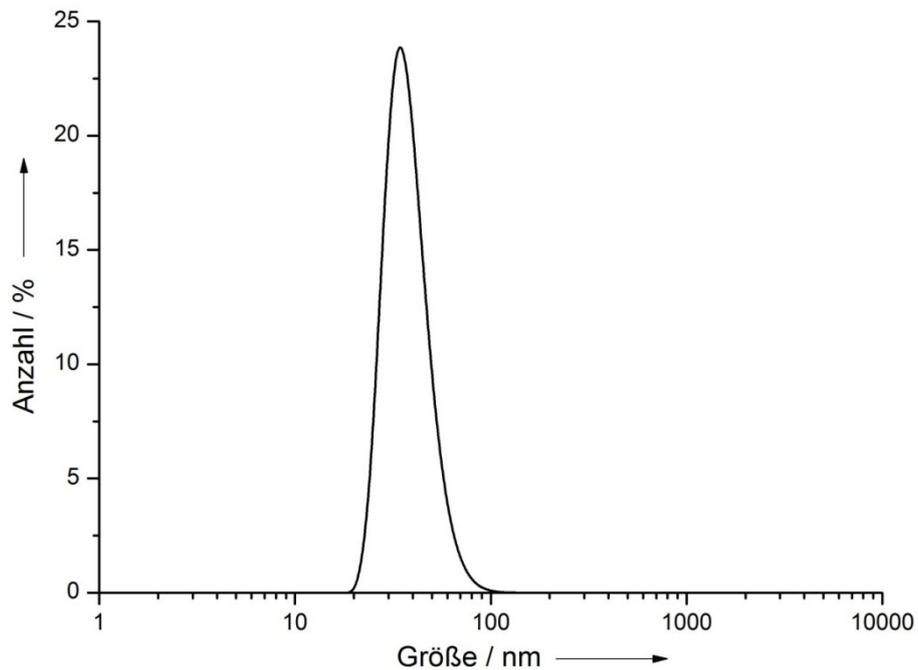
Die mittels des Polyol-Prozesses durch Reduktion mit Ethylenglycol erhaltenen PVP-stabilisierten Nanopartikel wurden mittels mehrerer kolloidchemischer Methoden und mittels Elektronenmikroskopie charakterisiert. Zunächst erfolgte die Charakterisierung mittels Dynamischer Lichtstreuung. Diese ergibt den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel. Die Partikel wurden als verdünnte wässrige Dispersion in einer Einwegküvette aus Polystyrol vermessen. Abbildung 60 zeigt die Auftragung nach der Streulichtintensität.



**Abbildung 60:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel, Auftragung nach der Streulichtintensität.

Der Z-Average beträgt bei dieser Messung 60 nm. Dabei ist wiederum zu beachten, dass der Z-Average eine gewichtete Größe ist. Das Maximum der Größenverteilung nach der Streulichtintensität liegt bei 56 nm. Der ermittelte Polydispersitätsindex bei

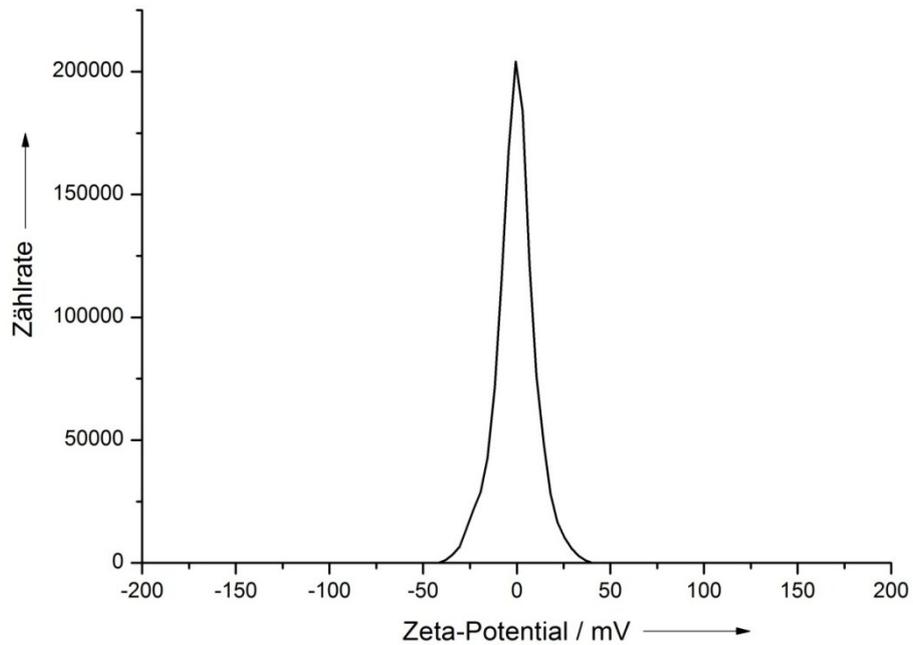
dieser Messung ist 0,290. In Abbildung 61 ist die gleiche Messung gezeigt, jedoch wird dort die Partikelgröße bezogen auf die Partikelanzahl aufgetragen.



**Abbildung 61:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel, Auftragung nach der Partikelanzahl.

Hier liegt das Maximum der Größenverteilung bei 34 nm.

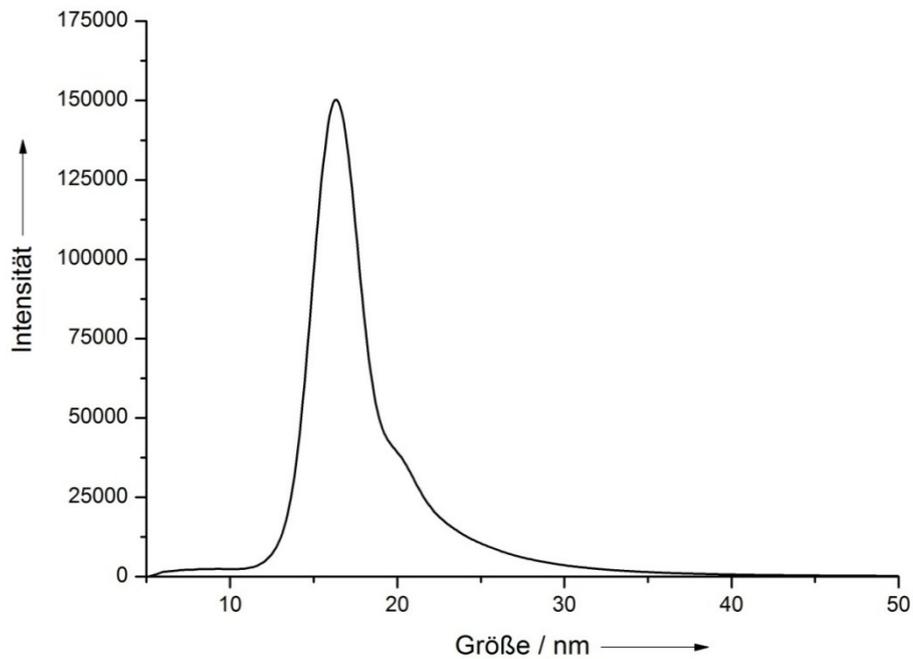
Das Ergebnis der Messung des Zeta-Potentials der Nanopartikel ist in Abbildung 62 gezeigt. Das Zeta-Potential wurde mit einer verdünnten Dispersion in einer Zeta-Potentialküvette aus Polycarbonat gemessen.



**Abbildung 62:** Zeta-Potential der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

Das ermittelte Zeta-Potential beträgt -1 mV. Das Zeta-Potential nahe Null weist auf die rein sterische Stabilisierung der Partikel durch das neutrale Polymer PVP hin.

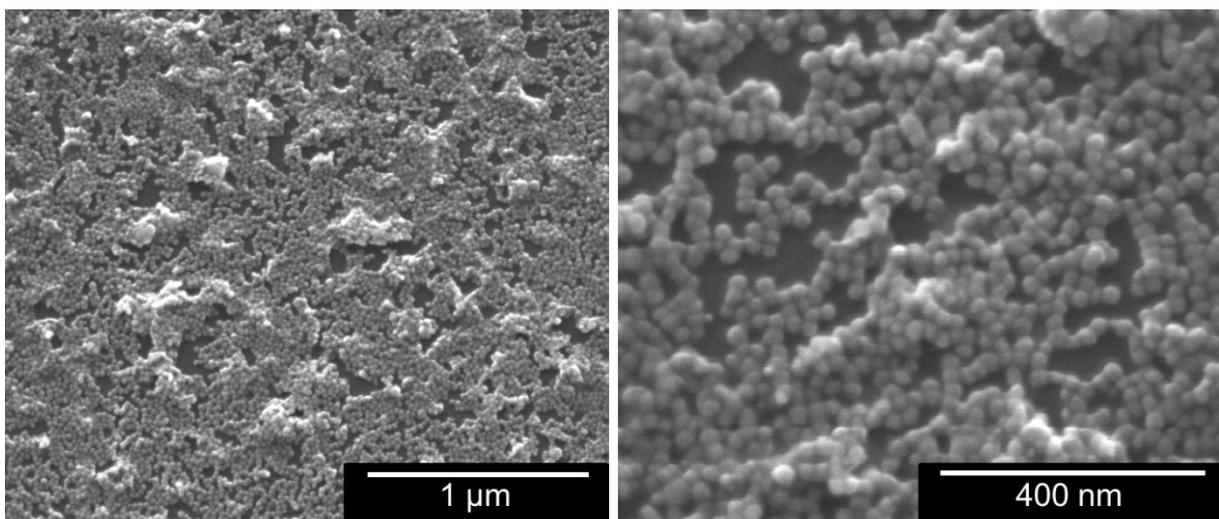
Die Partikel wurden ebenfalls mit der analytischen Scheibenzentrifugation vermessen. Für die Kalibrierung der Messung wurde ein Standard aus PVC-Nanopartikeln mit einer Größe von 377 nm verwendet. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 63 gezeigt.



**Abbildung 63:** Mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmte Größenverteilung der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

Man erkennt eine enge Größenverteilung der Partikel mit einem Maximum bei 16 nm. Die Messkurve weist eine geringfügige Schulter in Richtung größerer Partikeldurchmesser auf.

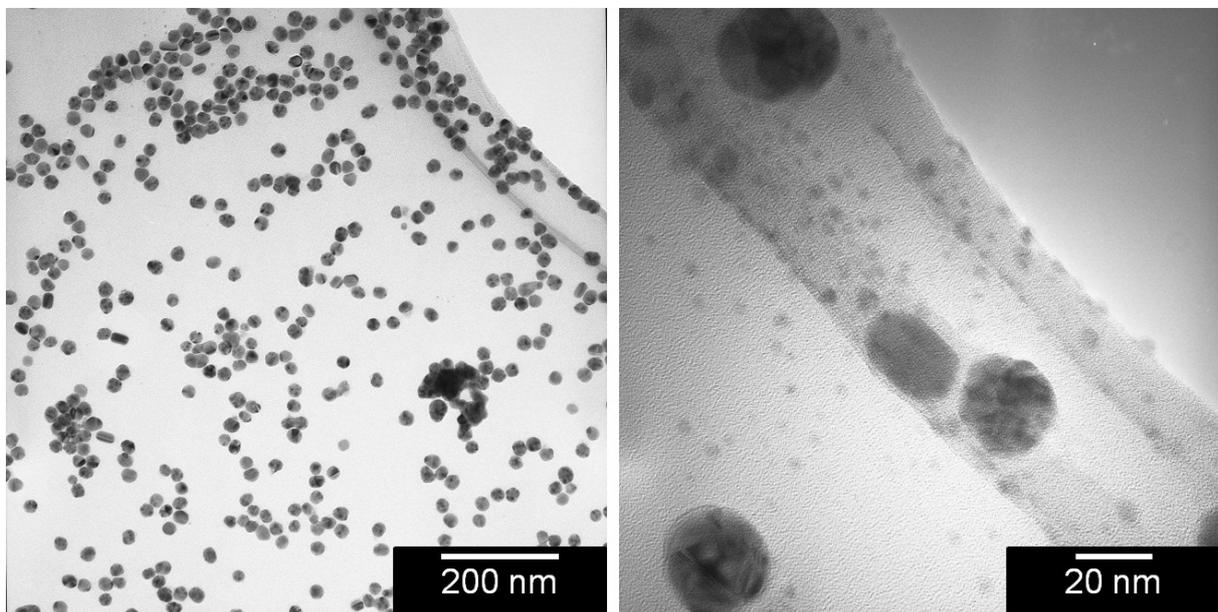
Abbildung 64 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Nanopartikel.



**Abbildung 64:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

Links ist eine Übersichtsaufnahme bei 100000-facher Vergrößerung zu sehen, rechts sind die Partikel bei 300000-facher Vergrößerung abgebildet. Die Dispersion wurde für die Aufnahme auf einem Silicium-Wafer als Probenträger eingetrocknet. Es sind sphärische Partikel mit einer monodispersen Größenverteilung zu sehen. Die aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelte mittlere Partikelgröße liegt bei etwa 25 nm. Dabei handelt es sich um den Durchmesser des metallischen Kerns ohne Ligandenhülle.

In Abbildung 65 sind transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Partikel gezeigt.



**Abbildung 65:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

Links ist eine Übersichtsaufnahme gezeigt, rechts eine Detailaufnahme einiger Partikel. Wie schon auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen, erkennt man auch hier monodisperse, sphärische Nanopartikel. Die Größe, die aus den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelt wurde, beträgt im Mittel 22 nm. Die Kontrastunterschiede innerhalb einzelner Partikel in der TEM-Detailaufnahme legen nahe, dass es sich auch hier um polykristalline Partikel handelt.

In Tabelle 11 sind alle gemessenen Größen der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel zusammengefasst.

**Tabelle 11:** Zusammenfassung aller ermittelten Größen der mit Ethylenglycol unter Zusatz von PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

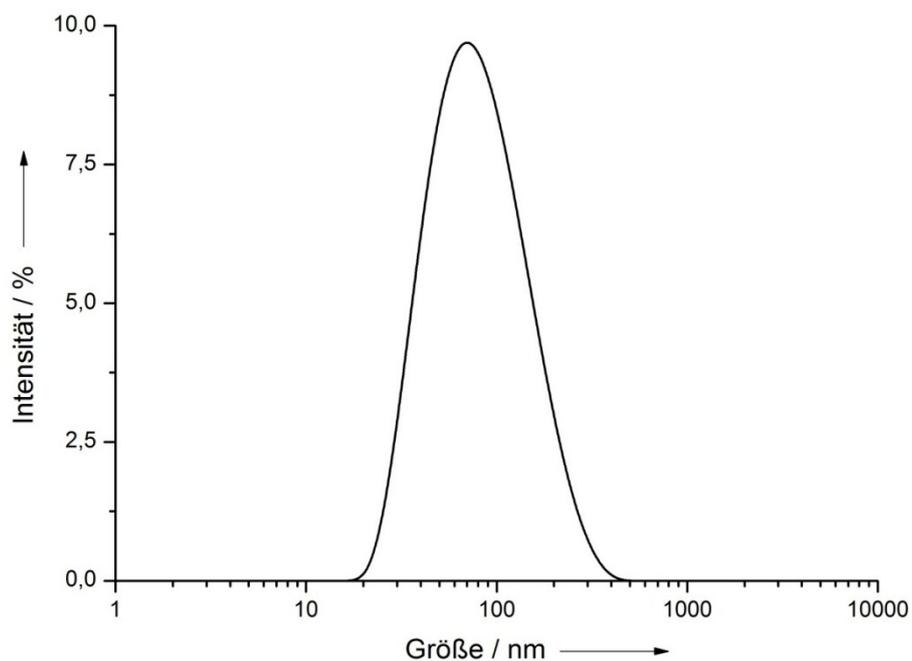
<b>Messmethode</b>	<b>Partikelgröße</b> / nm
Dynamische Lichtstreuung (Z-Average)	60
Dynamische Lichtstreuung (nach Partikelanzahl)	34
Analytische Scheibenzentrifugation	16
Rasterelektronenmikroskopie	25
Transmissionselektronenmikroskopie	22

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist der Z-Average von 60 nm bei einem nicht sehr monodispersen System wie diesem im Allgemeinen als zu hoch zu bewerten. Da der PDI in diesem Fall 0,290 beträgt, ist dieses Partikelsystem in der DLS als nur noch eingeschränkt monodispers anzusehen. Die Partikelgröße nach der Anzahl der streuenden Partikel, die aus der DLS erhalten wurde, ist mit 34 nm nur etwa halb so groß. Die Messung mit der analytischen Scheibenzentrifuge ergibt einen nochmals geringeren Wert von 16 nm. Der Einfluss der eigentlich anzunehmenden Dichte der Partikel inklusive der Ligandenhülle auf das Messergebnis wurde bereits bei der Charakterisierung der anderen Nanopartikel diskutiert.

Angesichts der kohärenten Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von 25 nm (REM) bzw. 22 nm) sind die kolloidchemischen Methoden in diesem Fall kritisch zu betrachten. Der hohe Messwert aus der DLS kann durch eine gewisse Agglomeration der Partikel in Dispersion verursacht worden sein. Der mittlere Partikelradius dürfte bei Berücksichtigung aller Messergebnisse mit etwa 22 nm anzugeben sein, da der Wert aus der Transmissionselektronenmikroskopie wegen der guten Qualität der Bilder am aussagekräftigsten ist. Dabei handelt es sich um den Durchmesser des metallischen Kerns der Partikel. Diese Partikel wurden trotz ihres in der Elektronenmikroskopie sehr monodispers erscheinenden Charakters wegen der eingeschränkten Reproduzierbarkeit der Synthese nicht weiter verwendet.

### 5.1.8 Charakterisierung der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel

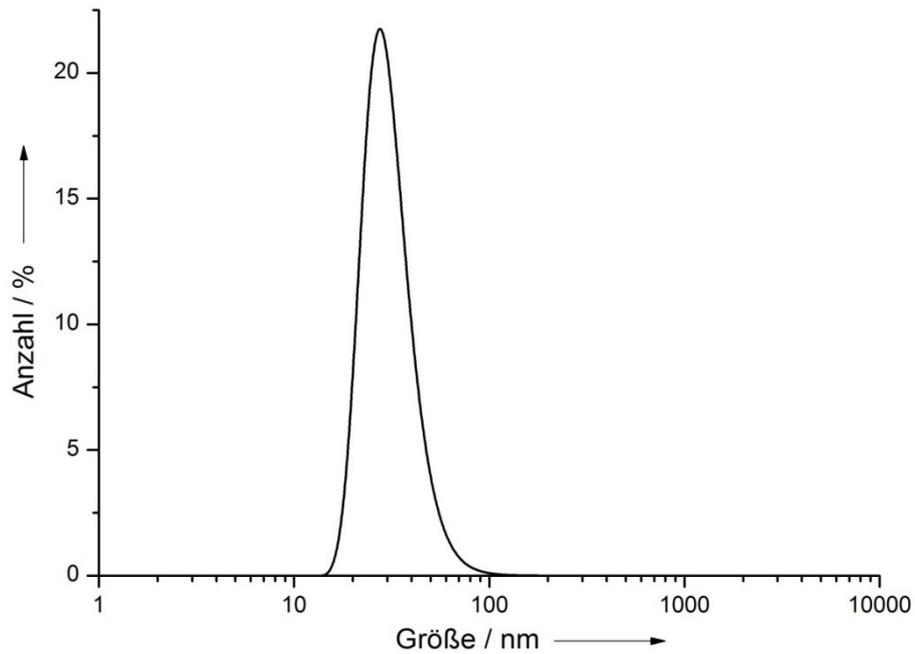
Die durch den Polyolprozess unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP synthetisierten Silber-Nanopartikel wurden ebenfalls mit verschiedenen kolloidchemischen Methoden und Elektronenmikroskopie charakterisiert. Abbildung 66 zeigt die Größenverteilung der Nanopartikel, die mit der Dynamischen Lichtstreuung ermittelt wurde. Es ist die Auftragung nach der Streulichtintensität gezeigt. Die Messung erfolgte anhand einer verdünnten wässrigen Dispersion in einer Einwegküvette aus Polystyrol.



**Abbildung 66:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel, Auftragung nach der Streulichtintensität.

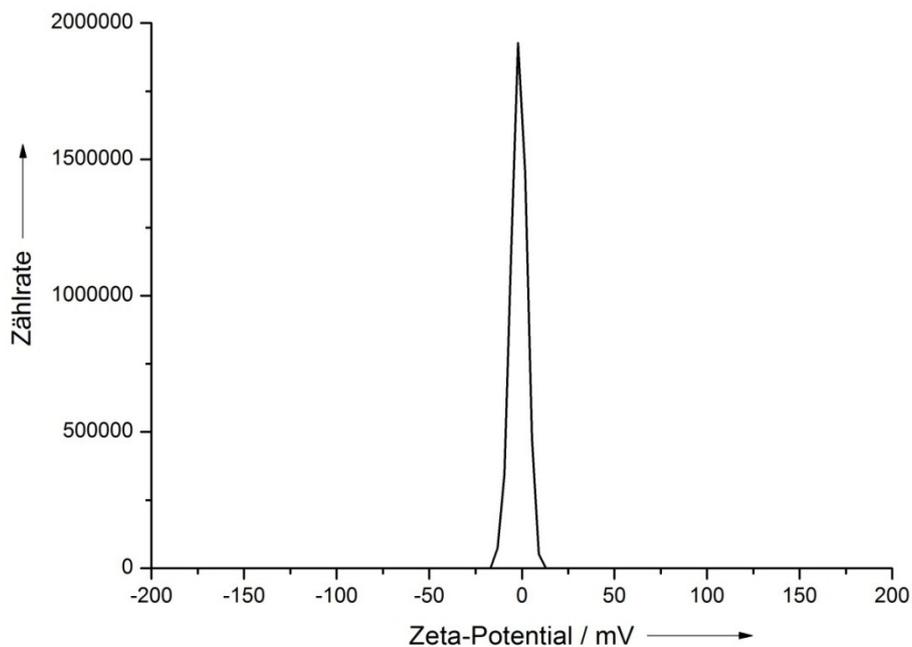
Das Maximum dieser Größenverteilung liegt bei 70 nm. Der Z-Average, also die durch die Software der DLS gewichtete mittlere Größe, liegt bei 65 nm. Der Polydispersitätsindex der Dispersion betrug bei dieser Messung 0,270. Man kann also noch von einem monodispersen System sprechen.

Die Auftragung dieser Messung nach der Partikelanzahl ist in Abbildung 67 gezeigt.



**Abbildung 67:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel, Auftragung nach der Partikelanzahl.

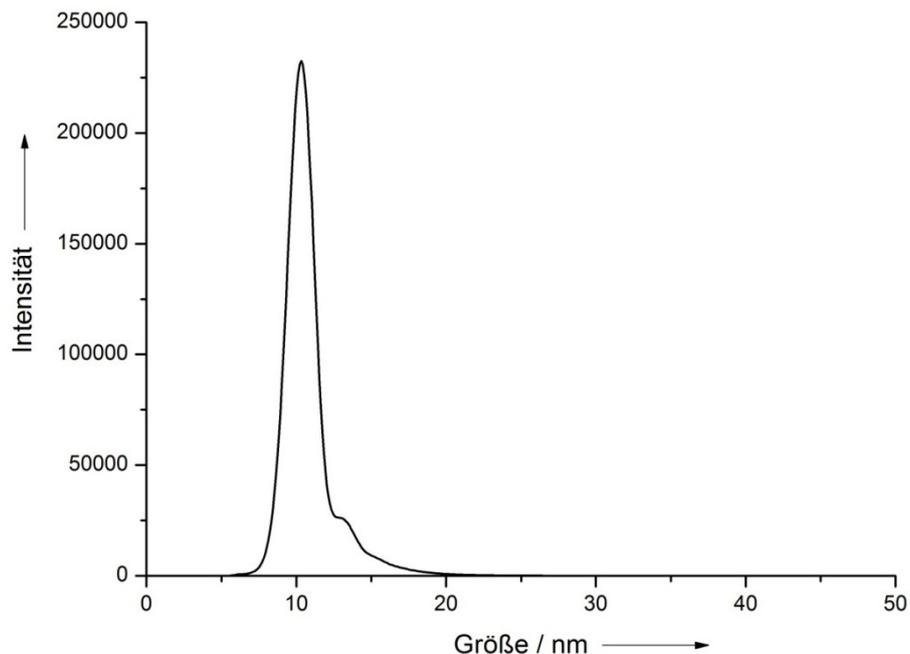
Bei dieser Darstellung der Partikelgrößenverteilung liegt das Maximum der Kurve bei 27 nm. Das Ergebnis der Messung des Zeta-Potentials der Nanopartikel zeigt Abbildung 68.



**Abbildung 68:** Zeta-Potential der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

Die Messung erfolgte in einer Einwegküvette aus Polycarbonat. Das Zeta-Potential der Nanopartikel beträgt  $-2$  mV. Dies bedeutet, die Partikel sind rein sterisch durch das neutrale Polymer PVP stabilisiert.

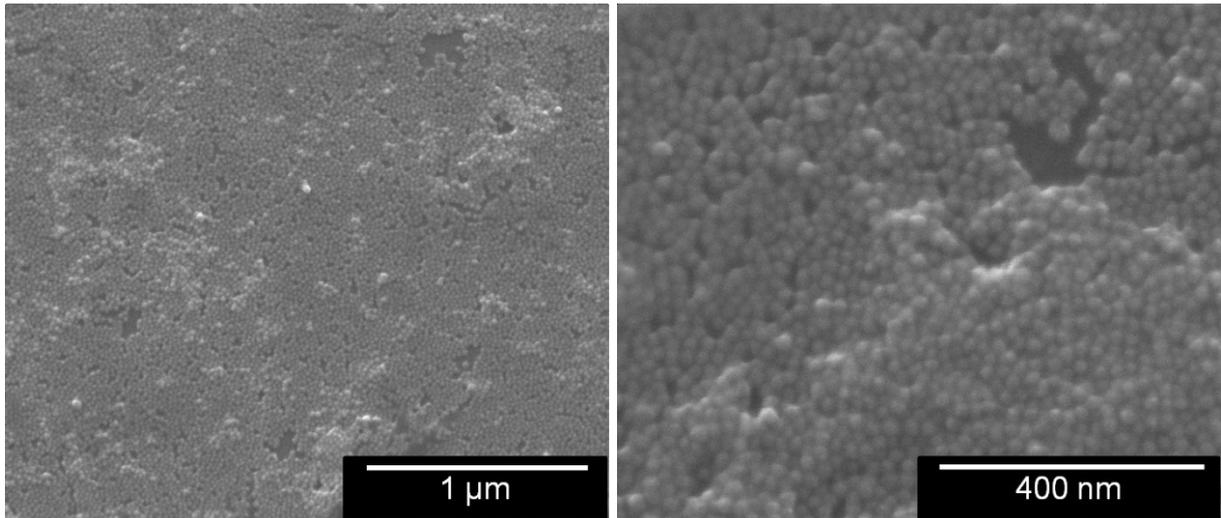
Die Nanopartikel wurden auch mittels Analytischer Scheibenzentrifugation charakterisiert. Das Messergebnis ist in Abbildung 69 gezeigt.



**Abbildung 69:** Mittels analytischer Scheibenzentrifugation bestimmte Größenverteilung der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

Man erkennt eine enge Größenverteilung mit einem Maximum bei 10 nm. Es ist ein Nebenpeak bei etwa 13 nm vorhanden, der allerdings erheblich kleiner ist.

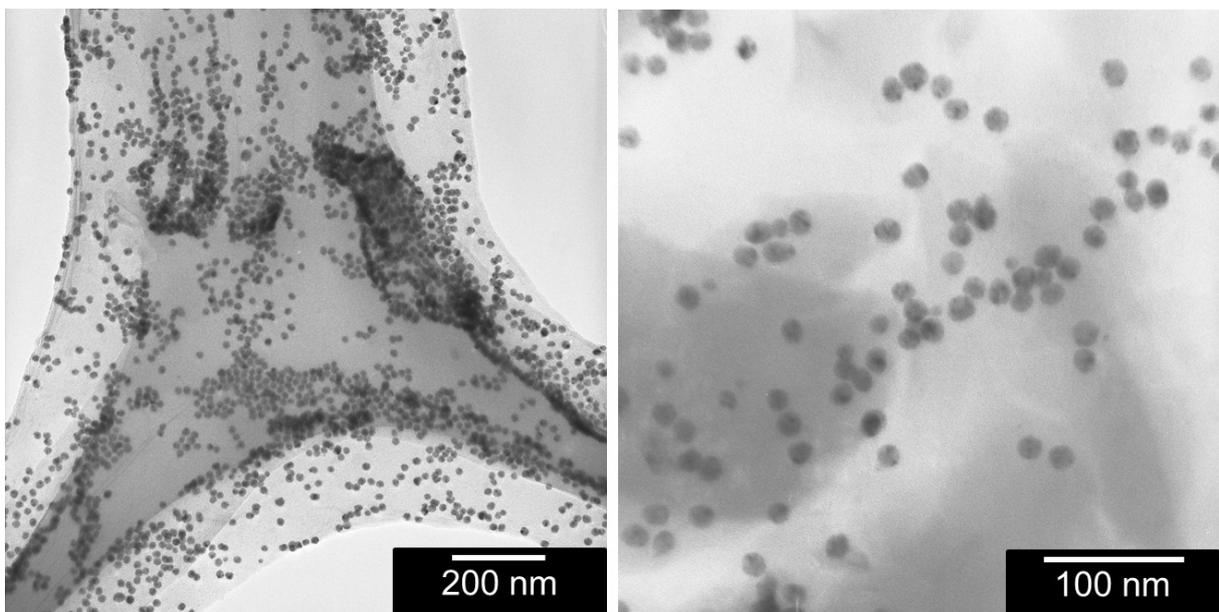
Es wurden auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. In Abbildung 70 ist links eine Übersichtsaufnahme der Partikel bei 100000-facher Vergrößerung zu sehen, rechts ist eine Aufnahme bei 300000-facher Vergrößerung gezeigt.



**Abbildung 70:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

Es sind sphärische Partikel zu erkennen. Der mittlere Kerndurchmesser beträgt etwa 20 nm, die Partikel sind monodispers. Auf Grund der hohen Polymermenge, die bei der Synthese verwendet wurde, sind die Bilder nicht sehr scharf, was die Größenbestimmung erschwert.

Abbildung 71 zeigt transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Nanopartikel.



**Abbildung 71:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

Wie schon auf den REM-Bildern sind monodisperse, sphärische Nanopartikel zu erkennen. Der aus den Aufnahmen ermittelte mittlere Durchmesser der Partikelkerne beträgt 18 nm. Die Kontrastunterschiede innerhalb einzelner Partikel auf der Detailaufnahme legen nahe, dass es sich um polykristallines Material handelt.

In Tabelle 12 sind alle ermittelten Partikelgrößen der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Zusammenfassung aller ermittelten Größen der mit Ethylenglycol unter Zusatz der zehnfachen Menge PVP reduzierten Silber-Nanopartikel.

Messmethode	Partikelgröße / nm
Dynamische Lichtstreuung (Z-Average)	65
Dynamische Lichtstreuung (nach Partikelanzahl)	27
Analytische Scheibenzentrifugation	10
Rasterelektronenmikroskopie	20
Transmissionselektronenmikroskopie	18

Der Z-Average mit einem Wert von 65 nm liegt, wie schon mehrfach erwähnt, bei nicht völlig monodispersen Systemen meist etwas zu hoch. Der mittels DLS ermittelte PDI der Nanopartikel war 0,270, was nah an der Grenze zur Polydispersität liegt. Allerdings zeigen die bildgebenden Methoden (REM und TEM), dass die Partikel monodispers vorliegen. Der stark erhöhte Z-Average könnte auch durch geringe Mengen an Agglomeraten hervorgerufen worden sein, die in der Dispersion vorlagen. Der mit der analytischen Scheibenzentrifuge ermittelte Wert liegt mit 10 nm aus den bereits diskutierten Gründen erheblich unter den Werten aus der Elektronenmikroskopie. Wegen der Unschärfe der REM-Bilder sind die TEM-Aufnahmen als am zuverlässigsten einzustufen. Die mittlere Partikelgröße kann daher mit etwa 18 nm angegeben werden, wobei es sich allerdings um den Durchmesser des metallischen Kerns der Nanopartikel handelt. Obwohl die Partikel in der Elektronenmikroskopie sehr monodispers und einheitlich erscheinen, wurden sie wegen der eingeschränkten Reproduzierbarkeit der Synthese nicht weiter verwendet.

### **5.1.9 Vergleich der verwendeten Messmethoden und Zusammenfassung der Charakterisierung der synthetisierten Silber-Nanopartikel**

Die Bestimmung der Größe der verwendeten Nanopartikeln ist ein ausgesprochen wichtiger Schritt bei der Untersuchung nanopartikulärer Eigenschaften, da die Größe von Nanopartikeln ihre physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften wesentlich beeinflusst.<sup>[166-169]</sup> Bei metallischen Nanopartikeln wurde beispielsweise die Größenabhängigkeit der Verteilung im Körper und der Toxizität gezeigt.<sup>[170-174]</sup>

Die auf unterschiedlichsten Wegen synthetisierten Silber-Nanopartikel wurden mit zahlreichen kolloidchemischen Methoden, der Elektronenmikroskopie und der Röntgenbeugung untersucht. Nicht alle Partikelsysteme wurden mit allen Methoden untersucht. Dies liegt daran, dass einige Partikelsysteme in dieser Arbeit in viel größerem Umfang für weitere Untersuchungen verwendet wurden als andere. Dies hängt nicht zuletzt mit der mehr oder weniger guten Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Synthesemethode zusammen. Ein weiterer Grund ist, dass nicht jedes Partikelsystem jeder Messmethode zugänglich ist, sei es wegen einer nicht möglichen Probenpräparation, einem unpassenden Messbereich oder auch, weil ein bestimmtes Messgerät zum Zeitpunkt der Synthese noch nicht vorhanden war.

Anhand der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel (Kapitel 5.1.1 und Tabelle 3) sollen exemplarisch die Stärken und Schwächen der einzelnen Messmethoden und ihrer Ergebnisse hinsichtlich ihrer Aussagekraft diskutiert werden.

Grundsätzlich liefern unterschiedliche Messgeräte bzw. -methoden zur Analyse der Größe von Nanopartikeln unterschiedliche Messergebnisse, die zum Teil erheblich voneinander abweichen. Dies liegt an den zu Grunde liegenden physikalischen Prinzipien, Wechselwirkungen der Partikel mit dem Messinstrument oder auch der besseren oder schlechteren Eignung einer bestimmten Partikelsorte für eine Messmethode. „Die Partikelgröße“ existiert nicht, sondern es muss stets angegeben werden, mit welcher Messmethode und unter welchen Bedingungen diese Größe ermittelt wurde, und ob der hydrodynamische Durchmesser oder der Kerndurchmesser gemeint ist.

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist sicher eine der am weitesten verbreiteten Methoden zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung. Sie ist einfach anzuwenden, kostengünstig und liefert schnell Ergebnisse. Sie beruht auf der Streuung von Laserlicht an den dispergierten Partikeln und ergibt den hydrodynamischen

Partikeldurchmesser. Die gemessene Streulichtintensität ist allerdings proportional zur sechsten Potenz des Partikeldurchmessers, was dazu führt, dass die DLS bei nicht sehr monodispersen Proben zur Überschätzung der Partikelgröße neigt. Auch von der Kugelform abweichende Morphologien stellen sie vor Probleme, besonders dann, wenn mehrere Morphologien zugleich vorliegen. Bei der Angabe des Z-Average bzw. der Partikelgrößenverteilung nach der Streulichtintensität ist also zu beachten, dass der Z-Average bereits durch geringe Mengen an Agglomeraten oder einen geringen Anteil größerer Partikel in einem System überproportional ansteigt. Dies führt dazu, dass dieser Wert bei den mit Glucose reduzierten und mit PVP funktionalisierten Silber-Nanopartikeln, die naturgemäß nicht völlig monodispers sind, mit 142 nm im Vergleich zu den übrigen erhaltenen Messergebnissen deutlich zu hoch liegt.

Besonderen Wert hat die starke Abhängigkeit der Streulichtintensität bzw. des Z-Average von der Partikelgröße und einer eventuell vorhandenen geringfügigen Agglomeration der Partikel allerdings bei der bewussten Beobachtung der Agglomeration von Nanopartikeln, z. B. in biologischen Medien (Kapitel 5.4 und Kapitel 5.5). Die Ergebnisse der DLS können zusätzlich zum Z-Average bzw. der Auftragung nach der Streulichtintensität auch noch nach der Anzahl oder dem Volumen der streuenden Partikel dargestellt bzw. in diese Darstellungen umgerechnet werden.<sup>[175]</sup> Dies führt zu anderen Größenverteilungen und anderen mittleren Partikelgrößen. Die Auftragung nach der Partikelanzahl ergab bei den mit Glucose reduzierten Nanopartikeln einen Durchmesser von 77 nm, was sich gut mit der NTA und den elektronenmikroskopischen Ergebnissen deckt (siehe unten). Die Auftragung nach dem Partikelvolumen wurde hier nicht gezeigt.

Mittels der *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) wird ebenso wie mit der DLS der hydrodynamische Partikeldurchmesser erhalten. Die Partikel werden in der Dispersion durch einen Laser beleuchtet und das seitlich herausgestreute Licht beobachtet. Die Brownsche Bewegung dieser Lichtstreuzentren wird aufgezeichnet und über die Messung der zurückgelegten Weglängen pro Zeiteinheit ausgewertet. Für die Messung muss die Probe sehr stark verdünnt werden, da sich sonst die Wege, die die einzelnen Partikel bzw. Streulichtzentren während der Beobachtung zurücklegen, zu oft kreuzen, was die Auswertung unmöglich macht. Diese starke Verdünnung ist gleichzeitig eine große Stärke der Methode, da sie Wechselwirkungen der Partikel untereinander vermindert, andererseits auch ein

Nachteil, weil die Proben durch diese Verdünnung im Allgemeinen für die weitere Verwendung verloren sind. Die mit den Glucose-reduzierten Partikeln erhaltene Partikelgröße betrug 80 nm, was gut mit den Ergebnissen aus der DLS (Auftragung nach Partikelanzahl) und der Elektronenmikroskopie übereinstimmt. Generell ist zu dieser Methode anzumerken, dass bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät eine nicht zu unterschätzende Fülle an Möglichkeiten besteht, die Messparameter in der Mess-Software zu modifizieren. Dies kann in Abhängigkeit von der Routine und den Kenntnissen des Bedieners der Apparatur durchaus zu Schwankungen der Messergebnisse führen. Durch die Verwendung der vorhandenen weitgehenden Automatismen bei der Aufnahme der Bewegungen der Streulichtzentren und der Auswertung der erhaltenen Aufzeichnungen kann eine unter Umständen unterstellte Willkür bei der Generierung des Messergebnisses allerdings entschieden verneint werden. Alle Messergebnisse dieser Arbeit wurden mittels der eben angesprochenen Automatismen in den Messeinstellungen durchgeführt.

Als letzte kolloidchemische Methode, die den hydrodynamischen Durchmesser ergibt, wurde die analytische Scheibenzentrifugation verwendet. Hierbei wird auf die dispergierten Partikel eine Zentrifugalkraft ausgeübt und ihre Sedimentationsgeschwindigkeit gemessen. Dabei gilt es zu bedenken, dass die Sedimentation in einer Lösung mit einem Dichtegradienten stattfindet. In diesem Fall handelte es sich um eine recht konzentrierte Saccharoselösung. Die Nanopartikel könnten also mit dieser Zuckerlösung wechselwirken, insbesondere hinsichtlich ihrer kolloidalen Stabilisierung und bei komplexeren Oberflächenfunktionalisierungen.

Bei der Betrachtung des Messergebnisses, das bei der Untersuchung der mit Glucose reduzierten Silber-Nanopartikel erhalten wurde (60 nm), fällt auf, dass dieser Wert erheblich unter allen anderen Messwerten liegt und sogar geringer ist, als der mittlere Kerndurchmesser, der aus der Elektronenmikroskopie ermittelt wurde. Dies liegt daran, dass die Dichte des nanopartikulären Materials die wesentliche Rolle bei der Auswertung der Sedimentation und damit auch der Berechnung der Partikelgröße spielt. Es kann naturgemäß nur die Dichte des eigentlichen Materials angegeben werden, aus dem die Partikel bestehen. In diesem Fall ist dies die Dichte von metallischem Silber. Da die Partikel aber noch eine Ligandenhülle haben, müsste man eigentlich eine Mischdichte für die Partikel angeben. Diese würde sich aus dem metallischen Kern und der Hülle, also der Funktionalisierung zusammensetzen und eine Art hydrodynamische Dichte ergeben. Die effektive

Dichte der Partikel (aus dem Kern und der Hülle) ist also geringer als die Dichte des reinen Kernmaterials, die man zur Auswertung der Messung heranzieht.

Da eine zuverlässige Abschätzung oder exakte Messung der Dicke und Beschaffenheit der Funktionalisierung (in diesem Fall der PVP-Hülle) schwierig oder gar unmöglich ist, tendiert die Scheibenzentrifugation generell zur Unterschätzung der Partikelgröße. Je größer der Dichteunterschied zwischen dem Material, aus dem die Nanopartikel bestehen, und der Funktionalisierung ist, und je sterisch aufwändiger die Funktionalisierung ist, desto stärker tritt dieser Effekt in den Vordergrund. Bei den relativ dichten Silber-Nanopartikeln mit einer Funktionalisierung aus PVP, deren Dichte man im gequollenen Zustand als im Bereich der Dichte von Wasser annehmen kann, und einer relativ dicken Polymerhülle um den Partikelkern, ist der Größenunterschied von ungefähr 20 nm im Vergleich zu den anderen Messmethoden also gut nachvollziehbar.

Die elektronenmikroskopischen Methoden (REM und TEM) ergeben im Allgemeinen nicht den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel, sondern den Durchmesser der festen Partikelkerne. Es sind keine Aussagen über den Zustand der Partikel in der Dispersion möglich, da die Dispersion bei der Probenvorbereitung auf dem REM- oder TEM-Probenträger eingetrocknet wird. Dabei setzen Agglomerationserscheinungen ein, und die Partikel können sich auch verändern. Dies betrifft vor allem die Funktionalisierung der Partikel, also zum Beispiel die Polymerhülle. Bei beiden Methoden wird zudem nicht die Dispersion als Gesamtsystem untersucht, sondern nur ein kleines Partikelensemble im gerade betrachteten Probenträgerabschnitt. Der wesentliche Vorteil dieser Methoden ist die Bildgebung. Man kann direkte Aussagen über die Morphologie der Partikel treffen. Bei einer ausreichend großen Anzahl an beobachteten Partikeln ist auch eine zuverlässige Aussage über die Größe und Größenverteilung möglich. Dies kann auch über Auswertprogramme geschehen. Während der Abbildung der Partikel ist es möglich, ein EDX-Spektrum aufzunehmen, um die Zusammensetzung der Partikel zu ermitteln. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie ist auch Elektronenbeugung möglich, um Informationen über die Kristallinität der Probe zu erhalten. Gewöhnlich kollabiert in dem Hochvakuum, das in den Geräten herrscht, die Hülle der Partikel und ihr Kontrast ist zu gering, um sie zu beobachten. Die Ligandenhülle ist nur in Ausnahmefällen darstellbar, beispielsweise bei der Kryo-TEM, bei der die wässrige Dispersion mit flüssigem Ethan zu einer amorphen

Eismasse gefroren wird. Die Möglichkeit, die Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln darzustellen, haben *Wang et al.* und *Neyman et al.* eindrucksvoll dargestellt.<sup>[176, 177]</sup> Die Größeninformationen aus REM und TEM sind im Allgemeinen identisch und betragen bei den mit Glucose reduzierten Nanopartikeln jeweils 70 nm. Bei sehr kleinen Partikeln ist das TEM dem REM meist überlegen, da die Auflösung bei letzterem höher ist.

Zusätzlich zu den hier angewandten Methoden gibt es noch weitere, weniger verbreitete Charakterisierungsmöglichkeiten für die Größe bzw. Größenverteilung von Nanopartikeln, die hier nicht weiter diskutiert werden sollen. Dies sind die asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (aFFFF),<sup>[178]</sup> die analytische Ultrazentrifugation<sup>[179, 180]</sup> und die Kleinwinkelstreuung von Röntgenstrahlung<sup>[181]</sup> oder Neutronen.<sup>[182, 183]</sup> Zusätzlich kann die Dynamische Lichtstreuung statt mit einem Festwinkeldetektor, wie er in marktüblichen und auch in dem hier verwendeten Messgerät meist zur Anwendung kommt, mit mehreren, nicht fixierten Detektionswinkeln arbeiten, was ihre Aussagekraft gerade bei polydispersen Systemen stark verbessert.<sup>[184, 185]</sup>

Es bleibt festzuhalten, dass die Charakterisierung von Nanopartikeln stets mit mehreren Methoden erfolgen sollte, falls dies möglich ist. Das schließt insbesondere die Elektronenmikroskopie ein, um Aussagen über die Morphologie der Partikel treffen zu können. Durch die Kombination mehrerer Methoden können Schwächen einzelner Methoden ausgeglichen bzw. überhaupt erst erkannt werden. Diese Forderung wird auch in der Literatur gestellt, beispielsweise von *Bootz et al.*, die Polymer-Nanopartikel mittels DLS, REM und analytischer Ultrazentrifugation untersuchten. Es wurde deutlich gemacht, dass nur alle drei Charakterisierungsmethoden gemeinsam aussagekräftige Ergebnisse lieferten.<sup>[186]</sup> Anhand von dispergierten Zinksulfid-Nanopartikeln haben auch *Dieckmann et al.* die Grenzen verschiedener Charakterisierungsmethoden dokumentiert,<sup>[178]</sup> während *Planken et al.* bei einer Untersuchung von Silica-Nanopartikeln die Grenzen der Dynamischen Lichtstreuung durch einen Vergleich mit analytischer Ultrazentrifugation und Transmissionselektronenmikroskopie aufgezeigt haben.<sup>[187]</sup>

Auch andere Autoren betonten, dass die Dynamische Lichtstreuung nur für monodisperse Partikelsysteme gute Ergebnisse liefert und dass mehrere Methoden zur Größenbestimmung ergänzend eingesetzt werden sollten.<sup>[188-190]</sup> Zusätzlich muss nach *Bowen* auch die Form der Nanopartikel berücksichtigt werden, um

aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.<sup>[191]</sup> Da in vielen Forschungsarbeiten nur eine Methode zur Größen-Charakterisierung von Nanopartikeln angewendet wird (typischerweise DLS oder TEM), erschwert dies den Vergleich von unterschiedlichen Ergebnissen sehr.

Die Synthese der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel zeichnet sich durch sehr gute Reproduzierbarkeit aus. Die Partikel weisen in gewissen Grenzen stets dieselbe Morphologie, Größe und Homogenität auf. Zusätzlich erhält man eine hohe absolute Ausbeute, weil mit einer sehr hohen Ausgangskonzentration an Silber gearbeitet wird. Dies insbesondere für weitergehende Experimente wichtig, da oftmals eine gewisse Minimalkonzentration an Silber bzw. Partikeln benötigt wird. Die Partikel sind auch in sehr hoher Konzentration (bis  $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in wässriger Dispersion über Monate hinweg kolloidal stabil und lagerfähig. Die Synthese ist weiterhin schnell und einfach durchzuführen und die Aufreinigung der Partikel mittels Ultrazentrifugation ist problemlos und beeinträchtigt nicht die Monodispersität der Partikel. Wie später gezeigt wird und früher gezeigt wurde<sup>[138]</sup>, sind die Partikel auch in Zellkulturmedien stabil.

Die mittels Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel sind nicht so gut reproduzierbar darstellbar wie die mit Glucose reduzierten Partikel. Die Synthese ist zwar weniger zeitaufwändig, ist aber dennoch schwieriger durchzuführen, weil der Endpunkt der Reduktion genau getroffen und die Dispersion dann mit Eis gekühlt werden muss. Die Kochzeit, bis dieser Punkt erreicht ist, variiert aus unbekanntem Gründen erheblich (zwischen 6 min und 12 min). Die Partikel weisen eine vergleichsweise geringe Monodispersität und auch von der sphärischen Gestalt abweichende Morphologien auf. Es können zwar auch ausreichend hohe Silberkonzentrationen bei der Synthese erhalten werden, allerdings ist dafür die Verarbeitung eines großen Volumens nötig. Die Dispersion muss bei der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation dazu stark aufkonzentriert werden. Es ist nur eine einmalige Zentrifugation möglich, da die Partikel bei einer zweiten Zentrifugation nicht redispersierbar sind. Generell sind die mit Citrat reduzierten Nanopartikel wegen ihrer rein elektrostatischen Stabilisierung durch das Citrat kolloidal nicht sehr stabil. Daher eignen sich diese Partikel nicht so gut für biologische Untersuchungen. Auch eine Umfunktionalisierung mit dem Liganden TPPTS bringt keine nennenswerten Vorteile. Die Partikel sind

zwar nach der Umfunktionalisierung kolloidal etwas stabiler, allerdings bleiben die Probleme bei der Synthese bestehen, da ja zunächst die mit Citrat reduzierten und funktionalisierten Nanopartikel hergestellt werden müssen.

Die Reduktion mit einem Gemisch aus Citrat und Gerbsäure ergab in guter Ausbeute besonders kleine Silber-Nanopartikel. Silber-Nanopartikel in dieser Größenordnung sind sonst nur entweder in organischen Lösungsmitteln oder durch Reduktion mit Borhydrid zu synthetisieren. Bei der Synthese in organischen Lösungsmitteln sind oftmals die Ausbeute und die Überführbarkeit in ein wässriges Medium (Zellkulturmedium) eingeschränkt. Es muss betont werden, dass bei dieser Synthese keine zelltoxischen Reagenzien verwendet werden wie beispielsweise das häufig eingesetzte Tensid CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid).<sup>[192-194]</sup> Die Synthese ist einfach und sehr schnell durchzuführen und liefert sehr gut reproduzierbare Ergebnisse. Die mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Partikel sind durch mehrfache Ultrazentrifugation aufzureinigen, ohne dass ihre kolloidale Stabilität oder Monodispersität verloren geht. Die Ausbeute der Synthese erlaubt es, Dispersionen mit ausreichend hoher Silberkonzentration für zellbiologische und andere Anwendungen bereitzustellen. Sowohl die mit TPPTS als auch die mit PVP umfunktionalisierten Partikel sind kolloidal für mehrere Monate stabil und zeigen auch in Zellkulturmedien eine ausreichende Stabilität.

Die nach dem Polyolprozess synthetisierten Nanopartikel sind relativ klein und monodispers, allerdings ist die Synthese nicht zuverlässig und dauerhaft reproduzierbar. Die Größe der erhaltenen Nanopartikel variierte bei gleichen Bedingungen häufig. Es wurde ein Einfluss der Wassergehaltes des verwendeten Ethylenglycols und eine Veränderung der Ausgangslösung von Silbernitrat in Ethylenglycol beim Stehenlassen beobachtet. Die Partikel sind auch schwieriger zu reinigen sind als bei einer wässrigen Dispersion, da das hochviskose Ethylenglycol lange Zentrifugationszeiten und hohe Rotationsgeschwindigkeiten erfordert, um die Partikel daraus abzutrennen. Darüber hinaus muss mehrmals mit Ethanol oder Aceton und mit Wasser gewaschen werden, um das Ethylenglycol vollständig aus der Dispersion zu entfernen.

Alle synthetisierten und charakterisierten Silber-Nanopartikel sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13:** Zusammenfassung aller synthetisierten Silber-Nanopartikel, ihrer Funktionalisierung, ihrer Größe und ihrer weiteren Verwendung in dieser Arbeit.

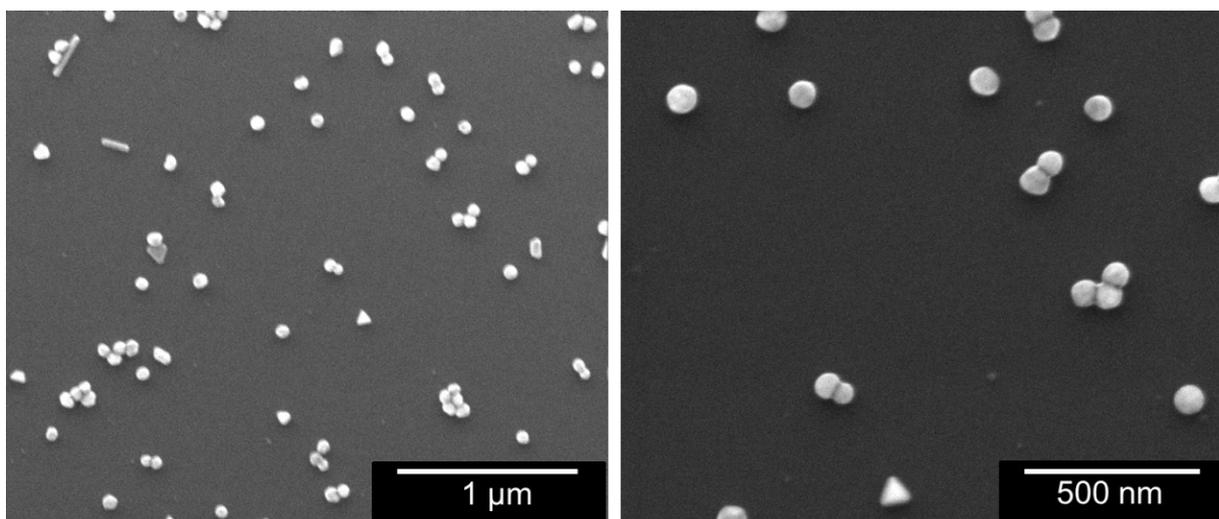
<b>Partikelsorte (Synthesemethode)</b>	<b>Funktionalisierung</b>	<b>Kerndurchmesser</b>	<b>weitere Verwendung in dieser Arbeit</b>
Reduktion mit Glucose	PVP	70 nm	Auflösung, zellbiologische Experimente, Stabilität in Medien, Gefriertrocknung, BSA-Adsorption
Reduktion mit Citrat	Citrat	45 nm	Auflösung
Reduktion mit Citrat	TPPTS	45 nm	keine
Reduktion mit Citrat und Gerbsäure	Citrat/Gerbsäure	20 nm	keine
Reduktion mit Citrat und Gerbsäure	TPPTS	20 nm	Auflösung, zellbiologische Experimente, Stabilität in Medien, Gefriertrocknung, BSA-Adsorption
Reduktion mit Citrat und Gerbsäure	PVP	20 nm	Auflösung, zellbiologische Experimente, Stabilität in Medien, Gefriertrocknung, BSA-Adsorption
Polyol-Prozess	PVP	22 nm	keine
Polyolprozess	PVP	18 nm	keine

Die Nanopartikel, die für weitere Untersuchungen, insbesondere für Experimente mit Zellkulturen, verwendet werden sollten, mussten folgende Anforderungen erfüllen: Die Synthese muss gut und einfach reproduzierbar sein, die Partikel müssen eine hohe kolloidale Stabilität aufweisen, es müssen hohe Silber- bzw. Partikelkonzentrationen in wässriger Dispersion erhalten werden und die Partikel müssen mittels Ultrazentrifugation ohne nennenswerte Qualitätseinbußen zu reinigen sein. Diese Anforderungen werden besonders gut von den mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln und von den mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikeln erfüllt. Daher wurden diese Partikelsorten bevorzugt für die weiteren Untersuchungen in

dieser Arbeit verwendet, wie schon in den Kapiteln zur Charakterisierung der einzelnen Partikel und in Tabelle 13 ausgeführt wurde.

Zusätzlich wurden die mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel für Löslichkeitsuntersuchungen verwendet, da dies im Zusammenhang mit früheren Arbeiten<sup>[143, 195]</sup> interessant war, und die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, nicht umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden für die Versuche zur Adsorption von BSA verwendet.

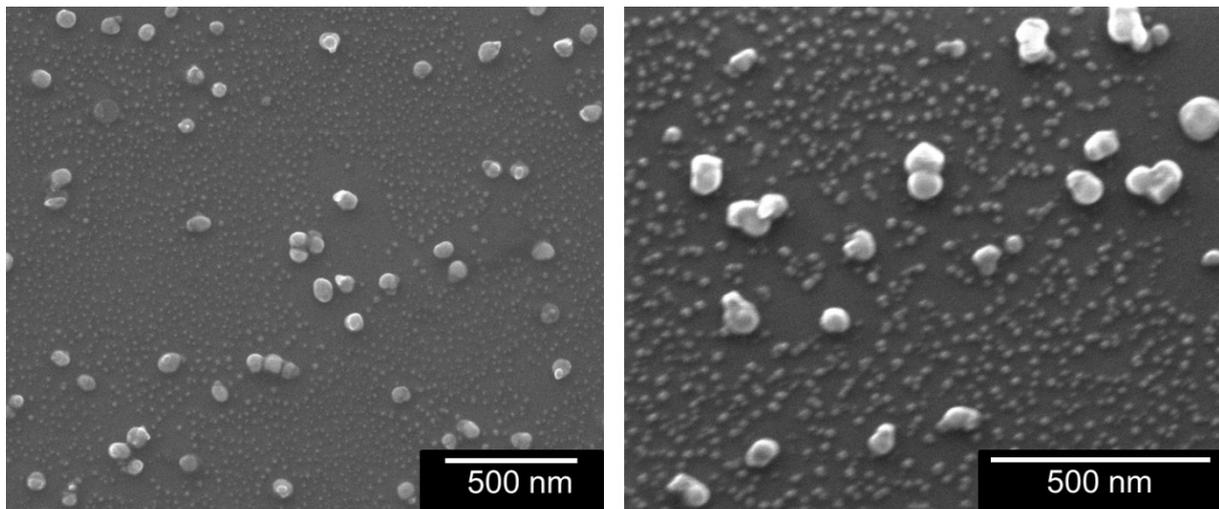
Zum Abschluss des Kapitels sei noch auf eine bemerkenswerte Beobachtung bei der Charakterisierung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel hingewiesen. Untersuchte man diese Nanopartikel, die für die Charakterisierung mittels Rasterelektronenmikroskopie auf einem Silicium-Wafer als Probenträger aufgetrocknet waren, erneut mittels der Rasterelektronenmikroskopie, nachdem sie einige Zeit unter normalen Umweltbedingungen im Laboratorium gelagert wurden, hatten sich die Partikel verändert. Neben den bereits bei den frischen Nanopartikeln beobachteten etwa 70 nm großen Partikeln, wurde die Anwesenheit einer großen Anzahl sehr viel kleinerer Partikel festgestellt. Abbildung 72 zeigt die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Partikel direkt nach der Synthese im Mai 2010. Die Partikel wurden als wässrige Dispersion auf den Probenträger aufgetropft und eingetrocknet.



**Abbildung 72:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel direkt nach der Synthese.

Das linke Bild zeigt die Probe bei 80000-facher Vergrößerung, das rechte Bild zeigt

sie bei 160000-facher Vergrößerung. Es sind die bereits aus Kapitel 5.1.1 bekannten, etwa 70 nm großen Silber-Nanopartikel zu sehen. Nach einem Jahr der lichtgeschützten Lagerung an Luft unter normalen Laborbedingungen wurde der gleiche Probenträger im Mai 2011 noch einmal untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 73 zu sehen.



**Abbildung 73:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme derselben Partikel wie in Abbildung 72 nach der Lagerung für ein Jahr auf einem Silicium-Wafer als Probenträger unter normalen Bedingungen im Labor.

Das linke Bild zeigt die Probe bei 120000-facher Vergrößerung, das rechte Bild zeigt sie bei 200000-facher Vergrößerung. Neben den bereits vorher vorhandenen Partikeln sind zahlreiche sehr kleine Partikel zu erkennen. Offenbar haben die Nanopartikel sich durch die Lagerung an Luft verändert. Es wurde versucht, mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie zu ermitteln, ob es sich bei den kleinen Fragmenten um Silber handelt. Dies war jedoch wegen der sehr geringen Probendicke der Fragmente nicht möglich.

Eine kürzlich erschienene Arbeit von *Glover et al.* thematisierte eine solche Beobachtung anhand von Silber- und Kupfer-Nanopartikeln.<sup>[196]</sup> Die Autoren beobachteten, dass sich bei der Lagerung von Nanopartikeln auf einer Oberfläche unter normalen Laborbedingungen kleinere Nanopartikel um die größeren Primärpartikel bildeten. Sie zeigten dies anhand von transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen unter anderem bei 75 nm großen PVP-stabilisierten Silber-Nanopartikeln. Der Mechanismus, den sie für diese

Partikelneubildung vorschlagen, beinhaltet eine Oxidation der zunächst vorhandenen Partikeloberfläche durch Sauerstoff und Feuchtigkeit aus der Umgebung. Die gebildeten Ionen wandern durch einen Konzentrationsgradienten auf der Oberfläche von den Primärpartikeln weg und bilden durch chemische oder photoinduzierte Reduktion neue Partikel.

*Elechiguerra et al.* zeigten ebenfalls, dass sich Silber-Nanopartikel durch den Einfluss von Umgebungsluft verändern.<sup>[197]</sup> Sie konnten mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie ebenfalls die Bildung subnanopartikulärer Strukturen auf Nanopartikeln nachweisen. Ebenso stellten sie die Bildung von Silbersulfid auf den der Umgebungsluft ausgesetzten Nanopartikeln fest. Silber-Nanopartikel, die auf festen Substraten gebunden sind, korrodieren also an Luft. Die beobachteten Phänomene können unter Umständen auch die häufig bei der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung von metallischen Nanopartikeln festgestellten sehr kleinen Fragmente erklären, die beispielsweise auch in Abbildung 65 vorhanden sind.

## **5.2 Auflösung von Silber-Nanopartikeln in unterschiedlichen Medien**

Die biologischen Wirkungen, also insbesondere die antimikrobiellen Eigenschaften von Silber-Nanopartikeln, scheinen kein alleiniger Partikeleffekt zu sein. Dafür spricht, dass Silber-Nanopartikel an sich eine geringe Toxizität gegenüber Bakterien zeigen, solange sie keine Ionen freisetzen (können).<sup>[198]</sup> Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass sich Silber-Nanopartikel in reinem Wasser in relativ kurzer Zeitspanne, auf einer Zeitskala von Tagen bis Wochen, zum Teil auflösen.<sup>[143, 195]</sup> Die Partikel werden also in Wasser oxidiert und setzen Silber-Ionen frei, denen die eigentliche toxische Wirkung zugeschrieben wird.

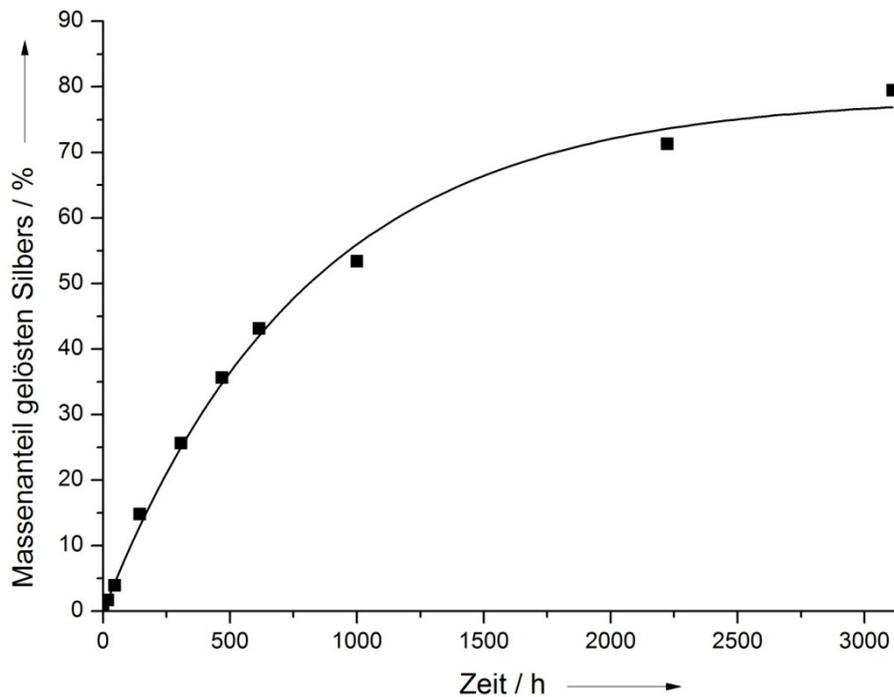
Die gerade erwähnten früheren Untersuchungen fanden alle in reinem Wasser statt. Hier wird nun in der Fortführung dieser Arbeit die Auflösung von Silber-Nanopartikeln in modifizierten wässrigen Medien untersucht. Dies geschieht hauptsächlich anhand der etwa 70 nm großen mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel, die auch in der früheren Arbeit verwendet wurden. Zusätzlich wird das Auflösungsverhalten der erheblich kleineren mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Silber-Nanopartikel (Durchmesser etwa 20 nm) und der ausschließlich mit Citrat

reduzierten Partikel (Durchmesser etwa 45 nm) untersucht. Die Untersuchung der letztgenannten Partikel ist vor allem vor dem Hintergrund der vorangegangenen Arbeit von Frau Dr. Stefanie Kittler zu sehen. In jener Arbeit wurde die Methode der Dialyse für die Auflösungsexperimente auch erfolgreich validiert.

Bei allen im Folgenden dargestellten Dialysen betrug das Volumen des Dialysemediums 396 mL und das Volumen innerhalb des Dialyseschlauches 4 mL, sodass ein Gesamtvolumen von 400 mL vorhanden war. Die Dialysetemperatur war jeweils 25 °C. Die Silberkonzentration der Nanopartikel innerhalb des Dialyseschlauches wird jeweils angegeben. Bei einigen dafür geeigneten Auflösungskurven wurde ein nichtlinearer Fit durch die gemessenen Zeit-Konzentrationspunkte gelegt. Details dazu sind in Kapitel 5.2.7 angegeben.

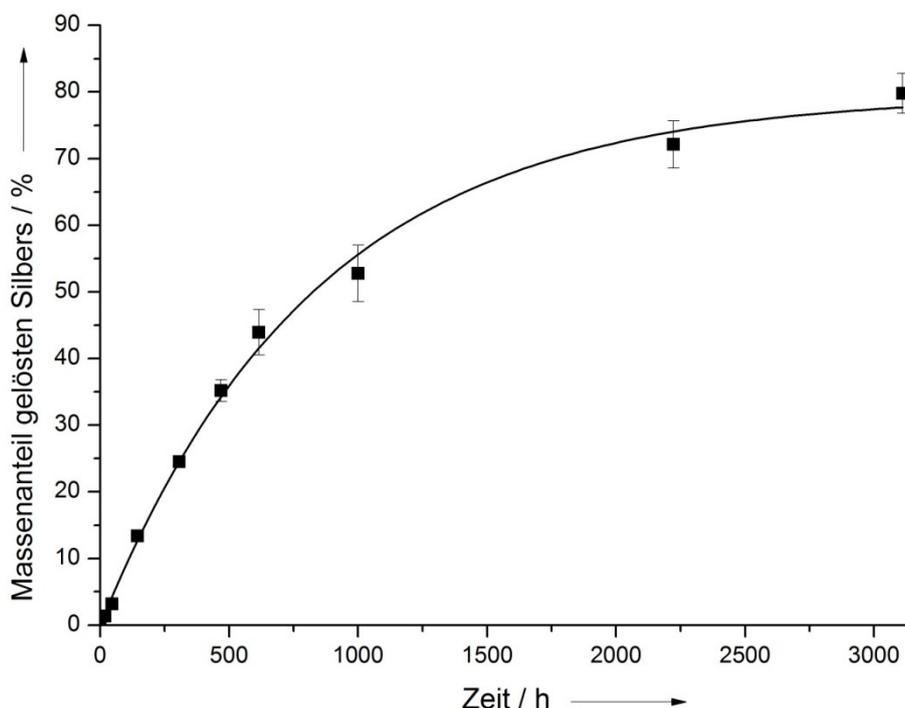
### **5.2.1 Auflösung in Reinstwasser**

Zunächst wurde die Auflösung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Silber-Nanopartikel in unmodifiziertem Reinstwasser untersucht. Die Silberkonzentration der Nanopartikel im Dialyseschlauch betrug  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ . Der pH-Wert betrug 6,7 und die Sauerstoffsättigung 68 % ( $5,6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Es wurden sowohl die mit PVP als auch die mit TPPTS umfunktionalisierten Nanopartikel untersucht, um den Einfluss der Funktionalisierung bei gleicher Partikelgröße zu ermitteln. Die Auflösung der mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel ist in Abbildung 74 gezeigt.



**Abbildung 74:** Auflösung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in Reinstwasser.

Die Dialyse erfolgte über einen Zeitraum von 3111 h (130 d). Nach der maximalen Dialysezeit hatten sich die Nanopartikel zu 79,5 % aufgelöst. Es wird dabei allerdings keine vollständige, sondern nur eine annähernde Konstanz der Silberkonzentration erreicht. Die Auflösung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel ist in Abbildung 75 dargestellt.



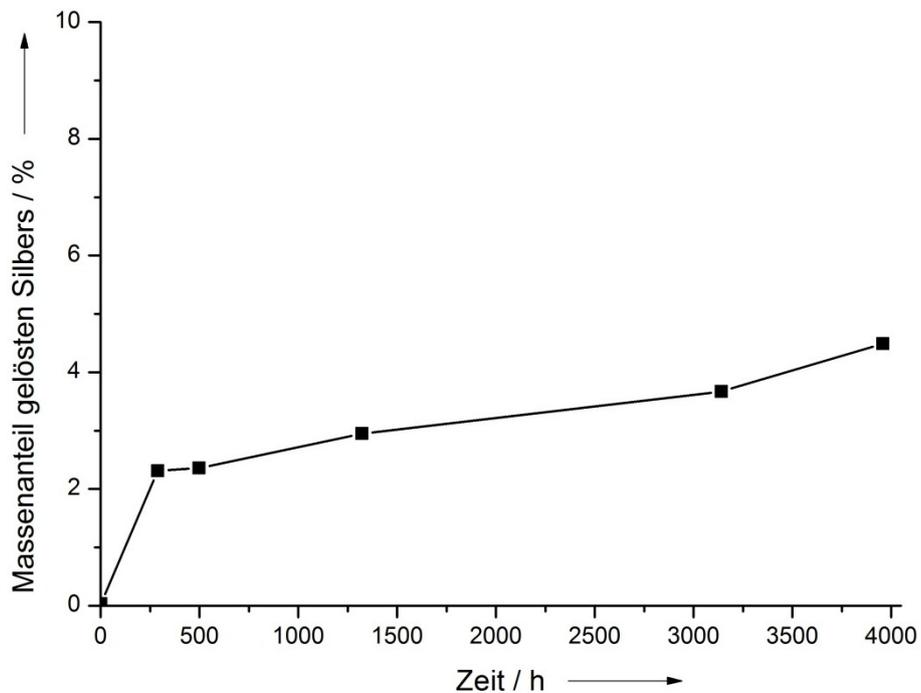
**Abbildung 75:** Auflösung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in Reinstwasser.

Die Parameter waren bei diesem Experiment dieselben wie bei der Auflösung der mit PVP umfunktionalisierten Nanopartikel (Silberkonzentration im Dialyseschlauch:  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ , pH-Wert 6,7 und  $\text{O}_2$ -Gehalt: 68 % bzw.  $5,6 \text{ mg L}^{-1}$ ), da das gleiche Reinstwasser als Dialysemedium verwendet wurde. Es ist nahezu kein Unterschied in der Auflösung zwischen den unterschiedlich funktionalisierten Nanopartikeln feststellbar. Die maximale Auflösung nach 3111 h (130 d) beträgt 82,8 %. Die Funktionalisierung scheint also für die Liganden PVP und TPPTS keinen nennenswerten Einfluss auf die Auflösung der Nanopartikel zu haben.

### 5.2.2 Auflösung unter Sauerstoffausschluss

Es wird vermutet, dass die Auflösung der Silber-Nanopartikel durch eine Oxidation des metallischen Silbers durch im Wasser gelösten Sauerstoff zu Silberionen verursacht wird. Um die Ursache für die Auflösung der Silber-Nanopartikel zu ergründen, wurden die Auflösungsexperimente in sauerstofffreiem Reinstwasser unter einer Inertgas-Atmosphäre wiederholt, wo dann keine oder nur eine sehr geringfügige Auflösung der Nanopartikel zu erwarten wäre. Dazu wurde das Reinstwasser zunächst mehrere Minuten lang durch Abkochen entgast und anschließend unter Argon-Atmosphäre abgekühlt. Dabei sättigte sich das Wasser

entsprechend mit dem inerten Edelgas. Die Dialyse und die Entnahmen der Proben erfolgten ebenfalls unter Argon-Atmosphäre. Die Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in derart aufbereitetem Reinstwasser ist in Abbildung 76 dargestellt.

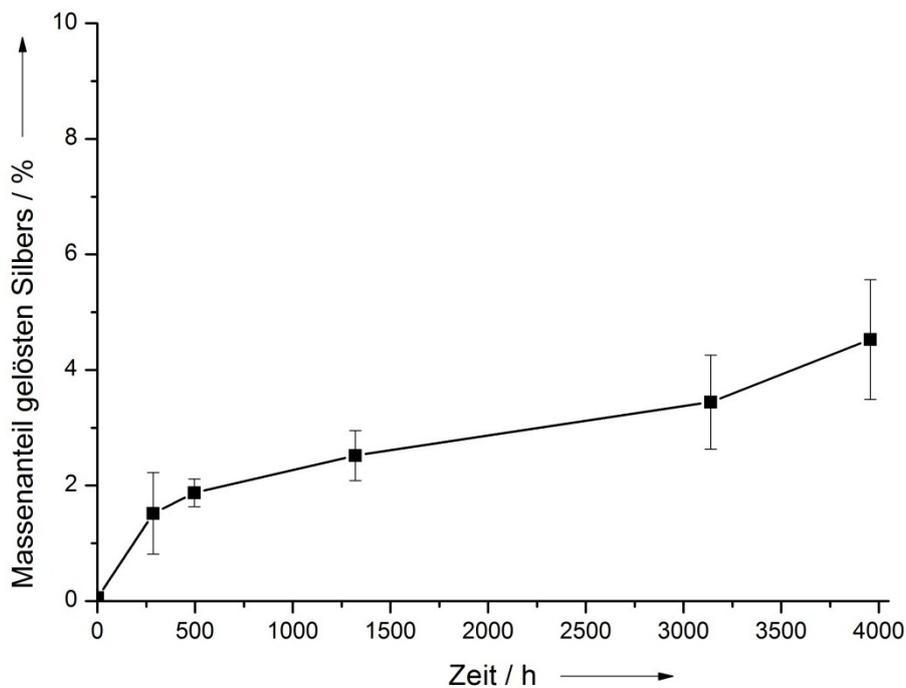


**Abbildung 76:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in entgastem Reinstwasser unter Argon-Atmosphäre.

Der pH-Wert des Argon-gesättigten Wassers wurde mit 7,1 bestimmt. Die Sauerstoffsättigung betrug  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  (3 %) bis  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$  (9 %). Die Dialysezeit betrug 3958,5 h (165 d). Es ist ein sehr geringer Anstieg der Silberkonzentration außerhalb des Dialyseschlauches zu erkennen. Dies kann zum einen daran liegen, dass Reste von Silberionen aus der Synthese, die beispielsweise in der Polymerhülle adsorbiert waren, freigesetzt wurden, zum anderen war das Wasser nicht völlig sauerstofffrei.

Auch später stieg die Silberkonzentration während der gesamten Dauer des Experiments (fast ein halbes Jahr) nur sehr geringfügig an, und die Auflösung der Nanopartikel erreichte nach der maximalen Dialysezeit nur einen Wert von 4,5 %. In einem vorausgegangenem Versuch mit geringerer Laufzeit war nach 1660,5 h sogar nur eine Auflösung von etwa 1,8 % beobachtet worden. Bei der hier gezeigten Dialyse betrug die Auflösung der Nanopartikel nach 1321,5 h rund 2,9 %. Die

Nanopartikel lösen sich also in entgastem und Argon-gesättigtem Wasser kaum auf. Das mittels der Nernst-Gleichung ermittelbare Redoxpotential des gelösten Sauerstoffes beträgt bei den angegebenen Konzentrationen zwischen +1,20 V und +1,21 V. Bei vollständiger Auflösung der Nanopartikel im Dialyseschlauch beträgt das Redoxpotential des Silbers etwa +0,54 V, bei den tatsächlich in diesem Versuch aufgelösten Silbermengen ist es noch leicht geringer. Das Silber kann also auch bei den hier gegebenen Konzentrationen vom gelösten Sauerstoff oxidiert werden. Zum Vergleich wurden auch die mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel in entgastem, Argon-gesättigtem Reinstwasser untersucht. Die Silberkonzentration im Dialyseschlauch betrug in diesem Fall  $0,2896 \text{ mg mL}^{-1}$ . Das Ergebnis dieses Auflösungs-experiments ist in Abbildung 77 gezeigt.

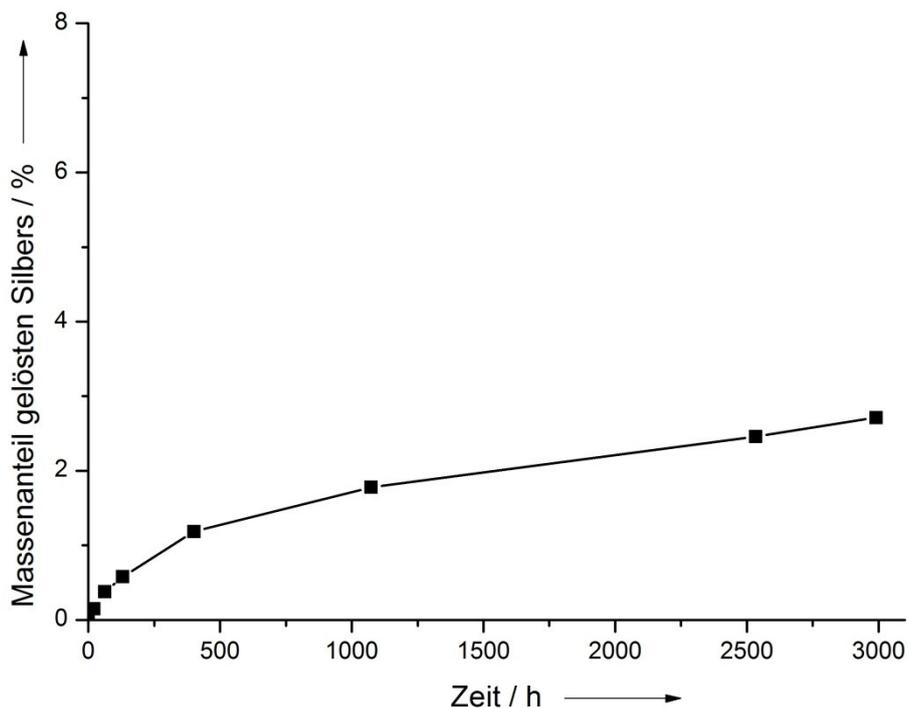


**Abbildung 77:** Auflösung der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel in entgastem Reinstwasser unter Argon-Atmosphäre.

Der pH-Wert des Wassers betrug 7,1 und der Sauerstoffgehalt wurde mit  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$  (6 %) bis  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  (10 %) bestimmt. Die Dialysezeit entspricht mit 3955,5 h annähernd der der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Partikel. Der Verlauf der Silberfreisetzung unterschied sich nicht wesentlich von dem der PVP-funktionalisierten Partikel. Nach der maximalen Dialysezeit hatten sich die Partikel zu

4,5 % aufgelöst, bezogen auf die ursprünglich zu Beginn eingesetzte Masse an Silber-Nanopartikeln.

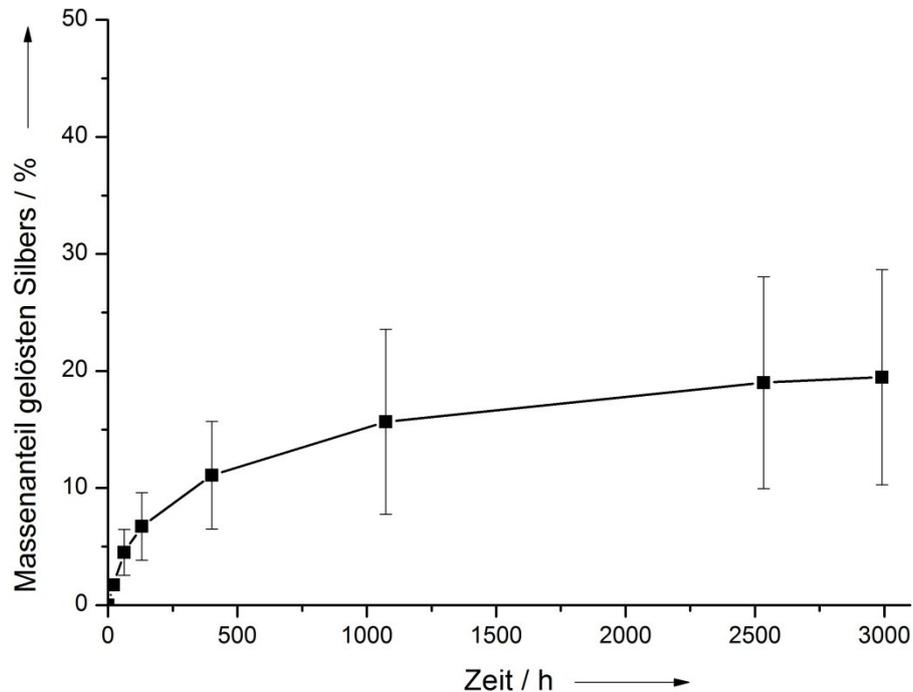
Nachdem die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in dem mit Argon gesättigten Wasser nahezu keiner Auflösung unterlagen, wurde nach den oben angegebenen 3958,5 h das Dialysemedium durch 396 mL frisches Reinstwasser (pH = 6,7) ersetzt, um die Auflösung der Nanopartikel zu induzieren. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 78 gezeigt.



**Abbildung 78:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel nach der Dialyse in entgastem Reinstwasser und anschließendem Austausch des Dialysemediums durch frisches Reinstwasser.

Wie zu erkennen ist, setzte trotz des nun eingesetzten frischen, sauerstoffhaltigen Reinstwassers, keine nennenswerte Auflösung der Nanopartikel ein. Nach 2991 h (125 d) hatten sich die Partikel nur zu 2,7 % aufgelöst. Diese Angabe bezieht sich auf die nach dem Abzug der bereits aufgelösten Silbermenge aus der ersten Dialyse unter Argon verbleibende Menge an Silber-Nanopartikeln. Offenbar hatten sich die Nanopartikel während der Dialyse unter Inertbedingungen derartig verändert, dass sie auch in frischem Reinstwasser keine Ionen mehr freisetzen konnten.

Die entsprechend weitergeführte Dialyse der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel, die zunächst unter Argon und dann mit frischem Reinstwasser (pH = 6,7) dialysiert wurden, zeigt Abbildung 79.

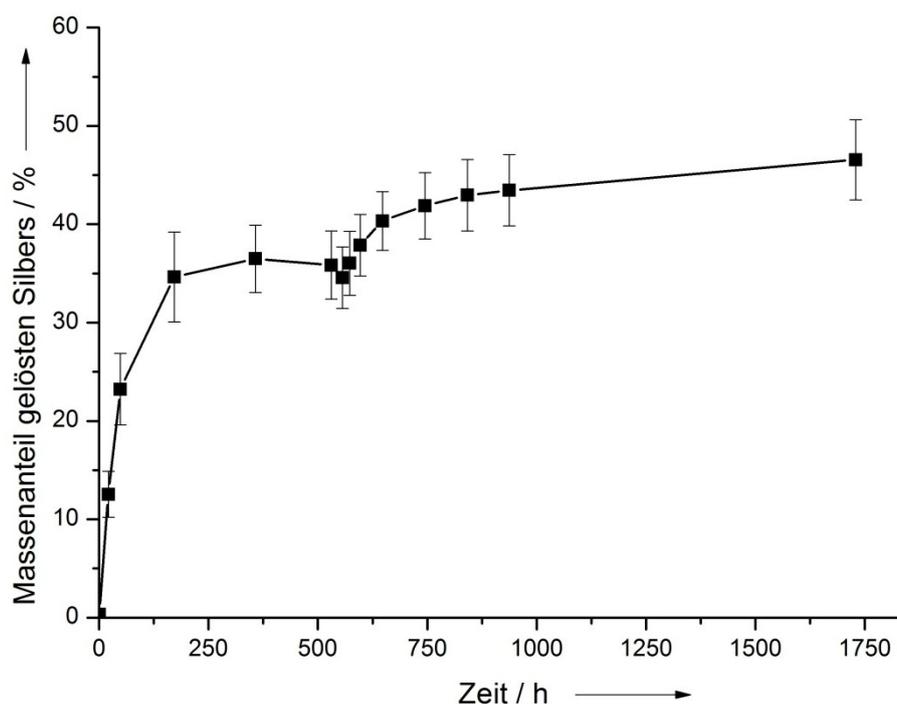


**Abbildung 79:** Auflösung der mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel nach der Dialyse in entgastem Reinstwasser und anschließendem Austausch des Dialysemediums durch frisches Reinstwasser.

Hier setzt, wie eigentlich erwartet wurde, die Auflösung ein und die Partikel setzten in merklichem Ausmaß Ionen frei. Nach der maximalen Dialysedauer von 2991 h (125 d) hatten sich die Nanopartikel zu 19,5 % aufgelöst. Diese Angabe bezieht sich wiederum auf die Masse an Silber-Nanopartikeln, die nach der Dialyse unter Argon noch im Dialyseschlauch verblieben war. Verglichen mit den Daten von *Kittler et al.* lösten sich die Nanopartikel sogar etwas stärker auf als bei einer Dialyse einer vergleichbaren Konzentration, die nur in normalem Reinstwasser vorgenommen worden war.<sup>[143, 195]</sup> Allerdings war der Fehler bei der hier gezeigten Dialyse recht hoch, was anhand der Fehlerbalken im Diagramm zu erkennen ist. Offenbar verändern sich die mit Citrat reduzierten Silber-Nanopartikel nicht in dem Maße wie die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Partikel, wenn sie unter inerter Atmosphäre für längere Zeit in einem großen Volumen Dispersionsmittel gelagert werden. Dies liegt entweder an der unterschiedlichen Größe oder an der

unterschiedlichen Art der Funktionalisierung der Partikel (PVP: sterisch; Citrat: elektrostatisch). Es ist auch denkbar, dass die kolloidale Stabilität der dispergierten Partikel über die Zeit geringer wurde und sie agglomerierten, was generell zu einer geringeren Auflösung führen könnte.

Da in den meisten Fällen keine vollständige Auflösung der Nanopartikel beobachtet wurde (auch nicht von *Kittler et al.*), sollte geklärt werden, ob sich die Nanopartikel durch die Lagerung in wässriger Dispersion im Dialyseschlauch in irgendeiner Form verändern, sodass die Ionenfreisetzung dadurch zum Erliegen kommt. Um dies zu untersuchen, wurde die Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in reinem Wasser begonnen und nach einer gewissen Zeit das Dialysemedium durch frisches Reinstwasser ersetzt. Das Ergebnis dieses Experiments mit einer Silberkonzentration der Partikel im Dialyseschlauch von  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$  zeigt Abbildung 80.



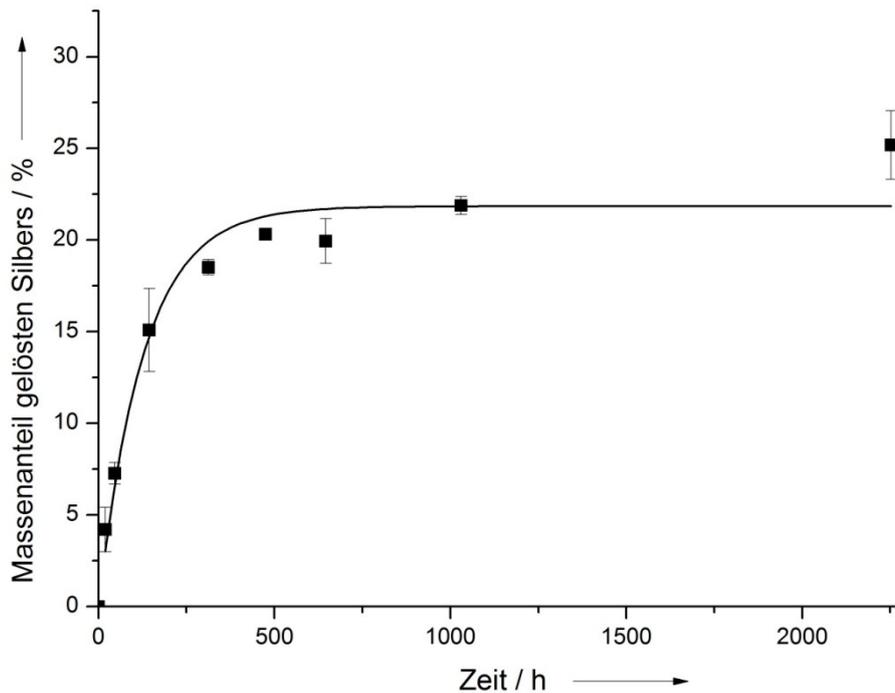
**Abbildung 80:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in lufthaltigem Reinstwasser mit Austausch des Dialysemediums durch frisches Reinstwasser.

Zunächst ist eine typische Konzentrationssteigerung der Silberionen im Dialysemedium festzustellen, die sich mit fortlaufender Versuchsdauer abflacht. Nach dem Austausch des Reinstwassers setzt erneut eine Auflösung der Nanopartikel ein,

die jedoch nicht die Größenordnung der ersten Auflösung erreicht. Offenbar verändern sich die Nanopartikel in der Dispersion zwar in einer Art, dass sie durch den gelösten Sauerstoff im Reinstwasser nicht erneut so stark aufgelöst werden wie frisch eingesetzte Partikel, jedoch hemmt diese Modifizierung die Silberionenfreisetzung nicht vollständig. Insbesondere ist festzuhalten, dass auch der Austausch des Dialysemediums nicht dazu geführt hat, dass sich die Nanopartikel vollständig auflösen.

### **5.2.3 Auflösung in Sauerstoff-Atmosphäre und unter Zusatz von Wasserstoffperoxid**

In Anbetracht der geringen Auflösung der Nanopartikel in sauerstofffreiem Reinstwasser unter Argon-Atmosphäre wurde untersucht, ob sich die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel bei einer Dialyse in Sauerstoff-gesättigtem Wasser und unter Sauerstoffatmosphäre verstärkt auflösen. Die Silberkonzentration der Nanopartikel im Dialyseschlauch betrug wieder  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ . Das Reinstwasser wurde durch mehrminütiges Abkochen entgast und unter Sauerstoff-Atmosphäre abgekühlt, sodass sich das Wasser mit Sauerstoff sättigen konnte. Das Ergebnis der Dialyse in dem so mit Sauerstoff angereicherten Reinstwasser ist in Abbildung 81 wiedergegeben.

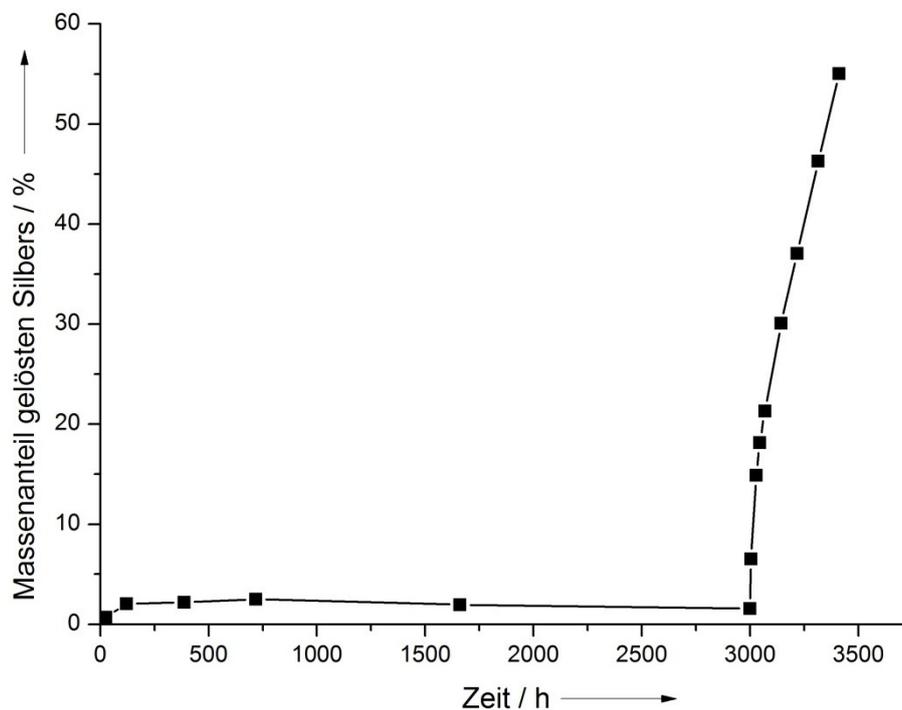


**Abbildung 81:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in mit Sauerstoff gesättigtem Wasser unter Sauerstoffatmosphäre.

Der pH-Wert des Reinstwassers betrug 7,0 bis 7,1. Der Sauerstoffgehalt wurde mit  $29,3 \text{ mg L}^{-1}$  (371 %) bis  $31,4 \text{ mg L}^{-1}$  (398 %) ermittelt. Da vermutet wurde, dass der im Wasser gelöste Sauerstoff für die Auflösung verantwortlich ist, indem er das Silber oxidiert, wurde erwartet, dass sich die Nanopartikel im Sauerstoff-gesättigten Reinstwasser schneller oder zu einem höheren Grad auflösen. Das war nicht der Fall. Die Auflösung erfolgte nach der maximalen Dialysedauer von 2253 h (94 d) lediglich zu 25,2 %. In einem vorangegangenen Experiment lösten sich die Partikel nach einer Dialysedauer von 4365,5 h (182 d) sogar nur zu 13,7 % auf. Bei den hier gefundenen Sauerstoffkonzentrationen beträgt dessen Redoxpotential etwa +1,23 V, das Silber kann also auch hier vom Sauerstoff oxidiert werden. Da die im Vergleich zu nicht vorbehandeltem Reinstwasser geringe beobachtete Auflösung nicht durch mangelnden Sauerstoff verursacht worden sein kann, muss die Ursache in diesem Fall in der Vorbehandlung des Reinstwassers gesucht werden. Der pH-Wert des abgekochten und mit Sauerstoff angereicherten Wassers lag leicht über dem des normalen Reinstwassers. Es fehlen durch das Entgasen die anderen Luftbestandteile wie Kohlenstoffdioxid und Stickstoff. Davon kann nur das Kohlenstoffdioxid einen Einfluss auf die Auflösung des Silbers nehmen, indem es den pH-Wert geringfügig senkt. Dennoch ist dieser starke Unterschied in der Auflösung damit kaum zu

erklären. Dieses Verhalten der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel ist ebenso unerwartet wie die praktisch nicht vorhandene Auflösung dieser Partikel nach der Zugabe von frischem Wasser zu einer Auflösung unter Argon.

Wenn bei der Dialyse von mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln in sauerstofffreiem Reinstwasser unter Argon-Atmosphäre allerdings Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  zugesetzt wird, so setzt sofort eine Oxidation und Auflösung der Nanopartikel ein (Abbildung 82).

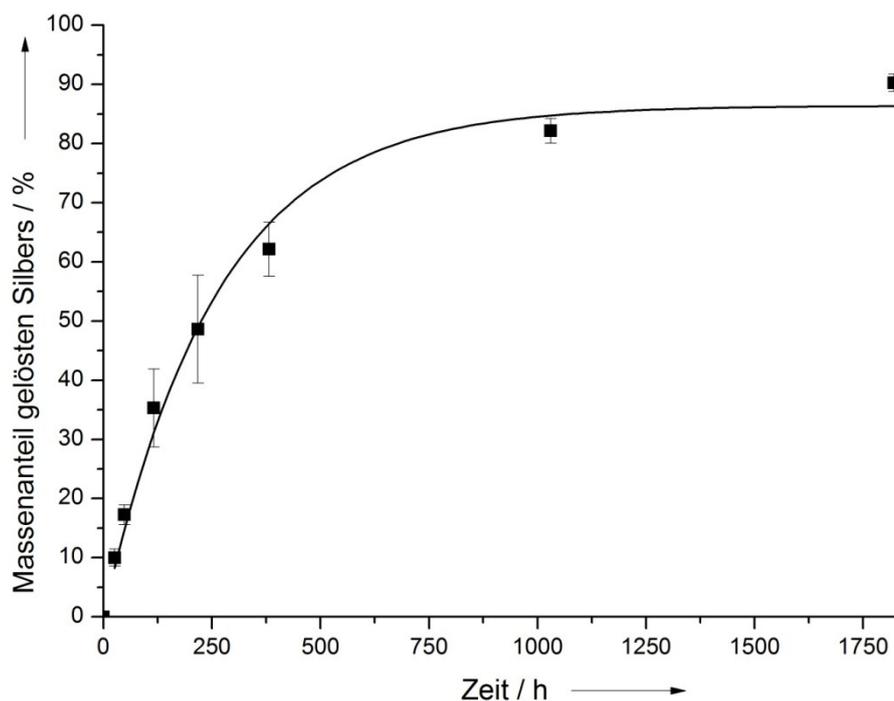


**Abbildung 82:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in entgastem Reinstwasser (0 h bis etwa 3000 h) mit nachfolgendem Zusatz von  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Wasserstoffperoxid (bei etwa 3000 h).

Bis zu einer Dialysedauer von 2998,5 h (125 d) ist nahezu keine Auflösung der Nanopartikel feststellbar. Lediglich 1,6 % des ursprünglich eingesetzten Silbers hat sich in der Form von Silberionen aus den metallischen Partikeln gelöst. Nach Zusatz des Wasserstoffperoxids, das ein starkes Oxidationsmittel ist (das Redoxpotential bei der eingesetzten Konzentration beträgt  $+1,721 \text{ V}$ ), steigt die Silberkonzentration außerhalb des Dialyseschlauches stark an und erreicht nach 3410,5 h (142 d) Gesamtdialysedauer (entsprechend 412 h bzw. 17 d nach der Zugabe des Wasserstoffperoxids) einen Wert von 55 %. Ein Ende des Anstiegs der

Silberkonzentration war noch nicht abzusehen, allerdings musste die Dialyse wegen eines Defekts am Dialyseschlauch vorzeitig beendet werden. Das Experiment zeigt, dass zumindest bezüglich der Oxidation mit Wasserstoffperoxid durch die längere dispergierte Lagerung der Nanopartikel im Dialyseschlauch keine Passivierung der Silberoberfläche auftritt.

Um den Einfluss des Wasserstoffperoxids auf die Auflösung der Nanopartikel weiter zu untersuchen, wurden die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel gegen Reinstwasser mit einem Zusatz von  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Wasserstoffperoxid dialysiert. Das Wasser wurde vor der Zugabe des Wasserstoffperoxids durch Abkochen entgast und während der Dialyse unter einer Argon-Atmosphäre gehalten. Die Silberkonzentration der Nanopartikel im Dialyseschlauch betrug wieder  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ . Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 83 gezeigt.



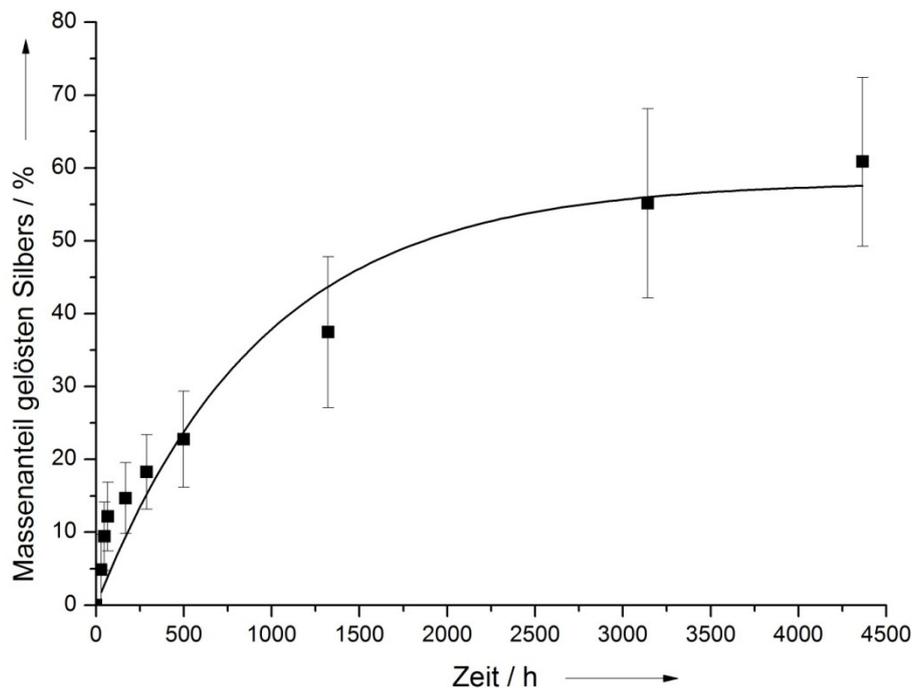
**Abbildung 83:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in entgastem Reinstwasser mit  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Wasserstoffperoxid-Zusatz.

Die Silberkonzentration außerhalb des Dialyseschlauchs stieg relativ schnell an. Nach der maximalen Dialysezeit von 1821 h (76 d) hatten sich die Silber-Nanopartikel zu 90,3 % aufgelöst und die Kurve näherte sich einer Art Sättigungswert, erreichte zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht 100 %, bezogen auf

die eingesetzte Masse an Silber. Wasserstoffperoxid ist also als starkes Oxidationsmittel in der Lage, das Silber schneller und zu einem größeren Anteil zu oxidieren und die Nanopartikel damit aufzulösen, als der in normalem Reinstwasser gelöste Sauerstoff. Da in diesem Fall kein gelöster Luftsauerstoff vorlag, haben sich die Effekte der beiden Oxidationsmittel auch nicht überlagert. Es ist jedoch zu bedenken, dass sich Wasserstoffperoxid mit der Zeit zersetzt, insbesondere in der Gegenwart von Schwermetallionen.

#### 5.2.4 Auflösung unter Zusatz von Glucose und Cystein

Um der Situation in biologischen Medien näher zu kommen, wurde die Auflösung von Silber-Nanopartikeln in einer Lösung aus  $1 \text{ g L}^{-1}$  Glucose in Reinstwasser untersucht. Dazu wurden wieder die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel verwendet, die im Dialyseschlauch in einer Silberkonzentration von  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$  vorlagen. Das Ergebnis dieser Dialyse ist in Abbildung 84 gezeigt.

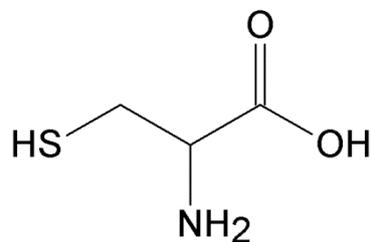


**Abbildung 84:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in Glucose-Lösung ( $\beta = 1 \text{ g L}^{-1}$ ).

Der pH-Wert der Glucose-Lösung betrug 6,8. Die Dialysezeit betrug 4365,5 h (182 d). Nach dieser Zeit hatten sich die Silber-Nanopartikel zu 60,9 % aufgelöst.

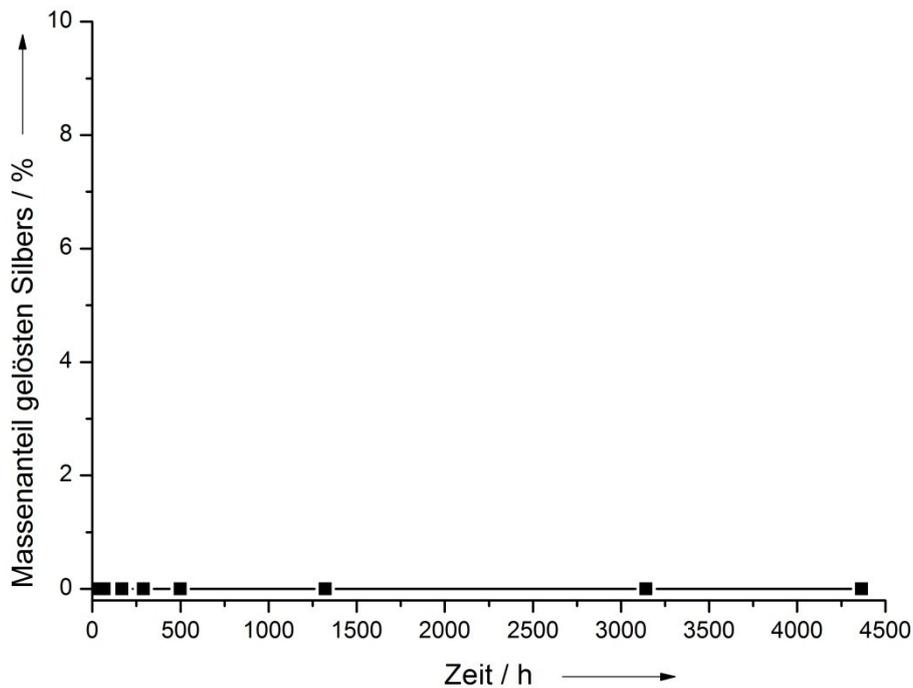
Obwohl Glucose ein reduzierender Stoff ist,<sup>[199]</sup> unterscheidet sich die Silberionen-Freisetzung nur geringfügig von der in Reinstwasser ohne Glucose-Zusatz, die von *Kittler et al.* Gezeigt wurde. Die Anwesenheit der Glucose hat also bei der Konzentration und der Temperatur in dem hier verwendeten Modellsystem keinen starken Effekt auf die Oxidation des Silbers durch reduzierende Effekte.

Es wurde auch die Auflösung der Silber-Nanopartikel in Reinstwasser mit einem Zusatz von Cystein untersucht. Cystein ist eine schwefelhaltige proteinogene Aminosäure und spielt eine große Rolle in der Biochemie von Proteinen, unter anderem bei der Strukturierung von Proteinen durch Disulfidbrücken.<sup>[200]</sup> Die Strukturformel von Cystein ist in Abbildung 85 gezeigt.



**Abbildung 85:** Lewis-Strukturformel von Cystein.

Die Silber-Konzentration im Dialyseschlauch betrug  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ . Das Cystein wurde dem als Dialysemedium dienenden Reinstwasser in einer Menge von  $1 \text{ g L}^{-1}$  zugesetzt. Das Ergebnis der Dialyse ist in Abbildung 86 gezeigt.

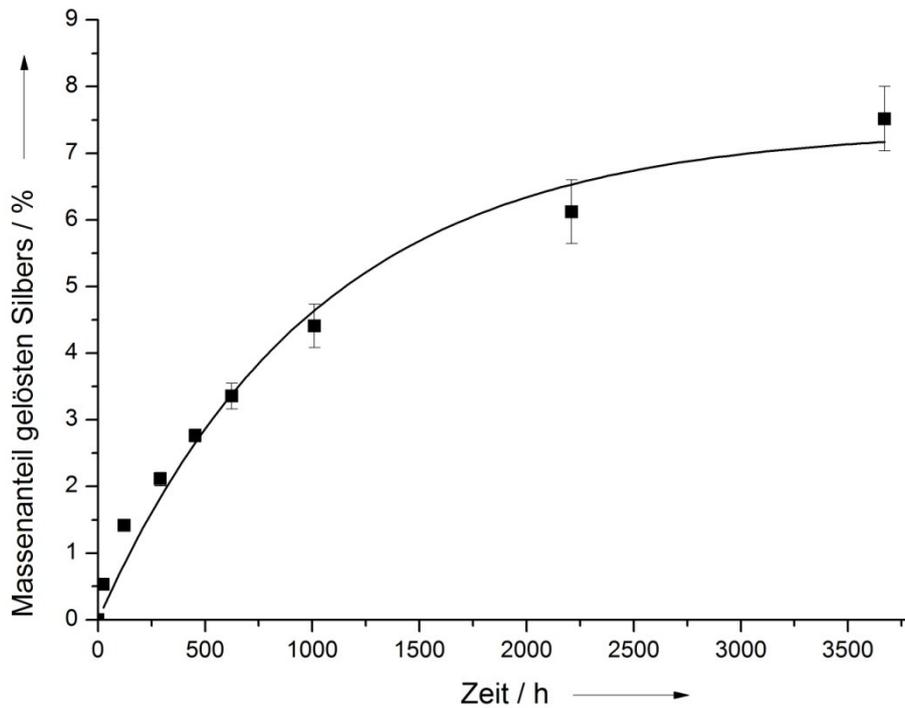


**Abbildung 86:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in Cystein-Lösung ( $\beta = 1 \text{ g L}^{-1}$ ).

Der pH-Wert der Lösung betrug 6,7. Die Dialyse wurde über einen Zeitraum von 4365,5 h (182 d) durchgeführt. Dabei wurde während der gesamten Versuchsdauer keine messbare Silberkonzentration außerhalb des Dialyseschlauchs festgestellt. Offensichtlich hat die Aminosäure einen gravierenden Einfluss auf die Freisetzung von Ionen aus den Silber-Nanopartikeln, indem sie entweder die freiwerdenden Silberionen noch im Dialyseschlauch bindet oder die Nanopartikel derart passiviert, dass erst gar keine Ionenfreisetzung stattfindet.

### 5.2.5 Auflösung in Natriumchlorid-Lösung und PBS

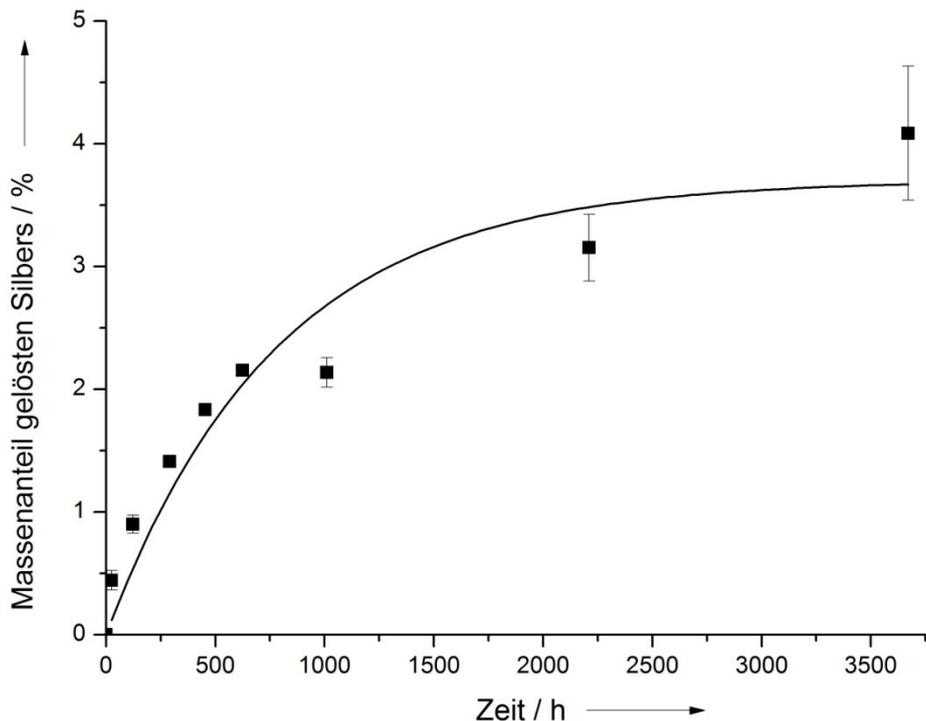
Zur weiteren Annäherung an biologische Medien wurde die Auflösung der Nanopartikel auch in isotonischer Natriumchlorid-Lösung ( $\beta = 0,9 \text{ g L}^{-1}$ ) und in phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) untersucht. Die Silberkonzentration im Dialyseschlauch betrug bei beiden Dialysen wiederum  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ . Das Ergebnis der Dialyse in der Natriumchlorid-Lösung zeigt Abbildung 87.



**Abbildung 87:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in isotonischer Natriumchlorid-Lösung ( $\beta = 0,9 \text{ g L}^{-1}$ ).

Der pH-Wert der Salzlösung betrug 6,8. Die Dialyse wurde über einen Zeitraum von 3670,5 h (153 d) durchgeführt. Nach dieser Zeit hatten sich die Silber-Nanopartikel zu 7,5 % aufgelöst. Die Kurve zeigt nach einem anfänglich etwas stärkeren Anstieg eine Abflachung. Insgesamt ist die Auflösung der Nanopartikel ebenfalls gering im Vergleich zu der Auflösung der gleichen Nanopartikel in Reinstwasser. Dies dürfte an der Anwesenheit des Chlorids liegen, mit dem Silber schwerlösliches Silberchlorid bildet.

Die Auflösung der Silber-Nanopartikel in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 ist in Abbildung 88 gezeigt.



**Abbildung 88:** Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in PBS.

Die Dialyse wurde ebenfalls über 3670,5 h (153 d) durchgeführt. Auch in diesem Fall ist die Auflösung der Silber-Nanopartikel gering. Sie erreicht nach der maximalen Dialysezeit 4,1 % und ist damit noch geringer als bei der Dialyse in isotonischer Natriumchlorid-Lösung. Dies war auf Grund des Vorhandenseins von Phosphat zusätzlich zum Chlorid, das mit dem Silber ebenfalls schwerlösliches Silberphosphat bildet, zu erwarten. Es ist im Laufe des Experiments nur ein geringer Anstieg der des Auflösungsgraphen festzustellen, nach einem etwas stärkeren Anstieg zu Beginn flacht die Kurve ab etwa 700 h ab.

### 5.2.6 Auflösung von makroskopischem Silber nach unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung in Reinstwasser

Zum Vergleich mit der Auflösung der Silber-Nanopartikel wurde auch die Auflösung von Silber in Form von Silberbarren in Reinstwasser untersucht. Die Auflösung der Silberbarren wurde nach einer Funktionalisierung mit TPPTS oder mit Cystein und ohne Funktionalisierung untersucht.

Die Silberbarren wurden vor dem Beginn des Experiments gereinigt, indem sie in Aceton für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend mit Aceton

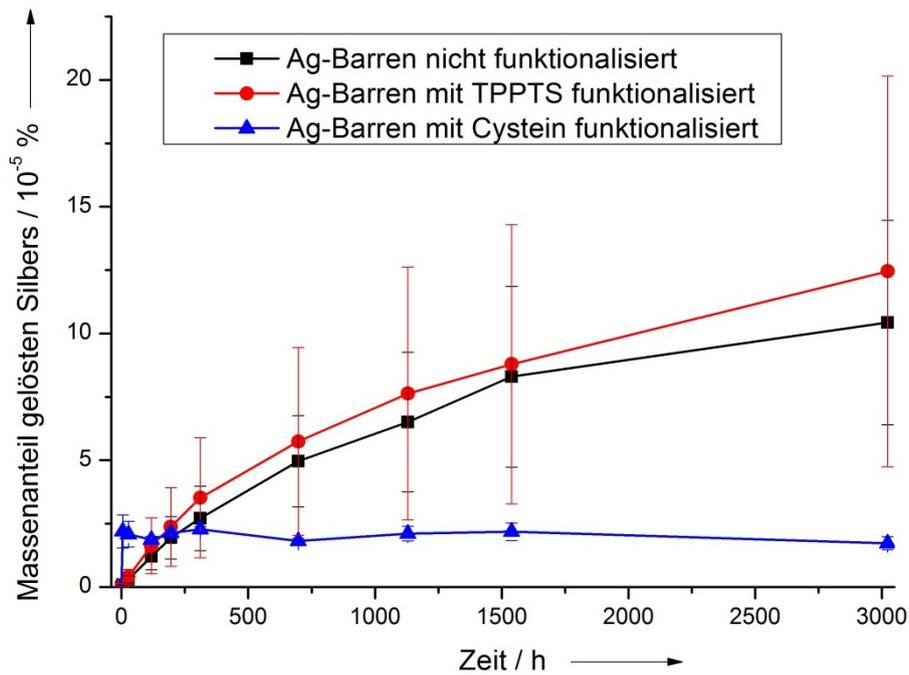
und Reinstwasser ab gespült und getrocknet wurden. Danach wurden die Barren gewogen. Es wurden Barren mit einer Masse von einer Feinunze (entspricht theoretisch 31,1035 g) verwendet. Die tatsächlichen Massen der einzelnen Barren sind in Tabelle 14 wiedergegeben.

**Tabelle 14:** Bestimmte Massen der verwendeten Silberbarren.

<b>Funktionalisierung der Silberbarren</b>	<b>Massen / g</b>	
keine	31,2753	31,2762
TPPTS	31,2887	31,2766
Cystein	31,2756	31,2679

Für die Oberflächenpassivierung wurden jeweils zwei Silberbarren in eine Cysteinlösung ( $\beta = 1 \text{ g L}^{-1}$ ) bzw. in eine TPPTS-Lösung ( $\beta = 1 \text{ g L}^{-1}$ ) gelegt und unter gelegentlichem Schütteln drei Tage darin belassen. Nach dieser Einwirkzeit wurden die Barren mit Reinstwasser ab gespült und in die Dialysegefäße aus Glas mit 500 mL Reinstwasser überführt. Um keinen Abrieb von Silber durch einen Rührstab zu erzeugen, wurde die Flüssigkeit in den Gefäßen während des Auflösungs-experiments nicht gerührt, sondern lediglich in regelmäßigen Abständen umgeschwenkt. Der pH-Wert des verwendeten Reinstwassers betrug 6,7. Die entnommenen Proben wurden sofort eingefroren und bis zur Messung bei  $-20 \text{ °C}$  gelagert, um Adsorptionseffekte an der Probengefäßwand bei den erwarteten geringen Silberkonzentrationen zu minimieren. Das Ergebnis der Auflösungs-experimente ist in Abbildung 89 dargestellt.

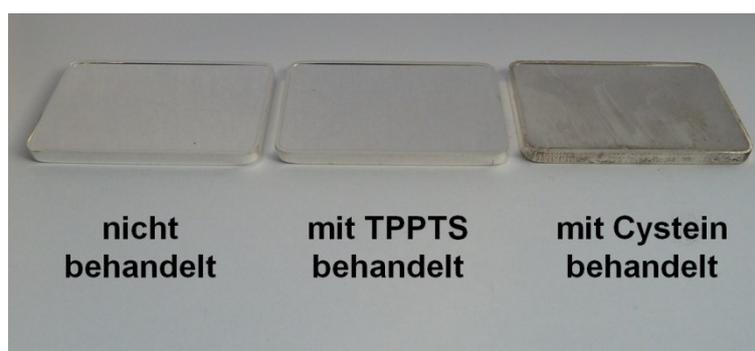
Es ist zu erkennen, dass die Silberkonzentration im Reinstwasser mit der Zeit ansteigt. Die maximale Auflösungszeit betrug 3023 h (126 d). Es fällt auf, dass die Auflösung der mit Cystein behandelten Silberbarren signifikant geringer ist als die der mit TPPTS oder gar nicht behandelten Silberbarren. Die Auflösung der beiden letztgenannten Barren unterscheidet sich nicht maßgeblich voneinander.



**Abbildung 89:** Auflösung von makroskopischem Silber ohne Funktionalisierung (schwarz), mit TPPTS-Funktionalisierung (rot) und Cystein-Funktionalisierung (blau) in Reinstwasser.

Nach der maximalen Versuchsdauer haben sich die mit Cystein funktionalisierten Barren zu  $1,7 \cdot 10^{-5}$  % aufgelöst, die mit TPPTS funktionalisierten Barren zu  $12,5 \cdot 10^{-5}$  % und die unbehandelten Barren zu  $10,4 \cdot 10^{-5}$  %.

Abbildung 90 zeigt die Barren nach dem Ende des Experiments.

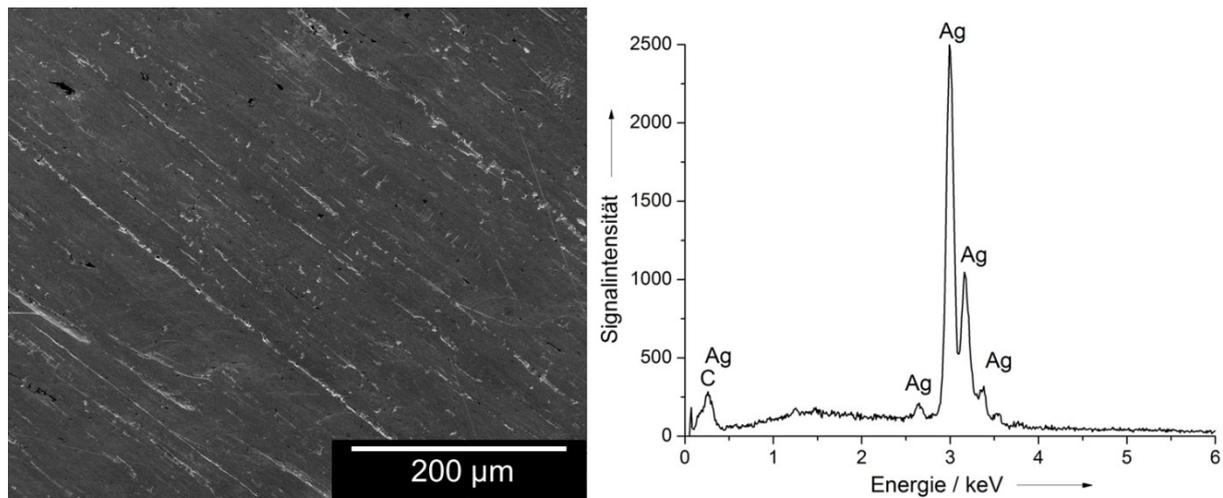


**Abbildung 90:** Silberbarren nach 3023 h Auflösung: Unbehandelt (links), mit TPPTS funktionalisiert (Mitte) und mit Cystein funktionalisiert (rechts).

Es ist gut zu erkennen, dass der zu Beginn mit Cystein behandelte Silberbarren eine dunklere Färbung aufweist als der mit TPPTS bzw. nicht behandelte Barren. Diese

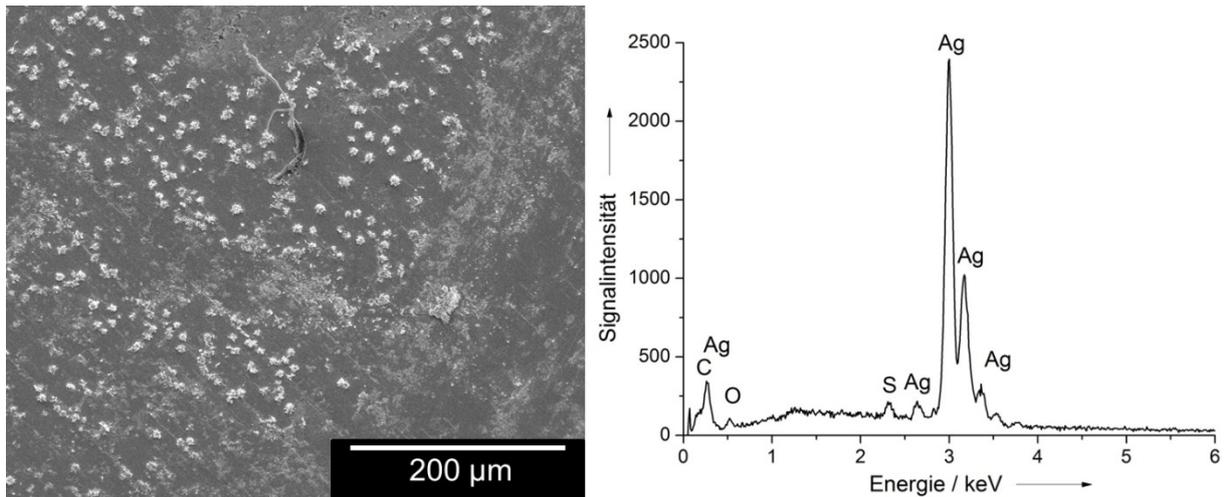
Dunkelfärbung ist vermutlich auf Silbersulfid zurückzuführen, das sich auf der Silberoberfläche durch das Cystein gebildet hat.

Der unbehandelte und der mit Cystein behandelte Barren wurden nach dem Ende des Freisetzungsexperiments jeweils rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Abbildung 91 zeigt den nicht behandelten Silberbarren nach der Entnahme aus dem Reinstwasser bei 500-facher Vergrößerung.



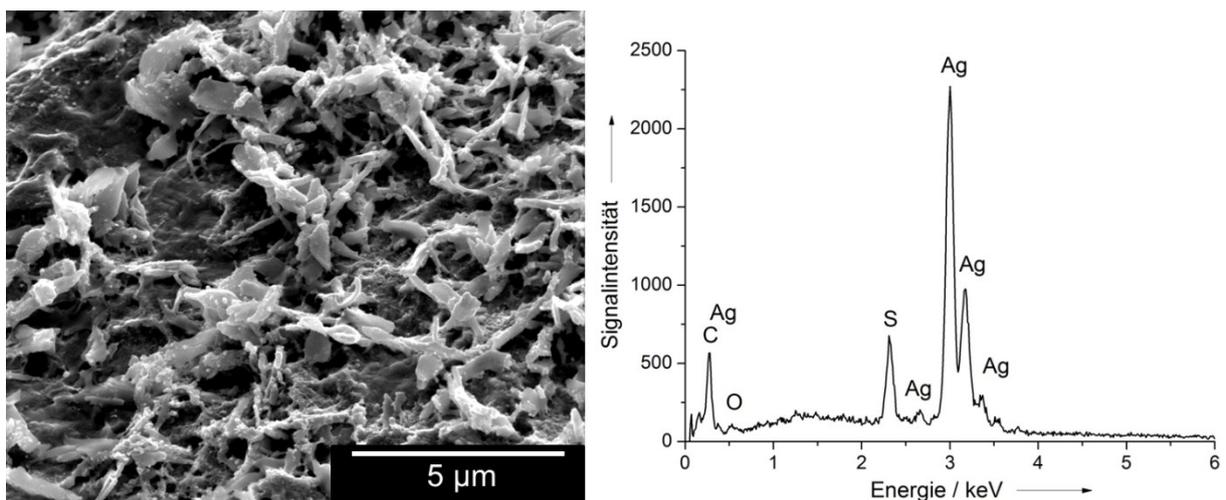
**Abbildung 91:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche des unbehandelten Barrens (links) und EDX-Spektrum des gezeigten Bereiches (rechts).

Es ist die unmodifizierte Oberfläche des in Abbildung 90 gezeigten, dort metallisch glänzenden Silberbarrens zu erkennen. Das zugehörige EDX-Spektrum zeigt im Wesentlichen die Signale für reines Silber. Es sind insbesondere keine Signale für Schwefel zu erkennen, die auf eine Oberflächenmodifizierung hinweisen. Die entsprechende Aufnahme des mit Cystein behandelten Barrens bei 500-facher Vergrößerung ist in Abbildung 92 zu sehen.



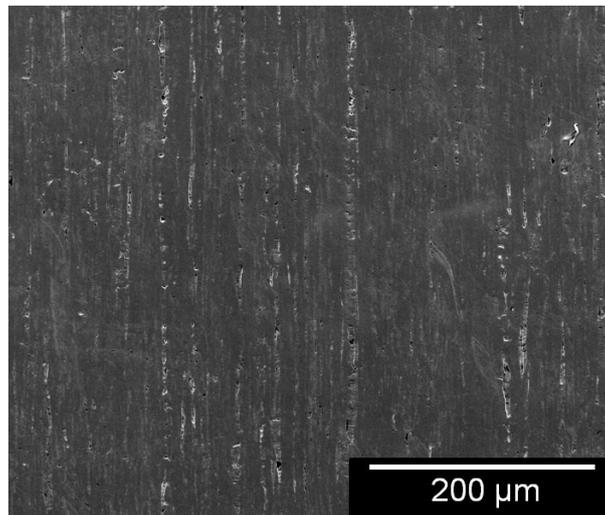
**Abbildung 92:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche des mit Cystein behandelten Barrens (links) und EDX-Spektrum des gezeigten Bereiches (rechts).

Im Vergleich zum unbehandelten Barren sind deutliche Veränderungen der Oberflächenstruktur zu erkennen. Es sind inselförmige Ablagerungen auf der Silberoberfläche vorhanden. Das EDX-Spektrum der gezeigten Silberoberfläche zeigt neben den Signalen für Silber deutlich ein Signal für Schwefel. Eine Detailaufnahme dieser Oberflächenstruktur an einer besonders stark gefärbten Stelle des Barrens ist in Abbildung 93 gezeigt.



**Abbildung 93:** Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der Oberfläche des mit Cystein behandelten Barrens (links) und EDX-Spektrum des gezeigten Bereiches (rechts).

Es sind bei der 20000-fachen Vergrößerung blatt- bis nadelförmige Strukturen zu erkennen, die einen erheblichen Schwefelanteil aufweisen, wie das nebenstehende EDX-Spektrum zeigt. Da die Barren nach der Behandlung mit Cystein jeweils abgespült und anschließend sehr lange in einem großen Volumen Reinstwasser gelagert wurden, ist es unwahrscheinlich, dass es sich um Reste von Cystein handelt. Gegen diese Annahme sprechen auch die geringen im EDX-Spektrum detektierten Kohlenstoff- und Sauerstoffanteile. Um zu untermauern, dass es sich nicht um Reste von Cystein handelt, wurde ein Barren analog zu der bereits beschriebenen Weise drei Tage in Cysteinlösung ( $\beta = 1 \text{ g L}^{-1}$ ) gelegt, danach abgespült und mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Abbildung 94.



**Abbildung 94:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche des zur Kontrolle drei Tage mit Cystein behandelten Barrens.

Es sind keine Veränderungen der Oberfläche zu erkennen, die auf anhaftende Reste von Cystein hinweisen. Bei den in Abbildung 92 und Abbildung 93 gezeigten Oberflächenveränderungen handelt es sich also mit großer Sicherheit um Silber-Schwefelverbindungen, wahrscheinlich um Silbersulfid, das durch die langsame Zersetzung des Cysteins gebildet wurde.

### 5.2.7 Kinetik der Auflösung

Für ausgewählte Auflösungsexperimente wurde eine kinetische Betrachtung durchgeführt. Es wurde generell eine Kinetik erster Ordnung aus der Sicht der Produktseite angenommen. Dabei wird nach *Kittler* die Abnahme der Silbermenge im Dialyseschlauch betrachtet.<sup>[143]</sup> Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der Auflösung wurde durch die erhaltenen Messwertpaare von Zeit und aufgelöstem Silberanteil ein nichtlinearer Fit pseudo-erster Ordnung nach Formel 9 gelegt.

$$y = y_0 \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (9)$$

$y$  = aufgelöster Silberanteil

$y_0$  = Maximalwert der Auflösung

$k$  = Geschwindigkeitskonstante

$t$  = Zeit

Die Fits sind in den entsprechenden Abbildungen in den vorangegangenen Kapiteln abgebildet. Die Halbwertszeit  $\tau$ , also die Zeit, bei der die Hälfte der maximal beobachteten Auflösung erreicht ist, kann über Formel 10 aus der Geschwindigkeitskonstanten berechnet werden.

$$\tau = \frac{\ln(2)}{k} \quad (10)$$

In Tabelle 15 sind die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k$  und die Halbwertszeiten  $\tau$  sowie die berechneten Werte für  $y_0$  zusammengefasst.

**Tabelle 15:** Zusammenfassung der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten für verschiedene Auflösungsexperimente.

Nanopartikel	Medium	$y_0$	$k$ / $h^{-1}$	$\tau$ / h
Mit Citrat und Gerbsäure reduziert, PVP-funktionalisiert	Reinstwasser	78,5	0,00125	555
Mit Citrat und Gerbsäure reduziert, TPPTS-funktionalisiert	Reinstwasser	79,6	0,00120	578
Mit Glucose reduziert, PVP-funktionalisiert	Sauerstoffgesättigtes Reinstwasser	21,8	0,00780	89
Mit Glucose reduziert, PVP-funktionalisiert	10 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	86,4	0,00384	181
Mit Glucose reduziert, PVP-funktionalisiert	1 g L <sup>-1</sup> Glucose-Lösung	58,1	0,00105	660
Mit Glucose reduziert, PVP-funktionalisiert	0,9 g L <sup>-1</sup> NaCl-Lösung	7,4	0,000984	705
Mit Glucose reduziert, PVP-funktionalisiert	PBS	3,7	0,00128	542

Es zeigt sich, dass die Auflösung der kleinen, mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Silber-Nanopartikel unabhängig von ihrer Funktionalisierung ist, wie schon in dem entsprechenden Abschnitt über ihre Auflösung beschrieben wurde. Verglichen mit den von *Kittler* untersuchten größeren Nanopartikeln, die mit Glucose reduziert, und mit PVP funktionalisiert waren (wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden),<sup>[143]</sup> ist die Auflösung langsamer. Die von *Kittler* untersuchten größeren Partikel lösten sich etwa vier Mal schneller auf ( $k = 0,00516 h^{-1}$ ) als die kleineren hier untersuchten Nanopartikel, wobei sich letztere allerdings zu einem erheblich größeren Anteil auflösten, während *Kittler* bei etwa 48 % eine Art Sättigungswert fand.

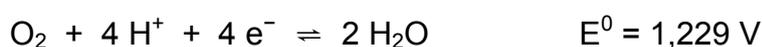
Die von *Kittler* für die größeren Nanopartikel ermittelte Halbwertszeit war mit 134 h ebenfalls geringer als der hier für die kleineren Partikel gefundene Wert. Die Auflösung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Nanopartikel in mit

Sauerstoff gesättigtem Reinstwasser ergab eine etwas größere Geschwindigkeitskonstante und eine etwas geringere Halbwertszeit verglichen mit den von *Kittler* in Reinstwasser bei ansonsten gleichen Bedingungen ermittelten Werten. Die Geschwindigkeitskonstante der Auflösung in Wasserstoffperoxid-Lösung ist wiederum kleiner. Die Halbwertszeit ist entsprechend höher, die Gesamtauflösung ist ebenfalls deutlich höher als bei *Kittler*. Die Geschwindigkeitskonstanten der Auflösung in Glucoselösung, NaCl-Lösung und PBS sind wiederum deutlich geringer, die Partikel lösen sich also im Vergleich zu Reinstwasser langsamer auf. Während sich die Nanopartikel in Glucoselösung jedoch verglichen mit der Auflösung in Reinstwasser zu einem vergleichbaren Anteil auflösen, sind diese Werte bei den Biologie-näheren, chloridhaltigen Medien stark herabgesetzt.

### 5.2.8 Zusammenfassung der Auflösungsexperimente

*Kittler et al.* konnten zeigen, dass etwa 70 nm große, PVP-funktionalisierte Silber-Nanopartikel in lufthaltigem reinem Wasser im Laufe mehrerer Wochen Ionen freisetzen und sich dadurch auflösen.<sup>[143]</sup> Diese Auflösung von Nanopartikeln konnte in dieser Arbeit in modifizierten Medien ebenfalls gezeigt werden. Eine entsprechende Untersuchung kleinerer Nanopartikel mit einem Durchmesser von etwa 20 nm in Reinstwasser ergab, dass sich die kleinen Partikel unter weitestgehend gleichen Bedingungen (Silberkonzentration, Volumina, Temperatur, Sauerstoffgehalt des Wassers) zu einem höheren Anteil auflösen. Bei den größeren Partikeln wurde bei einem entsprechenden Experiment nach knapp 4400 Stunden eine Auflösung zu 59 % beobachtet. Die kleineren Partikel lösten sich innerhalb von etwas mehr als 3100 Stunden zu etwa 80 % auf. Dabei konnte kein Unterschied zwischen mit PVP oder TPPTS unterschiedlich funktionalisierten Partikeln festgestellt werden. Eine so hohe Auflösung wurde bei den 70 nm großen PVP-funktionalisierten Partikeln in der Arbeit von *Kittler* nur bei einer erhöhten Temperatur von 37 °C und einer Silberkonzentration von 0,1 g L<sup>-1</sup> beobachtet.<sup>[143, 195]</sup>

Die einzige Spezies, die bei Standardbedingungen in der Lage ist, das Silber zu oxidieren, ist gelöster Sauerstoff. Das ist aus den Standardpotentialen ersichtlich:



Dies wurde auch für die konkret eingesetzten Konzentrationen gezeigt (vgl. vorhergehende Kapitel). Entsprechend wurde untersucht, ob die Auflösung der Silber-Nanopartikel bzw. die Freisetzung von Ionen durch die Abwesenheit von Sauerstoff verhindert werden kann. Durch eine Entgasung des verwendeten Dialysemediums und die nachfolgende Untersuchung der Auflösung unter einer inerten Argon-Atmosphäre konnte gezeigt werden, dass unter sauerstofffreien Bedingungen die Freisetzung von Silberionen aus den Nanopartikeln stark inhibiert wird. Unter weitgehend inerten Bedingungen lösten sich die 70 nm großen, PVP-funktionalisierten Nanopartikel über einen Zeitraum von fast 4000 Stunden zu weniger als 5 % auf. Citrat-funktionalisierte Silber-Nanopartikel zeigten unter gleichen Bedingungen und bei gleicher Dialysezeit ebenfalls eine Auflösung von weniger als 5 %.

Ein nachfolgendes Experiment, bei dem das Dialysemedium der Dialysen unter inerten Bedingungen durch frisches, lufthaltiges Reinstwasser ausgetauscht wurde, ergab unerwartete Ergebnisse. Die mit PVP funktionalisierten Silber-Nanopartikel lösten sich in dem frischen Wasser nahezu nicht auf. Der Anteil gelösten Silbers aus den Partikeln ist nach etwa 3000 Stunden mit dem der Dialysen unter Argon vergleichbar. Die mit Citrat funktionalisierten Nanopartikel zeigten hingegen eine deutliche Auflösung, die sogar geringfügig die von *Kittler et al.* beobachtete Ionenfreisetzung übertraf. Eine Untersuchung der Auflösung von PVP-funktionalisierten Partikeln in mit Sauerstoff angereichertem Wasser und unter Sauerstoff-Atmosphäre ergab ebenfalls eine geringere Auflösung der Partikel als in lufthaltigem Reinstwasser.

Durch einen Zusatz von  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Wasserstoffperoxid zu einer Dialyse unter Argon konnte ein sofortiger Beginn der Ionenfreisetzung bei PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln ausgelöst werden. Entsprechende Untersuchungen, bei denen die Nanopartikel direkt vom Beginn der Dialyse an in einer Lösung von  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Wasserstoffperoxid waren, zeigten, dass sich die Nanopartikel unter dem Einfluss dieses starken Oxidationsmittels zu einem sehr großen Teil auflösten. Es wurde eine 90 %-ige Auflösung nach etwa 1800 Stunden erreicht. Da das Wasser vor dem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zusatz entgast wurde, spielte der gelöste Luftsauerstoff in diesem Fall keine Rolle.

Während der Zusatz von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Glucose zu einer Dialyse der PVP-funktionalisierten Nanopartikel die Auflösungsgeschwindigkeit zwar leicht herabsetzte, die erreichte maximale Auflösung jedoch wenig beeinflusste, konnte durch einen gleich

konzentrierten Cystein-Anteil im Dialysemedium die Freisetzung von Silberionen vollständig unterdrückt werden. Während der Versuchsdauer von knapp 4400 Stunden konnte keine Auflösung der Nanopartikel beobachtet werden.

Auch bei einer Untersuchung des Verhaltens in isotonischer Natriumchlorid-Lösung und in PBS zeigte sich eine stark reduzierte Auflösung der Nanopartikel. In der Natriumchlorid-Lösung lösten sich die Partikel nach etwa 3700 Stunden nur zu etwa 8 % auf, in dem PBS-Medium in der gleichen Zeit zu etwa 4 %.

Auch die Auflösung von makroskopischem Silber wurde untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass sich Silberbarren während etwa 3000 Stunden merklich auflösten. Wurden die Barren vor der Auflösungsuntersuchung mit TPPTS funktionalisiert, so hatte dies keinen Einfluss auf die Auflösung. Erfolgte jedoch eine Funktionalisierung mit Cystein, so war die Freisetzung von Silberionen stark gehemmt und blieb signifikant unter der der nicht bzw. mit TPPTS behandelten Barren.

Alle Daten der Auflösung von Silber-Nanopartikeln in unterschiedlichen Medien sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Daten der Auflösung der Silberbarren sind in Tabelle 17 wiedergegeben. Die Silberkonzentration im Dialyseschlauch betrug bei den Citrat-funktionalisierten Partikeln  $0,2896 \text{ mg mL}^{-1}$ , bei allen anderen Partikeln betrug sie jeweils  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ .

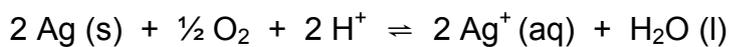
**Tabelle 16:** Zusammenfassung der Daten der Auflösung von Silber-Nanopartikeln.

Medium	pH-Wert	O <sub>2</sub> -Gehalt / mg L <sup>-1</sup>	Durchmesser / nm	Funktionalisierung	Zeit / h	Max. Auflösung / %
Reinstwasser	6,7	5,6	20	PVP	3111	79,5
Reinstwasser	6,7	5,6	20	TPPTS	3111	82,8
O <sub>2</sub> -freies Wasser	7,1	0,2...0,6	70	PVP	3958,5	4,5
O <sub>2</sub> -freies Wasser	7,1	0,4...0,8	45	Citrat	3955,5	4,5
O <sub>2</sub> -gesättigtes Wasser	7,0 ...7,1	29,3 ...31,4	70	PVP	2253	25,2
10 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	70	PVP	1821	90,3
1 g L <sup>-1</sup> Glucose-Lösung	6,8	-	70	PVP	4365,5	60,9
1 g L <sup>-1</sup> Cystein-Lösung	6,7	-	70	PVP	4365,5	0
0,9 % NaCl-Lösung	6,8	-	70	PVP	3670,5	7,5
PBS	7,4	-	70	PVP	3670,5	4,1

**Tabelle 17:** Zusammenfassung der Daten der Auflösung der Silberbarren.

Medium	pH-Wert	Funktionalisierung	Zeit / h	Max. Auflösung / 10 <sup>-5</sup> %
Wasser	6,7	keine	3023	10,4
Wasser	6,7	TPPTS	3023	12,5
Wasser	6,7	Cystein	3023	1,7

Über die Auflösung von nanopartikulärem Silber wird in neuester Zeit auch in der Literatur verstärkt berichtet. Dennoch ist die Menge publizierter Arbeiten überschaubar. Eine der wichtigsten Arbeiten wurde von *Liu* und *Hurt* vorgestellt.<sup>[201]</sup> Dort wurde die Freisetzung von Ionen aus etwa 5 nm großen, Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln mittels zentrifugaler Ultrafiltration untersucht. Auch dort wurde gezeigt, dass sich die Nanopartikel in lufthaltigem Wasser in kurzer Zeit auflösen. Eine Auflösung unter sauerstofffreien Bedingungen wurde in der Publikation nicht beobachtet. Dies stimmt mit den hier gezeigten Ergebnissen überein. Die Autoren schlagen folgende Reaktion vor, die die Auflösung des Silbers durch gelösten Sauerstoff charakterisiert:



Diese Gesamtreaktion ist vermutlich eine Vereinfachung, da die Autoren auch das temporäre Auftreten von Wasserstoffperoxid in Dispersionen von Silber-Nanopartikeln nachgewiesen haben und vermuten, dass dies während der Oxidation des Silbers eine Rolle spielt.

*Liu* und *Hurt* haben auch die Abhängigkeit der Ionenfreisetzung vom pH-Wert in Wasser untersucht und konnten zeigen, dass die Auflösung der Nanopartikel mit steigendem pH-Wert deutlich zurückgeht. Dies liegt in der abnehmenden Protonenkonzentration bei zunehmendem pH-Wert begründet. Mit dieser Beobachtung lässt sich zum Teil erklären, warum sich die Nanopartikel in sauerstoffgesättigtem Wasser nur zu einem geringeren Teil auflösen als in lufthaltigem Reinstwasser. Der pH-Wert lag bei dem mit Sauerstoff angereicherten Wasser geringfügig höher. Ob der Unterschied in den pH-Werten von nur 0,2 bis 0,3 allerdings einen so gravierenden Einfluss hat, muss aber bezweifelt werden. Letztlich bleibt in diesem Fall nur zu festzustellen, dass eine erhöhte Sauerstoffkonzentration allein nicht die Auflösung von Silber-Nanopartikeln verstärkt. Dennoch ist Sauerstoff notwendig, wie die Experimente unter Schutzgas zeigen.

Die Auflösung von kleineren Nanopartikeln erfolgt zu einem größeren Anteil als die von größeren Nanopartikeln. Dies dürfte in der unterschiedlichen spezifischen Oberfläche begründet liegen. Dadurch, dass bei gegebener Silberkonzentration pro Volumeneinheit bei einer Dispersion von kleinen Partikeln viel mehr Partikel vorhanden sind als bei einer entsprechenden Silberkonzentration an größeren Partikeln, ist die zur Oxidation zur Verfügung stehende Oberfläche stark vergrößert. Bei gleicher Silberkonzentration von  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$  haben die 70 nm großen Partikel

eine Oberfläche von  $28,6 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ , die 20 nm großen Partikel besitzen eine Oberfläche von  $100,1 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ . Das Volumen im Dialyseschlauch betrug jeweils 4 mL, sodass die größeren Partikel eine Gesamtoberfläche von  $114,4 \text{ cm}^2$  und die kleineren Partikel von  $400,4 \text{ cm}^2$  aufwiesen. Warum sich die kleineren Partikel allerdings langsamer auflösen, ist damit nicht zu erklären.

*Zhang et al.* untersuchten die Freisetzung von Silberionen aus Citrat-stabilisierten Nanopartikeln unterschiedlicher Größe (20 nm, 40 nm, 80 nm) in einem modifizierten Hoagland-Medium, das zahlreiche Ionen enthielt, jedoch kein Chlorid.<sup>[202]</sup> Die Abtrennung der gebildeten Ionen von den Partikeln wurde mittels Ultrafiltration erreicht. Sie konnten ebenfalls eine erhöhte Auflösung von kleineren Silber-Nanopartikeln gegenüber größeren Partikeln nachweisen. Dabei wurde zum einen beobachtet, dass die kleineren Partikel länger für eine Gleichgewichtseinstellung brauchten als die größeren Partikel, zum anderen lösten sich die Partikel stets nur unvollständig auf.

*Ho et al.* zeigten anhand kinetischer Untersuchungen mittels UV-Spektroskopie, dass Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikeln mit einer Größe von 10 nm sehr Sauerstoff-sensitiv sind. Sie zeigten bei einem pH-Wert von 8,5 in Tris-Puffer, dass die Oxidation von Silber-Nanopartikeln erster Ordnung bezüglich der  $\text{Ag}(0)$ -Konzentration, der Sauerstoffkonzentration und der Konzentration des verwendeten Tris-Puffers ist. Die Autoren zeigten auch, dass die Reaktionsordnung unabhängig von der Partikelgröße ist. Dies untersuchten sie an Nanopartikeln mit Durchmessern zwischen 5 nm und 20 nm.<sup>[203]</sup>

In einer weiteren Publikation haben *Ho et al.* die Oxidation von nanopartikulärem Silber durch Wasserstoffperoxid als biologisch relevantem Oxidationsmittel untersucht.<sup>[204]</sup> Dabei fanden sie eine erhöhte Bakterientoxizität der oxidierten Partikel. Des Weiteren postulierten sie, dass die Oxidation des Silbers eine Reaktion erster Ordnung sowohl bezüglich des  $\text{Ag}(0)$  als auch des Wasserstoffperoxids ist.

*Lok et al.* konnten nachweisen, dass Silber-Nanopartikel durch Begasung mit Sauerstoff in wässriger Dispersion teilweise oxidiert werden können, und dass nur diese teilweise oxidierten Partikel eine antibakterielle Wirkung gegen *E. coli*-Bakterien zeigten. Nanopartikel, die nach der Oxidation einer reduzierenden Behandlung mit Natriumborhydrid unterzogen wurden, zeigten wiederum keine antibakterielle Aktivität.<sup>[198]</sup>

Erwähnenswert ist, dass bei allen Freisetzungsexperimenten auch nach extrem langen Versuchslaufzeiten keine vollständige Auflösung der Nanopartikel beobachtet wurde. Die Effekt der Bildung einer Art Gleichgewichtskurve, dass die Silber-Nanopartikel sich also nicht vollständig auflösen, wurde ebenfalls von mehreren Autoren beobachtet, beispielsweise von *Liu und Hurt*<sup>[201]</sup> und *Zhang et al.*<sup>[202]</sup> In Reinstwasser, das wie oben beschrieben  $5,2 \text{ mg L}^{-1}$  Sauerstoff enthält, kann ein Mangel an Sauerstoff nicht der limitierende Faktor sein, der die Auflösung zum Erliegen bringt. Bei der angegebenen Sauerstoffkonzentration sind in einem 400 mL fassenden Dialyseansatz  $6,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol O}_2$  gelöst. Nach der oben angegebenen Gleichung kann ein Sauerstoffmolekül vier Silberatome oxidieren. Die molare Menge an Silber beträgt bei einer Silberkonzentration von  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$  und einem Volumen der eingesetzten Dispersion von 4 mL jedoch nur  $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$ . Es ist also mehr als genug gelöster Sauerstoff vorhanden, um die Nanopartikel vollständig zu oxidieren. Auch wenn Silber durch ausreichende Mengen gelösten Sauerstoffs thermodynamisch vollständig oxidiert werden müsste, so ist dennoch zu beachten, dass die für derartige Betrachtungen herangezogenen Daten stets für makroskopische Materialien gelten. Nanopartikuläres Silber weist aber sicherlich abweichende thermodynamische Eigenschaften auf.<sup>[205, 206]</sup> Silber-Nanopartikel weisen beispielsweise eine höhere spezifische Oberflächenenergie und eine höhere Bildungsenthalpie auf als die gleiche Menge makroskopischen Silbers.<sup>[202, 207]</sup> Sowohl die Ionenfreisetzung aus Silber-Nanopartikeln als auch aus makroskopischem Silber wird durch den Einfluss von Cystein stark gehemmt. Der Zusatz der Aminosäure zu der Dialyse von Silber-Nanopartikeln führte dazu, dass keinerlei Auflösung gemessen werden konnte. Bei den Silberbarren, die lediglich zu Beginn des Experiments in Cysteinlösung getaucht und dann in Reinstwasser gelegt wurden, lag die Ionenfreisetzung deutlich unter der der nicht behandelten Barren. Offenbar ist Cystein in der Lage, das metallische Silber an der Freisetzung von Ionen zu hindern oder es bindet entstehende Silberionen. Cystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure und kann an Silber-Nanopartikel binden. *Mandal et al.* zeigten, dass sich dabei zwischen den mit dem Cystein funktionalisierten Partikeln Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, die die Partikel reversibel zur Agglomeration bringen. Diese Agglomeration ist durch eine Erhitzung auf  $60 \text{ °C}$  rückgängig zu machen.<sup>[208]</sup>

Auf Abbildung 90 ist deutlich zu erkennen, dass der Silberbarren, der mit Cystein behandelt wurde, nach dem Ionenfreisetzungsexperiment eine dunkle Färbung aufwies. Dies könnte durch Silbersulfid verursacht worden sein, das sich auf der Oberfläche gebildet hat. Cystein kann sich in Wasser zu Schwefelwasserstoff zersetzen,<sup>[209]</sup> das wiederum das Silber angreift und zur Bildung von Silbersulfid führt. Diese Oberflächenmodifizierung könnte die Ursache für die geringere Ionenfreisetzung sein.

*Levard et al.* haben Silber-Nanopartikel an der Oberfläche durch eine Behandlung mit Natriumsulfid mit einer Sulfidschicht versehen und anschließend den Einfluss auf die Auflösung der Nanopartikel untersucht.<sup>[210]</sup> Die Autoren konnten mittels Transmissionselektronenmikroskopie zeigen, dass sich durch die Sulfidisierung der Partikeloberfläche interpartikuläre Silbersulfid-Brücken ausbilden. Ebenfalls wurde gezeigt, dass das PVP, das (wie bei den hier verwendeten Partikeln) als Funktionalisierung zur Stabilisierung der Nanopartikel verwendet wurde, nicht nur kein Hindernis für die Silbersulfid-Bildung darstellt, sondern sogar zum Teil im Laufe der Sulfidisierung verdrängt wurde. In der Arbeit wurde auch gezeigt, dass die Sulfidbildung an der Partikeloberfläche die Freisetzung von Silberionen in Abhängigkeit von der zugesetzten Natriumsulfidmenge bis unter die Nachweisgrenze verringern kann. Silbersulfid besitzt ein ausgesprochen geringes Löslichkeitsprodukt, worin vermutlich die geringe gemessene Ionenfreisetzung begründet liegt.

Die Untersuchung der Auflösung von Silber-Nanopartikeln in chloridhaltigen Medien zeigte, dass dort die Ionenfreisetzung ebenfalls erheblich geringer als in reinem Wasser ist. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Bildung schwerlöslicher Spezies zurückzuführen. Silberchlorid hat ein Löslichkeitsprodukt von nur  $1,7 \cdot 10^{-10} \text{ mol}^2 \text{ L}^{-2}$  und bildet sich vermutlich mit den aus den Partikeln freigesetzten Ionen. Es fällt also innerhalb des Dialyseschlauches aus, sodass es im Dialysemedium nicht messbar ist. Für die 0,9 %-ige Natriumchlorid-Lösung ist nur eine Silberkonzentration über dem Silberchlorid von  $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$  zu erwarten. Mit etwa  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  wurde am Ende der knapp 3700 Stunden dauernden Dialyse jedoch eine erheblich höhere Silberkonzentration gefunden.

Auch Silberphosphat ist schwerlöslich (Löslichkeitsprodukt:  $1,6 \cdot 10^{-18} \text{ mol}^4 \text{ L}^{-4}$ ),<sup>[211]</sup> was beispielsweise im PBS, das neben Chlorid noch große Mengen Phosphat enthält, das Auflösungsverhalten des Silbers beeinflusst und offenbar zu einer noch geringeren Auflösung des Silbers führt. Die gefundene Silberkonzentration scheint

der zu erwartenden Menge zu widersprechen, jedoch ist bei der Angabe der Löslichkeitsprodukte zu berücksichtigen, dass diese nur für makroskopische Stoffe gelten und nicht für Nanopartikel. Des Weiteren ist denkbar, dass das Silberchlorid, das sich mit den freiwerdenden Silberionen bildet, zu einem gewissen Teil in feinverteilter Form, also als nanoskopisches Kolloid vorliegt. Dieses kolloidale Silberchlorid oder andere schwerlösliche Silberverbindungen könnten durch die Dialysemembrane diffundiert sein, was die verhältnismäßig hohe gemessene Silberkonzentration erklärt.

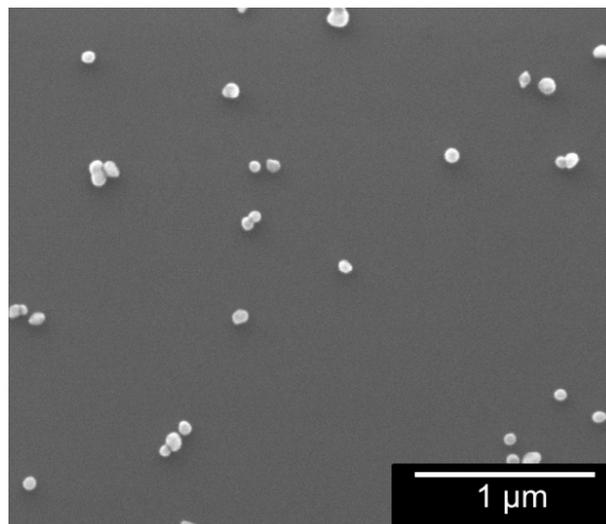
Aus den Auflösungsexperimenten kann das Fazit gezogen werden, dass die Freisetzung von Ionen aus Silber-Nanopartikeln in biologischen Medien und in Anwesenheit von lebenden Organismen (wie Zellen in Zellkulturexperimenten) sehr komplex sein wird. Auf der einen Seite sind Stoffe vorhanden, die die Auflösung der Partikel fördern, wie Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Auf der anderen Seite sorgen reduzierende Stoffe, Komplexbildner und Ionen, die Silberionen ausfällen können, dafür, dass die Ionenfreisetzung aus den Nanopartikeln geringer wird. Es dürfte also zu einem ausgesprochen komplexen Wechselspiel aller vorhandenen Bestandteile kommen. Wenn man nun noch bedenkt, dass in Zellkulturmedien, denen oft Proteingemische wie fetales Kälberserum zugesetzt wird, nicht einmal alle vorhandenen Bestandteile bekannt sind, wirft dies die Frage auf, ob das Verhalten von Silber-Nanopartikeln bezüglich ihrer Ionenfreisetzung in realen Umgebungen wie einer lebenden Zelle oder auch nur in Blut, wo sich z.B. Proteincoronae um die Partikel bilden können, in Zukunft ausreichend geklärt werden kann.

### **5.3 Untersuchung der Bildung einer Oberflächenmodifizierung auf Silber-Nanopartikeln durch den Einfluss von Natriumchlorid mittels HR-TEM**

Es wurde gezeigt, dass sich Silber-Nanopartikel in Reinstwasser und auch in Natriumchlorid-Lösung und PBS auflösen. Die Auflösung in den chloridhaltigen Medien ist zwar erheblich geringer als in Reinstwasser, aber dennoch vorhanden. Wenn Silber-Nanopartikel in biologischen Medien oder in anderen Medien dispergiert werden, die Chlorid enthalten, ist es denkbar, dass die sich aus den Nanopartikeln lösenden Silberionen mit dem Chlorid schwerlösliches Silberchlorid bilden, das eine passivierende Oberflächenschicht auf den Nanopartikeln bildet.

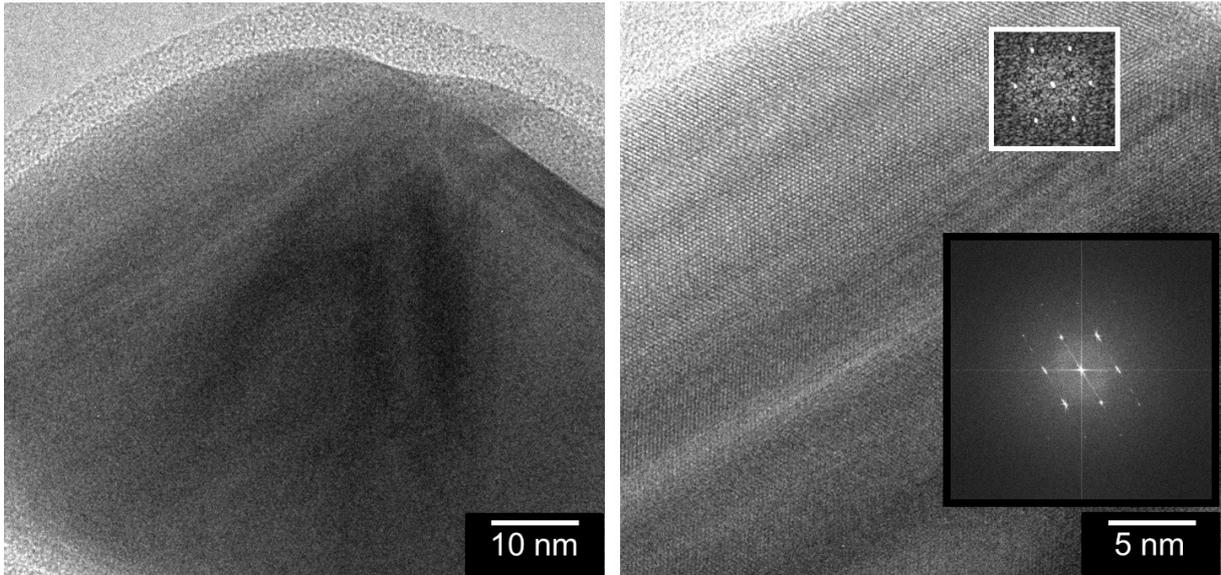
Daher wurde eine Dispersion der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in isotonischer Natriumchlorid-Lösung ( $\beta = 0,9 \text{ g L}^{-1}$ ) hergestellt. Die Silberkonzentration der Nanopartikel in dieser Dispersion betrug  $0,02 \text{ g L}^{-1}$ . Die Dispersion wurde gerührt und nach einem, sieben und vierzehn Tagen wurden Proben genommen. Die Nanopartikel in diesen Proben wurden durch zweifache Ultrazentrifugation (30 min bei  $30000 \text{ U min}^{-1}$ ) von der Natriumchlorid-Lösung getrennt, anschließend sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80 \text{ °C}$  bis zur Untersuchung mittels hochauflösender Transmissionselektronenmikroskopie (HR-TEM) gelagert. Die HR-TEM-Untersuchungen erfolgten durch L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet und M. Vallet-Regi an der Universität Madrid.

Abbildung 95 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der bei diesem Experiment verwendeten Nanopartikel bei 80000-facher Vergrößerung.



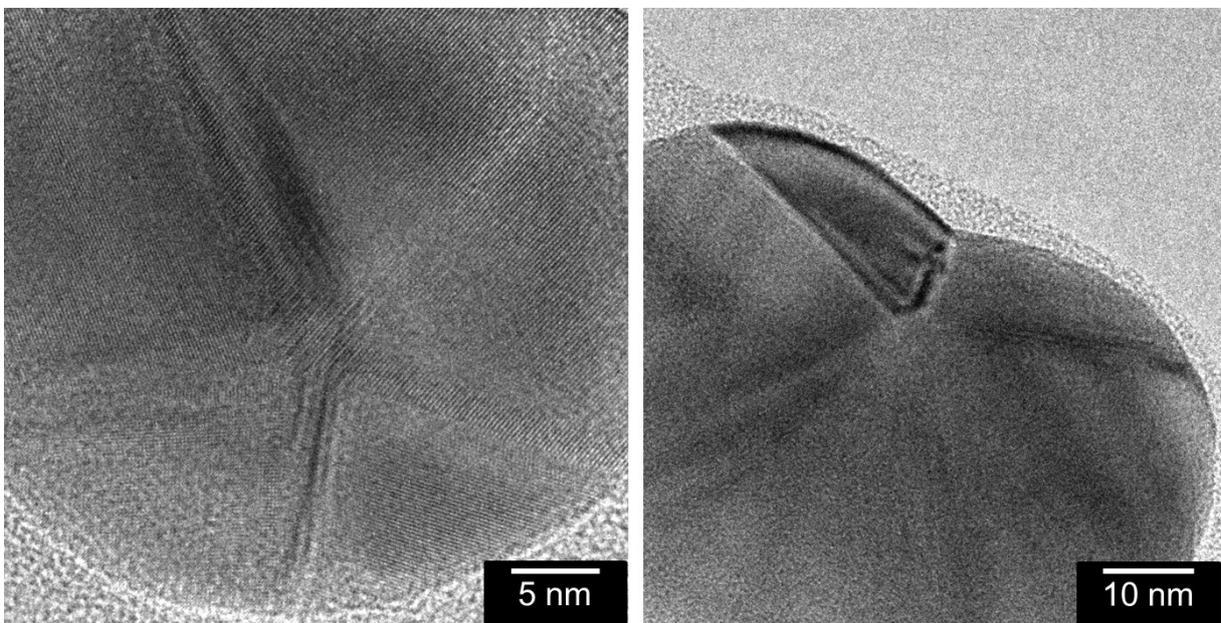
**Abbildung 95:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel, die für die Immersion in Natriumchlorid-Lösung verwendet wurden.

Man erkennt die sphärische Morphologie der Silber-Nanopartikel. Die Größe der Silber-Kerne beträgt im Mittel etwa 75 nm. Die gezeigte Aufnahme wurde von der unbehandelten Vergleichsprobe angefertigt. Ebenfalls von dieser Probe stammen die hochauflösenden TEM-Aufnahmen, die in Abbildung 96 zu sehen sind.



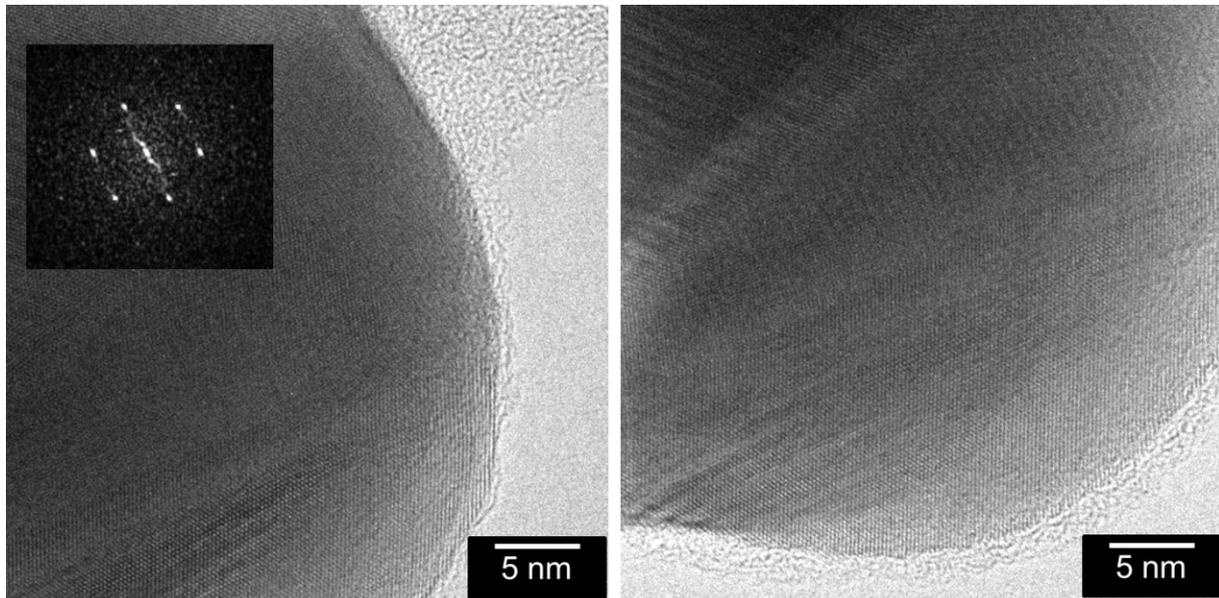
**Abbildung 96:** Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Die HR-TEM-Aufnahme der Nanopartikel, nachdem sie für einen Tag in der Natriumchlorid-Lösung dispergiert waren, ist in Abbildung 97 zu sehen.



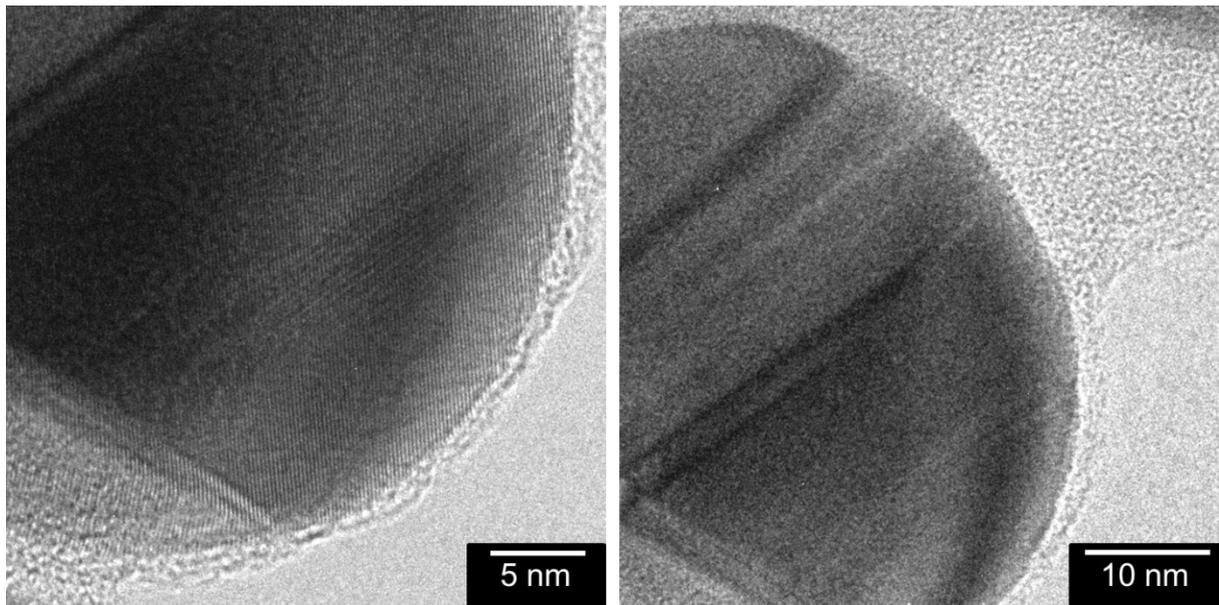
**Abbildung 97:** Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der einen Tag in Natriumchlorid-Lösung dispergierten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Abbildung 98 zeigt hochauflösende TEM-Aufnahmen der Partikel, die für sieben Tage in der isotonischen Natriumchlorid-Lösung dispergiert waren. Nach dieser Zeit traten bei den dispergierten Partikeln bereits deutliche Agglomerationserscheinungen auf.



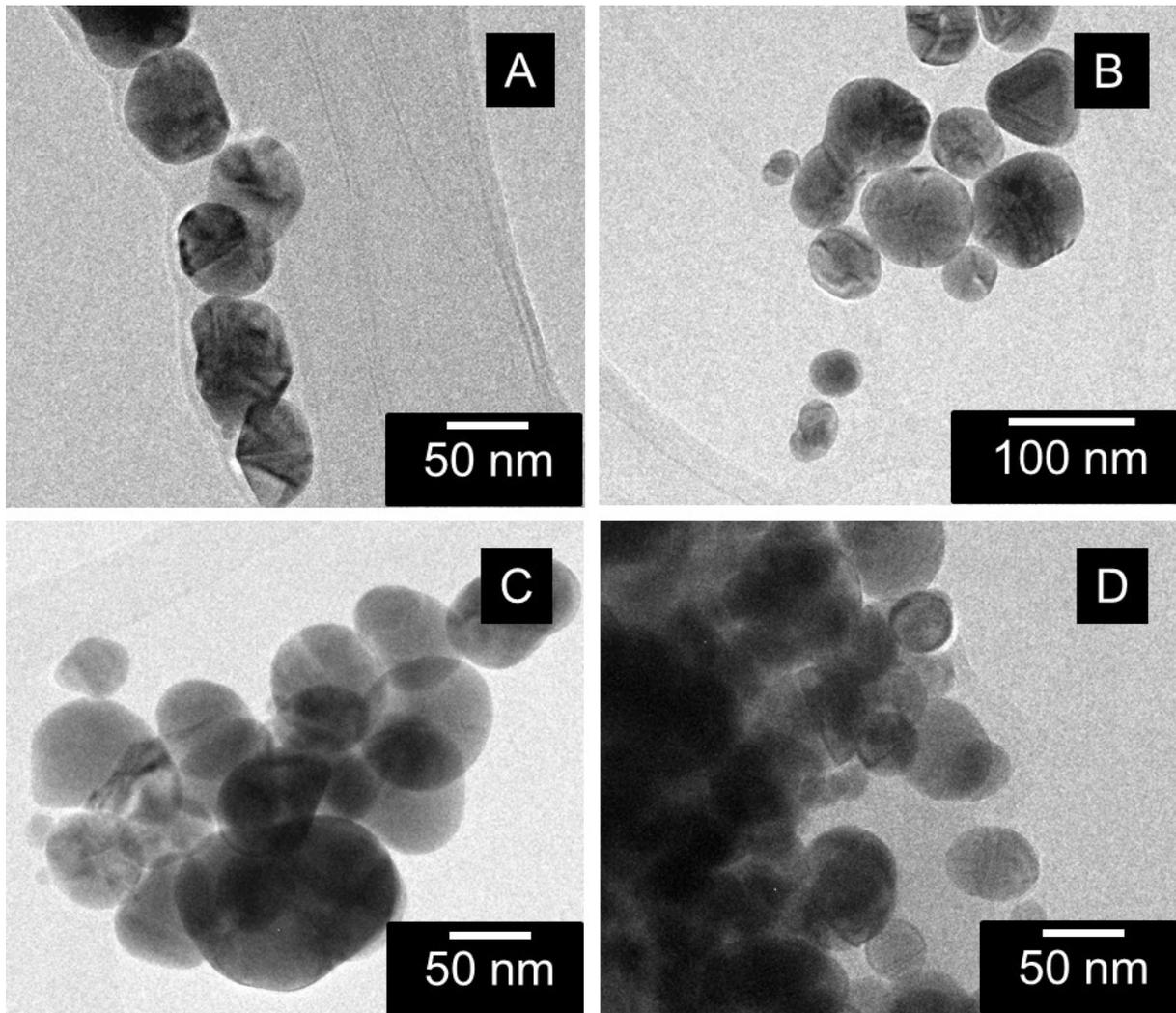
**Abbildung 98:** Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der sieben Tage in Natriumchlorid-Lösung dispergierten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Die für vierzehn Tage in der Natriumchlorid-Lösung gelagerten Partikel waren nach Ablauf dieser Zeit stark agglomeriert und konnten auch mittels Ultraschall nach der Reinigung nur schwer redispergiert werden. Die HR-TEM-Aufnahmen dieser Nanopartikel ist in Abbildung 99 gezeigt.



**Abbildung 99:** Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der vierzehn Tage in Natriumchlorid-Lösung dispergierten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

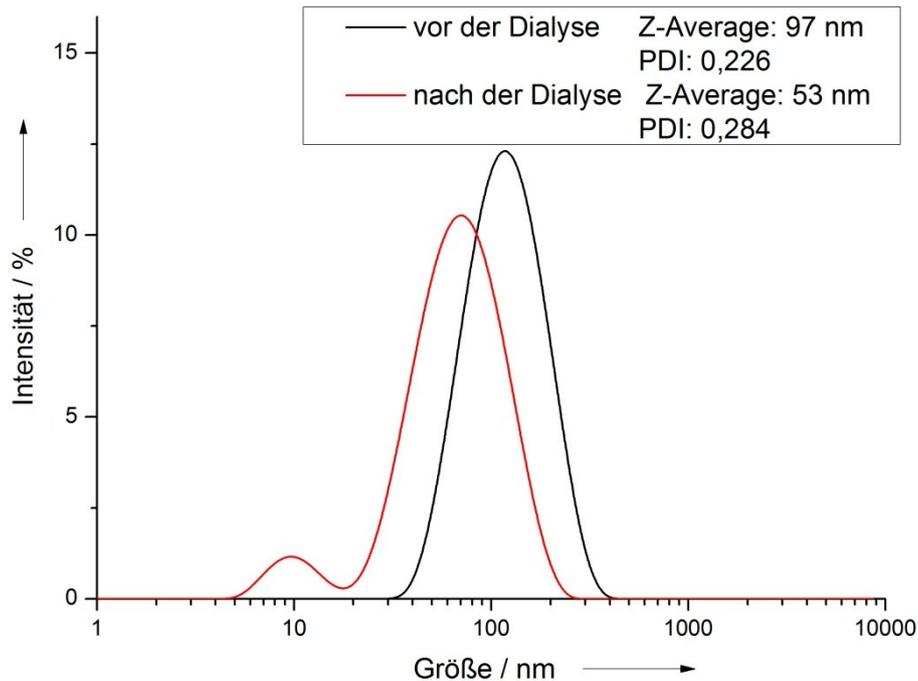
Bei allen Proben lagen kristalline, verzwilligte Nanopartikel vor. Die Kristallstruktur war kubisch-flächenzentriert, wie es für Silber zu erwarten war. Dies wurde durch Elektronenbeugung bestätigt. Es wurde in keinem Fall eine Modifikation der Oberfläche der Nanopartikel durch die Dispersion in der Natriumchlorid-Lösung festgestellt. Insbesondere wurde in keiner der Proben Silberchlorid nachgewiesen. Lediglich die zunehmende Agglomeration der Nanopartikel mit steigender Kontaktzeit zu der Natriumchlorid-Lösung ist in den Übersichtsaufnahmen, die in Abbildung 100 gezeigt werden, zu beobachten.



**Abbildung 100:** Übersichtsaufnahmen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel unbehandelt (A), nach einem Tag (B), sieben Tagen (C) und vierzehn Tagen (D) in Natriumchlorid-Lösung.

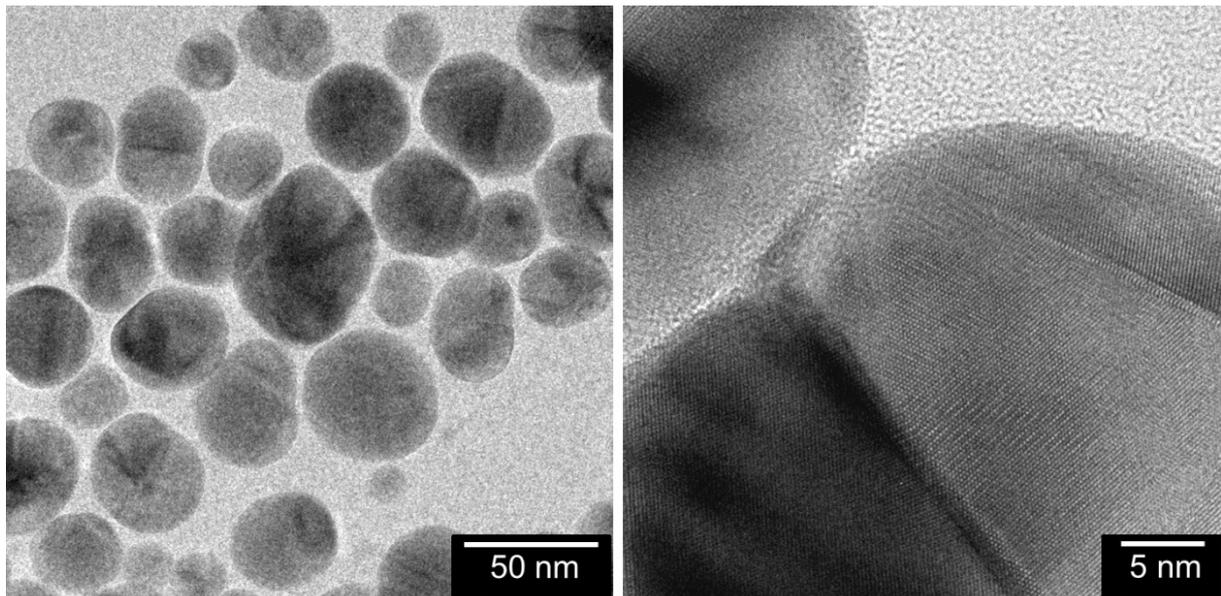
Allerdings darf diese Beobachtung wegen der Möglichkeit von Trocknungs- und Konzentrationsartefakten bei der Probenpräparation nicht überbewertet werden. Die Transmissionselektronenmikroskopie ist keine gut geeignete Methode, um die Agglomeration von Nanopartikel in einer Dispersion festzustellen. Neben der Möglichkeit, dass sich keine Silberchlorid-Schicht auf der Nanopartikeloberfläche gebildet hat, ist es auch denkbar, dass das Silberchlorid während der Zentrifugation der Partikel abgewaschen wurde. Dagegen spricht die Schwerlöslichkeit der Verbindung. Bei den vierzehn Tage in der Natriumchlorid-Lösung gelagerten Partikeln ist es zudem denkbar, dass die Ultraschallbehandlung die Silberchlorid-Schicht zerstört hat.

Zusätzlich zu den Nanopartikeln, die in der Natriumchlorid-Lösung gelagert wurden, wurden auch Nanopartikel untersucht, die für acht Monate bei 37 °C dialysiert wurden. Die Silberkonzentration im Dialyseschlauch betrug 0,05 mg mL<sup>-1</sup>, das Volumen des Reinstwassers als Dialysemedium war 396 mL. In Abbildung 101 ist die Größenmessung mittels Dynamischer Lichtstreuung der Nanopartikel vor und nach der Dialyse gezeigt.



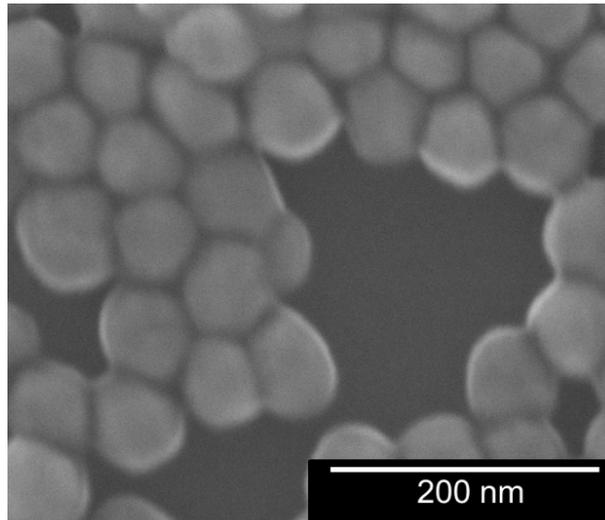
**Abbildung 101:** Größenmessung mittels Dynamischer Lichtstreuung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel vor (schwarz) und nach (rot) einer achtmonatigen Dialyse bei 37 °C. Gezeigt ist die Auftragung nach der Streulichtintensität.

Der Z-Average der frischen Nanopartikel, die für die Dialyse eingesetzt wurden, beträgt 97 nm, der PDI ist 0,226. Nach der achtmonatigen Dialyse liegt der Z-Average bei 53 nm und der PDI bei 0,284. Die Partikel sind also bei der Dialyse kleiner und polydispenser geworden. In der Grafik ist bei der Messkurve der dialysierten Nanopartikel ein zusätzliches Maximum bei geringer Größe hinzugekommen. Die hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme dieser dialysierten Partikel ist in Abbildung 102 zu sehen.



**Abbildung 102:** Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der acht Monate bei 37 °C dialysierten, mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Auch hier ist, wie schon bei den in Anwesenheit von Natriumchlorid dispergierten Partikeln, keinerlei Veränderung der Oberflächenstruktur zu erkennen, die auf die Auflösung hinweist. Lediglich die Größe der auch in diesen Aufnahmen verzwillingten, kubisch-flächenzentrierten Silber-Nanopartikel hat abgenommen. Nach der Dialyse wurde im HR-TEM eine Größe von 25 nm bis 60 nm bestimmt. Die frischen Nanopartikel vor der Dialyse wiesen einen Durchmesser von 70 nm bis 75 nm auf, was anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme aus Abbildung 103 ermittelt wurde.



**Abbildung 103:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel, die für die Dialyse verwendet wurden.

Dieser Wert stimmt auch mit der Partikelgröße überein, in Kapitel 5.1.1 bei der Charakterisierung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel ermittelt wurde. Die Größenabnahme, die im HR-TEM ermittelt wurde, korreliert gut mit den Beobachtungen aus der Dynamischen Lichtstreuung.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie keinerlei Oberflächenmodifikation an den Nanopartikeln festgestellt werden konnte. Es war weder die Anwesenheit von Silberchlorid an der Partikeloberfläche bei den in Natriumchlorid-Lösung dispergierten Nanopartikeln nachzuweisen noch die Veränderung der Partikeloberfläche bei langer bei erhöhter Temperatur in Wasser dialysierten Nanopartikeln. Gerade beim Kontakt der Silber-Nanopartikel mit chloridhaltigen Medien ist die Bildung von Silberchlorid nahezu unvermeidbar. Offenbar bildet dieses aber keine anhaftende feste Schicht auf den Nanopartikeln, sondern bildet sich abseits der Partikel, möglicherweise als eigene kolloide Spezies. Dies konnte mit den Experimenten in diesem Kapitel allerdings nicht untersucht bzw. gezeigt werden. Die Untersuchung ergab allerdings hervorragende hochauflösende TEM-Bilder der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel, auf denen wegen der nahezu atomaren Auflösung die Netzebenen sehr gut zu erkennen sind.

## **5.4 Konservierung von Silber-Nanopartikeln für die Tiefkühlung und Gefriertrocknung mittels eines Kryoprotektors**

Als Konsequenz aus den bisher gewonnenen und diskutierten Erkenntnis über die Auflösung und die damit verbundene Veränderung von Nanopartikeln in Dispersion, gilt es Möglichkeiten zu finden, um Nanopartikel nach der Synthese zu konservieren. Die Partikel sollen in eine lagerfähige Form überführt werden, in der zum einen die kolloidale Alterung von Partikeldispersionen im Allgemeinen verhindert oder stark herabgesetzt wird, und zum anderen die Freisetzung von Ionen aus den Silber-Nanopartikeln verringert oder unterbunden wird.

Dies ist aus mehreren Gründen wünschenswert oder sogar erforderlich. Die Durchführung systematischer Untersuchungen wird durch die ständige und rasche Veränderung der Eigenschaften der kolloidalen Silber-Nanopartikel während der Lagerung sehr erschwert. Insbesondere zellbiologische Experimente sind durch die sich rasch verändernde Zelltoxizität der Nanopartikel schwierig und untereinander nahezu nicht zu vergleichen. Streng genommen müssten alle zellbiologischen Experimente zu einem stets exakt gleich gehaltenen Zeitpunkt nach der Synthese der jeweils verwendeten Nanopartikel-Charge durchgeführt werden. Dies ist aus naheliegenden Gründen nicht immer möglich, sei es durch materielle, personelle oder experimentelle Faktoren, die zu Verzögerungen von Experimenten führen können. Es seien als Beispiele nur der Ausfall eines Messgerätes, die Verunreinigung einer Zellkultur während der Aussaat oder eine Verzögerung bei der Bearbeitung der Konzentrationsbestimmung der Nanopartikel-Dispersion erwähnt, was in der Praxis durchaus vorkommt. Auch ist es oftmals erstrebenswert, Proben bestimmter Partikelchargen für spätere Kontrollexperimente oder einfach als Referenz aufzubewahren. Da nicht jede Synthese die völlig identischen Nanopartikel liefert wie die vorhergehende, sind Vergleiche zwischen verschiedenen Partikelchargen sicherlich schwieriger und potentiell eher mit Fehlern behaftet als Vergleiche von Experimenten, die stets mit Partikeln einer einzigen Synthesecharge durchgeführt wurden. Es sei bezüglich der Reproduzierbarkeit einer Nanopartikelsynthese nur auf die bereits angesprochenen Schwierigkeiten und Schwankungen beim Polyol-Prozess hingewiesen (vgl. Kapitel 5.1.9).

Die erste, naheliegende Möglichkeit zur Konservierung ist es, die die Ionenfreisetzung auslösenden oder beschleunigenden Faktoren auszuschalten. Hier ist zunächst die Lagerung der Dispersionen bei erniedrigter Temperatur, also im

Kühlschrank angezeigt. Bei 5 °C erfolgt die Freisetzung von Ionen aus dispergierten Nanopartikeln zum einen langsamer als beispielsweise bei Raumtemperatur, zum anderen lösen sich die Partikel auch zu einem geringeren Anteil auf.<sup>[195]</sup> Auch die kolloidale Alterung der Partikel wird durch die Temperaturniedrigung verlangsamt. Eine wirksame Langzeitkonservierung der dispergierten Partikel ist so allerdings nicht möglich. Dies wird schon durch die fortschreitende Erhöhung der Toxizität von bei 5 °C gelagerten Silber-Nanopartikeln auf humane mesenchymale Stammzellen im Verlauf von drei Monaten deutlich (vgl. Kapitel 5.7.2.1).

Aus Kapitel 5.2.2 ist bekannt, dass die Silber-Nanopartikel sich in zunächst entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Reinstwasser nur in sehr geringem Umfang auflösen. Durch Dispergierung der Nanopartikel in entsprechend aufbereitetem Reinstwasser am Ende der Synthese kann die Ionenfreisetzung über mehrere Monate hinweg zum größten Teil vermieden werden. Allerdings ist diese Methode mit einem relativ großen Arbeitsaufwand verbunden, der außerdem fehleranfällig ist. Es muss zunächst das Wasser kontaminationsfrei aufbereitet und dann unter Schutzgasatmosphäre gehalten werden, dann muss die Aufarbeitung der Nanopartikel nach der Synthese mit diesem Wasser und unter weitgehender Schutzgasatmosphäre erfolgen und zuletzt muss die Partikeldispersion in geeigneter Form unter Schutzgas zum Gebrauch abgefüllt werden. Letzteres geschieht durch Abfüllung in kleinen Portionen unter Argon-Atmosphäre in Eppendorf-Reaktionsgefäße. Durch all diese Maßnahmen muss sichergestellt werden, dass kein Luftsauerstoff in die Partikeldispersion gelangt, der die Oxidation der Partikel und damit die Ionenfreisetzung wieder beschleunigen würde. Ein weiteres Problem dieser Methode ist, dass das zur Dispergierung der Partikel verwendete Wasser nicht vollständig sauerstofffrei herzustellen ist. Der geringe zurückbleibende Sauerstoffanteil und bei der Abfüllung und Handhabung der Partikeldispersion wieder eindiffundierender Sauerstoff führt zu einer geringfügigen Oxidation. Unbemerkt während der Lagerung eindringende Luft kann dazu führen, dass sich die Partikel auflösen und sich die Eigenschaften der Partikel ändern, ohne dass dies direkt nachweisbar ist. Außerdem ist die Lagerung unter Sauerstoffausschluss nicht in der Lage, die in Dispersion auftretende kolloidale Alterung der Nanopartikel zu verhindern.

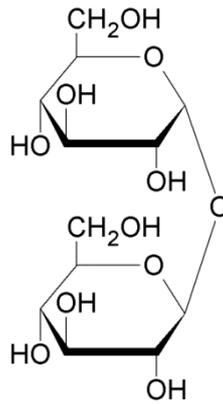
Um sowohl die Alterung des Kolloids als auch die Auflösung des metallischen Silbers zu verhindern, müssen die Partikel also chemisch inert und thermisch völlig

immobilisiert gelagert werden. Dies kann durch Einfrieren der wässrigen Dispersion und anschließende tiefgekühlte Lagerung geschehen. Die Nanopartikel werden bei geeigneter Methodik in ihrem erstarrten Dispersionsmittel weitgehend bewegungslos eingebettet. Durch die Immobilisierung der Partikel wird die im Wesentlichen auf Stößen der Partikel untereinander (bei den hier besprochenen Silber-Nanopartikeln; ansonsten spielt unter Umständen auch die Ostwaldreifung eine Rolle) beruhende Alterung der Nanopartikel in der Dispersion eliminiert. Durch eine ausreichend tiefe Temperatur wird auch die chemische Veränderung der Partikel dadurch wirksam aufgehalten, dass nur noch sehr wenig Gasdiffusion und Stoffaustausch von und zu den Partikeln ermöglicht ist.

Eine noch weitergehende Inertisierung der Nanopartikel-Dispersion ist dadurch möglich, dass man das Dispersionsmittel (Wasser) nicht nur einfriert, um die Partikel zu immobilisieren, sondern das Dispersionsmittel vollständig entfernt. Dies kann zum Beispiel durch Gefriertrocknung (Lyophilisation) erreicht werden. Durch das Fehlen des Dispersionsmittels wird bei anschließender trockener und eventuell unter Schutzgasatmosphäre stattfindender Lagerung der Partikel jegliche kolloidale Alterung und auch die Auflösung der Partikel verhindert.

Problematisch bei diesen beiden auf den ersten Blick vielversprechenden Methoden ist jedoch, dass es möglich sein muss, die Partikel nach der Lagerung für den Gebrauch ohne Qualitätseinbußen in den ursprünglichen kolloidalen Zustand zurückzusetzen. Beim Einfrieren der Dispersion ist es durch die Wahl der Methodik (Schockgefrieren) möglich und vorstellbar, dass die Partikel dispers erhalten bleiben. Die Monodispersität der Partikel in den nach der Lagerung im tiefgefrorenen Zustand redispergierten Proben wird aber unter Umständen gelitten haben. Nach der Gefriertrocknung ist eine Redispergierung der Partikel nicht mehr möglich, da sie durch die Trocknung irreversibel verklumpt bzw. agglomeriert sind.

Durch den Zusatz von Kryoprotektoren zu der Dispersion lässt sich die Agglomeration während des Einfrierens oder Gefriertrocknens verhindern. Als Kryoprotektoren kommen vor allem Zucker zum Einsatz, die beim Einfrieren eine Matrix bilden, in die die Nanopartikel eingebettet sind.<sup>[135, 136]</sup> Diese Matrix bleibt beim Gefriertrocknen erhalten und schützt die Partikel dadurch, dass sie sich nicht annähern können, vor der irreversiblen Agglomeration. Nach der Redispergierung liegen die Partikel nahezu unverändert im Dispersionsmittel vor. Als Kryoprotektor kommt hier der Zucker Trehalose (Abbildung 104) zum Einsatz.



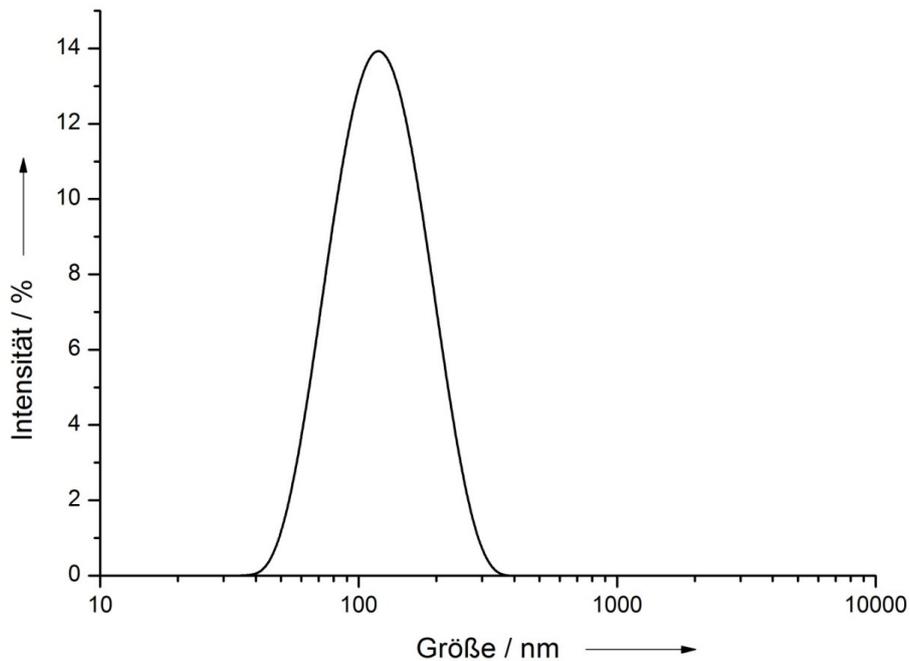
**Abbildung 104:** Lewis-Strukturformel von D-(+)-Trehalose.

#### 5.4.1 Tiefkühlung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel

Es wurde versucht, die etwa 70 nm großen, mit Glucose reduzierten und mit PVP funktionalisierten Silber-Nanopartikel, die für eine Vielzahl der Experimente in dieser Arbeit verwendet wurden, durch Zusatz von Trehalose als Kryoprotektor für die Tiefkühlung zu konservieren.

Für die Beurteilung des Erfolges der Versuche wurde die Dynamische Lichtstreuung verwendet. Hierbei wurde jeweils der Z-Average betrachtet. Dieser ist zwar als Maß für die tatsächliche Größe der Nanopartikel nur beschränkt aussagekräftig (vgl. Kapitel 5.1.9), da er die mittlere Größe der Nanopartikel in einem nicht ausgesprochen monodispersen System teils deutlich überschätzt. Jedoch ist er ein gutes Maß für die Veränderung der Probe hin zur Polydispersität, da er auf einsetzende Agglomeration in einer Dispersion ausgesprochen empfindlich reagiert.

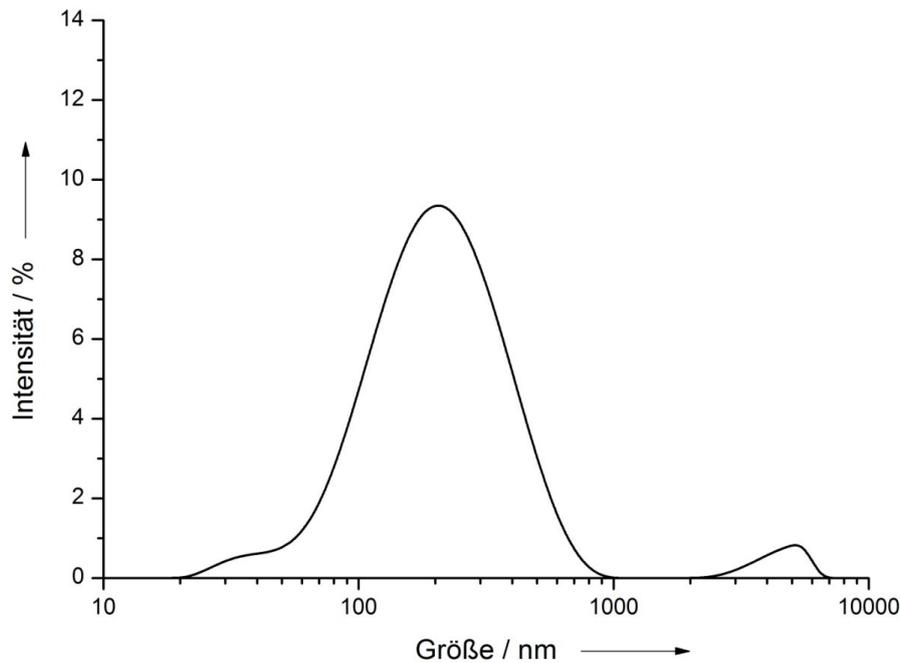
Die Partikel wurden zunächst in reiner und unbehandelter Form mittels Dynamischer Lichtstreuung charakterisiert. Dazu wurden 50  $\mu\text{L}$  einer Dispersion mit einem Silbergehalt von  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  mit 1 mL Reinstwasser verdünnt und in einer Einwegküvette gemessen. Abbildung 105 zeigt die erhaltene Größenverteilung als Auftragung nach der Streulichtintensität.



**Abbildung 105:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der unbehandelten (nicht eingefrorenen oder gefriergetrockneten) mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Der Z-Average dieser Nanopartikel beträgt 109 nm. Der PDI ist 0,142, womit gezeigt ist, dass es sich um ein monodisperses System handelt. Es ist nur ein Größenmaximum erkennbar.

Die wässrige Dispersion wurde zunächst ohne den Zusatz von Trehalose eingefroren, um den Effekt des Einfrier- und Auftauvorgangs auf die Monodispersität der Dispersion zu untersuchen. Hierfür wurde eine Dispersion auf einen Silbergehalt von  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  eingestellt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Partikel wurden dann bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Nach einer Lagerzeit von zehn Tagen wurde die gefrorene Dispersion bei Raumtemperatur ohne Schütteln oder andere Behandlung auftauen gelassen. Nach dem vollständigen Auftauen wurde die Probe geschüttelt,  $50 \mu\text{L}$  entnommen, mit  $1 \text{ mL}$  Reinstwasser verdünnt und erneut mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 106 dargestellt.

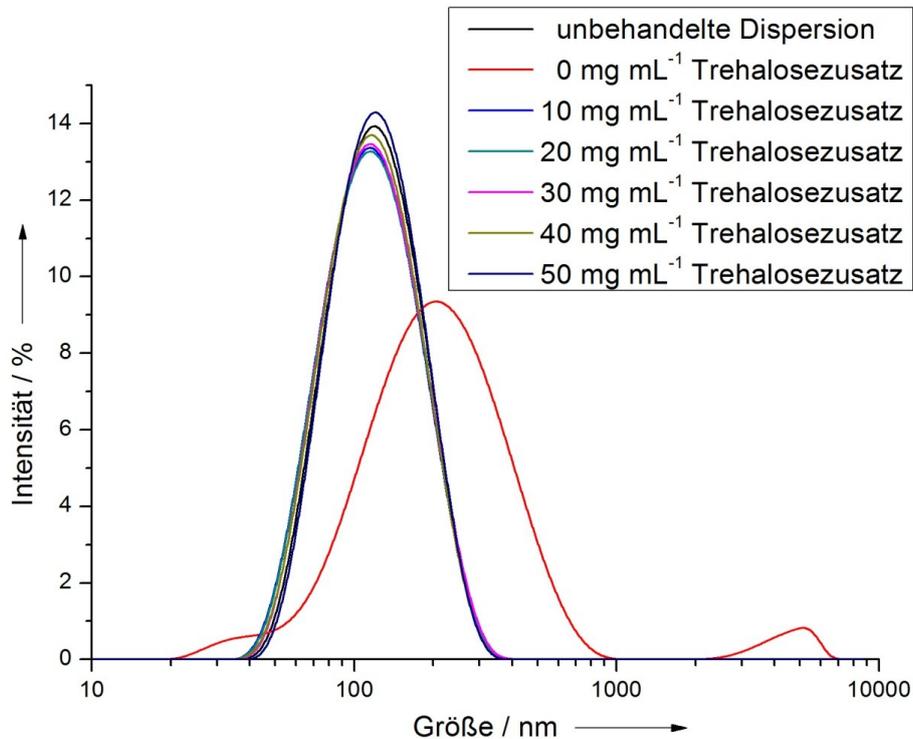


**Abbildung 106:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der ohne Zusatz von Trehalose eingefrorenen und wieder redispersierten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Nach dem Auftauen ist die Probe polydisperser geworden und die Nanopartikel weisen eine deutlich angestiegene mittlere Größe auf. Der Z-Average beträgt nun 174 nm, ein Zuwachs von 65 nm im Vergleich zur nicht eingefrorenen Dispersion. Der PDI ist auf 0,329 angestiegen, dies ist mehr als doppelt so groß wie bei der unbehandelten Probe. Die Dispersion ist also nicht mehr als monodispers anzusehen. Es ist bei der Messkurve nicht mehr nur ein Größenmaximum zu sehen. Der Hauptpeak ist zu größeren Durchmessern verschoben, es sind eine Schulter bei kleineren Größen und ein zweiter Peak im Bereich mehrerer Mikrometer zu erkennen. Die Partikel können also nicht ohne weiteres eingefroren werden, ohne dass es zu Agglomerationserscheinungen und einem deutlichen Anstieg des Polydispersitätsindex der Dispersion kommt.

Um diese negativen Effekte zu vermeiden, wurden die Nanopartikel vor dem Einfrieren mit unterschiedlichen Mengen Trehalose versetzt. Dazu wurden jeweils Dispersionen mit einem Silbergehalt von  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  mit Mengen zwischen  $10 \text{ mg L}^{-1}$  und  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Trehalose versetzt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach einer Lagerzeit von zehn Tagen wurden die Proben bei Raumtemperatur langsam aufgetaut, geschüttelt und mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht. Dazu wurden  $50 \mu\text{L}$  Dispersion mit  $1 \text{ mL}$  Reinstwasser

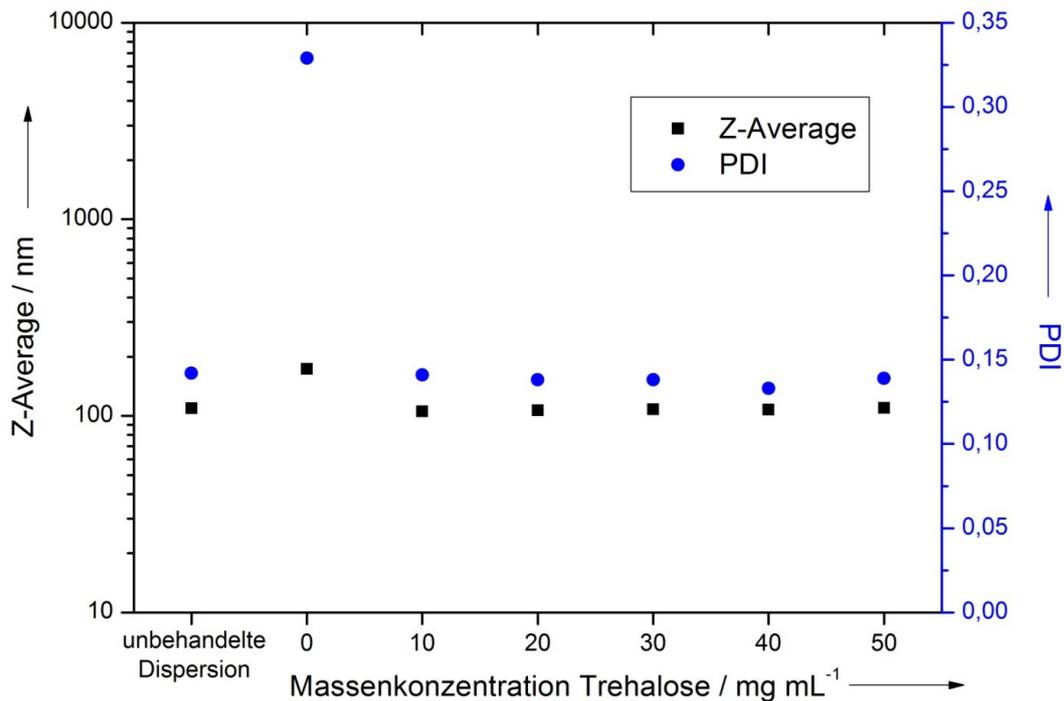
verdünnt. Durch diese Verdünnung wurde ein Einfluss der gelösten Trehalose auf die Viskosität der Flüssigkeit und damit auf das Messergebnis weitgehend verhindert. Die erhaltenen Größenverteilungen dieser Messungen sind in Abbildung 107 zusammengefasst.



**Abbildung 107:** Vergleich der mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmten Größenverteilungen von mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen Trehalose eingefroren und wieder redispergiert wurden und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Es sind zum Vergleich ebenfalls die Größenverteilungen der unbehandelten Dispersion (schwarz) und der ohne Trehalosezusatz eingefrorenen Dispersion (rot) abgebildet. Es ist gut zu erkennen, dass die Messungen nach dem Einfrieren mit Trehalose und dem anschließenden Wiederauftauen nahezu keine Veränderung der Größenverteilung der Nanopartikel zeigen. Die Kurven der unbehandelten Dispersion und der mit unterschiedlichen Trehalosezusätzen eingefrorenen und wieder aufgetauten Dispersionen liegen gut übereinander und sind fast deckungsgleich. Im Vergleich dazu ist bei den ohne Trehalose eingefrorenen Nanopartikeln eine deutliche Verschiebung der Kurve zu größeren Partikeldurchmessern und eine Verbreiterung der Größenverteilung gut zu erkennen.

In Abbildung 108 sind die Werte für den Z-Average und den PDI aller Dispersionen in Abhängigkeit von der zugesetzten Trehalosemenge aufgetragen.



**Abbildung 108:** Auftragung der Werte des Z-Average und des PDI (gemessen mittels Dynamischer Lichtstreuung) der mit unterschiedlichen Trehalose-Zusätzen eingefrorenen und wieder redispersierten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Trehalose-Konzentration und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Wie schon anhand des rein optischen Vergleichs der Messkurven in Abbildung 107 ersichtlich war, sind die mittlere Partikelgröße und der PDI der mit Trehalose eingefrorenen Dispersionen nahezu identisch mit den Werten der unbehandelten Dispersion. Dies gilt unabhängig von der zugesetzten Trehalosemenge. Es ist also schon bei einem Zusatz von nur 10 mg mL<sup>-1</sup> Trehalose zu der Nanopartikel-Dispersion ein gut stabilisierender Effekt zu beobachten.

In Tabelle 18 sind die Werte für den Z-Average und den PDI aller gemessenen Proben zusammengefasst.

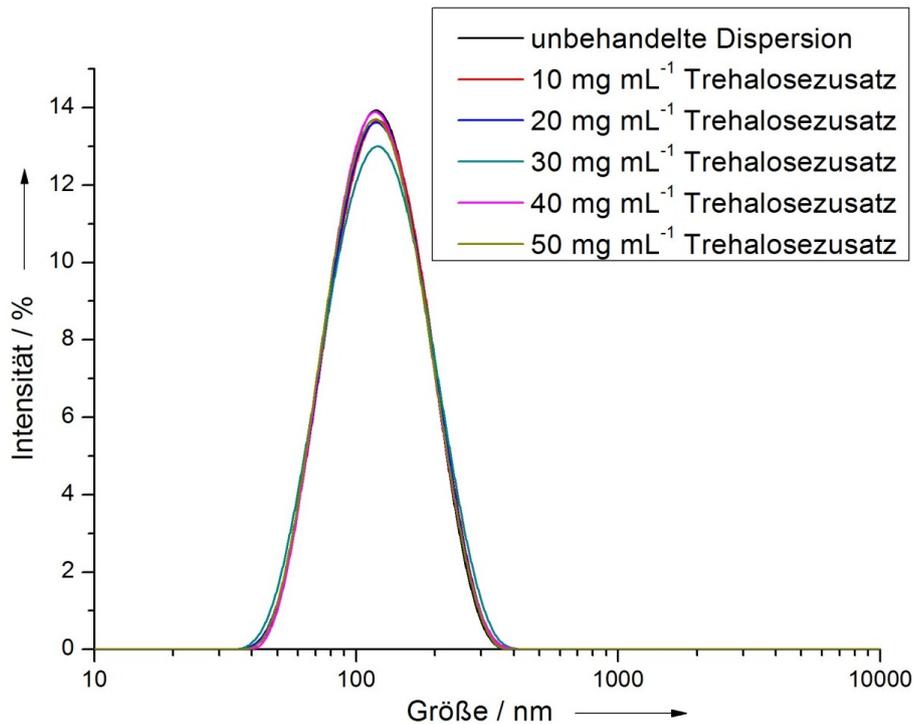
**Tabelle 18:** Zusammenfassung der Werte des Z-Average und des PDI der mit und ohne Trehalosezusatz eingefrorenen und anschließend redispergierten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit den Werten der unbehandelten Dispersion.

<b>Massenkonzentration Trehalose</b> <b>/ mg mL<sup>-1</sup></b>	<b>Z-Average (DLS)</b> <b>/ nm</b>	<b>PDI (DLS)</b>
0	174	0,329
10	106	0,141
20	107	0,138
30	108	0,138
40	108	0,133
50	110	0,139
[unbehandelte Dispersion]	109	0,142

#### **5.4.2 Gefriertrocknung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel**

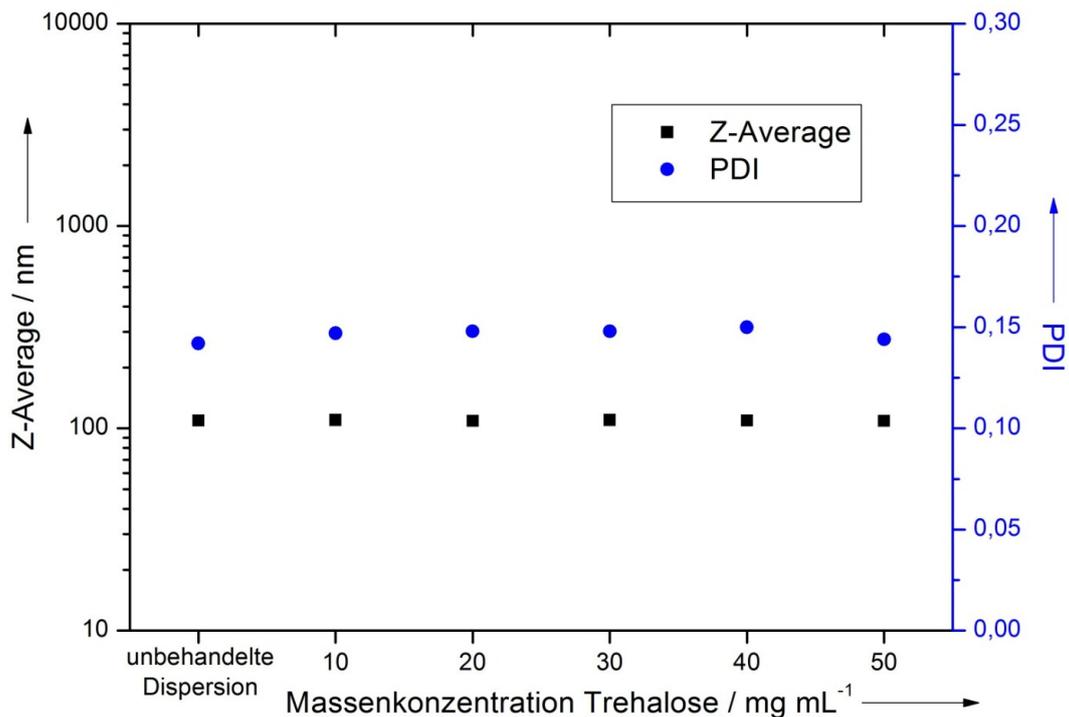
Nach der erfolgreichen Konservierung der Nanopartikel für die Tiefkühlung wurde die Möglichkeit untersucht, die Nanopartikel mit Zusätzen unterschiedlicher Mengen Trehalose zu lyophilisieren.

Zu diesem Zweck wurde eine Dispersion mit einem Silbergehalt von 500 µg mL<sup>-1</sup> mit Trehalose in einem Konzentrationsbereich von 10 mg mL<sup>-1</sup> bis 50 mg mL<sup>-1</sup> versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet und bei Raumtemperatur für zehn Tage verschlossen, trocken und lichtgeschützt gelagert. Danach wurden die Partikel in Reinstwasser redispergiert und auf das Anfangsvolumen aufgefüllt. Die Dispersionen wurden mittels Dynamischer Lichtstreuung charakterisiert. Dazu wurden jeweils 50 µL Dispersion mit 1 mL Reinstwasser verdünnt, um eine Viskositätsveränderung durch den Trehalosegehalt auszuschließen. In Abbildung 109 sind die erhaltenen Größenverteilungen als Auftragung nach der Streulichtintensität dargestellt.



**Abbildung 109:** Vergleich der mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmten Größenverteilungen von mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen Trehalose gefriergetrocknet und wieder redispergiert wurden und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Die Abbildung zeigt ebenfalls zum Vergleich das Messergebnis einer unbehandelten, also nicht gefriergetrockneten und redispergierten, Trehalose-freien Dispersion. Alle Kurven der gefriergetrockneten und redispergierten Dispersionen liegen nahezu deckungsgleich übereinander und entsprechen ebenfalls der Messung der unbehandelten Vergleichsprobe (schwarze Kurve). Dies spricht dafür, dass sich die Probe bezüglich ihrer Monodispersität und ihrer mittleren Partikelgröße durch das Einfrieren, die Gefriertrocknung und die anschließende Redispergierung nicht verändert hat. Eine ohne Trehalosezusatz gefriergetrocknete Probe war nach der Beendigung des Gefriertrocknungs-Prozesses irreversibel agglomeriert und ließ sich auch nicht unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbads in Wasser redispergieren. In Abbildung 110 sind die Werte für den Z-Average und den PDI der gemessenen Dispersionen in Abhängigkeit von der zugesetzten Trehalosemenge aufgetragen.



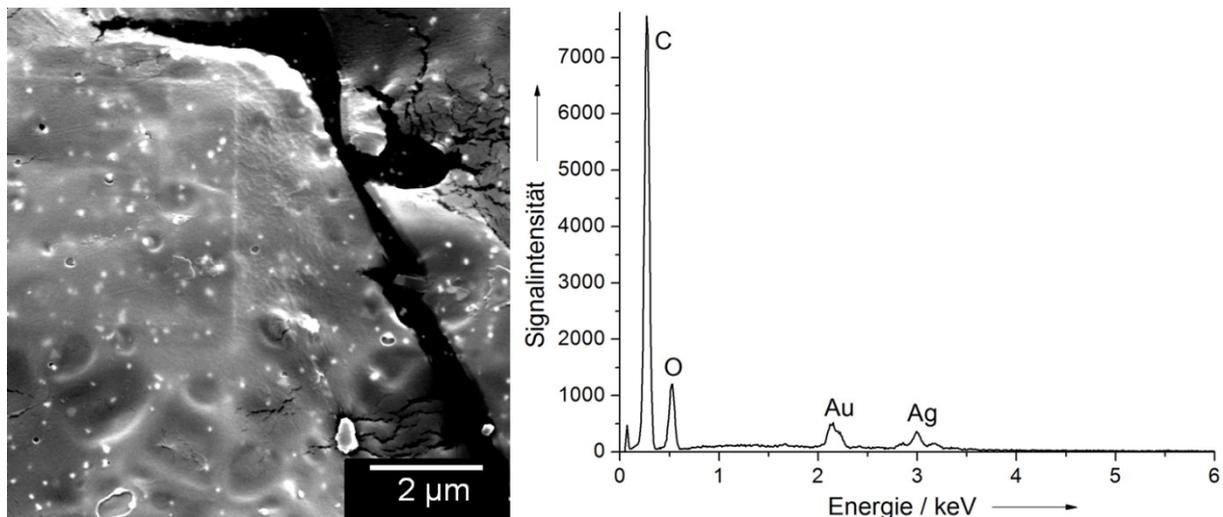
**Abbildung 110:** Auftragung der Werte des Z-Average und des PDI (gemessen mittels Dynamischer Lichtstreuung) der mit unterschiedlichen Trehalose-Zusätzen gefriergetrockneten und wieder redispergierten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Trehalose-Konzentration und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, sind die Werte des Z-Average, also die mittlere Partikelgröße, und des PDI bei allen mit unterschiedlichen Trehalosekonzentrationen gefriergetrockneten Proben nahezu gleich und stimmen sehr gut mit den Werten der unbehandelten Kontrolldispersion überein. Schon bei einer Trehalosekonzentration von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  wird die Dispersion sehr gut stabilisiert. Eine merkliche Verbesserung der Stabilisierung bei der Lyophilisation durch erhöhte Trehalosekonzentrationen ist nicht zu beobachten. In Tabelle 19 sind die gemessenen Werte für den Z-Average und den PDI aller Dispersionen zusammengefasst.

**Tabelle 19:** Zusammenfassung der Werte des Z-Average und des PDI der unter Trehalosezusatz lyophilisierten und anschließend redispergierten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit den Werten der unbehandelten Dispersion.

Massenkonzentration Trehalose / mg mL <sup>-1</sup>	Z-Average (DLS) / nm	PDI (DLS)
0	[nicht redispergierbar]	
10	110	0,147
20	109	0,148
30	110	0,148
40	110	0,150
50	109	0,144
[unbehandelte Dispersion]	109	0,142

Von einer mit 10 mg mL<sup>-1</sup> Trehalosezusatz gefriergetrockneten Probe der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 111).

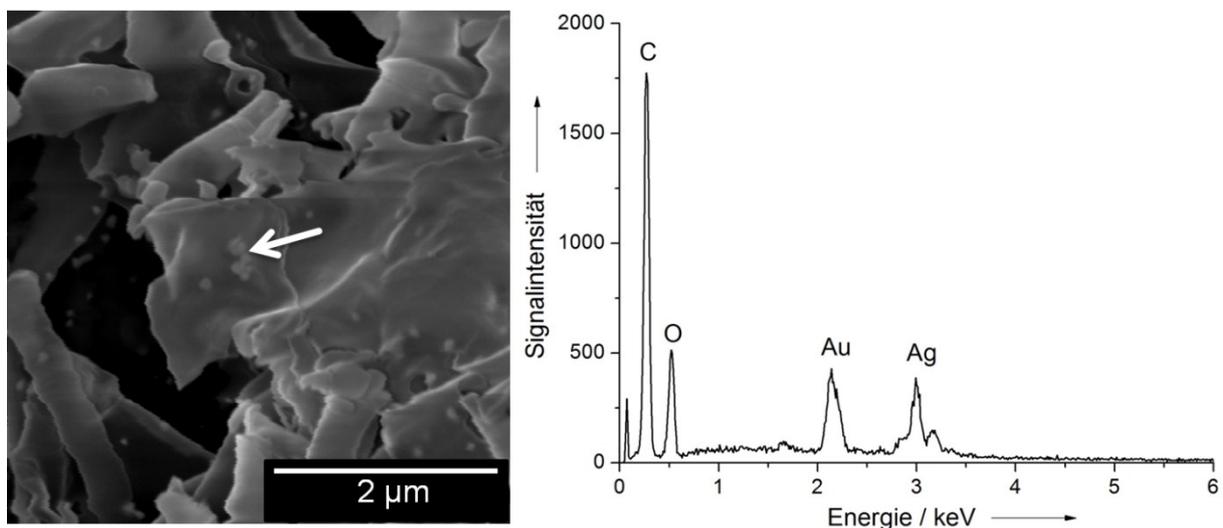


**Abbildung 111:** Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der mit 10 mg mL<sup>-1</sup> gefriergetrockneten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel (links) und EDX-Spektrum der Probe (rechts).

Dazu wurde die gefriergetrocknete Masse auf einen Kohlenstoffträger aufgebracht und 20 Sekunden lang mit einer Legierung aus 80 % Gold und 20 % Palladium

gesputtert. Auf der linken Bildseite ist eine Übersichtsaufnahme des Feststoffes bei 25000-facher Vergrößerung gezeigt. Man erkennt die Trehalose-Matrix, in die die Silber-Nanopartikel eingebettet sind. Diese sind an ihrem von der organischen Matrix unterschiedlichen Kontrast als helle Punkte erkennbar. Auf der rechten Bildseite ist ein EDX-Spektrum gezeigt, das von der gesamten abgebildeten Probe aufgenommen wurde. Es sind Signale von Kohlenstoff und Sauerstoff zu erkennen, die von der Trehalose stammen. Daneben finden sich Signale für Silber von den Silber-Nanopartikeln und ein Gold-Peak, der von der zum Sputtern verwendeten Legierung stammt.

In Abbildung 112 ist auf der linken Bildseite eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme bei 50000-facher Vergrößerung gezeigt.



**Abbildung 112:** Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der mit  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  gefriergetrockneten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel (links) und EDX-Spektrum des markierten Bereichs der Probe (rechts).

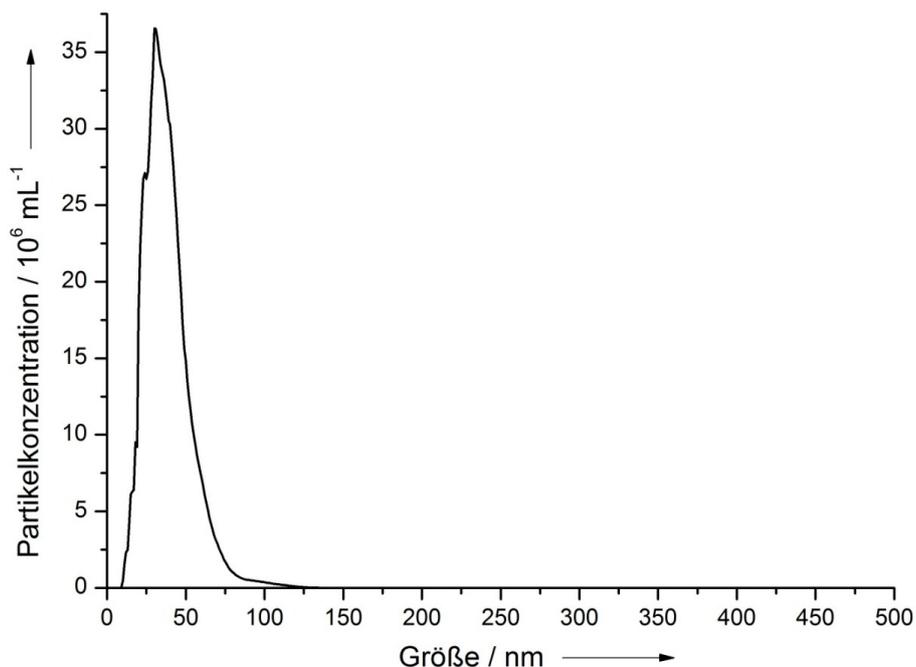
Hier sind die eingebetteten Nanopartikel noch etwas deutlicher zu erkennen. Von dem mit einem Pfeil gekennzeichneten Bereich wurde ein EDX-Spektrum (rechte Bildseite) angefertigt, um zu zeigen, dass es sich dabei um die Silber-Nanopartikel handelt. Neben den erwarteten Signalen für Kohlenstoff und Sauerstoff, die von der Trehalose stammen, und den durch das Sputtern verursachten Signalen für Gold, sind deutlich die Signale für Silber bei einer Energie von etwa 3 keV zu sehen. Dass die Signale für Gold in etwa genauso intensiv sind wie die des Silbers, lässt sich

dadurch erklären, dass das Gold die gesamte Oberfläche der Probe bedeckt und dadurch so deutlich detektiert wird.

#### 5.4.3 Tiefkühlung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel

Die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel mit einem Kern-Durchmesser von etwa 20 nm wurden ebenfalls auf die Möglichkeit hin untersucht, sie in Dispersion durch Tiefkühlung oder Lyophilisation zu konservieren. Da diese Partikel mit der Dynamischen Lichtstreuung nicht zuverlässig messbar sind, wurden die Größenmessungen mit der *Nanoparticle Tracking Analysis* vorgenommen. Diese ergibt ebenfalls den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel, liefert aber keinen Polydispersitätsindex. Allerdings kann die Breite der Größenverteilung, die man aus den Abbildungen abschätzen kann, als Maß für die Monodispersität bzw. Polydispersität der Proben dienen.

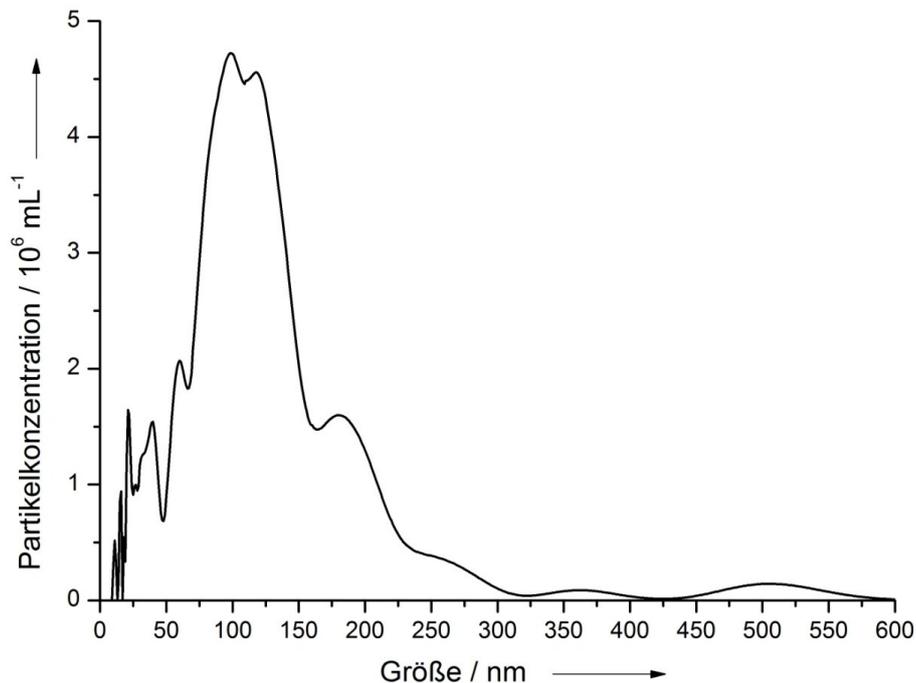
In Abbildung 113 ist das Ergebnis einer NTA-Messung von nicht eingefrorenen, unbehandelten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln gezeigt. Die Partikel wurden als stark verdünnte wässrige Dispersion gemessen.



**Abbildung 113:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der unbehandelten (nicht eingefrorenen oder gefriergetrockneten) mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Zu erkennen ist eine enge Größenverteilung mit einem Maximum bei 30 nm. Es sind keine Agglomerate bei größeren Durchmessern zu sehen, die Partikel können als monodispers angesehen werden.

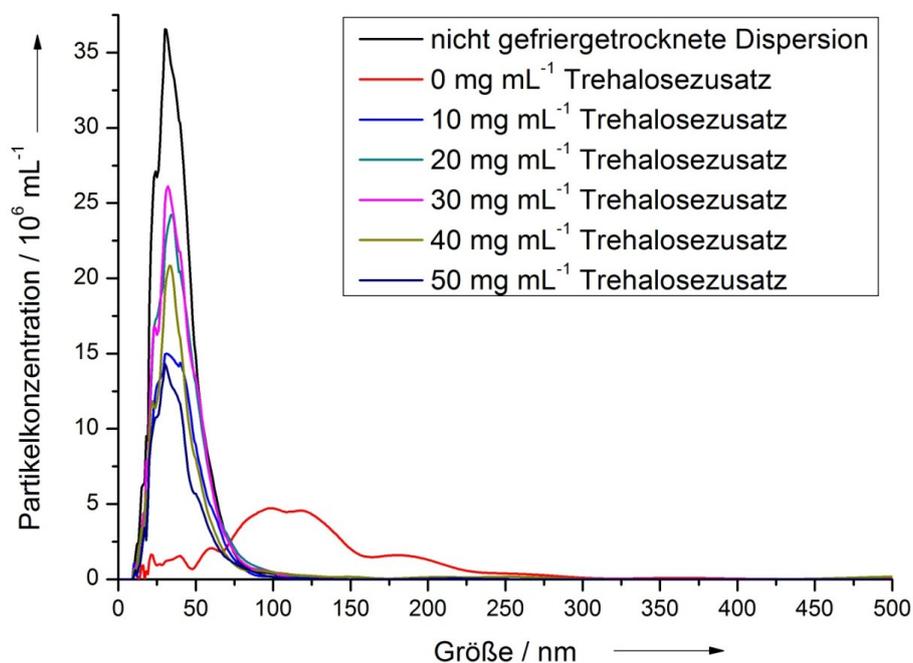
Eine Dispersion mit einem Silbergehalt von  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  wurde ohne Zusatz von Trehalose in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach einer Lagerzeit von 48 Stunden bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde die gefrorene Dispersion bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Anschließend wurde die aufgetaute Dispersion umgeschüttelt und in stark verdünnter Form mit der *Nanoparticle Tracking Analysis* charakterisiert. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 114 zu sehen.



**Abbildung 114:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der ohne Zusatz von Trehalose eingefrorenen und wieder redispergierten mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Die Dispersion ist deutlich polydisperser als die Vergleichsdispersion, die nicht eingefroren wurde. Es sind mehrere Maxima bei unterschiedlichen Größen zu erkennen und es liegen Agglomerate vor. Das globale Maximum der Kurve liegt bei 99 nm. Die mittlere Partikelgröße ist also stark angewachsen, und man kann angesichts der Breite der Größenverteilung nicht mehr von einer monodispersen Probe sprechen. Um den offensichtlichen negativen Einfluss des Einfrier- und Auftauvorgangs auf die Größe und Monodispersität der Nanopartikel zu minimieren,

wurde die Dispersion mit unterschiedlich großen Zusätzen von Trehalose eingefroren. Dazu wurde wiederum eine Dispersion mit einem Silbergehalt von  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  hergestellt und mit Trehalose versetzt, so dass Trehalosekonzentrationen von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  bis  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  erzielt wurden. Die Dispersionen wurden dann mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, für 48 Stunden bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert und anschließend langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Die aufgetauten Dispersionen wurden in stark verdünnter Form mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* hinsichtlich ihrer Partikelgrößenverteilungen untersucht. Die erhaltenen Messkurven sind in Abbildung 115 dargestellt.

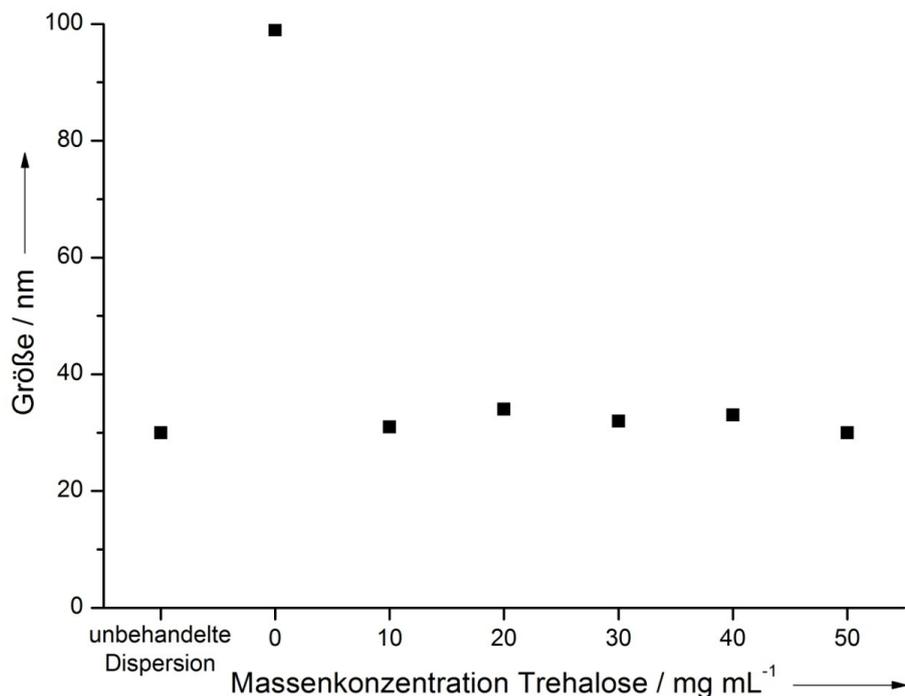


**Abbildung 115:** Vergleich der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmten Größenverteilungen von mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen Trehalose eingefroren und wieder redispersiert wurden und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Es ist zu erkennen, dass die wieder aufgetauten Dispersionen nichts hinsichtlich ihrer Monodispersität eingebüßt haben. Die Breiten der Größenverteilungen und damit die Monodispersität sind nach wie vor als gut zu bezeichnen. Auch die Größen, also die Maxima der Kurven, stimmen mit der ebenfalls abgebildeten Messkurve der unbehandelten Dispersion (schwarz) überein. Im Vergleich dazu ist die Verschlechterung der Eigenschaften der ohne Trehalosezusatz eingefrorenen

Dispersion (rote Kurve) deutlich sichtbar. Die unterschiedlichen Höhen der Messsignale sind dadurch zu erklären, dass die Proben jeweils individuell verdünnt werden müssen, um mit der NTA gemessen werden zu können. Dabei führt eine etwas stärkere Verdünnung einer Probe zu einem im Vergleich zu einer weniger stark verdünnten Probe weniger intensiven Messsignal.

Die ermittelten hydrodynamischen Durchmesser in Abhängigkeit von der zugesetzten Trehalosemenge sind in Abbildung 116 dargestellt.



**Abbildung 116:** Auftragung der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* gemessenen Größen der mit unterschiedlichen Trehalose-Zusätzen eingefrorenen und wieder redispersierten mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Trehalose-Konzentration und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Die Partikelgrößen der mit unterschiedlichen Trehalosekonzentrationen eingefrorenen Proben sind alle vergleichbar mit der nicht eingefrorenen Probe. Im Gegensatz dazu ist die mittlere Partikelgröße der ohne Trehalose eingefrorenen Dispersion erheblich angestiegen. Bereits ein Trehalosezusatz von 10 mg mL<sup>-1</sup> zu einer Dispersion der verwendeten Nanopartikel mit einer Silberkonzentration von 500 µg mL<sup>-1</sup> wirkt sehr gut stabilisierend. Eine Erhöhung der Trehalosekonzentration

auf bis zu  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  zeigt keine signifikante Verbesserung der stabilisierenden Wirkung beim Einfrieren.

In Tabelle 20 sind alle Messwerte der verwendeten Dispersionen zusammengefasst.

**Tabelle 20:** Zusammenfassung der hydrodynamischen Durchmesser der mit und ohne Trehalosezusatz eingefrorenen und anschließend redispergierten mit Gerbsäure und Citrat reduzierten und mit PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit den Werten der unbehandelten Dispersion. Angegeben ist jeweils das Maximum der Größenverteilung.

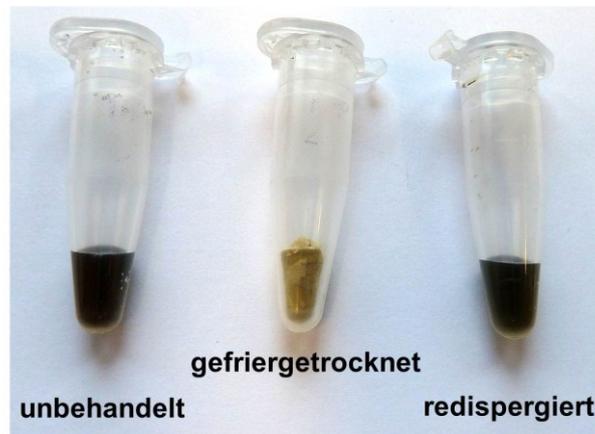
<b>Massenkonzentration Trehalose</b> <b>/ <math>\text{mg mL}^{-1}</math></b>	<b>Hydrodynamischer Durchmesser (NTA)</b> <b>/ nm</b>
0	99
10	31
20	34
30	32
40	33
50	30
[unbehandelte Dispersion]	30

#### **5.4.4 Gefriertrocknung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel**

Nachdem die PVP-funktionalisierten, mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Silber-Nanopartikel mit Trehalose als Kryoprotektor ohne Qualitätseinbußen einzufrieren sind, wurde versucht, die stabilisierten Partikel zu lyophilisieren.

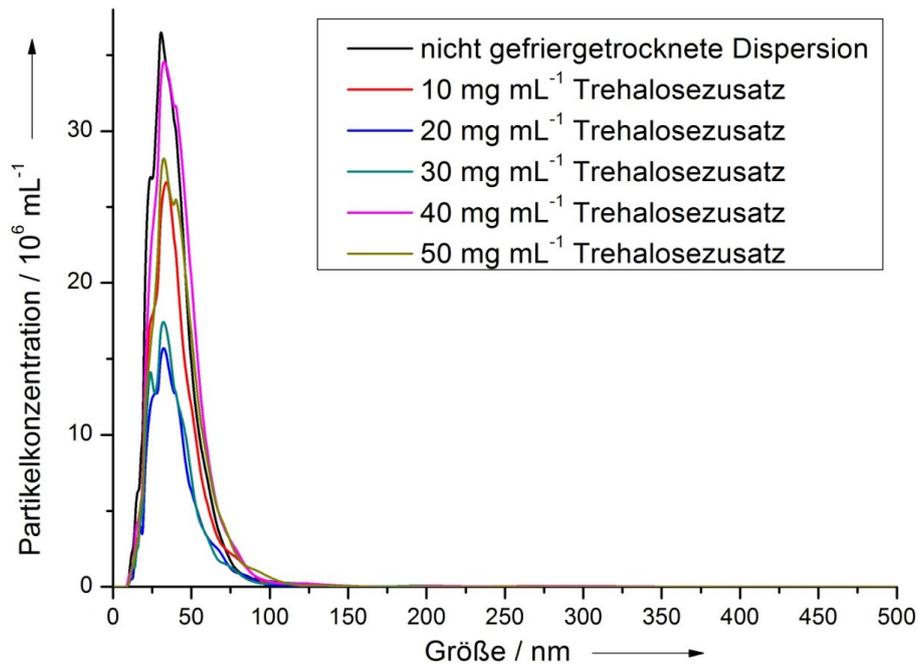
Es wurde eine Dispersion der Nanopartikel mit einem Silbergehalt von  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  mit Trehalose in einem Konzentrationsbereich von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  bis  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  versetzt. Diese wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gefriergetrocknet. Einen Vergleich der unbehandelten Ausgangsdispersion (links), der gefriergetrockneten Nanopartikel in der Trehalosematrix (Mitte) und der redispergierten Nanopartikel (rechts) ist in Abbildung 117 zu sehen. Bei der Gefriertrocknung quillt die Trehalose stark auf und bildet eine Art Zuckerkuchen, der

die Partikel umhüllt und so einschließt, dass eine Agglomeration verhindert wird. Dieser schaumartige Feststoff ist in der Bildmitte gut erkennbar.



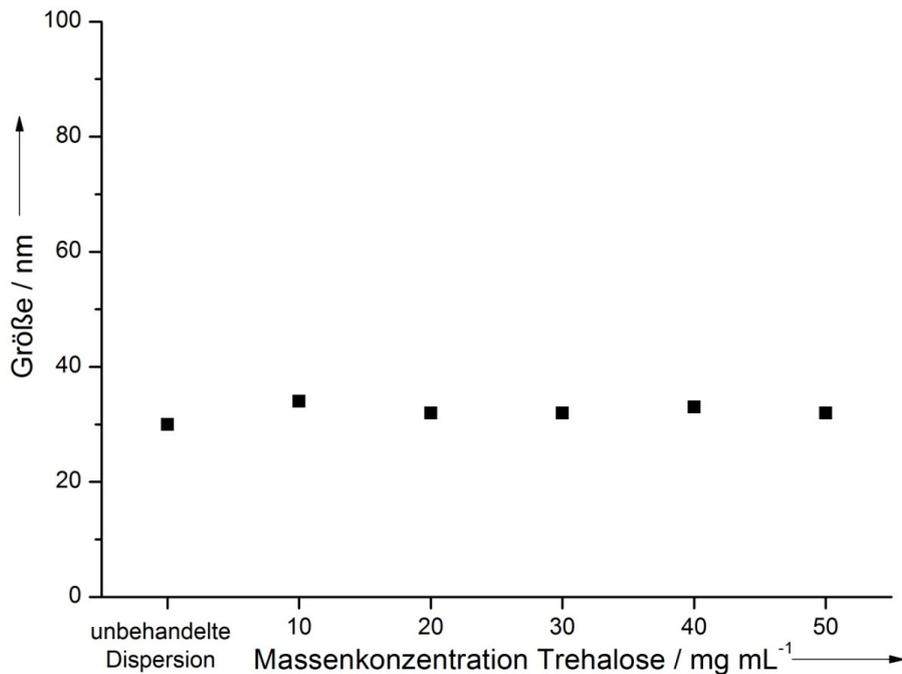
**Abbildung 117:** Eine Dispersion der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel vor dem Gefriertrocknen (links), im gefriergetrockneten Zustand (mittig) und nach dem Redispergieren mit Wasser (rechts).

Die gefriergetrockneten Proben wurden bei Raumtemperatur für zehn Tage verschlossen, trocken und lichtgeschützt gelagert. Anschließend wurde der Feststoff mit Reinstwasser auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und die Partikel so redispergiert. Die erhaltenen Dispersionen wurden dann in stark verdünnter Form mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* charakterisiert. Die erhaltenen Messkurven sind in Abbildung 118 gezeigt.



**Abbildung 118:** Vergleich der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmten Größenverteilungen von mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen Trehalose gefriergetrocknet und wieder redispergiert wurden und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Wie schon bei der Tiefkühlung ist auch bei der Gefrier Trocknung keine wesentliche Änderung der Partikelgröße und der Monodispersität zu beobachten. Alle gemessenen gefriergetrockneten und redispergierten Dispersionen zeigen Messkurven, die annähernd deckungsgleich mit der in schwarz dargestellten, nicht gefriergetrockneten Vergleichsdispersion sind. Unterschiedlich hohe Messsignale sind durch die für die Messung in der NTA unterschiedlich stark verdünnten Proben begründet. Auch die Breite der Größenverteilungen ist nahezu unverändert geblieben und als eng anzusehen. Eine Dispersion, die ohne Trehalosezusatz gefriergetrocknet wurde, war irreversibel agglomeriert, und es war nicht möglich, die Partikel mittels eines Ultraschallbads zu redispergieren. Die ermittelten Partikelgrößen in Abhängigkeit von der zugesetzten Trehalosekonzentration sind in Abbildung 119 dargestellt.



**Abbildung 119:** Auftragung der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* gemessenen Größen der mit unterschiedlichen Trehalose-Zusätzen gefriergetrockneten und wieder redispersierten mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Trehalose-Konzentration und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass sich die Partikelgrößen unabhängig von der Trehalosekonzentration nach der Gefriertrocknung nicht wesentlich verändert haben. Bereits ein Zusatz von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  Trehalose zu einer recht konzentrierten Partikeldispersion mit einem Silbergehalt von  $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  stabilisiert die Partikel sehr gut, sodass sie nach der Redispersierung in nahezu unveränderter Form vorliegen und kolloidal stabil bleiben. Eine höhere Trehalosekonzentration führt zu keiner signifikant verbesserten Stabilisierung. In Tabelle 21 sind alle gemessenen Partikelgrößen der gefriergetrockneten und der unbehandelten Vergleichsdispersion zusammengefasst.

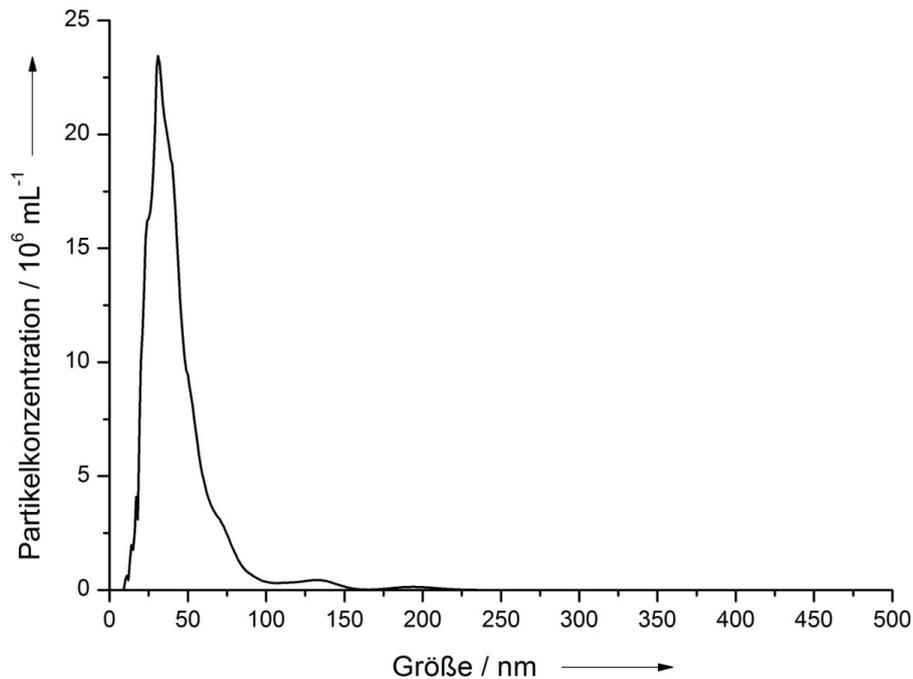
**Tabelle 21:** Zusammenfassung der hydrodynamischen Durchmesser der unter Trehalosezusatz lyophilisierten und anschließend redispergierten mit Gerbsäure und Citrat reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit den Werten der unbehandelten Dispersion. Angegeben ist jeweils das Maximum der Größenverteilung.

<b>Massenkonzentration Trehalose</b> / mg mL <sup>-1</sup>	<b>Hydrodynamischer Durchmesser (NTA)</b> / nm
0	[nicht redispergierbar]
10	34
20	32
30	32
40	33
50	32
[unbehandelte Dispersion]	30

#### **5.4.5 Tiefkühlung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel**

Auch die mit Gerbsäure und Citrat reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel mit einem Durchmesser des metallischen Kerns von etwa 20 nm wurden dahingehend untersucht, ob sie durch einen Zusatz von Trehalose für die Tiefkühlung konserviert werden können. Die Partikel wurden mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* charakterisiert, die den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel ergibt.

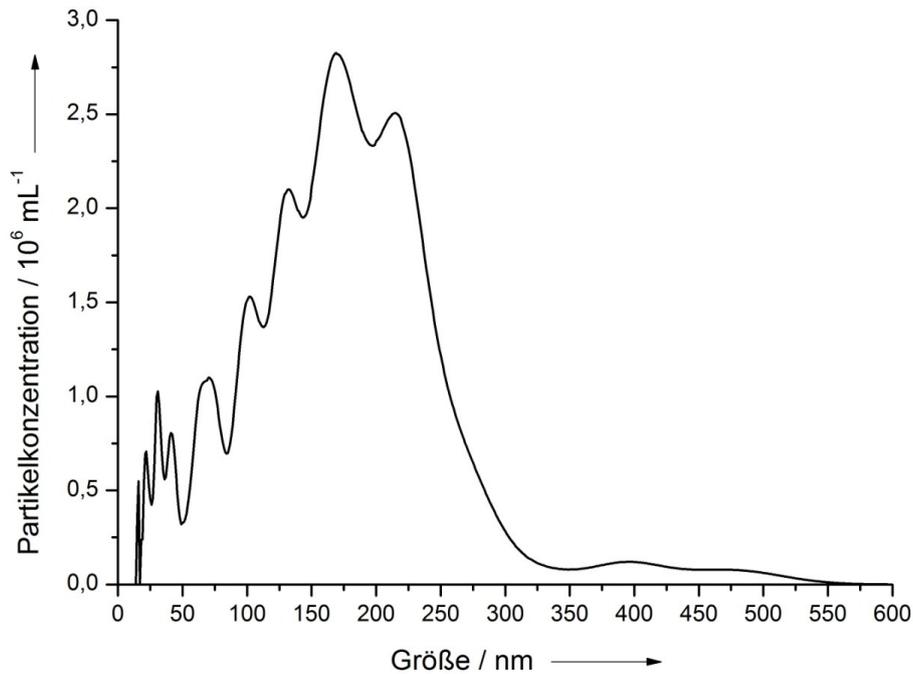
In Abbildung 120 ist das Ergebnis einer NTA-Messung der nicht behandelten Nanopartikel gezeigt. Die Partikel wurden als stark verdünnte wässrige Dispersion gemessen.



**Abbildung 120:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der unbehandelten (nicht eingefrorenen oder gefriergetrockneten) mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Das Maximum der Größenverteilung liegt bei 31 nm. Es handelt sich um eine enge Größenverteilung, also um ein monodisperses System. Es sind unwesentliche Mengen von Agglomeraten bei höheren Partikelgrößen zu erkennen.

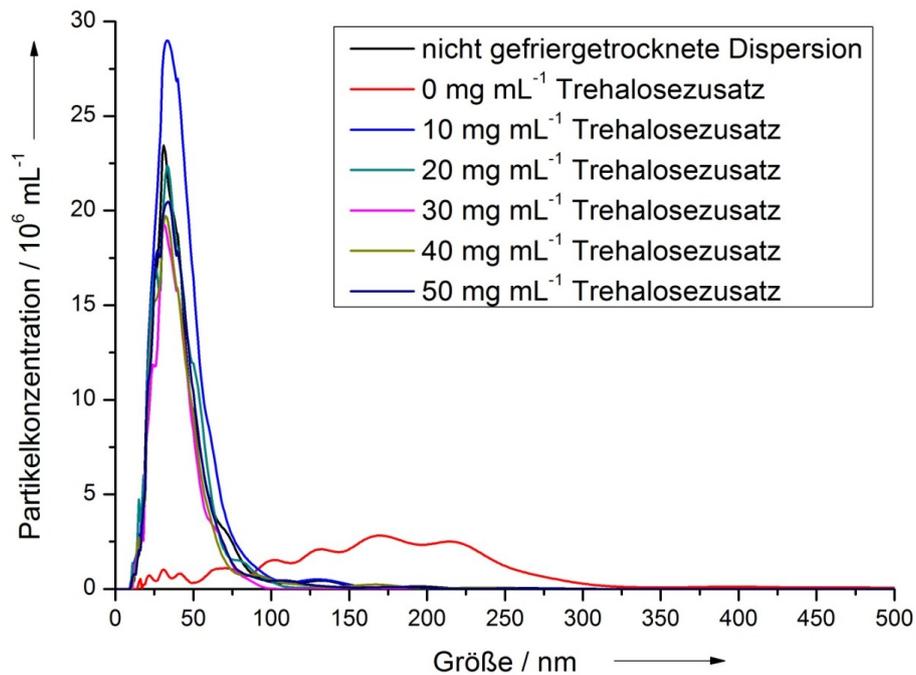
Die Nanopartikel wurden zunächst ohne Zusatz von Trehalose eingefroren, um den Einfluss des Einfrier- und Auftauvorgangs auf die Monodispersität und die mittlere Partikelgröße zu untersuchen. Dazu wurde eine Dispersion mit einem Silbergehalt von  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  hergestellt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorene Dispersion wurde für 48 Stunden bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert und dann bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Anschließend wurde die Dispersion geschüttelt und in stark verdünnter Form mit der NTA charakterisiert. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 121 zu sehen.



**Abbildung 121:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der ohne Zusatz von Trehalose eingefrorenen und wieder redispersierten mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

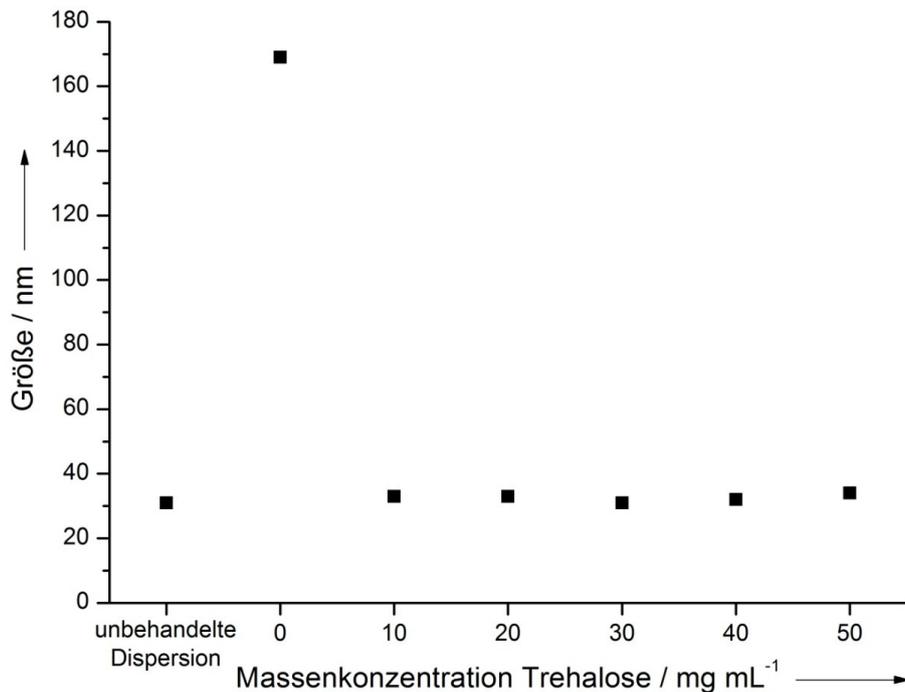
Es zeigt sich eine sehr polydisperse Größenverteilung. Die Größenverteilung ist sehr breit und es sind mehrere Maxima der Kurve zu erkennen. Das globale Maximum liegt bei 169 nm. Die Partikel sind also ohne Trehalosezusatz nicht stabil beim Einfrieren und verändern ihren Charakter stark in Richtung eines größeren mittleren hydrodynamischen Partikeldurchmessers und einer größeren Polydispersität.

Zur Konservierung der Dispersionen beim Einfrieren wurde wieder der Kryoprotektor Trehalose zugesetzt und das Einfrierexperiment wiederholt. Dazu wurde eine Dispersion der Nanopartikel mit einer Silberkonzentration von  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  hergestellt und mit Trehalose in einem Konzentrationsbereich von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  bis  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  versetzt. Die Dispersionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  für 48 Stunden gelagert. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und nach Umschütteln mittels der *Nanoparticle Tracking Analysis* charakterisiert. Die erhaltenen Größenverteilungen sind in Abbildung 122 dargestellt.



**Abbildung 122:** Vergleich der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmten Größenverteilungen von mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen Trehalose eingefroren und wieder redispersiert wurden und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Die eingefrorenen und wieder aufgetauten Dispersionen zeigen unabhängig von der Trehalosekonzentration eine unveränderte Monodispersität. Auch die Maxima der Größenverteilungen sind nicht wesentlich verschoben. Alle Messkurven liegen gut übereinander. Die unterschiedlichen Signalhöhen sind auf unterschiedliche Verdünnungsgrade der Dispersionen beim Messen zurückzuführen. Bereits ein Zusatz von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  Trehalose zu einer Dispersion stabilisierte die Partikel so gut, dass kein relevanter Unterschied in der Größenverteilung verglichen mit der Kontrolldispersion erkennbar ist. Auch hier erbrachte eine erhöhte Trehalosekonzentration keine merkliche Verbesserung der Stabilisierung. In Abbildung 123 sind die mittels NTA gemessenen Größen in Abhängigkeit von der eingesetzten Trehalosekonzentration aufgetragen.



**Abbildung 123:** Auftragung der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* gemessenen Größen der mit unterschiedlichen Trehalose-Zusätzen eingefrorenen und wieder redispergierten mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Trehalose-Konzentration und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Wie schon anhand der einzelnen Messkurven in Abbildung 122 ersichtlich war, ist die Größe der Nanopartikel nach dem Einfrieren und Wiederauftauen im Vergleich zur unbehandelten Dispersion unverändert. Es ist keine Abhängigkeit von der eingesetzten Trehalosekonzentration festzustellen. Lediglich die ohne Trehalose eingefrorene Dispersion liegt nach dem Wiederauftauen nicht in unveränderter Form vor. Hier sind die Nanopartikel merklich agglomeriert, was sich in der stark angewachsenen Größe von fast 170 nm niederschlägt.

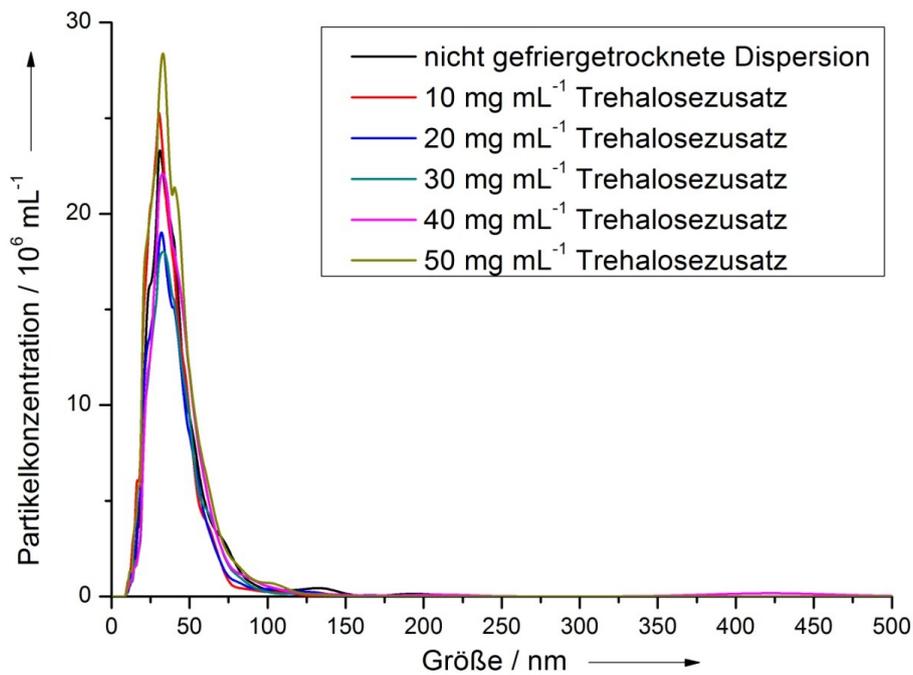
Tabelle 22 fasst die mit der NTA ermittelten Zahlenwerte der hydrodynamischen Durchmesser aller gemessenen Dispersionen noch einmal zusammen.

**Tabelle 22:** Zusammenfassung der hydrodynamischen Durchmesser der mit und ohne Trehalosezusatz eingefrorenen und anschließend redispergierten mit Gerbsäure und Citrat reduzierten, TPPTS-funktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit den Werten der unbehandelten Dispersion. Angegeben ist jeweils das Maximum der Größenverteilung.

<b>Massenkonzentration Trehalose</b> / mg mL <sup>-1</sup>	<b>Hydrodynamischer Durchmesser (NTA)</b> / nm
0	169
10	33
20	33
30	31
40	32
50	34
[unbehandelte Dispersion]	31

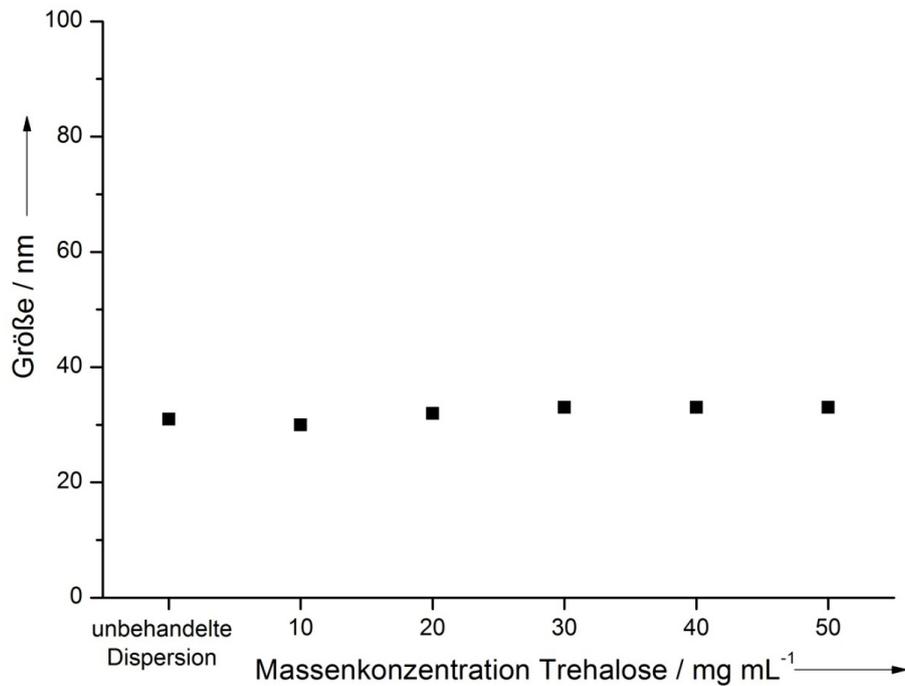
#### **5.4.6 Gefriertrocknung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel**

Die mit Trehalose versetzten Dispersionen wurden nach dem Einfrieren auch lyophilisiert, um zu untersuchen, ob die Trehalose in diesem Fall ebenfalls ausreichend stabilisierend wirkt, damit die Nanopartikel nach dem Redispergieren unverändert vorliegen. Es wurde wiederum eine Dispersion mit einem Silbergehalt von 500 µg mL<sup>-1</sup> hergestellt und mit Trehalose in Konzentrationen von 10 mg mL<sup>-1</sup> bis 50 mg mL<sup>-1</sup> versetzt. Die Dispersionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Im Anschluss an eine 48-stündige licht- und feuchtigkeitsgeschützte Lagerung wurden die festen Zuckermatrices mit Reinstwasser auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und die Nanopartikel so redispergiert. Die Dispersionen wurden umgeschüttelt und anschließend in starker Verdünnung mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* charakterisiert. Die erhaltenen Messergebnisse sind in Abbildung 124 dargestellt.



**Abbildung 124:** Vergleich der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmten Größenverteilungen von mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Mengen Trehalose gefriergetrocknet und wieder redispergiert wurden und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Wie der Abbildung und der darin ebenfalls gezeigten Messkurve der nicht behandelten Dispersion (schwarzer Graph) zu entnehmen ist, liegen alle Dispersionen auch nach der Gefrier Trocknung und Redispergierung nahezu unverändert vor. Die Maxima der Graphen sind nicht zu größeren Werten verschoben und die Breite der Größenverteilung ist gering. Die Partikelsysteme sind als monodispers anzusehen. Eine Dispersion, die ohne Trehalosezusatz gefriergetrocknet wurde, war danach irreversibel agglomeriert. Die Partikel konnten nicht redispergiert werden. Eine Auftragung der gemessenen Partikelgrößen der einzelnen Ansätze in Abhängigkeit von der Trehalosekonzentration zeigt Abbildung 125.



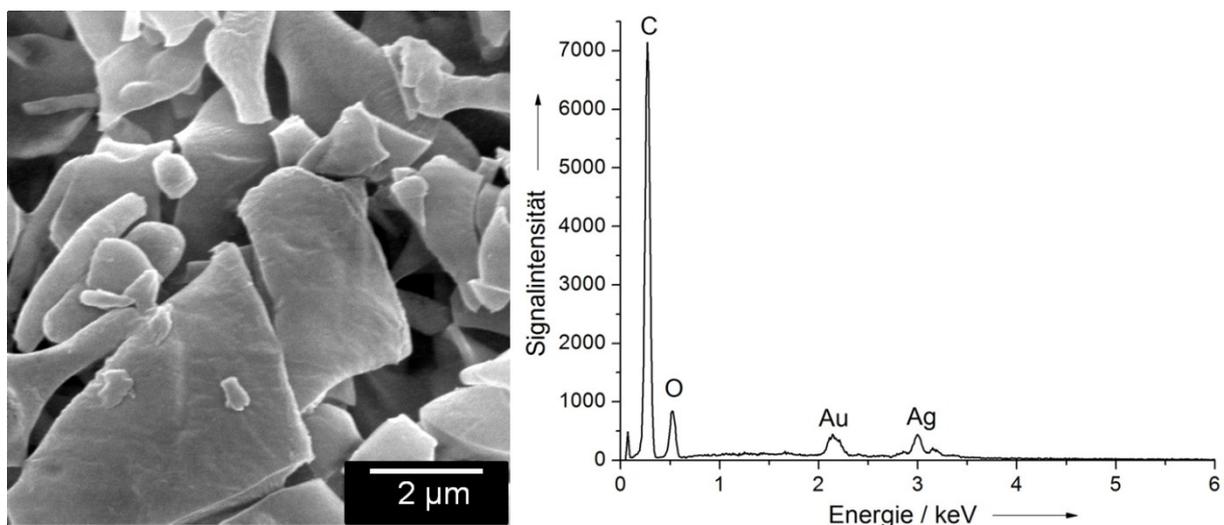
**Abbildung 125:** Auftragung der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* gemessenen Größen der mit unterschiedlichen Trehalose-Zusätzen gefriergetrockneten und wieder redispergierten mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Trehalose-Konzentration und Vergleich mit der unbehandelten Dispersion.

Unabhängig von der Trehalosekonzentration zeigen sich stets vergleichbare hydrodynamische Durchmesser der redispergierten Nanopartikel. Diese stimmen annähernd mit der Größe der nicht gefriergetrockneten Silber-Nanopartikel überein. Offenbar ist auch hier schon eine Trehalosekonzentration von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  ausreichend, um die Partikel während der Gefrier Trocknung und Lagerung zu stabilisieren. Erhöhte Trehalosekonzentrationen bringen auch hier keine signifikante Verbesserung. Die Ergebnisse der NTA-Messungen aller Dispersionen sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

**Tabelle 23:** Zusammenfassung der hydrodynamischen Durchmesser der unter Trehalosezusatz lyophilisierten und anschließend redispergierten mit Gerbsäure und Citrat reduzierten, TPPTS-funktionalisierten Silber-Nanopartikel und Vergleich mit den Werten der unbehandelten Dispersion. Angegeben ist jeweils das Maximum der Größenverteilung.

Massenkonzentration Trehalose / mg mL <sup>-1</sup>	Hydrodynamischer Durchmesser (NTA) / nm
0	[nicht redispergierbar]
10	30
20	32
30	33
40	33
50	33
[unbehandelte Dispersion]	31

Von einer Dispersion, die mit einem Zusatz von 10 mg mL<sup>-1</sup> Trehalose gefriergetrocknet wurde, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 126).

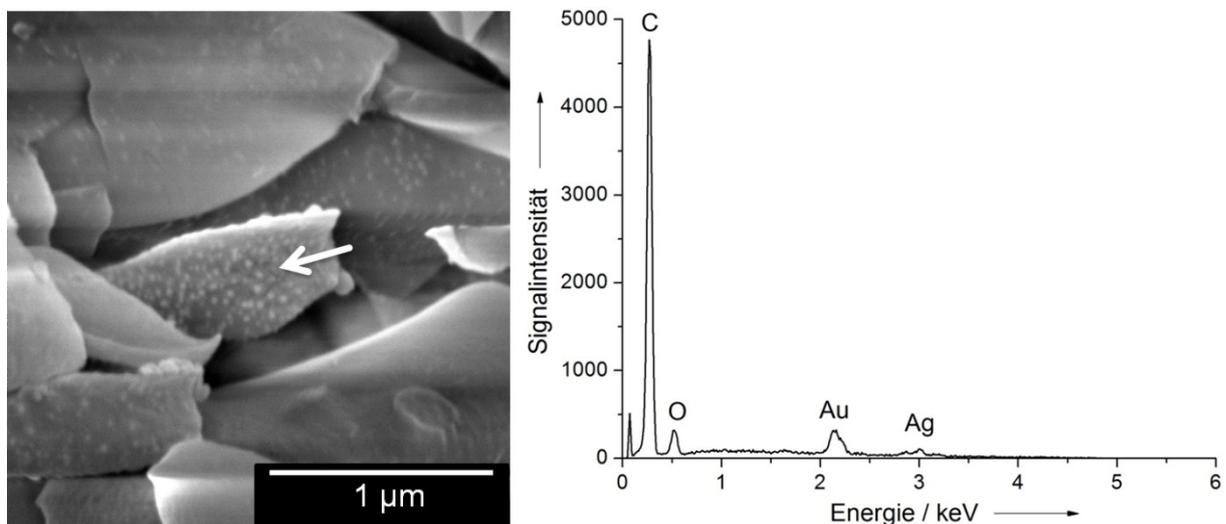


**Abbildung 126:** Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der mit 10 mg mL<sup>-1</sup> gefriergetrockneten mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, TPPTS-funktionalisierten Silber-Nanopartikel (links) und EDX-Spektrum der Probe (rechts).

Der feste Rückstand der Gefriertrocknung wurde auf einen Kohlenstoffträger aufgebracht und 20 Sekunden lang mit einer Legierung aus 80 % Gold und 20 % Palladium gesputtert. Eine Übersichtsaufnahme der bei der Lyophilisation entstandenen Zuckermatrix bei 25000-facher Vergrößerung ist in links gezeigt.

Man erkennt die eingebetteten Nanopartikel auf diesem Bild auf Grund ihrer geringen Größe von 20 nm nicht. Ein von der gesamten abgebildeten Probe aufgenommenes EDX-Spektrum (Abbildung 126 rechts) zeigt aber neben den von der Trehalose herrührenden Signalen für Kohlenstoff und Kupfer deutlich Signale für Silber. Ebenfalls zu sehen ist ein Peak für das Gold, das vom Sputter-Material stammt.

In Abbildung 127 ist eine Detailaufnahme derselben Probe bei 100000-facher Vergrößerung abgebildet.



**Abbildung 127:** Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der mit  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  gefriergetrockneten mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, TPPTS-funktionalisierten Silber-Nanopartikel (links) und EDX-Spektrum des markierten Bereichs der Probe (rechts).

Auf dieser Aufnahme erkennt man die in die Trehalosematrix eingebetteten Silber-Nanopartikel an ihrem stärkeren Kontrast im Vergleich zum Zucker. Von dem mit dem Pfeil gekennzeichneten Bereich wurde ein EDX-Spektrum angefertigt. Dieses ist in Abbildung 127 auf der rechten Bildseite gezeigt. Neben den Signalen der Elemente der Trehalose (Kohlenstoff und Sauerstoff) dem Peak des Goldes vom Sputtern sind Signale für Silber zu sehen, die von den Silber-Nanopartikeln stammen.

#### **5.4.7 Zusammenfassung der Tiefkühlung und Gefriertrocknung von Silber-Nanopartikeln unter Zusatz von Trehalose als Kryoprotektor**

Es wurden drei Arten von Silber-Nanopartikeln für ihre Eignung zur Tiefkühlung und Gefriertrocknung untersucht. Es handelte sich um PVP-funktionalisierte Nanopartikel mit einem Kerndurchmesser von etwa 70 nm (Charakterisierung in Kapitel 5.1.1), PVP-funktionalisierte Nanopartikel mit einem Kerndurchmesser von etwa 20 nm (Charakterisierung in Kapitel 5.1.4) und TPPTS-funktionalisierte Nanopartikel mit einem Kerndurchmesser von etwa 20 nm (Charakterisierung in Kapitel 5.1.5). Ziel dieser Experimente war es, die Nanopartikel so zu konservieren, dass ihre kolloidale Alterung und die Freisetzung von Silber-Ionen weitestgehend vermindert oder ganz ausgeschaltet wird. Dies ist mit beiden Konservierungsmethoden, der Tiefkühlung und der Gefriertrocknung möglich.

Die Partikel wurden jeweils als Dispersionen mit einem Silbergehalt von  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  mit Trehalose als Kryoprotektor versetzt und anschließend entweder nur schockgefroren oder schockgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Bei beiden Vorgehensweisen bleiben die Nanopartikel auch bei längerer Lagerung problemlos und ohne Verlust ihrer Monodispersität redispergierbar. Der Zusatz des Kryoprotektors Trehalose ermöglicht daher die langfristige stabilisierte Lagerung von Silber-Nanopartikeln.

#### **5.5 Stabilität von Silber-Nanopartikeln in Zellkulturmedien**

Wenn mit dispergierten Nanopartikeln wissenschaftliche Untersuchungen durchgeführt werden sollen, beispielsweise hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens, ist es von großer Wichtigkeit, dass die Partikel während der Untersuchungen durchgängig als diskrete Teilchen vorliegen. Wie schon in der theoretischen Einführung (Kapitel 2.1.3) angemerkt wurde, neigen Nanopartikel dazu zu agglomerieren, um ihre Oberflächenenergie zu minimieren. Insbesondere wenn Elektrolyte anwesend sind, ist die kolloidale Stabilität von Nanopartikeln oft nicht gegeben. Rein elektrostatische Stabilisatoren reichen schon bei geringen Elektrolytkonzentrationen nicht mehr aus, um die Partikel vor der Agglomeration zu bewahren.<sup>[212, 213]</sup> Die Stabilität in den verwendeten biologischen Medien wird jedoch nicht immer oder nur in Wasser<sup>[214]</sup> gemessen, bevor biologische Untersuchungen durchgeführt werden. Wie beispielsweise auch *Nallathamby et al.* fordern,<sup>[215]</sup> ist dies allerdings notwendig, weil beispielsweise in Zellkulturmedien in allen Fällen

erhebliche Mengen Salze und andere Stoffe (diverse Zucker, Aminosäuren, Proteine) enthalten sind, die unter Umständen eine Agglomeration der Nanopartikel auslösen können. In diesem Fall würde nicht mehr die Eigenschaft von Nanopartikeln gemessen, sondern die eines makroskopischen Körpers, also der agglomerierten Partikel. Sicherlich kann man damit argumentieren, dass Nanopartikel, zumindest solche, die in flüssigen Dispersionsmitteln verwendet werden, in der natürlichen Umgebung auch nur in den seltensten Fällen als disperse Partikel vorliegen, sondern wahrscheinlich auch agglomeriert sind. Wenn man die grundlegenden Eigenschaften von nanopartikulären Systemen studieren möchte, muss man sich also mit der Möglichkeit auseinandersetzen, dass die verwendeten Partikel unter den Versuchsbedingungen nicht stabil sein könnten. Dies ist also vorher zu überprüfen, da sonst keine nanopartikulären Effekte gemessen werden, sondern Artefakte. Daher wurde die kolloidale Stabilität der in den zellbiologischen Experimenten verwendeten Silber-Nanopartikel in entsprechenden Medien untersucht.

#### **5.5.1 Stabilität der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in McCoy's 5A + 10 % FCS**

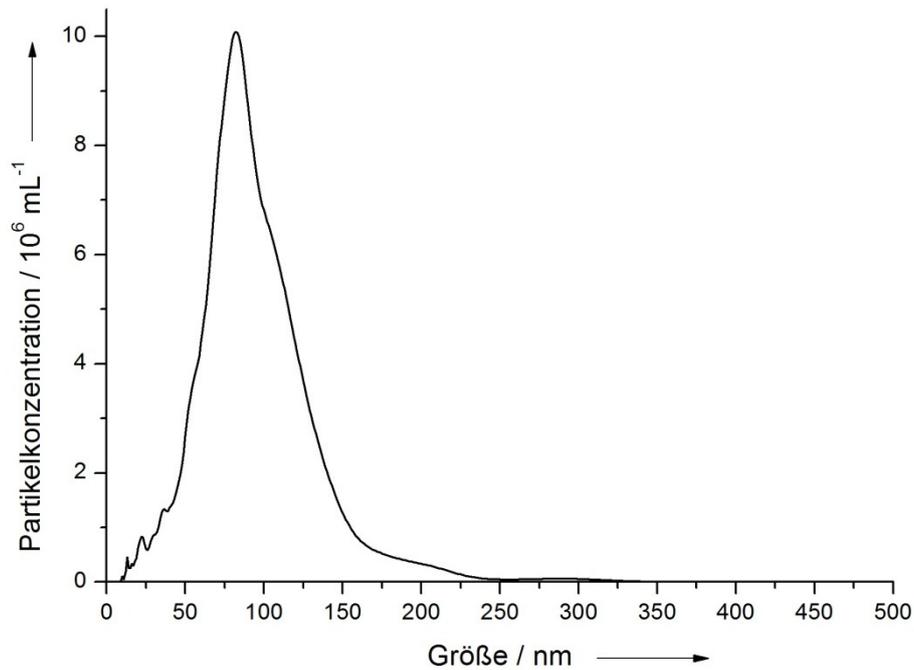
Die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden bezüglich ihrer kolloidalen Stabilität in dem Zellkulturmedium McCoy's 5A mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum untersucht.

Fetales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS) wird Zellkulturmedien zugesetzt, da es zahlreiche Bestandteile enthält, die für das Wachstum und die Proliferation der Zellen zusätzlich zu den Bestandteilen des Zellkulturmediums notwendig sind. Es setzt sich aus über 5000 Komponenten zusammen, unter anderem Serumproteinen, Hormonen, extrazellulären Enzymen und Fettsäuren.<sup>[216]</sup> Die Zusammensetzung des McCoy's 5A ist in Tabelle 24 wiedergegeben.

**Tabelle 24:** Zusammensetzung des Zellkulturmediums McCoy's 5A.

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b> <b>/ mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b> <b>/ mg L<sup>-1</sup></b>
<b>Anorganische Salze</b>			
CaCl <sub>2</sub>	100,00	KCl	400,00
MgSO <sub>4</sub>	97,70	NaCl	6460,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	580,00	NaHCO <sub>3</sub>	2200,00
<b>Aminosäuren</b>			
L-Alanin	13,36	L-Arginin·HCl	42,14
L-Asparagin·H <sub>2</sub> O	45,03	L-Asparaginsäure	19,97
L-Cystein·HCl·H <sub>2</sub> O	35,14	L-Glutaminsäure	22,10
Glycin	7,50	L-Histidin·HCl·H <sub>2</sub> O	20,96
L-Hydroxyprolin	19,70	L-Isoleucin	39,36
L-Leucin	39,36	L-Lysin·HCl	36,54
L-Methionin	14,92	L-Phenylalanin	16,52
L-Prolin	17,30	L-Serin	26,30
L-Threonin	17,90	L-Tryptophan	3,10
L-Tyrosin·2Na·2H <sub>2</sub> O	26,12	L-Valin	17,60
<b>Vitamine</b>			
Ascorbinsäure	0,50	Biotin	0,20
D-Calciumpantothenat	0,20	Cholinchlorid	5,00
Folsäure	10,00	i-Inositol	36,00
Nicotinamid	0,50	Nicotinsäure	0,50
p-Aminobenzoesäure	1,00	Pyridoxin·HCl	1,00
Riboflavin	0,20	Vitamin B <sub>12</sub>	2,00
<b>Sonstige Bestandteile</b>			
Bacto-Pepton	600,00	D-Glucose	3000,00
Glutathion	0,50	Phenolrot	10,00

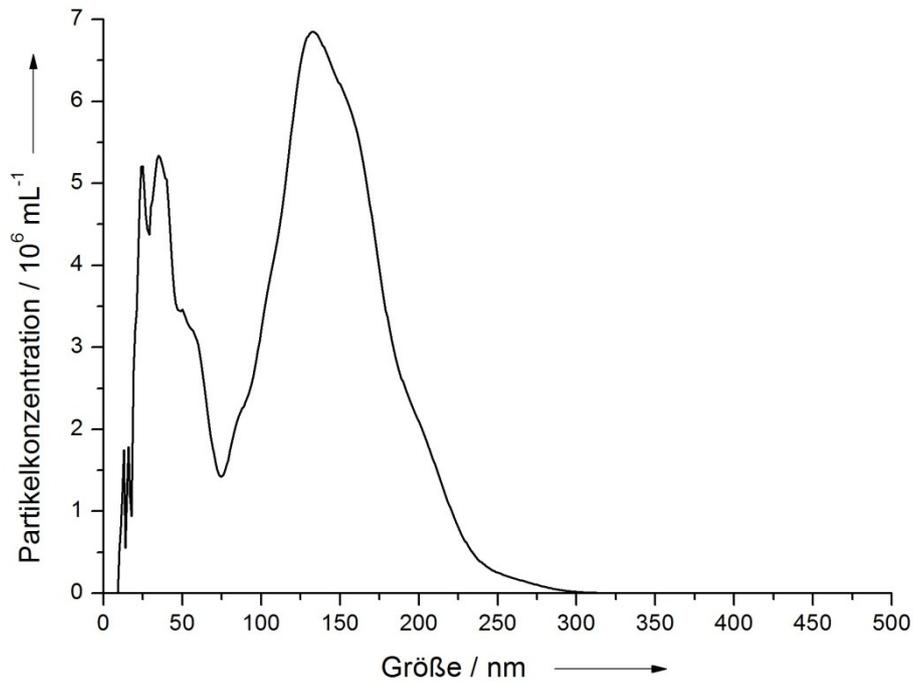
Die Untersuchung der Stabilität erfolgte mit der *Nanoparticle Tracking Analysis*. Die verwendeten Silber-Nanopartikel wurden zunächst hinsichtlich ihrer Größe in Reinstwasser untersucht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 128.



**Abbildung 128:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in Reinstwasser.

Das Maximum der recht monodispersen Größenverteilung liegt bei 82 nm. Dabei handelt es sich um den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel, der die Funktionalisierung und die Hydrathülle beinhaltet. Es sind keine nennenswerten Agglomerate bei größeren Durchmessern zu erkennen.

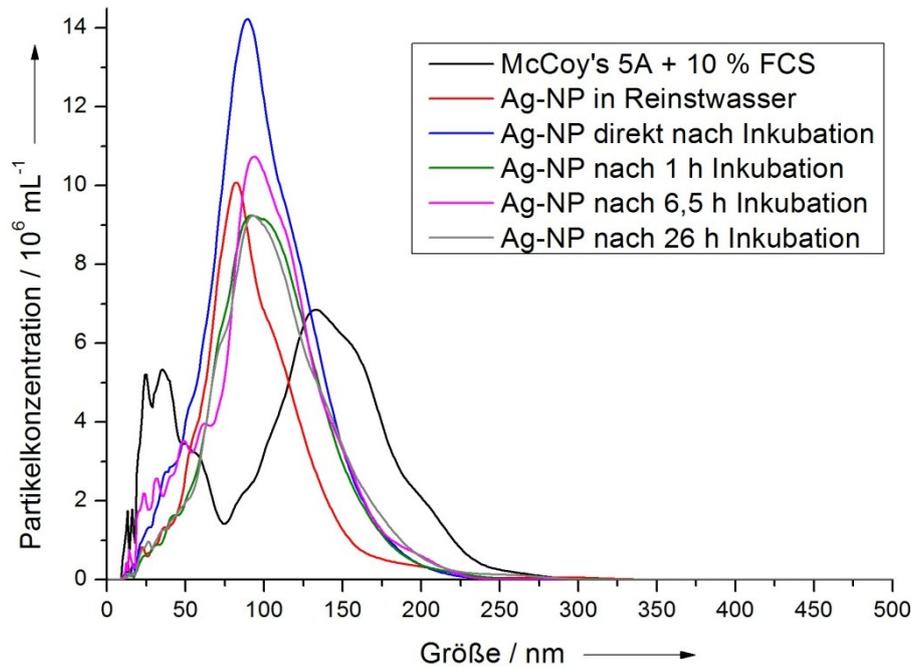
Das reine Zellkulturmedium mit dem FCS-Zusatz wurde ebenfalls mittels NTA vermessen, um auszuschließen, dass es Signale im Größenbereich der Nanopartikel ergibt, was die Aussagekraft der Messungen der im Medium dispergierten Partikel in Frage stellen könnte. Die erhaltene Größenverteilung für das Zellkulturmedium ist in Abbildung 129 gezeigt.



**Abbildung 129:** Messung von McCoy's 5A + 10 % FCS mittels *Nanoparticle Tracking Analysis*.

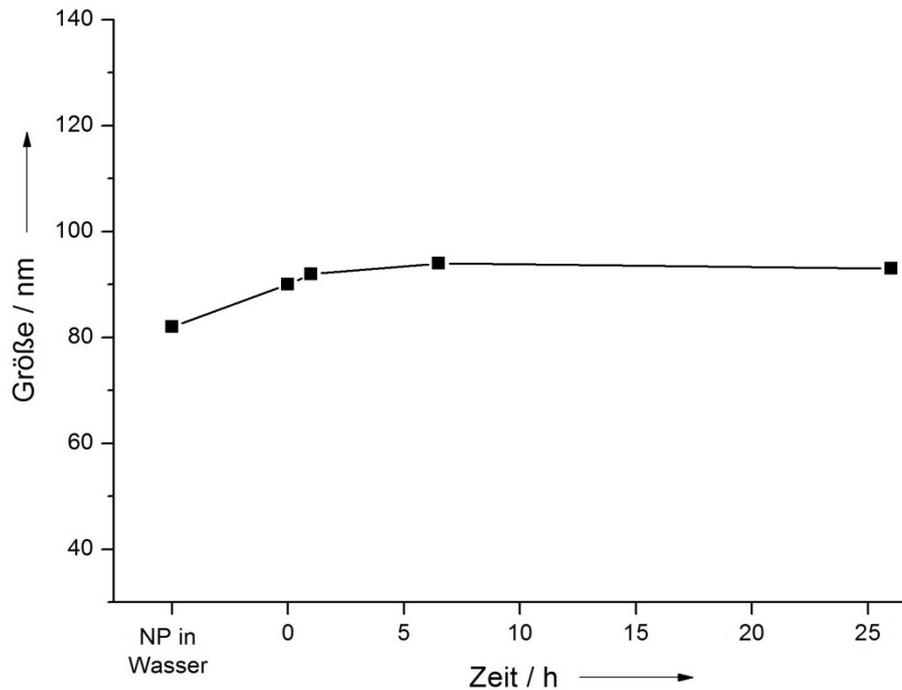
Es sind zwei prominente Signale bei 35 nm und bei 133 nm vorhanden. Das zu erwartende Maximum für die Nanopartikel wird also nicht durch das Medium verdeckt.

Für die Stabilitätsuntersuchung wurden die Nanopartikel in einer Konzentration von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  in McCoy's 5A + 10 % FCS dispergiert und bei  $37^\circ\text{C}$  gelagert. Von dieser Dispersion wurden direkt nach der Inkubation (0 h), nach 1 h, 6,5 h und 26 h Proben genommen und mit dem Zellkulturmedium verdünnt, sodass die Partikelkonzentration in einem für die *Nanoparticle Tracking Analysis* nutzbaren Bereich lag. Die genommenen Proben wurden dann mit der NTA hinsichtlich der Größe der Nanopartikel charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 131 gezeigt. Zusätzlich sind die Messkurven der in Reinstwasser dispergierten Nanopartikel und von McCoy's 5A + 10 % FCS zum Vergleich angegeben.



**Abbildung 130:** Vergleich der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmten Größenverteilungen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel nach unterschiedlich langer Inkubation in McCoy's 5A + 10 % FCS.

Bei allen Messungen wurden Kurven erhalten, die auf monodisperse Nanopartikel hinweisen. Die Maxima der im Zellkulturmedium dispergierten Partikel sind im Vergleich zu den in Wasser dispergierten Partikeln geringfügig zu größeren Partikeldurchmessern verschoben. Es zeigt sich also, dass die Partikel über den beobachteten Zeitraum in dem verwendeten Zellkulturmedium stabil sind. Die ermittelten Durchmesser der Nanopartikel in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer sind in Abbildung 131 und in Tabelle 25 zusammengefasst.



**Abbildung 131:** Verlauf der Partikelgröße der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in McCoy's 5A + 10 % FCS.

**Tabelle 25:** Zusammenfassung der hydrodynamischen Durchmesser der in McCoy's 5A + 10 % FCS inkubierten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Inkubationszeit / h	Hydrodynamischer Durchmesser / nm
[nicht inkubiert]	82
0	90
1	92
6,5	94
26	93

Aus der Grafik bzw. den Werten in der Tabelle ist zu entnehmen, dass der hydrodynamische Durchmesser der Partikel direkt nach der Inkubation um 8 nm zunimmt und dann im Wesentlichen konstant bleibt. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Umhüllung der Nanopartikel mit Proteinen zurückzuführen und nicht auf eine Agglomeration der Partikel. In dem fetalen Kälberserum, das zu 10 % dem

Zellkulturmedium zugesetzt ist, sind zahlreiche Proteine enthalten, die mit den Nanopartikeln interagieren können. Über die Bildung einer Protein-Corona um Nanopartikel, die in Kontakt mit Proteinen kommen, wird auch in der Literatur berichtet, beispielsweise von *Bihari et al.*<sup>[217]</sup> und *Lynch et al.*,<sup>[218]</sup> die beobachteten, dass durch die Anlagerung von Proteinmolekülen der Durchmesser von Nanopartikeln um mehrere Nanometer ansteigt.

Wären die Nanopartikel in dem McCoy's 5A-Zellkulturmedium mit FCS-Zusatz tatsächlich agglomeriert, so wären erheblich größere Partikeldurchmesser im Bereich mehrerer hundert Nanometer zu erwarten gewesen. Auch wenn dann nicht alle Partikel agglomeriert vorgelegen hätten, wären zumindest Nebensignale bei diesen großen Partikeldurchmessern aufgetaucht. Die Messung mittels NTA liefert Werte bis zu einem Partikeldurchmesser von 2 µm. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in den hier gezeigten Grafiken die Messungen nur bis 500 nm gezeigt, da dies im Allgemeinen ausreichend ist. Es konnten jedoch auch im Bereich zwischen 500 nm und 2 µm keine Signale festgestellt werden, die auf Agglomeration hinweisen.

Die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel sind also in dem hier als Modell verwendeten Zellkulturmedium über mindestens einen Tag hinweg kolloidal stabil. Dieses Medium wurde für Zellexperimente verwendet, die in dieser Arbeit nicht dargestellt werden. Die Stabilität der Nanopartikel in dem häufig verwendeten Zellkulturmedium RPMI mit FCS-Zusatz wurde bereits in einer früheren Arbeit nachgewiesen.<sup>[138]</sup>

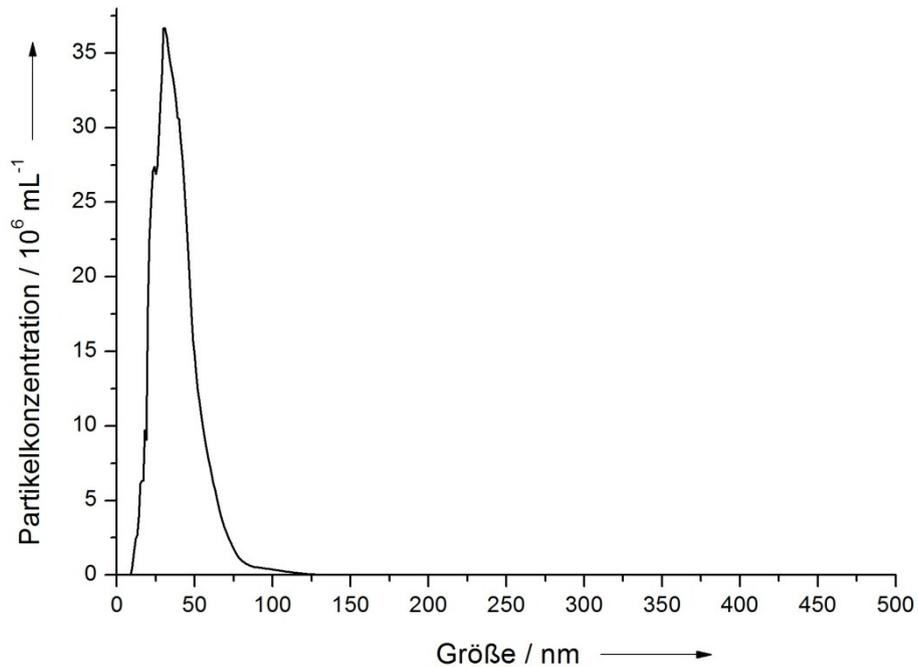
### **5.5.2 Stabilität der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in RPMI + 10 % FCS**

Die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer kolloidalen Stabilität in dem Zellkulturmedium RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) mit einem 10 %-igen Zusatz von FCS untersucht. Die Zusammensetzung von RPMI kann Tabelle 26 entnommen werden.

**Tabelle 26:** Zusammensetzung des Zellkulturmediums RPMI 1640.

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b> <b>/ mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b> <b>/ mg L<sup>-1</sup></b>
<b>Anorganische Salze</b>			
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100,00	KCl	400,00
MgSO <sub>4</sub>	48,80	NaCl	6000,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	800,70	NaHCO <sub>3</sub>	2000,00
<b>Aminosäuren</b>			
L-Arginin	200,00	L-Asparagin·H <sub>2</sub> O	56,82
L-Asparaginsäure	20,00	L-Cystin·2HCl	65,20
L-Glutaminsäure	20,00	L-Glutamin	300,00
Glycin	10,00	L-Histidin	15,00
L-Hydroxyprolin	20,00	L-Isoleucin	50,00
L-Leucin	50,00	L-Lysin·HCl	40,00
L-Methionin	15,00	L-Phenylalanin	15,00
L-Prolin	20,00	L-Serin	30,00
L-Threonin	20,00	L-Tryptophan	6,00
L-Tyrosin·2Na·2H <sub>2</sub> O	28,83	L-Valin	20,00
<b>Vitamine</b>			
Biotin	0,20	D-Calciumpantothenat	0,25
Cholinchlorid	3,00	Folsäure	1,00
i-Inositol	35,00	Nicotinamid	1,00
p-Aminobenzoesäure	1,00	Pyridoxin·HCl	1,00
Riboflavin	0,20	Thiamin·HCl	1,00
Vitamin B <sub>12</sub>	0,0005		
<b>Sonstige Bestandteile</b>			
D-Glucose	2000,00	Glutathion	1,00
Phenolrot	5,00		

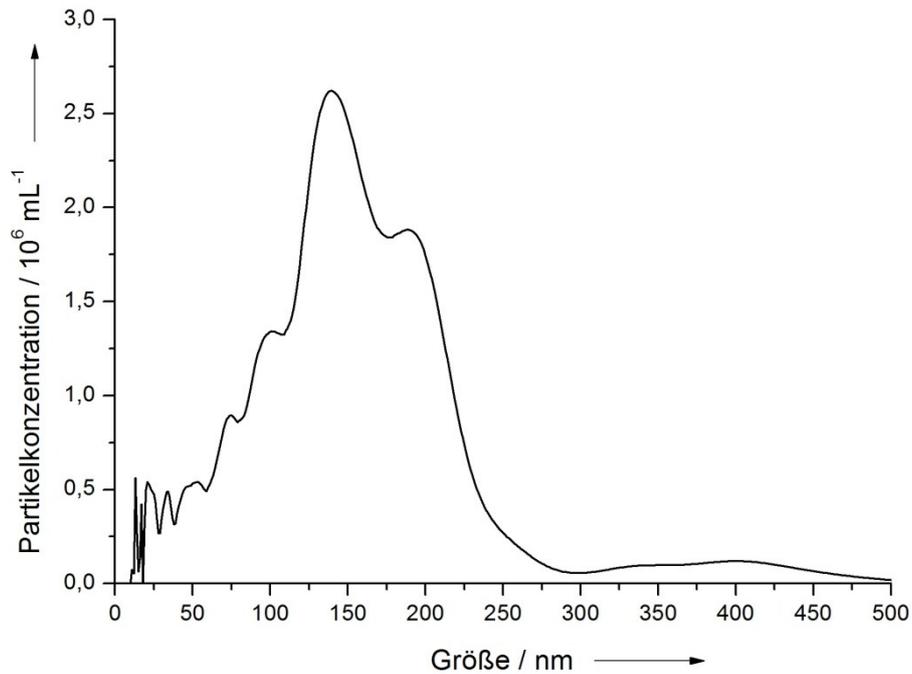
In Abbildung 132 ist die Größenverteilung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel gezeigt, die mittels NTA bestimmt wurde.



**Abbildung 132:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in Reinstwasser.

Es ist eine enge Größenverteilung mit einem Maximum bei 30 nm zu sehen. Bei dieser Größe handelt es sich um den hydrodynamischen Partikeldurchmesser. Es treten keine Agglomerate bei größeren Partikeldurchmessern auf.

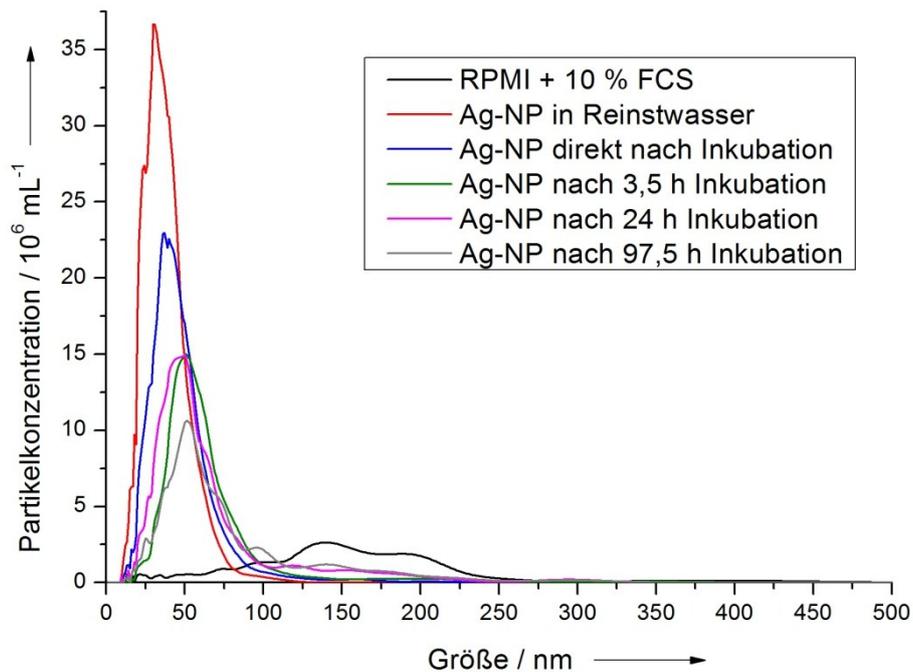
Das Zellkulturmedium wurde ebenfalls mittels der NTA charakterisiert, um auszuschließen, dass sich die Signale der Partikel und des Mediums überlagern und so die Aussagen verfälschen können. Die erhaltene Größenverteilung des Mediums ist in Abbildung 133 wiedergegeben.



**Abbildung 133:** Messung von RPMI + 10 % FCS mittels *Nanoparticle Tracking Analysis*.

Es ist eine polydisperse Größenverteilung mit einem Maximum bei 139 nm zu erkennen.

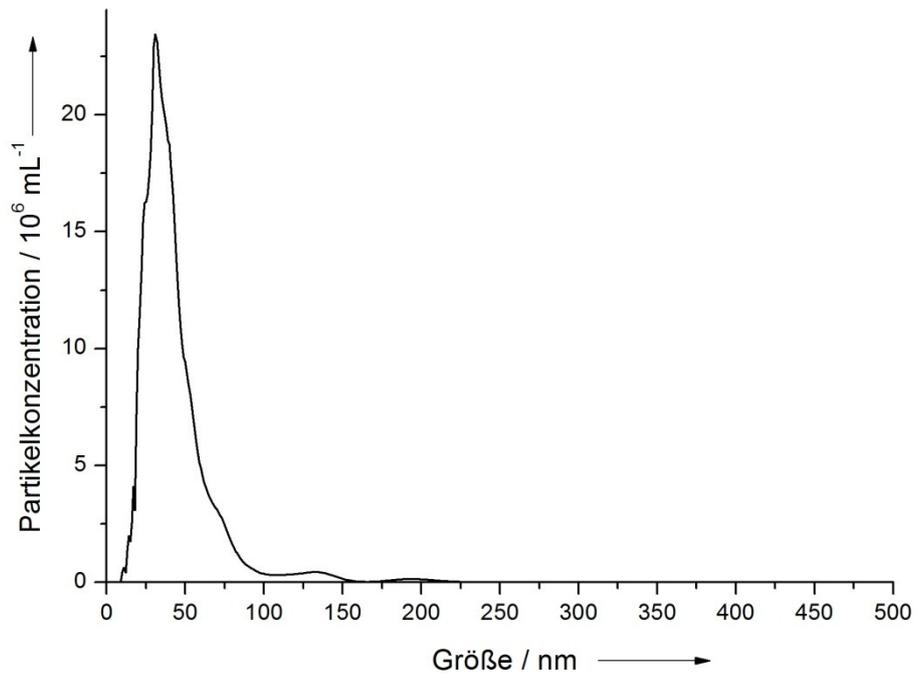
Die Nanopartikel wurden in einer Konzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  in RPMI + 10 % FCS dispergiert und bei  $37^\circ\text{C}$  gelagert. Es wurden direkt nach der Inkubation, nach 3,5 h, nach 24 h und nach 97,5 h Proben entnommen und mittels der *Nanoparticle Tracking Analysis* hinsichtlich der Größe der Nanopartikel analysiert. Hierfür wurden die Proben mit dem Zellkulturmedium so verdünnt, dass eine für die NTA brauchbare Partikelkonzentration vorlag. In Abbildung 134 sind alle gemessenen Größenverteilungen wiedergegeben. Zum Vergleich sind die Messkurven der in Reinstwasser dispergierten Nanopartikel und von RPMI + 10 % FCS mit angegeben.



**Abbildung 134:** Vergleich der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmten Größenverteilungen der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel nach unterschiedlich langer Inkubation in RPMI + 10 % FCS.

Bei allen untersuchten Proben wurde eine monodisperse Größenverteilung festgestellt. Die Durchmesser der Nanopartikel waren nach der Inkubation durchgängig zu höheren Werten verschoben. Es ist keine Überlagerung der Signale für die Partikel und die Bestandteile des Mediums festzustellen.

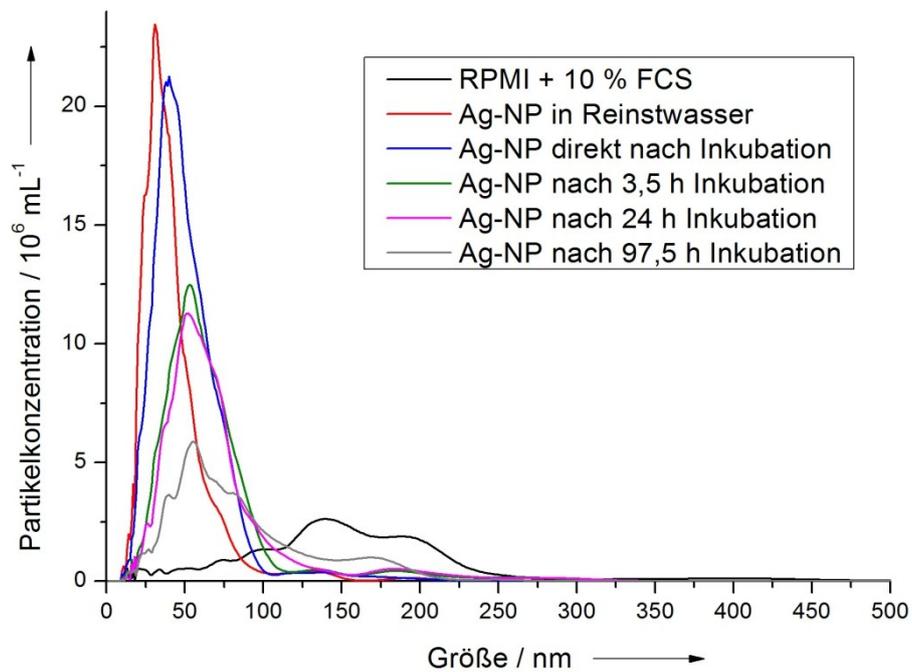
Die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden auf die gleiche Weise untersucht. Die Konzentration im Zellkulturmedium betrug ebenfalls  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , und die Probenintervalle waren identisch mit denen der mit PVP umfunktionalisierten Partikel. Die mittels NTA bestimmte Größenverteilung der Nanopartikel in Reinstwasser ist in Abbildung 135 dargestellt.



**Abbildung 135:** Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmte Größenverteilung der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in Reinstwasser.

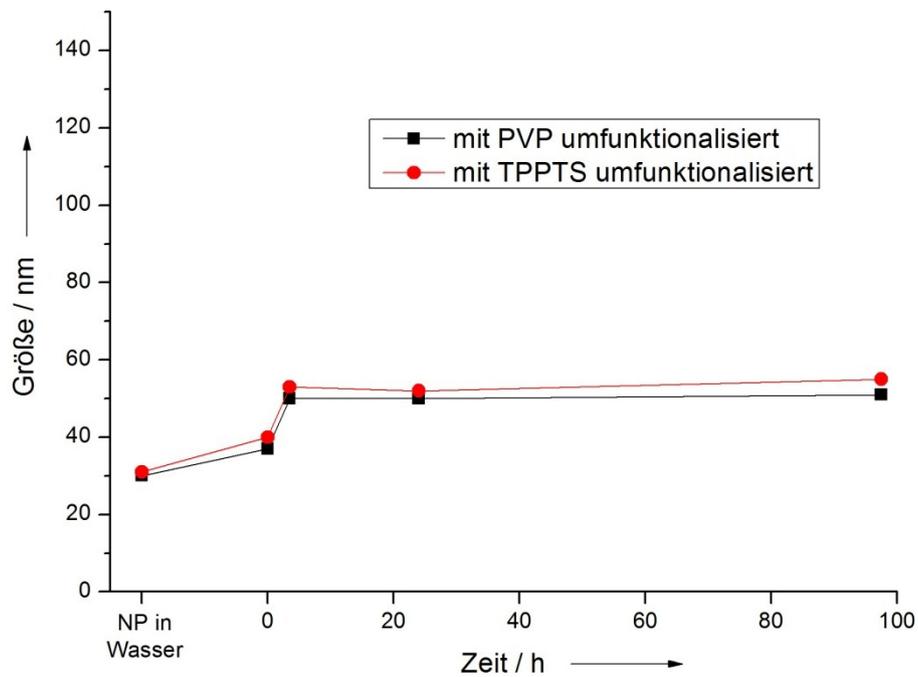
Die enge Größenverteilung der Partikel weist ein Maximum bei 31 nm auf. Es sind keine nennenswerten Agglomerate detektiert worden.

Die gemessenen Größenverteilungen der in RPMI + 10 % FCS inkubierten TPPTS-funktionalisierten Nanopartikel sind in Abbildung 136 zusammengefasst. Zum Vergleich ebenfalls angegeben werden die gemessenen Kurven des reinen Mediums und der in Wasser dispergierten Partikel.



**Abbildung 136:** Vergleich der mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* bestimmten Größenverteilungen der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel nach unterschiedlich langer Inkubation in RPMI + 10 % FCS.

Wie schon bei den mit PVP umfunktionalisierten Partikeln liegt auch in diesem Fall bei allen Messungen eine monodisperse Größenverteilung nach der Inkubation vor. Lediglich die Probe nach 97,5 h weist eine etwas breitere Größenverteilung auf. Der Graph wird aber zusätzlich durch die Skalierung im Verhältnis zu den anderen Kurven etwas verzerrt. Die gemessenen Größen der mit PVP und der mit TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel sind in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in Abbildung 137 und in Tabelle 27 zusammengefasst.



**Abbildung 137:** Verlauf der Partikelgröße der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP (schwarz) bzw. TPPTS (rot) umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in RPMI + 10 % FCS.

**Tabelle 27:** Zusammenfassung der hydrodynamischen Durchmesser der in RPMI + 10 % FCS inkubierten mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP bzw. TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel.

Inkubationszeit / h	Hydrodynamischer Durchmesser / nm	
	PVP-funktionalisiert	TPPTS-funktionalisiert
[nicht inkubiert]	30	31
0	37	40
3,5	50	53
24	50	52
97,5	50	55

Aus der Abbildung und der Tabelle ist ersichtlich, dass der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel unmittelbar nach der Inkubation deutlich ansteigt. Bei den mit PVP funktionalisierten Partikeln erhöht er sich um 7 nm, bei den mit TPPTS funktionalisierten Partikeln um 9 nm. Wie schon bei den mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln dargelegt wurde, ist dies sehr

wahrscheinlich auf eine sofortige Umhüllung der Partikel mit Proteinen aus dem fetalen Kälberserum zurückzuführen. Die Dicke dieser Protein-Corona wächst im weiteren Verlauf der Inkubation bis zur nächsten Größenbestimmung nach 3,5 h noch deutlich an und bleibt dann offenbar bis zum Ende der Inkubation bei 87,5 h konstant. Es tritt offenbar keine Agglomeration der Nanopartikel in dem Zellkulturmedium ein, die Partikel sind kolloidal stabil. Dies ist unabhängig davon, ob sie mit PVP oder TPPTS umfunktionalisiert wurden. Es ist kein wesentlicher Unterschied im Verhalten der beiden Partikelsorten auszumachen. Es bleibt also festzuhalten, dass auch die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel in dem hier als Modellsystem verwendeten Zellkulturmedium RPMI mit einem Zusatz von 10 % FCS kolloidal stabil sind.

### **5.5.3 Zusammenfassung der Stabilitätsuntersuchungen**

Sowohl die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel als auch die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel sind in den jeweils verwendeten Zellkulturmedien eine Zeit lang kolloidal stabil. Die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Nanopartikel zeigen in dem Zellkulturmedium McCoy's 5A mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum über 26 h keine nennenswerte Agglomeration. Diese Zeit genügt für die meisten gängigen zellbiologischen Untersuchungen, die häufig über 24 h erfolgen. Die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel waren in dem Zellkulturmedium RPMI, dem ebenfalls 10 % fetales Kälberserum zugesetzt waren, über einen Zeitraum von 97,5 h kolloidal stabil. Nach dieser Zeit zeigte sich noch keine Agglomeration der Partikel. Es konnte kein merklicher Einfluss der unterschiedlichen Funktionalisierungen mit PVP oder TPPTS auf die Stabilität beobachtet werden. Diese kolloidale Stabilität trotz der hohen Konzentration freier Ladungsträger in den Zellkulturmedien ist vermutlich auf den FCS-Zusatz zurückzuführen. Alle Nanopartikel zeigten einen merklichen Anstieg ihrer hydrodynamischen Durchmesser direkt nach der Inkubation um mehrere Nanometer. Es ist wahrscheinlich, dass sofort nach dem Kontakt der Partikel mit dem Medium eine Umhüllung der Partikel mit Proteinen stattfindet, die auf die Partikeloberfläche adsorbieren oder mit der Funktionalisierung wechselwirken. Diese Bildung einer

Protein-Corona würde den Anstieg der Partikeldurchmesser erklären. *Mahl et al.* haben bei der Untersuchung von Gold-Nanopartikeln einen vergleichbaren Größenanstieg der hydrodynamischen Radien und eine kolloidale Stabilisierung durch Proteine festgestellt.<sup>[219]</sup> *Murdock et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass der hydrodynamische Durchmesser verschiedener Nanopartikel zunimmt und sie dabei stabilisiert werden, wenn sie in biologischen Medien mit Serum inkubiert werden.<sup>[220]</sup>

## **5.6 Adsorption von BSA an Silber-Nanopartikel**

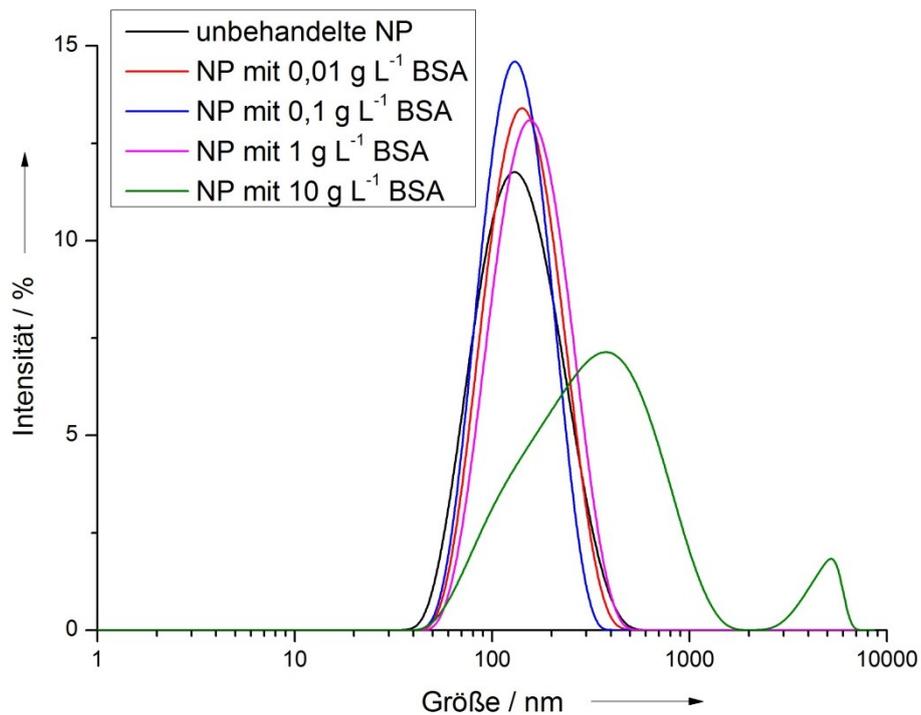
Wenn Nanopartikel in biologische Umgebungen gelangen, ist es möglich, dass sich in Abhängigkeit von der Art dieser Umgebung Änderungen an der Nanopartikelhülle ergeben. Wie im vorigen Kapitel gezeigt wurde, steigt der hydrodynamische Partikeldurchmesser merklich an, wenn Silber-Nanopartikel in einem Zellkulturmedium mit einem Zusatz von fetalem Kälberserum inkubiert werden. Da die Vermutung naheliegt, dass dies in biologischer Umgebung durch die Adsorption von Proteinen und anderen Stoffen verursacht wird, wurde der Einfluss von Proteinen auf den hydrodynamischen Durchmesser von Silber-Nanopartikeln und die Adsorption an ihre Oberfläche untersucht.

### **5.6.1 Einfluss von BSA in unterschiedlichen Konzentrationen auf die hydrodynamische Partikelgröße**

Als Modellprotein wird Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumine*, BSA) eingesetzt. Es wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von BSA auf die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel untersucht. Alle Messungen wurden mit durch Ultrazentrifugation gereinigten Partikeln durchgeführt. Die Messungen mittels Dynamischer Lichtstreuung und analytischer Scheibenzentrifugation sowie des Zeta-Potentials wurden von Frau Sabrina Berger im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

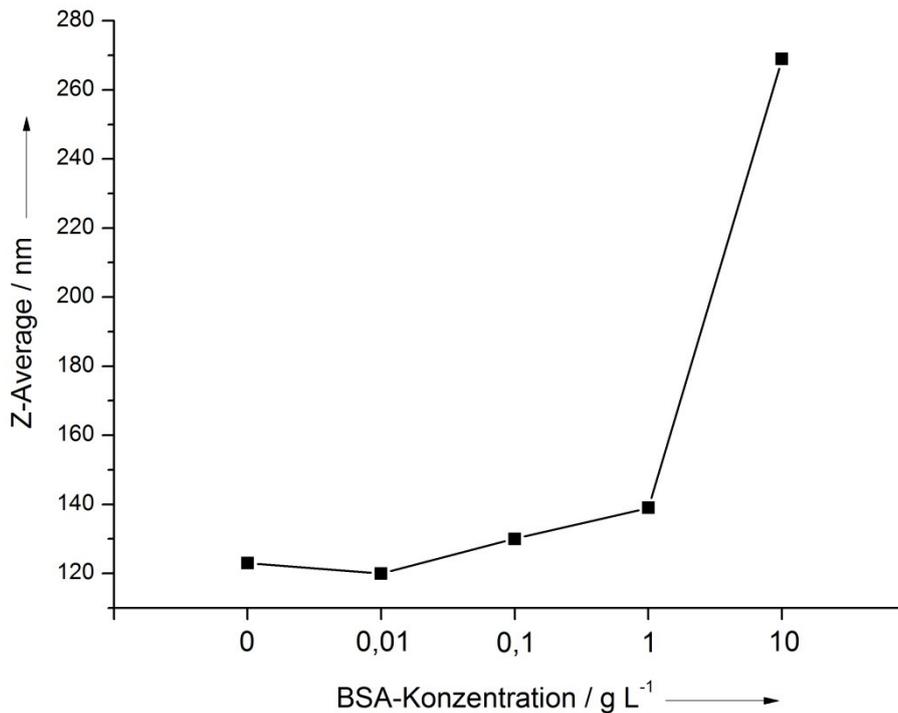
Die Nanopartikel wurden in einer Konzentration von  $61,25 \text{ mg L}^{-1}$  in BSA-Lösungen mit den Massenkonzentrationen  $0,01 \text{ g L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$ , und  $10 \text{ g L}^{-1}$  in Reinstwasser gegeben und über Nacht rühren gelassen. Nach der Reinigung der Partikel mittels Zentrifugation und Redispergierung in Reinstwasser wurde der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel mittels Dynamischer Lichtstreuung

und analytischer Scheibenzentrifugation gemessen und das Zeta-Potential bestimmt. Die Messungen mittels DLS sind in Abbildung 138 gezeigt.



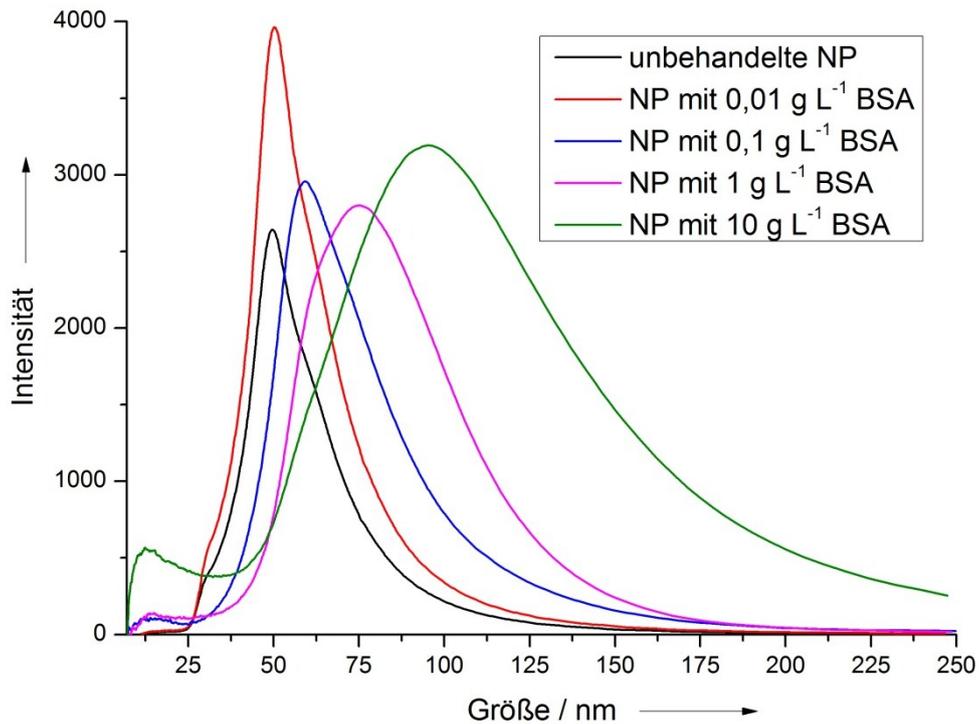
**Abbildung 138:** Mittels Dynamischer Lichtstreuung ermittelte Größenverteilungen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel nach Immersion in unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen.

Neben den in BSA-Lösungen inkubierten Partikeln ist die Messkurve der nicht inkubierten Nanopartikel (schwarz) zum Vergleich mit abgebildet. Es ist gut zu erkennen, dass bei BSA-Konzentrationen von  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  bis  $1 \text{ g L}^{-1}$  monodisperse Systeme vorliegen. Nach der Inkubation in einer Lösung mit der BSA-Konzentration von  $10 \text{ g L}^{-1}$  liegen die Nanopartikel allerdings deutlich agglomeriert vor und sind nicht mehr monodispers. Die Größenverteilung ist erheblich breiter als bei den anderen Konzentrationen und weist ein zusätzliches Signal bei großen Partikeldurchmessern auf, das von den Agglomeraten verursacht wird. Der Z-Average in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration bei der Immersion ist in Abbildung 139 dargestellt.

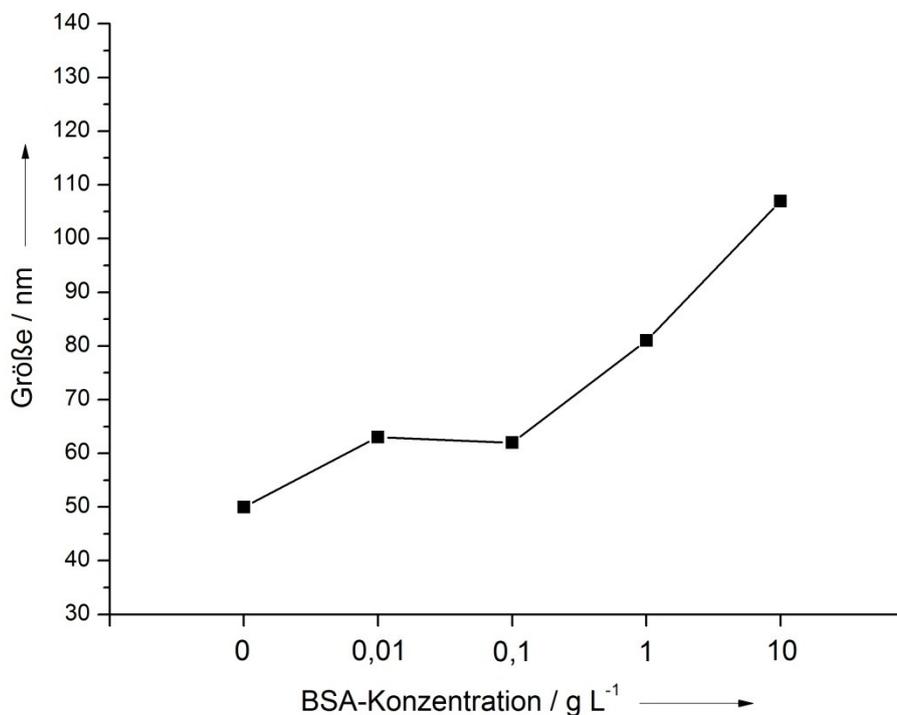


**Abbildung 139:** Abhängigkeit des Z-Average der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel von der BSA-Konzentration nach Immersion in unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen.

Es ist allgemein eine Größenzunahme der Partikel zu beobachten, je höher die BSA-Konzentration bei der Inkubation war. Der Z-Average der nicht mit BSA in Kontakt gekommenen Nanopartikel betrug 123 nm. Nach der Immersion in 0,01 g L<sup>-1</sup> BSA-Lösung fällt er geringfügig auf 120 nm und steigt dann mit steigender BSA-Konzentration wieder an. Den höchsten Wert erreicht der Z-Average bei der BSA-Lösung mit der Konzentration von 10 g L<sup>-1</sup>. Da hier die Nanopartikel allerdings bereits leicht agglomeriert vorliegen, ist der Z-Average in diesem Fall wenig aussagekräftig. Die mittels analytischer Scheibenzentrifugation erhaltenen Größenverteilungen der Nanopartikel sind in Abbildung 140 gezeigt. Die ermittelte Größe ist in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration in Abbildung 141 dargestellt.



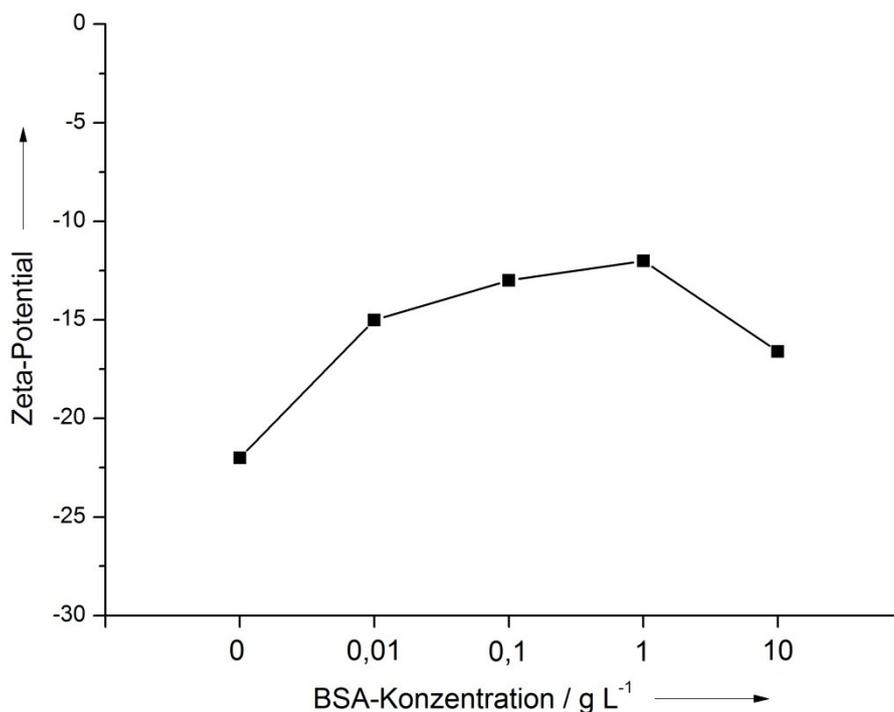
**Abbildung 140:** Mittels analytischer Scheibenzentrifugation ermittelte Größenverteilungen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel nach Immersion in unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen.



**Abbildung 141.** Abhängigkeit der mittels DCS bestimmten Größe der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel von der BSA-Konzentration nach Immersion in unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen.

Auch mit der analytischen Scheibenzentrifugation konnte ein genereller Größenanstieg der Nanopartikel mit steigender BSA-Konzentration festgestellt werden. Die Größenverteilung wird umso breiter, je höher die BSA-Konzentration ist. Die nicht mit BSA inkubierten Nanopartikel weisen eine Größe von 50 nm auf. Dieser Wert steigt nach der Immersion in der 0,01 g L<sup>-1</sup> BSA-Lösung auf 63 nm an. Bei der höchsten verwendeten BSA-Konzentration von 10 g L<sup>-1</sup> weisen die Nanopartikel eine Größe von 107 nm auf.

Abbildung 142 zeigt den Verlauf des Zeta-Potentials in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration bei der Immersion der Nanopartikel.



**Abbildung 142:** Abhängigkeit des Zeta-Potentials der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel von der BSA-Konzentration nach Immersion in unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen.

Das Zeta-Potential der nicht mit BSA in Kontakt gekommenen Partikel liegt bei -22 mV. Nach der Inkubation in der BSA-Lösung mit einer Konzentration von 0,01 g L<sup>-1</sup> steigt das Zeta-Potential auf -15 mV an. Es wird bei größer werdender BSA-Konzentration positiver, bis es bei der BSA-Lösung mit der Konzentration von 10 g L<sup>-1</sup> wieder auf -16,6 mV abfällt. Da diese Dispersion allerdings agglomeriert war, ist dieser Wert mit Vorsicht zu beurteilen.

Alle ermittelten Messwerte sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

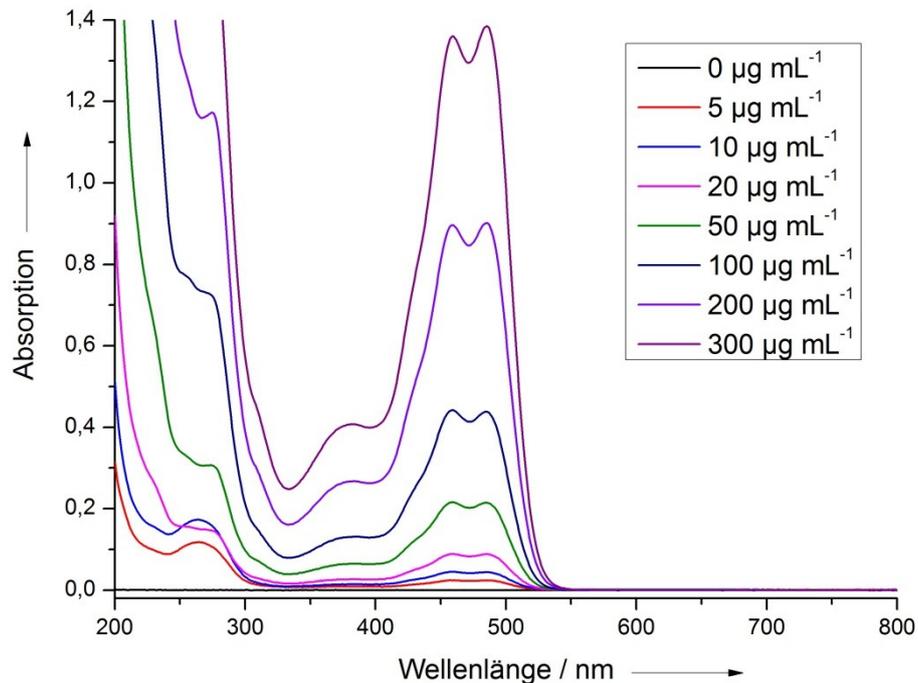
**Tabelle 28:** Zusammenfassung der Messwerte für die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel nach der Immersion in BSA-Lösungen.

<b>BSA-Konzentration</b> / g L <sup>-1</sup>	<b>Z-Average</b> / nm	<b>Größe laut DCS</b> / nm	<b>Zeta-Potential</b> / mV
0	123	50	-22
0,01	120	63	-15
0,1	130	62	-13
1	139	81	-12
10	269	107	-17

Der hydrodynamische Durchmesser der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel steigt generell beim Kontakt mit BSA-Lösungen an. Je höher die Konzentration des BSA ist, desto stärker ist dieser Anstieg im Allgemeinen. Bei sehr hoher BSA-Konzentration neigen die Partikel allerdings zur Agglomeration, was die Messwerte der Dynamischen Lichtstreuung und des Zeta-Potentials verfälscht. Das Zeta-Potential, das sich schon beim Kontakt mit der am geringsten konzentrierten BSA-Lösung stark verändert, ist neben der zunehmenden hydrodynamischen Größe ein deutlicher Hinweis auf eine Wechselwirkung des Proteins mit den Nanopartikeln. Da alle Partikel nach der Immersion in BSA-Lösung abzentrifugiert und in Reinstwasser redispergiert worden waren, lassen sich Effekte des gelösten Albumins (z. B. durch eine Viskositätsänderung des Dispersionsmittels) auf die Messergebnisse ausschließen.

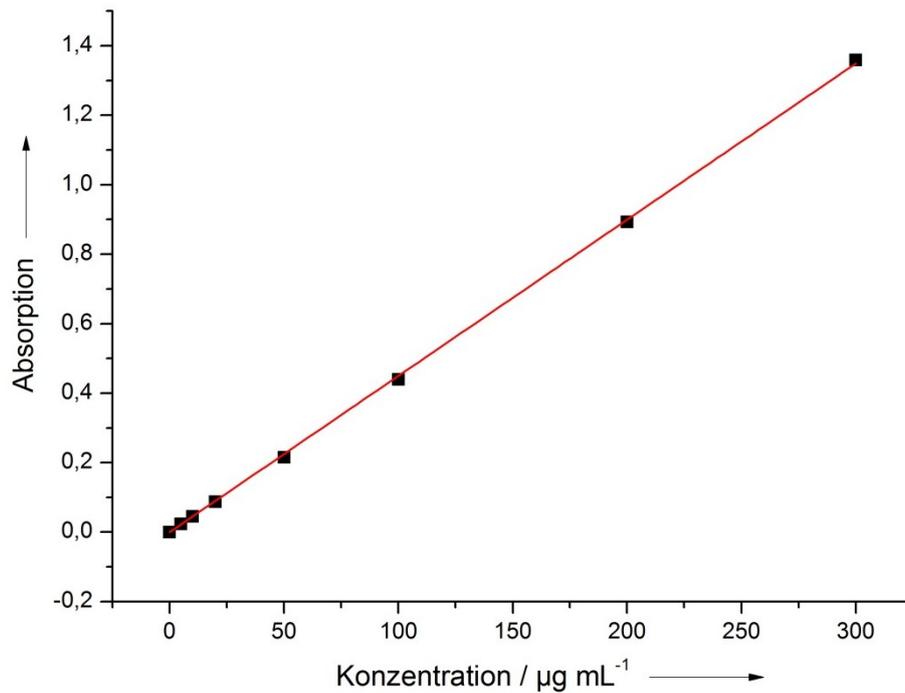
Die Adsorption von BSA an Silber-Nanopartikel wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Dazu wurden die Nanopartikel in einer Konzentration von 50 g mL<sup>-1</sup> in Lösungen aus mit Fluoresceinisothiocyanat markiertem BSA (FITC-BSA) für 20 h inkubiert. Danach wurden die Partikel abzentrifugiert und die Menge des verbleibenden BSA, das nicht an die Partikel adsorbiert hatte, im Überstand mit der UV/Vis-Spektroskopie gemessen. Die Absorption der Lösung wurde stets bei einer Wellenlänge von 460 nm ermittelt. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt, das mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt wurde. Alle Lösungen, die FITC-BSA enthielten, wurden im Dunkeln aufbewahrt, um das *Photobleaching* des Farbstoffes<sup>[221]</sup> zu minimieren. Die Auswertung der erhaltenen Absorptions-Spektren erfolgte mittels einer Kalibriergeraden. Dazu wurden

verschieden konzentrierte FITC-BSA-Lösungen hergestellt und ebenfalls mittels UV/Vis-Spektroskopie vermessen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 143 dargestellt.



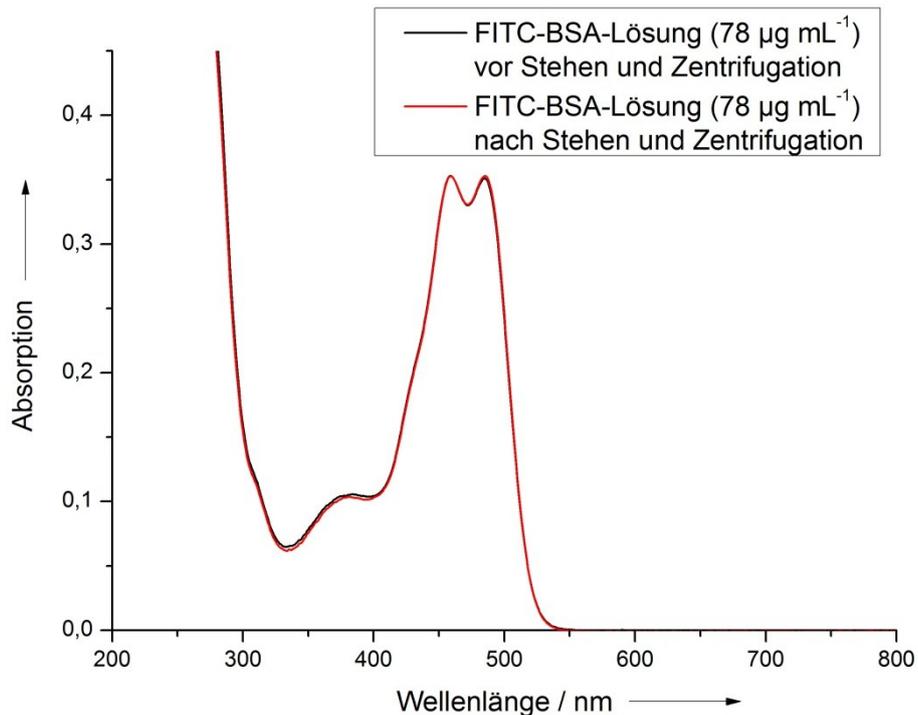
**Abbildung 143:** UV/Vis-Spektren der Kalibrierlösungen von FITC-BSA in Reinstwasser mit pH = 7,5.

Die mit steigender FITC-BSA-Konzentration ansteigende Absorption bei 460 nm ist gut zu erkennen. Aus den ermittelten Absorptionen bei dieser Wellenlänge für die verschiedenen FITC-BSA-Konzentrationen wurde eine Kalibriergerade erstellt, die die Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration darstellt. Diese Gerade ist in Abbildung 144 gezeigt.



**Abbildung 144:** Kalibriergerade aus den ermittelten Absorptionen von FITC-BSA in Reinstwasser mit pH = 7,5.

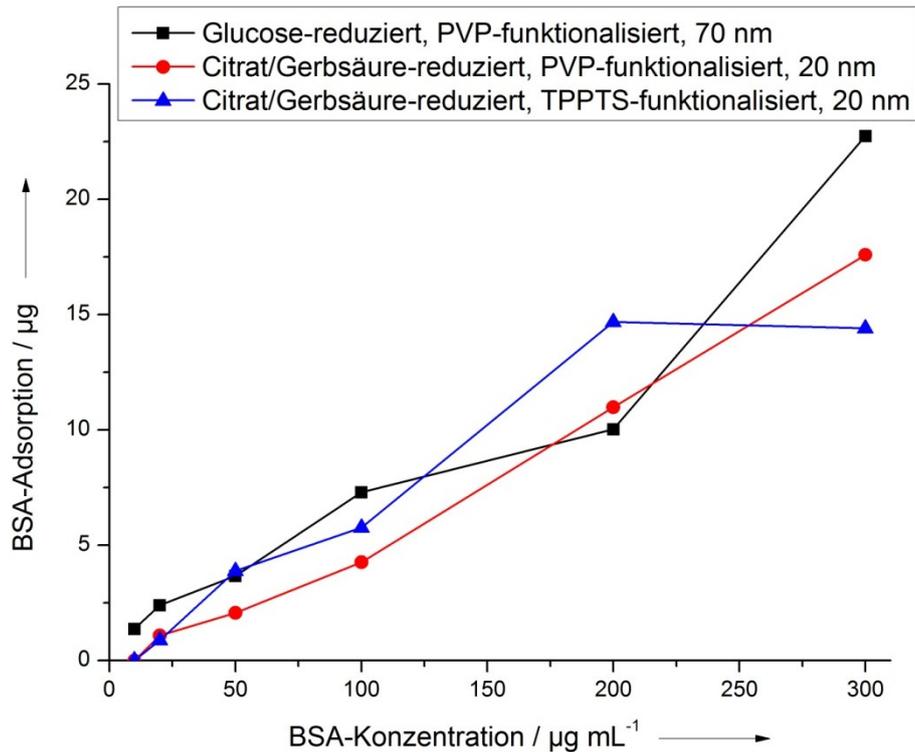
Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, ist die Absorption bei der gewählten Wellenlänge linear von der FITC-BSA-Konzentration abhängig. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $R^2 = 0,99987$  und liegt damit sehr nahe bei eins. Adsorptionseffekte des BSA an der Gefäßwandung<sup>[222]</sup> und die schon angesprochene Verringerung der Fluoreszenzintensität des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes während der Standzeit zur Equilibrierung und der Zentrifugation müssen ausgeschlossen werden. Daher wurde eine Lösung von FITC-BSA mit der Konzentration  $78 \mu\text{g mL}^{-1}$  zunächst mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Anschließend wurde die Probe genauso behandelt wie die mit Nanopartikeln inkubierten Proben, d. h. sie wurde 20 h stehen gelassen und anschließend zentrifugiert und der Überstand (über den in diesem Fall fiktiven Nanopartikeln) abpipettiert. Dann wurde die Probe erneut mit der UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Die beiden erhaltenen Spektren sind in Abbildung 145 übereinandergelegt gezeigt.



**Abbildung 145:** Vergleich des UV/Vis-Spektrums einer FITC-BSA-Lösung ( $\beta = 78 \text{ g mL}^{-1}$ ) vor 20-stündigem Stehenlassen und anschließender Zentrifugation (schwarz) und nach dieser Prozedur (rot).

Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, sind die beiden Spektren deckungsgleich. Insbesondere im Bereich der relevanten Wellenlänge von 460 nm ist die Signalintensität nahezu identisch. Vor der Behandlung lag die Absorption bei 0,352665, nach der Standzeit und der Zentrifugation bei 0,352657. Es findet also keine nennenswerte Veränderung des FITC-BSA während des Versuchs durch Adsorption an die Gefäßwandungen oder durch *Photobleaching* statt. Die gemessenen Intensitätsänderungen nach dem Abzentrifugieren der Nanopartikel müssen daher kommen, dass das BSA an die Partikel adsorbiert und nachfolgend mit abzentrifugiert wird.

Die ermittelten Adsorptionen von BSA an verschiedene Nanopartikel sind in Abbildung 146 gezeigt.



**Abbildung 146:** Adsorbierte Masse von BSA an die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Nanopartikel (schwarz) und die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP (rot) oder TPPTS (blau) umfunktionalisierten Nanopartikel bei einer Silber-Konzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration.

Es wurden die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Nanopartikel mit einem Durchmesser von 70 nm und die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Nanopartikel mit einem Durchmesser von jeweils 20 nm verwendet. Es ist zu erkennen, dass die Nanopartikel bei steigender BSA-Konzentration mehr BSA adsorbieren. Es existiert ein grober linearer Zusammenhang zwischen der BSA-Konzentration und der adsorbierten BSA-Menge, der unabhängig von ihrer Größe und ihrer Funktionalisierung zu sein scheint.

Über die adsorbierte Masse an BSA und die Partikelgröße, sowie die Silber-Konzentration kann man die Anzahl der pro Partikel adsorbierten BSA-Moleküle berechnen. Über die Größe der Nanopartikel lässt sich das Volumen eines Partikels berechnen. Bei einem Partikeldurchmesser von 70 nm beträgt das Volumen eines Partikels  $1,78 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3$ . Über die Dichte von Silber ( $10,49 \text{ g cm}^{-3}$ ) kann die Masse eines Nanopartikels berechnet werden, sie beträgt  $1,88 \cdot 10^{-18} \text{ kg}$ . Die eingesetzte Silberkonzentration betrug  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , das eingesetzte Volumen 1 mL. Durch

Division der eingesetzten Silbermasse von 50 µg durch die Masse eines Nanopartikels erhält man die Anzahl der Nanopartikel in dem Volumen von 1 mL. Sie beträgt  $2,65 \cdot 10^{10}$  Partikel. Entsprechend wurde für die Nanopartikel mit dem Durchmesser von 20 nm die Anzahl der Partikel in dem verwendeten Volumen von 1 mL mit  $1,14 \cdot 10^{12}$  berechnet.

Aus der insgesamt adsorbierten Masse an BSA pro Ansatz kann über die Avogadro-Konstante ( $6,02214129 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ) und die molare Masse des verwendeten BSA ( $67000 \text{ g mol}^{-1}$ ) und anschließende Division durch die Partikelanzahl berechnet werden, wie viele BSA-Moleküle pro Nanopartikel adsorbiert worden sind. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind für jede Partikelsorte und BSA-Konzentration in Tabelle 29 zusammengefasst.

**Tabelle 29:** Zusammenfassung der pro Nanopartikel adsorbierten BSA-Moleküle in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration.

c(BSA) / µg mL <sup>-1</sup>	adsorbierte BSA-Moleküle pro Nanopartikel		
	PVP-Ag-NP 70 nm	PVP-Ag-NP 20 nm	TPPTS-Ag-NP 20 nm
10	462	0	0
20	808	9	7
50	1243	16	31
100	2470	34	46
200	3395	87	116
300	7703	139	114

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, adsorbieren die größeren Nanopartikel sehr viel mehr BSA-Moleküle pro Partikel, da die Oberfläche eines einzelnen Partikels sehr viel größer ist als bei den kleinen Nanopartikeln.

Die Oberfläche eines 70 nm großen Nanopartikels beträgt  $1,54 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2$  ( $15394 \text{ nm}^2$ ). Damit ergibt sich die Gesamtoberfläche aller Nanopartikel in einem Volumen von 1 mL zu  $4,09 \text{ cm}^2$  ( $4,09 \cdot 10^{14} \text{ nm}^2$ ). Für die 20 nm großen Nanopartikel ergibt sich für die Oberfläche eines Partikels  $1,26 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2$  ( $1257 \text{ nm}^2$ ) und für die Oberfläche aller Partikel  $14,30 \text{ cm}^2$  ( $1,43 \cdot 10^{15} \text{ nm}^2$ ).

Dividiert man nun die Oberfläche eines Nanopartikels durch die Anzahl der BSA-Moleküle pro Partikel, erhält man die theoretisch von einem BSA-Molekül belegte Oberfläche. Die so berechneten Werte sind in Tabelle 30 wiedergegeben.

**Tabelle 30:** Belegte Oberfläche eines BSA-Moleküls auf den verschiedenen eingesetzten Nanopartikeln.

BSA-Konzentration / $\mu\text{g mL}^{-1}$	belegte Oberfläche eines BSA-Moleküls / $\text{nm}^2$		
	PVP-Ag-NP 70 nm	PVP-Ag-NP 20 nm	TPPTS-Ag-NP 20 nm
10	33,31	0	0
20	19,06	147,49	183,31
50	12,39	77,07	40,92
100	6,23	37,39	27,61
200	4,53	14,48	10,83
300	2,00	9,04	11,05

Für humanes Serumalbumin (HSA) wird in der Literatur eine mittels Röntgenstrukturanalyse ermittelte gleichseitige, dreieckige Prismen-Struktur angegeben,<sup>[223]</sup> die auch für BSA gelten soll.<sup>[224]</sup> Die Kantenlänge beträgt 8,4 nm und die Dicke der Struktur 3,15 nm.<sup>[225, 226]</sup> Daraus kann man für zwei mögliche Adsorptionswege des Moleküls die jeweils belegte Fläche berechnen: zum einen für die Adsorption mit der dreieckigen Seitenfläche an die Nanopartikeloberfläche (*side-on*), zum anderen mit der rechteckigen Stirnfläche (*end-on*). Für den *side-on*-Mechanismus ergibt sich eine durch das BSA-Molekül belegte Fläche von 30,6  $\text{nm}^2$ , für den *end-on*-Mechanismus ergibt sich eine Fläche von 26,46  $\text{nm}^2$ .

Vergleicht man diese beiden Werte mit den in der Tabelle angegebenen Flächen, erkennt man, dass sich bei allen Nanopartikeln bei höherer BSA-Konzentration Multilagengebilde ausgebildet haben müssen. Bei den mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 70 nm kann nur bei einer BSA-Konzentration von 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  von einer BSA-Monolage ausgegangen werden. Bei den mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 20 nm kann man bis zu einer BSA-

Konzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  von einer Monolage sprechen. Bei höherer BSA-Konzentration müssen sich auch hier Multilagen gebildet haben, da die berechnete durch ein BSA-Molekül belegte Fläche hier kleiner ist als die tatsächliche Molekülgröße des Proteins. Auf den mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, TPPTS-funktionalisierten, 20 nm großen Nanopartikeln ist bis zu einer BSA-Konzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  die Bildung einer BSA-Monolage wahrscheinlich. Bei einer BSA-Konzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ist mit dem *end-on*-Mechanismus noch eine Monolage denkbar. Bei höheren BSA-Konzentrationen bildet sich offenbar eine Multilage.

### 5.6.2 Zusammenfassung der Adsorption von BSA an Silber-Nanopartikel

BSA erhöht generell den hydrodynamischen Durchmesser von Silber-Nanopartikeln merklich, wenn es in Kontakt mit deren wässriger Dispersion kommt. Dies ist auf die Adsorption des Proteins zurückzuführen. Ebenfalls wird das Zeta-Potential durch die Anlagerung des BSA positiver.

Durch Quantifizierung mittels UV/Vis-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass BSA in merklichem Umfang an die Nanopartikel gebunden wird. Es bilden sich dabei bei steigender BSA-Konzentration zunächst Monolagen und dann Multilagen des Proteins auf der Partikeloberfläche aus. Bei sehr hohen BSA-Konzentrationen beginnen die Nanopartikel zu agglomerieren, wie mittels DLS nachgewiesen wurde.

Es ist bemerkenswert, dass die Menge an adsorbiertem BSA bei größer werdender BSA-Konzentration und gleich bleibender Partikelkonzentration immer weiter ansteigt. Es ist keinerlei Sättigungseffekt zu erkennen, der darauf hinweist, dass sich bevorzugt nur eine Monolage des Proteins auf der Partikeloberfläche bildet

Die moderate Erhöhung des Zeta-Potentials durch BSA konnte anhand negativ geladener Gold-Nanopartikel von *Brewer et al.* ebenfalls gezeigt werden.<sup>[227]</sup> Die Autoren haben auch diskutiert, dass BSA in der Lage ist, Dimere und Multimere zu bilden und damit Multilagen zu formen. Es könne ebenfalls passieren, dass das Protein auf der Nanopartikeloberfläche denaturiert wird und dadurch über hydrophobe Wechselwirkungen Multilagen ausbildet.

*Rezwan et al.* fanden hingegen, dass keine Monolage erreicht wird, wenn Partikel aus  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  oder  $\text{ZrO}_2$  mit BSA inkubiert werden.<sup>[228]</sup> In einer anderen Arbeit zeigten *Rezwan et al.* allerdings, dass mehr BSA an  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Nanopartikel gebunden wird, als für eine Monolage mit einem *side-on*-Mechanismus benötigt wird. Da der

*end-on*-Mechanismus aber wegen der unsymmetrischen Ladungsverteilung des BSA-Moleküls ungünstig sei, beginne BSA, Dimere auszubilden.<sup>[229]</sup> Dies geschehe bei hohen BSA-Konzentrationen zwangsläufig und führe zu Protein-Protein-Wechselwirkungen, beispielsweise über Wasserstoff-Brückenbindungen oder Disulfid-Brücken. Röcker *et al.* zeigten hingegen, dass HSA Monolagen auf Polymerbeschichteten FePt- und CdSe/ZnS-Nanopartikeln ausbildet.<sup>[226]</sup>

Die Bildung von Multilagen aus BSA um die Silber-Nanopartikel ist also denkbar, auch wenn die Bildung einer Monolage zunächst wahrscheinlich ist. Der mit zunehmender BSA-Konzentration steigende hydrodynamische Partikeldurchmesser weist allerdings darauf hin, dass sich tatsächlich Multilagen von BSA auf den Silber-Nanopartikeln bilden. Im Zusammenhang mit der Bildung einer Corona aus Proteinen um Silber-Nanopartikel sei auf eine Arbeit von Kittler *et al.* hingewiesen, in der nachgewiesen wurde, dass die Zelltoxizität der Partikel durch einen Zusatz von BSA (und von FCS) verringert werden kann.<sup>[138]</sup>

## 5.7 Zellbiologische Aktivität von Silber-Nanopartikeln

Silber-Nanopartikel haben, wie schon des Öfteren erwähnt, wegen ihrer bakteriziden Eigenschaften weite Anwendung gefunden, unter anderem in Gebrauchsgegenständen wie Kleidung. Dabei kann es zur Aufnahme der Partikel oder zumindest zu einem intensiven Kontakt mit ihnen kommen. Daher ist nicht nur die Wirkung auf unerwünschte Mikroben von Bedeutung, sondern auch die Wechselwirkung mit menschlichen Zellen. Idealerweise sollen die Silber-Nanopartikel, die dazu gedacht sind, Keime zuverlässig und in geringen Dosierungen abzutöten, auch in höheren Konzentrationen keinerlei negativen Auswirkungen auf menschliche Zellen haben. Um die Wirkung von Silber-Nanopartikeln auf menschliche Zellen zu untersuchen, wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und periphere mononukleäre Blutzellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBNC) als Modellzellen verwendet. Es wurden die Auswirkungen auf die Zellviabilität, die Veränderung der Freisetzung der Interleukine IL-6 und IL-8 und die Aufnahme in Zellen untersucht. Die zellbiologischen Untersuchungen wurden von Frau Dr. Christina Greulich von der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Die Daten sind Bestandteil mehrerer gemeinsamer Publikationen.

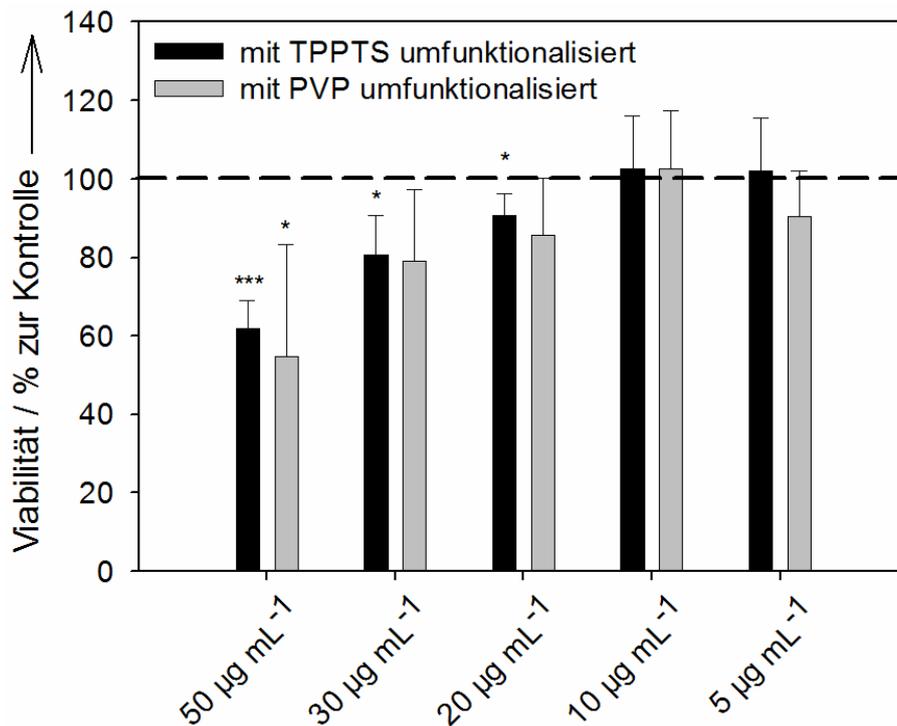
### **5.7.1 Zellbiologische Aktivität der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP bzw. TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel**

Zunächst wurden die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht. Es wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) als Modellzellen verwendet. Sowohl die Viabilität der Zellen nach einer Inkubation mit den Partikeln als Maß für ihre Zelltoxizität als auch die Änderung der Freisetzung der Interleukine IL-6 und IL-8 als Maß für die Zellaktivierung wurde gemessen. Die Zelltests wurden mit Silber-Nanopartikeln durchgeführt, die in entgastem Reinstwasser unter Argon und bei 5 °C aufbewahrt wurden.

#### **5.7.1.1 Einfluss auf die Viabilität von humanen mesenchymalen Stammzellen**

Die Stammzellen wurden in Anwesenheit der Silber-Nanopartikel für 24 h und 7 d unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die eingesetzten Silberkonzentrationen waren  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Die lebenden Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit Calcein-AM angefärbt. Der Farbstoff wird von lebenden Zellen aufgenommen und im Zellinneren enzymatisch gespalten. Dabei er in Calcein umgewandelt, welches intrazelluläres Calcium komplexiert und dann grün fluoresziert.<sup>[230-232]</sup> Tote Zellen können Calcein-AM nicht enzymatisch abbauen und werden so nicht erfasst. Die lebenden Zellen wurden dann über Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert.

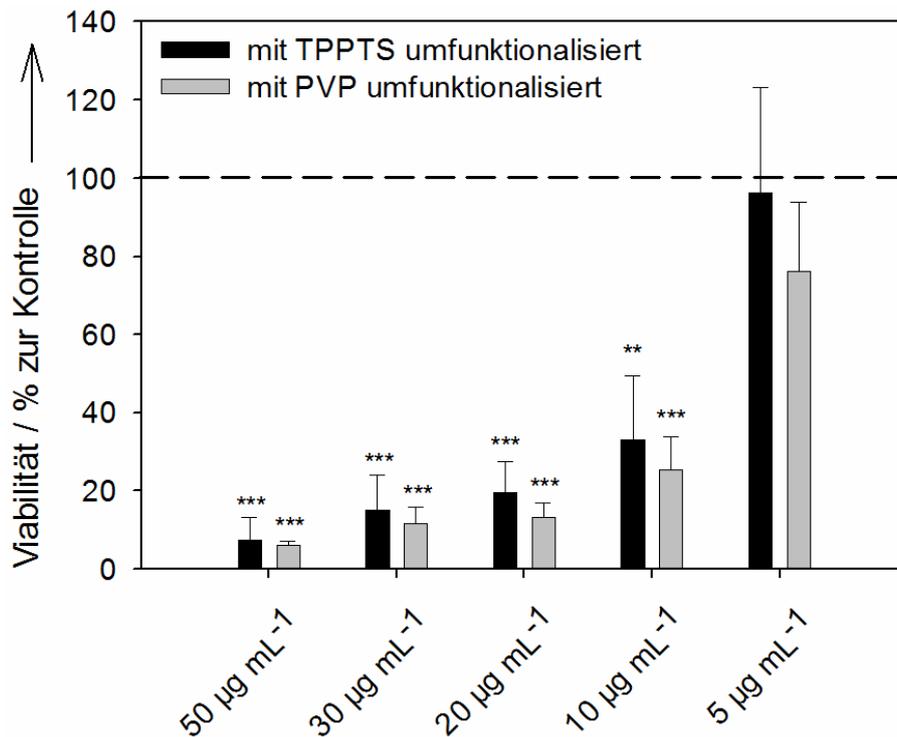
Abbildung 147 zeigt die quantitative Auswertung der Inkubation über 24 Stunden. Es wurden sowohl die mit PVP als auch die mit TPPTS umfunktionalisierten Nanopartikel eingesetzt.



**Abbildung 147:** Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel auf die Viabilität von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) bei einer Inkubation über 24 h. \* Signifikant im Vergleich zur Kontrolle (\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Mit steigender Silberkonzentration ist auch eine steigende toxische Wirkung der Nanopartikel auf die Stammzellen verbunden. Während bei den niedrigen Konzentrationen von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  Toxizität zu beobachten ist, nimmt die Viabilität ab einer Silberkonzentration von  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  ab. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration überlebt nach 24 h nur noch etwa die Hälfte der Zellen die Inkubation mit den Nanopartikeln. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den mit PVP und den mit TPPTS umfunktionalisierten Partikeln feststellbar.

Die quantitativen Ergebnisse der Inkubation über sieben Tage sind in Abbildung 148 wiedergegeben.



**Abbildung 148:** Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der mit PVP oder TPPTS funktionalisierten Silber-Nanopartikel auf die Viabilität von hMSC bei einer Inkubation über 7 d. \* Signifikant im Vergleich zur Kontrolle (\*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ ).

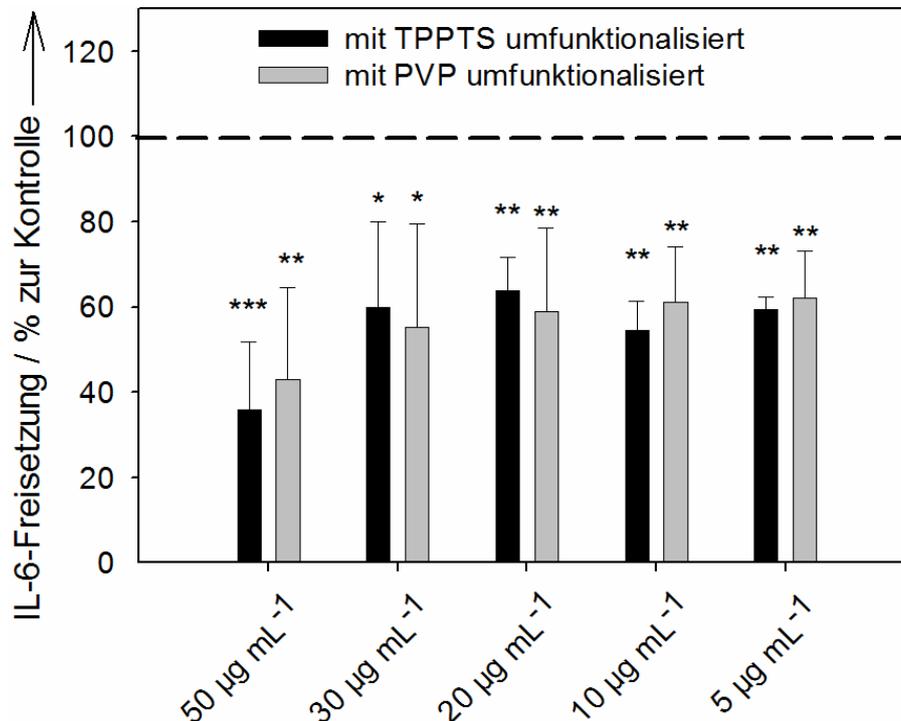
Bei der längeren Inkubationsdauer zeigt sich bereits ab einer Silberkonzentration von  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  eine stark verminderte Viabilität der Zellen. Sie sinkt bei steigender Silberkonzentration noch weiter ab, bis bei  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  fast keine viablen Zellen mehr vorhanden sind. Auch in diesem Fall ist kein Unterschied in der Toxizität bei den verschiedenen Funktionalisierungen vorhanden.

Die unterschiedliche Toxizität bei verschiedenen langen Inkubationszeiten lässt sich mit der Auflösung der Silber-Nanopartikel korrelieren. Da die Partikel nach der Synthese unter Argon-Atmosphäre gelagert worden waren, zeigt sich bei der 24-stündigen Inkubation nur eine geringe Toxizität, da die Zeit, um toxische Silber-Ionen freizusetzen, nur kurz war. Bei der Inkubation über sieben Tage setzten die Partikel jedoch langsam Silber-Ionen frei, die die Zelltoxizität der Nanopartikel erhöhten.<sup>[195]</sup>

### 5.7.1.2 Einfluss auf die Cytokin-Freisetzung von humanen mesenchymalen Stammzellen

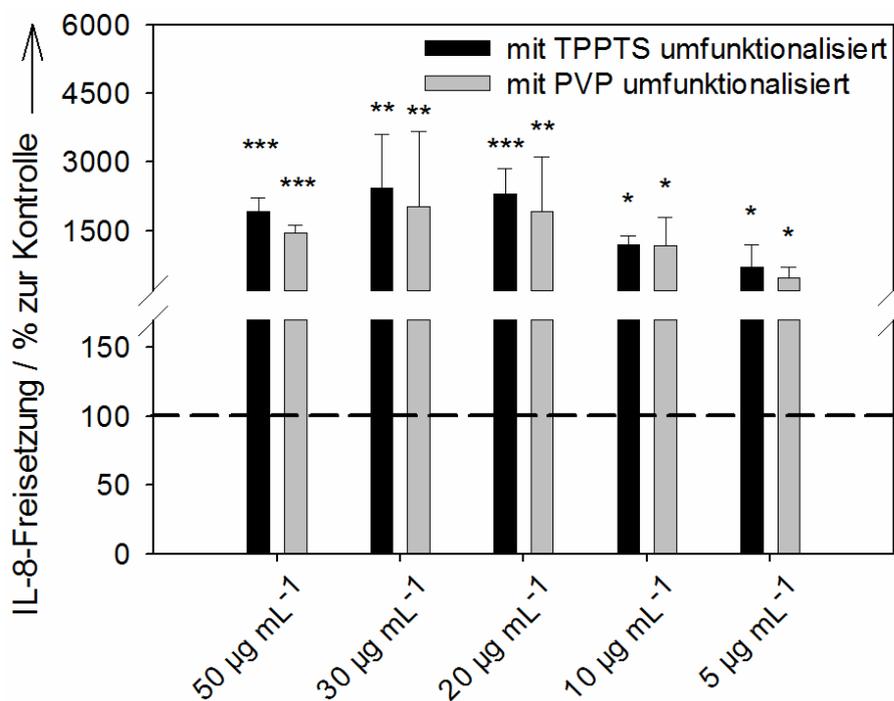
Nach der Inkubation mit den Silber-Nanopartikeln wurde auch die Freisetzung von Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) gemessen. Die beiden genannten Interleukine gehören zur Gruppe der Cytokine. Cytokine sind regulatorische Polypeptide bzw. Proteine, die sich auf das Wachstum, die Proliferation, und die Differenzierung von Zellen des Immunsystems auswirken. Unter die Gruppe der Cytokine fallen beispielsweise auch Interferone, Chemokine und Virokine.<sup>[233]</sup> Die Veränderung der Freisetzung von Cytokinen, und damit auch von IL-6 und IL-8 zeigt generell an, dass Zellen unter Stress stehen und durch äußere Faktoren aktiviert werden.

In Abbildung 149 ist gezeigt, wie sich die Inkubation der Stammzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der PVP- oder TPPTS-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln auf die Freisetzung von Interleukin-6 auswirkt. Es wurden, wie bei den Viabilitätsmessungen, Silberkonzentrationen von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  bis  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  eingesetzt.



**Abbildung 149:** Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der mit PVP oder TPPTS funktionalisierten Silber-Nanopartikel auf die Freisetzung von Interleukin-6 bei hMSC. \* Signifikant im Vergleich zur Kontrolle (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass bei allen verabreichten Konzentrationen der Silber-Nanopartikel die Freisetzung des IL-6 gehemmt wurde. Dieser Effekt ist bei der höchsten eingesetzten Konzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  am stärksten ausgeprägt und bei allen anderen Konzentrationen ungefähr gleich. Es ist kein Unterschied zwischen den PVP- und den TPPTS-funktionalisierten Nanopartikeln vorhanden. Die Änderung der Interleukin-8-Freisetzung der humanen mesenchymalen Stammzellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Silber-Konzentration ist in Abbildung 150 wiedergegeben. Auch hier wurden gleichen Konzentrationen verwendet.



**Abbildung 150:** Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der mit PVP oder TPPTS funktionalisierten Silber-Nanopartikel auf die Freisetzung von Interleukin-8 bei hMSC. \* Signifikant im Vergleich zur Kontrolle (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Bei allen eingesetzten Silberkonzentrationen ist die Freisetzung von Interleukin-8 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Inkubation mit Nanopartikeln massiv erhöht. Auch in diesem Fall zeigen die PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel den gleichen Effekt wie die mit TPPTS funktionalisierten Partikel. Die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Silber-Nanopartikel weisen also einen deutlichen aktivierenden Effekt auf die humanen mesenchymalen Stammzellen auf.

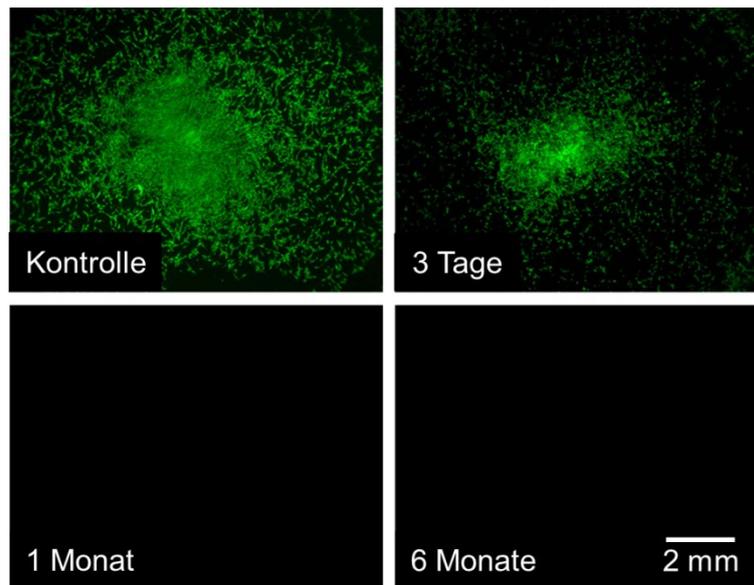
### **5.7.2 Zellbiologische Aktivität der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel**

Die Untersuchung der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität erfolgte an humanen mesenchymalen Stammzellen und humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). Unter dem Oberbegriff PBMC werden insbesondere Monozyten und T-Lymphozyten zusammengefasst, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen. Es wurde die Viabilität unter dem Einfluss unterschiedlich gelagerter Nanopartikel anhand der hMSC gemessen. Dabei kamen Nanopartikel zum Einsatz, die längere Zeit in normalem, lufthaltigem Reinstwasser an Luft gelagert wurden, und Partikel, die in entgastem Reinstwasser unter Schutzgas-Atmosphäre aufbewahrt wurden. In beiden Fällen erfolgte die Lagerung bei 5 °C. Es wurde weiterhin die Aufnahme der Nanopartikel in hMSC und in PBMC und die Beeinflussung der IL-6- bzw. IL-8-Freisetzung von PBMC untersucht.

#### **5.7.2.1 Einfluss auf die Viabilität von humanen mesenchymalen Stammzellen**

Für die Untersuchung der Toxizität der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel wurden hMSC mit den Partikeln bei verschiedenen Silberkonzentrationen behandelt. Die verwendeten Konzentrationen waren  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Die Zellen wurden mit den entsprechenden Mengen an Partikeln für 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert und dann die Zellviabilität mittels Anfärbung mit Calcein-AM und Auswertung über die Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Für diese Untersuchungen wurden Nanopartikel verwendet, die in lufthaltigem Reinstwasser unterschiedlich lange bei 5 °C gelagert wurden.

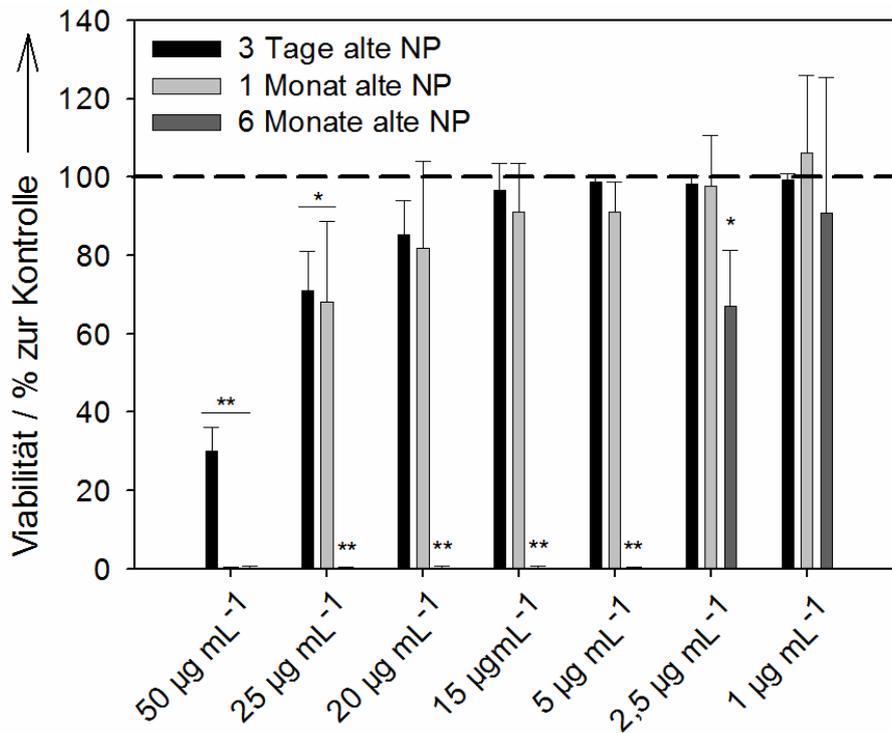
Abbildung 151 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit Calcein-AM angefärbten humanen mesenchymalen Stammzellen nach der Inkubation mit den verschieden lange gelagerten Nanopartikeln.



**Abbildung 151:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von hMSC nach einer 24-stündigen Inkubation mit drei Tagen, einem Monat und drei Monaten lang bei 5 °C gelagerten mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln mit einer Silberkonzentration von 50 µg mL<sup>-1</sup>. Grün sind lebende Zellen, die mit Calcein-AM fluoreszenzmarkiert wurden.<sup>[144]</sup>

Die Kontrolle zeigt eine grüne Fluoreszenz, was zahlreiche lebende Zellen anzeigt. Es ist also in Abwesenheit der Silber-Nanopartikel keine toxische Wirkung zu beobachten. Für die Inkubation wurden zunächst frische Nanopartikel verwendet, die drei Tage nach der Synthese und Reinigung mittels Ultrazentrifugation als Dispersion in lufthaltigem Wasser bei 5 °C gelagert wurden. Es ist eine geringfügige aber doch signifikante Abnahme der grünen Fluoreszenz festzustellen. Die Zellen, die mit Nanopartikeln inkubiert wurden, die einen Monat bzw. drei Monate nach der Synthese gelagert wurden, zeigen keine Fluoreszenz. Das bedeutet, dass keine lebenden Zellen mehr vorhanden sind. Es scheint also einen erheblichen Unterschied in der Wirkung der drei unterschiedlichen Nanopartikelchargen auf die Stammzellen zu geben. Offenbar sind die gealterten Nanopartikel erheblich zelltoxischer als frisch synthetisierte Nanopartikel.

Die quantitative Auswertung der Viabilitätsuntersuchungen mit unterschiedlich lange gelagerten Nanopartikeln bei verschiedenen Silber-Konzentrationen zeigt Abbildung 152.

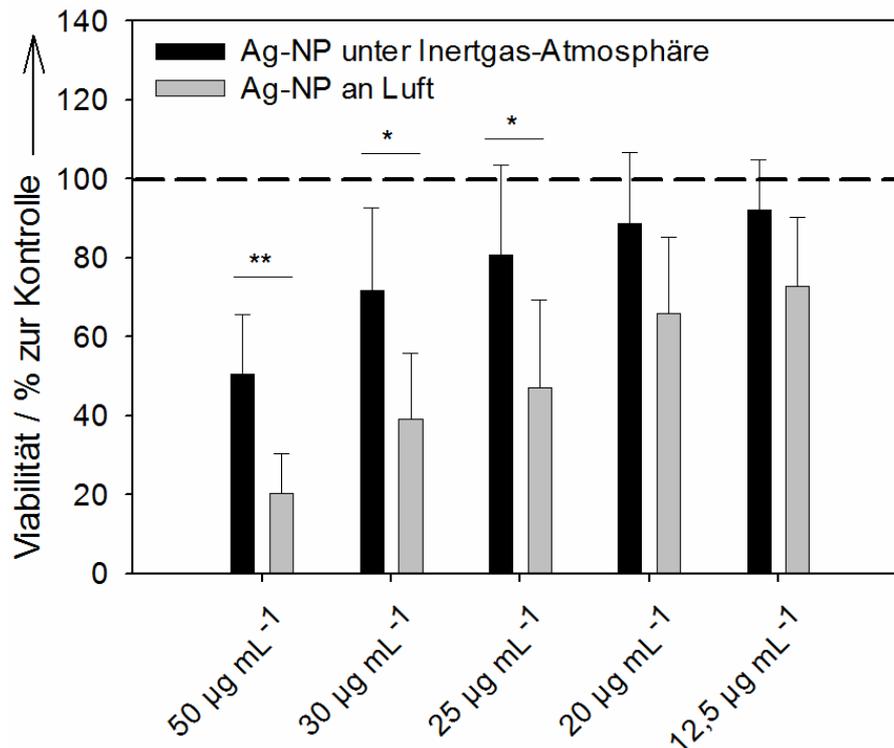


**Abbildung 152:** Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der verschieden lange bei 5 °C gelagerten, mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel auf die Viabilität von hMSC bei einer Inkubation über 24 h. \* Signifikant im Vergleich zur Kontrolle (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,001$ ).<sup>[144]</sup>

Aus der Grafik ist zu entnehmen, dass die Viabilität der Zellen mit steigender Silberkonzentration abnimmt. Je länger die Nanopartikel bereits gelagert wurden, desto stärker ist dieser Effekt ausgeprägt. Die frischen, drei Tage alten Nanopartikel zeigen bei geringeren Konzentrationen bis 15 µg mL<sup>-1</sup> keine nennenswerte Toxizität. Erst bei einer Zugabe von 20 µg mL<sup>-1</sup> beginnt die Zellviabilität zu sinken, bis sie bei einer Silberkonzentration von 50 µg mL<sup>-1</sup> nur noch etwa 30 % im Vergleich zur Kontrolle beträgt. Die einen Monat alten Nanopartikel zeigen eine ähnliche Wirkung auf die Zellen, jedoch wirken sie bei der maximalen eingesetzten Konzentration bereits so toxisch, dass die Zellviabilität auf null zurückgeht. Die sechs Monate alten Nanopartikel weisen hingegen bereits bei einer vergleichsweise geringen Silberkonzentration von 2,5 µg mL<sup>-1</sup> eine signifikante Toxizität auf und bei höheren Konzentrationen sinkt die Zellviabilität auf null.

Des Weiteren wurde untersucht, ob Silber-Nanopartikel, die in entgastem und mit Argon gesättigtem Wasser und unter Argon gelagert wurden, eine andere Toxizität aufweisen als Nanopartikel, die entsprechend in lufthaltigem Reinstwasser

dispergiert wurden. Dazu wurden hMSC für 24 h unter Zellkulturbedingungen mit Nanopartikeln inkubiert, die für einen Monat bei den genannten Bedingungen und bei einer Temperatur von 5 °C gelagert wurden. die Abbildung 153 zeigt Viabilität der Zellen in Abhängigkeit von der zugesetzten Silberkonzentration im Vergleich zur nicht mit Nanopartikeln behandelten Kontrolle. Es wurden Silberkonzentrationen von 12,5 µg mL<sup>-1</sup>, 20 µg mL<sup>-1</sup>, 25 µg mL<sup>-1</sup>, 30 µg mL<sup>-1</sup> und 50 µg mL<sup>-1</sup> eingesetzt.

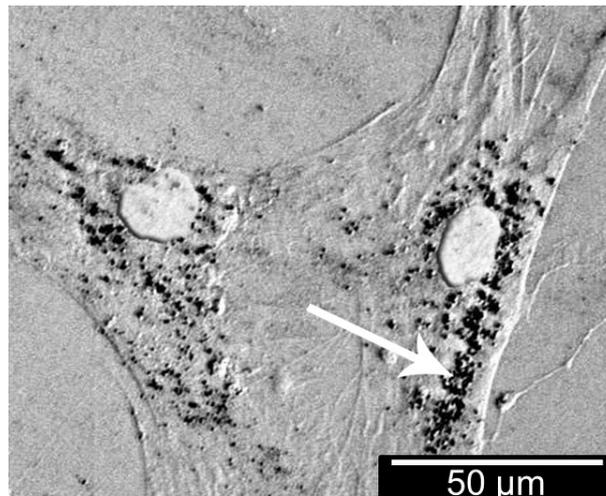


**Abbildung 153:** Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von einem Monat bei 5 °C an Luft bzw. unter Inertgas-Atmosphäre gelagerten, mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel auf die Viabilität von hMSC bei einer Inkubation über 24 h. \* Signifikant im Vergleich zur Kontrolle (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ).

Beide Nanopartikel-Chargen zeigen eine mit steigender Konzentration zunehmende Zelltoxizität. Die Nanopartikel, die in lufthaltigem Reinstwasser dispergiert gelagert wurden, sind jedoch signifikant toxischer als die Partikel, die unter Argon gelagert wurden. Dies ist insbesondere ab einer Silberkonzentration von 25 µg mL<sup>-1</sup> feststellbar.

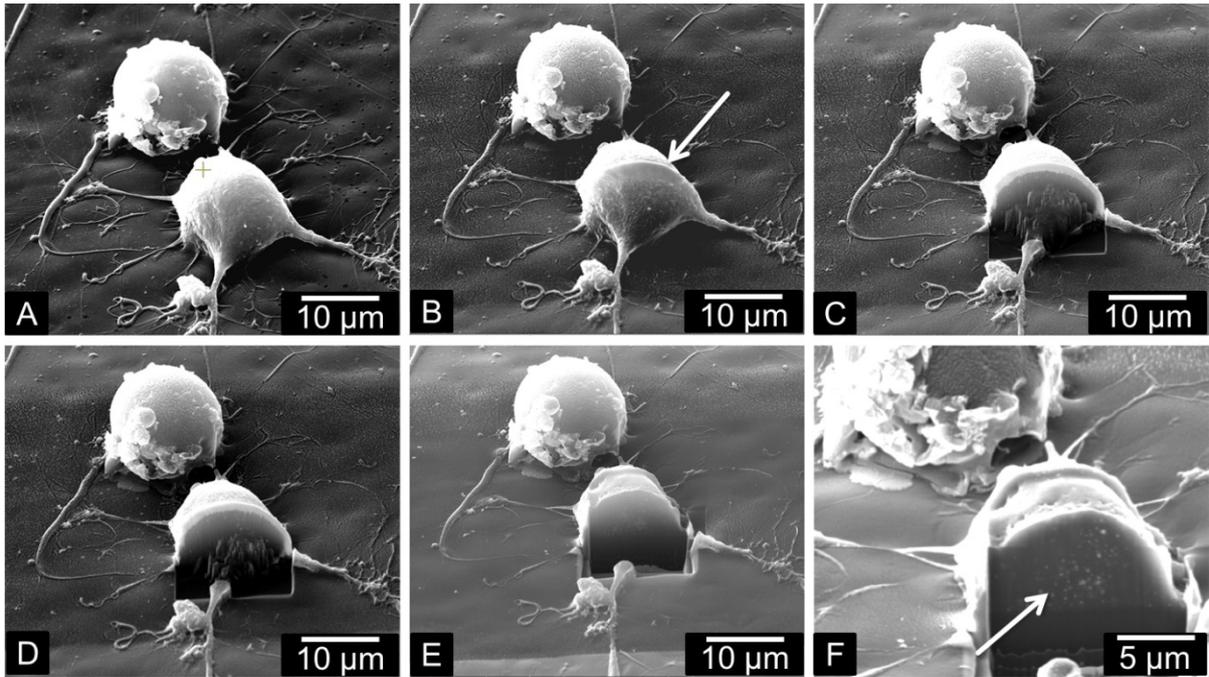
### 5.7.2.2 Aufnahme in Zellen

Die zelluläre Aufnahme der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel wurde anhand von humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht. Zunächst wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie eine Aufnahme von Zellen angefertigt, die mit  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  Silber-Nanopartikeln inkubiert wurden. Diese ist in Abbildung 154 wiedergegeben.



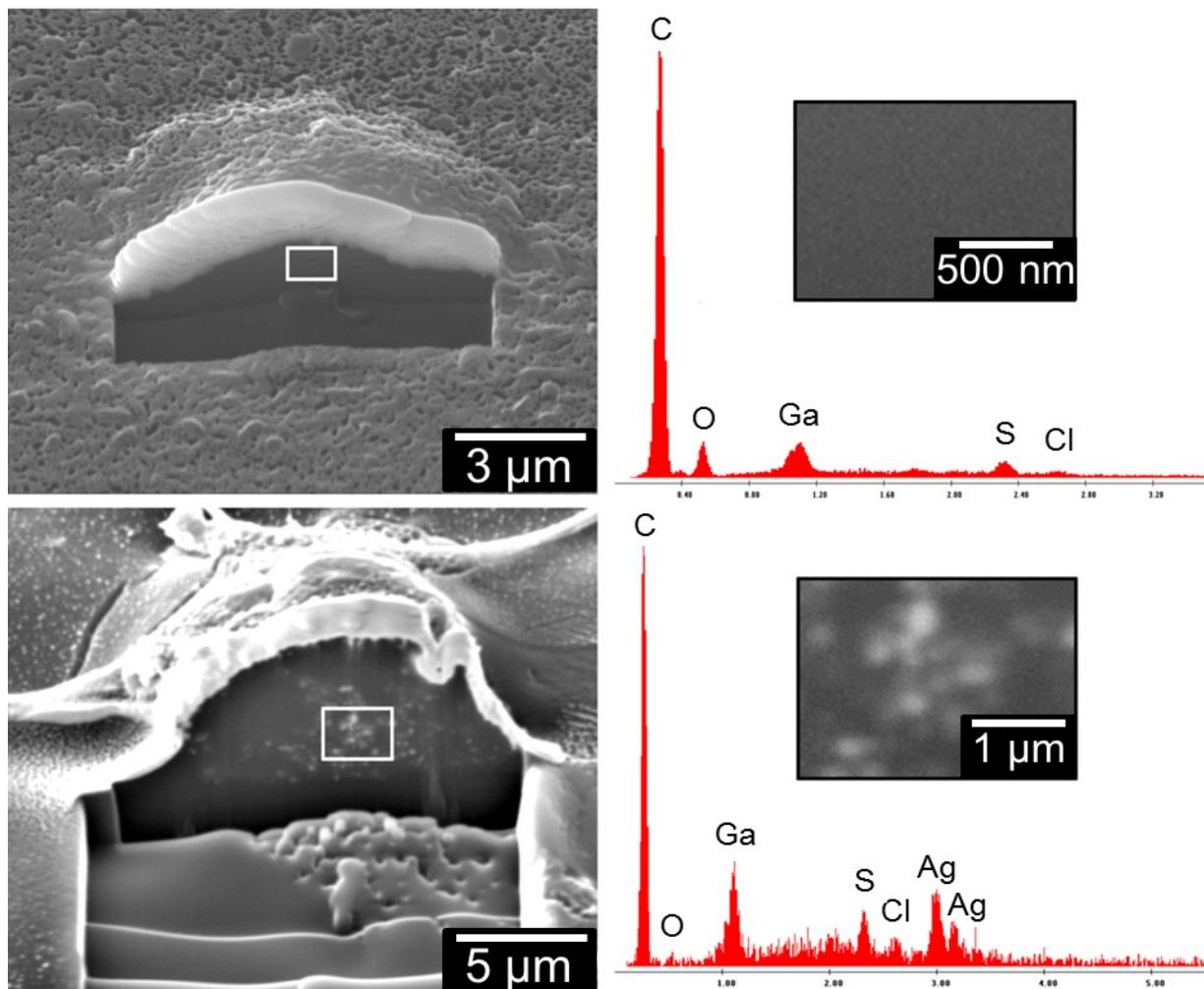
**Abbildung 154:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von hMSC nach der Inkubation mit Glucose-reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Der Pfeil zeigt auf intrazelluläre Agglomerate der Nanopartikel.<sup>[234]</sup>

Es sind deutlich die Kerne zweier Zellen zu erkennen. Ebenfalls sind Agglomerate von Silber-Nanopartikeln zu erkennen, die sich durch ihre schwarze Färbung abheben (weißer Pfeil in der Abbildung). Diese Agglomerate treten perinukleär, also rund um den Zellkern liegend auf. In einer Vergleichsprobe, in der die Zellen mit Silberionen inkubiert wurden, wurden keine Agglomerate festgestellt.<sup>[234]</sup> Aus den Aufnahmen kann allerdings nicht direkt abgeleitet werden, dass Nanopartikel von den Zellen aufgenommen wurden, da die Agglomerate auch auf den Zellen liegen könnten. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da sie selektiv nicht den Zellkern bedecken. Zum Nachweis der Aufnahme der Silber-Nanopartikel in die Stammzellen wurden diese für 24 h mit  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  Silber-Nanopartikeln inkubiert und mittels der *focused ion beam*-Technik (FIB) in der Mitte durchgeschnitten. Dieser Schnitvorgang ist in Abbildung 155 dargestellt.



**Abbildung 155:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von hMSC, die zunächst mit Silber-Nanopartikeln inkubiert ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und anschließend mittels der FIB-Technik durchgeschnitten wurden. (A) hMSC, (B) mit Wolfram beschichtete (Markierung) hMSC, (C-E) Fortgang des FIB-Schnittes, (F) vergrößerter Ausschnitt der Schnittfläche und markierte Silber-Nanopartikel.<sup>[234]</sup>

Bild A zeigt die mit Gold gesputterten Stammzellen im Rasterelektronenmikroskop. Die für den Schnitt ausgewählte Zelle wurde zum Schutz der entstehenden Schneidefläche während des Schneidevorgangs mit Wolfram beschichtet. Diese Schicht ist in Bild B mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Anschließend wurde die Zelle mittels eines Strahls aus Gallium-Ionen durchgeschnitten und die dem Betrachter zugewandte Seite abgetragen. Auf den Bildern D bis E ist der Fortgang des Abtragungsvorgangs zu sehen. Bild F zeigt eine vergrößerte Ansicht der Schnittfläche, in der hellere, elektronendichtere Strukturen sichtbar sind (weißer Pfeil), die von den intrazellulären Silber-Nanopartikeln stammen. Um die Anwesenheit des Silbers innerhalb der Zelle nachzuweisen, wurde ein EDX-Spektrum der Schnittfläche einer Zelle angefertigt, die mit Nanopartikeln inkubiert wurde und mit einer Zelle verglichen, die nicht mit Partikeln behandelt wurde. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 156 gezeigt.

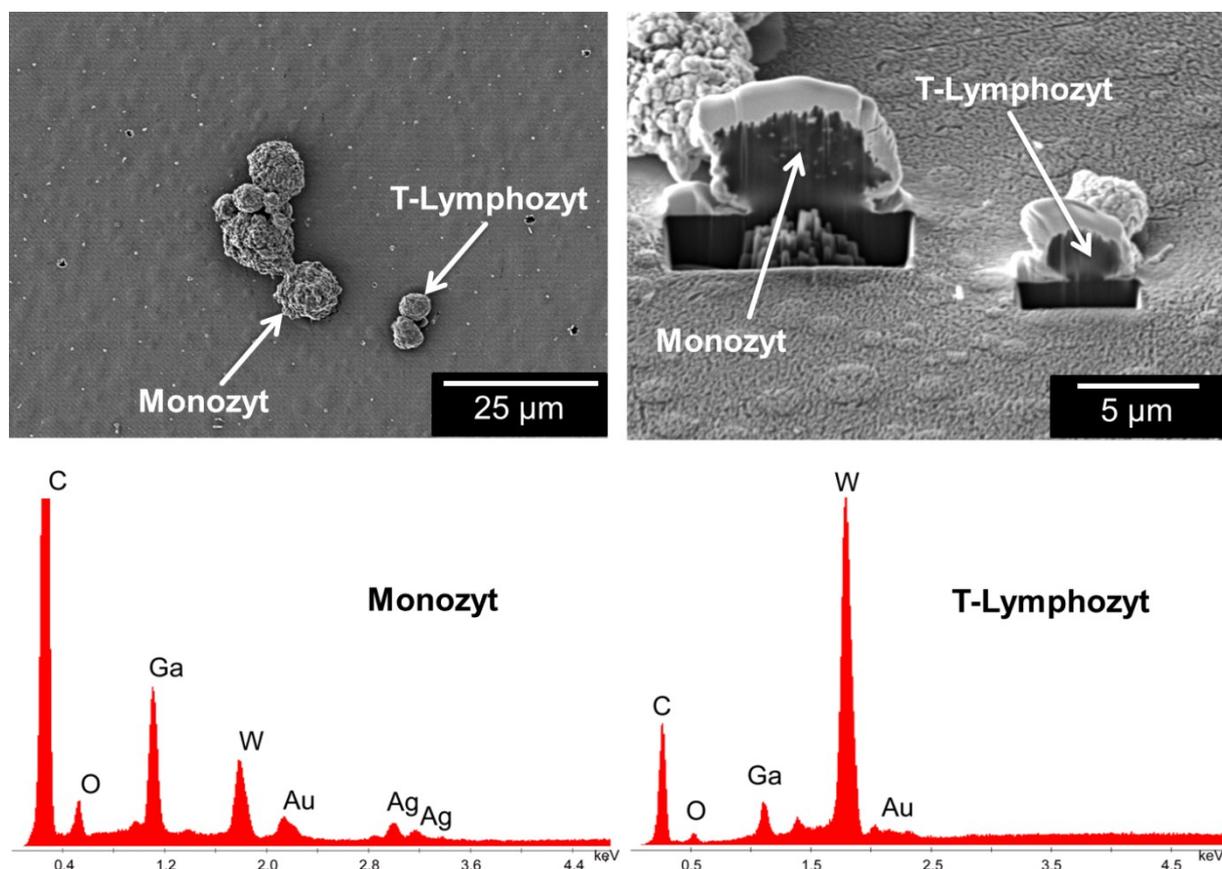


**Abbildung 156:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer unbehandelten und einer mit Silber-Nanopartikeln inkubierten ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und anschließend mittels FIB-Technik durchgeschnittenen hMSC und EDX-Spektren der markierten Stellen der Schnittflächen.<sup>[234]</sup>

Die obere rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Schnittfläche einer Zelle, die nicht mit Nanopartikeln inkubiert wurde. Das daneben gezeigte EDX-Spektrum zeigt die Anwesenheit der Elemente in dem markierten Bereich der Schnittfläche. Es sind Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel und Chlor als natürliche Zellbestandteile nachweisbar. Zusätzlich ist ein Signal für Gallium vorhanden, das von während des Schneidevorgangs inkorporiertem Gallium aus dem Gallium-Ionenstrahl stammt. Es ist kein Silber nachweisbar. Die untere rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Schnittfläche einer Zelle, die für 24 h mit Nanopartikeln entsprechend einer Silberkonzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  inkubiert wurde. Das entsprechende EDX-Spektrum der markierten Stelle der

Schnittfläche zeigt zusätzlich zu den bereits bei der anderen Zelle genannten Signalen ein deutliches Signal für Silber, das von den aufgenommenen Silber-Nanopartikeln herrührt. Damit ist die Anwesenheit von Silber innerhalb der humanen mesenchymalen Stammzellen und damit auch die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen nachgewiesen.

Entsprechend wurde auch die Aufnahme der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel in periphere mononukleäre Blutzellen untersucht. Abbildung 157 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Monozyten und T-Lymphozyten vor und nach der Behandlung mittels FIB-Technik. Die Zellen wurden für 24 h mit Nanopartikeln entsprechend einer Silber-Konzentration von  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  inkubiert.

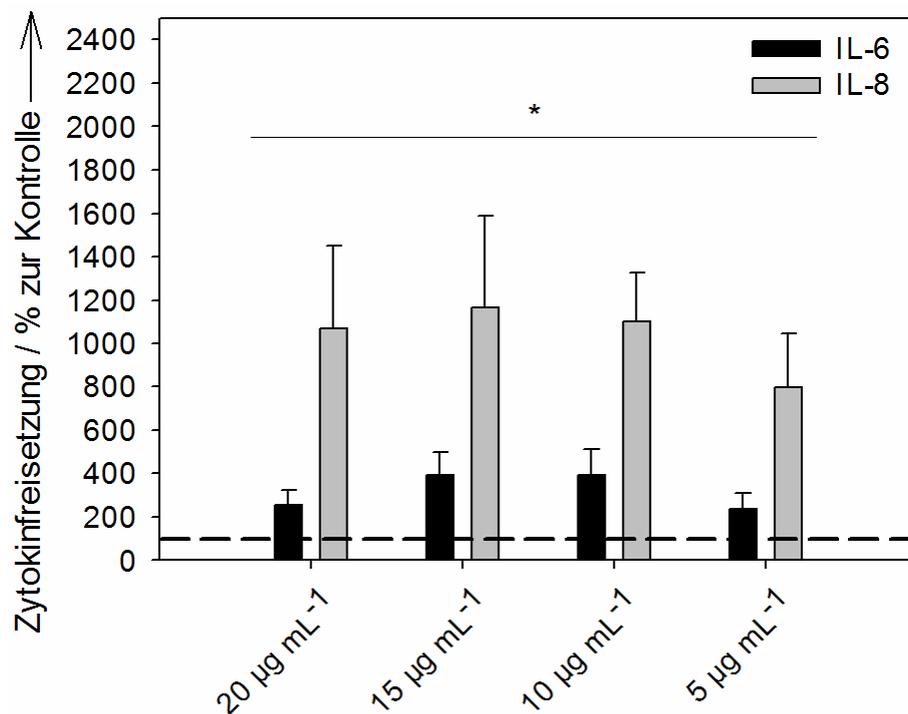


**Abbildung 157:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von mit Silber-Nanopartikeln inkubierten ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) Monozyten und T-Lymphozyten vor und nach einer Durchtrennung mittels FIB-Technik und EDX-Spektren der markierten Schnittflächen.<sup>[235]</sup>

Die EDX-Spektren der im rechten REM-Bild mittels der weißen Pfeile markierten Schnittflächen zeigen die Anwesenheit von Silber nur in den Monozyten. Die T-Zellen nehmen bei der angewendeten Silberkonzentration keine Nanopartikel in erkennbarem Maßstab auf.

### 5.7.2.3 Einfluss auf die Cytokin-Freisetzung von PBMC

Um die Zellaktivierung der PBMC durch die Silber-Nanopartikel zu untersuchen, wurde die Veränderung der Freisetzung von Interleukin-6 und Interleukin-8 aus den Zellen nach der Inkubation mit Nanopartikeln gemessen. Dazu wurde die gesamte PBMC-Fraktion, also Monozyten und T-Lymphozyten, mit den mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln in Konzentrationen von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  bis  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-6 und IL-8 im Überstand der Zellkulturmedien mittels ELISA gemessen. Das Ergebnis dieser Messungen in Abbildung 158 wiedergegeben.



**Abbildung 158:** Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel auf die Freisetzung von Interleukin-6 und Interleukin-8 bei PBMC. \* Signifikant im Vergleich zur Kontrolle (\*  $p < 0,05$ ).<sup>[235]</sup>

Bei allen verwendeten Silber-Konzentrationen wurde eine signifikante Erhöhung der Bildung von IL-6 und IL-8 festgestellt. Dies beweist eine starke Aktivierung der Zellen durch die Anwesenheit der Nanopartikel bereits bei geringen Silber-Konzentrationen.

### **5.7.3 Zusammenfassung der zellbiologischen Aktivität von Silber-Nanopartikeln**

Es wurde der Einfluss der 20 nm großen, mit Citrat und Gerbsäure reduzierten Nanopartikel, die mit PVP oder TPPTS funktionalisierten waren, auf humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) untersucht. Die Nanopartikel zeigen unabhängig von ihrer Funktionalisierung einen zelltoxischen Effekt. Während dieser bei einer 24-stündigen Inkubation auch bei höheren Konzentrationen moderat ausfällt, geht die Zellviabilität bei einer Inkubation über sieben Tage schon bei geringen Silberkonzentrationen stark zurück. Die Partikel zeigen also bei einer länger dauernden Inkubation einen starken toxischen Effekt auf die Stammzellen auf. Die Nanopartikel waren bis zur Anwendung im Zellkulturexperiment in sauerstofffreiem Wasser unter Schutzgas-Atmosphäre dispergiert. Die mit längerer Inkubationsdauer steigende Toxizität lässt sich dadurch erklären, dass die Nanopartikel sich nach dem Zutritt von Sauerstoff während der Zellkultur langsam auflösen und Silberionen freisetzen. Diese sind vermutlich die eigentlich toxische Spezies.

Auch die Untersuchung der Toxizität der 70 nm großen, mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel auf die hMSC legt diesen Schluss nahe. Bei diesen Experimenten wurden die Nanopartikel vor den Zellkulturexperimenten in lufthaltigem Wasser dispergiert gelagert. Die frisch synthetisierten Nanopartikel zeigten nur eine geringe Toxizität. Der toxische Effekt stieg jedoch mit dem Alter der Nanopartikel an. Sechs Monate alte Partikel waren sehr viel toxischer als die Partikel nach der Synthese und auch als einen Monat alte Partikel. Es konnte auch ein Unterschied in der Wirkung auf die Zellviabilität nachgewiesen werden, wenn die Partikel entweder in lufthaltigem Wasser oder in sauerstofffreiem Wasser dispergiert gelagert wurden. Die unter Inertbedingungen gelagerten Partikel zeigten nach einem Monat eine signifikant geringere Zelltoxizität. All diese Effekte lassen sich mit der durch Sauerstoff induzierten Oxidation und Auflösung der Nanopartikel in einen Zusammenhang bringen. Die Freisetzung der Silber-Ionen scheint die eigentliche Ursache der Toxizität von Silber-Nanopartikeln auf Zellen zu sein. Dies steht in Einklang mit der bereits in Kapitel 5.2.8 diskutierten Literatur, wo unter anderem von

*Liu et al.*,<sup>[201, 236]</sup> *Kittler et al.*<sup>[144]</sup> und *Ho et al.*<sup>[203]</sup> über die Freisetzung von Ionen aus Silber-Nanopartikeln berichtet wurde. Ionisch vorliegendes Silber kann nach *Ahamed et al.* innerhalb von Zellen beispielsweise mit Nucleinsäuren interagieren und sie so schädigen.<sup>[237]</sup> Auch die Interaktion mit Bestandteilen der Zellwände und mit Thiolgruppen von Enzymen ist möglich, wie beispielsweise *Slawson et al.*,<sup>[238]</sup> *Morones et al.*<sup>[239]</sup> und *Ruparella et al.*<sup>[240]</sup> berichteten. Zusätzlich scheint die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) durch Silber-Nanopartikel einen wesentlichen Anteil an ihrer Zelltoxizität zu haben.<sup>[235]</sup>

Alle untersuchten Silber-Nanopartikel verändern die Freisetzung von Interleukin-6 und Interleukin-8. Dies wurde anhand der mit Citrat und Gerbsäure reduzierten, PVP- bzw. TPPTS-funktionalisierten Silber-Nanopartikel bei hMSC und anhand der mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel bei PBMC nachgewiesen. Dies kann als Zeichen dafür gesehen werden, dass die Zellen durch die Nanopartikel aktiviert wurden, also Stress ausgesetzt wurden. Ähnliche Beobachtungen im Zusammenhang mit der Regulierung der genannten Interleukine haben *Hsin et al.* mit größeren Silber-Nanopartikeln an Maus-Fibroblasten<sup>[241]</sup> und *Yen et al.* an Makrophagen gemacht.<sup>[172]</sup> Es wird davon ausgegangen, dass Silberionen die erhöhte Freisetzung von IL-8 vermitteln.<sup>[242]</sup>

Es wurde mittels FIB-Technik gezeigt, dass sowohl hMSC als auch Monozyten Silber-Nanopartikel aufnehmen, die dann als Agglomerate innerhalb der Zellen nachzuweisen sind. Die Natur dieser intrazellulären Agglomeration ist nicht bekannt,<sup>[234]</sup> aber es ist wahrscheinlich, dass nach *Dausend et al.*<sup>[243]</sup> und *Harush-Frenkel et al.*<sup>[244]</sup> die Einkapselung in Vesikel eine Rolle spielt. Die Aufnahme von Platin-Nanopartikeln in Dickdarmkarzinom-Zellen wurde mit der gleichen Methode bereits von *Pelka et al.* erfolgreich gezeigt.<sup>[245]</sup> Die Kombination der FIB-Technik mit der Rasterelektronenmikroskopie ist wegen des geringen mechanischen Stresses also gut geeignet, um die Aufnahme von metallische Nanopartikeln in Zellen nachzuweisen.<sup>[246]</sup>

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, Silber-Nanopartikel hinsichtlich ihres Verhaltens in einem biologischen Umfeld zu untersuchen. Dazu wurden zunächst mit verschiedenen nasschemischen Methoden Nanopartikel synthetisiert. Diese Partikel wiesen unterschiedliche Größen und Funktionalisierungen auf. Es wurden 70 nm große Partikel durch Reduktion mit Glucose dargestellt, die mit dem Polymer PVP funktionalisiert waren. Durch Reduktion mit Natriumcitrat konnten 45 nm große Partikel erhalten werden, die elektrostatisch stabilisiert waren. Durch die Zugabe von Gerbsäure konnte die Partikelgröße deutlich auf 20 nm verringert werden. Diese Nanopartikel konnten mit PVP oder dem Phosphin-Liganden TPPTS funktionalisiert werden und zeigten, ebenso wie die mit Glucose reduzierten Partikel, eine hohe kolloidale Stabilität. Die Nanopartikel wurden jeweils eingehend mit zahlreichen kolloidchemischen und weiteren Methoden charakterisiert. Dabei zeigten sich die Stärken, aber auch die Grenzen einzelner Methoden wie der Dynamischen Lichtstreuung und der analytischen Scheibenzentrifugation.

Es konnte gezeigt werden, dass Silber-Nanopartikel in verschiedenen Medien Ionen freisetzen, sich also auflösen. Dabei wurde gelöster Sauerstoff als die wahrscheinliche Ursache für die Oxidation des metallischen Silbers identifiziert: In sauerstofffreiem Wasser lösten sich die Partikel nahezu nicht auf. Der Zusatz diverser Stoffe förderte ( $H_2O_2$ ) oder inhibierte (Cystein, NaCl) die Auflösung der Nanopartikel. Auch anhand makroskopischen Silbers konnte gezeigt werden, dass die chemische Umgebung die Freisetzung von Silberionen aus dem metallischen Silber beeinflusst: Eine Funktionalisierung mit Cystein verminderte die Ionenfreisetzung signifikant.

Die mit Glucose reduzierten, PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel und die mit Citrat und Gerbsäure reduzierten und mit PVP oder TPPTS umfunktionalisierten Nanopartikel wiesen auch in biologischen Zellkulturmedien eine hohe kolloidale Stabilität auf. Sie waren zum Teil über drei Tage in dem stark salzhaltigen, mit FCS versetzten Medium stabil, ohne nennenswerte Agglomeration zu zeigen. Dies ist insbesondere relevant, wenn die Partikel für zellbiologische Untersuchungen verwendet werden sollen. Bei diesen Experimenten wurde eine merkliche Anhebung des hydrodynamischen Durchmessers der dispergierten Partikel festgestellt. Da vermutet wurde, dass dies auf die Bildung einer Protein-Corona um die Partikel zurückzuführen ist, wurde die Adsorption von BSA untersucht. Dabei konnte

ebenfalls eine Zunahme des Partikeldurchmessers in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration beobachtet werden. BSA bildete eine konzentrationsabhängige Multilage um die Nanopartikel herum aus.

Die zellbiologische Untersuchung der Wirkung der synthetisierten Silber-Nanopartikel zeigte, dass sie toxisch auf humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wirken. Diese toxische Wirkung ließ sich mit der Auflösung der Nanopartikel korrelieren. Je älter die Nanopartikel waren, je länger sie also in wässriger Dispersion gelagert wurden und Ionen freisetzen konnten, desto toxischer waren sie. Die Lagerung unter inerten Bedingungen verringerte die Toxizität der Nanopartikel im Vergleich zur Lagerung in lufthaltigem Wasser. Es wurde mittels der FIB-Technik nachgewiesen, dass Silber-Nanopartikel sowohl von hMSC, als auch von Monozyten aufgenommen werden. Die Nanopartikel aktivieren die Zellen, was durch die Messung der veränderten Freisetzung von Interleukin-6 und Interleukin-8 gezeigt wurde.

Da sich die Nanopartikel während der Lagerung in wässriger Dispersion dadurch verändern, dass sie sich langsam auflösen und zusätzlich kolloidal altern, wurde versucht, die Partikel mittels Tiefkühlung und Lyophilisation zu konservieren. Dies ist durch den Zusatz des Kryoprotektors Trehalose sehr gut möglich, ohne dass die Partikel nach dem Auftauen bzw. Redispergieren ihre Monodispersität verlieren.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Z. Su, W. Zhou, Y. Zhang, *Chemical Communications* **2011**, 47, 4700.
- [2] D. v. Kerksenbrock-Krosigk, *Rubinglas des ausgehenden 17. und des 18. Jahrhunderts*, Verlag Philipp von Zabern, Mainz, **2001**.
- [3] J. Z. Zhang, C. Noguez, *Plasmonics* **2008**, 3, 127.
- [4] E. Roduner, *Nanoscopic Materials: Size-Dependent Phenomena*, RCS Publishing, Cambridge, **2006**.
- [5] P. P. Edwards, J. M. Thomas, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, 5480.
- [6] M. Faraday, *Philosophical Transactions of the Royal Society* **1857**, 147, 145.
- [7] W. Umbach, *Kosmetik – Entwicklung, Herstellung und Anwendung kosmetischer Mittel*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [8] H. C. v. d. Hulst, *Light Scattering by Small Particles*, Dover Publications, New York, **1981**.
- [9] S. Uhrlandt, A. Blume, *Kautschuk Gummi Kunststoffe* **2001**, 54, 520.
- [10] A. R. Horrocks, B. K. Kandola, P. J. Davies, S. Zhang, S. A. Padbury, *Polymer Degradation and Stability* **2005**, 88, 3.
- [11] M. Zammarano, M. Franceschi, S. v. Bellayer, J. W. Gilman, S. Meriani, *Polymer* **2005**, 46, 9314.
- [12] M. Scheffler, P. Colombo, *Cellular Ceramics: Structure, Manufacturing, Properties and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [13] A. V. Akimov, A. Mukherjee, C. L. Yu, D. E. Chang, A. S. Zibrov, P. R. Hemmer, H. Park, M. D. Lukin, *Nature* **2007**, 450, 402.
- [14] Z. Li, T. Shegai, G. Haran, H. Xu, *ACS Nano* **2009**, 3, 637.
- [15] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chemical Reviews* **2003**, 104, 293.
- [16] J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, R. P. Van Duyne, *Nat Mater* **2008**, 7, 442.
- [17] H. D. Hill, R. A. Vega, C. A. Mirkin, *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 9218.
- [18] N. L. Rosi, D. A. Giljohann, C. S. Thaxton, A. K. R. Lytton-Jean, M. S. Han, C. A. Mirkin, *Science* **2006**, 312, 1027.
- [19] A. Bachtold, P. Hadley, T. Nakanishi, C. Dekker, *Science* **2001**, 294, 1317.
- [20] K. W. C. Lai, X. Ning, C. K. M. Fung, Z. Jiangbo, C. Hongzhi, L. Yilun, U. C. Wejinya, *The International Journal of Robotics Research* **2009**, 28, 523.

- [21] Y. Huang, X. Duan, Y. Cui, L. J. Lauhon, K.-H. Kim, C. M. Lieber, *Science* **2001**, *294*, 1313.
- [22] K. Wolff, U. Hilleringmann, *Solid-State Electronics*, *62*, 110.
- [23] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angewandte Chemie*, *122*, 1402.
- [24] M. Grätzel, *Progress in Photovoltaics: Research and Applications* **2006**, *14*, 429.
- [25] H. J. Snaith, L. Schmidt-Mende, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 3187.
- [26] M. Grätzel, J. R. Durrant, *Series on Photoconversion of Solar Energy* **2008**, *3*, 503.
- [27] D. Timmerman, I. Izeddin, P. Stallinga, I. N. Yassievich, T. Gregorkiewicz, *Nature Photonics* **2008**, *2*, 105.
- [28] C.-Y. Liu, Z. C. Holman, U. R. Kortshagen, *Nano Letters* **2008**, *9*, 449.
- [29] M. Nanu, J. Schoonman, A. Goossens, *Advanced Materials* **2004**, *16*, 453.
- [30] I. n. Robel, V. Subramanian, M. Kuno, P. V. Kamat, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2385.
- [31] C. Lévy-Clément, R. Tena-Zaera, M. A. Ryan, A. Katty, G. Hodes, *Advanced Materials* **2005**, *17*, 1512.
- [32] A. Elder, H. Yang, R. Gwiazda, X. Teng, S. Thurston, H. He, G. Oberdörster, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 3124.
- [33] R. J. Griffitt, J. Luo, J. Gao, J.-C. Bonzongo, D. S. Barber, *Environmental Toxicology and Chemistry* **2008**, *27*, 1972.
- [34] M. Lindiger, in *Frankfurter Allgemeine Zeitung*, Verlagsgruppe Frankfurter Allgemeine Zeitung GmbH, Frankfurt am Main, **2005**, 239, 42.
- [35] R. J. Griffitt, K. Hyndman, N. D. Denslow, D. S. Barber, *Toxicological Sciences* **2009**, *107*, 404.
- [36] S. Hansen, E. Michelson, A. Kamper, P. Borling, F. Stuer-Lauridsen, A. Baun, *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 438.
- [37] S. L. Luoma, WoodrowWilson International Center for Scholars and The Pew Charitable Trusts, Washington, DC, **2008**.
- [38] X. Chen, H. J. Schluesener, *Toxicology Letters* **2008**, *176*, 1.
- [39] D. Roe, B. Karandikar, N. Bonn-Savage, B. Gibbins, J. B. Roullet, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2008**, *61*, 869.

- [40] M. S. Cohen, J. M. Stern, A. J. Vanni, R. S. Kelley, E. Baumgart, D. Field, J. A. Libertino, I. C. Summerhayes, *Surgical Infections: Selective Antibiotic Therapy* **2007**, *8*, 397.
- [41] D. Williams, J. Bridges, W. D. Jong, T. Jung, K. Rydzynski, *Vol. 002*, Wissenschaftlicher Ausschuss "Neu auftretende und neu identifizierte Gesundheitsrisiken" (SCENIHR) der Europäischen Kommission, Brüssel, **2005**.
- [42] H. D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer, Berlin, **2002**.
- [43] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [44] G. Jander, *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, S. Hirzel Verlag, Stuttgart **1995**.
- [45] C. H. Hamann, W. Vielstich, *Elektrochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [46] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [47] G. Schmid, *Chemical Reviews* **1992**, *92*, 1709.
- [48] F. Mafune, J.-y. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, H. Sawabe, *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 5114.
- [49] S. Barcikowski, A. Hahn, A. V. Kabashin, B. N. Chichkov, *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **2007**, *87*, 47.
- [50] J. Ding, W. F. Miao, P. G. McCormick, R. Street, *Applied Physics Letters* **1995**, *67*, 3804.
- [51] D. W. Zhang, C. H. Chen, J. Zhang, F. Ren, *Chemistry of Materials* **2005**, *17*, 5242.
- [52] A. Gutsch, H. Mühlenweg, M. Krämer, *Small* **2005**, *1*, 30.
- [53] S. E. Pratsinis, S. Vemury, *Powder Technology* **1996**, *88*, 267.
- [54] S. Panigrahi, S. Kundu, S. K. Ghosh, S. Nath, T. Pal, *Journal of Nanoparticle Research* **2004**, *6*, 411.
- [55] H. Hiramatsu, F. E. Osterloh, *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 2509.
- [56] S. Panigrahi, S. Praharaj, S. Basu, S. K. Ghosh, S. Jana, S. Pande, T. Vo-Dinh, H. Jiang, T. Pal, *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 13436.
- [57] C. Ducamp-Sanguesa, R. Herrera-Urbina, M. Figlarz, *Journal of Solid State Chemistry* **1992**, *100*, 272.

- [58] A. Jitianu, M. S. Kim, D. Andreescu, D. V. Goia, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, *9*, 1891.
- [59] J. Q. Hu, Q. Chen, Z. X. Xie, G. B. Han, R. H. Wang, B. Ren, Y. Zhang, Z. L. Yang, Z. Q. Tian, *Advanced Functional Materials* **2004**, *14*, 183.
- [60] X. Gu, C. Nie, Y. Lai, C. Lin, *Materials Chemistry and Physics* **2006**, *96*, 217.
- [61] B. Pietrobon, M. McEachran, V. Kitaev, *ACS Nano* **2008**, *3*, 21.
- [62] M. Tsuji, K. Matsumoto, N. Miyamae, T. Tsuji, X. Zhang, *Crystal Growth & Design* **2006**, *7*, 311.
- [63] R. J. Chimentao, I. Kirm, F. Medina, X. Rodriguez, Y. Cesteros, P. Salagre, J. E. Sueiras, *Chemical Communications* **2004**, 846.
- [64] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *Chemical Communications* **2001**, 617.
- [65] B. Wiley, Y. Sun, Y. Xia, *Accounts of Chemical Research* **2007**, *40*, 1067.
- [66] Y. Sun, B. Gates, B. Mayers, Y. Xia, *Nano Letters* **2002**, *2*, 165.
- [67] Y. Sun, Y. Xia, *Science* **2002**, *298*, 2176.
- [68] S. H. Im, Y. T. Lee, B. Wiley, Y. Xia, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 2154.
- [69] D. Yu, V. W.-W. Yam, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 13200.
- [70] B. Wiley, T. Herricks, Y. Sun, Y. Xia, *Nano Letters* **2004**, *4*, 1733.
- [71] J. Zhang, S. Li, J. Wu, G. C. Schatz, C. A. Mirkin, *Angewandte Chemie* **2009**, *121*, 7927.
- [72] J. Zhang, M. R. Langille, C. A. Mirkin, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 12502.
- [73] P. K. Khanna, N. Singh, D. Kulkarni, S. Deshmukh, S. Charan, P. V. Adhyapak, *Materials Letters* **2007**, *61*, 3366.
- [74] K. K. Caswell, C. M. Bender, C. J. Murphy, *Nano Letters* **2003**, *3*, 667.
- [75] G. Zhou, M. Lü, Z. Yang, H. Zhang, Y. Zhou, S. Wang, S. Wang, A. Zhang, *Journal of Crystal Growth* **2006**, *289*, 255.
- [76] D. Li, B. Hong, W. Fang, Y. Guo, R. Lin, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2010**, *49*, 1697.
- [77] Y. Sun, B. Mayers, Y. Xia, *Nano Letters* **2003**, *3*, 675.
- [78] A. Callegari, D. Tonti, M. Chergui, *Nano Letters* **2003**, *3*, 1565.
- [79] N. Shirtcliffe, U. Nickel, S. Schneider, *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *211*, 122.

- [80] A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V. K. Sharma, T. Nevecna, R. Zboril, *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 16248.
- [81] P. Raveendran, J. Fu, S. L. Wallen, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13940.
- [82] D. Yu, V. W.-W. Yam, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 5497.
- [83] U. Nickel, A. zu Castell, K. Pöpl, S. Schneider, *Langmuir* **2000**, *16*, 9087.
- [84] Y. Li, Y. Wu, B. S. Ong, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 3266.
- [85] A. Tao, P. Sinsersuksakul, P. Yang, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 4597.
- [86] B. Wiley, Y. Sun, B. Mayers, Y. Xia, *Chemistry – A European Journal* **2005**, *11*, 454.
- [87] S. Ayyappan, R. Srinivasa Gopalan, G. N. Subbanna, C. N. R. Rao, *Journal of Materials Research* **1997**, *12*, 398.
- [88] K. Dongjo, J. Sunho, M. Jooho, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 4019.
- [89] C. Chang, W. Li, J. Guohua, Z. Junfeng, C. Xu, Y. Haojie, Y. Qiang, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3933.
- [90] B. Wiley, Y. Sun, Y. Xia, *Langmuir* **2005**, *21*, 8077.
- [91] Z. S. Pillai, P. V. Kamat, *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *108*, 945.
- [92] S. Chen, Z. Fan, D. L. Carroll, *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 10777.
- [93] K.-S. Chou, C.-Y. Ren, *Materials Chemistry and Physics* **2000**, *64*, 241.
- [94] H. S. Shin, H. J. Yang, S. B. Kim, M. S. Lee, *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *274*, 89.
- [95] D. Chen, L. Gao, *Journal of Crystal Growth* **2004**, *264*, 216.
- [96] G. Yan, J. Peng, S. Li, L. Lifeng, Y. Xiaoqin, Z. Zhenping, L. Dongfang, W. Jianxiong, Y. Huajun, Z. Zengxing, Z. Xiaowei, D. Xinyuan, Z. Weiya, W. Gang, X. Sishen, *Journal of Physics D: Applied Physics* **2005**, *38*, 1061.
- [97] H. J. Klasen, *Burns* **2000**, *26*, 117.
- [98] F. Furno, K. S. Morley, B. Wong, B. L. Sharp, P. L. Arnold, S. M. Howdle, R. Bayston, P. D. Brown, P. D. Winship, H. J. Reid, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2004**, *54*, 1019.

- [99] S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song, *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, 73, 1712.
- [100] H. Q. Yin, R. Langford, R. E. Burrell, *The Journal of burn care & rehabilitation* **1999**, 20, 195.
- [101] K. Dunn, V. Edwards-Jones, *Burns* **2004**, 30, 1.
- [102] K. C. Bhol, J. Alroy, P. J. Schechter, *Clinical and Experimental Dermatology* **2004**, 29, 282.
- [103] P. Jain, T. Pradeep, *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 90, 59.
- [104] T. M. Benn, P. Westerhoff, *Environmental Science & Technology* **2008**, 42, 4133.
- [105] N. Duran, P. D. Marcato, G. I. H. De Souza, O. L. Alves, E. Esposito, *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2007**, 3, 203.
- [106] I. Chopra, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**, 59, 587.
- [107] R. W.-Y. Sun, R. Chen, N. P. Y. Chung, C.-M. Ho, C.-L. S. Lin, C.-M. Che, *Chemical Communications* **2005**, 5059.
- [108] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C.-Y. Hwang, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, D. H. Jeong, M.-H. Cho, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2007**, 3, 95.
- [109] S. A. Blaser, M. Scherlinger, M. MacLeod, K. Hungerbühler, *Science of The Total Environment* **2008**, 390, 396.
- [110] L. J. Sherry, S.-H. Chang, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, B. J. Wiley, Y. Xia, *Nano Letters* **2005**, 5, 2034.
- [111] J. J. Mock, M. Barbic, D. R. Smith, D. A. Schultz, S. Schultz, *The Journal of Chemical Physics* **2002**, 116, 6755.
- [112] A. J. Haes, R. P. Van Duyne, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 10596.
- [113] W. Li, Y. Guo, P. Zhang, *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, 114, 6413.
- [114] D. J. Anderson, M. Moskovits, *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 13722.
- [115] G. P. Glaspell, C. Zuo, P. W. Jagodzinski, *Journal of Cluster Science* **2005**, 16, 39.
- [116] J. Hu, R. S. Sheng, Z. S. Xu, Y. e. Zeng, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1995**, 51, 1087.

- [117] P. Miskovsky, D. Jancura, S. Sanchez-Cortes, E. Kocisova, L. Chinsky, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 6374.
- [118] P. Miskovsky, J. Hritz, S. Sanchez-Cortes, G. Fabriciova, J. Ulicny, L. Chinsky, *Photochemistry and Photobiology* **2001**, *74*, 172.
- [119] T. Vo-Dinh, D. L. Stokes, G. D. Griffin, M. Volkan, U. J. Kim, M. I. Simon, *Journal of Raman Spectroscopy* **1999**, *30*, 785.
- [120] K. Aslan, P. Holley, C. D. Geddes, *Journal of Materials Chemistry* **2006**, *16*, 2846.
- [121] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *16*, 55.
- [122] P. J. Goodhew, F. J. Humphreys, *Elektronenmikroskopie: Grundlagen und Anwendung*, McGraw-Hill, Maidenhead, **1994**.
- [123] S. L. Flegler, J. W. Heckman, K. L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie. Grundlagen, Methoden, Anwendungen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**.
- [124] L. Reimer, G. Pfefferkorn, *Raster-Elektronenmikroskopie*, Springer-Verlag, Berlin, **1977**.
- [125] G. L. Hornyak, S. Peschel, T. Sawitowski, G. Schmid, *Micron* **1998**, *29*, 183.
- [126] J.-O. Malm, J.-O. Bovin, A. Petford-Long, D. J. Smith, G. Schmid, N. Klein, *Angewandte Chemie* **1988**, *100*, 580.
- [127] R. Gruehn, W. Mertin, *Angewandte Chemie* **1980**, *92*, 531.
- [128] J. Demeester, S. Smedt, N. Sanders, J. Haustraete, in *Methods for structural analysis of protein pharmaceuticals* (Eds.: W. Jiskoot, D. J. Crommelin), American Association of Pharmaceutical Scientists, Arlington, **2005**.
- [129] *Zetasizer Nano Series, Benutzerhandbuch*, Malvern Instruments, **2004**.
- [130] *Introduction to Differential Sedimentation*, CPS Instruments Europe, **2011**.
- [131] R. F. Domingos, M. A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M. M. Reid, N. Tufenkji, J. R. Lead, G. G. Leppard, K. J. Wilkinson, *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, 7277.
- [132] B. Carr, P. Hole, A. Malloy, P. Nelson, M. Wright, J. Smith, *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences* **2009**, *14*, 45.
- [133] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, *Pharmaceutical Research* **2010**, *27*, 796.
- [134] H. P. Latscha, H. A. Klein, *Analytische Chemie*, Springer-Verlag, Heidelberg, **1990**.

- [135] G. Adams, in *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Vol. 368, 2nd ed. (Eds.: J. G. Day, G. N. Stacey), Humana Press, Totowa, **2007**, pp. 15.
- [136] P. Matejtschuk, in *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Vol. 368, 2nd ed. (Eds.: J. G. Day, G. N. Stacey), Humana Press, Totowa, **2007**, pp. 59.
- [137] H. Wang, X. Qiao, J. Chen, S. Ding, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, 256, 111.
- [138] S. Kittler, C. Greulich, J. S. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Zellner, M. Koller, M. Epple, *Journal of Materials Chemistry* **2010**, 20, 512.
- [139] H. Wang, X. Qiao, J. Chen, X. Wang, S. Ding, *Materials Chemistry and Physics* **2005**, 94, 449.
- [140] P. C. Lee, D. Meisel, *The Journal of Physical Chemistry* **1982**, 86, 3391.
- [141] D. W. Wyrwa, Dissertation, Universität Duisburg-Essen (Essen), **2006**.
- [142] D. Kim, S. Jeong, J. Moon, *Nanotechnology* **2006**, 17, 4019.
- [143] S. Kittler, Dissertation, (Essen), **2009**.
- [144] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Epple, *Chemistry of Materials* **2010**, 22, 4548.
- [145] G. Sauthier, A. Pérez del Pino, A. Figueras, E. György, *Journal of the American Ceramic Society*, 94, 3780.
- [146] Y. Lu, Y. Mei, M. Schrunner, M. Ballauff, M. W. Möller, J. Breu, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, 7676.
- [147] J. Spreadborough, J. W. Christian, *Journal of Scientific Instruments* **1959**, 36, 116.
- [148] P. Scherrer, *Nachrichten von der königlichen Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen* **1918**, 98.
- [149] R. McGehee, *Journal of Applied Crystallography* **1972**, 5, 365.
- [150] H. Jagodzinski, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1975**, 79, 553.
- [151] V. Knecht, H. J. Risselada, A. E. Mark, S. J. Marrink, *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 318, 477.
- [152] H. H. Huang, X. P. Ni, G. L. Loy, C. H. Chew, K. L. Tan, F. C. Loh, J. F. Deng, G. Q. Xu, *Langmuir* **1996**, 12, 909.
- [153] S. He, J. Yao, P. Jiang, D. Shi, H. Zhang, S. Xie, S. Pang, H. Gao, *Langmuir* **2001**, 17, 1571.

- [154] A. Henglein, *Chemistry of Materials* **1998**, *10*, 444.
- [155] A. Rostek, D. Mahl, M. Epple, *Journal of Nanoparticle Research*, *13*, 4809.
- [156] E. Bulut, M. Özacar, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, *48*, 5686.
- [157] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *231*, 98.
- [158] S. Gunckel, P. Santander, G. Cordano, J. Ferreira, S. Munoz, L. J. Nunez-Vergara, J. A. Squella, *Chemico-Biological Interactions* **1998**, *114*, 45.
- [159] H. Ortiz-Ibarra, N. Casillas, V. Soto, M. Barcena-Soto, R. Torres-Vitela, W. de la Cruz, S. Gomez-Salazar, *J Colloid Interface Sci* **2007**, *314*, 562.
- [160] M. Shaolin, *Synthetic Metals* **2003**, *139*, 287.
- [161] C. Zhao, J. Song, J. Zhang, *Talanta* **2003**, *59*, 19.
- [162] X. Tian, W. Wang, G. Cao, *Materials Letters* **2007**, *61*, 130.
- [163] M. Ji, X. Chen, C. M. Wai, J. L. Fulton, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 2631.
- [164] S. P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, *Biotechnology Progress* **2006**, *22*, 577.
- [165] B. Yin, H. Ma, S. Wang, S. Chen, *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 8898.
- [166] V. Sokolova, M. Epple, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 1382.
- [167] S.-J. Choi, J.-M. Oh, J.-H. Choy, *Journal of Materials Chemistry* **2008**, *18*, 615.
- [168] D. W. Grainger, D. G. Castner, *Advanced Materials* **2008**, *20*, 867.
- [169] Y.-w. Jun, J.-w. Seo, J. Cheon, *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 179.
- [170] M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche, G. Schmid, *Small* **2005**, *1*, 841.
- [171] M. Motskin, D. M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T. G. Gard, A. E. Porter, J. N. Skepper, *Biomaterials* **2009**, *30*, 3307.
- [172] H.-J. Yen, S.-h. Hsu, C.-L. Tsai, *Small* **2009**, *5*, 1553.
- [173] M. Semmler-Behnke, W. G. Kreyling, J. Lipka, S. Fertsch, A. Wenk, S. Takenaka, G. Schmid, W. Brandau, *Small* **2008**, *4*, 2108.
- [174] Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jahnen-Dechent, *Small* **2007**, *3*, 1941.

- [175] G. D. M. H. Mulholland, CR; Kukuck, SR; Hackley, VA, *Journal of Research of the National Institute for Standards and Technology* **2006**, 111, 257.
- [176] Y. Wang, A. Neyman, E. Arkhangelsky, V. Gitis, L. Meshi, I. A. Weinstock, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 17412.
- [177] A. Neyman, L. Meshi, L. Zeiri, I. A. Weinstock, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 16480.
- [178] Y. Dieckmann, H. Cölfen, H. Hofmann, A. Petri-Fink, *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 3889.
- [179] K. L. Planken, H. Cölfen, *Nanoscale* **2010**, 2, 1849.
- [180] D. Gebauer, A. Völkel, H. Cölfen, *Science* **2008**, 322, 1819.
- [181] R. Bienert, F. Emmerling, A. Thünemann, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 395, 1651.
- [182] H. Endo, D. Schwahn, H. Cölfen, *The Journal of Chemical Physics* **2004**, 120, 9410.
- [183] A. Heiss, W. Jahnen-Dechent, H. Endo, D. Schwahn, *Biointerphases* **2007**, 2, 16.
- [184] F. Scheffold, A. Shalkevich, R. Vavrin, J. Crassous, P. Schurtenberger, in *Particle Sizing and Characterization, Vol. 881*, American Chemical Society, **2004**, pp. 3.
- [185] M. Shibayama, T. Karino, S. Okabe, *Polymer* **2006**, 47, 6446.
- [186] A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, J. Kreuter, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 57, 369.
- [187] K. L. Planken, B. W. M. Kuipers, A. P. Philipse, *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 8871.
- [188] R. Landsiedel, L. Ma-Hock, A. Kroll, D. Hahn, J. Schnekenburger, K. Wiench, W. Wohlleben, *Advanced Materials* **2010**, 22, 2601.
- [189] S. M. Hussain, L. K. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, R. C. Murdock, K. O. Yu, D. M. Mattie, J. J. Schlager, M. Terrones, *Advanced Materials* **2009**, 21, 1549.
- [190] H. Lange, *Particle & Particle Systems Characterization* **1995**, 12, 148.
- [191] P. Bowen, *Journal of Dispersion Science and Technology* **2002**, 23, 631.
- [192] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* **2005**, 1, 325.
- [193] T. S. Hauck, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Small* **2008**, 4, 153.

- [194] M. Chanana, A. Gliozzi, A. Diaspro, I. Chodnevskaja, S. Huewel, V. Moskalenko, K. Ulrichs, H.-J. Galla, S. Krol, *Nano Letters* **2005**, *5*, 2605.
- [195] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Epple, *Chemistry of Materials* **2010**, *22*, 4548.
- [196] R. D. Glover, J. M. Miller, J. E. Hutchison, *ACS Nano* **2011**, *5*, 8950.
- [197] J. L. Elechiguerra, L. Larios-Lopez, C. Liu, D. Garcia-Gutierrez, A. Camacho-Bragado, M. J. Yacaman, *Chemistry of Materials* **2005**, *17*, 6042.
- [198] C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, P. Tam, J.-F. Chiu, C.-M. Che, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, *12*, 527.
- [199] H. Scherz, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **1979**, *168*, 91.
- [200] C. Jacob, G. I. Giles, N. M. Giles, H. Sies, *Angewandte Chemie* **2003**, *115*, 4890.
- [201] J. Liu, R. H. Hurt, *Environmental Science & Technology* **2010**, *44*, 2169.
- [202] W. Zhang, Y. Yao, N. Sullivan, Y. Chen, *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, 4422.
- [203] C.-M. Ho, C.-K. Wong, S. K.-W. Yau, C.-N. Lok, C.-M. Che, *Chemistry – An Asian Journal* **2001**, *6*, 2506.
- [204] C.-M. Ho, S. K.-W. Yau, C.-N. Lok, M.-H. So, C.-M. Che, *Chemistry – An Asian Journal* **2010**, *5*, 285.
- [205] W. Luo, W. Hu, S. Xiao, *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 2359.
- [206] B. Gilbert, F. Huang, H. Zhang, G. A. Waychunas, J. F. Banfield, *Science* **2004**, *305*, 651.
- [207] C. Marambio-Jones, E. Hoek, *Journal of Nanoparticle Research*, *12*, 1531.
- [208] S. Mandal, A. Gole, N. Lala, R. Gonnade, V. Ganvir, M. Sastry, *Langmuir* **2001**, *17*, 6262.
- [209] H. Zahn, E. Golsch, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1962**, *330*, 38.
- [210] C. Levard, B. C. Reinsch, F. M. Michel, C. Oumahi, G. V. Lowry, G. E. Brown, *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, 5260.
- [211] F. W. Küster, A. Thiel, A. Ruland, *Rechentafeln für die Chemische Analytik*, Walter de Gruyter, Berlin, **2002**.
- [212] C. Freitas, *Journal of Microencapsulation* **1999**, *16*, 59.

- [213] J. S. Gebauer, L. Treuel, *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 354, 546.
- [214] S. Siddhartha, B. Tanmay, R. Arnab, S. Gajendra, P. Ramachandrarao, D. Debabrata, *Nanotechnology* **2007**, 18, 225103.
- [215] P. D. Nallathamby, X.-H. N. Xu, *Nanoscale* **2010**, 2, 942.
- [216] H. J. Boxberger, *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [217] P. Bihari, M. Vippola, S. Schultes, M. Praetner, A. Khandoga, C. Reichel, C. Coester, T. Tuomi, M. Rehberg, F. Krombach, *Particle and Fibre Toxicology* **2008**, 5, 14.
- [218] I. Lynch, K. A. Dawson, *Nano Today* **2008**, 3, 40.
- [219] D. Mahl, C. Greulich, W. Meyer-Zaika, M. Köller, M. Epple, *Journal of Materials Chemistry* **2010**, 20, 6176.
- [220] R. C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, S. M. Hussain, *Toxicological Sciences* **2008**, 101, 239.
- [221] L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young, H. J. Tanke, *Biophysical Journal* **1995**, 68, 2588.
- [222] C. H. Suelter, M. DeLuca, *Analytical Biochemistry* **1983**, 135, 112.
- [223] X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **1992**, 358, 209.
- [224] M. L. Ferrer, R. Duchowicz, B. Carrasco, J. G. d. I. Torre, A. U. Acuña, *Biophysical Journal* **2001**, 80, 2422.
- [225] D. C. Carter, J. X. Ho, in *Advances in Protein Chemistry, Vol. 45*, Academic Press, **1994**, pp. 153.
- [226] C. Röcker, M. Pötzl, F. Zhang, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *Nature Nanotechnology* **2009**, 4, 577.
- [227] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, S. Franzen, *Langmuir* **2005**, 21, 9303.
- [228] K. Rezwan, A. R. Studart, J. Vörös, L. J. Gauckler, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, 14469.
- [229] K. Rezwan, L. P. Meier, M. Rezwan, J. Vörös, M. Textor, L. J. Gauckler, *Langmuir* **2004**, 20, 10055.
- [230] W. Xiu Ming, P. I. Terasaki, G. W. Rankin Jr, D. Chia, Z. Hui Ping, S. Hardy, *Human Immunology* **1993**, 37, 264.
- [231] S. A. Weston, C. R. Parish, *Journal of Immunological Methods* **1990**, 133, 87.

- [232] R. Lichtenfels, W. E. Biddison, H. Schulz, A. B. Vogt, R. Martin, *Journal of Immunological Methods* **1994**, *172*, 227.
- [233] H. Loppnow, *Der Internist* **2001**, *42*, 13.
- [234] C. Greulich, J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Epple, M. Köller, *Acta Biomaterialia* **2011**, *7*, 347.
- [235] C. Greulich, J. Diendorf, J. Geßmann, T. Simon, T. Habijan, G. Eggeler, T. A. Schildhauer, M. Epple, M. Köller, *Acta Biomaterialia* **2011**, *7*, 3505.
- [236] J. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani, R. H. Hurt, *ACS Nano* **2010**, *4*, 6903.
- [237] M. Ahamed, M. Karns, M. Goodson, J. Rowe, S. M. Hussain, J. J. Schlager, Y. Hong, *Toxicology and Applied Pharmacology* **2008**, *233*, 404.
- [238] R. M. Slawson, H. Lee, J. T. Trevors, *BioMetals* **1990**, *3*, 151.
- [239] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, M. J. Yacaman, *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346.
- [240] J. P. Ruparelia, A. K. Chatterjee, S. P. Duttagupta, S. Mukherji, *Acta Biomaterialia* **2008**, *4*, 707.
- [241] Y.-H. Hsin, C.-F. Chen, S. Huang, T.-S. Shih, P.-S. Lai, P. J. Chueh, *Toxicology Letters* **2008**, *179*, 130.
- [242] H. J. Johnston, G. Hutchison, F. M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, V. Stone, *Critical Reviews in Toxicology* **2010**, *40*, 328.
- [243] J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailänder, *Macromolecular Bioscience* **2008**, *8*, 1135.
- [244] O. Harush-Frenkel, N. Debotton, S. Benita, Y. Altschuler, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *353*, 26.
- [245] J. Pelka, H. Gehrke, M. Esselen, M. Tuğrk, M. Crone, S. Brañse, T. Muller, H. Blank, W. Send, V. Zibat, P. Brenner, R. Schneider, D. Gerthsen, D. Marko, *Chemical Research in Toxicology* **2009**, *22*, 649.
- [246] J. A. W. Heymann, D. Shi, S. Kim, D. Bliss, J. L. S. Milne, S. Subramaniam, *Journal of Structural Biology* **2009**, *166*, 1.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Ag-NP	Silber-Nanopartikel
BSA	Bovines Serumalbumin
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
DCS	Analytische Scheibenzentrifugation (engl. <i>differential centrifugal sedimentation</i> )
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. <i>dynamic light scattering</i> )
DLVO	Theorie von Derjagin, Landau, Verwey und Overbeek
EA	Elementaranalyse
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-BSA	Fluoresceinisothiocyanat-markiertes bovines Serumalbumin
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie (engl. <i>graphite furnace atomic absorption spectroscopy</i> )
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen (engl. <i>human mesenchymal stem cells</i> )
HR-TEM	Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (engl. <i>high resolution transmission electron microscopy</i> )
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IR	Infrarot
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
NP	Nanopartikel
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline solution</i> )
PDI	Polydispersitätsindex
PVC	Polyvinylchlorid

PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Zellnährmedium)
RT	Raumtemperatur (im Mittel ca. 296 K)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TPPTS	Tris(natrium- <i>m</i> -sulfonatophenyl)phosphan
UV/Vis	Ultraviolett / Visible
VE	Voll entsalzt

## 8.2 Publikationsliste

### Referierte Publikationen

E. M. Luther, M. M. Schmidt, J. Diendorf, M. Epple, R. Dringen, „Upregulation of metallothioneins after exposure of cultured primary astrocytes to silver nanoparticles“, *Neurochemical Research* **2012**. (im Druck)

E. M. Luther, J. Diendorf, M. Epple, R. Dringen, „Accumulation of silver nanoparticles by cultured primary brain astrocytes“, *Nanotechnology* **2011**, 22, 375101.

C. Greulich, J. Diendorf, J. Geßmann, T. Simon, T. Habijan, G. Eggeler, T.A. Schildhauer, M. Epple, M. Köller, „Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles“, *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, 3505.

D. Mahl, J. Diendorf, W. Meyer-Zaika, M. Epple, „Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles“, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, 377, 386.

C. Greulich, J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Epple, M. Köller, „Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells“, *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, 347.

S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Epple, „Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions“, *Chemistry of Materials* **2010**, 22, 4548.

S. Kittler, C. Greulich, J.S. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Zellner, M. Köller, M. Eppe, „The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles“, *Journal of Materials Chemistry* **2010**, 20, 512.

### **Sonstige Publikationen**

C. Greulich, J. Diendorf, T.A. Schildhauer, M. Eppe, M. Köller, „Influence of nano-silver on peripheral blood mononuclear cells: uptake and biological response“, *Biomaterialien* 12 (2011) 45.

J. Diendorf, D. Mahl, S. Ristig, C. Greulich, Z.-A. Li, M. Farle, M. Köller, M. Eppe, „Synthese von kleinen Silber-, Gold- und Silber-Gold(50:50)-Nanopartikeln in Wasser mittels Citrat-Reduktion in Anwesenheit von Gerbsäure: Charakterisierung und zellbiologische Aktivität“, *Biomaterialien* 12 (2011) 46.

C. Greulich, J. Diendorf, M. Eppe, M. Köller, „Uptake of silver nanoparticles by human mesenchymal stem cells: intracellular localization and exocytosis“, *Biomaterialien* 11 (2010) 155.

### **Poster und Vorträge**

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. 10.-12.11.2011, Gießen, Deutschland: J. Diendorf, D. Mahl, S. Ristig, C. Greulich, Z.-A. Li, M. Farle, M. Köller, M. Eppe, „Synthese von kleinen Silber-, Gold- und Silber-Gold(50:50)-Nanopartikeln in Wasser mittels Citrat-Reduktion in Anwesenheit von Gerbsäure: Charakterisierung und zellbiologische Aktivität“ (Vortrag)

International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles 11.-15.09.2011, Essen, Deutschland: J. Diendorf, M. Eppe, „Release of silver ions from silver nanoparticles in different media“ (Poster)

International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles 11.-15.09.2011, Essen, Deutschland: M. Malissek, S. Simon, C. Damm, J. Diendorf, D. Mahl, W. Meyer-Zaika, M. Eppe, R. Zellner, W. Peukert, L. Treuel, „Interactions of

Nanoparticles with Proteins – Adsorption Equilibria and Impact on the Structural Integrity of the Protein“ (Poster)

International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles 11.-15.09.2011, Essen, Deutschland: D. Mahl, J. Diendorf, S. Ristig, C. Greulich, Zi-An Li, M. Farle, M. Köller, and M. Epple, „Nanoparticles of silver, gold, and silver-gold (50:50) prepared in water by citrate reduction in the presence of tannin: Characterization and biological properties“ (Poster)

International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles 11.-15.09.2011, Essen, Deutschland: C. Greulich, J. Diendorf, T. A. Schildhauer, M. Epple, M. Köller, „Differential Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Nano-Silver“ (Poster)

International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles 11.-15.09.2011, Essen, Deutschland: N. Haberl, E. Richter, A. Wenk, J. Diendorf, M. Epple, S. Hirn, B. D. Johnston, M. Schäffler, W. G. Kreyling, C. Schleh, „Establishing a System to Investigate the Toxicity of Silver Nanoparticles“ (Poster)

Materials Research Society Fall Meeting 29.11.-03.12.2010, Boston, USA: J. Diendorf, S. Kittler, C. Greulich, M. Köller, M. Epple, „The correlation between toxicity and the release of silver ions from silver nanoparticles“ (Vortrag)

Ukrainian-German Symposium on Nanoscience and Nanotechnology and on Nanobiotechnology, 06.-10.09.2010, Berehove, Ukraine: J. Diendorf, S. Kittler, C. Greulich, M. Köller, M. Epple, „Silver nanoparticles: Synthesis, dissolution, and toxicity“ (Vortrag)

Materials Research Society Fall Meeting 30.11.-04.12.2009, Boston, USA: J. Diendorf, S. Kittler, C. Greulich, M. Köller, M. Epple, „Synthesis of PVP-functionalized silver nanoparticles and their biological activity towards human mesenchymal stem cells“ (Vortrag)

44<sup>th</sup> Meeting of the German Colloid Society, 28.-30.09.2009, Hamburg, Deutschland: M. Epple, J. Diendorf, S. Kittler, D. Mahl, „On the slow dissolution of metallic nanoparticles (gold, silver) in aqueous media“ (Poster)

### **8.3 Lebenslauf**

Lebenslauf aus Datenschutzgründen nicht enthalten

## **8.4 Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Silber-Nanopartikel – Synthese, Stabilität und biologische Wirkungen“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im April 2012

## 8.5 Danksagungen

Ich danke (ohne bestimmte Reihenfolge)...

Herrn Prof. Dr. Matthias Epple für die Stellung dieses herausfordernden und interessanten Promotionsthemas, die gute Betreuung während der Arbeit und die gewährten Freiräume bei der Bearbeitung, die Ermöglichung meiner nationalen und internationalen Forschungsaufenthalte und Vorträge auf zahlreichen Fachtagungen,

Herrn Prof. Dr. Christian Mayer für die Übernahme des Zweitgutachtens,

Frau Dr. Christina Greulich für die Durchführung der zellbiologischen Experimente und die tolle Zusammenarbeit über die gesamten drei Jahre,

Frau Dr. Sonja Zimmermann, Herrn Mark Schumann, Herrn Jörg Kaminski, Frau Nadine Ruchter und Herrn Manoochehr Bahmani für die sehr freundliche und umfangreiche Hilfe bei der AAS, der Sauerstoffmessung und vielen Kleinigkeiten,

Frau Kerstin Brauner und Frau Veronika Hiltenkamp für die Ausführung zahlloser AAS- und EA-Messungen,

Frau Dr. Stefanie Kittler für die reibungslose Übergabe des interessanten Themas und die Einarbeitung,

Frau Dr. Luisa Ruiz-Gonzales, Herrn Dr. Jose Gonzalez-Calbet und Frau Prof. Dr. Maria Vallet-Regi von der Universität Madrid für die Anfertigung der HR-TEM-Bilder,

Herrn Dr. Meyer-Zaika für die Anfertigung von TEM-Aufnahmen und die vielen kritischen Diskussionen,

Frau PD Dr. Christina Graf für die Anfertigung einer TEM-Aufnahme,

Herrn Dr. Zi-An Li und Herrn Prof. Dr. Michael Farle für die Anfertigung weiterer HR-TEM-Bilder,

Herrn Dr. Oleg Prymak für die Anfertigung der XRD-Messungen,

Herrn Sven Backhaus, Herrn Dr. Dirk Mahl, Frau Dr. Anna Kovtun, Herrn Jan Klesing, Herrn Alexander Peetsch, Herrn Johannes Rüsing, Herrn Dr. Daniel Hagmeyer, Herrn Dr. Thomas Annen, Herrn Simon Ristig, Frau Katrin Wallat, Frau Diana Kozlova, Herrn Sven Range und Frau Dr. Paulina Kaempfe für die vielen

lustigen Tage, die Kameradschaft und Hilfe im Labor und die erinnerungswerten Reisen,

Herrn Sven Range für die Ernennung zum Halbfreund.

Frau Carola Fischer für die stete Hilfsbereitschaft bei vielen Dingen und insbesondere bei der Abwendung der ständig auftretenden ultimativen EDV-Katastrophen.

Frau Sabrina Berger für die Daten der BSA-Adsorption.

Herrn Tobias Urbainczyk für die Hilfe bei der Synthese nach dem Polyol-Prozess.

Herrn Smail Boukercha für die Hilfe bei vielen REM-Aufnahmen.

Frau Sabine Kiefer für stetige Hilfe bei der Bewältigung der Bürokratie.

Herrn Wulf Engelen für viele „Tassen Stickstoff“, zahllose kleine und große Hilfen und die stets gute Laune,

Frau Olga Rotan für die Durchführung von zellbiologischen Experimenten,

Frau Brigitte Dietz dafür, dass im Grundpraktikum noch alles läuft.