Dissertation

Nanokristall-Polymer-Hybridstrukturen für biologische Anwendung und Charakterisierung der Polymermembran mit Fluoreszenzlösch-Experimenten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jan-Philip Merkl
Hamburg, 2016

Live as if you were to die tomorrow. Learn as if you were to live forever.

Be the change you want to see in the world.

both **M. Ghandi**

You'll never walk alone

Dissertation

Titel:	Nanokristall-Polymer-Hybridstrukturen für biologische Anwendung und Charakterisierung der Polymermembran mit Fluoreszenz-Löschexperimenten
Titel (engl.):	Nanocrystal-Polymer-Hybrid Structures for Biological Applications and Characterization of the Polymer Membrane with Fluorescence Quenching Experiments

eingereicht von:	Jan-Philip Merkl
Martrikelnummer:	6261918
Kontakt:	janphilip.merkl@gmail.com

eingereicht am:	10.03.2016
Universität:	Universität Hamburg
Arbeitsgruppe:	Prof. Dr. Horst Weller
	Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:
Erstgutachter:	**Herr Prof. Dr. Horst Weller**
Zweitgutachter:	**Herr Prof. Dr. Christian Klinke**
Tag der Disputation:	**29.04.2016**

Publikationen

Diese Arbeit wurde von Februar 2013 bis April 2016 größtenteils an der Universität Hamburg durchgeführt. Während dieses Zeitraumes befand ich mich neun Monate an der *Florida State Univeristy* in Tallahassee, Florida und vier Monate am *CICbiomaGUNE* in San Sebastian, Spanien für Forschungsaufenthalte in anderen Laboratorien. Im Laufe dieser Promotionszeit sind 15 Artikel in Fachjournalen mit Beiträgen von mir erschienen, zwei weitere befinden sich derzeit unter Begutachtung, bzw. kurz vor dem Einreichen. Nachfolgend ist eine tabellarische, invers-chronologische Publikationsliste angehängt. Sollten an einer Publikation geteilte Erstautoren beteiligt gewesen sein, sind diese unterstrichen. Wenn ich (geteilter) Erstautor einer Veröffentlichung bin, ist mein Name doppelt unterstrichen und als Coautor fett markiert. Auf den Seiten 104 ff. sind die Publikationen abgedruckt, die in Fachzeitschriften erschienen sind. Auf den Seiten 195 ff. sind Übersichtsartikel und Konferenzartikel aufgelistet. Dort ist jeweils mein Beitrag zu der Publikation detailliert beschrieben. Weiterhin habe ich Beiträge zu zwei Projekten geleistet, die sich in der Patentierungsphase befinden und demzufolge in dieser Arbeit nicht weiter erwähnt werden.

01. *Bio-orthogonal Coupling as a Means of Quantifying the Ligand Density on Hydrophilic Quantum Dots*, Naiqian Zhan, Goutam Palui, **Jan-Philip Merkl** und Hedi Mattoussi.

J. Am. Chem. Soc., **2016**, *DOI: 10.1021/jacs.5b13574*. Die Publikation ist auf den Seiten 91 ff. abgedruckt und als Quelle[1] im Ergebnisteil geführt.

02. *Investigations of Ion Transport through Nanoscale Polymer Membranes by Fluorescence Quenching of CdSe/CdS Quantum Dot/Quantum Rods*, **Jan-Philip Merkl**, Christopher Wolter, Sandra Flessau, Christian Schmidtke, Johannes Ostermann, Artur Feld, Alf Mews und Horst Weller.

Nanoscale **2016**, *accepted*. Die Publikation ist auf den Seiten 104 ff. abgedruckt und als Quelle[2] im Ergebnisteil geführt.

03. *Cellular Uptake Behavior of Glycoconjugated and Micellar-Encapsulated Quantum Dots on HeLa Cervical Cancer Cells*, **Jan-Philip Merkl**, Christian Schmidtke, Malak Safi, Megan Muroski, Dirk Alpers, Huong Tran, Johannes Ostermann, Anna-Marlena Kreuziger, Sebastian Ehrich, Geoffery Strouse, Gerrit Wolters-Eisfeld, Hedi Mattoussi und Horst Weller.

Biotech, Biomaterials and Biomedical. TechConnect Briefs 2015 Chapter 2: Cancer Nanotechnology, **2015**, 78-81. Die Publikation ist auf den Seiten 195 ff. abgedruckt und als Quelle[3] im Ergebnisteil geführt.

04. *Structural Investigations on Magneto-Fluorescent-Plasmonic Nanocomposites*, **Jan-Philip Merkl**, Hameed Heidari, Christian Schmidtke, Hauke Kloust, Artur Feld, Fadi Aldeek, Holger Lange, Hedi Mattoussi, Sara Bals und Horst Weller.

Biotech, Biomaterials and Biomedical. TechConnect Briefs 2015 Chapter 6: Nanocomposite Materials, **2015**, 432-435. Die Publikation ist auf den Seiten 200 ff. abgedruckt und als Quelle[4] im Ergebnisteil geführt.

05. *Quantifying the Density of Surface Capping Ligands on Semiconductor Quantum Dots*, Naiqian Zhan, Goutam Palui, **Jan-Philip Merkl** und Hedi Mattoussi.

Proc. of SPIE **2015**, 93381, 93381-11. Die Publikation ist auf den Seiten 205 ff. abgedruckt und als Quelle[5] im Ergebnisteil geführt.

06. *A Universal Approach to Ultrasmall Magneto-Fluorescent Nanohybrids*, Artur Feld, **Jan-Philip Merkl**, Hauke Kloust, Sandra Flessau, Christian Schmidtke, Christopher Wolter, Johannes Ostermann, Michael Kampferbeck, Robin Eggers, Alf Mews, Theo Schotten und Horst Weller.

Angew. Chem. Int. Ed. **2015**, 54, 12468-12471. Die Publikation ist auf den Seiten 107 ff. abgedruckt und als Quelle[6] im Ergebnisteil geführt. Deutsche Version: *Angew. Chem.* **2015**, 127, 12645-12648.[7]

07. *Synthesis of Iron Oxide Nanorods Using a Template Mediated Approach*, Hauke Kloust, Robert Zierold, **Jan-Philip Merkl**, Christian Schmidtke, Artur Feld, Elmar Poeselt, Andreas Kornowski, Kornelius Nielsch und Horst Weller.

Chem. Mater. **2015**, 27, 4914-4917. Die Publikation ist auf den Seiten 112 ff. abgedruckt und als Quelle[8] im Ergebnisteil geführt.

08. *Tailoring the Ligand Shell for the Control of Cellular Uptake and Optical Properties of Nanocrystals*, Johannes Ostermann, Christian Schmidtke, Christopher Wolter, **Jan-Philip Merkl**, Hauke Kloust und Horst Weller.

Beilstein J. Nanotechnol. **2015**, 6, 232-242. Die Publikation ist auf den Seiten 217 ff. abgedruckt und als Quelle[9] im Ergebnisteil geführt.

09. *Polymer-Assisted Self-Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Well-Defined Clusters: Controlling the Collective-Magnetic Properties*, Christian Schmidtke, Robin Eggers, Robert Zierold, Artur Feld, Hauke Kloust, Christopher Wolter, Johannes Ostermann **Jan-Philip Merkl**, Theo Schotten, Kornelius Nielsch und Horst Weller.

Langmuir **2014**, 30, 11190-11196. Die Publikation ist auf den Seiten 117 ff. abgedruckt und als Quelle[10] im Ergebnisteil geführt.

10. *CdSe/CdS-Quantum Rods: Fluorescent Probes for in vivo Two-Photon Laser Scanning Microscopy*, Jelena Dimitrijevic, Lisa Krapf, Christopher Wolter, Christian Schmidtke, **Jan-Philip Merkl**, Tobias Jochum, Andreas Kornowski, Anna Schüth, Andreas Gebet, Gereon Hüttmann, Tobias Vossmeyer und Horst Weller.

Nanoscale, **2014**, 6, 10413-10422. Die Publikation ist auf den Seiten 125 ff. abgedruckt und als Quelle[11] im Ergebnisteil geführt.

11. *Shielding of Quantum Dots Using Diblock Copolymers: Implementing Copper Catalyzed Click Chemistry to Fluorescent Quantum Dots*, **Jan-Philip Merkl**, Johannes Ostermann, Christian Schmidtke, Hauke Kloust, Robbin Eggers, Artur Feld, Christopher Wolter, Anna-Marlena Kreutziger, Sandra Flessau, Hedi Mattoussi und Horst Weller.

Proc. of SPIE **2014**, 8955, 89551X-5. Die Publikation ist auf den Seiten 229 ff. abgedruckt und als Quelle[12] im Ergebnisteil geführt.

12. *Poly(ethylene oxide) and Polystyrene Encapsulated Quantum Dots: Highly Fluorescent, Functionalizable, and Ultra Stable in Aqueous Media*, Hauke Kloust, Christian Schmidtke, **Jan-Philip Merkl**, Artur Feld, Theo Schotten, Ursula E. A. Fittschen, Manuela Gehring, Johannes Ostermann, Elmar H. Pöselt und Horst Weller.

J. Phys. Chem. C **2013**, 117 23244-23250. Die Publikation ist auf den Seiten 136 ff. abgedruckt und als Quelle[13] im Ergebnisteil geführt.

13. *A General Route Towards Well-Defined Magneto- or Fluorescent-Plasmonic Nanohybrids*, Christian Schmidtke, Hauke Kloust, Neus G. Bastús, **Jan-Philip Merkl**, Huong Tran, Sandra Flessau, Johannes Ostermann, Artur Feld und Horst Weller.

Nanoscale **2013**, 5, 11783-11794. Die Publikation ist auf den Seiten 144 abgedruckt und als Quelle[14] im Ergebnisteil geführt.

14. *Controlling the Physical and Biological Properties of Highly Fluorescent Aqueous Quantum Dots Using Block Copolymers of Different Size and Shape*, Johannes Ostermann, **Jan-Philip Merkl**, Sandra Flessau, Christopher Wolter, Andreas Kornowski, Christian Schmidtke, Andrea Pietsch, Hauke Kloust, Artur Feld und Horst Weller.

ACS Nano **2013**, 7, 9156-9167. Die ist auf den Seiten 157 ff. abgedruckt und als Quelle[15] im Ergebnisteil geführt.

15. *Radical Initiated Reactions on Biocompatible CdSe-Based Quantum Dots: Ligand Cross-Linking, Crystal Annealing, and Fluorescence Enhancement*, Christian Schmidtke, Holger Lange, Huong Tran Johannes Ostermann, Hauke Kloust, Neus G. Bastús, **Jan-Philip Merkl**, Christian Thomsen und Horst Weller.

J. Phys. Chem. C **2013**, 117, 8570-8578. Die Publikation ist auf den Seiten 170 ff. abgedruckt und als Quelle[16] im Ergebnisteil geführt.

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

ϵ_λ	wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient
$\hat{H}$	Hamiltonoperator
$\hbar$	reduziertes Plancksches Wirkungsquantum
π	Kreiszahl pi
$\Psi_J^{(*)}$	(elektronisch angeregter) Zustand im Schwingungsmodus J
τ	Fluoreszenzabklingzeit
e	Elementarladung
k	Wellenvektor oder Geschwindigkeitskonstante
R_I	Ortskoordinate von einem Atomkern
r_r	Ortskoordinate eines Elektrons
$S^{(*)}$	(angeregter) Singulettzustand
ϵ_0	Dielektrizitätskonstante des Vakuums
Γ	Ratenkonstante der Fluoreszenz
τ_{av}	mittlere Fluoreszenzabklingzeit
τ_{off}	Auszeit
τ_{on}	Anzeit
$\vec{\mu}_e$	Dipolmoment
$\vec{\mu}_{ik}$	Übergangsdipolmoment
$\vec{E}$	elektrischer Feldvektor
A_i	präexponentieller Faktor oder Wahrscheinlichkeit
c	Konzentration
d	Länge des Absorptionsweges
d_h	hydrodynamischer Durchmesser
D_i	Diffusionskoeffizient
E	elektrischen Feld
E_n	Energieniveu des n-ten Zustandes
$F = FI = I$	Fluoreszenzintensität
$f_D(\lambda)$	normierten Strahlungsintensität des Donors
f_Q	Quenchingeffizienz
G	Freie Enthalpie
H	Enthalpie
J	Überlappungsintegral
K	Gleichgewichtskonstante oder Stern-Volmer Konstante
k_{NR}	Summe aller desaktivierenden Ratenkonstanten
k_Q	bimolekulare Quenchingkonstante
m_e	Ruhemasse des Elektrons
N_A	Avogadrozahl
r_s	Wigner-Seitz Radius

S	Entopie
T_B	Blockadetemperatur
T_C	Curietemperatur
T_N	Néeltemperatur
cmc	kritische Mizellenkonzentration
A549	Krebs-Zelllinie - menschliche Lungenkrebszellinie
Abb.	Abbildung
AgNK	Silbernanokristalle
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
ATP	Adenosintriphosphat
AuNK	Goldnanokristall
AuNRs	Goldnanostäbchen
bzw.	beziehungsweise
CdSe	Cadmiumselenid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DETA	Diethylentriamin
DNA	=DNS, Desoxyribonukleinsäuren
DNS	Desoxyribonukleinsäuren
DVB	Divinylbenzol
EDX	*energy-dispersive X-ray spectroscopy*
EMAT	*Electron Microscopy for Materials Science*
EP	Emulsionspolymerisation
ESI	*electronic supplementary information*
FDA	*US Food and Drug Administration*
FeONK	Eisenoxidnanokristalle
FeONK-LA	Eisenoxidnanokristalle mit PI-*b*-PEO-LA verkapselt
FLIM	*fluorescence lifetime imaging*
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
FSU	*Florida State University*
GHS	Globally Harmonised System
HAADF	*high-angle annular dark-field imaging*
HDA	Hexadodecylamin
HeLa	Krebs-Zelllinie - menschliche Epitelzellinie von Henrietta Lacks
HIS-MBP	Polyhistidin-maltosebindendendes Protein
HIS-MBP-γ	Polyhistidin-maltosebindendendes Protein-γ-Peptid Fusionsprotein
i.d.R.	in der Regel
KMR	krebserregend- mutagen- reproduktionsschädigend
LA-ZW	Liponsäure-Zwitterion
MNK	Metallnanokristalle
n.v.u.	nicht vollständig untersucht
NK	Nanokristall
NP	Nanopartikel
NSET	*nanosurface-energy transfer*

P+F	Peptid-*Atto-655*
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
PI	Polyisopren
PI-*b*-PEO	Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid
PI-*b*-PEO-COOH	Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid-Carboxylsäure
PI-*b*-PEO-LA	Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid-Liponsäure
PI-*b*-PEO-NH2	Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid-Amin
PI-DETA	Polyisoprendiethylentriamin
PLQY	Fluoreszenzquantenausbeuten
PS	Polystyrol
QA	Quantenausbeute
QD	*quantum dot*
QP	Quantenpunkt
QP-COOH	Quantenpunkte mit PI-*b*-PEO-COOH verkapselt
QP-LA	Quantenpunkte mit PI-*b*-PEO-LA verkapselt
QP-NH2	Quantenpunkte mit PI-*b*-PEO-NH2 verkapselt
RAW-264.7	Zellinie - murine Makrophagen
REM	Rastertransmissionselektronenmikroskop
SERRS	*surface enhanced resonance raman scattering*
SERS	*surface enhanced raman scattering*
SILAR	*successive ionic-layer adsorption and reaction process*
SNC	*semiconductor nanocrystals*
sog.	so genannt
STEM	*scanning transmission electron microscopy*
TCSPC	*time correlated single photon counting*
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TOP	Trioctylphosphan
TOPO	Trioktylphosphanoxid
VCI	Verband der chemischen Industrie e.V.
vgl.	vergleiche

Inhaltsverzeichnis

Publikationen ii

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis v

1 Zusammenfassung 1

2 Abstract 4

3 Einleitung 6

4 Kenntnisstand 9

4.1 Besonderheiten nanoskaliger Objekte . . . 9
4.1.1 Oberflächenabhängige Partikeleigenschaften . . . 10
4.1.2 Größenabhängige Partikeleigenschaften . . . 10
4.1.3 Größenabhängige Quanteneffekte . . . 10
4.2 Synthese von kolloidalen Nanokristallen . . . 10
4.3 Magnetische Nanokristalle am Beispiel der Eisenoxidnanokristalle . . . 12
4.3.1 Magnetismus von Eisenoxidnanokristallen . . . 13
4.3.2 Synthese von anisotropen Eisenoxidnanokristallen und Clustern von Eisenoxidnanokristallen . . . 14
4.3.3 Anwendung von FeONK *in vivo* und *in vitro* . . . 15
4.4 Metallnanokristalle am Beispiel der Gold Nanokristalle . . . 15
4.4.1 Wechselwirkung von Goldnanokristallen mit Licht . . . 16
4.4.1.1 Lichtstreuung, Absorption und lokalisierte Plasmonen . . . 16
4.4.2 Synthese von Gold Nanokristallen . . . 17
4.4.2.1 Formkontrolle von Gold Nanokristallen und anisotropes Wachstum . . . 18
4.4.3 Verwendung von elektromagnetischer Feldverstärkung von gekoppelten Metallnanokristallen - *surface enhances raman scattering* . . . 20
4.5 Quantenpunkte und ihre Fluoreszenzeigenschaften . . . 21
4.5.1 Synthese von kolloidalen Halbleiternanokristallen . . . 21
4.5.1.1 Kern/Schale Partikel . . . 23
4.5.1.2 Verzweigte und elongierte Halbleiternanokristalle . . . 24
4.5.1.3 Dotieren und Kationenaustausch von Halbleiternanokristallen . . . 25
4.5.1.4 Mikrofluidik Synthese . . . 26
4.5.2 Beschreibung von Energiezuständen in Festkörpern . . . 26
4.5.3 Effektive Masse . . . 28

4.5.4 Größenquantisierungseffekt . . . 29
4.5.5 Bandstruktur von Cadmiumselenid Nanokristallen und Relaxationswege . . . 30
4.6 Spektroskopie . . . 31
4.6.1 Emissionseigenschaften . . . 32
4.6.2 Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzabklingzeit . . . 33
4.6.3 Spektrale Diffusion und Blinken . . . 34
4.6.3.1 Spektrale Diffusion . . . 34
4.6.3.2 Blinken . . . 35
4.7 Fluoreszenzlöschung . . . 37
4.7.1 Grundlagen und Terminologie der Fluoreszenzlöschung . . . 37
4.7.2 Elektronenübertragung als Fluoreszenzlöschmechanismus . . . 38
4.7.2.1 Dynamisches Quenching . . . 39
4.7.2.2 Statisches Quenching . . . 41
4.7.2.3 Gemischtes Quenching . . . 42
4.7.3 Energieübertragung, Dipol-Dipol Interaktionen und Förster- Resonanzenergietransfer . . . 42
4.7.4 Besonderheiten bei der Verwendung von Halbleiternanokristallen als Donor für Fluoreszenzlöschassays . . . 43
4.8 Oberflächenchemie und Phasentransfer von Nanokristallen . . . 44
4.8.1 Phasentransfer . . . 44
4.8.1.1 Ligandenaustausch . . . 45
4.8.1.2 Polymere und Verkapselung von Nanopartikeln und Wirkstoffen . . . 45
4.8.1.3 Saat-Emulsionspoylmerisation . . . 47
4.8.2 Ligandenanzahl . . . 47
4.9 Fluoreszenzlöschung und Ionensensitivität von eingekapselten Quantenpunkten . . . 48
4.10 Darstellung und Verwendung von Hybridsystemen . . . 49
4.10.1 Funktionalisierung mit kleinen Molekülen wie Farbstoffen und Peptiden . . . 50
4.10.1.1 *Click*- und Bioorthogonale Reaktionen an Nanokristallen . . . 51
4.10.2 Cluster aus Metallnanokristallen . . . 51
4.10.2.1 Thermodynamik von Selbstassemblierungsvorgängen . . . 52
4.10.3 Darstellung und Verwendung von Goldnanokristall-Quantenpunkt basierten Hybridmaterialien . . . 53
4.10.3.1 Wechselwirkung von Exzitonen und Plasmonen . . . 53
4.10.3.2 Synthese und Anwendung von QD-AuNK Hybriden . . . 55
4.10.4 Darstellung von magneto-fluoreszenten Hybridmaterialien . . . 56
4.10.5 Darstellung und Verwendung magneto-plasmonischer Hybridmaterialien . . . 57
4.11 Nanomedizin - eine Kurzeinführung . . . 57
4.11.1 Zellaufnahme, Toxikologie und Organverteilung von Nanopartikeln - generelle Konzepte? . . . 58

4.11.2 Proteinkorona 60

5 Zielsetzung und Problemstellung 63

6 Synopsis 64
6.1 Untersuchung von Polymerkapseln von HLNKn mittels Fluoreszenzlöschung 64
6.1.1 Fluoreszenzlöschassay 66
6.1.1.1 Durchführung und Interpretation des PL-Löschassays . . . 68
6.1.2 Eigenschaften der PI-*b*-PEO Mizellen sowie der verkapselten QP und QDQRs 69
6.1.3 Einfluss der Polymergröße und des Polymerüberschusses auf radikalisch quervernetze PI-*b*-PEO Membranen um Quantenpunkte . . 70
6.1.3.1 Einfluss der Emulsionspolymerisation auf PI-*b*-PEO Membranen 71
6.1.4 Übertragung auf Quantenpunkte in Quantenstäbchen 72
6.1.5 Farbstoffe als Quencher 75
6.1.6 Zusammenfassende Betrachtung der Abschirmung von Halbleiternanokristallen, zellulare Aufnahme und Einzelteilchenuntersuchungen 75
6.1.6.1 Zellulare Aufnahme der verkapselten Quantenpunkte . . . 77
6.1.6.2 Quenching auf Einzelteilchenebene 78
6.1.6.3 Vergleich mit Berichten aus der Literatur 80
6.2 Bioorthogonale Kopplung von Liponsäure-PEO-FG tragenden Quantenpunkten 80
6.3 Darstellung von fluoreszierenden Hybridstrukturen mehrerer Nanokristalle 82
6.3.1 Darstellung von magneto-fluoreszenten Nanohybriden 82
6.3.2 Darstellung und Verwendung von fluoreszent-plasmonischen und magneto-fluoreszenten Hybriden 84
6.3.2.1 Verwendung von Citrat-stabilisierten AuNKn zur Hybridbildung 84
6.4 Untersuchung von Fluoreszent-Plasmonischen Hybridstrukturen 85
6.5 Darstellung von Hybridstrukturen mittels Clusterbildung und Synthese elongierter FeONK 85
6.6 Publikationen in Fachzeitschriften 87
6.6.1 Bio-orthogonal Coupling as a Means of Quantifying the Ligand Density on Hydrophilic Quantum Dots 87
6.6.2 Investigations of Ion Transport through Nanoscale Polymer Membranes by Fluorescence Quenching of CdSe/CdS Quantum Dot/Quantum Rods 100
6.6.3 A Universal Approach to Ultrasmall Magneto-Fluorescent Nanohybrids 107
6.6.4 Synthesis of Iron Oxide Nanorods Using a Template Mediated Approach 112

6.6.5 Polymer-Assisted Self-Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Well-Defined Clusters: Controlling the Collective-Magnetic Properties . . . 117
6.6.6 CdSe/CdS-Quantum Rods: Fluorescent Probes for in vivo Two-Photon Laser Scanning Microscopy . . . 125
6.6.7 Poly(ethylene oxide) and Polystyrene Encapsulated Quantum Dots: Highly Fluorescent, Functionalizable, and Ultra Stable in Aqueous Media . . . 136
6.6.8 A general route towards well-defined magneto- or fluorescent-plasmonic nanohybrids . . . 144
6.6.9 Controlling the Physical and Biological Properties of Highly Fluorescent Aqueous Quantum Dots Using Block Copolymers of Different Size and Shape . . . 157
6.6.10 Radical Initiated Reactions on Biocompatible CdSe-Based Quantum Dots: Ligand Cross-Linking, Crystal Annealing, and Fluorescence Enhancement . . . 170

7 Unveröffentlichte Arbeiten, Übersichts- und Konferenzartikel 180
7.1 Verwendung von Farbstoffen als Quencher . . . 180
7.2 Verwendung von Peptid-Farbstoff Konjugaten als Quencher . . . 181
7.3 Bestimmung der Ligandenzahl von PI-*b*-PEO verkapselten QP . . . 183
7.4 Darstellung Fluoreszenz-Plasmonischer Hybridstrukturen . . . 184
7.4.0.1 Verwendung von zwitterionisch-stabilisierten AuNKn zur Darstellung biologisch aktiver Hybride . . . 185
7.5 Fluoreszent-Plasmonische Hybride mit effektiver zellularer Aufnahme . . . 190
7.6 Gezielte Darstellung von Metall Nanopartikel Clustern als Plattform für SERS . . . 193
7.7 Weitere Publikationen . . . 195
7.7.1 Cellular Uptake Behavior of Glycoconjugated and Micellar-Encapsulated Quantum Dots on HeLa Cervical Cancer Cells . . . 195
7.7.2 Structural Investigations on Magneto-Fluorescent-Plasmonic Nanocomposites . . . 200
7.7.3 Quantifying the Density of Surface Capping Ligands on Semiconductor Quantum Dots . . . 205
7.7.4 Tailoring the ligand shell for the control of cellular uptake and optical properties of nanocrystals . . . 217
7.7.5 Shielding of quantum dots using diblock copolymers: implementing copper catalyzed click chemistry to fluorescent quantum dots . . . 229

Literaturverzeichniss 242

8 Anhang 273
8.1 Verwendete Chemikalien und KMR-Stoffe . . . 273
8.2 Eidesstattliche Erklärung . . . 277

8.3 Angehängte Abbildungen 278

9 Danksagung **279**

1 Zusammenfassung

Mit Hilfe von Fluoreszenzlöschung von Halbleiternanokristallen mit Ionen und Farbstoffen kann die Halbleiternanokristall-umgebende Hülle charakterisiert und analysiert werden. Hierbei wurde gefunden, dass Halbleiternanokristalle (HLNK), die mit dem amphiphilen Diblockcopolymer Polyisopren-*block*-Polyethylenglycol (PI-*b*-PEO) verkapselt wurden, eine hohe Abschirmung gegenüber Kupfer(II)- und Eisen(III)ionen aufweisen. Die Zugänglichkeit der HLNK wird durch die Oberflächenbelegung, Quervernetzungsreaktionen und Membrandicke bestimmt: Eine hohe Belegungsdichte, Quervernetzung sowie hohe PI-*b*-PEO-Molekulargewichte bewirken eine äußerst effiziente Abschirmung der Partikel gegenüber der Umgebung. Eine nahezu vollständige Abschirmung der Partikel gelingt bei der Verwendung von Polymeren, deren hydrophober Block die kritische Verschlaufungslänge erreicht. Die verschlauften Polymere bilden ein dichtes, undurchdringliches Netzwerk, wohingegen sich nicht verschlaufte Polymere parallel ausrichten und so Nanoporen und Löcher bilden.

Durch Analyse des Fluoreszenzlösch-Assays ist es möglich, drei Spezies von unterschiedlich zugänglichen Halbleiternanokristallen im Ensemble zu identifizieren: HLNK mit fehlerhaften Polymermembranen, die eine direkte Zugänglichkeit für Ionen erlauben, HLNK die äußerst effizient gegenüber der Umgebung abgeschirmt sind und HLNK, deren Membran Nanoporen aufweist, durch die die Ionen nicht frei eindiffundieren können. Die relative Anzahl der verschiedenen Spezies lässt sich über die verwendeten Polymere einstellen, wo verzweigte Polymere zu einer hohen Inhomogenität des Ensembles führen. Die Analyse des Fluoreszenzlöschmechanismus legt nahe, dass sich die Polymermembranen um Quantenpunkte (QP) und um Quantenpunkte in Quantenstäbchen (QDQR), in Bezug auf ihre Durchlässigkeit und Nanoporenausbildung, nicht signifikant unterscheiden. Jedoch wird für die Verkapselung der größeren QDQR im Vergleich mehr Polymer benötigt, um eine Verkapselung einzelner Halbleiternanokristalle zu erreichen. Ein Polymerunterschuss führt zu der Bildung von Clustern von mehreren Nanokristallen, was ebenfalls auf Eisenoxidnanokristalle und Goldnanokristalle übertragen werden kann. Die so dargestellten Cluster weisen neuartige Materialeigenschaften, wie z.B. clustergrößenabhängige Blockadetemperatur und Magnetoviskosität sowie oberflächenverstärkte Ramanstreuung, auf, die mit den einzelnen Partikeln nicht zu erreichen sind.

Reaktionsfortschritte von radikalischen Quervernetzungsreaktionen und von Emulsionspolymerisation, die in der Hülle von Halbleiternanokristallen stattfinden, können ebenfalls mit Fluoreszenzlösch-Studien untersucht werden. Diese Reaktionen führen zu einer erhöhten Verdünnungsstabilität und effizienteren Abschirmung, wo lange Reaktionszeiten von 5-10 Stunden zu einer Langzeitresistenz gegenüber hohen Quencherkonzentrationen führen.

Im Vergleich zu Halbleiternanokristall-Phasentransfersystemen aus der Literatur, bei denen die Kupferresistenz untersucht und berichtet wurde, weist selbst die durchlässigs-

te Polymerhülle, die auf Grundlage dieses Systems dargestellt wurde, einen signifikant höheren Schutz gegenüber Kupferionen auf. Durch die hohe Resistenz dieser Strukturen gegenüber Kupferionen wurde die 1,3- dipolare *Husigen* Cyloaddition durchgeführt, was vorher nicht an polymer-verkapselten Quantenpunkten berichtet wurde. Die am besten abgeschirmten Konstrukte ermöglichen eine bis zu dreijährige Abschirmung gegenüber einer sehr hohen Konzentration an Kupfer(II)ionen. Eine Emulsionspolymerisation an PI-*b*-PEO-verkapselten Cluster aus Goldnanokristallen liefert Hybride, die eine außerordentliche Resistenz gegen Königswasser aufweisen. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Polymerverkapselung und einer optional durchzuführenden Emulsionspolymerisation Nanokristalle gegenüber Einflüssen aus der Umgebung effizient abgeschirmt werden können. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in magneto-fluoreszenten Nanohybriden, die aus QDQRs und Eisenoxidnanokristallen bestehen und von einer Polystyrolschicht getrennt sind, die Halbleiternanokristalle nicht negativ durch die Eisenoxidnanokristalle, oder daraus freigesetzte Eisenionen, beeinflusst werden. Somit weisen die so dargestellten magneto-fluoreszenten Hybride die kombinierten, unveränderten Eigenschaften der Ausgangsmaterialien auf. Hierbei lässt sich die Zusammensetzung des finalen Konstrukts über eine Vielzahl von Reaktions- und Partikelparametern, wie z.B. Injektionsgeschwindigkeit und Aspektverhältnis, das Konzentrationsverhältnis und die Oberflächenfunktionalisierung der Nanokristalle variieren.

Um die Biokompatibilität der verkapselten Halbleiternanokristalle zu untersuchen, wurden zellulare Aufnahmestudien durchgeführt. Die zellulare Aufnahme der verkapselten Quantenpunkte variiert mit der Polymergröße sowie der funktionellen Endgruppe der PI-*b*-PEO-Polymere. In Serum-freiem Medium weisen die am besten abschirmenden Polymer-Quantenpunkt-Konstrukte die geringste zellulare Aufnahme in A549 und RAW-264.7 Zellen auf, was entweder mit der Polymerverschlaufung oder mit der Größe der Konstrukte erklärt werden kann. Eine effiziente endosomale Aufnahme in HeLa- Zellen innerhalb von weniger als einer Stunde kann durch die Funktionalisierung der Polymerhülle mit Maltose erreicht werden, welche sogar in Serum-haltigem Medium mit hoher Zuckerkonzentration zu beobachten ist.

Verschieden funktionalisierte, verkapselte Quantenpunkte können an die Oberfläche von Goldnanokristallen binden und so fluoreszent-plasmonische Nanohybride bilden. Diese Selbstassemblierung kann ebenfalls über die Fluoreszenzeigenschaften der Quantenpunkte studiert werden. Durch eine zusätzliche Emulsionspolymerisation und einer quasikovalenten Bindung von Quantenpunkt und Goldnanokristallen kann zudem der Abstand zwischen Goldnanokristall und Quantenpunkt eingestellt werden. So ist es möglich, deren abstandsabhängiges Fluoreszenzverhalten zu studieren. Durch Austausch der funktionellen Gruppe auf der Mizelloberfläche der Quantenpunkte und die Verwendung von Goldnanokristallen, die durch zwitterionische Liganden stabilisiert wurden, kann die Selbstassemblierung von Quantenpunkt und Goldnanokristall und die interne Struktur des Hybrids verändert werden. So nahm die PL-Löschung, wie nach dem Konzept der harten und weichen Säuren bzw. Basen von Ralph Pearson erwartet, durch Goldnanokristalle sukzessive ab, wenn auf der Mizelloberfläche Liponsäure gegen Amin- bzw. Carboxylgruppen ausgetauscht wurde. Die Analyse der zeitaufgelösten Fluoreszenz und der Kinetik dieser Selbstassemblierung legt nahe, dass sich die Struktur der dargestellten Hybride durch die

mittlere Anzahl der Goldnanokristall-gebundenen funktionellen Gruppen erklären lässt. Die verwendeten zwitterionischen Liganden ermöglichten den Einsatz dieser Hybride in biologischen Medien, was mit Citrat-stabilisierten Goldnanokristallen nicht möglich war. So konnten die dargestellten Hybride mit maltosebindendem Protein und einem darauf basierenden Fusionsprotein funktionalisiert und deren biologische Aktivität studiert werden. Diese Funktionalisierung beruht auf Metall-Polyhistidin Interaktionen an freien Goldoberflächenatomen im Hybrid. Die so dargestellten fluoreszent-plasmonischen Nanohybride weisen eine Bindungsaffinität an Maltose und eine effektive zellulare Aufnahme auf. Die Affinität zu Maltose wurde durch einen visuellen Bindungsassay an Amylose und die kompetitive Freisetzung durch Maltose gezeigt. Die zellulare Aufnahme wurde mit konfokalmikrsokopsichen bzw. durchflusszytometrischen Methoden nachgewiesen. Diese legen dabei nahe, dass die zellulare Aufnahme nicht über einen endosomalen Prozess abläuft.

2 Abstract

The polymer shell of semiconductor nanocrystals (SNC) was characterized and analyzed using ions and fluorescent dyes as PL-quenchers. By using the amphiphilic polymer poly(isoprene)-block-poly(ethylene oxide) (PI-*b*-PEO) a significant shielding of the semiconductor nanocrystals against quenching copper(II) and iron(III) ions can be achieved. The accessibility of the semiconductor nanocrystals can be tuned by the surface coverage, chemical cross-linking and membrane thickness: High surface coverages, thick membranes and cross-linking of PI-*b*-PEO-molecules yield a very high shielding of the semiconductor nanocrystal within the polymer micelle. A utmost perfect shielding can be achieved by using polymers whose hydrophobic PI-block length is in the range of the entanglement length of PI. This indicates, that polymer entanglement influence the accessibility of the nanomaterials inside the polymer micelle.

By analyzing the PL-quenching three different species of encapsulated SNCs within the ensemble may be identified: SNCs with imperfect ligand shells, which allow the quencher to directly diffuse to the SNC surface, SNCs, which exhibit an utmost perfect shielding towards the environment and SNCs, whose shells exhibit nanopores or nanoholes, which hinder direct surface excess, however do not provide perfect shielding at higher quencher concentrations. The relative number of the subsequent specimen is determined by the polymer used for phase transfer. Especially the use of branched, miktoarm star shaped polymers results in a highly inhomogeneous ensemble of encapsulated SNC. The analysis of the PL-quenching assay indicates, that polymer membranes surrounding spherical quantum dots (QDs) and quantum dots in quantum rods (QDQRs) do not differ significantly. However, the encapsulation of single QDQRs requires a higher polymer excess, which is likely due to the higher surface area. A lower polymer to nanocrystal ratio yields the formation of clustered QDQRs, which was also observed for gold an iron oxide nanocrystals. These clusters exhibit extraordinary material properties, e.g. cluster-size dependent blocking temperature and magneto viscosity as well as surface enhanced raman scattering, which can hardly be achieved using single particles.

The reaction processes of radically initiated cross-linking reactions and emulsion polymerization reactions in the SNC polymer-shell can also be analyzed by this PL-quenching assay. These reactions yield polymer encapsualted SNCs with better colloidal stability and efficient, long term shielding against quenchers. In comparison to other SNC-phase transfer systems, where the copper(II) resistivity was analyzed and reported, even the most permeable PI-*b*-PEO-shell reported here, exhibits a significantly higher protection against copper(II) ions. This shielding made 1,3-dipolar *Huisgen* cylcoaddion without a dramatic loss of PL-intensity possible, which was — on encapsulated SNC — not reported before. The samples with the most efficient shielding, exhibit a PL-stability of up to three years under high SNC dilution and hughe copper(II) excess. An emulsion polymerization with PI-*b*-PEO-encapsualted clusters of gold nanocrystals yields in products with

extraordinary resistance against aqua regia. This shows, that micellar encapsulation in combination with an optional emulsion polymerization enables the utmost perfect shielding of nanocrystals against their environment. By using the emulsion polymerization it was also possible to synthesize magneto-fluorescent nanohybrids consiting of QDQRs and iron oxide nanocrystals. In these hybrids the particles are separated by a polystyrene shell. Consequently, the QDQRs are not influenced negatively by the iron oxide nanocrystals, or iron ions released thereof. The hybrids exhibit the combined, unchanged properties of the initial materials. The composition of the final product can be tuned by a variety of reaction- and particle parameters, including injection speed, aspect ratio, relative concentrations and the surface modification of the initial nanocrystals.

To test the biocompatibility of the encapsulated SNCs, cellular uptake studies were performed. The cellular uptake of the encapsulated QDs correlates with polymer size as well as functional groups on the exterior of the micelle. In serum free media the best shielded particles do not exhibit cellular uptake in A549 and RAW-264.7 cells, while the less shielded, smaller QDs do. This may be correlated with the entanglement of the hydrophobic block or may, simply, be explained by the size of the constructs. An efficient endosomal uptake in HeLa cells wihitn less than one hour can be achieved by maltose functionalization of the QDs' polymer micelle. Surprisingly, maltose functionalized QDs also exhibit cellular uptake in protein- and sugar-rich media.

Differently functionalized, encapsulated QDs bind to the sparse surface of gold nanocrystals under the formation of fluorescent-plasmonic nanohybrids. This self-assembly process can also be investigated with the fluorescence properties of the QDs, whose exciton decays faster due to the interaction with the gold nanoparticles' plasmon. Using emulsion polymerization and quasi-covalent binding between encapsulated QD and gold nanocrystal their distance can be adjusted and the size dependent interaction between exciton and plasmon may be studied. By exchange of the linking group and the use of lipoic-zwitterion stabilized gold nanocrystals the internal structure of the nanohybrid may be changed and the colloidal stability increased. As expected by the soft and hard bases model of Ralph Pearson, the PL-quenching decreased when lipoic acid was replaced by amine or carboxylic groups, respectively. An analysis of the time resolved fluorescence and the kinetics of this self-assembly process indicates, that the functional group-dependent properties may be explained by the average number of functional groups bound to the gold surface. Because the gold nanocrystals are stabilized by zwitterionic ligands the hybrids exhibit a very high colloidal stability. So they can be used in biological media, such as protein-rich cellular growth media. This was not possible with similar hybrids, who were based on citrate gold nanoparticles and the same QDs. Furthermore, these nanohybrids could be functionalized with maltose binding protein and a fusion protein therefrom. This functionalization uses metal-affinity interactions of polyhistidin, targeting free gold-surface sides in the hybrid. These fluorescent-plasmonic nanohybrids exhibit binding affinity towards maltose and efficient cellular uptake. The affinity to maltose was tested using a visual amylose column assay and cellular uptake was studied using means of confocal microscopy and flow cytometry. The confocal fluorescence microscopy results indicate, that the cellular uptake of these materials does not involve endocytotic pathways.

3 Einleitung

Nanomaterialien werden die Produktwelt folgender Generationen maßgeblich verändern. Nach Aussage von Rick Smalley, die bereits im Jahr 2005 getätigt wurde[17] und kürzlich in einem *Editorial Article* von Wolfgang Parak, Andre Nel und Paul Weiss — Editoren der bedeutenden nano-spezifischen Fachzeitschrift *ACS Nano* — aufgegriffen wurde,[18] gebe es für jede der weltweit größten Herausforderungen eine Antwort mit Hilfe der Nanotechnologie. Dies umschließt Themen wie Energie, Wasser, Ernährung, Umwelt, Armut, Terrorismus, Krieg, Krankheiten, Erziehung, Demokratie und (Über)-Bevölkerung. Woher kommt diese Euphorie; oder kann man es schon Hybris nennen?

Eine fortschreitende Miniaturisierung und das Studium der Eigenschaften von Materie im Laufe des 20. Jahrhunderts führten zu der Entdeckung, dass Materialien ihre Eigenschaften ändern, wenn man sie winzig (aus dem Griechischem *nanos* - Zwerg) klein macht. Diese teilweise unerwarteten und faszinierenden Eigenschaften führten dazu, dass zahlreiche Wissenschaftler aller Fachrichtungen sich mit der Beschaffenheit von Materie auf der Nanoskala befassten.[19] Diese Aussichten, gekoppelt mit einer wachstumsgehemmten Weltwirtschaft, den oben genannten Perspektiven und dem saloppen Motto „*Aus weniger Material mach mehr Eigenschaften*“ führten mit Sicherheit auch dazu, dass eine Vielzahl von nano-spezifischen Förderprogrammen aufgesetzt wurden. Heutzutage sind Nanomaterialien demnach schon feste Bestandteile einiger Produkte und in den Fokus der breiten Öffentlichkeit gerückt.

Seit der Geburtsstunde der Nanotechnologie beflügeln die neu generierten Eigenschaften die Phantasie der Wissenschaftler weltweit. Die noch 1966 unter dem Namen *Phantastic Voyage* als *Science Fiction* verfilmte Illusion, Menschen zu schrumpfen und mittels eines Mini-U-boots ins Innere eines Körpers zu senden, scheint heutzutage in Form von Nanopartikeln möglich — jedenfalls wenn man davon absieht Menschen zu schrumpfen und funktionelle Nanopartikel als *gezielt gesteuertes* Mini-U-boot ansieht.[19,20]

Die Geburtsstunde der Nanotechnologie ist nicht genau definiert, aber Michael Faraday hat bereits in Mitte der 1850er Jahre die Lichtstreuung von Gold-Kolloiden beschrieben.[21] Oft wird jedoch eine Rede von Richard Feynmann mit dem Thema *There is plenty of room at the bottom* aus dem Jahre 1959 referenziert, wenn es um die Geburtsstunde der Nanotechnologie geht. In dieser visionären Rede beschrieb Feynmann diverse miniaturisierte Technologien, wie zum Beispiel winzige Motoren, die zum großen Teil bereits realisiert wurden.[22] Seit Ende des 20. Jahrhunderts befindet sich das Feld der Nanowissenschaften in einem extrem dynamischen Wachstumsprozess. Die exponentiell wachsende Anzahl an Publikationen auf diesem Gebiet[23,24] führte zur Schaffung einer Vielzahl nano-spezifischer Fachjournale und Forschungszentren. Da Miniaturisierung in nahezu allen naturwissenschaftlichen Fachrichtungen zu finden ist, verschwimmt die Grenze zwi-

schen den *klassischen* naturwissenschaftlichen Disziplinen zunehmend und bahnbrechende Erfolge können in der Regel nur noch durch Kooperationen von Wissenschaftlern diverser Fachrichtungen erreicht werden. Weiterhin halten Nanomaterialien immer weiteren Einzug in Produkte des täglichen Bedarfs, da „*Aus weniger mach mehr*“ auch exzellent in wirtschaftliche Wachstumsstrategien passt. Produkte, die Nanopartikel enthalten, genießen aus vielerlei Hinsicht besondere Aufmerksamkeit,[25] und da derzeit noch keine Kennzeichnungspflicht für Nanoprodukte besteht, bietet der Bund für Umwelt und Naturschutz e.V. (BUND) auf seiner Homepage eine Auflistung der Waren, die Nanopartikel bzw. „Nanotechnologie“ enthalten. Jedoch sei hier angemerkt, dass der Mensch seit Anbeginn seiner Existenz nanopartikulären Substanzen ausgesetzt ist und dies die Exposition mit künstlichen nanopartikulären Systemen um ein Vielfaches überschreitet.[26,27]

Aus der dynamischen Entwicklung der letzten Jahrzehnte resultierte ein großer Wissenszuwachs auf nahezu allen Gebieten der Nanotechnologie. Aufgrund dieses Wissenszuwachses sind eine Vielzahl von exzellenten Übersichtsartikeln erschienen, die im Kapitel 4 auszugsweise vorgestellt werden. So wurden zum Beispiel auf dem Gebiet der Nanopartikelsynthese große Fortschritte[28] erzielt, jedoch geschah dies nicht ohne die Komplexität der Systeme zu verstehen, was mit der Generierung neuer Fragen einherging.[29] Der exponentielle Anstieg der erschienenen Publikationen ist jedoch kein Alleinstellungsmerkmal der Nanowissenschaften, sondern findet sich in nahezu allen wissenschaftlichen Disziplinen wieder.[23,24,30] Nach Kaski und Mitarbeitern ist die Obergrenze der menschlichen Aufnahmekapazität erreicht, sodass Wissenschaftler nicht mehr mit dem Wissensanstieg in ihrem Feld Schritt halten können und dass, lediglich auf Grund von der hohen Anzahl der Publikationen, die *Beachtungshalbwertszeit* sinkt und mehr Publikationen — unabhängig ihres Alters — „vergessen“ werden.[30] Weiterhin kommt es vor, dass lang geglaubte und oft referenzierte Konzepte korrigiert und gleichzeitig fundamentale Prozesse neu definiert bzw. interpretiert werden müssen.[31,32] Schlussendlich erfährt das Gebiet der Nanowissenschaften eine immer weiter fortschreitende Spezialisierung und Sättigung, die mit einer Abnahme von „echten“ Anwendungen in kürzlich erschienenen Publikationen einhergeht.[19,33] Dies äußert sich auch darin, dass eine „echte“ nanotechnologische Revolutionen — gemessen an der, ausgelöst durch das Internet, die Dampfmaschine oder die Erfindung von Antibiotika — bislang ausblieb.[19,34]

Was sind aktuelle Fragen, die ein solch dynamisches und spezialisiertes Forschungsfeld bewegen?

Seit den ersten Berichten über die prinzipielle Verwendung von fluoreszierenden Halbleiternanopartikeln (sog. Quantenpunkten QPs, oder engl. *quantum dots*, QDs) in biologischen Medien,[35] wird die Verwendung von QPs als Fluoreszenzmarker in biologischen Umgebungen und Organismen intensiv erforscht. Aufgrund diverser Vorteile[36] gegenüber organischen Farbstoffen, auf die im Kapitel 4.5 ausführlich eingegangen wird, werden QP heute für die Detektion einer Vielzahl von biologischen Parametern verwendet.[37–39] So kann zum Beispiel der Sauerstoff- oder Glucosegehalt beziehungsweise der Protonenkonzentration in Tumoren bestimmt werden.[40] Da hochqualitative QP in der Regel in organischen Lösungsmitteln synthetisiert werden und somit langkettige organische Reste tragen,

wurde eine Vielzahl von Phasentransfersystemen entwickelt, um QP in wässriger Lösung zu stabilisieren.[41] Grob können diese Systeme in zwei Gruppen unterteilt werden, dem Ligandenaustausch und der Einkapselung von QP, die sich vor allem in der Größe und der verwendeten Moleküle für den Phasentransfer unterscheiden.[41,42] Bei Ligandenaustauschreaktionen werden vornehmlich kleine Moleküle verwendet, die eine geringe Abschirmung der Partikel bewirken. Da Halbleiternanopartikel in der Regel toxische Schwermetallionen enthalten, deren Freisetzung zu Toxizität[43] führt, ist die Abschirmung der QP gegenüber der Umgebung essentiell für die Anwendung in biologischen Systemen. Zudem können viele körpereigene Substanzen wie z.B. Eisenionen die Fluoreszenz von QP löschen, was den Einsatz vor allem in niedrigen Konzentrationen erschwert und limitiert.[44] Sehr gut abgeschirmte QP sind von daher für sensitive Assays wünschenswert. Eine Analyse der Zugänglichkeit der QP für Fluoreszenz-löschende Substanzen, sog. Quencher, kann ebenfalls dazu genutzt werden, Informationen über die Dichtigkeit von nanoskaligen Membranen zu erhalten. Diese Informationen sind von grundlegendem Interesse: So könnte im biologischen Kontext die Durchlässigkeit dieser Nanomembranen ausgenutzt werden um *surface enhanced raman* (SERS) basierte Sonden darzustellen.[45,46] Weiterhin ist die Kontrolle von katalytischen Prozessen über die Zugänglichkeit denkbar.[47] Deshalb wird in dieser Arbeit ein Fluoreszenzlösch-Assay entwickelt, mit dem die Dichtigkeit von nanoskaligen Membranen untersucht werden kann. Weiterhin ist so eine Charakterisierung der Polymerhülle möglich, über deren mikroskopische Struktur noch wenig bekannt ist. Durch chemische Modifikation nach dem Phasentransfer ist es ebenfalls möglich die Dichtigkeit der QP umgebenden Membran zu modifizieren, was einerseits dazu benutzt wird, den Kationenaustausch des Nanopartikels im Inneren der Mizelle zu kontrollieren oder andererseits eine vollständige Abschirmung des Partikels zu erreichen. Diese hervorragende Abschirmung kann genutzt werden, um kupfer-katalyiserte 1,3-dipolare *Husigen* Cycloaddition an QP zu verwenden, welches in der Literatur lediglich an silicatverkapselten QP mit sehr dicken Hüllen beschrieben wurde.[48] Im Weiteren kann mit dieser Assay die Inhomogenität eines Nanopartikelensembles untersucht werden. Diese intrinsische Inhomogenität ist von grundlegendem wissenschaftlichen Interesse, da verschiedene Arten von Nanopartikeln in einem Ensemble sich unterschiedlich verhalten können, was als große Chance oder als Risiko gesehen werden kann.[49]

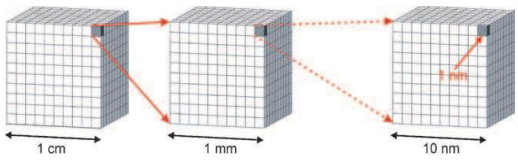
Durch den großen Fortschritt auf dem Gebiet der Nanopartikelsynthese[28] und der weit verbreiteten Kommerzialisierung von Nanopartikeln stehen heutzutage eine Vielzahl hochqualitativer Nanopartikel zur Verfügung. Die Kombination verschiedener Nanopartikel in einem gemeinsamen Konstrukt wird oft als Hybrid- beziehungsweise Kompositbildung bezeichnet. Diese neuartigen Hybridsysteme können einerseits dazu benutzt werden, um verschiedene physiko-chemische Eigenschaften in einem Konstrukt zu vereinen, die mit einem einzigen Material nicht — oder nur schwierig — kombiniert werden können. Andererseits können Hybridmaterialien dazu benutzt werden, die Interaktion zwischen den einzelnen Nanopartikeln, wie z.B. bei einem Selbstassemblierungsprozess, zu untersuchen.[50] Sowohl für die kontrollierte Hybridbildung als auch für das Studium der Interaktion von nanopartikulären Systemen wird in dieser Arbeit ein Lösungsvorschlag präsentiert.

4 Kenntnisstand

Die kumulative Dissertationsschrift hat zur Folge, dass eine Vielzahl von verschiedenen nanopartikulären Systemen synthetisiert, analysiert und verwendet wurden. In diesem Kapitel wird ein Überblick über die bearbeiteten Themenkomplexe gegeben. Dafür werden zunächst allgemein die Besonderheiten von Nanokristallen und deren Synthese beschrieben. Danach werden die Nanokristalle — geordnet nach ihren Eigenschaften — vorgestellt, die am häufigsten verwendet wurden. Diese sind magnetische Eisenoxidnanokristalle (FeONK, Kap. 4.3, S. 12 ff.), metallische Silber- und Gold Metallnanokristalle (Kap. 4.4, S. 15 ff.) und fluoreszierende Halbleiternanokristalle (HLNK, Kap. 4.5, 21 ff.). Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Darstellung, Verkapselung und Verwendung von fluoreszierenden Halbleiternanokristallen beruht, wird das Fluoreszenzverhalten dieser Konstrukte sehr ausführlich dargestellt (S. 31 ff). Weiterhin sind die dargestellten Partikel nahezu ausschließlich für den Einsatz als neuartige Therapeutika bzw. Theranostika optimiert wurden, und von daher wird am Ende dieses Kapitels ein Kurzüberblick über Nanomedizin und den Einsatz von nanopartikulären Systemen in Medizin und biologischer Forschung gegeben.

4.1 Besonderheiten nanoskaliger Objekte

Nanopartikel bzw. Nanokristalle sind Teilchen, deren laterale Ausdehnung in einer Raumrichtung 100 nm nicht übersteigt. Hierbei ist diese Grenze relativ willkürlich gewählt.[24] Die grundlegende Theorie der Quantenmechanik, und damit auch zur Beschreibung der Eigenschaften von Nanokristallen, ist der Welle-Teilchen-Dualismus. Dieser sagt aus, dass jedes Teilchen auch als Welle beschrieben werden kann.[51] Wenn die Größe eines physikalischen Systems mit seiner Wellenlänge korreliert, müssen seine Eigenschaften mit Hilfe der Quantenmechanik beschrieben werden.[52] Somit können sich Eigenschaften von makroskopischen Festkörpern und Nanokristallen mitunter deutlich voneinander unterscheiden. Das Edelmetall Gold katalysiert zum Beispiel die Oxidation von Kohlenmonoxid zu Kohlendioxid nur, wenn es nanoskalig auf einem Substrat abgeschieden ist.[53] Der Unterschied zwischen Nanokristallen und makroskopischen Festkörpern kann allgemein in drei Untergruppen[24] unterteilt werden: Den oberflächen- und größenabhängigen Partikeleigenschaften und den größenabhängigen Quanteneffekten.



Kantenlänge d. Würfel	Zahl d. Würfel	Volumen d. Würfel	Oberfläche d. Würfel
1 cm	1	1 cm^3	0.0006 m^2
1 mm	10^3	1 cm^3	0.006 m^2
1 µm	10^{12}	1 cm^3	6 m^2
1 nm	10^{21}	1 cm^3	6000 m^2

Abbildung 4.1: Zunahme der Oberfläche beim Zerlegen eines Würfels mit der Kantenlänge 1 cm zu 10^{21} Würfeln mit der Kantenlänge 1 nm.[24] Adapted with lisence. Copyright ©2010 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

4.1.1 Oberflächenabhängige Partikeleigenschaften

Bei den oberflächenabhängigen Partikeleigenschaften handelt es sich um Eigenschaften, die der makroskopische Festkörper besitzt, die jedoch erst im Nanokristall aufgrund der hohen Oberfläche merklich auftreten.[54] Die hohe relative Oberfläche wird an Abbildung 4.1 deutlich. In einem Gedankenexperiment wird ein Würfel mit der Kantenlänge 1 cm in 10^{21} Würfel mit der Kantenlänge 1 nm zerteilt. Bei gleichem Volumen besitzen die kleinen Würfel jedoch eine zehnmillionenfach höhere Oberfläche als der eine große Würfel. Der Anteil an Oberflächenatomen nimmt stark zu, wodurch die Eigenschaften der Oberflächenatome für die Gesamteigenschaften des Systems bestimmend werden.

4.1.2 Größenabhängige Partikeleigenschaften

Einige Eigenschaften von Nanokristallen bzw. nanostrukturierten Materialien können direkt mit ihrer geringen Abmessung erklärt werden. So sind einige nanostrukturierte Schichten zu dünn, um sichtbares Licht merklich zu streuen und erscheinen daher transparent. Dieser Effekt ist auch bei Sonnencreme zu beobachten, die — fein auf der Haut verteilt — als Beispiel für eine nanopartikuläre Dünnschicht angesehen werden kann, wohingegen dicke Schichten aufgrund von diffuser Mehrfachstreuung milchig-weiß erscheinen.[24]

4.1.3 Größenabhängige Quanteneffekte

Größenabhängige Quanteneffekte sind Effekte, bei denen die elektronische Struktur der Nanokristalle direkt von ihrer Größe abhängt. Ein Beispiel für größenabhängige Quanteneffekte ist der Größenquantisierungseffekt, der bei Halbleiternanokristallen auftritt. Die größenabhängigen Quanteneffekte lassen sich demnach nur mit den Gesetzen der Quantenmechanik beschreiben.

4.2 Synthese von kolloidalen Nanokristallen

Der Zugang zu Nanokristallen gelingt auf unterschiedlichste Weisen. Allgemein wird zwischen Auf- und Abbaureaktionen (sog. *bottom-up* bzw. *top-down* Verfahren)[22,24] unter-

schieden.[55] Im weiteren Verlauf dieses Kapitels soll allgemein auf die Synthese von kolloidalen Partikeln bzw. Kristallen eingegangen werden.[56] Nanokristallsynthesen und organische Molekülsynthesen haben einige Gemeinsamkeiten, weisen jedoch auch grundlegende Unterschiede auf. In der Regel können Modelle, die für organische Synthesen gelten, nur auf Nanokristallsynthesen angewendet werden, wenn alle möglichen Reaktionen gleichzeitig ablaufen und reversibel sind.[57] Da dies jedoch auf die wenigsten Nanokristallsynthesen zutrifft und kinetische Effekte, also aufeinander folgende, verkettete Reaktionen einen maßgeblichen Einfluss auf das spätere Produkt haben, sind Nanokristallsynthesen oftmals anspruchsvoll und schwer reproduzierbar. Diese aufeinander folgenden, verketteten Reaktionen können zudem nicht mit einfachen kinetischen Modellen beschrieben werden, was ihre Untersuchung bis heute schwierig macht und ein Hauptproblem für die reproduzierbare Synthese darstellt.[58]

Victor LaMer und Robert Dinegar veröffentlichten 1950 eine allgemeine Beschreibung der Synthese von einheitlichen Kolloiden. Dies geschah am Beispiel von Schwefel Nanobeziehungsweise Mikropartikeln, die aus Natriumthiosulfat mit Salzsäure in verdünnter Lösung gewonnen wurden.[56] Demnach gibt es in einer Kolloidsynthese drei Phasen, die in Abb. 4.2 mit I, II und III gekennzeichnet sind. In der Phase I erreicht das System den übersättigten Bereich II, sobald die Konzentration der Vorläuferverbindungen über c_{min} steigt. In Phase II setzt die Keimbildung ein. Diese Phase II ist für die spätere Qualität and Polydispersität der Kolloide maßgeblich verantwortlich und stellt somit einen Schlüsselschritt in der Kolloidsynthese dar. Da die Keimbildungsgeschwindigkeit sehr stark abhängig ist von (lokalen) Konzentrationsänderungen, ist Phase II die Hauptschwierigkeit für reproduzierbare Kolloidsynthesen.[59,60]

Sobald die Nukleation, die in der Regel eine sehr schnelle Reaktion ist, eingesetzt hat, werden Vorläuferverbindungen verbraucht und deren Konzentration sinkt unter c_{min}. Sobald dies geschieht, findet nahezu keine Nukleation mehr statt und die Kolloidsynthese geht über in die Wachstumsphase (Phase III). In Phase III wird die Wachstumsgeschwindigkeit durch eine Balance zwischen chemischer Reaktion und Diffusion bestimmt, was verdeutlicht, dass eine homogene Durchmischung für Kolloidsynthesen unabdingbar ist. Praktisch muss hier ein Gleichgewicht zwischen Rührgeschwindigkeit und den daraus resultierenden Scherkräften gefunden werden, da hohe Scherkräfte die kolloidale Stabilität von Nanopartikelemulsionen verringern können. Eine auftretende Nukleation in der Wachstumsphase III wird auch als Sekundärnukleation bezeichnet und sollte vermieden werden, wenn eine möglichst hohe Einheitlichkeit des Produktes erreicht werden soll. In einer Kolloidsynthese muss somit die Keimbildung und

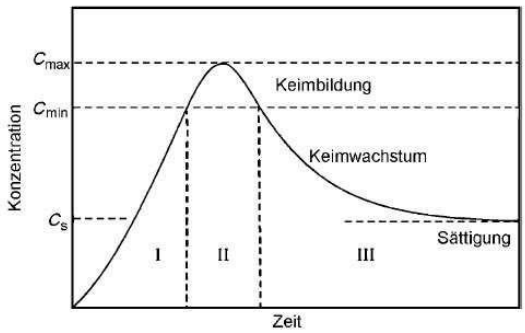


Abbildung 4.2: Kristallisation von QDs in drei Phasen: Konzentration der Vorläuferverbindungen in Abhängigkeit der Zeit.[24] Adapted with permission from[56]. Copyright ©1950 American Chemical Society.

das Keimwachstum kontrolliert werden. Dies wird in der Regel durch verschiedene Synthesestrategien erreicht, die im weiteren Verlauf dieses Abschnittes und in Kapitel 4.4.2 (S. 17 ff.) sowie in Kapitel 4.5.1 (S. 21 ff.) diskutiert werden.

Bei der Keimbildung handelt es sich aufgrund von Oberflächenspannung des Lösungsmittels, dem Entfernen von Solvathüllen und dem Bindungsbruch der Ausgangsverbindungen, um einen endothermen Prozess, wohingegen das Keimwachstum einen exothermen Prozess darstellt.[23,24] Oberflächenatome sind besonders reaktiv (vgl. Kap. 4.8, S. 44 ff) und da alle Systeme einen Zustand minimaler Energie anstreben, ist eine intrinsische Eigenschaft von Nanokristallen zu agglomerieren, wenn sie unzureichend stabilisiert sind. Aufgrund der Endothermie der Keimbildung werden bei hohen Reaktionstemperaturen in der Regel mehr Keime gebildet, was zu einer Bildung vieler kleiner Kristalle führt. Kleine Nanokristalle sind aufgrund des höheren Oberflächen-Volumenverhältnisses energetisch ungünstiger als große Kristalle. Dies wird bei der *hot injection* Methode ausgenutzt, die in Kapitel 4.5.1 vorgestellt wird. Wachsen größere Kristalle auf Kosten von kleinen Kristallen, wird von Ostwaldreifung gesprochen. Die Ostwaldreifung kann dazu genutzt werden eine geringe Größenverteilung der Produkte zu erhalten.[61]

Die Größe der Nanokristalle kann somit auch nach der Keimbildung beeinflusst werden: Eine Erhöhung der Reaktionszeit, beziehungsweise eine weitere Zugabe von Precursor führt zu der Bildung größerer Nanokristalle. Die Erhöhung der Stabilisatorkonzentration führt in der Regel zu kleineren Kristallen, da die Stabilisatoren die reaktiven Stellen an der Oberfläche besetzen und so der Wachstumsprozess verlangsamt wird.[62] Stabilisatoren können ebenfalls auch anisotropes Wachstum begünstigen (vgl. Kapitel 4.4.2.1).

Eine nicht auf diffusionskontrolliertem Wachstum basierende Synthese von einheitlichen Nanopartikeln aller Art wurde von Xinchang Peng *et al.* 2013 in *Nature Nanotechnology* vorgestellt. Die Autoren benutzen Mizellen aus sternförmigen Block-Copolymeren als Reaktionsraum für die Synthese einer Vielzahl von Nanokristallen.[63] Durch diesen Reaktionsraum ist das Wachstum limitiert und somit gelten einige der von Victor LaMer und Robert Dinegar vorgenommenen Annahmen nicht mehr. Dieses Beispiel zeigt, dass Diffusion von Substanzen in Polymeren Matrizes z.B. in darin ausgebildete Poren ein grundlegender und wichtiger Vorgang für nanotechnologische Prozesse sein kann.

4.3 Magnetische Nanokristalle am Beispiel der Eisenoxidnanokristalle

Magnetische Nanokristalle finden bereits seit nahezu einem halben Jahrhundert Anwendung als Kontrastmittel.[64] Es gibt somit eine Vielzahl von magnetischen Nanokristallen, die nicht im Einzelnen vorgestellt werden. Stellvertretend für magnetische Nanokristalle werden Eisenoxidnanokristalle (FeONK) vorgestellt, welche aufgrund von relativ niedrigem Preis der Ausgangsmaterialien, chemischer Inertheit und sehr niedriger Toxizität die am meist erforschten magnetischen Nanokristalle darstellen.[64,65] Aktuelle Anwendungsfelder für FeONK haben sich unter anderem auf Theranostik, Chemotherapie und magnetische Hyperthermie ausgeweitet, die teilweise bereits schon in der klinischen Forschung[66] getestet werden.[64–68] Neben der medizinischen Forschung wird eine Verwendung von FeONK ebenfalls in Erwägung gezogen um durch ihre magnetischen Eigenschaften Katalysatoren oder Schmutz aus Gewässern abzutrennen.[67,69,70] Eine weitere

Anwendungsmöglichkeit sind magnetische Speichermedien, magnetische Farben bzw. Pigmente und Elektroden.[67]

4.3.1 Magnetismus von Eisenoxidnanokristallen

Magnetismus ist ein kollektives Phänomen, das die Reaktion eines Materials in einem externen Magnetfeld beschreibt. Im Nachfolgenden wird auf den Magnetismus von Festkörpern und Nanostrukturen eingegangen, der sich in fünf Untergruppen einordnen lässt: Den Diamagnetismus, Paramagnetismus und Ferrimagnetismus sowie Ferromagnetismus und den Antiferromagnetismus. Alle bekannten Substanzen zeigen Diamagnetismus, wohingegen lediglich Substanzen mit ungepaarten Elektronen die anderen Formen des Magnetismus aufweisen. Wird eine Substanz, die nur gepaarte Elektronen aufweist, in ein externes Magnetfeld gebracht, so wird in der Elektronenhülle der Atome ein Strom erzeugt, dessen Magnetfeld dem Äußeren entgegen wirkt (Lenzsche Regel).[71,72] Weisen Substanzen ein magnetisches Moment auf, das üblicherweise von ungepaarten Elektronen hervorgerufen wird, so richten sie sich parallel zum externen Feld aus, was zu einer Verstärkung dessen führt.[58,71] In der Regel sind die einzelnen magnetischen Einheiten (Moleküle) voneinander isoliert und die Brownsche Bewegung bzw. die thermische Relaxation wirkt der induzierten Ordnung entgegen, weswegen paramagnetische Effekte mit steigender Temperatur abnehmen. Der Ferromagnetismus kommt in einigen metallischen Festkörpern vor. In diesen sind die magnetischen Momente benachbarter Bereiche nicht unabhängig und daher kommt es zur Ausbildung sog. Weissscher Bezirke, die bis zu Mikrometer große Domänen mit einer magnetischen Vorzugsrichtung beschreiben. Die Größe dieser Bezirke wird unter anderem von der Austauschenergie der Spins bestimmt.[73] Weisssche Bezirke sind im Material jedoch statistisch verteilt, was zu einem makroskopisch nicht magnetischen Festkörper führt. Wird jedoch ein externes Magnetfeld angelegt, so richten sich die einzelnen Bezirke dazu parallel aus und die Magnetisierung bleibt auch nach dem Abschalten dieses externen Feldes erhalten. Dies führt zu der typischen Hysteresekurve von ferromagnetischen Materialien.[58,72,74,75] Wird der Stoff anschließend über seine Curietemperatur (T_C) erhitzt, so löst sich die Magnetisierung durch Ausbildung von Weissschen Bezirken und unter Aufhebung der magnetischen Vorzugsrichtung wieder auf.[76] Der Ferrimagnetismus ist dem Ferromagnetismus sehr ähnlich, jedoch wechselwirken die einzelnen magnetischen Zentren miteinander und die elementaren Spins sind anti-parallel ausgerichtet. Dies führt zu einem, im Vergleich zum Ferromagnetismus, geringerem magnetischen Moment. Antiferromagnetismus bezeichnet die spontane antiparallele Ausrichtung der magnetischen Momente, welche sich in unmagnetisierten Weissschen Bezirken äußert.[71,72,74,75,77] Wenn antiferromagnetische Stoffe oberhalb ihrer Néeltemperatur (T_N) aufgeheizt werden, weisen sie paramagnetisches Verhalten auf. Dies bedeutet, dass durch die Temperaturabhängigkeit der Magnetisierung Informationen über die interne magnetische Struktur und somit kristalline Informationen der Materialien gewonnen werden können.

FeONK weisen aufgrund ihrer geringen Größe vom makroskopischen Festkörper unterschiedliche Eigenschaften auf: Unterschreitet die FeONK eine bestimmte Größe (ca. 20 nm), weisen sie Superparamagnetismus auf. Die eigentlich ferromagnetischen Stoffe

weisen keine stabile Magnetisierung unterhalb der Curietemperatur auf, was auf die Anisoropieenergie zurückzuführen werden kann.[73] Die Anisotropieenergie ist proportional zum Volumen, und wenn diese so klein ist, dass die thermische Energie sie übersteigt, kann das magnetische Moment fluktuieren. Anders ausgedrückt kann das magnetische Moment durch die thermische Energie des Partikels gedreht werden. Durch diese leichte Drehbarkeit des magnetischen Moments, weisen superparamagnetische Stoffe keine Hysterese auf.[64] Die Temperatur unter der superparamagnetische Stoffe ihre Magnetisierung für eine bestimmte Zeit halten können, wird *Blockingtemperatur* (T_B) genannt. Wie bei allen nanopartikulären Systemen haben Oberflächenatome und Liganden einen wesentlichen Einfluss auf den Magnetismus von FeONK.[74] So wird zum Beispiel die äußerste Hülle von FeONK als magnetisch inaktiv beschrieben, was die Gesamtmagnetisierung limitiert.[74,78] Wie im makroskopischen Festkörper, so haben auch die mindestens 16 existierenden Eisenoxide — darunter Oxide, Hydroxide und Oxyhydroxide — einen Einfluss auf die magnetischen Eigenschaften. Da diese Phasen kristallographisch mitunter schwer voneinander zu unterscheiden sind, ist eine generelle Aussage über magnetische Eigenschaften von FeONK nur anhand der Nanokristallgröße und -form nicht möglich.[64,67] Werden jedoch FeONK eines Kristallgittertyps miteinander verglichen, so wird beobachtet, dass die Sättigungsmagnetisierung mit abnehmender Größe der FeONK ebenfalls abnimmt, was mit der magnetisch-inaktiven äußeren Nanokristallschale assoziiert ist.[74]

Aufgrund ihres magnetischen Verhaltens werden FeONK zur Hyperthermie und als NMR Kontrastmittel verwendet. Hierbei wirken FeONK als T_1 und T_2-Kontrastmittel, welche unterschiedliche Relaxationsprozesse von benachbarten Protonen beschreiben.[65,74] T_1 und T_2 stellen dabei die mit den verschiedenen Relaxationsprozessen spezifischen Zeitkonstanten dar, die im Nachfolgenden ebenfalls als Charakteristikum für den jeweiligen Relaxationsweg benutzt werden.[65,74] T_1 stellt die sog. longitudinale Relaxation dar, die eine Umorientierung der Spins zum thermischen Gleichgewicht beschreibt. Hierbei wird Energie (i.d.R. Wärme) durch dipolare Kopplung mit Protonen in der Umgebung dem System entzogen. Isolierte Protonen weisen somit eine entsprechend langsame T_1-Relaxation auf. Die sog. transversale Relaxation T_2 beschreibt das Auseinanderlaufen, also die Dekohärenz (eng. *decoherence*) der Spins. Diese wird durch gegenseitige Wechselwirkung und durch die Wechselwirkung mit externen, fluktuierenden magnetischen Feldern hervorgerufen. Aufgrund ihres superparamagnetischen Verhaltens, also der sich stetig ändernden magnetischen Vorzugsrichtung, rufen FeONK üblicherweise eine höhere T_2 als T_1 Relaxation hervor.[65,74]

4.3.2 Synthese von anisotropen Eisenoxidnanokristallen und Clustern von Eisenoxidnanokristallen

Es gibt verschiedene Methoden um FeONK herzustellen, die von Fällung über Sol-Gel Reaktionen, thermische Zersetzung, Biosynthesen bis hin zu Mikrowellensynthesen nahezu alle Möglichkeiten der chemischen Synthese umspannen. Diese Syntheserouten sind in den Übersichtsartikeln der Arbeitsgruppen um Rajan Jose bzw. Woo-Sik Kim ausführlich dargestellt.[64,67] Dadurch, dass FeONKe ein wichtiger Baustein für zukünftige Materialien

sind, wurde die Synthese für sphärische FeONK bereits so optimiert, dass sie in — für Nanokristallsynthesen — großen Mengen von bis zu 40 g hergestellt werden können.[79] Demzufolge ist die Synthese von sphärischen FeONKn schon umfassend verstanden und optimiert worden.[80,81] Dem entgegen gelang die Darstellung von sehr kleinen, stäbchenförmigen FeONKn bislang nicht in zufriedenstellender Ausbeute bzw. Qualität.[82–87] Die Darstellung dieser Strukturen ist von besonderem Interesse, da große Strukturen die für biologische Systeme inhärent limitierenden Größenordnungen überschreiten können und da die magnetischen Eigenschaften von FeONK auch von deren Form abhängen.[64,88]

Trotz des Überschreitens dieses Größenlimits ist die Darstellung von Clustern mehrerer FeONK für das Verstehen von magnetischer Kommunikation in einem Partikelaggregat interessant, da für diesen Prozess generelle Konzepte erst erarbeitet werden müssen. Weiterhin weisen diese Partikel einstellbare Eigenschaften auf, die bei einzelnen FeONK schwer darzustellen sind.[89,90] Weil die Synthese von elongierten FeONK und von FeONK Clustern lediglich ein kurzes Seitenprojekt dieser Doktorarbeit darstellt, sei hier auf die ausführliche Darstellung von Athanasia Kostopoulou und Alexandros Lappas verwiesen.[89]

4.3.3 Anwendung von FeONK *in vivo* und *in vitro*

Maghemit und Magnetit gelten als untoxische Formen von FeONK und eignen sich deshalb besonders für Anwendungen im lebenden Körper und in Zellen.[67] Einzig die hohe Eisenkonzentration im Körper, die entsteht, wenn die FeONK abgebaut werden, gilt als medizinisch bedenklich.[65] Dadurch, dass einheitliche FeONK in der Regel in organischen Lösungsmitteln dargestellt werden müssen, ist ein Phasentransfer in wässriges Medium nötig, wobei alle in Kapitel 4.8.1 dargestellten Methoden bereits Verwendung gefunden haben.[41,67,68]

Eisenoxidnanokristalle werden aufgrund ihres superparamagnetischen Verhaltens üblicherweise als T_2 Kontrastmittel, als magneto-thermischer Vermittler und als Träger für Wirkstoffe verwendet, was ausführlich von den Arbeitsgruppen um Taeghwan Hyeon und Wolfgang Parak zusammengefasst wurde.[65,74]

4.4 Metallnanokristalle am Beispiel der Gold Nanokristalle

In diesem Abschnitt werden die Eigenschaften von Goldnanokristallen (AuNK) diskutiert, die hier beispielhaft für alle Arten von plasmonischen Metallnanokristallen behandelt werden. AuNK weisen eine Vielzahl von einzigartigen, optischen Eigenschaften auf, die Wissenschaftler schon seit langer Zeit faszinieren. Sie weisen einen hohen Lichtstreuquerschnitt und lokalisierte Oberflächenplasmonen auf, was schon früh dazu geführt hat, dass sie als Färbemittel von Kirchengläsern benutzt wurden. Das Zusammenspiel von Absorptions- und Streuprozessen führt dazu, dass eine Suspension von AuNK je nach Blickwinkel in unterschiedlichen Farben erscheint. Dies wurde erstmals Mitte des 19. Jahrhunderts von Michael Faraday erkannt und untersucht.[21] Im frühen 20. Jahrhundert befassten sich viele Wissenschaftler mit der Wechselwirkung von Licht mit Goldnanokristallen, was zu der Entdeckung neuer physikalischer Prinzipien führte[91,92] Auch 100 Jahre

nach diesen bahnbrechenden Entdeckungen, wird heutzutage eine Vielzahl neuer Phänomene auf dem Gebiet der *Nanoplasmonics* gemacht, die kürzlich in einer Sonderausgabe von *Chemical Society Reviews* diskutiert wurden.[93] Unter anderem werden plasmonische Materialien dazu benutzt, um Licht einzufangen und auf Nanoebene zu fokussieren.[94,95] Das Jahr 2015 wurde von den Vereinten Nationen als *Jahr des Lichts und der lichtbasierten Technologien* proklamiert, was das breite Interesse an diesen Materialien und *Nanoplasmonics* aufzeigt. All diese Entwicklungen wurden unter anderem durch eine enorm verbesserte Formkontrolle von AuNKs möglich, mit der eine Vielzahl von verschiedenen AuNK Formen und Größen synthetisch zugänglich gemacht wurde. Gleichzeitig eröffnete sich hier ein sehr interessantes Forschungsfeld für Grundlagenforschung.[29,57,95] Durch sehr geringe Toxizität und photothermischem Verhalten werden AuNK eine führende Rolle in zukünftiger Krebsdiagnosktik und Therapie zugeschrieben.[96,97]

4.4.1 Wechselwirkung von Goldnanokristallen mit Licht

Wechselwirkt Licht mit AuNKn kann es zu zwei verschiedenen Effekten kommen, entweder wird das Licht gestreut oder absorbiert. Wird eine AuNK Lösung mit weißem Licht bestrahlt, streuen die AuNK konzentrations-, größen- und formabhängig Licht, so dass die Lösung eine, mit Fluoreszenz vergleichbare, Emissionsfarbe aufweisen kann.[98,99] Weiterhin werden bei der Interaktion von AuNK mit Licht Plasmonen, die kollektive Schwingung von Elektronen, angeregt. Dies kann dafür genutzt werden, um die AuNK Umgebung aufzuheizen, was die Grundlage für das photothermische Verhalten der AuNK ist.[97] Die Farbigkeit von AuNK Lösungen wurde von Gustav Mie 1908 theoretisch beschrieben, indem er die Maxwell-Gleichungen dieses Systems löste.[91,92]

Durch die Wechselwirkung von Licht und AuNK können ebenfalls hochenergetische Elektronen in der Umgebung von AuNK entstehen, was Anwendungen in der Katalyse ermöglicht.[53,100] Diese entstehen durch Kollision von Leitungsbandelektronen mit den Atomrümpfen bzw. Wechselwirken mit den Phononen.[33,100,101] Es wird hierbei jedoch auch eine Wechselwirkung des Plasmons mit anti-bindenden Orbitalen, die die Moleküldissoziationen vereinfacht, diskutiert.[100,101] Es ist ebenfalls möglich, dass diese Elektronen auch mit für den Zelltod verantwortlich sind, der üblicherweise dem photothermischem Verhalten zugeschrieben wird.[102–104] Die Generierung von solchen Elektronen bzw. Radikalen ist stark von der Natur der einfallenden Strahlen abhängig, was die Grundlage für multifunktionale Therapieansätze liefern könnte.[100,102]

4.4.1.1 Lichtstreuung, Absorption und lokalisierte Plasmonen

Die Farbigkeit von AuNK-Dispersionen kann mit Hilfe der von Gusav Mie im Jahre 1908 beschrieben Theorie erklärt werden.[61,92] Unter der Annahme von sphärischen AuNKn und unendlicher Verdünnung beschrieb er den Unterschied zwischen Absorption und Streuung: Cluster weniger Goldatome weisen eine Absorption im ultravioletten Spektralbereich auf (>2.5 eV), die als Zwischenbandübergang bezeichnet wird (engl. *interband-transition*).[33] Der Zwischenbandübergang ist verantwortlich für die Absorption von kleinen AuNK (bis ca. 2 nm), die keine plasmonische Resonanz aufweisen. Überschreitet ein

Nanokristall die Größe von ca. 200 Atomen, entsteht ein neues System, in dem sich Elektronen relativ frei bewegen können. Diese Größe entspricht in etwa der Nichtlokalitätslänge, die sich aus der Fermigeschwindigkeit eines Elektrons von v_F=$2 * 10^6$ m/s und der Hälfte einer optischen Oszillation (ca. 1 fs) ergibt.[95] Die Resonanz dieses Systems liegt im sichtbaren Bereich (<2.6 eV) und ist durch Streu- und Emissionseffekte mitverantwortlich für die Farbigkeit der AuNK Dispersionen.[33] Dispersionen von kleinen AuNK (d<50 nm) erscheinen Rot, da das Absorptionsmaximum des lokalisierten Oberflächenplasmons im Grünen liegt, was 1904 bereits von James Clark Maxwell Garnett beobachtet wurde.[91] Größere AuNK erscheinen blau,[61] da Reflektions- und Streuprozesse im roten und gelben Spektralbereich überwiegen, was bisher nur anhand der Mie-Theorie erklärt werden kann. Plasmonen sind propagierende elektromagnetische Wellen, die an ein Elektronengas, das auch als Elektronenplasma beschrieben werden kann, koppeln. Sie entstehen typischerweise an einer Metall/Dielektikum-Grenzfläche. Lokalisierte Plasmonen sind andererseits nicht-propagierende Anregungen von Leitungselektronen eines Goldnanokristalls, die an ein externes Feld koppeln.[95,105] Dies ist Folge der gekrümmten Goldoberfläche, die eine direkte Anregung der Leitungselektronen erlaubt. Sind sphärische Goldnanokristalle klein im Vergleich zur Wellenlänge des Licht, mit dem sie wechselwirken ($r \ll \lambda$) und wird quasi-statisches Regime angenommen, so lässt sich die Resonanzfrequenz mit Gleichung 4.1 schreiben.[106] Hier ist ϵ_0 die Permittivitätskonstante des Vakuums, m_e die Ruhemasse des Elektrons und r_s der Wigner-Seitz Radius, der dem Radius einer Kugel des makroskopischen Festkörpers mit gleicher Anzahl Valenzelektronen entspricht.

$$\omega_1 = \sqrt{\frac{e^2}{m_e 4\pi\epsilon_0 r_S^3}} \tag{4.1}$$

Hierbei wird davon ausgegangen, dass Licht als elektromagnetische Welle eine Ladungsverteilung im Nanokristall induziert, welche eine linear korrelierende Rückstellkraft erfährt. Elektronen im Leitungsband bewegen sich mit der einfallenden optischen Welle, und auf der entgegengesetzten Seite des Nanokristalls entsteht eine positive Partialladung, welche für die Rückstellkraft verantwortlich ist.[95] Obwohl alle Elektronen schwingen, werden die Eigenschaften maßgeblich von den Oberflächenbegebenheiten bestimmt, da die Elektronen in gewissem Maße in das umgebende Medium eindringen und die positive Partialladung ebenfalls mit der Umgebung wechselwirkt. Im Vergleich zum makroskopischem Festkörper, das sich wie ein Relaxator verhält, verhalten sich Metallnanokristalle wie ein Oszillator. Gustav Mie erweiterte Gleichung 4.1 und formulierte eine für alle Kugelgrößen gültige Theorie der Lichtstreuung.[92] Die Sensitivität der Oberflächenplasmonen für ihre Umgebung kann zur Bestimmung des Brechungsindexes der Umgebung genutzt werden.[33]

4.4.2 Synthese von Gold Nanokristallen

Die meist genutzte Strategie AuNK herzustellen ist die Reduktion von Tetrachloroaurat. Als eine Standardsynthese hat sich das 1951 von Turkevich *et al.* publizierte Protokoll durchgesetzt, das Natriumcitrat als Reduktionsmittel und Tetrachlorgoldsäure als Vorläuferverbindung verwendet.[107] Diese Methode erlaubt die Synthese von einheitlichen

Goldnanokristallen. Trotz der Einfachheit dieses Protokolls, ist der Mechanismus dieser Reaktion noch nicht vollständig verstanden und zum Teil schwer reproduzierbar. Demzufolge erschienen in den letzten Jahren eine Vielzahl von Verbesserungen und Analysen dieses Prozesses.[108,109] Eine aktuelle Zusammenfassung des Standes der Goldnanokristallsynthese wurde kürzlich von Didier Astruc und Mitarbeitern veröffentlicht.[110]

Eine weitere Methode AuNK kontrolliert herzustellen gelingt mittels einer Kombination einer saatinduzierten Synthese (*seeded growth*) und der kinetischen Kontrolle des Wachstums.[61] Durch das Verhindern von Sekundärnukleation und der Kontrolle von Ostwaldreifung gelingt so eine nahezu stufenlose Größenkontrolle sphärischer AuNK bis hin zu einem Durchmesser von 200 Nanometern.

Die Reduktion von Goldsalzen in der Anwesenheit von stabilisierenden Liganden ermöglicht eine Kontrolle der Wachstumskinetiken. Über das Verhältnis von Ligand zu Goldsalz kann somit die gewünschte Größe der AuNKe eingestellt werden.[111] Da die Rolle von Citrat auf der AuNK-Oberfläche noch nicht hinreichend geklärt ist und Berichte über die nicht vollständige Entfernung von Citrat — selbst bei der Verwendung von Thioliganden[112] — existieren, gibt es Bestrebungen, Liganden-freie Nanokristalle mittels Laserabscheidung darzustellen.[113] Dieses Verfahren ist auch aufgrund seiner leichten Skalierbarkeit interessant, jedoch liefert es noch nicht die gezielte Größen- und Formkontrolle wie nass-chemische Synthesen. Trotz der besseren Größen- und Formkontrolle in nass-chemischen Synthesen, zeigt eine 2008 von Danielle Smith und Brian Kogel veröffentlichte Studie, dass die Bezugsquelle der einzelnen Chemikalien einen signifikanten Einfluss auf Form und Größe der synthetisierten AuNK hat.[114] Die Autoren berichten, dass bei Synthese von Goldnanostäbchen unter der Verwendung von Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ähnlicher Reinheit, welches von zehn verschiedenen Herstellern bezogen wurde, lediglich bei sieben Versuchen die Darstellung von Nanostäbchen gelang. Innerhalb dieser sieben gelungenen Versuche variierte das Aspektverhältnis der Goldnanostäbchen (AuNRs) zudem stark.[114] Dies zeigt erneut, dass kinetische Effekte, die durch Verunreinigungen entstehen können, einen massiven Einfluss auf die Synthese von Nanokristallen haben können.

4.4.2.1 Formkontrolle von Gold Nanokristallen und anisotropes Wachstum

Da die oszillierende Schwingung der Elektronen in Metallnanokristallen (MNK) form- und größenabhängig sind, ist für die gezielte Darstellung von plasmonischen Bauteilen eine Formkontrolle der AuNK vonnöten. Demzufolge wurde in den letzten Jahren auch die Darstellung von AuNK in Form von flachen Dreiecken,[115] Stäbchen,[116] Scheiben,[117] hohlen Sphären,[118] und Sternen[119] beschrieben und deren Eigenschaften analysiert. Eine detaillierte Übersicht über die Formkontrolle von AuNK kann der Literatur entnommen werden.[120] Ein Großteil der Synthesestrategien von anisotropen Nanokristallen basiert auf dem selektiven Blockieren einzelner Kristallfacetten, das zu anisotropem Wachstum führt. Die Formgebung ist massiv von thermodynamischen (z.B. Reduktionspotenzial, Oberflächenbelegung, Temperatur) und kinetischen (z.B. Konzentration, Stofftransport in Lösung, Zugänglichkeit der Kristallfacetten) Größen bestimmt.[57] Deshalb wird im

Nachfolgenden beispielhaft lediglich auf die thermodynamische Kontrolle des Wachstums von elongierten Goldnanostäbchen eingegangen.

Allgemein wird beim anisotropen, thermodynamisch kontrollierten Wachstum davon ausgegangen, dass eine Substanz selektiv auf eine Kristallfacette des Nanokristalls bindet, und sie somit für ein weiteres Wachstum blockiert. Demzufolge ist die Kristallstruktur des gebildeten Nanokristalls bzw. des Ausgangsnanokristalls, sowie seine Oberflächenchemie und die Bindungskonstanten zwischen den jeweiligen Kristallfacetten und den beteiligten Spezies essentiell für eine detaillierte Beschreibung anisotropen Wachstums.

Zur Bildung von AuNRs wird in der Regel eine *seeded growth*-basierte Synthese verwendet, bei der 1-2 nm große, sphärische AuNKe als Saat dienen. Zudem sind CTAB und Silbernitrat entscheidend für das anisotrope Wachstum und werden zugegeben. Als Reduktionsmittel für das Goldstäbchen-Wachstum wird Ascorbinsäure verwendet, die ein mildes Reduktionsmittel darstellt und somit zu einer verringerten Reduktionsgeschwindigkeit führt. Die AuNK, die als Saatpartikel eingesetzt werden, bestimmen maßgeblich die Struktur der AuNRs. Generell werden zwei Arten von AuNRs unterschieden, Einkristall-AuNRs, und sogenannte *pentatwinned*-AuNRs. Einkristall-AuNRs sind in der Regel kleiner und kürzer und werden in der Anwesenheit von Silbersalzen unter der Verwendung von Einkristall-AuNK Saatpartiklen, die bereits mit CTAB stabilisiert sind, synthetisiert. Sie bestehen aus einem durchgehenden Kristallgitter und weisen oktagonale Querschnittsflächen und hoch indizierte, äußere Facetten auf.[121] *Pentatwinned*-AuNRs hingegen, sind in der Regel größer, können größere Aspektverhältnisse aufweisen und werden silberfrei, unter Verwendung von citratstabilisierten AuNK-Saatpartikeln, synthetisiert. Sie weisen eine pentagonale Grundfläche und fünf {111}-Zwillingsdefekte auf.[122] Im Weiteren wird auf die Synsthese von Einkristall-AuNKn eingegangen, eine ausführliche Beschreibung ist der Literatur zu entnehmen.[123,124]

Einkristall-AuNK weisen {100}, {110}, {111}, {211} und {520} Facetten auf. Theoretische Studien an diesem System deuten an, dass keines der vorhandenen Anionen alleine für die Symmetriebrechung und das anisotrope Wachstum verantwortlich sein können.[125] Die Bindung der Halogenide ist nahezu gleich stark an die vorhandenen AuNK-Facetten und entweder zu schwach (Chlorid, Bromid) oder zu stark (Iodid) um anisotropes Wachstum zu initiieren. Somit kann lediglich ein Komplex aus Silber(I), Bromid und CTAB das Wachstum dirigieren.[125] Eine Adsorption von $[AgBr_2]^-$-CTA auf der {100}- Facette der AuNKe unter Erhalt der umgebenden CTAB-Mizelle liefert die benötigte Energie, um das Wachstum in dieser Richtung zu hindern. Dies geschieht ausschließlich auf der {100} Facette, da Silberbromid hier epitaktisch aufwachsen kann, was die hohe Bindungsenergie erklärt. Wie synthetisch anspruchsvoll diese Synthese in Bezug auf die Reproduzierbarkeit ist, wird in einem aktuellen *Feature Article* von Leonardo Scarabelli *et al.* dargestellt.[123,124] Wie einem anderen, kürzlich erschienenen Artikel zu entnehmen ist, ist die Geometrie solcher Einkristallnanostäbchen auch unter extremen Bedingungen, wie in einem Rastertransmissionselektronenmikroskop (REM, oder STEM, von *scanning transmission electron microscope*) ausgesprochen stabil, obwohl es zu einer signifikanten Bewegung von Atomen auf der Oberfläche kommt, was die thermodynamische Stabilität dieser Einkristallnanostäbchen unterstreicht.[126]

4.4.3 Verwendung von elektromagnetischer Feldverstärkung von gekoppelten Metallnanokristallen - *surface enhances raman scattering*

Die Verwendung von plasmonischen Nanokristallen beruht insbesondere auf der oben beschriebenen Eigenschaft, mit Hilfe von kollektiver Elektronenschwingung mit einfallendem Licht zu wechselwirken. Dies führt dazu, dass in unmittelbarer MNK Umgebung eine lokale Verstärkung des elektromagnetischen Feldes auftritt, welche zu metallverstärkter Fluoreszenz und zur oberflächenverstärkten Ramanstreuung (*surface enhanced raman scattering*, SERS) benutzt werden kann.[33,45,46,127,128] Da diese Effekte in unmittelbarer MNK Nähe auftreten, werden sie auch als Nahfeld-Effekte bezeichnet. Die Ursache dieses Effektes ist noch nicht zweifelsfrei geklärt, jedoch spielen Quanteneffekte eine maßgebliche Rolle bei der theoretischen Beschreibung von SERS.[100,129]

Diese lokalisierten Felder sind besonders stark an Orten konstruktiver Interferenz zweier Nahfelder ausgeprägt, welcher sich in der Regel zwischen zwei AuNKn.[95] Deswegen werden für SERS basierte Applikationen üblicherweise Aggregate von mindestens zwei Nanokristallen benutzt, die eine weitaus höhere elektromagnetische Feldverstärkung durch die Kopplung der einzelnen Plasmonen aufweisen. Der Ort, an dem die Feldverstärkung besonders hoch ist, wird *hot spot* genannt.[95] Die Feldverstärkung kann so stark sein, dass Ramanstreuung von einzelnen Molekülen beobachtet werden kann, wo sie mitunter ein höheres Einzelmolekülsignal als Fluoreszenz aufweist.[45,46,130,131]

Wie sich von dem Namen direkt ableiten lässt, behandelt SERS die verstärkte Raman Streuung an Oberflächen. Um SERS zu detektieren, benötigt es das Zusammenspiel von (kleinen) Molekülen mit Oberflächen von plasmonischen Nanopartikeln und deren Feldverstärkung einer einfallenden, elektromagnetischen Welle; kurz: die Präsenz eines Raman-aktiven Moleküls in einem *hot-spot* unter Einwirkung eines externen Feldes.[45,46] Hierbei trägt lediglich das gestreute Licht zur Signalverstärkung bei. Die SERS Intensität hängt hierbei vom Produkt der Quadrate des externen (E_{loc}) und lokalen (E_{inc}) Feldes ab, was zu der Abhängigkeit $I(SERS) = |E(\omega_{inc})|^4$ führt. Hierbei ist $E(\omega_{inc})$ das lokale Feld, am Ort des Raman-aktiven Moleküls und ω_{inc} die Frequenz der einfallenden, elektromagnetischen Welle. Die hohe Signalverstärkung von SERS geht aus der oben diskutierten Abhängigkeit und dem lichtfokussierenden Effekt von MNK einher. Der lichtfokussierenden Effekt kann mit dem Quotienten aus lokalen (E_{loc}) und einfallendem Feld (e_{inc}) beschreiben werden, welcher leicht den Faktor 100 übersteigt.[45,46] Dies ist beispielhaft in Gleichung 4.2 dargestellt.

$$I(SERS) = \left(\frac{E_{loc}}{E_{inc}}\right)^4 = (10^2)^4 = 10^8 \tag{4.2}$$

[Es sei angemerkt, dass es sich bei den diskutierten Effekten ausschließlich um Nahfeldeffekte handelt, und dass Nahfeldphänomene nur vom Betrachter (=Im Fernfeld) detektiert werden können, wenn sie das Nahfeld verlassen können. Dies ist nicht trivial und mit komplexen, quantenmechanischen Zweiphotonenprozessen zu beschreiben, die selbst noch nicht zweifelsfrei verstanden sind.][45,46,95,132]

Aus Gleichung 4.2 ergibt sich direkt die immens hohe Signalverstärkung in SERS. Der Faktor 10^8 wird auch Verstärkungsfaktor (EF, aus dem Englischen *enhancement factor*)

genannt und kann Größenordnungen von bis zu 10^{11} annehmen.[45,46] Es sei anzumerken, dass das Molekül für SERS lediglich diese Vibrationstransformation ($\omega_{Stokes} = \omega_{inc} - \omega_{vib}$) bewirkt, jedoch für den jeweiligen Effekt unerheblich und — theoretisch — leicht zu substituieren ist. Praktisch wird die Wahl eines bestimmten Moleküls jedoch oftmals durch seine Oberflächenaffinität, Toxizität und Schwingungsfrequenzen bestimmt, wodurch sich die Verwendung von aromatischen Thiolen als äußerst effektiv erwiesen hat.[133] Weist das Molekül selbst Resonanz zum einfallenden Licht (i.d.R. monochromatischer Laser) auf, wird von oberflächenverstärktem, resonanten Raman SERRS (*surface enhanced resonance raman scattering*) gesprochen. Diese Resonanz des Moleküls bewirkt einen um Größenordnungen höheren EF. Weitere Verstärkungsmechanismen, wie chemische Verstärkung und ausführliche Erläuterungen sind dem exzellenten Übersichtsartikel von Sebastian Schlücker zu entnehmen.[45,46]

Da mit Hilfe von stark gekoppelten MNKn Plasmonenresonanzen im infraroten Spektralbereich erzeugt werden können, werden SERS-Sonden als mögliches, minimalinvasives Diagnostikum gesehen. Eine detailliertere Beschreibung der Darstellung solcher SERS-Sonden wird in Kapitel 4.10.2 diskutiert. Die Darstellung neuartiger, effektiver SERS-Sonden zusammen mit den Fortschritten, die in der Vibrationsspektroskopie in den letzten Jahrzehnten gemacht wurden, werden eine neuartige Form der *in situ* Diagnostik ermöglichen und so vermutlich ebenfalls zu vollkommen neuartigen Therapieansätzen führen.[134]

4.5 Quantenpunkte und ihre Fluoreszenzeigenschaften

Die Besonderheit von kolloidalen Halbleiternanokristallen kann auf die eingangs erklärten oberflächenabhängigen Partikeleigenschaften und größenabhängigen Quanteneffekte (beides S. 9 ff.) zurückgeführt werden.[135–137] Diese äußern sich in größenabhängigen optischen Eigenschaften und sind sowohl von wissenschaftlichem als auch vom kommerziellem Interesse. So geht die Forschung an fluoreszierenden, anorganischen Materialien schon mehr als 100 Jahre zurück,[138] liefert jedoch immer noch neue, interessante Erkenntnisse[139] und immer mehr Produkte wie Quantenpunktdisplays kommen auf den Markt.[140] Kolloidale Halbleiternanokristalle werden aufgrund ihres 0-dimensionalen Verhaltens und der größenabhängigen Quanteneffekte auch als Quantenpunkte (QPs) oder aus dem Englischen als *quantum dots* (QDs) bezeichnet.

In diesem Kapitel wird zunächst auf die Synthese von Cadmiumselenid-basierten Halbleiternanokristallen eingegangen, wonach die Eigenschaften von Halbleiternanokristallen allgemeiner beschrieben werden. Die Diskussion der Eigenschaften beginnt mit einer kurzen, theoretischen Einführung in die elektronische Struktur von (nanoskaligen) Festkörpern.

4.5.1 Synthese von kolloidalen Halbleiternanokristallen

In diesem Kapitel wird zunächst die *Standard*-Synthese von HLNKn vorgestellt. Im Anschluss daran wird die Synthese von vielschaligen QPn, sowie kurz auf die Synthese im kontinuierlichen Fluss eingegangen. Mit letzterer ist es möglich einige der diskutierten Schwierigkeiten der Reproduzierbarkeit von QP-Synthesen zu lösen. Da die Größenvertei-

lung für die Qualität der QP eine maßgebliche Rolle spielt und sich Größenunterschiede in einem Ensemble unter anderem durch unterschiedliche Anfangskristallisationzeit erklären lassen, haben Christopher Murray, David Norris und Moungi Bawendi 1993 ein Verfahren entwickelt, das sich als *hot injection* Methode etabliert hat.[141]

Die Thermolyse der Ausgangsverbindungen führt hierbei zur Übersättigung der Lösung und schließlich zur Keimbildung. Bei der Heißinjektionsmethode wird eine Lösung von Vorläuferverbindungen stark erhitzt (250-350 °C) und eine weitere Lösung der zweiten Vorläuferverbindung unter schnellem Rühren rasch injiziert. So ist eine annähernd konstante Anfangskristallisationszeit gewährleistet. Anschließend kann, durch sehr schnelle Verringerung der Temperatur, die Wachstumsphase abgebrochen werden. Diese Methode hat sich bei der Synthese von relativ kleinen Mengen (von bis zu 200 mL Lösungsmittel) etabliert. Da bei größeren Reaktionsvolumen die veränderte Wärmeübertragung vom Heizmantel zur Lösung sowie schlechtere Durchmischung der Lösung zu lokalen Konzentrations- und Temperaturunterschieden führen, die mit einer stark lokal abhängigen Nukleationsgeschwindigkeit einhergehen, liefern größere Ansätze weniger reproduzierbare Ergebnisse. Deswegen kann die Heißinjektionsmethode nicht für die Synthese großer Mengen hoch qualitativer Nanopartikel benutzt werden, es sei denn, die Synthese wird in mehreren Ansätzen durchgeführt. Durch den Größenquantisierungseffekt lassen sich QP Synthesen gut mit Hilfe von Absorptionsspektroskopie verfolgen. Dies ist beispielhaft in Abb. 4.3 am Wachstum von CdSe NPn dargestellt. Das sich rot-verschiebende Absorptionsmaximum lässt sich mit wachsenden CdSe-Nanopartikeln erklären: Durch die zunehmende Größe des CdSe Kernes, wird das Exziton weniger stark lokal beschränkt, was zu einer Verringerung seiner Energie und somit zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums führt.

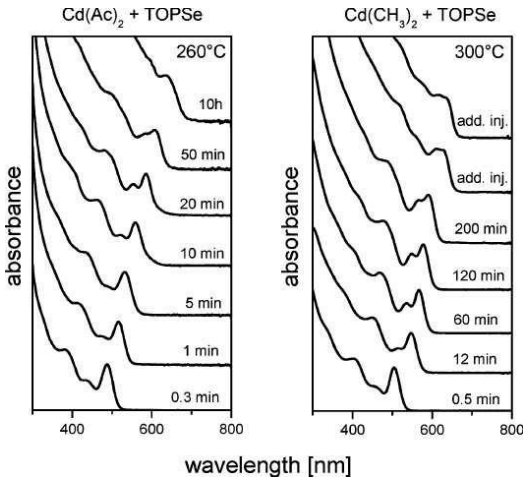


Abbildung 4.3: Zeitabhängige Absorptionsspektren von zwei Cadmiumselenidsynthesen. Das Partikelwachstum ist am sich verschiebenden ersten Absorptionsmaximum zu erkennen. Reprinted with permission from[142]. Copyright © 2003 American Chemical Society.

Durch die hohen Temperaturen, die für die Thermolyse der Vorläuferverbindungen benötigt werden, kommen nur wenige organische Lösungsmittel für die Synthese von Halbleiternanokristallen in Frage. Dies sind die sog. hochsiedenden organischen Lösungsmittel wie Trioctylphosphan (TOP), Trioktylphosphanoxid (TOPO), Hexadoedecylamin (HDA) und Squalen. Die meisten dieser Lösungsmittel besitzen auch koordinierende Eigenschaften und beeinflussen somit ebenfalls die Nukleations- und Wachstumsprozesse.[143] Weiterhin ist bekannt, dass auch kleinste Restspuren von sekundären und tertiären Phosphanen die Reaktionsgeschwindigkeiten von CdSe Nanopartikeln verändern, was für den synthetisch arbeitenden Chemiker eine besondere Herausforderung darstellt, da TOP und TOPO in der Regel nicht rein geliefert werden.[144] TOP und andere sekundäre und tertiäre

Phosphane können an die Cadmiumvorläuferverbdindung koordinieren, und somit seine Reaktivität verändern. Weiterhin ist die Standardselenquelle TOP-Selen, wobei es sich um das Reaktionsprodukt von TOP mit elementarem Selen handelt. Werden dem TOP andere Phosphane zugemischt oder sind schon ab Werk erhalten, so ändern sich die Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Nanokristallsynthese, und die in Kapitel 4.2 geforderten Bedingungen sind nicht mehr erfüllt.[144,145] Üblicherweise verwendete Vorläuferverbindungen für die CdSe- bzw. CdS-Nanokristallsynthese heutzutage sind Cadmiumacetat, Cadmiumoxid, Dihydrogensulfid, TOP-Schwefel und TOP-Selen. Diese haben die hoch reaktiven und toxischen Verbindungen Dimethylmetallverbindungen sowie Hexamethyldisilathian weitestgehend ersetzt.[141,142,146]

4.5.1.1 Kern/Schale Partikel

Das Aufwachsen von unterschiedlichen Halbleitermaterialien aufeinander kann zu der Bildung von Kern-Schale Strukturen führen, mit denen sich die Funktionalität von Halbleiternanokristallen einstellen lässt. Da reine CdSe-NP in der Regel geringe Fluoreszenzquantenausbeuten (PLQY) aufweisen, werden sie mit einem Material, was eine höhere Bandlücke aufweist, eingeschlossen. Durch die Passivierung, wird das Exziton im CdSe Kern lokalisiert und die Wahrscheinlichkeit der radiativen Rekombination nimmt zu. Dadurch steigt die PLQY, die als ein Gütemaß für kolloidale Halbleiter gewertet werden kann, wie in Kapitel 4.6.2 (S. 33 ff.) genauer beschrieben. Im Falle von CdSe ist dies in der Regel Zinksulfid,[146,147] was zu der Bildung von so genannten Typ I Nanokristallen führt. Typ I bzw. II und die (Pseudo-) Typen beschreiben hierbei die relative Lage der Bandlücken von Kern und Schale in Kern/Schale Nanokristallen. Besitzt das Schalenmaterial eine größere Bandlücke und liegen Leitungs/Valenzband der Schale energetisch höher/tiefer, so wird von Typ I Nanokristallen gesprochen. Wie oben bereits erwähnt, führt es dazu, dass die Wellenfunktionen beider Ladungsträger im Kern lokalisiert sind.[148] Zur Ladungstrennung werden Typ II Nanokristalle verwendet, bei denen entweder Leitungs- oder Valenzband des Schalenmaterials energetisch tiefer bzw. höher liegt als das des Kernmaterials.[149] Somit ist nur eine Wellenfunktion im Kern lokalisiert und nur einer der Ladungsträger weist eine hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Kernmaterial auf. Dies führt zu hohen Fluoreszenzabklingzeiten, da die strahlende Rekombination der Partikel aufgrund von Ladungstrennung erschwert wird.[148] Bei invertierten Kern/Schale Strukturen kann der Typ und somit die Ladungsverteilung mithilfe der Schalendicke eingestellt werden.[150]

Die Synthese von Kern/Schale Nanokristallen kann unter Verwendung der so genannten SILAR-Methode (*successesive ion layer adhesion and reaction*) geschehen. So können sukzessive Schalen verschiedener Halbleitermaterialien aufeinander abgeschieden werden.[151–154] Da CdSe und ZnS eine relativ hohe Abweichung der Gitterparameter aufweisen, erzeugt die Synthese von drei oder mehr ZnS Schalen Spannungen auf dem CdSe Kern, was zu einer Abnahme der PLQY führt.[152] Die Synthese einer Zwischenschicht aus Cadmiumsulfid führt dazu, dass auf der Schnittstelle zwischen Kern und Schale weniger Spannung lastet und hilft somit die PLQY zu verbessern, was auch für eine Vielzahl von zusätzlichen ZnS-Schalen beobachtet wird. Das SILAR-Verfahren wurde kürzlich be-

nutzt um den Einfluss von verschiedenen Schalenmaterialien auf die Eigenschaften von vielschaligen, CdSe-basierten Nanokristallen zu untersuchen.[155] Hierbei wurde gefunden, dass das Zwischenschalenmaterial von *core/shell/shell* Quantenpunkten einen massiven Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften zeigt. Weiterhin wurde eine vorher nicht bekannte und unerwartete Antikorrelation zwischen Blinken und PLQY gefunden, worauf in Kap. 4.6.3 (S. 34) ausführlicher eingegangen wird.[155]

Cadmiumsulfid kann auch allein als Schalenmaterial verwendet werden, was jedoch aufgrund der relativ kleinen Bandlückendifferenz von CdSe und CdS zur Bildung von (Pseudo-) Typ II Strukturen führen kann. Die kann jedoch, je nach Anwendungsgebiet der NK, zu unerwünschten Effekten, wie Ladungstrennung, führen.[152] Durch die Verwendung von neuen, langsamer reagierenden Vorläuferverbindungen (Cadmiumoleat und Octanthiol) gelang es 2013 der Bawendi Gruppe ein langsames, nahezu perfektes, epitaktisches Schalenwachstum zu etablieren, was zu der Bildung von hoch luminseszenten CdSe/CdS Nanokristallen mit einer relativ dünnen, jedoch annähernd perfekten Schale und PLQY von bis zu 97% führt.[144] Diese zeigen, wie vorher beschriebene CdSe/CdS mit sehr dicker Schale,[156,157] unterdrücktes Blinken, dies jedoch bei einer hohen Einheitlichkeit der Probe, wodurch die Partikel auch zu sensitiven *in vivo* Experimenten eingesetzt werden konnten.

Eine weitere Möglichkeit der Synthese von HLNKs mit neuer Funktionalität ist die Bildung einer legierten Schale und das Dotieren mit Fremdionen, das in Kapitel 4.5.1.3 (S. 25) diskutiert wird. Die Bildung von legierten Schalen kann sich massiv auf die Eigenschaften der Halbleiternanokristalle auswirken.[158,159] Bei der Legierung der Schale wird die Bandstruktur und der Überlappung der Wellenfunktionen der Ladungsträger verändert, wovon maßgeblich die elektronischen Eigenschaften der Halbleiternanokristalle abhängen (S. 26 ff.). In der Regel wird eine Legierung der Schale durch hohe Reaktionstemperaturen erreicht, was auch nach der eigentlichen Synthese geschehen kann. Ein elektronenmikroskopischer Nachweis der Legierungsbildung ist aufgrund der geringen Dicken der Halbleiternanopartikel Schalen äußerst schwierig. Die Arbeitsgruppe um Sara Bals am EMAT in Antwerpen hat auf dem Gebiet der elektronenmikroskopischen Untersuchung solcher Systeme in den letzten Jahren sehr interessante Ergebnisse veröffentlicht und so einen Einblick in die atomaren Prozesse während der Legierungsbildung gegeben.[160,161]

4.5.1.2 Verzweigte und elongierte Halbleiternanokristalle

Die Darstellung von verzweigten bzw. elongierten Halbleiternanokristallen basiert auf dem gleichen Konzept der kinetischen bzw. thermodynamischen Kontrolle der Nukleation bzw. des Wachstums, das schon in Kapitel 4.4.2.1 (S. 18) beschrieben und kürzlich von Sandeep Kumar und Thomas Nann zusammengefasst wurde.[162] Bei der Synthese von elongierten bzw. verzweigten CdSe NKn geschieht die Synthese von anisotropen Strukturen in der Regel durch Wahl der Kristallstruktur der Saatpartikel bzw. durch Zugabe von stark koordinierenden Liganden. Cadmiumselenid kann in zwei verschiedenen Kristallstrukturen kristallisieren, der kinetisch bevorzugten Zinkblendestruktur und der thermodynamisch bevorzugten Wurzitstruktur. Aaron Washington *et al.* beobachteten eine Phasenumwandlung oberhalb einer bestimmten Schmelztemperatur und lieferten so den Beweis für die

rein empirische *Ostwald's rule of stages*, die besagt, dass Kristallisation über eine Vielzahl von thermodynamischen in- bzw. semistabilen Kristallformationen geschieht.[163]

Durch Zugabe von Hexylphosphonsäure zur Synthese von CdSe NKn gelang es der Arbeitsgruppe um Paul Alivisatos 2000 die Wachstumsgeschwindigkeit von CdSe in der Wurzitstruktur so zu verringern, dass die Synthese von elongierten Nanostäbchen mit Aspektverhältnissen kleiner als 5 gelang.[164] Ohne den Zusatz von Hexylphosphonsäure ist der Wachstumsprozess in eine Raumrichtung so schnell, dass sehr lange Stäbchen entstehen, die in organischen Lösungsmitteln unlöslich sind.[164]

Drei Jahre später gelang der Gruppe um Horst Weller die Darstellung elongierter Nanokristallheterestrukturen mit einem CdSe Kern und einer elongierten CdS-Schale unter kinetischer Kontrolle, dem Zusatz von Hexadecylamin und einem großen Überschuss der Schwefelvorläuferverbindung, welche eine höhere Reaktivität gegenüber der $\{00\bar{1}\}$-Facette des CdSe Wurzit Kerns besitzt.[165] So dirigiert der Überschuss der Schwefelvorläuferverbindung das Wachstum in eine Raumrichtung. Hexadecylamin hilft dabei, indem es andere Facetten zusätzlich belegt und für ein Wachstum nicht zugänglich macht. Diese Synthese wurde im Jahre 2007 von einer Wissenschaftlergruppe um Liberato Manna modifiziert, mit der eine wesentlich größere Auswahl an Aspektverhältnissen zugänglich gemacht wurde.[166]

In 2003 wurde die Synthese und Charakterisierung von CdTe-Tetrapods beschrieben, die aus einem Zinkblende-Kern und Wurzit-Armen bestehen. Diese Tetrapods kristallisieren in der Zinkblende-Struktur, woraufhin direkt das Armwachstum in der Wurzit-Form folgt. Demzufolge sind Veränderungen der Tetrapods nur bei der Nukleation möglich.[167] Ein Jahr später wurde diese Einschränkung aufgehoben, indem der Wachstumsprozess umgekehrt wurde. Zunächst wurde ein kurzes CdSe oder CdS Stäbchen synthetisiert, wonach diverse Verzweigungspunkte eingeführt werden konnten. Durch die Wahl der Verzweigungspunkte konnte so eine Vielzahl anisotroper Heterostrukturen dargestellt werden.[168]

4.5.1.3 Dotieren und Kationenaustausch von Halbleiternanokristallen

Eine weitere Möglichkeit HLNK mit neuer Funktionalität darzustellen ist mittels einer Kationenaustauschreaktion an bestehenden Nanokristallen. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass bei einer Kationenaustauschreaktion das Netzwerk der Anionen in einem Nanokristall erhalten bleibt und sich lediglich die Kationen bewegen.[169] Dotierung geschieht in der Regel nach der Synthese einer Nanopartikel-Art, indem ein anderes Metall in Form seiner Ionen im Überschuss zugegeben wird, welches mit den Anionen ein niedrigeres Löslichkeitsprodukt aufweist. Dadurch kommt es zu einem, thermodynamisch bevorzugten, Austausch der im Nanopartikel befindlichen Kationen.[170,171]

Beim Dotieren werden gezielt Verunreinigungen in das Kristallgitter eines Nanokristalls eingefügt, um dessen Eigenschaften zu verändern. Je nach Position des Fremdions sind seine Einflüsse auf die Gesamteigenschaften des Nanokristalls unterschiedlich. Dotierungsreaktionen sind, ähnlich den Kationenaustauschreaktionen, extrem temperaturabhängig.[172,173] Kationenaustausch- bzw. Dotierungsreaktionen verlaufen nicht, wie oft publiziert und referenziert, nur über Leerstellen, sondern ebenfalls — und zum Teil aus-

schließlich — über eine *kick-out* Verdrängung, bei der die Fremdionen über Zwischengitterplätze in den Festkörper eindringen und die ursprünglichen Ionen förmlich herausdrücken. Die Arbeitsgruppe um Horst Weller zeigte dies eindrucksvoll an Blei- bzw. Zinkselenidnanokristallen.[31,32] Diesen Mechanismus beschreiben auch David Norris und Mitarbeiter für die Kationenaustauschreaktion von Silberionen mit CdSe Nanokristallen.[174] Zunächst diffundieren wenige Silberionen auf Zwischengitterplätzen, wo sie relativ mobil sind. Erhöht sich die Zahl der Silberionen pro Nanokristall jedoch, werden die Silberionen an die Oberfläche gedrängt, wo das erste Silberion ein Cadmiumatom auf einem Cadmiumkristallplatz verdrängt. Dies ist mit einer Redoxreaktion verbunden, da der einzig stabile Zustand von Cadmium auf einem Zwischengitterplatz das zweifach positive Cadmiumion Cd(II) ist. Demzufolge bleibt ein einfach negativ geladenes Silberion auf einem Cadmiumgitterplatz, welches nun den weiteren *kick-out* von Cd(II) um ein Vielfaches beschleunigt, da es Cd(II) auf Zwischengitterplätzen stabilisiert und Ag(I) anzieht.[174] Durch diesen starken Einfluss von kinetischen Prozessen erlauben Kationenaustauschreaktionen die Synthese von Materialien, die thermodynamisch metastabil sind und nicht mit nasschemischen Syntheserouten zugänglich sind.[44] Demzufolge wurden die meisten Kationenaustauschprozesse mit kleinen, sehr mobilen Kationen durchgeführt, da die Festkörperdiffusionsgeschwindigkeit von größeren Ionen relativ klein ist.[44] Kationenaustauschreaktionen können ebenfalls benutzt werden, um plasmonische Halbleiternanokristalle herzustellen, welche eine Klasse von Nanokristallen darstellen, die Eigenschaften von AuNKn und HLNKn verbinden.[175] Eine umfassender Übersichtsartikel, über die verschiedenen Mechanismen und Einflussfaktoren bei Kationenaustausch- bzw. Dotierungsreaktionen wurde kürzlich von Luca De Trizio und Liberato Manna veröffentlicht.[176]

4.5.1.4 Mikrofluidik Synthese

Um den Anforderungen von großen Materialumsätzen und reproduzierbarer Synthese von Halbleiternanokrsitallen zu entsprechen, wurden einige Systeme, die auf kontinuierlichem Fluss basieren, entwickelt.[177–180] Sind kontinuierliche Flüsse und Mischprozesse sowie stabile Temperaturbedingungen gewährleistet, sind solche Systeme in der Lage eine große Menge an Partikeln reproduzierbar darzustellen. Diese Prozesse sind generell auch auf den Phasentransfer von Nanokristallen übertragbar.

4.5.2 Beschreibung von Energiezuständen in Festkörpern

Da Synthesen von kolloidalen Halbleiternanokristallen immer eine Mischung aus Nanokristallen verschiedener Größen darstellen (s. Kapitel 4.5.1), können Phänomene wie spektrale Diffusion und Blinken (Kapitel 4.6.3) nicht am Ensemble studiert werden, da sie hier als spektrale Verbreiterung beziehungsweise verringerte PLQY detektiert werden.[181–183] Diese Phänomene müssen an einzelnen Partikeln untersucht und studiert werden und um Einzelpartikel theoretisch beschreiben zu können, wird kurz in die Grundlagen der Festkörperphysik eingeführt und anschließend der Größenquantisierungseffekt diskutiert.

Energiezustände in Kristallen unterscheiden sich von denen der isolierten Atome, aus denen sie bestehen. Bilden mehrere Atome durch chemische Bindung einen Festkörper,

formen ihre (Valenz)-Elektronen Energiebänder, die Molekülorbitalen sehr ähnlich sind. In diesen Energiebändern sind die Elektronen delokalisiert.[184]

Die Annahme eines periodischen Potenzials, in dem sich die Elektronen bewegen, führt nach dem Bloch Theorem zur Verwendung von sog. Bloch Wellen $\Psi_{n,k} = u_k(r)exp(ikr)$, in denen $u_k(r)$ eine Funktion der Periodizität des Kristalls ist und die Variationen der Wellenfunktion in der Einheitszelle darstellt, wobei k der Ausbreitungsvektor ist.[185,186] Das Vorhandensein von periodischen Potenzialen unterscheidet Festkörper von Molekülen. Die mathematische Formulierung des Bloch-Theorems lautet[184]

$$\Psi_n(k, r + R) = \Psi_n(k, r)exp(ik \cdot R), \tag{4.3}$$

wobei R ein Gittervektor des Kristalls ist. Die Periodizität des Gitters ermöglicht es, die Betrachtung auf den reduzierten Bereich bzw. die Brillouin-Zone zu beschränken.[58,184] Werden die Bloch-Funktionen in die Schrödinger Gleichung

$$\hat{H}\Psi_{n,k}(r) = E_n(k)\Psi_{n,k}(r) \tag{4.4}$$

eingesetzt, erhält man von k abhängige Energieniveaus $E_n(k)$. Dabei zählt n die einzelnen Energiebänder und k die Zustände in einem Band. Für viele Eigenschaftsvorhersagen genügt es, die Energiebänder entlang der Geraden hoher Symmetrie zu kennen.[184] In Abbildung 4.4 ist dies am Γ-Punkt von Zinkblende und Wurzit strukturierten Cadmium(II)selenid zu erkennen. Um diesen Punkt sind die Bänder parabolisch geformt. Die Bänder werden durch die Symmetrieeigenschaften der Energiezustände der Brillouin-Zone unterschieden.

Weist die Bandstruktur Energielücken auf, liefern diese Energien beim Einsetzen in die Schrödingergleichung komplexe k, die die Blochbedingungen (Gl. 4.3) nicht erfüllen und somit verboten sind.[184] In Abbildung 4.4 ist das Maximum des Valenzbandes auf 0 eV gesetzt und die Bandlücke beträgt ca. 2 eV. Diese Bandlücke weist in Halbleiternanokristallen eine Größenabhängigkeit auf, wie in Kapitel 4.5.4 beschrieben wird.

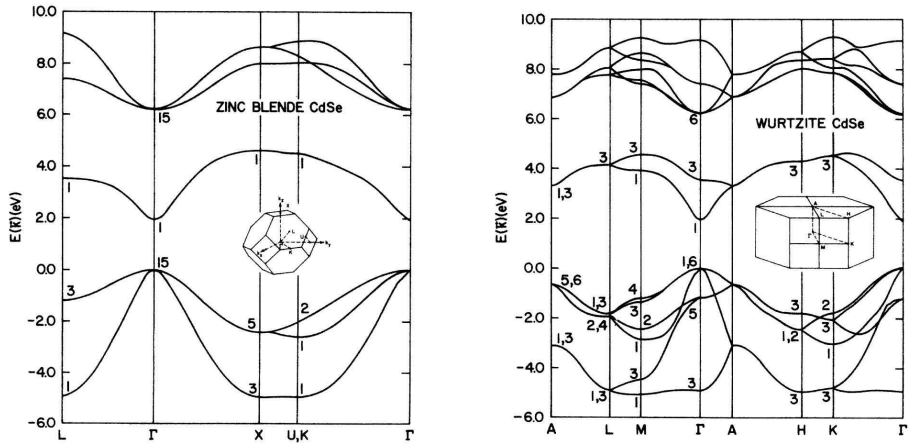


Abbildung 4.4: Bandstruktur von Cadmiumselenid in der Zinkblende (links) und der Wurzitstruktur. Bänder mit hoher Symmetrie sind jeweils am Γ-Punkt zu erkennen.[187,188] Adapted with license from[187] ©1988 American Physical Society

Die theoretische Beschreibung eines idealen (ohne Verunreinigungen, perfekt sphärischen) Halbleiterkristalls basiert auf der Annahme, dass das Valenzband voll gefüllt und das Leitungsband leer ist und beide durch eine Energiebarriere voneinander getrennt sind. Energetische Anregung erzeugt ein Elektron-Loch-Paar, ein sog. Exziton. Die elektronischen Niveaus eines idealen Kristalls sind Eigenfunktionen zum exakten Hamiltonoperator $\hat{H}$.[181]

$$\hat{H} = \sum_i \frac{\hat{p}_i^2}{2m_i} + \sum_I \frac{\hat{p}_I^2}{2m_I} + \frac{1}{2}\sum_{I<J} \frac{Z_I Z_J e^2}{4\pi\epsilon_0 |R_I - R_J|} - \sum_{I,i} \frac{Z_I e^2}{4\pi\epsilon_0 |R_I - r_i|} + \sum_{i<j} \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 |r_i - r_j|} + \hat{H}_s \tag{4.5}$$

Die Terme entprechen (der Reihe nach): Der kinetischen Energie der Elektronen, der kinetischen Energie der Kerne, der Wechselwirkungsenergie der Kerne, der Wechselwirkungsenergie von Kernen und Elektronen, der Wechselwirkungsenergie der Elektronen und der spinabhängigen, elektronischen Energie $\hat{H}_s$, die die Spin-Orbit-Kopplung enthält. Große Buchstaben stehen für Kernatome und kleine für Elektronen. Dieser Hamiltonoperator kann nicht gelöst werden und geht nach der Separation von Kern- und Elektronenbewegung in den Hamiltonoperator $\hat{H}_{aprox}$ über:[181]

$$\hat{H}_{aprox} = \hat{H}_e(r_i, R_I) + \hat{H}_{ion}(R_I) + \hat{H}_{e-ion}(r_i, \delta R_I) + \hat{H}_s \tag{4.6}$$

$\hat{H}_e$ beschreibt die Bewegung der Elektronen im elektrischen Feld der statischen Kerne, $\hat{H}_{ion}$ die Bewegung der Kerne und $\hat{H}_{e-ion}$ die Änderung in der elektronischen Energie in Abhängigkeit der Phononen. Die weitere mathematische Behandlung und eine ausführliche theoretische Analyse dieses Ansatzes ist in der Literatur[181,189] beschrieben. Eine erste, relativ einfache und anschauliche Näherung für viele optische Eigenschaften[55,181] von Halbleiternanokristallen ist die der effektiven Massen.

4.5.3 Effektive Masse

Die effektive Masse ist ein Korrekturfaktor der Ruhemasse und leitet sich aus der Krümmung der Energiebänder nahe des Ferminiveaus ab. Im oben beschriebenen Bändermodell werden Elektronen im Kristall durch ihren Wellenvektor k beschrieben. Die Geschwindigkeit v_n des n-ten Elektrons kann mit Hilfe von Gleichung 4.7 beschrieben werden.[184]

$$v_n(k) = \frac{1}{\hbar}\frac{\partial}{\partial k} E_n(k) \tag{4.7}$$

Nach dem Pauli-Prinzip kann jedes Energieniveau nur mit zwei Elektronen besetzt werden. Aufgrund der parabolischen Symmetrie des k-Raums am Γ-Punkt (Abb. 4.4) gilt $E_n(k) = E_n(-k)$ und $v_n(k) = -v_n(-k)$ (vgl. Gl. 4.7). Die Näherung der effektiven Masse liefert für Halbleiternanokristalle daher verlässliche Ergebnisse, da die Elektronen, deren Energie am nächsten zum Ferminiveau liegen, die physiklischen Eigenschaften maßgeblich bestimmen. Daher muss lediglich die Struktur der Energiebänder betrachtet werden, die in unmittelbarer energetischer Umgebung des Ferminiveaus liegen. Eine Taylorreihenentwicklung der Energie im Minimum des Leitungsbandes gibt:

$$E(k) = E_0 + \frac{1}{2} \sum_v \left[\frac{\partial^2 E}{\partial k_v^2} k_v^2 \right] \tag{4.8}$$

und die effektive Masse ist dann definiert durch:[184]

$$\frac{1}{m^*} = \frac{1}{\hbar^2} \left[\frac{\partial^2 E}{\partial k_v^2} \right] \tag{4.9}$$

Elektronen und Löcher müssen separat betrachtet werden, da ihr physikalischer Ursprung unterschiedlich ist. Bei Löchern handelt es sich um Quasiteilchen; ein fehlendes Elektron in einem Band voller Elektronen, das die Anziehung aller Elektronen spürt. Ein zusätzliches Elektron in einem Band wird von allen anderen Elektronen abgestoßen, ist also eher durch das freie Elektronengas beschrieben.[55] Daher unterscheiden sich die Ruhemassen von Elektron und Loch mitunter stark.[181] Die bis hierhin eingeführten theoretischen Konzepte gelten generell für Festkörper. In den nachfolgenden Abschnitten wird auf eine Besonderheit von sehr kleinen Strukturen, den Größenquantisierungseffekt, eingegangen, der zu den größenabhängigen Quanteneffekten gezählt wird.

4.5.4 Größenquantisierungseffekt

Der Größenquantisierungseffekt gehört zu den größenabhängigen Quanteneffekten und besagt, dass die Bandlücke von Halbleiternanopartikeln mit abnehmendem Radius größer wird.[135] Dieses Phänomen wurde bereits 1984 von Louis Brus mit der Annahme eines räumlich eingesperrten Wannier Exzitons beschrieben.[190] Der Unterschied zur makroskopischen Bandlückte ΔE wird nach Gleichung 4.10 durch den Radius des Teilchens r und die effektiven Massen von Elektron und Loch $m^*_{e/h}$ beschrieben.

$$\Delta E = \frac{\pi^2 \hbar^2}{2r^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1,8e^2}{4\pi\epsilon \cdot r} \tag{4.10}$$

Der linke Teil der Gleichung leitet sich vom Teilchen im Kasten ab, in dem die Wellenfunktionen von Elektron und Loch voneinander separiert wurden. Der rechte Teil der Gleichung beschreibt die Coulombwechselwirkung von Elektron und Loch. Die quantenmechanische Beschreibung von Nanopartikeln hat ebenfalls eine Nullpunktsenergie zur Folge.

Die Bandlücke vom Molekül über einen Nanokristall bis hin zum makroskopischen Festkörper wird in Abbildung 4.5 schematisch veranschaulicht. Nicht beachtet wurde hier, dass die Aufspaltung der Orbitale zum Teil nicht symmetrisch passiert. n-Atomorbitale bilden n-Moleküle bzw. Festkörperorbitale. Da jedes Orbital nach dem Pauli-Prinzip durch maximal zwei Elektronen besetzt werden kann, bilden sich aus n-einfach besetzten Orbitalen *n/2* doppeltbesetzte Orbitale. In Halbleitern entstehen so Valenz- und Leitungsband (Kap. 4.5.2), in Molekülen bindende und antibindende Orbitale. Im Schema 4.5 wird deutlich, dass mit abnehmender Größe (von rechts nach links), also mit sinkender Atomzahl, die Bandlücke größer wird. An dieser Darstellung wird ebenfalls deutlich, dass sich Nano-

kristalle im Übergangsgebiet vom unendlich ausgedehnten Festkörper oder Bulkmaterial (rechts) zum Molekül (links) befinden.

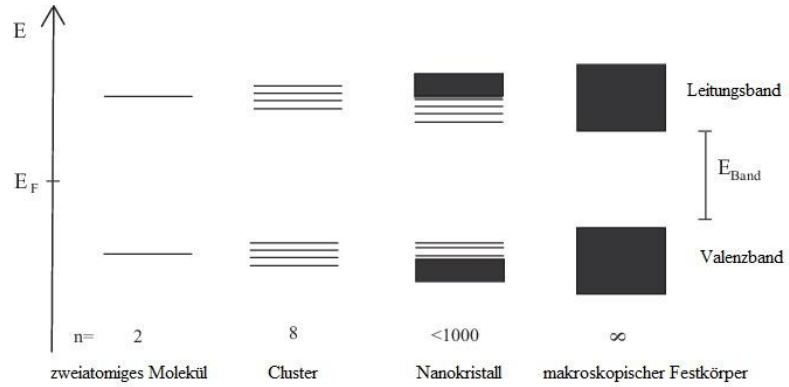


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des LCAO-Ansatzes: Vom zweiatomigen Molekül zum Festkörper. n= Anzahl der Atome, E_F= Ferminiveau, E_{Band}= Bandlücke des makroskopischen Festkörpers.

4.5.5 Bandstruktur von Cadmiumselenid Nanokristallen und Relaxationswege

Der exzitonische 1S-Zustand ist in fünf Energieniveaus unterteilt, die sich in der Projektion des Gesamtdrehimpulses F voneinander unterscheiden. Diese Zustände sind $F = 0^L$, 0^U, $\pm 1^L$, $\pm 1^U$ und ± 2.[181,182,191] Die Energieniveaus, die einen von Null verschiedenen Drehimpuls aufweisen, sind zweifach entartet und L, beziehungsweise U symbolisieren den jeweils energetisch höheren (U) oder niedrigeren (L) Zustand (vgl. c) in Abb. 4.6). Aufgrund des Drehimpulserhaltungssatzes bei Emission eines Photons, gilt $\Delta F = \pm 1$, daher ist Photonenemission aus den Zuständen $F = \pm 2$ und $F = 0^L$ unter Relaxation in den Grundzustand verboten und gestrichelt dargestellt. Von daher wird der energetisch niedrigste Elektronenzustand ($J = \pm 2$) von sphärischen Quantenpunkten als *dark state* bezeichnet.[182] Gelangt der Ladungsträger in den *dark state*, hat er nach Anregung durch verschiedene Relaxationsreaktionen Energie verloren. Die Zeitskala typischer Relaxationsreaktionen ist in b) Abbildung 4.6 dargestellt. Aufgrund dieser Relaxationsreaktionen und der relativ langsamen strahlungslosen Relaxation aus diesem ist der *dark state* eine Ursache für die lange Fluoreszenzabklingzeit von Cadmiumselenidnanopartikeln.[181,192] Die anderen Relaxationswege, die in Abbildung 4.6 als *(hot) carrier trapping* bezeichnet sind, haben Auswirkungen auf das Blinkverhalten, spektrale Diffusion (Kap. 4.6.3), die Fluoreszenzquantenausbeute (Kap. 4.6.2) beziehungsweise, durch neue Trapzustände auf der Oberfläche, auf das Quenchingverhalten (Kap. 4.7) und werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

4.6 Spektroskopie

Absorptions- und Emissionseigenschaften von Quantenpunkten sind abhängig von ihrer Größe, wie an Gleichung 4.10 abzulesen ist; kleinere Nanokristalle emittieren Licht höherer Energie aufgrund ihrer größeren Bandlücke (Abb. 4.5). Das Absorptions- sowie Emissionsspektrum von Halbleiternanokristallen lässt somit Rückschlüsse auf die Nanokristallgröße zu (Kap. 4.5.1, S. 22). Mit zunehmender Größe verschiebt sich das erste Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen, also zu niedriger Energie (vgl. Abb. 4.5 und Gl. 4.10).

Absorbiert ein beliebiges Molekül im Singulett-Zustand Strahlung, wird es elektronisch angeregt und geht in den Zustand S^* bzw. Ψ_k über. Der angeregte Singulett Zustand S^* (Ψ_k) kann verschiedene Deaktivierungsreaktionen wie chemische Reaktion, Fluoreszenz oder *inter system crossing* mit anschließender Phosphoreszenz eingehen, die in Abbildung 4.6 schematisiert sind.[58,191,193]

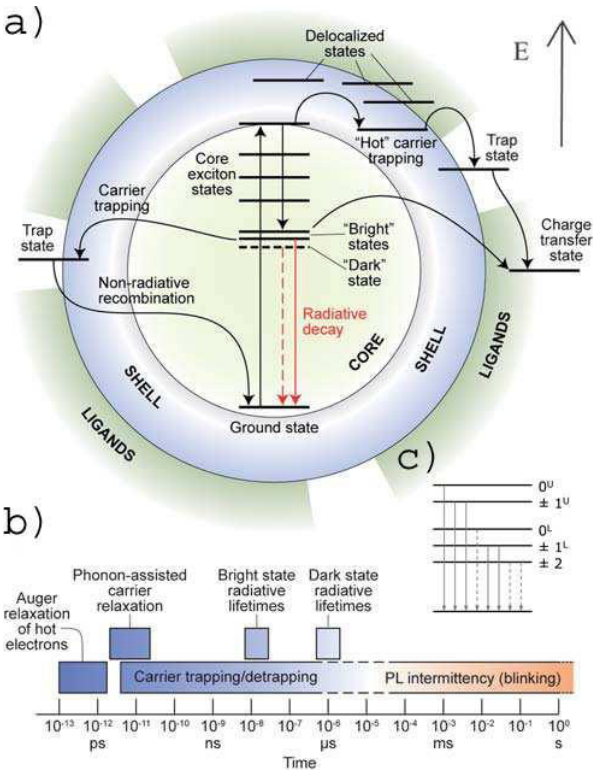


Abbildung 4.6: a und c) Schematische Darstellung von elektrischen Übergängen in *core/shell*-Partikeln und b) beobachtete Zeitskalen von elektronischen Vorgängen in QD.[191] Reproduced with license of Royal Society of Chemistry ©2010 The Royal Society of Chemistry.[191]

Die Absorbanz (A) einer Verbindung lässt sich mit dem Lambert-Beerschen Gesetz beschreiben und ist linear abhängig vom wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten ϵ_λ, der Konzentration c und der Länge des Absorptionsweges d.[58]

$$A_\lambda = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon_\lambda c d \tag{4.11}$$

Quantenmechanisch betrachtet, findet ein Übergang zwischen den Zuständen $|\Psi_i\rangle$ und $|\Psi_k\rangle$ statt. Das elektrische Feld des wechselwirkenden Lichtes muss mit dem Dipolmoment $\vec{\mu}_e$ der Verbindung wechselwirken. Eine Absorption kann nur erfolgen, wenn das Übergangsdipolmoment μ_{ik} ungleich Null ist. Dies entspricht dann $\epsilon_\lambda \neq 0$ für die jeweilige Wellenlänge des einfallenden Lichtes.

$$\vec{\mu}_{ik} = \langle \Psi_i | \vec{\mu}_e | \Psi_k \rangle \neq 0 \tag{4.12}$$

Die Übergangswahrscheinlichkeit des Überganges, der die Absorption A_{ik} abbildet, lässt sich aus dem Betragsquadrat des Übergangsdipolmomentes mit dem einfallenden, elektrischen Feld $\vec{E}$ darstellen:

$$A_{ik} = |\vec{\mu}_{ik} * \vec{E}|^2 \tag{4.13}$$

Die Emissionswahrscheinlichkeit E_{ik} lässt sich ebenfalls aus dem Übergangsdipolmoment berechnen, sie entspricht Gleichung 4.14 nur ohne Beitrag des externen elektrischen Feldes. Folgt man dieser Begründung, sollten QP eine kurze Fluoreszenzabklingzeit besitzen, da die Übergangsdipolmomente in HLNKn groß sind, womit eine hohe Wahrscheinlichkeit der strahlenden Emission einhergeht. Grund für die lange Fluoreszenzabklingzeit von HLNKn ist die aufgespaltene Bandstruktur und die daraus resultierenden *dark states*, wie in Kap. 4.5.5 beschrieben.

$$E_{ik} = |\vec{\mu}_{ik}|^2 \tag{4.14}$$

4.6.1 Emissionseigenschaften

Da die Energiezustände von HLNKn dem Größenquantisierungseffekt unterliegen und Fluoreszenz nur aus wenigen Energieniveaus erlaubt ist, sind Emissionsspektren von HLNK-Ensembles in der Regel schmal und maßgeblich von ihrer Größenverteilung abhängig. Die Farbklarheit von einheitlichen HLNKn führt bereits zu ihrem Einsatz in verschiedenen bildgebenden Technologien, wie z.B. Handydisplays und Flachbildfernsehern. Emission ist gegenüber der Absorptionswellenlänge zu höheren Wellenlängen verschoben. Dieser Effekt wird Stokes-Verschiebung genannt wird. Die Stokes-Verschiebung hat in Quantenpunkten eine andere Ursache als in herkömmlichen organischen Farbstoffen und ist typischerweise größer. Die Stokes-Verschiebung herkömmlicher organischer Farbstoffe basiert darauf, dass die Potenzialfunktionen $F^*(r)$ eines angeregten Zustandes Ψ_k^* gegenüber der Grundzustandspotenzialfunktion $F(r)$ verschoben ist. Da die elektronische Anregung in erster Näherung bei konstantem Kernabstand erfolgt, ist eine elektronische Anregung nur in höhere Schwingungsniveaus $\Psi_{J>0}^*$ möglich, welche wieder in den vibronischen Grundzustand $\Psi_{J=0}^*$ des angeregten Zustands relaxiert. Aus dem Zustand $\Psi_{J=i}^*$ relaxiert das System strahlend in einen vibronisch angeregten, elektronischen Grundzustand $\Psi_{i\pm1}$, aus dem es wieder in den Grundzustand $\Psi_{J=0}$ zurückkehrt. Die Energie wird hierbei in Form von Stößen (= Wärme) an die Umgebung abgegeben. Halbleiternanokristalle bestehen aus 100 bis 10000 Atomen und können von daher als Festkörper beschrieben werden. In Festkörpern werden die vibronischen Niveaus mit Quasiteilchen den Phononen beschrieben. Die Anregungsenergie wird also durch Exziton-Phonon Kopplung abgegeben. Eine Besonderheit von HLNKn besteht in ihrem breiten Absorptionsspektrum (Abb. 4.5.1), was dazu führt, dass HLNK durch nahezu jeden Laser angeregt werden können. Die Anregung mit hoher Energie führt jedoch zur Bildung von hoch-energetischen Exzitonen, die andere Relaxationswege, als in Kap. 4.5.5 beschrieben, eingehen können.[191]

Somit bilden Quantenpunkte eine neue Klasse von Fluorophoren und unterscheiden sich grundlegend von organischen Farbstoffen[36] und es musste zum Beispiel die Stokes-Verschiebung von Quantenpunkten neu definiert werden. In der Regel wird die Differenz vom ersten exzitonischen Übergang und Emissionsmaximum als Stokes-Verschiebung von Quantenpunkten angegeben.

4.6.2 Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzabklingzeit

Die Quantenausbeute (QA) eines photochemischen Prozesses ist das Verhältnis der Anzahl der abgelaufenen photochemischen Prozesse und Anzahl der absorbierten Photonen. Hierbei kann die Quantenausbeute $\Phi_{photochem}$ des betrachteten photochemischen Prozesses als das Verhältnis der Ratenkonstanten der Emission (Γ) zur Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller Deaktivierungsreaktionen (k_{NR}) beschrieben werden. Zu den Deaktivierungsreaktionen gehören einmal die Fluoreszenz und alle Vorgänge, die nicht-radiativ ablaufen, wie zum Beispiel das Einfangen von Ladungsträgern an der Oberfläche, Auger-Prozesse und die Interaktion mit Substanzen, die die Fluoreszenz löschen. Einen schematischen Überblick über mögliche Deaktivierungswege von Quantenpunkten und deren Zeitskalen liefert Abbildung 4.6 auf Seite 31. Die Interaktion mit Substanzen, die die Fluoreszenz löschen, sog. Fluoreszenz-Quenchern, wird in Kapitel 4.7 ausführlich dargestellt.

Die Fluoreszenzquantenausbeute (PLQY) gibt an, wie viele der absorbierten Photonen (n_{abs}) als Fluoreszenzphotonen emittiert werden (n_{emit}) und ist somit maximal 1. Dies lässt sich auch mit der Ratenkonstanten der Emission Γ ausdrücken, wie Gleichung 4.15 zu entnehmen ist.[194]

$$PLQY = \Phi_{PL} = \frac{n_{emit}}{n_{abs}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{NR}} \tag{4.15}$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute kann für Quantenpunkte als Gütemaß für die Teilchen und deren Oberflächenabsättigung betrachtet werden, da ein einzelner Nanokristall bei maximaler Fluoreszenzintensität eine PLQY von 1 aufweist.[195] In einem Quantenpunkt, der nicht-radiative Prozesse aufweist, treten alle Deaktivierungswege gleichzeitig auf und jeder Zerfall kann als Kinetik erster Ordnung mit einer durchschnittlichen Zerfallszeit τ_i beschrieben werden (Gleichung 4.16). Die Wechselwirkung mit Substanzen, die die Fluoreszenz löschen, wird im Kapitel 4.7 ausführlich dargestellt. A_i ist der präexponentielle Faktor. Es gibt einige Einschränkungen dieser Gleichung, wenn einzelne Nanokristalle betrachtet werden, die im nächsten Kapitel beschrieben sind.

$$I_{PL}(t) = A_i e^{-(\Gamma + k_{NR})t} \tag{4.16}$$

Hierbei wird deutlich, dass die Fluoreszenz als relativ einfaches kinetisches Modell von Konkurrenzprozessen aufgefasst werden kann. Die mittlere, detektierte Fluoreszenzabklingzeit τ_{av} kann mit der Gleichung 4.17 beschrieben werden. Aus der Summation der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten k_i folgt, dass ein Prozess die anderen überwiegen kann, wenn er im Vergleich eine sehr viel höhere Geschwindigkeitskonstante besitzt. Diese Berechnungen gelten lediglich für freie Fluorophore und müssen angepasst werden, wenn Fluorophore mit dem Nahfeld eines Metallnanopartikels (S. 53 ff.) oder mit Quenchern (S. 37) wechselwirken.[132]

$$\frac{1}{\tau_{av}} = \Gamma + k_{NR} \tag{4.17}$$

Eine sehr ausführliche und schematische Darstellung des Einflusses von HLNK Liganden auf die unterschiedlichen Deaktivierungswege wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe um

Andrew Greytak beschrieben und zeigt auf, dass sowohl Liganden als auch oberflächengebundenes Zink einen massiven Einfluss auf die nicht radiativen Prozesse von CdSe/ZnS QP haben.[196]

4.6.3 Spektrale Diffusion und Blinken

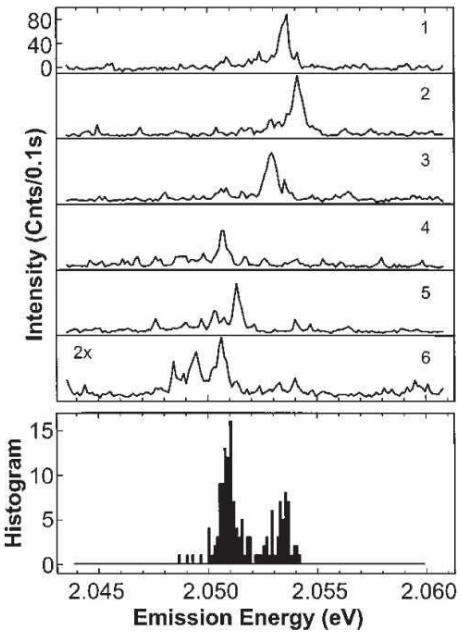


Abbildung 4.7: Spektrale Diffusion eines 5.6 nm großen CdSe Partikels und Histogramm von 150 Einzelspektren. Reprinted with permission from[197]. Copyright © 1999 American Chemical Society.

Quantenpunkte zeigen zwei ausgeprägte, besondere spektroskopische Phänomene: Blinken und die spektrale Diffusion, welche nur an Einzelteilchen beobachtet werden können. Durch die intrinsische Inhomogenität von QP Synthesen wird das Emissionsmaximum eines Ensembles breit im Vergleich zu den einzelnen Partikeln und die spektrale Diffusion wird überlagert. Das Blinken lässt sich in der Ensemblemessung nicht von niedrigen Quantenausbeuten (also z.B. schlecht abgesättigten Partikeln) unterscheiden.[155] Grundlegend besagen beide Effekte, dass die Emissionseigenschaften eines einzelnen Partikels unter kontinuierlicher Beobachtung nicht konstant sind.

4.6.3.1 Spektrale Diffusion

Ausgelöst von zusätzlicher, dem Partikel zugeführter, Photoenergie kann sich das Emissionsmaximum nach Anregung ändern. In Abbildung 4.7 ist das Emissionsspektrum eines einzelnen 5.6 nm großen CdSe Partikels zu verschiedenen Zeiten gezeigt. Temperaturabhängige Messungen (>40 K) suggerieren, dass die spektrale Diffusion ein Effekt der fluktuierenden Nanokristall-Umgebung ist.[197,198] Die Umorientierung von Ladungsträgern in der Umgebung der Nanokristalle führt zu unterschiedlichen externen elektrischen Feldern relativ zum Nanokristall und somit zu unterschiedlichen Stark-Effekten. Der Stark-Effekt ist das elektronische Analogon zum Zeemaneffekt und besagt, dass Spektrallinien im externen elektrischen Feld aufspalten. Der Stark-Effekt hat nicht nur theoretische Bewandtnis, sondern konnte kürzlich auch ausgenutzt werden, um die Aktivität und das Potential von Neuronen zu bestimmen.[199] Weiterhin sind Fluoreszenzintensitätsschwankungen auch an einzelnen Atomen, Molekülen und Proteinen beobachtet und somit keinesfalls eine einzigartige Eigenschaft von QPn.[200,201] Wird der Stark-Effekt quantenmechanisch betrachtet, so wird zum Hamiltonoperator (Gleichung 4.5, 4.18 ein elektrischer Term $\hat{H}_{el}$ hinzugefügt.[58,202] Ist das elektrische Feld klein, so hat es einen vernachlässigbaren Einfluss auf $\hat{H}$ bzw. $\hat{H}_{approx}$ und der Gesamt-Hamiltonoperator kann mittels Störungstheorie geschrieben werden als:

$$\hat{H}_{ges} = \hat{H}_{approx} + \hat{H}_{el} \tag{4.18}$$

Die beobachteten Fluoreszenzintensitätsschwankungen von QPn gehen mit schwankender Fluoreszenzabklingzeit einher und können korreliert werden. *Schlegel et al.* beobachten, dass für in eine Polymermatrix eingebettete CdSe/ZnS- *core/shell*-Nanopartikel eine hohe Fluoreszenzintensität mit einer langen Fluoreszenzabklingzeit einhergeht.[195] Dies führt allgemein dazu, dass die Fluoreszenzabklingzeit eines einzelnen Partikels mit einem multiexponentiellen Abfall beschrieben werden muss. Die Gleichung 4.16 gilt somit nur für ein Ensemble von Partikeln, in der diese Effekte zeitlich gemittelt in die Zerfallskinetik eingehen. *Fisher et al.* berichten, dass sich bei maximaler Emissionsintensität von CdSe-Partikeln die Fluoreszenzabklingzeiten als monoexponentieller Zerfall beschreiben lassen. Sie konnten zeigen, dass die Zerfallszeit größenabhängig ist, jedoch nicht von der Darstellungsweise der Partikel abhängt. Daher schließen sie, dass die so bestimmte „Maximale-Intensitätsabklingzeit“ die reine Fluoreszenzabklingzeit ohne nicht-strahlende Relaxationswege ist und führen die Intensitätsschwankungen auf Fluktuationen von nichtstrahlenden Rekombinationswegen zurück.[203]

4.6.3.2 Blinken

Schwankt die Fluoreszenzintensität sehr stark, sodass es zeitlich getrennte Phasen des Emittierens und sogenannte Dunkelphasen in einem einzelnen Nanokristall gibt, wird von einem „Blink“-Prozess gesprochen. Es wird auch von einem An/Aus-Verhalten gesprochen.[204] Bei genauerer Betrachtung der Auszustände, die mit einem optimierten Versuchsaufbau durchgeführt wurden, fällt jedoch auf, dass diese sehr wohl noch Photonen emittieren, jedoch signifikant weniger als im Anzustand. Längere Auszeiten gehen demnach mit kürzeren Fluoreszenzabklingzeiten einher und verdeutlichen somit das komplexe Zusammenspiel mehrerer Prozesse im Laufe der Zeit (vgl. Gl. 4.17).[203,205,206]

Um zwischen An- und Auszeiten zu unterscheiden, wird somit oft willkürlich eine Intensitätsschwelle in die Blinkspur gelegt. Ist die Fluoreszenz oberhalb dieser Schwelle, wird der Partikel als „An“ bezeichnet (*on*), andernfalls als „Aus“ (*off*). Die Wahl der Schwelle ist für die Analyse der Daten immens wichtig, da eine falsche Wahl zu artifiziellen Messwerten führen kann.[207] Lange Zeit wurde angenommen, dass ein geladenes Partikel für die nicht fluoreszierenden Auszustand verantwortlich ist. Dieses geladene Partikel wird folgendermaßen erzeugt: Durch die Absorption von zwei Photonen wird schrittweise ein Biexziton im Partikel erzeugt. Dies ist aufgrund der hohen Zustandsdichte der angeregten Zustände möglich. Die Wahrscheinlichkeit ein Biexziton zu erzeugen steigt mit zunehmender Anregungsintensität.[183] Rekombiniert das eine Exziton, so ist es möglich, dass es die Energie nicht in Form von Strahlung abgibt, sondern auf einen Ladungsträger im Quantenpunkt überträgt. Dadurch kommt es zu einer Ionisierung des Partikels, beziehungsweise zu einem ladungsgetrennten Elektron-Loch-Paar, in dem einer der Ladungsträger in einem *(deep) trap state* der umgebenden Matrix gefangen ist. Dieser Zustand absorbiert weiterhin Photonen, jedoch wird die Exzitonenenergie strahlungslos auf den überschüssigen Ladungsträger übertragen und dadurch die Fluoreszenz gelöscht.[55] Die Fluoreszenz wird wieder hergestellt, sobald der gefangene Ladungsträger thermisch relaxiert. Ein nicht fluoreszierender, (teilweise) ionisierter Zustand muss nicht zwangsläufig durch Photonen erzeugt werden, eine thermische auto-Augerionisation ist ebenfalls möglich.[183] Aus den

jeweiligen Übergängen zwischen An- und Auszeiten und ihrer statistischen Auswertung können Rückschlüsse auf die Kinetik zwischen fluoreszierenden und gefangenen Zuständen erfolgen. *Kuno et al.* erweitern den Ansatz von Alexander Elfros und Mitarbeitern und beschreiben die Wahrscheinlichkeit ($P(\tau_{off})$) der Auszeit τ_{off} mit dem inversen Potenzgesetz Gl. 4.19.[204] Dieses Modell bezieht somit unterschiedliche Tunneldistanzen, beziehungsweise unterschiedliche Traptiefen mit ein.

$$P(\tau_{off}) \sim 1/\tau_{off}^{1+\alpha} \tag{4.19}$$

Kürzlich erschienene Publikationen[191,205,208] stellen jedoch in Frage, dass der oben beschriebene Mechanismus der einzige für das Blinkverhalten verantwortliche Mechanismus ist. Ein zusätzlicher Mechanismus wird diskutiert, der auf fluktuierenden *trap*-Zuständen basiert. Hauptkritikpunkte am statischen Augermechanismus sind: Fluoreszenzabklingzeitabhängigkeit von der Dauer der Auszeiten[205] und Verringerung der Emissionsintensität bei gleichbleibenden Emissionsdynamiken.[208] Beide sind nicht mit dem Augermechanismus zu erklären.

Da Blinken jedoch in allen Fällen stark abhängig ist von den Oberflächenbeschaffenheiten der Partikel, kann Blinken durch die Zugabe von kurzkettigen Thiolen[209] und durch Bildung von Hybridstrukturen aus CdSe/ZnS und Titandioxidnanopartikeln[210] sehr stark reduziert werden. Diese Prozesse verlaufen jedoch über Oberflächenatome und unterscheiden sich von dem Blinken, das durch Partikel-intrinsische Fehlstellen, die z.B. durch ein nicht perfektes Aufwachsen und Spannungseffekte entstehen. So berichteten *Wang et al.* 2009 nicht blinkende CdZnSe/ZnSe *alloy*-Nanopartikel mit extrem kurzen Fluoreszenzabklingzeiten von τ= 5 ns und drei Emissionsmaxima als Folge einer strahlenden Rekombination eines Trions. Diese nicht-unterbrechende Fluoreszenz wurde kürzlich aber als Fluoreszenzsignal vom Substrat identifiziert und die Publikation zurückgezogen.[158,211,212] So wird heute davon ausgegangen, dass lediglich HLNK mit dicken Schalen von ca. 10 nm Blinken unterdrücken können, die jedoch unter der Verwendung bestimmter oberflächenaktiver Verbindungen zum Blinken angeregt werden können.[144,156,157] Die Struktur der inneren Schale hat ebenfalls einen Einfluss auf die photophysikalischen Eigenschaften der einzelnen QP und des QP-Ensembles. So berichteten Colin Heyes und Mitarbeiter kürzlich, dass unterschiedliche Schalenmaterialien einen unerwarteten Einfluss auf die photophysikalischen Eigenschaften haben; demnach korreliert ein erhöhtes Blinkverhalten nicht direkt mit hoher bzw. niedriger PLQY des Ensembles.[155] In diesem Bericht wird weiterhin darauf geschlossen, dass deaktivierende und aktivierende Prozesse während eines An/Ausvorganges unterschiedliche physikalische Ursachen haben.[155,208]

Die oben genannten Eigenschaften beziehen sich ausschließlich auf Nanopartikel, die auf einem Substrat platziert und anschließend spektroskopisch untersucht wurden. Durch diese Untersuchungen ist bekannt, dass die spektroskopischen Eigenschaften von einzelnen HLNKn massiv von dem umgebenden Medium abhängen. Neueste Untersuchungen, in denen Nanopartikel auf ein Glassubstrat abgeschieden und von Lösungsmittel umgeben,[213] in der Gasphase[214,215] bzw. in sehr verdünnter Lösung[216] untersucht wurden, eröffnen einen neuen Zugang zu den spektroskopischen Eigenschaften einzelner Partikel in anderen Umgebungen. So zeigen z.B. in einer Quadrupol Falle isolierte QP Fluoreszenz

trotz einer 14-fachen Ladung. In diesem Messaufbau können die Partikel ebenso einzeln aufgeheizt werden und so Einflüsse von Materialsublimation und Ligandenentfernung auf die PL-Eigenschaften untersucht werden.[215]

4.7 Fluoreszenzlöschung

Der Prozess der Fluoreszenzlöschung (PL-Löschung) eines Fluorophors durch eine andere Substanz wird auch Quenching (vom engl. *to quench - löschen*) genannt. Quenching ist demzufolge die Abnahme der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors und wird im Weiteren auch als solches synonym verwendet. Die Fluoreszenzlöschung kann hierbei viele verschiedene Effekte haben wie zum Beispiel Komplexbildung, Energietransfer oder interne Konversion.[58,217] Diese führen zu verschiedenen Relaxationsprozessen und Ladungsträgerdynamiken des Fluorophors und schlussendlich zur Löschung der Fluoreszenz. Durch diese Vielzahl an verschiedenen Deaktivierungsmöglichkeiten wird Fluoreszenzlöschung weiter differenziert. Da im Verlaufe dieser Arbeit diverse Substanzen benutzt werden, die die Fluoreszenz von HLNKn löschen, wird zunächst auf die unterschiedlichen Fluoreszenzlöschmechanismen eingegangen und anschließend die Besonderheit der Verwendung von HLNKn als Fluorophore für PL-Löschassays beschrieben. Da die Theorie zur Fluoreszenzlöschung von Otto Stern und Max Volmer anhand von organischen Farbstoffen entwickelt wurde (vgl. Kap. 4.6), ist die ursprünglich entwickelte Terminologie der Fluoreszenzlöschung in Bezug auf HLNKe zum Teil irreführend, was im Folgenden detailliert beschrieben wird.[36,218]

4.7.1 Grundlagen und Terminologie der Fluoreszenzlöschung

Fluoreszenzlöschung wird üblicherweise anhand der Auswirkungen des Quenchers auf die Fluoreszenzabklingzeit des Fluorophors klassifiziert.[194] Eine Verringerung der Fluoreszenzabklingzeit des Ensembles wird als dynamisches Quenching beschrieben (S. 39 ff). Historisch gesehen wurde dynamisches Quenching von Otto Stern und Max Volmer durch Stoßreaktionen erklärt. Die Verringerung der Fluoreszenz kann anhand der modifizierten Gleichungen 4.20, 4.21 und 4.22, die sich von den Gleichungen 4.15 bis 4.17 (S. 33) ableiten, verstanden werden. Zusätzlich zur intrinsischen Deaktivierung (k_{NR}) der Partikel über Oberflächenfehlstellen oder Schalenspannung, weisen die Gleichungen 4.20 bis 4.22 die Ratenkonstante k_Q^{rate} auf, die hier den Quenchingprozess allgemein beschreibt und nicht mit der bimolekularen Quenchingkonstante k_Q verwechselt werden darf. Diese Ratenkonstante muss eine ähnliche Größenordnung wie k_{NR} und Γ aufweisen, damit das dynamische Quenching als solches detektiert werden kann.

$$PLQY = \Phi_{PL} = \frac{n_{emit}}{n_{abs}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{NR} + k_Q^{rate}} \tag{4.20}$$

$$I_{PL}(t) = Ae^{-(\Gamma + k_{NR} + k_Q^{rate})t} \tag{4.21}$$

$$\frac{1}{\tau_{av}} = \Gamma + k_{NR} + k_Q^{rate} \tag{4.22}$$

Wie den Gleichungen zu entnehmen ist, klingt die PL in Anwesenheit eines dynamischen Quenchers schneller ab, was zu einer verringerten PLQY und Fluoreszenzabklingzeit führt. Dementgegen wird eine Verringerung der Fluoreszenzintensität bei gleichbleibender Fluoreszenzabklingzeit des Ensembles als statische Fluoreszenzlöschung bezeichnet. Diese geht üblicherweise mit einem sehr effektiven Energie- beziehungsweise Elektronentransfer zwischen Fluorophor und Quencher einher. Dies führt dazu, dass (nahezu) alle Ladungsträger nicht-strahlend über den zusätzlichen Quenching-Relaxationsprozess abklingen. In der Analyse von der Fluoreszenzlöschung molekularer, organischer Farstoffe wird dies mit einer Komplexbildung assoziiert. Dieser Komplex hat eine höhere Verweilzeit als die Fluoreszenzabklingzeit des Fluorophors (vgl. Kap. 4.7.2) und der entstandene angeregte Zustand wird sehr effektiv gelöscht. Somit wird das Fluorophor aus dem Ensemble entfernt, die Fluoreszenzintensität des Ensembles nimmt ab, jedoch bleibt die Fluoreszenzabklingzeit des Ensembles konstant. Wird ein einzelner Nanokristall i in diesem Ensemble betrachtet, so weist dieser eine sehr hohe Ratenkonstante $k_Q^{rate}(i)$ auf, und es gilt $k_Q^{rate}(i) >> \Gamma$, wodurch die Fluoreszenz ein äußerst unwahrscheinliches Ereignis darstellt. Die Fluoreszenz anderer Nanokristalle, die keinen Komplex mit dem Quencher bilden, sind hingegen nicht betroffen, was der Grund für die unveränderte Abklingzeit des Nanopartikelensembles darstellt.

Im Falle von HLNKn kann es jedoch auch zu einer Komplexbildung zwischen einem Quencher und dem HLNK kommen, wonach der HLNK sehr wohl noch PL-Intensität aufweist. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn Farbstoffmoleküle oder andere Akzeptoren an den Nanopartikel koordiniert werden und es zu einer Dipol-Dipol Interaktion kommt.

Eine Dipol-Dipol Interaktion von einem Donor (Fluorophor) auf einen Akzeptor (Quencher) wurde bereits 1948 von *Theodor Förster* beschrieben; seitdem ist dieser Energietransfer als *Förster-Resonanzenergietransfer* (FRET) benannt (Kap. 4.7.3, S. 42).[219]. Wird Energie in Form eines Elektrons übertragen, muss das Elektron durch den Raum tunneln, um vom Donor auf den Akzeptor überzugehen. Die Elektronenübertragung bei Redoxreaktionen wurde von *R. A. Marcus* 1956 theoretisch beschrieben[220] und 1992 mit dem Nobelpreis für Chemie[221] ausgezeichnet.

4.7.2 Elektronenübertragung als Fluoreszenzlöschmechanismus

Bei der Elektronenübertrag zwischen einem organischen Fluorophor und einem Akzeptor unterscheiden sich dynamisches und dem statischem Quenching maßgeblich in der Kontaktzeit zwischen den beiden beteiligten Substanzen und der Lage der Redoxpotentiale. Dies liegt daran, dass mit längerer Kontaktzeit und höherer Potenzialdifferenz der wechselwirkenden Orbitale die Wahrscheinlichkeit des Elektronentransfers steigt. In der Regel passieren Elektronentransferprozesse auf kürzeren Zeitskalen als Fluoreszenz, besitzen also ein höheres k_Q^{rate} und werden somit als statisches Quenching detektiert.

Damit Fluorophor und Quencher wechselwirken können, müssen sie sich auf wenige Ångström annähern. Bei beiden Quenchingmechanismen wird die Fluoreszenzintensität (üblicherweise als F, FI, PL oder I bezeichnet) herabgesetzt. Daher ist es nicht möglich aus dem Verlauf von F Aussagen über den Quenchingmechanismus zu treffen. In Abbildung 4.8 ist der Verlauf von I_0/I gegen die Quencherkonzentration für beide Quenchingmecha-

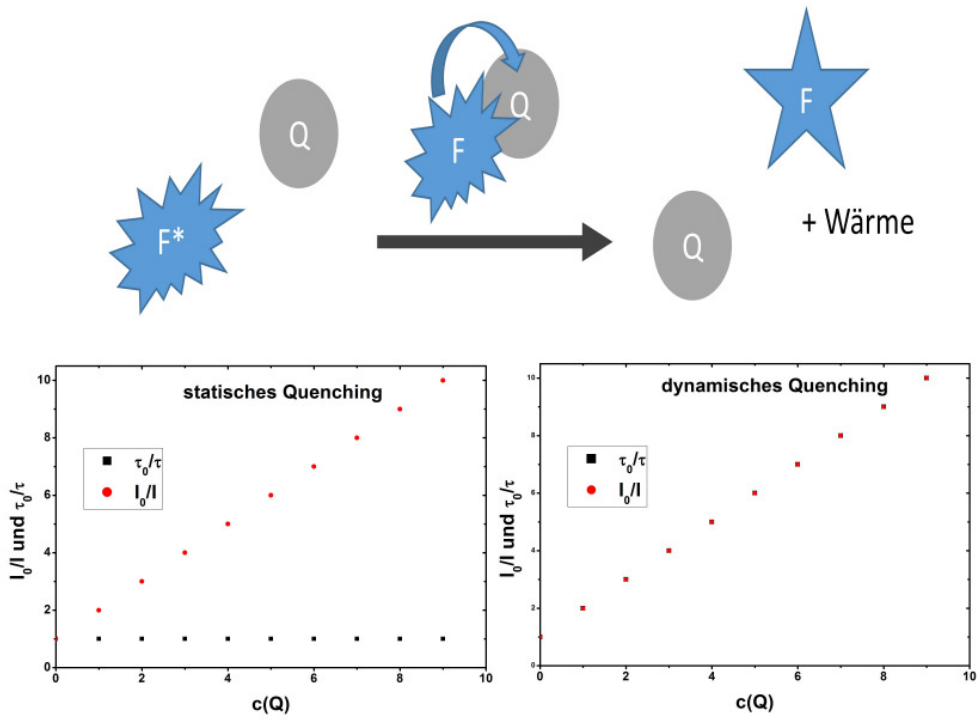


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung von Quenching und der Entwicklung der Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzabklingzeit:[194] Untere Reihe: Stern-Volmer Auftragung der Fluoreszenzintensitäten und Fluoreszenzabklingzeiten von dynamischem (links) und statischem Quenching (rechts), berechnet mit den Gleichungen, die in diesem Kapitel für dynamisches und statisches Quenching präsentiert werden.

nismen aufgetragen, beide verlaufen linear. Eine Unterscheidung der Mechanismen ist nur aufgrund der Entwicklung der Fluoreszenzabklingzeit möglich. Beim dynamischen Quenching nimmt die Fluoreszenzabklingzeit im gleichen Maße wie die Fluoreszenzintensität ab, wie links in Abbildung 4.8 zu erkennen ist. Beim statischen Quenching wird die Fluoreszenzabklingzeit nicht durch den Quencher beeinflusst und die Auftragung τ_0/τ ist eine Gerade mit der Steigung null (links in Abb. 4.8). In den meisten Fällen treten dynamisches und statisches Quenching gleichzeitig auf.

4.7.2.1 Dynamisches Quenching

Otto Stern und Max Volmer fanden 1919 in ihrem berühmten Artikel „Über die Abklingzeit der Fluoreszenz“, dass die Fluorezenzabklingzeit von Iod vom Partialdruck in der Messkammer abhängt und dass der Zusatz von Helium zu einer Verringerung der Fluoreszenz von Iod unter Aktivierung des Heliums einhergeht. Diese Verringerung der Fluoreszenz wurde mit einem schnelleren Abklingen der Iod-Fluoreszenz korreliert.[218] Demzufolge wird dynamisches Quenching auch Stoß-Quenching genannt.[58] Otto Stern und Max Volmer lieferten damit auch einen Beweis dafür, dass es sich bei Fluoreszenz um

einen quantenmechanischen Vorgang handelt. Damit eine PL-Löschreaktion dieser Art möglich ist, müssen das angeregte Fluorophor und der Quencher innerhalb der Zeit, in der der angeregten Zustand existiert, nahekommen oder stoßen. Da die Elektronenübertragungsreaktion schneller ist als die strahlende Relaxation, wird sowohl die Fluoreszenzabklingzeit τ als auch Fluoreszenzintensität F beim dynamischen Quenching verringert. Das dynamische Quenching kann mit Hilfe der Stern-Volmer-Gleichung (Gl. 4.23) für dynamisches Quenching beschrieben werden.[194] Die Summe $\Gamma + k_{NR}$ bezeichnet hierbei die Ratenkonstante des Fluorophors in Abwesenheit eines Quenchers (vgl. Gl. 4.17) und k_Q die bimolekulare Quenchingkonstante.

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\Gamma + k_{NR} + k_Q[Q]}{\Gamma + k_{NR}} = 1 + K^{dym}[Q] \tag{4.23}$$

F_0 ist die Fluoreszenzintensität, $\tau_0 = (\Gamma + k_{NR})^{-1}$ die Fluoreszenzabklingzeit bei Abwesenheit des Quenchers und k_Q die bimolekulare Quenchingkonstante, die sich aus der Quenchingeffizienz f_Q und der diffusionskontrollierten bimolekularen Geschwindigkeitskonstante k_0 zusammensetzt:

$$k_Q = f_Q k_0 \tag{4.24}$$

k_0 kann mit Hilfe der Smoluchowski-Gleichung 4.25 aus den Kollisionsradii R_i und der Summe der Diffusionskoeffizienten der beteiligten Spezies D_i beschrieben werden. Der Faktor $4\pi N/1000$ konvertiert die Molarität in $Molek\ddot{u}le/cm^3$, wobei N die Avogadrozahl ist.[222] Für den Kollisionsradius wird in der Regel die Summe der Molekülradii der beteiligten Spezies benutzt.[194] Es ist anzumerken, dass es sich bei dem Kollisionsradius um den gedachten Radius des Fluorophors handelt, in dem eine Quenchingreaktion ablaufen kann. Nur der Quencher, der durch diese Kugel diffundiert, kann eine Quenchingreaktion eingehen, und von daher ist die Quenchingreaktion umso wahrscheinlicher je größer der Kollisionsradius ist ($k_0 \sim R$). Dadurch, dass die aus der Fluoreszenzabklingzeit von Iod berechneten Stöße mehr sind als die, die Iod als ideales Gas betrachtet, eingehen würde, schlossen Otto Stern und Max Volmer darauf, dass ein angeregtes Teilchen einen größeren Wechselwirkungs- als Molekülradius besitzt.

$$k_0 = \frac{4\pi RDN}{1000} = \frac{4\pi N}{1000}(R_f + R_q)(D_f + D_q) \tag{4.25}$$

Die Polymere, die in dieser Arbeit verwendet werden, um HLNK in Wasser zu überführen, erschweren den Zugang des Quenchers zum Kollisionsradius. Das führt dazu, dass mit dem Analysieren der Fluoreszenzeigenschaften von HLNK in Anwesenheit von Quenchern Aussagen über deren Zugänglichkeit und somit über die Beschaffenheit der Polymermembran getätigt werden können (Kap. 6).

Über k_Q können Informationen über die Quenchingeffizienz und über die Zugänglichkeit der Partikel gewonnen werden. Für diffusionskontrollierte Reaktionen nimmt k_Q Werte von bis zu 10^{10} $[s\ M]^{-1}$ an, wohingegen größere Werte Bindung zwischen Fluorophor und Quencher anzeigen.[194] Die Stern-Volmer Gleichung basiert auf der Annahme, dass die Fluorophore für alle Quenchermoleküle gleich zugänglich sind, dies wird durch einen

linearen Verlauf von F_0/F gegen die Quencherkonzentration *[Q]* gezeigt. Gibt es mehrere, unterschiedlich zugängliche Fluorophore im betrachteten System, beziehungsweise unterschiedliche Zugangswege, so weicht der Verlauf vom Linearen ab. Dieses Verhalten wird oft für das Quenching von Tryptophan in Proteinen gefunden, da sich diese in unterschiedlichen Umgebungen im Protein befinden und so unterschiedlich zugänglich sind.[194] Dadurch, dass der Quencher mit dem angeregten Fluorophor stößt, verringert sich die detektierte Fluoreszenzabklingzeit konzentrationsabhängig und es gilt:

$$\frac{\tau_0}{\tau(Q)} = 1 + k_Q \tau_0 [Q] \tag{4.26}$$

Einsetzen in Gleichung 4.23 liefert:

$$\frac{\tau_0}{\tau(Q)} = \frac{F_0}{F} \tag{4.27}$$

Dieses Verhalten ist rechts in Abbildung 4.8 (S. 39) dargestellt. Beim rein dynamischen Quenching ändert sich die Anfangszählrate bei der Bestimmung der Fluoreszenzabklingzeit mittels Einzelphotonenzählung (TCSPC *time correlated single photon counting*) nicht, da weiterhin alle Fluorophore angeregt werden, bevor sie durch einen Stoß deaktiviert werden und keines davon durch einen sehr effektiven Zerfallskanal gelöscht wird (für eine Veranschaulichung siehe Abb. 6.2, S. 66).

4.7.2.2 Statisches Quenching

Beim statischen Quenching bildet sich ein nicht-fluoreszierender Komplex aus Fluorophor und Quencher $[FQ]$ (Abb. 4.8), der jedoch immer noch Photonen absorbiert. Der entstandene, angeregte Zustand wird dann in einer sehr schnellen Elektronenübertragungsreaktion deaktiviert, sodass Fluoreszenz, mit ihrer vergleichsweise langsamen Geschwindigkeitskonstante, sehr unwahrscheinlich wird (Abb. 4.6). Die Komplexbildung kann mit einem chemischen Gleichgewicht geschrieben werden als

$$F + Q \rightleftharpoons [FQ] \tag{4.28}$$

und die Gleichgewichtskonstante, die der Stern-Volmer-Konstante für statisches Quenching K^{stat} entspricht, ist

$$K = K^{stat} = \frac{[FQ]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \tag{4.29}$$

Da es sich um ein chemisches Gleichgewicht handelt, liegt in der Regel noch freies Fluorophor in Lösung vor, das durch den Quencher unbeeinflusst ist. Die Fluoreszenzabklingzeit ändert sich nicht, jedoch nimmt die Anfangszählrate im TCSPC und die PL-Intensität ab. Umstellen von Gleichung 4.29 ergibt Gleichung 4.30, die analog zur Stern-Volmer-Gleichung vom dynamischen Quenching aufgebaut ist. Zur Unterscheidung der beiden Quenchmechanismen muss entweder die Temperaturabhängigkeit des Quen-

chings oder, wie ausführlich dargelegt, der Verlauf von τ_0/τ herangezogen werden (vgl. Abb. 4.8).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K^{stat}[Q] \tag{4.30}$$

4.7.2.3 Gemischtes Quenching

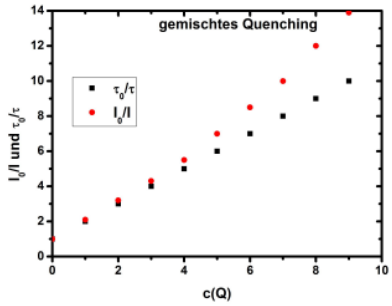


Abbildung 4.9: Gemischtes Quenching. Treten dynamisches und statisches Quenching gemeinsam auf, weicht der Kurvenverlauf von F_0/F vom linearen Verhalten ab. Es ist eine Auftragung von Gleichung 4.31 gezeigt.[194]

Dynamisches und statisches Quenching treten oftmals gemeinsam auf. In diesem Fall können die Stern-Volmer Konstanten K^{dym} und K^{stat} mithilfe von Gleichung 4.31 bestimmt werden, jedoch nur dann, wenn nur zwei Einzelvorgänge ablaufen, die sich jeweils durch ideale Vorgänge beschreiben lassen. Bei gemischtem Quenching verläuft F_0/F mit zunehmendem Quencher nach oben gekrümmt, wie Abbildung 4.9 zu entnehmen ist.

$$\left(\frac{F_0}{F} - 1\right)\frac{1}{[Q]} = (K^{dym} + K^{stat}) + K^{dym}K^{stat}[Q] \tag{4.31}$$

4.7.3 Energieübertragung, Dipol-Dipol Interaktionen und Förster-Resonanzenergietransfer

Der (Förster)-Resonanzenergietransfer beruht auf Dipol-Dipol-Interaktionen zwischen einem Donor und einem Akzeptor. Zur theoretischen Beschreibung werden punktförmige Akzeptoren bzw. Donoren angenommen. Da die Wechselwirkung von Dipolen mit ihrer Umgebung mit den Faktor r^{-3} abnehmen, ergibt sich eine Abstandsabhängigkeit von r^{-6} für die Dipol-Dipol Interaktion. Beide Dipole müssen energetisch wechselwirken können, also Resonanz aufweisen, was sich dadurch beschreiben lässt, dass die korrespondierenden Emissions- und Absorptionsspektren vom Donor und Akzeptor sich überlappen müssen. Mathematisch wird die Überlappung vom Überlappungsintegral J (Gleichung 4.32) beschrieben, was von der normierten Strahlungsintensität des Donors $f_D(\lambda)$ und dem Extinktionskoeffizienten des Akzeptors ϵ_A abhängt.[219,223]

$$k_{RET} \sim J = \int_0^\infty f_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \tag{4.32}$$

$$k_{RET} \sim r^{-6} \tag{4.33}$$

k_{RET} ist die Geschwindigkeitskonstante vom Energietransfer. Die Kopplung von Donor D_R und Akzeptor A_R wird durch die Reorganisation der Chromophore und deren Lösungsmittelhülle bei den Übergängen D*—>D und A—>A* erschwert. Die relative Orientierung der Chromophore ist ebenfalls wichtig, da es sich bei den Dipolmomenten der Substanzen um vektorielle Größen handelt und wird durch den Orientierungsfaktor κ angegeben. Bei freier Drehbarkeit der Chromophore ist $\kappa = 2/3$.[223] Der Radius, bei der die Effizienz der Energieübertragung 50% beträgt, wird als Försterradius R_0 bezeichnet, der sich aus Gleichung 4.34 in der N_A die Avogradozahl und n_D den Brechungsindex des Mediums darstellt und die das Überlappungsinegral J erhält.[194,219,224]

$$R_0 = \left(\frac{9000ln(10)\kappa^2|PLQY|}{128\pi^5 n_D^4 N_A} J\right)^{1/6} \tag{4.34}$$

Der Donor wird durch ein Photon angeregt und überträgt die Energie strahlungslos auf den Akzeptor. Im Falle eines fluoreszierenden Akzeptors kann dieser die übertragene Energie in Form eines Photons abgeben. Es gibt jedoch ebenfalls dunkle Quencher, die die aufgenommene Energie in Form von Schwingungen an die Umgebung abgeben.

Die oben diskutierte Beschreibung beruht auf der Verwendung eines einzelnen Akzeptors mit einem Donor und besitzt Reichweiten von maximal 10 nm. Kürzlich gelang es einer Forschergruppe um Michael Schlierf, unter Verwendung von multiplen Akzeptoren, diesen Abstand zu vergrößern und Informationen über eine weitere Distanz zu übertragen.[225] Dies deckt sich mit Beobachtungen von Hedi Mattoussi und Mitarbeitern, die CdSe/ZnS Nanokristalle mit einer Vielzahl von verschiedenen Akzeptoren funktionalisiert und ebenfalls eine Korrelation zwischen Quencheffizienz und Anzahl der verknüpften Akzeptoren gefunden haben.[224,226–228]

4.7.4 Besonderheiten bei der Verwendung von Halbleiternanokristallen als Donor für Fluoreszenzlöschassays

Durch ihre lange Fluoreszenzabklingzeit sind Halbleiternanokristalle besonders gut für Fluoreszenzlöschassays geeignet.[36,217] Dies in Kombination mit ihrer hohen Photostabilität ermöglicht besonders genaue Fluoreszenzlöschassays.[229] Halbleiternanokristalle sind in der Regel größer als organische Fluorophore und deswegen ist es relativ einfach möglich eine Vielzahl von Akzeptoren an einen Halbleiternanokrsitall zu koppeln, was die Sensitivität der Fluoreszenzlöschassays beeinflusst.[224–228] Weiterhin können die optischen Eigenschaften von HLNKn durch eine geschickte Wahl der verknüpften Moleküle beeinflusst werden.[217] All diese Prozesse verlangen eine gezielte Modifikation der Quantenpunkte, was in der Regel in wässrigem Medium geschieht. Von daher wird im Nachfolgenden der Phasentransfer von Nanokristallen und deren Funktionalisierungsstrategien beschrieben.

4.8 Oberflächenchemie und Phasentransfer von Nanokristallen

Hochqualitative Nanokristalle werden in der Regel in organischen Lösungsmitteln synthetisiert und besitzen hoch reaktive Oberflächen.[53,230,231] Die Beschaffenheit dieser Oberflächen und deren Ligandenumgebung wird in einem aktuellen Übersichtsartikel von Dimitri Tapalin und Taegwahn Heyon *et al.* beschrieben und zusammengefasst.[232] Wenn Nanopartikel jedoch in biologischen Umgebungen eingesetzt werden, sind hoch reaktive Oberflächen normalerweise unerwünscht, da sie unkontrolliert Proteine und Peptide binden können, wie in Kapitel 4.11.2 ausführlich dargestellt wird. Die Synthese in organischen Lösungsmitteln hat zur Folge, dass Nanokristalle hydrophobe Liganden tragen und somit in Wasser unlöslich sind.[41] Selbst wenn dies nicht der Fall ist, können einzelne Liganden, die in der Synthese eingesetzt werden, eine unerwünscht hohe Affinität zu der Oberfläche haben, was eine spätere Abtrennung schwierig macht.[112] Da die Ligandenumgebung von Nanopartikeln für deren Interaktion mit der Umgebung verantwortlich ist, bestimmt diese maßgeblich die biologischen Eigenschaften der Nanopartikel.[233–236] Weiterhin kann die Ligandenumgebung auch die photophysikalischen Eigenschaften von Quantenpunkten beeinflussen.[237]

4.8.1 Phasentransfer

Da ein mögliches Anwendungsgebiet von Nanokristallen die Anwendung in biologischen, also wässrigen Umgebungen ist, wurden eine Vielzahl von Methoden entwickelt um Nanokristalle in wässrigen Umgebungen zu stabilisieren. Diese Methoden beruhen auf der Verwendung von kleinen, hydophilen Liganden oder (amphiphilen) Polymeren[234] und lassen sich generell in zwei Kategorien einstufen: Dem Ligandenaustausch und der Verkapselung. Beim Ligandenaustausch werden die nativen Liganden der Nanokristalle entfernt, wohingegen bei der Verkapselung die nativen Liganden in der Regel an der Nanokristalloberfläche gebunden bleiben und eine zusätzliche Ligandenschicht aus Polymeren um den Nanokristall hergestellt wird. Die am häufigsten verwendete Verbindung, um Nanokristalle in wässriges Medium zu überführen, ist Polyethylenglycol (PEG, jedoch oftmals als Polyethylenoxid PEO bezeichnet).[238–240] PEG wird seit mehreren Jahrzenten in der Pharmakologie verwendet, da es einen so genannten Stealth-Effekt aufweist, also die Immunerkennung von Substanzen verringert und ihre Bluthalbwertszeit erhöht. Da schon eine Vielzahl von pegylierten Wirkstoffen auf dem Markt sind, besteht in Bezug auf pegylierte Verbindungen ein hohes Maß an klinischen Daten.[241–243] Dadurch wurde herausgefunden, dass PEG, bei all den Vorteilen, die es hat, Überempfindlichkeit auslösen kann. Weiterhin kann es unter chemischem Stress zu toxischen Produkten abgebaut werden.[242] Trotz dieser Nachteile ist PEG jedoch immer noch der „Goldstandard“ für den Einsatz von Polymeren in medizinischen Anwendungen.[242,244] Um eine Alternative zu PEG-basierten Ligandensystemen anzubieten, wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von zwitterionischen Liganden entwickelt, die aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte ebenfalls die Proteinadsorption verringern und vielversprechende Eigenschaften in *in vivo* Anwendugen zeigen.[42,104]

4.8.1.1 Ligandenaustausch

Ligandenaustauschreaktionen basieren darauf, dass die nativen Liganden von einem anderen Liganden ersetzt werden, der anschließend die Wasserlöslichkeit generiert. Der neu hinzugefügte Ligand muss also eine höhere Affinität zur Nanokristalloberfläche besitzen als der ursprünglich gebundene Ligand oder in hohem Überschuss hinzugegeben werden.[232] Durch den Ligandenaustausch bildet sich in der Regel eine Monolage des Liganden auf der Nanokristalloberfläche.[245] Dies wird üblicherweise erreicht, indem dem Nanokristall ein (thiolbasierter) Chelatligand angeboten wird, der mit seiner Vielzahl von funktionellen Gruppen eine hohe Bindungskonstante mit der Nanokristalloberfläche aufweist.[246] Dadurch, dass die koordinierten Liganden mit den in Lösung befindlichen im chemischen Gleichgewicht stehen, ist die Multivalenz der Liganden nötig, damit das Lösen von der Nanopartikeloberfläche unterbunden bzw. verringert wird.[247] Das Ablösen der Liganden ist generell ein Nachteil von Ligandenaustauschreaktionen, wohingegen in der Regel kleinere Strukturen mit Ligandenaustauschreaktionen dargestellt werden können.[248,249] Dies ist auf die kleinen Molekulargewichte der Liganden zurückzuführen, die üblicherweise für den Ligandenaustausch verwendet werden. Andererseits kann diese Labilität jedoch auch von Vorteil sein, wenn sehr sensitive Detektionsassays verwendet werden sollen, die darauf beruhen, dass der Analyt an eine freie Koordinationsstelle des Nanokristalls bindet, wie am Beispiel von Liponsäure und monovalenten Thiolen gezeigt werden konnte.[247] Thiolbasierte Liganden haben ebenfalls den Nachteil, dass sie die Fluoreszenz der Quantenpunkte statisch löschen können. In diesem Fall sind die statisch gelöschten Nanopartikel für die fluoreszenzbasierte Detektion unsichtbar und wichtige Information gehen verloren.[250]

Eine häufig verwendete Ankergruppe für Quantenpunkte ist die Liponsäure, ein natürlich vorkommendes Coenzym, das in seiner geöffneten Form der Dihydroliponsäure an die Nanokristalle binden kann.[251,252] Durch relativ einfache, aber zeitaufwändige Synthesen kann Liponsäure in pegylierte, funktionelle Liganden überführt werden, die anschließend für den Phasentransfer von Quantenpunkten eingesetzt werden können.[253] Auf Grundlage von Liponsäure können mono[254] bzw. multidentate[62,255,256] zwitterionische Liganden dargestellt werden. Eine Öffnung der Liponsäure erfolgt reduktiv, was entweder nass- oder photochemisch erfolgt,[62,257] wobei der Ligandenaustausch an der flüssig/flüssig-Grenzfläche erfolgt.[258] Den Nachteil der Ablösung molekularer Liganden von der Nanokristalloberfläche kann Einhalt geboten werden, wenn polymere, multidentate Liganden verwendet werden. Diese Liganden weisen eine Vielzahl von koordinierenden Gruppen bei möglicher Quervernetzung der einzelnen Einheiten auf.[259–262] Trotz der kolloidalen Stabilität dieser Konstrukte ist die Nanokristalloberfläche für kleine Liganden wie Polyhistidin zugänglich, was in oben genannten Studien dazu benutzt wird, die Nanokristalle mit Peptiden zu funktionalisieren.[62,256,259,260,263]

4.8.1.2 Polymere und Verkapselung von Nanopartikeln und Wirkstoffen

Bei der Verkapselung werden wasserunlösliche Nanokristalle mit einer Polymerschicht umgeben. Dies passiert üblicherweise unter Vorhandensein der nativen Liganden, also unter „Einpacken“ der nativen Nanopartikel.[41,235,264–266] Polymere Kapseln, beziehungsweise polymerfunktionalisierte Therapeutika haben in der Regel eine hohe Bluthalbwertszeit

und werden dementsprechend als zukünftige Nanoarzneien gehandelt oder befinden sich teilweise schon in klinischen Untersuchungsphasen.[267–270] Diverse Studien zeigen, dass die gezielte Verkapselung von Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Camptothecin bzw. *cis*-Platin bei verringerten Wirkstoffdosen höhere Effekte erzielen.[271,272] Dies beruht darauf, dass sich die Polymerkapseln, die die Wirkstoffe tragen, stärker in Tumoren ansammeln als molekulare Wirkstoffe und und so eine geringere Wirkstoffmenge benötigt wird. Weiterhin kann die geringe Wasserlöslichkeit von organischen Wirkstoffen erhöht werden, wenn sie von Polymerkapseln getragen werden. Die Verwendung von Polymerkapseln für Bildgebung und Therapie wurde kürzlich von Mahmoud Elsabahy *et al.* ausführlich zusammengefasst und an dieser Stelle sei auf seinen Übersichtsartikel verwiesen.[273] Ein weiterer, sehr ausführlicher Übersichtsartikel wurde von einer Arbeitsgruppe um Brigitte Voit angefertigt, wobei hier der Fokus auf stimulus-sensitive Nanocontainer gelegt wurde.[266]

Da Polymer Makromoleküle sind, die gegebenenfalls die größen- und formabhängigen Eigenschaften von Nanokristallen maskieren, stellt sich die Frage, welche Vorteile eine Verkapselung von Nanokristallen in Polymeren mit sich bringt.[20,274] Zum einen kann angenommen werden, dass viele der Eigenschaften von Polymerkapseln unabhängig von ihrer Beladung sind. Somit könnten prinzipiell alle Erkenntnisse, die für reine Polymerpartikel gelten, direkt auf Nanopartikel-gefüllte Polymerkapseln übertragen werden.[268,270,273] Anstelle von organischen Wirkstoffen könnten somit Goldnanopartikel in Krebszellen transportiert werden, welche dann durch Hyperthermie die Krebszelle zerstören können.[104] Zum anderen können polymerverkaspselte Eisenoxidnanokristalle mit Antikörpern versehen und anschließend mithilfe von Magnetresonanztomographie Tumore detektiert werden.[265] Ein sehr interessantes, jedoch noch nicht so intensiv bearbeitetes Gebiet, ist die Verwendung von polymerverkapselten, fluoreszierenden Quantenpunkten. Die ersten Ergebnisse der publizierten Forschungsvorhaben sind jedoch in einem Bericht von Dusica Maysinger *et al.* zusammengefasst.[275] Hier können die Vorteile[36] von Quantenpunkten gegenüber organischen Farbstoffen, die im Kapitel 4.5 dargestellt wurden, benutzt werden, um fluoreszierende Konstrukte mit einer großen Helligkeit und Stabilität darzustellen.[265,276,277] Christian Schmidtke zeigte in seiner Dissertationsschrift, dass verschieden funktionalisierte Polyisopren-*block*-Polyethylenglycol Diblockcopolymere (PI-*b*-PEO-FG) zur Verkapselung von Quantenpunkten verwendet werden können.[267] Die so entstehenden multifunktionalen Nanocontainer werden unterschiedlich in Krebszellen aufgenommen und können mit verschiedenen, biologisch aktiven Molekülen funktionalisiert werden.[265,267,278] Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Darstellung von Quantenpunkt-basierten Sensoren, die teilweise im Kapitel 4.7.4 diskutiert wurden.[37,229,279] Durch ihre lange Fluoreszenzabklingzeit eignen sich Quantenpunkte besonders für die Fluoreszenzlebenszeit-basierte Bildgebung FLIM (*fluorescence lifetime imaging*).[38,280–282] Eine interessante Studie wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe um Moungi Bawendi veröffentlicht, in der der hohe Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt von Quantenpunkten benutzt wurde, um die Phosphoreszenz von Palladium-Porphirin Komplexen anzuregen. Dieser Komplex wurde kovalent an den Quantenpunkt gebunden und anschließend in einer Lipidmizelle eingeschlossen. Die Sauerstoffempfindlichkeit der Palladium Porphyrinkomplexe konnte ausgenutzt werden, um einen nicht-invasiven *in vivo*

Sauerstoffsensor für Blutgefäße darzustellen.[283] Für diesen Prozess müssen die Sauerstoffmoleküle in den Liposomenkern diffundieren, um mit dem eingeschlossenen Palladium-Porphyrinkomplex wechselwirken zu können. Nanokristalle, die in Liposomen verkapselt sind, können ebenfalls dafür benutzt werden, um (braunes) Fettgewebe und Fettstoffwechsel zu untersuchen.[284–286] Weiterhin wird ebenfalls von *Verkapselung* gesprochen, wenn mithilfe eines Sol-Gel Verfahrens eine Silikatschicht um Nanokristalle synthetisiert wird.[287,288]

4.8.1.3 Saat-Emulsionspoylmerisation

Nanopartikelumgebende, amphiphile Polymermembranen können aufgrund ihrer Hydrophobizität als Reaktionsraum für eine Emulsionspolymerisation (EP) genutzt werden.[289,290] Dieses ermöglicht eine gleichzeitige Funktionalisierung, wenn funktionale Emulgatoren beziehungsweise Monomere verwendet werden.[291] Bei der Emulsionspolymerisation wird ein in Wasser unlösliches Monomer in Wasser dispergiert. Die Monomertröpfchen werden hierbei von Emulgatoren stabilisiert, da sie Mizellen bilden, die als Reservoir für die Monomere fungieren.[292,293] Die Monomere liegen entweder gelöst in den Mizellen oder als Monomertröpfchen von ca. 1 µm vor. Wenn polymerverkapselte Nanopartikel in Lösung vorhanden sind, können diese ebenfalls als Reservoir und Reaktionsraum für die Monomere dienen. Diese polymerverkapselten Nanopartikel können somit als Saatpartikel bezeichnet werden und für eine Vielzahl von Anwendungen funktionalisiert werden, was in der Dissertationsschrift von Hauke Kloust gezeigt wird.[289–291,294] Eine (reverse) Emulsionspolymerisation ist eine universell einzusetzende Methode zur Herstellung von Polymernanokapseln mit verschiedenen Funktionalitäten.[295–298]

4.8.2 Ligandenanzahl

Um die Eigenschaften von wässrigen, ligandentragenden Nanokristallsystemen zu untersuchen, vorherzusagen oder ggf. berechnen zu können, ist es notwendig die Anzahl der Liganden und deren Orientierung zu kennen. Die Bestimmung der Anzahl der Liganden mittels einer Kombination von konventionellen Kopplungsstrategien und UV-Vis, NMR bzw. ICP-MS Spektroskopie von wasserlöslichen Nanopartikeln wurde berichtet.[299–302] Diese verwendeten Methoden haben jedoch gewisse Nachteile, wie zum Beispiel die unspezifische Adsorption von Farbstoffmolekülen und die Zeitaufwändigkeit der Bestimmung.[302]

Für Quantenpunkte, die noch ihre nativen Liganden tragen, ist bekannt, dass mit zunehmender Größe der Partikel sich die linearen Octadecylamin Liganden dichter packen. Dies ist ein Resultat der Nanopartikeloberflächenkrümmung, die bei größeren Partikeln abnimmt, und somit die parallele Anordnung der Liganden begünstigt, was zu einer höheren Viskosität der Schale führt.[303,304]

4.9 Fluoreszenzlöschung und Ionensensitivität von eingekapselten Quantenpunkten

Es ist bekannt, dass viele Ionen die PL von Quantenpunkten löschen können, wenn sie mit ihnen in direkten Kontakt treten.[48,280,281,305–308] Für eine effektive Detektion von Ionen wäre jedoch ein PL Gewinn von Vorteil, da die PL von Quantenpunkten von vielen Substanzen gelöscht wird.[48] Silber(I), Kupfer(I) und (II) und Eisen(III) stellen unter den Kationen die Spezies dar, die die PL von Quantenpunkten am effektivsten löschen.[309] Hierbei ist vor allem die Sensitivität gegenüber Kupfer- und Eisenionen problematisch, da diese im Körper häufig vorkommen und somit PL basierte Detektion limitieren könnten.[310–312] Anionen löschen die PL von Quantenpunkten in der Regel weniger effektiv, jedoch ist die PL-löschende Wirkung von Cyanid und Chlorid berichtet.[313]

Die extreme Sensitivität der Quantenpunktfluoreszenz führt dazu, dass diese benutzt werden, um Ionensensitivitätsassays z.B. für Abwässer zu entwickeln.[48,280,281,305–308] Da jedoch mitunter ein Kation pro Nanokristall ausreicht, um die Fluoreszenz irreversibel zu löschen und Nanokristallhüllen vermutlich hinreichend permeabel sind, wurden Fluoreszenzlöschuntersuchungen der Nanokristall-umgebenden Membran mit Ionen noch nicht häufig berichtet.[314–316] Solche Untersuchungen sind von grundlegendem Interesse für die Oberflächenzugänglichkeit von Nanokristallen, die für katalytische Prozesse oder SERS-basierte Sensoren bestimmend ist.[317] Die wenigen Studien zum Quenchingverhalten von Nanopartikeln in Abhängigkeit von der umgebenden Polymermatrix sind im Nachfolgenden zusammengefasst. Eine Vergleichbarkeit zwischen diesen Systemen ist schwierig, da Effekte von unterschiedlichen Partikeln, Polymeren, Ankergruppen und Quenchern nicht mit Sicherheit gegeneinander aufgewogen oder verglichen werden können. So beobachten zum Beispiel *Boldt et al.* keinen Einfluss der PEG Kettenlänge für 1000 bzw. 2000 g/mol schwere PEO-$(SH)_3$ auf die Permeabilität der Proben[188,318], wohingegen *Beaune et al.* eine größere Abschirmung mit zunehmender PEG Kettenlänge (2000 und 5000 g/mol) diskutieren.[314]

Boldt et al. berichteten weiterhin, dass für PEO-$(SH)_3$ verkapselte *core/shell/shell* Nanopartikel von einer 1-2 nm großen Polymerschicht, die für kleine organische Moleküle undurchlässig ist. Weiterhin wird mit dieser Oberflächenbelegung ein Abschirmungsgewinn gegenüber Eisen(III)-Ionen im Vergleich zu Quantenpunkten, die Cystein auf der Oberfläche tragen, berichtet.[188,318] Als Quencher wurde hierbei Eisen(III)nitrat verwendet, das in Wasser langsam zu kolloidalem Eisen(III)hydroxid reagiert.[319] Dadurch kann die Konzentration der Eisen(III)ionen, die für das Quenching zur Verfügung stehen, nicht mit Sicherheit bestimmt werden. *Texier et al.* berichten in 2010 von einem Fluoreszenzabfall von 50% unter *Click* Reaktionsbedingungen (0.1 äq. Kupfer pro funktioneller Gruppe, entsprechen 10 äq. pro Partikel) und eine allgemeine Zunahme des Absorptionsspektrums durch Kupferzugabe, die eventuell auf einen Streuhintergrund zurückzuführen ist.[320] In 2011 berichtet die gleiche Arbeitsgruppe den Einbau von Kupfer in die Hülle von CdSeTe/ZnS *core/shell*- Partikeln durch Kationenaustausch.[314] Ein solcher Kationenaustausch wurde von *Son et al.* 2004 für Cadmiumselenide gezeigt, in denen das Cadmium reversibel gegen Silber ausgetauscht wurde. Kürzlich veröffentlichten *Schieber et al.* für Polystyrol-Co-Maleinsäureanhydrid (PSMA) eingekapselte CdSe/ZnS eine 86%ige Fluo-

reszenzlöschung unter den oben genannten *Click*-Bedingungen.[321,322] Somit verwundert es nicht, dass der einzig bekannte Bericht, in dem kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition an Quantenpunkten durchgeführt wurde, eine ca. 80 nm dicke Hülle Silica um die Quantenpunkte aufweist, die eine hinreichende Abschirmung der Quantenpunktoberfläche gegen Kupferionen gewährleistet.[48] Dieses Vorgehen könnte ggf. auch auf ähnliche Strukturen übertragen werden,[323,324] jedoch ist bekannt, dass Silikathüllen die PL von Quantenpunkten herabsetzen können.[316,325]

Die oben vorgestellten Berichte, mit Ausnahme derer, die Silicahüllen tragen, beruhen auf Ligandenaustauschreaktionen. Aufgrund des Fehlens einer zusätzlichen Quervernetzung und dem molekularen Charakter der Liganden ist davon auszugehen, dass die Oberfläche der HLNK für Ionen gut zugänglich ist.[277,303,304,326] Für Quantenpunkte, die mit diversen Polymeren verkapselt wurden, ist bekannt, dass Hypochlorige Säure (HClO), die ein kleines, ungeladenes Molekül ist, durch die Hülle diffundieren kann und die Fluoreszenz der QP löscht. Die Fluoreszenz kann mithilfe von UV-Licht wiedergewonnen werden, jedoch schrumpfen die Quantenpunkte bei diesem Vorgang und das Absorptionsmaximum verschiebt sich.[327]

Weitere PL-basierte QD Sensoren für Insektizide[328], Sauerstoff[283] und für die kolloidale Stabilität sind bekannt.[329] Der Sauerstoffsensor basiert auf einer Koordination von funktionalisiertem Porphyrin, das an die Oberfläche von Quantenpunkten koordiniert ist. Dieses Konstrukt ist in eine Lipidmizelle eingekapselt. Da die Sauerstoffabsorption auf ein FRET vom Quantenpunkt auf das Porphyrinchromophor und einem molekularen Kontakt von Porphyrin und Sauerstoff basiert, muss die Lipidmizelle für Sauerstoff permeabel sein.[283] Auch wenn dies anscheinend keinen Einfluss auf die Sauerstoffsensitivität *in vivo* hat, wurde der Einfluss von Eisen- und Kupferionen nicht untersucht.

4.10 Darstellung und Verwendung von Hybridsystemen

In der Literatur werden verschiedenste Strukturen als Hybridmaterialien bezeichnet, was zu Verständnis- und Verständigungsschwierigkeiten führen kann. Nahezu alle haben gemein, dass sie die Kombination zweier unterschiedlicher Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften zu einer übergeordneten Einheit bezeichnen. Diese übergeordnete Einheit weist die (ggf. modifizierten) Eigenschaften der einzelnen Komponenten auf.[330,331] So werden zum Beispiel auch polymertragende, wasserlösliche Nanokristalle oder Kern/Schale Strukturen als Hybridmaterialien bezeichnet.[332] Eine weitere, verbreitete Beschreibung für solche Kombination von Nanokristallen ist die der (Nano)-Komposit-Bildung.[333–335] In dieser Arbeit wird von Hybridmaterialien gesprochen, wenn zwei oder mehr Einzelkomponenten (Nanokristalle oder Farbstoffe) in einem kovalent verbundenen oder adsorbierten Konstrukt vereint werden. Die Einzelkomponenten müssen hierbei eine der folgenden Eigenschaften aufweisen: Fluoreszenz, plasmonisches Verhalten oder Magnetismus. Die typischen Materialien hierzu sind Farbstoffe oder Quantenpunkte, Metallnanokristalle und Eisenoxidnanokristalle. Ein Konstrukt aus Nanokristallen und Liganden oder Polymeren wird somit in dieser Arbeit nicht als Hybrid bezeichnet. Innerhalb des Hybrids weist die

kleinste, verbundene Einheit dieses Hybridensembles die kombinierten und ggf. interagierenden Eigenschaften der Ausgangsmaterialien auf.

Die Kombination verschiedener Nanokristalle in einem verbundenen Konstrukt liefert Überstrukturen, die mit einem einzelnen Material nicht, oder nur sehr schwierig darzustellen sind.[330] Dies wird am Beispiel der Synthese von fluoreszent-plasmonischen Materialien deutlich. Zwar weisen unstöchometrische Kupferchalkogenide beide Eigenschaften auf, jedoch können durch Oxidations- beziehungsweise Reduktionsempfindlichkeit dieser Substanzen Probleme bei der Dateninterpretation auftreten.[336] Eine gezielte Kombination aus stabilen Einzelkomponenten erlaubt ebenfalls das Studium der Wechselwirkung der einzelnen Partikel und ermöglicht so die Entwicklung neuer, theoretischer Beschreibungen dieses Systemes.

Nanokristallhybride wurden bereits in der Krebstheranostik[330] und der biologischen Sensorik eingesetzt.[39,229,337] Ein häufig verwendetes Verbindungsmaterial zur Darstellung von Hybridmaterialien sind Desoxirubionucleinsäuren (DNS), die aufgrund ihrer genauen Einstellbarkeit der Abstände ein ideales Verbindungsmaterial darstellen.[338] Oleg Gang und Mitarbeiter haben dieses Strukturmotiv benutzt um eine Vielzahl von Hybridmaterialien darzustellen. Hierzu gehören dreidimensional kontrolliert angeordnete Überstrukturen von Nanopartikeln, die eine hohe Fernordnung aufweisen.[338–341] Ebenfalls häufig verwendet ist Coverkapselung sowie (epitaktisches) Aufwachsen von verschiedenen Materialien.[342–346]

4.10.1 Funktionalisierung mit kleinen Molekülen wie Farbstoffen und Peptiden

Die Kombination von Nanokristallen mit organischen Farbstoffen ermöglicht die Darstellung von fluoreszierenden Nanokristallkonstrukten.[88] Je nach Nanokristall können so magneto-fluoreszente,[347–349] plasmonisch-fluoreszente[128,226,350] oder gekoppelte Fluoreszenzsysteme[224,234] dargestellt werden. Vor allem die beiden zuletzt genannten sind von gehobenem Interesse, da die Interaktion von Nanokristall mit dem Farbstoff zu gekoppelten Effekten wie erhöhter Fluoreszenz oder FRET (vgl. 4.7.3) führt. Weiterhin kann ein solches System benutzt werden, um ultra-schnelle Prozesse an Farbstoff/Quantenpunkt Grenzflächen zu untersuchen.[351] Die Funktionalisierung mit Peptiden oder Antikörpern ermöglicht es biologisch aktive Nanokristalle zu generieren, die z.B. zellulare Aufnahme über endosomalen Transport aufweisen.[259,263,265,352–354]

Die Funktionalisierung kann hierbei sowohl vor[278,355] als auch nach[356] dem Phasentransfer geschehen. Nach dem Phasentransfer steht ebenfalls die Möglichkeit einer direkten Oberflächenkoordination offen.[62,357] Die Modifikation vor dem Phasentransfer ermöglicht die Verwendung von relativ harschen Reaktionsbedingungen, die Nanokristallkonstrukte degradieren oder aggregieren würden, wohingegen sich die Funktionalisierung nach dem Phasentransfer dadurch auszeichnet, dass die gekoppelten Gruppen in der Regel keine unerwünschten Auswirkungen auf den Phasentransfer haben. Bei der Platzierung der Liganden auf der Nanokristalloberfläche kann deren Reaktivität vom Rest der Ligandenhülle beeinflusst werden, wenn zum Beispiel die reaktiven Stellen weit im Innen der Hülle der

Nanokristalle liegen.[358–360] Einen sehr umfangreichen Übersichtsartikel zur chemischen Modifikation von Nanokristallhüllen ist kürzlich von der Arbeitsgruppe um Igor Medintz verfasst worden.[236]

4.10.1.1 *Click*- und Bioorthogonale Reaktionen an Nanokristallen

Bioorthogonale Reaktionen sind eine Unterklasse von *Click* Reaktionen, deren Definition von Barry Sharpless *et al.* 2001 gegeben wurden.[361,362] Demnach zeichnen sich *Click*-Reaktionen dadurch aus, dass sie modular aufgebaut sind und ein breites Anwendungsgebiet haben und weiterhin in hohen Ausbeuten und ohne die Darstellung von toxischen Nebenprodukten geschehen.[362] Weiterhin sollen die Reaktionen in jedem chemischen Labor durchführbar sein, ohne — oder unter Verwendung unbedenklicher Lösungsmittel — funktionieren und eine einfache Produktisolation gewährleisten.[236,362] Bioorthogonale Reaktionen erfüllen alle *Click* Kriterien und kennzeichnen sich zusätzlich darüber aus, dass sie chemoselektiv nicht mit biologischen Funktionalitäten reagieren, (bio)chemische Prozesse innerhalb von Zellen nicht beeinflussen und keine zytotoxischen Edukte oder Katalysatoren verwenden.[236,362–364] Trotz einer immer weiter fortschreitenden Entwicklung von bioorthogonalen Reaktionen, wurden nur wenige dieser Reaktionen an Quantenpunkten eingesetzt.[236] Dies liegt vermutlich daran, dass die bei der Hydrazonligation[356,365,366,366] beziehungsweise kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition verwendeten Katalysatoren die Fluoreszenzeigenschaften der Quantenpunkte zum Teil irreversibel löschen (vgl. auch Kap. 4.9).[321,322] Die Verwendung von *Huisgen*- Cycloadditionen an Quantenpunkten konnte somit lediglich durch die Verwendung von gespannten, hochreaktiven Alkinen[321,322] oder mithilfe der Verwendung sehr dicker Silikathüllen gelingen.[48] Die [4+2] Diels-Alder Cycloaddition wurde ebenfalls häufig verwendet, um Nanokristalle zu funktionalisieren.[236] Im Gegensatz zu Quantenpunkten werden MNK nicht von Kupfer zerstört und so wurde bereits vor einigen Jahren die Funktionalisierung von AuNKn mittels kupferkatalyisierter 1,3-dipolarer Cycloaddition beschrieben.[367,368]

4.10.2 Cluster aus Metallnanokristallen

Die Darstellung von einem Cluster aus AuNKn wurde aufgrund der in Kapitel 4.4.3 diskutierten Feldverstärkung an der Kontaktfläche der AuNK von vielen Arbeitsgruppen durchgeführt.[45,46,50,369] Die gezielte Darstellung einheitlicher Nanocluster ist aufgrund der Unspezifität der Wechselwirkung eine Herausforderung,[370] weswegen die Darstellung von sehr einheitlichen Clustern üblicherweise auf Trenntechniken beruht.[371,372] In der Regel basieren die Darstellungsformen von Clustern von AuNKn auf Selbstassemblierungsprozessen, die aufgrund ihrer vielen Einflussfaktoren schwierig zu kontrollieren sind.[373,374] Vor allem die kinetischen Aspekte der Selbstassemblierungsvorgänge stellen eine Herausforderung für die Reproduzierbarkeit der Synthesen dar.[375] Zur Darstellung von AuNK-Clustern werden insbesondere Polymere benutzt, die den Selbstassemblierungsprozess kontrollieren.[376–385] Weiterhin wurden das gezielte Aufwachsen[386] und die Verknüpfung verschiedener Partikel[387–391] zur Clusterbildung berichtet.

4.10.2.1 Thermodynamik von Selbstassemblierungsvorgängen

Die Thermodynamik von Selbstassemblierungsvorgängen unterliegt einem komplexen Zusammenspiel von Oberflächenadsorptions- und Solvatationsprozessen und ist somit nicht einfach vorherzusagen.[392] Ein Großteil der zugrundeliegenden Wechselwirkungen basiert auf dem sog. *hydrophoben Effekt*, der eine Mischung aus entropischem und energetischem Effekt darstellt.[393,394] Je nach Definition liegen diesem Effekt van-der-Waals- Wechselwirkungen, aber auch hydrophile Interaktionen zugrunde.

Werden Nanomaterialien in einem Solvents (hier Wasser) gelöst, muss das Lösungsmittelmolekül, das den Raum, den das Nanomaterial einnimmt, verdrängt werden. Dadurch haben entropische Effekte eine maßgebliche Rolle für die Selbstassemblierung von Nanokristallen in ihre (geordneten) Überstrukturen.[395,396] Durch diese Verdrängung von Wasser müssen ggf. Wasserstoffbrückenbindungen umorientiert werden, was eine Ursache für die große Bedeutung des entropischen Terms $T\Delta S$ ist (Gleichung 4.35). Hier stellt ΔG die Änderung der freien Enthalpie und ΔH die Änderung der Enthalpie dar.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{4.35}$$

In der Regel wird der entropische Teil von der Solvatation von kleinen Molekülen (i.d.R. des Solvents) und der enthalpische Teil von der Oberfläche der Nanomaterialien dominiert.[374,392]

Durch die gute Sichtbarkeit von Nano- und Mikropartikeln in (Elektronen)-Mikroskopischen Techniken erlauben Untersuchungen derer Selbstassemblierung neue Methoden, um die schwierig messbare Größe Entropie zu untersuchen. Entropie steht zweifelsohne mit dem Entstehen des uns bekannten Lebens in Verbindung, und so erhoffen sich Wissenschaftler, dass ein Studium von Nano- bzw Mikrokristallselbstassemblierung neue Erkenntnisse über das Entstehen des uns bekannten Lebens liefert.[395,396] Hierbei unterscheidet sich diese Selbstassemblierung von Nanopartikeln massiv von der Kristallisation, über die bereits viel gelernt wurde, jedoch entropische Effekte eine untergeordnete, und vor allem schwer variierbare, Rolle einnehmen. Dementgegen können diese Effekte durch relativ einfache chemische Modifizierungen oder durch bloßen Austausch der Lösungsmittelkomposition bei Nanopartikeln eingestellt werden.[395,396] So wird erwartet, dass das Studieren der Selbstassemblierungsprozesse experimentelle Befunde für kooperative Effekte und weitere Anordnungsmechanismen auf mikroskopischer Ebene liefert, die bereits vorgeschlagen wurden, jedoch noch nicht zweifelsfrei belegt worden sind, da das Untersuchen von weniger kontrastreichen Materialien, wie z.B. Proteinen experimentell weit aufwändiger ist.[395,396] Ein solcher Bericht wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe um Paul Alivisatos veröffentlicht, in der die Selbstassemblierung von Goldnanostäbchen in einer Flüssigkeits-TEM Zelle sichtbar gemacht werden konnte.[397,398]

Ein interessantes Beispiel des filigranen Zusammenspiels zwischen entropischen und enthalpischen Effekten bei der Selbstassemblierung wurde von He *et al.* 2013 veröffentlicht: Sie beschreiben die Selbstassemblierung von AuNK, die ein funktionales Polystyrol-*block*-Polyethylenoxid Diblockcopolymeer tragen.[379] Hierbei beoabchten sie, dass, wenn FG-PS-*b*-PEO auf einem AuNK (vor)-koordiniert ist, die Selbstassemblierung dieser Partikel weniger zur Freien Energie beiträgt, als die Selbstassemblierung der freien Liganden.[379]

Dies liegt vermutlich daran, dass der Koordinationsprozess der Liganden an den Nanokristall schon mit einer Verdrängung der Wassermoleküle aus dem Polystyrolteil der Mizelle verbunden ist.[379] Weiterhin beschreibt dieser Bericht eine AuNK-Größenabhängigkeit und eine Abhängigkeit der Blocklänge des hydrophoben PS Teils auf die Struktur der Produkte, was mit dem verdrängten Volumen im Mizellinneren korreliert wird.[379] Hierbei kann durch Wahl der AuNK Größe bzw. der Wahl der PS Blocklänge zwischen Mizellen, Vesikel und Clustern unterschieden werden.

4.10.3 Darstellung und Verwendung von Goldnanokristall-Quantenpunkt basierten Hybridmaterialien

Die Kombination von Quantenpunkten und Gold Nanopartikeln ermöglicht die Darstellung von fluoreszent-plasmonischen Nanohybriden, welche nicht nur aufgrund ihres bimodalen Charakters[399] interessant sind: Die komplexe Wechselwirkung der Exzitonen im Quantenpunkt und der Plasmonen im MNK reicht von „Fluoreszenzverstärkung“[400–402] bis Fluoreszenzlöschung[226] und kann die Photostabilität der beteiligten Spezies erhöhen.[132] Die Ursache dieser komplexen und oftmals wenig intuitiven Wechselwirkung sind Nahfeld Effekte von Metallnanokristallen, welche in Distanzen auftreten, die kleiner als die Wellenlänge des einfallenden Lichtes sind.[132] Da die Beobachtung der Fluoreszenz aus dem Fernfeld — also mehrere Wellenlängen entfernt — stattfindet, müssen klassische Modelle mitunter adaptiert werden. Der Mechanismus der Wechselwirkung ist dadurch und durch die starke Kopplung von Exziton und Plasmon zum Mittelpunkt einer breiten, wissenschaftlichen Diskussion geworden.[94] Die Stärke der Kopplung resultiert in einer sehr sensitiven, abstands- und geometrieabhängigen Änderung in der Anregungs- und Zerfallsrate.[400,403] Je nach Abstand und Geometrie überwiegt ein Effekt, was zu Fluoreszenzverstärkenden oder -abschwächenden Effekten führt. Dies konnte gezeigt werden, indem AuNK und Quantenpunkte mit der jeweilig komplementären DNA funktionalisiert wurden, die unterschiedliche Längen aufweisen.[401] Mit diesem System konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Anregung in der plasmonischen Resonanz (ca. 530 nm) nötig ist, um einen signifikant PL-verstärkenden Effekt zu beobachten.[401,404] Metallnanokristalle schließt in diesem Kontext üblicherweise Gold- und Silbernanokristalle ein, die maßgeblich in Bezug auf ihre Fluoreszenz-verstärkende- bzw. -löschende Wirkung hin untersucht wurden. Generell liefern Silbernanokristalle eine höhere PL-Verstärkung als AuNK, aber aufgrund der geringeren chemischen Stabilität von Silbernanokristallen gibt es jedoch weit mehr Studien, in denen AuNKn verwendet werden.[132]

4.10.3.1 Wechselwirkung von Exzitonen und Plasmonen

Die Wechselwirkung von Exzitonen und Plasmonen ist von grundlegendem Interesse, da deren Wechselwirkung benutzt werden kann, um Informationen über Distanzen von einigen Nanometern zu übertragen. Durch das Studium der Interaktion lassen sich ebenfalls Informationen über die komplexe, zeitliche Entwicklung von Plasmonen und Exzitonen gewinnen, die für eine Vielzahl von Anwendungen interessant sein können und mit anderen Technologien schwieriger zugänglich sind. Plasmonen besitzen Zerfallszeiten von ca. 10 Femtosekunden und koherente Evolutionszeiten von 100 Attosekunden, was sie und

mit ihnen gekoppelte Systeme für optische Speichermedien und Datenprozessierung interessant macht.[95] So beruht zum Beispiel eine Hoffnung darauf, dass mithilfe von stark absorbierenden Nanopartikeln künstliche photosynthetische Systeme dargestellt werden, in denen die Energie durch den Raum transportiert und genutzt werden kann. Schon heute werden plasmonische Materialien als lichtstreuende Elemente in Solarzellen verwendet.[95] Weiterhin kann durch kondensierte, lokale Felder die Helligkeit von Fluorophoren bei gleicher Anregungsintensität erhöht werden, was für elektronische Geräte und Pigmente interessant ist. Einige der in diesem Kapitel referenzierten Artikel behandeln die Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen mit Metallnanokristallen, die jedoch ebenfalls Informationen über die Wechselwirkung von Exzitonen und Plasmonen liefert und daher mit vorgestellt werden.[405]

Wird ein Quantenpunkt in die Nähe eines Metallnanokristalls gebracht, wechselwirken beide Partikel und die emittierende Spezies weist Eigenschaften beider Systeme auf: Kurze Fluoreszenzabklingzeit (des Plasmons) und Stokes-Verschiebung (des Quantenpunktes). Um diesen Unterschied deutlich zu machen wird dieses System auch als Plasmophor oder Fluoron beschrieben.[132] Studien haben gezeigt, dass die Wechselwirkung zwischen QD und AuNK zumindest von spektraler Überlappung,[350,400,401,406] Anregungswellenlänge,[401,404,407] Partikelgröße[226,408] und Abstand[226,400,401,403,404,408–411] abhängt.[405] Es muss ebenfalls unterschieden werden, ob kleine AuNK (d<1.5 nm) benutzt wurden, die kein Plasmon aufweisen und somit keine Exzitonen-Plasmonen Interaktion, sondern Wechselwirkung von Exzitonen mit Zwischenbandübergängen untersuchen.[226,411] Den referenzierten Berichten ist gemein, dass die Fluoreszenzabklingzeit der Quantenpunkte verringert ist.[405] Weitere Studien legen nahe, dass sowohl die radiative als auch die nichtradiative Zerfallsrate von der Beschaffenheit des externen Plasmons abhängen.[400,412] Eine verringerte Fluoreszenzabklingzeit geht in der Regel mit verringerter Fluoreszenzintensität bzw. PLQY einher, wie in den Kapiteln 4.6.2 und 4.7 ausführlich diskutiert wurde. Die Gleichungen 4.15 und 4.17 müssen mit dem Term Γ_M erweitert werden, der die zusätzliche radiative Ratenkonstante darstellt, die durch das Metall verursacht wird.[132,407] Dies führt zu Gleichung 4.36, die nur gültig ist, wenn die Interaktion zwischen Metall und Quantenpunkt durch den Raum und nicht durch Stoß geschieht, was jedoch nahezu immer erfüllt ist.

$$PLQY_M = \Phi_{PL}^{Metall} = \frac{\Gamma + \Gamma_M}{\Gamma + \Gamma_M + k_{NR}} \tag{4.36}$$

Die Fluoreszenzabklingzeit muss ebenfalls um diesen Term angepasst werden, was in Gleichung 4.37 dargestellt ist.

$$\tau_M = (\Gamma + \Gamma_M + k_{NR})^{-1} \tag{4.37}$$

Diese angepassten Gleichungen zeigen, dass — im Gegensatz zum im Kapitel 4.7 diskutierten Quenching — im Falle von Metallnanokristallen und Quantenpunkten die PLQY erhöht sein kann, wenn die Lebenszeit verringert ist. Dies ist auf die Eigenschaften des Plasmons zurückzuführen, welches in der Lage ist Licht zu bündeln und somit die Anregung des Quantenpunktes erhöht.[400,401] Durch den Term Γ_M, also die Anwesenheit des

AuNK in unmittelbarer Umgebung des Fluorophors, werden Photonen in die Betrachtung der PLQY mit einbezogen, die sonst mit dem System, aufgrund von Sättigung, nicht wechselwirken würden. Demzufolge ist die Beschreibung eines erhöhten Photonenumsatzes vermutlich zutreffender als die Terminologie „Fluoreszenzverstärkung“. In Einzelpartikeluntersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass Blinken, welches in der Regel zu verringerter Ensemblefluoreszenzintensität führt, unterdrückt ist[413,414] und dass anstelle von Auszuständen sogenannte *grey states* auftreten.[400] Dies sind Zustände, mit einer signifikant verringerten — jedoch messbaren — Fluoreszenzintensität, die mit einer plasmoninduzierten, erhöhten radiativen Rate im Auszustand erklärt werden können.[205,400,409] Diese Effekte grob zusammengefasst bedeuten, dass Quantenpunkte in relativ großem Abstand zu großen AuNKn (d>10-20 nm) mehr Licht absorbieren, welches sie wiederum schneller emittieren, was in der Regel zu einer verstärkten Fluoreszenz führt. Bei kleineren Distanzen zu kleinen AuNKn überwiegt der fluoreszenzlöschende Effekt, der auftritt, wenn der im QP entstandene Dipol schwingt und ein Feld im Goldnanokristall induziert.[132,408] So wird Energie vom QP zum AuNK übertragen und die strahlende Rekombination des QPs unterbunden. Dies ist ausführlich in einem Übersichtsartikel von Joseph Lakowicz und Mitarbeiter diskutiert.[132]

Kommt es zur Fluoreszenzlöschung, kann die Abstandsabhängigkeit dieses Quenchingprozesses ggf. mit FRET (vgl. Kap. 4.7.3) oder mit dem Nanooberflächenenergietransfer (NSET- *nanosurface energy transfer*) erklärt werden. Beim NSET Modell wird der QP als Dipol angesehen, der mit einer unendlichen Metalloberfläche wechselwirkt, was nicht auf Resonanz basiert, wohingegen FRET Resonanz benötigt.[401,405] Die Abhängigkeit der PL-Intensität vom Abstand ist beim NSET-Modell r^{-4} und ist, aufgrund der langreichenden[410] Kopplung von Plasmonen und Exzitonen, konsequenterweise vor allem zutreffend bei Nanokristallkonstrukten, die wenig spektralen Überlapp und einen relativ hohen Abstand haben.[226,409,410,415–424] Diese weitreichende Wechselwirkung ist mit einer höheren Polarisierbarkeit der größeren Metalloberfläche zu erklären, die dem NSET Modell zugrunde liegt. Im Gegensatz dazu liefert der auf Resonanz basierende FRET lediglich bei relativ kurzen Distanzen zutreffende Erklärungen (vgl. hierzu ebenfalls Kap. 4.7.3). Durch die Abhängigkeit der PL-Intensität von r^{-6} ist das FRET-Modell nicht imstande Kopplungen zu erklären, die über lange Distanzen geschehen.[226,401,410,411] Obwohl mathematisch zutreffender, ist jedoch anschaulich nicht klar, wieso ein QP in großem Abstand zu einem AuNK am besten als Wechselwirkung eines Dipols mit einer eindimensionale Fläche beschreiben lassen. Dies zeigt die Notwendigkeit von neuen mathematischen Beschreibungen dieser Systeme an, die quantenmechanische Prozesse mit einschließen.[94,425,426]

4.10.3.2 Synthese und Anwendung von QD-AuNK Hybriden

Durch das große Interesse an QD-AuNK Hybriden ist eine große Auswahl von möglichen Darstellungsrouten vorhanden. Die gezielte Konjugation von genau einem QP an AuNKe kann durch Einbetten des QPs in eine Membran und anschließende Konjugation mit einem AuNK-DNA Konstrukt erreicht werden.[427] Weiterhin konnten diskrete Strukturen mithilfe von säulenchromatographischen Trennverfahren dargestellt werden.[428] Leider ist bei beiden oben genannten Systemen keine Untersuchung der Fluoreszenzeigen-

schaften berichtet worden. Ein allgemeines Syntheseprotokoll, das einen entsprechenden Abstand zwischen Metallnanokristall und QP gewährleistet, basiert auf einem Siliziumdioxidschichtwachstum und eine Einbettung der QP in diese Schicht.[399] Ähnlich zu diesem Ansatz sind weiter Darstellungsformen bekannt, die jedoch alle auf der Passivierung der Goldoberfläche beziehungsweise einer chemischen Kopplung beruhen.[400,403,429,430]

Neben der starken Kopplung zwischen Exziton und Plasmon in solchen Konstrukten finden Hybride aus AuNKn und QP, aufgrund der Möglichkeit für multimodale Bildgebung, ebenfalls Einsatz *in vivo* und *in vitro*. Ein auf DNA-Verknüpfung basiertes Methode wurde von Warren Chan und Mitarbeitern entwickelt: Die als Gold-Kern und QD-Satellit bestehenden Hybride werden als ein Konstrukt in Zellen aufgenommen.[389] Der Freisetzung dieser Strukturen ins Zellcytosol folgt die Freisetzung der einzelnen Komponenten, was z.B. zur DNA Detektion benutzt werden kann.[389] Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde ein ähnliches System entwickelt, welches einen polyelektrolytbasierten Abstandshalter verwendet. Die reihenweise Abscheidung einzelner Polyelektrolytschichten auf dem AuNK ermöglicht eine genaue Einstellung des Abstandes, wodurch es gelang nicht blinkende, fluoreszenz-plasmonische Hybride herzustellen, die zum barcodeartigen Markieren von Zellen benutzt wurden.[413,414] Das Strukturmotiv DNA als Verbindungsglied von AuNK und QP wird auch in Berichten von Oleg Gang verwendet.[338,431] Eine chemische Verknüpfung von QP und AuNKn wurde von Nikhil Jana und Mitarbeitern entwickelt, welches zusätzlich mit Eisenoxidnanopartikeln funktionalisiert wurde, um ein fluoreszent-plasmonisch-magnetisches Nanohybrid darzustellen, das zur Zellmarkierung benutzt werden kann.[430]

4.10.4 Darstellung von magneto-fluoreszenten Hybridmaterialien

Eine effiziente und weit verbreitete Möglichkeit magneto-fluoreszente Nanopartikel herzustellen ist die Konjugation mit Farbstoffen.[249,347] Diese Konstrukte unterliegen jedoch naturgemäß den Nachteilen von organischen Farbstoffen (vgl. 4.6.1 für Details).[36] Eine Kombination von FeONK mit Quantenpunkten ist demzufolge wünschenswert, wenn die Vorteile derer gegenüber organischen Farbstoffen ausgenutzt werden sollen.[88] Ein Problem bei der Verknüpfung von Eisenoxidnanokristallen mit Fluorophoren ist die Fluoreszenzlöschung, die durch abgelöste Eisenionen oder durch die Eisenoxidnanokristalle selbst verursacht werden kann.[88,318] Demzufolge sind noch nicht viele magneto-fluoreszente Nanohybride bekannt. In der Literatur finden sich z.B. co-verkapselte, riesige (d ca. 5 µm)Vesikel, die Quantenpunkte und Eisenoxidnanokristalle einschließen.[432,433] Diese Vesikel weisen sowohl magnetisches, als auch fluoreszentes Verhalten auf, jedoch ist nicht genau berichtet, wie viele der co-verkapselten Quantenpunkte intakt sind. Die schiere Masse der co-verkapselten Quantenpunkte ermöglicht, dass einige dieser Quantenpunkte, vermutlich zufällig, von der fluoreszenzlöschenden Wirkung abgeschirmt sind. In diesen Berichten wurde gezeigt, dass diese Konstrukte erwartungsgemäß sehr photostabil sind und als Medikamentencargo eingesetzt werden können.[36,432–436] Ein weiteres Konzept, das auf einer Vielzahl von Quantenpunkten beruht, wurde von einer Wissenschaftlergruppe um Moungi Bawendi entwickelt.[437] Diese magneto-fluoreszenten Konstrukte bestehen aus einem Kern von dicht gepackten Eisenoxidnanokristallen, um die eine Monolage Quan-

tenpunkte abgeschieden wird und einen Durchmesser von ungefähr 120 nm. Jede kleinste Einheit besteht aus ca. 2000 einzelnen Nanopartikeln und weist somit kein Blinken auf, da bei der Vielzahl von Quantenpunkten statistisch gesehen die gleiche Anzahl der Partikel „an“ ist. Aus derselben Arbeitsgruppe stammt ein Bericht aus dem Jahr 2008, in dem relativ große Mμcosphären dargestellt wurden, in deren äußere Schale Eisenoxidnanokristalle und Quantenpunkte eingebaut wurden.[438] Neuere Arbeiten beschreiben ebenfalls die Darstellung großer Vesikel, die bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung jedoch kollabieren,[439] und die Kombination von FeONK mit fluoreszierenden Polymeren.[440]

4.10.5 Darstellung und Verwendung magneto-plasmonischer Hybridmaterialien

Die Darstellung von magneto-plasmonischen Hybridmaterialien ist die einfachste der hier vorgestellten Materialsysteme, da sich die jeweiligen Eigenschaften nicht signifikant beeinflussen.[330] Demzufolge gibt es eine Vielzahl von Syntheseprotokollen zur Darstellung dieser Materialsysteme. Die Möglichkeiten der Darstellung sind denen von Clustern von Metallnanokristallen sehr ähnlich und reichen von dem gegenseitigen Aufwachsen der einzelnen Materialien[441–444] über Co-Verkapselung[289] bis hin zur ladungsinduzierten Adsorption der einzelnen Komponenten.[445] Neben der multimodalen Bildgebung sind diese magneto-plasmonischen Materialien besonders interessant für die Kombination von photoinduzierter und magnetisch induzierter Hyperthermie, wie eine Wissenschaflergruppe um Ali Abdou-Hassan kürzlich berichtet hat.[442] Kovalent verknüpfte Nanohybride ermöglichen die Kombination von magnetomotorischer und photoakustischer Bildgebung, was die Basis für ein neuartiges, bildgebendes Verfahren ist, das ein sehr geringes Hintergrundsignal aufweist.[441]

4.11 Nanomedizin - eine Kurzeinführung

Eine der Hauptinteressen bei der Entwicklung von Nanopartikeln bzw. Nanopartikel-Phasentransfersystemen ist deren Einsatz in der Medizin. Hierbei reicht die Anwendbarkeit von Nanokristallen von der Diagnostik bis hin zur Therapie und der Kombination beider, der Theranostik. Aufgrund ihrer Größe, die im Bereich einzelner oder mehrere Proteine liegt, sind Nanopartikel bestens geeignet, um in biologischen Systemen und Organismen eingesetzt zu werden. Seitdem 1998 von Marcel Bruchez *et al.* die erste Anwendung von fluoreszierenden QPs in biologischem Medium gelang,[251] hat auf dem Gebiet der Bio-/Nanomedizin eine sehr schnelle und erfolgreiche, wissenschaftliche Entwicklung stattgefunden.[446] So gelang es zum Beispiel mithilfe von Kohlenstoffnanoröhrchen zwei getrennte Neuronen wieder kommunizieren zu lassen, was ein Hoffnungsschimmer für gelähmte Menschen ist.[447,448] Weiterhin gelang durch eine Kombination aus Nanokristallen, die *in vivo* zunächst eine lokale Gewebeänderung durch Hyperthermie auslösen und diese anschließend erkennen, eine Tumortherapie mit einer 40-fach geringeren Wirkstoffdosis.[449] Dies sind nur zwei Beispiele von der Vielzahl von Fortschritten, die nahezu jedes Gebiet der modernen Medizin abdeckt. Bei all den oben genannten Beispielen handelt es sich um erste Indizien, wozu eine gezielte Theranostik mit Nanopartikeln imstande ist und lässt hoffen schwere Krankheiten in Zukunft zu behandeln und die Medizin zu

revolutionieren. So zeigte ein erster Test mit Docetaxel-tragenden Polymernanopartikeln an krebskranken Menschen, der im Jahr 2012 publiziert wurde, dass diese Nanopartikel eine höhere Bluthalbwertszeit als der molekulare Wirkstoff haben. Weiterhin wurde ein gleicher bzw. höherer Tumorverkleinerungseffekt bei geringerer Wirkstoffdosis gefunden, welcher ebenfalls mit weniger Nebenwirkungen einherging.[450] In den USA werden derzeit AuNK ersten klinischen Testphasen unterzogen.[451] Trotz dieser vielversprechenden Beispiele und der unglaublichen Möglichkeiten für Nanomedizin, sind derzeit nur sehr wenige klinische Studien publiziert, beziehungsweise geplant.[452] Warren Chan führt dies darauf zurück, dass die Nanomedizin hauptsächlich von Wissenschaftlern ohne medizinischen Hintergrund erforscht wird.[452]

Im Nachfolgenden wird versucht generell auf die komplexen Struktur/Eigenschaftsbeziehungen von Nanopartikeln in biologischen Medien und Organismen einzugehen. Weiterhin wird die sogenannte Proteinkorona diskutiert, die entsteht, wenn Nanopartikel biologischen Flüssigkeiten ausgesetzt werden. Beides sind hoch-dynamische und komplexe Forschungsthemen, die, mit Auswahl einiger Schwerpunkte, kurz vorgestellt werden.

4.11.1 Zellaufnahme, Toxikologie und Organverteilung von Nanopartikeln - generelle Konzepte?

Wenn ein Nanopartikel biologischem Medium (z.B. Zellen, biologischen Flüssigkeiten wie Blut) ausgesetzt ist, kommt es zu einer physiko-chemischen Wechselwirkung seiner Oberfläche mit Bestandteilen des Mediums. Diese können von molekularen Erkennungsreaktionen bis hin zu Physi- und Chemisorption reichen. Blut, Blutserum bzw. Zellmedium sind relativ hoch viskose Flüssigkeiten, die eine hohe Protein- bzw. Salzkonzentration aufweisen. Durch die Vielzahl an Materialien und Phasentransfermöglichkeiten, mit denen Nanopartikel in wässriger Umgebung dargestellt werden können, existiert ebenso eine Vielzahl an physikochemischen Größen, die Einfluss auf diese Interaktionen nehmen können. Eine besondere Herausforderung für den Präparator von biologisch, aktiven Nanopartikeln ist die Variation eines einzelnen physikochemischen Parameters, ohne andere Parameter gleichzeitig zu variieren.[347,453,454] Dadurch ist es oftmals schwierig aus der publizierten Literatur allgemeingültige Konzepte zu entwickeln und verschiedene Berichte bzw. Systeme miteinander zu vergleichen. Diese Schwierigkeit kann gut anhand eines kürzlich erschienen Übersichtsartikels verdeutlicht werden, dessen frei aus dem englischen übersetzter Titel „*In vitro* Interaktion von kolloidalen Nanopartikeln mit Säugetier-Krebstzellen: Was haben wir gelernt?“ lautet und 166 Artikel vergleicht.[455] Laut dieser und anderer Studien[235,347,453] ist es derzeit generell akzeptiert, dass folgende physiko-chemische Größen von Nanokristallen in Wasser einen Haupteinfluss auf die Zellaufnahme haben:

- Größe und/oder Aggregationszustand[456–460]
- Ladung[347,461]
- Form[456,462,463]

Zu jeder der aufgezeigten physiko-chemischen Größen ist eine Auswahl von Originalliteratur referenziert. Allen Größen ist gemein, dass sie von der kolloidalen Stabilität der Nanopartikel abhängen, die jedoch keine fest definierte physiko-chemische Größe ist und von

daher unterschiedlich interpretiert und analysiert wird.[455] Sollten beim heutigen Stand der Wissenschafft Nanopartikel mit einer optimalen Zellaufnahme induziert werden, so würden kleine, elongierte und positiv geladene Nanopartikel synthetisiert werden.[454,455]

Der Weg der zellularen Aufnahme von (Nano)-Materialien ist an sich ein komplexer Prozess, bei dem ein interzelluläres Vesikel um die einzuschließenden Materialien gebildet wird.[464] Dieser Prozess wird Endozytose genannt und in verschiedene Untergruppen aufgeteilt: Phagocytose ist das „Zellessen“, die Aufnahme von großen Organismen wie Bakterien, oder Partikeln über 0.5 µm. Über Pinozytose, das „Zelltrinken“, werden kleine Flüssigkeitsmengen in Vesikel eingeschlossen und in die Zelle aufgenommen. Der, laut Iversen *et al.*, am besten erforschte Zellaufnahmeweg ist die Clathrin-abhängige Endozytose, in der ATP-, also energieabhängig, Vesikel um die einzuschließenden Materialien gebildet werden.[464]

Eine interessante Untersuchung wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe um Vincent Rotello veröffentlicht, in der systematisch die Zellaufnahme in HeLa-Zellen von verschieden großen (2, 4, 6 nm) sphärischen AuNKn mit verschiedenen Oberflächenladungen untersucht wurde. Mit zwitterionischen und anionischen Partikeln wurde eine verringerte Aufnahme mit steigender AuNK Größe gefunden, wohingegen bei positiv geladenen AuNKn die Aufnahme durch steigende AuNK Größe erhöht wurde. Dieser Unterschied wurde mit unterschiedlichen Aufnahmewegen assoziiert: Bei den geladenen Partikeln werden die AuNK mittels endozytotischen Prozessen in die Zellen aufgenommen, wohingegen zwitterionische Partikel *via* passiver Diffusion in die Zellen gelangen.[461]

Der Einsatz von Nanopartikeln im lebenden Organismus ist geplant bzw. bereits erfolgt und weiterhin sind lebende Organismen seit jeher einer Vielzahl von natürlichen, nanopartikulären Systemen ausgesetzt.[26,27] Nanopartikel werden dem jeweiligen Organismus zugeführt und bewegen sich anschließend passiv in ihm.[449–451] Dadurch sind sie sich wechselnden Umgebungen und dem körpereigenen Immunsystem ausgesetzt, was das Verhalten der Partikel massiv beeinflussen kann. Dies wird unter anderem mit einer sich ändernden Proteinkorona assoziiert, was im nächsten Kapitel ausführlicher diskutiert wird.[465] Weiterhin wurde in einer aktuellen Studie einer Wissenschaftlergruppe um Wolfgang Parak gezeigt, dass Liganden sich von Nanopartikeln lösen, bzw. chemisch abgetrennt werden, selbst wenn stabile Partikel verwendet werden. Die Liganden oder deren Abbauprodukte bewegen sich anschließend vom NP unabhängig und werden somit in anderen Körperregionen gefunden.[466]

Die Notwendigkeit von klinischen Daten für die Anwendbarkeit von Nanopartikeln als Theranostikum für die Zukunft[452] folgt unter anderem aus einer Studie aus dem Jahr 2013 die besagt, dass die erwartete Toxikologie von Cadmium-enthaltenden Quantenpunkten zwar in Zellexperimenten bestätigt wurde,[43] jedoch zu dem Zeitpunkt noch keine Tierversuchsreihe existierte, die die Toxizität von Quantenpunkten *in vivo* belegten.[467] Dies wurde von Warren Chan in einem ausführlichen Artikel dargelegt, in der vor allem die Diskrepanz zwischen Zellexperimenten und Tierversuchen dargestellt wird, welche nicht ausschließlich auf Dosis-Effekte reduziert werden kann.[467] Eine Diskrepanz zwischen *in*

vivo und *in vitro* Versuchen wurde ebenfalls für Gold Nanokristalle gefunden.[468]

Da, aufgrund des komplexen Immunsystems des Menschen, generell nur 8% der erfolgreichen, krebsrelevanten Tierversuche positive Ergebnisse in klinischen Studien zeigen[469] und da allgemein hohen regulatorischen Hürden, ethischen Bedenken und Schwierigkeiten bei der Dosisanpassung von Arzneien existieren, wird die Regulierung von von Nanotherapeutika sicher noch zusätzliche, verkomplizierende Fragen aufwerfen.[469,470]

Durch die intrinsische Komplexität, die sowohl die Medizin als auch die Nanotechnologie mit sich bringen, kann Nanomedizin als Sinnbild der komplexen und diffusen Welt des 21. Jahrhunderts angesehen werden: Das Potenzial für große Veränderungen ist gegeben, ob diese geschehen, liegt in der Hand der Menschen, die mit ihnen arbeiten und umgehen.

4.11.2 Proteinkorona

Um die oben diskutierte Komplexität zu verringern und verlässliche Informationen zur Interaktion von Nanopartikeln mit definierten Proteinen beziehungsweise Peptiden zu gewinnen, wurde in den letzten Jahren die Forschung an der so genannten Proteinkorona intensiviert.[471,472] Diese Interaktion von Proteinen und Peptiden mit Nanopartikeln kann generell als ein physikochemisches Adsorptionsgleichgewicht gesehen werden.[473–475] Elektrostatische Anziehung ist hierbei die stärkste, nicht-kovalente Kraft, die die Adsorption zwischen Nanopartikeln und Proteinen bestimmt.[476] Um Adsorptionsprozesse zu verstehen, darf jedoch die Solvathülle, die Nanopartikel umgibt und die durch adsorbierte Peptide bzw. Proteine gestört wird, nicht außer Acht gelassen werden.[476]

Selbst auf definierten, makroskopischen Oberflächen ist die Untersuchung von adsorbierten Proteinen ein kompliziertes Unterfangen und wird in der Regel mit oberflächenspezifischen Analysetechniken untersucht.[477,478] Durch die Krümmung, die hohe Anzahl und Reaktivität von Oberflächenatomen sowie die zur Stabilisierung eingesetzten Liganden bringen nanopartikuläre Systeme weitere Freiheitsgrade mit sich, die die Proteinbindung an die Oberfläche beeinflussen können.[479] Es konnte gezeigt werden, dass mehr als 300 Proteine binnen weniger als 30 Sekunden auf Polystyrol beziehungsweise Silika-Nanopartikeln binden, wenn diese humanem Serum ausgesetzt sind.[480] In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Proteinkorona zeitabhängig ist und sich erst eine „weiche“, reversible Proteinkorona bildet, die anschließend von einer „harten“, irreversibel gebundenen Proteinkorona ersetzt wird.[481,482] Die Proteinkorona beeinflusst kolloidale Stabilität, Zellaufnahme und Blutzirkulation von Nanopartikeln.[249,297,458,483–485] Die verschiedenen Bindungskonstanten von Peptiden und Proteinen, die ausgeschieden werden, wenn Krebszellen Cytostatika ausgesetzt sind, werden in einem kompetitiven Bindungsassay ausgenutzt um die Wirksamkeit und den Wirkmechanismus der Cystostatika zu bestimmen.[486] Hierbei ersetzen die von Zellen ausgeschiedenen Substanzen auf Gold Nanopartikel adsorbierte, fluoreszierende — jedoch gequenchte — Proteine. Durch die Freisetzung der fluoreszierenden Proteine wird die Fluoreszenzlöschung durch das Gold unterbunden und die zurückgewonnene Fluoreszenz kann mit dem jeweiligen cytotoxischen Mechanismus korreliert werden. Dieses Beispiel zeigt an, dass Nanopartikel vermutlich zunächst in biologischen Assays angewendet werden, da diese ohne Injektion der Nano-

partikel in den menschlichen Organismus funktionieren.

Die Bindung von körpereigenen beziehungsweise Serumproteinen kann schließlich dazu führen, dass funktionelle Nanopartikel ihre Funktionalität verlieren beziehungsweise ändern.[298,483]. Eine Wissenschaflergruppe um Warren Chan behauptet, dass die Bestimmung der Proteinkorona die Zellaufnahme wesentlich verlässlicher vorhersagt als physikochemische Größen wie Größe, Aggregation und Oberflächenbeschaffenheit.[487] Dies impliziert, dass die adsorbierten Proteine die Nanopartikel-Beschaffenheit komplett verändern und dass die physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel die Adsorption von Proteinen beeinflussen, die dann die biologische Funktion auslösen.[479] Dieser Effekt fügt der Diskussion um den geplanten Einsatz von Nanopartikeln im Körper einen interessanten Aspekt hinzu: Bei ihrer „Reise“ durch den Körper sind Nanopartikel verschiedenen Umgebungen und verschiedenen Zelltypen, die verschiedene Proteine sekrieren, ausgesetzt. Dieser Vorgang wurde in einer Studie nachgestellt, in der AuNK Medien ausgesetzt wurden, die Sekrete unterschiedlicher Zellen enthielten. Die Zusammensetzung der Proteinkorona war abhängig von der Art der Zelllinie und beeinflusste wiederum die zellulare Aufnahme der Nanopartikel. Diese Ergebnisse deuten an, dass Nanopartikel je nach Zirkulationsweg[488] im Körper oder einer Erkrankung eines Patienten unterschiedliche Proteine auf der Oberfläche aufweisen könnten, was entweder zu Komplikationen oder zur Lösung von zukünftigen Problem beitragen kann.[465,479] Somit ist es denkbar, dass zwei Nanopartikel, die die exakt gleiche chemische Struktur aufweisen, nach ihrer unterschiedlichen „Reise“ durch den Körper, unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, was die regulatorische Diskussion über den Einsatz von Nanopartikeln im menschlichen Organismus sicher nicht vereinfacht. Als Reaktion auf diese Komplexität fordern Wissenschaftler mehr klinische Studien von Nanopartikeln und entwickeln neue Systeme und Analysetechniken, um diesen potenziellen Einfluss zu verstehen.[452,489]

Dadurch, dass Plasma aus einer Vielzahl von Proteinen besteht und die Adsorption auf der Nanopartikeloberfläche dynamisch ist, erlaubt die Untersuchung mit einzelnen, definierten Nanopartikeln eine genauere Untersuchung des Adsorptionsmechanismus. So konnte mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie gezeigt werden, dass humanes Serumalbumin eine Monolage auf polymerverkapselten FePt bzw. CdSe/ZnS Nanopartikeln bildet.[490] Durch die Zunahme im hydrodynamischen Radius konnte weiterhin die Orientierung des Proteins auf der Nanopartikeloberfläche bestimmt werden. Eine Erweiterung dieser Studie erlaubte die Bestimmung der Orientierung von verschiedenen Serumalbuminen, die mit den unterschiedlichen Haftgruppen Bernsteinsäureanhydrid bzw. Diethylendiamin funktionalisiert wurden, auf dihydroliponsäure-tragenden CdSe/ZnS Quantenpunkten. Beide zeigten eine höhere Affinität und unterschiedliche Orientierung auf der Quantenpunktoberfläche. Zellaufnahme-Studien dieser Konstrukte legen nahe, dass leichte Umorientierung der Proteine auf der Nanopartikeloberfläche die biologischen Eigenschaften massiv beeinflussen können.[491]

Zur Verhinderung beziehungsweise zur Verringerung der Proteinadsorption wurden einige Strategien entwickelt, die maßgeblich auf die Synthese von Liganden bzw. Polymeren für den Phasentransfer von Nanopartikeln zurückgehen, wie in Kapitel 4.8.1 dargestellt.

Trotz einer intensiven Entwicklung auf diesem Gebiet, ist es bis heute nicht gelungen Nanopartikel zu entwickeln, die überhaupt keine Proteine adsorbieren.[476] Jedoch konnte in den letzten Jahren der negative Einfluss der Proteinkorona auf die Eigenschaften der Nanopartikel stetig verringert werden[492,493] und so wurde gefunden, dass die Formation einer harten, irreversibel-gebundenen Proteinkorona durch bestimmte Oberflächenmodifikation nahezu unterdrückt wird.[249,494] Dies gelang besonders effektiv mit einer zusätzlichen hydrophoben Region, die sich zwischen Nanokristalloberfläche und zwitterionischen Region befindet.[494] Eine ähnliche Hülle stellt auch das Polyisopren bzw. Polystyrol dar, dessen Analyse ein zentraler Punkt dieser Arbeit darstellt.

5 Zielsetzung und Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Darstellung von wasserlöslichen, funktionalen Quantenpunkten und multifunktionalen Nanohybriden und ihr Einsatz in biologischen Umgebungen. Die Quantenpunkte sollen mittels verschiedener Methoden, z.B. Ligandenaustausch und Einkapselung, in Wasser transferiert werden. Da die Hülle von nanopartikulären Systemen die biologischen Eigenschaften maßgeblich bestimmt, ist sie von besonderem Interesse für biomedizinische und biologische Anwendungen. Da wenige Analysemethoden dieser Hülle existieren, soll ein Fluoreszenz-basierter Assay entwickelt werden, mit dem eine Charakterisierung der Nanokristall-umgebenden Polymerhülle möglich ist. Hierbei sollen Reaktionsbedingungen und andere Faktoren identifiziert werden, die für die Dichtigkeit solcher Hüllen bestimmend sind.

Die neuartigen, multifunktionalen Hybridmaterialien sollen aus verschiedenen Nanokristallen bestehen und in biologischen Umgebungen einsetzbar sein. Hierbei sollen fluoreszente Nanohybride dargestellt werden und eine Analyse der Fluoreszenzeigenschaften soll genutzt werden, um Informationen über die mikroskopische Struktur und die Wechselwirkung der Einzelkomponenten zu erhalten.

6 Synopsis

Ein Großteil meiner Beiträge zu den hier zusammengefassten Veröffentlichungen bezieht sich auf die Verkapselung und Charakterisierung von fluoreszierenden Halbleiternanokristallen (HLNK) und davon abgeleiteten multifunktionalen Hybridstrukturen. Im ersten Teil dieser Synopsis wird ein Fluoreszenzlöschassay vorgestellt, der entwickelt wurde, um die Halbleiternanokristall-umgebende Polymermembran zu charakterisieren. Als amphiphiles Polymer wurden verschiedene Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid (PI-*b*-PEO) Diblockcopolymere mit unterschiedlichem Molekulargewicht benutzt um Halbleiternanokristalle zu verkapseln. Mit Hilfe dieses Assays werden verschiedene Einflussfaktoren, wie z.B. Größe, Belegungsdichte und Quervernetzung des PI Teils, für die Ionendurchlässigkeit der entstandenen Polymermembran identifiziert und analysiert. Ebenso korreliert die zellulare Aufnahme von diesen polymerverkapselten Quantenpunkten mit der Abschirmung gegenüber Ionen, indem gut geschützte Partikel nicht von Krebszellen aufgenommen werden. Durch die hohe Abschirmung der Quantenpunkte ist es weiterhin möglich, kupferkatalysierte 1,3- dipolare *Huisgen* Cycloaddition anzuwenden, um die Nanocontainer nach dem Phasentransfer zu funktionalisieren, was aufgrund der Fluoreszenz-löschenden Wirkung von Kupferionen schwierig ist und mit polymerverkapselten Quantenpunkten noch nicht erreicht wurde.[236] Der Einfluss der funktionellen Endgruppe der äußeren Polyethylenoxidhülle auf die zellulare Aufnahme der Nanocontainer wurde unter der Verwendung von verschieden funktionalisierten Polymeren (PI-*b*-PEO-FG) untersucht. Die bioorthogonale Funktionalisierung von HLNK wurde auch auf Liponsäure-PEO-FG tragenden Quantenpunkte angewendet, um eine Abfolge von zwei bioorthogonalen Verknüpfungen der Ligandenhülle durchzuführen. Hierbei wird unter anderem ein zusätzliches Hydrazonchromophor und ein Farbstoff mit Quantenpunkten verknüpft, um multifunktionale Konstrukte zu erhalten und die mittlere Anzahl der Liganden pro Nanokristall zu bestimmen.

Der zweite Teil der Synopsis vertieft die Darstellung multifunktionaler Hybride, indem verschiedene Arten von Nanokristallen in Wasser verknüpft werden. So werden sowohl fluoreszent-plasmonische als auch magneto-fluoreszente Hybride aus verschiedenen Nanokristallen dargestellt. Weiterhin wird die Darstellung von Überstrukturen mehrerer Nanokristalle (sog. Cluster) durch eine Verringerung der PI-*b*-PEO Überschüsse erreicht. Eine schematische Übersicht über die Ergebnisse dieser Arbeit ist Abbildung 6.1 zu entnehmen.

6.1 Untersuchung von Polymerkapseln von HLNKn mittels Fluoreszenzlöschung

Die Verkapselung der Quantenpunkte wurde mittels eines Verfahrens, das von Elmar Pöselt *et al.* entwickelt wurde, durchgeführt, bei dem die nativen Liganden der Quantenpunkte zunächst gegen PI-DETA ersetzt werden.[265] Anschließend wird eine bestimmte Menge PI-*b*-PEO in THF hinzugegeben und die Lösung mittels eines automatisierten Spritzen-

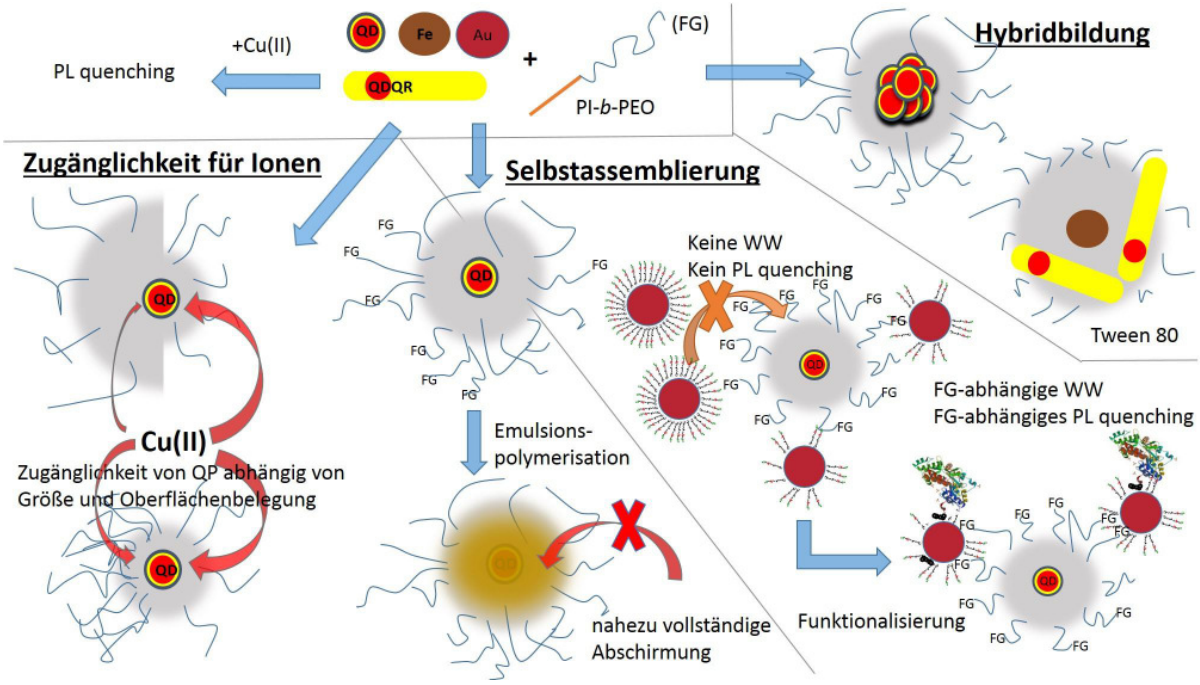


Abbildung 6.1: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Dissertationsschrift.

pumpensystems in Wasser transferiert.[265] Dies erlaubt einen reproduzierbaren und skalierbaren Phasentransfer und ist auf verschiedene Nanokristalle anwendbar. So konnten Quantenpunkte in Quantenstäbchen (QDQRs, aus dem Englischen *quantum dots in quantum rods*), Eisenoxidnanokristalle (FeONK) und Goldnanokristalle (AuNK) in Wasser transferiert werden. Da die einzelnen Polymerliganden jedoch nicht untereinander vernetzt sind, liegt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Mizell-assoziierten und freien Polymeren vor, welches vor allem für die Verdünnungsstabilität dieser Konstrukte problematisch ist (vgl. Kap. 4.8, S. 44 ff.). Deshalb wurden zwei unterschiedliche Quervernetzreaktionen durchgeführt und deren Effekt auf die Konstrukte in Wasser untersucht: Die radikalische Quervernetzung des PI-Teils mit dem Wasser-schwerlöslichen Radikalstarter AIBN und eine Saat-Emulsionspolymerisation (Kap. 4.8.1.3, S. 47 ff.), bei der Styrol und Divinylbenzol im hydrophoben Bereich der PI-*b*-PEO Mizelle polymerisiert werden.[13,289,290] Bei der radikalischen Quervernetzung wird AIBN im hydrophoben Bereich co-verkapselt, thermisch (80 °C) zersetzt und initiiert so die Quervernetzung benachbarter Isopreneinheiten der PI-*b*-PEO Moleküle und des PI-DETAs. Werden für diese Art der Quervernetzung CSS und CS QP verwendet, so beeinflusst diese radikalische Reaktion auch die Kern-Schale Struktur der CSS bzw. CS QP, was zu einer zeitabhängigen PLQY und Blauverschiebung des Emissionsmaximums während der Quervernetzungsreaktion führt. Die PLQY weist nach ca. 5 h ein Maximum auf.[16] Diese Art der Radikal-Sensitivität ist bei QDQRs nicht zu beobachten.[2] Das legt den Schluss nahe, dass die Zinkschale eine essentielle Rolle während dieser Reaktion hat. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich die Ramanmoden des CdSe-Kerns und der ZnS-Schale während der Reaktion ändern, was mit veränderter Kristallspannung assoziiert wird.[16]

Auch wenn ein offensichtlicher Unterschied zwischen diesen beiden Reaktionen in der HLNK-umgebenden Polymermembran besteht, sind die unmittelbaren Eigenschaften und die daraus resultierenden Vor- und Nachteile nicht direkt ersichtlich. Weiterhin existieren wenig verlässliche Analysemöglichkeiten, um Informationen über die Dichtigkeit der Membran und die Zugänglichkeit der Partikel zu gewinnen.

6.1.1 Fluoreszenzlöschassay

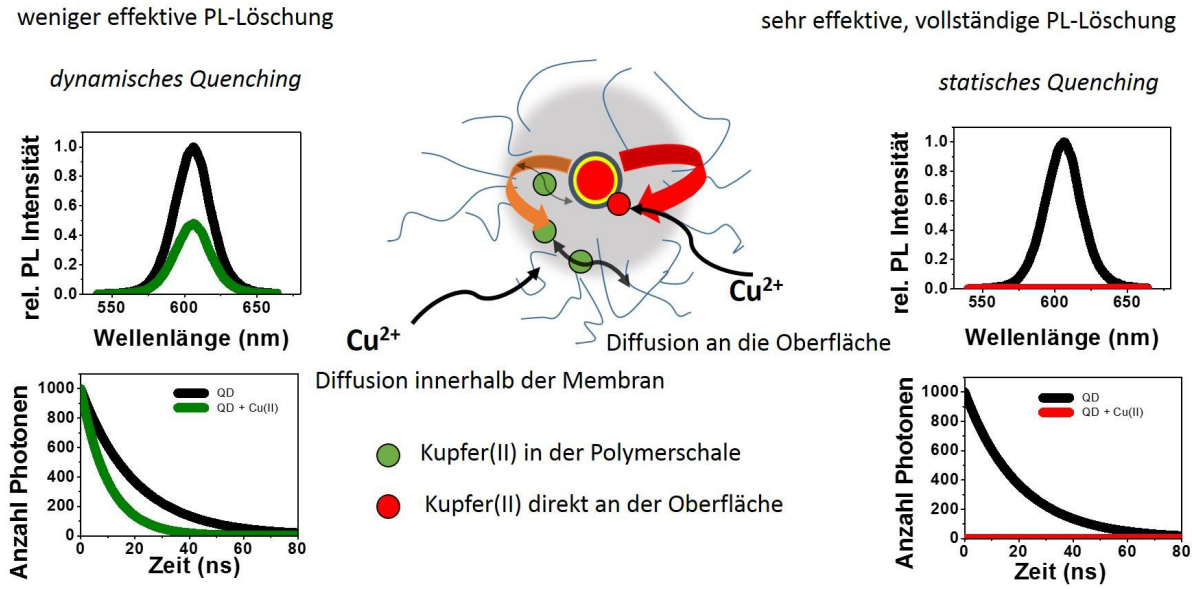


Abbildung 6.2: Interpretation der unterschiedlichen Mechanismen der PL-Löschung. Statisches Quenching wird mit einer Diffusion von Cu(II) direkt an die Oberfläche assoziiert (rot), wohingegen die Verringerung der PL-Abklingzeit (links) mit einer Ansammlung von Cu(II) in der Polymerschale erklärt wird (grün).

Der Fluoreszenzlöschassay wurde entwickelt, um die Durchlässigkeit der Halbleiternanokristall-umgebenden Membran zu charakterisieren. Hierbei werden Substanzen, die die PL der HLNK löschen zu der Lösung gegeben, welche sich dann in der Hülle der HLNK anlagern, von ihr abgehalten werden oder komplett hindurchdiffundieren. Über die Entwicklung des PL-Signals der HLNK können Rückschlüsse über die Anwesenheit der Substanzen in der unmittelbaren HLNK-Nähe bzw. auf der HLNK-Oberfläche getroffen werden. Dies passiert, da die Quencher unterschiedlich mit dem HLNK wechselwirken, wie in Abbildung 6.2 veranschaulicht. Die verwendeten Quencher sind Cu(II)- und Fe(III)Ionen und verschiedene Farbstoffe, wie in diesem Kapitel ausführlich beschrieben.

Der in dieser Arbeit am häufigst verwendete Quencher ist Cu(II). Cu(II) ist einer der effektivsten PL-Löscher für HLNK und ein kleines Ion, das durch kleinste Fehlstellen oder Löcher in der HLNK-Hülle diffundieren kann.[314–316,320–322] Es ist bekannt, dass Kupferionen die PL von QP effektiv und irreversibel löschen, und es wird davon ausgegangen, dass ein auf dem HLNK adsorbiertes Kupferion ausreicht, um die PL dieses HLNK komplett

zu löschen[315,316] Dies ist in Abbildung 6.2 in Rot dargestellt. Ein adsorbiertes Kupferion führt zur kompletten, statischen PL-Löschung der HLNK. Die Kupfer(II) Sensitivität der in dieser Arbeit verwendeten HLNK wurde getestet, indem die HLNK, die noch die Liganden aus der Synthese trugen, in *n*-Hexan vorgelegt wurden und Cu(II)acetat (als Lösung in THF) zugegeben wurde. Es reichten wenige Äquivalente Cu(II) aus, um die CSS QP (ca. 5 Äquivalente Cu(II) pro NK) bzw. QDQRs (bis zu 30 Äquivalente Cu(II) pro QDQR) zu löschen. Dies bestätigt die Kupfer(II) Sensitivität und zeigt an, dass die nativen organischen Liganden keine hinreichende Abschirmung der Nanokristalle gegenüber ihrer Umgebung gewährleisten. Dies deckt sich mit Berichten aus der Literatur.[314–316,320–322] Die etwas höhere Anzahl an Cu(II), die für die PL-Löschung der QDQRs benötigt wird, ist vermutlich mit der höheren Gesamtkationenanzahl der QDQRs im Vergleich zu den Quantenpunkten zu erklären.

Wird zu PI-*b*-PEO verkapselten Quantenpunken in Wasser Cu(II) gegeben, so tritt eine dynamische PL-Löschreaktion, also eine Verringerung der PL-Abklingzeit auf (Abb. 6.2 und 6.3). Der physikalische Ursprung dieser Reaktion konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht zweifelsfrei geklärt werden, jedoch kann eine direkte Oberflächenadsorption an die Nanokristalle ausgeschlossen werden, da diese zu statischer PL-Löschung führt. Weiterhin kann, aufgrund des weitaus geringeren Löslichkeitsproduktes der Kupferchalkogenide im Vergleich zu den Cadmium- bzw. Zinkchalkogeniden eine Stoßreaktion von HLNK mit Cu(II) vermutlich ausgeschlossen werden.[314,315,320,495]

In der Literatur ist dieser Effekt in einem Bericht beschrieben und mit einem FRET und einem Försterradius von 2 nm erklärt worden.[496] Unter Berücksichtigung anderer Berichte[314–316,320–322] und der Ergebnisse dieser Dissertation muss dieser Bericht jedoch in Frage gestellt werden: Es wird eine immens hohe Cu(II) Resistenz der QP (geschützt mit einer relativ dünnen PEO_{800} Hülle) berichtet, die mit den oben referenzierten Berichten und den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen nicht im Einklang steht. Allerdings könnte die berichtete Resistenz auch auf die Aggregation von Partikeln zurückzuführen sein.[496]

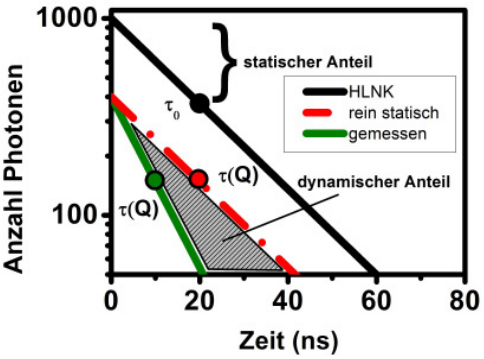


Abbildung 6.3: Darstellung der Fluoreszenzabklingkurven unter realen Bedingungen und Interpretation der verschiedenen Zerfallskanäle. Verkapselte QP (schwarz) und verkapselte QP in Anwesenheit von Kupfer(II)ionen (grün). Als Veranschaulichung ist eine Zerfallskurve gezeigt, wie sie bei rein statischem Quenching zu erwarten wäre (rot), da $\tau(Q) = \tau_0$ gilt.

Vermutlich ist die dynamische Löschreaktion durch einen, im Vergleich zur statischen Löschung, weniger effektiven Elektronentransfer von HLNK zu Cu(II) zu erklären, was mit einer größeren Distanz zwischen HLNK und Cu(II) erklärt werden kann (max. 1.5 nm). Dies ist in Abbildung 6.2 schematisiert, wobei Cu(II) sich in unmittelbarer HLNK Nähe aufhält. Ungeachtet der exakten physikalischen Ursache der Interaktion zeigt das Auftreten der dynamischen PL-Löschung, dass sich Cu(II) in der HLNK Umgebung anlagert und dessen PL-Abklingzeit beeinflusst. Da die verwendeten Polymere (Tab. 6.1) jedoch alle einen re-

lativ großen PI-Block aufweisen dessen Länge, unter Annahme einer vollkommen gestreckten PI-Kette, mindestens 5 nm (PI-*b*-PEO 1) ist, zeigt das Auftreten der dynamischen PL-Löschreaktion an, dass Cu(II) in die PI-Membran eindringen können. Deswegen kann die Effizienz dieser Löschreaktion als Analysewerkzeug für die Kupfer(II)ionendiffusion in der Polymermembran benutzt werden. Die Zugänglichkeit der Hülle wird vermutlich durch Nanoporen bzw. -löcher ausgelöst. Weiterhin können Amine des PI-DETA, die nicht an die Nanokristalloberfläche koordiniert sind, Cu(II) binden und so als Abstandshalter zwischen HLNK und Cu(II) fungieren.

6.1.1.1 Durchführung und Interpretation des PL-Löschassays

Zur Durchführung des PL Löschassays wird eine Lösung von verkapselten, mittels Succrosegradientenzentrifugation gereinigten Halbleiternanokristallen (c= 100 nM) in einer Quartzglasküvette vorgelegt und 15 min im Dunkeln equilibriert. Es wurde vorher gewährleistet, dass die Fluoreszenz der verkapselten Quantenpunkte in dieser Verdünnung über einen langen Zeitraum stabil sind (mind. 1 Tag). Anschließend wird die stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 438 nm) gemessen und als Referenzwert benutzt. Es wird ein Aliquot einer hoch konzentrierten Salzlösung (Kupfer(II)acetat oder Eisen(III)chlorid) hinzugegeben und gut durchmischt. Nach einer Equilibrierungszeit von ca. 30 min wird erneut die stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenz gemessen. Zur Datenanalyse wird die zeitaufgelöste Fluoreszenz als ein gestreckt-exponentieller Zerfall betrachtet und dementsprechend angepasst.[195] Die relative Fluoreszenzintensität wird aus dem Integral unter der Fläche der stationären oder zeitaufgelösten Fluoreszenz bestimmt, beide liefern im Rahmen der Messgenauigkeit gleiche Werte. Die hierzu verwendeten Gleichungen können dem Kapitel 4.6.2 (S. 33 ff.) entnommen werden. Abbildung 6.3 zeigt eine PL-Abklingkurve unter realen Bedingungen, wo dynamisches und statisches Quenching in der Regel gemeinsam auftreten. So kann das statische Quenching aus der Differenz der Anfangszählraten (t= 0 ns) und das dynamische Quenching aus der Verringerung der PL-Abklingzeit bestimmt werden.

Zu Beginn des PL-Löschassays werden nur wenige Kupfer(II)ionen ins Wasser gegeben, was dazu führt, dass vornehmlich die leicht zugänglichen Partikel gelöscht werden. Dabei kann die Fluoreszenzabklingzeit des Ensembles steigen, was bedeutet, dass die HLNK, die anfänglich gelöscht werden, eine kürzere PL-Abklingzeit aufweisen.[2,12,15] Dies ist vermutlich auch auf die Nanoporen und Löcher in der Polymermembran zurückzuführen. Diese machen die HLNK auch für Wasser leichter zugänglich, was die PL-Abklingzeit dieser HLNK verringert. Mit Hilfe des PL-Löschassays können somit verschiedene Formen von HLNKn im Ensemble unterschieden werden: HLNK, die vollständig geschützt sind gegen den Einfluss der Quencher, HLNK, die direkt zugänglich sind für Quencher, also eine imperfekte Polymerhülle aufweisen und HLNK, die eine Membran aufweisen, die einen gewissen Schutz gegenüber Ionen liefert, jedoch ab einer bestimmten Ionenkonzentration Diffusion in der Membran und Oberflächenzugänglichkeit erlaubt.

6.1.2 Eigenschaften der PI-*b*-PEO Mizellen sowie der verkapselten QP und QDQRs

Tabelle 6.1: Analytische Daten der verwendeten PI-*b*-PEO Polymere: Die Molekulargewichte M_w und M_n, der Massenanteil an PEO, die kritische Mizellenkonzentration *cmc* und der volumengewichtete, hydrodynamische Durchmesser d_h der Mizellen, die die PI-*b*-PEO-Moleküle in Wasser bilden.[15]

Name	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	%(PEO) (%)	*cmc* (μM)	d_h (nm)
PI-*b*-PEO 1	4600	4300	68	0.60	16.8
PI-*b*-PEO 2	8100	6600	73	0.35	21.9
PI-*b*-PEO 3	9900	9000	65	0.27	24.8
PI-*b*-PEO 4	11900	10500	67	0.20	27.4
PI-*b*-PEO 5	14300	13400	70	0.15	28.0
PI-*b*-$(PEO)_2$ Y	8400	7300	73	0.36	15.9

Zum Phasentransfer wurden sechs verschiedene PI-*b*-PEO Blockcopolymere, mit unterschiedlichem Molekulargewicht und unterschiedlicher Verzweigung, verwendet. Alle weisen einen ähnlichen PEO-Massenanteil auf und sind optimiert, um Kugelmizellen auszubilden.[497] In Tabelle 6.1 sind die physikalischen Charakteristika dieser Polymere aufgelistet. Das Molekulargewicht nimmt von PI-*b*-PEO 1 zu PI-*b*-PEO 5 zu. Bei PI-*b*-$(PEO)_2$ Y handelt es sich um ein Polymer, dessen Molekulargewicht dem von PI-*b*-PEO 2 ähnelt, jedoch eine Verzweigung am Übergang vom PI zum PEO-Teil aufweist. Es kann als Miktoarm-Sternpolymer mit einem PI und zwei PEO Blöcken beschrieben werden. Es ist bekannt, dass Mizellen, die aus solchen Polymeren gebildet werden, weniger Polymermoleküle pro Mizelle aufweisen als Diblockcopolymere gleichen Molekulargewichts.[498] Das Molekulargewicht von PI-DETA für alle in dieser Arbeit durchgeführten Phasentransfers beträgt $M_n = \ 1400 g/mol$. Der Überschuss der PI-*b*-PEO Moleküle pro HLNK ist essentiell für die Ausbildung von einzeln verkapselten HLNKn und wurde für CSS QP von 50 bis zu 350 PI-*b*-PEO/ QP variiert, wohingegen der Überschuss bei den QDQRs von 300 bis zu 6000 PI-*b*-PEO/ QDQR variiert wurde. Kleinere Überschüsse liefern geclusterte QP bzw. QDQRs.[10,276] Die Optimierung der Einkapselung von QDQRs in Polymermizellen und deren Einsatz *in vivo* ist in den Artikel eingeflossen, der 2014 in *Nanoscale* veröffentlicht wurde (S. 125 ff.).[11]

Die Polymere allein formen unterschiedlich große Mizellen in Wasser (vgl. Tab. 6.1). Dies gilt ebenfalls, wenn HLNK in ihnen eingeschlossen sind, wie an dem Beispiel von verkapselten QP deutlich wird. Mit PI-*b*-PEO 1 verkapselte QP haben einen hydrodynamischen Durchmesser von 24 nm, wohingegen mit PI-*b*-PEO 5 verkapselte QP ca. 55 nm groß sind (Maximum der volumengewichteten Größenverteilung). Die Messwerte hierzu sind in *Figure 1* in Kap. 6.6.9 (S. 157 ff.) gezeigt. Bei PI-*b*-PEO verkapselten QDQRs ist ein ähnlicher Effekt zu erkennen und die Größenverteilung der einzelnen Konstrukte ist in Abb. 6.6 gezeigt.[2]

6.1.3 Einfluss der Polymergröße und des Polymerüberschusses auf radikalisch quervernetze PI-*b*-PEO Membranen um Quantenpunkte

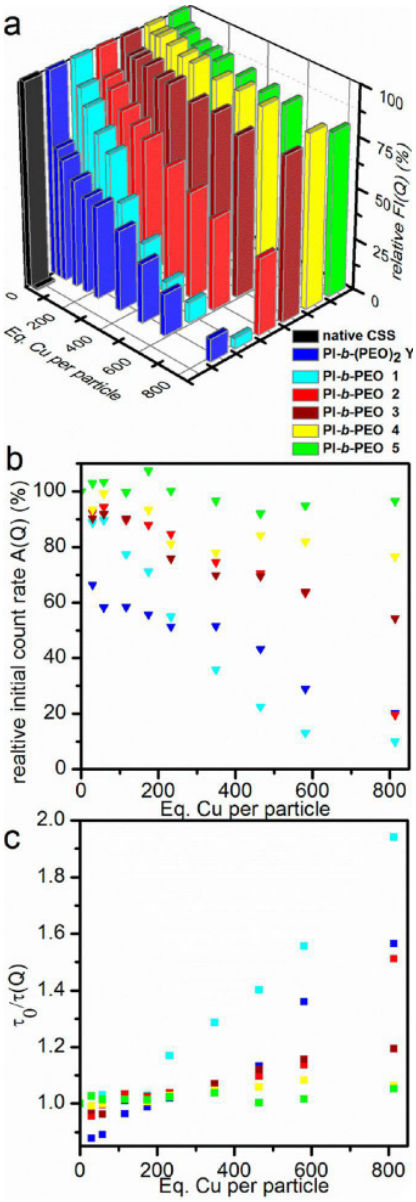


Abbildung 6.4: a) Relative PL-Intensität verschiedener QP (c= 100 nM) gegen die Äquivalente Cu(II). b) Relative Anfangszählrate und c) Stern-Volmer Auftragung der dynamischen Löschkomponente gegen die Äquivalente Cu(II). Reprinted with permission from[15]. Copyright © 2013 American Chemical Society.

Eine unvernetzte Hülle ist nicht imstande, eine gute Abschirmung gegenüber Cu(II) und Protonen zu gewährleisten, selbst bei relativ hohen Polymerüberschüsse.[2,16] Von daher werden im Nachfolgenden lediglich Einflussfaktoren von quervernetzten Nanomembranen diskutiert. Um eine möglichst ähnliche Quervernetzung zu gewährleisten, wurde für je drei Doppelbindungen des Polyisoprenteils ein Molekül AIBN zugegeben und vier Stunden bei 80 °C quervernetzt. Die Ergebnisse des oben beschriebenen PL-Löschassays auf Quantenpunkt-umgebende PI-*b*-PEO-Membranen ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Hierbei wurde ein 300-facher Überschuss PI-*b*-PEO/QP verwendet. In Abbildung 6.4 a ist die relative PL-Intensität in Abhängigkeit der Cu(II) Konzentration dargestellt, woran deutlich wird, dass die Abschirmung der QP mit zunehmender Polymergröße zunimmt. Ab einem Molekulargewicht von ca. 10000 g/mol (PI-*b*-PEO 3-5) sind die Quantenpunkte sehr gut gegen die Kupfer(II)ionen geschützt. Lediglich bei einer hohen Quencherkonzentration lassen sich die Membranen, die die PI-*b*-PEO Moleküle gebildet haben, unterscheiden.

Bei höchster Quencherkonzentration sind ca. 75% der PI-*b*-PEO 2 verkapselten Quantenpunkte direkt zugänglich für Cu(II), während mit PI-*b*-PEO 5 verkapselte nahezu vollständig abgeschirmt sind. Die Polymere eines kleineren Molekulargewichtes PI-*b*-PEO 1 und 2 sowie das verzweigte PI-*b*-$(PEO)_2$ Y weisen eine höhere Zugänglichkeit gegenüber Kupfer(II) ionen auf. Dies ist nahezu vollständig auf statisches Quenching, also direkten Zugang der Ionen zur QP Oberfläche zu erklären, wie der Abnahme der Anfangszählrate zu entnehmen ist (Abb. 6.4 b). Es wird jedoch ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenzabklingzeit detektiert, die mit der Ansammlung von Kupfer(II) in der Ligandenhülle erklärt und auf die Ausbildung von Nanoporen zurückgeführt werden kann. Bei der Analyse der Fluoreszenzabklingzeit fällt auf, dass diese bei Zugabe von wenig Cu(II)acetat zunimmt, wenn die QP mit dem PI-*b*-$(PEO)_2$ Y verkapselt sind (Abb. 6.4 c). Dies ist damit zu erklären, dass die Quantenpunkte, die zuerst mit dem Quencher reagieren, eine geringere Fluoreszenzabklingkeit aufweisen. Die einfache Zugäng-

lichkeit deckt sich mit der niedrigen Fluoreszenzabklingzeit, da Löcher oder Nanoporen Quencher wie Wassermoleküle leicht eindiffundieren lassen. Dies ist bei dem verzweigten Polymer PI-*b*-$(PEO)_2$ Y vermutlich deshalb so ausgeprägt, da die Verzweigung eine dicht gepackte Mizelle verhindert und weniger Moleküle zur Ausbildung der Mizelle notwendig sind.[498] Weiterhin ist die dynamische Löschreaktion bei den PI-*b*-$(PEO)_2$ Y verkapselten Quantenpunkten ausgeprägter als die bei dem nicht verzweigen PI-*b*-PEO 2 gleichen Molekulargewichtes. Dies deckt sich mit Beobachtungen, dass Quantenpunkte, die mit einem geringeren Überschuss von PI-*b*-PEO verkapselt wurden, ebenfalls eine höhere dynamische PL-Löschung aufweisen, wie in *Proc. of the SPIE* 2014 veröffentlicht wurde (vgl. Kap. 7.7.5, S. 229 ff., *Figure 1*).[12] Die Analyse dieses PL-Löschassays zeigt, dass mit zunehmendem Molekulargewicht der PI-*b*-PEO Moleküle der Anteil der gut abgeschirmten Partikel signifikant zunimmt. Die nahezu perfekte Abschirmung gelingt mit PI-*b*-PEO 5, dessen PI Blocklänge (ca. 4300 g/mol) nahe der kritischen Verschlaufungslänge eines ähnlichen PI-Blocks von 5500 g/mol liegt.[499] Zusammen mit dem PI-Block des PI-DETA wird diese kritische Verschlaufungslänge sogar erreicht, was den Schluss zulässt, dass sich die nahezu perfekte Abschirmung der Partikel auch auf die Verschlaufung der PI-Reste zurückzuführen lässt. Diese Verschlaufung führt zu einem sehr dichten, quervernetzten PI-Block um die Partikel und schützt sie somit sehr effektiv gegen quenchende Ionen. Diese Schlussfolgerung deckt sich mit Ergebnissen, die in Johannes Ostermanns Dissertationsschrift und 2015 im *Beilstein Journal of Nanotechnology* veröffentlicht wurden.[9,497] Hier wurden QP mit einem PI-DETA, welches einen längeren PI-Block (ca. 2000 g/mol) aufweist, versehen, mit PI-*b*-PEO 2 verkapselt und demgleichen PL-Löschassay unterzogen. Die vollständige Unterbindung der dynamischen PL-Löschreaktion könnte ebenfalls auf die Verschlaufung der PI-Reste beim Überschreiten der kritischen Verschlaufungslänge zurückzuführen sein.[499]

6.1.3.1 Einfluss der Emulsionspolymerisation auf PI-*b*-PEO Membranen

Bei der durchgeführten Emulsionspolymerisation handelt es sich um eine Saat-Emulsionspolymerisation, bei der der PI Teil der PI-*b*-PEO Mizelle als Reaktionsraum für Divinylbenzol und Styrol fungiert, wobei die PS-Hülle auch über den PI-Teil hinauswachsen kann. Die Monomere werden hierbei durch Pentanol stabilisiert und durch den wasserlöslichen Radikalstarter 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid initiiert.[289–291]

Der Einfluss der Emulsionspolymerisation auf die Abschirmung der Quantenpunkte ist enorm. Wird der gleiche PL Löschassay auf PI-*b*-PEO verkapselte Quantenpunkte vor und nach der Emulsionspolymerisation durchgeführt, so erhöht sich die Abschirmung der Quantenpunkte stark.[13] So können Quantenpunkte, bei denen ungefähr 90% der Nanokristalle für Kupfer(II)ionen zugänglich sind, durch eine nachgeschaltete Emulsionspolymerisation so abgeschirmt werden, dass anschließend lediglich 20% der Partikel zugänglich sind (vgl. Kap. 7.7.5, S. 229 ff., *Figure 3*).[12] Hierdurch wird ebenfalls die dynamische Quenchingreaktion komplett unterbunden, was anzeigt, dass die EP in der Lage ist, die ausgebildeten Nanoporen und Fehlstellen zu schließen. Die PL-Löschung ist auf einen kleinen Anteil nicht gut abgeschirmter Partikel zurückzuführen. Dies zeigt an, dass

das Einbringen von Styrol und Divinylbenzol den PI-Teil der Quantenpunkt-umgebenden Mizellen die Ionendiffusion in der Membran effizient unterbindet.

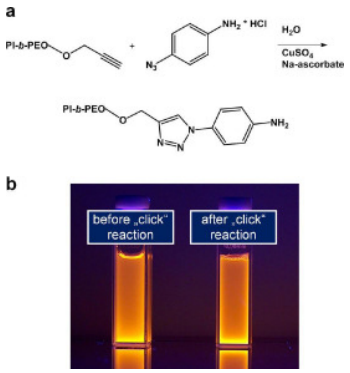


Abbildung 6.5: a) Reaktionsgleichung der Cycloaddition, b) Foto der verkapselten QP vor und nach der EP. Adapted with permission from[13]. Copyright © 2013 American Chemical Society.

Dieser exzellente Schutz ermöglicht die Anwendung von kupferkatalysierter 1,3- dipolarer *Husigen* Cycloaddition, deren Einsatz für Quantenpunkte sonst, aufgrund der starken PL-Quenchingeffizienz von Kupferionen, lediglich durch eine ca. 80 nm dicke Silicaschale erreicht wurde.[48] Die kupferkatalysierte Cycloaddition an PS verkapselten QP geschieht unter nahezu vollständigem Erhalt der Fluoreszenz, wie anhand des Fotos in Abbildung 6.5 zu erkennen ist und durch Analyse der PL-Intensität bestätigt wurde.[13]

Die Stabilität der Reaktionsprodukte der EP wurde ebenfalls in verschiedenen, stark quenchenden Medien wie Glutaraldehyd und EDTA getestet. Lediglich Wasserstoffperoxid ist in der Lage die Fluoreszenz der Quantenpunkte zu löschen. Das liegt vermutlich daran, dass Wasserstoffperoxid kein geladenes Molekül darstellt und die organische Schale abbaut. Trotzdem benötigt der Abbau von QP , die eine PI-*b*-PEO-Hülle und eine zusätzliche Polystyrolhülle tragen, mehr als sechs Stunden in einer 1% wässrigen Wasserstoffperoxidlösung. Im Vergleich zu biologischen Medien ist dies eine sehr harsche Umgebung und unterstreicht die Resistenz der so stabilisierten Konstrukte. Diese Beobachtung deckt sich mit der Königswasser-Resistenz von Clustern von AuNK, die noch nicht veröffentlicht, jedoch kurz in Kapitel 7.6 (S. 193 ff.) zusammengefasst ist.

6.1.4 Übertragung auf Quantenpunkte in Quantenstäbchen

Die mizellare Verkapselung von QDQRs stellt insbesondere eine Herausforderung dar, da die QDQRs durch ihre Form das Ausbilden einer undurchlässigen Mizelle stören können. Weiterhin ist es denkbar, dass Teile der QDQRs aus der Mizelle herausragen und so leichter zugänglich sind für die Umgebung. Der 2014 in *Nanoscale* erschienene Artikel ist einer der ersten, der sich mit der mizellaren Verkapselung von QDQRs befasst (S. 125 ff.).[11] Hier wurden die Phasentransferbedingungen jedoch nicht optimiert, sondern von Quantenpunkten übertragen und der größeren Oberfläche der QDQRs angepasst.[11,265]

Die Anwendung des PL-Löschassays zur Untersuchung der Polymermembran um HLNK ist im Nachfolgenden präsentiert. Die von sphärischen Quantenpunkten gewonnenen Erkenntnisse wurden auf QDQRs eines Aspektverhältnisses von 8 und einer durchschnittlichen Länge von 30 nm übertragen. Um zu untersuchen, ob der oben beschriebene Trend der besseren Abschirmung der HLNK, wenn sie mit Blockcopolymeren eines höheren Molekulargewichtes verkapselt werden, auch für QDQRs gilt, wurden die nativen Liganden von QDQRs zunächst gegen PI-DETA ausgetauscht und anschließend mit dem PI-*b*-PEO 1 und dem PI-*b*-PEO 5 verkapselt (1800 PI-*b*-PEO Moleküle pro QDQR). Die verschiedenen Konstrukte weisen, analog zu den verkapselten QP, einen unterschiedlichen hydrodyna-

mischen Radius auf. Das Maximum der volumengewichteten Verteilung des hydrodynamischen Radius beträgt 28 bzw. 44 nm.

In Abbildung 6.6 B ist die Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensität bei Kupferzugabe gezeigt. Hier ist zu erkennen, dass der Abschirmungseffekt, der für sphärische QP gilt, ebenso für QDQRs auftritt. Das Polymer mit dem höheren Molekulargewicht PI-*b*-PEO 5 schirmt die QDQRs wesentlich besser ab als PI-*b*-PEO 1. Ebenfalls das Auftreten der dynamischen PL-Löschreaktion ist ähnlich dem Verhalten der QP: Bei der Membran, die von PI-*b*-PEO 5 geformt wird, ist keine Verringerung der PL-Abklingzeit zu erkennen, wohingegen dies bei PI-*b*-PEO 1 klar zu erkennen ist. Dies bedeutet, dass Kupferionen nicht so weit in die von PI-*b*-PEO 5 geformte Membran eindringen können, damit es zu einer Verringerung der PL-Abklingzeit kommt. Bei höchster Quencherzugabe sind bei QDQRs, die mit PI-*b*-PEO 1 verkapselt wurden, ca. 75% der QDQRs statisch gelöscht, was 20%-Punkte weniger als bei den verkapselten QPn ist (vgl. Abb. 6.4). Im Vergleich zu sphärischen QP ist die dynamische Quenchingreaktion bei PI-*b*-PEO 1 ähnlich stark ausgeprägt, wie anhand der Stern-Volmer Konstanten für dynamisches Quenching zu erkennen ist (QP: 9.0±0.4 mM^{-1}, QDQRs: 7.5±0.3 mM^{-1}). Dies ist ein erstes Indiz dafür, dass sich die Verkapselung von elongierten und sphärischen HLNKn in Bezug auf die Nanoporenausbildung nicht maßgeblich unterscheidet. Mit diesem Vergleich sollte jedoch sehr vorsichtig umgegangen werden, da diese Experimente nicht für das Unterscheiden zwischen der Verkapselung von elongierten und sphärischen HLNKn optimiert wurden.

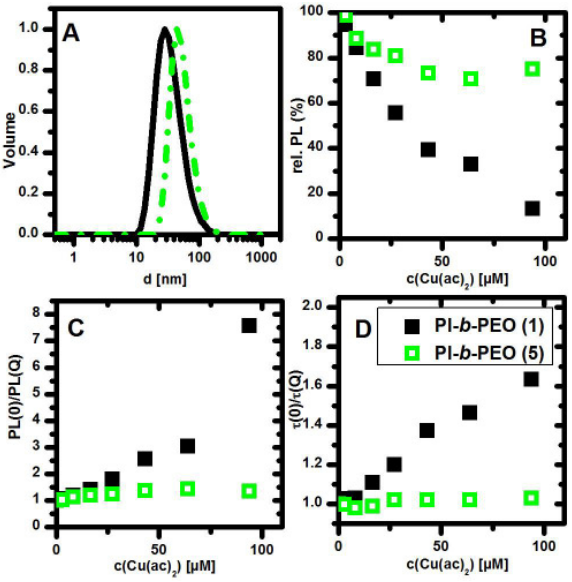


Abbildung 6.6: PL-Löschassay und Charakterisierung von verkapselten QDQRs (c= 100 nM) mit Kupfer(II)acetat. a) volumengewichtete Größenverteilung b) relative Fluoreszenzintensität c) Stern-Volmer Auftragung von $PL(0)/PL(Q)$, d) Stern-Volmer Auftragung $\tau_0/\tau(Q)$, die dynamisches Quenching beschreibt. Adapted with permission from [2]. Copyright © 2016 Published by the Royal Society of Chemistry.

Um den Durchsatz von Proben zu optimieren und den Einfluss von Reaktionsparametern von Quervernetzungsreaktionen auf die Anzahl der gut abgeschirmten Partikel zu untersuchen, wurde der oben vorgestellte PL-Löschassay leicht abgewandelt. Hierzu wurden QDQRs mit PI-*b*-PEO 5 verkapselt, der Überschuss von PI-*b*-PEO 5/QDQRs wurde hierbei konstant bei 1800 gehalten, welcher in Vorversuchen als ein geeigneter Wert für weitere Quervernetzungsstudien bestimmt wurde.[2] Weiterhin wurde eine hohe Anzahl von Kupfer(II)ionen auf einmal hinzugegeben (800 Äquivalente pro QDQR), wodurch alle schlecht abgeschirmten Partikel direkt gelöscht wurden. Direkt nach Zugabe wurde jeweils ein Emissionsspektrum pro Minute für insgesamt zwanzig Minuten detektiert, wonach die Abstände zwischen den Messungen bis zu einem Tag vergrößert wurden. Die Gesamtzeit

dieser Analyse beträgt sieben Tage. Dies ermöglicht einen besseren Einblick in die Zeitabhängigkeit der Diffusion durch die Nanomembran. Dies wurde ebenfalls mit Protonen und Hydroxidionen als Quencher durchgeführt, indem die Proben in wässrige Medien mit verschiedenen Protonenkonzentrationen gegeben wurden.

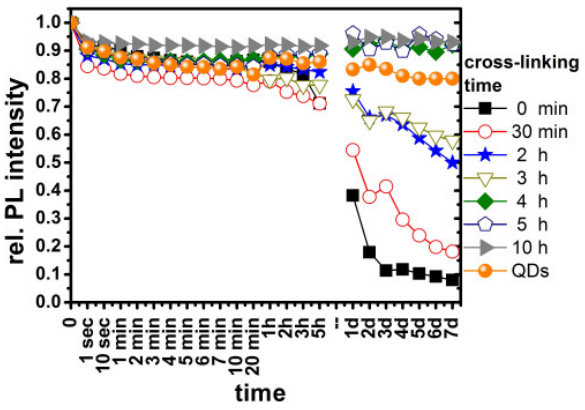


Abbildung 6.7: Entwicklung der relativen PL-Intensität nach Zugabe von 800 Äquivalenten Cu(II) pro QDQR über einen Zeitraum von 7 Tagen. Adapted with permission from [2]. Copyright © 2016 Published by the Royal Society of Chemistry.

Das Ergebnis dieses PL-Löschassays bei der Verwendung von Cu(II) als Quencher ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Hier ist die Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensität gegenüber der Zeit nach Zugabe von 800 Äquivalenten Cu(II) gezeigt. Die Proben weisen unterschiedliche radikalische Quervernetzungszeiten (Initiator: AIBN T= 80 °C) auf. Innerhalb der ersten sechs Stunden verringert sich die PL-Intensität lediglich bei den nicht (schwarze ausgefüllte Quadrate) und bei den kurz quervernetzen Proben (blaue, ausgefüllte Sterne und olivfarbene, leere Dreiecke) leicht. Hier ist eine Abnahme der PL-Intensität von bis zu 30% zu verzeichnen. Der Unterschied wird jedoch bei langen Inkubationszeiten offensichtlicher, wo ab einer Quervernetzungszeit von vier Stunden die Proben nahezu vollständig gegenüber Kupfer(II)ionen abgeschirmt sind. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die bei sphärischen Quantenpunkten gemacht wurden und zeigt an, dass für eine hinreichende Quervernetzung und ggf. Verschlaufung der PI-Reste eine Reaktionszeit von mindestens 3-4 Stunden nötig ist. [499]

Ein sehr ähnliches Bild zeigt sich bei der Quervernetzung mittels EP, auch hier weisen die QDQRs erst bei sehr langer Reaktionszeit (10 h) einen hinreichenden Langzeitschutz gegen Kupferionen auf. [2] Ein signifikanter Unterschied zeigt sich jedoch bei der Stabilisierung gegenüber Protonen. Dies ist in Abbildung 6.8 eindeutig zu erkennen, welche die relative Fluoreszenzintensität von verkapselten QDQRs nach 30 min Quervernetzungszeit mit AIBN als radikalischem Quervernetzer (A) und die relative Fluoreszenzintensität nach 5 min EP (B) bei verschiedenen pH-Werten zeigt. Die QDQRs, die einer kurzen EP unterzogen wurden, zeigen eine weitaus höhere Stabilität gegenüber Protonen auf als die AIBN quervernetzten.

Dies kann mit der unterschiedlichen Art der Reaktion erklärt werden: Wo bei radikalischer Quervernetzung mit AIBN zwei benachbarte PI-*b*-PEO Moleküle im hydrophoben PI Teil quervernetzt werden, wird bei der EP zusätzliches Material in die Schale eingebracht. Somit ist die radikalische Quervernetzung nicht geeignet, um die Fehlstellen zu verschließen, die lokal einen Unterschuss an Liganden aufweisen. Wird jedoch zusätzliches Material in die Schale eingebracht, wie durch die EP, wird sich dieses auch — oder sogar vermehrt — an diesen Fehlstellen ansammeln und dort polymerisieren. Die kurze Reaktionszeit, der es bedarf, um diese Fehlstellen zu schließen, unterstreicht die Vermutung,

dass das Polystyrol vornehmlich an solchen Fehlstellen entsteht.

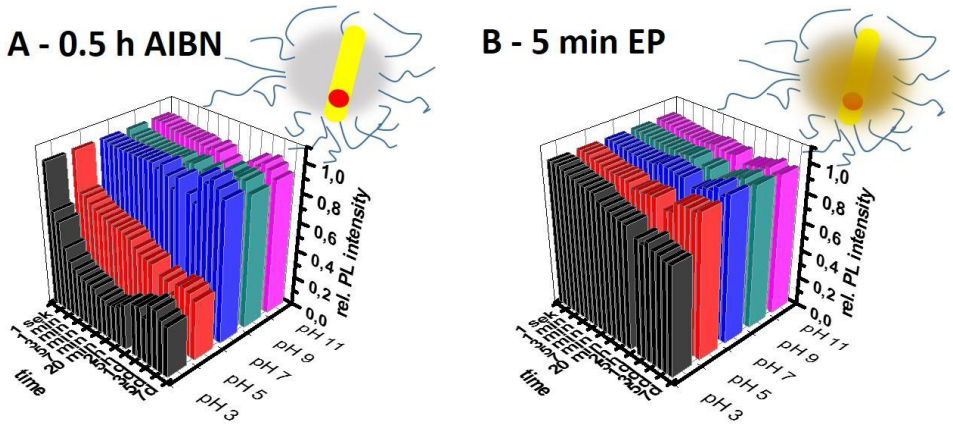


Abbildung 6.8: Darstellung der relativen PL-Intensität von PI-*b*-PEO 5 verkapselten QDQRs nach einer halben Stunde Quervernetzen (A) sowie 5 Minuten EP (B) sowie eine schematische Darstellung der Konstrukte. Adapted with permission.[2] Copyright © 2016 The Royal Society of Chemistry.

6.1.5 Farbstoffe als Quencher

Im Gegensatz zu Ionen weisen Farbstoffe eine hohe Hydrophobizität auf, womit erwartet werden kann, dass sie stärker mit dem hydrophoben Kern der PI-*b*-PEO Mizellen wechselwirken und sich dort akkumulieren.[318] Deshalb wurden mit PI-*b*-PEO 5 verkapselten QDs und QDQRs gleicher Emissionswellenlänge sowie Neutravidin-funktionalisierten QDQRs PL-Löschstudien mit zwei verschiedenen Farbstoffen *Atto-594* und *Atto-610* der Firma *ATTO-TEC* durchgeführt. Beide Farbstoffe waren mit Biotin funktionalisiert. Obwohl *Atto-594* einen höheren spektralen Überlapp und somit auch einen geringeren Försterradius besitzt, löscht *Atto-610* die Fluoreszenz von verkapselten QP und QDQRs signifikant besser. Dieses unterschiedliche Verhalten liegt höchstwahrscheinlich daran, dass *Atto-610* hydrophober ist. Laut Herstellerangaben ist *Atto-594* „sehr hydrophil“, wohingegen *Atto-610* hydrophober ist.[1] Dies bestätigt, dass der hydrophobe PI-Teil der PI-*b*-PEO Mizellen maßgeblich für die Abschirmung verantwortlich ist. Diese Arbeiten sind noch nicht veröffentlicht und eine Zusammenfassung findet sich in Kapitel 7.1 (S. 180).

6.1.6 Zusammenfassende Betrachtung der Abschirmung von Halbleiternanokristallen, zellulare Aufnahme und Einzelteilchenuntersuchungen

Wie auf den vorherigen Seiten dargestellt, ist es mit dem entwickelten PL-Löschassay möglich, die HLNK-umgebende Membran zu charakterisieren. Alle hier diskutierten Untersuchungen sind durch PL-Löschassays mit Eisen(III)ionen bestätigt. Gegenüber Eisen(III)

[1] Telefonische Rücksprache mit Herrn Dr. Reichwein von ATTO-TEC und Angaben auf der Internetseite www.atto-tec.com, abgerufen 15.01.2016

weisen die hergestellten Proben grundsätzlich den gleichen abschirmenden Effekt auf. Eisen(III) ist jedoch ein weniger effektiver PL-Löscher für die Fluoreszenz von HLNK[309] und somit ist der Unterschied zwischen den verschieden verkapselten HLNKn nicht so stark ausgeprägt, wie bei der Verwendung von Kupfer(II).[15] Neben dieser Bestätigung decken sich die Untersuchungen der Zugänglichkeit der Partikel ebenfalls mit Absorptionsstudien, die eine Zunahme eines breiten Absorptionssignales mit einem Maximum bei ca. 1100 nm anzeigen, wenn QP mit Cu(II)acetat reagieren. Dieses Signal wird einer plasmonischen Resonanz von nichtstöchometrischem $Cu_{(2-x)}$selenid bzw. sulfid zugeordnet und dessen Intensität korreliert mit der Quencheffizienz (vgl. S. 157 ff.).[500] Jedoch ist dieses Signal nicht zu finden, wenn QDQRs mit Cu(II)acetat versetzt werden, was entweder dafür spricht, dass der assoziierte Kationenaustausch unter den gewählten Bedingungen an Wurzitkristallstrukturen nicht ablaufen kann oder anzeigt, dass die Zinkschale der QP den Kationenaustausch mit Cu(II) vereinfacht. Letzteres wäre mit der relativ höheren Löslichkeit von Zink(II)sulfid bzw. selenid im Vergleich zu Kupfer(II)selenid bzw. sulfid,[314,315,320,495] oder einer vereinfachten *kick-out* Verdrängung[31,32,174] erklärbar. Dies ist unter der Berücksichtigung der komplexen Vorgänge bei Kationenaustauschreaktionen (vgl. Kap 4.5.1.3) jedoch vermutlich ein zu einfaches Bild.

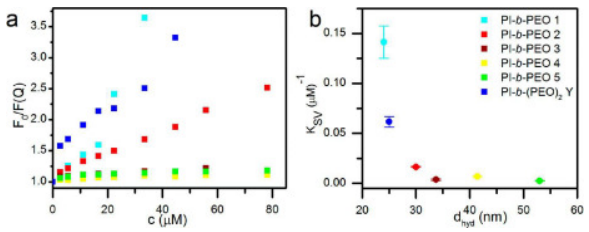


Abbildung 6.9: a) Stern-Volmer Auftragung der Fluoreszenzintensität von PI-*b*-PEO-verkapselten Quantenpunkten. b) Auftragung der aus a) extrahierten Stern-Volmer Konstanten gegen das Maximum der volumengewichteten Größenverteilung. Reprinted with permission from[15]. Copyright © 2013 American Chemical Society.

Mit Hilfe des entwickelten PL-Löschassays können Quervernetzungsreaktionen von Halbleiternanokristallen umgebenden Membranen analysiert werden. Hierbei wurde ersichtlich, dass lange Quervernetzungszeiten von 3-4 Stunden notwendig sind, um die Partikel vollständig gegenüber dem Einfluss von Kupfer(II) abzuschirmen. Um einen nahezu vollständigen Schutz der HLNK vor Kupfer zu gewährleisten, muss entweder ein Polymer mit einer PI-Blocklänge, die ähnlich der minimalen Verschlaufungslänge von PI ist, verwendet werden oder eine Emulsionspolymerisation durchgeführt werden.[13,499] Der PEO-Teil kann, Literaturberichte[314,315,320–322] heranziehend, jedenfalls als nahezu vollständig permeabel angesehen werden. Weiterhin lässt sich die Zugänglichkeit der HLNK durch eine Verzweigung an der Verbindungsstelle zwischen dem PI und dem PEO Block variieren. Im übertragenen Sinne bestätigt dies einen Bericht von Colin Heyes und Mitarbeitern, die eine erhöhte Zugänglichkeit von QP bei der Verwendung von multidentaten Liganden gefunden haben.[247] So zeigt der PL-Löschassay an, dass bei den PI-*b*-$(PEO)_2$ Y-verkapselten QP eine Vielzahl von QP nicht hinreichend gegenüber Quenchern abgeschirmt sind, was den Schluss zulässt, dass die Einführung von Verzweigungen in den PI-*b*-PEO-Molekülen dazu führt, dass sich keine homogene Probe bilden kann.[49] Die Analyse des PL-Löschassays zeigt an, dass ca. 30% der QP nicht hinreichend gegenüber Quenchern abgeschirmt sind, wohingegen die, die nicht bei der ersten Zugabe von Cu(II) gelöscht werden, eine dem PI-*b*-PEO 2 ähnliche Resistenz gegenüber Kupfer(II) zeigen.

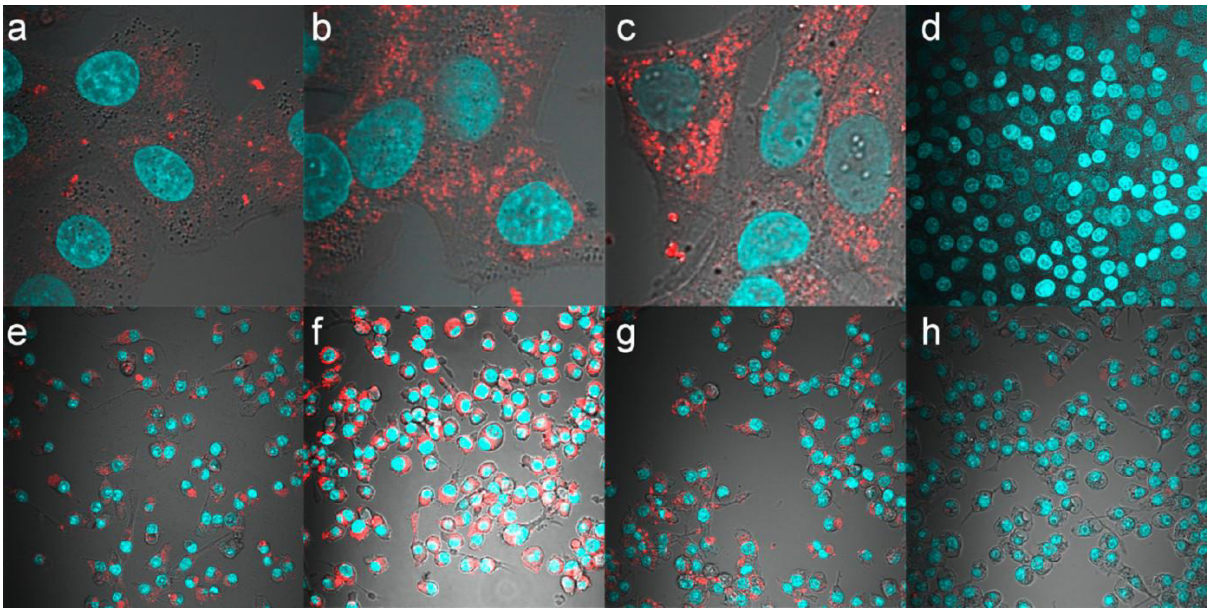


Abbildung 6.10: Zellulare Aufnahme von QP ($c = 1\ \mu M$), die mit verschiedenen PI-*b*-PEO verkapselt wurden. Obere Reihe: A549 Zellen, untere Reihe: RAW-264.7 Zellen. QP sind an ihrem Fluoreszenzsignal (rot) zu erkennen, der Zellnucleus wurde mit Hoechst 33342 angefärbt und ist blau dargestellt. Erste Spalte: PI-*b*-PEO 1 (a, e), zweite Spalte: PI-*b*-PEO 2 (b, f), dritte Spalte: PI-*b*-$(PEO)_2$ Y (c, g), vierte Spalte: PI-*b*-PEO 5 (d, h). Reprinted with permission from [15]. Copyright © 2013 American Chemical Society.

Dies belegt, dass die Fraktion der Partikel, die gut gegenüber Quenchern abgeschirmt ist, eine ähnliche Permeabilität der Polymermembran aufweist. PI-*b*-$(PEO)_2$ Y und PI-*b*-PEO 2 weisen einen gleich großen PI Block auf, was die Bedeutung dieses Blockes — also der hydrophoben Membran — für die Abschirmung nochmals unterstreicht: Wenn sich eine gut abschirmende Membran bildet, dann wird die Abschirmung über die PI-Blocklänge vorgegeben, was sich auch durch eine Normalisierung des PL-Löschassays auf die erste Quencherzugabe belegen lässt. [15]

6.1.6.1 Zellulare Aufnahme der verkapselten Quantenpunkte

Den Effekt einer ähnlichen hydrophoben Membran auf zellulare Aufnahme [494,501] und Resistenz gegenüber Cyanidionen [502] wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen für Goldnanopartikel untersucht. Hier wurde durch eine relativ kurze, geordnete Kette von gesättigen Kohlenwasserstoffen die zellulare Aufnahme verringert sowie die Stabilität gegenüber Cyanidionen und Verdünnung massiv erhöht. Auch wenn diese Berichte mitunter nicht direkt auf die hier behandelte mizellare Verkapselung übertragbar sind, zeigen sie, dass solch eine schützende Schicht die Eigenschaften von Nanokristallen massiv beeinflussen kann, obwohl sie nicht außen an der Struktur angebracht ist. [359,360] Dies deutet an, dass Zellen und Proteine im zellularen Medium nicht nur die äußere Hülle eines Nanomaterials abtasten, sondern auch mit tiefer liegenden Hüllenregionen wechselwirken können.

Auf Basis dieser Kenntnisse wurde die zellulare Aufnahme der PI-*b*-PEO verkapselten Quantenpunkte mit zwei Zelllinien (A549 und RAW-264.7) untersucht. In proteinreichem Medium, das dafür bekannt ist die zellulare Aufnahme zu verringern (vgl. Kap. 4.11, S. 57 ff.),[455] wurde innerhalb von 24 h keine Aufnahme detektiert.[15] Wird jedoch Proteinfreies Medium gewählt, so zeigen die Quantenpunkte, die mit PI-*b*-PEO 1, 2 und PI-*b*-$(PEO)_2$ Y verkapselt wurden, zellulare Aufnahme binnen 20 Stunden, wohingegen Quantenpunkte, die PI-*b*-PEO 5 tragen, nicht aufgenommen werden. Dies ist in Abbildung 6.10 dargestellt. Der Unterschied zwischen proteinhaltigem und proteinfreiem Medium kann mit dem Ausbilden der Proteinkorona erklärt werden (vgl. Kap. 4.11.2, S. 60 ff.).[249] Der Unterschied zwischen den Quantenpunkten, die mit verschiedenen Polymeren verkapselt wurden, korreliert sowohl mit der Größe als auch mit der Stern-Volmer Konstanten, wie Abbildung 6.9 zu entnehmen ist. Die größte Struktur (PI-*b*-PEO 5) zeigt keine zellulare Aufnahme, wohingegen die kleineren Strukturen in die Zelle aufgenommen werden. Die Größenabhängigkeit der zellularen Aufnahme ist bekannt, jedoch ist die biophysikalische Grundlage dieses Prozesses noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand derzeitiger Diskussionen.[456–460] Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen entweder an, dass die mit PI-*b*-PEO 5 verkapselten Quantenpunkte die biologisch inhärenten Größenlimitierungen überschreiten oder dass die Zellen, aufgrund der dicken Polymerschale, die Oberfläche der Quantenpunkte nicht abtasten können und so eventuelle Rezeptoren nicht mit den QP bzw. der Quantenpunktoberfläche interagieren können. Letzteres kann mit der im Laufe dieser Arbeit nahegelegten Polymerverknäulung und einem kürzlich erschienenen Bericht der Arbeitsgruppe um Wolfgang Parak korreliert werden, welcher beschreibt, dass weiche Nanostrukturen leichter in Zellen aufgenommen werden.[503,504]

Der Einfluss der Funktionalisierung an der äußeren Polymerhülle auf die Zellaufnahme von PI-*b*-PEO-FG Quantenpunkten wurde an HeLa Zellen untersucht und in *Tech-Connect Proceedings 2015, Biotech, Biomaterials and Biomedical* veröffentlicht und ist auf den Seiten 195 ff. abgedruckt.[3] Hier konnte gezeigt werden, dass PI-*b*-PEO-verkapselte Quantenpunkte, die Maltose an der Mizelloberfläche (PI-*b*-PEO-Mal) tragen, binnen einer Stunde in HeLa Zellen aufgenommen wurden, wohingegen mit anderen Endgruppen funktionalisierte Konstrukte keine Aufnahme zeigten. Eine Co-Lokalisierung mit dem Endosomenmarker Cy5-Transferrin legt nahe, dass die Aufnahme, wie erwartet, über einen endosomalen Mechanismus läuft.[464] Selbst in der Anwesenheit von Proteinen zeigen PI-*b*-PEO-Mal tragende Quantenpunkte zellulare Aufnahme, jedoch ist diese, im Vergleich zur Aufnahme ohne die Anwesenheit von Protein, stark verringert.[3] Diese Untersuchung belegt, dass die polymerverkapselten QP ein geeignetes Material für die Anwendung *in vivo* sind, da sie ihre gewünschte Funktionalität auch in proteinreicher Umgebung behalten.

6.1.6.2 Quenching auf Einzelteilchenebene

Neben der Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften im Nanokristallensemble, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sandra Flessau und Prof. Dr. Alf Mews an der Universität Hamburg auch Untersuchungen an einzelnen Nanokristallen durchgeführt. Hierbei wurde gefunden, dass Wasser kein geeignetes Solvents für die Untersuchung der einzelnen verkapselten QP bzw. QDQRs ist.[2,505] Weiterhin sind Quantenpunkte, aufgrund

ihrer verringerten Photostabilität im Vergleich zu QDQRs, weniger geeignet für Einzelteilchenuntersuchungen.[15] In einer vorangegangenen Studie wurde PEO_{300} als geeignetes Lösungsmittel identifiziert und im Weiteren auch verwendet.[505] Zur Durchführung einer PL-Löschuntersuchung auf Einzelteilchenebene wurde zuvor überprüft, dass der berichtete Abschirmungseffekt durch die Polymermembran auch gilt, wenn PEO_{300} als Lösungsmittel verwendet wird. Anschließend wurden die mit PI-*b*-PEO 1 und PI-*b*-PEO 5 verkapselten QDQR mittels Rotationsbeschichtung auf ein Glassubstrat gebracht, welches in einer Flusszelle montiert wurde. Die Nanokristalle wurden mit PEO_{300} überschichtet und anschließend mittels Weitfeld- und Konfokalmikroskopie (Abb. 6.11 A und B, S. 104 ff.) vor und nach Kupferionenzugabe untersucht. In Abbildung 6.11 sind Histogramme von Fluoreszenzabklingzeiten von einzelnen, PI-*b*-PEO 1 (A, C) bzw. PI-*b*-PEO 5 (B, D) verkapselten QDQRs vor (τ_0, links) und nach ($\tau(Q)$, rechts) Quencherzugabe und eine Gaußanpassung abgebildet. Einzelne Nanokristalle wurden hierbei anhand ihres Emissionsspektrums identifiziert (HWHM <22 nm).

Diese Einzelteilchenuntersuchung belegt, dass die Fluoreszenzabklingzeit nur bei PI-*b*-PEO 1 verkapselten QDQRs sinkt, wenn Cu(II) in Lösung vorhanden ist. Dies zeigt an, dass auch in PEO_{300} Cu(II) in Wechselwirkungsdistanz zu den QDQRs diffundiert und belegt somit die Ausbildung von Nanoporen und Nanolöchern in der PI-*b*-PEO 1 Membran. Durch die geringe Anregungsleistung (14 nW im Fokus), die gewählt wurde, da die QDQRs ein erhöhtes PL-Löschverhalten unter höheren Lichtintensitäten aufweisen, ist eine verlässliche Analyse des An/Ausverhaltens der QDQRs nicht möglich.[2,505]

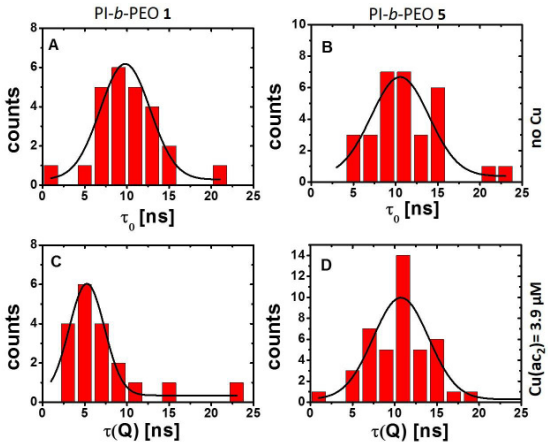


Abbildung 6.11: Histogramme der PL-Abklingzeiten von PI-*b*-PEO 1 (A,C) und PI-*b*-PEO 5 (B,D) verkapselten QDQR ohne (A,B) und mit Cu(II)acetat (C,D) Anwesenheit in PEO_{300}. Die Kurven zeigen eine Gaußanpassung. Adapted with permission from[2]. Copyright © 2016 The Royal Society of Chemistry.

Die hier präsentieren Resultate werden ebenfalls von weitfeldmikroskopischen Untersuchngen unterstützt, die zeigen, dass einige QDQRs direkt bei Zugabe des Cu(II) gelöscht werden und andere eine höhere Cu(II)-Abschirmung aufweisen.[2] Bei PI-*b*-PEO 1 verkapselten QDQRs wird eine höhere Anzahl der Partikel statisch gelöscht. Dies belegt, dass die unterschiedliche Abschirmung einzelner Partikel im Ensemble auf verschiedene Polymerhüllen um die HLNK zurückzuführen ist. Diese unterschiedlichen Polymerhüllen resultieren in einer Inhomogenität des Ensembles, die mit den verschiedenen PI-*b*-PEO Molekülen, die zum Phasentransfer verwendet werden, eingestellt werden kann.

6.1.6.3 Vergleich mit Berichten aus der Literatur

Selbst die Cu(II)-sensitivsten Proben, die während der Arbeit auf Basis von PI-*b*-PEO verkapselten HLNK dargestellt wurden, weisen eine signifikant höhere Abschirmung gegenüber Kupfer auf, als bisher mit anderen Phasentransfersystememem berichtet wurde (Für eine grafische Auftragung siehe *Figure 3*, Kap. 6.6.7, S. 136 ff).[314–316,320–322] Dies stellt im Vergleich zu anderen Phasentransfersystemen ein klares Alleinstellungsmerkmal dar und könnte zukünftig in biomedizinischen Assays oder in anderen Anwendungen Gebrauch finden, wo Abschirmungseffizienz verlangt ist. Weiterhin konnte mithilfe dieser effizienten Abschirmung erstmals die erfolgreiche, kupferkatalysierte 1,3-dipolare *Huisgen* Cycloaddition an polymerverkapselten Quantenpunkten durchgeführt werden.[48] Kupferkatalysierte 1,3-dipolare *Huisgen* Cycloaddition kann sowohl mit[13] als auch ohne[15] EP durchgeführt werden. Letzteres jedoch nur, wenn die QP mit PI-*b*-PEO 5 verkapselt wurden, was, wie besprochen, zu der höchsten Abschirmung führt und mit dem höchsten hydrodynamischen Durchmesser (Maximum der volumengewichteten Größenverteilung ca. 55 nm) des Gesamtkonstruktes einhergeht. Da jedoch auch die bioorthogonale Funktionalisierung von kleineren Strukturen wünschenswert ist, wird nachfolgend eine andere Strategie beschrieben, um diese zu erreichen.[236,321,322]

6.2 Bioorthogonale Kopplung von Liponsäure-PEO-FG tragenden Quantenpunkten

Der hier beschriebene Ansatz basiert auf einem Benzaldehyd-funktionalisiertem Liponsäure-PEO (LA-PEO-BA), das durch eine Abwandlung eines bekannten Syntheseprotokolls dargestellt wurde[253,255] und der photochemischen Ringöffnung der Liponsäure, die ohne Zusatz chemischer Reduktionsmittel funktioniert.[257,263] So können Benzaldehyd- und Azid- funktionalisierte LA-PEOs zum Phasentransfer verwendet werden, die sonst mit dem chemischen Reduktionsmittel reagieren würden. Weiterhin wurde mittels NMR-Untersuchungen ausgeschlossen, dass die geöffnete Liponsäure mit dem Benzaldehyd reagiert. So werden kleine QP-Konstrukte mit besonderer Funktionalität dargestellt. Dieses Projekt wurde an der *Florida State University*, Tallahassee in Zusammenarbeit mit Dr. Naiquian Zhan, Dr. Goutam Palui und Prof. Dr. Hedi Mattoussi durchgeführt und im *Proceeding of the SPIE 2015* und im *Journal of the American Chemical Society* veröffentlicht.[1,5]

Ziel dieses Projektes war die Bestimmung der Anzahl der Liganden von QP in wässriger Umgebung, die bioorthogonale Kopplung von QP ohne den Zusatz von Katalysatoren sowie die Durchführung von zwei aufeinanderfolgenden, bioorthogonalen Kopplungen an QP. Solche konsekutiven Kopplungsstrategien sind erforderlich, um die Komplexität von Quantenpunkten in biologischen und zellularen Medien verstehen und studieren zu können.[236] Hierzu wurde LA-PEO-BA und ein azidmodifiziertes Liponsäure-PEO (LA-PEO-N3) dargestellt und in Abmischung mit metoxyliertem Liponsäure-PEO (LA-PEO-OMe) zum Phasentransfer eingesetzt. Um eine hinreichende kolloidale Stabilität der QP-Konstrukte zu gewährleisten, muss PEO eines Molekulargewichts von 1000 g/mol benutzt werden. Anfänglich wurden Studien mit den oben dargestellten Liganden, die einen PEO-Block

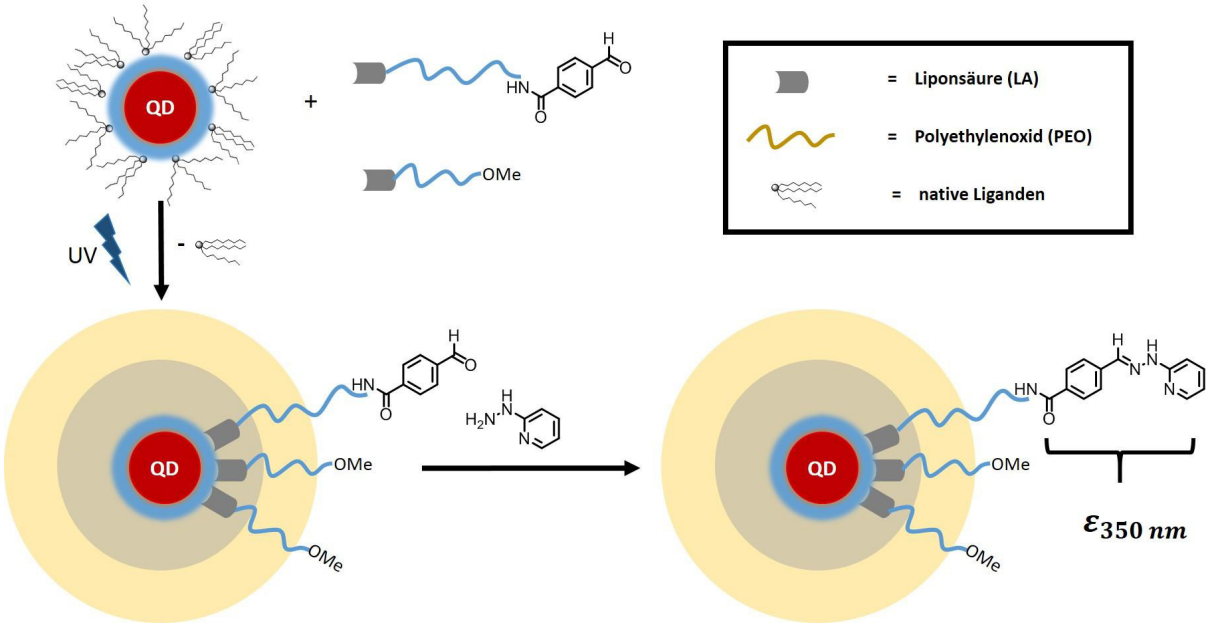


Abbildung 6.12: Schematische Darstellung des photochemischen Ligandenaustausches von QP mit LA-PEO-FG basierten Liganden. Nach chemischer Reaktion mit Hydrazinopyridin bildet sich ein Hydrozonchromophor, das ein charakteristisches Absorptionssignal bei 350 nm aufweist. Adapted with permission from [5].

von 700 g/mol aufwiesen, durchgeführt. Hierbei wurde eine leicht verringerte kolloidale Stabilität der Produkte unter den Kopplungsbedingungen beobachtet. Die so erlangten Erkenntnisse stützen die hier präsentierten Ergebnisse ausnahmslos, sind jedoch nicht gezeigt, da die zugrundeliegenden Normalisierungen in einem höheren Fehler resultierte. Im Weiteren dargestellte Ergebnisse wurden ausnahmslos mit LA-PEO_{1000} basierten Liganden gewonnen.

Um die Anzahl der Liganden am QP zu bestimmen, wurden verschiedene Proben mit unterschiedlichen Abmischungen von LA-PEO-BA hergestellt (vgl. Abb. 6.12) und deren Reinigung mittels Amicon-Membranfiltern optimiert. Hierbei waren drei Waschschritte nötig, um kolloidale Stabilität zu erhalten. Weitere Waschschritte verringerten die kolloidale Stabilität enorm, was ebenfalls mit einer Reduktion der Anzahl der Liganden einherging. Hier wird nochmals der Vorteil der Verwendung von quervernetzten Ligandenhüllen deutlich, die nicht mit Liganden in Lösung in chemischem Gleichgewicht stehen (vgl. vorherige Kapitel und Kap. 4.8, S. 44 ff.).

Die Bildung des Hydrazonchromophors aus QP-gebundenem Benzaldehyd und Hydrazinopyridin kann mittels Absorptionsspektroskopie verfolgt werden. Anilin und seine Derivate sind Katalysatoren dieser Reaktion,[365,366,506,507] löschen jedoch die PL der QP.[356,508,509] Die berichtete Reversibilität[356] dieser PL-Löschung konnte zum Teil reproduziert werden, jedoch wurde kein vollständiger PL-Rückgewinn beobachtet. Da Anilin erst in sehr hohen Konzentrationen reaktionsbeschleunigend wirkt und dadurch ebenfalls die kolloidale Stabilität der wässrigen QP herabgesetzt wird, wurde auf die Verwendung von Anilin ebenfalls verzichtet. Durch die Synthese des Hydrazonchromophors, bei leicht

verringertem pH Wert (pH 5) und Reaktion über Nacht, konnte Benzaldehyd quantitativ umgesetzt werden. Es ergibt sich ein lineares Verhältnis zwischen Benzaldehydgehalt und Anzahl der Liganden, die extrapoliert die Gesamtzahl der Liganden liefert.[5] Diese Extrapolation besitzt einen y-Achsenabschnitt von Null, was anzeigt, dass bei dieser Bestimmung kein Hintergrundsignal, wie z.B. durch unspezifische Adsorption, auftritt.[299–302] Basis dieses Ansatzes ist, dass beide Liganden dieselbe Wahrscheinlichkeit haben an den QP zu koordinieren.[1] Hiermit konnte anhand vier verschieden großen CdSe/ZnS QP (Durchmesser: 3.1, 3.4, 3.6 und 4.0 nm, bestimmt durch die Emissionseigenschaften und den Größenquantisierungseffekt) gezeigt werden, dass die Anzahl der Liganden mit zunehmendem Radius (mittlere Anzahl Liganden pro QP: 115±15, 155±15, 205±15 und 225±15) steigt und der durchschnittliche Raumbedarf mit zunehmendem Radius leicht sinkt (durchschnittlicher Raumbedarf pro Ligand in nm^2 1.05, 0.94, 0.79, 0.89), was einen Bericht von der Arbeitsgruppe um Uri Banin bestätigt, wo jedoch mit hydrophoben QP gearbeitet wurde.[303,304]

Im Anschluss an die bioorthogonale Funktionalisierung mit 2-Hydrazinopyridin kann eine ringspannungsinduzierte *Huisgen* Cycloaddition verwendet werden. Dies wird mit einem Dibenzocyclooctin-PEO Amin Derivat durchgeführt, an das anschließend *N*-Hydroxysuccinimid-aktiviertem Farbstoff Cy3 gekoppelt wird. Kontrollexperimente zeigen, dass diese Reaktion nur ablaufen kann, wenn der QP Azide an der Oberfläche trägt. Die Funktionalisierung mit dem Farbstoff Cy3 kann anhand des resultierenden FRETs beobachtet und analysiert werden. Der Farbstoff wurde hier stellvertretend für ein biologisches Affinitätsmolekül, wie z.B. ein Peptid oder Antikörper verwendet.

Der aus der chemischen Kopplung von Farbstoff und Quantenpunkt resultierende Energietransfer und dessen Studium ist eine Motivation für das nachfolgende Kapitel, das sich mit der Darstellung von multifunktionalen Hybridsystemen beschäftigt, als welches ein QP-Farbstoff Konjugat selbst schon angesehen werden kann.

6.3 Darstellung von fluoreszierenden Hybridstrukturen mehrerer Nanokristalle

Inspiriert von den im vorherigen Kapitel gewonnenen Erkenntnissen über die Abhängigkeit der Partikelabschirmung von der Polymerhülle, wurden verschiedene Hybridsysteme entwickelt, die das Vorhandensein der schützenden Polymerhülle ausnutzen, um fluoreszierende Hybridsysteme darzustellen. Diese Konstrukte besitzen neuartige Eigenschaften und geben unter anderem die Möglichkeit, Information über den Selbstassemblierungsprozess von verkapselten Quantenpunkten mit Goldnanokristallen zu gewinnen. Hierbei gelang es sowohl magneto-fluoreszente[6,7] als auch fluoreszent-plasmonische[14] und trifunktionale magneto-fluoreszent-plasmonische[4] Hybride darzustellen und zu charakterisieren.

6.3.1 Darstellung von magneto-fluoreszenten Nanohybriden

Wie in Kapitel 4.10.4 beschrieben, ist die Darstellung von magneto-fluoreszenten Hybridmaterialien aus FeONK und HLNKn nicht trivial.[88] Dies liegt vorallem daran, dass die FeONK selbst, oder von ihnen freigesetzte Ionen, die Fluoreszenz von HLNK löschen

können.[318] Da eine PS Schale die Zugänglichkeit der Partikel massiv verringern kann, ist sie ein ideales Material um einen Schutz der HLNK zu gewährleisten. Hierzu wurden zunächst FeONK in Polysorbat-80 Mizellen verkapselt und diese in einer EP mit einer PS Schale versehen.[289,290] Nach magnetsäulenchromatographischer Aufreinigung und simultanem Lösungsmitteltausch in THF, wurden die QDQRs und PS-tragenden FeONK in THF gemischt (Schritt I, Abb. 6.13) und in eine Polysorbat-80 Lösung eingespritzt, wobei sich die QDQRs an der Oberfläche der FeONK anlagern. Dieser Schritt ist maßgeblich für die Eigenschaften des späteren Produktes verantwortlich. Die hierbei ausschlaggebenden Einflussfaktoren sind Injektionsgeschwindigkeit, QDQR-Aspektverhältnis, das Konzentrationsverhältnis von Eisenoxid zu QDQR und ebenso die Oberflächenfunktionalisierung der individuellen Saatpartikel (vgl. elektronische Hintergrundinformationen von[6,7] für eine detaillierte Beschreibung). Die beste Produktkontrolle gelang schließlich durch die Verwendung einer hochkonzentrierten QDQR und FeONK-Lösung und einer schnellen Injektion in die Polysorbat-80 Lösung (vgl. S107 ff.).[6,7]

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung, in der alle nicht an FeONK-Beads gebundenen QDQRs entfernt wurden, wurde eine zweite Emulsionspolymerisation durchgeführt (Schritt II), in der die PS-Schale um das Nanohybrid geschlossen wird. Bei dem Versuch, eine dickere Schale durch die Zugabe von mehr Monomer zu synthetisieren, stellte sich heraus, dass sich ungeordnete Überstrukturen aus mehreren FeONK und QDQRs bilden (Abb. 6.13 E). Hierbei bleibt das Verhältnis zwischen QDQR und FeONK annähernd konstant, was nahelegt, dass diese Cluster durch Zusammenlagerung einzelner QDQR/FeONK-Dyaden entstehen.

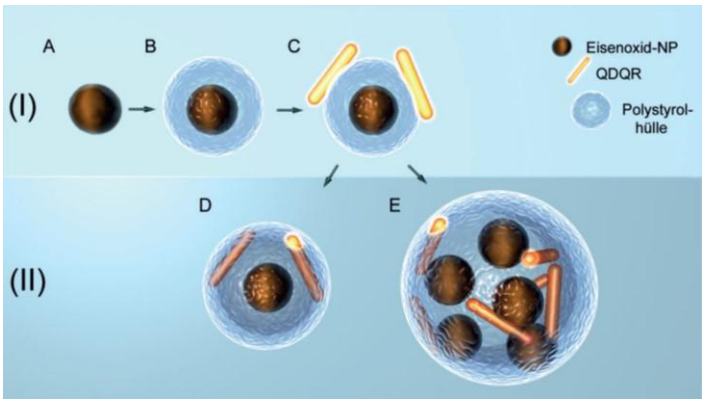


Abbildung 6.13: Die zweistufige Nanohybridsynthese. Schritt I: A) Eisenoxidnanopartikel (native Liganden nicht gezeigt), B) Eisenoxidnanokristalle mit der ersten Polystyrolhülle (Eisenoxid-Polystyrol-Saatpartikel), C) Nanohybrid nach der Anlagerung von QDQRs. Schritt II: D) Nanohybrid nach der Synthese einer dünnen Polystyrolhülle, E) Nanohybrid nach der zweiten Saat-Emulsionspolymerisation, wenn sich Eisenoxid-QDQR-Dyaden durch eine hohe Styrolkonzentration zusammenlagern. Reprinted with license from[6,7]. Copyright ©2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Das Fluoreszenzverhalten der so gewonnenen QDQR/FeONK Dyaden wurde an Einzelteilchen und am Partikelensemble untersucht. Hierbei konnten die QDQRs im Hybrid nicht von freien QDQRs unterschieden werden, was bedeutet, dass sie von den Einflüssen des FeONK sowie der ggf. daraus freigesetzten Eisenionen geschützt sind (vgl. S. 107 ff.). So gelang die Darstellung von kleinen (50 nm) magneto-fluoreszenten Hybridstrukturen, in denen sich die FeONK und QDQR nicht negativ beeinflussen, was im Hinblick auf die Berichte aus der Literatur ein Alleinstellungsmerkmal darstellt.[88,437–440] (Für TEM Bilder siehe *Figure 1*, Kap. 6.6.3, S. 107 ff.)

6.3.2 Darstellung und Verwendung von fluoreszent-plasmonischen und magneto-fluoreszenten Hybriden

Das Vorhandensein der relativ dicken Polymermembran um die verkapselten QP kann dafür genutzt werden, Quantenpunkte mit plasmonischen AuNKn zu einem multifunktionalen Hybrid zu koppeln. Wird ähnliches mit QP versucht, die eine dünnere Ligandenhülle aus LA-PEO_{700}-NH2 tragen, wird die Fluoreszenz der QP komplett gelöscht. Weiterhin ist bekannt, dass Goldionen die Fluoreszenz von Quantenpunkten ebenfalls löschen können,[510] was die Verwendung der hier präsentierten PI-*b*-PEO verkapselten, gut abgeschirmten Quantenpunkte nahelegt. Die PI-*b*-PEO Polymerhülle dient hierbei sowohl als Abstandshalter als auch als Schutz gegenüber Elektronentransferquenching, was die Materialien zu einem idealen Werkzeug für das Studium von Energietransfereignissen macht.

Um ein möglichst einfaches System zum Studieren der Wechselwirkung von AuNK und verkapselten Quantenpunkten zu entwickeln, sollte zudem auf eine chemische Kopplung, die den Zusatz neuer Reagenzien erfordert, zwischen polymerverkapseltem Quantenpunkt und AuNP verzichtet werden. Deshalb wurde PI-*b*-PEO 5 mit Liponsäure funktionalisiert, die eine sehr hohe Affinität zur Goldnanokristalloberfläche aufweist. Hierzu wurde die Liponsäure zunächst mit Thionylchlorid aktiviert und anschließend mit PI-*b*-PEO-OH umgesetzt.[14] Um den Einfluss anderer funktioneller Gruppen am PI-*b*-PEO (PI-*b*-PEO-FG) auf diesen Selbstassemblierungsprozess zu untersuchen, wurden aminfunktionalisierte (PI-*b*-PEO-NH2) und carboxylfunktionalisierte (PI-*b*-PEO-COOH) PI-*b*-PEO-Derivate synthetisiert.[278] Quantenpunkte und FeONK wurden unter Verwendung der verschiedenen Polymere verkapselt, 4 h mit AIBN quervernetzt und anschließend mit Succrosegradientenzentrifugation gereinigt. Ausgehend von diesen Konstrukten wurden Selbstassemblierungsvorgänge mit AuNK, die verschiedene Oberflächenfunktionalitäten tragen, durchgeführt. Nachfolgend wird zunächst auf die Verwendung von citratstabilisierten AuNKn beschrieben. In Kapitel 7.4 (S. 184 ff.) wird auf die die Verwendung von AuNK, die Liponsäure-basierte zwitterionische Liganden tragen, eingegangen. Mit letzteren ist es möglich, fluoreszent-plasmonische Hybride mit einer hohen kolloidalen Stabilität darzustellen.

6.3.2.1 Verwendung von Citrat-stabilisierten AuNKn zur Hybridbildung

Auf die QP und FeONK, die mit dem PI-*b*-PEO-LA verkapselt wurden, (QP-LA bzw FeONK-LA) wurden AuNK mittels Reduktion von Gold(III)tetrachlorid durch Natriumcitrat synthetisiert. Hierbei entstehen sphärische und elongierte AuNK in der Peripherie der QP-LA bzw. FeONK-LA. Weiterhin können durch Mischen und Einstellen des Verhältnisses der jeweiligen Nanokristalle Kern/Satellit oder inverse Kern/Satellit-Strukturen dargestellt werden. Dies kann mittels TEM und UV-Vis beobachtet werden und wurde 2013 in *Nanosacle* publiziert (vgl. Kap. 6.6.8, S. 144 ff.). Hierbei sind die Golddomänen klar zu erkennen und von den FeONK bzw. QP zu unterscheiden.[14] Auf Basis dieser verkapselten Quantenpunkte wurden ebenfalls trifunktionale FeONK/AuNK/QP Nanohybride erzeugt. So wurden zunächst AuNK um FeONK-LA synthetisiert. Nach magnetsäulen-

chromatographischer Aufreinigung wurden QP-LA hinzugegeben, die sich von außen an die FeONK/Au Konstrukte anlagern, wie kryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen belegen.[4] Diese wurden durchgeführt, da Trocknungseffekte beim Präparieren von TEM-Proben dazu führen können, dass sich die dreidimensionale Struktur der Konstrukte ändert und so nicht abgebildet werden kann. Es wurde ein Überschuss von 40 QP-LA pro FeONK/AuNK gewählt, um sowohl freie als auch Hybrid-gebundene QP in einer Probe zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden von Dr. Hamed Heidari und Prof. Dr. Sara Bals am EMAT in Antwerpen durchgeführt. Die Hybride wurden mit verschiedenen Methoden für die kryo-elektronenmikroskopsiche Untersuchung vorbereitet: Zunächst wurden die Proben unter raschem Abkühlen verglast, untersucht und anschließend einem weiteren Gefriertrocknungsschritt unterzogen. Beide Methoden bestätigen die erwartete Struktur: Die FeONK befinden sich im Zentrum, welches von Golddomänen umgeben ist, an diese Golddomänen binden die QP-LA, die sich als Satelliten außen am Konstrukt befinden. Durch den Gefriertrocknungsschritt ist es möglich, HAADF-STEM (*high-angle annular dark-field scanning transmission elelctron microscopy*) und STEM-EDX (*scanning transmission elelctron energy-dispersive X-ray microscopy*) durchzuführen, welche durch die Visualisierung der Elementverteilung von Eisen, Gold und Cadmium die Struktur der Hybride bestätigen (vgl. Kap. 7.7.2, S. 200 *Figure 2*).[4] Weiterhin ist es möglich, durch eine dreidimensionale Rekonstruktion den Abstand zwischen Goldoberfläche und QP zu bestimmen, welcher 4±2 nm betrug. Jedoch schrumpfen die Konstrukte durch den Gefriertrocknungsschritt,[4] was anzeigt, dass der Abstand in Lösung vermutlich etwas höher ist.

6.4 Untersuchung von Fluoreszent-Plasmonischen Hybridstrukturen

Die Anwendung dieser Abstandskontrolle zwischen AuNK und QP zur Untersuchung von Exziton-Plasmon Wechselwirkungen sowie die Verwendung von zwitterionisch stabilisierten AuNKs ist in Kapitel 7.4 (S. 184 ff.) dargestellt. Hierbei ist es möglich durch Abstandskontrolle, in Zusammenarbeit mit theoretischen Physikern, ein Modellsystem für die Wechselwirkung von Exzitonen mit Plasmonen zu entwerfen. Durch zwitterionisch stabilisierte AuNK ist es möglich, stabile und biologisch aktive Hybridstrukturen herzustellen, deren Selbstassemblierung durch PL-Löschexperimente untersucht wurde.

6.5 Darstellung von Hybridstrukturen mittels Clusterbildung und Synthese elongierter FeONK

Beim Optimieren des Phasentransfers von QDQRs zur Untersuchung der HLNK-umgebenden Polymermembran ist aufgefallen, dass die QDQRs bei einem Unterschuss Polymer die Tendenz zeigen Cluster zu bilden. Diese Beobachtung deckt sich mit Berichten aus der Literatur, die Clusterbildung bei der Verwendung eines Polymerunterschusses beobachten.[90,379] Dieses Verhalten wurde auf FeONK[10] und AuNK übertragen. Der Bericht der Clusterbildung der AuNK ist noch nicht veröffentlicht und in Kapitel 7.6 (S. 193 ff.) dargestellt. Es sei angemerkt, dass sich mithilfe der Verkapselung in PI-*b*-PEO und an-

schließender EP Cluster herstellen lassen, die eine außergewöhnliche Stabilität gegenüber Königswasser zeigen.

Die Übertragung der Clusterbildung auf FeONK und die magnetische Untersuchung von verschieden großen FeONK Clustern zeigte, dass die Blockadetemperatur, die Magnetoviskosität und die r_2 Relaxation abhängig von der Clustergröße, also auch der Anzahl der FeONK pro Cluster, ist. Dies zeigt eindrucksvoll die Generierung von neuen Eigenschaften durch Zusammenlagerung einzelner Materialien in einer Mizelle.

Mit dem Vorhandensein von Mizellen bzw. mizellähnlichen Templaten wird auch die Bildung von anisotropen FeONK erklärt, die in einem Seitenprojekt aufgeklärt und publiziert wurde.[8] Wird bei der Darstellung von FeONK aus Eisenoleat lediglich moderates Vakuum angelegt, so bilden sich Eisenstäbchen. Wohingegen keine Stäbchenbildung beobachtet wurde, wenn das Eisenoleat am Membranpumpenvakuum getrocknet wurde (S. 112 ff.). Dies liegt vermutlich daran, dass leicht flüchtige Komponenten wie Ethanol und Wasser, die bei der Synthese von Eisen(III)oleat entstehen, abgetrennt werden. Diese Komponenten bilden im weiteren Syntheseverlauf mit der Ölsäure und dem Oleylalcohol, die als Liganden verwendet werden, Überstrukturen, die die anisotrope Zusammenlagerung einzelner Eisenoxidnanokristallite bewirken. Die Zusammenlagerung bzw. das Zusammenwachsen einzelner Nanokristalle passiert hier zufällig und nicht entlang einer bestimmten Kristallrichtung, was aus dem Fehlen von sehr intensiven, nicht verbreiterten XRD-Reflexen geschlussfolgert werden kann. Solche Signale entstehen, wenn sich Nanokristalle bevorzugt mit bestimmten Kristallfacetten aneinander anlagern und so in eine Raumrichtung eine Vorzugsrichtung ausbilden.[511–514] Diese Eisenoxidnanostäbchen weisen eine magnetokristalline Anisotropie auf. Über Reaktionsparameter wie Reaktionstemperatur und -dauer kann das Aspektverhältniss dieser Eisenoxidnanostäbchen zudem eingestellt werden.

6.6 Publikationen in Fachzeitschriften

6.6.1 Bio-orthogonal Coupling as a Means of Quantifying the Ligand Density on Hydrophilic Quantum Dots

Diese Veröffentlichung beschreibt den photochemisch induzierten Phasentransfer von Quantenpunkten mit funktionalen Liponsäure-PEO Liganden, die eine anschließende bioorthogonale Kopplung der Quantenpunkte zulässt. Durch die Kopplung von Benzaldehyd an den Quantenpunkten mit Hydrazinopyridin ist eine genaue Bestimmung der Ligandenanzahl der Partikel möglich. Durch die Verwendung von azid- und benzaldehydfunktionalisierten Liganden wurden zwei bioorthogonale Reaktionen konsekutiv durchgeführt und so ein multifunktionales Hybrid hergestellt. Reprinted with permission from *Bio-orthogonal Coupling as a Means of Quantifying the Ligand Density on Hydrophilic Quantum Dots*, Naiquian Zhan, Goutam Palui, Jan-Philip Merkl and Hedi Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, jacs.5b13574. Copyright ©2016 American Chemical Society.

JACS
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY
Article
pubs.acs.org/JACS

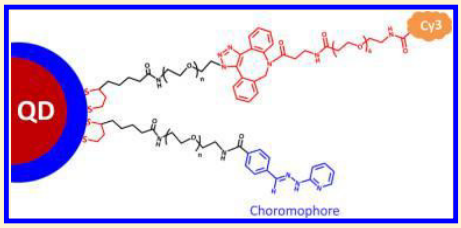
Bio-orthogonal Coupling as a Means of Quantifying the Ligand Density on Hydrophilic Quantum Dots

Naiqian Zhan,[†] Goutam Palui,[†] Jan-Philip Merkl,[†,‡] and Hedi Mattoussi*[,†]

[†]Department of Chemistry and Biochemistry, Florida State University, 95 Chieftan Way, Tallahassee, Florida 32306, United States
[‡]Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: We describe the synthesis of two metal-coordinating ligands that present one or two lipoic acid (LA) anchors, a hydrophilic polyethylene glycol (PEG) segment and a terminal reactive group made of an azide or an aldehyde, two functionalities with great utility in bio-orthogonal coupling techniques. These ligands were introduced onto the QD surfaces using a combination of photochemical ligation and mixed cap exchange strategy, where control over the fraction of azide and aldehyde groups per nanocrystal can be easily achieved: LA-PEG-CHO, LA-PEG-N_3, and bis(LA)-PEG-CHO. We then demonstrate the application of two novel bio-orthogonal coupling strategies directly on luminescent quantum dot (QD) surfaces that use click chemistry and hydrazone ligation under catalyst-free conditions. We applied the highly efficient hydrazone ligation to couple 2-hydrozinopyridine (2-HP) to aldehyde-functionalized QDs, which produces a stable hydrazone chromophore with a well-defined optical signature. This unique optical feature has enabled us to extract a measure for the ligand density on the QDs for a few distinct sizes and for different ligand architectures, namely mono-LA-PEG and bis(LA)-PEG. We found that the foot-print-area per ligand was unaffected by the nanocrystal size but strongly depended on the ligand coordination number. Additionally, we showed that when the two bio-orthogonal functionalities (aldehyde and azide) are combined on the same QD platform, the nanocrystal can be specifically reacted with two distinct targets and with great specificity. This design yields QD platforms with distinct chemoselectivities that are greatly promising for use as carriers for in vivo imaging and delivery.



INTRODUCTION

Integration of luminescent semiconductor nanocrystals (quantum dots, QDs) into biology for use as tagging agents and/or sensing platforms is greatly promising.[1−6] It exploits some of the unique physical and optical properties that these materials exhibit, such as tunable emission and great photochemical stability.[7] However, this requires postgrowth modification to render the QDs hydrophilic and biocompatible, as these materials are often prepared using high temperature growth route and are thus hydrophobic. Several strategies have been developed to modify the QD surfaces and promote their dispersion in aqueous media.[8−12] One strategy exploits the ability of certain coordinating groups to interact with the metal-rich surface of the nanocrystals and employs ligand exchange, where the native cap is substituted with bifunctional coordinating ligands to promote hydrophilicity.[10,13−16] These bifunctional ligands typically present one or more anchoring groups that coordinate onto the QD surfaces and a hydrophilic moiety to promote affinity to buffer media. The ligand exchange strategy is easy to implement and allows control over the coordination interactions between the nanocrystals and ligands, as well as the number of reactive groups per QD; it also provides QDs with compact hydrodynamic size. Dihydrolipoic acid (DHLA) and its derivatives have been used in designing ligands with high affinity to ZnS-overcoated QDs.[10,14,17] For instance, our group has developed several molecular scale ligands presenting one or two lipoic acid anchors appended with either a polyethylene glycol (PEG) short chain or a zwitterion group (LA-PEG, LA-ZW, bis(LA)-PEG, and bis(LA)-ZW) and applied them for stabilizing both luminescent QDs and Au nanoparticles.[10,14,18,19] This route has yielded dispersions of QDs and AuNPs with good colloidal stability over a wide range of conditions.[14,18,19] Additionally, the PEG moiety can be modified with specific terminal functionalities to facilitate the bioconjugation of the nanoparticles with target molecules such as dyes, peptides, proteins, and redox complexes.[14,15,20−22]

Several conventional conjugation techniques have been developed to couple biomolecules to various inorganic nanocrystals, including EDC condensation reaction (amine to carboxylic acid), thiol−ene reaction, and avidin−biotin binding.[8,23,24] These approaches, though ubiquitous, have some limitations. For example, EDC coupling uses excess amounts of precursors and coupling reagents, which require careful removal of the byproducts and excess reagents; it may also cause cross-linking.[25] As alternative to these routes, there has been a growing interest in developing bio-orthogonal coupling chemistries directly on the nanocrystal surfaces, because these routes are rapid, selective, and can be carried out under mild

Received: December 30, 2015
Published: February 8, 2016

ACS Publications © 2016 American Chemical Society

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190−3201

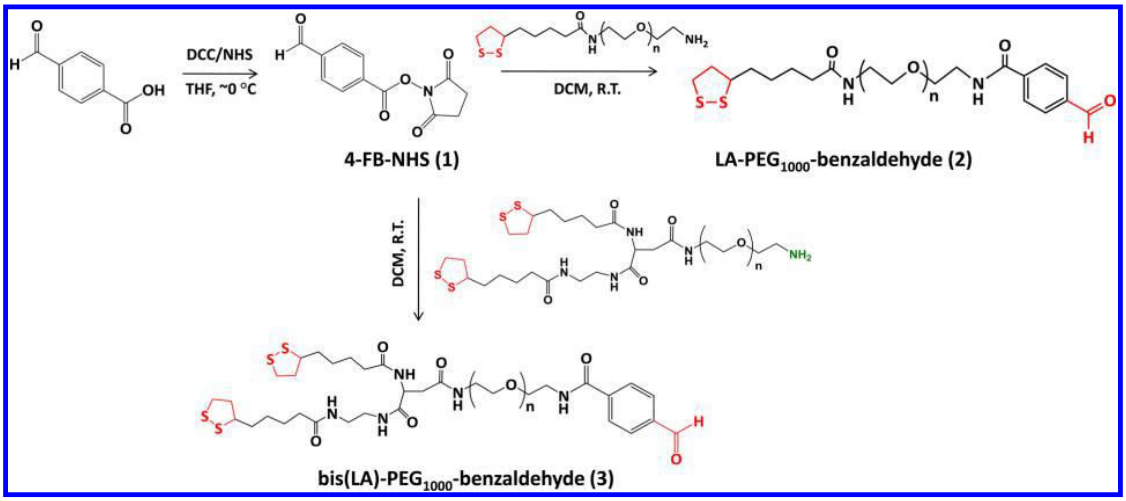


Figure 1. Schematic representation of the chemical structures and synthetic steps to prepare LA-PEG-CHO and bis(LA)-PEG-CHO ligands used in this study.

conditions. They also exhibit minimum interference with the biological properties of the system or cross coupling.[26] Bio-orthogonal reactions applied directly on the nanoparticle surface include strain-promoted azide−alkyne cycloaddition, tetrazine ligation, and hydrazone ligation.[27−30]

For most applications in biology a thorough characterization of the number of target molecules coupled to a nanocrystal (i.e., the surface coverage) following a reaction is crucial. This controls the nanocrystal reactivity and the biological activity of the resulting conjugates. However, characterization of such properties using conventional coupling strategies combined with UV−vis optical spectroscopy, NMR, or ICP-MS spectroscopy has been rather challenging, especially for hydrophilic nanocrystals; results have also been rather limited.[23,31−33] Therefore, it is highly desirable to develop an effective method that can provide quantitative information about the ligand density and reactivity of the nanocrystal surfaces.

In the present study, we report the synthesis of three new PEGylated ligands presenting LA anchors and specific terminal reactive functions: azide-terminated LA-PEG (LA-PEG-N_3), aldehyde-appended LA-PEG (LA-PEG-CHO), and aldehyde-appended bis(LA)-PEG (bis(LA)-PEG-CHO). This design is further combined with a mild photoligation strategy to cap CdSe-ZnS QDs with these ligands under $NaBH_4$-free conditions, providing nanocrystals with controlled surface functionality. The CHO-modified QDs are reacted with 2-hydrazinopyridine (2-HP). This coupling yields hydrazone chromophores with a well-defined optical feature at 350 nm, which has been exploited to extract an estimate for the density of PEG-CHO groups per QD. Similarly, the azide-modified QDs have been reacted with dibenzocyclooctyne (DBCO) via strain-promoted cycloaddition reaction and further coupled with Cy3 dye. The effectiveness of the coupling route is inferred from the combined analyses of the absorption and fluorescence resonance energy transfer data. Furthermore, we have prepared QDs that present both N_3 and CHO groups and used them to test bio-orthogonal coupling (click reaction and hydrazone ligation) on the nanocrystal surfaces.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Poly(ethylene glycol) (PEG) (MW: ~1000 Da), poly(ethylene glycol) methyl ether (MW: ~750 Da), lipoic acid (LA), 2-hydrozinopyridine (2-HP), 4-formylbenzoic acid (4-FB), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N*,*N*-dicylohexylcarbodiimide (DCC), tetramethylammonium hydroxide (TMAH), and organic solvents (e.g., $CHCl_3$, CH_2Cl_2, CH_3OH, and C_6H_{14}) were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Phosphate salts such as monosodium phosphate and disodium phosphate were also purchased from Sigma Chemicals. Poly(ethylene glycol)-modified dibenzocyclooctyne (DBCO-PEG_{200}-NH_2) and sulfo-Cy3 NHS esters were respectively purchased from Click Chemistry Tools (Scottsdale, AZ) and GE Healthcare Life Science (Pittsburgh, PA). Deuterated solvents (e.g., D_2O and $CDCl_3$) used for ^1H NMR and ^{13}C NMR experiments were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Column chromatography purification was performed using silica gel (60 Å, 230−400 mesh, from Bodman Industries, Aston, PA). All chemical reactions reported here were performed under nitrogen atmosphere unless otherwise specified. Moisture- and oxygen-sensitive solid materials were handled in a glovebox (MBraun Labmaster). All the solvents were used as purchased without further purification, unless otherwise specified.

Instrumentation. The NMR spectra were collected using a Bruker SpectroSpin 600 MHz spectrometer, while the FT-IR (Fourier transform infrared) spectra were recorded on a PerkinElmer FT-IR spectrometer. The optical characterization of the dispersions was carried out using a Shimadzu UV−vis absorption spectrophotometer (UV 2450 model). A Fluorolog-3 spectrometer (JobinYvon Inc., Edison, NJ), equipped with PMT and a CCD for detection, was used to collect the photoluminescence spectra. Solvent evaporation (to concentrate or dry samples) was carried out using a lab-scale Buchi rotary evaporator R-215 (New Castle, DE). The photoligation experiments were carried out using a UV photoreactor, Model LZC-4 V (Luzchem Research Inc., Ottawa, Canada).

■ LIGAND SYNTHESIS

The various polyethylene glycol-appended monolipoic acid ligands used in this study were prepared following previous protocols with a few modifications.[34] LA-PEG_{750}-OCH_3, bis(LA)-PEG_{750}-OCH_3, and bis(LA)-PEG_{1000}-NH_2 were prepared and purified following the procedures described in our previous reports.[19,35,36] To improve the limited solubility of the azide and aldehyde groups as well as the resulting azide- and aldehyde-functionalized QDs in water, we used a longer

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190−3201

PEG_{1000} chain (instead of PEG_{400} or PEG_{600}) to prepare both the azide- and aldehyde-appended ligands. As such, the LA-PEG_{1000}-N_3, LA-PEG_{1000}-NH_2, and bis(LA)-PEG_{1000}-NH_2 were synthesized following previous protocols but starting with PEG_{1000} precursor.[34,36] The LA-PEG_{1000}-NH_2 and bis(LA)-PEG_{1000}-NH_2 were further reacted with NHS-activated formylbenzoic acid (4-FB-NHS) to yield LA-PEG_{1000}-CHO and bis(LA)-PEG_{1000}-CHO ligands, as shown in Figure 1. The ligands with various structures and terminal functions were photoligated onto CdSe-ZnS QDs in situ starting with the oxidized form under UV-irradiation.[37] Below we provide the details of the synthetic procedure used for the preparation of the aldehyde-terminated LA-modified ligands.

Compound 1: 4-FB-NHS (NHS-Modified 4-Formylbenzoic Acid). 4-Formylbenzoic acid (1.0 g, ∼ 6.7 mmol), NHS (0.92 g, ∼8 mmol) and 40 mL of THF were mixed in a 250 mL two-neck round-bottom flask equipped with a magnetic stirring bar. The solution was purged with N_2 and cooled to ∼0 °C using an ice bath, and then DCC (1.65 g, ∼8.01 mmol) dissolved in 15 mL of THF was added dropwise. Once the addition was complete, the reaction mixture was gradually warmed up to room temperature and stirred under N_2 atmosphere overnight. The THF was removed using a rotary evaporator, yielding a dry solid, which was redissolved in $CHCl_3$, and the insoluble byproducts (white solid) were removed by passing the solution through a filter paper. The remaining residue was purified using silica gel chromatography employing 20:1 (v/v) $CHCl_3$:MeOH mixture as the eluent. After solvent evaporation, the product was collected as a white solid (∼1.3 g ; reaction yield ∼80%) and stored at 4 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, in $CDCl_3$): δ (ppm) 10.13 (s, 1H), 8.29−8.30 (d, 2H, J = 6 Hz), 8.01−8.02 (d, 2H, J = 6 Hz), 2.96 (s, 4H).

Compound 2: LA-PEG-CHO. Compound **1** (4-FB-NHS, 0.21 g, ∼0.85 mmol) was dissolved in 20 mL of DCM in a 100 mL two-neck round-bottom flask. The content was purged with N_2, a solution of LA-PEG_{1000}-NH_2 (1.53 g, 1.27 mmol) dissolved in 20 mL of DCM was added dropwise through an additional funnel at room temperature, and the reaction mixture was stirred overnight. Once the reaction was complete, the mixture was filtered (through a filter paper) to remove any solid byproduct (e.g., NHS). The solution was concentrated using rotary evaporator and further purified on a silica gel column using 20:1 (vol:vol) $CHCl_3$:MeOH solvent mixture as the eluent. The eluted fractions were combined and the solvent was evaporated, yielding compound **2** as a yellow paste (∼1.35 g; reaction yield ∼50%). ^{1}H NMR (600 MHz, in $CDCl_3$): δ (ppm) 10.10 (s, 1H), 7.98−7.99 (d, 2H, J = 6 Hz), 7.91−7.92 (d, 2H, J = 6 Hz), 7.34 (s, 1H), 6.58 (s 1H), 3.62 (m, 90H), 3.52−3.54 (m, 6H), 3.42−3.44 (m, 4H), 3.13−3.17 (m, 1H), 3.06−3.11 (m, 1H), 2.41−2.46 (m, 1H), 2.20 (t, 2H, J = 6 Hz), 1.91−1.85 (m, 1H), 1.63−1.68 (m, 4H), 1.42−1.45 (m, 2H).

Compound 3: Bis(LA)-PEG-CHO. In a 100 mL two-neck round-bottom flask, 4-FB-NHS (0.11 g, ∼0.45 mmol) was dissolved in 15 mL of DCM. Then bis(LA)-PEG_{1000}-NH_2 (1.0 g, ∼0.65 mmol) also dissolved in DCM (15 mL) was added dropwise through an addition funnel. The reaction mixture was stirred at room temperature under N_2 atmosphere overnight. The solution mixture was passed through a filter paper and then further purified on a silica gel column using an eluent mixture of 20:1 (vol:vol) $CHCl_3$:MeOH. The eluted fractions were combined, and the solvent was evaporated, yielding the product as a yellow solid (∼0.5 g; reaction yield ∼50%). ^{1}H NMR (600 MHz, in $CDCl_3$): δ (ppm) 10.10 (s, 1H), 8.03−8.04 (d, 2H), 7.93−7.94 (d, 2H), 7.43 (s, 1H), 6.94 (s 1H), 4.72−4.76 (m, 1H), 3.63 (m, 90 H), 3.52−3.56 (m, 6H), 3.32−3.38 (m, 6H), 3.14−3.20 (m, 2H), 3.07−3.12 (m, 2H), 2.64−2.67 (m, 1H), 2.54−2.57 (m, 1H), 2.40−2.46 (m, 2H), 2.25−2.27 (t, 2H, J = 6 Hz), 2.19−2.21 (t, 2H, J = 6 Hz), 1.85−1.89 (m, 2H), 1.64−1.69 (m, 8H), 1.43−1.48 (m, 4H).

Growth of the Quantum Dots. Growth of the CdSe-ZnS core−shell QDs used in this study was carried out using a stepwise reaction involving the reduction of organometallic precursors at high temperature and in a coordinating solvent mixture made of *n*-trioctylphosphine (TOP), *n*-trioctylphosphine oxide (TOPO), and alkylamines along with a small fraction of *n*-hexylphosphonic acid. Core growth was then followed by overcoating with a few monolayers of ZnS; additional details can be found in previous references.[38−44]

Photoligation of QDs with a Mixture of Azide and Aldehyde-Functionalized Ligands. Below we briefly describe the protocol used to photoligate the CdSe-ZnS QDs with a mixture of LA-PEG_{750}-OCH_3 and LA-PEG_{1000}-CHO (i.e., mixed surface ligand exchange). The molar fraction of LA-PEG_{1000}-CHO used was varied to allow the preparation of QDs with controllable numbers of surface-reactive groups. First, hydrophobic TOP/TOPO-capped QDs (130 μL of a 10 μM stock dispersion in hexane/toluene mixture with a volume ratio of 1:2) were precipitated using excess ethanol, followed by centrifugation, yielding a precipitate of the QD materials; note that the hexane/toluene volume ratio reported above can be slightly varied without affecting the phase transfer process or the quality of the final materials. The solvent was removed using a glass pipet, and the wet QD solid paste was redispersed in 500 μL of hexane. Separately, LA-PEG_{750}-OCH_3 (47.5 mg) and LA-PEG_{1000}-CHO (3.6 mg) were dissolved in 500 μL of MeOH and a catalytic amount of tetramethylammonium hydroxide (TMAH, ∼10 mM) was also added. The content of the two vials (QDs and ligands) were combined in one scintillation vial equipped with a magnetic stirring bar; this yielded a two-phase solution mixture made of a hexane phase containing the QDs (top) and a methanol phase containing the ligands (bottom). The vial was sealed with a rubber septum, and the atmosphere was switched to nitrogen. This vial was placed inside a UV reactor (Luzchem Research Inc., Ottawa, Canada) and then irradiated using UV light (irradiation peak centered at 350 nm and a power = 4.5 mW/cm^2) for 30 min with constant stirring. A complete phase transfer of the QDs from hexane (top) to methanol (bottom) occurred, indicating that ligand exchange had taken place. The organic solvents were removed using a pipet followed by evaporation under vacuum, and then a mixture of chloroform:methanol:hexane (1:1:10, vol:vol:vol) was added to the QD paste followed by centrifugation at 1900*g* for 5 min. The solvent containing TOP, TOPO, and other alkyl amine and alkyl carboxyl ligands were removed using a glass pipet. The QD paste was gently dried under vacuum and dispersed in DI water. Finally, three rounds of concentration/dilution using a centrifugal membrane filtration device (MW cutoff = 50 kDa) were applied to remove excess free hydrophilic and solubilized hydrophobic ligands. This protocol can also be applied to photoligate QDs with other sets of ligands, such as a mixture of LA-PEG_{750}-OCH_3 and LA-PEG_{1000}-N_3, a mixture of bis(LA)-PEG_{750}-OCH_3 and bis(LA)-PEG_{1000}-CHO, or a three-ligand mixture of LA-PEG_{750}-OCH_3, LA-PEG_{1000}-CHO, and LA-PEG_{1000}-N_3. This

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190−3201

protocol has yielded multifunctional QDs with controllable surface reactivity.

Hydrazone Ligation on Aldehyde-Modified QDs. First, aliquots of QDs photoligated with 5% LA-PEG-CHO (50 μL, 3.67 μM), 2-hydrozinopyridine (2-HP) solution in DMF (7 μL, 1 mg/mL), and 1443 μL of phosphate buffer (10 mM, pH 4.9) were mixed in a scintillation vial. The total volume of the reaction solution was maintained at 1500 μL. Combining the use of excess 2-HP and acidic condition allowed us to increase the reaction yield to ∼100%. The reaction mixture was first placed in a water bath at 37 °C with constant stirring for 2.5 h and then further stirred at room temperature overnight in the dark (by wrapping aluminum foil around the vial). Once the reaction was complete, excess 2-HP was removed by applying one round of centrifugal purification using a membrane filtration device (Amicon, cutoff MW = 50 kDa), and then the solution was concentrated to final volume around 200 μL. The same protocol was applied to attach 2-HP onto QDs photoligated with a higher mole fraction of LA-PEG-CHO, except that the amount of 2-hydrozinopyridine added was accordingly increased. This is done in order to account for the higher density of aldehyde groups per QD and to maintain a 2-HP-to-CHO molar ratio comparable to the one used above. Following the same protocol, different size QDs were photoligated with varying mole fractions of bis(LA)-PEG-CHO (using a mixture of bis(LA)-PEG-CHO and bis(LA)-PEG-OCH_3). Here too, the amount of precursors (e.g., namely 2-hydrozinopyridine) were adjusted to account for the higher fractions of CHO groups per nanocrystal, when larger size nanocrystals with higher surface areas were used.

Click Coupling on Azide-Modified QDs. To implement a strain-promoted metal-free cyclization reaction, 20% LA-PEG-N_3 functionalized QDs (60 μL, 4 μM) and dibenzocyclooctyne-PEG_{200} (DBCO-PEG_{200}-NH_2) stock solution in DMSO (31 μL, 1 mg/mL) were added to a scintillation vial equipped with a magnetic stirring bar. Then 155 μL of phosphate buffer (10 mM, pH 7) and 154 μL of DMSO were added to the vial, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h in the dark. Unreacted DBCO was removed using a PD-10 size exclusion column. The first fraction was collected and concentrated to a final volume of ∼150 μL using a centrifugal membrane filtration device (cutoff MW = 50 kDa). The purified sample was mixed with NHS-ester-activated Cy3 predissolved in DMSO (20 μL, 2.4 mM), and then 330 μL of phosphate buffer (10 mM, pH8.7) was added to maintain basic pH condition. The content was stirred at room temperature for 5 h, followed by purification of the final QD-DBCO-dye conjugates using a PD-10 size exclusion column.

Functionalization of QDs with a Mixture of 2-HP and DBCO Groups. A dispersion of QDs photoligated with a mixture of 5% LA-PEG-CHO, 8% LA-PEG-N_3, and 87% LA-PEG-OCH_3 was first prepared. The QDs presenting both azide and aldehyde groups on their surfaces were reacted stepwise with 2-HP and then with DBCO. An aliquot of the QD dispersion (60 μL, 6 μM) was first mixed with 2-HP dissolved in DMF (14 μL, 1 mg/mL), and then 1426 μL of pH4.9 phosphate buffer (10 mM) was added. The reaction was allowed to proceed at 37 °C (using a water bath) for 2.5 h, followed by stirring at room temperature overnight. Once the reaction was complete, excess 2-HP was removed by applying one round of purification using a membrane centrifugal filtration device (cutoff MW = 50 kDa). The purified hydrazinopyridine-modified QDs were reacted with DBCO (1 mg/mL in DMSO, 19 μL) at room temperature and then with NHS-Cy3 dye (1.5 mM in DMSO, 19 μL), following the steps used for the click coupling of azide-QDs described above. The QD-Cy3 conjugates were purified using a PD-10 column. The first fraction was collected and further concentrated using a membrane centrifugal filtration device for further use.

RESULTS AND DISCUSSION

Ligand Design and Phase Transfer. The overall aim of the present ligand design is to introduce aldehyde (CHO) or/and azide (N_3) functional groups on the QD surfaces, with a controllable density and then to use the resulting nanocrystals to implement new coupling chemistries that can selectively and specifically target biomolecules. Such coupling chemistries include hydrazone ligation applied to aldehyde-QDs and strain-promoted cycloaddition carried out using azide-modified QDs. These reactions are reported to be rapid and chemoselective and can proceed without the need for coupling reagents. This contrasts with more "traditional" methods, such as carbodiimide coupling between carboxylic acid and amine groups installed on the targeted molecules. Furthermore, we exploited the high efficiency of the hydrazone ligation and its ability to form a chromophore with a well-defined optical absorption feature, to extract an estimate for the number of LA-PEG and bis(LA)-PEG ligands attached onto a QD. The synthetic protocols of the ligands involve a few simple steps. The LA-PEG_{1000}-N_3 ligands used to prepare azide-functionalized QDs were synthesized following our previous protocols.[14,19,34] Similarly, synthesis of LA-PEG_{1000}-CHO was carried out starting with LA-PEG_{1000}-NH_2. Then, LA-PEG_{1000}-NH_2 was reacted with 4-FB preactivated with NHS (4-FB-NHS-ester), yielding LA-PEG_{1000}-CHO (Figure 1). A similar protocol was applied to prepare bis(LA)-PEG-CHO: bis(LA)-PEG_{1000}-NH_2, prepared using the protocol described in our recent study,[36] was reacted with 4-FB-NHS to provide aldehyde-appended bis(LA)-PEG_{1000} ligands. The use of a longer PEG chain improves the colloidal stability of nanoparticles presenting azide and benzaldehyde groups in aqueous solution;[34] benzaldehyde, in particular, has a limited solubility in water.

Photoligation of QDs with Aldehyde and Azide-Terminated Ligands. The phase transfer of hydrophobic TOP/TOPO-QDs to aqueous media, while preserving the integrity of the target-reactive groups (N_3 and CHO), was achieved using in situ photoligation under sodium borohydride-free conditions and starting with the oxidized form of the ligands. This phase transfer route relies on the photochemical transformation of the lipoic acid groups under UV irradiation at 350 nm. This approach is compatible with an array of LA-based ligands, including small molecules as well as polymer ligands.[19,45,46]

Characterization of the Azide- and Aldehyde-Functionalities on the QDs. We confirmed the intact functionality of the azide and aldehyde groups following photoligation on the QDs using two key analytical tests. (1) The integrity of N_3 groups was verified by comparing the FTIR spectra collected from QDs photoligated with a mixture of 20% LA-PEG-N_3 and 80% LA-PEG-OCH_3 and from pure LA-PEG-N_3 (control). The spectra show that the characteristic band around 2100 cm^{-1} ascribed to N_3 is present in the pure ligand and in the QD samples, indicating that the azide groups have been preserved during the photoligation and phase transfer step (see Supporting Information, Figure S2). The weak intensity of

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190−3201

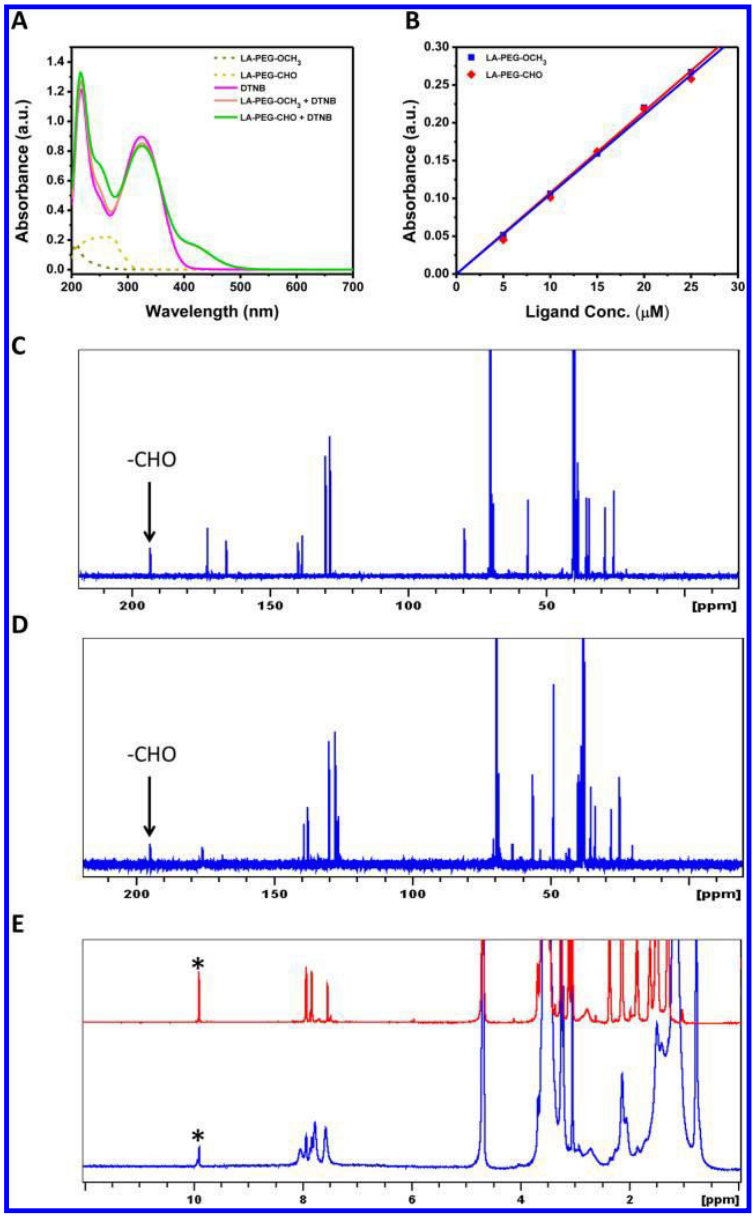


Figure 2. (A) Comparison of the UV–vis absorption spectra collected from solutions of photoirradiated LA-PEG-CHO and LA-PEG-OCH_3 ligands in the presence of 50 μM DTNB; the ligand concentration was 15 μM for both cases. The absorption spectra of DTNB and nonirradiated ligands are also provided. (B) Plot showing the linear correlation between the absorbance at 412 nm (associated with TNB^{2-} product) and the concentration of the photoirradiated ligands; the concentration of the LA-PEG ligands was varied from 5 μM to 25 μM. (C and D) ^{13}C NMR spectra of LA-PEG-CHO ligand in DMSO-d_6 and of photoirradiated LA-PEG-CHO in a deuterated solvent mixture of DMSO-d_6 and D_2O, respectively. (E) ^{1}H NMR spectra of LA-PEG-CHO ligand (red) and QDs photoligated with a mixture of 15% LA-PEG-CHO and 85% LA-PEG-OCH_3 (blue); all the spectra were collected from solutions in D_2O. An asterisk (*) designates the aldehyde feature around 10 ppm.

the N_3 band measured for the QD sample is due to the rather low concentration of QD materials used to collect the FTIR spectrum. (2) We verified the integrity of the aldehyde groups following photoligation on the QDs by checking: (i) the chemical stability of CHO group in the presence of thiol, and (ii) the potential reactivity of CHO with methanol. It is known that aldehyde and ketone can react with thiols to form hemithioacetal and dithioacetal, respectively, which changes the integrity of the carbonyl group. The photoirradiation of LA-based ligands during phase transfer produces abundant active thiol species (e.g., radical byproducts),[47,48] which may react with the aldehyde groups. In addition, methanol solvent (used during photoligation) could react with aldehyde to form hemiacetal or acetal under certain conditions (e.g., neutral conditions). We thus investigated the effect of thiols and methanol on the integrity of the aldehyde using our experimental conditions. The effects of thiol byproducts on the integrity of aldehyde were checked using the Ellman test.

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190–3201

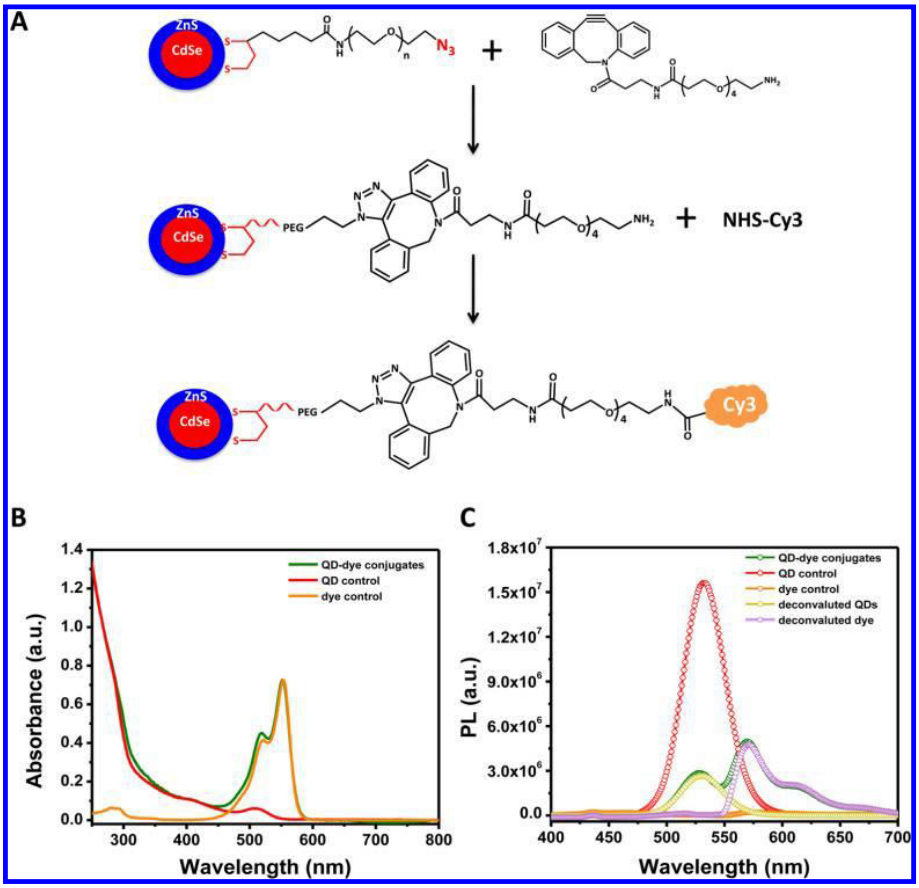


Figure 3. (A) Schematic representation of the QD-Cy3 conjugates assembly via click coupling chemistry. A mixture of LA-PEG-N_3 (20%) and LA-PEG-OCH_3 (80%) was photoligated onto TOP/TOPO-QDs (λ_{em} = 530 nm). The N_3 groups on the QD surfaces were subsequently reacted with DBCO through strain-promoted cycloaddition and then with NHS-Cy3. (B and C) UV−vis absorption and PL spectra of QDs self-assembled with NHS-Cy3. The control samples of QDs and NHS-Cy3 along with the deconvoluted contribution of QDs and NHS-Cy3 are also provided (excitation wavelength = 400 nm).

This test/assay is a reliable route to quantify the concentration of thiol groups in a medium by reacting the thiolated compounds with DTNB (5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)). This reaction yields 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB^{2-}), a colored product that has a distinct absorption feature at 412 nm (with ε = 14 150 M^{-1} cm^{-1}).[49] Here, the Ellman assay was performed using two sets of ligands: (i) LA-PEG-CHO that was photoirradiated in a MeOH solution purged with argon, and (ii) LA-PEG-OCH_3 irradiated under the same conditions (used as control). We expect that the concentration of free thiols, produced in the irradiated LA-PEG-CHO solution, to be essentially the same as that of LA-PEG-OCH_3 if the generated thiols do not interact with the aldehydes. For this test, a series of solutions with different molar concentrations of LA-PEG-CHO and LA-PEG-OCH_3 (5 μM, 10 μM, 15 μM, 20 μM, 25 μM) in MeOH were prepared and irradiated (at 350 nm using a UV reactor) for 30 min. The samples were then incubated with DTNB (50 μM) for 25 min at room temperature, followed by collection of the absorption spectra. Figure 2A shows one representative example of two different ligand solutions (LA-PEG-CHO and LA-PEG-OCH_3) with the same concentration (15 μM). In both cases, mixing with DTNB produced a new absorbance feature at 412 nm attributed to the product formation, and the absorbance values of the two samples at this wavelength are essentially the same, indicating that photoligation produced the same amount of thiols in the solutions. Moreover, the contribution at 412 nm was found to increase linearly with the ligand concentration. Using this linear correlation between the absorbance at 412 nm and the ligand concentration, we found that the slopes extracted for the two set of ligands are similar, further confirming that the thiols in the medium produced during the photoligation did not interfere with the aldehyde groups (Figure 2B). We should note that the concentration of thiols, determined from the Ellman test data (using Beer's law) for such photochemically transformed ligands, is smaller than the one extracted from chemically reduced DHLA-ligands using sodium borohydride, e.g., the overall concentration of thiol groups produced via photoirradiation of a solution of LA-PEG ligands in methanol is ∼60% of that generated following borohydride-reduction of lipoic acid.[49] Chemical reduction using sodium borohydride has been shown to yield nearly 100% reduction of the dithiolane rings in the sample.[49] In addition, we measured the ^{13}C NMR spectrum of LA-PEG-CHO UV-irradiated in methanol to probe solvent effects; acetal and hemiacetal carbons have clear and distinct signatures in ^{13}C NMR at ∼100 ppm. During the experiment, the LA-PEG-CHO solution in methanol was irradiated for 30 min, and then the methanol was completely

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190−3201

removed under vacuum (by drying for 3 h). The dried sample was then dissolved in DMSO-d_6 along with a small amount of D_2O; the latter was added to match the aqueous conditions used for reacting the photoligated QDs with 4-FB. The ^{13}C NMR spectra shown in Figure 2C and 2D for nonirradiated and UV-irradiated ligands do not show a signature around 100 ppm (where the expected acetal signature is) but a clearly defined peak at ~195 ppm, indicating the absence of hemiacetal or acetal from the sample and the presence of the aldehyde. Additionally, the integrity of the aldehyde groups after ligand exchange was characterized by ^1H NMR spectroscopy of CHO-QD dispersion, which shows an aldehyde feature at chemical shift δ = 10.0 ppm (Figure 2E). This is a strong evidence that the integrity of the aldehyde groups on the surface of QDs after photoligation has been preserved, thus paving the way for further coupling with 2-HP.

Strain-Promoted Click Coupling of QDs with DBCO. Conjugation of QDs with biomolecules such as antibodies, enzymes, proteins typically relies on carbodiimide activation chemistry using amine and carboxyl functional groups on the target molecules. One of the disadvantages of this route is that the presence of both amine and carboxyl groups in proteins and antibodies may create undesired cross-linking between the biomolecules, causing aggregation of the desired products (here nanoparticle-conjugates). The recent developments in the use of cycloaddition reaction between azide and alkyne have opened up new opportunities in the modification of nanoparticles for site-specific targeting.[50,51] This reaction meets the criteria of bio-orthogonal chemistry, namely high efficiency and chemoselectivity. Thus far, such conjugation strategy relying on the Cu(I)-catalyzed cycloaddition has been extensively used for the functionalization of Au, silica, and iron oxide nanoparticles.[52−54] When this reaction is applied to QDs, quenching of the emission brought by the copper catalyst (Cu(I)) takes place, rendering its use ineffective, though such quenching can be reduced using a rather thick polymer coating as has been shown recently by Weller and co-workers.[55] The emergence of strain-promoted azide−alkyne cycloaddition (SPAAC) has provided an alternative strategy which relies on the use of highly strained alkynes instead, allowing the reaction to proceed without the need of a copper catalyst. This alternative route has been used to conjugate QDs to target molecules, as described in a few recent reports.[28,56]

In our study, the QDs photoligated with LA-PEG-N_3 were reacted with DBCO-PEG_{200}-NH_2 under mild conditions promoted by SPAAC reaction. To confirm that the reaction between the azide-QDs and alkyne bond in DBCO has taken place, the resulting QD-DBCO conjugates were further coupled to sulfo-Cy3 NHS ester via the reactive amine on the DBCO molecule (see Figure 3A). Figure 3B shows that the absorption spectra of the final conjugates (after purification) display the composite features of both QDs and dye. Additionally, the emission spectra of the conjugates and control samples were measured using 400 nm excitation, which coincides with the absorption valley of Cy3 to minimize direct excitation of acceptor dye. Figure 3C shows that deconvolution of the composite spectrum yields two distinct contributions from the QDs and the dye. Furthermore, the deconvoluted spectra show that the QD contribution has decreased (compared to pure QD dispersion) combined with enhancement in the emission of Cy3; these changes are attributed to efficient FRET interactions. In comparison, the emission signal collected from the Cy3 dye-control was negligible. The combined absorption and emission data provide clear evidence that the QDs and Cy3 were brought in close proximity promoted by covalent coupling, resulting in strong FRET interactions.

We used the above spectroscopic data to extract separate estimates for the number of Cy3 per QD conjugate. First we used the absorption data to estimate the average number of dye (n) attached to a nanocrystal, by comparing the extinction coefficients of the green QDs (3.348×10^5 M^{-1} cm^{-1} at 350 nm) and Cy3 dye (1.5×10^5 M^{-1} cm^{-1} at 552 nm); we extracted a value of $n \sim 9$. We should, however, note that the absorption data alone do not unequivocally prove that conjugation has taken place. FRET measurements, in contrast, are more reliable, because the process requires close proximity interactions.[57] We first extracted the experimental QD-PL quenching efficiency from the emission spectra using the relation:

$$E_n = \frac{F_D - F_{DA}}{F_D} \quad (1)$$

where F_D and F_{DA} represent the emission intensity of the QD-donor alone and QD in the presence of Cy3, respectively. Using a quantum yield (Q_D) value of 0.18, a center-to-center separation distance (r) between QD surface and dye of 60 Å, and a fit to the quenching data assuming a centrosymmetric conjugate configuration, we calculate a valence n of ~8.[58] This value is in good agreement with the number estimated from the absorption data above. Additional details of the FRET analysis are provided in the Supporting Information.

Hydrazone Ligation and Quantification of the Ligand Density per QD. Exploiting the great potentials offered by inorganic nanoparticles in biology undoubtedly hinges on our ability to understand and control their interactions with biological systems. Such control requires a thorough characterization of the surface properties of such materials, including ligand arrangements, ligand density, and conjugation to target biomolecules.

In an earlier report, we designed maleimide-functionalized AuNPs (by ligand exchanging citrate-nanoparticles with LA-PEG-maleimide ligands).[23] The NPs were reacted with Cy5 dye through a cysteine−peptide bridge and then combined with optical absorption measurements to extract an estimate for the ligand density on two different size AuNPs.[23] One limiting factor of that approach was the difficulty to reduce issues of nonspecific adsorption (i.e., stickiness) of the dye onto the AuNP surfaces. Here, we wanted to exploit the fact that hydrazone ligation between aldehyde groups and hydrazinopyridine can produce a specific chromophore with a well-defined optical signature and use it to extract a measure of the LA-PEG density on luminescent QDs. This strategy can reduce issues of nonspecific adsorption, because the hydrazone chromophores are formed only as a result of a successful ligation reaction. Overall use of this ligand counting strategy benefits from three features: (1) the hydrazone chromophores formed after ligation have a distinct absorption feature at 350 nm, implying that the reaction progress can be monitored optically, (2) the reaction is highly efficient and chemoselective under acidic conditions and without the need for a catalyst,[29,59−61] and (3) the use of hydrazinopyridine derivative to develop new bioconjugation strategies has steadily increased.[62−64] The ligation reaction is carried out in phosphate buffer (pH 4.9). We should stress that use of acidic conditions is crucial for accelerating the ligation reaction, as this pH is reported to enhance the reaction yield

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190−3201

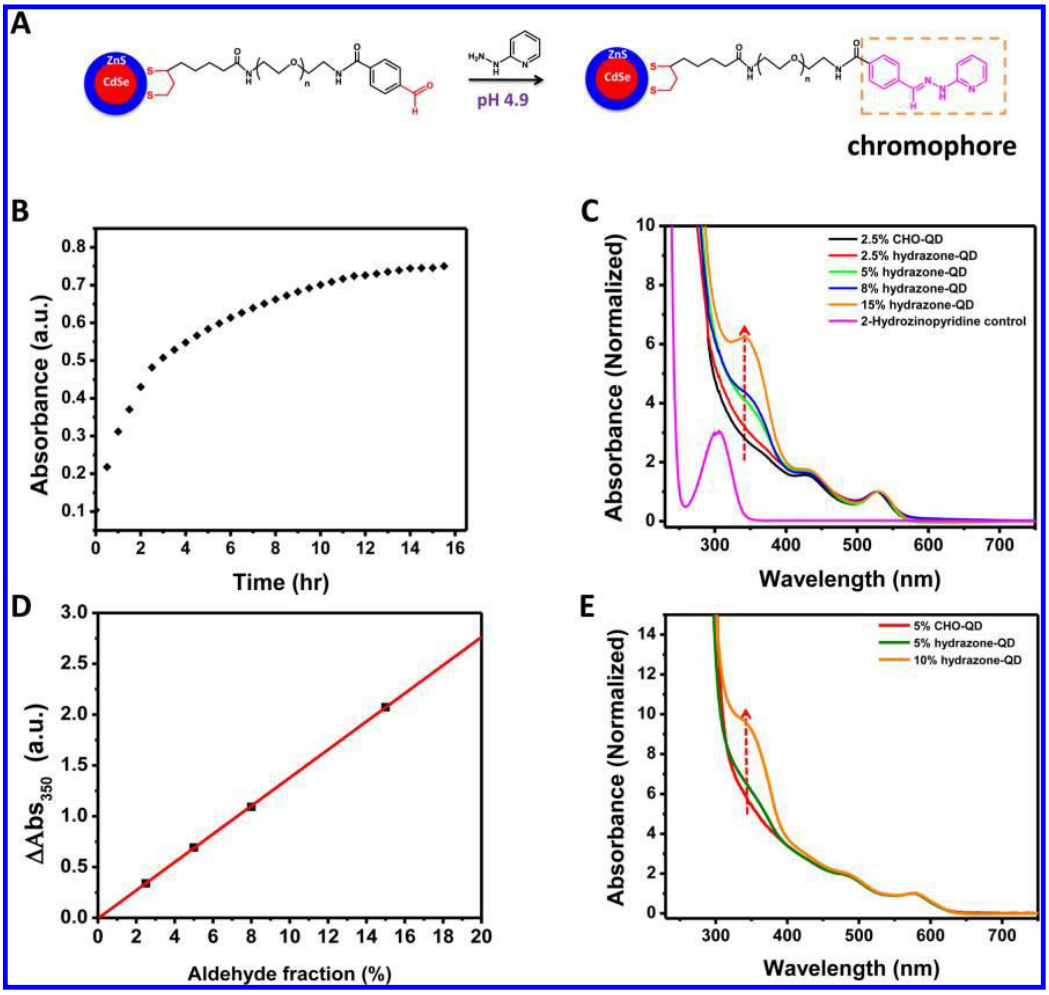


Figure 4. (A) Schematic illustration of the hydrazone ligation applied to prepare QD-hydrazone conjugates. QDs were photoligated with a mixture of LA-PEG-CHO and LA-PEG-OCH_3; the molar fraction of CHO was varied between 2.5 and 15%. The CHO groups on the QD surfaces were covalently ligated with 2-HP, providing hydrazone chromophores with a well-defined feature at 350 nm. (B) Monitoring of the reaction progress with time by tracking the progression of the absorbance at 350 nm: 5% CHO-QDs mixed with 50 times molar excess 2-HP with respect to CHO were used. (C) UV–vis absorption spectra collected from green-emitting (λ_{em} = 540 nm) QD-hydrazone conjugates prepared using CHO-QDs (2.5–15%) reacted with 2-HP; the spectra were collected after removing excess free 2-HP using a membrane filtration device. The absorption spectra of 2-HP alone and 2.5% CHO-QDs were also provided. The absorption spectrum from unreacted CHO-QDs at the corresponding molar fraction is subtracted from every composite spectrum (i.e., of QD-hydazone conjugates) before analysis. (D) Plot of ΔAbs_{350} versus aldehyde molar fraction collected from green-emitting QDs (λ_{em} = 540 nm). (E) UV–vis absorption spectra collected from 5% and 10% bis(LA)-PEG-CHO-QDs ligated with 2-HP, orange-emitting QDs were used (λ_{em} = 590 nm). The absorption spectrum of 5% bis(LA)-PEG-CHO-QDs before ligation is also shown. Absorbance data were collected at room temperature.

over 90% at low reagent concentrations, while eliminating the need for aniline catalyst; the latter quenches the photoluminescence of QDs (see protocol at https://www.hitpages.com/doc/6410955713937408/1/).

To follow the reaction progress, we first investigated its kinetics by tracking changes in the measured absorbance at 350 nm, as coupling between CHO-QDs and 2-HP progressed. Figure 4B shows that the reaction proceeded rapidly during the first 3 h and then gradually slowed down until completion after ~15 h. As a control, we mixed 100% OCH_3-QDs with 2-HP and monitored the absorption at 350 nm under the same reaction conditions. No change in the absorbance at 350 nm was measured regardless of the incubation time, indicating that no hydrazone formation had taken place (see Supporting Information, Figure S3). This can be attributed to the inert nature of the methoxy groups on the QDs. These results prove that hydrazone ligation on the nanocrystal surfaces has taken place only when CHO-QDs were mixed with 2-HP.

We then applied this reaction to two different sets of QDs (with λ_{em} at 540 and 563 nm) photoligated with varying fractions of LA-PEG-CHO. As above, the QD dispersions were reacted with excess amounts of 2-HP to ensure maximal reaction conversion. The reaction mixtures were allowed to proceed for 15 h, and once the reaction was complete, excess 2-HP was removed by applying one round of centrifugal filtration (see Experimental Section). Figure 4C shows that the absorbance at 350 nm increases with increasing fraction of CHO per QD used, due to the formation of hydrazone

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190–3201

Table 1. Quantification of the Ligand Coverage for Two Different Size QDs Ligated with Mono-LA-PEG[a]

Radius (nm)	λ_{em} (nm)	% aldehyde	# of hydrazone	# of ligands per QD	FPA (nm^2)
3.1	540	2.5	5 ± 2	200 ± 12	~0.60
		5	10 ± 1		
		8	16 ± 1		
		15	30 ± 1		
3.4	563	2.5	7 ± 2	289 ± 38	~0.5
		5	15 ± 1		
		7	20 ± 1		

[a]Shown are the numbers of hydrazone chromophores per QD for each % CHO used, along with the total number of ligands per nanocrystal extracted from fits to the differential absorption data, as detailed in the text. The corresponding FPA values are also shown.

Table 2. Quantification of the Ligand Coverage for a Few Different Size QDs Using Bis(LA)-PEG[a]

radius (nm)	λ_{em} (nm)	% aldehyde	# of hydrazone	# of ligands per QD	FPA (nm^2)
3.1	540	5	6 ± 1	115 ± 16	~1.05
		10	11 ± 1		
3.4	563	5	8 ± 1	155 ± 15	~0.94
		10	15 ± 1		
3.6	590	5	10 ± 1	205 ± 15	~0.79
		10	21 ± 1		
4	630	5	11 ± 1	225 ± 15	~0.89
		10	23 ± 1		

[a]Shown are the numbers of hydrazone chromophores per QD extracted for each CHO fraction used, along with the total number of ligands extracted from the absorption data. The corresponding FPA values are also provided.

chromophores. This contribution is distinct from that of the 2-HP reactant; the latter has a signature at 300 nm (see Figure 4C). Deconvolution of the absorption spectra allowed us to isolate the contribution of the hydrazone chromophores from that of the QDs. The spectrum from a control CHO-QD dispersion prepared with the same molar concentration of QDs (no 2-HP) was subtracted from the composite spectra prior to deconvolution. A plot of the differential absorption at 350 nm (ΔAbs_{350}) vs % CHO used is shown in Figure 4D. The plot shows two important properties of the hydrazone reaction applied to our CHO-functionalized QDs. (1) ΔAbs_{350} exhibits a linear dependence on the %-CHO used, and (2) the linear fit yields a zero intercept at the origin: $\Delta Abs_{350} = \alpha \times (\%\ CHO)$, where α is an experimental constant. The zero intercept is an important feature, as it reflects the high efficiency and specificity of the reaction, combined with the absence of nonspecific binding of the 2-HP groups on the QD surfaces. By comparing the absorbance and the extinction coefficient at 350 nm for the QDs (7.85×10^5 M^{-1} cm^{-1} for 540 nm-emitting QDs and 8.34×10^5 M^{-1} cm^{-1} for 563 nm-emitting QDs) and for the hydrazone chromophore (24 500 M^{-1} cm^{-1}), we extracted an estimate for the number of chromophores formed per QD at each CHO fraction used (see protocol at http://www.solulink.com/products/protocols/4FBColorimetricMSRAssayProteinNanodropMethodProtocol.pdf). In Table 1 we list the number of hydrazone chromophores obtained for different fractions of CHO groups per QD used for green- and yellow-emitting nanocrystals. By extrapolating the linear fit to 100% CHO (corresponding to QDs photoligated with pure LA-PEG-CHO), we extract a measure for the number of ligands per nanocrystal for each size used (see Table 1). Clearly, a larger number of ligands per nanocrystal is measured for the QDs with a larger average surface area: ~200 and 289 ligands per nanocrystal are measured for 540 nm- and 563 nm-emitting QDs, respectively. Additionally, the data show that the footprint area (FPA) per ligand measured for the present QD-ligand pair is ~0.60–0.5 nm^2.

We also applied this ligand counting strategy to QDs capped with bis(LA)-PEG, which has allowed us to investigate the effects of ligand architecture on the capping density. Four different sets of nanocrystals with emission ranging from green to red were photoligated using a mixture of bis(LA)-PEG-OCH_3 (inert) and bis(LA)-PEG-CHO. Following reaction with 2-HP, we extracted values for ΔAbs_{350} vs % CHO per nanocrystal for every set of QDs used. We only used two factions: 5% and 10% CHO-terminated ligands (Figure 4E). Table 2 summarizes the number of hydrazone chromophores measured for each set of QDs as a function of the % CHO used, along with estimates for the total number of bis(LA)-PEG ligands per nanocrystal. The number of ligands per nanocrystal is found to vary with the size for all sets of QDs used. In addition, lower ligand density is measured for bis(LA)-PEG ligands compared with LA-PEG, i.e., the FPA of LA-PEG is ~2 times smaller than that of bis(LA)-PEG. We attribute this difference to the fact that the anchoring motif of the bis(LA)-PEG (with two LA groups) is larger, yielding a lower density coverage compared to mono-LA-PEG.

We should note that introduction of the CHO-appended ligands onto the QD tends to reduce the solubility in buffer media. Indeed, the range of molar fraction of PEG_{1000}-CHO per QD is limited to values smaller than 20%, though such values can vary from one set of QDs to another and from mono-LA-PEG to bis(LA)-PEG ligands. We would also like to note that the major source of errors in estimating the ligand density (and FPA values) result from uncertainty in the measured absorbance values and QD sizes. Uncertainty associated with size estimate may be pronounced for smaller size core–shell nanocrystals. This may affect the FPA values for the green-emitting QDs. The potential effects of crystallinity of the ZnS-

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190–3201

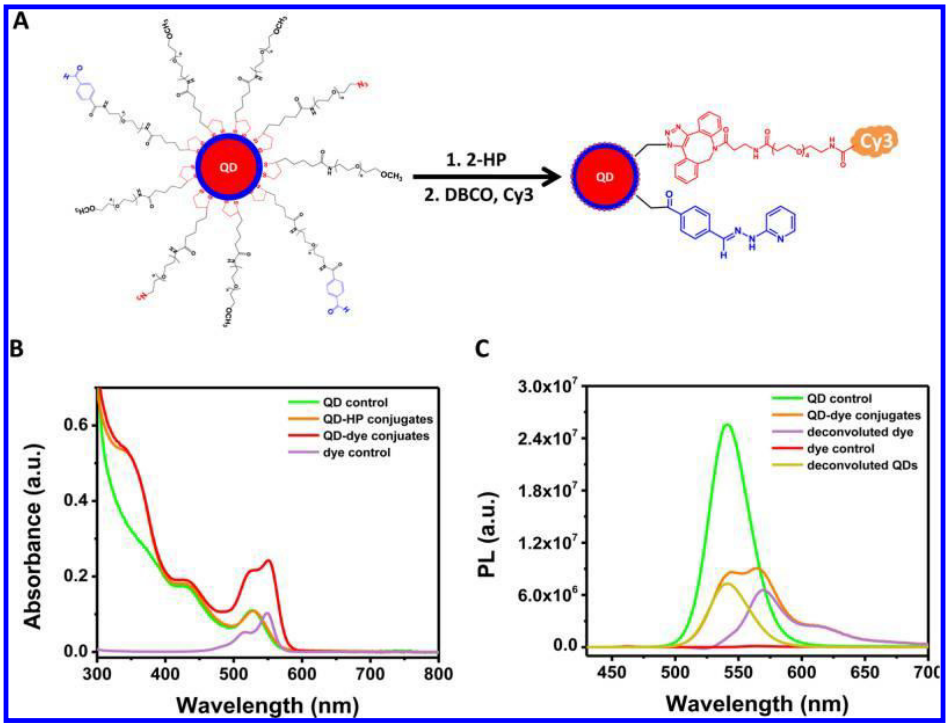


Figure 5. (A) Schematic representation of the stepwise coupling of a QD to 2-HP and DBCO-dye; the starting QD was photoligated with three terminally modified ligands: inert, OCH_3; bio-orthogonal, N_3; CHO. (B) UV−vis absorption spectra of QDs photoligated with 5% LA-PEG-CHO and 8% LA-PEG-N_3, after conjugation with 2-HP and then with NHS-Cy3 dye using DBCO as a bridge; the spectra were collected after purification. (C) PL spectra of QD-Cy3 conjugates, QDs alone, and dye alone, along with the deconvoluted contributions of the QDs and dye (excitation wavelength = 400 nm). Absorbance and fluorescence data were collected at room temperature.

shell, where facets and edges may create somewhat inhomogeneous density of ions at the crystal edge are averaged out. The size difference between the nanocrystals probed is rather small. Finally, we would also like to compare the ligand density measurement using hydrazone ligation to those previously reported by our group using AuNPs, where a dye was conjugated onto a terminal maleimide (on LA-PEG-AuNP) through a peptide bridge. In that study we used the dye absorption to extract an estimate for the FPA value on citrate-AuNPs cap exchanged with LA-PEG ligands. The multistep coupling combined with a rather high degree of nonspecific adsorption had complicated the data analysis, likely yielding lower estimate for the density of LA-PEG ligands on the AuNPs tested.[23]

These findings indicate that combining the use of LA-PEG-aldehyde or bis(LA)-PEG-aldehyde ligands, photoligation strategy, and the hydrazone coupling reaction directly onto the QD surface provides a simple and effective approach to estimate the density of ligands on a nanocrystal. They also indicate that hydrazone ligation is a promising coupling strategy for use in nanoparticle conjugation to various molecules, provided that they are modified with 2-HP derivatives.

Bio-orthogonal Coupling of QDs Modified with Azide and Aldehyde Groups. We started with QDs (λ_{em} = 540 nm) that were photoligated using a mixture of three ligands: 87% LA-PEG-OCH_3, 8% LA-PEG-N_3, and 5% LA-PEG-CHO; this is expected to yield nanocrystals presenting two bio-orthogonal functional/reactive groups (N_3 and CHO). To confirm the presence of the two reactive groups on the QD, the nanocrystals were first reacted with 2-hydrazinopyridine under the reaction conditions mentioned above, purified and the absorption spectrum was collected. Figure 5B shows that there is clear enhancement in the absorbance at 350 nm compared to the QD control, confirming that hydrazone chromophores have been formed. This provides strong evidence that the aldehyde groups were present on the QD surfaces and were readily accessible for reaction with the hydrazine derivative. The resulting QD-2-hydrazinopyridine conjugates were then reacted with DBCO-PEG_{200}-NH_2 followed by reaction with NHS-Cy3 dye. The absorption spectrum collected from the final dispersion (after purification using a PD-10 column) shows a clear contribution from both QDs and Cy3 dye (Figure 5B). Similarly, the composite emission spectrum also shows contributions from the QDs at 540 nm and Cy3 at 570 nm (see Figure 5C). Furthermore, there is substantial reduction of the QD signal compared to that measured for the QDs-only sample. A control experiment of Cy3 alone with the same concentration provides a negligible PL signal compared to the contribution measured for the conjugates. These features indicate that resonance energy transfer has taken place as a result of covalent binding between the QD-azide-DBCO and NHS-Cy3.

These above results indicate that our ligand design combined with the photoligation and mixed surface coating strategy have the potential for developing multifunctional nanoparticles that combine multiple bio-orthogonal functionalities on a single nanoscale platform. The process is simple to implement, and the introduction of the two reactive groups onto the QD surfaces can be achieved during ligand exchange and without the need for post phase transfer modification. The resulting

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190−3201

bio-orthogonal platforms constitute an improvement over monofunctional nanoparticles and can be applied to target two different biomolecules with the desired functions via highly efficient coupling chemistries.

CONCLUSION

We have designed and synthesized modular multidentate ligands with terminal azide or aldehyde reactivity. The ligand design uses lipoic acid as anchors and was combined with a mild photoligation strategy to prepare azide- and aldehyde-functionalized QDs with controllable reactivity. The azide-modified QDs were reacted with dibenzocyclooctyne via click reaction under Cu(I)-free conditions, eliminating issues of QD PL losses encountered when the coupling requires the use of copper catalyst. We also covalently coupled aldehyde-functionalized QDs with 2-hydrozinopyridine, leading to the formation of hydrazone chromophores, with a well-defined optical signature, on the QD surface. This route has eliminated problems associated with nonspecific stickiness routinely encountered when attaching dyes or other analytical labels via conventional coupling chemistries.

We exploited the specific optical feature of the hydrazone chromophore at 350 nm to estimate the number of chromophores formed on a QD when the mole fraction of aldehydes was changed. We found that the number of chromophores per QD linearly tracked the % CHO introduced on the nanocrystal. This allowed us to extract a measure for the number of ligands per QD for a few sets of nanocrystals emitting at distinct regions of the optical spectrum. We further used this strategy to explore the effects of ligand architecture on the density of surface coverage by comparing mono-LA-appended vs bis(LA)-appended PEG ligands and found that the ligand density coverage was indeed strongly dependent on the ligand architecture but not on the nanocrystal size. Using mixed ligation, we prepared multifunctional QDs that combine azide and aldehyde functionalities on the same nanocrystal and showed that the resulting nanocrystals can be easily reacted with two specific target molecules with no cross-reactivity. This strategy can be easily applied to other nanoparticles. The ability to provide nanoparticles presenting aldehyde and azide groups on the same platforms is greatly promising for a variety of applications in biology. They provide multifunctional platforms which can be used as probes and/or carriers in applications such as imaging, diagnostics, sensing, and delivery.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/jacs.5b13574.

Additional details on the Förster dipole−dipole analysis applied to the energy transfer data, NMR and FT-IR spectra of aldehyde- and azide-modified ligands and QDs, and tracking of the reaction progression with time (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*mattoussi@chem.fsu.edu

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Science Foundation for financial support (NSF-CHE no. 1508501 and no. 1058957). We also thank Professor Philip E. Dawson and Dr. Valle Palomo (at the Scripps Research Institute) for fruitful discussions.

REFERENCES

(1) Larson, D. R.; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Clark, S. W.; Bruchez, M. P.; Wise, F. W.; Webb, W. W. *Science* **2003**, *300*, 1434.
(2) Medintz, I.; Uyeda, H.; Goldman, E.; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435.
(3) Michalet, X.; Pinaud, F.; Bentolila, L.; Tsay, J.; Doose, S.; Li, J.; Sundaresan, G.; Wu, A.; Gambhir, S.; Weiss, S. *Science* **2005**, *307*, 538.
(4) Zrazhevskiy, P.; Sena, M.; Gao, X. H. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4326.
(5) Nam, J.; Won, N.; Bang, J.; Jin, H.; Park, J.; Jung, S.; Jung, S.; Park, Y.; Kim, S. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 622.
(6) Cassette, E.; Helle, M.; Bezdetnaya, L.; Marchal, F.; Dubertret, B.; Pons, T. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 719.
(7) Mattoussi, H.; Palui, G.; Na, H. B. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 138.
(8) Wu, X. Y.; Liu, H. J.; Liu, J. Q.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N. F.; Peale, F.; Bruchez, M. P. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 41.
(9) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Radler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703.
(10) Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. M.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3870.
(11) Lees, E. E.; Nguyen, T. L.; Clayton, A. H. A.; Mulvaney, P.; Muir, B. W. *ACS Nano* **2009**, *3*, 1121.
(12) Liu, W. H.; Greytak, A. B.; Lee, J.; Wong, C. R.; Park, J.; Marshall, L. F.; Jiang, W.; Curtin, P. N.; Ting, A. Y.; Nocera, D. G.; Fukumura, D.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 472.
(13) Mattoussi, H.; Mauro, J. M.; Goldman, E. R.; Anderson, G. P.; Sundar, V. C.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142.
(14) Susumu, K.; Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Pons, T.; Delehanty, J. B.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13987.
(15) Liu, W.; Howarth, M.; Greytak, A. B.; Zheng, Y.; Nocera, D. G.; Ting, A. Y.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1274.
(16) Liu, W. H.; Choi, H. S.; Zimmer, J. P.; Tanaka, E.; Frangioni, J. V.; Bawendi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14530.
(17) Muro, E.; Pons, T.; Lequeux, N.; Fragola, A.; Sanson, N.; Lenkei, Z.; Dubertret, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4556.
(18) Stewart, M. H.; Susumu, K.; Mei, B. C.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9804.
(19) Zhan, N.; Palui, G.; Mattoussi, H. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 859.
(20) Delgado, C.; Francis, G. E.; Fisher, D. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1992**, *9*, 249.
(21) Palui, G.; Na, H. B.; Mattoussi, H. *Langmuir* **2012**, *28*, 2761.
(22) Dixit, V.; Van den Bossche, J.; Sherman, D. M.; Thompson, D. H.; Andres, R. P. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 603.
(23) Oh, E.; Susumu, K.; Blanco-Canosa, J. B.; Medintz, I. L.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. *Small* **2010**, *6*, 1273.
(24) Zhang, C. Y.; Yeh, H. C.; Kuroki, M. T.; Wang, T. H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 826.
(25) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed.; Academic Press: New York, 2013, 1.
(26) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13.
(27) Bernardin, A.; Cazet, A.; Guyon, L.; Delannoy, P.; Vinet, F.; Bonnaffe, D.; Texier, I. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 583.
(28) Zhang, P.; Liu, S.; Gao, D.; Hu, D.; Gong, P.; Sheng, Z.; Deng, J.; Ma, Y.; Cai, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8388.
(29) Blanco-Canosa, J. B.; Medintz, I. L.; Farrell, D.; Mattoussi, H.; Dawson, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10027.

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190−3201

(30) Han, H. S.; Devaraj, N. K.; Lee, J.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7838.
(31) Liu, X.; Yu, M.; Kim, H.; Mameli, M.; Stellacci, F. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, article number 1182.
(32) Mullen, D. G.; Fang, M.; Desai, A.; Baker, J. R.; Orr, B. G.; Holl, M. M. B. *ACS Nano* **2010**, *4*, 657.
(33) Hinterwirth, H.; Kappel, S.; Waitz, T.; Prohaska, T.; Lindner, W.; Lammerhofer, M. *ACS Nano* **2013**, *7*, 1129.
(34) Susumu, K.; Mei, B. C.; Mattoussi, H. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 424.
(35) Mei, B. C.; Susumu, K.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 412.
(36) Zhan, N.; Palui, G.; Kapur, A.; Palomo, V.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 16084.
(37) Zhan, N. Q.; Palui, G.; Safi, M.; Ji, X.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13786.
(38) Dabbousi, B. O.; RodriguezViejo, J.; Mikulec, F. V.; Heine, J. R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, K. F.; Bawendi, M. G. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463.
(39) Peng, Z. A.; Peng, X. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 183.
(40) Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706.
(41) Murray, C. B.; Kagan, C. R.; Bawendi, M. G. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 545.
(42) Hines, M. A.; Guyot-Sionnest, P. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468.
(43) Qu, L. H.; Peng, Z. A.; Peng, X. G. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 333.
(44) Clapp, A. R.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1258.
(45) Wang, W.; Kapur, A.; Ji, X.; Safi, M.; Palui, G.; Palomo, V.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5438.
(46) Palui, G.; Avellini, T.; Zhan, N.; Pan, F.; Gray, D.; Alabugin, I.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16370.
(47) Bucher, G.; Lu, C. Y.; Sander, W. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 2607.
(48) Brown, P. R.; Edwards, J. O. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3131.
(49) Aldeek, F.; Hawkins, D.; Palomo, V.; Safi, M.; Palui, G.; Dawson, P. E.; Alabugin, I.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2704.
(50) Lutz, J.-F.; Zarafshani, Z. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 958.
(51) Lim, R. K. V.; Lin, Q. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589.
(52) Nebhani, L.; Barner-Kowollik, C. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3442.
(53) Na, H. B; Palui, G.; Rosenberg, J. T.; Ji, X.; Grant, S. C.; Mattoussi, H. *ACS Nano* **2012**, *6*, 389.
(54) Brennan, J. L.; Hatzakis, N. S.; Tshikhudo, T. R.; Dirvianskyte, N.; Razumas, V.; Patkar, S.; Vind, J.; Svendsen, A.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; Brust, M. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1373.
(55) Ostermann, J.; Merkl, J. P.; Flessau, S.; Wolter, C.; Kornowksi, A.; Schmidtke, C.; Pietsch, A.; Kloust, H.; Feld, A.; Weller, H. *ACS Nano* **2013**, *7*, 9156.
(56) Schieber, C.; Bestetti, A.; Lim, J. P.; Ryan, A. D.; Nguyen, T.-L.; Eldridge, R.; White, A. R.; Gleeson, P. A.; Donnelly, P. S.; Williams, S. J.; Mulvaney, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10523.
(57) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006.
(58) Ji, X.; Wang, W.; Mattoussi, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 10108.
(59) Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475.
(60) Nilsson, B. L.; Hondal, R. J.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268.
(61) Dirksen, A.; Dirksen, S.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602.
(62) Aryal, S.; Grailer, J. J.; Pilla, S.; Steeber, D. A.; Gong, S. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 7879.
(63) Iyer, G.; Pinaud, F.; Xu, J.; Ebenstein, Y.; Li, J.; Chang, J.; Dahan, M.; Weiss, S. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1006.
(64) Hong, Z.-Y.; Lv, C.; Liu, A.-A.; Liu, S.-L.; Sun, E.-Z.; Zhang, Z.-L.; Lei, A.-W.; Pang, D.-W. *ACS Nano* **2015**, *9*, 11750.

DOI: 10.1021/jacs.5b13574
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3190−3201

6.6.2 Investigations of Ion Transport through Nanoscale Polymer Membranes by Fluorescence Quenching of CdSe/CdS Quantum Dot/Quantum Rods

Bei diesem Paper wird der Phasentransfer von QDQRs mittels PI-*b*-PEO verschiedener Größen diskutiert und mithilfe des von mir entwickelten Fluoreszenzlösch-Assays die Membran im Ensemble und auf Einzelteilchenebene untersucht. Meine Anteil hieran war sowohl, gemeinsam mit Dr. Christian Schmidtke, der Phasentransfer als auch die Durchführung des Fluoreszenzlöschassays. Die Langzeitstabilitätstests und der Phasentransfer der dafür verwendeten Konstrukte wurde von Dr. Christopher Wolter durchgeführt und in seiner Dissertationsschrift[515] ausführlich diskutiert. Reprinted with permission.[2] Copyright ©2016 published by The Royal Society of Chemistry.

Published on 11 March 2016. Downloaded by Bibliotheekssystem Universitaet Hamburg on 24/03/2016 09:00:21.

Nanoscale

COMMUNICATION

View Article Online
View Journal



Cite this: DOI: 10.1039/c5nr08318d

Received 24th November 2015,
Accepted 10th March 2016

DOI: 10.1039/c5nr08318d

www.rsc.org/nanoscale

Investigations of ion transport through nanoscale polymer membranes by fluorescence quenching of CdSe/CdS quantum dot/quantum rods†

Jan-Philip Merkl,*[a] Christopher Wolter,[a] Sandra Flessau,[a] Christian Schmidtke,[a] Johannes Ostermann,[a,b] Artur Feld,[a] Alf Mews[a] and Horst Weller*[a,b,c]

Detailed steady-state and time-resolved fluorescence quenching measurements give deep insight into ion transport through nanometer thick diblock copolymer membranes, which were assembled as biocompatible shell material around CdSe/CdS quantum dot in quantum rods. We discuss the role of polymer chain length, intermolecular cross-linking and nanopore formation by analysing electron transfer processes from the photoexcited QDQRs to Cu(II) ions, which accumulate in the polymer membrane. Fluorescence investigations on single particle level additionally allow identifying ensemble inhomogeneities.

Diffusion of molecules and ions within polymer membranes is an emerging field for future products, such as organic solar cells, polymeric batteries, fuel cells as well as encapsulated nanomaterials.[1,2] Due to progressive miniaturization in all technical fields, the synthesis of nanoscale membranes and the study of diffusion within these membranes is important for fundamental and product based research.[3–5] Furthermore, the exponential rise of nanomaterial use in consumer products and the accompanied unavoidable release of nanoparticles (NPs) into the environment raises concerns of long-term stability.[6–8]

Encapsulation in amphiphilic polymer micelles is one of the main strategies to transfer water insoluble NPs into aqueous solution.[9] A cross-linkage between the single polymer molecules leads to enhanced stability due to fixation of the micelle.[9–12] The diffusion of molecules and ions through such membranes or shells may be used for accessibility assessment or for modulating the catalytic activity[13] and the analytical properties[14,15] of the NPs. Consequently, the surface coating of nanomaterials not only ensures water solubility but also determines the interaction with the surrounding media.[10] It reveals on one hand a physical barrier controlling the mass transport between the NP and the environment and, on the other hand, determines the adsorption of proteins and peptides and therefore the biological fate of these particles.[16–18] Furthermore, the particle accessibility is of upmost importance for Cd(II)-based NP use in biological environment because of the potential leakage of toxic Cd(II) ions from not perfectly encapsulated QDQRs.[19]

In the past, we studied the encapsulation of spherical CdSe/CdS/ZnS quantum dots (QDs) into micelles using amphiphilic poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene oxide) (PI-*b*-PEO) polymers and showed that parameters such as the ratio of PI-*b*-PEO/QD,[20] size of PI-*b*-PEO,[21] chemical reactions with radical initiators[11] and polymerizable monomers *e.g.* styrene and divinylbenzene[22] influence the accessibility of various ions to the QDs. This encapsulation technique was also used to transfer elongated CdSe/CdS quantum dots in quantum rods (QDQRs) into water, preventing their extraordinary fluorescent properties.[23,24] Thereby the PI-*b*-PEO forms spherical micelles surrounding the QDQRs.[24,25] However, due to their elongated shape and curvature, the QDQR may hinder the formation of a perfectly dense micelle, which will be addressed here investigating the particle accessibility using a detailed study of the fluorescence quenching of encapsulated QDQRs on particle ensembles and on single particle level. The PL quenching can directly be attributed to the diffusion of PL quenchers in the NP shell and, consequently, allows to study the influences of chemical cross-linking reactions in the QDQRs ligand shell. QDQRs (length: 30 nm, aspect ratio 8.4, ESI Fig. 1†) were transferred to water using two PI-*b*-PEOs of different molecular weights (PI-*b*-PEO **(1)**: M_n = 4.3 kDa, M_w = 4.6 kDa and **(2)**: M_n = 13.6 kDa, M_w = 14.3 kDa, ratio PI/PEO = 1/2), which were chosen because they lead to pronounced differences in the quenching behaviour of encapsulated QDs.[21] Prior to phase

[a]*Institute of Physical Chemistry, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, and the Hamburg Center for Ultrafast Imaging, University of Hamburg, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany. E-mail: weller@chemie.uni-hamburg.de, merkl@chemie.uni-hamburg.de*

[b]*Center for Applied Nanotechnology (CAN) GmbH, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

[c]*Department of Chemistry, Faculty of Science, King Abdulaziz University, P.O BOX 80203 Jeddah 21589, Saudi Arabia*

†Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental section, particle characterization, data acquisition, widefield images, representative PL time traces, extracted stretched exponential factors, long term PL stability assessment at different pH values and in the presence of quenching Cu(II) ions. See DOI: 10.1039/c5nr08318d

Published on 11 March 2016. Downloaded by Bibliothekssystem Universitaet Hamburg on 24/03/2016 09:00:21.

transfer the QDQRs were coated with PI-DETA (M_n = 1.3 kDa, M_w = 1.3 kDa). Then Polymer and AIBN were added and the solution was transferred to water and cross-linked for 4 hours at 80 °C. The ratio of PI-*b*-PEO/QDQRs was 1800/1, because lower excesses lead in formation of clustered QDQRs.[25]

As expected, the encapsulated QDQRs exhibit different hydrodynamic sizes in water. Fig. 1A shows the DLS volume distribution maximum of **(1)** and **(2)** at the size of 28 nm and 44 nm, respectively (intensity distribution and comments on the precision of determining the NPs size is given in the ESI†). We attribute the hydrophobic PI polymer region as the key of efficient shielding from the environment,[11,20–22,26,27] while similar hydrophobic coatings are known to be of significant importance for shielding and biological fate of gold NPs.[16,28] The hydrophobic part is also a unique feature with respect to other QD surface coatings which provides substantial PL of the QD, even under copper catalysed 1,3-dipolar *Huisgen* cycloaddition conditions.[20–22,29–32] Based on the typical C–C bond length, we estimate the upper limit for the PI-block length in **(1)** and **(2)** to be 5.8 nm and 16.2 nm, respectively.

We exposed the encapsulated QDQRs (100 nM) to different concentrations of copper(II) acetate in a cuvette and measured the relative PL-intensity and the respective PL decay curves. The PL of semiconductor NP is very sensitive to Cu(II) ions, which result in an efficient PL quenching upon contact of semiconductor NP and Cu(II) ion.[29,30,32,33] The contact of one single Cu(II) ion can quench the PL of a semiconductor nanocrystal, as demonstrated for the case of CdS QDs.[34] It is believed that the adsorbed Cu(II) is reduced to Cu(I), creating a sub band gap below the conduction band of the QD, leading to trap emission in the long wavelength region, thus quenching the PL.[34] Here we observe that the PL of QDQRs with native ligands is also instantaneously quenched upon Cu(II) addition (ESI Fig. 8†), however without rise of surface defect trap emission.[20,21]

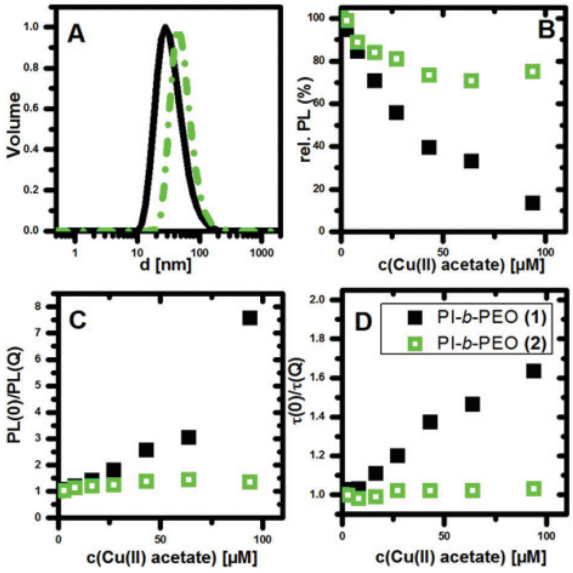


Fig. 1 A: Normalized volume weighted size distribution of the encapsulated QDQRs with two different polymer coatings (thin coating: black solid line, thick coating: green dotted line). B: Relative fluorescence Intensity of encapsulated QDQRs (100 nM) with PI-*b*-PEO **(1)** (black filled squares) and PI-*b*-PEO **(2)** (green empty squares) diblock copolymer while incubation with copper(II) acetate in water. The addition of the copper(II) acetate was proceeded subsequently and between each measurement an equilibration time of 15 min was used. C: Stern–Volmer plot of the combined quenching, D: Stern–Volmer plot of the average fluorescence lifetime.

In general, fluorescence quenching is classified into two mechanisms. The *static* quenching is caused by the formation of a non-fluorescent complex with the quencher and the PL lifetime τ of the unaffected fluorophores is unchanged. In contrast, the *dynamic* quenching, resulting from dynamic encounters between the fluorophore and quencher, shortens the PL lifetime.[35]

Here, we use the distinction between these two processes to study the ion permeability of QDQR surrounding polymer membranes. Because Cu(II) ions in direct contact to the semiconductor NP result in complete PL quenching, we interpret the occurrence of *static quenching* by diffusion of Cu(II) through the polymer shell to the QDQRs surface.[21] Contrary, the *dynamic* PL quenching process can be attributed to either electron or energy[36] transfer from QDQRs to Cu(II) ions diffusing in the vicinity of the QDQRs. Albeit the exact mechanism of this dynamic quenching remains unclear, both energy- (Förster radii of approx. 2 nm)[36] and electron transfer processes require proximity between QDQRs and the quenchers and thus penetration of Cu(II) into the hydrophobic PI-part of the micelle.

As shown in Fig. 1B, the PL intensity of the QDQRs encapsulated with the smaller polymer **(1)** is reduced significantly upon Cu(II) addition, whereas the PL of the QDQRs encapsulated with the larger polymer **(2)** is reduced only by 20% and then reaches a saturation plateau. The Stern–Volmer formalism is a useful tool to describe this fluorescence quenching process (eqn (1)), where the Stern–Volmer-constant K_{SV} is a measure for the efficiency of the PL quenching and [Q] the concentration of the quencher (Fig. 1C).[37,38]

$$\frac{PL(0)}{PL(Q)} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

The *dynamic* quenching may be expressed by eqn (2) where $\tau(0)$ and $\tau(Q)$ are the fluorescence lifetimes in absence and presence of the quencher, respectively. K_{dyn} is the Stern–Volmer constant for dynamic quenching.

$$\frac{PL(0)}{PL(Q)} = \frac{\tau(0)}{\tau(Q)} = 1 + K_{dyn}[Q] \quad (2)$$

The Stern–Volmer plots of the PL intensity and the fluorescence lifetime are shown in the Fig. 1C and D. These highlight the fact, that substantial PL-quenching is only observed for QDQRs encapsulated with the small polymer **(1)**. Especially no dynamic quenching occurs when the QDQRs are surrounded with PI-*b*-PEO **(2)**, manifested by constant $\tau(0)/\tau(Q)$

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

Published on 11 March 2016. Downloaded by Bibliothekssystem Universitaet Hamburg on 24/03/2016 09:00:21.

values, where PI-*b*-PEO **(1)** coated QDQRs exhibit subsequent reduction of the PL-lifetime when Cu(II) is added (Fig. 1D). At the highest quencher concentration (c(Cu(II) = 90 μM)) approx. 75% of the PI-*b*-PEO **(1)** encapsulated QDQRs are quenched *statically*, while those who remain luminescent exhibit shorter PL lifetimes. Moreover, 20% of the particles which are surrounded by PI-*b*-PEO **(2)** are quenched *statically*, while the rest is utmost perfectly shielded from the Cu(II) influence.

As a further proof, we conducted confocal fluorescence microscopy on QDQRs which were deposited on a glass cover slide mounted at the bottom of a flow cell. A detailed description of the procedure can be found in the ESI.† Due to the fact that water is not an optimal solvent for this experimental setup,[39] we used PEO300 and ensured that the shielding trend reported above is also present in the ensemble quenching assay with PEO300 as the solvent. Then, we spin-coated a diluted nanoparticle solution to ensure sufficient interparticle distance for single particle detection. Signals from objects with more than one encapsulated QDQR were omitted based on the spectral width of the associated emission spectra (ESI). The excitation power was kept at 14 nW in the focal volume to avoid multiphoton processes.[25,39] This investigation confirmed the ensemble PL-quenching assay, where some QDQRs vanished instantaneously, while others showed neither interaction with the quencher nor a reduced PL-lifetime, respectively. Representative fluorescence time traces of single encapsulated QDQRs before and after the addition of copper(II) acetate are shown in ESI Fig. 6,† which make reliable blinking analysis not possible.

The investigation of the PL lifetimes, however, gives insight into the diffusion of Cu(II) through the polymer membranes **(1)** and **(2)**. Histograms of the average PL lifetime in the absence (Fig. 2A and B) and presence (Fig. 2C and D) of Cu(II) clearly revealed a reduction of the PL lifetime only for QDQRs coating with polymer shell **(1)** indicating substantial influence of the Cu(II) ions. The thick polymer shell **(2)** prevents this *dynamic* quenching mechanism.

This can only be explained by close proximity between QDQRs and Cu(II) (typically <1 nm for electron transfer), indicating Cu(II) penetration into the hydrophobic PI part of the micelle of PI-*b*-PEO **(1)**. This may be due to imperfections in the ligand shell, such as nanopores or holes, which allow the accumulation of Cu(II) but prevent direct surface access.

This is in agreement with a recent report,[21] where three different species of surface coatings of QDs were identified: dense coatings, which shield the particles well from the influence of Cu(II), permeable coatings which allow Cu(II) diffusion to the semiconductor surface, and partial permeable membranes, which prevent *static*, but allow *dynamic* quenching. The proportion of the latter two is highest, when small polymers (PI-*b*-PEO **(1)**) are used for encapsulation, while dense coatings are predominant, when QDs are encapsulated in PI-*b*-PEO **(2)**.[21] The here presented results underline these assumptions, which are also supported by the widefield microscopy investigation presented in the ESI.†

The PI block length of approximately 4.3 kDa (PI-*b*-PEO **(2)**) can be seen as a critical molar mass for effective shielding. We also notice that this block length, with addition of the PI-DETA block, is similar to the reported entanglement length of PI of 5.5 kDa.[40] We, therefore, explain the different shielding by different coiling of the PI chains of PI-DETA and PI-*b*-PEO. Obviously, the PI chains interpenetrate as almost linear chains when PI-*b*-PEO **(1)** is used, which results in free space, where Cu(II) can accumulate (see Scheme 1). On the contrary, a more effective and flexible interaction occurs, when the PI moieties of PI-*b*-PEO **(2)** can entangle among each other and the PI-DETA (see Scheme 1), which may result in a coiled, perfectly dense PI-region surrounding the QDQRs. This prevents

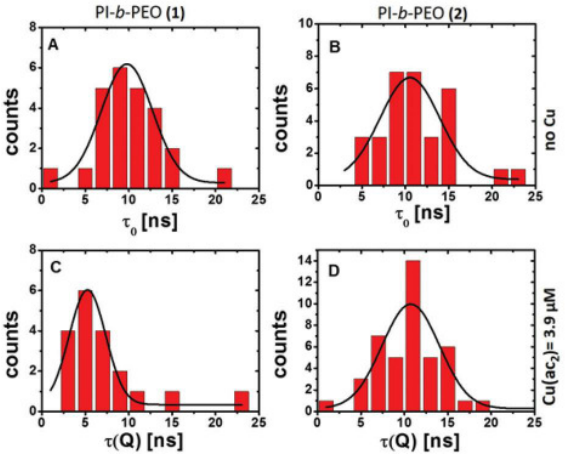
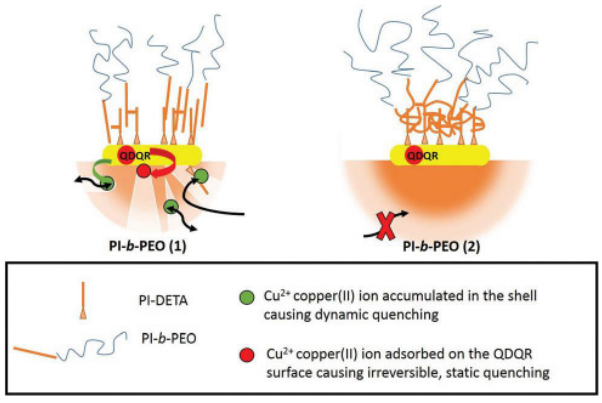


Fig. 2 Histogram (binning 1 ns) of the average fluorescence lifetimes before (τ_0, A, B) and after ($\tau(Q)$, C, D) the addition of copper(II) acetate to the QDQRs encapsulated with the PI-*b*-PEO **(1)** (left A, C) and the PI-*b*-PEO **(2)** (right B, D) and the associated fit (fitting parameters given in Table ESI 1†).



Scheme 1 Schematic representation of the different polymer membranes surrounding the QDQRs encapsulated with PI-*b*-PEO **(1)** (left) and **(2)** (right). The upper part schematizes the different arrangement of the PI-DETA and PI-*b*-PEO, while the lower part shows the polymer membranes with or without nano-pores and holes.

Published on 11 March 2016. Downloaded by Bibliotheekssystem Universitaet Hamburg on 24/03/2016 09:00:21.

the accumulation of Cu(II) in the membrane and thus the *dynamic* quenching reaction. It is reasonable that in the latter case a more homogeneous shrinking of the PI shell may compensate contraction during cross-linking, whereas percolation with nanopore formation results in the more stiff arrangement of the PI chains.

As a first and very brief estimation, we used the Stern–Volmer constant for *dynamic* quenching as a measure for the presence of Cu(II) in close distance to the QDQR and determined the diffusion coefficient of Cu(II) in the nanopores to be approx. 3×10^{-7} cm^2 s^{-1}, which is 40 times slower than ion diffusion in water (equation and assumptions given in the ESI†).[41] The *dynamic* quenching reaction is similar to PI-*b*-PEO **(1)** encapsulated QDs, which indicates, that the membrane structure around QDs and QDQRs does not differ significantly.[21]

For a better understanding of the parameters determining the sample homogeneities and the intermolecular cross-linking, we investigated the influence of a variety of criteria, such as the polymer excess during encapsulation, the cross-linking time using AIBN, and a subsequent emulsion polymerization step with styrene and divinylbenzene on the shielding of the QDQRs.[11,21,22] We added 800 equivalents of copper(II) acetate to a solution of PI-*b*-PEO **(2)** encapsulated QDQRs (c = 100 nM) to study only the particles of higher Cu(II) resistivity. We followed the temporal evolution of the quenching by acquisition of a variety of spectra during the first minutes and on longer time scales of up to one week. This allows to analyse the long term shielding of these particles, which may be of interest for *in vivo* application.[42] Additionally protons and hydroxyl ions were used as PL quenchers to model different environments. Details on the experimental procedure and PL-intensity plots can be found in the ESI.†

Cross-linking of the micelles is essential to increase the stability against quenchers (ESI Fig. 8†). The temporal evolution of the relative PL intensity of QDQRs, which were cross-linked for various times during the encapsulation process, in the presence of 800 equivalents Cu(II) is shown in Fig. 3. Cross-linking reactions times of 4–10 h are necessary to form a dense PI-region and effectively shield the particles. For the EP similar shielding is achieved by reaction times of at least 1 hour (ESI Fig. 10 and 11†).

The main difference between the EP and the radically initiated AIBN cross-linkage is observed at short reaction times, where only the EP provides sufficient shielding against protons (ESI Fig. 9 and 11†). This can be attributed to the different nature of the polymerizable unit and the radical source, where reaction times can be considered comparable under the reaction conditions [respective 10 hour half times provided by the suppliers: AIBN 65 °C ($T_{reaction}$ = 80 °C), VA-044 44 °C ($T_{reaction}$ = 60 °C)]: AIBN initiates the cross-linkage of two neighbouring isoprene double bounds, while during the EP new material is brought into the QDQR shell. Imperfections in the ligand shell are likely to have a local lack of polymer ligands, which may hinder their cross-linkage. Contrarily, styrene and divinylbenzene swell the micelle during the initial

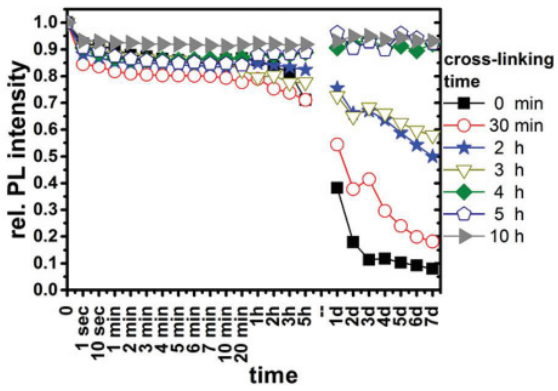


Fig. 3 Relative PL intensity upon the addition of 800 eq. copper(II) acetate of QDQRs encapsulated with PI-*b*-PEO **(2)** under different cross-linking times using AIBN as a radical initiator. The different cross-linking times are colour- and symbol-coded: 0 min (filled black squares), 30 min (empty red spheres), 2 h (filled blue stars), 3 h (empty olive triangles), 4 h (filled green diamonds), 5 h (empty dark-blue pentagons), 10 h (filled grey triangles).

step of the EP and their polymerization is initiated by oligomer radicals, which enter the seeds after being formed in solution.[43] So, the better shielding after short reactions times of the seeded emulsion polymerization samples may be due to the diffusion of styrene and divinylbenzene to the imperfections in the shell. Their subsequent polymerization creates a rigid and hydrophobic polymer network, which closes the respective imperfection and hinders quencher diffusion towards the QDQR surface.

Conclusions

We report a Cu(II) ion and proton accessibility study of polymer encapsulated QDQRs based on fluorescence quenching analysis. This sensitive assay allows us to study the diffusion of Cu(II) in nanoscale membranes in ensemble and on single particles. It revealed that accessibility is favoured, when a small polymer surrounds the QDQR. The occurrence of two different PL quenching mechanisms allows distinguishing between QDQRs surrounded by perfect and imperfect shells, which exhibit holes or nano-pores. The accessibility of elongated QDQRs can be fine-tuned by chemical cross-link reactions in the surrounding polymer layer and the influence of these reactions can also be tracked using the same PL quenching assay.

Acknowledgements

This work was supported by the Chemical Industry Fund, VCI: German Chemical Industry Association, and the German–American Fulbright Program. The authors thank Dr. Alexey Chernikov (Columbia University, New York City), Julian

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

Published on 11 March 2016. Downloaded by Bibliotheekssystem Universitaet Hamburg on 24/03/2016 09:00:21.

Miranda (Florida State University, Tallahassee) and Prof. Dr. Volker Abetz and Dr. Son C. Nguyen (University of Hamburg) for fruitful discussions. Further, we thank Daniel Meyer for the illustration of the TOC graphic.

References

1 T. C. Merkel, B. D. Freeman, R. J. Spontak, Z. He, I. Pinnau, P. Meakin and A. J. Hill, *Science*, 2002, **296**, 519–522.
2 S. Gunes, H. Neugebauer and N. S. Sariciftci, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 1324–1338.
3 D. Anselmetti and A. Gölzhäuser, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 12300–12302.
4 D. Anselmetti and A. Gölzhäuser, *Angew. Chem.*, 2014, **126**, 12498–12500.
5 R. Ishimatsu, J. Kim, P. Jing, C. C. Striemer, D. Z. Fang, P. M. Fauchet, J. L. McGrath and S. Amemiya, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 7127–7134.
6 B. Pelaz, G. Charron, C. Pfeiffer, Y. Zhao, J. M. de la Fuente, X.-J. Liang, W. J. Parak and P. del Pino, *Small*, 2013, **9**, 1573–1584.
7 I. Corsi, G. N. Cherr, H. S. Lenihan, J. Labille, M. Hassellov, L. Canesi, F. Dondero, G. Frenzilli, D. Hristozov, V. Puntes, C. Della Torre, A. Pinsino, G. Libralato, A. Marcomini, E. Sabbioni and V. Matranga, *ACS Nano*, 2014, **8**, 9694–9709.
8 W. J. Stark, P. R. Stoessel, W. Wohlleben and A. Hafner, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 5793–5805.
9 G. Palui, F. Aldeek, W. T. Wang and H. Mattoussi, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 193–227.
10 E. Pöselt, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, U. Schumacher, C. Wagener, S. Förster and H. Weller, *ACS Nano*, 2012, **6**, 3346–3355.
11 C. Schmidtke, H. Lange, H. Tran, J. Ostermann, H. Kloust, N. G. Bastús, J.-P. Merkl, C. Thomsen and H. Weller, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 8570–8578.
12 W. Wang, A. Kapur, X. Ji, M. Safi, G. Palui, V. Palomo, P. E. Dawson and H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 5438–5451.
13 Y. Que, C. Feng, S. Zhang and X. Huang, *J. Phys. Chem. C*, 2015, **119**, 1960–1970.
14 S. Schlücker, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 4756–4795.
15 S. Schlücker, *Angew. Chem.*, 2014, **126**, 4852–4894.
16 T. A. Larson, P. R. Joshi and K. Sokolov, *ACS Nano*, 2012, **6**, 9182–9190.
17 J. Ostermann, C. Schmidtke, C. Wolter, J.-P. Merkl, H. Kloust and H. Weller, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2015, **6**, 232–242.
18 D. Maiolo, P. Del Pino, P. Metrangolo, W. J. Parak and F. Baldelli Bombelli, *Nanomedicine*, 2015, **10**, 3231–3247.
19 K. M. Tsoi, Q. Dai, B. A. Alman and W. C. W. Chan, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 662–671.
20 J.-P. Merkl, J. Ostermann, C. Schmidtke, H. Kloust, R. Eggers, A. Feld, C. Wolter, A.-M. Kreuziger, S. Flessau, H. Mattoussi and H. Weller, in *Proc. of SPIE 8955*, ed. W. J. Parak, M. Osinski and K. I. Yamamoto, 2014, vol. 8955, p. 89551X.
21 J. Ostermann, J.-P. Merkl, S. Flessau, C. Wolter, A. Kornowksi, C. Schmidtke, A. Pietsch, H. Kloust, A. Feld and H. Weller, *ACS Nano*, 2013, **7**, 9156–9167.
22 H. Kloust, C. Schmidtke, J.-P. Merkl, A. Feld, T. Schotten, U. E. A. Fittschen, M. Gehring, J. Ostermann, E. Pöselt and H. Weller, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 23244–23250.
23 L. Carbone, C. Nobile, M. De Giorgi, F. Della Sala, G. Morello, P. Pompa, M. Hytch, E. Snoeck, A. Fiore, I. R. Franchini, M. Nadasan, A. F. Silvestre, L. Chiodo, S. Kudera, R. Cingolani, R. Krahne and L. Manna, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 2942–2950.
24 J. Dimitrijevic, L. Krapf, C. Wolter, C. Schmidtke, J.-P. Merkl, T. Jochum, A. Kornowski, A. Schüth, A. Gebert, G. Hüttmann, T. Vossmeyer and H. Weller, *Nanoscale*, 2014, **6**, 10413–10422.
25 M. Rafipoor, C. Schmidtke, C. Wolter, C. Strelow, H. Weller and H. Lange, *Langmuir*, 2015, **31**, 9441–9447.
26 A. Feld, J.-P. Merkl, H. Kloust, S. Flessau, C. Schmidtke, C. Wolter, J. Ostermann, M. Kampferbeck, R. Eggers, A. Mews, T. Schotten and H. Weller, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 12468–12471.
27 A. Feld, J.-P. Merkl, H. Kloust, S. Flessau, C. Schmidtke, C. Wolter, J. Ostermann, M. Kampferbeck, R. Eggers, A. Mews, T. Schotten and H. Weller, *Angew. Chem.*, 2015, **127**, 12645–12648.
28 F. Schulz, T. Vossmeyer, N. G. Bastús and H. Weller, *Langmuir*, 2013, **29**, 9897–9908.
29 C. Schieber, A. Bestetti, J. P. Lim, A. D. Ryan, T. Nguyen, R. Eldridge, A. R. White, P. A. Gleeson, P. S. Donnelly, S. J. Williams and P. Mulvaney, *Angew. Chem.*, 2012, **124**, 10675–10679.
30 C. Schieber, A. Bestetti, J. P. Lim, A. D. Ryan, T.-L. Nguyen, R. Eldridge, A. R. White, P. A. Gleeson, P. S. Donnelly, S. J. Williams and P. Mulvaney, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 10523–10527.
31 A. Bernardin, A. Cazet, L. Guyon, P. Delannoy, F. Vinet, D. Bonnaffé and I. Texier, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 583–588.
32 G. G. Beaune, S. Tamang, A. Bernardin, P. Bayle-Guillemaud, D. Fenel, G. Schoehn, F. Vinet, P. Reiss and I. Texier, *ChemPhysChem*, 2011, **12**, 2247–2254.
33 A. Bernardin, A. Cazet, L. Guyon, P. Delannoy, F. Vinet, D. Bonnaffé and I. Texier, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 583–588.
34 A. V. Isarov and J. Chrysochoos, *Langmuir*, 1997, **13**, 3142–3149.
35 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer-Verlag, Heidelberg, 4th edn, 2006.
36 J. U. Sutter, D. J. S. Birch and O. J. Rolinski, *Meas. Sci. Technol.*, 2012, **23**, 55103.
37 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science+Buisness Media, New York, 3rd edn, 2006.

Published on 11 March 2016. Downloaded by Bibliothekssystem Universitaet Hamburg on 24/03/2016 09:00:21.

38 O. Stern and M. Volmer, *Phys. Zeitschrift*, 1919, **20**, 183–188.
39 S. Flessau, C. Wolter, E. Pöselt, E. Kroger, A. Mews and T. Kipp, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 10444–10455.
40 L. J. Fetters, D. J. Lohse and R. H. Colby, *Physical Properties of Polymers Handbook*, Springer New York, New York, NY, 2007.
41 M. Smoluchowski, *Ann. Phys.*, 1915, **48**, 1103–1112.
42 W. G. Kreyling, A. M. Abdelmonem, Z. Ali, F. Alves, M. Geiser, N. Haberl, R. Hartmann, S. Hirn, D. J. de Aberasturi, K. Kantner, G. Khadem-Saba, J.-M. Montenegro, J. Rejman, T. Rojo, I. R. de Larramendi, R. Ufartes, A. Wenk and W. J. Parak, *Nat. Nanotechnol.*, 2015, **10**, 619–623.
43 J. W. Vanderhoff, J. F. Vitkuske, E. B. Bradford and T. Alfrey, *J. Polym. Sci.*, 1956, **20**, 225–234.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

6.6.3 A Universal Approach to Ultrasmall Magneto-Fluorescent Nanohybrids

Bei diesem Paper wird die Synthese von ultrakleinen magneto-fluoreszenten Nanohybriden beschrieben. Mein Beitrag war hierbei sowohl die Syntheseplanung als auch die Durchführung (zusammen mit Artur Feld) und die Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften. Die konzeptionelle Gestaltung des Systems und die erste Idee hierzu stammen von Dr. Hauke Kloust. Die englische Version der Veröffentlichung habe ich maßgeblich mit Unterstützung von Theo Schotten formuliert.[6] Reprinted with license. Copyright ©2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Functional Nanostructures Hot Paper

International Edition: DOI: 10.1002/anie.201503017
German Edition: DOI: 10.1002/ange.201503017

A Universal Approach to Ultrasmall Magneto-Fluorescent Nanohybrids**

*Artur Feld, Jan-Philip Merkl, Hauke Kloust, Sandra Flessau, Christian Schmidtke, Christopher Wolter, Johannes Ostermann, Michael Kampferbeck, Robin Eggers, Alf Mews, Theo Schotten, and Horst Weller**

Abstract: *Seeded emulsion polymerization is a powerful universal method to produce ultrasmall multifunctional magnetic nanohybrids. In a two-step procedure, iron oxide nanocrystals were initially encapsulated in a polystyrene (PS) shell and subsequently used as beads for a controlled assembly of elongated quantum dots/quantum rods (QDQRs). The synthesis of a continuous PS shell allows the whole construct to be fixed and the composition of the nanohybrid to be tuned. The fluorescence of the QDQRs and magnetism of iron oxide were perfectly preserved, as confirmed by single-particle investigation, fluorescence decay measurements, and relaxometry. Biofunctionalization of the hybrids was straightforward, involving copolymerization of appropriate affinity ligands as shown by immunoblot analysis. Additionally, the universality of this method was shown by the embedment of a broad scale of NPs.*

Nanocrystals (NCs) are favorable materials for biomedical applications, which is mainly due to superparamagnetism, fluorescence, or plasmonic behavior.[1] This makes nanocrystals a platform for magnetic-resonance and fluorescence imaging as well as a scaffold for new therapeutic agents.[2] Usually three different types of nanocrystals are used that exhibit these properties: iron oxide,[3] semiconductors, and gold NCs.[4] CdSe/CdS/ZnS quantum dots (QDs) show high fluorescence quantum yields and photostability, which offers the opportunity to use them in various fluorescence imaging techniques.[5] Recently, elongated quantum dots in quantum rods (QDQRs) have gained more interest, because of their even higher fluorescence quantum yield, polarized emission, and enhanced multiphoton absorption.[6] A material combining magnetism, fluorescence, and/or plasmonic behavior is desirable because the bio-imaging techniques benefiting from these effects complement each other. Since no single material is known to have these combined properties, multifunctional composites were achieved by attaching different particles within one construct. Such constructs are often referred to be nanocomposites or nanohybrids.

Various approaches for dual, that is, magnetofluorescent imaging have been described. The nanocrystal hybrid can be formed by a direct clustering of the as-synthesized crystals,[7] by co-encapsulation of different types of nanocrystals, or conjugation of separate nanoconstructs.[8] In particular, the second approach holds high potential, because the nanocrystal properties can be optimized for the different imaging modalities independently. However, care has to be taken that no undesirable interactions within the nanohybrid abrogate these respective properties. For example, in a magnetofluorescent hybrid, the fluorescence of semiconductor nanocrystals can be quenched by iron oxide nanocrystals or iron ions released thereof and have therefore been rarely described.[9] Furthermore, hybrids may exceed inherent biological size limits by profuse clustering of the nanocrystals.[9b]

Recently, Bawendi and co-workers presented superstructures comprised of close-packed magnetic nanoparticle cores that were fully surrounded by a shell of fluorescent quantum dots. Each "supernanoparticle" consists of about 2000 nanocrystals with an overall diameter of about 100 nm.[10] These superstructures form very regular superlattice fringes, thus providing an inherently fixed monodisperse distribution. Although photoluminescence quantum yield (PLQY) was significantly reduced down to 12%, the sheer number of fluorescent CdSe/CdS quantum dots still allowed single particle tracking and suppressed blinking. However, the putative hepatobiliary accumulation of these particles and eventual release of high cadmium concentrations may pose toxicological risks to living structures.

Herein, we propose a novel two-step concept that is further developed from our recently reported seeded emulsion polymerization technique.[11] This technique already allowed us to co-encapsulate gold and iron oxide NCs without impairment of each other's physicochemical properties.

[*] A. Feld,[+] J.-P. Merkl,[+] Dr. H. Kloust, Dr. S. Flessau, Dr. C. Schmidtke, C. Wolter, Dr. J. Ostermann, M. Kampferbeck, R. Eggers, Prof. Dr. A. Mews, Prof. Dr. H. Weller
Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg
Grindelallee 117, 20146 Hamburg (Germany)
E-mail: weller@chemie.uni-hamburg.de

Dr. J. Ostermann, Prof. Dr. A. Mews, Dr. T. Schotten, Prof. Dr. H. Weller
Center for Applied Nanotechnology
Grindelallee 117, 20146 Hamburg (Germany)

Prof. Dr. H. Weller
The Hamburg Center for Ultrafast Imaging, University of Hamburg
Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg (Germany)

[+] These authors contributed equally to this work.

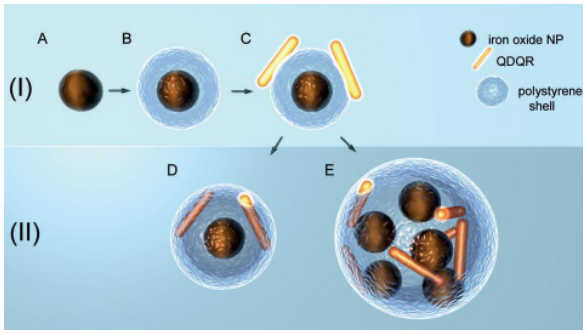
[**] We thank Jenny Spöttel for supporting the preparative work. This work was supported by SFB 986M3 of the German Research Foundation (DFG), the Chemical Industry Fund, VCI: German Chemical Industry Association, and the German–American Fulbright Program.

Supporting information for this article (experimental section, design and characterization of the nanohybrids (TEM, DLS), TEM analysis of iron oxide/nickel platinum, iron oxide/iron oxide, iron oxide/gold hybrids, and quantification of the purification process; confocal fluorescence microscopy video of the magneto-fluorescent hybrids) is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/anie.201503017.

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

However, combining iron oxide and semiconductor NCs with the same procedure was less successful, leading to irreversible fluorescence quenching.[9b] In contrast, by the approach presented herein, the pristine fluorescent properties of the QDQRs are fully maintained. Moreover, the composition of the nanohybrid can be user-defined tuned from dyads to clusters containing 30–40 NPs with diameters ranging from 50 to 150 nm (DLS).

During step (I) towards the formation of these magneto-fluorescent hybrid structures, we encapsulated iron oxide nanocrystals in a polysorbate 80/polystyrene shell as reported before (Scheme 1 A→B).[11a] After purification, elongated



Scheme 1. The two-step hybrid formation. Step I: A) Iron oxide nanocrystals (native ligands not shown), B) iron oxide nanoparticles with the first polystyrene shell, C) nanohybrid after the deposition of QDQRs. Step II: D) nanohybrid after synthesizing a thin PS shell, E) nanohybrid after second emulsion polymerization, when dyads cluster owing to high styrene concentration.

QDQRs (CdSe/CdS) were deposited on the iron oxide-PS seeds by means of a controlled assembly. Although deposition of spherical NCs was considerably easier to achieve, we focused on the deposition of QDQRs owing to their advantages mentioned above. The assembly step (Scheme 1, B→C) determined the structure of the hybrids. The predominant formation of the dyads was controlled by injection speed, QDQR aspect ratio, QDQR/iron oxide NC ratio, as well as surface functionalization of the individual seed particles (see comprehensive discussion in the Supporting Information).

In brief, controlled deposition of QDQRs to the iron oxide beads was achieved by mixing a highly concentrated solution of the iron oxide–PS beads with QDQRs in THF, which was then rapidly injected into an aqueous solution of polysorbate 80. Owing to the increased polarity of the solution, the QDQR NCs attached to the polystyrene shell (B→C). Notably, QDQRs with aspect rations higher than 8 showed a propensity not to adhere to the PS shell, but arrange separately in a parallel fashion among themselves.

A consecutive emulsion polymerization was used to finally integrate this nanocomposite in a continuous PS shell optionally under functionalization with affinity ligands, for example, biotin (step II, C→D/E). This second step combines the established procedures[8] of co-encapsulation[11a] and conjugation[12] of different nanoparticles within one approach, which is very straightforward for the synthesis of an integrated, multifunctional nanohybrid with controlled surface properties. In step (II), low styrene and low NP concentrations yielded predominantly dyads (Figure 1a; DLS size 74 nm), whereas high styrene and NP concentrations led to multiply clustered hybrids (Figure 1b,c) with DLS size up to 150 nm. Remarkably, in most cases the ratio of QDQR/iron oxide was 1:1, suggesting that a primarily formed population of dyads assemble to higher clusters during the second polymerization step. For further investigations, samples consisting mainly of dyads were used.

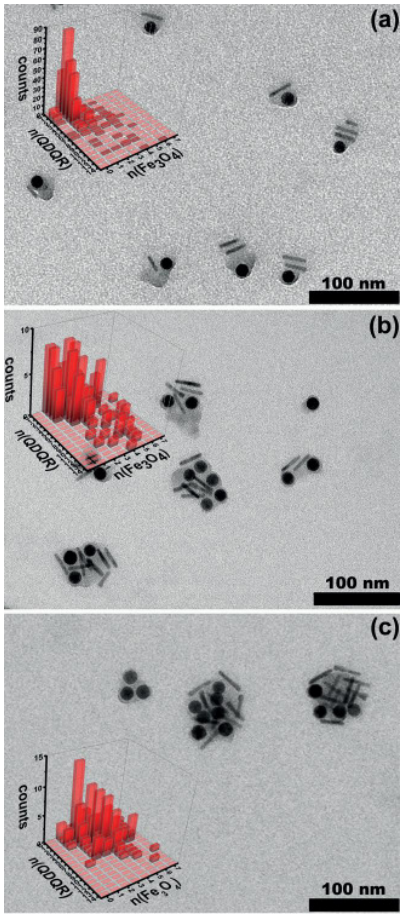


Figure 1. Representative TEM images of the different hybrids achieved using different amounts of monomer during the second emulsion polymerization. The inset shows a three-dimensional histogram of the number of QDQRs n(QDQR) and the number of iron oxide n(Fe_3O_4) within one hybrid. Amounts used of each monomer: a) 4 nmol, b) 8 nmol, c) 26 nmol.

Absorption and fluorescence properties of the hybrids are shown in Figure 2a and b. The absorption spectrum (black solid line) represents an exact superposition of the iron oxide (black dashed line) and of the QDQRs (red line) spectra, and the fluorescence spectrum is identical to the pure QDQRs. Owing to the strong light absorption of the iron oxide, standard measurements did not yield reliable values for the fluorescence quantum yield of the hybrids. However, considering the inner filter effect, the fluorescence intensities of the hybrids and the pure QDQRs were very similar.

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

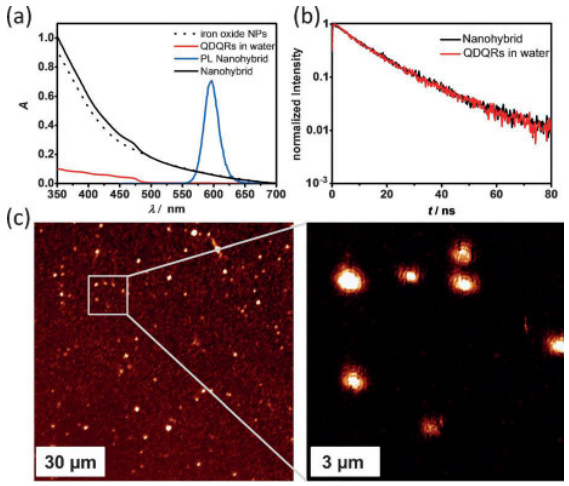


Figure 2. a) Absorption spectra of the hybrids (black solid line), absorption spectra of polystyrene encapsulated iron oxide nanocrystals (black dashed line), absorption spectra of QDQRs (red solid line), normalized emission spectra of the hybrids (blue solid line). b) Normalized fluorescence decay curves of the nanohybrids (black) and of the encapsulated QDQRs (red). c) Confocal fluorescence microscopy images of the individual hybrids.

Furthermore, we examined the fluorescence decay times of the QDQR–iron oxide hybrids in comparison to a pure QDQR sample. As can be clearly seen in Figure 2b, the fluorescence lifetime of the QDQRs (11 ns) does not change in the hybrids. We concluded that no interactions between the iron oxide NC and the QDQR exist, which would lead to dynamic quenching. An additional indication for the conservation of the fluorescence properties of the QDQRs within the hybrids was found in single-particle fluorescence investigations (Figure 2c).

The characterization of the fluorescence properties of the hybrids compared with those of the pure QDQRs by confocal techniques reflects biological conditions more accurately than cuvette measurements. In biological systems, samples are regularly highly diluted and have low section thicknesses, making light absorption by the iron oxide less disturbing.

We compared the average fluorescence intensities of the QDQR–iron oxide hybrid emission with those of a pure QDQR and found almost identical average values (10–15 particles counted; see the Supporting Information).

Remarkably, these dyad-hybrids exhibit fluorescence blinking, characteristic for single-particle fluorescence (video available in the Supporting Information). It should be noted that these features are indispensable for super resolution microscopy, such as STORM and related techniques.[13]

These results clearly indicate that the QDQRs in the hybrids were perfectly shielded against quenching agents and the average distance between QDQRs and iron oxide was large enough to suppress electron or energy transfer. The magnetic properties of the magnetofluorescent nanohybrids were measured by relaxometry at 1.41 T and 37 °C. With a r_2 relaxivity of 164 $mM^{-1}s^{-1}$, the hybrids exhibit typical values of T_2 or T_2* contrast agents for magnetic resonance imaging. Compared to solitarily encapsulated iron oxide nanocrystals by seeded emulsion polymerization, no significant changes in r_2 were observed. This clearly indicates that only one iron oxide nanocrystal per dyad was enclosed. In contrast, the T_2 relaxivity of the nanohybrid can be increased to 240 $mM^{-1}s^{-1}$ by synthesizing iron oxide/iron oxide core/satellite structures (see the Supporting Information). This increase may be explained by magnetic interactions leading to an enhancement of the saturation magnetization in the hybrids.[14]

As shown recently, seeded emulsion polymerization allows a concomitant co-polymerization of affinity molecules. Following this approach, biotin-PEO_{60}-*N*-(allyl 2-hydroxypropyl ether) was copolymerized during step (II).[15] In a dot-blot experiment, the biotinylated nanohybrids showed binding to NeutrAvidin, whereas the corresponding non-biotinylated probe showed none (see photograph in the Supporting Information).

To show the broad scope of this approach, we embedded spherical gold, nickel–platinum, iron oxide nanocrystals, and QDs (CdSe/CdS/ZnS) and synthesized a variety of multifunctional nanohybrids with biological relevance. The combination of iron oxide with nickel platinum nanocrystals may find applications in catalysis, where particles can be easily separated from the reaction mixture by simply applying a magnet.

In conclusion, consecutive seeded emulsion polymerization allows the preparation of advanced nanohybrids combining completely different properties without any interference of the uniform particles. Recently, we demonstrated that a PS shell is highly effective to prevent fluorescence quenching of singly encapsulated semiconductor NCs.[11b,16] Herein we expanded on these findings by embedding diverse nanocrystals into a continuous PS. The first PS shell efficiently insulates iron oxide NCs from QDQRs, thus suppressing effectively dynamic and static quenching. Furthermore, it also acts as an ion barrier, suppressing leaching of cadmium ions. The combined QDQRs/iron oxide magnetofluorescent nanohybrids fully preserved the fluorescence of the incorporated QDQRs. This method allows the synthesis of exceptional small nanohybrids with excellent properties, which is hardly achievable by other methods or one single material. Additionally, purification and bio-functionalization of the nanohybrids was very straightforward, as demonstrated by magnetic column purification and co-polymerization of a biotin monomer, respectively. These hybrids may spur major progress in targeted dual imaging applications.

Keywords: emulsion polymerization · magnetofluorescence · nanocomposites · nanohybrids · single-particle spectroscopy

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12468–12471
Angew. Chem. **2015**, *127*, 12645–12648

[1] a) M. J. Sailor, J. H. Park, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3779–3802; b) H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1362–1395; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1402–1437.
[2] Z. P. Qin, J. C. Bischof, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1191–1217.
[3] a) N. Lee, T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2575–2589; b) D. Yoo, J.-H. Lee, T.-H. Shin, J. Cheon, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*,

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

863 – 874; c) J. Gao, H. Gu, B. Xu, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1097 – 1107.

[4] a) R. A. Sperling, P. Rivera Gil, F. Zhang, M. Zanella, W. J. Parak, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1896 – 1908; b) D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3280 – 3294; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3352 – 3366.

[5] a) T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, A. M. Seifalian, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4717 – 4732; b) E. Pöselt, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, U. Schumacher, C. Wagener, S. Förster, H. Weller, *ACS Nano* **2012**, *6*, 3346 – 3355; c) G. Xu, K.-T. Yong, I. Roy, S. D. Mahajan, H. Ding, S. A. Schwartz, P. N. Prasad, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1179 – 1185; d) K.-T. Yong, I. Roy, H. E. Pudavar, E. J. Bergey, K. M. Tramposch, M. T. Swihart, P. N. Prasad, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1412 – 1417.

[6] a) J. Dimitrijevic, L. Krapf, C. Wolter, C. Schmidtke, J. P. Merkl, T. Jochum, A. Kornowski, A. Schuth, A. Gebert, G. Huttmann, T. Vossmeyer, H. Weller, *Nanoscale* **2014**, *6*, 10413 – 10422; b) H. Htoon, J. A. Hollingworth, A. V. Malko, R. Dickerson, V. I. Klimov, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 4776 – 4778.

[7] a) S. T. Selvan, P. K. Patra, C. Y. Ang, J. Y. Ying, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2448 – 2452; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2500 – 2504; b) N. s. Pazos-Pérez, Y. Gao, M. Hilgendorff, S. Irsen, J. Pérez-Juste, M. Spasova, M. Farle, L. M. Liz-Marzán, M. Giersig, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 4415 – 4422; c) N. Lee, H. R. Cho, M. H. Oh, S. H. Lee, K. Kim, B. H. Kim, K. Shin, T.-Y. Ahn, J. W. Choi, Y.-W. Kim, S. H. Choi, T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10309 – 10312; d) L. Y. T. Chou, K. Zagorovsky, W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 148 – 155.

[8] a) F. Erogbogbo, K. T. Yong, R. Hu, W. C. Law, H. Ding, C. W. Chang, P. N. Prasad, M. T. Swihart, *ACS Nano* **2010**, *4*, 5131 – 5138; b) N. Insin, J. B. Tracy, H. Lee, J. P. Zimmer, R. M. Westervelt, M. G. Bawendi, *ACS Nano* **2008**, *2*, 197 – 202; c) R. Kas, E. Sevinc, U. Topal, H. Y. Acar, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 7758 – 7766; d) V. Roullier, F. Grasset, F. Boulmedais, F. Artzner, O. Cador, V. r. Marchi-Artzner, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 6657 – 6665; e) R. Di Corato, N. C. Bigall, A. Ragusa, D. Dorfs, A. Genovese, R. Marotta, L. Manna, T. Pellegrino, *ACS Nano* **2011**, *5*, 1109 – 1121; f) B.-S. Kim, T. A. Taton, *Langmuir* **2007**, *23*, 2198 – 2202; g) J.-H. Park, G. von Maltzahn, E. Ruoslahti, S. Bhatia, M. Sailor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7284 – 7288; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7394 – 7398.

[9] a) K. Boldt, S. Jander, K. Hoppe, H. Weller, *ACS Nano* **2011**, *5*, 8115 – 8123; b) N. C. Bigall, W. J. Parak, D. Dorfs, *Nano Today* **2012**, *7*, 282 – 296.

[10] O. Chen, L. Riedemann, F. Etoc, H. Herrmann, M. Coppey, M. Barch, C. T. Farrar, J. Zhao, O. T. Bruns, H. Wei, P. Guo, J. Cui, R. Jensen, Y. Chen, D. K. Harris, J. M. Cordero, Z. Wang, A. Jasanoff, D. Fukumura, R. Reimer, M. Dahan, R. K. Jain, M. G. Bawendi, *Nat. Commun.* **2014**, *5093*, 1 – 8.

[11] a) H. Kloust, E. Pöselt, S. Kappen, C. Schmidtke, A. Kornowski, W. Pauer, H.-U. Moritz, H. Weller, *Langmuir* **2012**, *28*, 7276 – 7281; b) H. Kloust, C. Schmidtke, J.-P. Merkl, A. Feld, T. Schotten, U. E. A. Fittschen, M. Gehring, J. Ostermann, E. Pöselt, H. Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 23244 – 23250.

[12] C. Schmidtke, H. Kloust, N. G. Bastús, J.-P. Merkl, H. Tran, S. Flessau, A. Feld, T. Schotten, H. Weller, *Nanoscale* **2013**, *5*, 11783 – 11794.

[13] T. Dertinger, R. Colyer, G. Iyer, S. Weiss, J. Enderlein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 22287 – 22292.

[14] a) C. Schmidtke, R. Eggers, R. Zierold, A. Feld, H. Kloust, C. Wolter, J. Ostermann, J. P. Merkl, T. Schotten, K. Nielsch, H. Weller, *Langmuir* **2014**, *30*, 11190 – 11196; b) R. J. Hickey, A. S. Haynes, J. M. Kikkawa, S. J. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1517 – 1525.

[15] H. Kloust, C. Schmidtke, A. Feld, T. Schotten, R. Eggers, U. E. A. Fittschen, F. Schulz, E. Pöselt, J. Ostermann, N. G. Bastús, H. Weller, *Langmuir* **2013**, *29*, 4915 – 4921.

[16] a) H. Kloust, C. Schmidtke, J. P. Merkl, A. Feld, T. Schotten, U. E. A. Fittschen, M. Gehring, J. Ostermann, E. Poselt, H. Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 23244 – 23250; b) J. Ostermann, C. Schmidtke, C. Wolter, J. P. Merkl, H. Kloust, H. Weller, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 232 – 242; c) J. Ostermann, J. P. Merkl, S. Flessau, C. Wolter, A. Kornowksi, C. Schmidtke, A. Pietsch, H. Kloust, A. Feld, H. Weller, *ACS Nano* **2013**, *7*, 9156 – 9167.

Received: April 1, 2015
Revised: April 30, 2015
Published online: July 2, 2015

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

6.6.4 Synthesis of Iron Oxide Nanorods Using a Template Mediated Approach

In dieser Veröffentlichung wird die templatgesteuerte Synthese von extrem kleinen Eisenstäbchen beschrieben. Mein Beitrag zu dieser Veröffentlichung war das Schreiben des finalen Manuskriptes sowie die Analyse und Interpretation der Daten. Die Projektidee und die synthetische Durchführung stammen von Dr. Hauke Kloust,[291] die magnetische Charakterisierung maßgeblich von Dr. Robert Zierold. Reprinted with permission from *Synthesis of Iron Oxide Nanorods Using a Template Mediated Approach*, Hauke Kloust, Robert Zierold, Jan-Philip Merkl, Christian Schmidtke, Artur Feld, Elmar Poeselt, Andreas Kornowski, Kornelius Nielsch and Horst Weller, *Chem. Mater.* **2015**, 27, 4914-4917.[8] Copyright ©2015 American Chemical Society.

CHEMISTRY OF MATERIALS

Communication

pubs.acs.org/cm

Synthesis of Iron Oxide Nanorods Using a Template Mediated Approach

Hauke Kloust,[†,‡] Robert Zierold,[§] Jan-Philip Merkl,[†,‡] Christian Schmidtke,[†,‡] Artur Feld,[†,‡] Elmar Pöselt,[†,‡] Andreas Kornowski,[†,‡] Kornelius Nielsch,[§,#] and Horst Weller*[,†,‡,∥,⊥]

[†]Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

[‡]The Hamburg Center for Ultrafast Imaging, University of Hamburg, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany

[§]Institute of Nanostructure and Solid State Applied Physics, Jungiusstrasse 11, 20355 Hamburg, Germany

[∥]Center for Applied Nanotechnology (CAN) GmbH, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

[⊥]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Abdulaziz University, P.O Box 80203, Jeddah 21589, Saudi Arabia

Supporting Information

Iron oxide nanocrystals which behave superparamagnetically are used in the biomedical field as well as in technical applications.[1−4] For instance, iron oxide-based contrast agents, such as Feridex and Resovist to name a few of them, are already applied in clinical use for magnetic resonance imaging (MRI).[5] The most scalable, chemical synthesis routes result in iron oxide nanocrystals with spherical shape.[6,7] However, iron oxide nanocubes, which recently appeared, show an increased relaxivity compared to spherical crystals, and thus constitute the second generation of MRI contrast agents.[8−10] To further improve the functionality of iron oxide nanoparticles, a pronounced magnetic anisotropy would be favorable. Since the magnetic crystalline anisotropy is material dependent, tuning the shape anisotropy of the nanocrystals might be a solution to increase the effective magnetic anisotropy. On the one hand, the shape of magnetic nanoparticles consisting of cobalt or nickel can be controlled by varying the organic ligands in the synthesis route.[3,11−13] However, due to their toxic heavy metal content, these systems are not treated as biocompatible and thus cannot be used in clinic. On the other hand, the control of shape and aspect ratio of biocompatible iron oxide nanoparticles is quite challenging. Recently, a few strategies for tailor-made manipulation of the shape are reported in the literature. For instance, nanorods with a length larger than 100 nm can be produced, e.g., by hydrothermal[14,15] or by microwave-assisted synthesis.[16] When shorter nanorods are required, growth on seeds,[17] or on side facets of FeO nanocubes can be considered.[18] Si et al. present a method for a solvothermal preparation of iron oxide nanorods from 58 to 250 nm.[19] Other anisotropic nanoparticles such as nanowhiskers and tetrapods were produced by selective decomposition of an iron oleate complex or by a mix of three different surfactants, respectively.[20,21]

In this communication we present a versatile method that allows the synthesis of iron oxide nanorods directly from iron oleate in a one-step procedure. We propose a nonoriented attachment mechanism in the reaction sphere of a colloidal structure. This structure acts as the template for the attachment and may be destroyed by vacuum. We therefore assume that volatile compounds, such as water and ethanol, which occur during the iron oleate synthesis, form this soft template in combination with oleic acid and oleyl alcohol, which are present in the reaction mixture. The importance of the conservation of these colloidal structures is demonstrated by the transmission electron microscopy (TEM) images shown in Figure 1. If the iron oleate is only moderately dried after synthesis (10 mbar using a rotary evaporator), it consists of approximately 1% water and ethanol (∼6:1). By using this precursor as it is—without any drying of the reaction mixture—iron oxide nanorods are synthesized, as shown in Figure 1A.

However, when lower pressure (∼10^{-2} mbar) is applied to the reaction solution to remove the volatile compounds, no formation of nanorods can be observed. The product of such a synthesis route is displayed in Figure 1B and appears irregularly shaped, dot-like. Specifically, no significant elongation of the nanocrystals can be found.

The formed nanorods exhibit a mean length of approximately 24 nm and a mean diameter of 2.5 nm with an associated aspect ratio of 10. Compared to other template mediated syntheses of similar structures, the herein presented method allows the synthesis of particularly small and thin nanorods.[22−24] The corresponding histograms of diameter and length are displayed in Figure 1C. Noticeably, the formation of the rod building template structure is not possible by purely adding the required amounts of water and ethanol to the reaction solution, after drying in high vacuum. Therefore, we conclude that the template formation needed for the nanorod formation can only take place during the iron oleate synthesis due to chemical reaction kinetics.

A representative TEM micrograph of the iron oxide nanorods is shown in Figure 2A, where the alignment of a single-dot characteristic is apparent. The high resolution TEM image of iron oxide nanorods (Figure 2B) confirms this characteristic and shows the twisted crystal orientations of the single nanocrystals. To further confirm these twisted crystal orientations the nanorods were investigated by X-dray diffraction (XRD). As reported by us, an alignment of single nanocrystals along preferred crystal facettes—referred as oriented attachment—leads to pronounced and sharp XRD reflexes correlating with the respective crystallographic direction.[25,26] In Figure 2C an XRD pattern of the nanorods, taken on a dried sample deposited on a silicon waver, is presented. This pattern shows typical broadened

Received: February 9, 2015
Revised: June 22, 2015
Published: June 23, 2015

ACS Publications © 2015 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.chemmater.5b00513
Chem. Mater. 2015, 27, 4914−4917

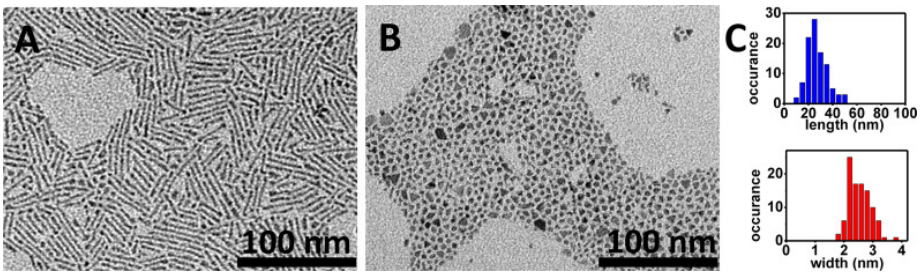


Figure 1. Influence of the application of vacuum on the formation of iron oxide nanorods. (A) Product of the nanorod synthesis, no vacuum was applied to the reaction solution. (B) Vacuum was applied to the reaction solution and no rods were formed. (C) Top histogram: nanorod length (blue), bottom: histogram of the nanorod width (red).

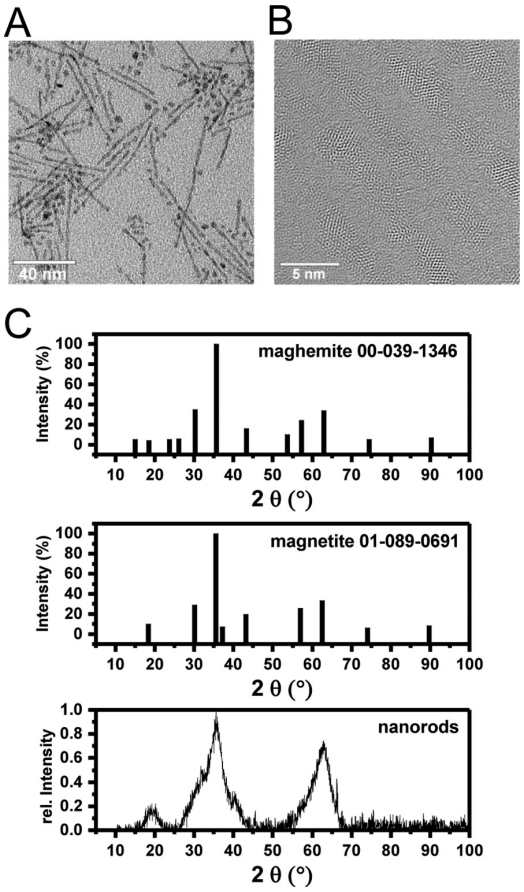


Figure 2. (A) Overview image of the iron oxide nanorods. (B) High resolution TEM image of iron oxide nanorods. (C) XRD diffraction pattern and reference pattern of maghemite (00-039-1346) and magnetit (01-089-0691) and the XRD diffraction pattern of the nanorods.

reflexes, taking the small crystallite domain sizes into account. Due to the absence of these sharp reflexes, we conclude a nonoriented attachment mechanism during the ironrod synthesis. The position of the peaks corresponds to maghemite (00-039-1346) or magnetite (01-089-0691). On the basis of the measured X-ray diffraction pattern it is not possible to distinguish between these two crystalline phases of iron oxide.

To determine the magnetic properties of the nanorods under concomitant analysis of their crystalline phase, superconducting quantum interference device (SQUID) magnetometry was conducted. Therefore, nanorods were dried on a glass/silicon substrate in the presence of a magnetic field: These measurements allow for insight in the micromagnetic properties, such as easy axis, coercive field, and blocking temperature, to name a few of them. Additionally, the saturation magnetization at high magnetic fields can also be used to deduce the crystalline phase of the iron oxide.

Temperature-dependent magnetization measurements (Figure 3A) indicate superparamagnetic behavior of the nanorods by a vanishing remanence at around 27 ± 5 K and a sharp maximum in the zero-field-cooled (ZFC) measurement at 11 ± 1 K.

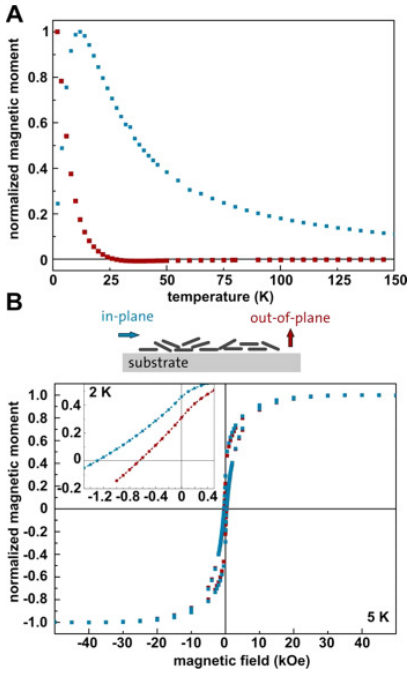


Figure 3. (A) Temperature-dependent SQUID measurements. Light-blue represents the data of a ZFC measurement with an obvious maximum at around 11 K. Remanence data is plotted in red. (B) Magnetization isotherm measurement at 5 K. The scheme illustrates the two measurement directions. The inset shows a zoom-in of the 2 K measurement revealing the large differences for the two mounting configurations.

DOI: 10.1021/acs.chemmater.5b00513
Chem. Mater. 2015, 27, 4914−4917

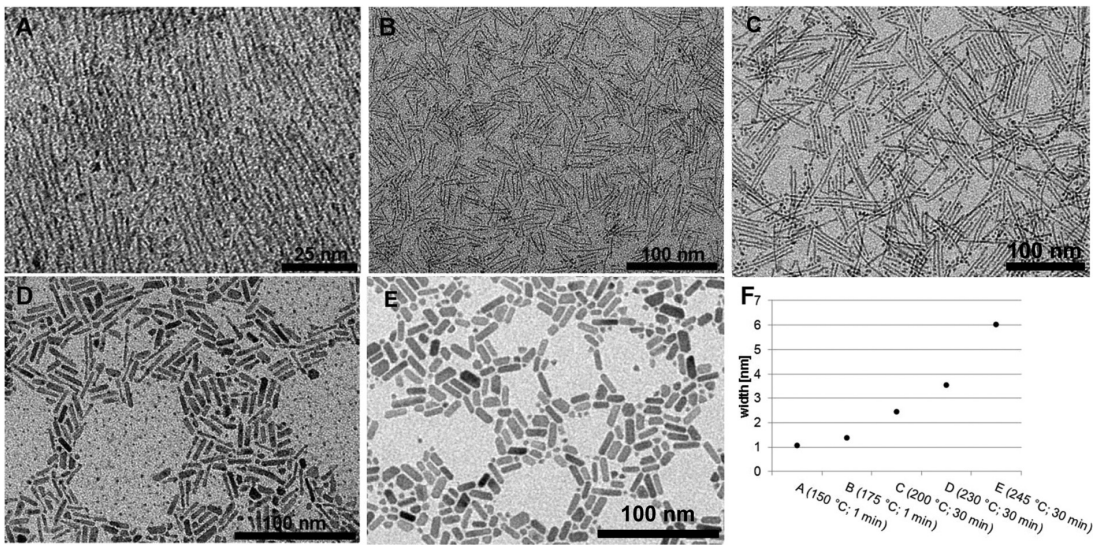


Figure 4. Size control of the iron oxide nanorods shown by TEM images of synthesis at different temperatures. (A) 150 °C, 1 min; (B) 175 °C, 1 min; (C) 200 °C, 30 min; (D) 230 °C, 30 min; (E) 245 °C, 30 min. (F) Diagram showing the influence of the reaction temperature and time on the nanorod width.

Isothermal magnetization measurements were realized in two different mounting configurations, namely, in-plane and out-of-plane as schematically drawn in the scheme in Figure 3B. Low-temperature measurements exhibit the typical features of remanence and coercivity expected for magnetic nanorods in the blocked state (Figure 3B). The saturation magnetization is estimated to be 370 ± 40 emu cm^{-3} by taking the dried amount of iron oxide nanorods into account; this value is close to the literature value of maghemite, thus supporting the presumption of mainly formed maghemite during the synthesis of iron oxide nanorods. Specifically, at 2 K (inset in Figure 3B), the squareness—remanent magnetization normalized to saturation magnetization—of the in-plane configuration amounts to 0.46 ± 0.01 compared to 0.31 ± 0.02 in the out-of-plane measurement. This observation indicates that the magnetic moment prefers to point along the long axis of the nanorods instead of a perpendicular alignment. Furthermore, the coercive field rises from 650 ± 20 Oe to 1300 ± 20 Oe (intersection with *x*-axis, compare inset Figure 3B) for the out-of-plane and in-plane configuration, respectively. Since the nanorods can be treated as a connected row of spherical nanocrystals possessing various crystal orientations as proved by TEM, this difference between the two mounting configurations cannot only be explained by magnetocrystalline anisotropy. Applying the Jacobs–Bean model[27]—chain of interacting spherical monodomain particles—allows for the calculation of the switching field of a single nanorod with its long axis parallel to the external magnetic field. Assuming a saturation magnetization of 400 emu cm^{-3} for maghemite and 10 particles forming a chain, the switching field can be calculated to 1310 Oe, being in good agreement with the experimental value. A deviation (of up to 60°) from the perfect parallel alignment would only result in a slight increase in the coercive field and rounding of the magnetization isotherms. In contrast, in the out-of-plane configuration—rod axis perpendicular to the field—a vanishing coercive field is theoretically expected. However, we attribute the apparent remanence and coercive field in the out-of-plane measurement to the magnetocrystalline anisotropy of the individual nanocrystals in the row. The coercive field of nanoparticles with a randomly oriented cubic anisotropy can be estimated to be between 160 and 800 Oe[28] assuming a magnetocrystalline anisotropy constant of 1×10^{-5} to 5×10^{-5} erg cm^{-3} as reported for maghemite nanoparticles.[29−32]

The length as well as the diameter of the rods is tuned by reaction time and temperature as indicated by the transmission electron microscopy images displayed in Figure 4A–E. The diameter of the nanorods increases with both reaction time and temperature (see Figure 4F). After 1 min at 150 °C iron oxide nanorods (A) with a width of 1.1 nm are synthesized. In the further course of the reaction, namely, a slight increase of reaction temperature to 175 °C, the width increases to 1.4 nm (B). Subsequently the diameter reaches 2.5 nm after 30 min at 200 °C (C). Consecutive increasing of the reaction temperature results in a further increase of the diameter up to 6.0 nm (E). Remarkably, the length of the iron oxide nanorods is almost constant until 200 °C; thus, this synthetic approach allows the aspect ratio to be tuned by setting a specific reaction temperature. At temperatures above 200 °C (D and E) the rods shorten down to 16 nm under concomitant increase in width. After this transformation, the single nanodots are not distinguishable anymore.

To conclude, we found a simple synthetic approach that directly allows the formation of iron oxide nanorods consisting of maghemite in a one-step synthesis. A templated effect is observed that is provided by a mixture of volatile compounds and can thus be degraded by vacuum. During the synthesis iron oxide nanodots are facilitated to attach to each other. In this nonoriented attachment, nanorods, still containing the crystalline structure of the individual nanocrystals, are synthesized. Especially the width can precisely be tuned between 1 and 6 nm by changing the reaction temperature and reaction time. Temperature- and magnetic field-dependent magnetization measurements reveal superparamagnetic behavior of the prepared iron oxide nanorods. In the blocked state the nanorods exhibit a magnetic easy axis parallel to the long axis of the nanorods caused by the enhanced shape anisotropy.

DOI: 10.1021/acs.chemmater.5b00513
Chem. Mater. 2015, 27, 4914−4917

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Experimental procedure, Instrumentation, and TEM histograms of iron oxide nanorods. The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.chemmater.5b00513.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(H.W.) E-mail: weller@chemie.uni-hamburg.de.

Present Address

#(K.N.) IfW Leibniz Institute for Solid State and Material Research Dresden, Helmholtzstrasse 20, 01069 Dresden, Germany.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the EU within the FP 7 program (Vibrant, EU 228933), the State Excellence Initiative "Nanotechnology in Medicine" from the Free and Hanseatic City of Hamburg, and SFB 986 M^3 (R.Z., K.N., A.F. & H.W.) of the German Research Foundation (DFG). Financial support for R.Z. was provided by the DFG NI616/18-1. J.-P.M. and H.W. acknowledge the support of the *Chemical Industry Fund, VCI: German Chemical Industry Association* and the *German-American Fulbright Program*.

■ REFERENCES

(1) Lee, N.; Hyeon, T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2575−2589.

(2) Sassin, M. B.; Mansour, A. N.; Pettigrew, K. A.; Rolison, D. R.; Long, J. W. Electroless Deposition of Conformal Nanoscale Iron Oxide on Carbon Nanoarchitectures for Electrochemical Charge Storage. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4505−4514.

(3) Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schueth, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222−1244.

(4) Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetische Nanopartikel: Synthese, Stabilisierung, Funktionalisierung und Anwendung. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1242−1266.

(5) Wang, Y. X. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2011**, *1*, 35−40.

(6) Hyeon, T.; Lee, S. S.; Park, J.; Chung, Y.; Na, H. B. Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12798−12801.

(7) Yu, W. W.; Falkner, J. C.; Yavuz, C. T.; Colvin, V. L. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem. Commun.* **2004**, 2306−2307.

(8) Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J.-G.; Noh, H.-J.; Kim, J.-Y.; Park, J.-H.; Hwang, N.-M.; Hyeon, T. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 891−895.

(9) Shavel, A.; Rodríguez-González, B.; Spasova, M.; Farle, M.; Liz-Marzán, L. M. Synthesis and Characterization of Iron/Iron Oxide Core/Shell Nanocubes. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 3870−3876.

(10) Lee, N.; Choi, Y.; Lee, Y.; Park, M.; Moon, W. K.; Choi, S. H.; Hyeon, T. Water-Dispersible Ferrimagnetic Iron Oxide Nanocubes with Extremely High r_2 Relaxivity for Highly Sensitive in Vivo MRI of Tumors. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 3127−3131.

(11) Dumestre, F.; Chaudret, B.; Amiens, C.; Respaud, M.; Fejes, P.; Renaud, P.; Zurcher, P. Unprecedented Crystalline Super-Lattices of Monodisperse Cobalt Nanorods. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5371−5374.

(12) Dumestre, F.; Chaudret, B.; Amiens, C.; Respaud, M.; Fejes, P.; Renaud, P.; Zurcher, P. Unprecedented crystalline super-lattices of monodisperse cobalt nanorods. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 5213−6.

(13) Cordente, N.; Respaud, M.; Senocq, F.; Casanove, M. J.; Amiens, C.; Chaudret, B. Synthesis and magnetic properties of nickel nanorods. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 565−568.

(14) Zhao, Y. M.; Li, Y.-H.; Ma, R. Z.; Roe, M. J.; McCartney, D. G.; Zhu, Y. Q. Growth and Characterization of Iron Oxide Nanorods/Nanobelts Prepared by a Simple Iron−Water Reaction. *Small* **2006**, *2*, 422−427.

(15) Chaudhari, N. K.; Yu, J.-S. Size Control Synthesis of Uniform β-FeOOH to High Coercive Field Porous Magnetic α-Fe_2O_3 Nanorods. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 19957−19962.

(16) Nadagouda, M. N.; Varma, R. S. Microwave-Assisted Shape-Controlled Bulk Synthesis of Ag and Fe Nanorods in Poly(ethylene glycol) Solutions. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *8*, 291−295.

(17) Park, S.-J.; Kim, S.; Lee, S.; Khim, Z. G.; Char, K.; Hyeon, T. Synthesis and Magnetic Studies of Uniform Iron Nanorods and Nanospheres. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8581−8582.

(18) Sun, H.; Chen, B.; Jiao, X.; Jiang, Z.; Qin, Z.; Chen, D. Solvothermal Synthesis of Tunable Electroactive Magnetite Nanorods by Controlling the Side Reaction. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 5476−5481.

(19) Si, J. C.; Xing, Y.; Peng, M. L.; Zhang, C.; Buske, N.; Chen, C.; Cui, Y. L. Solvothermal synthesis of tunable iron oxide nanorods and their transfer from organic phase to water phase. *CrystEngComm* **2014**, *16*, 512−516.

(20) Palchoudhury, S.; An, W.; Xu, Y.; Qin, Y.; Zhang, Z.; Chopra, N.; Holler, R. A.; Turner, C. H.; Bao, Y. Synthesis and Growth Mechanism of Iron Oxide Nanowhiskers. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 1141−1146.

(21) Cozzoli, P. D.; Snoeck, E.; Garcia, M. A.; Giannini, C.; Guagliardi, A.; Cervellino, A.; Gozzo, F.; Hernando, A.; Achterhold, K.; Ciobanu, N.; Parak, F. G.; Cingolani, R.; Manna, L. Colloidal Synthesis and Characterization of Tetrapod-Shaped Magnetic Nanocrystals. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1966−1972.

(22) Xu, X.; Cao, R.; Jeong, S.; Cho, J. Spindle-like Mesoporous alpha-Fe2O3 Anode Material Prepared from MOF Template for High-Rate Lithium Batteries. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 4988−4991.

(23) Qu, X.; Kobayashi, N.; Komatsu, T. Solid Nanotubes Comprising alpha-Fe2O3 Nanoparticles Prepared from Ferritin Protein. *ACS Nano* **2010**, *4*, 1732−1738.

(24) Manukyan, K. V.; Chen, Y. S.; Rouvimov, S.; Li, P.; Li, X.; Dong, S. N.; Liu, X. Y.; Furdyna, J. K.; Orlov, A.; Bernstein, G. H.; Porod, W.; Roslyakov, S.; Mukasyan, A. S. Ultrasmall alpha-Fe2O3 Superparamagnetic Nanoparticles with High Magnetization Prepared by Template-Assisted Combustion Process. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 16264−16271.

(25) Pacholski, C.; Kornowski, A.; Weller, H. Self-assembly of ZnO: From nanodots, to nanorods. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1188−1191.

(26) Pacholski, C.; Kornowski, A.; Weller, H. Selbstorganisation von ZnO: von Nanopartikeln zu Nanostäbchen. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1234−1237.

(27) Jacobs, I. S.; Bean, C. P. An Approach to Elongated Fine-Particle Magnets. *Phys. Rev.* **1955**, *100*, 1060−1067.

(28) Néel, L. Magnetisme - proprietes dun ferromagnetique cubique en grains fins. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1947**, *224*, 1488−1490.

(29) Hendriksen, P. V.; Bodker, F.; Linderoth, S.; Wells, S.; Morup, S. Ultrafine maghemite particles. I. Studies of induced magnetic texture. *J. Phys.: Condens. Matter* **1994**, *6*, 3081.

(30) Garcia-Otero, J.; Porto, M.; Rivas, J.; Bunde, A. Influence of the cubic anisotropy constants on the hysteresis loops of single-domain particles: A Monte Carlo study. *J. Appl. Phys.* **1999**, *85*, 2287−2292.

(31) Tronc, E.; Jolivet, J. P. Clustering and Magnetic Coupling. *J. Phys. Colloq.* **1988**, *49*, C8-1823−C8-1824.

(32) Shendruk, T. N.; Desautels, R. D.; Southern, B. W.; Lierop, J. v. The effect of surface spin disorder on the magnetism of γ-Fe_2O_3 nanoparticle dispersions. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 455704.

DOI: 10.1021/acs.chemmater.5b00513
Chem. Mater. 2015, 27, 4914−4917

6.6.5 Polymer-Assisted Self-Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Well-Defined Clusters: Controlling the Collective-Magnetic Properties

Diese Publikation befasst sich mit dem Clustern verschiedener Nanopartikel zu Strukturen höherer Ordnung und deren Charakterisierung. Die magnetischen Eigenschaften wie Blocktemperatur, Magnetoviskosität und Relaxivität sind abhängig von der Clustergröße, was auf einen magnetischen Austausch der Partikel schließen lässt. Ich war hier bei der Konzeptplanung und beim Verfassen des Manuskriptes involviert. Reprinted with permission from *Polymer-Assisted Self-Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Well-Defined Clusters: Controlling the Collective-Magnetic Properties*, Christian Schmidtke, Robin Eggers, Robert Zierold, Artur Feld, Hauke Kloust, Christopher Wolter, Johannes Ostermann, Jan-Philip Merkl, Theo Schotten, Kornelius Nielsch and Horst Weller, *Langmuir* **2014**, 30, 11190-11196.[10] Copyright ©2014 American Chemical Society.

Langmuir

Article

pubs.acs.org/Langmuir

Polymer-Assisted Self-Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Well-Defined Clusters: Controlling the Collective Magnetic Properties

Christian Schmidtke,*[,†,‡] Robin Eggers,[†,‡] Robert Zierold,[§] Artur Feld,[†,‡] Hauke Kloust,[†,‡] Christopher Wolter,[†,‡] Johannes Ostermann,[†,‡] Jan-Philip Merkl,[†,‡] Theo Schotten,[∥] Kornelius Nielsch,[§] and Horst Weller*[,†,‡,∥,⊥]

[†]Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

[‡]The Hamburg Center for Ultrafast Imaging, University of Hamburg, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany

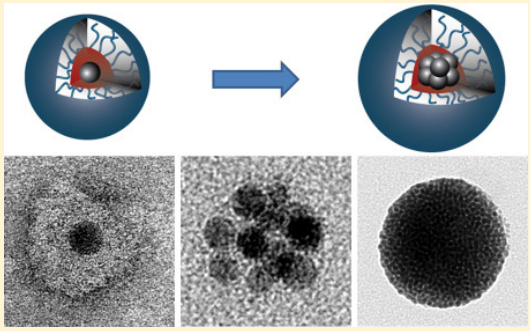
[§]Institute of Applied Physics, University of Hamburg, Jungiusstrasse 11, 20355 Hamburg, Germany

[∥]Center for Applied Nanotechnology, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

[⊥]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia

Supporting Information

ABSTRACT: The combination of superstructure-forming amphiphilic block copolymers and superparamagnetic iron oxide nanoparticles produces new nano/microcomposites with unique size-dependent properties. Herein, we demonstrate the controlled clustering of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs) ranging from discretely encapsulated SPIOs to giant clusters, containing hundreds or even more particles, using an amphiphilic polyisoprene-*block*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer. Within these clusters, the SPIOs interact with each other and show new collective properties, neither obtainable with singly encapsulated nor with the bulk material. We observed cluster-size-dependent magnetic properties, influencing the blocking temperature, the magneto-viscosity of the liquid suspension, and the r_2 relaxivity for magnetic iron oxide nanoparticles. The clustering methodology can be expanded also to other nanoparticle materials [CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell quantum dots (QDs), CdSe/CdS quantum dots/quantum rods (QDQRs), gold nanoparticles, and mixtures thereof].



INTRODUCTION

The self-assembly of block copolymers leads to ordered superstructures (micelles, vesicles, tubules, and gels),[1,2] which can be used as vehicles for drugs or contrast agents in targeted delivery.[3] For instance, water-soluble micelles form a hydrophobic inner core, in which hydrophobic dyes or drugs can be encapsulated and well-protected.[4] The outer sphere, consisting of hydrophilic blocks, provides solubility of the micellar container and ideally minimizes interactions with the biological environment.

However, in order to exploit the outstanding size-dependent properties of inorganic nanoparticles (NPs) in material and life science,[5] these particles need to be rendered water-soluble, because high-quality NPs are usually synthesized in organic high-boiling solvents—incompatible with biological systems.

By means of block copolymers, it is possible to encapsulate the hydrophobic particles under conservation of their characteristics and render them water-soluble.[6−8] Furthermore, multiple[9] or different NPs[10] can be assembled into ordered clusters within the polymeric container.[11] This leads to new functional materials with novel collective properties (magnetic−magnetic, magnetic−plasmonic, plasmonic−plasmonic, plasmonic−fluorescent, or magnetic−fluorescent interactions) not existent in singly encapsulated NPs or in the bulk material.[12−14] Another advantage of the clustering is the signal intensity enhancement for biological imaging applications. Gaining full control over the self-assembly of NPs into well-defined monodisperse clusters is still a formidable challenge, because of multifactorial parameters influencing the self-assembly process. Clusterization depends on the nature of the polymer, the NPs-to-polymer ratio,[11,15] the solvent composition,[16] temperature, and injection speed (shearing forces[17]).

Recently, we published a report on the micellar encapsulation of NPs by using an amphiphilic poly(isoprene)-*b*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer (PI-*b*-PEG).[18,19] This system can be further stabilized by cross-linking[20] or by introducing a

Received: June 5, 2014
Revised: August 21, 2014
Published: August 25, 2014

ACS Publications © 2014 American Chemical Society

polystyrene shell via an emulsion polymerization process.[21] Herein, we apply our methodology for the generation of nanoparticle (NP) clusters ranging from the nano- to the microscale. We also demonstrate how clustering of iron oxide NPs affects the magnetic properties, for instance, magneto-viscosity, blocking temperature, relaxivity, and coercivity.

EXPERIMENTAL SECTION

Instrumentation. (Hydro)dynamic light scattering (DLS) measurements were performed on Malvern Zetasizer Nano ZS system equipped with a single angle 173° backscatter system using He−Ne laser illumination at 633 nm. Ultraviolet−visible (UV−vis) absorption spectra were collected on Cary 50 (Varian). Fluorescence spectra were recorded on Eclipse (Varian) and on FluoroMax-4 (Horiba) instruments. TEM-Images were recorded with a JEOL JEM-1011 microscope. SEM images were recorded with a LEO 1550 Gemini from Zeiss (Oberkochen, Germany). Flame atomic absorption spectrometry was performed on a PE 5000 spectrometer from PerkinElmer. Relaxometric measurements were performed on a Minispec mq60 (1.41 T) from Bruker Optics (Ettlingen, Germany) at 37 °C. SQUID magnetometry was conducted in a MPMS-2 system by Quantum Design enabling a magnetic field up to ±10 kOe. The cryostat temperature was controlled between 2 and 300 K with an accuracy of 1 K. A piezomembrane axial vibrator apparatus (PMAV) by IdM Ulm equipped with a magnetic coil was employed to measure the complex apparent viscosity and the shear modulus of the liquid suspensions as a function of magnetic field and shear frequency.[22] The temperature-controlled PMAV setup can handle small volumes down to 100 μL, with a maximum applied magnetic field density of 1100 Oe perpendicular to the shear flow direction. Size exclusion measurements (SEC) were performed at 35 °C on a Tosoh EcoSEC HLC-8320GPC system, using three SDV columns (Polymer Standards Service) with a porosity range from 50 to 1000 Å and a SDV precolumn with THF as solvent (1 mg/mL) and eluent. The flow rate was set to 1 mL/min and detection was executed with a Tosoh RI detector. PEG standards (PSS) were used for calibration.

Synthesis. The block copolymers [polyisoprene-*block*-diethylene-triamine (PI-DETA) and PI-*b*-PEG] (see Table 1) and the CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell QDs were synthesized as described in ref 19.

Table 1. Analytical Data of the Copolymers

sample	M_W[a] (g/mol)	M_N[a] (g/mol)	M_W/M_N[a]	wt % PEG[b]
PI-*b*-PEG	11900	10500	1.13	67
PI-DETA	2050	1850	1.11	

[a]From SEC analysis, using a PEG calibration. [b]Calculated from NMR.

The iron oxide nanoparticles were synthesized as described by Yu et al.[23] The gold nanoparticles were synthesized according to Bastús et al.[24] The preparation of the CdSe/CdS QDQRs was performed following the protocol reported by Carbone et al.[25]

Methods. *Phase Transfer.* NPs were incubated with a 600−1000 molar excess of PI-DETA (average $M_W \sim 2$ kDa). After 3 h, NPs were precipitated with ethanol from the *n*-hexane solution and directly encapsulated by adding the PI-*b*-PEG (average $M_W \sim 11.9$ kDa) ligand. Thus, an aliquot of 20 nmol of PI-DETA-coated NPs was removed and dried under N_2 flow. The dried NPs were resuspended with a 25−400-fold excess of PI-*b*-PEG ligands in 2 mL of THF. AIBN was added in the half mass ratio as the used diblock copolymer, and three different injection methods were performed.

Phase Transfer via Syringe by Hand. This solution was injected into stirred (200 rpm) water (18 mL) via syringe and incubated for 15−30 min at room temperature. Critical step: The injection needle has to be placed into the water and the injection of air bubbles should be avoided.

Phase Transfer via Syringe Pump. This solution was injected into stirred (200 rpm) water (18 mL) via syringe pump (KDS100 from KD Scientific) and incubated for 15−30 min at room temperature. Critical step: The injection needle has to be placed into the water, and the injection of air bubbles should be avoided.

Phase Transfer via Microfluidic. The phase transfer was realized using a computer-controlled flow system (neMESYS pumps from cetoni, Gera, Germany) which is equipped with a microfluidic reactor chip as described by Thiermann et al.[26] The THF/superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs)/polymer solution was mixed via a microfluidic chamber (microstructure = 45 μm in diameter) with water (total flow rate = 16 mL/min), whereas the flow of the THF/SPIOs/polymer phase and the water phase was always kept constant at 1:9. Afterward, the solution was incubated for 15−30 min at room temperature.

Cross-Linking. After phase transfer, the resulting solution was subsequently heated to 80 °C for 2−3 h to initiate cross-linking. The resulting NP solution was filtered through a syringe filter (CE, hydrophilic, 0.45 μm) and washed twice with 8 mL of water in centrifugal filter units (Amicon Ultra-15, 100 kDa membrane). Purification, e.g., removal of empty micelles (without NPs), was accomplished via sucrose gradient centrifugation[19] and HPLC or, in the case of iron oxide nanoparticles (FeO_X-NPs), with magnetic columns.[21]

For magnetometry and magnetorheological measurements, FeO_X-NPs−polymer clusters of three different sizes were transferred to a diethylene glycol/water mixture with a volume ratio of 7:3. The concentration of the liquid suspension was kept constant at 96 g of Fe per 1 L of carrier liquid.

Determination of the Iron Concentration. The iron concentration was determined by flame atomic absorption spectrometry. Therefore, the encapsulated SPIOs were dissolved in 32.5% nitric acid (suprapur) for 2 h at 75 °C.

Magnetization Isotherms. Magnetization isotherms were measured in an in-house-made Teflon sample holder at 2 and 300 K. Temperature-dependent measurements, namely, field-cooled (FC) and zero-field-cooled (ZFC) measurements, were conducted between 5 and 300 K with increments of 2 K. For a FC measurement a small magnetic field of 100 Oe was applied at a cryostat temperature of 300 K and the absolute magnetic moment was measured during down cooling. The ZFC procedure was performed in two steps: First, the sample was cooled from 300 to 2 K in zero magnetic field. Then, a magnetic field of 100 Oe was applied and the magnetic moment was measured during warm-up.

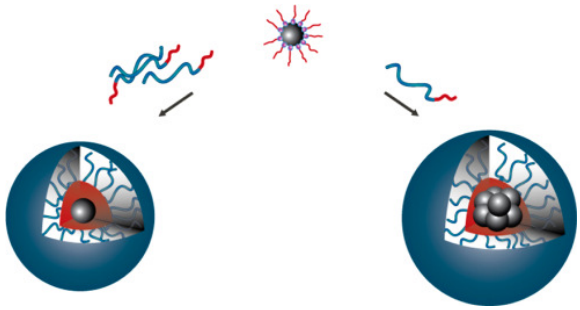
Magnetorheological Measurements. Magnetorheological measurements were performed by loading 100 μL of the liquid suspension into the PMAV setup. After thermal equilibration of about 10 min, the viscosity was measured at zero magnetic field and subsequently at an applied magnetic field of 1100 Oe controlled by the current flow through the magnetic coil. After an equilibration period of 10 min the measurement procedure was repeated. The absolute deviation between the two magnetoviscosity measurements was less than 1%. All measurements were carried out at 20 ± 0.2 °C.[27]

RESULTS AND DISCUSSION

Clustering of NPs was achieved by using the well-established PI-*b*-PEG diblock copolymer system with some minor modifications, namely, by varying the injection method as well as the polymer:NP ratio. The phase transfer included a three-stage process: (1) the native ligands on the NP's surface were exchanged by PI-DETA; (2) the PI-DETA-coated NPs were mixed with the PI-*b*-PEG diblock copolymer and transferred into water, under spontaneous formation of micelles, entrapping the NPs in the hydrophobic cores; and (3) the hydrophobic blocks were cross-linked by thermal treatment in the presence of a radical initiator, for instance, AIBN.[20] This led to ultrastable micelles with a fixed ligand shell around the particles. The ratio of diblock copolymers to particles determines the particle content and the final size of the micelle. A high ratio favors the formation of discretely

encapsulated NPs, whereas at a low ratio the relative depletion of polymer enforces particle clusterization (see Scheme 1).

Scheme 1. Schematic Representation of the PI-*b*-PEG Diblock Copolymer Encapsulation of Single or Multiple NPs



In this study, FeO_X-NPs 8 nm in diameter were coated with PI-DETA and then encapsulated with different amounts of PI-*b*-PEG diblock copolymer wiyh a polymer:NP ratio ranging from 20:1 to 400:1. Different injection methods were tested. By careful control of the conditions we were able to produce hydrodynamic diameters of FeO_X-NPs micelles from 54 to 750 nm (see Figure 1 and selected TEM/SEM overview images in the Supporting Information). In general, a 300−500-fold access of polymer per particle (with diameter between 5 and 10 nm) led predominantly to singularly encapsulated NPs, because the polymer concentration is sufficient to saturate the hydrophobic surface of the particles.[11] However, empty micelles, not enclosing any NPs, were concomitantly formed. These empty micelles and larger aggregates were removed either via sucrose gradient centrifugation and HPLC/centrifugal filter units or—if appropriate—via magnetic separation. Reversely, reduced amounts of polymer induced clustering of NP clusters, due to entropic effects of minimizing the hydrophobic surface exposed to the aqueous environment.

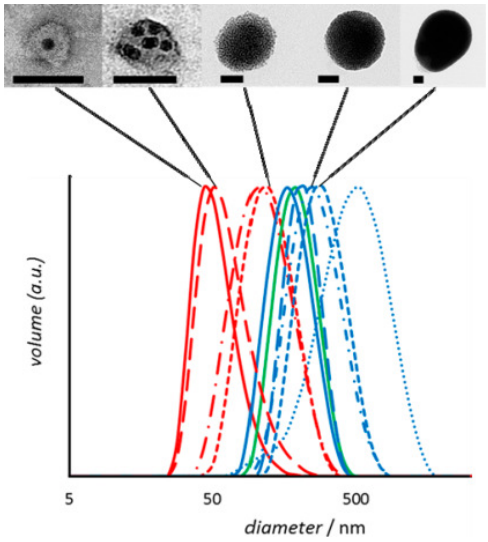


Figure 1. TEM images (scale bar = 50 nm) and hydrodynamic diameter by DLS (volume-weighted distribution) of SPIO clusters. Peak values of the curves from left to right with corresponding polymer:NP ratio and injection method (red, microfluidic mixing chamber with a flow of 16 mL/min; blue, syringe pump with a flow of 0.16 mL/min; and green, syringe via hand with a flow of 1 mL/min): 54 nm (400:1), 66 nm (200:1), 89 nm (50:1), 95 nm (30:1), 179 nm (400:1), 216 nm (50:1), 225 nm (100:1), 328 nm (50:1), 352 nm (25:1), and 747 nm (20:1).

Computer-controlled microfluidic mixing chambers (microstructure of 45 μm) provide excellent control over mixing and flow rate.[17] As a result, the reproducibility of NP micelles is greatly improved compared to the manual process. Interestingly, constant polymer:NP ratios at increased flow rates provided smaller cluster sizes, due to higher shear forces. A detailed comparison of the advantages and disadvantages of the different phase transfer methods is given in Table 2.

By using amphiphilic PI-*b*-PEG diblock polymer with a low PEG proportion of 25 wt %, large vesicular polymer−NP constructs in sizes between 0.5 and 20 μm rather than micelles were obtained, similar to previous findings.[28]

The clusterization methodology was successfully extended also to CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell quantum dots (QDs), CdSe/CdS quantum dots/quantum mrods (QDQRs), gold NPs, and mixtures thereof, resulting in new hybrid nanomaterials (Figure 2). As expected, the collective optical properties of these micellar constructs distinctively depend on the cluster size. The absorption and emission spectra of clusters containing semiconductor QDs or QDQRs showed changes due to size-induced scattering, influencing each other mutually (possible energy transfer/cross-talk) (see Figures S7, S8, S9, and S10, Supporting Information). The clustering of plasmonic Au NPs within a micelle led as well to more scattering and to plasmon coupling (dipole moments), with a concomitant shifting of plasmon frequencies.[29,14] These findings will be reported soon. Albeit we achieved excellent control over the size of the hybrid micelles as well as the overall number of coencapsulated NPs, the composition of the heterogeneous NP payload was statistical; i.e., micelles containing different numbers of diverse NPs were obtained. The mutual physical interactions of the various heterogeneous NP collectives, e.g., QDs and Au NPs, from fluorescence quenching, energy transfer, or concurring light absorption processes,[30] imposed special challenges on the characterization of these micelle preparations.

Collective Magnetic Properties. The magnetic properties of the iron oxide clusters were studied, in particular their relaxivity, blocking temperature, and magnetoviscosity, in a suspension as a function of diameter. With increasing cluster size (i.e., aggregation number) the magnetic moment of the cluster increased. A very important application for magnetic NPs is their use as contrast agent in MRI.[31] The quality of a negative contrast agent is described by the relaxivity r_2, whereby large r_2 values are preferred. However, r_2 is determined by two counteracting phenomena resulting from aggregation number and diameter of the clusters. As described by Gillis et al. first, the relaxivity increases with increasing cluster size.[32−34] This regime is called the motional averaging regime (MAR). But with further increasing cluster size, r_2 reaches the static dephasing regime (SDR), where it stays constant and decreases in the echo limiting regime (ELR). Experimentally, the effects were examined by Pöselt et al., using a PEI-*b*-PCL-*b*-PEG triblock copolymer for the encapsulation of the FeO_X-NPs.[35] Accordingly, the PI-*b*-PEG-stabilized clusters showed a similar behavior. Clusters with hydrodynamic diameters of 54, 89, and 96 nm showed a nearly linear increase of r_2 relaxivities of 131,

Table 2. Evaluation of Different Mixing Methods

mixing method	scalability (nmol)	reproducibility	technical effort	phase of material flow
syringe by hand	20−30	moderate	low	polymer/NP/THF
syringe via pump	20−30	good	moderate	polymer/NP/THF
microfluidic	200−300	very good	high[a]	polymer/NP/THF and water

[a]Possible clogging of the microstructure under frequent use.

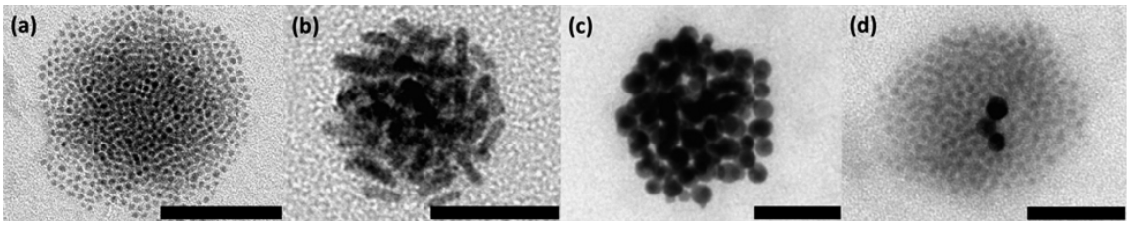


Figure 2. TEM images of clustered (a) CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell QDs, (b) CdSe/CdS QDQRs, (c) gold NPs, and (d) QDs with gold NPs. Scale bar = 100 (a) and 50 nm (b−d).

250, and 353 mM^{-1} s^{-1}, with a sharp drop to a mere 16 mM^{-1} s^{-1} when the cluster size grew to 216 nm (DLS data).

The suspensions with cluster sizes of 54, 96, and 216 nm were subjected to SQUID magnetometry. Hysteresis curves at 5 K of all liquid suspensions (as exemplarily displayed for clusters with a hydrodynamic diameter of 216 nm in Figure 3a) displayed an open graph regarding remanence and coercive field, thus proving the permanent ferrimagnetism of the iron oxide clusters. In detail, the coercive field is increased from 32 ± 5 to 60 ± 5 Oe for increasing cluster size (Table 3). In contrast, a closed hysteresis curve is measured at 300 K without remanence and coercive field for all three studied cluster sizes. Whereas the particles are immobilized at 5 K under matrix conditions in the carrier liquid, Brownian relaxation in liquid suspension at 300 K has to be considered as a possible reason for the disappearance of coercivity and remanence. However, superparamagnetism in NPs has to be taken into account as a possible reason, too. Therefore, temperature-dependent FC and ZFC measurements [exemplarily shown in Figures 3b and S6 (Supporting Information) for the liquid suspension of 216 nm clusters] were conducted. Especially, the saturating behavior of the FC curve at low temperatures, the obvious peak in the ZFC curve (blocking temperature), and the splitting temperature of the two superimposed curves between 125 and 175 K strongly indicate superparamagnetism. Herein, the clusters (or the individual particles in the clusters) act as permanent magnets (in a blocked state) below the blocking temperature—the temperature of the peak in the ZFC curve—and become superparamagnetic (unblocked) above it. At the blocking temperature, the thermal energy exceeds the magnetic anisotropy energy of the single-domain particles, leading to a fluctuation of the magnetic moment's direction inside the individual particle.[36] Interestingly, the blocking temperature also increased with increasing cluster size (Figure 3c), as the coercive field. Since the particle size distribution in the clusters is identical in the three liquid suspensions, the determining factors are the number of particles per cluster as well as the interparticle distance. Taheri et al. have shown that similarly produced PI-DETA-coated SPIOs form well-ordered densely packing structures (body-centered cubic or face-centered cubic phases).[37] Therefore, we assume that the interparticle distance is also identical in the three samples. Differences in the interparticle distance on the TEM images can be explained as artifacts from evaporation of the stabilizing solvent and vacuum-induced flattening of the micelle on the TEM grid. Thus, the number of NPs per micelle can be regarded as the sole causation. In general, the dipolar interaction energy between nanoparticles in ensembles cannot be neglected and significantly influences the physical properties of the ensembles.[38−40] Specifically, in our case, the dipolar energy between two iron oxide nanoparticles inside one cluster is on the order of the thermal energy at the blocking temperature (further information to the calculation is given in the Supporting Information), being in good agreement with other estimations.[41] More NPs in a cluster lead to stronger dipolar interactions, which result in an increased coercive field at low temperatures, as well as to a blocking-temperature shift to higher temperatures.[42−46] Notably, as the dipolar field decreases with d^{-3} and considering the high dilution of the liquid suspension, dipolar coupling between two clusters can be neglected.

To conclude, the herein proposed synthesis route of the iron oxide−polymer clusters allows for influencing the magnetic properties of the (frozen) liquid suspension by adjusting the number of iron oxide particles per cluster. Such a precise adjustment of the low-temperature coercive field or the blocking temperature is not possible by only controlling the size of the particles: An increase of the NP diameter from 8 to 10 nm would increase the blocking temperature by more than 10 K. A controlled tuning of the collective properties of the individual clusters might be of special interest in biomedical applications like biosensing, drug delivery, and hyperthermia, to name a few of them.[47]

Magnetorheological Measurements: A Proof of Concept. Magnetic liquid suspensions based on spherical (superparamagnetic) NPs can be utilized as ferrofluids that increase their apparent viscosity (η_B) in an applied magnetic field. The viscosity increase is called magnetoviscosity (or magnetoviscous effect) and is defined as the viscosity increase normalized to the zero-field viscosity[48] (η_0): $(\eta_B - \eta_o)/(\eta_o)$.

Three liquid suspensions of PI-*b*-PEG-encapsulated SPIOs of different cluster sizes were prepared for intended biomedical use. Interestingly, when applying a magnetic field to these samples, a small but significant increase of the viscosity was detectable. Assumedly, the effect is more pronounced at iron concentrations higher than 96 mg/L Fe, chosen herein in order

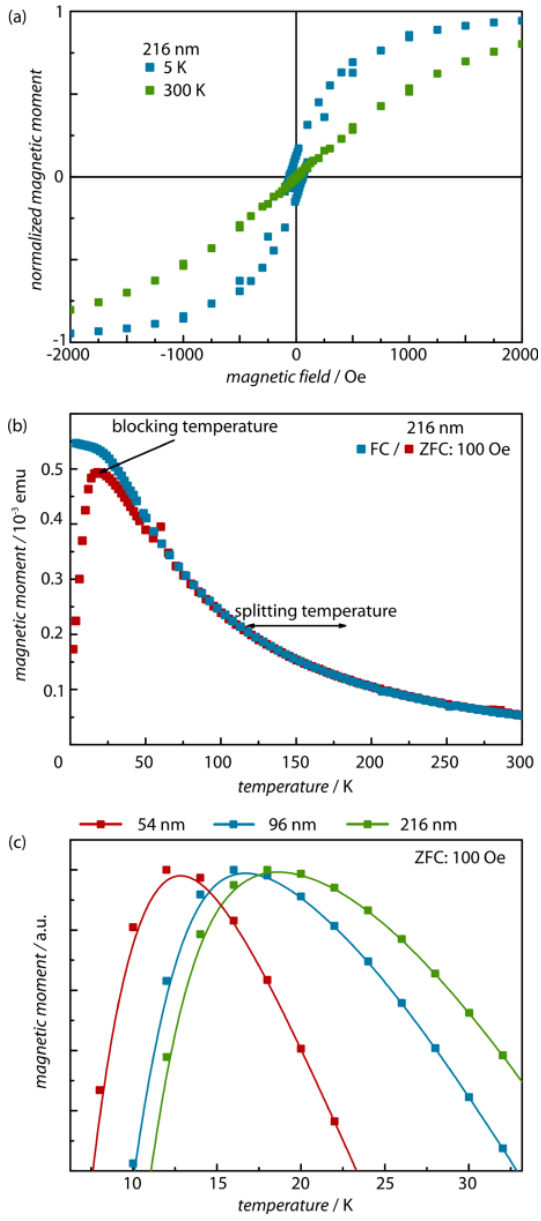


Figure 3. (a) Hysteresis curves at 5 and 300 K of SPIO clusters with a hydrodynamic diameter of 216 nm and (b) corresponding temperature-dependent FC and ZFC measurements. (c) The blocking temperature for the SPIO cluster sizes: 54 nm (red), 96 nm (blue), and 216 nm (green).

to avoid solubilization issues. This trend corresponds to magnetometry data recorded previously:[49,50] A larger cluster size results in a larger magnetoviscosity (Table 3). Remarkably, this was achieved with SPIOs of diameters as small as 8 nm. Typically, much larger SPIOs and higher Fe concentration are needed to induce these effects.

As discussed in the previous section, the individual NP diameter and the interparticle distances inside the clusters can be considered to be identical in all samples. In a future study, we will systematically vary SPIO diameters, interparticle distance, and overall iron concentration, in order to elucidate magnetoviscous effects in detail. This will open new avenues to ferrofluids with precisely controlled, tunable magnetic and magnetorheological properties.

CONCLUSION

Relaxometry, temperature-dependent magnetization, and magnetorheological measurements of defined superparamagnetic iron oxide nanoparticle clusters substantiated the relationships between cluster size (aggregation number) and the magnetic properties. In particular, it was proven that the magnetic moment per cluster is the sum of the magnetic moments of the encapsulated SPIOs and that collective effects were generated by dipolar interaction of the SPIOs within the clusters. The latter effect can be used to tune the blocking temperature, as well as the magnetoviscosity of the liquid suspension. As expected, r_2 relaxivity changed with cluster size, hence allowing the optimization of SPIO clusters as a negative contrast agent for MRT. Future investigations will elucidate the effects of nanoparticle size and interparticle distances on the magnetic properties of nanoparticular clusters in detail.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

TEM and SEM overview images of different samples of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-clusters, a comparison of two ZFC measurements for the 216 nm cluster, details of the estimation of the dipolar energy, and absorption and emission spectra of singly and multiple encapsulated QDs/QDQRs. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*C.S. e-mail: schmidtke@chemie.uni-hamburg.de.
*H.W. e-mail: weller@chemie.uni-hamburg.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the EU within the FP 7 program (Vibrant, EU 228933), the State Excellence Initiative "Nanotechnology in Medicin", the German Research Foundation (DFG) SFB 986, the DFG Priority Program SPP 1313 (DFG WE-2059/8-2), and the DFG project NI-616/18-1. We gratefully acknowledge Prof. Carl E. Krill III, Institute of

Table 3. Magnetic Data of Different SPIO Cluster Sizes

cluster size/nm	coercive field[a]/Oe	blocking temp/K	magnetoviscosity/%
54	32	12	1.5
96	47	16	4
216	60	18	6.5

[a]At 5 K.

Micro and Nanomaterials, Ulm University, for lending the PMAV setup to the University of Hamburg. We would like to thank Dr. Neus Gómez Bastús [Institut Català de Nanotecnologia (ICN), Barcelona, Spain], Dr. Huong Tran, Dr. Jan Niehaus, Sören Becker, and Sascha Ehlert for the support and for valuable discussions. We thank Andreas Kornowski (Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg) for the SEM images. Furthermore, we thank 2layers and specifically Frederik Schmidtke for the graphic design.

■ REFERENCES

(1) Förster, S.; Plantenberg, T. From Self-Organizing Polymers to Nanohybrid and Biomaterials. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41* (5), 688−714.
(2) Cabral, H.; Kataoka, K. Multifunctional Nanoassemblies of Block Copolymers for Future Cancer Therapy. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2010**, *11* (1), 014109.
(3) Blanazs, A.; Armes, S. P.; Ryan, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and Their Biological Applications. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30* (4-5), 267−277.
(4) Oerlemans, C.; Bult, W.; Bos, M.; Storm, G.; Nijsen, J. F.; Hennink, W. Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (12), 2569−2589.
(5) Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1025−1102.
(6) Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. *Science* **2002**, *298* (5599), 1759−1762.
(7) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. *Nano Lett.* **2004**, *4* (4), 703−707.
(8) Kang, Y.; Taton, T. A. Core/Shell Gold Nanoparticles by Self-Assembly and Crosslinking of Micellar, Block-Copolymer Shells. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44* (3), 409−412.
(9) Kim, B.-S.; Qiu, J.-M.; Wang, J.-P.; Taton, T. A. Magnetomicelles: Composite Nanostructures from Magnetic Nanoparticles and Cross-Linked Amphiphilic Block Copolymers. *Nano Lett.* **2005**, *5* (10), 1987−1991.
(10) Kim, B.-S.; Taton, T. A. Multicomponent Nanoparticles Via Self-Assembly with Cross-Linked Block Copolymer Surfactants. *Langmuir* **2006**, *23* (4), 2198−2202.
(11) Rhyner, M. N.; Smith, A.; Nie, S. Micellar Structures, Methods of Making Micellar Structures, Methods of Imaging, and Methods of Delivering Agents. WO patent: WO2008137733 A3, 2008.
(12) He, J.; Liu, Y.; Babu, T.; Wei, Z.; Nie, Z. Self-Assembly of Inorganic Nanoparticle Vesicles and Tubules Driven by Tethered Linear Block Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (28), 11342−11345.
(13) Li, W.; Liu, S.; Deng, R.; Wang, J.; Nie, Z.; Zhu, J. A Simple Route to Improve Inorganic Nanoparticles Loading Efficiency in Block Copolymer Micelles. *Macromolecules* **2013**, *46* (6), 2282−2291.
(14) Sánchez-Iglesias, A.; Grzelczak, M.; Altantzis, T.; Goris, B.; Pérez-Juste, J.; Bals, S.; Van Tendeloo, G.; Donaldson, S. H.; Chmelka, B. F.; Israelachvili, J. N.; Liz-Marzán, L. M. Hydrophobic Interactions Modulate Self-Assembly of Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6* (12), 11059−11065.
(15) Sanchez-Gaytan, B. L.; Cui, W.; Kim, Y.; Mendez-Polanco, M. A.; Duncan, T. V.; Fryd, M.; Wayland, B. B.; Park, S.-J. Interfacial Assembly of Nanoparticles in Discrete Block-Copolymer Aggregates. *Angew. Chem.* **2007**, *119* (48), 9395−9398.
(16) Hickey, R. J.; Haynes, A. S.; Kikkawa, J. M.; Park, S.-J. Controlling the Self-Assembly Structure of Magnetic Nanoparticles and Amphiphilic Block-Copolymers: From Micelles to Vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (5), 1517−1525.
(17) Wang, C.-W.; Oskooei, A.; Sinton, D.; Moffitt, M. G. Controlled Self-Assembly of Quantum Dot−Block Copolymer Colloids in Multiphase Microfluidic Reactors. *Langmuir* **2009**, *26* (2), 716−723.
(18) Pöselt, E.; Schmidtke, C.; Fischer, S.; Peldschus, K.; Salamon, J.; Kloust, H.; Tran, H.; Pietsch, A.; Heine, M.; Adam, G.; Schumacher, U.; Wagener, C.; Förster, S.; Weller, H. Tailor-Made Quantum Dot and Iron Oxide Based Contrast Agents for in Vitro and in Vivo Tumor Imaging. *ACS Nano* **2012**, *6* (4), 3346−3355.
(19) Schmidtke, C.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Pietsch, A.; Kloust, H.; Tran, H.; Schotten, T.; Bastús, N. G.; Eggers, R.; Weller, H. Amphiphilic, Cross-Linkable Diblock Copolymers for Multifunctionalized Nanoparticles as Biological Probes. *Nanoscale* **2013**, *5* (16), 7433−7444.
(20) Schmidtke, C.; Lange, H.; Tran, H.; Ostermann, J.; Kloust, H.; Bastús, N. G.; Merkl, J.-P.; Thomsen, C.; Weller, H. Radical Initiated Reactions on Biocompatible CdSe-Based Quantum Dots: Ligand Cross-Linking, Crystal Annealing, and Fluorescence Enhancement. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (16), 8570−8578.
(21) Kloust, H.; Schmidtke, C.; Feld, A.; Schotten, T.; Eggers, R.; Fittschen, U. E. A.; Schulz, F.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Bastús, N. G.; Weller, H. In Situ Functionalization and PEO Coating of Iron Oxide Nanocrystals Using Seeded Emulsion Polymerization. *Langmuir* **2013**, *29* (15), 4915−4921.
(22) Kirschenmann, L. Aufbau Zweier Piezoelektrischer Sonden (PRV/PAV) Zur Messung der Viskoelastischen Eigenschaften Weicher Substanzen im Frequenzbereich 0,5 Hz−2 kHz bzw. 0,5 Hz−7 kHz. Ph.D. thesis, Ulm University, Ulm, Germany, 2003.
(23) Yu, W. W.; Falkner, J. C.; Yavuz, C. T.; Colvin, V. L. Synthesis of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystals by Thermal Decomposition of Iron Carboxylate Salts. *Chem. Commun.* **2004**, *20*, 2306−2307.
(24) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing Versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098−11105.
(25) Carbone, L.; Nobile, C.; De Giorgi, M.; Sala, F. D.; Morello, G.; Pompa, P.; Hytch, M.; Snoeck, E.; Fiore, A.; Franchini, I. R.; Nadasan, M.; Silvestre, A. F.; Chiodo, L.; Kudera, S.; Cingolani, R.; Krahne, R.; Manna, L. Synthesis and Micrometer-Scale Assembly of Colloidal CdSe/CdS Nanorods Prepared by a Seeded Growth Approach. *Nano Lett.* **2007**, *7* (10), 2942−2950.
(26) Thiermann, R.; Mueller, W.; Montesinos-Castellanos, A.; Metzke, D.; Löb, P.; Hessel, V.; Maskos, M. Size Controlled Polymersomes by Continuous Self-Assembly in Micromixers. *Polymer* **2012**, *53* (11), 2205−2210.
(27) Wu, Z.; Zierold, R.; Mueller, A.; Ruff, S. E.; Ma, C.; Khan, A. A.; Geiger, F.; Sommer, B. A.; Knez, M.; Nielsch, K.; Bittner, A. M.; Wege, C.; Krill, C. E. Preparation and Magnetoviscosity of Nanotube Ferrofluids by Viral Scaffolding and ALD on Porous Templates. *Phys. Status Solidi B* **2010**, *247* (10), 2412−2423.
(28) Krack, M.; Hohenberg, H.; Kornowski, A.; Lindner, P.; Weller, H.; Förster, S. Nanoparticle-Loaded Magnetophoretic Vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (23), 7315−7320.
(29) Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A. M.; Goldsmith, E. C.; Baxter, S. C. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (12), 1721−1730.
(30) Schmidtke, C.; Kloust, H.; Bastús, N. G.; Merkl, J.-P.; Tran, H.; Flessau, S.; Feld, A.; Schotten, T.; Weller, H. A General Route towards Well-Defined Magneto- or Fluorescent-Plasmonic Nanohybrids. *Nanoscale* **2013**, *5* (23), 11783−94.
(31) Na, H. B.; Song, I. C.; Hyeon, T. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (21), 2133−2148.
(32) Gillis, P.; Moiny, F.; Brooks, R. A. On T2-Shortening by Strongly Magnetized Spheres: A Partial Refocusing Model. *Magn Reson Med.* **2002**, *47* (2), 257−263.
(33) Gossuin, Y.; Gillis, P.; Hocq, A.; Vuong, Q. L.; Roch, A. Magnetic Resonance Relaxation Properties of Superparamagnetic

Particles. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1* (3), 299−310.
(34) Vuong, Q. L.; Gillis, P.; Gossuin, Y. Monte Carlo Simulation and Theory of Proton NMR Transverse Relaxation Induced by Aggregation of Magnetic Particles Used as MRI Contrast Agents. *J. Magn. Reson.* **2011**, *212* (1), 139−148.
(35) Pöselt, E.; Kloust, H.; Tromsdorf, U.; Janschel, M.; Hahn, C.; Maßlo, C.; Weller, H. Relaxivity Optimization of a PEGylated Iron-Oxide-Based Negative Magnetic Resonance Contrast Agent for T2-Weighted Spin−Echo Imaging. *ACS Nano* **2012**, *6* (2), 1619−1624.
(36) Knobel, M.; Nunes, W. C.; Socolovsky, L. M.; De Biasi, E.; Vargas, J. M.; Denardin, J. C. Superparamagnetism and Other Magnetic Features in Granular Materials: A Review on Ideal and Real Systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8* (6), 2836−2857.
(37) Taheri, S. M.; Fischer, S.; Trebbin, M.; With, S.; Schröder, J. H.; Perlich, J.; Roth, S. V.; Forster, S. Lyotropic Phase Behavior of Polymer-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *Soft Matter* **2012**, *8* (48), 12124−12131.
(38) García-Otero, J.; Porto, M.; Rivas, J.; Bunde, A. Influence of Dipolar Interaction on Magnetic Properties of Ultrafine Ferromagnetic Particles. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84* (1), 167−170.
(39) Poddar, P.; Telem-Shafir, T.; Fried, T.; Markovich, G. Dipolar Interactions in Two- and Three-Dimensional Magnetic Nanoparticle Arrays. *Phys. Rev. B* **2002**, *66* (6), 060403−1-060403-4.
(40) Hiroi, K.; Komatsu, K.; Sato, T. Superspin Glass Originating from Dipolar Interaction with Controlled Interparticle Distance among γ-Fe_2O_3 Nanoparticles with Silica Shells. *Phys. Rev. B* **2011**, *83* (22), 224423-1−224423-9.
(41) Varón, M.; Beleggia, M.; Kasama, T.; Harrison, R. J.; Dunin-Borkowski, R. E.; Puntes, V. F.; Frandsen, C. Dipolar Magnetism in Ordered and Disordered Low-Dimensional Nanoparticle Assemblies. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1−5.
(42) Mørup, S.; Hansen, M. F.; Frandsen, C. Magnetic Interactions between Nanoparticles. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2010**, *1*, 182−190.
(43) Bae, C. J.; Angappane, S.; Park, J.-G.; Lee, Y.; Lee, J.; An, K.; Hyeon, T. Experimental Studies of Strong Dipolar Interparticle Interaction in Monodisperse Fe_3O_4 Nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91* (10), 102502-1−102502-3.
(44) Dormann, J. L.; D'Orazio, F.; Lucari, F.; Tronc, E.; Prené, P.; Jolivet, J. P.; Fiorani, D.; Cherkaoui, R.; Noguès, M. Thermal Variation of the Relaxation Time of the Magnetic Moment of γ-Fe_2O_3 Nanoparticles with Interparticle Interactions of Various Strengths. *Phys. Rev. B* **1996**, *53* (21), 14291−14297.
(45) Nunes, W. C.; Cebollada, F.; Knobel, M.; Zanchet, D. Effects of Dipolar Interactions on the Magnetic Properties of γ-Fe_2O_3 Nanoparticles in the Blocked State. *J. Appl. Phys.* **2006**, *99* (8), 08N705-1−08N705-3.
(46) Peddis, D.; Orrù, F.; Ardu, A.; Cannas, C.; Musinu, A.; Piccaluga, G. Interparticle Interactions and Magnetic Anisotropy in Cobalt Ferrite Nanoparticles: Influence of Molecular Coating. *Chem. Mater.* **2012**, *24* (6), 1062−1071.
(47) Kolhatkar, A. G.; Jamison, A. C.; Litvinov, D.; Willson, R. C.; Lee, T. R. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 15977−16009.
(48) Odenbach, S. Recent Progress in Magnetic Fluid Research. *J. Phys.: Condens. Matter* **2004**, *16* (32), R1135.
(49) Odenbach, S.; Raj, K. The Influence of Large Particles and Agglomerates on the Magnetoviscous Effect in Ferrofluids. *Magnetohydrodynamics* **2000**, *36* (4), 312−319.
(50) Thurm, S.; Odenbach, S. Particle Size Distribution as Key Parameter for the Flow Behavior of Ferrofluids. *Phys. Fluids* **2003**, *15* (6), 1658−1664.

6.6.6 CdSe/CdS-Quantum Rods: Fluorescent Probes for in vivo Two-Photon Laser Scanning Microscopy

In dieser Publikation werden Quantenpunkte in Quantenstäbchen in Polymermizellen verkapselt und deren Eigenschaften, Stabiliät und in vivo Anwendung zur Zweiphotonenanregungsspektroskopie untersucht. Mein Beitrag war zum kleinen Teil die Verkapselung und Reinigung der QDQRs. Die Durchführung der Stabilitätstests in verschiedenen Medien und bei verschiedenen pH Werten oblag maßgeblich mir. Weiterhin war ich bei der Erstellung des Manuskriptes beteiligt. Reprinted with permission from *CdSe/CdS-Quantum Rods: Fluorescent Probes for in vivo Two-Photon Laser Scanning Microscopy*, Jelena Dimitrijevic, Lisa Krapf, Christopher Wolter, Christian Schmidtke, Jan-Philip Merkl, Tobias Jochum, Andreas Kornowski, Anna Schüth, Andreas Gebet, Gereon Hüttmann, Tobias Vossmeyer, and Horst Weller, *Nanoscale*, **2014**, 6, 10413-10422. Copyright ©2014 published by The Royal Society of Chemistry.[11]

Nanoscale

PAPER

CdSe/CdS-quantum rods: fluorescent probes for *in vivo* two-photon laser scanning microscopy†

Jelena Dimitrijevic,‡[a] Lisa Krapf,‡[c] Christopher Wolter,‡[a] Christian Schmidtke,[a] Jan-Philip Merkl,[a] Tobias Jochum,[b] Andreas Kornowski,[a] Anna Schüth,§[d] Andreas Gebert,¶[d] Gereon Hüttmann,[c] Tobias Vossmeyer*[a] and Horst Weller*[abef]

Cite this: *Nanoscale*, 2014, **6**, 10413

Received 16th May 2014
Accepted 30th June 2014

DOI: 10.1039/c4nr02702g

www.rsc.org/nanoscale

CdSe/CdS-Quantum-dots-quantum-rods (QDQRs) with an aspect ratio of ~6 are prepared *via* the seeded growth method, encapsulated within a shell of crosslinked poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene glycol) (PI-*b*-PEG) diblock copolymer, and transferred from the organic phase into aqueous media. Their photoluminescence quantum yield (PLQY) of 78% is not compromised by the phase transfer. Within a period of two months the PLQY of QDQRs in aqueous solution at neutral pH decreases only slightly (to ~65%). The two-photon (TP) action cross sections of QDQRs (~10^5 GM) are two orders of magnitude higher than those of CdSe/CdS/ZnS-core/shell/shell quantum dots (QDs, ~10^3 GM) with comparable diameter (~5 nm). After applying PI-*b*-PEG encapsulated QDQRs onto the small intestinal mucosa of mice *in vivo*, their strong red fluorescence can easily be observed by two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) and clearly distinguished from autofluorescent background. Our results demonstrate that PI-*b*-PEG encapsulated CdSe/CdS-QDQRs are excellent probes for studying the uptake and fate of nanoparticles by two-photon imaging techniques *in vivo*.

1 Introduction

During the past decade the application of semiconductor nanocrystals (quantum dots, QDs) as strongly fluorescent biolabels *in vitro* and *in vivo* has convincingly been demonstrated in numerous studies.[1–7] Compared to conventional organic fluorophores the optical properties of QDs provide several advantages for this purpose: extremely high absorption cross sections and two-photon action cross sections with broad band excitation, spectrally narrow and by variation of QD-size, -shape and -composition tuneable emission bands, very high photobleaching thresholds, and long fluorescence lifetimes. Because of their exceptionally high fluorescence quantum yields core/shell structured nanocrystals, especially CdSe/ZnS- and CdSe/CdS/ZnS-QDs, have been investigated most intensively. It was shown that core/shell-QDs are excellent probes for TPLSM,[7–12] a technique that allows for deep tissue imaging with reduced autofluorescence background, and intrinsic depth sectioning properties.[13,14] Recently, we developed a method for *in vivo* spectral imaging of different cell types in the small intestine of mice by TPLSM.[15]

Until now, only a few studies have focused on the investigation of CdSe/CdS- and CdSe/CdS/ZnS-core/shell quantum rods (QRs) as novel probes for bioimaging.[16–19] CdSe/CdS-quantum-dots-quantum-rods (QDQRs) are comprised of an approximate spherical CdSe-core controlling the spectral position of the narrow emission band and a rod-shaped CdS-shell with diameters of only a few nanometers and lengths up to 150 nm.[20,21] Because of their relatively large CdS-volume QDQRs have extinction coefficients approaching 10^7 cm^{-1} M^{-1}.[20] These giant extinction coefficients combined with photoluminescence quantum yields above 70% facilitate the detection of fluorescence from single QDQRs. Further, QDQRs and QRs exhibit polarized emission[20–23] and have interesting nonlinear optical properties, including enhanced and tunable multiphoton absorption cross sections.[24–26] These additional features make QDQRs and QRs highly interesting materials for the

[a]*Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany. E-mail: tobias.vossmeyer@chemie.uni-hamburg.de; horst.weller@chemie.uni-hamburg.de*

[b]*Centrum für Angewandte Nanotechnologie (CAN) GmbH, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

[c]*Institute of Biomedical Optics, University of Lübeck, Peter-Monnik-Weg 4, 23562 Lübeck, Germany*

[d]*Institute of Anatomy, University of Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany*

[e]*The Hamburg Centre for Ultrafast Imaging, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany*

[f]*Department of Chemistry, Faculty of Science, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia*

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4nr02702g

‡ These authors contributed equally to this paper.

§ Current address: Department of Urology, School for Mental Health and Neuroscience, Maastricht University, Universiteitssingel 40, P.O. Box 616, 6200 MD Maastricht, The Netherlands.

¶ Current address: Institute of Anatomy II, University Hospital Jena Teichgraben 7, 07740 Jena, Germany.

development of novel fluorescent probes, especially for bioimaging requiring single particle detection and particle tracking.

QDs, QDQRs and QRs can only be employed as fluorescent probes for bioimaging after they have been made biocompatible by proper surface modification. High quality semiconductor nanocrystals are usually prepared in high-boiling, nonpolar solvents and in the presence of hydrophobic ligands. Thus, the as prepared particles are hydrophobic and cannot be dispersed in aqueous media. Early studies have demonstrated the transfer of nanocrystals into aqueous solutions after exchanging the hydrophobic ligands by polar, low molecular weight compounds, *e.g.* (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane,[27] mercaptoacetic acid,[28] or dihydrolipoic acid.[29] However, these particles are either difficult to prepare or show only very limited stability.[30,31] Diluting them in physiological buffer, in cell culture medium, or application to living tissue easily causes their aggregation and loss of fluorescence. A very promising strategy to solve this problem is to encapsulate QDs within amphiphilic polymer shells.[2,32] Because of its well-known biocompatibility and chemical robustness polyethylene glycol (PEG) is currently one of the most favored polymers for this purpose.[31–36] It has been shown that PEG-based polymers can be attached to nanocrystal surfaces either directly *via* polydentate thiol groups,[31,36] or indirectly by using amphiphilic PEG-copolymers whose hydrophobic ends interlace with hydrophobic ligands at the nanocrystal surface.[33,37,38] Recently, we developed a method to enforce the stability of these QDs by crosslinking the hydrophobic inner part of the PI-*b*-PEG diblock copolymer shell as well as by using PI-*b*-PEG diblock copolymers of different molecular weight.[39,40] Further, it has been demonstrated that polymer encapsulated QDs can be conjugated with a broad variety of biomolecules.[32–34,38,39]

In our current study we succeeded in transferring CdSe/CdS-QDQRs from the organic phase into various aqueous media, thus, making their extraordinary linear and non-linear optical properties now available for a broad variety of bioanalytical applications. Although the QDQRs investigated here had an aspect ratio of ~6 it was possible to apply the same PI-*b*-PEG-encapsulation strategy, which we originally developed for the phase transfer of spherical QDs, proving the versatility and robustness of this approach. Further, we demonstrate that the stability of PI-*b*-PEG encapsulated QDQRs in aqueous solution at neutral and alkaline pH is excellent. Over a period of one week the relative PLQY decreased by only ~20%, and at neutral pH the PLQY remained rather unchanged over a period of even two months. At acidic pH the relative PLQY decreased more rapidly, but leveled within a few hours at ~20% of the initial PLQY, which is still sufficient for fluorescence imaging. In addition, the TP-action cross sections were not compromised by the phase transfer into aqueous solution, and we demonstrate the application of PI-*b*-PEG encapsulated QDQRs as probes for intravital TPLSM imaging of the murine small intestine. With respect to brightness and size, these probes are superior to commonly used dye-loaded polystyrene beads. To the best of our knowledge this is the first example showing the application of QDQRs as probes for *in vivo* imaging.

2 Results and discussion

2.1 Size, shape, composition, and structure of QDQRs

The preparation of the QDQRs was performed following the seeded-growth method reported by Carbone *et al.*[21] This method is based on the injection of approximately spherical CdSe seeds and sulfur in trioctylphosphine (TOP) into a hot mixture of decomposed CdO, trioctylphosphine oxide (TOPO), hexylphosphonic acid (HPA), and octadecylphosphonic acid (ODPA). Before transferring the purified QDQRs into aqueous solution, they were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM), Energy Filtered Transmission Electron Microscopy (EFTEM), and Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) combined with elemental analysis by Energy Dispersive X-ray (EDX) Spectroscopy. Two batches of QDQRs with very similar absorption and emission characteristics were used for characterization. If not otherwise indicated, all data shown below refer to sample A. Fig. 1a shows a representative overview TEM image. The rods had a length of 28.7 ± 2.6 nm and a diameter of 5.1 ± 0.5 nm resulting in an aspect ratio of ~6. The inset of Fig. 1a shows a TEM image of the CdSe-seeds used to grow the rod-shaped CdS-shell. These nanocrystals had a diameter of 4.5 ± 0.3 nm. The High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM) image of a single QDQR depicted in Fig. 1b reveals a well-developed crystalline structure. Fig. 1c shows an EFTEM image measured at the $L_{2,3}$-sulfur absorption edge. The image clearly shows the position of the CdSe cores (dark areas) being located close to the center of the bright appearing CdS rod-shells. This finding, which is verified by the elemental distribution profiles shown in Fig. 1d, confirms results from HRTEM-measurements reported by Carbone *et al.*[21] They localized the position of the CdSe-core typically between 1/4 and 1/3 of the overall length of the rods, but rarely at the tips. The statistical analysis of EFTEM images of our samples showed the CdSe core being located between 1/3 and 1/2 of the overall length of the rods (ESI, Fig. S1†).

2.2 Linear optical properties of QDQRs

Fig. 2 shows the absorbance of QDQRs of sample B dispersed in chloroform. Within the spectral range between 500 to 630 nm a well resolved transition at 589 nm is observed and attributed to the photogeneration of excitons with the holes being more strongly confined to the CdSe core than the electrons.[20,41] Due to the large volume of the rod-shaped CdS shell a huge absorption is observed below 500 nm. At ~350 nm the molar extinction coefficient ε is $\sim 2 \times 10^7$ L mol^{-1} cm^{-1} (ESI, Fig. S2†). This value is approximately two times larger than the extinction coefficient previously reported for CdSe/CdS-QDQRs having roughly half the volume of the rods investigated here.[20] Taking into account a linear increase of the extinction coefficients with the volume of the nanocrystals, both results are in very good agreement.

Also shown in Fig. 2 is a typical PL emission spectrum of the QDQR solution in chloroform of sample B with the maximum position at 601 nm. The Stokes shift of 12 nm corresponding to 42 meV is somewhat smaller than the value of ~44 meV reported by Carbone *et al.*[21] and significantly smaller than

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2014

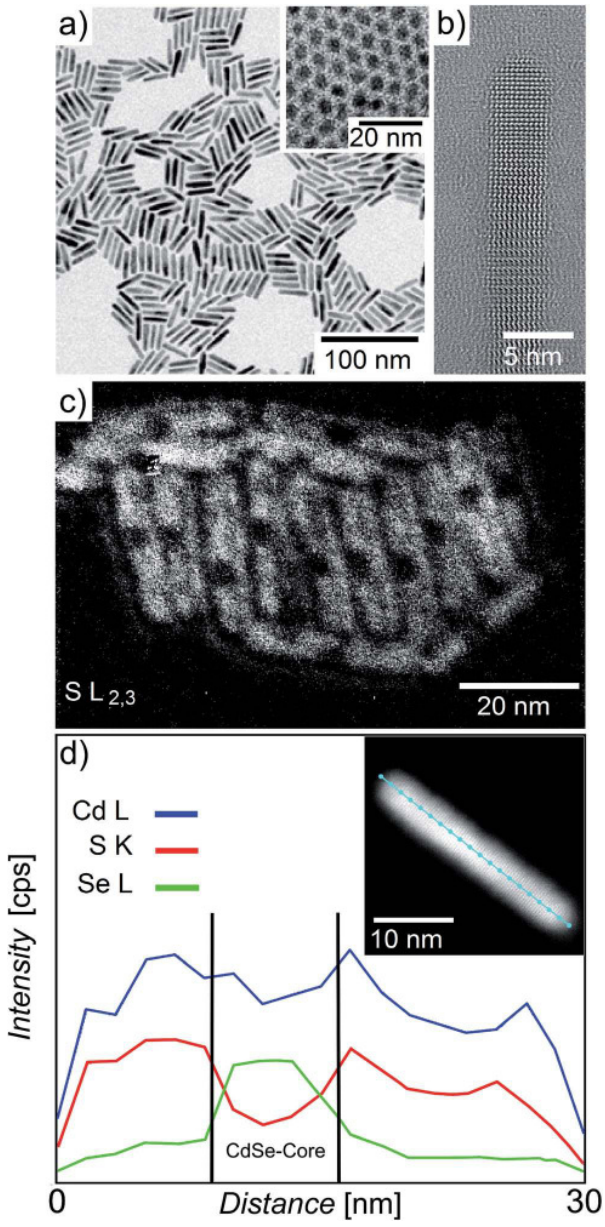


Fig. 1 a) Overview TEM image of CdSe/CdS-QDQRs. The inset shows a TEM image of the CdSe seeds used for growing the rods. (b) HRTEM image of a single CdSe/CdS-QDQR revealing the well-developed crystalline structure. (c) EFTEM image of sulfur $L_{2/3}$. (d) Element distribution profiles of Cd (blue), S (red) and Se (green) obtained by measuring the EDX signal intensities along a single CdSe/CdS-QDQR. The inset shows a STEM image with the line indicating the positions of EDX measurements.

values larger 60 meV reported by Talapin *et al.*[20] for CdSe/CdS-QDQRs with aspect ratios >3. The PL quantum yield (PLQY) of 78% is in agreement with previously published data.[21] The excitation spectrum, also displayed in Fig. 2, is similar to the absorbance. This feature is well known for these types of QDQRs and is attributed to the efficient capture and recombination of

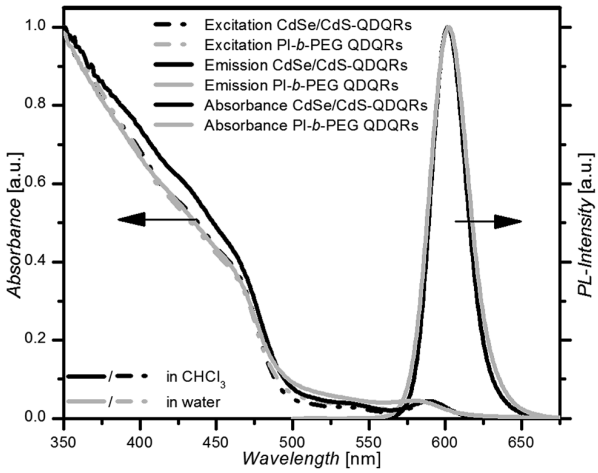


Fig. 2 Optical properties of CdSe/CdS-QDQRs of sample B. The UV/Vis-absorbance and the PL-emission spectra of QDQRs in chloroform are shown as black solid lines while the spectra recorded from aqueous solutions are displayed in grey. The transfer into aqueous medium does not significantly affect the spectral properties of the sample. The PL-excitation spectra (dashed lines) of QDQRs in chloroform (black) and PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs in water (grey) were detected at an emission wavelength of 600 nm. These spectra closely follow the absorbance spectra.

charge carriers in the CdSe core after their generation by the absorption of photons.[20]

2.3 Phase transfer into aqueous solution

For transferring QDQRs from the organic phase into the aqueous phase they were first reacted with 2,2′-diaminodiethylamine-*block*-polyisoprene (PI_{35}–N3), as shown schematically in the ESI, Fig. S3.† The multidentate ligand with its amine groups binds to the nanorod surface and replaces TOP/TOPO, HPA and ODPA to some extent. Thus, by this first reaction step the nanorods are encapsulated by an outer shell of hydrophobic polyisoprene. In the second reaction step poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene glycol) (PI_{63}-*b*-PEG_{227}) is added to the QDQR solution. The hydrophobic polyisoprene block interlaces with the outer polyisoprene shell of the nanorods *via* hydrophobic interactions resulting in the formation of micellar structures with the nanorod located at the center and the amphiphilic PI-*b*-PEG blocks at their surface. In order to enforce the stability of these polymer-encapsulated QDQRs the interacting polyisoprene entities were covalently crosslinked by adding azobisisobutyronitrile (AIBN), a radical initiator. Finally, the aqueous dispersion of the QDQRs was obtained by injecting the organic solution of PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs into water. Recently, we described this encapsulation protocol and demonstrated the phase transfer of different types of spherical nanocrystals into the aqueous phase.[39] We showed that nanocrystals encapsulated by this strategy have extraordinary stability in various physiological buffer media and are well suited for *in vivo* studies. It is quite remarkable that this method is robust enough to be easily adjusted for the encapsulation of elongated nanoobjects having an aspect ratio of ~6.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2014

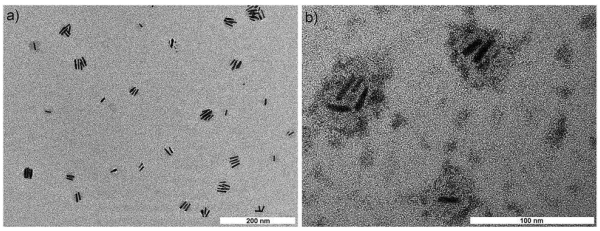


Fig. 3 a) Overview TEM image of PI-*b*-PEG-encapsulated CdSe/CdS-QDQRs deposited onto the TEM grid from aqueous solution. (b) TEM image of QDQRs with stained PEG-shell. As staining agent phosphotungstic acid was used.

Fig. 3 shows representative TEM images of PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs. In the overview image of Fig. 3a single and clustered nanorods are observed. Fig. 3b shows an image at larger magnification and after staining the PEG-shell using phosphotungstic acid (PTA). The statistical evaluation of several images revealed that 85% of polymer micelles counted contained 1–5 QDQRs (ESI, Fig. S4†). We attribute this finding to the well-known tendency of rods-shaped objects to self-assemble as laterally aligned aggregates, making it difficult to exclusively encapsulate single QDQRs. The diameters of the PTA-stained PEG-shells containing up to four QDQRs ranged between ~30 and ~55 nm. Taking into account that the polymer shell decreases in diameter while drying on the TEM grid, this result agrees quite well with the slightly larger hydrodynamic diameter of ~75 nm for the solvated PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs, which was determined by Dynamic Light Scattering (DLS).

We note that the hydrodynamic size remained unchanged over the whole observation period of 3 months (ESI, Fig. S5a†).

Upon transfer into water at neutral pH, the linear optical properties did not change significantly, as seen by the absorbance and emission spectra displayed as solid lines in Fig. 2 (sample B). Initially, the PLQY was unchanged and dropped only slightly to ~65% while storing the aqueous QDQR dispersion for a period of two months at ambient condition, as shown in Fig. 4a.

We attribute both, the exceptionally high PLQY as well as its stability over a prolonged time period to the encapsulation by covalently crosslinked PI-*b*-PEG shells.[39] The stability of photoluminescence was not affected by diluting the samples to QDQR concentrations ranging from 15 nM to 1.5 nM. This result corroborates the firm encapsulation of the rods by the crosslinked ligand shell.

In order to investigate the stability of the PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs against pH variations and behaviour in different media aliquots of stock solution were incubated in aqueous media at pH values from 3 to 13 and in different biochemically relevant media/buffers and the photoluminescence was followed over a period of 7 days. Fig. 4b shows the PL intensity of the samples normalized against the initial PL intensity of a corresponding aqueous QDQR solution (pH 7, sample B). These data reveal a significant drop of PL-intensity in the acidic pH range but good stability in neutral and alkaline environment.

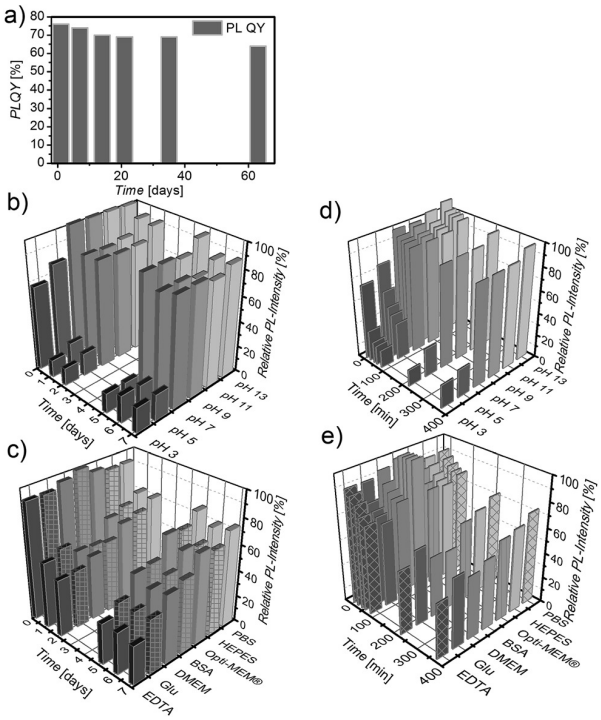


Fig. 4 a) PLQY of PI-*b*-PEG-encapsulated CdSe/CdS-QDQRs in an aqueous solution at neutral pH measured over a period of two months. The concentration of dispersed QDQRs was ~15 nM. (b) PL intensity of PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs (sample B) in aqueous solutions (~4 nM) at different pH values (different grey tones). The data were normalized against the initial PL intensity of the QDQRs at pH 7. (c) PL intensity of PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs (sample B) dissolved in various biologically relevant media over a period of 7 days (1 mM EDTA, 3.5% glutaraldehyde (Glu), DMEM media without phenol red, 10 mg mL^{-1} BSA in 1× PBS, Opti-MEM® without phenol red, 10 mM HEPES, 1× PBS). The data were normalized against the initial PL intensity of the aqueous solution at pH 7. (d) PL intensity of PI-*b*-PEG encapsulated CdSe/CdS-QDQRs (sample B) in aqueous solutions (4 nM) at different pH values (different grey tones) over a time period of ~6 h directly after mixing. The data were normalized against the initial PL intensity of the QDQRs at pH 7. (e) PL intensity of PI-*b*-PEG encapsulated QDQRs (sample B) dissolved in various biologically relevant media over a period of ~6 h directly after mixing (1 mM EDTA, 3.5% glutaraldehyde, DMEM media without phenol red, 10 mg mL^{-1} BSA in 1× PBS, Opti-MEM® without phenol red, 10 mM HEPES, 1× PBS). The data were normalized against the initial PL intensity of the aqueous solution at pH 7.

Sufficient stability of the PLQY in slightly acidic to moderately basic environment is of major importance for our interest to study the uptake of nanocrystals through the mucosa of the small intestine, with typical pH-values ranging between pH 4.5 and pH 7.5 in the upper, and between pH 6.5 and pH 8 in the lower small intestine.[42] In addition we investigated the drop of PL-intensity during the first 6 hours after changing the pH or incubating the PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs in buffer/media because a period of up to several hours is the typical duration for the *in vivo* experiments described below. As shown in Fig. 4b and d, the PL-intensity decreased to about 20% of the initial value within 2 hours and remained stable at that level when

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2014

lowering the pH to 5 or 3. Even after 6 hours, the PL intensity is still sufficiently high to allow for fluorescence imaging. We also tested the PL stability in different biologically relevant buffer and media such as phosphate buffered saline (PBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Opti-MEM® (a reduced serum modification of DMEM), bovine serum albumin (BSA) in PBS, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer (HEPES), and glutaraldehyde. Fig. 4c shows the fluorescence intensity of the PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs in different media normalized against the initial PL intensity of the aqueous solution at pH 7 over a period of 7 days and Fig. 4e shows the normalized fluorescence intensity over a period of 6 hours. Together with the results presented in Fig. 4b and d, these data reveal that even under rather harsh conditions (pH 3, EDTA, and glutaraldehyde) the PLQY of PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs is sufficiently preserved, qualifying them for various *in vitro* and *in vivo* imaging applications.

2.4 Two-photon action cross sections of QDQRs

TP-action cross sections, *i.e.* the TP-absorption cross section multiplied with the fluorescence quantum efficiency, were measured using a titanium-sapphire ultra-short pulsed laser with a pulse width of approximately 200 fs in the focus and a repetition rate of 80 MHz. Fluorescence was collected through a high numerical aperture (NA) objective (NA = 1.2) and detected by a photomultiplier tube (PMT). The determination of TP-action cross sections was performed with Rhodamine 6G as reference substance with known TP-action cross section.[43] As described by Xing *et al.*,[24] a correction factor of 5 was used to take into account the random orientation of the rods in solution under linearly polarized excitation pulses. Fig. 5 shows the TP-excitation spectra of QDQRs in chloroform and water presented as a semi logarithmic plot. For comparison the spectra of commercially available CdSe/CdS/ZnS-QDs were measured, as well. These QDs had a nominal diameter of 4.7 nm and an excitonic PL emission band peaking at 584 nm with a PLQY of 47%. For transferring the QDs from the organic phase into water the same encapsulation method was used as described above for QDQRs. Within the spectral range of our measurements (730–870 nm) the TP-excitation spectra of QDQRs and QDs are qualitatively very similar. Their spectral characteristics are rather unaffected by the phase transfer from the organic into the aqueous phase, with only slightly decreasing TP-action cross sections. The TP-action cross sections of the QDQRs are about two orders of magnitude higher than those of the QDs. At an excitation wavelength of 750 nm (mostly used for autofluorescence *in vivo* imaging)[15] we measured TP-action cross sections of 1.4×10^5 GM for QDQRs and 3.4×10^3 GM for QDs (both in chloroform). These values can easily be converted into the TP-absorption cross sections by dividing them by respective PLQYs. For this purpose the one-photon PLQYs are often used as an approximation for the TP-PLQYs.[44] With the one-photon PLQYs of the QDQRs and QDs investigated in this study (~0.78 and ~0.47, respectively) we obtain TP-absorption cross sections of 1.8×10^5 GM and 7.2×10^3 GM, respectively. For both types of nanocrystals these values are similar to previously published data for CdSe/CdS/ZnS-,[11] CdSe-,[44] CdS-QDs,[25] CdS-QRs,[25] and CdSe/CdS-QDQRs[24] of comparable size. The observation of significantly larger TP-absorption cross sections for QDQRs in contrast to those of QDs is not surprising. It has been shown that TP-absorption cross sections of CdSe- and CdSe/CdS/ZnS-QDs scale with their diameter obeying a power-law proportionality of ~3–4.[11,44–46] In addition, the TP-absorption cross sections of CdSe/CdS-QDQRs have been shown to scale with the nanorod volume obeying a power-law proportionality of 1.2, consistent with a model of increased density of states.[24] Similar as shown here, Li *et al.* reported TP-absorption cross sections of CdS-QRs being approximately one to two orders of magnitude larger than those of CdS-QDs of comparable diameter.[25]

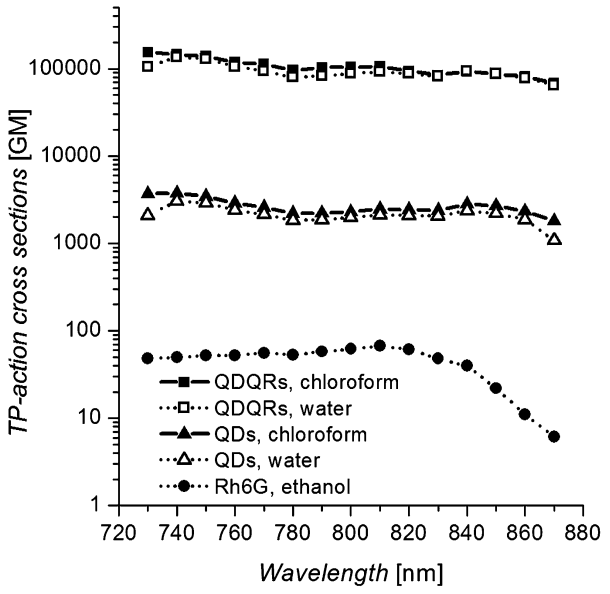


Fig. 5 TP-action cross sections of CdSe/CdS-QDQRs and CdSe/CdS/ZnS-QDs dispersed in chloroform and water, as indicated. Rhodamin 6G (Rh6G) dissolved in ethanol was used as reference.

2.5 Application of QDQRs as probes for TPLSM

Their very high TP-action cross sections together with their high colloidal stability in aqueous media make PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs highly promising candidates for application as probes for *in vivo* TPLSM. In a set of preliminary experiments we first tested TPLSM detection of QDQRs on the single particle level. For this purpose the nanocrystals were deposited from highly diluted solutions onto glass substrates *via* spin-coating. Fig. 6a and b show representative images recorded with samples deposited from toluene solution (QDQRs without PI-*b*-PEG encapsulation, Fig. 6a) and from aqueous solution (QDQRs with PI-*b*-PEG encapsulation, Fig. 6b), respectively. These images were measured in a multibeam excitation mode by simultaneous excitation of fluorescence at 750 nm with an average laser power of 2.2 mW (in each of the 64 foci) and detection with a CCD-camera. Together with the TEM images shown in Fig. 1a, in case of the QDQR deposited from toluene, the appearance of

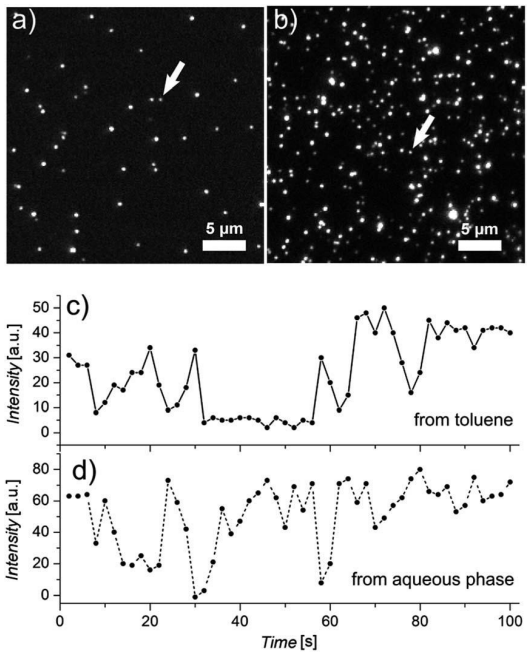


Fig. 6 TPLSM images of QDQRs, (a) without PI-*b*-PEG-encapsulation deposited from toluene and, (b) with PI-*b*-PEG-encapsulation deposited from aqueous solution. Images were acquired using a CCD camera in 64-beam mode with the excitation wavelength at 750 nm and an excitation power of 2.2 mW. (c and d) Blinking of photoluminescence of QDQRs under TP-excitation. (c) refers to the sample deposited from toluene (without PI-*b*-PEG-encapsulation). (d) refers to a sample deposited from aqueous solution (with PI-*b*-PEG-encapsulation). The spots at which data were collected over time are indicated in parts (a and b).

spatially well resolved, bright spots suggests the detection of either single QDQRs or small aggregates containing only a few nanorods. In comparison, the sample prepared from the aqueous solution shown in Fig. 3a and b, *i.e.* containing PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs, shows a more heterogeneous distribution of signal intensities than the sample prepared from organic solution, *i.e.* containing QDQRs without PI-*b*-PEG-encapsulation. This might be due to the fact that predominantly between 1 and 5 QDQRs were encapsulated per micelle (ESI, Fig. S4†). However, as shown in Fig. 6c and d, the TPLSM-signals of both samples showed very similar fluorescence intermittency (blinking), a feature typically observed when imaging immobilized single nanocrystals by either one- or two-photon excitation.[12,20,23,47] Because the observed intermittency did show almost total temporal extinction of fluorescence, we assume that the signals observed in TPLSM images are mainly caused by either single QDQRs or small aggregates, comprised of approximately 2–5 QDQRs (see above). Further, we note that the fluorescence of the QDQRs was polarized (ESI, Fig. S6†), similar as shown previously in confocal microscopy measurements of single CdSe/CdS-QDQRs.[20] This finding indicates that QDQRs within the aggregates were to some extend aligned, as was also observed in the TEM images, presented above (Fig. 3a and b).

In order to investigate the photostability of PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs when performing extended TPLSM measurements, we deposited QDQRs from a highly diluted aqueous solution together with commercially available dye loaded polystyrene beads (FluoSpheres®) onto a glass substrate. A 50 × 50 × 5 μm^3 volume of this sample was repeatedly scanned over a total duration of one hour. During that time the QDQRs' PL intensity decayed to some extent, indicating that due to the high excitation power some of the QDQRs photobleached irreversibly. At the same time the signal of the dye loaded polystyrene spheres remained quite stable, see Fig. S7 (ESI).† Doing this comparison, however, it is important to note that besides sufficient photostability the size of bioanalytical probes is of critical concern for many applications. In this regard, the smaller size of our PI-*b*-PEG encapsulated QDQRs with a DLS diameter of ~70 nm (sample B), together with sufficient photostability for most TPLSM applications, constitutes a clear advantage over the much larger polystyrene beads with a DLS size of ~120 nm (see Fig. S5b, ESI†). In another TPLSM experiment, which was performed using the same experimental settings as before, we tried to image smaller dye loaded polystyrene beads (FluoSpheres®) having a DLS size of ~60 nm (see Fig. S5b†). However, under these conditions it was impossible to detect such probes with our TPLSM setup.

In order to investigate the use of PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs as probes for *in vivo* TPLSM we applied 50 μL aqueous solution of the nanocrystals (concentration: 15 nM, or below) to the mucosa of the small intestine of mice. Parts of the experimental setup (specimen, sample holder, objective) are shown schematically in Fig. 7a. A detailed description of the setup is provided in ref. 15 and 48. Fig. 7b shows a scanned volume of small intestinal villi incubated with QDQR solution. This 3D view was rendered from a stack of false colour images, which were acquired in single-beam mode with the fluorescence signals being separated to three spectral channels (blue, green, and red). The epithelial cells are readily recognized by their autofluorescence (blue and green channel), mainly caused by NADH.[15] In the lumen between the villi the strong fluorescence of QDQRs was detected in the red channel. This observation clearly demonstrates that our PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs

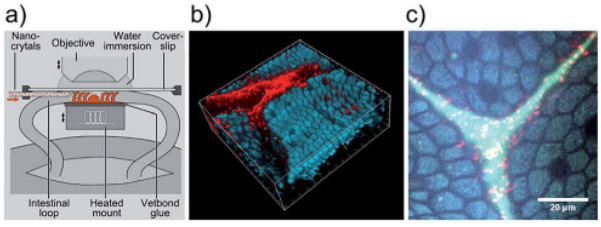


Fig. 7 a) Schematic drawing showing the experimental setup used to investigate *in vivo* the murine intestinal mucosa by TPLSM. (b) 3D image of small intestinal villi incubated with QDQR solution. The red fluorescence of CdSe/CdS-QDQRs can clearly be distinguished from the bluish autofluorescence of epithelial cells. The size of the scanned volume was 200 μm × 200 μm × 50 μm. (c) Formation of red fluorescent aggregates of CdSe/CdS-QDQRs in the gut lumen with dimensions in the low μm-range.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2014

are promising TPLSM probes for application in hostile biological environments, such as digestive fluids of the intestine. However, we note that occasionally QDQRs did not dissolve homogeneously in intestinal fluid. Fig. 7c shows the formation of red fluorescent aggregates with dimensions in the low μm-range.

3 Experimental

Materials

Chemicals and solvents were purchased from Alfa Aesar, Merck, Fluka, Life Technologies, Lonza, PAA, and Sigma Aldrich. All chemicals were used as received. Unless indicated otherwise, all solvents used were of analytical grade (p.a.). Water was purified using a Millipore-Q System (18.2 MΩ cm). CdSe/CdS/ZnS-QDs were provided by the Center for Applied Nanotechnology (CANdots Series A-CSS, CAN GmbH, Germany). The nanocrystals had a nominal diameter of 4.7 nm. Absorbance and emission spectra of these nanocrystals before and after phase transfer are exemplary shown in ref. 39. The 2,2′-diaminodiethylamine-*block*-polyisoprene (PI_{35}–N3, $M_w \sim 2500$ g mol^{-1}) and poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene glycol) (PI_{63}-*b*-PEG_{227}; $M_w \sim 14\,300$ g mol^{-1}; $M_n \sim 13\,400$ g mol^{-1} determined from size-exclusion chromatography analysis, using a PEG calibration) were synthesized *via* living anionic polymerization according to Pöselt *et al.*[39]

Synthesis of CdSe/CdS-QDQRs and phase transfer

CdSe/CdS-QDQRs were synthesized by the procedure reported by Carbone *et al.*[21] This procedure yielded a solution of strongly luminescent QDQRs in chloroform. The phase transfer into aqueous solution was done by a method recently developed in our laboratory and adjusted to the larger surface area of the QDQRs compared to the smaller surface of the QDs.[39] This method is based on performing first a ligand exchange with 2,2′-diaminodiethylamine-*block*-polyisoprene (PI_{35}–N3, $M_w \sim 2500$ g mol^{-1}) at the nanocrystals' surface and then encapsulating the hydrophobic PI-decorated nanocrystals with poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene glycol) (PI_{63}-*b*-PEG_{227}; $M_w \sim 14\,300$ g mol^{-1}). For this purpose the solutions of respective polymers, QDQRs and AIBN (azobisisobutyronitrile) were mixed in THF and injected into the aqueous phase employing a programmable flow system. The flow system is equipped with a microfluidic reactor chip enabling highly reproducible PI-*b*-PEG-encapsulation and phase transfer. The general procedure is described in ref. 39 and further details with a description of the flow system will be published separately. The phase transfer of commercial CdSe/CdS/ZnS-QDs into aqueous solution *via* PI-*b*-PEG-encapsulation was done by the same method as for the QDQR samples.

Stability tests

Stability tests were performed by following the PLQY over time using a 15 nM and a 4 nM solution (media and pH stability, respectively) of PI-*b*-PEG-encapsulated CdSe/CdS QDQRs. For this purpose 2500 μL of prevailing media were mixed with 60 μL of the QDQR stock solution. After 5 minutes of incubation, the initial emission spectra ($t = 0$) were recorded, integrated and normalized against the PL-intensity of QDQRs at pH 7. The PL-intensity was recorded over a period of 1 week. These measurements were done using a Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon) spectrometer. During the time intervals between the PL-measurements the samples were stored, protected from light, in a laboratory cabinet at ambient temperature. The pH values were 3, 5, 7, 9, 11, and 13. The used media were 1× PBS, 10 mM HEPES, Opti-MEM® without phenol red, 10 mg mL^{-1} BSA in 1× PBS, 3.5% glutaraldehyde, DMEM without phenol red, 1 mM EDTA.

High resolution transmission electron microscopy (HRTEM)

Samples for TEM investigations were prepared by depositing QDQRs from diluted solutions onto carbon coated TEM grids. For staining the PEG ligand shell of the encapsulated QDQRs phosphotungstic acid (PTA, Fluka) was used as staining reagent. Following a standard protocol, 150 μL of freshly prepared solution of PTA in water 10% (w/v) were mixed with 150 μL of QDQRs dispersed in water. The incubation time was 10 minutes. After this, the carbon coated side of a TEM copper grid was brought into contact with a drop of the mixture deposited onto laboratory film. After 5 min, excess liquid was removed with filter paper. In order to remove excess staining agent the TEM grid was washed twice by bringing it into contact with drops of water deposited onto laboratory film. The samples were dried 24 hours before TEM investigation. Overview images were measured using a JEOL JEM-1011 TEM, LaB_6, operated at 100 kV. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX, JED 2300 detector), EFTEM, and HRTEM imaging of the samples were done using a JEOL JEM 2200 FS (UHR) TEM operated at 80 kV, equipped with CEOS CS-correctors for STEM (CESCOR) and TEM (CETCOR).

Determination of QDQR concentrations and molar extinction coefficients

QDQR concentrations were determined using a protocol similar to the method reported by Mulvaney and coworkers[49] for the determination of CdSe nanocrystal concentrations. 50 μL aliquots of QDQRs in chloroform were dried and then incubated in 450 μL freshly prepared aqua regia (1 : 3 v/v HNO_3/HCl) [**Caution**: this mixture is hazardous and produces toxic gases] for 48 h. The solutions were diluted with water and UV/Vis absorption spectra were taken before and after digestion to confirm complete digestion of the nanocrystals. The cadmium concentrations of digested samples were determined by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) and Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy (ICP-MS), depending on the concentration range (limits of detection: 18 ng mL^{-1} for ICP-OES, 0.05 ng mL^{-1} for ICP-MS). These measurements were done at the Zentrallabor Chemische Analytik of the Technical University at Hamburg-Harburg, Germany. The QDQR concentrations were calculated by dividing the measured free cadmium concentrations of the digested samples by the sum of the agglomeration numbers of

the CdSe core and the CdS shell. These agglomeration numbers were obtained by dividing the volume of the CdSe core ($V_{core} = 4.77 \times 10^{-20}$ cm^3) and the volume of the CdS shell ($V_{shell} = V_{rod} - V_{core} = 5.04 \times 10^{-19}$ cm^3) by respective volumes of CdSe- and CdS-units of the bulk materials ($V_{CdSe} = 5.48 \times 10^{-23}$ cm^3, $V_{CdS} = 4.98 \times 10^{-23}$ cm^3, from molar volumes divided by Avogadro's constant). For calculating V_{core} we assumed an idealized spherical shape ($d_{core} = 4.5$ nm), and for calculating V_{shell} we assumed the rods having a circular cross section ($d_{rod} = 5.1$ nm) and hemispherical caps with a maximum length of $l_{rod} = 28.7$ nm (vertex–vertex distance). After determining the QDQR concentrations, the molar extinction coefficients were calculated using Lambert–Beer's law. UV/Vis absorption spectra were recorded using a Varian Cary 500 UV-VIS-NIR absorption spectrometer.

Photoluminescence quantum yields (PLQYs)

The PL spectra and PL excitation spectra were recorded using a Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon) spectrometer. All spectra were corrected using the correction files provided with the instrument software (FluorEssence). Rhodamin (Rh101, Radient Dyes GmbH) dissolved in ethanol (Uvasol, Merck) was used as reference standard dye for determining PL quantum yields (QYs), assuming 100% PLQY of this standard. All samples were filtered through syringe filters (0.22 or 0.45 μm pore size) before the measurements. In case of emission spectra the absorbance of the samples at the excitation wavelength was below 0.1. For determining PLQYs the following equation was used:

$$\Phi_x = \frac{F_x f_{st}}{F_{st} f_x}\left(\frac{n_x}{n_{st}}\right)^2 \Phi_{st} \quad (1)$$

The subscripts x and st denote sample and standard, respectively. Φ represents the PLQY, F is the integrated area of the emission spectra, n is refractive index of the solvent, and f is the absorptance:

$$f = 1 - 10^{-A} \quad (2)$$

A is absorbance at the excitation wavelength. The PL quantum yield of commercial CdSe/CdS/ZnS-QDs was 47%, as indicated by the data sheet of this sample.

Dynamic Light Scattering

The hydrodynamic diameter of PI-*b*-PEG-polymer encapsulated QDQRs were determined using Dynamic Light Scattering (DLS, Malvern Zetasizer Nano ZS). The concentration of samples used for these experiments was ~15 nM. Before measurements, the samples were filtered through CME filter membranes (0.45 μm pore size, Roth, Germany). The data reported represent averages of three sequential measurements, with each measurements consisting of 40 runs of 1 s duration. The equilibration time before each measurement was set to 2 min. Data were acquired and analyzed using the Dispersion Technology Software package provided with the instrument. The DLS sizes of commercially available dye loaded polystyrene beads (FluoSpheres®) were determined using the same equipment.

Two-photon-laser scanning microscopy (TPLSM) and two-photon-action cross sections

Two setups were used for multiphoton imaging. With a TriM Scope (LaVision BioTec, Germany) immobilized single particles were imaged by multiple beam excitation (64 foci) using a tunable Ti:Sapphire laser (Ultra II, Coherent) and fluorescence detection by a highly sensitive CCD camera (Imager Intense, LaVision, Göttingen, Germany). Fast and sensitive imaging was possible due to the parallel excitation and the high quantum efficiency of the camera in the red and near-infrared spectral region. Samples for imaging single particles without autofluorescent background were prepared by spin-coating 100 μL diluted QDQR solution onto previously cleaned glass coverslips. *In vivo* images were obtained by 3-channel spectral detection, which could distinguish particles from tissue autofluorescence.

TP-action cross sections were obtained by a second two-photon microscope (DermaInspect 101, Jenlab). Fluorescence was excited with a tuneable Ti:Sapphire laser (MaiTai, Spectra-Physics) at a pulse duration of 200 fs with a repetition rate of 80 MHz. The TP-action cross section α, which is defined as the product of the two-photon absorption cross section and the quantum yield, links the detected fluorescence intensity I_d of a sample to excitation radiant flux P, wavelength λ, and pulse width τ:

$$I_d \cong \varphi c \alpha \frac{P^2}{\lambda \tau} \quad (3)$$

φ represents the detection efficiency and c the concentration of the fluorescent molecules or particles. TP-action cross sections of the nanocrystals were measured by comparing their fluorescence intensity with that of a reference solution.[43] Solutions with the nanoparticles and the reference solution with Rhodamine 6G (Radiant Dyes) dissolved in spectroscopy grade ethanol were imaged in 25 μL chambers between two cover glasses (Gene Frame 10 × 10, Abgene). Excitation series covering excitation wavelengths between 730 nm and 870 nm were acquired in 10 nm steps at identical imaging conditions (same laser intensity, PMT settings, and acquisition time) for samples and reference. For Rhodamin 6G TP-action cross sections were taken from ref. 43. In the case of the QDQR samples the TP-action cross sections determined using eqn (3) were multiplied by the factor 5 to account for anisotropy of the nanorod shape and polarization effects, *i.e.* to account for the random distribution of the rods excited by linearly polarized laser pulses.[24,50] We note that the TP-action cross sections presented in this study were measured at relatively high laser intensity in order to meet conditions typically required for *in vivo* TPLSM. Thus, due to saturation effects the reported TP-action cross sections are up to 40% below TP-action cross sections measured at low laser intensities. The slope of a log–log plot of emission intensity *vs.* excitation power decreased from ~2.0 to ~1.5 with increasing laser power (0.5 to 5.0 mW). These data and a representative plot of the TP-action cross section as a function of the laser power are provided as ESI (Fig. S8).†

For comparison of brightness and photostability, Carboxylate-Modified Microspheres (FluoSpheres®, Life Technologies™) with nominal diameters of 20 nm (blue fluorescent,

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2014

Molecular Probes, F8781) and 100 nm (blue fluorescent, Molecular Probes F8797) were used as purchased.

To measure the stability of QDQRs and FluoSpheres® during TPLSM imaging, an aqueous mixture of PI-*b*-PEG-encapsulated QDQRs and 100 nm or 20 nm blue fluorescent FluoSpheres®, both diluted to a concentration below 1 nM, was drop-casted onto a coverslide and imaged between two coverslides with an excitation wavelength of 750 nm. A volume of 50 μm × 50 μm × 5 μm consisting of 10 slices each of which was scanned 50 times during an acquisition time of around 1 hour with a radiant flux slightly lower (around 10 mW) than in the case of the *in vivo* TPLSM investigation. Each image stack was averaged and a linear section through the image containing QDQRs as well as FluoSpheres® was plotted over time to show differences of photostability of both particle types (see Fig. S7, ESI†).

In vivo microscopy

The experimental setup used for *in vivo* microscopy of the murine small intestine has been described previously by our groups.[15,48] In brief, the abdominal cavity of anaesthetised mice was opened surgically and a loop of the small intestine was placed onto a supporting block. After opening the gut wall, an aqueous solution of nanocrystals was applied to the inner (mucosal) surface. After an incubation time of 2 min, the tissue was rinsed with Ringer solution. Nearly physiological conditions were obtained by heating the mouse to 37 °C, ventilation and monitoring the oxygen saturation of blood. Microscopy was performed through a microscopic cover slip (see Fig. 7a) using a Zeiss C-Apochromat 40/1.2 W objective lens (Zeiss, Jena, Germany) and the TriMScope. Digital data were processed using Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland). The *in vivo* experiments were performed in compliance with the regulations of the University of Lübeck and the German Animal Protection Law (LANUV) (Permission number V742-72241.122 by Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft Schleswig-Holstein, Germany). The *in vivo* experiments were approved by the institutional ethical review committee. All efforts were made to minimize animal suffering.

4 Summary and conclusions

In this study, we demonstrated the transfer of highly fluorescent CdSe/CdS-QDQRs from the organic phase into the aqueous phase by the encapsulation within crosslinked PI-*b*-PEG micelles. Because the PEG-shell can be conjugated with various biologically active species *via* standard coupling reactions this encapsulation methods makes the outstanding linear and nonlinear optical properties of QDQRs now accessible for a broad variety of bioanalytical applications. A statistical TEM-analysis revealed that ~85% of the micellar structures contained 1–5 QDQRs. We attribute this observation to the well-known tendency of nanorods to form small aggregates. In order to further decrease the hydrodynamic size of the micelles we are currently optimizing the encapsulation method to allow for the encapsulation of exclusively single QDQRs. After the phase transfer into aqueous solution at neutral pH, the high PLQY (78%) was maintained and degraded only very slowly to ~65% after storage for more than two months. In addition, the encapsulated nanocrystals showed prolonged stability in various buffer/media with neutral to alkaline pH (7 to 13). The PL intensity in the acidic pH range (3–5) decreased to about 20% of the initial value which is still sufficiently high for imaging *in vivo* and *in vitro*. The TP-action cross sections of CdSe/CdS-QDQRs were approximately two orders of magnitude higher than those of commercial CdSe/CdS/ZnS-QDs of approximately the same diameter. This finding is attributed to both, the significantly larger volume of the QDQRs as well as their higher PLQY. The absolute values of the TP-absorption cross sections reported here are similar to those reported previously for nanocrystals of similar composition and size.[11,24,25,44] Upon phase transfer into aqueous solution the TP-action cross sections of both, QDQRs and QDs, decreased only slightly. After applying an aqueous QDQR solution to the murine small intestinal epithelium, their strong red fluorescence could clearly be detected by TPLSM and distinguished from autofluorescence of the matrix. In order to prevent particle aggregation and to allow for single particle tracking of QDQRs in the intestinal epithelium our research efforts are currently focusing on further optimizing the structure and exo-functionalization of the PI-*b*-PEG-polymers encapsulating the nanocrystals.

Acknowledgements

This project was supported by DFG as part of the DFG Priority Programme SPP1313 “Biological Responses to Nanoscale Particles”. (Grant numbers: DFG GE647/10-2, GE647/9-1, WE2059/8-2, WE2059/8-1, HU624/9-1). We acknowledge technical support by Mr Norbert Koop. We acknowledge the support of the Chemical Industry Fund, VCI: German Chemical Industry Association.

Notes and references

1 X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss, *Science*, 2005, **307**, 538–544.
2 I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman and H. Mattoussi, *Nat. Mater.*, 2005, **4**, 435–446.
3 J. K. Oh, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 8433–8445.
4 T. Y. Ohulchanskyy, I. Roy, K.-T. Yong, H. E. Pudavar and P. N. Prasad, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2010, **2**, 162–175.
5 J. M. Klostranec and W. C. W. Chan, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 1953–1964.
6 X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale and M. P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 41–46.
7 D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise and W. W. Webb, *Science*, 2003, **300**, 1434–1436.
8 D. J. Bharali, D. W. Lucey, H. Jayakumar, H. E. Pudavar and P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 11364–11371.
9 T. J. Deerinck, *Toxicol. Pathol.*, 2008, **36**, 112–116.

10 C.-W. Lai, Y.-H. Wang, Y.-C. Chen, C.-C. Hsieh, B. P. Uttam, J.-K. Hsiao, C.-C. Hsu and P.-T. Chou, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 8314–8319.
11 Y. Liu, P. Chen, L. Lin, G. Q. Tang and G. G. Mu, *Proc. SPIE*, 2008, **6866**, 68660Z–68668Z.
12 R. Zhang, E. Rothenberg, G. Fruhwirth, P. D. Simonson, F. Ye, I. Golding, T. Ng, W. Lopes and P. R. Selvin, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 4074–4078.
13 F. Helmchen and W. Denk, *Nat. Methods*, 2005, **2**, 932–940.
14 W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, *Science*, 1990, **248**, 73–76.
15 R. Orzekowsky-Schroeder, A. Klinger, B. Mertensen, M. Blessenohl, A. Gebert, A. Vogel and G. Hüttmann, *J. Biomed. Opt.*, 2011, **16**, 116025–116038.
16 A. Fu, W. Gu, B. Boussert, K. Koski, D. Gerion, L. Manna, M. Le Gros, C. A. Larabell and A. P. Alivisatos, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 179–182.
17 S. Deka, A. Quarta, M. G. Lupo, A. Falqui, S. Boninelli, C. Giannini, G. Morello, M. De Giorgi, G. Lanzani, C. Spinella, R. Cingolani, T. Pellegrino and L. Manna, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 2948–2958.
18 A. Zacheo, A. Quarta, A. Mangoni, P. P. Pompa, R. Mastria, M. C. Capogrossi, R. Rinaldi and T. Pellegrino, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 2011, **10**, 209–215.
19 K.-T. Yong, J. Qian, I. Roy, H. H. Lee, E. J. Bergey, K. M. Tramposch, S. He, M. T. Swihart, A. Maitra and P. N. Prasad, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 761–765.
20 D. V. Talapin, R. Koeppe, S. Götzinger, A. Kornowski, J. M. Lupton, A. L. Rogach, O. Benson, J. Feldmann and H. Weller, *Nano Lett.*, 2003, **3**, 1677–1681.
21 L. Carbone, C. Nobile, M. De Giorgi, F. D. Sala, G. Morello, P. Pompa, M. Hytch, E. Snoeck, A. Fiore, I. R. Franchini, M. Nadasan, A. F. Silvestre, L. Chiodo, S. Kudera, R. Cingolani, R. Krahne and L. Manna, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 2942–2950.
22 J. Hu, L. Li, W. Yang, L. Manna, L. Wang and A. P. Alivisatos, *Science*, 2001, **292**, 2060–2063.
23 E. Rothenberg, Y. Ebenstein, M. Kazes and U. Banin, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 2797–2800.
24 G. Xing, S. Chakrabortty, K. L. Chou, N. Mishra, C. H. A. Huan, Y. Chan and T. C. Sum, *Appl. Phys. Lett.*, 2010, **97**, 061112–061114.
25 X. Li, J. Van Embden, J. W. M. Chon and M. Gu, *Appl. Phys. Lett.*, 2009, **94**, 103117–103120.
26 G. Xing, S. Chakrabortty, S. W. Ngiam, Y. Chan and T. C. Sum, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 17711–17716.
27 M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos, *Science*, 1998, **281**, 2013–2016.
28 W. C. W. Chan and S. M. Nie, *Science*, 1998, **281**, 2016–2018.
29 H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 12142–12150.
30 W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han and S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, **13**, 40–46.
31 H. T. Uyeda, I. L. Medintz, J. K. Jaiswal, S. M. Simon and H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 3870–3878.
32 F. Zhang, E. Lees, F. Amin, P. Rivera-Gil, F. Yang, P. Mulvaney and W. J. Parak, *Small*, 2011, **7**, 3113–3127.
33 W. W. Yu, E. Chang, J. C. Falkner, J. Zhang, A. M. Al-Somali, C. M. Sayes, J. Johns, R. Drezek and V. L. Colvin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2871–2879.
34 K. Susumu, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, T. Pons, J. B. Delehanty and H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 13987–13996.
35 B. C. Mei, K. Susumu, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, T. J. Mountziaris and H. Mattoussi, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 4949–4958.
36 M. Thiry, K. Boldt, M. S. Nikolic, F. Schulz, M. Ijeh, A. Panicker, T. Vossmeyer and H. Weller, *ACS Nano*, 2011, **5**, 4965–4973.
37 E. Pöselt, S. Fischer, S. Foerster and H. Weller, *Langmuir*, 2009, **25**, 13906–13913.
38 T. Pons and H. Mattoussi, *Ann. Biomed. Eng.*, 2009, **37**, 1934–1959.
39 E. Pöselt, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, U. Schumacher, C. Wagener, S. Förster and H. Weller, *ACS Nano*, 2012, **6**, 3346–3355.
40 J. Ostermann, J.-P. Merkl, S. Flessau, C. Wolter, A. Kornowski, C. Schmidtke, A. Pietsch, H. Kloust, A. Feld and H. Weller, *ACS Nano*, 2013, **7**, 9156–9167.
41 Y. Luo and L.-W. Wang, *ACS Nano*, 2010, **4**, 91–98.
42 B. W. Watson, S. J. Meldrum, H. C. Riddle, R. L. Brown and G. E. Sladen, *Br. Med. J.*, 1972, **2**, 104–106.
43 N. S. Makarov, M. Drobizhev and A. Rebane, *Opt. Express*, 2008, **16**, 4029–4047.
44 S.-C. Pu, M.-J. Yang, C.-C. Hsu, C.-W. Lai, C.-C. Hsieh, S. H. Lin, Y.-M. Cheng and P.-T. Chou, *Small*, 2006, **2**, 1308–1313.
45 G. S. He, K.-T. Yong, Q. Zheng, Y. Sahoo, A. Baev, A. I. Ryasnyanskiy and P. N. Prasad, *Opt. Express*, 2007, **15**, 12818–12833.
46 Y. Liu, P. Chen, Z.-H. Wang, F. Bian, L. Lin, S.-J. Chang and G.-G. Mu, *Laser Phys.*, 2009, **19**, 1886–1890.
47 M. Nirmal, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris and L. E. Brus, *Nature*, 1996, **383**, 802–804.
48 A. Klinger, R. Orzekowsky-Schroeder, D. von Smolinski, M. Blessenohl, A. Schueth, N. Koop, G. Huettmann and A. Gebert, *Histochem. Cell Biol.*, 2012, **137**, 269–278.
49 J. Jasieniak, L. Smith, J. Van Embden, P. Mulvaney and M. Califano, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 19468–19474.
50 M. A. Bopp, Y. Jia, G. Haran, E. A. Morlino and R. M. Hochstrasser, *Appl. Phys. Lett.*, 1998, **73**, 7–9.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2014

6.6.7 Poly(ethylene oxide) and Polystyrene Encapsulated Quantum Dots: Highly Fluorescent, Functionalizable, and Ultra Stable in Aqueous Media

In dieser Veröffentlichung wird die Anwendung von der Emulsionspolymerisation von DVB und Styrol[289] auf Quantenpunkte beschrieben. Diese erlaubt die gleichzeitige Funktionalisierung der QD Mizellen, bei einer geschickten Wahl des Monomers. Das Einbringen von DVB und Styrol in den hydrophoben Bereich der QD Mizellen schirmt den QD gegenüber Ionen in Lösung ab, was mittels Fluoreszenzlöschassay bestimmt wurde. Eine nahezu vollständige Abschirmung der Partikel über Jahre gegen hohe Quencherkonzentrationen kann so erreicht werden. Eine gute Abschirmung erlaubt ebenfalls den Nutzen von kupferkatalysierter 1,3 dipolarer Cycloaddition von alkinfunktionalisierten QDs mit 4-Azidoanilin. Mein Beitrag war hier vor allem die Durchführung und Interpretation des Fluoreszenzlöschassays. Weiterhin war ich beim Schreiben des Manuskriptes beteiligt. Reprinted with permission from *Poly(ethylene oxide) and Polystyrene Encapsulated Quantum Dots: Highly Fluorescent, Functionalizable, and Ultra Stable in Aqueous Media*, Hauke Kloust, Christian Schmidtke, Jan-Philip Merkl, Artur Feld, Theo Schotten, Ursula E. A. Fittschen, Manuela Gehring, Johannes Ostermann, Elmar H. Pöselt, and Horst Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 23244-23250.[13] Copyright ©2013 American Chemical Society.

THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY C

Article

pubs.acs.org/JPCC

Poly(ethylene oxide) and Polystyrene Encapsulated Quantum Dots: Highly Fluorescent, Functionalizable, and Ultrastable in Aqueous Media

Hauke Kloust,[†] Christian Schmidtke,[†] Jan-Philip Merkl,[†] Artur Feld,[†] Theo Schotten,[‡] Ursula E. A. Fittschen,[§] Manuela Gehring,[†] Johannes Ostermann,[†] Elmar Pöselt,[†] and Horst Weller*[,†,‡,⊥]

[†]Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

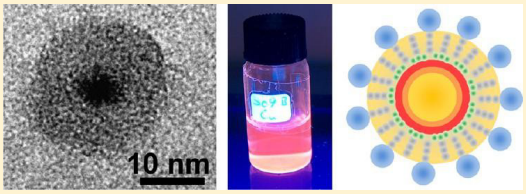
[‡]Center for Applied Nanotechnology, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

[§]Institute of Inorganic and Applied Chemistry, University of Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg, Germany

[⊥]The Hamburg Center for Ultrafast Imaging, University of Hamburg, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: The polymer encapsulation of quantum dots via seeded emulsion polymerization is a powerful method for the preparation of extraordinarily stable fluorescent particles and furthermore allows simple and straightforward *in situ* functionalization of the polymeric shell. Both features are inevitable for the application of quantum dots as targetable fluorescent probes in advanced biomedical studies. In particular, polymer encapsulated quantum dots showed only marginal loss of quantum yields when exposed to Cu^{2+} ions, which under nonoptimized conditions completely quenched quantum dot fluorescence. This will allow the application of copper-catalyzed click chemistry. Furthermore, by simple addition of functional surfactants or functional monomers during the seeded emulsion polymerization process, a broad range of *in situ* functionalized polymer-coated quantum dots were obtained. This was demonstrated by purposeful modulation of the zeta potential encapsulated of quantum dots and conjugation of dyestuff. Successful functionalization was unequivocally proven by total reflection X-ray fluorescence.



INTRODUCTION

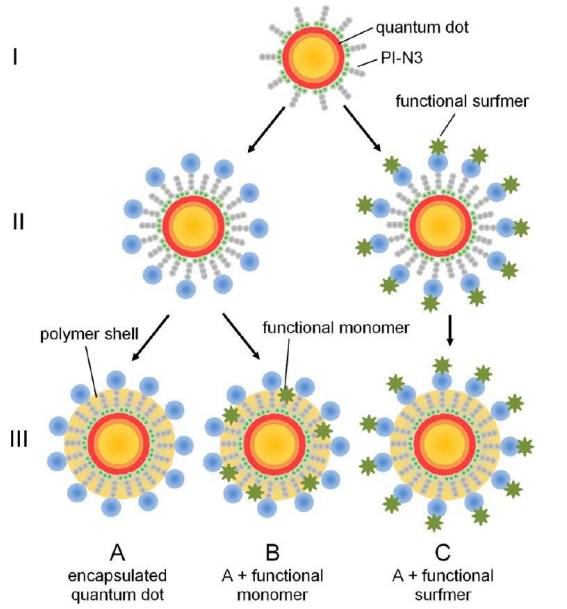
During the past decade, considerable efforts have been made in order to exploit the unique spectral properties of fluorescent nanocrystals—so-called semiconductor quantum dots (QDs)—in biological and preclinical applications. In particular, absorption and emission wavelengths of QDs are size-tunable, providing extremely broad and intense absorption bands, very narrow emission bands, and high fluorescence quantum yields.[1] Since QDs are hydrophobic after synthesis in high boiling organic solvents, a surface modification has to be done to render them biocompatible, without compromising the spectral preferences.[2,3] To this end, several different, often polymeric ligand systems have been developed.[4−12] An optimized ligand system will provide superior colloidal stability in biological media as well as high fluorescence quantum yields for extended periods. Additionally, particles will be straightforwardly functionalized. Both aims—facile functionalization[13−15] and protection against quenching—are still major challenges. Some metal ions are known to be strong quenchers, in particular copper ions. This effect has been exploited for the determination of copper ion concentrations by fluorescence quenching of QDs.[16] Interestingly, copper ions undergo irreversible ion exchange reactions on the surface of QDs, thus inducing irrevocable quenching.[17,18] In practice, popular copper-catalyzed click chemistry afforded poor results regarding fluorescence quantum yield on CdSe core based QDs (CdSe/ZnS) as reported by Schieber et al.[19] and Bernardin et al.[20] Moreover, for using QDs in biological studies, copper concentrations >1 μg/mL in blood plasma of humans and rats have to be considered.[21,22] Thus, for biomedical applications an ultimate shielding of QDs against copper ions is indispensable.

Previously, we reported the functionalization of iron oxide nanocrystals and CdSe/CdS/ZnS (core/shell/shell) QDs after micellular encapsulation by means of amphiphilic poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene oxide) (PI-*b*-PEO) copolymer.[9] In brief, the first step of encapsulation of QDs relied on a ligand exchange with a specially designed ligand, namely 2,2′-diaminodiethylamine-*block*-polyisoprene (PI-N3), which firmly attached to the nanocrystal surface. Subsequently, the PI-N3-coated QDs (Scheme 1, I) were transferred into micelles of poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene oxide) (PI-*b*-PEO) (Scheme 1, II). Herein, the number of QDs per micelle can be tuned by the PI-*b*-PEO/QD ratio, thus single encapsulated QDs are obtained when using high amounts of PI-*b*-PEO, while clusters of QDs can be achieved using low amounts of PI-*b*-

Received: May 8, 2013
Revised: October 10, 2013
Published: October 10, 2013

ACS Publications © 2013 American Chemical Society

Scheme 1. Encapsulation of QDs by Seeded Emulsion Polymerization: (I) PI-N3-Coated QD; (II) QD in PI-*b*-PEO Micelle after Phase Transfer; (III) QD Encapsulated in Polystyrene: (A) without Additional Functionality; (B) with Copolymerized Functional Monomer; (C) with Functional Surfmer



PEO (see Supporting Information). To this end, the precoated QDs, PI-*b*-PEO and radical initiator 2,2′-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN) were codissolved in tetrahydrofuran (THF) and injected into water. QD containing micelles were formed, wherein the polyisoprene units of the PI-N3 precoating and of the amphiphilic PI-*b*-PEO intercalated. Heating to 80 °C generated a cross-linked polymer shell, wherein any leaching of the surfactant was prevented under high dilution condition, thus substantially improving longitudinal signal stability.[9] Remarkably, as a benefical side effect, AIBN radicals improved fluorescence properties of the QDs, presumably due to annealing of the nanocrystal surface.[23]

In a different approach, we successfully applied seeded emulsion polymerization for the encapsulation of oleic acid-coated iron oxide nanocrystals into a polystyrene shell and performed functionalization of the composites with polymerizable molecules.[24,25]

Herein, we combine both methods for the biofunctionalization of QDs. Advantageously, the PI-*b*-PEO coating was augmented with an additional protective polystyrene shell around the QDs, which notably improved stability, hence maintaining extraordinary fluorescence quantum yields under forced quenching conditions, e.g., copper-catalyzed click chemistry. Furthermore, we utilized the emulsions polymerization protocol for utmost convenient *in situ* functionalization of the QDs by reverting to functional monomers and functional surfmers.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Materials. All chemicals were used as received unless otherwise stated. Organic ligand stabilized quantum dots were provided by CAN GmbH, Hamburg, Germany. Styrene and divinylbenzene were distilled at reduced pressure prior to use.

Synthesis of Alkylated Rose Bengal. Rose Bengal was *O*-alkylated with 4-vinylbenzyl chloride according to Nowakowska et al.[26]

Synthesis of PI-*b*-PEO-OH and PI-*b*-PEO-COOH. Polyisoprene-*block*-poly(ethylene oxide) diblock copolymers (PI-*b*-PEO-OH and PI-*b*-PEO-COOH) were synthesized according to Pöselt et al.[9] The prepared polymers had different M_n between M_n = 7200 g/mol and M_n = 12 700 g/mol.

Synthesis of PI-*b*-PEO-NH$_2$. To a vigorously stirred solution of 516 mg (3.18 mmol) of 1,1′-carbonyldiimidazole (CDI) in 10 mL of dry CH_2Cl_2 a solution of 2.15 g (0.159 mmol) of PI-*b*-PEO-OH in 15 mL of dry CH_2Cl_2 was added dropwise. After stirring for 40 h at room temperature, the solution was extracted with distilled water (4 × 40 mL) at 4 °C to remove excess CDI and imidazole. In order to prevent hydrolysis of the activated intermediate, all washings have to be done quickly at low temperature, and the organic phase was dried immediately over Na_2SO_4. Filtration and evaporation provided the crude activated intermediate as a yellow gel, which was immediately used in the next step without further purification.

To a vigorously stirred solution of 383 mg (6.36 mmol) of ethylenediamine in 5 mL of dry CH_2Cl_2 a solution of the foregoing CDI-activated PI-*b*-PEO diblock copolymer (0.159 mmol) in 10 mL of dry CH_2Cl_2 was added dropwise within 10 min. After adding 10 mL of anhydrous $CHCl_3$, the reaction mixture was stirred for 31 h at 55 °C. Stirring was continued for a further 7 days at room temperature. After filtration, the solvent was removed under vacuum. The remaining residue was dissolved in 2 mL of CH_2Cl_2 and precipitated by addition of acetone (60 mL) at −20 °C. After centrifugation, the supernatant was removed, and the crude product was again purified by subsequent precipitations in acetone (60 mL) at −20 °C and diethyl ether (60 mL) at −20 °C. The product was dissolved in deionized water (25 mL) and then dried by lyophilization (yield: 1827 mg, 85%). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 5.97−5.55 (m, 1H per unit of 1,2-PI, −HC=C*H*$_2$), 5.30 (br s, 1H, −OCONH−), 5.11−4.49 (m, 1H per unit of 1,4-PI, −C=C*H*−; 2H per unit of 3,4-PI, −C=C*H*$_2$; 2H per unit of 1,2-PI, −*H*C=C*H*$_2$), 4.20 (t, 2H, −C*H*$_2$−OCON*H*−), 3.79−3.46 (m, 4H per PEO unit), 3.21 (m, 2H, −N*H*−C*H*$_2$−), 2.80 (t, 2H, ^3J = 5.7 Hz, −C*H*$_2$−N*H*$_2$), 2.27−1.70 (m, 1H per unit of 3.4-PI, −C*H*−; 2H per unit of 1.4-PI, −*H*C=C*H*−C*H*$_2$−; 2H per unit of 1.4-PI, −C*H*$_2$−C*H*(−C*H*$_3$)=), 1.70−1.45 (m, 3H per unit of 3,4-PI, C−C*H*$_3$; 3H per unit of 1.4-PI, −C*H*(−C*H*$_3$)=), 1.45−1.04 (m, 3H, −C*H*(−C*H*$_3$)−; 2H per unit of 1,2-PI, −C−(C*H*$_3$)−C*H*$_2$−; 2H, C*H*$_3$−CH$_2$−; 2H per unit of 3,4-PI, C*H*−CH$_2$−), 1.04−0.86 (m, 1H, −CH(−C*H*$_3$)−; 3H per unit of 1,2-PI, −C−(C*H*$_3$)−), 0.86−0.74 (m, 3H, CH$_3$−C*H*$_2$−).

Synthesis of PI-*b*-PEO-OMe. 254 mg (2.07 × 10^{-3} mol) of 3-methoxypropionyl chloride (2.07 × 10^{-3} mol) was dissolved in 10 mL of THF and cooled to −30 °C. A solution of 700 mg (5.51 × 10^{-5} mol) PI-*b*-PEO-OH in 10 mL of dry THF was injected dropwise using a syringe. The solution was stirred for 23 h at room temperature. After evaporation of the solvent, the viscous crude product was dissolved in 2 mL of CH_2Cl_2 and precipitated by addition of acetone (40 mL) at −20 °C. The crude product was centrifuged off, and the precipitation process was repeated thrice. The product was dissolved in deionized water (10 mL) and dried by lyophilization (yield: 631 mg,

90%). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 5.97−5.55 (m, 1H per unit of 1,2-PI, −HC═CH_2), 5.11−4.49 (m, 1H per unit of 1,4-PI, −C═CH−; 2H per unit of 3,4-PI, −C═CH_2; 2H per unit of 1,2-PI, −HC═CH_2), 4.26 (t, 2H, ^3J = 4.8 Hz, −CH_2−O−CO−), 3.79−3.46 (m, 4H per PEO unit), 3.76 (2H, t, ^3J = 6.3 Hz, −CH_2−OCH_3), 3.35 (s, 3H, −OCH_3), 2.61 (t, 2H, ^3J = 6.3 Hz, −O−CO−CH_2−), 2.27−1.70 (m, 1H per unit of 3.4-PI, −CH−; 2H per unit of 1.4-PI, −HC═CH−CH_2−; 2H per unit of 1.4-PI, −CH_2−CH(−CH_3)═), 1.70−1.45 (m, 3H per unit of 3,4-PI, C−CH_3; 3H per unit of 1.4-PI, −CH(−CH_3)═), 1.45−1.04 (m, 3H, −CH(−CH_3)−; 2H per unit of 1,2-PI, −C−(CH_3)−CH_2−; 2H, CH_3−CH_2−; 2H per unit of 3,4-PI, CH−CH_2−), 1.04−0.86 (m, 1H, −CH−(−CH_3)−; 3H per unit of 1,2-PI, −C−(CH_3)−), 0.86−0.74 (m, 3H, CH_3−CH_2−).

Synthesis of PI-*b*-PEO-C≡CH. The alkyne end group was introduced according to Schmidtke et al.,[27] using propargyl bromide and the potassium salt of PI-*b*-PEO-OH in dry THF. The following NMR signals were characteristic (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 2.38 (t, 1H, J = 2.4 Hz, −CH_2−C≡CH), 4.14 (d, 2H, J = 2.4 Hz, −CH_2−C≡C*H*).

Synthesis of PI-N3. PI-N3 was synthesized according to Pöselt et al.[9] In brief, PI was synthesized by LAP of isoprene using *sec*-butyllithium (*s*-BuLi) as initiator. A terminal hydroxyl group was introduced by chain termination with ethylene oxide. PI-N3 was synthesized by CDI coupling of PI to diethylenetriamine (N3).

Instrumentation. Total reflection X-ray fluorescence (TXRF) measurements were carried out with a Bruker S2 Picofox. The instrument is equipped with a Mo tube (750 mA, 50 kV), a curved multilayer monochromator, and a silicon drift detector with an active area of 30 mm^2 and a resolution of 143 eV at 5.9 keV (Mn Kα). For all measurements, the Mo Kα line (17.4 keV) radiation was selected for excitation and an integration time of 100 s was used. TEM measurements were carried out with a Jeol JEM-1011 microscope (100 keV). The absorption spectra were recorded on a Cary 50 spectrometer (Varian). Emission spectra were recorded on a FluoroMax-4 spectrometer (Horiba, excitation wavelength λ = 438 nm). The fluorescence lifetime and the initial count rate of the fluorescence decay curve were determined using a PDL 800-D pulsed diode laser (λ = 438 nm), a PicoQuant PMA-M 185 photomultiplier, a constant-fraction discriminator (200 MHz), and an Ortec time-amplitude converter. The acquired data were fitted using a stretched exponential decay. Zeta potential and DLS measurements were carried out with a Malvern Zetasizer Nano ZS system. Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) spectra were recorded on AV I 400, AV II 400, or DRX 500 spectrometer (Bruker).

Seeded Emulsion Polymerization. In a standard experiment, a 10 nmol solution of QDs in 1 mL of *n*-hexane was incubated for 4 h with 6 μmol of PI-N3. After ligand exchange, PI-N3-coated QDs were precipitated by addition of excess ethanol and centrifugation at 6000*g*. The QD pellet was redissolved in 1 mL of THF and mixed with 0.5 μmol of PI-*b*-PEO and 8 mg of AIBN. This solution was injected into 10 mL of water and heated to 80 °C for 3 h. After careful removal of oxygen first by nitrogen flow and second by repetitive evacuation and flushing with nitrogen (20 cycles), 20 μL of 1-pentanol, 5 μL of styrene, 5 μL of divinylbenzene, and 1 mg of the radical initiator 2,2′-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)-propane] dihydrochloride were added. The solution was stirred at 50 °C for 5 h. Purification of the product can be performed via sucrose gradient centrifugation (see Supporting Information). Optionally PI-*b*-PEO-OH was replaced with functionalized PI-*b*-PEO derivatives. Similarly, styrene and divinylbenzene were optionally (partially) replaced with functional monomers.

Click Reaction. The copper-catalyzed Huisgen reaction between PI-*b*-PEO-C≡CH-functionalized QDs (4 mL, 1 μM) and 4-azidoaniline hydrochloride (1.5 mL, 3 mM) was performed in the presence of copper(II) sulfate (10 μL, 80 mM) and sodium ascorbate (10 μL, 40 μM) according to the protocol of Hassane et al.[28] Characteristic NMR peaks (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) δ (ppm) = 7.64−7.72 (m, 2H, aromatic-H), 8.02 (s, 1H, triazole-H) indicated a successful transformation.

■ RESULTS AND DISCUSSION

In the standard process styrene and divinylbenzene were used as monomers and polymerization was thermally initiated using 2,2-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane], thus obtaining highly cross-linked polystyrene encapsulated QDs (Scheme 1, III-A). Owing to the rigidity of the inner shell, the QDs are located in the center (Figure 1a). The absorption and emission spectra are shown in Figure 1b. Typically, fluorescence quantum yields are in the range of 30%−45%. According to dynamic light scattering (DLS), the hydrodynamic diameter of the particles shown in the TEM image is 54 nm (*Z*-average) (Figure 1c). The increased diameter found in DLS in comparison to TEM is explained by hydration effects of the exterior PEO shell, making the PEO shell very compressible.[29] Empty polymer particles can be removed quantitatively via sucrose gradient centrifugation (see Supporting Information).

Polystyrene encapsulated QDs showed excellent long-term stability in aqueous buffers. No significant loss in fluorescence quantum yields was observed over 8 weeks in water, PBS (pH 7.4 and pH 11.3), borate buffer (pH 8.2), and 0.025% sodium azide. However, a 40% decrease of fluorescence quantum yield was recorded in PBS at pH 3.0 (Figure 2a). We also tested putative fluorescence quenching of polystyrene encapsulated QDs on exposition to various reagents frequently used in histology. The polymer-coated QDs were perfectly stable in 10 mM EDTA and showed only moderate loss (15% and 37%) of fluorescence on exposition to 5% Triton X and 5% glutardialdehyde, respectively. However, on addition of 1% hydrogen peroxide rapid decay occurred, resulting in almost total quenching after 6 h (Figure 2b). Hydroxyl radicals may degrade the polystyrene shell.[30,31] The quenching effect of hydroxyl radicals *per se* on QDs is well-known.[32]

In a second series of experiments, fluorescence quenching of various QD preparations, which represent the different steps in the emulsion polymerization process, were tested on addition of Cu^{2+} ions. QDs covered with native ligands (green colums), as well as after PI-N3 coating (brown columns), lose their fluorescence immediately (Figure 3a). This total quenching even at minute Cu^{2+} concentrations demonstrated that the ligand exchange was devoid of any protective effects. Significantly in contrast, the seeded emulsion polymerization with styrene/divinylbenzene and using PI-*b*-PEO-NH_2 as surfmer provided stably encapsulated QDs, preserving about 80% of their original quantum yields (black columns). Our polystyrene encapsulated QDs displayed also excellent long-term stability against Cu^{2+} ions and preserved fluorescence quantum yield unchanged after 4 months (Figure 3b; under daylight, left, under UV-excitation, right).

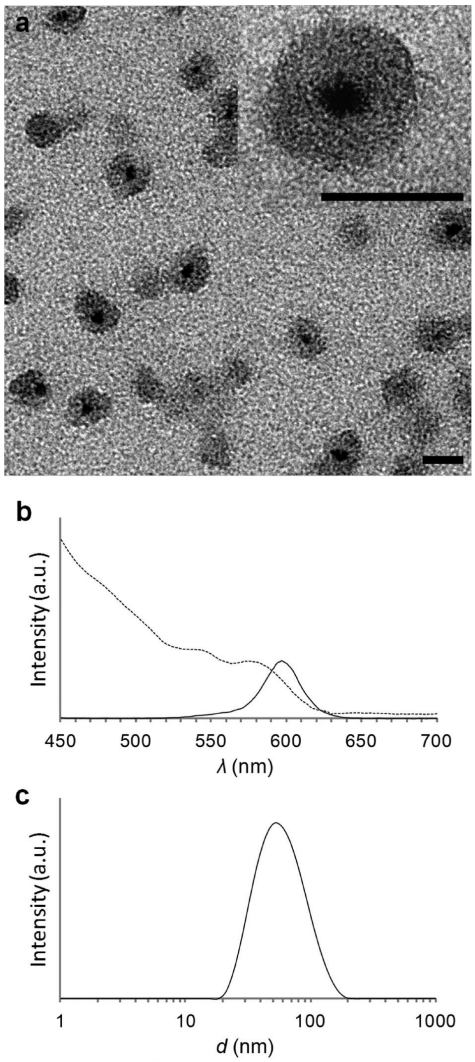


Figure 1. (a) TEM micrograph of encapsulated CdSe/CdS/ZnS (core/shell/shell) nanocrystals (scale bar = 20 nm). (b) Absorption (dashed line) and emission (solid line) spectrum of the encapsulated QDs. (c) DLS histogram (intensity distribution) of the encapsulated QDs.

The literature data of two CdSe/ZnS QD preparations containing PEO from Schieber et al.[19] (Figure 3a, red columns) and Bernardin et al.[20] (orange columns) suggest a ~85% drop in quantum yield after addition of ~25 and ~150 equiv of Cu^{1+} ions, thus performing better than our preparations, in organic solvents—as synthesized—or after ligand exchange with PI-N3 in the presence of Cu^{2+} ions. But, compared to our encapsulated QDs in water, their fluorescence gets quenched much stronger. Notably, as also reported by Beaune et al.[33] Cu^{1+} ions showed weaker quenching effects than Cu^{2+} ions (results not shown). In comparison with our diblock copolymer system,[9] we clearly observed a positive effect of the polystyrene shell with respect to the shielding.

In a more detailed study the effect of Cu^{2+} ions on the initial count rate of the fluorescence decay curve (Figure 3c) and the fluorescence lifetime (Figure 3d) was determined. After addition of 490 equiv of Cu^{2+} ions to polystyrene encapsulated QDs, the relative quantum yield as well as the initial count rate dropped by 10%; thereby the relative fluorescence lifetime stayed almost constant. Thus, one can conclude that the observed quenching is mainly static.[34] As well, immediate irreversible cation exchange occurs, as soon as Cu^{2+} is in contact with the QD surface.[33] The quenching occurred mainly on the addition of minute Cu^{2+} concentrations and stayed almost constant when further quencher is added. Assumedly, this was ascribed to a minor fraction of insufficiently shielded QDs, which are e.g. not totally covered by the polystyrene shell. The majority is centered in the polystyrene capsule thus appeared sufficiently shielded from the Cu^{2+} ions and long-term stable.

Our encapsulated QDs showed also excellent stability in the presence of 1,1′-dimethyl-4,4′-bipyridinium dichloride (methyl viologen) which is well-known to be a strong quencher.[35] Details about this series are presented in the Supporting Information.

As a result, our encapsulated QDs with a polystyrene-PI-*b*-PEO composite shell were not only rendered compatible with contemporary copper-catalyzed click chemistry but in general displayed enhanced stability under chemical stress, highly desirable for advanced biomedicinal and histological applications.

We further enhanced the concept of seeded emulsion polymerization for *in situ* functionalization of encapsulated quantum dots. Two different strategies were pursued. First, functional surfmers were used to modify the outer surface of the composite shell (Scheme 1C). Second, functional monomers were used (Scheme 1B). Herein, the functionalization took place in the inner part of the composite shell. The versatility of these approaches was demonstrated by copolymerization of basic, acidic, and neutral functional surfmers and—as a functional monomer—4-vinylbenzoic acid, hence tuning the zeta potential of the composite shells (Figure 4a). Expectedly, copolymerized functional surfmers like amino-terminated PI-*b*-PEO tuned the zeta potential highly positive (+28 mV), whereas hydroxyl- and methoxy-terminated PI-*b*-PEOs showed neutral and carboxy-terminated PI-*b*-PEO negative zeta potentials (−6 mV). Using a 1:1 mixture of amino-terminated PI-*b*-PEO and methoxy-terminated PI-*b*-PEO reduced the zeta potential almost by halve to +16 mV. Copolymerization of 4-vinylbenzoic acid (7%) provided particles with a zeta potential of −21 mV.

In a further experiment dyestuff conjugated quantum dots were prepared. To this end, Rose Bengal was *O*-alkylated with 4-vinylbenzyl chloride in order to introduce a polymerizable double bond[26] prior to the *in situ* copolymerization with styrene/divinylbenzene (absorption and emission spectra are provided in the Supporting Information). Rose Bengal and its derivatives have been used e.g. in experimental photodynamic therapy.[36] Rose Bengal contains four iodine atoms, highly amenable to total reflection X-ray fluorescence (TXRF) as an analytical method to prove successful functionalization. Neat polystyrene encapsulated quantum dots were used as a control. Expectedly, both samples—the dyestuff conjugated quantum dots and the blank—were positive on Cd, Zn, and Se, but only the former showed a concomitant I-signal. Notably, the intensities of the X-ray fluorescence allowed the quantification of functional groups per particle. Thus, about 580 Rose Bengal molecules per quantum dot were calculated from the signal ratios of the iodine and the cadmium signal (Figure 4b).

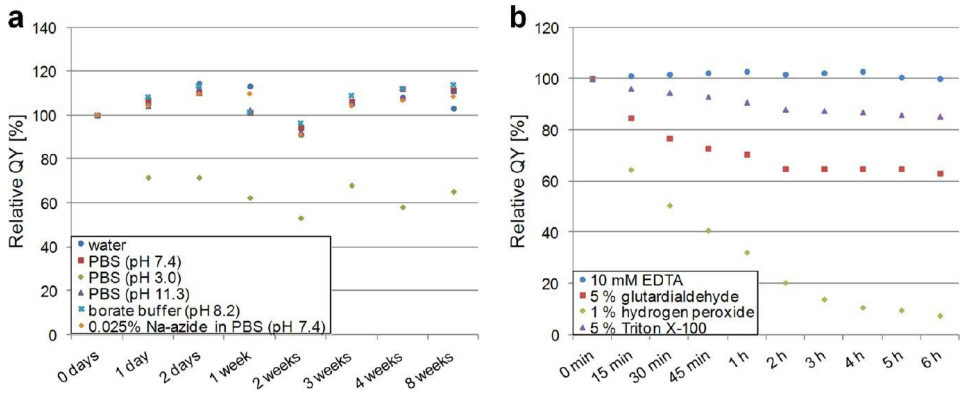


Figure 2. (a) Long-term stability test of the QDs fluorescence in water, PBS (pH 3.0, pH 7.4 and pH 11.3), borate buffer (pH 8.2), and 0.025% sodium azide. (b) Short-term stability test of the QDs fluorescence in water, EDTA (10 mM), glutardialdehyde (5%), hydrogen peroxide (1%), and Triton X-100 (5%).

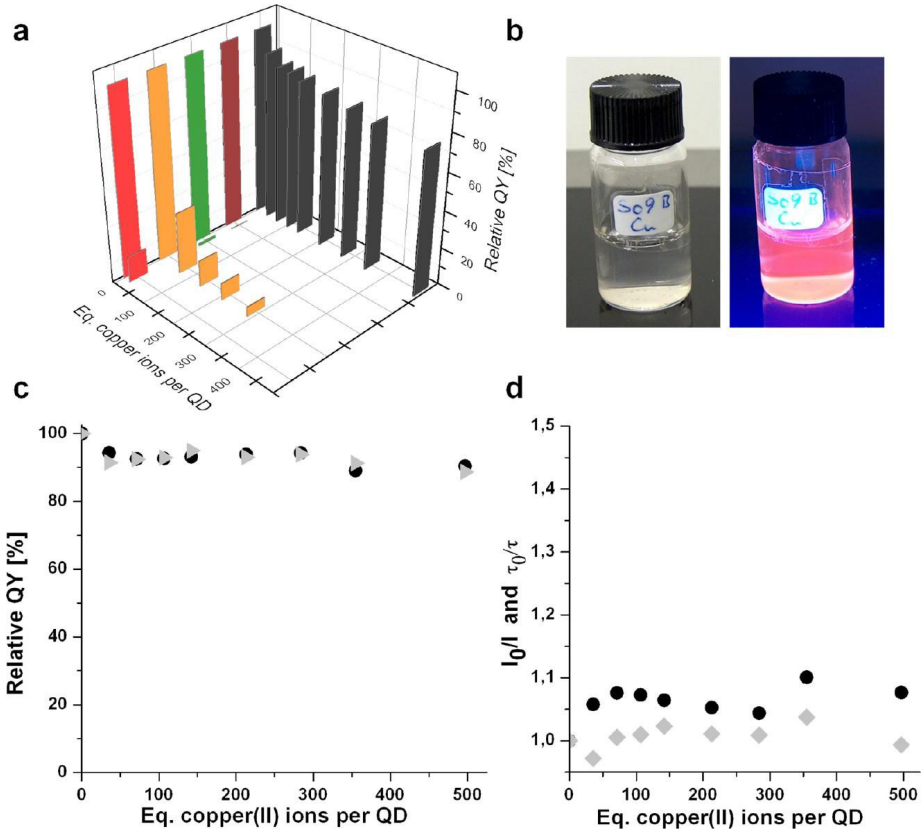


Figure 3. (a) Quenching of QDs by addition of copper ions. Red: as reported by Schieber et al.;[19] orange: as reported by Bernardin et al.;[20] green: QDs with native ligands; brown: PI-N3 coated QDs; black: QDs encapsulated in polystyrene using PI-*b*-PEO-NH_2 as surfactant. (b) Encapsulated QDs in the presence of 490 equiv of Cu^{2+} ions after 4 months with (right) and without (left) UV irradiation. (c) Relative fluorescence QY (black cycles) and relative initial count rate of the fluorescence decay curve (gray triangles). (d) Stern–Volmer plot of the fluorescence intensity (black cycles) and fluorescence lifetime (gray diamonds).

Finally, we demonstrated full applicability of our system by using click chemistry. Therefore, the diblock copolymer was modified with an alkyne group. As known from monomers and initiators, carrying an alkyne functionality, our alkyne functionalized surfmer endured the seeded emulsion polymerization.[37] The water-soluble alkyne-QDs were further reacted with 4-azidoaniline hydrochloride in the presence of copper(II) sulfate and sodium ascorbate (Figure 5a). The progress of the copper-catalyzed Huisgen reaction was monitored by NMR: the alkyne signal (2.38 ppm) disappeared, and a new signal from the triazole (8.02 ppm) and aromatic protons from the 4-azidoaniline hydrochloride (7.64–7.72 ppm) arised due to

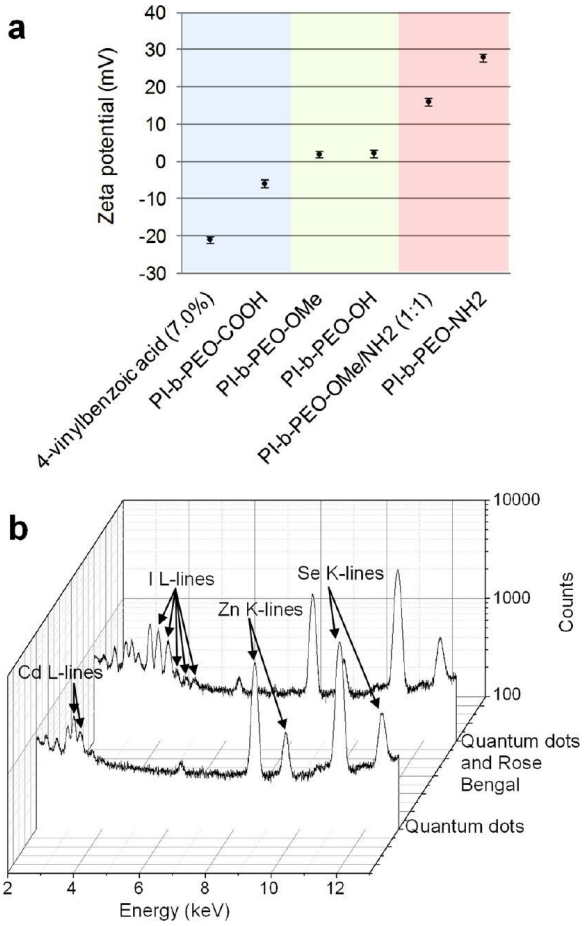


Figure 4. (a) Zeta potential of encapsulated quantum dots, functionalized with 4-vinylbenzoic acid, PI-*b*-PEO-COOH, PI-*b*-PEO-OMe, PI-*b*-PEO-OH, and PI-*b*-PEO-NH_2. (b) TXRF analysis of quantum dots encapsulated in a polystyrene shell with and without copolymerized Rose Bengal.

the successful click reaction. The optical properties of the QDs were nearly maintained (as expected from the stability tests seen in Figure 3) showing the effective shielding against copper (Figure 5b).

CONCLUSION

In conclusion, the implementation of a polystyrene shell round the QDs not only provided extraordinarily stable fluorescent particles under forcing conditions like copper-catalyzed click chemistry but also allowed simple and straightforward *in situ* functionalization of the polymeric shell. Both features are inevitable for the application as targetable fluorescent probes in advanced biomedical studies. In particular, polymer encapsulated quantum dots showed only marginal loss of quantum yields when exposed to Cu^{2+} ions, which under nonoptimized conditions completely quenched quantum dot fluorescence. By checking on the initial count rate of the fluorescence decay curve and the fluorescence lifetime, we were able to ascribe the quenching to be mainly static. Furthermore, by simple addition of functional surfactants or functional monomers during the process, a broad range of *in situ* functionalized polymer coated quantum dots were obtained. This was demonstrated by

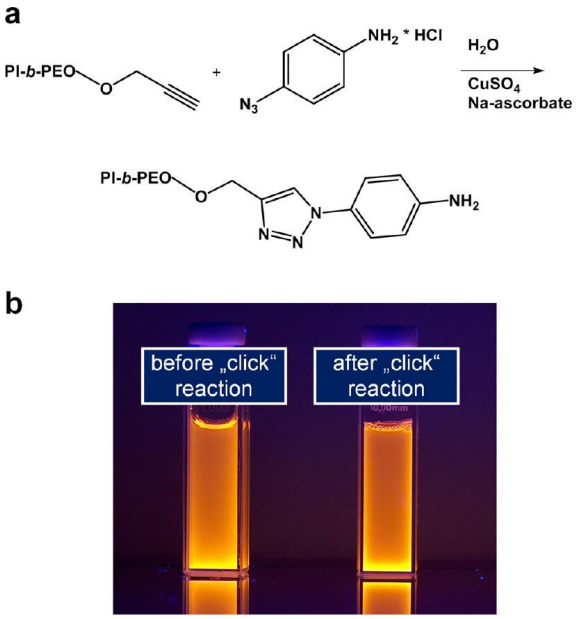


Figure 5. (a) Click reaction on alkyne-QDs. (b) QDs before (left) and after (right) click reaction under UV light.

purposeful modulation of the zeta potential of encapsulated of quantum dots and conjugation of a dyestuff. Successful functionalization was unequivocally proven by TXRF.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

A stability test of the encapsulated QDs in the presence of methyl viologen, the absorption and emission spectra of the Rose Bengal functionalized QDs, and references with more than 10 authors. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel +49 40 428383449; e-mail horst.weller@chemie.uni-hamburg.de (H.W.).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank O. Dabrowski for the *O*-alkylation of Rose Bengal and CAN GmbH for the preparation and provision of the slightly modified CANdots Serie A free of charge. This work was supported by the European Union's Seventh Framework Programme (VIBRANT, FP7-228933-2) and the state excellence initiative "Nanotechnology in Medicine".

REFERENCES

(1) Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Quantum Dots Versus Organic Dyes as Fluorescent Labels. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763–775.

(2) Dabbousi, B. O.; Rodriguez-Viejo, J.; Mikulec, F. V.; Heine, J. R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, K. F.; Bawendi, M. G. (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Optical and Structural Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Materials. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463–9475.

(3) Talapin, D. V.; Mekis, I.; Goetzinger, S.; Kornowski, A.; Benson, O.; Weller, H. CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS Core-Shell-Shell Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18826−18831.
(4) Bruchez, M., Jr.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science* **1998**, *281*, 2013−2016.
(5) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Raedler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703−707.
(6) Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. *Science* **2002**, *298*, 1759−1762.
(7) Akerman, M. E.; Chan, W. C. W.; Laakkonen, P.; Bhatia, S. N.; Ruoslahti, E. Nanocrystal Targeting in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12617−12621.
(8) Mattoussi, H.; Mauro, J. M.; Goldman, E. R.; Anderson, G. P.; Sundar, V. C.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G. Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142−12150.
(9) Pöselt, E.; Schmidtke, C.; Fischer, S.; Peldschus, K.; Salamon, J.; Kloust, H.; Tran, H.; Pietsch, A.; Heine, M.; Adam, G.; et al. Tailor-Made Quantum Dot and Iron Oxide Based Contrast Agents for in Vitro and in Vivo Tumor Imaging. *ACS Nano* **2012**, *6*, 3346−3355.
(10) Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. M.; Mattoussi, H. Synthesis of Compact Multidentate Ligands to Prepare Stable Hydrophilic Quantum Dot Fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3870−3878.
(11) Wang, Q.; Iancu, N.; Seo, D.-K. Preparation of Large Transparent Silica Monoliths with Embedded Photoluminescent CdSe@ZnS Core/Shell Quantum Dots. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4762−4764.
(12) Wang, Q.; Seo, D.-K. Preparation of Photostable Quantum Dot-Polystyrene Microbeads through Covalent Organosilane Coupling of CdSe@Zns Quantum Dots. *J. Mater. Sci.* **2009**, *44*, 816−820.
(13) Chang, Y.-P.; Pinaud, F.; Antelman, J.; Weiss, S. Tracking Bio-Molecules in Live Cells Using Quantum Dots. *J. Biophotonics* **2008**, *1*, 287−298.
(14) Wang, Q.; Xu, Y.; Zhao, X.; Chang, Y.; Liu, Y.; Jiang, L.; Sharma, J.; Seo, D.-K.; Yan, H. A Facile One-Step in Situ Functionalization of Quantum Dots with Preserved Photoluminescence for Bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6380−6381.
(15) Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W. K.; Nie, S. In Vivo Cancer Targeting and Imaging with Semiconductor Quantum Dots. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 969−976.
(16) Callan, J. F.; Mulrooney, R. C. Luminescent Detection of Cu(II) Ions in Aqueous Solution Using CdSe and CdSe-ZnS Quantum Dots Functionalised with Mercaptosuccinic Acid. *Phys. Status Solidi C* **2009**, *6*, 920−923.
(17) Isarov, A. V.; Chrysochoos, J. Optical and Photochemical Properties of Nonstoichiometric Cadmium Sulfide Nanoparticles: Surface Modification with Copper(II) Ions. *Langmuir* **1997**, *13*, 3142−3149.
(18) Son, D. H.; Hughes, S. M.; Yin, Y.; Paul Alivisatos, A. Cation Exchange Reactions in Ionic Nanocrystals. *Science* **2004**, *306*, 1009−1012.
(19) Schieber, C.; Bestetti, A.; Lim, J. P.; Ryan, A. D.; Nguyen, T.-L.; Eldridge, R.; White, A. R.; Gleeson, P. A.; Donnelly, P. S.; Williams, S. J.; et al. Conjugation of Transferrin to Azide-Modified CdSe/ZnS Core−Shell Quantum Dots Using Cyclooctyne Click Chemistry. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10675−10679.
(20) Bernardin, A.; Cazet, A.; Guyon, L.; Delannoy, P.; Vinet, F.; Bonnaffé, D.; Texier, I. Copper-Free Click Chemistry for Highly Luminescent Quantum Dot Conjugates: Application to in Vivo Metabolic Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 583−588.
(21) Linder, M. C.; Moor, J. R.; Wright, K. Ceruloplasmin Assays In Diagnosis and Treatment of Human Lung, Breast, and Gastrointestinal Cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **1981**, *67*, 263−275.
(22) Linder, M. C.; Houle, P. A.; Isaacs, E.; Moor, J. R.; Scott, L. E. Copper Regulation of Ceruloplasmin in Copper-Deficient Rats. *Enzyme* **1979**, *24*, 23−35.
(23) Schmidtke, C.; Lange, H.; Tran, H.; Ostermann, J.; Kloust, H.; Bastús, N. G.; Merkl, J.-P.; Thomsen, C.; Weller, H. Radical Initiated Reactions on Biocompatible CdSe-Based Quantum Dots: Ligand Cross-Linking, Crystal Annealing, and Fluorescence Enhancement. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 8570−8578.
(24) Kloust, H.; Pöselt, E.; Kappen, S.; Schmidtke, C.; Kornowski, A.; Pauer, W.; Moritz, H.-U.; Weller, H. Ultrasmall Biocompatible Nanocomposites: A New Approach Using Seeded Emulsion Polymerization for the Encapsulation of Nanocrystals. *Langmuir* **2012**, *28*, 7276−7281.
(25) Kloust, H.; Schmidtke, C.; Feld, A.; Schotten, T.; Eggers, R.; Fittschen, U. E. A.; Schulz, F.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Bastús, N. G.; et al. In Situ Functionalization and PEO Coating of Iron Oxide Nanocrystals Using Seeded Emulsion Polymerization. *Langmuir* **2013**, *29*, 4915−4921.
(26) Nowakowska, M.; Kepczyński, M.; Szczubialka, K. Polymeric Photosensitizers, 1. Synthesis and Photochemical Properties of Poly[(sodium p-styrenesulfonate)-co-(4-vinylbenzyl chloride)] Containing Rose Bengal Chromophores. *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196*, 2073−2080.
(27) Schmidtke, C.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Pietsch, A.; Kloust, H.; Tran, H.; Schotten, T.; Bastús, N. G.; Eggers, R.; Weller, H. Amphiphilic, Cross-Linkable Diblock Copolymers for Multifunctionalized Nanoparticles as Biological Probes. *Nanoscale* **2013**, *5*, 7433−7444.
(28) Said Hassane, F.; Frisch, B.; Schuber, F. Targeted Liposomes: Convenient Coupling of Ligands to Preformed Vesicles Using "Click Chemistry". *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 849−854.
(29) De Vringer, T.; Joosten, J. G. H.; Junginger, H. E. A Study of the Hydration of Poly(oxyethylene) at Low Temperatures by Differential Scanning Calorimetry. *Colloid Polym. Sci.* **1986**, *264*, 623−30.
(30) Weir, N. A. Reactions of Hydroxyl Radicals with Polystyrene. *Eur. Polym. J.* **1978**, *14*, 9−14.
(31) Ktari, N.; Poncet, P.; Sénéchal, H.; Malaquin, L.; Kanoufi, F.; Combellas, C. Patterning of Polystyrene by Scanning Electrochemical Microscopy. Biological Applications to Cell Adhesion. *Langmuir* **2010**, *26*, 17348−17356.
(32) Kumar, A.; Janata, E.; Henglein, A. Photochemistry of Colloidal Semiconductors. 25. Quenching of Cadmium Sulfide Fluorescence by Excess Positive Holes. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 2587−2591.
(33) Beaune, G.; Tamang, S.; Bernardin, A.; Bayle-Guillemaud, P.; Fenel, D.; Schoehn, G.; Vinet, F.; Reiss, P.; Texier, I. Luminescence of Polyethylene Glycol Coated CdSeTe/ZnS and InP/ZnS Nanoparticles in the Presence of Copper Cations. *ChemPhysChem.* **2011**, *12*, 2247−2254.
(34) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006.
(35) Logunov, S.; Green, T.; Marguet, S.; El-Sayed, M. A. Interfacial Carriers Dynamics of CdS Nanoparticles. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5652−5658.
(36) Liu, K.; Liu, X.; Zeng, Q.; Zhang, Y.; Tu, L.; Liu, T.; Kong, X.; Wang, Y.; Cao, F.; Lambrechts, S. A. G.; Aalders, M. C. G.; Zhang, H. Covalently Assembled NIR Nanoplatform for Simultaneous Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy of Cancer Cells. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4054−4062.
(37) Mansfeld, U.; Pietsch, C.; Hoogenboom, R.; Becer, C. R.; Schubert, U. S. Clickable Initiators, Monomers and Polymers in Controlled Radical Polymerizations - a Prospective Combination in Polymer Science. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1560−1598.

6.6.8 A general route towards well-defined magneto- or fluorescent-plasmonic nanohybrids

In dieser Veröffentlichung wird die Synthese eines neuartigen, Liponsäure-funktionalisiertem PI-*b*-PEO beschrieben, das anschließend zum Phasentransfer von Eisenoxidnanopartikeln und QDs benutzt wird. Die darin eingeschlossenen Nanopartikel besitzen, aufgrund der Liponsäure auf der Mizelloberfläche, eine besonders hohe Affinität zu Goldoberflächen. Die so verkapselten Nanopartikel werden benutzt um unterschiedliche, multifunktionale Nanohybride darzustellen. So konnten AuNK bzw. FeONK/Au Kern/Satellit Strukturen mittels Selbstassemblierung sowie FeONK/AuNK Kern/Schale mittels *seeded growth* hergestellt werden. Ausgehend von FeONK/AuNK Kern/Schale Strukturen können mit Liponsäure-verkapselten QDs trifunktionale Hybride dargestellt werden. Generell besitzen QP-LA die Möglichkeit AuNP zu verbrücken, was zu Aggregation führt. Hierbei war ich maßgeblich an der Synthese der trifunktionalen Hybride beteiligt. Des Weiteren war ich bei der Assemblierung und des Verfassens des Manuskriptes involviert. *A general route towards well-defined magneto- or fluorescent-plasmonic nanohybrids*, Christian Schmidtke, Hauke Kloust, Neus G. Bastús, Jan-Philip Merkl, Huong Tran, Sandra Flessau, Johannes Ostermann, Artur Feld and Horst Weller, *Nanoscale* **2013**, 5, 11783-11794. Copyright ©2013 published by The Royal Society of Chemistry. [14]

Nanoscale

RSC Publishing

PAPER

View Article Online
View Journal

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

A general route towards well-defined magneto- or fluorescent-plasmonic nanohybrids†

Cite this: DOI: 10.1039/c3nr04155g

Christian Schmidtke,‡[a] Hauke Kloust,‡[a] Neus G. Bastús,§[a] Jan-Philip Merkl,[a] Huong Tran,[a] Sandra Flessau,[a] Artur Feld,[a] Theo Schotten[b] and Horst Weller*[ab]

Received 7th August 2013
Accepted 24th September 2013

DOI: 10.1039/c3nr04155g

www.rsc.org/nanoscale

Herein, we present a general route towards defined nanohybrids, comprised of a fluorescent quantum dot (QD) or superparamagnetic iron oxide (Fe_2O_3) nanocrystal core and a tuneable corona of plasmonic gold or silver nanoparticles (NPs), adhered by a cross-linked poly(isoprene)-*b*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer (PI-*b*-PEG) matrix. To this end, the PEG-terminus of the amphiphilic polymer was acylated with lipoic acid (LA), which, as is known, forms quasi-covalent Au–thiol- or Ag–thiol-bonds. Surprisingly, by variation of the ratio of the different NPs, inverse core/satellite structures bearing QDs or Fe_2O_3 around a metallic NP core were obtained. Furthermore, gold NPs or even closed gold shells were grown by *in situ* reductive deposition of Au^{3+} ions on Fe_2O_3 NP seeds. Finally, in order to demonstrate the scope of the method, ternary nanohybrids, composed of QDs, Fe_2O_3 and Au NPs, were accomplished. All magneto-plasmonic and fluorescent-plasmonic materials were thoroughly characterized by absorption and emission spectroscopy, TEM and TEM-EDX. Antibody conjugation to these novel nanohybrids proved their practical utility in a prototype immunoassay.

Introduction

The concept of inorganic hybrid nanostructures is to combine the disparate physico-chemical properties of diverse nanocrystals towards higher integrated functionalities, affording solutions in biomedicine, energy harvesting and materials science, otherwise not obtainable with the discrete nanomaterials.[1] Undeniably, different kinds of nanoparticles should fully maintain, rather than mutually compromise their original properties, resulting in *e.g.* undesirable fluorescence quenching, energy transfer, or concurring light absorption processes, due to the proximity of fluorescent components to the other materials.[2,3] Herein, we focused on hybrids, which consist of a superparamagnetic iron oxide (Fe_2O_3) or a fluorescent semiconductor core and plasmonic gold nanoparticles (Au NPs). The strong absorption and scattering of visible light render Au NPs to be highly sensitive indicators in optical read-outs. Concomitantly, the high absorption coefficient for X-rays can be exploited for imaging in computed tomography (CT).[4,5] Superparamagnetic NPs are well-established as T2 contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI) or magnetic hyperthermia, thermoablation, and magnetically induced remote controlled drug delivery.[6–8] Fluorescent quantum dots (QDs) have been widely used as sensors, markers and biomedical imaging agents.[9,10] Consequently, combined magneto-plasmonic and fluorescent-plasmonic hybrid systems are of great interest in order to unlock the full potential of therapeutic and diagnostic, *i.e.* "theranostic" applications, resting on magnetic- or photo-induced hyperthermia therapy, fluorescence, dark-field, or magnetic resonance imaging, surface enhanced Raman spectroscopy (SERS), CT, and magnetic manipulations.[2,11,12]

However, meeting the numerous mandatory requirements for nanohybrids in biomedical applications – such as aqueous solubility, reproducibility, control of composition, morphology and size, functional versatility, tolerable toxicity and physiological stability – is a formidable challenge. Furthermore, hybrids have to be within the size dependent boundaries given by biological barriers, circulation time and excretion.[12,13] Owing to the complexity of the task, many different strategies towards nanohybrids have been developed, in order to accomplish these ambitious goals, such as (1) the co-encapsulation of different nanoparticles (NPs) into a nanocontainer (*e.g.* liposomes/vesicles,[14] micelles,[15,16] and porous silica[17]), (2) direct or ligand mediated grafting to core/satellite structures,[18] nanoflowers,[19,20] nanodumbbells,[20,21] or core/(hollow)shell structures,[18,22,23] and (3) the clustering of different NPs by electrostatic

[a]*Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany. E-mail: schmidtke@chemie.uni-hamburg.de; weller@chemie.uni-hamburg.de*

[b]*Center for Applied Nanotechnology, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

† Electronic supplementary information (ESI) available: NMR spectra, magnetic purification, BrCN coupling of 2,2′-dithiobis(ethylamine), Au domain growth on OH- and COOH-functionalized iron oxide NPs, Ag/QD core/satellite hybrids and dot-blot analysis of Ms mAb to ovalbumin conjugated hybrids. See DOI: 10.1039/c3nr04155g

‡ These authors contributed equally to this work.

§ Current address: Institut Català de Nanotecnologia (ICN), Campus UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

interactions,[24–27] hydrogen bonding,[3] covalent coupling chemistry (*e.g.* EDC/NHS, Au–thiol, *etc.*),[16,28,29] or *via* ligand–ligand interactions of biomolecules (*e.g.* DNA and biotin–(strept) avidin).[30,31] Therefore, besides highly specialized "stand-alone" solutions, general, broad scope avenues towards bio-applicable nanohybrids are utmost desirable.

Herein, we report a general strategy for the controlled clustering of different kinds of NPs by a stepwise self-assembly process in aqueous media, using chemically modified amphiphilic PI-*b*-PEG diblock copolymers. In particular binary or ternary combinations of fluorescent CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell-QDs, superparamagnetic Fe_2O_3 and plasmonic Au NPs were assembled *via* a uniform protocol. Deliberately, Au NP satellites were arranged around a central QD or Fe_2O_3 core or *vice versa*, hence providing hybrids comprised of a central Au core with a corona of peripheral QDs or Fe_2O_3 NPs, leveraging on a micellar encapsulation method, recently published by us.[32] Notably, the amphiphilic poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer (PI-*b*-PEG) rendered hydrophobic QDs and Fe_2O_3 NPs water-soluble, without affecting their primary properties. Aqueous stability was optionally enhanced by radical initiated cross-linking of the PI-part or, alternatively, by forming a polystyrene-shell (PS-shell) around the NP core.[33] Quasi-covalent attachment of Au or Ag NP satellites was accomplished by distal modification of the PI-*b*-PEG shell with lipoic acid, exploiting the extraordinary affinity of thiols or disulfides to noble metals.[34,35] Finally, this concept was expanded by the generation of Au-domains or even closed shells around Fe_2O_3 NPs *via* a seeded-growth method under very mild conditions. As a result, we obtained well-defined nanohybrids, wherein the polymer acted as an insulating matrix, embedding disparate NPs, thus preserving their pristine properties. External Au domains were eventually capped with thiol–PEGs, providing a stealth layer against immunorecognition.[13,36] Nevertheless, facile functionalization *via* thiol groups omnipresent in *e.g.* antibodies, fab-fragments, *etc.* is optional. The synthetic parameters providing different morphologies and compositions of the nanohybrids, as well as their optical and magnetic characteristics were systematically studied and their biomedical applications were demonstrated.

Results and discussion

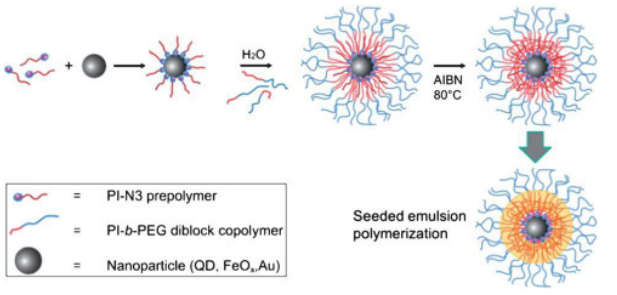
For biomedical applications of nanoparticles, water solubility is indispensable. Unfortunately, premium quality, monodisperse NPs with superior physico-chemical properties require synthesis in high boiling, non-polar organic solvents incompatible with an aqueous environment. Rendering these hydrophobic NPs water-soluble demands for a sophisticated phase-transfer process, namely which would not sacrifice the costly acquired attributes from the *de novo* synthesis. Recently, we reported two successful micellar encapsulation strategies for hydrophobic NPs – solely or in combination – either using poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene glycol) (PI-*b*-PEG),[32] or seeded emulsion polymerization of styrene/divinylbenzene (Scheme 1).[33] As a result, highly stable, water soluble semiconductor QDs or magnetic Fe_2O_3 NPs were obtained, which fully preserved their original attributes. Furthermore, the diblock copolymer provided straightforward attachment of biologically active molecules or chemical functionalities.

Herein, we expanded these concepts for the preparation of nanoclusters presenting a corona of gold NPs. To this end, the hydroxy terminus of PI-*b*-PEG was acylated with lipoic acid (LA), which – as is known – forms strong bonds between the (di)-thiol groups and gold surfaces. Acylation was accomplished either by condensation of amino terminal PI-*b*-PEG-NH_2 (ref. 37) and lipoic acid using 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM), or by direct esterification of PI-*b*-PEG-OH with lipoyl chloride (Scheme 2).

Controlled formation of hybrid structures

Self-assembly of NPs into controllable hybrid structures was accomplished by mixing different amounts of PI-*b*-PEG-LA encapsulated QDs or Fe_2O_3 NPs with citrate stabilized Au NPs in aqueous citrate solution [2.2 mM]. At first, the procedure was carried out under moderate dilution conditions ([Au NPs] = 10^{12} NPs per mL) with a considerable excess of QDs or Fe_2O_3 NPs (1 : 25). Representative TEM images of hybrid nanostructures obtained at high QD/Au NP ratios (Fig. 1, QD row) show the formation of discrete, rather uniform structures, composed of a central Au domain and several QD satellites. In contrast, at low QD/Au NP ratios, inverse structures with a QD or Fe_2O_3 NP core surrounded by a corona of Au-NPs were obtained. Interestingly, when the QD/Au NP ratio was close to 1, formation of Au/QD NP networks occurred. This is explainable by void dithiol groups of the QDs, which will be cross-linked by reactive Au NPs. Analogous results were obtained when using PI-*b*-PEG-LA encapsulated Fe_2O_3 NPs, indicating that nanohybrids were formed irrespective of the core components (Fig. 1, Fe_2O_3 row). In summary, by using PI-*b*-PEG-LA for micellar encapsulation, a general, straightforward access to defined nanoclusters is provided by simply adjusting the interrelated proportions of diverse NPs.

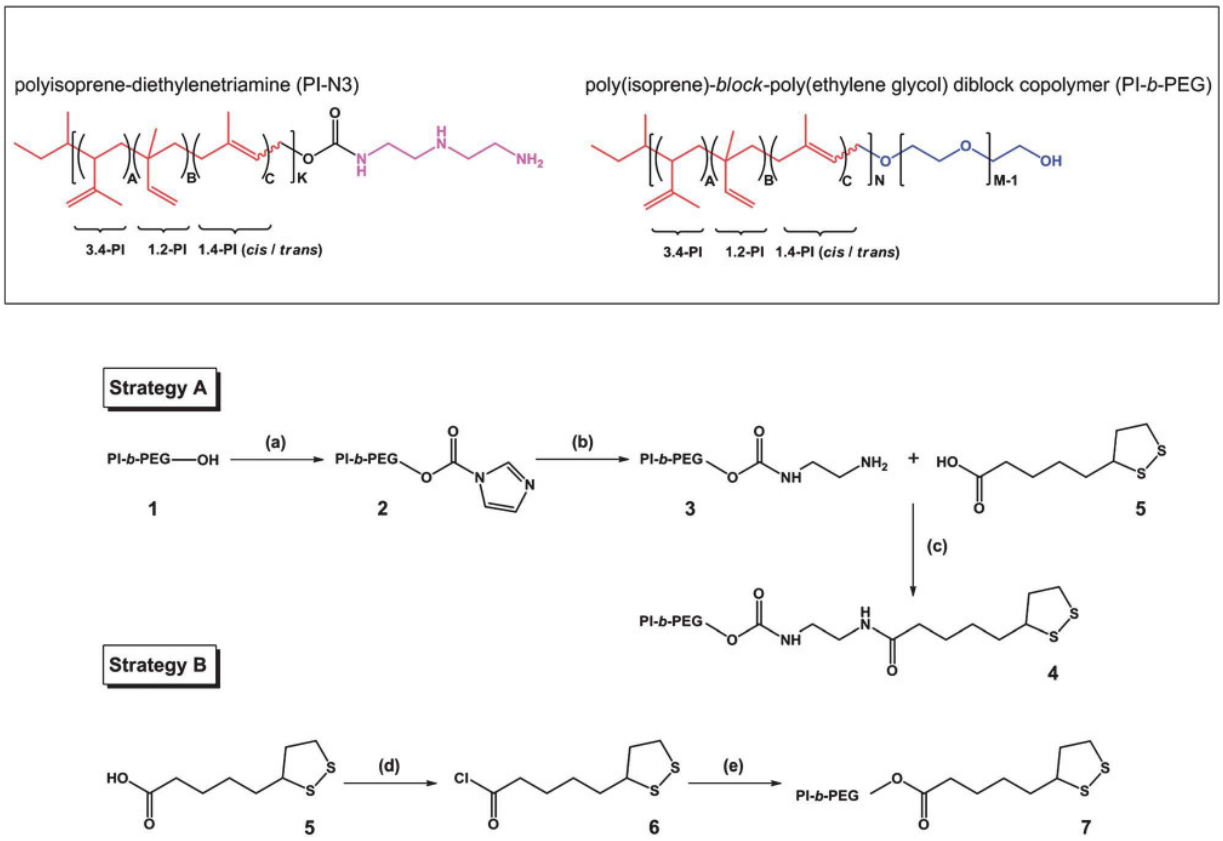
Controlled nanoclusterization was not restricted to lipoic acid derivatives, but also achieved with other disulfides. For instance, after functionalization of PI-*b*-PEG-OH encapsulated NPs with 2,2′-dithiobis(ethylamine) *via* cyanogen bromide activation, analogous QD/Au or Fe_2O_3–Au hybrids were obtained (see ESI†).



Scheme 1 Schematic representation of nanoparticle encapsulation with the PI-*b*-PEG diblock copolymer and seeded emulsion polymerization.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.



Scheme 2 Chemical structures and synthetic routes for the attachment of LA to PI-*b*-PEG: (a) CDI, CH_2Cl_2, (b) ethylenediamine, DABCO, CH_2Cl_2–CH_2Cl_3 (3 : 2), (c) DMT-MM, THF–H_2O (2 : 1), (d) thionyl chloride, CH_2Cl_2, and (e) PI-*b*-PEG 1, DABCO, CH_2Cl_2.

Kinetics of nanoclusterization

Progress of the self-assembly process was easily monitored by UV-Vis spectroscopy, leveraging on the characteristic Au surface plasmon resonance (SPR) band. Immediately after addition of QDs to the Au NP solution SPR was recorded. At a high QD to Au NP ratio (25 : 1), a slight red-shift (from 520 to 530 nm) occurred. This small shift was explained by the changes in the dielectric properties of the Au NPs due to the presence of QDs on their surface[38] and is in agreement with the formation of discrete oligomers observed in TEM. At similar amounts of QDs and Au NPs, the SPR band, initially found at 524 nm, further red-shifted and broadened, leading to a decrease of the absorption with a concomitant increase of the SPR band between 600 and 800 nm. This observation can be explained by coupling of the dipole moments of adjacent Au NPs[39–41] and clearly indicated aggregation of Au NPs to Au/QD networks, as evidenced by TEM. For an in-depth examination, additional QD/Au NP ratios of 0.3 : 1 and 6 : 1 were studied. Ten minutes after mixing colloidal Au NP solutions with QDs in a ratio of 25 : 1 or 6 : 1, a marginal shift of the intense red color of the starting solution occurred, not detectable by the naked eye, clearly indicating well-dispersed particles (Fig. 2A and B). In contrast, after addition of QDs in the ratio of 1 : 1 or 0.3 : 1, a pronounced blue-shift took place, pointing to aggregation (Fig. 2C and D). Interestingly, the blue color of the 1 : 1 Au NP–QD mixture suggested even higher aggregation than the purple coloration of the respective 0.3 : 1 mixture. Indeed, these observations were quantified by calculating the aggregation parameter, according to Lévy *et al.*[42] As can be seen in Fig. 3A (red graph), maximum aggregation occurred at an Au NP to QD ratio of 1 : 1. Further depletion of QDs again decreased the extent of aggregation (Fig. 3A, black graph). We hypothesized that the QD/Au ratio for maximum aggregation would proportionally increase to the Au NP surface. In fact, when using larger Au NPs of 50 and 110 nm diameters, *i.e.* increasing the Au surface areas by factors of 6 and 30 respectively, the QD/Au ratio increased exactly in parallel, hence affording 6 : 1 and 30 : 1 QD/Au ratios for maximum aggregation (Fig. 3).

This thiol-induced aggregation was further studied by blocking the surface of the Au NPs with MeO–PEG–SH. Immediately after adding MeO–PEG–SH, the gradual spectral broadening induced by the network formation stopped (Fig. 2E).

Optical properties of Au/QD-hybrids

In order to study how putative interference between Au NPs and the QDs of the hybrids may affect fluorescence properties, we used single particle fluorescence confocal microscopy on a glass substrate. Fig. 4 (black triangles) presents the fluorescence

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

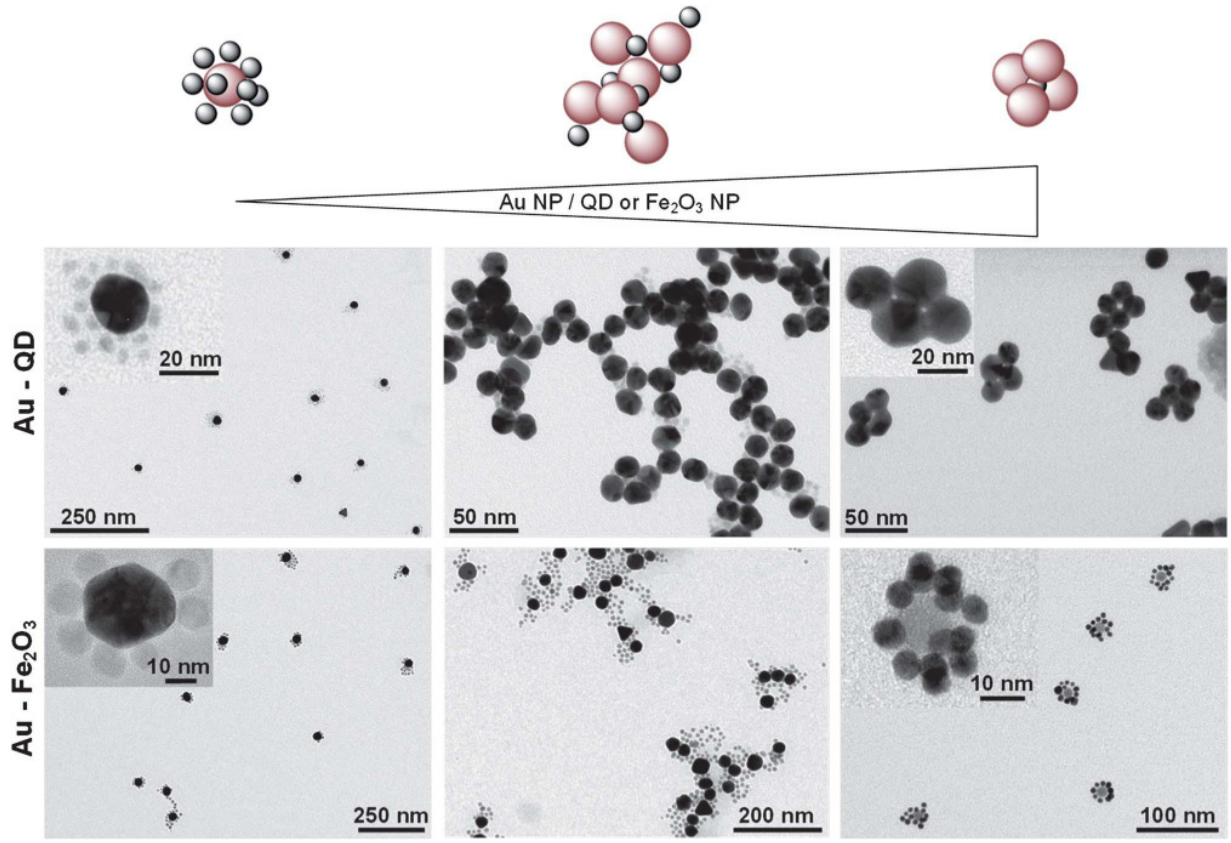


Fig. 1 Upper row: schematic representation of three types of hybrid structures: core/satellite hybrid, networks, and the inverse core/satellite hybrid. Middle row: QD/Au-hybrids (from left to right): Au/QD core/satellite hybrids; Au/QD networks, and QD/Au core/satellite hybrids. Lower row: analogous Fe_2O_3/Au-hybrids.

spectrum of an individual native QD. In contrast, inverse hybrids with an Au core and QD satellites (representative emission spectra are shown in Fig. 4 (red dots)) provided a broader emission spectrum, owing to the plurality of QDs in this case. However, the mean fluorescence lifetime (9.4 ns) was shorter compared to that of the native QDs which exhibited an average lifetime of 17 ns.

Formation of Ag–QDs and Ag–Fe_2O_3 core/satellite hybrids

To demonstrate the versatility of our approach, we also successfully attached silver nanoparticles (Ag NPs) to the LA functionalized micelles. Ag/Fe_2O_3 hybrids may find interesting applications as cytotoxic agents and photothermal probes.[27] QD/Ag-hybrids showed similar morphologies to the corresponding gold hybrids (see ESI†), but no fluorescence, most likely due to instantaneous quenching by the enhanced release of silver ions.

Formation of Au-domains and Au-shells

Next, we studied the growth of Au NPs from ionic Au precursors on lipoic acid functionalized NPs *in situ*. To our delight, addition of $HAuCl_4$ solution to LA-polymer encapsulated Fe_2O_3 NPs in an aqueous sodium citrate solution provided Au-domains on the surface initially (Fig. 5I).

The formation of the Au-domains can be explained by the reduction of Au^{3+} atoms on the LA modified PI-*b*-PEG coated Fe_2O_3 NPs. No reaction at RT was observed in solutions containing only the $HAuCl_4$ precursor and sodium citrate. Control experiments with hydroxyl or carboxyl functionalized Fe_2O_3 NPs provided uncontrolled and irregularly shaped structures, showing partial aggregation (see ESI†). These results suggest a LA-surface catalyzed reduction of Au^{3+}, rather than a separate nucleation of Au NPs, subsequently attaching to PI-*b*-PEG-coated Fe_2O_3 NPs. Particle stability upon formation of the Au shell is largely controlled by electrostatic interactions, promoted by the presence of sodium citrate.

Kinetics of gold growth were monitored *via* color changes of the reaction mixture after mixing a colloidal solution of PI-*b*-PEG-LA-coated Fe_2O_3 NPs with freshly prepared solutions of $HAuCl_4$ [25 mM] and sodium citrate [2.2 mM] at room temperature. Initially, PI-*b*-PEG-coated Fe_2O_3 NPs exhibit a flat spectrum (Fig. 6A, dashed line), characterized by an increasing absorption from longer to shorter wavelengths. After adding the Au precursor, the characteristic Au surface plasmon band appeared, peaking initially at 540 nm. With increasing reaction time, the surface plasmon resonance (SPR) band gets more pronounced and it is blue-shifted to 531 nm. This can be explained by the presence of gold intermediates (protoparticles)

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

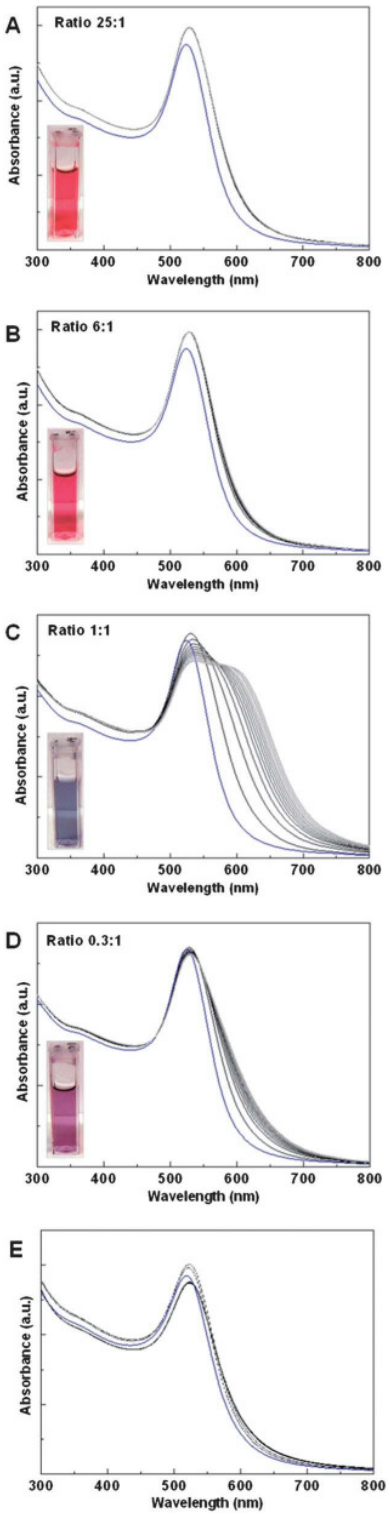


Fig. 2 Gradual shift of the plasmon resonance band in UV-Vis extinction spectra of Au/QD hybrids at different QD/Au ratios: 25 : 1 (A), 6 : 1 (B), 1 : 1 (C), 0.3 : 1 (D) and stopped aggregation by the addition of thiolated PEG (E).

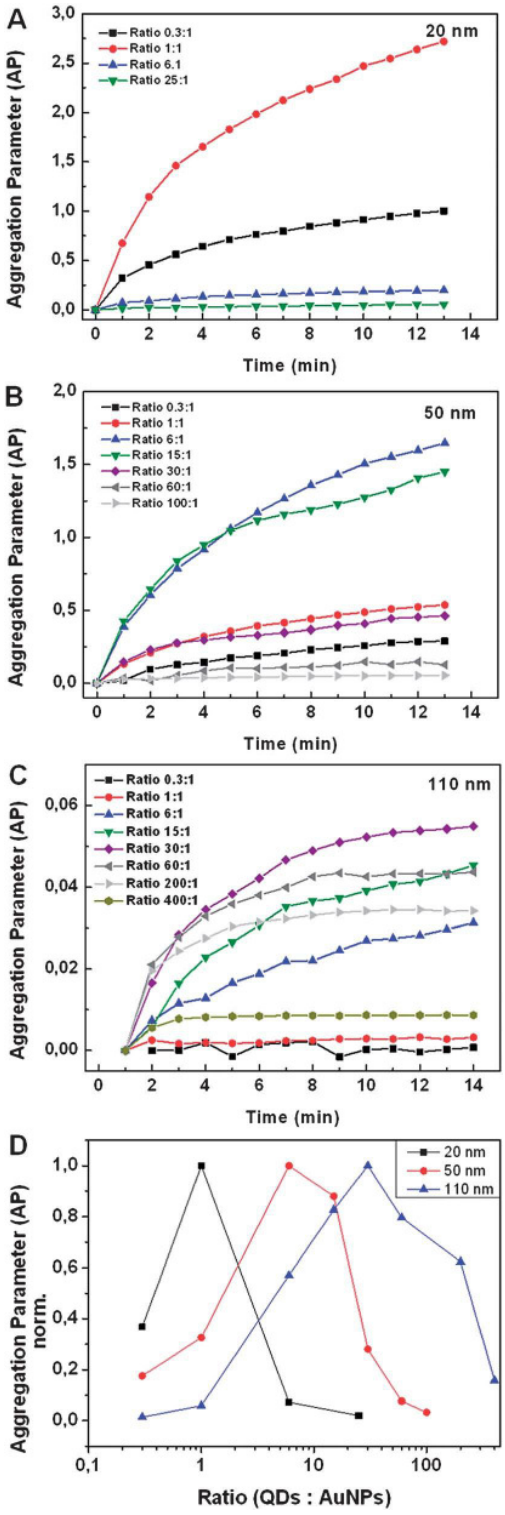


Fig. 3 Aggregation parameter obtained for different Au cores at different ratios: 20 nm (A), 50 nm (B) and 110 nm (C). QD : Au NP ratio dependence of the aggregation parameter (D).

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

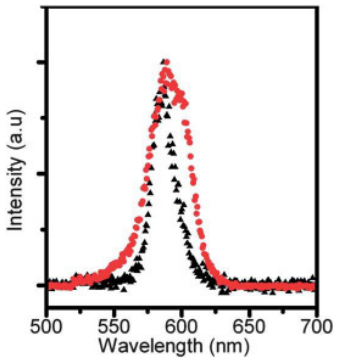


Fig. 4 Fluorescence spectra recorded with a confocal fluorescence microscope of native QDs (black triangles), and hybrid Au NPs surrounded by QDs (red dots).

which act as monomers for the formation of the Au domains. These protoparticles appear in the early stages of Au NP formation and absorb in the 600–800 nm range of the UV-Vis spectra.[43] At short times, this band can be clearly seen, whereas it progressively disappears when the further growth process of the domains takes place. Thus, with further growth of the Au domains a red shift is observed (Fig. 6A and B).

The composition and morphology of these hybrid structures were thoroughly analyzed by using transmission electron microscopy (TEM) and high resolution TEM (HRTEM) images (Fig. 7A and B), and transmission electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometry (TEM-EDX) elemental mappings (Fig. 7C–F). As can be clearly seen, central iron oxide cores were surrounded by irregular gold NPs. In TEM-EDX elemental mappings, iron and oxygen expectedly showed a strong signal in the center of the hybrids, whereas a strong gold signal was detected at the periphery. Minor signals of iron and oxygen in the gold domains were caused by scattering effects.

Additionally, the distance between the Fe_2O_3 cores and the Au satellites can be adjusted by the controlled polymerization of the polystyrene shell around the Fe_2O_3. As expected, higher amounts of styrene provided a higher thickness layer between the cores and the satellites (Fig. 8).

These *in situ* formed hybrids or the previously described Fe_2O_3/Au core/satellite hybrids can undergo further Au NP growth by adding further $HAuCl_4$ solution in an iterative procedure, which finally completely enclosed the Fe_2O_3 cores (Fig. 5II and III).

When *in situ* formed hybrids were used as seeds for iterative growth of Au domains, the SPR slightly red-shifted on each growth step (Fig. 6C: first iteration – solid line, second iteration – dashed line, and third iteration – dotted line). Furthermore, the absorption between 650 nm and 700 nm increased, which is probably due to the lack of uniformity of the Au domains around the cores, indicating larger Fe_2O_3/Au core/shell structures, similar to those reported by Lyon *et al.* without a polymeric layer *via* iterative hydroxylamine seeding.[44]

We applied our hybrids to a prototypic dot-blot assay, successfully conjugating the monoclonal mouse anti-ovalbumin antibody (Ms mAb to ovalbumin) to the gold surface (see ESI†). Purple staining of the dotted ovalbumin spots indicates that the hybrids specifically bind and aggregate on these treated areas. After 1 h of incubation, dot-blot analysis on ovalbumin coated nitrocellulose membranes proved full functionality of the antibody conjugated hybrids and as well with antibody conjugated 40 nm sodium citrate stabilized gold NPs as positive control. Expectedly, the negative control using unconjugated hybrids showed no reactivity.

Finally, the magnetic properties of the Fe_2O_3/Au hybrids at 37 °C and 1.41 T displayed an r_2 relaxivity of 180 mM^{-1} s^{-1} and an r_1 relaxivity of 6.6 mM^{-1} s^{-1}, suggesting these hybrids well-suited as contrast agents for T_2 or T_2^* weighted MRI sequences.

Formation of Fe_2O_3/Au/QD core/satellite/satellite hybrids

The method described herein can be easily extended to the formation of even more complex structures, comprised of a central NP, surrounded by a composite shell of two different nanomaterials. Hence, on the surface of PI-*b*-PEG-LA

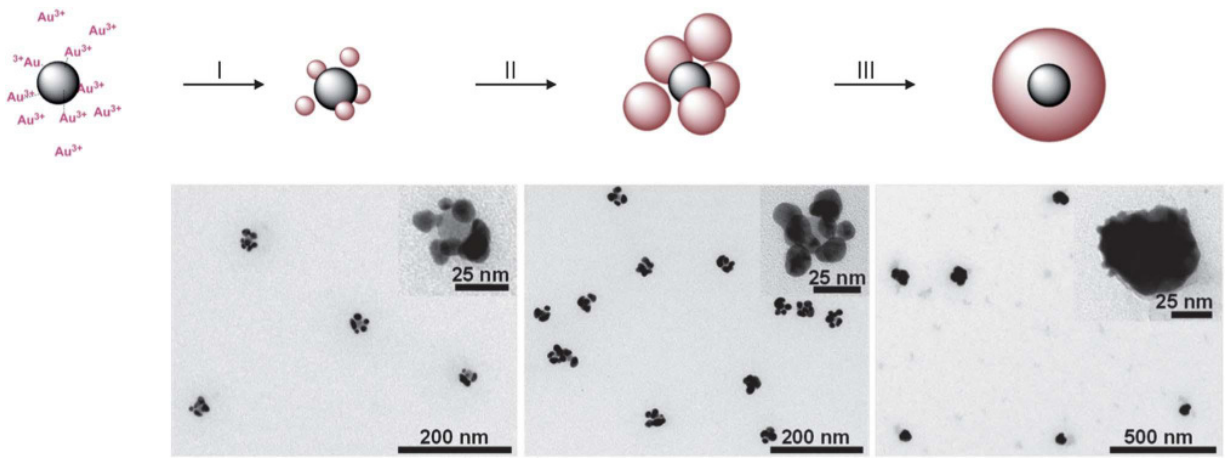


Fig. 5 *In situ* growth of gold nanocrystals from gold precursors on the lipoic acid functionalized Fe_2O_3 NPs and further growth of gold nanocrystals on these hybrids and on hybrids of attached Au NPs, respectively.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

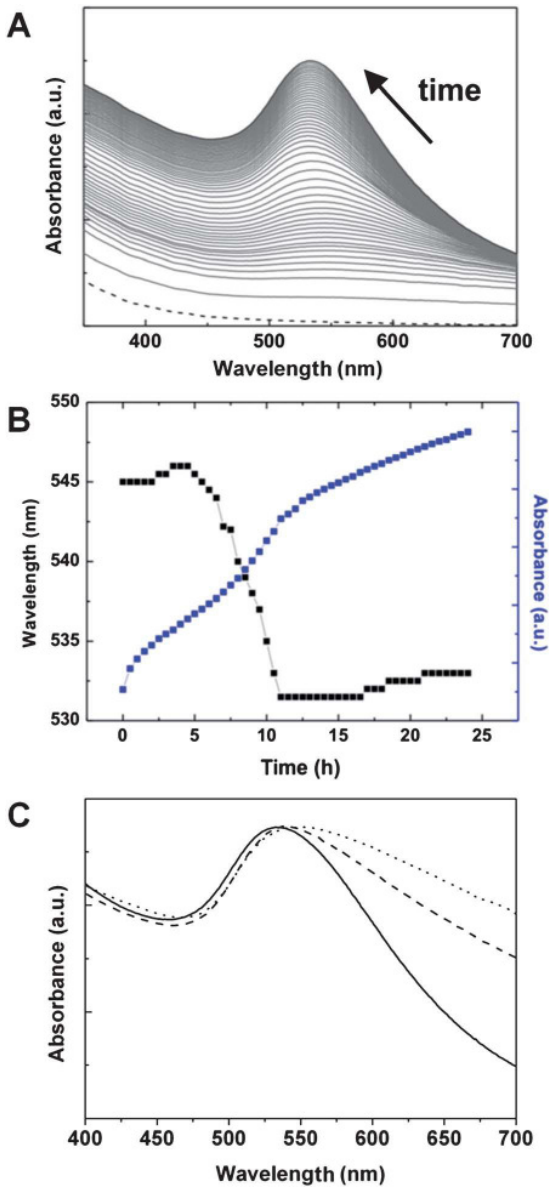


Fig. 6 (A and B) Absorption of the reaction solution over time from bottom (t = 0 h) to top (t = 24 h); (C) absorption spectra of the hybrids after three iterative gold growth steps (first iteration: solid line; second iteration: dashed line; third iteration: dotted line).

encapsulated Fe_2O_3 NPs gold domains were grown from $HAuCl_4$ solution. The resulting Fe_2O_3/Au hybrid structures were purified by means of a magnetic column and resuspended in aqueous sodium citrate solution. Subsequently, PI-*b*-PEG-LA encapsulated QDs were added, which in turn adhered to the Au NPs, leading to the formation of ternary hybrids composed of a central Fe_2O_3 NP domain with an inner orbit of Au NPs and an outer orbit of QDs. Accordingly, TEM images showed the formation of ternary hybrids, consisting of a central 16 nm Fe_2O_3 NP surrounded by a shell composed of both 20 nm Au NPs and 5 nm QDs (Fig. 9).

Conclusion

Starting from a common precursor, we established two different methods leading to hybrid nanostructures, whose composition can be precisely tuned. The key component for both methods is a polymer-coated core particle, exposing dithiol moieties of *e.g.* lipoic acid on its surface. The cross-linked PI-*b*-PEG optionally copolymerized with styrene/divinylbenzene stably encloses the NPs (QDs or Fe_2O_3), hence fully preserving the characteristics of the core, whereas the extroverted dithiol moieties bind quasi-covalently to plasmonic gold or silver NPs. Fluorescent-plasmonic, magneto-plasmonic and even fluorescent–magneto-plasmonic hybrids were prepared by using virtually identical protocols. Advantageously, the morphology of and spatial arrangement within the hybrids can be precisely tuned, by simple variation of the proportions of the distinct components. Thus, either hybrids with a gold corona around a QD or Fe_2O_3 core, or the inverted hybrids, bearing QDs or Fe_2O_3 satellites around a gold core, were selectively accomplished. Maximum aggregation, leading to nanohybrid networks, was achieved with about 1200 nm^2 of the gold surface per LA-PI-*b*-PEG coated QD. All hybrids were thoroughly characterized by TEM, HR-TEM and TEM-EDX, confirming their structures. The same protocol was successfully applied to silver hybrids, however the more negative redox potential of silver led to fluorescence quenching of the QDs.

Additionally, we used LA-PI-*b*-PEG coated Fe_2O_3 NPs as seeds for *in situ* gold deposition from aqueous $HAuCl_4$/sodium citrate solution. Optionally, by iterative growth steps either gold domains on, or even closed gold shells around the seeds were achieved.

Finally, magneto-plasmonic hybrids were conjugated to an antibody, leveraging on the straightforward protein functionalization of gold surfaces *via e.g.* cysteine/cystine residues. These constructs proved full functionality in a prototypic dot-blot assay, comparable to the corresponding conjugates with sole gold NPs.

Magnetic relaxivities of magneto-plasmonic hybrids were quite similar to approved MRI contrast agents.

In summary, we developed a broadly applicable, uniform protocol for the preparation of fluorescent-plasmonic, magneto-plasmonic and even fluorescent–magneto-plasmonic hybrids of distinct morphology and composition, which displayed promising features for practical applications in biology and medicine (imaging, sensing and diagnosis), as well as in opto-electronics.

Experimental section

Materials

Air or water sensitive chemical compounds were handled under inert conditions with N_2/Ar using the Schlenk technique or glove boxes. Cadmium acetate anhydrous (99.99%) and zinc acetate hydrate (99.9%) were purchased from ChemPur, and selenium shots (1–5 mm, 99.9%) from Alfa Aesar. Ethylenediamine (≥99.5%) and thionyl chloride were purchased from Fluka. (±)-(α)-Lipoic acid was purchased from Sigma, and MeO-PEG-SH (MW 2.0 kDa) from Iris Biotech. Chloroform (anhydrous, amylene stabilized), dichloromethane (anhydrous, amylene stabilized), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), and diethyl

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

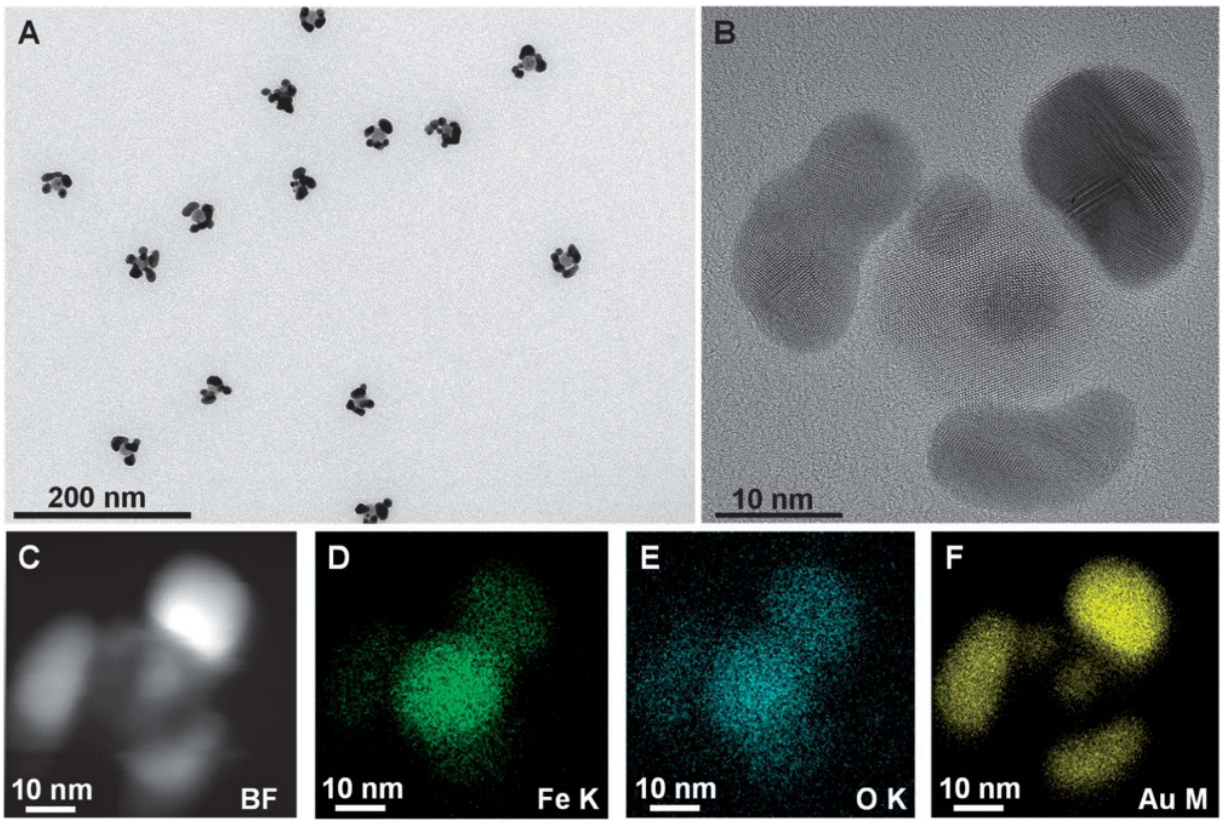


Fig. 7 (A and B) TEM and HRTEM images; (C) bright field image; (D) Fe TEM-EDX elemental mapping; (E) oxygen TEM-EDX elemental mapping; (F) Au TEM-EDX elemental mapping.

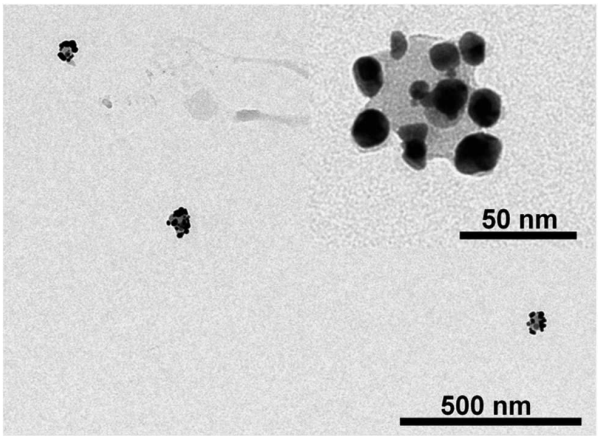


Fig. 8 Fe_2O_3/Au core/satellite hybrids with increased polystyrene shell.

ether (inhibitor BHT-free, ≥99.9%) were obtained from Sigma-Aldrich. 1,1′-Carbonyldiimidazole (CDI), 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (≥96.0%) and trioctyl phosphine (TOP, 90%) were purchased from Aldrich, acetone from Grüssing, and chloroform D1 ($CDCl_3$) and tetrahydrofuran (THF, 99.9%) from Carl Roth.

Styrene and divinylbenzene were distilled *in vacuo* before use.

Methods

Spectroscopy. Ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectra were recorded on a Cary 50 (Varian). Fluorescence spectra were recorded on an Eclipse (Varian) and on a FluoroMax-4 (Horiba). Hydrodynamic light scattering (DLS) was performed on a Zetasizer Nano ZS system (Malvern) equipped with a single angle 173° backscatter system using He–Ne laser illumination at 633 nm. Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR) spectra were recorded on an AV I 400, AV II 400 or DRX 500 spectrometer (Bruker). Chemical shifts in ^{1}H-NMR spectra are reported in δ units (ppm) relative to a deuterated solvent signal as an internal standard (chloroform D1 signal at 7.26 ppm).

Single particle spectra and lifetimes. For confocal investigations, the QD solution or the hybrid NP solution respectively was diluted and spin coated on a glass substrate so that single particles laid well separated from each other. A collimated 485 nm laser beam of a pulsed diode laser (PDL800-D, LDH-D-C-485, PicoQuant GmbH) was focused onto single particles with a 100× oil immersion objective (Zeiss Achroplan, 1.25 NA) to excite the sample. The emitted light was collected by the same objective, spectrally separated from backscattered laser light by a longpass filter (edge wavelength 522 nm, Semrock), and guided to either a spectrograph (Acton SP2500) combined with a CCD camera (ProEM 512B, Princeton Instruments) to take single particle fluorescence spectra, or to an avalanche

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

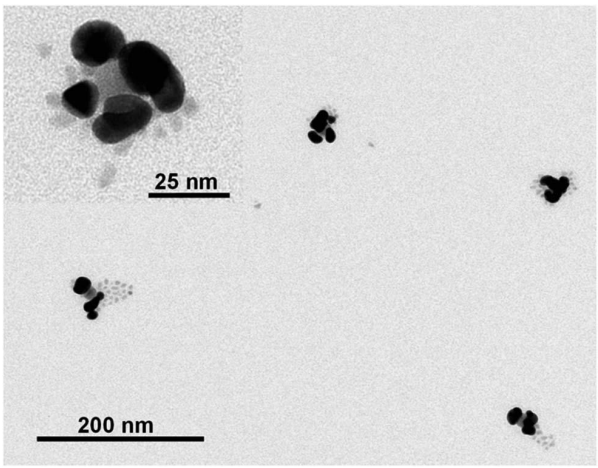


Fig. 9 Representative TEM images of ternary structures composed of Fe_2O_3/Au/QD core/satellite/satellite hybrids.

photodiode (PDM Series, Micro Photon Devices) to record fluorescence decay curves with TCSPC techniques (PicoHarp 300, PicoQuant GmbH). The decay curves were fitted to a stretched exponential function to obtain fluorescence lifetimes.

Aggregation parameter. The aggregation parameter (AP) was calculated by measuring the variation of the integrated absorbance between 600 and 800 nm. It is defined as $AP = (A - A_0)/A_0$, where A is the integrated absorbance of the sample at a given moment and A_0 is the integrated absorbance of the initial solution of Au NPs.[42]

TEM and HRTEM. Images were recorded with a Jeol JEM-1011 operating at 100 kV and Jeol JEM-2200FS microscope with C_S-correctors (CETCORR, CESCORR) and equipped with a JED-2300 50 mm^2 (Li)Si detector with a UTW window. Samples were prepared by pipetting ~10 μL of the sample solution onto carbon coated copper grids and left for drying for at least 24 h.

Relaxometry. The relaxation time T_2 was determined using a Bruker minispec mq60 (1.41 T). All measurements were performed at 37 °C. The relaxivity r_2 was calculated from the relaxation time and the analytical iron concentration that was determined by atomic absorption spectroscopy.

Preparation

Synthesis of NPs. CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell QDs were synthesized in high boiling organic solvents using TOP, TOPO, and hexadecyl amine (HDA) following a modified protocol of Talapin *et al.*[45] Potentially hazardous bis(trimethylsilyl) sulfide and diethylzinc were replaced by more environmentally benign hydrogen sulfide and zinc acetate. The nanoparticles were precipitated twice with methanol to remove excess TOP/TOPO and were stored in *n*-hexane.

Fe_2O_3 NPs. Fe_2O_3 NPs were synthesized by following the protocol previously reported by Hyeon *et al.*,[46] or by Yu *et al.*[47]

Au NPs. Au NPs of 20, 33, 50, and 110 nm diameters were grown from 10 nm seed-particles according to the seeded-growth method previously reported by Bastús *et al.*[43]

Synthesis of PI, PI–N_3, and PI-*b*-PEG (1). The polymers PI and PI-*b*-PEG were synthesized by living anionic polymerization (LAP) as previously described.[32] LAP of isoprene in dry THF under an argon atmosphere using *sec*-butyllithium (*s*-BuLi) as an initiator and ethylene oxide for chain termination yielded hydroxy terminated PI_{23}, PI_{50}, and PI_{61}. The PEG block was synthesized *via* anionic ring opening polymerization using $PI–O^-\ K^+$ as a macro-initiator, generated with diphenylmethyl potassium. Chain propagation with ethylene oxide and termination with acetic acid yielded PI_{50}-*b*-PEG_{150} (average MW 10.0 kDa) and PI_{61}-*b*-PEG_{212} diblock copolymer (average MW 13.5 kDa). Prepolymer $PI_{23}–N_3$ was prepared *via* CDI activation of PI–OH and reaction with diethylenetriamine (DETA or N3).

Synthesis of PI-*b*-PEG-LA: strategy A

Synthesis of PI-b-PEG-carbonylimidazole (2). To a vigorously stirred solution of CDI (516 mg, 3.18 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL), PI-*b*-PEG diblock copolymer (average MW 13.5 kDa) (2149 mg, 0.1592 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was added dropwise over a period of 15 min. After stirring for 40 h at room temperature, the solution was quickly washed with distilled water (4 × 40 mL) at 4 °C and dried immediately over Na_2SO_4. The yellow gel thus obtained after filtration and evaporation was directly reacted in the next step.

Synthesis of PI-b-PEG-NH_2 (3). To a vigorously stirred solution of ethylenediamine (383 mg, 6.36 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (5 mL) a solution of the CDI-activated PI-*b*-PEG diblock copolymer obtained from the previous step (0.159 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added dropwise over a period of 10 min. After adding anhydrous $CHCl_3$ (10 mL) the reaction mixture was stirred for 31 h at 55 °C. Stirring was continued for a further 7 days at room temperature. After filtration, the solvent was removed under vacuum. Polymer **3** was purified by precipitation from acetone (2×) and diethyl ether. To this end, the remaining residue was dissolved in CH_2Cl_2 (2 mL) and precipitated with 60 mL of solvent at −20 °C. After centrifugation the supernatant was discarded, and the product was dissolved in de-ionized water (25 mL) and lyophilized, yielding 1827 mg of product (85%).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.97–5.55 (m, 1H per unit of 1,2-PI, –HC=CH_2), 5.30 (br. s, 1H, –OCONH–), 5.11–4.49 (m, 1H per unit of 1,4-PI, –C=CH–; 2H per unit of 3,4-PI, –C=CH_2; 2H per unit of 1,2-PI, –HC=CH_2), 4.20 (t, 2H, –CH_2–OCONH–), 3.79–3.46 (m, 4H per unit of PEG), 3.21 (m, 2H, –NH–CH_2–), 2.80 (t, 2H, ^3J = 5.7 Hz, –CH_2–NH_2), 2.27–1.70 (m, 1H per unit of 3.4-PI, –CH–; 2H per unit of 1.4-PI, –HC=CH–CH_2–; 2H per unit of 1.4-PI, –CH_2–C(–CH_3)=), 1.70–1.45 (m, 3H per unit of 3,4-PI, C–CH_3; 3H per unit of 1.4-PI, –C(–CH_3)=), 1.45–1.04 (m, 3H, –CH(–CH_3)–; 2H per unit of 1,2-PI, –C–(CH_3)–CH_2–; 2H, CH_3–CH_2–; 2H per unit of 3,4-PI, CH–CH_2–), 1.04–0.86 (m, 1H, –CH(–CH_3)–; 3H per unit of 1,2-PI, –C–(CH_3)–), and 0.86–0.74 (m, 3H, CH_3–CH_2–).

Synthesis of PI-b-PEG-LA (4). In a one-pot synthesis a suspension of PI-*b*-PEG-NH_2 (average MW 13.6 kDa) (500 mg, 0.037 mmol), lipoic acid (**5**) (152 mg, 0.736 mmol) and 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (204 mg, 0.736 mmol) in THF (10 mL) was stirred for 23 h at room temperature. After addition of distilled water (5 mL) stirring was continued for 22 h. The solvent was removed by evaporation.

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

Polymer **4** was purified by precipitation from acetone (3×) and diethyl ether (2×). To this end, the remaining residue was dissolved in CH_2Cl_2 (2 mL) and precipitated with 40 mL of solvent at −20 °C. After centrifugation, the supernatant was discarded, and the product was dissolved in de-ionized water (25 mL), dialyzed against distilled water and lyophilized, yielding 386 mg of the desired product (76%).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 5.96–5.56 (m, 1H per unit of 1,2-PI, –HC═C*H*$_2$), 5.11–4.48 (m, 1H per unit of 1,4-PI, –C═C*H*–; 2H per unit of 3,4-PI, –C═C*H*$_2$; 2H per unit of 1,2-PI, –*H*C═C*H*$_2$), 4.20 (t, 2H, –CH$_2$–OCON*H*–), 3.79–3.45 (m, 4H per unit of PEG, 1H, –S–C*H*–), 3.37–3.23 (m, 4H, –N*H*–CH$_2$–CH$_2$–N*H*), 3.20–3.06 (m, 2H, –S–CH$_2$–), 2.48–2.40 (m, 1H, –S–C*H*$_2$–CH*H*–), 2.28–1.72 (m, 1H per unit of 3.4-PI, –C*H*–; 2H per unit of 1.4-PI, –*H*C═C*H*–CH$_2$–; 2H per unit of 1.4-PI, –CH$_2$–C(–C*H*$_3$)═), 2.16 (m, 2H, –CH$_2$–CON*H*–), 1.94–1.86 (m, 1H, –S–C*H*$_2$–CH*H*–), 1.72–1.45 (m, 3H per unit of 3,4-PI, C–CH$_3$; 3H per unit of 1.4-PI, –C(–CH$_3$)═), 1.45–1.04 (m, 3H, –C*H*(–CH$_3$)–; 2H per unit of 1,2-PI, –C–(C*H*$_3$)–CH$_2$–; 2H, C*H*$_3$–CH$_2$–; 2H per unit of 3,4-PI, C*H*–CH$_2$–), 1.04–0.85 (m, 1H, –CH(–C*H*$_3$)–; 3H per unit of 1,2-PI, –C–(C*H*$_3$)–), and 0.85–0.74 (m, 3H, CH$_3$–C*H*$_2$–).

Synthesis of PI-*b*-PEG-LA: strategy B

Synthesis of lipoyl chloride. To a vigorously stirred solution of freshly distilled thionyl chloride (375 mg, 3.15 mmol) and dry CH_2Cl_2 (4 mL) at 0 °C was added lipoic acid (500 mg, 2.42 mmol) in CH_2Cl_2 (3.4 mL) dropwise. The reaction mixture was stirred without further cooling at room temperature for 1 h under a N_2 atmosphere. After evaporation 509 mg (93%) of a yellow-brown residue was obtained. The crude lipoyl chloride was directly used in the next steps.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 3.59–3.52 (m, 1H, –S–CH–), 3.21–3.08 (m, 2H, –S–CH$_2$–), 2.90 (t, 2H, ^3J = 7.3 Hz, –CH$_2$–COCl), 2.50–2.42 (m, 1H, –S–C*H*$_2$–CH*H*–), 1.94–1.87 (m, 1H, –S–C*H*$_2$–CH*H*–), 1.80–1.63 (m, 4H, 2× –CH$_2$–), and 1.57–1.41 (m, 2H, –CH$_2$–).

Synthesis of PI-b-PEG-LA (7). Lipoyl chloride (500 mg, 2.22 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (5 mL). The PI-*b*-PEG diblock copolymer (average MW 10 kDa) (1200 mg, 0.12 mmol) in dry CH_2Cl_2 (4 mL) was added dropwise over a period of 10 min. The reaction mixture was stirred at room temperature for 17 h in the dark. After addition of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (30 mg, 0.27 mmol) stirring was continued for 3 h. All solids were removed by filtration and centrifugation and the filtrate was evaporated. The remaining viscous residue was re-dissolved in $CHCl_3$ (1 mL) and precipitated in cold acetone (40 mL). The supernatant was discarded after centrifugation and the crude sediment was repeatedly purified by two precipitation steps from acetone. The precipitate was dissolved in de-ionized water (20 mL) and lyophilized, yielding 678 mg (55%) of **7**.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.98–5.54 (m, 1H per unit of 1,2-PI, –HC═C*H*$_2$), 5.15–4.48 (m, 1H per unit of 1,4-PI, –C═C*H*–; 2H per unit of 3,4-PI, –C═C*H*$_2$; 2H per unit of 1,2-PI, –*H*C═C*H*$_2$), 3.77–3.47 (m, 4H per unit of PEG; 1H, –S–C*H*–), 3.20–3.05 (m, 2H, –S–CH$_2$), 2.49–2.40 (m, 1H, –S–C*H*$_2$–CH*H*–), 2.33 (t, 2H, ^3J = 7.3 Hz, –CH$_2$–COO–), 2.27–1.74 (m, 1H per unit of 3.4-PI, –CH–; 2H per unit of 1.4-PI, –*H*C═C*H*–CH$_2$–; 2H per unit of 1.4-PI, –CH$_2$–C(–C*H*$_3$)═), 1.94–1.84 (m, 1H, –S–C*H*$_2$–CH*H*–), 1.74–1.44 (m, 3H per unit of 3,4-PI, C–CH$_3$; 3H per unit of 1.4-PI, –C(–CH$_3$)═), 1.44–1.04 (m, 3H, –C*H*(–CH$_3$)–; 2H per unit of 1,2-PI, –C–(C*H*$_3$)–CH$_2$–; 2H, C*H*$_3$–CH$_2$–; 2H per unit of 3,4-PI, C*H*–CH$_2$–), 1.04–0.86 (m, 1H, –CH(–C*H*$_3$)–; 3H per unit of 1,2-PI, –C–(C*H*$_3$)–), and 0.86–0.74 (m, 3H, CH$_3$–C*H*$_2$–).

Ligand exchange and encapsulation

Ligand exchange with PI–N3. NPs were incubated with a 600 molar excess of PI$_{23}$–N$_3$ (average MW 1.7 kDa) in *n*-hexane. After 2–5 h, the NPs were precipitated with ethanol. After isolation by centrifugation, NPs were re-dissolved in *n*-hexane and stored in the dark.

Encapsulation. Aliquots of PI–N$_3$ coated NPs were dried under a nitrogen flow and re-suspended in a solution (2 mL) of tetrahydrofuran (THF) containing a 50–300-fold excess of PI-*b*-PEG-LA ligands. A large excess of AIBN was added, corresponding to a mass ratio of 0.5 to 1 with respect to the applied PI-*b*-PEG-LA. After 10 min, the solution was injected into water (18 mL) and incubated for 15–30 min at RT. The solution was heated at 80 °C for 2–5 h to initiate cross-linking. The NP solution was filtered through a syringe filter (CE; hydrophilic; 0.45 μm) and washed twice with water (8 mL) in centrifugal filter units (Amicon® Ultra-15; 100 kDa membrane).

PS-shell growth by seeded emulsion polymerization

In an exemplary formulation, the micellar encapsulated NPs were dissolved in water (20 mL). After removal of oxygen by alternating cycles of evacuating and flushing with nitrogen, 1-pentanol (20 μL), styrene (2 μL), divinylbenzene (2 μL), and radical initiator 2,2′-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride (0.5 mg) were added. The solution was stirred at 44 °C for 20 h. Purification of the product was performed using magnetic columns (Fe_2O_3 NPs).

Capping of exterior Au surfaces with PEG–SH

Hybrids presenting exterior citrate stabilized Au surfaces were capped by adding a 1000–2000-fold excess of MeO-PEG-SH (average MW 2.0 kDa). Unbound PEG–thiol was removed by centrifugation and re-suspension of the resulting NP-pellet in water or by magnetic separation in the case of superparamagnetic hybrids.

Au/QD and Au/Fe_2O_3 hybrids *via* self-assembly

Au/QD and Au/Fe_2O_3 hybrids were obtained by adding an aqueous solution of PI-*b*-PEG-LA-coated QDs or Fe_2O_3 NPs into an aqueous citrate solution (2.2 mM) of Au NPs. The concentration of Au NPs was kept constant at 10^{12} NPs per mL whereas the ratio between QDs/Fe_2O_3 and Au was varied from 0.1 : 1 to 500 : 1, depending on the size and composition of the reacted core NPs.

Synthesis of plasmonic hybrids *via* deposition of Au^{3+}

The PI-*b*-PEG-LA-coated Fe_2O_3 NPs (0.2 nmol in 200 μL) were added to aqueous sodium citrate solution (125 mL; c = 2.2 mM). To this mixture aqueous $HAuCl_4$ solution (1 mL; c = 25 mM) was

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

added. The solution was stirred for 48 h at room temperature. The hybrids were isolated using magnetic columns (see purification). Eventually, by iterative growth steps according to the procedure described above, closed gold shells were achieved.

Purification of hybrids

The resulting hybrid Au/QD and Au/Fe_2O_3 structures were purified by repeated centrifugation for 5 min at 2000–10 000 *g*, depending on the diameter of the NPs, in order to remove the excess of unbound NPs. The supernatant was discarded and replaced with an aqueous solution of sodium citrate (2.2 mM). Advantageously, Fe_2O_3 hybrids were purified by means of a magnetic column. To this end, the reaction solution was applied to a Milteny LD or LS column in the presence of a magnetic field (details given in the ESI†). The retained magnetic fraction was washed with 2 mL sodium citrate (2.2 mM). After removal of the magnet, hybrids were eluted with sodium citrate (2.2 mM), optionally containing 1% polysorbate 80 (Tween 80), if the elution was sluggish.

Conjugation of monoclonal anti-ovalbumin antibody (mAb)

To a suspension of Fe_2O_3/Au core/satellite-hybrids (0.25 pmol) in MES buffer (400 μL; 0.1 M; pH 5.5), mAb (100 μL; 5.3 μM) and water (950 μL) were added. The solution was stirred for 30 min at room temperature. After centrifugation (Minispin; 1500 × *g*; 12 min; 20 °C), the hybrid–antibody conjugate was redissolved in PBS (pH 7.4).

Dot-blot analysis

Dots of ovalbumin (2.3 nmol; 1 nmol; 100 pmol) dissolved in PBS (1 μL, pH 7.4) were blotted on a nitrocellulose membrane. The spots were dried for 10 min at room temperature. Free binding sides were blocked using 4% BSA in PBS (pH 7.4) for 20 min at room temperature. The primed membrane was incubated with the mAb-conjugated hybrids for 1–3 h at room temperature. In parallel, non-conjugated hybrids were run as a control.

Acknowledgements

We would like to thank Sylvia Bartholdi-Nawrath and Andreas Kornowski for HRTEM and TEM-EDX measurements and Christian Supej (CAN GmbH) for supporting the dot blot experiments. This work was supported by the EU within the FP 7 program (Vibrant, EU 228933), the State Excellence Initiative "Nanotechnology in Medicine", and the DFG Priority Program SPP 1313 (DFG WE-2059/8-2).

References

1 R. Costi, A. E. Saunders and U. Banin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 4878–4897.
2 N. C. Bigall, W. J. Parak and D. Dorfs, *Nano Today*, 2012, **7**, 282–296.
3 L. Etgar, G. Leitus, L. Fradkin, Y. G. Assaraf, R. Tannenbaum and E. Lifshitz, *ChemPhysChem*, 2009, **10**, 2235–2241.
4 J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, T. M. Focella and H. M. Smilowitz, *Br. J. Radiol.*, 2006, **79**, 248–253.
5 W. E. Ghann, O. Aras, T. Fleiter and M.-C. Daniel, *Langmuir*, 2012, **28**, 10398–10408.
6 R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenberg, C. A. Rabito, H. H. Bengele and L. Josephson, *Radiology*, 1990, **175**, 489–493.
7 N. Lee and T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2575–2589.
8 S. Dutz, W. Andrä, R. Hergt, I. Hilger, R. Müller, J. Töpfer, M. Zeisberger and M. E. Bellemann, *IFMBE Proceedings*, 2007, **14**, 271–274.
9 W. C. W. Chan and S. Nie, *Science*, 1998, **281**, 2016–2018.
10 P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.*, 2004, **22**, 47–52.
11 K. C.-F. Leung, S. H. Xuan, X. M. Zhu, D. W. Wang, C.-P. Chak, S.-F. Lee, W. K.-W. Ho and B. C.-T. Chung, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1911–1928.
12 M. J. Sailor and J.-H. Park, *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 3779–3802.
13 M. R. Longmire, M. Ogawa, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 993–1000.
14 G. Beaune, B. Dubertret, O. Clement, C. Vayssettes, V. Cabuil and C. Menager, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 5421–5424.
15 B.-S. Kim and T. A. Taton, *Langmuir*, 2007, **23**, 2198–2202.
16 S. K. Basiruddin, A. R. Maity, A. Saha and N. R. Jana, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 19612–19620.
17 N. Insin, J. B. Tracy, H. Lee, J. P. Zimmer, R. M. Westervelt and M. G. Bawendi, *ACS Nano*, 2008, **2**, 197–202.
18 M. Meyns, N. G. Bastús, Y. Cai, A. Kornowski, B. H. Juárez, H. Weller and C. Klinke, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 10602–10605.
19 Y. Wei, R. Klajn, A. O. Pinchuk and B. A. Grzybowski, *Small*, 2008, **4**, 1635–1639.
20 N. A. Frey, S. Srinath, H. Srikanth, C. Wang and S. Sun, *IEEE Trans. Magn.*, 2007, **43**, 3094–3096.
21 H. Yu, M. Chen, P. M. Rice, S. X. Wang, R. L. White and S. Sun, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 379–382.
22 E. V. Shevchenko, M. I. Bodnarchuk, M. V. Kovalenko, D. V. Talapin, R. K. Smith, S. Aloni, W. Heiss and A. P. Alivisatos, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 4323–4329.
23 M. Mahmoudi and V. Serpooshan, *ACS Nano*, 2012, **6**, 2656–2664.
24 Y. Jin and X. Gao, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**, 571–576.
25 S. Xuan, Y.-X. J. Wang, J. C. Yu and K. C.-F. Leung, *Langmuir*, 2009, **25**, 11835–11843.
26 A. Gole, J. W. Stone, W. R. Gemmill, H.-C. z. Loye and C. J. Murphy, *Langmuir*, 2008, **24**, 6232–6237.
27 R. Di Corato, D. Palumberi, R. Marotta, M. Scotto, S. Carregal-Romero, P. Rivera-Gil, W. J. Parak and T. Pellegrino, *Small*, 2012, **8**, 2731–2742.
28 C. Wang, J. Chen, T. Talavage and J. Irudayaraj, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 2759–2763.
29 J. Tian, F. Zheng and H. Zhao, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 3304–3312.
30 A. Fu, C. M. Micheel, J. Cha, H. Chang, H. Yang and A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 10832–10833.
31 S. Rauf, A. Glidle and J. M. Cooper, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 4020–4024.
32 E. Pöselt, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, U. Schumacher, C. Wagener, S. Förster and H. Weller, *ACS Nano*, 2012, **6**, 3346–3355.

Published on 27 September 2013. Downloaded by Universitat Hamburg on 14/10/2013 19:42:07.

33 H. Kloust, C. Schmidtke, A. Feld, T. Schotten, R. Eggers, U. E. A. Fittschen, F. Schulz, E. Pöselt, J. Ostermann, N. G. Bastús and H. Weller, *Langmuir*, 2013, **29**, 4915–4921.
34 C. D. Bain and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 7164–7175.
35 M. A. H. Muhammed, F. Aldeek, G. Palui, L. Trapiella-Alfonsob and H. Mattoussi, *ACS Nano*, 2012, **6**, 8950–8961.
36 K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer and U. S. Schubert, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6288–6308.
37 C. Schmidtke, E. Pöselt, J. Ostermann, A. Pietsch, H. Kloust, H. Tran, T. Schotten, N. G. Bastús, R. Eggers and H. Weller, *Nanoscale*, 2013, **5**, 7433–7444.
38 M. Chanana and L. M. Liz-Marzán, *Nanophotonics*, 2012, **1**, 199–220.
39 H. Lange, B. H. Juárez, A. Carl, M. Richter, N. G. Bastús, H. Weller, C. Thomsen, R. von Klitzing and A. Knorr, *Langmuir*, 2012, **28**, 8862–8866.
40 T. Kim, C.-H. Lee, S.-W. Joo and K. Lee, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **318**, 238–243.
41 R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger and C. A. Mirkin, *Science*, 1997, **277**, 1078–1080.
42 R. Lévy, N. T. K. Thanh, R. C. Doty, I. Hussain, R. J. Nichols, D. J. Schiffrin, M. Brust and D. G. Fernig, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 10076–10084.
43 N. G. Bastús, J. Comenge and V. Puntes, *Langmuir*, 2011, **27**, 11098–11105.
44 J. L. Lyon, D. A. Fleming, M. B. Stone, P. Schiffer and M. E. Williams, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 719–723.
45 D. V. Talapin, I. Mekis, S. Gotzinger, A. Kornowski, O. Benson and H. Weller, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 18826–18831.
46 T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung and H. B. Na, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 12798–12801.
47 W. W. Yu, J. C. Falkner, C. T. Yavuz and V. L. Colvin, *Chem. Commun.*, 2004, 2306–2307.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

6.6.9 Controlling the Physical and Biological Properties of Highly Fluorescent Aqueous Quantum Dots Using Block Copolymers of Different Size and Shape

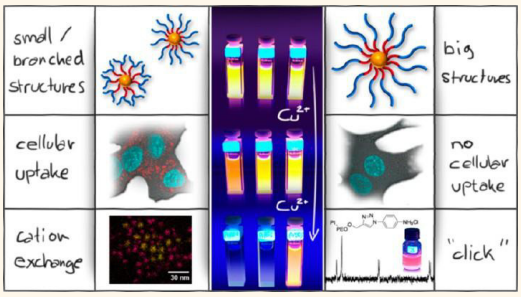
Diese Veröffentlichung beschäftigt sich mit der Verkapselung von CdSe/CdS/ZnS Quantenpunkten mit verschiedenen PI-*b*-PEO Molekülen verschiedener Größe. Durch die Verwendung verschiedener Polymere kann die Größe des finalen Konstruktes und seine Eigenschaften, wie Zellaufnahme, Zugänglichkeit für Kupfer(II)ionen und somit Kationenaustausch gesteuert werden. Die Verwendung des größten Polymers (13.5 kDa) ermöglicht eine nahezu vollständige Abschirmung der QDs und die Verwendung von kupferkatalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition und Alkin-funktionalisierte Quantenpunkt-enthaltende Mizellen. Weiterhin kann durch die Polymerhülle auch die Kationenaustauschgeschwindigkeit gesteuert werden. Reprinted with permission from *Controlling the Physical and Biological Properties of Highly Fluorescent Aqueous Quantum Dots Using Block Copolymers of Different Size and Shape*, Johannes Ostermann, Jan-Philip Merkl, Sandra Flessau, Christopher Wolter, Andreas Kornowski, Christian Schmidtke, Andrea Pietsch, Hauke Kloust, Artur Feld, and Horst Weller, *ACSNano* **2013**, 7, 9156-9167.[15] Copyright ©2013 American Chemical Society.

Controlling the Physical and Biological Properties of Highly Fluorescent Aqueous Quantum Dots Using Block Copolymers of Different Size and Shape

Johannes Ostermann,[†] Jan-Philip Merkl,[†] Sandra Flessau, Christopher Wolter, Andreas Kornowksi, Christian Schmidtke, Andrea Pietsch, Hauke Kloust, Artur Feld, and Horst Weller*

Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany. [†]These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT The phase transfer of fluorescent CdSe based quantum dots (QDs) while retaining their properties and offering some advantages concerning the stability and functionalization characteristics is an important and intensively investigated field of research. Here we report how to tune and control the properties of CdSe/CdS/ZnS core—shell—shell QDs in water, using poly(isoprene-*block*-ethylene oxide) (PI-*b*-PEO) as a versatile system of amphiphilic diblock copolymers for the micellular encapsulation of nanoparticles (NPs). We show the synthesis of a novel PI-*b*-$(PEO)_2$ miktoarm star polymer and how this different architecture besides the variation of the polymers' molecular weight gives us the opportunity to control the size of the built constructs in water between 24 and 53 nm. Because of this size control, an upper limit of the construct's diameter for the cellular uptake could be determined by a systemic study with human alveolar epithelial cells (A549) and murine macrophage leukemia cell (RAW-264.7). Furthermore, fluorescence quenching experiments with copper(II) and iron(III) ions show a strong influence of the used polymer on the shielding against these ions. This enables us to control the permeability of the polymer shell from very porous shells, which allow an almost complete cation exchange up to very dense shells. These even offer the possibility to perform copper(I) catalyzed click reactions while keeping the fluorescence of the QDs. All these results underline the huge variability and controllability of the PI-*b*-PEO diblock copolymer system for the encapsulation and functionalization of nanoparticles for biological applications. As a general trend, it can be stated that those coatings, which were most stable against quenchers, also showed the best resistivity with respect to unspecific cellular uptake.



KEYWORDS: quantum dots · phase transfer · amphiphilic diblock copolymer · micelles · fluorescence quenching · cellular uptake · copper mediated click reaction

The use of highly fluorescent quantum dots (QDs) as labels for biological imaging is a very promising approach. QDs possess extraordinary optical properties, such as high extinction coefficients, broad absorption, narrow, adjustable emission and high photostabilities.[1−3] However, to obtain QDs with a narrow size distribution and high photoluminescence quantum yields, a synthesis in organic media is essential.[2,4] Thus, for biological applications, a phase transfer is required while retaining the optical properties of the nanoparticles. Several strategies for this phase transfer have been developed, such as ligand exchanges with polyethylene oxide (PEO) derivatives,[5,6] encapsulation in amphiphilic di- or triblock copolymers,[7,8] silica shells[9] or polymer beads.[10]

Typically, in biological *in vitro* and *in vivo* studies, the concentration of the biolabel is very low and salt concentrations are very high. These conditions already highlight the requirements on water-soluble QDs, and the ligand system. The particles must be stable at very high dilutions without any aggregation or loss of their properties. The ligand system must provide an excellent shielding against the biological media, which includes proteins, small organic molecules and the high amount of present ions. Especially the latter can have a strong impact on fluorescence properties and possibly even on the stability of the ligand shell.

* Address correspondence to weller@chemie.uni-hamburg.de.

Received for review July 22, 2013 and accepted September 13, 2013.

Published online September 13, 2013
10.1021/nn4037859

© 2013 American Chemical Society

Finally, the ligand system has to offer a functionalization site, at which typical bioconjugation reactions can be carried out to build a specific label. For a better accessibility, this functionalization site should be presented at the outer shell.

A very potent and frequently used coupling method for biologically relevant molecules is the copper(I)-catalyzed azide alkyne Huisgen cycloaddition. These reactions can be performed under very mild conditions; the tolerance to functional groups is huge and the built products do not undergo hydrolysis reactions.[11] Thus, copper(I) mediated 'click' chemistry can be utilized easily for the functionalization and coupling of biomolecules to nanoparticles once the phase transfer has been performed. Such coupling reactions on nanoparticles have already been demonstrated for several systems.[12,13] Unfortunately, the adoption of this coupling strategy to QDs has shown to result in strong fluorescence quenching during the reactions.[14] This can be explained by the permeable nature of the used ligand systems for copper ions. Once a copper ion diffuses in direct contact to the QD surface, the bandgap emission fluorescence is quenched statically and irreversibly, leading to drastic loss of fluorescence quantum yields due to cation exchange or formation of Cu(I) species.[15,16] In contrast to this surface adsorption, copper cluster-seeded quantum dots, namely, cadmium selenide[17] and zink sulfide,[18,19] exhibit emission from dopant states while bandgap luminescence is quenched. This quenching of the bandgap and the appearance of dopant emission are temperature dependent and were correlated with different chemical doping reactions such as surface adsorption and lattice incorporation.[18]

Quenching of the luminescence during copper catalyzed cycloaddition reactions can be avoided by using strained cyclooctyne derivatives. However, cyclooctyne derivatives are expensive and need to be coupled to the target molecule, resulting in a bigger synthetic effort.[20−22] Therefore, a strategy or ligand system, allowing classic copper(I)-catalyzed click chemistry, would overcome a lot of problems in coupling biological relevant molecules to QDs for the use as biolabels. Here we present, to the best of our knowledge, the first click reaction in the presence of QD by using a micellular encapsulation technique which provides a significantly improved shielding against quenching ions while retaining the fluorescence properties of the QDs. Permeability control of the organic layer is important for the *in vivo* use of the particles with respect to possible ion leaching due to cation exchange reaction. The fluorescence of semiconductor nanocrystals is very sensitive to its surface states and can thus be influenced by adsorbed molecules,[23] epitaxially grown nanoparticles[24] and ions.[20] Thus, fluorescence quenching experiments are commonly used to study the environment surrounding a QD.[25−27]

TABLE 1. Analytical Data Concerning Molecular Weight and Aggregation Properties of Used Diblock Copolymers

name	M_w[a] (g/mol)	M_n[a] (g/mol)	M_w/M_n[a]	M% PEO[b]	cac[c] (μM)	d_H[d] (nm)
PI-*b*-PEO 1	4600	4300	1.06	68	0.60	16.8
PI-*b*-PEO 2	8100	6600	1.22	73	0.35	21.9
PI-*b*-PEO 3	9900	9000	1.09	65	0.27	24.8
PI-*b*-PEO 4	11900	10500	1.13	67	0.20	27.4
PI-*b*-PEO 5	14300	13400	1.07	70	0.15	28.0
PI-*b*-$(PEO)_2$ Y	8400	7300	1.15	73	0.36	15.9

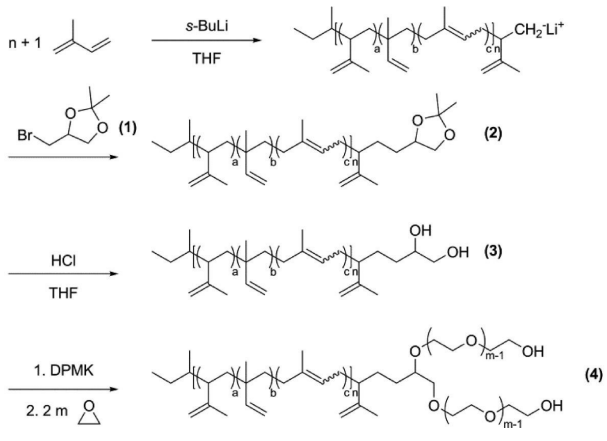
[a] SEC analysis using PEO standards. [b] NMR analysis. [c] Fluorescence studies using pyrene as fluorophore.[42] [d] DLS measurements, mean diameter by volume.

We recently demonstrated a versatile encapsulation system for nanoparticles, based on an amphiphilic poly(isoprene-*block*-ethylene oxide) (PI-*b*-PEO) diblock copolymer. The particles, encapsulated in micelles, keep their unique optical properties, while the PI-*b*-PEO diblock copolymer offers some advantages. The terminal double-bonds of the polyisoprene (PI) chain offer the possibility of cross-linking the hydrophobic core of the micelle. Poly(ethylene oxide) (PEO) is a water-soluble polymer, which is known to be nontoxic, used to reduce unspecific protein absorption and, therefore, provides a good biocompatibility. Finally, it offers the possibility of functionalization at the terminal alcohol function prior or subsequent to the encapsulation of nanoparticles.[28,29]

Herein, we report the influence of the PI-*b*-PEO's size and architecture on the encapsulation of QDs and on the properties of the obtained structures. Therefore, several differently sized PI-*b*-PEOs and one new miktoarm star, consisting of two PEO and one PI chain (PI-*b*-$(PEO)_2$), have been synthesized. The differences between the branched and the linear polymers concerning their aggregation behavior in water have been examined. All polymers have been used for the phase transfer of QDs to investigate size and architecture effects of the polymers on the QDs. This includes the determination of the constructs' physical properties like size and stability against quenching by copper ions and the determination of their biological properties, namely, the interaction with two different cell lines.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterization of the PI-*b*-PEO Block Copolymers and Aggregation Behavior. For the investigation of the influence of polymer lengths on the properties of encapsulated nanoparticles, we synthesized five different PI-*b*-PEO block copolymers with a M_n between 4300 and 13 400 g/mol according to the known procedure using standard anionic polymerization techniques.[28,30,31] The obtained polymers show low polydispersities (see Table 1), and since the polymerization reactions of isoprene were carried out in THF, they exhibit a high content of 1,2- and 3,4-linked units in the hydrophobic region.[32] This microstructure offers the



Scheme 1. Synthetic route for the amphiphilic PI-*b*-(PEO)$_2$ miktoarm star.

opportunity for cross-linking polyisoprene chains with each other by radical initiators.[33] All polymers bear an alcohol function at the hydrophilic PEO end which makes them accessible for functionalization[29,34] and/or coupling of biomolecules. The PI chain end is blunt and, therefore, not accessible for functionalization or specific interactions.

During the last years, several star-shaped polymers and miktoarm stars have been synthesized[35−38] and investigated concerning their aggregation properties. Since the architecture has a strong influence on some important parameters like the critical micelle concentration,[39] aggregation number,[36] and the hydrodynamic diameter[36,40] of the aggregated structures, we synthesized one amphiphilic miktoarm star consisting of one PI and two PEO chains to investigate the influence of the architecture on the encapsulation of nanoparticles. Therefore, the anionic polymerization of isoprene was terminated using 4-(bromomethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (**1**) which can easily be obtained in a two-step synthesis starting from epibromohydrine. This leads to an acetal end group, which can be deprotected using HCl in THF to yield two alcohol functions as new starting points for the subsequent polymerization of ethylene oxide (see Scheme 1). All polymers show a very similar ratio of hydrophilic to hydrophobic blocks which was determined by SEC and ^{1}H NMR analysis.

The aggregation behavior of the five synthesized polymers in water was investigated by building micellular constructs using a similar method as for the encapsulation of nanoparticles. The samples were dissolved in THF and injected into water, followed by heating to 80 °C for four hours to remove most of the THF. Dynamic light scattering measurements show the expected behavior between the molecular weight of the PI-*b*-PEO and the determined hydrodynamic radius of the micellular aggregates. As has already been published for other A$_2$B miktoarm stars,[36,40] we observed a significantly smaller hydrodynamic radius of the PI-*b*-(PEO)$_2$ miktoarm star micelle than that for for the comparable linear PI-*b*-PEO micelle (see Figure 1a).

Investigation of the critical aggregation concentration (cac) of the different polymers again shows a systemic correlation to the polymer size, as can be seen in Table 1. Although all cac's are in the same dimension, the value shows a significant decrease with increasing polymer size. This finding is consistent with literature reports on the correlation between the chain length of the insoluble block and the cmc value.[41] For the miktoarm star, we determined a slightly higher cac than that for the comparable diblock copolymer (PI-*b*-PEO 2), which has been explained for PS-*b*-(PEO)$_2$ miktoarm stars by Gibanel *et al.* by the higher steric hindrance of the branched polymer during the micellation process.[39]

Encapsulation of QD Using Micellular Encapsulation Technique. The encapsulation of CdSe/CdS/ZnS core−shell−shell nanoparticles was carried out with the described block copolymers following a standard procedure for this system.[28] The nanoparticles' native ligands were replaced by a short polyisoprene (M_n = 1400 g/mol) bearing a diethylenetriamine function (DETA) which has already shown good properties as an anchor group for this particle system. After the QDs were mixed with a 300-fold excess of block copolymer in THF, 2,2′-azobis-(2-methylpropionitrile) (AIBN) (1/3 relating to the number of double bonds in the PI-*b*-PEO) was added and the mixture was injected into water, using a flow controlled mixing device. Finally, the mixture was heated to 80 °C to enable the cross-linking process and to evaporate the THF, followed by a sucrose gradient ultracentrifugation to remove excess empty micelles.

Despite the complexity of the system, DLS studies of the built constructs also show the expected relation to the size of the used block copolymer and hydrodynamic diameters between 24 and 53 nm can be adjusted (see Figure 1a). This stringent behavior and its high reproducibility turns the used block copolymers into a very powerful tool for the phase transfer of nanoparticles

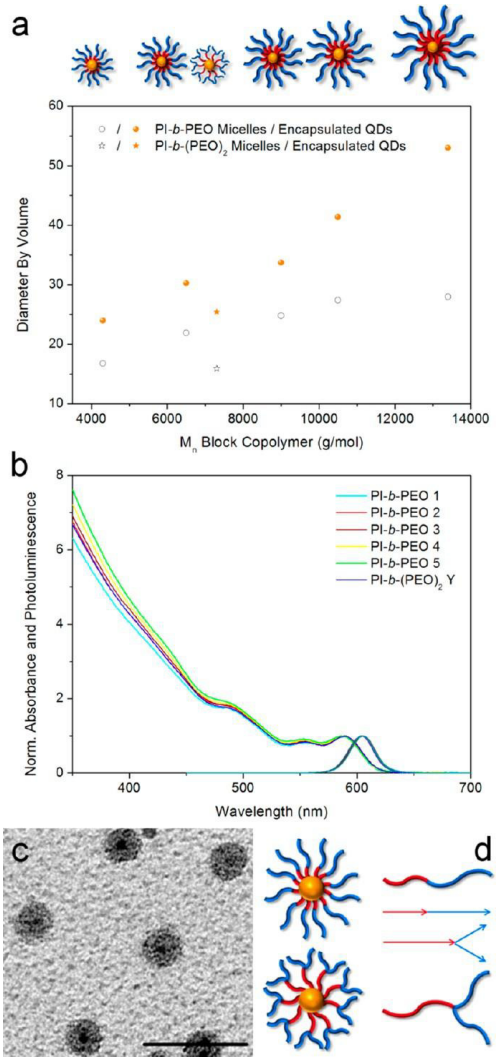


Figure 1. (a) Hydrodynamic diameters for empty micelles and encapsulated particles, determined by dynamic light scattering (DLS, volume mean) *vs* the molecular weight of the used PI-*b*-PEO; black hollow circles, star PI-*b*-PEO micelles; orange filled circles, star QDs encapsulated in PI-*b*-PEO. (b) Absorption and emission spectra of PI-*b*-PEO encapsulated QDs in water. (c) TEM images of PI-*b*-PEO 5 encapsulated QDs. Scale bars represent 50 nm; contrast was achieved by OsO_4 staining. (d) Schematic illustration of the expected differences between the linear and miktoarm block copolymer.

while keeping their properties and having control over the size of the resulting constructs. Again we achieve much smaller hydrodynamic diameters for the nanoparticles encapsulated in the miktoarm star compared to those for the linear diblock copolymers, which makes further investigation concerning the shielding and biological compatibility of these constructs very interesting.

As we expected, the absorption and emission properties of all the prepared samples are not influenced by the different block copolymers (see Figure 1b). Fluorescence quantum yields of the constructs are almost the same, showing no significant relation to the polymer size or architecture. TEM images (see Figure 1c; Figure SI 1) show predominately single encapsulated QDs. The samples were stained with OsO_4 to enhance the contrast of the polymer. Since OsO_4 is known to stain double-bonds selectively,[43] the dark corona around the particles is assumed to be mainly polyisoprene.

Cellular Uptake. Since the influence of the polymers' size and architecture on the size of the encapsulated quantum dots was very strong, the investigation of the QDs' behavior in biological systems was another aim. Therefore, experiments with human alveolar epithelial cells (A549) were carried out to investigate toxicity and the unspecific cellular uptake. As has been recently reported by us and other groups, the unspecific uptake of aqueous nanocrystals is strongly dependent on the chosen experiment conditions. Serum containing medium, for example, reduces the unspecific cellular uptake of nanocrystals, which seems to be a result of the protein corona formed around the nanocrystals.[29,44,45] Experiments with our constructs under biologically relevant conditions in fact show no unspecific uptake at all (see Supporting Information for conditions and confocal microscope images, Figure SI 3). This provides the opportunity to use this system as a tool for specific targeting of certain cells *via* bound recognition molecules in the future, since no unspecific background has to be expected.

Further investigations aimed to enforce the uptake of our constructs by changing the experiment conditions. Therefore, we worked under very radical conditions in serum free media, with very high nanocrystal concentrations and long incubation times. As can be seen from the confocal microscope images (Figure 2), we observed cellular uptake for all tested constructs in A549 cells except for the quantum dots encapsulated in the biggest diblock-copolymer (PI-*b*-PEO 5). Even under these extreme conditions after 20 h of incubation, the unspecific uptake is somehow hindered, which coincides with the information on cellular uptake we earlier gained for encapsulated quantum dots in a similar sized diblock copolymer.[28] These findings lead us to the assumption that the hydrodynamic diameter and therefore also the polymer size determines whether the unspecific uptake takes place. To see if this trend is also valid for other cell lines, some of the constructs (PI-*b*-PEO 1, PI-*b*-PEO 2, PI-*b*-PEO 5, and PI-*b*-$(PEO)_2$ Y) were tested on murine macrophage leukemia cells (RAW-264.7) (Figure 2e−g). As we expected, the uptake of encapsulated QDs in macrophages is huge for the smaller constructs (PI-*b*-PEO 1, PI-*b*-PEO 2, and PI-*b*-$(PEO)_2$Y) and almost not observable for the biggest polymer (PI-*b*-PEO 5), emphasizing the previously observed size dependent effect. Since the investigated cells show no obvious degeneracy

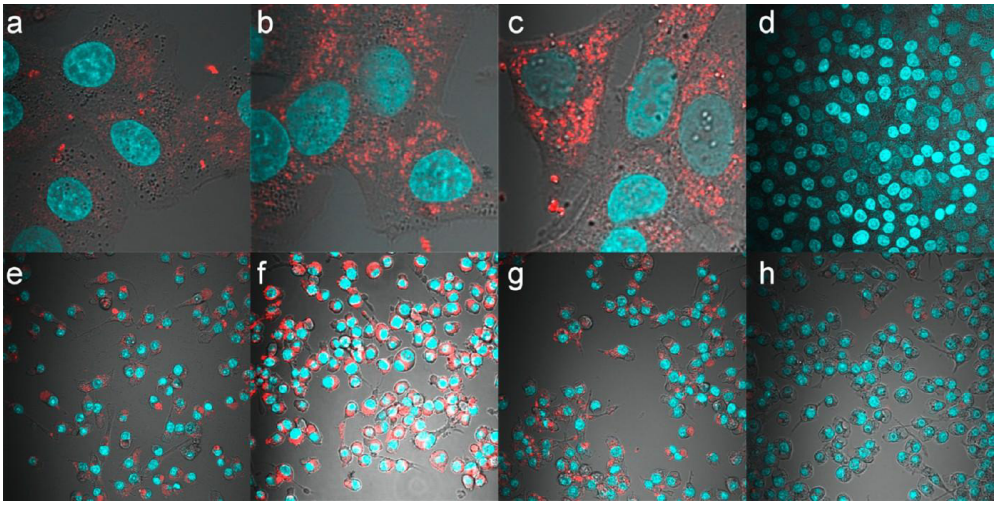


Figure 2. Confocal microscope images of (top row) A549 cells incubated with 1 μM of PI-*b*-PEO encapsulated quantum dots after an incubation time of 20 h: (a) PI-*b*-PEO 1; (b) PI-*b*-PEO 2; (c) PI-*b*-$(PEO)_2$ Y; (d) PI-*b*-PEO 5. (Bottom row) RAW-264.7 cells incubated with 1 μM of PI-*b*-PEO encapsulated quantum dots after 20 h of incubation: (e) PI-*b*-PEO 1; (f) PI-*b*-PEO 2; (g) PI-*b*-$(PEO)_2$ Y; (h) PI-*b*-PEO 5. Red areas arise from QD fluorescence. The cells nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue).

even after such a long time of incubation with quantum dots, no further toxicity tests were executed. This is supported by recent investigations of similarly prepared samples, which showed no toxicity in standard WST8 and LDH tests.[28,29] The findings concerning the toxicity suggest a dense shell around the particles, which prevents leaching of cadmium ions. Interestingly, the fluorescence intensity for the smallest construct (PI-*b*-PEO 1) in the cell experiment seemed to be lower compared to that for the other constructs (Figure 2a), which could be an indication for a quenching process, due to the smaller protecting polymer shell. To gain more knowledge about the permeability of the polymer shell around the nanoparticles, fluorescence quenching experiments were conducted.

Fluorescence Quenching Experiments. The fluorescence quantum yield of quantum dots is very sensitive to the presence of electron acceptors and chemical changes at the nanocrystal surface. Thus, fluorescence quenching experiments conveniently indicate whether and to what extent molecules or ions can penetrate the surrounding ligand shell. This information is also of strong biological relevance, because serum compounds, as well as receptors or target molecules, may come into direct contact with the nanocrystal surface or ionic compounds of the nanocrystals may leak out into the biological environment. Thus, the biological response to nanoparticles will obviously depend on the shielding of the nanocrystals by the ligand shell.

In photochemistry, two different mechanisms of fluorescence quenching are distinguished. So-called dynamic quenching occurs upon collisions of the excited dye with a quencher and is usually dominated by diffusion processes. Static quenching, on the other hand, occurs when the quencher forms a nonfluorescent ground state complex with the dye. In case of quantum dots, the latter corresponds to surface adhesion of the quencher or even a chemical reaction like ion exchange. In both cases, the integral fluorescence intensity is decreased as can be seen in the fluorescence spectra. In fluorescence lifetime measurements, distinct differences show up in the decay curves, eq 1.

$$I(t) = Ae^{-t/\tau(Q)} \quad (1)$$

Dynamic quenching opens an additional decay channel of the excited state. As a consequence, the decay time, $\tau(Q)$, is shortened, but the signal height at $t = 0$ (number of counts), A, stays constant. In contrast, $\tau(Q)$ remains constant and A decreases as a result of static quenching, because one fraction of particles is completely quenched, whereas the other remains unaffected.

Fluorescence quenching is usually described by the Stern–Volmer-formalism, eq 2. F_0 is the fluorescence intensity in absence of a quencher, $F(Q)$ is the fluorescence intensity depending on the quencher concentration, K_{SV} is the Stern–Volmer-constant, and $[Q]$ is the quencher concentration.[46]

$$\frac{F_0}{F(Q)} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2)$$

For static quenching, K_{SV} corresponds to the equilibrium constant of complex formation, whereas it equals the product of the bimolecular quenching rate constant, k_q, and the fluorescence decay time in the absence of quencher, τ_0. F_0 and $F(Q)$ can be determined in both cases from the integral of the fluorescence spectra or, if the spectral distribution remains constant upon quenching, from the integral of the

decay curves at a given wavelength. For dynamic quenching, the ratio of F_0 and $F(Q)$ can also be expressed by the ratio of τ_0 and $\tau(Q)$. Equation 2 can then be written as

$$\frac{F_0}{F(Q)} = \frac{\tau_0}{\tau(Q)} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \qquad (3)$$

To study the permeability of the various polymer shells, we performed quenching experiments with copper(II) acetate for six samples, encapsulated with linear PI-*b*-PEO (PI-*b*-PEO 1−5) and star shaped PI-*b*-$(PEO)_2$ Y polymers. Aliquots of copper(II) acetate stock solution were added to a QD solution, and emission and absorption spectra, as well as the fluorescence decay curves, were measured. The results from the quenching analysis are summarized in Figure 3. As an overview, the normalized fluorescence intensities obtained from the integral fluorescence spectra, $F(Q)/F_0$, are plotted against the equivalents of copper added to the QD solution (Figure 3a). Copper is known to quench the fluorescence of QDs irreversibly and statically due to the formation of copper sulfide/selenide.[20] This observation was confirmed with the native QD sample in organic solution (black bars in Figure 3a). We observed total quenching within seconds after adding 5 equiv of copper per particle (equiv pp). After phase transfer, the protection of the particles against quenching copper ions is strongly enhanced and depends on the size of the used polymer. Compared to reported results with PEO-amine[20,47] of similar molecular weight but without hydrophobic blocks and L-cystein[48] based ligand systems, we observed a significantly higher shielding. This indicates that it is mainly the thickness of the hydrophobic part of the ligand shell (red region in Figure 1) which hinders solution compounds to reach the nanocrystal surface. Accordingly, we found as a general trend that within the series of linear polymers the bigger ones with higher molecular weight (PI-*b*-PEO 3−5) achieve better shielding than the smaller ones. It should be pointed out that the highest amount of quencher addition would correspond to 40% ion exchange of Zn^{2+} and Cd^{2+} against Cu^{2+}, if the surface would be freely accessible. The very moderate quenching effect indicates how effective shielding in all samples is. A more careful analysis shows that the quenching is mainly associated with a drop of the initial height of the decay curves (Figure 3b) and to a smaller extent with a decrease in decay time (Figure 3c), meaning static quenching dominates over dynamic. Only at copper additions exceeding 200 equiv per particles a slight decrease of the excited state lifetime is observed (a factor of 2 at maximum for PI-*b*-PEO-1). We also notice that the first addition of Cu^{2+} (corresponding to ~35 euiv pp) leads to the relative strongest static quenching effect in all cases. We assume that this finding is due to a small fraction of particles, in which the shielding is less optimal,

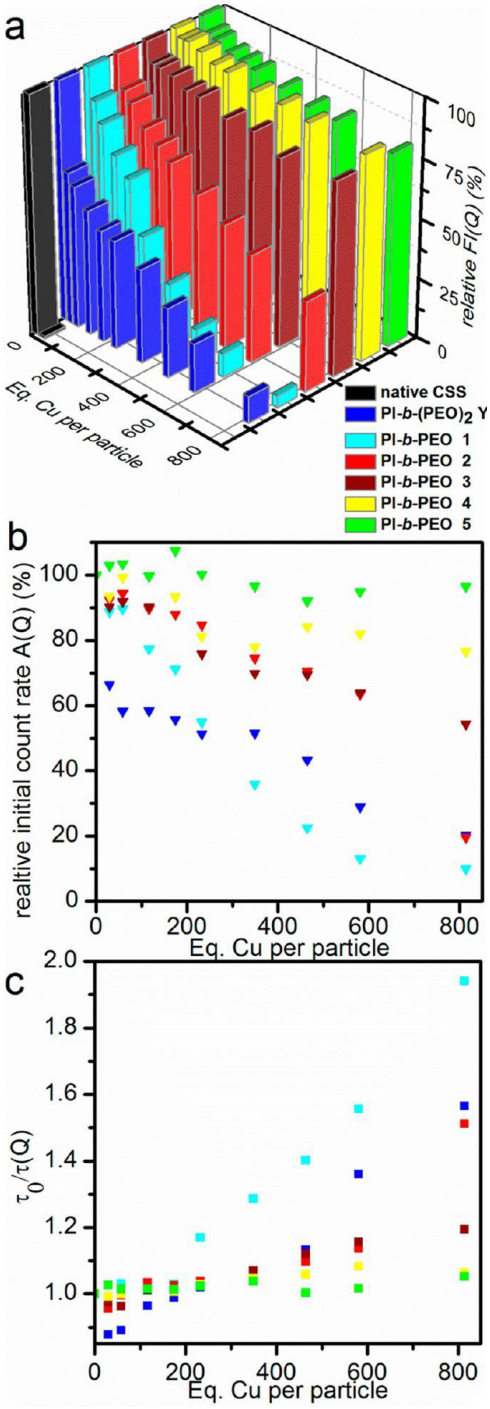


Figure 3. (a) Relative fluorescence intensities of QDs encapsulated with PI-*b*-PEO 1 (cyan), PI-*b*-PEO 2 (red), PI-*b*-PEO 3 (brown), PI-*b*-PEO 4 (magenta), PI-*b*-PEO 5 (green), and miktoarm star shaped PI-*b*-$(PEO)_2$ Y (dark blue) after the addition of aliquots Cu^{2+}. The data were taken from the fluorescence spectra. Native QD in organic solution are shown as a black bar (10× enlarged intensity). (b) Initial counts (signal height) of the fluorescence decay curves, (same color code as in (a)). (c) Stern−Volmer plot of the fluorescence lifetimes (τ_0/τ) indicating dynamic quenching (same color code as in (a)).

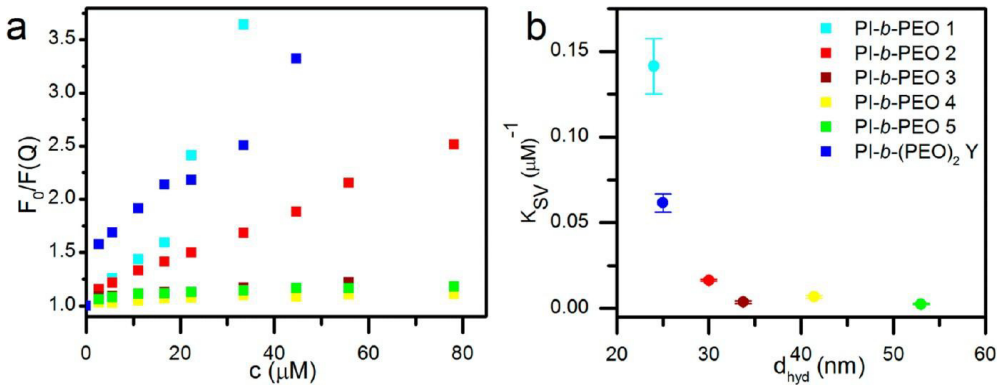


Figure 4. (a) Stern–Volmer plot of encapsulated QD (*c*(QD) = 0.1 μM) with PI-*b*-PEO 1 (cyan), PI-*b*-PEO 2 (red), PI-*b*-PEO 3 (brown), PI-*b*-PEO 4 (yellow), PI-*b*-PEO 5 (green), and miktoarm star shaped PI-*b*-(PEO)$_2$ Y (dark blue) by quenching with Cu(ac)$_2$ (squares). (b) Stern–Volmer constant plotted against the hydrodynamic diameter (circles).

probably due to nonperfect self-assembly during phase transfer.

Some special features were observed for the star shape miktoarm PI-*b*-PEO Y encapsulated QDs. First, static quenching at low quencher concentrations is more pronounced than for the linear components of comparable molecular weight (PI-*b*-PEO 2) (initial drop of the intensity bars in Figure 3a). Because of the geometry of this polymer, we expect a lower number of ligands being bound per particles compared to the linear polymers.[36] This would result in a less dense or thinner PI moiety of ligand shell allowing Cu^{2+} an easier access to the QD surface. Curiously, the initial quenching at low Cu^{2+} concentrations results in a slight increase of the fluorescence decay time (blue squares in Figure 3c). This concave curvature of the $\tau_0/\tau(Q)$ plot of PI-*b*-PEO Y was confirmed in numerous experiments. The reason for this behavior is seen in the fact that the $\tau(Q)$ values reflect an average decay time of the nanocrystal ensemble concerning the stretched exponential fit routine. Assuming the fraction of less perfectly encapsulated QDs having a lower fluorescence quantum yield and therefore a shorter fluorescence decay time, this fraction is missing in the decay curve after the first quencher addition. As a result, the average decay time of the remaining fluorescent fraction increases. We observed the same behavior according shielding, dynamic quenching and concave curvature of the τ_0/τ plot in quenching experiments with Fe^{3+} as a quencher. The results are shown in the Supporting Information (Figure SI 5) together with further details on the dynamic quenching process (Figure SI 6).

The Stern–Volmer plots of the integral fluorescence intensity obtained from the fluorescence spectra are shown in Figure 4a. Astonishingly, all curves except the one of PI-*b*-PEO 1 show an almost perfect linear slope, although rather different fluorescence quenching processes were clearly observed in the time-resolved measurements. This finding underlines the importance of combined static and dynamic fluorescence investigations for obtaining detailed information on the ligand shell of fluorescent nanocrystals. At a quencher concentration of 15 μM, the Stern–Volmer plot of the sample with the low molecular weight polymer shell, PI-*b*-PEO 1, changes its slope, indicating a more effective quenching at higher concentrations. This is understood by the less effective shielding and the thereof resulting formation of larger CuS moieties at the surface of the nanocrystals and supported by absorption spectra (Figures 5 and SI8. In Figure 4b, the Stern–Volmer constant K_{SV} is plotted against the hydrodynamic diameter. It can be seen that in the range between d_{hyd} = 20 and 35 nm the shielding depends strongly on the size of the obtained construct. An optimum hydrodynamic diameter of about 35 nm is required for a good protection of the nanocrystals (PI-*b*-PEO 3).

We also recorded absorption spectra during the fluorescence quenching experiments. As expected, changes at very low quencher additions are hard to determine (see Supporting Information). At higher quencher concentrations, spectral changes are clearly visible, which are in accordance with copper sulfide formation and the more detailed results from the fluorescence quenching experiments. The corresponding data are shown in the Supporting Information (Figures SI 7–9)

Reaction between Copper Ions and QDs. For practical applications as "clickable" biolables, long-term stability against copper ions is important. We therefore added 2000 equiv of Cu^{2+} per particle to the QD samples corresponding total ion exchange within the nanocrystal core and shell, and recorded the absorption spectra after 4 days of incubation (Figure 5a). In all cases except the PI-*b*-PEO 5 samples, a strong signal in the near-infrared region was detected due to copper sulfide/selenide formation. Kriegel *et al.* explained these bands by localized surface plasmons of nonstoichiometric ($x > 0$) copper chalkogenide nanoparticles such as

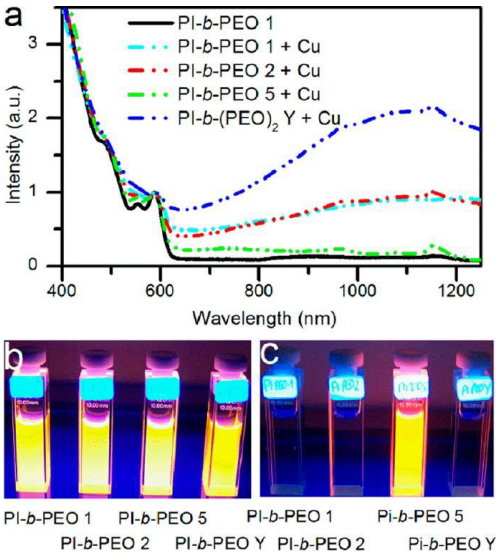


Figure 5. (a) Absorption spectra of the QD constructs after 4 days (dashed lines) incubation with 2000 equiv of Cu(II) per QD. The spectra were normalized to the first absorption maximum. A blank sample with $Cu(II)ac_2$ solution did not show any comparable absorption, and the spectrum of PI-*b*-PEO 1 encapsulated QD is shown as a black solid line. (b and c) Photographs of aqueous QDs with and without addition of Cu^{2+}. Related emission spectra are shown in Figure SI 10.

$Cu_{2-x}S$ and $Cu_{2-x}Se$.[49] Highest reactivity of Cu^{2+} was observed for the miktoarm star shaped polymer (PI-*b*-$(PEO)_2$ Y) particles, where the QD absorption almost completely vanished. Much to our delight, we found that sample PI-*b*-PEO 5 exhibits only very minor changes in the absorption spectra and that the fluorescence is almost completely retained even after these crude four days incubation conditions (Figure 5b,c).

To further investigate the copper sulfide/selenide formation, TEM element mappings were performed of the above-mentioned samples after 1 month of incubation. The samples were purified to remove excess copper ions by washing three times with water in a membrane filter. No copper was found in the third washing solution by atomic absorption spectroscopy (AAS). As expected, the mappings for the long-term incubated samples exhibit clear differences between the investigated samples (see Figure 6). Part a of the figure shows a gallery of a HADF STEM, Cd-L, Se−L, and Cu−K EDX mappings for the PI-*b*-$(PEO)_2$ Y sample, and part b shows the respective images for PI-*b*-PEO 5 encapsulated QDs. As seen in the HAADF image of Figure 6b, the sample consists of a fraction of larger and a fraction of smaller particles and is rather polydisperse in total. Some particles can only be found in the Cd map, others in the Cu map, whereas Se is found in all particles. Also the superposition of the Cd and Cu maps (part c) yields the same morphology pattern as the HAADF image. Thus, a fraction of particles is almost completely converted into copper selenide, whereas others still mainly consist of the original QD composition.

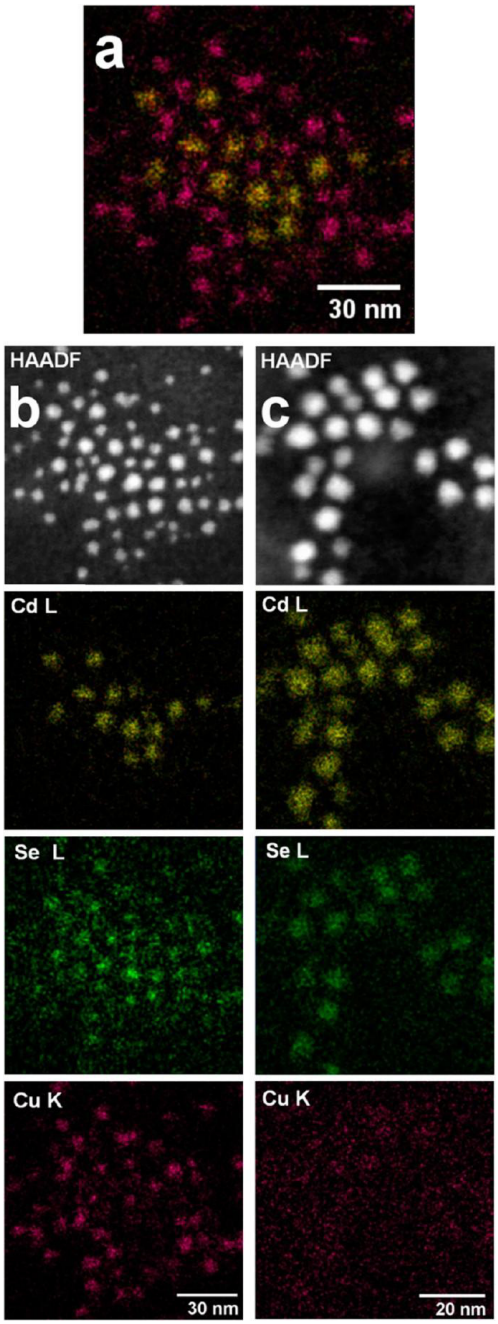


Figure 6. Scanning transmission electron microscopy (STEM) measurements of the copper incubated (2000 equiv pp) encapsulated QD: (a) Overlay of the cadmium L (yellow) and copper K (magenta) signals of PI-*b*-$(PEO)_2$ encapsulated particles; (b and c) high angular dark-field (HAADF) STEM images of the encapsulated PI-*b*-$(PEO)_2$ Y (b) and PI-*b*-PEO 5 (c). Elemental mappings of cadmium L-line (yellow), selenium L-line (green), and copper K-line (magenta).

The latter does not mean, that those particles do not contain any copper. Since the fluorescence of this sample is completely quenched, some copper must also be present in these particles, which is, however, covered by noise in the element maps. Most probably

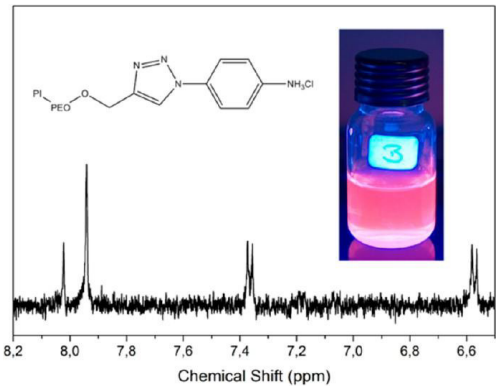


Figure 7. Aromatic region of the ^{1}H NMR spectrum of aniline hydrochloride coupled QDs, showing the signals of the aniline (6.6 and 7.4 ppm) and the signal for the aromatic triazole proton (8.1 ppm), measured in THF-d8.

the sample consisted of differently shielded QDs, some of which were easily converted into the respective copper−chalcogenide, whereas others were more resistant to ion exchange. This would be in perfect accordance to the fluorescence quenching experiments (see Figure 3).

The images for PI-*b*-PEO 5 encapsulated QDs, which showed up an extremly high resistivity against Cu^{2+} fluorescence quenching, do not differ from pure QD samples without copper addition. Consequently, no copper was found in the elemental maps (Figure 6c) again confirming the conclusions from the fluorescence data. More element maps of other samples can be found in the Supporting Information (Figures SI 11−13).

Click Chemistry. The high stability of particles encapsulated in the big polymers against copper ions led us to the investigation of copper catalyzed azide alkyne cycloaddition reactions. Therefore, a small batch of QDs was encapsulated in a blend of alkyne (~33%) and hydroxyl functionalized (~67%) PI-*b*-PEO, following the standard procedure of encapsulation. In four quick experiments, the coupling of 4-azido-aniline hydrochloride to the alkyne functionalized micelles was tested, varying some parameters according to literature reports.[50] We found a quick and versatile method to perform the cyclo-addition, yielding the desired product with a conversion of 20% (determined from the NMR signals for the aniline (6.6 and 7.4 ppm) and the triazole proton (8.1 ppm)). Fortunately and as expected, the particles retained their fluorescence with almost no loss (see Figure 7). For the complete NMR spectrum and further information, see Figure SI 14.

CONCLUSION

Differently sized and shaped PI-*b*-PEO diblock copolymer ligands may control the interaction of the quantum dot polymer construct leading to different properties in cellular uptake and different accessibility of the quantum dot itself. Thus, the polymer shell may avoid the contact of quenching ions and quantum dots. Herein, we presented a copper catalyzed click reaction of quantum dots maintaining their fluorescence properties, which has not been reported for the functionalization of single encapsulated QDs until now. A correlation between the density of the polymeric shell of the QDs and their accessibility by quenchers was proven with Cu and Fe ions. Further, a cellular uptake study showed a size dependent uptake behavior on two different cell lines. As a general trend, it can be stated that those coatings, which were most stable against quenchers, also showed the best resistivity with respect to unspecific cellular uptake.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. Air or water sensitive chemical compounds were handled under inert conditions (Ar) using standard Schlenk technique. Chloroform (anhydrous, amylene stabilized), dichlormethane (anhydrous, amylene stabilized), 1,1′-carbonyldiimidazole (CDI), disodium 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline-disulfonate, 4-azido-aniline hydrochloride, sodium ascorbate, copper(II) sulfate, 1-bromo-2,3-epoxypropane (98%), *n*-BuLi (1.6 M in *n*-hexane), 2,2′-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN), *s*-BuLi (1.4 M in cyclohexane), trioctylphosphine (TOP), selenium and zinc acetate were purchased from Aldrich; trioctylphosphine oxide (TOPO) and hexadecylamine (HDA) were from Merck; acetone, hydrochloric acid (37%), and tetrahydrofuran (THF) were from Grüssing; chloroform-d_1 ($CDCl_3$, 99.8%) and tetrahydrofuran-d_8 (THF-d_8, 99.9%) were from Deutero; copper(II) acetate and tetradecylphosphonic acid were from Alfa Aesar, and cadmium acetate was from ChemPur.

The synthesis of different sized PI and PI-*b*-PEO was performed according to the known procedure.[28] The conversion of 1-bromo-2,3-epoxypropane to 3-bromo-1,2-propanediol was done analogous to the described synthesis elsewhere.[51] 4-(Bromomethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane was prepared as described elsewhere;[52] however to avoid benzene as a solvent, acetone was used. Exchange of ligands on nanoparticles was done analogous to the previously described procedure.[28]

Instrumentation. Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) spectra were recorded on a Bruker AV I 400, AV II 400 or DRX 500 spectrometer. Chemical shifts in are reported in δ units (ppm) relative to the deuterated solvent signal ($CDCl_3$ signal at 7.26 ppm) or tetramethylsilane as an internal standard (TMS signal at 0 ppm).

Size exclusion measurements (SEC) were performed at 35 °C on a Tosoh EcoSEC HLC-8320 GPC system, using three SDV columns (Polymer Standards Service) with a porosity range of 50−1000 Å and a SDV precolumn with THF as solvent and eluent. The sample concentration was 1 mg mL^{-1}, the flow rate was set to 1 mL min^{-1}, and detection was executed with a Tosoh RI detector. PEG standards (PSS) were used for calibration.

TEM measurements were carried out with a Jeol JEM-1011 microscope (100 keV) and with a double corrected (cescor, cetcor) JEM 2200 FS. EDX Mappings were made using JED-2300 with Si(Li) detector.

Absorption measurments were made with a Cary 50 from Varian and steady-state fluorescence was measured using a Fluoromax 4 from Horiba Jobin Yvon. The fluorescence decay spectra (TRSPC) were collected with an excitation wavelength λ = 438 nm from a PDL 800-D pulsed diode laser and detected

with a PMA-M185 photomultipier with a resolution of 500 ps (PicoQuant). The signal was processed by a constant fraction 200 MHz discriminator and a time-to-amplitude converter (EG&G Ortec). Fluorescence decay curves were fitted with a stretched monoexponential using *Mathematica* and the average lifetime were calculated using the gamma function.[48] Beta for the native particles is ~0.7 and is reduced slightly within quencher addition. In the strongest quenched sample (1000 equiv) beta is about 0.5.

Synthesis of PI-*b*-(PEO)$_2$ Y (4). The polymerization of isoprene was performed, following the already mentioned procedure.[28] Instead of ethylene oxide, a slight excess of 4-(bromomethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (**1**) was used as terminating reagent. After evaporation of the solvent, the polymer was precipitated in methanol and dried *in vacuo*.

A total of 14.5 g (6.30 mmol) of the dioxolane-terminated PI (**2**) was dissolved in 200 mL of THF. Then, 50 mL of hydrochloric acid (4 M) was added, and the mixture was refluxed for 4 h. The mixture was stirred for another 12 h at ambient temperature, before the solvent was evaporated. The biphasic mixture was diluted with 300 mL of dichloromethane. The aqueous phase was discarded; the organic phase was washed with water (1×), saturated $NaHCO_3$ (2×), and water again before it was dried over Na_2SO_4. After evaporation of the solvent, the polymer was precipitated in methanol.

A total of 12.8 g (5.57 mmol) of the deprotected PI (**3**) was used as macroinitiator for the polymerization of ethylene oxide. The polymer was dissolved in 350 mL of dry THF. Under an argon atmosphere, 11.2 mL of diphenylmethylpotassium (~1 mmol/L in THF) was added. Then, 35 mL of ethylene oxide was dried and purified over CaH_2, sodium mirror, and *n*-BuLi before it was distilled to the activated PI solution. The polymerization was carried out for 96 h at 40 °C and finally terminated using 2 mL of acetic acid (35 mmol). After evaporation of the solvent, the polymer was precipitated in diethyl ether and cold acetone.

Synthesis of Quantum Dots. CdSe/CdS/ZnS core−shell−shell nanocrystals (CANdots Serie A, slightly modified) were prepared by CAN GmbH (Center for Applied Nanotechnology, Hamburg, Germany) based on the synthesis of Talapin *et al.*[53] Trioctylphosphine oxide (TOPO, 64 g) was dried *in vacuo* for 1 h before hexadecylamine (HDA, 40 g) and tetradecylphosphonic acid (TDPA, 1.6 g) were added, and the obtained solution was further dried *in vacuo* (120 °C, 30 min). Se-TOP (16 mL, 1 M solution) was added, and the reaction mixture was heated to 300 °C. Cadmium acetate, dissolved in TOP (24 mL, 0.17 M solution) was added *via* hot injection. The reaction mixture was stirred for 100 min at 260 °C. The solution was cooled to 90 °C, and toluene was added. The CdSe *core* Particles were precipitated using methanol and dissolved in *n*-hexane. The shell was synthesized using a solution of TOPO, HDA and TDPA, as explained above. The CdSe *core* solution was added, and the *n*-hexane was removed *in vacuo*. Cadmium acetate, dissolved in TOP (24 mL, 0.17 M), was added, and the solution was heated to 220 °C. Aliquots of hydrogen sulfide (96 mL) were added over a period of 40 min. Afterward, zinc acetate TOP solution (24 mL, 0.2 M) and hydrogen sulfide (192 mL) were added and the solution was stirred overnight. Zinc acetate TOP solution was added (12 mL, 0.2 M) and excess hydrogen sulfide was removed using nitrogen stream. The solution was cooled down and toluene was added. The *core−shell−shell* particles were precipitated with methanol three times before dissolving them in hexane.

Encapsulation of QDs in PI-*b*-PEO Block Copolymers. PI-coated quantum dots, a 300-fold excess of PI-*b*-PEO and AIBN (1/3 of isoprene units present in the diblock copolymer) were dissolved in THF to yield a 10 μM solution. This solution was injected into the 10-fold volume of water and stirred for 30 min to equilibrate. After equilibration, the solution was heated to 80 °C for 4 h to initiate cross-linking and remove excess THF. The samples were purified by ultracentrifugation using a sucrose gradient from 0% up to 60%. Excess sucrose was removed by several washing steps, using centrifugal filter units.

Quenching Experiments. The CSS QD (100 nM) were diluted in a quarz cuvette and equilibrated 15 min. Absorption, steady-state fluorescence and fluorescence decay spectra (TRSPC) were collected. Aliquots of the copper acetate solution (1.452 mM) were added and kept for 30 min in the dark before absorption, steady-state and fluorescence decay spectra were collected.

Click Reaction. The click reactions were performed based on the work of Hassane *et al.* using copper sulfate, sodium ascorbate, 4-azido-aniline hydrochloride and bathophenanthroline disulfonate.[50] The concentrations were the following: QD 1 μM, 4-azido-aniline hydrochloride 200 μM, copper sulfate 100 μM, disodium 4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolinedisulfonat 200 μM, sodium ascorbate 500 μM. The solutions were mixed and stirred for 20 h at room temperature. The concentration of the alkine was 100 μM using a 1/3 blend of alkine functionalized PI-*b*-PEO and PI-*b*-PEO 5. Afterward, the solution was washed three times using a membrane filter and dialyzed against water. Water was removed using a freeze-dryer and the product was dissolved in in THF-d_8.

Cellular Uptake. A549 cells (10 000 cells per well) were grown in Lab-Tek thin bottom chambers to confluence, before being exposed to 1 μM nanoparticles in serum free medium. After 20 h incubation at a temperature of 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2, cells were washed with PBS, counterstained with Hoechst 33342, and monitored by confocal laser scanning microscopy (Olympus FluoView FV1000 with an IX81 inverted microscope; CLSM).

RAW-264.7 cells (10 000 cells per well) were grown in Lab-Tek thin bottom chambers for 2 days, before being exposed to 1 μM nanoparticles in serum free medium. After 20 h incubation at a temperature of 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2, cells were washed with PBS, counterstained with Hoechst 33342 and monitored by CLSM.

Conflict of Interest: The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment. This work was supported by the EU within the FP 7 program (Vibrant, EU 228933), the State Excellence Initiative "Nanotechnology in Medicine" and the Chemical Industry Fund, VCI: German Chemical Industry Association. We kindly thank CAN GmbH for the preparation and provision of the slightly modified CANdots Serie A free of charge. Further, we thank D. Meyer for the illustration of the TOC graphic.

Supporting Information Available: DLS data and TEM images of PI-*b*-PEO encapsulated QDs, additional CLSM images of A549 cells incubated with encapsulated QDs, extended information on fluorescence quenching experiments (quenching with $FeCl_3$, investigation of quenching with wide-field fluorescence imaging), additional STEM EDX mappings, NMR spectrum of aniline hydrochloride coupled QDs. This material is available free of charge *via* the Internet at http://pubs.acs.org.

REFERENCES AND NOTES

1. Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435–446.
2. Chen, O.; Zhao, J.; Chauhan, V. P.; Cui, J.; Wong, C.; Harris, D. K.; Wei, H.; Han, H.-S.; Fukumura, D.; Jain, R. K.; *et al.* Compact High-Quality CdSe-CdS Core-Shell Nanocrystals with Narrow Emission Linewidths and Suppressed Blinking. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 1–7.
3. Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Quantum Dots *versus* Organic Dyes as Fluorescent Labels. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763–775.
4. Mekis, I.; Talapin, D. V.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdSe/CdS Core−Shell Nanocrystals *via* Organometallic and "Greener" Chemical Approaches. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7454–7462.
5. Thiry, M.; Boldt, K.; Nikolic, M. S.; Schulz, F.; Ijeh, M.; Panicker, A.; Vossmeyer, T.; Weller, H. Fluorescence Properties of Hydrophilic Semiconductor Nanoparticles with Tridentate Polyethylene Oxide Ligands. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4965–4973.
6. Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. M.; Mattoussi, H. Synthesis of Compact Multidentate Ligands to Prepare Stable Hydrophilic Quantum Dot Fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3870–3878.

7. Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Ra, J.; Natile, G.; Parak, W. J. Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703–707.
8. Pöselt, E.; Fischer, S.; Foerster, S.; Weller, H. Highly Stable Biocompatible Inorganic Nanoparticles by Self-Assembly of Triblock-Copolymer Ligands. *Langmuir* **2009**, *25*, 13906–13913.
9. Chan, Y.; Zimmer, J. P.; Stroh, M.; Steckel, J. S.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G. Incorporation of Luminescent Nanocrystals into Monodisperse Core-Shell Silica Microspheres. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2092–2097.
10. Kloust, H.; Pöselt, E.; Kappen, S.; Schmidtke, C.; Kornowski, A.; Pauer, W.; Moritz, H.-U.; Weller, H. Ultrasmall Biocompatible Nanocomposites: a New Approach Using Seeded Emulsion Polymerization for the Encapsulation of Nanocrystals. *Langmuir* **2012**, *28*, 7276–7281.
11. Rostovtsev, V. V; Green, L. G.; Fokin, V. V; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
12. Brennan, J. L.; Hatzakis, N. S.; Tshikhudo, T. R.; Dirvianskyte, N.; Razumas, V.; Patkar, S.; Vind, J.; Svendsen, A.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; *et al.* Bionanoconjugation *via* Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1373–1375.
13. Boisselier, E.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Astruc, D. How to Very Efficiently Functionalize Gold Nanoparticles by "Click" Chemistry. *Chem. Commun.* **2008**, 5788–5790.
14. Binder, W. H.; Sachsenhofer, R.; Straif, C. J.; Zirbs, R. Surface-Modified Nanoparticles *via* Thermal and Cu(I)-Mediated "Click" Chemistry: Generation of Luminescent CdSe Nanoparticles with Polar Ligands Guiding Supramolecular Recognition. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2125–2132.
15. Beaune, G.; Tamang, S.; Bernardin, A.; Bayle-Guillemaud, P.; Fenel, D.; Schoehn, G.; Vinet, F.; Reiss, P.; Texier, I. Luminescence of Polyethylene Glycol Coated CdSeTe/ZnS and InP/ZnS Nanoparticles in the Presence of Copper Cations. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2247–2254.
16. Isarov, A. V.; Chrysochoos, J. Optical and Photochemical Properties of Nonstoichiometric Cadmium Sulfide Nanoparticles: Surface Modification with Copper(II) Ions. *Langmuir* **1997**, *13*, 3142–3149.
17. Jawaid, A. M.; Chattopadhyay, S.; Wink, D. J.; Page, L. E.; Snee, P. T. Cluster-Seeded Synthesis of Doped CdSe:Cu_4 Quantum Dots. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3190–3197.
18. Chen, D.; Viswanatha, R.; Ong, G. L.; Xie, R.; Balasubramaninan, M.; Peng, X. Temperature Dependence of "Elementary Processes" in Doping Semiconductor Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9333–9339.
19. Srivastava, B. B.; Jana, S.; Pradhan, N. Doping Cu in Semiconductor Nanocrystals: Some Old and Some New Physical Insights. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1007–1015.
20. Bernardin, A.; Cazet, A.; Guyon, L.; Delannoy, P.; Vinet, F.; Bonnaffé, D.; Texier, I. Copper-Free Click Chemistry for Highly Luminescent Quantum Dot Conjugates: Application to *in Vivo* Metabolic Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 583–588.
21. Schieber, C.; Bestetti, A.; Lim, J. P.; Ryan, A. D.; Nguyen, T.-L.; Eldridge, R.; White, A. R.; Gleeson, P. a; Donnelly, P. S.; Williams, S. J.; *et al.* Conjugation of Transferrin to Azide-Modified CdSe/ZnS Core-Shell Quantum Dots Using Cyclooctyne Click Chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10523–10527.
22. Zhang, P.; Liu, S.; Gao, D.; Hu, D.; Gong, P.; Sheng, Z.; Deng, J.; Ma, Y.; Cai, L. Click-Functionalized Compact Quantum Dots Protected by Multidentate-Imidazole Ligands: Conjugation-Ready Nanotags for Living-Virus Labeling and Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8388–8391.
23. Breus, V. V.; Heyes, C. D.; Nienhaus, G. U. Quenching of CdSe-ZnS Core-Shell Quantum Dot Luminescence by Water-Soluble Thiolated Ligands. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 18589–18594.
24. Peng, P.; Sadtler, B.; Alivisatos, A. P.; Saykally, R. J. Exciton Dynamics in CdS−Ag_2S Nanorods with Tunable Composition Probed by Ultrafast Transient Absorption Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 5879–5885.
25. Boldt, K.; Jander, S.; Hoppe, K.; Weller, H. Characterization of the Organic Ligand Shell of Semiconductor Quantum Dots by Fluorescence Quenching Experiments. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8115–8123.
26. Ji, X.; Palui, G.; Avellini, T.; Na, H. B.; Yi, C.; Knappenberger, K. L.; Mattoussi, H. On the pH-Dependent Quenching of Quantum Dot Photoluminescence by Redox Active Dopamine. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6006–6017.
27. Pons, T.; Medintz, I. L.; Sapsford, K. E.; Higashiya, S.; Grimes, A. F.; English, D. S.; Mattoussi, H. On the Quenching of Semiconductor Quantum Dot Photoluminescence by Proximal Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3157–3164.
28. Pöselt, E.; Schmidtke, C.; Fischer, S.; Peldschus, K.; Salamon, J.; Kloust, H.; Tran, H.; Pietsch, A.; Heine, M.; Adam, G.; *et al.* Tailor-Made Quantum Dot and Iron Oxide Based Contrast Agents for *in Vitro* and *in Vivo* Tumor Imaging. *ACS Nano* **2012**, *6*, 3346–3355.
29. Schmidtke, C.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Pietsch, A.; Kloust, H.; Tran, H.; Schotten, T.; Bastús, N. G.; Eggers, R.; Weller, H. Amphiphilic, Cross-Linkable Diblock Copolymers for Multifunctionalized Nanoparticles as Biological Probes. *Nanoscale* **2013**, *5*, 7433–7444.
30. Förster, S.; Kramer, E. Synthesis of PB-PEO and PI-PEO Block Copolymers with Alkyllithium Initiators and the Phosphazene Base t-BuP_4. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2783–2785.
31. Allgaier, J.; Poppe, A.; Willner, L.; Richter, D. Synthesis and Characterization of Poly[1,4-isoprene-b-(ethylene oxide)] and Poly[ethylene-co-propylene-b-(ethylene oxide)] Block Copolymers. *Macromolecules* **1997**, *30*, 1582–1586.
32. Al-Jarrah, M. M. F.; Apikian, R. L.; Ahmed, E. Polymerization Mechanisms. *Polym. Bull.* **1984**, *12*, 433–436.
33. Schmidtke, C.; Lange, H.; Tran, H.; Ostermann, J.; Kloust, H.; Bastús, N. G.; Merkl, J.-P.; Thomasen, C.; Weller, H. Radical Initiated Reactions on Biocompatible CdSe-Based Quantum Dots: Ligand Crosslinking, Crystal Annealing and Fluorescence Enhancement. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 8570–8578.
34. Zalipsky, S. Functionalized Poly(ethylene glycol) for Preparation of Biologically Relevant Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 150–165.
35. Natalello, A.; Tonhauser, C.; Berger-Nicoletti, E.; Frey, H. A Combined DPE/Epoxide Termination Strategy for Hydroxyl End-Functional Poly(2-vinylpyridine) and Amphiphilic AB_2-Miktoarm Stars. *Macromolecules* **2011**, *44*, 9887–9890.
36. Pispas, S.; Hadjichristidis, N.; Potemkin, I.; Khokhlov, A. Effect of Architecture on the Micellization Properties of Block Copolymers: A_2B Miktoarm Stars *vs* AB Diblocks. *Macromolecules* **2000**, *33*, 1741–1746.
37. Cai, Y.; Tang, Y.; Armes, S. P. Direct Synthesis and Stimulus-Responsive Micellization of Y-Shaped Hydrophilic Block Copolymers. *Macromolecules* **2004**, *37*, 9728–9737.
38. Soliman, G. M.; Sharma, R.; Choi, A. O.; Varshney, S. K.; Winnik, F. M.; Kakkar, A. K.; Maysinger, D. Tailoring the Efficacy of Nimodipine Drug Delivery Using Nanocarriers Based on A_2B Miktoarm Star Polymers. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8382–8392.
39. Gibanel, S.; Forcada, J.; Heroguez, V.; Schappacher, M.; Gnanou, Y. Novel Gemini-Type Reactive Dispersants Based on PS/PEO Block Copolymers: Synthesis and Application. *Macromolecules* **2001**, *34*, 4451–4458.
40. Liu, H.; Xu, J.; Jiang, J.; Yin, J.; Narain, R.; Cai, Y.; Liu, S. Syntheses and Micellar Properties of Well-Defined Amphiphilic AB_2 and A_2B Y-Shaped Miktoarm Star Copolymers of ε-Caprolactone and 2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylate. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 1446–1462.
41. Gao, Z.; Eisenberg, A. A Model of Micellization for Block Copolymers in Solutions. *Macromolecules* **1993**, *26*, 7353–7360.

42. Wilhelm, M.; Zhao, C.; Wang, Y.; Xu, R.; Winnik, M. A.; Mura, J.-L.; Riess, G.; Croucher, M. D. Poly(styrene-ethylene Oxide) Block Copolymer Micelle Formation in Water: a Fluorescence Probe Study. *Macromolecules* **1991**, *24*, 1033–1040.
43. Kangwansupamonkon, W.; Gilbert, R. G.; Kiatkamjornwong, S. Modification of Natural Rubber by Grafting with Hydrophilic Vinyl Monomers. *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 2450–2460.
44. Hühn, D.; Kantner, K.; Geidel, C.; Brandholt, S.; Cock, I. De; Soenen, S. J. H.; Rivera Gil, P.; Montenegro, J.-M.; Braeckmans, K.; Müllen, K.; *et al.* Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3253–3263.
45. Mahmoudi, M.; Abdelmonem, A. M.; Behzadi, S.; Clement, J. H.; Dutz, S.; Ejtehadi, M. R.; Hartmann, R.; Kantner, K.; Linne, U.; Maffre, P.; *et al.* Temperature—The "Ignored" Factor at the NanoBio Interface. *ACS Nano* **2013**, 10.1021/nn305337c.
46. Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Springer: New York, 2010.
47. Beaune, G.; Tamang, S.; Bernardin, A.; Bayle-Guillemaud, P.; Fenel, D.; Schoehn, G.; Vinet, F.; Reiss, P.; Texier, I. Luminescence of Polyethylene Glycol Coated CdSeTe/ZnS and InP/ZnS Nanoparticles in the Presence of Copper Cations. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2247–2254.
48. Chen, Y.; Rosenzweig, Z. Luminescent CdS Quantum Dots as Selective Ion Probes. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5132–5138.
49. Kriegel, I.; Jiang, C.; Rodríguez-Fernández, J.; Schaller, R. D.; Talapin, D. V; Como, E. da; Feldmann, J. Tuning the Excitonic and Plasmonic Properties of Copper Chalcogenide Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1583–1590.
50. Hassane, F. S.; Frisch, B.; Schuber, F. Targeted Liposomes: Convenient Coupling of Ligands to Preformed Vesicles Using "Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 849–854.
51. Winstein, S.; Goodman, L. Neighboring Groups in Addition. II. Hydroxyl and Acetoxy Groups in Allyl Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 4368–4372.
52. Marasco, C. J.; Piantadosi, C.; Meyer, K. L.; Morris-Natschke, S.; Ishaq, K. S.; Small, G. W.; Daniel, L. W. Synthesis and Biological Activity of Novel Quaternary Ammonium Derivatives of Alkylglycerols as Potent Inhibitors of Protein Kinase C. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 985–992.
53. Talapin, D. V.; Mekis, I.; Götzinger, S.; Kornowski, A.; Benson, O.; Weller, H. CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS Core-Shell-Shell Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18826–18831.

6.6.10 Radical Initiated Reactions on Biocompatible CdSe-Based Quantum Dots: Ligand Cross-Linking, Crystal Annealing, and Fluorescence Enhancement

Diese Veröffentlichung beschäftigt sich mit der radikalischen Quervernetzung der Polyisopreneinheiten des PI-*b*-PEO bzw. des PI-DETA mit Azobis(isobutyronitril). Bei der Verwendung von Azobis(isobutyronitril) kommt es zu einer sofortigen Fluoreszenzlöschung. Die PL baut sich jedoch langsam wieder auf, erreicht nach ca. 4-6 Stunden ein Maximum und fällt dann wieder ab. Der Abfall geht mit dem Verlust einiger Partikel einher, wohingegen andere unverändert bleiben. Die Quervernetzung wird neben NMR und Ramanspektroskopie auch mittels Fluoreszenzstabilitätsassays und Zugänglichkeitsstudien mit Eisen(III) und Methylviologenionen untersucht. Diese Assays habe ich geplant und durchgeführt, weiterhin war ich am Schreiben des Manuskriptes beteiligt. Reprinted with permission from*Radical Initiated Reactions on Biocompatible CdSe-Based Quantum Dots: Ligand Cross-Linking, Crystal Annealing, and Fluorescence Enhancement*, Christian Schmidtke, Holger Lange, Huong Tran Johannes Ostermann, Hauke Kloust, Neus G. Bastús, Jan-Philip Merkl, Christian Thomsen, and Horst Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 8570-8578.[16] Copyright ©2013 American Chemical Society.

THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY C

Article

pubs.acs.org/JPCC

Radical Initiated Reactions on Biocompatible CdSe-Based Quantum Dots: Ligand Cross-Linking, Crystal Annealing, and Fluorescence Enhancement

Christian Schmidtke,[†] Holger Lange,[‡,§] Huong Tran,[†] Johannes Ostermann,[†] Hauke Kloust,[†] Neus G. Bastús,[†,∥] Jan-Philip Merkl,[†] Christian Thomsen,[‡] and Horst Weller*[,†]

[†]Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, and Center for Applied Nanotechnology, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany, and The Hamburg Center for Ultrafast Imaging, University of Hamburg, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany

[‡]Institut, für Festkörperphysik, Technische Universität Berlin, Hardenbergstrasse 36, 10623, Berlin, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Cross-linking of biocompatible ligand shells significantly improves the stability of nanocrystals in the biological environment. We report a detailed spectroscopic study of radical initiated reactions on poly(isoprene)-*b*-poly(ethelene glycol) encapsulated CdSe/CdS/ZnS core–shell–shell quantum dots. It was found that the radicals not only initiate cross-linking of the polyisoprene moieties but also may anneal the nanocrystal surfaces and improve their crystallinity.



INTRODUCTION

Fluorescent semiconductor nanoparticles (quantum dots, QDs) are used for imaging in biomedicine because of their excellent fluorescence properties.[1−3] The major advantages to organic dyes are their high photostability, their adjustable emission wavelength, their narrow emission band, and the wide spectral window for excitation. Monodisperse samples of highly crystalline nanoparticles (NPs) are usually synthesized in high boiling organic solvents[4] using hydrophobic surface ligands such as trioctylphosphine (TOP), trioctylphosphine oxide (TOPO), and alkylamines.

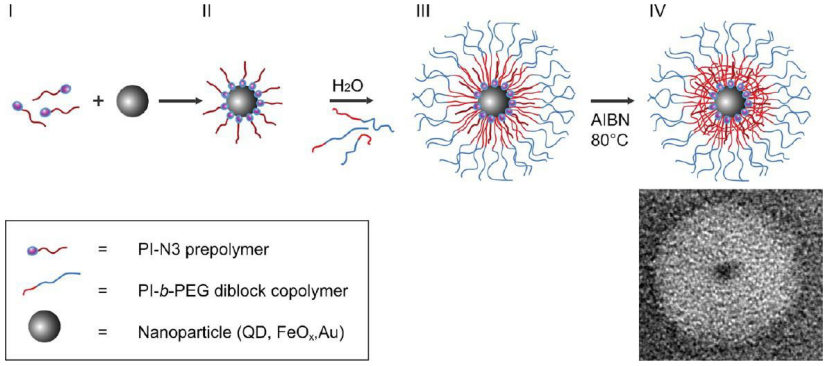
Applications in biological systems, however, require a phase transfer into aqueous media. Many different coating strategies have been developed to make nanoparticles water-soluble including the use of silica-shells,[5,6] hydrophilic small molecules,[1,7] or (amphiphilic) polymers.[8−11]

Most of the reported polymeric ligand systems are based on self-organization by hydrophobic effects[9] and/or coordinative bonds.[10] Such relative loosely bound polymers as well as small molecules underlie surface equilibria leading to ligand release at low concentrations and,[12] as a consequence, to colloidal destabilization and a loss in fluorescence quantum efficiency.[13] To overcome this problem, cross-linking of the ligand shell is an appropriate approach.[8] We recently described an encapsulation method for QDs and other nanoparticles combining self-assembly and cross-linking of amphiphilic *block*-copolymer ligands.[14] It consists of a partial ligand exchange of native ligands against poly(isoprene)-diethylentriamine (PI−N3) and a subsequent addition with poly(isoprene)-*b*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer (PI-*b*-PEG) (chemical structures of the polymers can be found in the Supporting Information). After transfer to water, micelles are formed and in a final step the PI moiety can be cross-linked using azobisisobutyronitrile (AIBN) as a radical starter (see Scheme 1). In contrast to the reported system of Pellegrino et al.,[8] cross-linking occurs in the inner, hydrophobic part of the micelle. This not only leads to a substantially improved stability of the quantum dots against fluorescence quenchers from the aqueous environment but also allows further reactions of the hydrophobic cross-linker radicals with the encapsulated nanocrystals. Often, QDs degrade under radical attack and the fluorescence gets quenched. Astonishingly, we found that after an initial break down the fluorescence recovers under radical exposure. Here, we describe a detailed investigation of this post treatment process by a combined approach of absorption, emission, NMR, and Raman spectroscopy and present data from density functional theory (DFT) calculations. This combination allows distinguishing between the effect of cross-linking, surface annealing, and changes in the crystal structure of the quantum dots.

Received: March 25, 2013
Published: April 3, 2013

ACS Publications © 2013 American Chemical Society

Scheme 1. Schematic Representation of Nanoparticle Encapsulation with PI-*b*-PEG Diblock Copolymer and a Phosphotungstic Acid-Stained TEM Image of a QD-Micelle with a Diameter of 29 nm



EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Air or water sensitive chemical compounds were handled under inert conditions with N_2/Ar using the Schlenk technique or glove boxes. Cadmium acetate anhydrous (99.99%) and zinc acetate hydrate (99.9%) were purchased from ChemPur, selenium shots (1−5 mm, 99.9%) from Alfa Aesar. Chloroform (anhydrous, amylene stabilized) and dichlormethane (anhydrous, amylene stabilized) were obtained from Sigma-Aldrich. 1,1′-Carbonyldiimidazole (CDI), ε-caprolactone (97%), hexamethyldisilathiane ($(TMS)_2S$), poly(ethylene glycol) methyl ether (mPEG, $M_n \sim 2000$ mol flakes), polyethylenimine (PEI, $M_W \sim 800$ mol), and trioctyl phosphine (TOP, 90%) were purchased from Aldrich, acetone from Grüssing, and chloroform D1 ($CDCl_3$) and tetrahydrofuran (THF, 99.9%) from Carl Roth.

Synthesis of QDs. CdSe/$Cd_xZn_{(1-x)}S$ core/alloy-shell and CdSe/$Cd_xZn_{(1-x)}S$/ZnS core/alloy-shell/shell nanoparticles were synthesized after a modified synthesis of Xie et al. without the first CdS-shell.[15] Cadmium acetate, zinc acetate, and trioctyl phosphine (TOP) were used instead of cadmium oxide, diethylzinc, and trioctyl phosphine oxide (TOPO). The shell growth temperature was 130 °C. Finally, the nanoparticles were precipitated once with methanol to remove any excess of ligands and were stored in *n*-hexane.

CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell QDs were produced in high boiling organic solvents using TOP, TOPO, and hexadecyl amine (HDA) following the altered protocol of Talapin et al.[16] Bis(trimethylsilyl) sulfide and diethylzinc were replaced by less environmentally hazardous compounds: hydrogen sulfide and zinc acetate. The nanoparticles were precipitated twice with methanol to remove excess TOP/TOPO and were stored in *n*-hexane. Alternatively we used core/shell/shell can-dots, which were supplied by the Center for Applied Nanotechnology.

Synthesis of Used Polymers. The polymers PI and PI-*b*-PEG were synthesized by living anionic polymerization (LAP) as previously described.[14] PI−N3 was synthesized by CDI coupling PI to diethylenetriamine (N3). The PEI-*b*-PCL-*b*-PEG triblock copolymer was synthesized by ringopening polymerization of ε-caprolactone using the mPEG as a macroinitiator.[17] The resulting PCL-*b*-PEG diblock copolymer was activated by CDI and reacted with branched PEI.

Ligand Exchange with PI−N3. The CdSe-based QDs were incubated with 600 eq. of PI_{18}−N3 (average M_W 1.3 kDa). After 2−5 h, the nanoparticles were precipitated with ethanol out of *n*-hexane. The nanoparticles were stored in *n*-hexane under light exclusion.

Ligand Addition. The concentration of the PI_{18}−N3 coated QDs/*n*-hexane stock solution was defined by their UV−vis absorbance.[18] An aliquot of 20 nmol QDs was removed and dried under nitrogen flow. The dried particles were resuspended with a 50 times excess of PI_{50}-*b*-PEG_{150} ligands (average M_W 10.0 kDa) in 2 mL of THF. In the case of cross-linking, AIBN was added in the same or half mass ratio as the used diblock copolymer. The solution was injected into 18 mL of water and incubated for 15−30 min at room temperature. Afterward the solution was heated at 80 °C for different durations to initiate cross-link formation. The particle solution was filtered through a syringe filter (CE, hydrophilic, 0.45 μm) and washed twice with 8 mL of water in centrifugal filter units (Amicon Ultra-15, 100 kDa membrane).

Formation of Empty Micelles. A similar process to the standard encapsulation of fluorescent QDs was used. The PI_{50}-*b*-PEG_{150} diblock copolymer (10 mg) was dissolved with the same amount of AIBN in 2 mL of THF and injected into 18 mL of water at room temperature. The solution was heated at 80 °C temperature (60 °C for the NMR experiment) to initiate the cross-linkage. For the NMR experiment, deuterated solvents were used (D_2O and THF-d_8). The same purification method was applied as for encapsulated QDs.

Ligand Exchange with PEI-*b*-PCL-*b*-PEG. CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell nanoparticles (20 nmol) were incubated with 300 eq. of PEI_{16}-*b*-$[PCL_3$-*b*-$PEO_{44}]_3$ (average M_W 6.8 kDa) in 1 mL of $CHCl_3$ for 2−5 h. After removing the solvent, the dried particles were resuspended in 2 mL of THF. In the case of cross-linking, AIBN (10 mg) was added in. The solution was injected into 18 mL of water and incubated for 15−30 min at room temperature. Afterward the solution was heated at 80 °C for different durations to initiate cross-link formation. The particle solution was filtered through a syringe filter (CE, hydrophilic, 0.45 μm) and washed twice with 8 mL of water in centrifugal filter units (Amicon Ultra-15, 100 kDa membrane).

Fluorescence Quenching Experiments with QDs. PI-*b*-PEG encapsulated QDs (0.250 nmol) were diluted with distilled water (2.6 mL) in a quartz cuvette and were allowed to equilibrate for 1 h. Aliquots of the quencher solution [iron(III)chloride ($FeCl_3$) in THF 1.48 mM or methyl viologen (MV^{2+}) in water 1.42 mM] were added in the steps of V_{total} = 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70 μL. After each addition, the sample was allowed to equilibrate for 30 min before measuring the emission

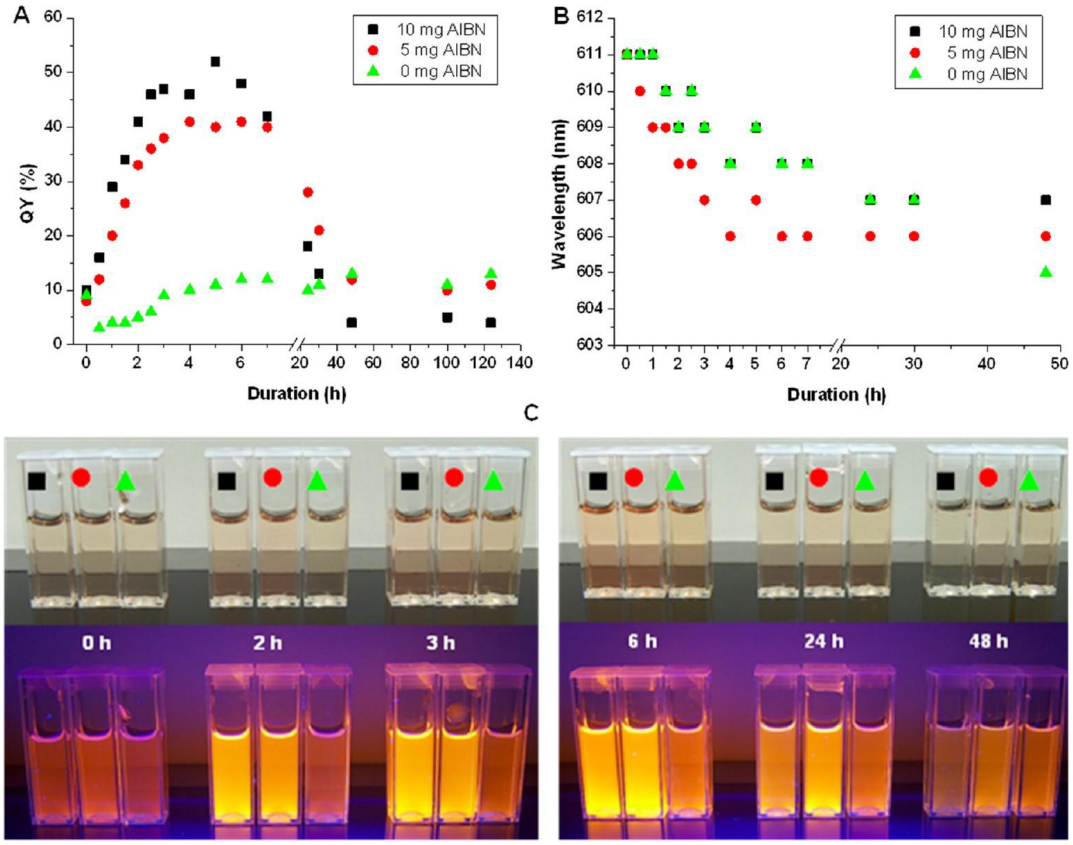


Figure 1. (A) Fluorescence QY of PI-*b*-PEG encapsulated CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell QDs in water at different cross-linking durations in the presence of different amounts of AIBN (■, 10 mg AIBN; red ●, 5 mg AIBN; green ▲, without AIBN) and (B) the corresponding emission maxima plotted against the cross-linking durations. (C) Photograph of the QDs in water (top, under daylight; bottom, under UV excitation.

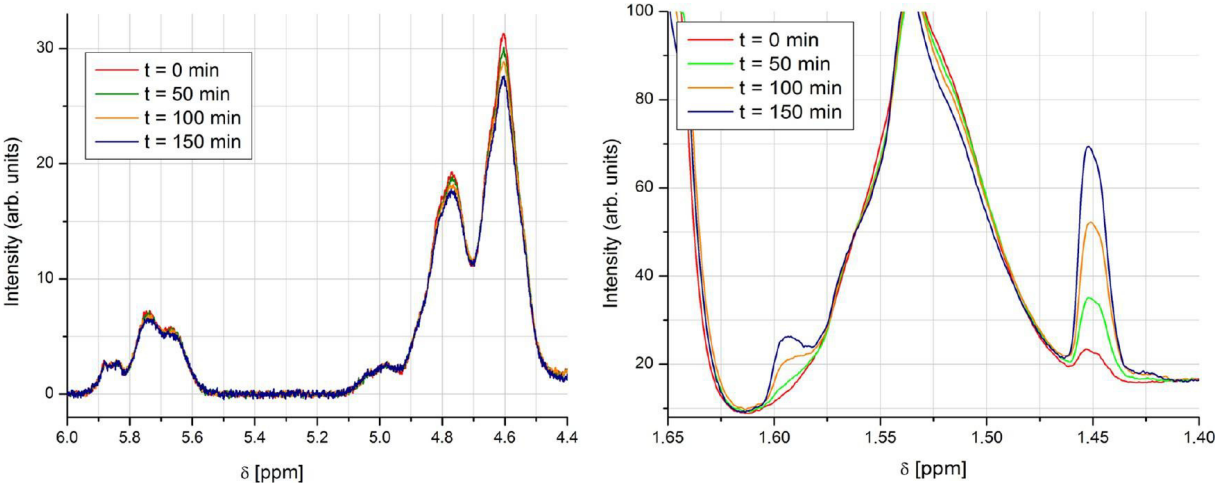


Figure 2. Superimposed NMR spectra of PI-*b*-PEG micelles in D_2O; the spectra are adjusted to the PEG signal at 3.62 ppm. Olefinic (left window) and aliphatic region (right window) of the superimposed spectra in detail.

(excitation wavelength λ_{ex} = 438 nm) and absorption spectra. Iron(III)chloride in THF was used because of the smaller inner filter effect[19] compared to iron(III)nitrate.[20] The THF did not show a significant influence on the QY in comparison with PI-*b*-PEG encapsulated QDs in distilled water without any treatment. The emission signals were corrected for the inner filter effect and the dilution due to quencher addition.

Spectroscopy. Ultraviolet−visible (UV−vis) absorption spectra were collected on Cary 50 (Varian). Fluorescene spectra were recorded on Eclipse (Varian) and on FluoroMax-4

(Horiba). Hydrodynamic light scattering (DLS) was performed on Zetasizer Nano ZS system (Malvern) equipped with a single angle 173° backscatter system using He−Ne laser illumination at 633 nm. Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) spectra were recorded on an AV I 400, AV II 400, or DRX 500 spectrometer (Bruker). Chemical shifts in ^{1}H NMR spectra are reported in δ units (ppm) relative to deuterated solvent signal as internal standard (chloroform D1 signal at 7.26 ppm). For the Raman spectra, the particle solutions were dip-coated on Si wafers and left until the solvent evaporated. Raman spectra were obtained using a LabRAM HR confocal Raman microscope in backscattering geometry. Bulk polymers and empty micelles were excited using a frequency-doubled Nd:YAG laser running at 532 nm. Additional reference spectra were obtained using a 835 nm GaAs/AlGaAs laser diode. To reduce the luminescent background all samples containing semiconductor nanoparticles were excited using the 835 nm laser diode.

TEM and HRTEM. Images were recorded with a Jeol JEM-1011 and Jeol JEM-2200FS microscope with C_S-correctors (CETCORR, CESCORR) and equipped with a JED-2300 50 mm^2 (Li)Si detector with a UTW window.

DFT Calculations. The geometry optimization and the normal mode calculations were performed with the Gaussian09 program.[21] Geometries and vibrational frequencies were obtained by analytical gradient-based techniques using density functional theory, employing the B3LYP (Beckes three-parameter exchange[22] and LeeYangParr correlation[23]) potentials, combined with the 6-311G** basis set.[24] Harmonic vibrational wavenumbers including IR and Raman intensities were calculated analytically for the fully optimized molecular geometry. Since DFT calculations usually yield to high vibration frequencies, we followed the common approach to scale the calculated values by a constant factor for best fit with well-defined vibration bands.[25−27] In our case, all DFT vibrational frequencies were scaled by a factor of 0.83 to match the set of C−H vibrations in experiment and theory.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Recently, we reported a two-step procedure for the phase transfer of CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell and iron oxide nanoparticles.[14] Briefly, it consists of a ligand exchange with PI−N3 followed by micelle formation with PI-*b*-PEG diblock copolymers in water (Scheme 1). The amino functionalities of PI−N3 act as anchor groups and as an organic passivator for trap states in quantum dots, while the PI part acts as seed for the micelle formation. We have shown that the chemical and photochemical stability can be largely improved by subsequent cross-linking of the PI moiety using azobisisobutyronitrile (AIBN) as a radical initiator.[14] The fluorescence quantum yield (QY) of CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell particles is strongly suppressed immediately after phase transfer to water but recovers surprisingly within a few hours of cross-linking to values up to 40−50%. This behavior can be seen in Figure 1A, where the QY is plotted against the duration of cross-linking at 80 °C.

For this experiment we used 20 nmol of PI-*b*-PEG encapsulated CdSe/CdS/ZnS with 10, 5, and 0 mg of AIBN in a mixture of 18 mL of water and 2 mL of THF corresponding to a ratio of 60, 30, and 0 cross-linker molecules per PI. It is seen that the fluorescence QY rises during the first hours of cross-linking and reaches its maximum after 5−6 h in the case of the AIBN containing samples. For longer treatment,

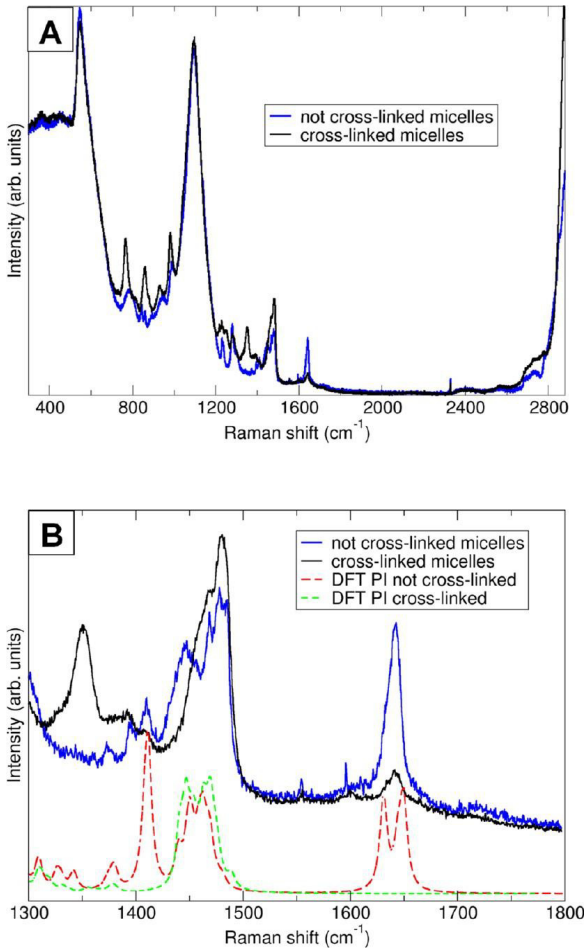


Figure 3. (A) Raman spectra from empty micelles, plain and linked with AIBN. The spectra were normalized to a common background and the intensity of the 1150 cm^{-1} vibration. (B) Selected frequency range of the Raman spectra. Additionally, the calculated spectra for a PI-*b*-PEG molecule and linked PI-*b*-PEG molecules are shown as dashed lines.

QY drops again and reaches a final value around 10% or less. The maximum QY is slightly higher for the 10 mg sample than for the 5 mg one. Larger amounts than 10 mg resulted in micelle destabilization. Heat treatment alone is not responsible for this behavior as can be seen from the blank experiment, in which the sample was heated to 80 °C in the absence of AIBN. However, an increase of QY to values around 10% is also observed is this case. Obviously, two effects influence the fluorescence of the QDs. The first is a consequence of the radical reaction initiated by AIBN and the second arises from the heat treatment itself. The latter effect is most likely to be understood by annealing of the QDs, whereas the first can be assigned to either a better shielding of the QDs by the cross-linked micelle, an improved surface passivation by the radicals themselves and/or by side products formed by the radicals.

Minor changes of the QDs during heat treatment show up in the spectral position of the fluorescence maximum (Figure 1B). For all three samples, a slight blue shift is observed, however, with no significant difference between the AIBN containing samples and the blank. The corresponding absorption spectra

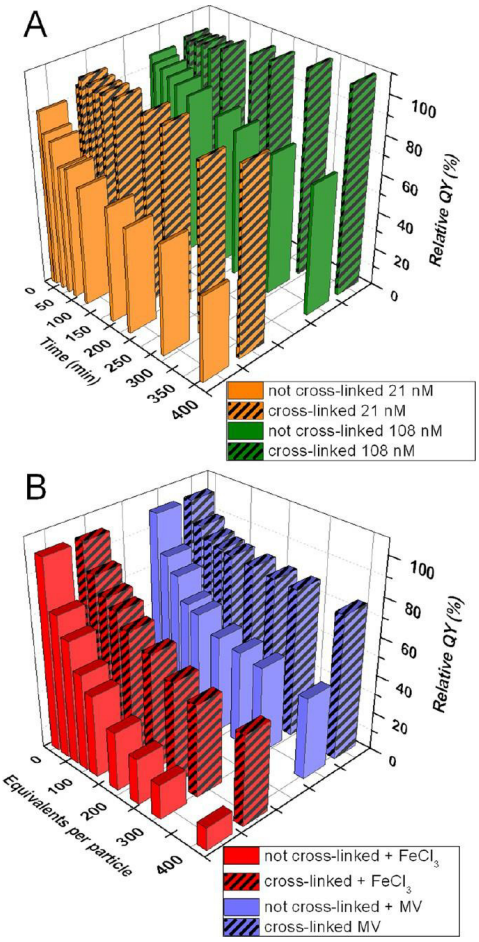


Figure 4. (A) Decrease of fluorescence intensity with time at different particle concentrations in water, cross-linked versus not cross-linked micelles. (B) Fluorescence quenching of cross-linked and non cross-linked micelles with Fe^{3+} and MV^{2+}.

are given in the Supporting Information (Figure S2). It is most likely that the blue shift can be assigned to a rearrangement of the crystal structure. This hypothesis is supported by the measured strain of the CdSe-core via Raman spectroscopy and will be discussed further below.

Analogue observations were made with PI-*b*-PEG encapsulated $CdSe/Cd_xZn_{(1-x)}S$ core/alloy-shell and $CdSe/Cd_xZn_{(1-x)}S/ZnS$ core/alloy-shell/shell nanoparticles. The corresponding spectra and a more detailed description of the experiments can be found in the Supporting Information.

Noteworthy, the AIBN concentrations used for cross-linking are much higher than usually applied for radical polymerizations. Thus, we expect an increased probability of radical recombination under 2,2,3,3-tetramethylsuccinonitrile formation. Because this compound is insoluble in water, it should be incorporated into the hydrophobic micelle core and might influence the fluorescence QY. We checked this in a control experiment, in which the dimer instead of AIBN was added before heating. After 4 h of heating to 80 °C, the sample shows a QY of 11%, that is, the value which was also obtained solely by heating in the absence of AIBN (see Figure S3 in the Supporting Information). Thus, the strong fluorescence enhancement of the AIBN containing samples is likely to be directly associated with radical reactions within the PI part of the micelle and/or the nanocrystal surface. We also investigated other radical initiators than AIBN. No fluorescence enhancement was observed by the treatment with the water-soluble radical initiator 2,2′-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane]-dihydrochloride (VA-044), whereas the hydrophobic radical initiator dimethyl 2,2′-azobis(2-methylpropionate) (V-601) also leads to a slight increase of the QY (see the Supporting Information). Thus, the observed fluorescence activation by radicals is not limited to AIBN but clearly requires radical starters, which are soluble in the hydrophobic micelle core.

In the following section we present NMR and Raman studies on the cross-linking within the PI moiety of the micelles. To avoid influences of the quantum dots on the NMR and Raman signals, we prepared "empty" micelles from PI-*b*-PEG and AIBN in deuterated solvents (THF-d_8 and D_2O) in the absence of nanocrystals. Their size was slightly smaller but comparable to the encapsulated nanocrystal samples. AIBN was encapsulated in the hydrophobic part of the micelles. After measuring the NMR spectrum at 25 °C (before radical formation starts, t = 0), we heated the sample in the NMR spectrometer to 60 °C to initiate radical formation and recorded the spectra over a time period of 150 min. We reduced the cross-linking temperature slightly in this experiment because of the low boiling point of THF. Details of the obtained spectra are depicted in Figure 2. One recognizes a decrease of the olefin peaks around 4.6 and 4.8 ppm due to a loss of double bonds of PI and the occurrence of two new singlets at 1.45 and 1.6 ppm, which can be attributed to isobutyronitrile addition to the PI double bonds. After 150 min, 6% of the double bonds have reacted. Keeping in mind that our normal cross-linking process happens on a longer time scale and at a higher temperature, we believe that most of the double bonds disappear during the time of fluorescence enhancement. In which ratio cross-linking and isobutyronitrile addition occurs cannot be deduced from these spectra, because no reliable integrals could be obtained for the 1.45 and 1.60 ppm peak. However, the possibility of complete isobutyronitrile addition to PI double bonds instead of cross-linking is very unlikely due to steric reasons. On the other hand, long radical chain lengths of the radical cross-linking reaction are also not expected and, therefore, the NMR data are in good agreement with the proposed micelle structure.

This conclusion is supported by Raman investigations, which allow a direct access to the structural changes in the PI environment. Figure 3A displays Raman spectra from empty micelles before and after 5 h of AIBN treatment at 80 °C. The spectra feature a rich set of C−C backbone vibrations and intense C−H vibrations above 3000 cm^{-1}. For an interpretation of the spectra and an assignment of the vibrations, DFT calculations were performed. A chain of seven isoprene units approximated the polymer before cross-linking, whereas the cross-linked polymer chains were approximated by a subunit, in which two diisoprene-molecules have been linked via C−C bonds under loss of the double bonds (see the Supporting Information, Figure S12). The molecules were relaxed and their vibrations were calculated. The most significant changes in the calculated spectra can be found in the frequency range from 1300 cm^{-1} to 1700 cm^{-1}. Figure 3 B displays the Raman spectra of the empty micelles together with the calculated spectra in this regime. The agreement of the calculated and measured spectra is good. The double-bond related vibrations around 1400 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} vanish, and an increase in

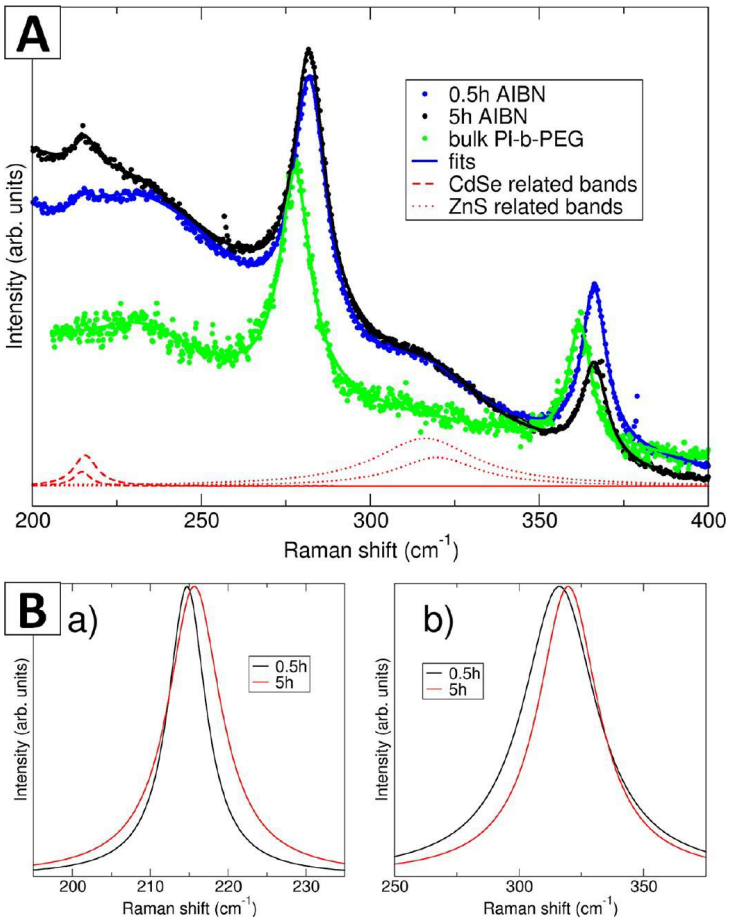


Figure 5. (A) Raman spectra from encapsulated CdSe/CdS/ZnS nanoparticles for different durations of cross-linking and Raman spectrum of bulk PI-*b*-PEG. The fits to the spectra are displayed as solid lines, and the Lorentzian functions used for fitting the semiconductor-related components are shown as dashed lines. (B) Lorentzian functions used for fitting the CdSe (a) and ZnS (b)-related bands in the Raman spectra shown in part A. The bands were normalized to equal intensity.

the intensity of the C−C related vibrations around 1475 cm^{-1} can be observed. Together with the NMR results, this confirms the radical-initialized cross-linking of the double-bonds. The prominent peak around 1350 cm^{-1} in the spectra of the linked micelles can be assigned to a C−N (nitrile) vibration. More measured and calculated spectra can be found in the Supporting Information (see Figures S13 and 14).

As shown in ref 14, cross-linking leads to a drastic decrease in the critical micelle concentration and therefore to an increased stability of the encapsulated QDs against dilution. Here, we have chosen two highly diluted samples and followed the fluorescence intensity over a period of 6 h (Figure 4A). Whereas the fluorescence of the cross-linked samples are completely stable and even improve slightly, the non cross-linked sample loses its luminescence dramatically within a few hours. Another effect of cross-linking is shielding the particle surface from compounds from the surrounding aqueous medium. This is shown by fluorescence quenching experiments with water-soluble Fe^{3+} and methyl viologen cations (MV^{2+}) (Figure 4B). For both quenchers, the cross-linked samples show less quenching than the non cross-linked ones indicating better shielding of the QDs against small molecules from the aqueous phase in the case of the cross-linked shell. In the case of the cross-linked MV^{2+} sample, a small degree of quenching occurs already at very low quencher concentrations, whereas for higher concentrations an almost constant fluorescence intensity of approximately 80% of the initial value is conserved. We interpret this in terms of a small fraction of less perfectly encapsulated particles. The fact that Fe^{3+} ions are more effective quenchers than MV^{2+} is probably due to their smaller size and therefore better penetration properties through the polymer shell. In the case of MV^{2+}, we detect static quenching, and in the case of Fe^{3+}, a mixture of dynamic and static quenching is observed. Detailed information about the quenching mechanism of QDs with these quenchers can be found in refs 20 and 28.

We also applied Raman spectroscopy to encapsulated QDs. These spectra additionally allow the investigation of the impact of the radical initiated cross-linking on the QD lattice (Figure 5A). First, when looking at the double-bond related vibrations discussed above, one still finds strong vibrations in the spectra for the 0.5 h heated system, in perfect agreement with the time-dependent QY measurements, and only a small evidence of double-bond related vibrations in the 5 h heated system. Figure 5A shows the Raman spectra in the frequency range of the CdSe and ZnS LO phonon vibrations. The prominent bands

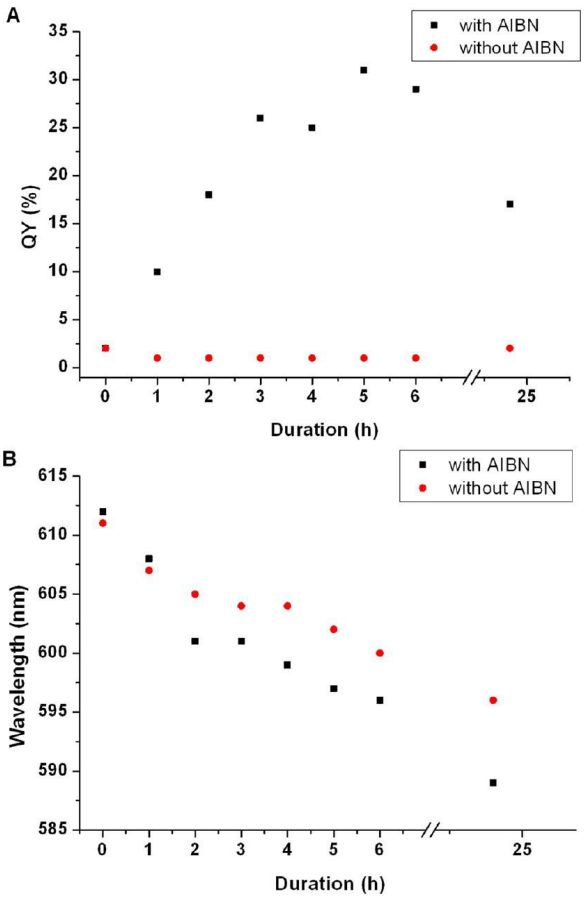


Figure 6. (A) Fluorescence QY of PEI-*b*-PCL-*b*-PEG encapsulated CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell QDs in water at different cross-linking durations with and without AIBN (■, with AIBN; red ●, 5 mg without AIBN) and (B) the corresponding emission maxima plotted against the cross-linking durations.

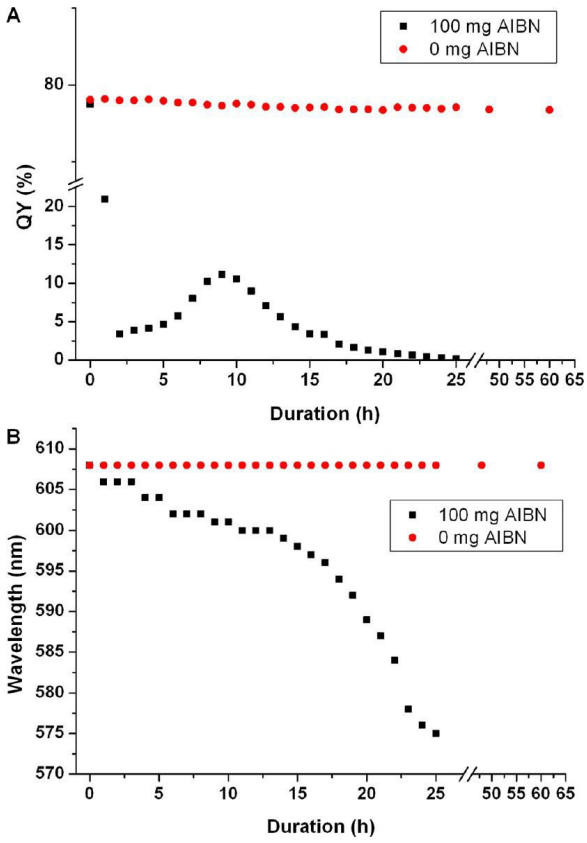


Figure 7. (A) Fluorescence QY of TOP, TOPO, and HDA capped CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell QDs in $CHCl_3$ at different durations with and without AIBN (■, 100 mg AIBN; red ●, 0 mg AIBN) and (B) the corresponding emission maxima.

around 275 cm^{-1} and 360 cm^{-1} can be assigned to PI-related vibrations. The spectra also feature a fluorescent background. The CdSe longitudinal optical phonon (LO) around 215 cm^{-1} and the ZnS LO around 310 cm^{-1} can be well resolved and fitted with Lorentzian functions. Figure 5B displays these fits. Compared to the bulk values (210 and 350 cm^{-1}) the CdSe band is slightly blue-shifted, whereas the ZnS band is significantly red-shifted. The blue shift is usually explained by compressive strain, whereas the red shift indicates tensile stress or, chemically spoken, larger average bond lengths, probably due to imperfect crystallinity. Both, the CdSe and ZnS related bands are shifted to higher wavenumbers for prolonged heating. This can be understood in an increased compressive strain in the CdSe core and an improvement of the formerly disturbed ZnS crystallinity. Shifts in the phonon frequencies can be related to strain by $(\Delta\omega)/\omega = (1 + (\Delta a)/a)^{-\gamma} - 1$, where γ is the Grueneisen parameter.[29] Evaluating this expression with γ = 1.1 for CdSe[29] and γ = 0.95 for ZnS[30] and the estimated shifts from the fits to the spectra results in a compressive strain of $(\Delta a)/a = -0.17\%$ for the CdSe core and $(\Delta a)/a = -0.35\%$ for the ZnS shell. A more extensive discussion about strain and strain distribution in core−shell QDs can be found in ref 31. Beside the blue shift, the spectra exhibit a band broadening for CdSe and a narrowing for ZnS. This is in agreement with the picture that the as grown ZnS shell is polycrystalline or partially amorphous and anneals upon radical treatment. On the other hand, a "better" closed crystalline shell will enhance compressive strain on the core due to lattice mismatch. The question arises what the nature of crystalline improvement is. In comparative experiments of heating with and without AIBN we found that this effect is significantly stronger in the presence of AIBN and can thus not be understood solely as annealing and reconstruction of the ZnS shell upon heating (see the Supporting Information, Figure S15 for spectra). This is a somehow expectable result, since the temperature of shell growth is much higher than that of radical formation for cross-linking. Most probably, the AIBN radicals react with excess sulfide at the ZnS surface. As a consequence, this should not only result in a surface reconstruction but also in making the surface more stoichiometric. This in term should favor the crystallization of the former polycrystalline shell to a more properly closed single crystalline structure. Indeed it is well-known that the surface of ZnS colloids is usually sulfur rich leading to a negative zeta potential and preventing the particles from coagulation and coalescence.[32]

To further prove this concept, we treated poly(ethylene imine)-*b*-poly(ε-caprolactone)-*b*-poly(ethylene glycol) (PEI-*b*-PCL-*b*-PEG) triblock copolymer encapsulated QDs with AIBN radicals. This type of encapsulation leads to comparable

structures with the difference, however, that this polymer does not contain any cross-linkable double bonds. Thus, it allows the observation of the effect of AIBN radical exposure on the QDs independently from the cross-linking reaction. Figure 6 shows the result of this experiment with a very similar behavior of the quantum dot fluorescence as in the case of PI-PEG: a drastic increase of the quantum yield during the first 5 h followed by a decrease for longer times (A) and a blue shift of the maximum (B).

In a final experiment we treated the TOP/TOPO and HDA capped QDs in chloroform with AIBN at RT for 60 h. In the very beginning, the fluorescence QY strongly dropped down, recovered partially within 8 h to vanish completely after about 1 day (see Figure 7). The latter effect is clearly associated with particle dissolution being observed in the absorption and fluorescence spectra (see the Supporting Information for spectra and HRTEM images). In contrast no change in the emission and absorption spectra were observed during 60 h without AIBN. This experiment clearly shows that the effect of AIBN on the fluorescence of quantum dots is not restricted to micellar systems and that AIBN can act in different ways. In the beginning of the experiment, only a very small amount of radicals is formed and the fluorescence drastically decreases. Similar behavior has been found already in the 80s upon OH radical attack on CdS QDs.[33] The authors also found that prolonged OH attack can improve the fluorescence quantum yield during concomitant QD degradation.[33,34] At this time no conclusive explanation could be given for this effect. Our experiments now clearly show that radical reaction with the QDs can foster surface and crystal annealing under removal of defects and open a new synthetic strategy for highly luminescent QDs.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Absorption, emission, NMR, DFT, and Raman spectra, molecule patterns, and additional experimental data. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: weller@chemie.uni-hamburg.de.

Present Addresses

[§]H.L.: Dept. of Physics, Columbia University, 530 West 120th Street, New York, NY 10027, United States.

[∥]N.G.B.: Institut Català de Nanotecnologia (ICN), Campus UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the EU within the FP 7 program (Vibrant, EU 228933), the State Excellence Initiative "Nanotechnology in Medicin", and the DFG Priority Program SPP 1313 (DFG WE-2059/8-2). We would like to thank Dr. Thomas Hackl from the Institute of Organic Chemistry for the helpful discussion and NMR measurements and Dr. Jan Niehaus and Dr. Theo Schotten from the Center of Applied Nanotechnology Hamburg for supplying QD samples and for valuable discussions. We thank Andreas Kornowski for the TEM images. Furthermore, we thank 2layers and specifically Frederik Schmidtke for the graphic design. H.L./We acknowledge(s) DFG within DFG individual Grant LA 2901/1-1/ and the Max Kade Foundation for financial support.

■ REFERENCES

(1) Chan, W. C. W.; Nie, S. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* **1998**, *281*, 2016−2018.

(2) Alivisatos, P. The Use of Nanocrystals in Biological Detection. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 47−52.

(3) Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M. P. Immunofluorescent Labeling of Cancer Marker Her2 and Other Cellular Targets with Semiconductor Quantum Dots. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 4−46.

(4) Zhang, F.; Lees, E.; Amin, F.; Rivera-Gil, P.; Yang, F.; Mulvaney, P.; Parak, W. J. Polymer-Coated Nanoparticles: A Universal Tool for Biolabelling Experiments. *Small* **2011**, *7*, 3113−3127.

(5) Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science* **1998**, *281*, 2013−2016.

(6) Gerion, D.; Pinaud, F.; Williams, S. C.; Parak, W. J.; Zanchet, D.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8861−8871.

(7) Algar, W. R.; Krull, U. J. Luminescence and Stability of Aqueous Thioalkyl Acid Capped CdSe/ZnS Quantum Dots Correlated to Ligand Ionization. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 561−568.

(8) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703−707.

(9) Jin, R. Super Robust Nanoparticles for Biology and Biomedicine. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6750−6753.

(10) Susumu, K.; Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Pons, T.; Delehanty, J. B.; Mattoussi, H. Enhancing the Biological Stability and Functionalities of Quantum Dots *via* Compact Multifunctional Surface Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13987−13996.

(11) Wang, M.; Zhang, M.; Qian, J.; Zhao, F.; Shen, L.; Scholes, G. D.; Winnik, M. A. Enhancing the Photoluminescence of Polymer-Stabilized CdSe/CdS/ZnS Core/Shell/Shell and CdSe/ZnS Core/Shell Quantum Dots in Water through a Chemical-Activation Approach. *Langmuir* **2009**, *25*, 11732−11740.

(12) Tsai, D.-H.; Shelton, M. P.; DelRio, F. W.; Elzey, S.; Guha, S.; Zachariah, M. R.; Hackley, V. H. Quantifying Dithiothreitol Displacement of Functional Ligands from Gold Nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 3015−3023.

(13) Giovanelli, E.; Muro, E.; Sitbon, G.; Hanafi, M.; Pons, T.; Dubertret, B.; Lequeux, N. Highly Enhanced Affinity of Multidentate versus Bidentate Zwitterionic Ligands for Long-Term Quantum Dot Bioimaging. *Langmuir* **2012**, *28*, 15177−15184.

(14) Pöselt, E.; Schmidtke, C.; Fischer, S.; Peldschus, K.; Salamon, J.; Kloust, H.; Tran, H.; Pietsch, A.; Heine, M.; Adam, G.; Schumacher, U.; Wagener, C.; Förster, S.; Weller, H. Tailor-Made Quantum Dot and Iron Oxide Based Contrast Agents for *in Vitro* and *in Vivo* Tumor Imaging. *ACS Nano* **2012**, *6*, 3346−3355.

(15) Xie, R.; Kolb, U.; Li, J.; Basché, T.; Mews, A. Synthesis and Characterization of Highly Luminescent CdSe−Core CdS/$Zn_{0.5}Cd_{0.5}S$/ZnS Multishell Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7480−7488.

(16) Talapin, D. V.; Mekis, I.; Gotzinger, S.; Kornowski, A.; Benson, O.; Weller, H. CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS Core-Shell-Shell Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18826−18831.

(17) Pöselt, E.; Fischer, S.; Förster, S.; Weller, H. Highly Stable Biocompatible Inorganic Nanoparticles by Self-Assembly of Triblock-Copolymer Ligands. *Langmuir* **2009**, *25*, 13906−13913.

(18) Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854−2860.

(19) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 4th ed.; Springer: New York, 2006.
(20) Boldt, K.; Jander, S.; Hoppe, K.; Weller, H. Characterization of the Organic Ligand Shell of Semiconductor Quantum Dots by Fluorescence Quenching Experiments. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8115−8123.
(21) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, revision A.1; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, 2009.
(22) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648−5653.
(23) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785−789.
(24) Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wave Functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650−655.
(25) Chun, H. J.; Weiss, T. L.; Devarenne, T. P.; Laane, J. Vibrational Spectra and DFT Calculations of Squalene. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1032*, 203−206.
(26) Xie, M.; Qi, Y.; Hu, Y. Conformational Equilibrium and Hydrogen Bonding in Liquid 2-Phenylethylamine Explored by Raman Spectroscopy and Theoretical Calculations. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 3060−3067.
(27) Mohandas, P.; Umapathy, S. Density-Functional Studies on the Structure and Vibrational Spectra of Transient Intermediates of *p*-Benzoquinone. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 4449−4459.
(28) Hässelbarth, A.; Eychmüller, A.; Weller, H. Detection of Shallow Electron Traps in Quantum Sized CdS by Fluorescence Quenching Experiments. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *203*, 271−276.
(29) Alivisatos, A. P.; Harris, T. D.; Brus, L. E.; Jayaraman, A. Resonance Raman-Scattering and Optical-Absorption Studies of CdSe Microclusters at High-Pressure. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 5979−5982.
(30) Madelung, O.; Rössler, U.; Schulz, M., Eds. *Zinc sulfide (ZnS) third-order elastic constants, Young's modulus, Poisson's ratio, Grueneisen parameters*. SpringerMaterials-The Landolt-Börnstein Database, DOI: 10.1007/10681719_381.
(31) Tschirner, N.; Lange, H.; Schliwa, A.; Biermann, A.; Thomsen, C.; Lambert, K.; Gomes, R.; Hens, Z. Interfacial Alloying in CdSe/CdS Heteronanocrystals, a Raman Spectroscopy Analysis. *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 311−318.
(32) Wang, M.; Zhang, Q.; Hao, W.; Sun, Z.-X. Surface Stoichiometry of Zinc Sulfide and its Effect on the Adsorption Behaviors of Xanthate. *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 73−82.
(33) Kumar, A.; Janata, E.; Henglein, A. Quenching of CdS Fluorescence by Excess Positive Holes. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 2587−2591.
(34) Weller, H.; Koch, U.; Gutiérrez, M.; Henglein, A. Absorption and Fluorescence of Extremely Small ZnS Particles (The World of the Neglected Dimensions). *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 649−656.

7 Unveröffentlichte Arbeiten, Übersichts- und Konferenzartikel

Die unveröffentlichten Ergebnisse dieser Arbeit können, wie in der Synopsis, in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Der PL-Quenching basierten Untersuchung der Ligandenhülle von PI-*b*-PEO-verkapselten HLNKn sowie der Darstellung von Hybridstrukturen. In den nachfolgenden drei Kapiteln wird zunächst die Verwendung von Farbstoffen und Peptid-Farbstoffkonjugaten als PL-Quencher für HLNK besprochen. Anschließend wird die bioorthogonale Funktionalisierung von LA-PEG-tragenden QP auf die PI-*b*-PEO-verkapselten QP übertragen und abschließend die gezielte Darstellung von Clustern von Metallnanokristallen beschrieben. Auf den Seiten 195 ff. finden sich die Übersichtsartikel und Konferenzproceedings, die während der letzten drei Jahre erschienen sind.

7.1 Verwendung von Farbstoffen als Quencher

Die praktischen Arbeiten zu diesem Kurzbeitrag wurden von Eva Gjuzi und Katharina Kröning im Rahmen eines zweiwöchigen Praktikums durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene HLNK gleicher Emissionswellenlänge als Donoren und die Biotin-funktionalisierten Farbstoffe *Atto-594*- Biotin und *Atto-610*- Biotin der Firma *ATTO-TEC* verwendet. Die verwendeten Proben sind: PI-*b*-PEO 5 verkapselte QP, PI-*b*-PEO 5 verkapselte QDQRs und PI-*b*-PEO 5 verkapselte QDQRs, die mit Neutravidin funktionalisiert wurden. Die QDQR-Konstrukte wurden von Katja Werner zur Verfügung gestellt. Obwohl *Atto-594*- Biotin einen höheren spektralen Überlapp mit den Quantenpunkten aufweist (Abb. 7.1 a)) und somit auch einen hohen Försterradius (R_0(*Atto-594*)= 4.9 nm, R_0(*Atto-610*)= 3.2 nm) besitzt, löscht *Atto-610*- Biotin die Fluoreszenz von verkapselten QP und QDQRs signifikant besser. Dies ist anhand der PL-Löscheffizienz in Abbildung 7.1 c) und d) zu erkennen. *Atto-594*- Biotin erreicht bei höchster Quencherkonzentration eine maximale Löscheffizienz von 60%, wohingegen *Atto-610*- Biotin eine nahezu vollständige PL-Löschung bewirkt. Dies ist entweder mit tieferem Eindringen in die Nanopartikelhülle oder mit einer höheren Bindungseffizienz zur Hülle zu erklären, welches beides mit der höheren Hydrophobizität von *Atto-610*- Biotin korreliert. Dies wird bestätigt, wenn die PL-Löschung der Neutravidin-funktionalisierten HLNK mit den Farbstoffen betrachtet wird (Abb. 7.1 b)). Hier weisen beide Farbstoffe eine ähnliche Löscheffizienz auf, was auf die Spezifität der Bindung an Neutravidin zurückzuführen ist. Vor allem bei niedrigen Quencherkonzentrationen unterscheiden sich funktionalisierte (Abb. 7.1 c))und unfunktionalisierte QDQRs (Abb. 7.1 c)) in Bezug auf ihr Quenchverhalten stark. Bei niedrigen Quencherkonzentrationen ist lediglich bei Neutravidin-funktionalisierten QDQRs eine signifikante PL-Löschung zu detektieren. Dies liegt daran, dass die Biotin-funktionalisierten Farbstoffe an Neutravidin binden und es so zur Fluoreszenzlöschung kommt. Dies bestä-

tigt auch, dass die oben diskutieren Effekte auf unspezifische Bindung der hydrophoben Farbstoffe an die Polymermembran zu erklären sind.

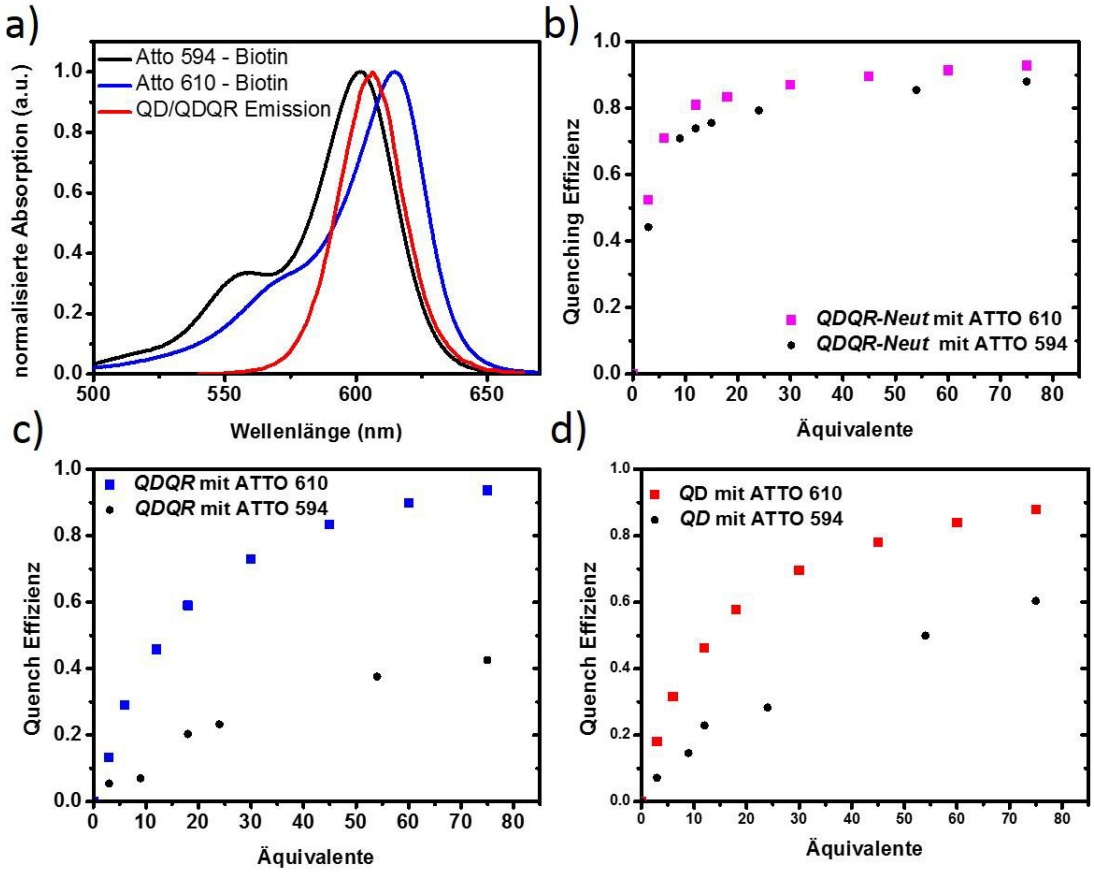


Abbildung 7.1: a) Normalisierte Emissions- bzw. Absorptionsspektren der HLNK (rot) bzw. *Atto-594* (schwarz) und *Atto-610* (blau). b) PL-Löscheffizienz von Neutravidin-funktionalisierten QDQRs, c) PL-Löscheffizienz von PI-*b*-PEO 5 verkapselten QDQRs d) Pl-Löscheffizient von PI-*b*-PEO 5 verkapselten QP

7.2 Verwendung von Peptid-Farbstoff Konjugaten als Quencher

Die hier präsentierten Ergebnisse sind während der Bachelor-Arbeit von Yen way Isabell Trinh entstanden. Dementsprechend wurden nahezu alle praktischen Arbeiten von ihr durchgeführt. Die Peptidauswahl traf Prof. Philip Dawson und die Peptidsynthese wurde von Dr. Valle Palomo durchgeführt (beide Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornien). Die InP/ZnS Synthese wurde unter Anleitung von Sarah Wölper durchgeführt und die Verkapselung zusammen mit Dr. Johannes Ostermann und Sarah Wölper optimiert.

Drei verschiedene α-Helices, die sich in ihrer Hydrophobizität unterscheiden, wurden nach einer Literaturvorschrift von Datta *et al.* dargestellt.[516] Diese Peptide sollten einerseits als Modellpeptide mit unterschiedlicher Hydrophobizität fungieren, um die unspezifische Adsorption der Peptide mit der PI-Hülle von verkapselten Quantenpunkten

zu modellieren. Andrerseits sind ähnliche α-Helices Bestandteile des Apolipoproteins A-I, welches wieder ein Hauptbestandteil von Lipoproteinen hoher Dichte ist. Diese und deren Vorhandensein im Blut werden oft mit koronaren Herzkrankheiten und Arteriosklerose korreliert.[517] Ebenso sind Apolipoproteine ein Hauptbestandteil[518] der Proteincorona von Nanopartikeln und von daher kann ein Studium der Adsorption dieser Peptidfragmente an Nanokristalle Informationen über die Bildung der Proteincorona geben. Die Peptidhelices wurden mit dem Farbstoff Atto-655 funktionalisiert, bei dem es sich, laut Angaben des Herstellers, um einen *sehr hydrophilen*, zwitterionischen Farbstoff handelt (Struktur nicht veröffentlicht). Diese Konstrukte sollten in einem Fluoreszenzlösch-Experiment als Quencher eingesetzt werden, um durch die Fluoreszenzlöschung von verkapselten Quantenpunkten Informationen über die Prozesse bei der unspezifischen Adsorption der Peptidfragmente an die Polymermatrix zu gewinnen. Die Farbstoffunktionalisierung der Peptide gestaltete sich jedoch umständlicher als erwartet, und so konnte nur ein Peptid-*Atto-655* (P+F) Konstrukt erhalten werden. Bei dem Peptid handelte es sich um eine α-Helix mit der Aminosäuresequenz Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-Propargylglycin-G-G-C-NH2.[516] Die Fluoreszenzlöschung von InP/ZnS-Partikeln, welche mit einem PI-*b*-PEO 5 ähnlichen PI-*b*-PEO Polymer verkapselt, jedoch nicht quervernetzt wurden, wurde untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bei einer Zugabe von ca. 40 Äquivalenten des P+F-Konstruktes ca. 80% der PL-Intensität der Quantenpunkte gelöscht wurde, wohingegen *Atto-655* in derselben Konzentration lediglich 40% der PL-Intensität löscht (nicht gezeigt, PL-Intensität bestimmt nach Dekonvolutierung von QP und Farbstofffluoreszenz). Aufgrund von Material- und Zeitmangel basieren die hier präsentierten Daten auf einem Modellversuch und müssen somit wiederholt und weiter untersucht werden. Bei der Betrachtung der absoluten Werte sollte demzufolge eine möglichst große Ungenauigkeit angenommen werden. Trotzdem zeigt der Vergleich zwischen den Systemen, dass das gekoppelte Peptid dazu beiträgt, dass das Peptid-Farbstoffkonstrukt an die Partikel bindet. Die zeitaufgelöste Fluoreszenz der HLNK allein sowie in Anwesenheit der Quencher ist in Abbildung 7.2 bei verschiedenen Quencherkonzentrationen (a und b) dargestellt. Diese Kurven belegen, dass es im Ensemble der verkapselten QP zwei verschiedene Spezies von InP/ZnS Quantenpunkten gibt. Einige interagieren mit dem Quencher, was zu der schneller abfallenden Fluoreszenz bei kurzen Zeiten führt, und einige interagieren nicht mit dem Quencher, was sich an dem zu freien QP unveränderten PL Signals bei langen Zeiten zeigt (nahezu parallele Entwicklung der grauen und blauen Kurven nach t= 60 ns). Dementgegen verhält sich die Fluoreszenz der verkapselten QP, wenn sie mit dem Peptid-Farbstoffkonstrukt versetzt wurden, anders: Die Kurve zeigt einen allgemein schnelleren PL-Abfall, wobei die kurze Komponente nicht so stark verkürzt ist wie bei *Atto-655* allein. Der grundsätzlich schnellere Abfall des Fluoreszenzsignals zeigt an, dass alle QP mit dem Quencher wechselwirken, was auf die Wechselwirkung der Peptide mit der PI-Membran der QP zurückzuführen ist. Die zwei Möglichkeiten, mit denen sich das Peptid-Farbstoffkonstrukt in der Membran einzulagern vermag (vgl. Abb. 7.2 c), und die unzureichenden Datenlage erschweren eine weitere Interpretation und erfordern weitere Studien. Trotzdem belegen die hier gewonnenen Ergebnisse erneut, dass zeitaufgelöste Fluoreszenz ein sehr sensitives Analysewerkzeug für die nanopartikelumgebende Polymermembran darstellt.

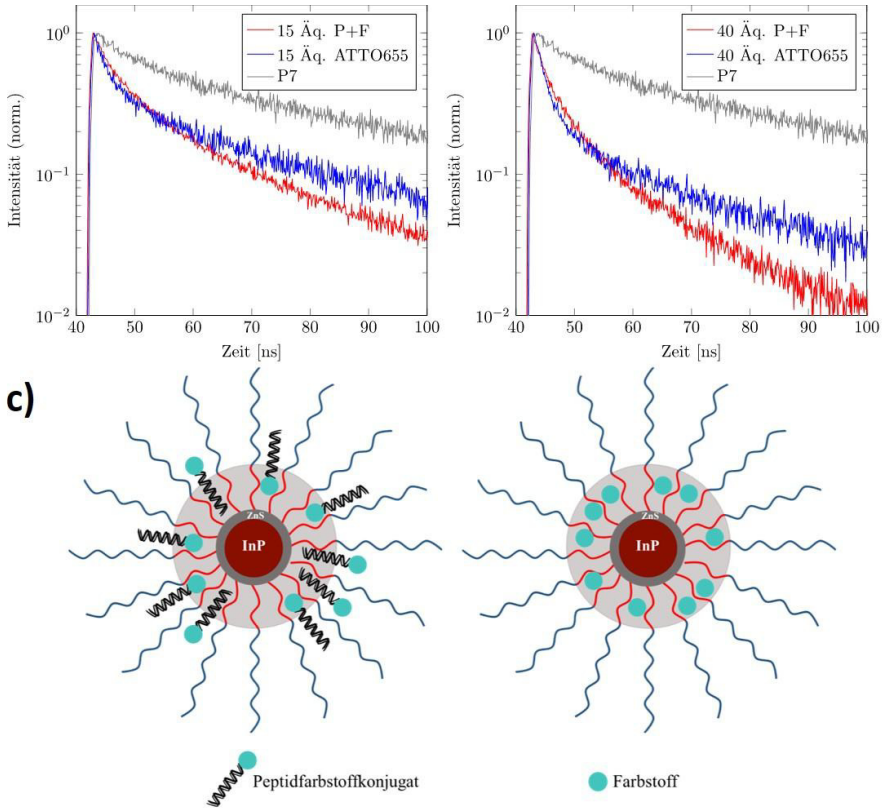


Abbildung 7.2: a,b) Normalisierte zeitaufgelöste Fluoreszenz der InP/ZnS Nanokristalle (P7, grau), der InP/ZnS Nanokristalle in Anwesenheit von *Atto-655* (blau) und der InP/ZnS Nanokristalle in Anwesenheit des Peptid-Farbstoffkonjugates (P+F, rot) bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen: InP/ZnS ca. 100 nM, P+F und *Atto-655* 1.5 µM (a), 4 µM (b). c) Schematische Darstellung der verschiedenen Anordnungsformen des Peptid-Farbstoffkonstruktes (links) und des Farbstoffs (rechts) in der Polymerhülle.

7.3 Bestimmung der Ligandenzahl von PI-*b*-PEO verkapselten QP

Die hier präsentierten Ergebnisse sind während der Bachelor-Arbeit von Marius Schumacher entstanden. Dementsprechend wurden alle praktischen Arbeiten von ihm durchgeführt. Die Bestimmung der Anzahl der Liganden ist angelehnt an die Arbeit, die an der *Florida State Universtiy* durchgeführt wurde.[1,5] Die Funktionalisierung der äußersten Hydroxylgruppen des PI-*b*-PEO wurde durch Aktivierung mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und abschließender nucleophiler Substitution mit 4-Hydroxybenzaldehyd erreicht. Leider gelang die Aktivierung mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in unzureichenden Ausbeuten, wodurch das ProduktPI-*b*-PEO-*p*-Oxybenzaldehyd ebenfalls nur in geringen Ausbeuten erhältlich war (max. 20%). Da als Nebenprodukt lediglich das unfunktionalisierte PI-*b*-PEO anfällt, wurden diese Strukturen trotzdem benutzt, um die Anzahl der Liganden zu bestimmen, indem verschiedene Abmischungen der teilweise derivatisierten Liganden für den Phasentransfer eingesetzt wurden. Nach anschließender Reinigung durch Succrosegradientenzentrifugation wurde eine Anilin-katalysierte Umsetzung des *p*-Oxybenzaldehyd

mit 2-Hydrazinopyridin durchgeführt. Dies ist in Abbildung 7.3 dargestellt, wobei auf die Darstellung der Partikel verzichtet wurde. Die Ausbildung des Hydrazonchromophors ist im Absorptionsspektrum klar zu erkennen, und dessen Intensität kann, in Relation zu der Anzahl der QP im Ensemble, benutzt werden, um die durchschnittliche Zahl der PI-*b*-PEO-Moleküle pro Mizelle zu bestimmen. Dies lieferte für PI-*b*-PEO 1 48±3, für PI-*b*-PEO 5 44±3 und für PI-*b*-$(PEO)_2$ Y 14±3. Diese Werte sind, gemessen an den Erfahrungswerten, die mittels thermogravimetrischer Untersuchung gewonnen wurden, zu klein. Die Gesamtzahl der Liganden dieser PI-*b*-PEO-QP ist demnach ca. 300.[1] Die starke Diskrepanz zwischen erwarteten und gemessenen Werten ist höchstwahrscheinlich auf die geringen Kopplungsausbeuten im ersten Funktionalisierungsschritt zurückzuführen. Jedoch könnte es auch sein, dass Liganden, die nicht aus der Mizelloberfläche herausragen, eine verringerte Reaktivität aufweisen, wie kürzlich an ähnlichen Konstrukten gezeigt werden konnte.[359,360] Trotz der relativ großen Unsicherheit wird die Anzahl der Liganden pro QP, wenn QP mit PI-*b*-$(PEO)_2$ Y verkapselt wurden, als signifikant geringer bestimmt, was ein Indiz für die Annahme ist, dass diese Konstrukte weniger PI-*b*-$(PEO)_2$ Y Moleküle pro Mizelle aufweisen. Dies macht die Mizellen durchlässiger und sorgt für den relativ hohen Anteil an nicht perfekt abgeschirmten Partikeln, die mithilfe des PL-Löschassays identifiziert wurden.

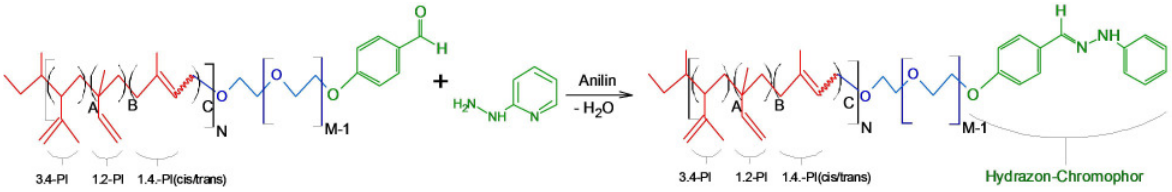


Abbildung 7.3: Chemische Funktionalisierung der PI-*b*-PEO-Ligandenhülle von QP (QP sind nicht gezeigt) unter Darstellung des Hydrazon-Chromophors, über dessen Absorption die Anzahl der Liganden pro QP bestimmt werden kann.

7.4 Darstellung Fluoreszenz-Plasmonischer Hybridstrukturen

Die in diesem Kapitel dargestellten Beiträge liegen als Manuskript zur Veröffentlichung in *Nano Letters* bzw. *The Journal of Physical Chemistry C* vor.

Exciton-Plasmon Interactions in Hybrid Nanoparticle Systems, Christian Strelow, Sverre Theuerholz, Christian Schmidtke, Marten Richter, **Jan-Philip Merkl**, Hauke Kloust, Ziliang Ye, Horst Weller, Tony Heinz, Andreas Knorr, und Holger Lange. Zur Veröffentlichung in *Nano Letters* vorgesehen.[519]

Functional Group Dependent Formation and Biofunctionalization of Fluorescent-Plasmonic Nanohybrids, **Jan-Philip Merkl**, Christian Schmidtke, Fadi Aldeek, Malak Safi, Artur Feld, Hauke Kloust, Hedi Mattoussi, Holger Lange und Horst Weller. Zur Veröffentlichung in *The Journal of Physical Chemistry C* vorgesehen.[520]

[1] Aussage Dr. Christian Schmidtke und Prof. Dr. Horst Weller, Grundlage sind unveröffentlichte Untersuchungen

Ein gekoppeltes System aus QP und AuNK mit verlässlicher Abstandskontrolle ein ideales Werkzeug, um die Interaktion von Exzitonen und Plasmonen zu studieren. Um ein breiteres Spektrum von Abständen gewährleisten zu können, wurde um die QP-LA eine PS Schale synthetisiert, deren Dicke über Reaktionszeit und Monomerzugabe kontrolliert wurde.[519] So war es möglich, QP-LA mit 5, 10 bzw 15 nm Abstandshalter darzustellen (QP-LA-X, X= Dicke des Abstandshalters), die für das Studium der zeitaufgelösten Fluoreszenz eingesetzt wurden. Diese Konstrukte wurden mit citratstabilisierten AuNK verschiedener Größe (d= 12, 20 und 40 nm) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, welches jedoch teilweise angepasst werden musste, da die Lösungen zeitabhängig Kopplung der Plasmonen anzeigten. Dies spricht für einen Aggregationsprozess, der auch mit Lichstreuuntersuchungen bestätigt wurde. Jedoch wurde dabei ebenfalls gefunden, dass die zeitaufgelöste Fluoreszenz des Ensembles sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes (1-3 Tage) nicht vom Aggregationszustand der AuNK bzw. dem hydrodynamischen Radius des Gesamtkonstruktes abhängt. Dies spricht dafür, dass die QP entweder nicht so platziert sind, dass sie mit den gekoppelten Plasmonenmoden wechselwirken können, oder dafür, dass die QP, die mit diesen Plasmonenmoden wechselwirken, eine so geringe PLQY aufweisen, dass sie nicht zum PL-Signal des Ensembles beitragen. Trotzdem wurde in Verhältnissen gearbeitet, in denen eine Plasmonenkopplung vermieden wurde, um das Experiment besser dem theoretischen Modell anzupassen.

Auf Grundlage dieses Systems haben die Arbeitsgruppen um Andreas Knorr (Berlin), Tony Heinz (Stanford) und Holger Lange (Hamburg) ein quantenmechanisches Modell entwickelt, das ohne Näherungen auskommt und somit besonders robust und zuverlässig funktioniert. Es liefert optimale Übereinstimmung der zeitaufgelösten Fluoreszenz mit der theoretischen Betrachtung. Weiterhin konnte so eine exakte Übereinstimmung von experimentellen Befunden und näherungslosem, theoretischen Modell in einem Bericht beschrieben werden, was ein großer Schritt zum Verständnis von Exziton-Plasmon-Wechselwirkungen ist. Diese Ergebnisse können somit als ein signifikanter Beitrag zur Beschreibung von gekoppelten Exzitonen und Plasmonen bezeichnet werden.

Citratstabilisierte AuNK weisen in zellularen Medien keine hinreichende Stabilisierung auf, was ihren Einsatz in biologischen Umgebungen limitiert und zu aggregationsinduziertem Verhalten führen kann.[465,484,487,521] Dies wurde bestätigt, indem QP-LA mit citratstabilisierten AuNK gemischt und anschließend in zellulares Minimalmedium gegeben wurden. Die Konstrukte zeigten binnen weniger als einer Minute Aggregation und irreversible Präzipitation. Somit sind diese Strukturen für das Verständnis der Wechselwirkung zwischen Exziton und Plasmon optimal, jedoch ist ihr Einsatz in biologischen Medien limitiert. Deswegen wird im nachfolgenden Kapitel ein System entwickelt, das eine höhere Stabilität besitzt und in biologischen Experimenten eingesetzt werden kann.

7.4.0.1 Verwendung von zwitterionisch-stabilisierten AuNKn zur Darstellung biologisch aktiver Hybride

Um stabilere Hybridsysteme darzustellen, wurden die QP-LA mit AuNK, die Liponsäure-Zwitterion Liganden (LA-ZW) tragen, versetzt. Diese LA-ZW AuNK wurden aus Tetrachlorgoldsäure und Natriumborhydrid in Anwesenheit von LA-ZW synthetisiert. Hierbei

kann die Größe der AuNK über das Verhältnis von LA-ZW zu Tetrachlorgoldsäure eingestellt werden.[228,522] Diese Methode erlaubt es AuNK darzustellen, deren Oberfläche nur teilweise mit ZW-LA Liganden belegt — und somit frei für direkte Oberflächenkoordination — ist. Ein zusätzlicher Passivierungsschritt mit LA-ZW ermöglicht die vollständige Bedeckung der Oberfläche mit zwitterionischen Liganden (vgl. obere Reihe in Abb. 7.4).

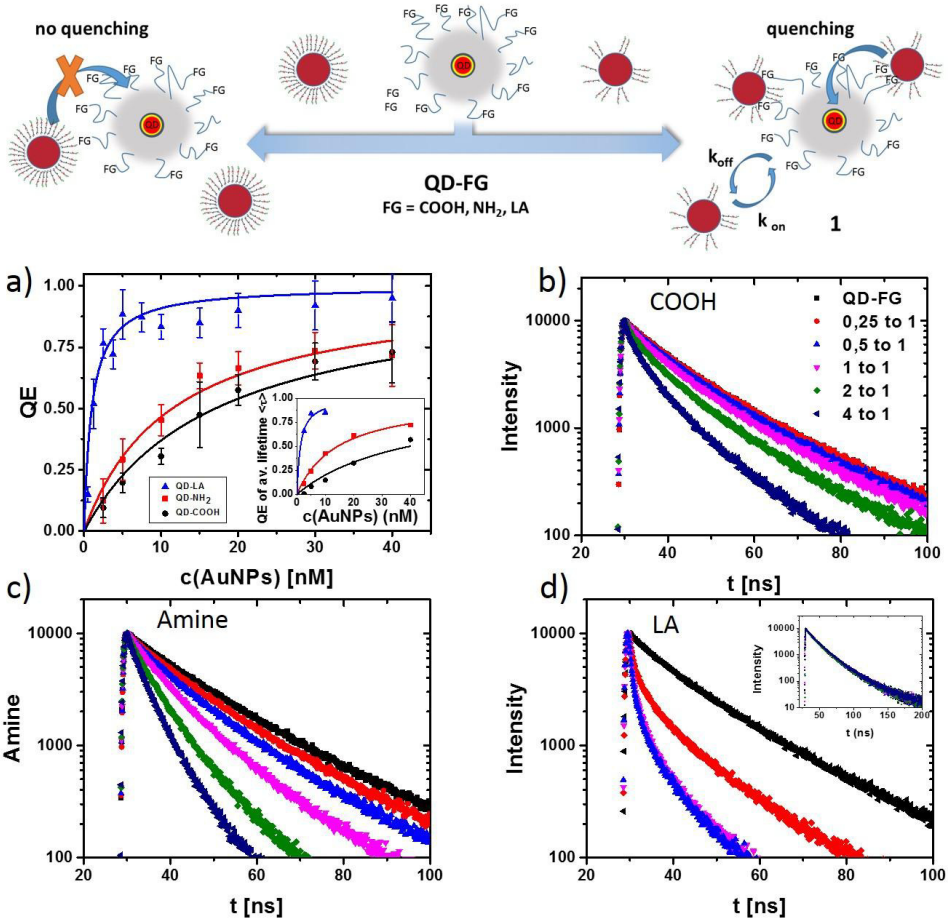


Abbildung 7.4: Obere Reihe: Schematische Darstellung der Selbstassemblierung von QP-FG mit partiell bedeckten LA-ZW AuNKn. Die Verwendung von vollständig bedeckten LA-ZW AuNK liefert keine Wechselwirkung. a) Quencheffizienz einer 10 nM QP-FG Lösung mit partiell bedeckten AuNKn, nach Korrektur des *inner filter effekt*. Das kleine Fenster zeigt die Quencheffizienz der mittleren PL-Abklingzeit. b)-d) Zeitaufgelöste PL-Signale der verschiedenen QP-FG mit AuNKn: b) QP-COOH, c) QP-NH2 und d) QP-LA. Zur Veröffentlichung in *The Journal of Physical Chemistry C* vorgesehen.

Werden die QP-LA mit partiell bedeckten AuNK gemischt, wird bei einem Verhältnis von AuNK:QP-LA von 1:1 eine Abnahme der PL um 85% detektiert, was eine effiziente Bindung von QP-LA an die Goldoberfläche anzeigt (vgl. Abb 7.4 a). Des Weiteren wurde die Interaktion von QP-NH2 und QP-COOH mit AuNK untersucht, welche weniger effiziente PL-Löschung anzeigen. Das bedeutet, dass die Konstrukte entweder weniger

stark an die AuNK binden und so mehr freie QP in Lösung vorhanden sind, oder dass die Bindung von QP-NH2 und QP-COOH an AuNK zu einer Bindung mit weniger effizienter Exzitonen-Plasmonenkopplung führt. In beiden Fällen kann dies mit der Affinität der funktionellen Gruppe zu Gold korreliert und unter Anwendung des Konzeptes von Ralph Pearsons mit harten und weichen Säuren bzw. Basen verstanden werden.[523] Der Unterschied in der Quencheffizienz spiegelt sich ebenfalls in den zeitaufgelösten Fluoreszenzsignalen wieder, wie Abb. 7.4 b)- d) zu entnehmen ist. Hier zeigt QP-LA die stärkste Kopplung zu den AuNKn, was sich in der stark verringerten PL-Abklingzeit zeigt. Werden vollständig mit LA-ZW bedeckte AuNK verwendet, so kommt es nicht zur Fluoreszenzlöschung der QP, was anzeigt, dass die FG der QP direkt an die Goldoberfläche binden.

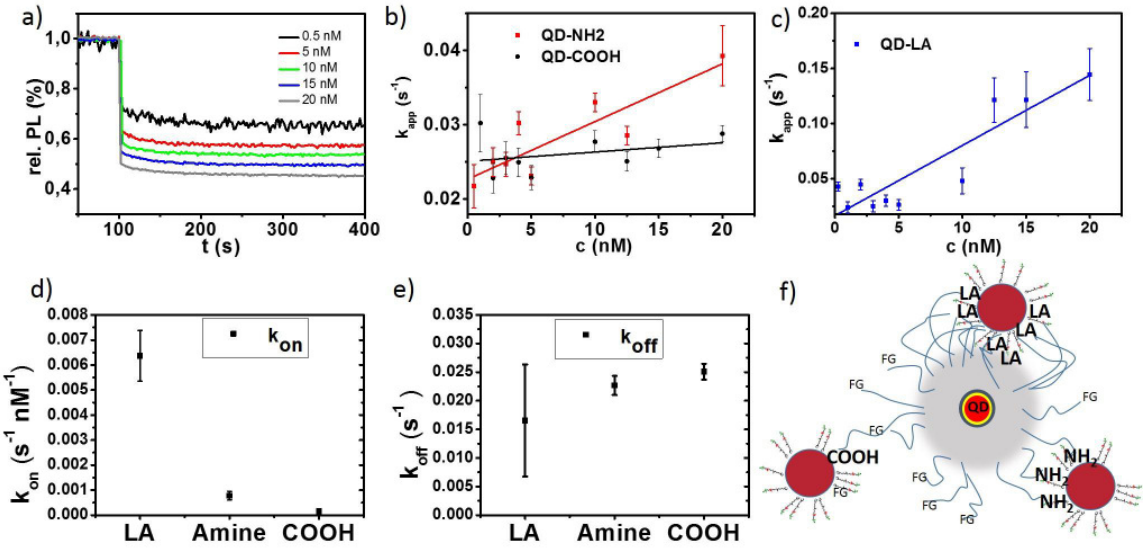


Abbildung 7.5: a) Repräsentatives, zeitabhängiges PL-Signal nach Mischen von QP-FG und AuNK bei verschiedenen Nanokristallkonzentrationen bei konstantem Verhältnis (1:1) b) Kinetische Konstanten extrahiert aus der Zeitabhängigkeit der PL-Löschung für QP-NH2 (rot) und QP-COOH (schwarz) bei verschiedenen Nanokristallkonzentrationen c) Kinetische Konstanten extrahiert aus der Zeitabhängigkeit der PL-Löschung für QP-LA (blau), d) FG-abhängige Anlagerungsrate k_{on} e) FG-Abhängige Desorptionsrate k_{off} f) Schematische Darstellung der verschiedenen, FG-abhängigen Strukturen von QP-FG und AuNK. Zur Veröffentlichung in *The Journal of Physical Chemistry C* vorgesehen.

Um den Selbstassemblierungsprozess weiter zu verstehen, wurden kinetische Untersuchungen in Anlehnung an Protokolle aus der Literatur[228,524] durchgeführt. Hier wurde gefunden, dass die Interaktion aller QP-FG und AuNK sehr schnell passiert: Zur kinetischen Untersuchung wurden die Proben manuell gemischt, was zu einer Blindzeit des Experimentes von 1-3 Sekunden führt, in der ein großer Anteil der Interaktion bereits geschehen ist, wie in Abb. 7.5 a) zu erkennen ist. Diese schnelle Interaktion ist vermutlich auf die hohe Anzahl an FG auf der Mizelloberfläche zurückzuführen. Im Vergleich zu den hier beschriebenen Effekten ist die Selbstassemblierung von LA-ZW AuNK mit

Proteinen wesentlich langsamer, was vermutlich auf die Anzahl und die Lokalisierung der funktionellen Gruppen auf den Proteinen zu erklären ist.[228]

Die kinetischen Untersuchungen wurden bei unterschiedlichen Nanokristallkonzentrationen und einem konstanten Nanokristallverhältnis von AuNK:QP-FG von 1:1 durchgeführt. Die bei verschiedenen Gesamtkonzentrationen an Nanokristallen bestimmten kinetischen Daten sind in Abb. 7.5 b) und c) für die verschiedenen Endgruppen gezeigt. Aus der Steigung dieser Auftragungen kann die Anlagerungsrate k_{on} und aus dem y-Achsenabschnitt die Dissoziationsrate k_{off} bestimmt werden, was in Abb. 7.5 d) bzw. e) dargestellt ist. Vor allem die Anlagerungsrate k_{on} ist von der funktionellen Gruppe auf der Mizelloberfläche abhängig. Auf Grundlage dieser Bestimmung ist die Desorptionsrate der verschiedenen Nanohybride aufgrund des großen Fehlers nicht zu unterscheiden und wird als ähnlich angenommen (Abb. 7.5 e). Diese Bestimmung stellt das simple Modell aus gebundenen und freien QP-FG in Frage, was auch durch ein genaues Betrachten der zeitaufgelösten Fluoreszenz bestätigt wird: Das Gleichgewicht zwischen gebundenen und freien QP-FG hätte einen biexponentiellen Zerfall der PL-Abklingkurve zur Folge, welcher jedoch nicht detektiert wird (vgl. Abb. 7.4 b)-d)). Unter Betrachtung der langreichenden Kopplungen zwischen AuNK und QP[226,401,410] und dem hier beobachteten PL-Abklingverhalten ist es wahrscheinlich, dass das unterschiedliche Verhalten der Hybride mit einer im Durchschnitt unterschiedlichen Anzahl an AuNK gebundener funktioneller Gruppen erklärt werden kann (vgl. Abb. 7.5 f). Dies führt zu einem unterschiedlichen, mittleren Abstand. Dass solche Konstrukte möglich sind, zeigt die Arbeitsgruppe um Oleg Gang, die die Überbrückung von Nanokristallen mit ein bzw. mehreren DNA-Strängen zeigt und einen unterschiedlichen Abstand zwischen den Partikeln misst.[341]

Da freie Goldoberflächen als Bindestelle für die funktionellen Gruppen der QP-FG dienen und solche freien Stellen Polyhistidin-tragende Proteine binden können, wurde getestet, ob solche freien Oberflächen auch noch nach Bildung des QP-FG/AuNK Hybrids zugänglich sind. Hierfür wurde als Modellprotein Polyhistidin-maltosebindendendes-Protein (HIS-MBP) und ein visueller amylosebindungs-Assay verwendet. Das QP-FG/ AuNK Hybrid wurde mit HIS-MBP in einer Pufferlösung gemischt und 30 min inkubiert, bevor es auf die Amylose-Säule geladen wurde. Bei Amylose handelt es sich um eine Kohlenhydratstruktur, an die das MBP bindet. Lediglich das Waschen mit Maltoselösung kann das Protein freisetzen. Dies beruht auf der höheren Bindungsaffinität von Maltose mit dem MBP, die die Amylose aus der Bindungstasche verdrängt. Es ist weiterhin bekannt, dass Nanokristalle, die HIS-MBP auf ihrer Oberfläche tragen, bei diesem Assay an die Amylose binden und nur mit Maltose — und nicht mit Puffer — freigesetzt werden können.[228,256,524] Demzufolge dient dieser Assay dazu die Stabilität der Bindung zwischen Nanokristall und HIS-MBP zu testen. In dem hier präsentierten Fall dient dieser Assay weiterhin als Stabilitätstest der QP-FG-AuNK Bindung.

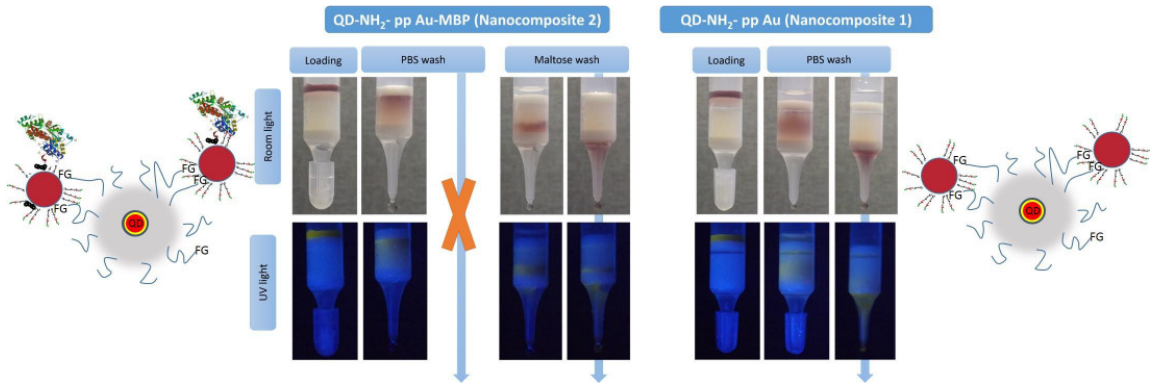


Abbildung 7.6: Fotos des visuell basierten Amyloseaffinitätsassays unter Raumlicht (oben) und unter UV Anregung (unten). Auf der linken Seite sind Fotos gezeigt, die das MBP-funktionalisierte QP/AuNK auf der Amylosesäule zeigen. Das Konstrukt bindet an die Säule und kann lediglich mit einer Maltoselösung freigesetzt werden. Auf der rechten Seite ist das nicht-funktionalisierte Konstrukt gezeigt, das nicht an die Säule bindet und direkt beim Waschen mit Puffer freigesetzt wird (pp steht für partially passivated, und besagt, dass AuNK mit nicht voll besetzter Oberfläche benutzt wurden). Zur Veröffentlichung in *The Journal of Physical Chemistry C* vorgesehen.

Fotos dieses visuellen Affinitätsassays sind in Abb. 7.6 dargestellt. Auf der linken Seite ist die Auftragung des funktionalisierten QP-FG/AuNK Hybrids gezeigt, welches beim Waschen mit Puffer (PBS) an die Amylose bindet. Dies ist sowohl unter Raumlicht — anhand der Farbe der plasmonischen AuNK — als auch unter UV Beleuchtung — anhand des Fluoreszenzsignals der QP — zu erkennen. Hier wird der Vorteil eines bifunktionalen Nanohybrids direkt ersichtlich. Beim Waschen mit Puffer wird in diesem weder für QP typisches PL-Signal noch plasmonische Resonanz beobachtet. Dies belegt, dass die QP an die AuNP binden und dieses Konstrukt über HIS-MBP fest an die Amylose bindet. Wird die Säule mit einer Maltoselösung gewaschen, so bewegen sich QP und AuNK gemeinsam, was belegt, dass sie ein verbundenes Konstrukt bilden. Auf der rechten Seite ist der gleiche Assay, jedoch mit unfunktionalisierten QP-FG/AuNK Hybriden gezeigt. Diese binden nicht an die Säule und passieren sie mit der ersten Zugabe von Pufferlösung. Dies belegt, dass die Hybride keine unspezifische Interaktion mit der Säule aufweisen und die Wechselwirkung mit der Amylose dem HIS-MBP zuzuordnen ist. Weitere Kontrollversuche, wie z.B. QP-FG+HIS-MBP und QP-FG mit AuNKn, deren Oberfläche mit HIS-MBP gesättigt wurde, bevor sie mit QP-FG zusammen gegeben wurden, zeigen an, dass HIS-MBP lediglich an die AuNP bindet und dass die Interaktion von QP-FG mit der Oberfläche von AuNK essentiell für die Bildung des funktionalen Hybrids ist.

Diese Stabilität zeigt eindeutig, dass QP-FG an die AuNK Oberfläche binden und mit HIS-MBP ein stabiles, biologisch aktives Konstrukt bilden.[228,256,524] In einer noch nicht veröffentlichten Arbeit wurden diese Hybride mit einem Fusionspeptid funktionalisiert. Die so dargestellten Hybride zeigen unter anderem eine sehr hohe Stabilität in zellularem Medium und eine rasche und effiziente zellulare Aufnahme (vgl. Kap. 7.5, S. 190 ff.). Diese Ergebnisse bestätigen, dass sich die auf Basis von LA-ZW AuNK und mizellar

verkapselten QP-FG dargestellten Hybride für die Anwendung in biologischen Assays eignen und mithilfe biologisch aktiver Substanzen weiter funktionalisieren lassen.

7.5 Fluoreszent-Plasmonische Hybride mit effektiver zellularer Aufnahme

In diesem Kapitel ist die Verwendung eines Fusionspeptids beschrieben, das benutzt wurde um die im vorherigen Kapitel vorgestellten fluoreszenz-plasmonischen Hybride zu funktionalisieren. Das Fusionspeptid wurde von Dr. Tatiana Domitrovic und Prof. Dr. Jack Johnsonn (beide Scripps Research Institute, La Jolla, Calofirnia) zur Verfügung gestellt und die zellularen Aufnahmestudien hat Dr. Malak Safi (*Florida State University*) durchgeführt. Das Fusionspeptid besteht aus einer γ-Peptid Sequenz, das vom Nudaurelia Capensis Omega Virus stammt,[525,526] und HIS-MBP. Dieses Peptidfragment ist in der Lage artifizielle Liposomen zu destabilisieren und ihm wird daher eine entscheidende Rolle in der zellularen Aufnahme des nicht-membranumhüllten Nudaurelia Capensis Omega Virus zugeschrieben.[525,526] Das Fusionspeptid wird im Folgenden als HIS-MBP-γ bezeichnet.

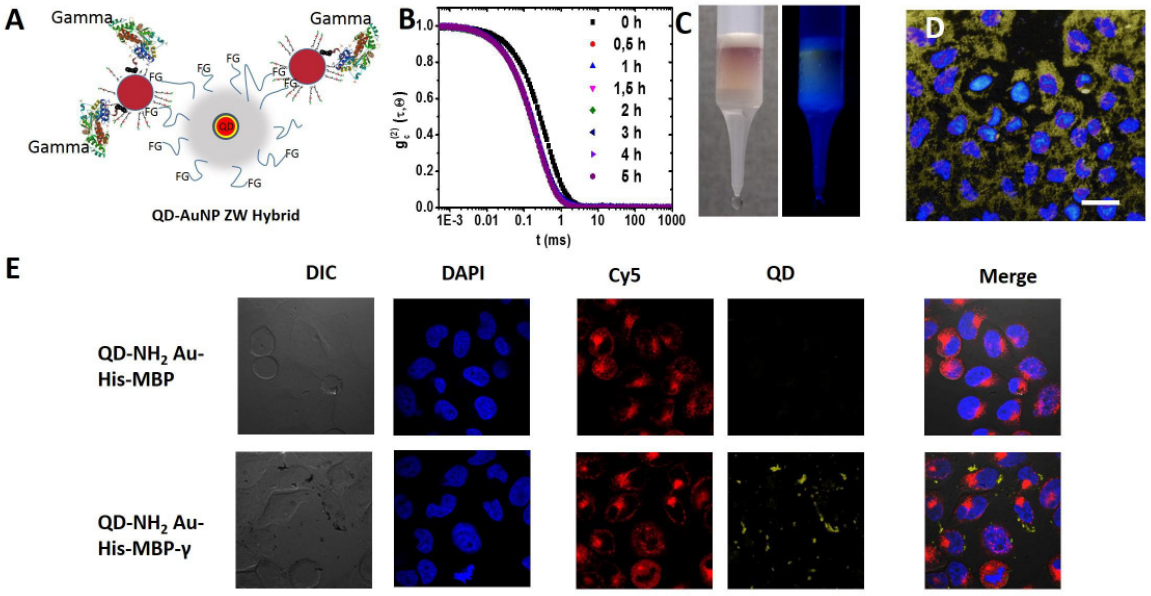


Abbildung 7.7: A)Schematische Darstellung des Nanohybrids, B) Autokorrelationsfunktion der dynamischen Lichtstreuung der Nanohybride über einen Zeitraum von fünf Stunden in zellularen Minimalmedium DMEM, C) visueller Amylosebindungsassay (Auswaschen der Probe mit 20 mM Maltoselösung ist nicht gezeigt) D) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von HeLa Zellen nach 1 h Inkubation mit 100 nM QP-FG/AuNK/HIS-MBP-γ einer Zusammensetzung von 1/2/14. In Gelb QP-Fluoreszenz und in Blau Fluoreszenz von DAPI, E: Konfokalmikroskopische Untersuchung von HeLa Zellen nach 30 min Inkubation mit 50 nM QP-FG/AuNK/HIS-MBP-γ/HIS-MBP einer Zusammensetzung von 1/2/7/7 (unten) und des Kontrollexperiments, welches mit Hybriden durchgeführt wurde, die lediglich unfunktionalisierten HIS-MBP trugen.

Das HIS-MBP-γ wurde analog zu den HIS-MBP zur Darstellung von Fluoreszenz-Plasmonischen Hybriden (Kap. 7.4.0.1) verwendet. Eine schematische Darstellung der Hybridstruktur ist in Abb. 7.7 A abgebildet. Das verwendete Hybridsystem ist aufgrund seiner bimodalen Eigenschaften ein ideales Werkzeug um die Eigenschaften des HIS-MBP-γ-Peptids zu studieren.[527,528] Hierbei wurde zunächst gewährleistet, dass das Fusionsprotein sich ähnlich dem HIS-MBP verhält: Die kolloidale Stabilität in zellularem Medium ist gegeben, wie an der unveränderten Autokorrelation nach fünfstündiger Inkubation in zellularem Medium zu erkennen ist (vgl. Abb. 7.7 B). Hierbei verändert sich die Autokorrelationsfunktion direkt nach dem Injizieren (t= 0 h) nur leicht zu kürzeren Korrelationszeiten, was ein Schrumpfen der Partikel anzeigt. Anschließend ist die Autokorrelationsfunktion unverändert. Weiterhin ist das Amylosebindungsverhalten identisch, was anhand des Amylosebindungsassays erkannt werden kann (vgl. Abb. 7.7 C). Diese Hybride verhalten sich somit so, wie die Strukturen, die in Kapitel 7.4.0.1 vorgestellt wurden und es ist von daher davon auszugehen, dass sich deren Struktur ähnelt. Die so funktionalisierten Hybride wurden zu HeLa Zellen gegeben, um ihre zellulare Aufnahme zu studieren. Dazu wurde eine Hybridkonzentration von 100 nM verwendet und die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Das Hybrid besaß hier eine Zusammensetzung von QD-FG/AuNK/HIS-MBP-γ von 1/2/14, die durch die Konzentration der Eingangsmaterialien eingestellt wurde. Eine mikroskopische Untersuchung der HeLa Zellen nach dieser einstündigen Inkubation ist in Abb. 7.7 D gezeigt. Hier ist die Quantenpunktfluoreszenz (575 nm) in Gelb und die 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Fluoreszenz in Blau dargestellt. Eine Kontrolle unter Verwendung des unfunktionalisierten HIS-MBP zeigte unter identischen Bedingungen kein Fluoreszenzsignal (nicht gezeigt). Die zellulare Aufnahme dieser Konstrukte erfolgt sehr effizient, was anhand der hohen Signalintensität der Quantenpunkte zu erkennen ist. Weiterhin verteilt sich die Fluoreszenz auf die gesamte Zelle und in den Zellzwischenräumen wurde keine Fluoreszenz detektiert. Dies belegt einerseits die kolloidale Stabilität der hergestellten Hybride und ist andrerseits ein Indiz dafür, dass die Aufnahme nicht über Endozytose erfolgt, da hier ein anderes Verteilungsmuster der Quantenpunkte beobachtet wird.[263,464,529] Flusszytometrische Untersuchungen zeigten an, dass bei dieser Inkubation mehr als 75% der Zellen mit Quantenpunkten markiert wurden. Die Verteilung der Quantenpunkte wurde mithilfe von konfokalmikroskopischen Untersuchungen analysiert. Aufgrund der äußerst effektiven zellularen Aufnahme wurde hierbei die Hälfte des funktionalen HIS-MBP-γ mit HIS-MBP ersetzt und die Inkubationszeit auf 30 min verkürzt. Flusszytometrische Untersuchungen zeigten eine verringerte Zellmarkierung von ca. 20% der Zellen an. Konfokalmikroskopische Aufnahmen sind in Abbildung 7.7 E gezeigt. Dort ist in der oberen Reihe die Kontrolle der Hybride, die das unfunktionalisierte HIS-MBP tragen, gezeigt. In der unteren Reihe sind Bilder der HeLa Zellen gezeigt, die mit HIS-MBP-γ-tragenden Hybriden inkubiert wurden. Die verschiedenen Bilder zeigen unterschiedliche Fluoreszenzkanäle an, die unter Verwendung spezieller Filter der Firma *Nikon* aufgenommen wurden: DIC-Differentialinterferenzkontrast, DAPI, Cy5-Transferrin als Endosomenmarker und QD (575 nm) sowie deren Überlagerung (Merge). Einzig der QD Filter wurde speziell angefertigt und wies eine ultraviolette Anregung und einen sehr schmalen Detektionskanal von 575$\pm$10 nm auf. Diese Bilder belegen, dass das HIS-MBP-γ für die zellulare Aufnahme verantwortlich ist. Weiterhin zeigt sie

an, dass der Endosomenmarker Cy5-Transferrin nicht mit der Quantenpunktfluoreszenz co-lokalisiert, was ein weiteres Indiz für einen nicht-endosomalen Aufnahmemechanismus ist.

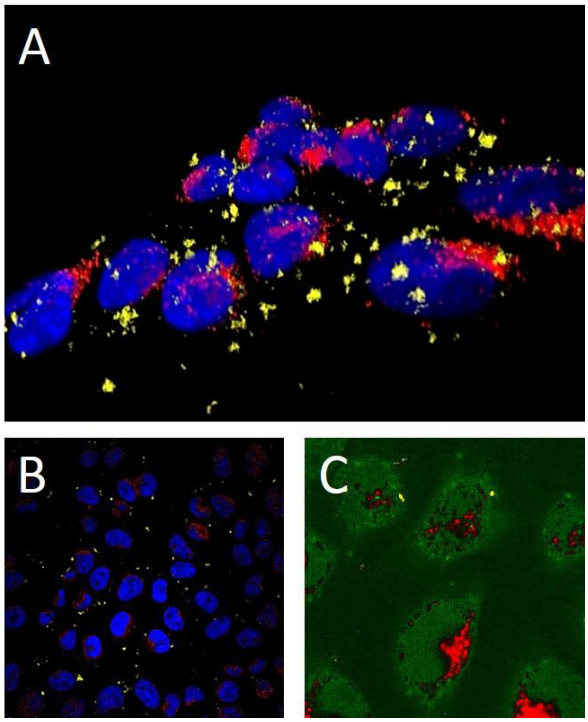


Abbildung 7.8: A) konfokalmikroskopischer, dreidimensionaler Scan von drei Fluoreszenzkanälen. In Blau ist der DAPI-Kanal, in Rot der Cy5-Kanal und in Gelb der QD-Kanal (575 nm) gezeigt. Hierbei wurden die einzelnen Verbindungen anhand ihres Emissionsspektrums identifiziert und eingefärbt B) Konfokalmikroskopische Aufnahme einer größeren Region C) spektrale Auflösung einer kleinen Region, in Rot ist das Fluoreszenzsignal von Cy5 gezeigt und in Gelb die Fluoreszenz, die anhand der raumaufgelösten, detektierten Spektren identifiziert wurde.

Diese Proben wurden weiter konfokalmikroskopisch untersucht, indem ein dreidimensionaler, konfokaler Scan eines Bereichs der Probe angefertigt wurde (Abbildung 7.8 A). Hierbei wurden die Substanzen DAPI, Cy5-Transferrin und Quantenpunkte durch ihr charakteristisches Fluoreszenzsignal identifiziert und abgebildet. Die Verteilung des Quantenpunktsignals ist hierbei zufällig in einem gewissen Abstand zum Zellkern (DAPI). Hier wird fluoreszierendes Material in einem relativ großen Bereich identifiziert, was dafür sprechen kann, dass die Hybride nur mit bestimmten Bereichen der Zelle wechselwirken oder es zeigt an, dass die Hybride sich an der Zellmembran zusammenlagern. Die Analyse der Autokorrelationsfunktion legt nahe, dass diese großen Strukturen nicht in Lösung entstanden sind. Weiterhin findet sich Fluoreszenzsignal im Inneren der Zelle, wie anhand des Ausschnittes aus Abb. 7.8 C zu erkennen ist. Dieser Abschnitt ist in Fehlfarben dargestellt, indem das DAPI Signal elektronisch herausgefiltert wurde. Diese Darstellung veranschaulicht, dass die Hybride in das Zellinnere aufgenommen werden, jedoch nicht mit dem Endosomenmarker Cy5-Transferrin co-lokalisieren, was einen nicht-endosomalen

Aufnahmemechanismus nahelegt. Weiterhin fällt auf, dass diese fluoreszierenden Regionen eine weniger hohe räumliche Ausdehnung aufweisen als die Regionen, die sich vermutlich an der Zellmembran befinden, was den Schluss nahelegt, dass die zusammengelagerten Hybride nicht in die Zelle aufgenommen werden können. Diese Untersuchung zeigt, dass die dargestellten, multifunktionalen Hybride in biologischen Assays eingesetzt werden können und durch ihren bimodalen Charakter innerhalb der Zelle identifiziert werden können.

7.6 Gezielte Darstellung von Metall Nanopartikel Clustern als Plattform für SERS

Das hier präsentierte Projekt ist eine Kooperation der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Luis Liz-Marzán und Prof. Dr. Horst Weller und wurde in Kooperation mir Dr. Dorleta Jimenez de Aberasturi und Dr. Leonardo Scarabelli am *CICbiomaGUNE* bearbeitet. Praktische Vorarbeiten wurden von Dr. Leonardo Scarabelli, Dr. Christian Schmidtke und Artur Feld an der Universität Hamburg durchgeführt.

Wie in Kapitel 6.5 bereits diskutiert, ist es möglich durch eine Verringerung des Polymerüberschusses während des Phasenstransfers von Nanokristallen eine Clusterbildung herbeizuführen.[10,276] Dieses Konzept wurde auf Metallnanokristalle übertragen, wozu die wasserlöslichen Goldnanokristalle (AuNK) bzw. Silbernanokristalle (AgNK) zunächst in THF transferiert werden mussten. Zu citrat-stabilisierten AuNK in Wasser, die nach einem Protokoll von Bastús *et al.* synthetisiert wurden, wurde PI-DETA, in THF gelöst, zugegeben.[61] Die dabei ausfallenden MNK wurden isoliert, in THF gelöst und anschließend mit verschiedenen PI-*b*-PEO 5 Überschüssen verkapselt und einer EP unterzogen. Hierbei kann die Größe der Cluster, also die mittlere Anzahl von MNK pro Mizelle über den Polymerüberschuss gesteuert werden, wie in Abbildung 7.9 zu erkennen ist. Die Polystyrolschicht ist hierbei vor allem für die chemische Resistenz der AgNK wichtig, da bekannt ist, dass diese sehr leicht durch eine oxidative Reaktion abgebaut werden und dabei toxische Silber(I)ionen freisetzt.[259] Die Stabilität in oxidativer Umgebung wurde getestet, indem die Produkte in 30%tigem frischen Königswasser verdünnt wurden, wobei die Konstrukte eine außerordentlich hohe Stabilität aufwiesen: Wo Kontrollexperimente mit ungeschützten MNK zeigten, dass sich diese binnen Sekunden auflösen, weisen die MNK, die eine schützende Schicht auf PS trugen, eine Resistenz von bis zu einer Woche auf, bis keine Absorption von MNK mehr zu detektieren war. Dies belegt, dass die EP ein verlässliches Werkzeug ist, um Nanokristalle von Einflüssen aus der Umgebung zu schützen.

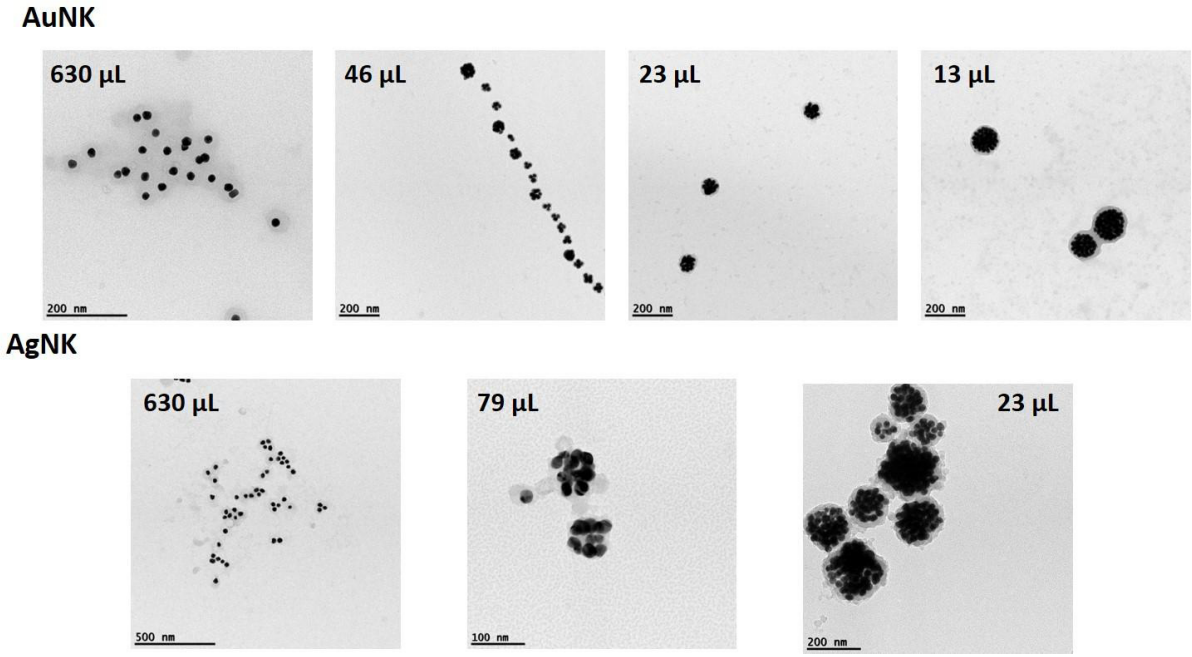


Abbildung 7.9: Die Darstellung verschiedener Metallnanokristallcluster mit PI-*b*-PEO 5 Verkapselung, gefolgt von einer Emulsionspolymerisation. In der oberen Reihe sind TEM-Bilder von AuNK-Clustern und in der unteren Reihe TEM-Bilder von AgNK-Clustern dargestellt. Die Volumenangaben beziehen sich auf die Zugabe einer PI-*b*-PEO 5 Stammlösung der Konzentration von 1 mg/mL. Die Bilder zeigen die Reaktionslösung ohne Aufreinigung,

Abbildung 7.9 zeigt TEM-Bilder von Reaktionslösungen dieser Clustersynthese, ohne weitere Aufreinigungsschritte. Die Partikel sind sehr einheitlich, was sie zu einer optimalen Plattform für SERS macht (vgl. Kap. 4.4.3). Die wechselwirkenden Plasmonen der AuNK bestätigen, dass sich AuNK sehr nahe kommen. So konnten verschiedene Ramanaktive Moleküle wie Kristallviolet, Naphtalin-1-thiol, Naphtalin-2-thiol, Biphenyl-4-thiol und 4-Methylthiophenol vor der Einkapselung auf der AuNK und AgNK Oberfläche platziert werden. Bei dem Phasentransfer bleiben diese Moleküle auf der MNK-Oberfläche und durch die Wechselwirkung der MNK entstehen *hot spots*, welche zu einer signifikant erhöhten Ramanstreuung der Moleküle führen. Demzufolge konnten verschiedene Ramanaktive Cluster hergestellt werden, die ebenefalls eine sehr hohe Resistenz gegenüber Königswasser aufweisen und so eine ideale Ramansonde für biomedizinische Anwendungen darstellen.

7.7 Weitere Publikationen

7.7.1 Cellular Uptake Behavior of Glycoconjugated and Micellar-Encapsulated Quantum Dots on HeLa Cervical Cancer Cells

In dieser Publikation wird die zellulare Aufnahme von verschieden funktionalisierten, Quantenpunkt-enthaltenden Mizellen in HeLa Krebszellen beschrieben. Die Projektidee wurde von Dr. Christian Schmidtke und mir entworfen. Mir oblag die Durchführung vor Ort (Tallahassee). Die Zellen wurden von Dr. Malak Safi und Dr. Megan Muroski kultiviert. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung sowie das Schreiben des Manuskriptes wurden maßgeblich von mir und Dr. Christian Schmidtke durchgeführt. ©2015 NSTI http://nsti.org. Reprinted and revised, with permission, from the TechconnectWorld Proceedings, pp. 78-81, June 14th-17th 2015, Washington DC, U.S.A. [3]

Cellular Uptake Behavior of Glycoconjugated and Micellar-Encapsulated Quantum Dots on HeLa Cervical Cancer Cells

J.-P. Merkl,[†] C. Schmidtke,[†] M. Safi,[#] M. Muroski,[#] D. Alpers,[‡] H. Tran,[†] J. Ostermann,[†] A.-M. Kreuziger,[†] S. Ehrich,[%] G. Strouse,[#] G.Wolters-Eisfeld,[%] H. Mattoussi[#] and H. Weller.[†,&]

† Institute of Physical Chemistry, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, and the Hamburg Center for Ultrafast Imaging, University of Hamburg, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany, email presenting author: merkl@chemie.uni-hamburg.de

‡ Institute of Organic Chemistry, Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg, Germany,

Department of Chemistry and Biochemistry, Florida State University, 95 Chieftan Way, Tallahassee, Florida 32306, United States of America,

% General, Visceral and Thoracic Surgery Department and Clinic, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany

& Department of Chemistry, Faculty of Science, King Abdulaziz University, P.O BOX 80203 Jeddah 21589 (Saudi Arabia).

ABSTRACT

Glyconanomaterials are of great interest for bio-imaging to understand biological processes, for instance metabolism, cell-cell or virus-cell interactions, gluconeogenesis, and cancer. Herein, we present a strategy for the biofunctionalization of fluorescent quantum dots (QDs) from continuous-flow reactor with carbohydrates. This flow reactor enables the reproducible synthesis of a large amount of QDs, with controlled surface functionalization. These QDs act as fluorescent biomarkers and as structural scaffolds for the presentation of glycoclusters to lectins, receptors and cells. Before the phase transfer into water takes place, the carbohydrates are covalently attached to an amphiphilic poly(isoprene)-*b*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer (PI-*b*-PEG) using click-chemistry as previously described by us. These functionalized polymers are subsequently used for the encapsulation of the QDs under preservation of their unique optical properties in a continuous flow system. Binding of glycoconjugated QDs to the human cervical cancer cell line HeLa was characterized using confocal microscopy. Depending on the terminal group of the polymer (namely: D-maltose, D-glucose, carboxyl, and amine), the uptake of the functionalized QDs can be controlled and directed. Functionalization with maltose yields very high uptake in low incubation times and low concentrations. Although serum is known to inhibit the cellular response of artificial nanostructures, we observe reduced but significant cellular uptake of the maltose functionalized nanocontainers in serum containing media. This encapsulated materials have already been tested to be suitable for *in vivo* tumor targeting, due to their lack of toxicity as well as extraordinary stability. Though this method relies on highly reproducible continuous flow systems, which yield high amounts of well defined, functional, non-toxic and highly stable nanoparticles this method has extraordinary industrial, biological and medical relevance.

Keywords: cellular uptake, carbohydrates, diblock copolymer, continuous flow reactor, glycopolymer

INTRODUCTION

In the human organism carbohydrates play an essential role in many biological processes, for instance as structural device in the DNA and RNA, in the energy metabolism, as posttranslational modifications of proteins influencing tumor genesis, bacterial/ viral infection, inflammation, immune response, and cell-cell communication.[1-2] Many processes are mediated *via* interactions between sugar-binding proteins, so called glycoreceptors, and carbohydrates.[3] These interactions are difficult to analyze and to monitor with a single monosaccharide moiety due to the weak affinity.[4] This binding strength can be increased about several orders of magnitude by the combination of nanomaterials with carbohydrates. These gyconanomaterials present many sugars to the glycoreceptor. The strong binding of glycoclusters is a result of polyvalent interactions.[5] By combining the carbohydrate with a fluorescent quantum dot (QD), the localisation of the composite in the tissue can be monitored and the influence of carbohydrates on such composites may be studied. QDs are used in biomedicine for imaging, because of their excellent optical properties.[6] QDs benefit from high photostability and of their adjustable emission wavelength correlating with the particle size in contrast to organic dyes.[7-8]

Nonetheless, only a few articles in scientific literature can be found on glycoconjugated QDs.[9-11] Recently, we published a micellular encapsulation technique which is applicable for different NPs (QDs, iron oxides and gold NPs) using an amphiphilic poly(isoprene)-*b*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer (PI-*b*-PEG).[12] The polymers can be cross-linked which leads to a high stability, preserving the physical properties of the particle.[13-14], Due to the synthesis of the diblock copolymer by living anionic polymerization (LAP) the chain end can be tailored by different strategies.[12] More recently, we presented the attachment of azido-modified carbohydrates to PI-*b*-PEG with an alkyne end group using copper catalyzed Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition (*click*-chemistry).[15] The

glycosylated polymers were successfully used for the encapsulation of QDs and used for lectin-binding assays.
Here, we performed uptake studies of the glycoconjugated QDs on HeLa cells *in vitro*. Their binding to the cervical cancer cell line was characterized using confocal microscopy. Depending on the terminal group of the polymer, (D-maltose, D-glucose, carboxy, and amine) the uptake of the functionalized QDs can be controlled. This may have a high potential for specific targeting of cervical cancer cells and further tumor entities *in vivo*.

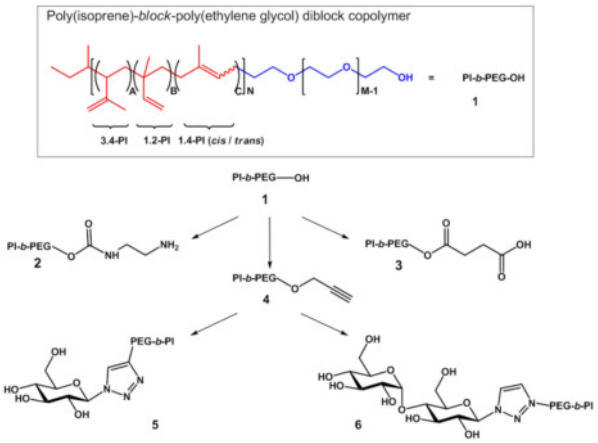
EXPERIMENTAL SECTION

Synthesis. CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell nanoparticles were synthesized in a flow reactor as described previously.[16-17] The block copolymers PI and PI-*b*-PEG **(1)** were synthesized by living anionic polymerization (LAP) as previously described.[12] PI-DETA was synthesized by CDI-activation and coupling to diethylenetriamine (DETA).[18]
Functionalization of PI-*b*-PEG. PI-*b*-PEG-NH_2 (**2**), PI-*b*-PEG-COOH (**3**), and PI-*b*-PEG-C≡CH (**4**) the glycosylation *via* click-chemistry were realized according to Schmidtke *et al.*[12, 19],
Phase Transfer into Water. The QDs were encapsulated with PI-*b*-PEG diblock copolymer as reported previously.[12]
Confocal Microscope Imaging. HeLa cells were cultured to 30% confluency in Lab-Tek thin bottom chambers in Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, c(glucose) = 4.5 g/L) medium containing 10% FCS at a temperature of 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Medium was replaced with serum-containing or serum free DMEM. Subsequently, the cells were exposed to 0.1 µM of QDs for one hour and to the endosomal marker Cy5-transferrin. The cells were fixed using repeated rinsing with 4% paraformaldehyde and mountened with *Prolong Antifade Reagent with DAPI*.
Instrumentation: Confocal microscopy images were collected on an inverted Nikon TE2000-E2 Eclipse C1si (Nikon Instruments Inc., U.S.) equipped with a Nikon CFI Plan Apochromat TIRF 60x oil immersion objective (NA 1.49, 0.12 mm WD) and imaged with a Cool SNAP HQ2 monochrome camera (Photometric). DAPI, Cy5 and a QD filters (excitation 400-440 nm, emission 540-580 nm) were used.

RESULTS AND DISCUSSION

Phase Transfer

Since most high-quality NPs with a high crystallinity and monodispersity are produced in organic solvents at high temperatures *via* bottom-up procedure, a phase transfer into aqueous media is necessary.[20] In our case, we synthesized CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell QDs in a flow-reactor.[16] These QDs can be transferred into water using an amphiphilic, cross-linkable poly(isoprene)-*b*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer (PI-*b*-PEG) as previously reported.[18] We have already shown that the functionalization of the polymer can be done prior to the phase transfer (pre-assembly). This strategy is useful to incorporate functional groups (amine (**1**), alkyne (**2**), or carboxyl (**3**)) or small affinity molecules (e.g. biotin or carbohydrates).[12] We adopted this method for the glycosylation of the diblock copolymer with D-glucose (**5**) and D-maltose (**6**) using Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition[21] under copper catalyzed conditions[22],[23] between a glyco-azide (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-glucopyranosyl azide and 2,3,6,2′,3′,4′,6′-hepta-*O*-acetyl-*α*-D-glucopyranosyl-1→4-*β*-D-glucopyranosyl azide) and a polymeric alkyne (PI-*b*-PEG-C≡CH (**4**)).[15] The reaction is not affected by other biological relevant end groups and the resulting triazole ring is very stable against hydrolysis/enzymatic degradation. Sharpless *et al.* defined this kind of reactions as click-chemistry which are simple, selective, avoiding byproducts and running under mild conditions in high yields.[24] Taking the highly selective structure/effect relationships between glycoreceptors and sugars into account, we synthesized functional polymers with the same connectivity to the anomeric carbon atom of the carbohydrate.



Scheme 1: Schematic representation of the functionalization / glycoconjugation strategy and chemical structures of the resulting compounds.

These functionalized polymers were successfully used for the micellar encapsulation of QDs in water with excellent fluorescence quantum yields.[13] No spectral shifts were obtained by UV-vis spectroscopy, neither in the absorption nor in the emission maximum. Furthermore, the good fluorescence properties of the glyco-QDs showing that the toxic copper catalyst is well separated during the purification of the polymers, because even smallest quantities of copper ions quench the QDs immediately.[14, 25-27]

Cellular Uptake of encapsulated QDs on human cervical carcinoma cell line HeLa

Cervical cancer rates fourth in cancer related death in women. Therefore, the human cervical carcinoma cell line

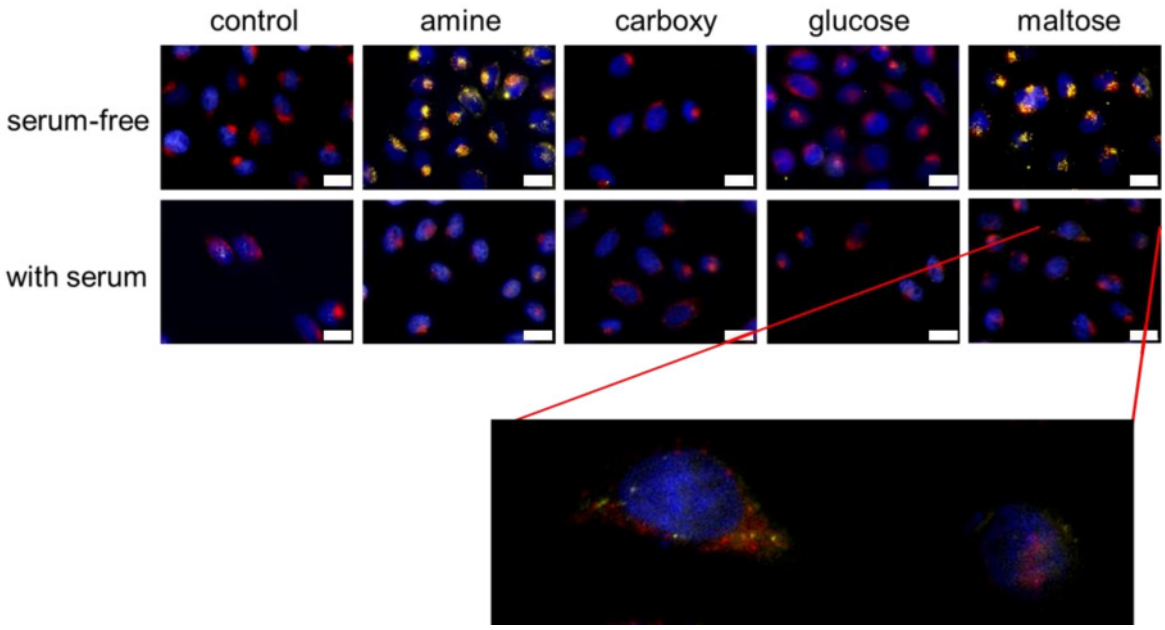


Figure 1: Confocal microscopy images of HeLa cells after exposure to different functionalized QDs. Top row: serum-free media, middle row: serum containing media, bottom: enlargement of HeLa cells incubated with maltose functionalized QD in serum-containing media. The color code represents blue: DAPI, red: Cy5, yellow: QD, the scale bar represents 20 μm.

HeLa is highly attractive for *in vitro* binding and uptake studies to achive cancer specific targeting. Many important biological processes like inflammation, cancer and cancer metastasis, are frequently mediated by glycoreceptor−glycan interactions.

The influence of different functional groups and carbohydrates on the surface of the QDs, namely: amine, carboxyl, D-glucose, and D-maltose were studied.

We performed the uptake-studies on HeLa cells, where the functional QDs were incubated on the cells for one hour in serum-containing and serum-free medium. The latter prevents a possible protein corona formation on the NP or an impaired uptake mechanism.[28] Using confocal microscopy, the cell-nanoparticle interactions were investigated and the fluorescent quantum dots were located intracellularly (see Figure 1). QDs were identified by both spectral position and by wavelength scans, if necessary. Surprisingly, we observed cellular uptake of maltose-functionalized QDs in serum-free as well as serum-containg media, even though cellular uptake in serum-containing media was significantly reduced. Furthermore, we observed a strong uptake in serum-free media for the QDs with amine, whereas the carboxylated and glucose functionalized NPs showed none. These results are in accordance to our previous published results.[29] Colocalization with the endosomal marker Cy5-transferrin indicates endosomal uptake in both cases. We interpret the cellular uptake of maltose-QDs medium as specific, due to comparable low incubation times and concentrations compared to our recent reports.[29] The reduced, but significant uptake of maltose-QDs in serum containing media supports this assumption. This is also supported by a recent report of Song *et al*., where enhanced cellular uptake of maltose-modified liposomes in HeLa cells in serum-free medium is reported.[30] In a more recent report, the influence of the number of glucose units in a maltooligosaccharide-QD construct on the rate of nuclear import was studied. There microinjection was used to transfer QDs into the cells and an enhanced rate of nuclear import of maltooligo-QDs with more than three glucose units was found in comparison to (mono)-glucose functionalized QDs.[31] These reports underline the importance of polysaccharides in the cellular response of glyco-QD constructs. Interestingly, eukaryotic cells do not express endogenous maltose receptors since maltose is broken down to glucose by maltase (alpha-glucosidase) in the small intestine.[32] It can be hypothesed that maltose is transported via its terminal glucose moiety by the faciliative glucose receptors (GLUTs) that are frequently overexpressed in cancer cells to overcome the elevated need for energy and that the glucose functionalized QDs are not identified due to the triazole.[33] Further investigations will elucidate the effects of carbohydrate presentation on the NP's surface and their receptor interactions in detail.

CONCLUSION

In conclusion, we could show a simple method to couple different carbohydrates (D-maltose and D-glucose) to the PI-*b*-PEG diblock copolymer *via* click-chemistry. The glycosylated polymers were successfully used for the phase transfer of fluorescent QDs preserving their optical properties. Both QD synthesis as well as phase transfer

were carried out in automated flow systems, allowing highly reproducible synthesis of a big amount of nanomaterials. The resulting glyco-QDs have proven to be non-toxic assessed by several toxicity assays (WST8 and LDH) at concentrations as high as 1 µM. Uptake studies presented in this article, show that these glyconanomaterials can be used to target HeLa cells. These results are promising and underline the potential of glyconanomaterials for further *in vivo* studies.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the EU within the FP 7 program (Vibrant, EU 228933). J.-P.M. acknowledges the support of the Chemical Industry Fund, VCI: German Chemical Industry Association, the German-American Fulbright Program and furthermore travel fellowships of the Freunde- und Förderverein Chemie der Universität Hamburg e.V. and of the University of Hamburg. We would like to thank Matthias Wulf from the Institute of Organic Chemistry (University of Hamburg) for providing us the maltose-derivate.

REFERENCES

[1] T. K. Lindhorst, *Chem. Unserer Zeit* **2000**, *34*, 38-52.
[2] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
[3] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.
[4] X. Wang, O. Ramström, M. Yan, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1946-1953.
[5] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
[6] P. Alivisatos, *Nat. Biotech.* **2004**, *22*, 47-52.
[7] W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016-2018.
[8] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Meth.* **2008**, *5*, 763-775.
[9] P. Babu, S. Sinha, A. Surolia, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *18*, 146-151.
[10] R. Kikkeri, B. Lepenies, A. Adibekian, P. Laurino, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2110-2112.
[11] H. Bavireddi, R. Kikkeri, *Analyst* **2012**, *137*, 5123-5127.
[12] C. Schmidtke, E. Poselt, J. Ostermann, A. Pietsch, H. Kloust, H. Tran, T. Schotten, N. G. Bastus, R. Eggers, H. Weller, *Nanoscale* **2013**, *5*, 7433-7444.
[13] C. Schmidtke, H. Lange, H. Tran, J. Ostermann, H. Kloust, N. G. Bastús, J.-P. Merkl, C. Thomsen, H. Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 8570-8578.
[14] J. Ostermann, J.-P. Merkl, S. Flessau, C. Wolter, A. Kornowksi, C. Schmidtke, A. Pietsch, H. Kloust, A. Feld, H. Weller, *ACS Nano* **2013**.
[15] C. Schmidtke, A.-M. Kreuziger, D. Alpers, A. Jacobsen, Y. Leshch, R. Eggers, H. Kloust, H. Tran, J. Ostermann, T. Schotten, J. Thiem, J. Thimm, H. Weller, *Langmuir* **2013**, *29*, 12593-12600.
[16] H. Tran; S. Niehaus; H. Weller; D. Ness, *Vol. WO2014033213 (A2)*, **2014**.
[17] H. Tran, University of Hamburg, PhD thesis (Munich), **2012**.
[18] E. Pöselt, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, U. Schumacher, C. Wagener, S. Förster, H. Weller, *ACS Nano* **2012**, *6*, 3346-3355.
[19] C. Schmidtke, A.-M. Kreuziger, D. Alpers, A. Jacobsen, Y. Leshch, R. Eggers, H. Kloust, H. Tran, J. Ostermann, T. Schotten, J. Thiem, J. Thimm, H. Weller, *Langmuir* **2013**.
[20] G. Palui, F. Aldeek, W. T. Wang, H. Mattoussi, *Chem Soc Rev* **2015**, *44*, 193-227.
[21] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494-2507.
[22] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
[23] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
[24] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075.
[25] C. Schieber, A. Bestetti, J. P. Lim, A. D. Ryan, T.-L. Nguyen, R. Eldridge, A. R. White, P. A. Gleeson, P. S. Donnelly, S. J. Williams, P. Mulvaney, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10523-10527.
[26] H. Kloust, C. Schmidtke, J. P. Merkl, A. Feld, T. Schotten, U. E. A. Fittschen, M. Gehring, J. Ostermann, E. Poselt, H. Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 23244-23250.
[27] J. P. Merkl, J. Ostermann, C. Schmidtke, H. Kloust, R. Eggers, A. Feld, C. Wolter, A. M. Kreuziger, S. Flessau, H. Mattoussi, H. Weller, *Proc. Spie* **2014**, *8955*.
[28] M. Moros, B. Hernáez, E. Garet, J. T. Dias, B. Sáez, V. Grazú, Á. González-Fernández, C. Alonso, J. M. de la Fuente, *ACS Nano* **2012**, *6*, 1565-1577.
[29] J. Ostermann, C. Schmidtke, C. Wolter, J. P. Merkl, H. Kloust, H. Weller, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 232-242.
[30] C. K. Song, S. H. Jung, D.-D. Kim, K.-S. Jeong, B. C. Shin, H. Seong, *Int. J. Pharm.* **2009**, *380*, 161-169.
[31] S. Sekiguchi, K. Niikura, Y. Matsuo, S. H. Yoshimura, K. Ijiro, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1656-1662.
[32] S. H. Sorensen, O. Noren, H. Sjostrom, E. M. Danielsen, *Eur J Biochem* **1982**, *126*, 559-568.
[33] M. L. Macheda, S. Rogers, J. D. Best, *J. Cell Physiol.* **2005**, *202*, 654-662.

7.7.2 Structural Investigations on Magneto-Fluorescent-Plasmonic Nanocomposites

In dieser Publikation wird die elektronenmikroskopische Struktur von einem Nanohybrid, das aus AuNKn und FeONKn sowie fluoreszierenden Quantenpunkten besteht, beschrieben. Mein Betrag war die Konzeptplanung, Umsetzung, Synthese und Verkapselung der Quantenpunkte, Präparieren der Hybride sowie die Zusammenstellung des Manuscriptes. ©2015 NSTI http://nsti.org. Reprinted and revised, with permission, from the TechconnectWorld Proceedings, pp. 432-435, June 14th-17th 2015, Washington DC, U.S.A. [4]

Structural Investigations on Magneto-Fluorescent-Plasmonic Nanocomposites

J.-P. Merkl,[†] H. Heidari,[‡] C. Schmidtke,[†] H. Kloust,[†] A. Feld,[†] F. Aldeek,[#] H. Lange,[†] H. Mattoussi,[#] S. Bals[‡] and H. Weller.[†,&]

† Institute of Physical Chemistry, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, and the Hamburg Center for Ultrafast Imaging, University of Hamburg, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany, email presenting author: merkl@chemie.uni-hamburg.de

‡ EMAT, Department of Physics, University of Antwerp, Groenenborgerlaan 171, B2020 Antwerp, Belgium,

Department of Chemistry and Biochemistry, Florida State University, 95 Chieftan Way, Tallahassee, Florida 32306, United States of America,

& Department of Chemistry, Faculty of Science, King Abdulaziz University, P.O BOX 80203 Jeddah 21589, Saudi Arabia.

ABSTRACT

Hybrid nanostructures are a new class of multifunctional materials with unique optical and electronic properties that make them promising for a variety of biological applications and optoelectric devices. In this work, we have designed and studied a tri-functional hybrid nanomaterial consisting of magnetic iron oxide nanoparticles (NPs) as a core material, plasmonic gold (AuNPs) as an interior satellite and fluorescent quantum dots (QDs) as an exterior satellite. Iron oxide NPs were first encapsulated with a lipoic acid (LA) terminated poly-(isoprene)-*block*- poly(ethylene oxide) diblock copolymer and act as seeds for the reductive deposition of AuNPs. The disulfide moiety of the LA ligand on the surface permitted to stabilize the AuNPs due to the high affinity of Au-to-sulfur. Using the same affinity to Au, QDs encapsulated with similar polymer (QD-LA) were then added to the iron oxide-AuNPs to create a final iron oxide/AuNP/QD hybrid nanomaterial. The structure, size, and morphology of this new, trifunctional hybrid was investigated and confirmed using two distinct transmission electron microscopy (TEM) techniques including cryo transmission electron tomography, as well as high angle annular dark field scanning TEM (HAADF-STEM).

Keywords: multifunctional nanohybrids, transmission electron microscopy, cryo electron tomography, HAADF-STEM, nano-assemblies

INTRODUCTION

In the last two decades, nanoparticles have attracted a great deal of interest and much research activity. This has been motivated by the promise they offer for use in various applications due to their unique properties. For example, fluorescent semiconducting QDs exhibit tunable emission and absorption spectra, a high molar extinction coefficient, broad absorption profiles, and high fluorescence quantum yield.[1] Similarly, AuNPs exhibit size- and shape-dependent plasmonic absorption features and high molar extinction coefficients which make them suitable as contrast agents for dark field imaging, computed tomography (CT) and hyperthermia therapy.[2] In addition, nanostructure containing iron, such as superparamagnetic iron oxide NPs, have shown strong size- and composition-dependent coercivity which make them of potential use in biomedical application *e.g.* as MRI contrast agents.[3-4] Combining these nanostructures together in one assembly to provide material with new and combined properties represents a major challenge in the field of nanoscience, since no single material is known to exhibit all desirable properties. These combined structures are often referred to be (nano)-hybrids or (nano)-assemblies. Various hybrid nanostructures, including core/shell iron oxide/Au nanoparticles, self-assembled Au-nanorods/iron oxide nanohybrids, vesicles containing irons oxide and QDs as well as iron oxide/silica-QD hybrdis have been developed to provide new nanocomposites yielding unique properties.[5-7] For example, AuNP - QD hybrids nanostructures have recently attracted much attention due to the large fields and the high confinement associated to the plasmonic resonances, resulting in strong exciton plasmon interaction.[8] *Sailor and Park* presented a detailed overview of different hybrid systems that have already been used *in vivo* and *in vitro*.[9] Nanocrystal hybrids can be formed by a direct fusion of the crystal lattices,[10-13] by co-encapsulation of different types of nanocrystals or conjugation of separate NPs.[7, 14-19] For the latter, self-assembly is an important process to arrange two separately synthesized (nano)-structures into a materials with superior properties.[20-21] Recently, we have developed a micellar encapsulation process to transfer a variety of nanoparticles into aqueous solution with high degree of preservation of their properties.[22-28] This strategy involves the use of amphiphilic poly(isoprene)-block-poly(ethylene oxide) diblock copolymers (PI-*b*-PEO) to encapsulate NPs and provide a robust, stable, and easy-to-functionalize micelle surrounding the NP.[22-23, 27, 29-30] These modular functional micelles allowed us to design well defined magneto- or fluorescent-plasmonic nanohybrids.[31] More recently, the same block co-polymers were used to perform the synthesis of new iron oxide nano- and micro-composites by clusterization. Here cluster-size dependent- blocking temperature, magneto-viscosity and r_2 relaxivity were observed.[32]

EXPERIMENTAL SECTION

Synthesis. CdSe/CdS/ZnS core/shell/shell nanoparticles were synthesized in a flow reactor as described previously.[33] The block copolymers PI and PI-*b*-PEG **(1)**

were synthesized by living anionic polymerization (LAP).[26] Iron oxide NPs were synthesized according to Hyeon *et al*.[34]

Functionalization of PI-*b*-PEG. PI-*b*-PEG-LA was synthesized in accordance to the methodology reported by Schmidtke *et al*.[26]

Phase Transfer into Water. The NPs (QDs and iron oxide) were encapsulated with PI-*b*-PEG-LA diblock copolymer as reported previously.[26-28] Briefly, a partial ligand exchange of the native ligands was executed with polyisoprene-diethylenetriamine (PI-DETA) and PI-DETA coated NPs were subsequently transferred to the aqueous phase using an automated flow system.

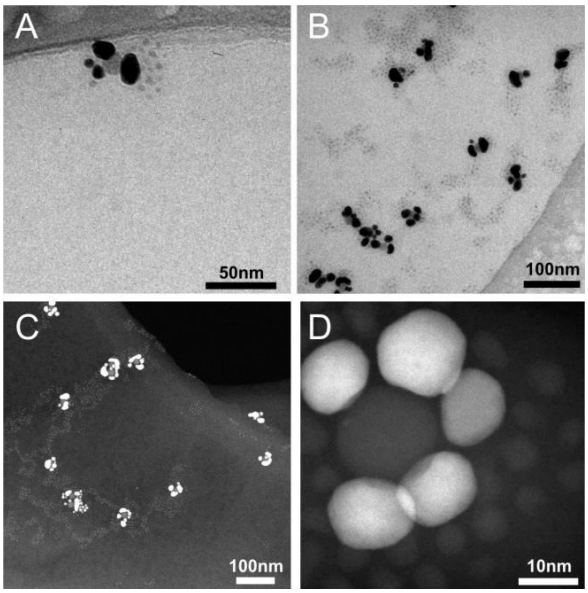


Figure 1: TEM images of the iron oxide/Au/QD-LA assemblies. A: Iron oxide surrounded by Au domains and QD-LA embedded in a layer of vitreous ice. B: overview image of the cryo-prepared sample C: HAADF-STEM image of the freeze-dried assemblies. D: HAADF-STEM image of an assembly. The particle with lower contrast in the middle corresponds to the iron oxide particle in the assembly.

Synthesis of Au-domains on iron oxide. The PI-*b*-PEG-LA-coated iron oxide NPs were diluted in aqueous sodium citrate solution (125 mL; c= 2.2 mM) and chloroauric acid was added and stirred for 48 h at room temperature. The fluorescent-plasmonic hybrids were isolated using magnetic columns.[31]

Cryo preparation and freeze-drying of the assemblies. For preparation of the TEM sample, a 3.5 µL drop of the solution was applied onto a hydrophilic carbon coated TEM grid (Quantifoil R2.2). After the excess solution was blotted using filter paper, the grid was rapidly plunged into a cryogenic medium (liquid ethane) using a FEI Vitrobot. The procedure results in the formation of a thin layer (~100nm) of vitreous ice embedding the structure in a frozen state of the solution.

In order to investigate the samples at room temperature, the cryo-prepared vitrified samples were freeze-dried. Therefore they were transferred to an environmental scanning electron microscope (ESEM) equipped with a peltier stage which was cooled to 248 K. By maintaining the chamber pressure at 250 Pa, sublimation of vitreous ice was ensured. The specimens were then heated up to the room temperature using a controlled heating of the peltier stage with a ramp of 2 K/min.

Cryo electron tomography. Cryo prepared specimens were mounted on a Gatan 676 cryo transfer tomography holder and investigated using a Tecnai Spirit TEM, operated at an accelerating voltage of 120 kV. Controlled electron dose imaging mode was used during tomography tilt series acquisition. A tilt increment of 5° was used to acquire the tilt series over a range of ±65°. The series was aligned and reconstructed using the FEI inspect 3-D software. 3-D visualization was performed using the Amira software.

RESULTS AND DISCUSSION

The self-assembly of QD-LA onto magneto-fluorescent iron oxide/Au core/satellite structures yields a tri-functional nanocomposite. To study the structure of those hybrids fluorescence quenching as well as electron microscopy techniques may be used. Since AuNPs are very effective fluorescence quenchers, with quenching efficiencies exceeding those predicted by the Förster dipole–dipole interaction formalism, fluorescence quenching is an excellent indicator of the QD-Au interactions.[35] Quenching analysis indicate that QD-LA are tightly bound to the Au-surface, because QD-fluorescence is quenched up to 95 % by the AuNPs' plasmon and fluorescence lifetime of the coupled QD-AuNP is drastically reduced.[36-37] When excess, unbound QDs are present in solution these QDs contribute more to the overall decay curve, due to their high, unquenched fluorescence. Here, we used a ratio of 40 QD per iron oxide/Au core and observed both bound QD-LA and free QD-LA. This allowed simultaneous investigation of both species within one sample. We should mention that a clarification of the quenching mechanism between AuNPs and QDs is still lacking, however, the distance and orientation as well as spectral overlap would influence the coupling and therefore the quenching behavior. [35, 38] Although fluorescence quenching is highly sensitive, the distinct distance dependence combined with intrinsic polydispersity of colloid chemistry makes data interpretation challenging. In this study, we focused on the characterization of the structure of this trifunctional nanomaterial system using electron microscopy techniques in order to provide more insight into how nanoparticles are bound to each other. We believe that this is of significant importance for both elucidation of the quenching mechanism as well as future biomedical applications. Such biomedical processes run under physiological, aqueous

conditions and biological response to NPs is known to be structure, shape and size dependent.[39] Thus, accessibility of the single compartments as well as surface chemistry will determine biological response to those structures. There is no easy way to determine the solution structure of such nanoparticle assemblies, when they are loosely assembled instead of fixed in a rigid network. Quantitative information on the structure of such nano-assemblies allows accurate structure/property correlations. Cryo-TEM tomography is the most suitable technique for such investigations.[40-41] We performed cryo-TEM imaging and cryo electron tomography on the vitrified samples and then performed a freeze-drying procedure on the vitrified samples in order to investigate them using HAADF-STEM technique at room temperature. We found that both preparation techniques yield almost the same configuration of the nano-assemblies, although the assemblies shrunk in the freeze-dried sample.

Cryo-TEM images are presented in Figure 1 A and B, where iron oxide is surrounded by Au- domains and QDs. The iron oxide/Au structure was synthesized by direct growth of Au onto encapsulated iron oxide NPs.[31] As shown in Figure 1 A, QD-LAs are assembled around the Au-domains. HAADF-STEM studies confirm the composition of the nanohybrid; since the HAADF-STEM intensity depends on the atomic number (Z), the intensity of iron oxide particles is lower in comparison to Au in Figure 1 C, D. Figure 1 C shows freeze-dried structures on a carbon-coated TEM grid. Obviously, the core/satellite structure is preserved and the QDs are collapsed on the surface of the grid close to the assembly. A HAADF-STEM image of the assembly shown in figure 1 D, depicts the contrast difference between the iron oxide core and the Au satellite shell around it. Figure 2 B is a STEM-EDS elemental map of the assembly shown in Figure 2 A and confirms the distribution of the different elements. The QDs may be identified by the green color. QDs assemble around the AuNP covering the surface. Due to the high affinity of LA towards the Au surface, it is expected, that the Au surface is completely covered with LA molecules, which are present on the QDs' micelle. The interspace between the QD and the Au surface is therefore provided by the amphiphilic PI-*b*-PEO polymer. Excess, unbound QDs are found, which are freely distributed in solution.

In order to investigate the 3-D arrangement of the particles close to the native state in solution, a cryo electron tomography experiment was performed. Figure 2 C shows a projection image acquired at zero tilt whereas the 3-D arrangement is visualized in figure 2 D. Here the structure of such an ensemble is visualized, the gaps between iron oxide and Au and Au and QD-LA are clearly visible. The estimated distance between Au and QD is approximately 4±2 nm whereas the distance between the individual QDs is 6±4 nm on average and varies according to the size of the QDs and their relative distance from the center of the assembly.

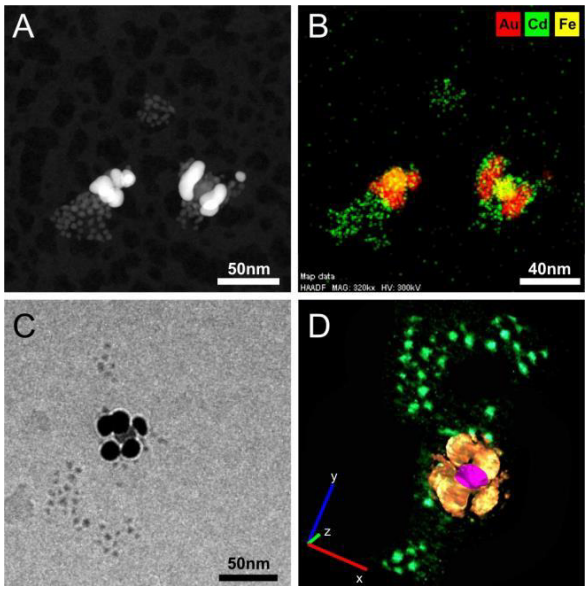


Figure 2: A, B: HAADF-STEM image and STEM-EDS elemental map of freeze dried assemblies. C: Cryo-EM projection image at 0° angle of the assembly embedded in vitreous ice D: Volume rendering visualization of 3-D reconstruction of the assembly. In the 3D visualization the particles are false colored for visual interpretation.

CONCLUSION

The solution structure of a trifunctional iron oxide/Au/QD-LA nanocomposite was determined and visualized using various transmission electron microscopic techniques. The QD-LA attach onto the Au-surface and the amphiphilic polymer provides an interspace between Au surface and the QD. In the analyzed assembly this distance was approximately 4±2 nm. This quantification will help in elucidating the interaction between QDs and AuNPs in the future.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the EU within the FP 7 program (Vibrant, EU 228933). J.-P. M. acknowledges the support of the Chemical Industry Fund, VCI: German Chemical Industry Association, the German-American Fulbright Program and furthermore travel fellowships of the Freunde- und Förderverein Chemie der Universität Hamburg e.V. and of the University of Hamburg.

REFERENCES

[1] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Meth.* **2008**, *5*, 763-775.

[2] X. Huang, M. A. El-Sayed, *Journal of Advanced Research* **2010**, *1*, 13-28.

[3] F. Caruso, T. Hyeon, V. M. Rotello, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2537-2538.

[4] G. Palui, F. Aldeek, W. T. Wang, H. Mattoussi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 193-227.

[5] Y. Jin, C. Jia, S.-W. Huang, M. O'Donnell, X. Gao, *Nat. Commun* **2010**, *1*, 41.
[6] G. Beaune, B. Dubertret, O. Clement, C. Vayssettes, V. Cabuil, C. Menager, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2007**, *46*, 5421-5424.
[7] N. Insin, J. B. Tracy, H. Lee, J. P. Zimmer, R. M. Westervelt, M. G. Bawendi, *ACS Nano* **2008**, *2*, 197-202.
[8] A. O. Govorov, G. W. Bryant, W. Zhang, T. Skeini, J. Lee, N. A. Kotov, J. M. Slocik, R. R. Naik, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 984-994.
[9] M. J. Sailor, J. H. Park, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3779-3802.
[10] S. T. Selvan, P. K. Patra, C. Y. Ang, J. Y. Ying, *Angew Chem Int Edit* **2007**, *119*, 2500-2504.
[11] N. s. Pazos-Pérez, Y. Gao, M. Hilgendorff, S. Irsen, J. Pérez-Juste, M. Spasova, M. Farle, L. M. Liz-Marzán, M. Giersig, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 4415-4422.
[12] N. Lee, H. R. Cho, M. H. Oh, S. H. Lee, K. Kim, B. H. Kim, K. Shin, T.-Y. Ahn, J. W. Choi, Y.-W. Kim, S. H. Choi, T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10309-10312.
[13] L. Y. T. Chou, K. Zagorovsky, W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 148-155.
[14] F. Erogbogbo, K.-T. Yong, R. Hu, W.-C. Law, H. Ding, C.-W. Chang, P. N. Prasad, M. T. Swihart, *ACS Nano* **2010**, *4*, 5131-5138.
[15] R. Kas, E. Sevinc, U. Topal, H. Y. Acar, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 7758-7766.
[16] V. Roullier, F. Grasset, F. Boulmedais, F. Artzner, O. Cador, V. r. Marchi-Artzner, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 6657-6665.
[17] R. Di Corato, N. C. Bigall, A. Ragusa, D. Dorfs, A. Genovese, R. Marotta, L. Manna, T. Pellegrino, *ACS Nano* **2011**, *5*, 1109-1121.
[18] B.-S. Kim, T. A. Taton, *Langmuir* **2007**, *23*, 2198-2202.
[19] J.-H. Park, G. von Maltzahn, E. Ruoslahti, S. Bhatia, M. Sailor, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2008**, *47*, 7284-7288.
[20] M. Grzelczak, J. Vermant, E. M. Furst, L. M. Liz-Marzan, *Acs Nano* **2010**, *4*, 3591-3605.
[21] T. R. Cook, Y. R. Zheng, P. J. Stang, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 734-777.
[22] J. Ostermann, C. Schmidtke, C. Wolter, J. P. Merkl, H. Kloust, H. Weller, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 232-242.
[23] J. P. Merkl, J. Ostermann, C. Schmidtke, H. Kloust, R. Eggers, A. Feld, C. Wolter, A. M. Kreuziger, S. Flessau, H. Mattoussi, H. Weller, *Proc SPIE* **2014**, *8955*.
[24] J. Dimitrijevic, L. Krapf, C. Wolter, C. Schmidtke, J. P. Merkl, T. Jochum, A. Kornowski, A. Schuth, A. Gebert, G. Huttmann, T. Vossmeyer, H. Weller, *Nanoscale* **2014**, *6*, 10413-10422.
[25] C. Schmidtke, H. Lange, H. Tran, J. Ostermann, H. Kloust, N. G. Bastús, J.-P. Merkl, C. Thomsen, H. Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 8570-8578.
[26] C. Schmidtke, E. Pöselt, J. Ostermann, A. Pietsch, H. Kloust, H. Tran, T. Schotten, N. G. Bastus, R. Eggers, H. Weller, *Nanoscale* **2013**, *5*, 7433-7444.
[27] J. Ostermann, J.-P. Merkl, S. Flessau, C. Wolter, A. Kornowksi, C. Schmidtke, A. Pietsch, H. Kloust, A. Feld, H. Weller, *ACS Nano* **2013**.
[28] E. Pöselt, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, U. Schumacher, C. Wagener, S. Förster, H. Weller, *ACS Nano* **2012**, *6*, 3346-3355.
[29] H. Kloust, C. Schmidtke, A. Feld, T. Schotten, R. Eggers, U. E. A. Fittschen, F. Schulz, E. Pöselt, J. Ostermann, N. G. Bastús, H. Weller, *Langmuir* **2013**, *29*, 4915-4921.
[30] H. Kloust, C. Schmidtke, J. P. Merkl, A. Feld, T. Schotten, U. E. A. Fittschen, M. Gehring, J. Ostermann, E. Poselt, H. Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 23244-23250.
[31] C. Schmidtke, H. Kloust, N. G. Bastús, J.-P. Merkl, H. Tran, S. Flessau, A. Feld, T. Schotten, H. Weller, *Nanoscale* **2013**.
[32] C. Schmidtke, R. Eggers, R. Zierold, A. Feld, H. Kloust, C. Wolter, J. Ostermann, J. P. Merkl, T. Schotten, K. Nielsch, H. Weller, *Langmuir* **2014**, *30*, 11190-11196.
[33] H. Tran, S. Niehaus, H. Weller, D. Ness, *Vol. WO2014033213 (A2)*, **2014**.
[34] T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, H. B. Na, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12798-12801.
[35] T. Pons, I. L. Medintz, K. E. Sapsford, S. Higashiya, A. F. Grimes, D. S. English, H. Mattoussi, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3157-3164.
[36] F. Aldeek, M. Safi, N. Q. Zhan, G. Palui, H. Mattoussi, *ACS Nano* **2013**, *7*, 10197-10210.
[37] F. Aldeek, X. Ji, H. Mattoussi, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 15429-15437.
[38] C. J. Breshike, R. A. Riskowski, G. F. Strouse, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 23942-23949.
[39] W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 145-150.
[40] S. Bals, B. Goris, L. M. Liz-Marzan, G. Van Tendeloo, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2014**, *53*, 10600-10610.
[41] J. E. Galvan-Moya, T. Altantzis, K. Nelissen, F. M. Peeters, M. Grzelczak, L. M. Liz-Marzan, S. Bals, G. Van Tendeloo, *ACS Nano* **2014**, *8*, 3869-3875.

7.7.3 Quantifying the Density of Surface Capping Ligands on Semiconductor Quantum Dots

Diese Veröffentlichung handelt von der Synthese eines neuartigen Liponsäure-PEG-Benzaldehyd Liganden und dessen Verwendung für den Phasentransfer von QDs. Durch Verwendung verschiedener molarer Anteile des Liganden und die quantitative Umsetzung mit Hydrazinopyridin zu einem Hydrazonchromophor, das ein Absorptionsmaximum bei 350 nm aufweist, gelang die Bestimmung der Anzahl der Liganden von grün emittierenden QDs. ©SPIE 2015, reproduced with permission of *Proc. of SPIE* **2015**, 93381, 93381-11.[5]

Quantifying the Density of Surface Capping Ligands on Semiconductor Quantum Dots

Naiqian Zhan,[a] Goutam Palui,[a] Jan-Philip Merkl,[a,b] and Hedi Mattoussi[a]

[a] Florida State University, Department of Chemistry and Biochemistry, 95 Chieftan Way, Tallahassee, Florida 32306, USA; [b] Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, 20146 Hamburg, Germany

ABSTRACT

We have designed a new set of coordinating ligands made of a lipoic acid (LA) anchor and poly(ethylene glycol) (PEG) hydrophilic moiety appended with a terminal aldehyde for the surface functionalization of QDs. This ligand design was combined with a recently developed photoligation strategy to prepare hydrophilic CdSe-ZnS QDs with good control over the fraction of intact aldehyde (-CHO) groups per nanocrystal. We further applied the efficient hydrazone ligation to react aldehyde-QDs with 2-hydrazinopyridine (2-HP). This covalent modification produces QD-conjugates with a well-defined absorption feature at 350 nm ascribed to the hydrazone chromophore. We exploited this unique optical signature to accurately measure the number of aldehyde groups per QD when the fraction of LA-PEG-CHO per nanocrystal was varied. This allowed us to extract an estimate for the number of LA-PEG ligands per QD. These results suggest that hydrazone ligation has the potential to provide a simple and general analytical method to estimate the number of surface ligands for a variety of nanocrystals such as metal, metal oxide and semiconductor nanocrystals.

Keywords: Quantum dots, surface ligand counting, photo-ligation, hydrazone coupling, UV-spectroscopy, NMR spectroscopy

1. INTRODUCTION

The use of semiconductor nanocrystals (colloidal quantum dots) as multifunctional platforms for developing various applications in biology has grown steadily over the past two decade.[1-7] This was motivated by some of their unique optical and spectroscopic properties, which can be tuned by varying the nanocrystal size, shape and/or composition.[7-12] These materials combine high luminescence efficiency and excellent photo-chemical stability, which have made them suitable for various applications such as cellular labeling, deep tissue imaging, tracking and biochemical sensing.[3, 5, 13-15] Furthermore, because they have broad absorption profile and narrow and tunable emission ranging from the visible to the near infrared (IR) regions, it is possible to simultaneously excite different color nanocrystals with a single wavelength, making them suitable for multiplexing.[1, 7, 16] A common and robust method for synthesizing highly fluorescent QDs relies on the high temperature reduction of organometallic precursors in the presence of hydrophobic coordinating ligands.[17-23] As this growth route employs hydrophobic ligands to stabilize the nanocrystals in solutions, post-synthetic modification is required to make them compatible with biological media.

Cap exchange with coordinating ligands has been used by several groups to promote the dispersion of QDs and other inorganic nanocrystals in buffer media.[5, 24-30] This procedure provides good control over the

nature and number reactive groups on the nanocrystal surfaces. In recent years, poly(ethylene glycol) appended-thiol has become a popular motif to prepare water soluble, colloidally stable and biocompatible QDs via cap exchange methods.[5, 31, 32] For further functionalization of the QD surfaces, PEGylated ligands can be terminally modified with amine or carboxyl groups to facilitate coupling to biomolecules via traditional coupling chemistry (e.g., EDC/NHS).[24, 27, 33] However, to achieve an efficient coupling, rather large excesses of reagents are often used, which can produces cross-coupling, eventually leading to aggregate formation. Along with this issue, the quantification of these functional groups on the nanoparticles is still challenging. Only a few reports have attempted to address this challenge thus far. This issue is of great importance for the quantitative control over the surface reactivity in many biological applications. It is thus highly desirable to develop an effective method that provides quantitative information about the ligand density on the nanoparticles. The latter would allow determination of the number of biomolecules per nanocrystal (e.g., peptides, proteins, DNA), which is highly relevant for a variety of applications.

In recent years, new ligation strategies, such as sulfhydryl-maleimide conjugation and strain promoted azide-alkyne "click" addition reaction have been developed for attaching biomolecules onto the nanoparticles in a site selective manner.[33-39] These strategies show great advantage over conventional conjugation methods (such as EDC/NHS), including high reaction efficiency in aqueous media and high chemo-selectivity, which reduces cross coupling. An important development in the field of bio-conjugation is "hydrazone ligation". Reactive hydrazide groups can be introduced into proteins, peptides or other biomolecules through chemical modification, and the reaction of those hydrazide-modified molecules with aldehyde or ketone leads to the formation of a stable hydrazone structure. Specifically hydrazone resulting from aromatic aldehyde and hydrazinopyridine (aromatic hydrazide) have found great use owing to the rapid reaction kinetic (170 M^{-1} s^{-1} at neutral pH) in the micro molar regime and stability of this bond. Recently, our group has shown that poly-his tagged aldehyde linker can be used as a means to prepare aldehyde functionalized QDs for efficient hydrazone ligation.[40] We have shown that bidentate ligands made of borohydride-reduced lipoic acid appended with a short polyethylene glycol (LA-PEG) yields hydrophilic QDs with great colloidal stability. More recently, we have combined this design with a mild photochemically-driven strategy to ligate LA-PEG ligands onto CdSe-ZnS QDs, and further demonstrated that this route provides nanocrystals that can be easily functionalized with sensitive groups that are greatly important in biology.

Here, we report the synthesis of a new lipoic acid appended poly(ethylene glycol) ligand that contains an aldehyde terminal reactive group (LA-PEG-CHO) and its use for the surface functionalization of CdSe-ZnS QDs. We combine the design of LA-PEG-CHO with the above photoligation strategy to promote the dispersion of QDs in buffer media with good control over the fraction of intact -CHO groups per nanocrystal. This method shows great improvement over previous strategy where aldehydes were introduced onto the nanoparticles via post phase transfer using peptides.[40] The presence of aldehyde group on the nanocrystal surface has been verified using two analytical techniques: 1) ^{1}H NMR spectroscopy and 2) reaction of -CHO with 2-hydrazinopyridine (2-HP) followed by the UV-Vis absorption data analysis. The latter uses the optical signature of the covalent bond to extract an accurate measure of the number of aldehyde groups per QD. We have used

these techniques to extract an estimate for the total number of LA-PEG ligands per QD for a few distinct nanocrystal populations with different sizes. We also applied the same photoligation strategy to functionalize QDs with azide-modified LA-PEG ligands with preserved integrity of the reactive groups, and showed that the resulting QDs are suitable for strain promoted "click" addition reaction.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materials

Poly(ethylene glycol) (PEG) (average Mw: ~1000 Da), poly(ethylene glycol) methyl ether (average Mw: ~750 Da), Lipoic acid (LA), 2-Hydrozinopyridine (2-HP), 4-Formylbenzoic acid, N-hydroxysuccinimide (NHS), N,N-dicylohexylcarbodiimide (DCC), triphenylphosphine (PPh_3), triethylamine (Et_3N), tetramethylammonium hydroxide (TMAH), and organic solvents ($CHCl_3$, CH_3OH, hexane, etc.) were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Phosphate salts such as monosodium phosphate and disodium phosphate were also purchased from Sigma Chemicals. Deuterated solvents (e.g., D_2O) used for ^1H NMR experiments were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Column chromatography for purification was performed using silica gel (60 Å, 230−400 mesh, from Bodman Industries, Aston, PA). All chemical reactions reported here were performed under nitrogen atmosphere, unless otherwise stated. Moisture- and oxygen-sensitive solid materials were handled in a glovebox (MBraun Labmastersp).

2.2. Synthesis of LA-appended ligands

Three types of lipoic acid (LA)-based ligands were employed for the stabilization of CdSe-ZnS QDs relying on the photoligation strategy.[30, 41, 42] Each ligand contained one lipoic acid, a short poly(ethylene glycol) chain as a spacer and a terminal group made of -OCH_3, -CHO or -N_3. The synthetic routes to prepare LA-PEG_{750}-OCH_3 and LA-PEG_{1000}-N_3 have been detailed in previous literature (see Figure 1 for ligand structures).[24, 25] The synthesis of LA-PEG_{1000}-CHO required three steps starting from LA-PEG_{1000}-azide. First, the azide was converted to amine by adding triphenylphosphine to yield LA-PEG_{1000}-NH_2. Then, 4-Formylbenzoic acid was activated with DCC and NHS. The final LA-PEG-CHO was obtained by subsequent coupling with the LA-PEG_{1000}-NH_2.[25] Briefly, 4-FB-NHS (NHS ester of 4-Formylbenzoic acid), 0.21g, ~0.85 mmol) was dissolved in 20ml of DCM in a 100 ml two-necked round-bottom flask at room temperature. The solution was purged with nitrogen and then LA-PEG_{1000}-NH_2 (1.0 g, 1.27 mmol) dissolved in 20 ml of DCM was added dropwise using an addition funnel under nitrogen atmosphere. The reaction was left stirring at room temperature overnight. The residual DCM was evaporated, and the crude compound was chromatographed on silica gel with 20:1 (vol/vol) $CHCl_3$:MeOH as eluent to obtain the pure product. ^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 9.9 (s, 1H), 7.95 (d, 2H), 7.84 (d, 2H), 3.61-3.52 (m), 3.52-3.48 (b, 4H), 3.26 (s, 5H), 3.16-3.10 (m, 1H), 3.10-3.03 (m, 1H), 2.51-2.33 (m, 1H), 2.15 (t, J= 7.17, 2H), 1.91-1.82 (m, 1H), 1.68-1.59 (m, 1H), 1.58-1.45 (m, 3H), 1.35-1.26 (m, 2H).

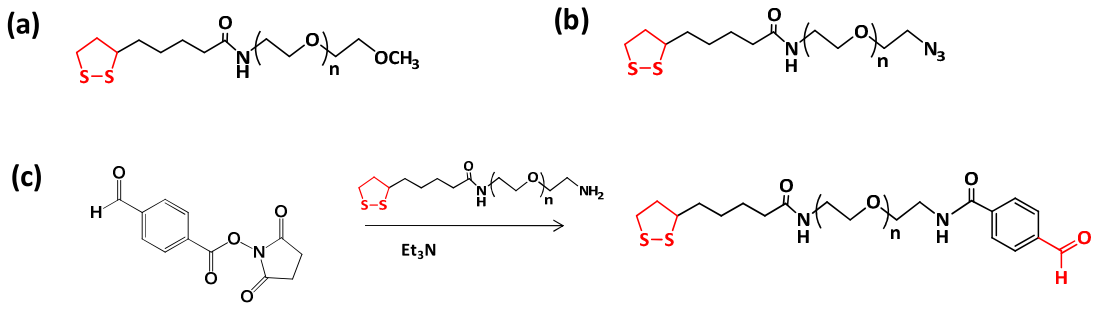


Figure 1. Chemical structure of (a) LA-PEG_{750}-OCH_3; (b) LA-PEG_{1000}-N_3; (c) Chemical structure and synthetic scheme of LA-PEG_{1000}-CHO described in this study.

2.3. Photoligation of the QDs with azide- and aldehyde-appended LA-PEG ligands

We used ZnS overcoated CdSe QDs emitting at 540 nm in this study. High quality CdSe-ZnS core-shell nanocrystals were grown using high temperature reduction of organometallic precursors (e.g., cadmium acetylacetonate and trioctylphosphine selenium) in a coordinating mixture of trioctyl phosphine (TOP), trioctyl phosphine oxide (TOPO), alkylamines and a small fraction n-hexylphosphonic acid (HPA).[17-19, 21, 43] Overcoating the CdSe core with a few monolayers of ZnS shell was also carried out at high temperature (~150 ^{0}C).

Phase transfer of the hydrophobic QDs was carried out using a photoligation strategy which relies on the in-situ photochemical transformation of the dithiolane ring (of lipoic acid group in the ligand) promoted by UV excitation, as described in our previous report.[41] This strategy was combined with mixed ligands to introduce a controlled fraction of reactive groups (e.g., aldehyde or azide) per QDs. Several dispersions of aldehyde- or azide-modified QDs were prepared s using this method.

2.4. Hydrazone ligation on photoligated QDs

First, in a scintillation vial we mixed 50 µl of 5% aldehyde-functionalized QDs (3.67 µM) and 7 µl of 2-Hydrozinopyridine solution pre-dissolved in DMF (at 1 mg/ml); 2-HP was added in excess with respect to the amount of aldehyde present on the QD surface. Then, 1443 µl of phosphate buffer (50 mM, pH 4.9) was added to the vial to increase the reaction rate. The total volume of the solution was maintained at 1500 µl, the temperature at ~37 ˚C with constant stirring for 2.5 hours, followed by overnight stirring at room temperature. After the reaction was complete, the solution was concentrated and the excess 2-HP was removed using a membrane filtration device (Amicon Ultra 50 kDa from Millipore). The dispersions were purified from excess unreacted 2-HP using one round of concentration/dilution using a centrifugal membrane filtration device (Amicon Ultra 50,000 Mw, from Millipore).

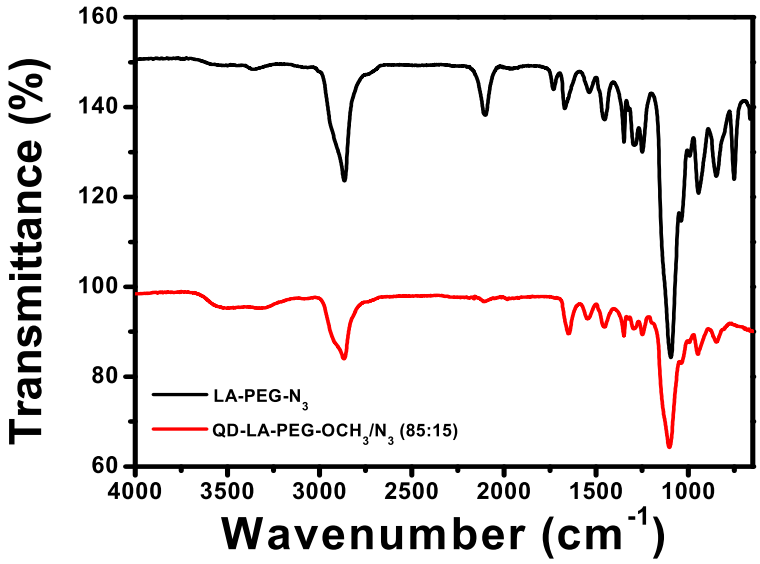


Figure 2. FTIR spectra of LA-PEG-N_3 ligand alone and QDs surface capped with a mixture of LA-PEG-N_3/LA-PEG-OCH_3. The azide signature is around 2000 cm^{-1}.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Ligand design

Our rationale of the ligand design was motivated by a desire to explore the use of a novel coupling strategy as means of introducing biological molecules on the QD surfaces via a rapid and highly chemoselective "click" reaction. We also wanted to exploit the conjugation strategy to extract an accurate estimate of the number of functional groups attached to a nanoparticle surface. This would allow us to extract an estimate for the density of surface ligands per CdSe-ZnS QDs.

3.2. Photoligation and phase transfer of QDs

We applied the above photoligation strategy to cap exchange CdSe-ZnS QDs with LA-PEG ligands and transfer them to aqueous media. This approach relies on the substitution of the native ligands (e.g., TOP/TOPO) with LA-PEG ligands under UV irradiation. It involves the photochemical transformation of the lipoic acid (opening of the disulfide ring) coupled with in-situ ligand exchange. An important advantage of this strategy is that it does not require the pre-transformation of the dithiolane ring of lipoic acid to dithiols (lipoic acid, LA, to dihydrolipoic acid, DHLA). Chemical reduction of LA is usually carried out using $NaBH_4$; but such transformation can alter the integrity of both azide and aldehyde groups. In contrast, photoligation is gentle and preserves the integrity of these groups. We applied this transfer strategy using a mixture of LA-PEG_{750}-OCH_3 and LA-PEG_{1000}-CHO or LA-PEG_{1000}-N_3 to introduce a controlled fraction of either group on the QD surfaces.

This is achieved by varying the molar fraction of LA-PEG$_{1000}$-CHO or LA-PEG$_{1000}$-N$_3$ with respect to the total amount of ligands added prior to UV irradiation.

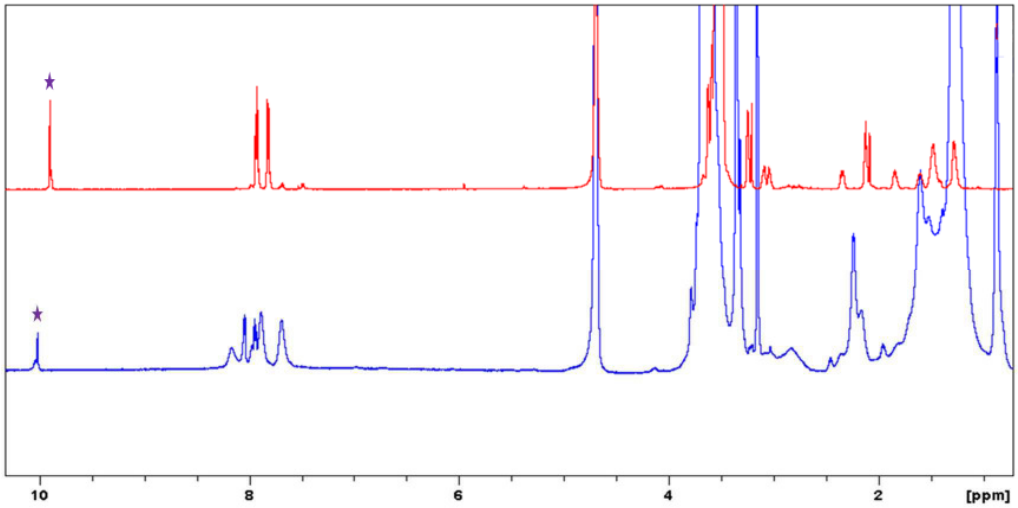


Figure 3. ^{1}H NMR spectra of LA-PEG-CHO ligand alone (red line) and QDs ligated with a mixture of LA-PEG-CHO/LA-PEG-OCH$_3$ (blue line), collected in D$_2$O. The asterisk indicates the presence of aldehyde functional group at ~ 10 ppm.

3.3. Characterization of the azide-functionalized QDs

The presence of azide groups on the QD surfaces was confirmed using FTIR spectroscopy. Figure 2 shows the presence of a distinct band around 2000 cm^{-1} ascribed to –N$_3$ group measured for both pure LA-PEG$_{1000}$-N$_3$ ligand and QDs photoligated with a mixture of 15% LA-PEG$_{1000}$-N$_3$ and 85% LA-PEG$_{750}$-OCH$_3$. The rather weak peak measured for the QD sample is due to a combination of low concentration of nanocrystals used during FTIR experiment and the small molar fraction of azide used (15% of the total ligands are made of LA-PEG-N$_3$).

3.4. Characterization of the aldehyde-functionalized QDs

The hydrazone ligation between aldehyde and hydrazine derivatives has been explored by several groups as an efficient and highly chemoselective coupling strategy.[44-48] In a previous report, we designed His$_6$-tagged peptide modified with terminal benzaldehyde, and self-assembled them onto DHLA-PEG-OCH$_3$-QDs (via metal-histidine conjugation) as a means of introducing aldehyde groups onto the nanocrystal surfaces. This route was employed to circumvent issues of degradation of the aldehyde groups when chemical reduction of LA-PEG-CHO in the presence of NaBH$_4$ is used. In this study, we relied on the photoligation strategy to functionalize QDs with aldehyde groups. The ^{1}H NMR spectra in Figure 3 show that there is a sharp peak at δ = 10.0 measured for a solution of LA-PEG$_{1000}$-CHO alone (pure ligand) and for dispersion of QDs photoligated with LA-PEG-OMe/LA-PEG-aldehyde mixture. This presents strong evidence that the use of an in-situ

photoligation preserves the integrity of the aldehyde after phase transfer. The spectral properties of the QDs were unaltered after the functionalization of QDs with aldehyde-modified ligand.

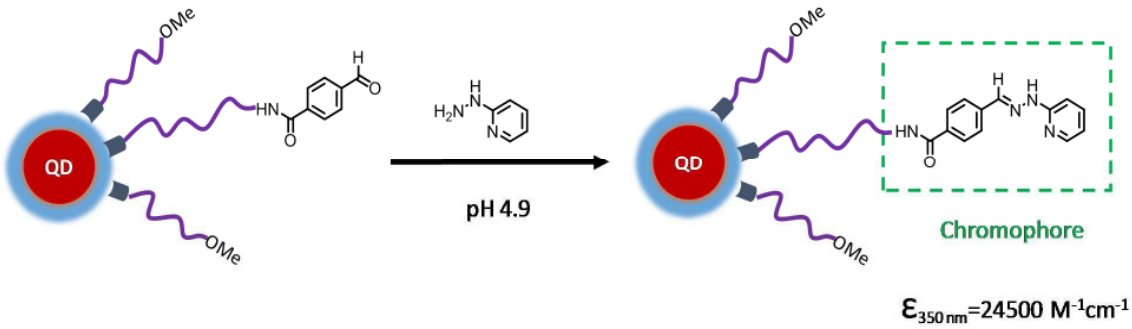


Figure 4. Schematic illustration of the strategy used to quantify the average number of LA-PEG-CHO ligated onto a QD by tracking the hydrazone ligation on the QD via spectrophotometric means.

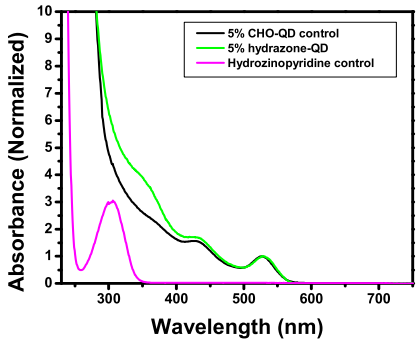


Figure 5. UV-vis spectra of 2-Hydrozinopyridne (2-HP)control and QDs photoligated with 5% LA-PEG-CHO and reacted with 2-HP. The increase of absorbance value at 350 nm is due to the hydrazone formation between aldehyde on the QD surfaces and the 2-Hydrozinopyridne.

3.5. Quantification of surface ligands using hydrazone ligation

Several dispersions of QDs (λ_{em}=540 nm) were prepared by photoligating TOP/TOPO-QDs with different mixtures of LA-PEG_{750}-OCH_3 and LA-PEG_{1000}-CHO at variable aldehyde-to-methoxy molar ratios. We then reacted these QDs with 2-HP, which leads to the formation of a hydrazone chromophores on the QD surface, resulting in the buildup of an optical feature at 350 nm (Figure 4). The hydrazone ligation reaction was carried out in pH 4.9 phosphate buffer; this condition was reported to provide more than 90% reaction yield for nano-molar nanocrystal concentration.[33, 40] The UV spectra collected form dispersions of CHO-modified QDs reacted with 2-HP (after the reaction was complete) show an net increase in the absorbance value at 350 nm with increasing molar fractions of aldehyde used (Figure 4); this is directly attributed to the hydrazone formation as anticipated. By comparing the absorbance values measured for the various dispersions and using the extinction coefficients of the hydrazone chromophore (25400 $M^{-1}cm^{-1}$at 350 nm) and the QDs ($7.85\times10^5 M^{-1}cm^{-1}$ at 350 nm), we were able to extract estimates for the number of LA-PEG_{1000}-CHO ligated per nanocrystal. The

data show that there is proportional increase in the measured absorbance with the fraction of aldehyde groups used during the ligand exchange step, indicating that number of hydrazone chromophores in the dispersion tracks the fraction of LA-PEG-aldehyde used during the ligation step. By normalizing the molar fraction of the aldehyde ligands to 100% we were able to extract a measure for the total number of LA-PEG ligands per QD (see Table 1). Using a QD radius of 3.5 nm we infer that the density of LA-PEG ligands on the QD surfaces is 1.3 ligands per nm^2.

Table 1. Quantification of the number of hydrazone chromophore per QDs (540 nm-emitting nanocrystals) along with the total number of ligands per nanoparticle extracted from the data shown in Figure 5 using the extinction coefficient of the QDs and hydrazone choromophore.

aldehyde (%)	# of hydrazone	# of ligands
5	10 ± 1	200 ± 20
8	16 ± 1	200 ± 12

4. CONCLUSION

We have designed and synthesized a new set of lipoic acid-based ligand presenting a disulfide anchoring group and a terminal group made of either an aldehyde or an azide, LA-PEG_{1000}-CHO or LA-PEG-N_3. Combining this ligand design with a newly-developed photoligation strategy yields aldehyde- or azide-functionalized QDs, where the integrity of the aldehyde and azide groups are fully preserved during the ligand exchange and phase transfer procedure. In particular, we have covalently coupled these aldehyde-functionalized QDs to 2-Hydrozinopyridine, and used the optical signature of the newly formed hydrazone choromophore to track the correlation between the molar fraction of LA-PEG-aldehyde used during ligand exchange and the number of choromopres per QD measured. We then used those data to extract a measure of the ligand density on the QDs.

REFERENCES

[1] C. B. Murray, C. R. Kagan, and M. G. Bawendi, "Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies," Annual Review of Materials Science, 30, 545-610 (2000).

[2] H. Mattoussi, G. Palui, and H. B. Na, "Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes," Advanced Drug Delivery Reviews, 64(2), 138-166 (2012).

[3] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin *et al.*, "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels," Science, 281(5385), 2013-2016 (1998).

[4] P. Zrazhevskiy, M. Sena, and X. H. Gao, "Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery," Chemical Society Reviews, 39(11), 4326-4354 (2010).

[5] W. H. Liu, A. B. Greytak, J. Lee *et al.*, "Compact Biocompatible Quantum Dots via RAFT-Mediated Synthesis of Imidazole-Based Random Copolymer Ligand," Journal of the American Chemical Society, 132(2), 472-483 (2010).
[6] J. Cheon, [Inorganic nanoprobes for biological sensing and imaging] Artech House, (2009).
[7] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman *et al.*, "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing," Nature Materials, 4(6), 435-446 (2005).
[8] A. L. Efros, and M. Rosen, "THE ELECTRONIC STRUCTURE OF SEMICONDUCTOR NANOCRYSTALS," Annual Review of Materials Science, 30(1), 475 (2000).
[9] V. I. Klimov, [Nanocrystal Quantum Dots] CRC Press, (2010).
[10] S. V. Gaponenko, [Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals] Cambridge University Press, (1998).
[11] D. V. Talapin, J.-S. Lee, M. V. Kovalenko *et al.*, "Prospects of Colloidal Nanocrystals for Electronic and Optoelectronic Applications," Chemical Reviews, 110(1), 389-458 (2009).
[12] L. Qu, and X. Peng, "Control of Photoluminescence Properties of CdSe Nanocrystals in Growth," Journal of the American Chemical Society, 124(9), 2049-2055 (2002).
[13] D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams *et al.*, "Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo," Science, 300(5624), 1434-1436 (2003).
[14] P. T. Snee, R. C. Somers, G. Nair *et al.*, "A ratiometric CdSe/ZnS nanocrystal pH sensor," Journal of the American Chemical Society, 128(41), 13320-13321 (2006).
[15] X. H. Gao, Y. Y. Cui, R. M. Levenson *et al.*, "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots," Nature Biotechnology, 22(8), 969-976 (2004).
[16] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila *et al.*, "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics," Science, 307(5709), 538-544 (2005).
[17] C. B. Murray, D. J. Norris, and M. G. Bawendi, "Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse Cde (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites," Journal of the American Chemical Society, 115(19), 8706-8715 (1993).
[18] B. O. Dabbousi, J. RodriguezViejo, F. V. Mikulec *et al.*, "(CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites," Journal of Physical Chemistry B, 101(46), 9463-9475 (1997).
[19] M. A. Hines, and P. Guyot-Sionnest, "Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-Capped CdSe nanocrystals," Journal of Physical Chemistry, 100(2), 468-471 (1996).
[20] X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich *et al.*, "Epitaxial Growth of Highly Luminescent CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals with Photostability and Electronic Accessibility," Journal of the American Chemical Society, 119(30), 7019-7029 (1997).
[21] Z. A. Peng, and X. G. Peng, "Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor," Journal of the American Chemical Society, 123(1), 183-184 (2001).
[22] L. Qu, Z. A. Peng, and X. Peng, "Alternative Routes toward High Quality CdSe Nanocrystals," Nano Letters, 1(6), 333-337 (2001).
[23] A. R. Clapp, E. R. Goldman, and H. Mattoussi, "Capping of CdSe-ZnS quantum dots with DHLA and subsequent conjugation with proteins," Nat. Protocols, 1(3), 1258-1266 (2006).
[24] K. Susumu, H. T. Uyeda, I. L. Medintz *et al.*, "Enhancing the stability and biological functionalities of quantum dots via compact multifunctional ligands," Journal of the American Chemical Society, 129(45), 13987-13996 (2007).
[25] K. Susumu, B. C. Mei, and H. Mattoussi, "Multifunctional ligands based on dihydrolipoic acid and polyethylene glycol to promote biocompatibility of quantum dots," Nature Protocols, 4(3), 424-436 (2009).

[26] H. T. Uyeda, I. L. Medintz, J. K. Jaiswal *et al.*, "Synthesis of compact multidentate ligands to prepare stable hydrophilic quantum dot fluorophores," Journal of the American Chemical Society, 127(11), 3870-3878 (2005).
[27] W. Liu, M. Howarth, A. B. Greytak *et al.*, "Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging," Journal of the American Chemical Society, 130(4), 1274-1284 (2008).
[28] E. Muro, A. Fragola, T. Pons *et al.*, "Comparing Intracellular Stability and Targeting of Sulfobetaine Quantum Dots with Other Surface Chemistries in Live Cells," Small, 8(7), 1029-1037 (2012).
[29] E. Giovanelli, E. Muro, G. Sitbon *et al.*, "Highly Enhanced Affinity of Multidentate versus Bidentate Zwitterionic Ligands for Long-Term Quantum Dot Bioimaging," Langmuir, 28(43), 15177-15184 (2012).
[30] N. Zhan, G. Palui, M. Safi *et al.*, "Multidentate Zwitterionic Ligands Provide Compact and Highly Biocompatible Quantum Dots," Journal of the American Chemical Society, 135(37), 13786-13795 (2013).
[31] P. F. Zhang, S. H. Liu, D. Y. Gao *et al.*, "Click-Functionalized Compact Quantum Dots Protected by Multidentate-Imidazole Ligands: Conjugation-Ready Nanotags for Living-Virus Labeling and Imaging," Journal of the American Chemical Society, 134(20), 8388-8391 (2012).
[32] K. Susumu, E. Oh, J. B. Delehanty *et al.*, "A New Family of Pyridine-Appended Multidentate Polymers As Hydrophilic Surface Ligands for Preparing Stable Biocompatible Quantum Dots," Chemistry of Materials, 26(18), 5327-5344 (2014).
[33] G. T. Hermanson, [Bioconjugate techniques] Academic press, (2013).
[34] E. Oh, K. Susumu, J. Blanco‐Canosa *et al.*, "Preparation of Stable Maleimide‐Functionalized Au Nanoparticles and Their Use in Counting Surface Ligands," Small, 6(12), 1273-1278 (2010).
[35] H. S. Han, N. K. Devaraj, J. Lee *et al.*, "Development of a Bioorthogonal and Highly Efficient Conjugation Method for Quantum Dots Using Tetrazine-Norbornene Cycloaddition," Journal of the American Chemical Society, 132(23), 7838-+ (2010).
[36] G. Palui, H. B. Na, and H. Mattoussi, "Poly(ethylene glycol)-Based Multidentate Oligomers for Biocompatible Semiconductor and Gold Nanocrystals," Langmuir, 28(5), 2761-2772 (2012).
[37] A. Bernardin, A. Cazet, L. Guyon *et al.*, "Copper-Free Click Chemistry for Highly Luminescent Quantum Dot Conjugates: Application to in Vivo Metabolic Imaging," Bioconjugate Chemistry, 21(4), 583-588 (2010).
[38] P. Zhang, S. Liu, D. Gao *et al.*, "Click-Functionalized Compact Quantum Dots Protected by Multidentate-Imidazole Ligands: Conjugation-Ready Nanotags for Living-Virus Labeling and Imaging," Journal of the American Chemical Society, 134(20), 8388-8391 (2012).
[39] J. D. Gregory, "The Stability of N-Ethylmaleimide and its Reaction with Sulfhydryl Groups," Journal of the American Chemical Society, 77(14), 3922-3923 (1955).
[40] J. B. Blanco-Canosa, I. L. Medintz, D. Farrell *et al.*, "Rapid Covalent Ligation of Fluorescent Peptides to Water Solubilized Quantum Dots," Journal of the American Chemical Society, 132(29), 10027-10033 (2010).
[41] G. Palui, T. Avellini, N. Zhan *et al.*, "Photoinduced phase transfer of luminescent quantum dots to polar and aqueous media," Journal of the American Chemical Society, 134(39), 16370-8 (2012).
[42] N. Zhan, G. Palui, H. Grise *et al.*, "Combining Ligand Design with Photoligation to Provide Compact, Colloidally Stable, and Easy to Conjugate Quantum Dots," ACS Applied Materials & Interfaces, 5(8), 2861-2869 (2013).

[43] Z. A. Peng, and X. Peng, “Nearly Monodisperse and Shape-Controlled CdSe Nanocrystals via Alternative Routes: Nucleation and Growth,” Journal of the American Chemical Society, 124(13), 3343-3353 (2002).
[44] A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng *et al.*, “Nucleophilic Catalysis of Hydrazone Formation and Transimination: Implications for Dynamic Covalent Chemistry,” Journal of the American Chemical Society, 128(49), 15602-15603 (2006).
[45] A. Dirksen, and P. E. Dawson, “Rapid Oxime and Hydrazone Ligations with Aromatic Aldehydes for Biomolecular Labeling,” Bioconjugate Chemistry, 19(12), 2543-2548 (2008).
[46] E. T. Kool, D.-H. Park, and P. Crisalli, “Fast Hydrazone Reactants: Electronic and Acid/Base Effects Strongly Influence Rate at Biological pH,” Journal of the American Chemical Society, 135(47), 17663-17666 (2013).
[47] X. Wang, and J. W. Canary, “Rapid Catalyst-Free Hydrazone Ligation: Protein-Pyridoxal Phosphoramides,” Bioconjugate Chemistry, 23(12), 2329-2334 (2012).
[48] J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi, “Chemistry in living systems,” Nat Chem Biol, 1(1), 13-21 (2005).

7.7.4 Tailoring the ligand shell for the control of cellular uptake and optical properties of nanocrystals

Diese Kurzzusammenfassung der Publikationen, die vom Arbeitskreis Weller im Rahmen des Schwerpunktprogrammes der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SPP 1313) publiziert wurden, wurde maßgeblich von Dr. Johannes Ostermann verfasst. Mein Beitrag war teilweise die Konzeptionierung und Durchführung einiger Ergebnisse sowie der Literaturvergleich. Weiterhin war ich am Erstellen des Manuskriptes beteiligt. ©2015 Ostermann et al; licensee Beilstein-Institut. [9]

BEILSTEIN JOURNAL OF NANOTECHNOLOGY

Tailoring the ligand shell for the control of cellular uptake and optical properties of nanocrystals

Johannes Ostermann[1], Christian Schmidtke[1], Christopher Wolter[1], Jan-Philip Merkl[1], Hauke Kloust[1] and Horst Weller[*1,2,3,4]

Review

Open Access

Address:
[1]Institute for Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany, [2]Center for Applied Nanotechnology, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany, [3]The Hamburg Centre for Ultrafast Imaging, University of Hamburg, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany and [4]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia

Email:
Horst Weller[*] - weller@chemie.uni-hamburg.de

* Corresponding author

Keywords:
biolable; cellular uptake; fluorescence quenching; poylmeric micelles; quantum dots

Beilstein J. Nanotechnol. **2015,** *6,* 232–242.
doi:10.3762/bjnano.6.22

Received: 30 May 2014
Accepted: 12 December 2014
Published: 21 January 2015

This article is part of the Thematic Series "Biological responses to NPs".

Guest Editor: R. Zellner

© 2015 Ostermann et al; licensee Beilstein-Institut.
License and terms: see end of document.

Abstract

In this short review, the main challenges in the use of hydrophobic nanoparticles in biomedical application are addressed. It is shown how to overcome the different issues by the use of a polymeric encapsulation system, based on an amphiphilic polyisoprene-*block*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer. On the basis of this simple molecule, the development of a versatile and powerful phase transfer strategy is summarized, focusing on the main advantages like the adjustable size, the retained properties, the excellent shielding and the diverse functionalization properties of the encapsulated nanoparticles. Finally, the extraordinary properties of these encapsulated nanoparticles in terms of toxicity and specificity in a broad in vitro test is demonstrated.

Introduction

One of the main challenges in using high quality nanoparticles for biological applications is to ensure that the ligand system surrounding the particles fulfills specific requirements [1]. On the one hand the ligands have to stabilize the particles at high dilution in aqueous media, be non-toxic and provide a good shielding against biological conditions (e.g., ions, peptides, enzymes). On the other hand the control over the size and functionality is desirable to study even these properties in the interaction between nanoparticles and biological material. Furthermore, the extraordinary properties of the nanoparticles should be retained during the phase transfer. Many different approaches for the phase transfer of hydrophobic nanoparticles have been described and analyzed concerning their behavior in biological media. Several excellent reviews of these methods

can be found in the literature, very prominent and recent ones can be found in [2,3]. The here summarized phase transfer approach is based on amphiphilic diblock copolymers and meets most of the above mentioned requirements. Therefore amphiphilic diblock copolymers have been intensively discussed in drug delivery applications [4-6]. Due to the covalent connection of two chemically incompatible polymer blocks, these polymers show an interesting aggregation behavior in solvents, which are selective for only one of the blocks [7]. The formation of polymeric vesicles (polymerosomes) and spherical micelles is an interesting tool for the encapsulation of hydrophobic nanoparticles and since the critical micelle concentration (CMC) is comparatively low [8,9], a high stability against dilution can be achieved. By carefully choosing the monomers, reaction conditions and block length ratios it is possible to reproducibly synthesize very defined ligands, using anionic polymerization techniques [10]. One advantage of this reaction type is the absence of chain transfer and termination reactions, which gives the opportunity to easily functionalize the polymer chains using specific terminating reagents [11,12]. In this short review we summarize our experiences with amphiphilic diblock copolymers for the encapsulation of inorganic nanoparticles for their use in biomedical application and show how the cellular response can be tuned by tailoring the molecular properties of the polymer ligands.

A typical hydrophilic polymer ligand which is used for the coating of nanoparticles [13,14] and in the drug application [15] is poly(ethylene glycol) (PEG). PEG has already proven to be non-toxic and to minimize unspecific interactions with the immune system, resulting in enhanced blood circulation times of so-called PEGylated drugs [16-18]. For the second block, polyisoprene is a suitable material due to its incompatibility with PEG, which ensures a good formation of self-assembled vesicles and micelles in water, depending on the chosen block length ratio [19]. The high amount of present double bonds in the micelle core offers the possibility of radically initiated cross-linking of the structures or even microemulsion polymerizations to produce very dense capsules.

Review

Ligand synthesis

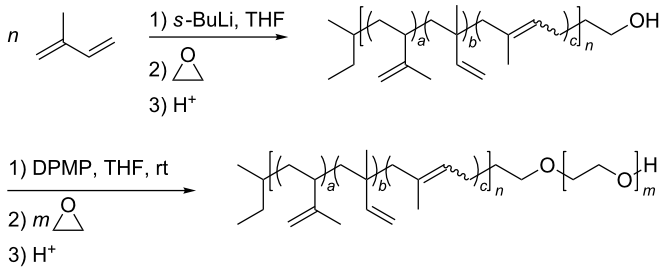
The synthesis of amphiphilic polyisoprene-*block*-poly(ethylene glycol) (PI-*b*-PEG) was realized via anionic polymerization, using standard high vacuum reaction techniques [10,20]. Isoprene was polymerized in dry THF by the quick addition of *sec*-butyllithium at −40 °C. After completion of the reaction, the living anion was functionalized by the addition of ethylene oxide and subsequent quenching with acetic acid to obtain an alcohol functionalized polyisoprene (PI). In the following step, the terminal hydroxy group was deprotonated with diphenyl methyl potassium (DPMP) to obtain a solvate separated ion pair, which is capable of starting the polymerization of ethylene oxide at room temperature (Scheme 1). Using this reaction path a variety of PI homopolymers and PI-*b*-PEG diblock copolymers differing in size and block length ratio were synthesized (Table 1).

Table 1: Analytical data of synthesized PI-*b*-PEG diblock copolymers.

Name	M_n[a]	M_w[a]	M_w/M_n[a]	wt % PEG[b]
PI-*b*-PEG 1	2200	2800	1.27	42
PI-*b*-PEG 2	2700	3000	1.11	51
PI-*b*-PEG 3	4300	4700	1.07	68
PI-*b*-PEG 4	5900	6300	1.07	70
PI-*b*-PEG 5	6600	8100	1.22	73
PI-*b*-PEG 6	9000	9900	1.09	65
PI-*b*-PEG 7	10000	11300	1.13	75
PI-*b*-PEG 8	10500	11900	1.13	67
PI-*b*-PEG 9	13400	14300	1.07	70
PI-*b*-PEG 10	13700	14200	1.04	65

[a]By SEC measurements, using PEG standards. [b]Calculated by NMR measurements.

The aggregation of the PI-*b*-PEGs in water was investigated and showed the expected behavior depending on the size and block length ratio of the polymer [19]. The analytical data of the used characterization methods like dynamic light scattering (DLS)



Scheme 1: Reaction scheme of the PI-*b*-PEG diblock copolymer synthesis.

and fluorescence microscopy are summarized in Figure 1. As can be seen from the microscope image, the PI-*b*-PEG with 42 wt % PEG forms unilamellar vesicles in water in a size range between 2 and 5 µm. The sample containing 51 wt % PEG shows a big hydrodynamic diameter of about 250 nm with a broad size distribution in the DLS measurements (Figure 1B). This could be attributed to the formation of cylindrical or wormlike micelles, especially if these results are compared to the measurements of the other PI-*b*-PEG aggregates in water, which show much smaller hydrodynamic diameters with a good correlation between the polymer and the micelles size (Figure 1C).

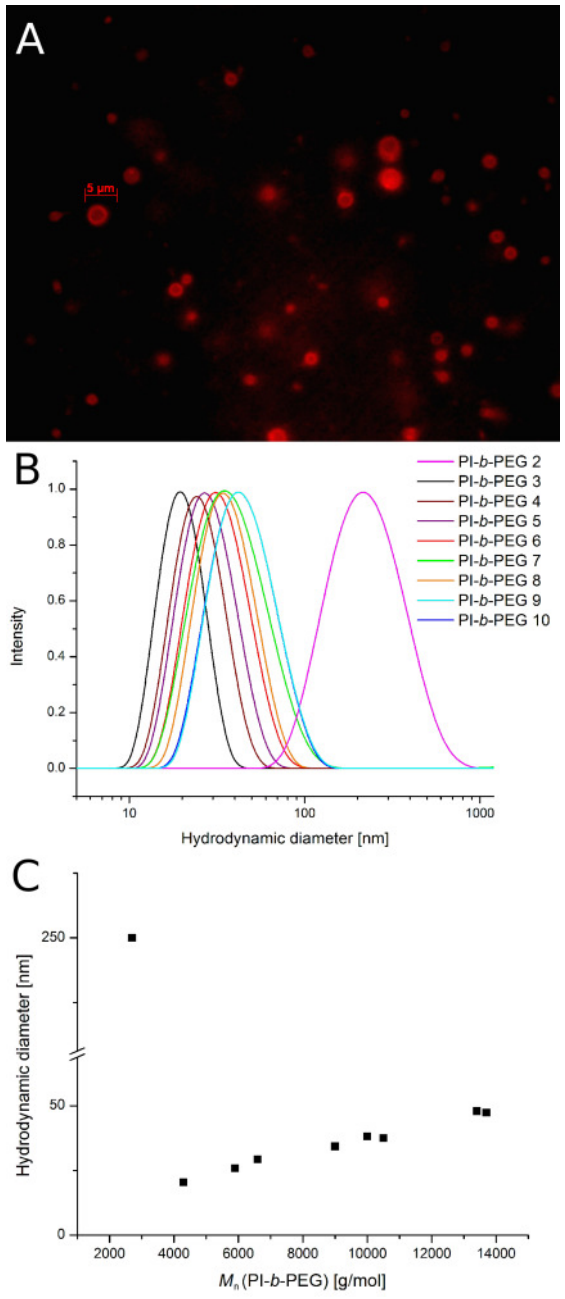


Figure 1: Fluorescence microscopy image of vesicles from PI-*b*-PEG 1 in water, the bilayer was visualized using the hydrophobic dye Nile Red (A); Size distribution of the micelles build from PI-*b*-PEG 2 – PI-*b*-PEG 10 in water, determined by DLS measurements (B); Correlation between the molecular weight of the PI-*b*-PEG and the build micelles (C).

The CMC values of the polymers were determined based on the varying fluorescence properties of pyrene, depending on the polarity of the surrounding medium [21]. The values correlate well with the polymer size and lie between 6.0×10^{-7} M for the smallest and 1.5×10^{-7} M for the biggest polymer.

Encapsulation methods for nanoparticles

As shown before a multiplicity of PI-*b*-PEG ligands can be synthesized using living anionic polymerization. In this part the focus is set on the use of different PI-*b*-PEGs and the effect of these different molecules on the physical properties of the obtained nanocontainers. The encapsulation of inorganic nanoparticles has been shown to depend on several parameters, like the ratio between ligands and particles or the surface chemistry of the particles. In this review the discussion is limited to the encapsulation of highly fluorescent QDs in PI-*b*-PEG for the use in biological systems. Since cellular uptake mechanisms except from phagocytosis are known to work best with small structures below 150 nm [22], only spherical micelles fulfilling this requirement will be discussed.

To ensure a good compatibility between the hydrophobic particles and the inner core of the final micellar container, a partial ligand exchange with a diethylene-triamine functionalized PI (PI-DETA; see Figure 2) is conducted, usually in the range of 1000 g/mol up to 3000 g/mol, but also bigger PI-DETA have already been used successfully.

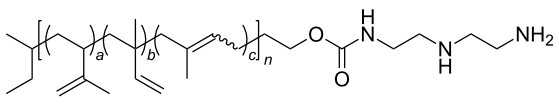


Figure 2: Illustration of the diethylene-triamine functionalized PI (PI-DETA).

After the PI coating, the QDs are dissolved in THF, mixed with the PI-*b*-PEG and are injected into a 10-fold excess of water, followed by heating to 80 °C for several hours to remove the THF. Depending on the required density of the nanocontainer, a radical initiator can be added to partially cross-link the double bonds of the PI core. The addition of the radical initiator has

shown to drastically enhance the fluorescence properties, namely the fluorescence quantum efficiency, of encapsulated CdSe/CdS/ZnS and CdSe/$Cd_xZn_{(1-x)}$S/ZnS core–shell–shell quantum dots (QDs). This enhancement can be explained to a certain extent by the cross-linking of the micelles but further investigations showed a radical mediated annealing of the particle surface and crystal structure leading to a more crystalline ZnS shell with less defects [23].

The presented micellar encapsulation process worked very well and reproducibly with all PI-*b*-PEG diblock copolymers independently of the molecular weight. The fluorescence properties like the characteristic narrow emission band or the absorption maximum of the QDs did not change due to the phase transfer, as can be seen from Figure 3B. In fact, it was not only possible to conserve the particles properties, but to also to keep the correlation between the molecular weight of the polymer and the hydrodynamic diameter of the final construct containing the fluorescing QDs. The associated results from DLS measurement are shown in Figure 3A.

The enhanced stability of the cross-linked nanocontainers was proven by dilution experiments, in which native QDs in chloroform, QDs in a regular PI-*b*-PEG micelle in water and QDs in a cross-linked micelle in water were stepwise diluted until the fluorescence of the particles ceased due to aggregation or the collapsing of the ligand system. The particles in cross-linked micelles showed an increased stability against dilution, which was a magnitude higher than for the regular micelles and the native ligands as can be seen in Figure 4 [25]. Furthermore cross-linked micelles hindered ion-accessibility on QDs as is discussed in the following section.

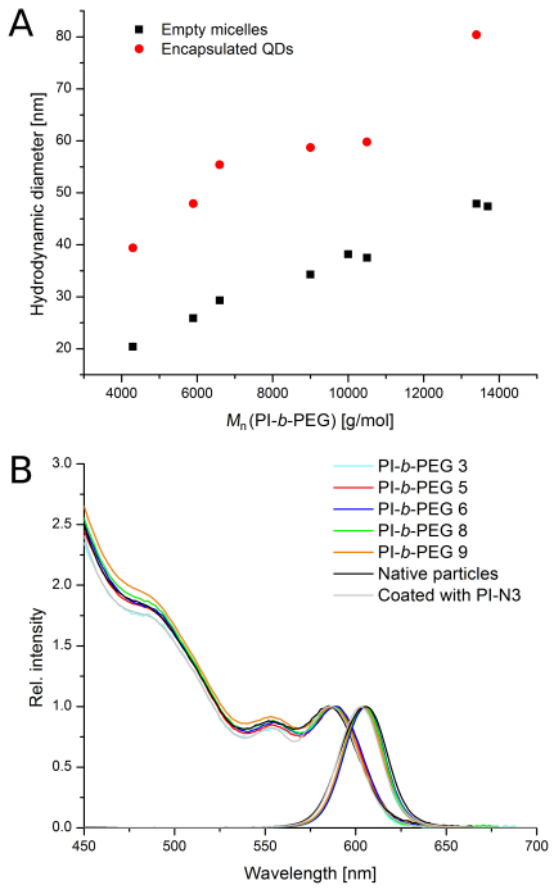


Figure 3: Conserved correlation between the molecular weight of the PI-*b*-PEG and the size of empty micelles (black squares) and encapsulated QDs (red dots) (A); Absorption and emission spectra for native and PI-DETA coated QDs in organic and QDs encapsulated in different PI-*b*-PEGs (B) [24].

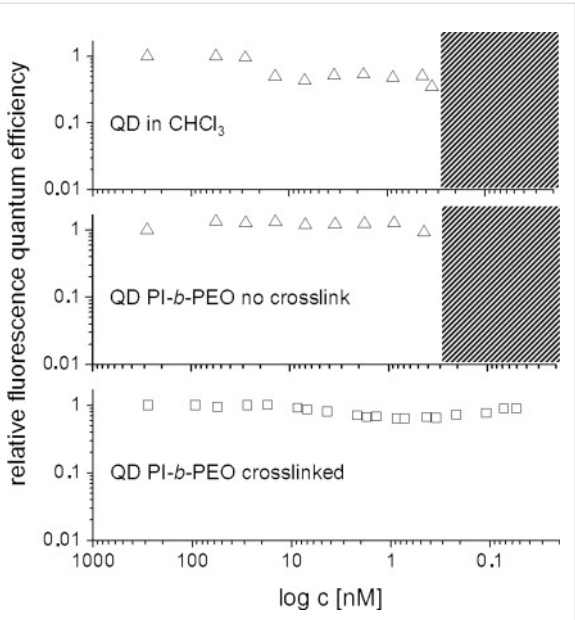


Figure 4: Fluorescence quantum efficiency in dependence of the dilution. At the top for native QDs in $CHCl_3$, in the middle for QDs in non-cross-linked micelles and at the bottom the increased stability against dilution for the QDs in cross-linked micelles. Reprinted with permission from [25]. Copyright 2012 American Chemical Society.

To produce an even denser hydrophobic core region a seeded emulsion polymerization has been developed, in which additional monomer like styrene, isoprene and divinylbenzene are added as a cross-linking reagent after the micellar encapsulation and polymerized in the hydrophobic core [26]. The monomers react with the double bonds of the PI forming a covalently coupled dense shell. Figure 5 shows the whole encapsulation process, including the possible cross-linking and seeded emulsion polymerization steps.

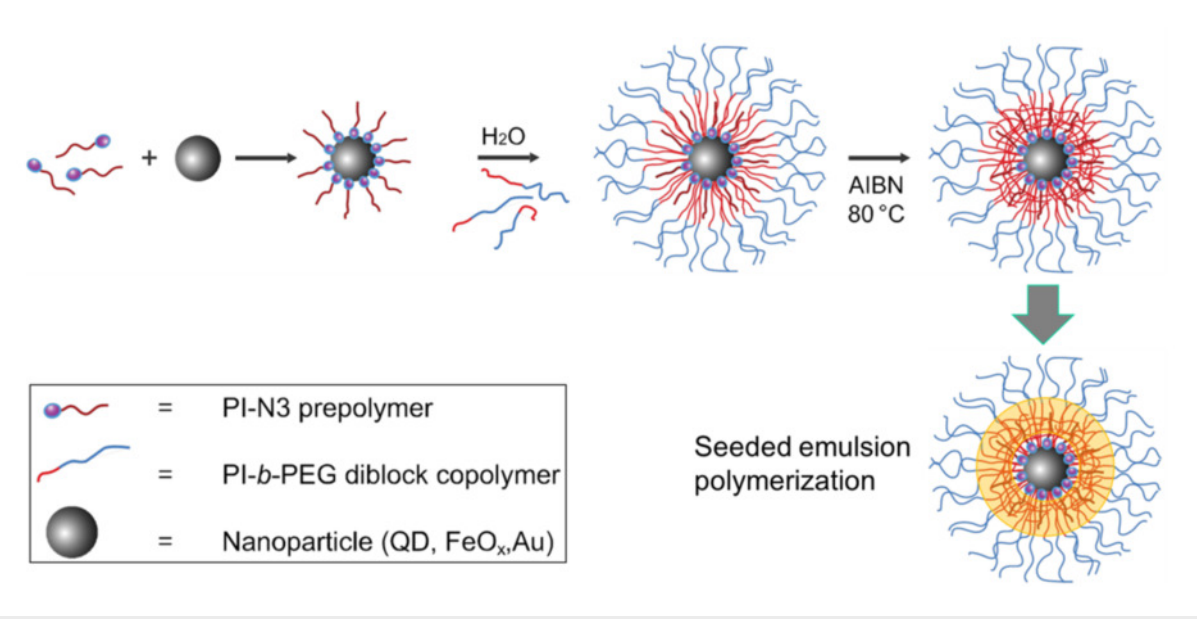


Figure 5: Schematic presentation of the encapsulation of inorganic nanoparticles in a nanocontainer, based on PI-*b*-PEG including optional cross-linking and seeded emulsion polymerization steps for a higher density of the core region. Reproduced with permission from [27]. Copyright 2013 The Royal Society of Chemistry.

A very powerful and sensitive tool to test the density of the nanocontainers is fluorescence quenching with small organic molecules or ions to simulate biological conditions. The big variety of options before, during and after the encapsulation has a strong influence on the properties of the final nanocontainer. As for the stability against dilution, the radically initiated cross-linking has a positive influence on the shielding properties of the micelle around the encapsulated nanoparticles. This can be seen from the experiments performed by Schmidtke et al. in which iron(III) ions and methylviologene were added stepwise to a solution of cross-linked and non-cross-linked QDs. Fluorescence quenching was less pronounced in the case of cross-linked micelles indicating hindered diffusion towards the QD and therefore a denser shell [23]. A strong enhancement of the density could also be observed in the case of QDs stabilized by emulsion polymerization [26].

Finally, the used polymers and ratios between QDs and the polymer have a strong influence on the shielding against ions, as can be seen in Figure 6. By using the differently sized PI-*b*-PEG diblock copolymers for the encapsulation of QDs a strong correlation between the polymer size and the density of the micellar core can be observed [24]. Since the hydrophobic region is thought to have the biggest influence on the shielding, samples using differently sized PI-DETA ligands, but the same mid-sized PI-*b*-PEG (5900 g/mol) were produced. Again, a strong correlation between the size of the PI-DETA and the shielding can be observed, which confirms the assumptions concerning the importance of the hydrophobic core region. Finally, the amount of ligand molecules per QD has to be chosen carefully. Merkl et al. showed the importance of a properly chosen ligand to QD ratio in fluorescence quenching experiments, using a 6600 g/mol PI-*b*-PEG. A clear trend can be observed as the fluorescence is less quenched, the more ligands are present around the particles, although this trend is only valid to a certain extent of ligand excess [28]. It has to be noted, that these experiments were performed, using different types of QDs so the results are not directly comparable. However, the trends for all three experiments are very strong and reproducible. Further results obtained from quenching experiments based on PEG- and PI-*b*-PEG ligand systems, including a branched polymer of the type PI-*b*-$(PEG)_2$ can be found elsewhere [13,24,28,29].

Taking advantage of the drastically increased shielding against quenching ions like copper, first experiments using copper catalyzed azide–alkyne cycloaddition (Click chemistry) have proven the possibility to functionalize PI-*b*-PEG encapsulated QDs, retaining their fluorescence properties [26,30]. This superior property opens new paths in functionalization possibilities for this type of nanocontainers additional to the subsequently presented strategies.

Functionalization properties

For the biological use of encapsulated nanoparticles functionalizing of the capsules with relevant molecules (sugars, peptides),

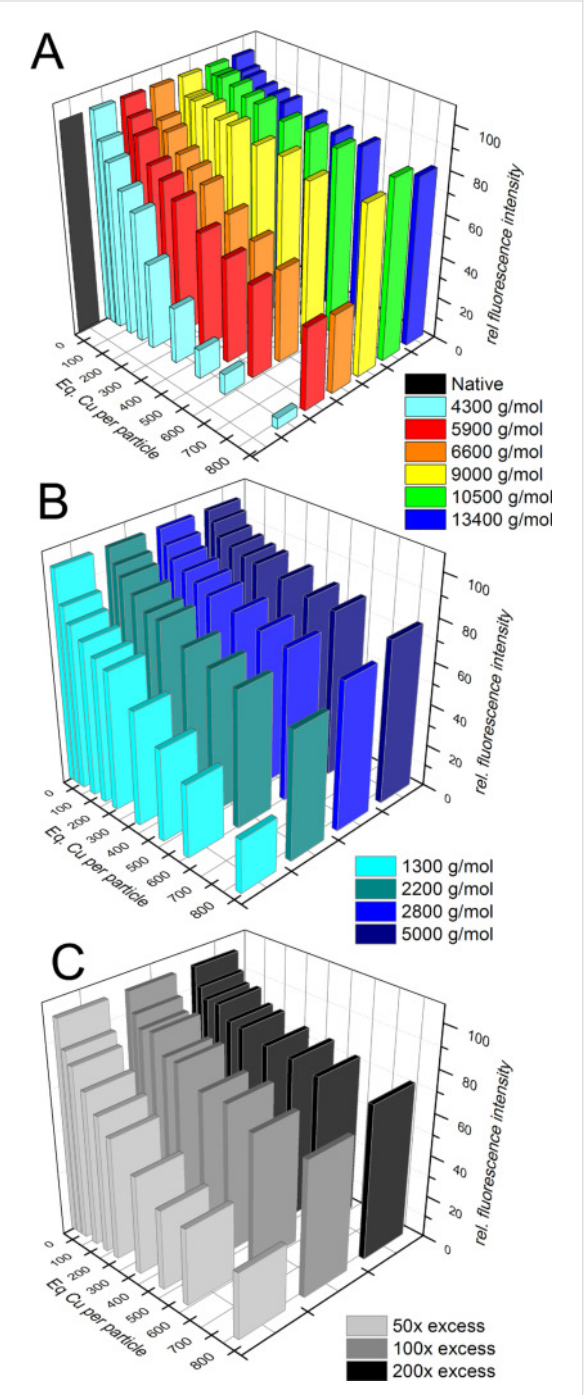


Figure 6: Relative fluorescence intensity of QDs after the addition of aliquots of Cu^{2+}. Coated with a 1300 g/mol PI-DETA and encapsulated in PI-*b*-PEG of different molecular weights (A) (Reprinted with permission from [24]. Copyright 2013 American Chemical Society); coated with differently sized PI-DETA and encapsulated in a PI-*b*-PEG with a M_N of 5900 g/mol (B); coated with a 1300 g/mol PI-DETA and encapsulated in a PI-*b*-PEG of 6600 g/mol, using different excesses (C) during phase transfer (Figure reproduced with permission from [28]. Copyright 2014 Society of Photo Optical Instrumentation Engineers).

proteins or DNA is required. The most common coupling strategies are based on specific chemical groups like amines, carboxyl and hydroxyl functions [31]. Functional groups are not only useful for typical coupling strategies of biomolecules, but also for the determination of the surface properties of the final nanocontainers. Differently charged particles show different unspecific interactions with cells, like macrophages, epithelic or endothelic cells [32]. For macrophages the internalization process follows the typical steps of phagocytosis, which is controlled by the adsorption of specific proteins on the surface of the nanocontainer. Hydrophobic and charged particles in general (positively or negatively) show a much more efficient adsorption of these proteins needed for the recognition by macrophages [33,34]. Other cell types follow the endocytotic process, which can be receptor mediated or unspecific. For the uptake via endocytosis a positive surface charge has shown to enhance the cellular uptake, due to the attractive interaction with the negatively charged cell membrane [35,36]. Therefore, control over the surface chemistry is crucial to study the nanocontainers behavior in vitro and in vivo.

Figure 7 shows possible functionalization of PI-*b*-PEG prior to the encapsulation of nanoparticles which were realized so far [30]. These functionalization reactions can be subdivided into two different types, the functionalization by termination of the anionic polymerization and the modification after the anionic polymerization.

By the termination of the living alkoxide with α-halogen or succinic anhydride compounds several useful groups for subsequent coupling strategies are easily accessible in a Williamson ether synthesis. Using this approach, carboxy-, amine-, alkyne-, epoxide- and methoxide-functionalized PI-*b*-PEG could be obtained. The typical termination with acetic acid leads to the formation of hydroxy-functionalized PI-*b*-PEG, which can be further functionalized by known procedures for the functionalization of PEG [37,38]. Via this approach PI-*b*-PEGs bearing a biotin and a sugar as first examples for small biological molecules were accessible. A detailed overview about glycol-conjugated strategies using click chemistry is provided in [39].

The encapsulation of inorganic nanoparticles like iron oxide particles or QDs in the as functionalized PI-*b*-PEGs did not change the properties of the material, as it has already been observed for regular PI-*b*-PEG. This indicates, that the functional groups embedded on the outer part of the micelle do not interact significantly with the surface of the inorganic NP. In contrast, the surface charge was influenced by the end-group of the polymer as it was expected. This could be proven by zeta potential measurements in deionized water, as can be seen in Figure 8. The charge could be adjusted between −35 and

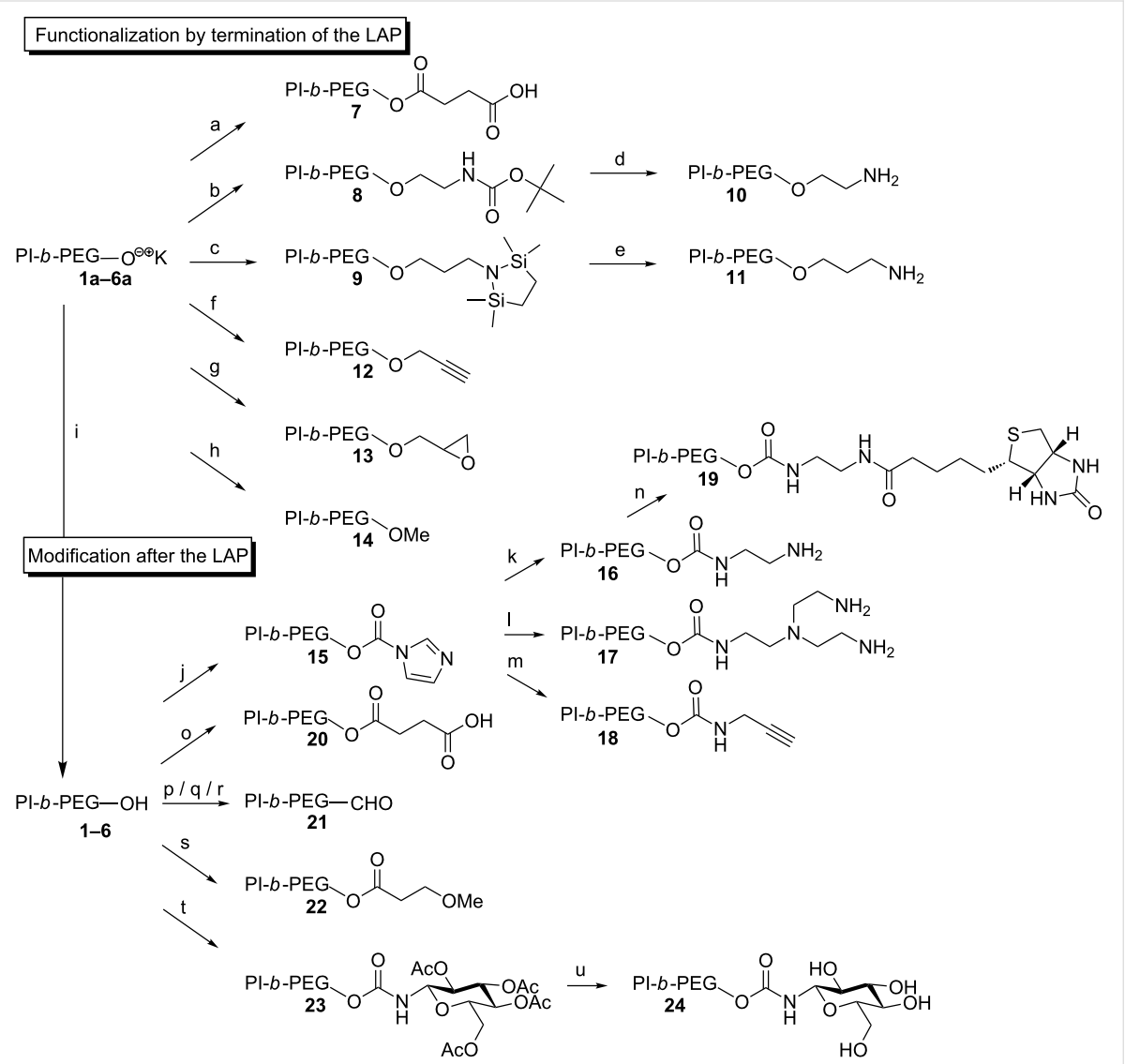


Figure 7: Synthetic routes of the modified PI-*b*-PEG ligands. (a) succinic anhydride, THF; (b) 2-(boc-amino)ethyl bromide, THF; (c) 1-(3-bromopropyl)-2,2,5,5-tetramethyl-1-aza-2,5-disilacyclopentane, THF; (d) 1 M HCl, THF; (e) HCl, THF; (f) propargyl bromide, THF; (g) epibromohydrin, THF; (h) methyl iodide, THF; (i) CH_3COOH, THF; (j) CDI, DABCO, CH_2Cl_2; (k) ethylenediamine, DABCO, $CHCl_3$; (l) tris(2-aminoethyl)amine, $CHCl_3$; (m) propargylamine, DABCO, $CHCl_3$; (n) biotin *N*-succinimidyl ester, DABCO, DMF, THF; (o) succinic anhydride, DABCO, $CHCl_3$; (p) acetic anhydride, DABCO, $CHCl_3$, DMSO; (q) DMP, H_2O, $CHCl_3$; (r) PDC, CH_2Cl_2; (s) 3-methoxypropionyl chloride, THF; (t) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl isocyanate, DABCO, $CHCl_3$; (u) NaOMe, MeOH, Amberlite® IR120 (hydrogen form). Reproduced with permission from [30]. Copyright 2013 The Royal Society of Chemistry.

+35 mV by properly mixing neutral and amine- or carboxy-functionalized PI-*b*-PEGs [30].

Whereas the functionalization properties of the pure PI-*b*-PEG system are mainly limited to reactions prior to the encapsulation of particles, the seeded emulsion polymerization opens the possibility to functionalize the nanocontainers during the polymerization process. Molecules with an alkene function are suitable to be introduced into the polymeric shell via radical polymerization. Since this reaction takes place in the hydrophobic region of the micelle, small functional monomers will be found there and at the interface between the hydrophobic and hydrophilic part. This can be avoided by using a spacer like PEG between the alkene and the functional molecule (see Figure 9). Combined with the pre-phase transfer functionalization of PI-*b*-PEO a successive emulsion polymerization gives the possibility of adding a variety of functional monomers to the nanoparticle.

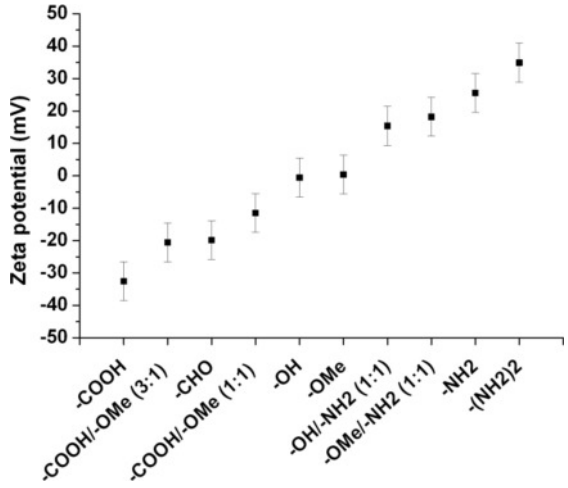


Figure 8: Zeta potential of PI-*b*-PEG encapsulated QDs with different end groups in deionized water. Reproduced with permission from [30]. Copyright 2013 The Royal Society of Chemistry.

In vitro studies

The influence of differently sized and functionalized nanocontainers on the interaction with cells was tested on human alveolar epithelial cells (A549). First, a general investigation of the toxicity of various nanocontainers (QDs, iron oxide particles, differently sized and functionalized PI-*b*-PEG) was performed, using standard WST8- and LDH-assays. In a region between 0.1–1.0 µmol/L none of the tested constructs showed any toxicity or influence on the viability of the cells [25,30]. The properties of a representative selection concerning the cellular uptake was investigated by incubating A549 cells under biologically relevant conditions for up to 4 h and under more radical conditions in serum free media for 20 h and analyzed via confocal microscopy. The tested samples and the obtained results are summarized in Table 2.

None of the samples showed unspecific adhesion or uptake on A549 cells in serum containing medium after 4 h, although the containers range in a suitable size range between 40 and 80 nm for endocytosis [22]. Even the positively charged samples, bearing the amino functions showed no unspecific interaction with the cell membrane, which qualifies the nanocontainers in a first step as versatile tools for specific targeting, since no unspecific background has to be expected. Figure 10 shows exemplarily the confocal microscopy images for the cells incubated with QDs encapsulated in the smallest PI-*b*-PEG with the four different functional groups.

A general trend for the size dependent interaction between non-charged nanocontainers and A549 cells has already been reported [24]. Thereby an upper limit for encapsulated QDs in a PI-*b*-PEG of 13400 g/mol was recognized, since these samples showed no uptake under serum free conditions, while the smaller sized nanocontainers were internalized. The investigation under these conditions was extended to methoxy-, carboxy-, and amine-functionalized particles. Comparable results were obtained for the methoxy functionalized particles. Although the trend was not exactly identical, it clearly can be seen that the uptake for the bigger methoxy nanocontainers does

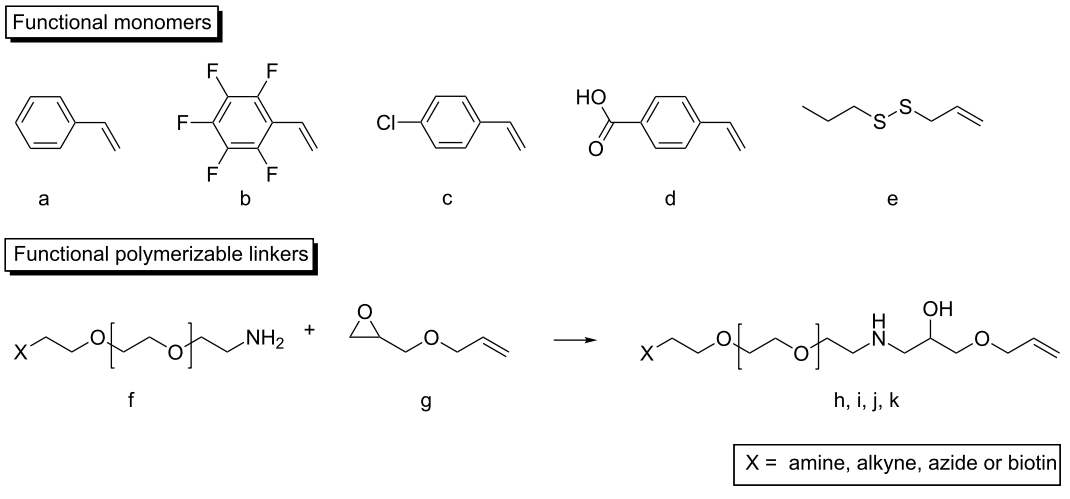


Figure 9: Different applied monomers for the functionalization during the seeded emulsion polymerization (upper part); strategy for the introduction of a PEG linker between the functional group or the functional molecule and a polymerizable alkene function (lower part) [40].

Table 2: Tested samples and the observed interaction with A549 cells.

Name	M_n (PI-*b*-PEG)	Functional group	Regular medium	Medium without serum
Container A-1	4300	Hydroxy	—	Uptake
Container A-2	6600	Hydroxy	—	Uptake
Container A-3	9000	Hydroxy	—	Uptake
Container A-4	10500	Hydroxy	—	Uptake
Container A-5	13400	Hydroxy	—	—
Container B-1	4300	Methoxy	—	Uptake
Container B-2	6600	Methoxy	—	Uptake
Container B-3	9000	Methoxy	—	Uptake
Container B-4	10500	Mehtoxy	—	—
Container B-5	13400	Methoxy	—	Partial uptake
Container C-1	4300	Amino	—	Uptake
Container C-2	6600	Amino	—	Uptake
Container C-3	9000	Amino	—	Uptake
Container C-4	10500	Amino	—	—
Container D-1	4300	Carboxy	—	—
Container D-2	6600	Carboxy	—	—
Container D-3	9000	Carboxy	—	Sticks to the cell membrane
Container D-4	10500	Carboxy	—	Partial uptake
Container D-5	13400	Carboxy	—	Uptake

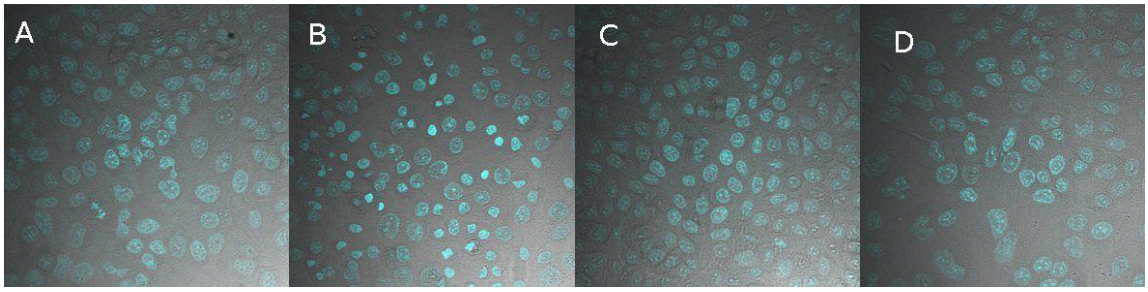


Figure 10: Confocal microscopy images of A549 cells, incubated with different nanocontainers under serum-containing conditions for 4 h. Hydroxy-functionalized PI-*b*-PEG (A); methoxy-functionalized PI-*b*-PEG (B); amine-functionalized PI-*b*-PEG (C); carboxy-functionalized PI-*b*-PEG (D).

not take place or is less pronounces than for the smaller ones (see Supporting Information File 1, Figure S1). As it was expected, most of the positively charged nanocontainers were taken up easily by the cells (see Supporting Information File 1, Figure S2), except for the biggest sample. This again could be due to a steric hindrance, since the positively charged samples show slightly higher hydrodynamic diameters then their neutral charged counterparts. However, this is in good agreement with literature findings concerning the uptake of positively charged nanoparticles [35,41].

Interestingly, a reverse size-dependent effect for the negatively charged nanocontainers was observed. While the smaller samples showed no interaction with the cells at all, the bigger samples were taken up by the cells (see Supporting Information File 1, Figure S3). However, it has to be kept in mind, that the uptake conditions are extremely harsh.

Figure 11 shows the uptake behavior for the four above shown samples under serum free conditions. While the neutral and positively charged nanocontainers were taken up by the cells, the negatively charged nanocontainers showed no interaction with the cells at all.

From these experiments can be concluded, that the as prepared nanocontainers are suitable for specific targeting attempts, since they on the one hand do not show any unspecific interaction with the cells under default conditions with serum containing

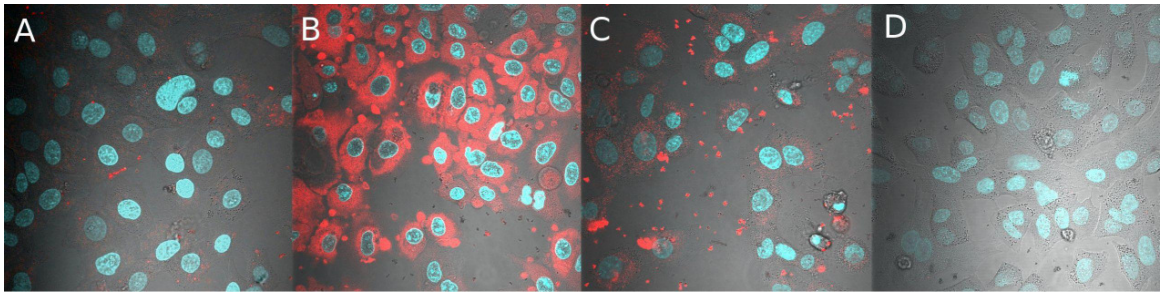


Figure 11: Confocal microscopy images of A549 cells, incubated with different nanocontainers under serum-free conditions for 20 h. Hydroxy-functionalized PI-*b*-PEG (A); methoxy-functionalized PI-*b*-PEG (B); amine-functionalized PI-*b*-PEG (C); carboxy-functionalized PI-*b*-PEG (D).

medium. On the other hand, the nanocontainers are in a good size range and can in general be internalized by the cells.

First experiments in tumor targeting with antibody coupled QDs and iron oxide particles have already shown this specificity in vivo. While particles coupled with a non-specific antibody or no functionality showed no elongated interaction, the nanocontainers bearing the tumor specific antibody were detected in the tumor tissue even after longer circulation times [25]. These results proof the superior applicability of the PI-*b*-PEG encapsulated nanoparticles in biomedicine.

Conclusion

This review has shown how the amphiphilic PI-*b*-PEG diblock copolymer can be used as a very versatile and powerful tool for the encapsulation of inorganic nanoparticles for the biomedical use. Especially the easily adjustable properties like size, surface chemistry and the shielding of the nanoparticles within the resulting nanocontainer are of a high importance, since these parameters determine the interaction with biomaterial. Furthermore, it has been demonstrated that this diblock copolymer system fulfills all stated requirements for biomedical applications such as no toxicity and no unspecific interaction in vitro and in vivo. The vast functionalization properties prior to and after the encapsulation of nanoparticles, even including copper catalyzed azide–alkyne cycloaddition make the PI-*b*-PEG nanocontainers a powerful tool for further in vivo experiments in future.

Supporting Information

Supporting Information File 1

Additional information about the conducted cell culture experiments available.
[http://www.beilstein-journals.org/bjnano/content/supplementary/2190-4286-6-22-S1.pdf]

Acknowledgements

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, SPP 1313), the EU within the FP 7 program (Vibrant, EU 228933) and the State Excellence Initiative “Nanotechnology in Medicine”.

References

1. Zhang, Y.; Clapp, A. *Sensors* **2011,** *11,* 11036–11055. doi:10.3390/s111211036
2. Zhang, F.; Lees, E.; Amin, F.; Rivera Gil, P.; Yang, F.; Mulvaney, P.; Parak, W. J. *Small* **2011,** *7,* 3113–3127. doi:10.1002/smll.201100608
3. Palui, G.; Aldeek, F.; Wang, W.; Mattoussi, H. *Chem. Soc. Rev.* **2015,** *44,* 193–227. doi:10.1039/C4CS00124A
4. Oerlemans, C.; Bult, W.; Bos, M.; Storm, G.; Nijsen, J. F. W.; Hennink, W. E. *Pharm. Res.* **2010,** *27,* 2569–2589. doi:10.1007/s11095-010-0233-4
5. Kazunori, K.; Kwon, G. S.; Masayuki, Y.; Teruo, O.; Yasuhisa, S. *J. Controlled Release* **1993,** *24,* 119–132. doi:10.1016/0168-3659(93)90172-2
6. Kwon, G.; Forrest, M. J. *Drug Dev. Res.* **2006,** *67,* 15–22. doi:10.1002/ddr.20063
7. Förster, S.; Plantenberg, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002,** *41,* 688–714. doi:10.1002/1521-3773(20020301)41:5<688::AID-ANIE688>3.0.CO;2-3
8. Diezi, T. A.; Bae, Y.; Kwon, G. S. *Mol. Pharmaceutics* **2010,** *7,* 1355–1360. doi:10.1021/mp100069p
9. Owen, S. C.; Chan, D. P. Y.; Shoichet, M. S. *Nano Today* **2012,** *7,* 53–65. doi:10.1016/j.nantod.2012.01.002
10. Förster, S.; Krämer, E. *Macromolecules* **1999,** *32,* 2783–2785. doi:10.1021/ma981597u
11. Jagur-Grodzinski, J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2002,** *40,* 2116–2133. doi:10.1002/pola.10291
12. Peters, M. A.; Belu, A. M.; Linton, R. W.; Dupray, L.; Meyer, T. J.; DeSimone, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995,** *117,* 3380–3388. doi:10.1021/ja00117a008
13. Thiry, M.; Boldt, K.; Nikolic, M. S.; Schulz, F.; Ijeh, M.; Panicker, A.; Vossmeyer, T.; Weller, H. *ACS Nano* **2011,** *5,* 4965–4973. doi:10.1021/nn201065y
14. Susumu, K.; Mei, B. C.; Mattoussi, H. *Nat. Protoc.* **2009,** *4,* 424–436. doi:10.1038/nprot.2008.247
15. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. *Angew. Chem.* **2010,** *122,* 6430–6452. doi:10.1002/ange.200902672

16. Yokoyama, M.; Miyauchi, M.; Yamada, N.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K.; Inoue, S. *Cancer Res.* **1990,** *50,* 1693–1700.
17. Couvreur, P.; Vauthier, C. *Pharm. Res.* **2006,** *23,* 1417–1450. doi:10.1007/s11095-006-0284-8
18. Harris, J. M.; Chess, R. B. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003,** *2,* 214–221. doi:10.1038/nrd1033
19. Jain, S.; Bates, F. S. *Science* **2003,** *300,* 460–464. doi:10.1126/science.1082193
20. Hadjichristidis, N.; Iatrou, H.; Pispas, S.; Pitsikalis, M. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000,** *38,* 3211–3234. doi:10.1002/1099-0518(20000915)38:18<3211::AID-POLA10>3.0.CO;2-L
21. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977,** *99,* 2039–2044. doi:10.1021/ja00449a004
22. Conner, S. D.; Schmid, S. L. *Nature* **2003,** *422,* 37–44. doi:10.1038/nature01451
23. Schmidtke, C.; Lange, H.; Tran, H.; Ostermann, J.; Kloust, H.; Bastús, N. G.; Merkl, J.-P.; Thomasen, C.; Weller, H. *J. Phys. Chem. C* **2013,** *117,* 8570–8578. doi:10.1021/jp402929j
24. Ostermann, J.; Merkl, J.-P.; Flessau, S.; Wolter, C.; Kornowski, A.; Schmidtke, C.; Pietsch, A.; Kloust, H.; Feld, A.; Weller, H. *ACS Nano* **2013,** *7,* 9156–9167. doi:10.1021/nn4037859
25. Pöselt, E.; Schmidtke, C.; Fischer, S.; Peldschus, K.; Salamon, J.; Kloust, H.; Tran, H.; Pietsch, A.; Heine, M.; Adam, G.; Schumacher, U.; Wagener, C.; Förster, S.; Weller, H. *ACS Nano* **2012,** *6,* 3346–3355. doi:10.1021/nn300365m
26. Kloust, H.; Schmidtke, C.; Merkl, J.-P.; Feld, A.; Schotten, T.; Fittschen, U. E. A.; Gehring, M.; Ostermann, J.; Pöselt, E.; Weller, H. *J. Phys. Chem. C* **2013,** *117,* 23244–23250. doi:10.1021/jp4045836
27. Schmidtke, C.; Kloust, H.; Bastús, N. G.; Merkl, J.-P.; Tran, H.; Flessau, S.; Feld, A.; Schotten, T.; Weller, H. *Nanoscale* **2013,** *5,* 11783–11794. doi:10.1039/c3nr04155g
28. Merkl, J.-P.; Ostermann, J.; Schmidtke, C.; Kloust, H.; Eggers, R.; Feld, A.; Wolter, C.; Kreutziger, A.-M.; Flessau, S.; Mattoussi, H.; Weller, H. Shielding of quantum dots using diblock copolymers: implementing copper catalyzed click chemistry to fluorescent quantum dots. In *Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications IX;* Parak, W. J.; Osinski, M.; Yamamoto, K. I., Eds.; *Proc. SPIE*, Vol. 8955; 2014; 89551X1–89551X12. doi:10.1117/12.2048368
29. Weller, H.; Ostermann, J.; Schmidtke, C.; Kloust, H. *Z. Phys. Chem.* **2014,** *228,* 183–192. doi:10.1515/zpch-2014-0481
30. Schmidtke, C.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Pietsch, A.; Kloust, H.; Tran, H.; Schotten, T.; Bastús, N. G.; Eggers, R.; Weller, H. *Nanoscale* **2013,** *5,* 7433–7444. doi:10.1039/c3nr01520c
31. Hermanson, G. *Bioconjugate techniques;* Academic Press: London, 2008; pp 169–212.
32. Hühn, D.; Kantner, K.; Geidel, C.; Brandholt, S.; De Cock, I.; Soenen, S. J. H.; Rivera Gil, P.; Montenegro, J.-M.; Braeckmans, K.; Müllen, K.; Nienhaus, G. U.; Klapper, M.; Parak, W. J. *ACS Nano* **2013,** *7,* 3253–3263. doi:10.1021/nn3059295
33. Salvador-Morales, C.; Zhang, L.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. *Biomaterials* **2009,** *30,* 2231–2240. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.005
34. Hillaireau, H.; Couvreur, P. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009,** *66,* 2873–2896. doi:10.1007/s00018-009-0053-z
35. Mao, S.; Germershaus, O.; Fischer, D.; Linn, T.; Schnepf, R.; Kissel, T. *Pharm. Res.* **2005,** *22,* 2058–2068. doi:10.1007/s11095-005-8175-y
36. Luo, R.; Neu, B.; Venkatraman, S. S. *Small* **2012,** *8,* 2585–2594. doi:10.1002/smll.201200398
37. Bückmann, A. F.; Morr, M.; Johansson, G. *Makromol. Chem.* **1981,** *182,* 1379–1384. doi:10.1002/macp.1981.021820509
38. Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* **1995,** *6,* 150–165. doi:10.1021/bc00032a002
39. Schmidtke, C.; Kreuziger, A.-M.; Alpers, D.; Jacobsen, A.; Leshch, Y.; Eggers, R.; Kloust, H.; Tran, H.; Ostermann, J.; Schotten, T.; Thiem, J.; Thimm, J.; Weller, H. *Langmuir* **2013,** *29,* 12593–12600. doi:10.1021/la402826f
40. Kloust, H.; Schmidtke, C.; Feld, A.; Schotten, T.; Eggers, R.; Fittschen, U. E. A.; Schulz, F.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Bastús, N. G.; Weller, H. *Langmuir* **2013,** *29,* 4915–4921. doi:10.1021/la400713p
41. Huang, M.; Ma, Z.; Khor, E.; Lim, L.-Y. *Pharm. Res.* **2002,** *19,* 1488–1494. doi:10.1023/A:1020404615898

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Nanotechnology* terms and conditions: (http://www.beilstein-journals.org/bjnano)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at: doi:10.3762/bjnano.6.22

7.7.5 Shielding of quantum dots using diblock copolymers: implementing copper catalyzed click chemistry to fluorescent quantum dots

Diese Veröffentlichung diskutiert die Zusammenhänge zwischen Polymerüberschuss, Polymergröße, Emulsionspolymerisation und radikalischer Quervernetzung der Abschirmung von sphärischen, verkapselten CdSe/CdS/ZnS Quantenpunkten gegenüber Kupfer(II)ionen. Weiterhin diskutiert sie Syntheseprotokolle zur Anwendung von kupferkatalysierter 1,3-dipolarer Cylcoaddition an fluoreszierenden Quantenpunkten, die bis dahin nicht gelang. Mein Beitrag liegt in dem Verfassen des Manuskriptes und der Durchführung von einem Großteil der praktischen Experimente. ©SPIE 2014, reproduced with permission of *Proc. of SPIE* **2014**, 93381, 93381-11.[12]

Shielding of quantum dots using diblock copolymers: Implementing copper catalyzed click chemistry to fluorescent quantum dots

Jan-Philip Merkl,[a] Johannes Ostermann,[a] Christian Schmidtke,[a] Hauke Kloust,[a] Robin Eggers,[a] Artur Feld,[a] Christopher Wolter,[a] Anna-Marlena Kreuziger,[a] Sandra Flessau,[a] Hedi Mattoussi,[b] and Horst Weller[a]

[a]Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany, [b] Department of Chemistry and Biochemistry, Florida State University, 95 Chieftan Way, Tallahassee, Florida 32306, United States.

ABSTRACT

We describe the design and optimization of an amphiphilic diblock copolymer and its use to provide surface functionalization of colloidal semiconductor nanoparticles (quantum dots, QDs). This polymer coating promotes hydrophilicity of the nanocrystals while providing numerous functional groups ideally suited for bio-functionalization of the QDs using copper-catalyzed azide alkyne *Husigen* 1,3-cyloaddition (i.e., cupper catalyzed "click" reaction).

Copper ions are known to quench the fluorescence of QDs in solution. Thus effective shielding of the nanocrystal surface is essential to apply copper-catalyzed reactions to luminescent QDs without drastically quenching their emission. We have applied a strategy based on micellar encapsulation within poly(isoprene-*block*-ethylene oxide) diblock-copolymers (PI-*b*-PEO), where three critical factors promote and control the effectiveness of the shielding of copper ion penetration: 1) The excess of PI-*b*-PEO, 2) the size of PI-*b*-PEO and 3) insertion of an additional PS-shell grown via seeded emulsion polymerization (EP) reaction.

Due to the amphiphilic character of the block-copolymer, this approach provides a shielding layer surrounding the particles, preventing metal ions from reaching the QD surfaces and maintaining high photoluminescence. The effective shielding allowed the use of copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-cycloaddition (CuAAC) to hydrophilic and highly fluorescent QDs, opening up great possibilities for the bio functionalization of QDs.

Keywords: quantum dots, phase transfer, block copolymers, fluorescence quenching, shielding, copper catalyzed click chemistry

Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications IX, edited by Wolfgang J. Parak, Marek Osi ski, Kenji I. Yamamoto, Proc. of SPIE Vol. 8955, 89551X · © 2014 SPIE
CCC code: 1605-7422/14/$18 · doi: 10.1117/12.2048368

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

1. INTODUCTION

Fluorescent semiconductors (QDs) have attracted intense scientific-research and have been incorporated in many applications[1]. Simultaneously, a great progress has been made for developing sound understanding of their unique photophysical properties. Fluorescent nanoparticles (NPs) such as colloidal quantum dots and quantum dot rods (QDRs) have extraordinary properties, such as high fluorescent quantum yields[2,3] and high photo stability,[4] which make them very promising for use in biological imaging sensing. Furthermore, because single QDs and QDRs exhibit fluorescent intermittency[5] and spectral diffusion[6,7] they have motivated several fundamental studies at the single molecule level (e.g. for stochastic optical reconstruction microscopy STORM).

Due to their small size, QDs and QDRs have large surface-to-volume ratio and electronic surface states strongly influence their properties, e.g. decay processes[8] and fluorescence quantum yields.[2] Interaction of meal ions, redox complexes and fluorescent dyes with these NPs can essentially influence almost every property of such all-inorganic NCs and NC solids.[9] For instance, QDs and QDRs have been used for intercellular pH determination,[10] molecular detection[11] and (multicolor) cellular uptake studies.[12–14]

Copper and iron ions have been known to quench the fluorescence of nanoparticles[15–20]. Although irreversible quenching of QD fluorescence has been widely observed when mixed with copper[15–19] salts, there are a few reports available where introduction of copper did not significantly quench the QD fluorescence.[21,22,23] Copper concentration in the human blood plasma of humans and rats is higher than 1 μg/mL.[24,25] Thus, an understanding of the interaction of copper ions with QDs provides greatly useful information for potential *in vivo* applications.

Since it was first reported, copper-catalyzed *Husigen* 1,3-cycloaddition has become one of the most used *click* reactions for bioconjugation.[26–29] It has also been used to functionalize a wide variety of particles,[30] including virus like particles,[31] gold nanoparticles[32,33] and polymersomes.[34]

Fluorescence quenching can be used to study the nature of nanoparticle membranes and coupled molecules.[15,35,36] Therefore, two different kinds of fluorescence quenching can be distinguished:[37] dynamic and static quenching. Dynamic quenching, also known as collisional quenching reduces the fluorescence lifetime of the donor due to collisions of the excited donor and the quencher. The formation of a non-fluorescent ground state of quencher and dye is called static quenching.[38] When QDs are used as a fluorophore, static quenching is usually attributed to surface adsorption[11], cation exchange or *solution phase quenching*. The two quenching mechanisms can be distinguished by investigation the fluorescence decay curves (eq 1) of the QDs. I_0(Q) is the initial count rate of the fluorescence decay curve and $\tau(Q)$ is the measured fluorescence lifetime of the QD at a discrete quencher concentration.

$$I(t) = I_o(Q)\exp\left[-t/\tau(Q)\right] \qquad (1)$$

In the case of dynamic quenching the fluorescence lifetime $\tau(Q)$ is decreased while I_0 is constant. Conversely, $\tau(Q)$ remains constant but I_0 is decreased when static quenching dominates the interactions.

Fluorescence quenching is usually discussed within the Stern-Volmer formalism using the expression shown in equation 2, where F_0 is the fluorescence intensity in absence of the quencher, $F(Q)$ the fluorescence intensity of the donor as a function of the quencher concentration [Q], and K_{SV} is the Stern-Volmer-constant.[38]

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

$$\frac{F_0}{F(Q)} = 1 + K_{SV}[Q] \qquad (2)$$

For static quenching, K_{SV} corresponds to the equilibrium constant of complex formation, whereas it equals the product of the bimolecular quenching rate constant, k_q, and the fluorescence decay time in the absence of quencher, τ_0. For dynamic quenching the ratio $F_0/F(Q)$ can also be expressed in terms of $\tau_0/\tau(Q)$, using a modified equation (2):

$$\frac{F_0}{F(Q)} = \frac{\tau_0}{\tau(Q)} = 1 + k_q\tau_0[Q] \qquad (3)$$

Herein, we discuss three different factors that influence the shielding of encapsulated fluorescent quantum dots against penetration of copper(II) ions: 1) the excess of diblock copolymer used during phase transfer, 2) the size of the diblock copolymer used, and the role played by the subsequent emulsion polymerization.

The encapsulation was based on an well-established protocol using cross-linked[39] poly(isoprene-*block*-ethylene oxide) block-copolymers (PI-*b*-PEO)[40] giving non-toxic[41], aqueous nanoparticles. In a second step an emulsion polymerization was carried out by reacting styrene and divinyl benzene in the hydrophobic region surrounding of the micelle.[42,43]

The resulting hydrophilic QDs were tested using copper catalyzed 1, 3-dipolar *Husigen* cycloaddition of 4-azido-aniline hydrochloride.

2. RESULTS

We found that the fluorescence of tri-*n*-octylphophine (TOP) and tri-*n*-octylphosphine oxid (TOPO) coated (i.e., hydrophobic) QDs mixed with copper ions was irreversibly quenched within seconds after the addition of 10 equivalents Cu(II) acetate in THF, indicating that no effective shielding of copper ions for these TOP/TOPO-QDs. Herein we present three different aspects which influence the shielding of PI-*b*-PEO diblock copolymer encapsulated CdSe/CdS/ZnS *core*/*shell*/*shell*- QDs, namely: excesses of PI-*b*-PEO, different sizes[20] of the PI-*b*-PEO and a subsequent seeded emulsion polymerization (scheme 1).[25] Shielding against copper ions was tested using fluorescence quenching experiment with copper(II) acetate in aqueous solution.

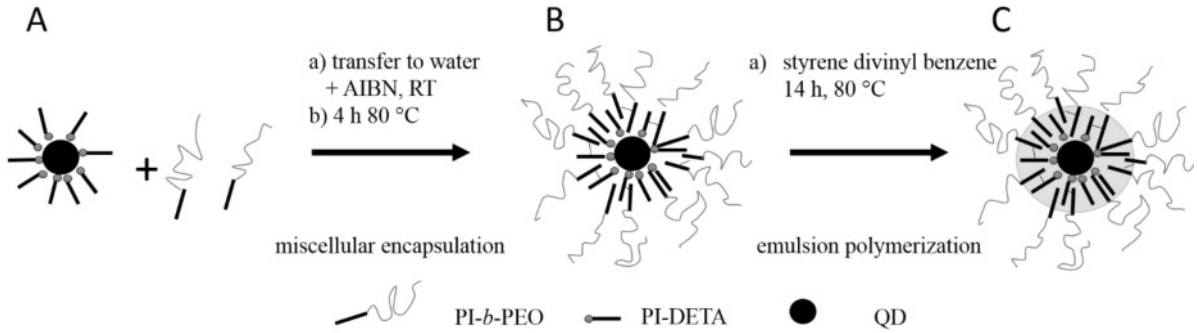
2.1 Influence on the shielding of QD by using different excess of PI-*b*-PEO polymers

Figure 1A shows the evolution of the relative fluorescence intensity as a function of the copper concentration introduced in the solution. This confirms that the excess of PI-*b*-PEO ligands used during encapsulation has a strong influence on the shielding of the nanoparticles against copper ions. This observation can be attributed to a substantially increased average number of PI-*b*-PEO per QD, when higher excess of PI-*b*-PEO is used for encapsulation. This implies that the density of the PI moiety, surrounding the nanoparticle becomes higher and the copper diffusion to the particle in hindered (see Scheme 1).

Static quenching of the QDs with copper indicates direct contact between the QD and the quenching ion.[16–20] As seen in Figure 1B I_0 is barely dependent on the excess of polymer used for encapsulation, while the dynamic quenching of the quantum dots, which is indicated by a decrease in the fluorescent lifetime of the particles, is highly dependent on the excess

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

of PI-*b*-PEO. Most likely the dynamic quenching is due to the accumulation of copper in the nanoparticle environment without direct contact between QD and ion. Thus, the higher polarity (or concentration of Cu) in the nanoparticle environment reduces the excitonic lifetime. The slope of the Stern-Volmer plot of the fluorescent lifetime at small copper concentrations is the same in indicating a similar permeability of the polymer coating at low copper concentrations. After a saturation concentration, the lifetime is no further changed by increasing the copper concentration.



Scheme 1: Micellar encapsulation of QD (black circle) with PI-*b*-PEO. A: QDs after partial ligand exchange of native TOP/TOPO (not shown) ligands, 2,2′-diaminodiethylamine-block-polyisoprene (PI-DETA) is coordinated to the surface. B: Transfer to water and addition of the hydrophobic radical initiator 2,2′-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN). C: Emulsion polymerization by addition of divinyl benzene and styrene.

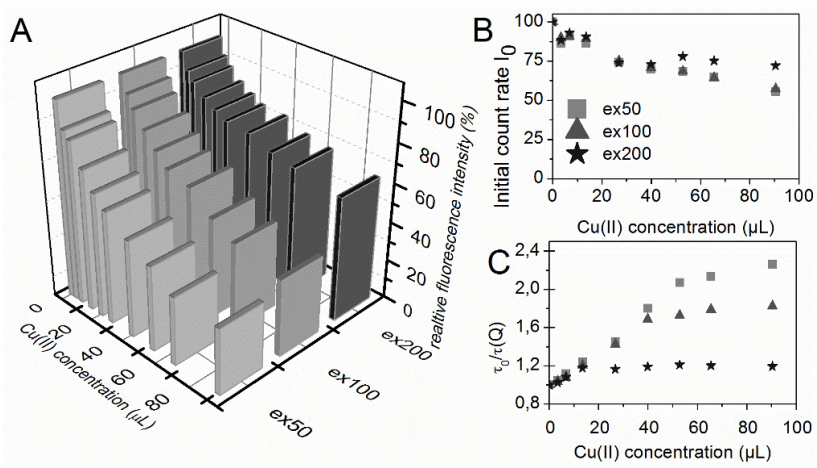


Figure 1: Fluorescence quenching of encapsulated QDs (120 nM) encapsulated with 50- (ex50, bright grey), 100- (ex100, grey) and 200-fold (ex200, black) excess of PI-b-PEO (M_n= 6600g/mol). A: Relative QD fluorescence intensities after the addition of Cu^{2+}. The data were taken from the integrated steady state fluorescence spectra. B: initial counts (signal height) of the fluorescence decay curves (same color code, 50-fold excess squares, 100-fold excess triangles, 200-fold stars). C: Stern-Volmer plot of the fluorescence lifetimes (τ_0/τ) indicating dynamic quenching.

2.2 Influence on the shielding of QD by using different sized PI-*b*-PEO polymers

Using different size PI-*b*-PEO block copolymers (while keeping the ratio between the blocks fixed) influences the shielding of the encapsulated quantum dots. Three different size PI-*b*-PEO were used: a small (M_n= *4300g/mol*), a medium (M_n=

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

9000g/mol) and large (M_n= *13400g/mol*) polymer, which yielded three differently hydrodynamic sizes for the same starting QDs. Encapsulation the same native QDs within these diblock copolymers, provided water dispersible QDs with hydrodynamic size (extracted for dynamic light scattering, DLS, measurements) of 24, 34 and 53 nm, respectively. The increase in the overall hydrodynamic size of the polymer encapsulated QDs is coupled with a significant enhancement of the nanocrystal surface, as reflected by the quenching data shown in figure 3. The fluorescence quenching observed for QDs encapsulated with the smallest block copolymer construct can mainly be attributed to static effects, as indicated by the drop in the initial count rate of the fluorescence curves (*Figure 2*B). This implies that this small polymer coating cannot provide shielding that is thick enough to prevent copper ions from accessing the nanocrystal surfaces The larger polymer coating forms a thick shielding around the nanocrystals, which drastically reduces the number of copper ions accessing the QD surface and the ensued PL quenching. Indeed, both dynamic and static quenching are significantly reduced for nanocrystals encapsulated within the larger block polymer, further confirming that high shielding against penetration by quenching ions can be achieved.

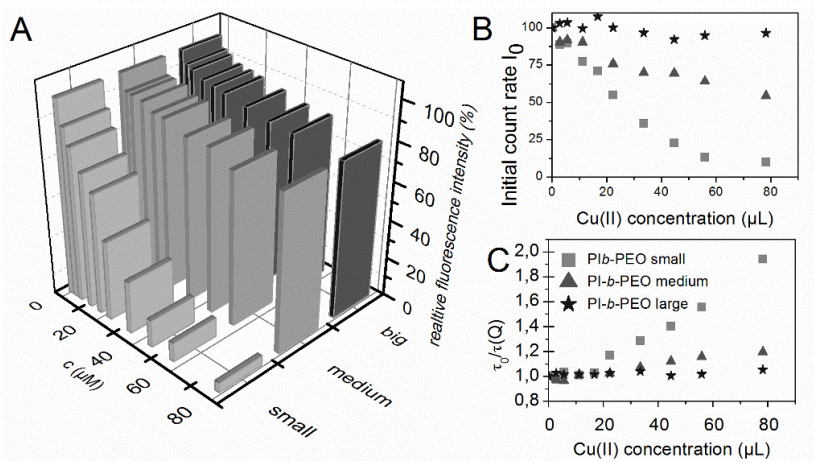


Figure 2: Fluorescence quenching of QDs (100 nM) encapsulated with a 300-fold excess of three differently sized PI-b-PEOs (small PI-b-PEO light grey squares, medium sized PI-b-PEO grey triangles, big PI-b-PEO black stars) A: Relative fluorescence intensities of QDs after the addition of aliquots Cu^{2+}. The data were taken from the integrated steady state fluorescence spectra. B: initial counts (signal height) of the fluorescence decay curves). C: Stern-Volmer plot of the fluorescence lifetimes (τ_0/τ) indicating dynamic quenching.

2.3 Influence on the shielding of QD by subsequent emulsion polymerization

Subsequent seeded emulsion polymerization the polymer coating of the particles provide enhanced shielding against ion penetration, thus reducing their access to the QD surfaces and significantly improving the PL signal. This is due to the fact that during the emulsion polymerization, styrene and divinyl benzene are embedded in the hydrophobic block, preserved by the PI moieties of the diblock copolymers and the PI-DETA respectively.[25] This increases the density of hydrophobic material in the inner shell of the encapsulated nanoparticle, which in turn hinders ion diffusion through the coating and reduce access of the copper ions to the QD surface, as can be seen in Figure 3. Data clearly show that dispersions of QDs surface functionalized using after the additional seeded emulsion polymerization step (black bars) provides significantly better shielding against copper penetration compared to samples preparing without relying introducing the additional

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

seeded emulsion polymerization. Both, static and dynamic quenching are reduced for these dispersions, with dynamic quenching being nearly completely suppressed (Figure 3B,C); this indicates that copper ion access to the QD surface via diffusion through the polymer coating is essentially suppressed when the additional emulsion polymerization is introduced. The static quenching is most likely due to a small fraction of less optimal shielded particles.

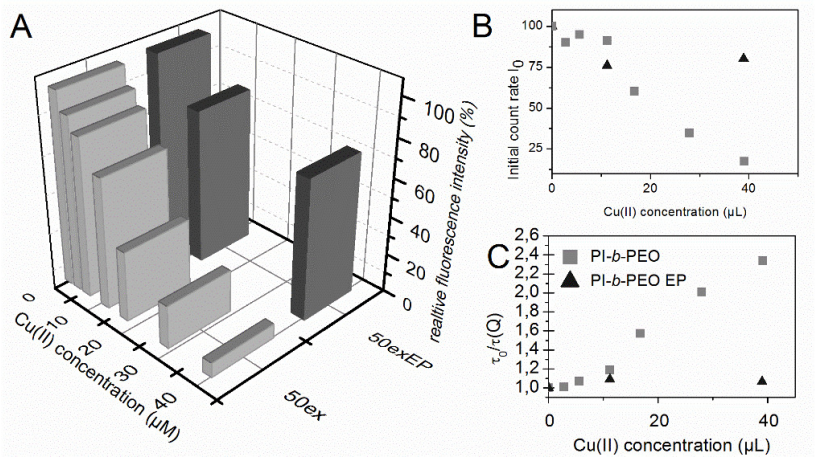


Figure 3: Fluorescence Quenching of encapsulated QDs (100 nM) before (grey) and after emulsion polymerization (black). A: Relative fluorescence intensities of QDs after the addition of Cu^{2+} aliquots. The data were taken from the integrated steady state fluorescence spectra. B: initial counts (signal height) of the fluorescence decay curves. C: Stern-Volmer plot of the fluorescence lifetimes (τ_0/τ) indicating dynamic quenching (same color code).

2.4 Copper-catalyzed *Huisgen* cycloaddition

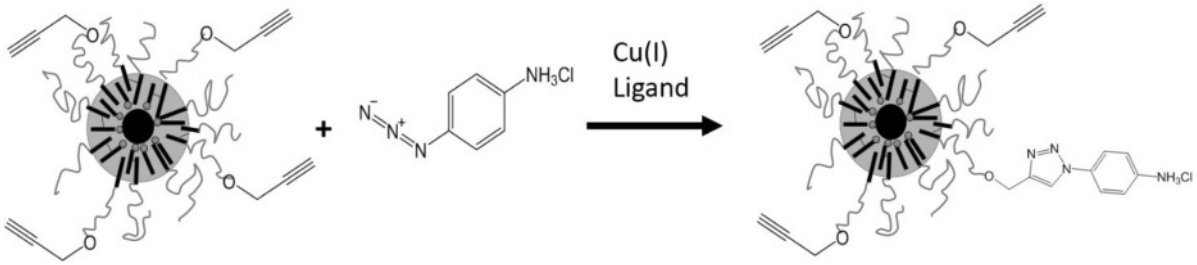
Taking advantage of the enhanced shielding of the QD surfaces against copper ion penetration, achieved using the above block copolymer encapsulation strategy, we proceeded with the implementation of CuAAC on these encapsulated quantum dots. As a proof of principle, we first encapsulated the quantum dots with a 1 to 2 blend of alkyne-terminated PI-*b*-PEO. Then, following the protocol of Hassane *et al.*,[44] we coupled 4-azido-aniline hydrochloride to the QDs using copper-catalyzed *Huisgen* 1,3-cycloaddition, as shown in Scheme 2. This procedure was accomplished for both QDs encapsulated with the large polymer along with QDs treated with an additional emulsion polymerization step. After the reaction was complete, the samples were dialyzed, lyophilized and analyzed using ^{1}H-NMR. The ^{1}H-NMR spectra clearly show the signal of the triazole, while being absent in the case of the blind sample (no copper while all other components were present). *[large polymer:* δ (ppm, 400 MHz, THF-d_8) 6.6 (m, 2H, aromatic-H), 7.4 (m, 2H, aromatic-H) and 8.1 (s, 1H, trizole-H), *EP:* δ (ppm, 400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) 7.64-7.72 (m, 2H, aromatic-H), 8.02 (s, 1H, triazole-H)]. Furthermore, the disappearance of the alkyne signal showed a successful triazole formation. The optical properties in both reactions were maintained, as predicted by the quenching experiments.[20,25] The ^{1}H-NMR spectra clearly show a successful coupling of 4-azido-aniline to the alkyne presented on the nanoparticles because unbound 4-azido-aniline was removed by dialysis. The removal of the unbound 4-azido-aniline can was confirmed by a control sample, where no copper was presented.

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

3. CONCLUSION

Using encapsulation within micelles of PI-*b*-PEO diblock copolymer, we were able to prepare hydrophilic dispersions of highly shielded quantum dots against copper ion penetration. Our data indicate that shielding of quantum dots against penetration of quenching Cu ions can be substantially improved by combining the use of large molecular weight PI-*b*-PEO block copolymer, higher excess of PI-*b*-PEOs during the encapsulation step, and by introducing an additional emulsion polymerization step; the latter increases the density of hydrophobic material around the nanoparticle surface and prevents ion diffusing towards the QD surface.

These highly shielded polymer encapsulated QDs allowed straightforward easy implementation of the copper-catalyzed *Husigen* 1,3- cycloaddition reaction, while maintaining high fluorescence emission . This might open up great possibilities for potential bio-functionalization of fluorescent QDs via the effective *click* coupling reaction.



Scheme 2: Copper-catalyzed click chemistry of PI-b-PEO-Alkyne/PI-b-PEO encapsulated QDs and 4-azido-aniline hydrochloride. Ligand = bathophenanthroline disulfonate.

4. EXPERIMENTAL DATA

4.1 Chemicals and polymer synthesis

Air and/or water sensitive chemical compounds were handled under inert conditions (Ar) using standard Schlenk technique. Chloroform (anhydrous, amylene stabilized), dichlormethane (anhydrous, amylene stabilized), 1,1′-carbonyldiimidazole (CDI), disodium 4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolinedisulfonat, 4-azido-aniline hydrochloride, sodium ascorbate, copper(II) sulfate, *n*-BuLi (1.6 M in *n*-hexane), 2,2′-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN), *s*-BuLi (1.4 M in cyclohexane) were purchased from Aldrich, acetone and tetrahydrofuran (THF) from Grüssing, chloroform d1 ($CDCl_3$, 99.8%) and tetrahydrofuran d8 (THF-d8, 99.9%) from Deutero and copper(II) acetate from Alfa Aesar.

The synthesis of different sized PI and PI-*b*-PEO was performed according to previously reported procedures.[40] Exchange of ligands on nanoparticles was carried out using an excess of 2,2'-diaminodiethylamine-*block*-polyisoprene.[40] Alkyne functionalized PI-*b*-PEO was synthesized according to Schmidtke *et. al.*[41]

4.2 Instrumentation

Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR) spectra were recorded on a Bruker AV II DRX 500 spectrometer. Chemical shifts in are reported in δ units (ppm) relative to the deuterated solvent signal ($CDCl_3$ signal at 7.26 ppm) or

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

tetramethylsilane as an internal standard (TMS signal at 0 ppm). Absorption measurements were carried out with a Cary 50 from Varian and steady-state fluorescence was measured using a Fluoromax 4 from Horiba Jobin Yvon. The time resolved fluorescence spectra were collected using a time-correlated single photon counting (TCSPC) system (both PicoQuant). The samples were excited with a PDL 800-D laser diode (wavelength λ=438 nm, pulse length). The emitted photons were detected using a PMA-M185 photomultiplier with a temporal resolution of 500 ps. The signal was processed by a constant fraction 200 MHz discriminator and a time-to-amplitude converter (EG&G Ortec). Fluorescence decay curves were fitted with a stretched exponential function using *Mathematica*.[45]

4.3 QD Synthesis

CdSe/CdS/ZnS *core*/*shell*/*shell* nanocrystals were synthesized according to the procedure introduced by Talapin *et al.*, but replacing bis-(trimethylsilyl) sulfide and diethyl zinc with hydrogen sulfide and zinc acetate, respectively.[46] Aggregation of the particles was prevented by the addition of tri-*n*-octylphophine (TOP) and tri-*n*-octylphosphine oxid (TOPO). For the phase transfer two different kinds of QD were used. Orange (emission peak at 595 nm) emitting QD were used for the emulsion polymerization samples, while red emitting QDs (emission peak at 600 nm) were used for the other experiments.

4.4 Phase Transfer

PI-DETA coated quantum dots, PI-*b*-PEO and AIBN (1/3 of isoprene units present in the diblock copolymer) were dissolved in THF to yield a 10 µM solution. The used excess was, in the case of Figure 1, 50-, 100- and 200- and in the case of the QD's used for the measurement of Figure 2 300-, respectively. The excess used for the samples, which were functionalized using emulsion polymerization was 50-fold. Different size PI-*b*-PEO are referred to as: *small* (M_n= 4300g/mol), *medium* (M_n= 9000g/mol) and *large* copolymer (M_n= 13400g/mol). These solutions were injected into the 10-fold volume of water and stirred for 30 min. After equilibration, the solution was heated to 80 °C for 4 hours to initiate cross-linking and removal of THF. The samples were purified by ultracentrifugation using a sucrose gradient from 0% up to 60%. Excess sucrose was removed by several washing steps, using centrifugal filter units. No sucrose gradient centrifugation was carried out for the QD dispersions that were treated with an emulsion polymerization.

4.5 Emulsion Polymerization

Following phase transfer, oxygen was removed by flushing with nitrogen (10 cycles), then 15 µL of 1-pentanol, 5 µL of styrene, 5 µL of divinylbenzene, and 1 mg of the radical initiator 2,2′-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride were added. The solution was stirred for 5 h at 50 °C. The QDs were further purified by applying a few rounds (3 times) of concentration/dilution with buffer using a membrane filtration device.

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

4.6 Quenching

The QD samples were diluted in a quartz cuvette and equilibrated 15 min. Absorption, steady-state fluorescence and fluorescence decay spectra were collected. Aliquots of the copper acetate solution (1.452 mM) were added and kept for 30 min in the dark before absorption-, steady-state and fluorescence decay curves were collected.

4.7 Copper Catalyzed Cycloaddition

The click reactions were performed following the protocols described by Hassane *et al.* using copper sulfate, sodium ascorbate, 4-azido-aniline hydrochloride and bathophenanthroline disulfonate.[44] The concentrations of the reagents were adjusted to: QDs (1 μM), copper sulfate (100 μM), disodium 4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolinedisulfonat (200 μM), and sodium ascorbate (500 μM). the reaction was left stirring for ~ 20 h at room temperature, and excess unreacted precursors were removed by dialysis. Water was removed using a freeze-dryer (lyophilization) and the solid was dissolved in THF-d8 or $CDCl_3$ for NMR measurements. Appearance of the characteristic NMR peaks in the measured spectra indicated a successful transformation: *large polymer:* δ (ppm, 400 MHz, THF-d_8) 6.6 (m, 2H, aromatic-H), 7.4 (m, 2H, aromatic-H) and 8.1 (s, 1H, trizole-H), *emulsion polymerization:* δ (ppm, 400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) 7.64-7.72 (m, 2H, aromatic-H), 8.02 (s, 1H, triazole-H).

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the EU within the FP 7 program (Vibrant, EU 228933), the State Excellence Initiative "Nanotechnology in Medicine". JPM acknowledges the support of the Chemical Industry Fund, VCI: German Chemical Industry Association, the *German-American Fulbright Program* and furthermore travel fellowships of the Freunde- und Förderverein Chemie der Universität Hamburg e.V. and of the University of Hamburg.

REFERENCES

[1] Goesmann, H., and Feldmann, C., "Nanopartikuläre Funktionsmaterialien," Angewandte Chemie 122(8), 1402–1437 (2010).

[2] Talapin, D. V., Mekis, I., Götzinger, S., Kornowski, A., Benson, O., and Weller, H., "CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS core-shell-shell nanocrystals," Journal of Physical Chemistry B 108, 18826–18831 (2004).

[3] Chen, O., Zhao, J., Chauhan, V.P., Cui, J., Wong, C., Harris, D.K., Wei, H., Han, H.-S., Fukumura, D., et al., "Compact high-quality CdSe-CdS core-shell nanocrystals with narrow emission linewidths and suppressed blinking.," Nature materials 12(5), 445–51 (2013).

[4] Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., and Nann, T., "Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels," Nature Methods 5(9), 763–775 (2008).

[5] Efros, A., and Rosen, M., "Random Telegraph Signal in the Photoluminescence Intensity of a Single Quantum Dot," Physical Review Letters 78(6), 1110–1113 (1997).

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

[6] Empedocles, S., Norris, D., and Bawendi, M., “Photoluminescence Spectroscopy of Single CdSe Nanocrystallite Quantum Dots.,” Physical Review Letters 77(18), 3873–3876 (1996).

[7] Empedocles, S. a., and Bawendi, M.G., “Influence of Spectral Diffusion on the Line Shapes of Single CdSe Nanocrystallite Quantum Dots,” The Journal of Physical Chemistry B 103(11), 1826–1830 (1999).

[8] Cordones, A.A., Scheele, M., Alivisatos, A.P., and Leone, S.R., “Probing the Interaction of Single Nanocrystals with Inorganic Capping Ligands: Time-Resolved Fluorescence from CdSe-CdS Quantum Dots Capped with Chalcogenidometalates.,” Journal of the American Chemical Society 134(44), 18366–73 (2012).

[9] Nag, A., Chung, D.S., Dolzhnikov, D.S., Dimitrijevic, N.M., Chattopadhyay, S., Shibata, T., and Talapin, D. V, “Effect of metal ions on photoluminescence, charge transport, magnetic and catalytic properties of all-inorganic colloidal nanocrystals and nanocrystal solids.,” Journal of the American Chemical Society 134(33), 13604–15 (2012).

[10] Ji, X., Palui, G., Avellini, T., Na, H. Bin, Yi, C., Knappenberger, K.L., and Mattoussi, H., “On the pH-dependent quenching of quantum dot photoluminescence by redox active dopamine.,” Journal of the American Chemical Society 134(13), 6006–17 (2012).

[11] Knowles, K.E., Tice, D.B., McArthur, E. a, Solomon, G.C., and Weiss, E. a, “Chemical control of the photoluminescence of CdSe quantum dot-organic complexes with a series of para-substituted aniline ligands.,” Journal of the American Chemical Society 132(3), 1041–50 (2010).

[12] Chan, W.C.W., Maxwell, D.J., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M., and Nie, S., “Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging.,” Current Opinion in Biotechnology 13(1), 40–6 (2002).

[13] Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K.N., Treadway, J. a, Larson, J.P., Ge, N., Peale, F., and Bruchez, M.P., “Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots.,” Nature biotechnology 21(1), 41–6 (2003).

[14] Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W.K., and Nie, S., “In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots.,” Nature biotechnology 22(8), 969–76 (2004).

[15] Boldt, K., Jander, S., Hoppe, K., and Weller, H., “Characterization of the organic ligand shell of semiconductor quantum dots by fluorescence quenching experiments.,” ACS nano 5(10), 8115–23 (2011).

[16] Beaune, G.G., Tamang, S., Bernardin, A., Bayle-Guillemaud, P., Fenel, D., Schoehn, G., Vinet, F., Reiss, P., and Texier, I., “Luminescence of polyethylene glycol coated CdSeTe/ZnS and InP/ZnS nanoparticles in the presence of copper cations.,” ChemPhysChem 12(12), 2247–54 (2011).

[17] Bernardin, A., Cazet, A., Guyon, L., Delannoy, P., Vinet, F., Bonnaffé, D., and Texier, I., “Copper-free click chemistry for highly luminescent quantum dot conjugates: application to in vivo metabolic imaging.,” Bioconjugate chemistry 21(4), 583–8 (2010).

[18] Callan, J.F., and Mulrooney, R.C., “Luminescent detection of Cu(II) ions in aqueous solution using CdSe and CdSe-ZnS quantum dots functionalised with mercaptosuccinic acid,” Physica Status Solidi (C) 6(4), 920–923 (2009).

[19] Schieber, C., Bestetti, A., Lim, J.P., Ryan, A.D., Nguyen, T.-L., Eldridge, R., White, A.R., Gleeson, P.A., Donnelly, P.S., et al., “Conjugation of Transferrin to Azide-Modified CdSe/ZnS Core-Shell Quantum Dots using Cyclooctyne Click Chemistry.,” Angewandte Chemie (International ed. in English) 51(42), 10523–7 (2012).

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

[20] Ostermann, J., Merkl, J.-P., Flessau, S., Wolter, C., Kornowksi, A., Schmidtke, C., Pietsch, A., Kloust, H., Feld, A., et al., "Controlling the Physical and Biological Properties of Highly Fluorescent Aqueous Quantum Dots Using Block Copolymers of Different Size and Shape.," ACS nano 7(10), 9156–9167 (2013).

[21] Jańczewski, D., Tomczak, N., Liu, S., Han, M.-Y., and Vancso, G.J., "Covalent assembly of functional inorganic nanoparticles by 'click' chemistry in water.," Chemical communications (Cambridge, England) 46(19), 3253–5 (2010).

[22] Wu, C., Khaing Oo, M.K., and Fan, X., "Highly Sensitive Multiplexed Heavy Metal Detection Using Quantum-Dot-Labeled DNAzymes," ACS nano 4(10), 5897–5904 (2010).

[23] Chen, D., Viswanatha, R., Ong, G.L., Xie, R., Balasubramaninan, M., and Peng, X., "Temperature dependence of 'elementary processes' in doping semiconductor nanocrystals.," Journal of the American Chemical Society 131(26), 9333–9 (2009).

[24] Cancers, G., Linder, M.C., Moor, J.R., and Wright, K., "Ceruloplasmin Assays In Diagnosis and Treatment of Human Lung ," 67(2), 263–275 (1981).

[25] Kloust, H., Schmidtke, C., Merkl, J.-P., Feld, A., Schotten, T., Fittschen, U.E.A., Gehring, M., Ostermann, J., Po, E., et al., "Poly(ethylene oxide) and Polystyrene Encapsulated Quantum Dots: Highly Fluorescent, Functionalizable, and Ultrastable in Aqueous Media," Journal of Physical Chemistry C 117, 23244−23250 (2013).

[26] Tornøe, C.W., Christensen, C., and Meldal, M., "Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides.," The Journal of organic chemistry 67(9), 3057–64 (2002).

[27] Rostovtsev, V. V, Green, L.G., Fokin, V. V, and Sharpless, K.B., "A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective 'ligation' of azides and terminal alkynes.," Angewandte Chemie (International ed. in English) 41(14), 2596–9 (2002).

[28] Tron, G.C., Pirali, T., Billington, R.A., Canonico, P.L., Sorba, G., and Genazzani, A.A., "Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry : Applications of the 1 , 3-dipolar Cycloaddition Between Azides and Alkynes," Medical Research Reviews 28(2), 278–308 (2007).

[29] Moses, J.E., and Moorhouse, A.D., "The growing applications of click chemistry.," Chemical Society reviews 36(8), 1249–62 (2007).

[30] Algar, W.R., Prasuhn, D.E., Stewart, M.H., Jennings, T.L., Blanco-Canosa, J.B., Dawson, P.E., and Medintz, I.L., "The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry.," Bioconjugate chemistry 22(5), 825–58 (2011).

[31] Hong, V., Presolski, S.I., Ma, C., and Finn, M.G., "Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation.," Angewandte Chemie (International ed. in English) 48(52), 9879–83 (2009).

[32] Brennan, J.L., Hatzakis, N.S., Tshikhudo, T.R., Dirvianskyte, N., Razumas, V., Patkar, S., Vind, J., Svendsen, A., Nolte, R.J.M., et al., "Bionanoconjugation via click chemistry: The creation of functional hybrids of lipases and gold nanoparticles.," Bioconjugate chemistry 17(6), 1373–5 (2006).

[33] Boisselier, E., Salmon, L., Ruiz, J., and Astruc, D., "How to very efficiently functionalize gold nanoparticles by 'click' chemistry.," Chemical communications (Cambridge, England)(44), 5788–90 (2008).

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

[34] Van Dongen, S.F.M., Nallani, M., Schoffelen, S., Cornelissen, J.J.L.M., Nolte, R.J.M., and van Hest, J.C.M., "A Block Copolymer for Functionalisation of Polymersome Surfaces," Macromolecular Rapid Communications 29(4), 321–325 (2008).

[35] Pons, T., Medintz, I.L., Wang, X., English, D.S., and Mattoussi, H., "Solution-phase single quantum dot fluorescence resonance energy transfer.," Journal of the American Chemical Society 128(47), 15324–31 (2006).

[36] Zhan, N., Palui, G., Safi, M., Ji, X., and Mattoussi, H., "Multidentate Zwitterionic Ligands Provide Compact and Highly Biocompatible Quantum Dots.," Journal of the American Chemical Society (2013).

[37] Jiang, Z.-J., Leppert, V., and Kelley, D.F., "Static and Dynamic Emission Quenching in Core/Shell Nanorod Quantum Dots with Hole Acceptors," The Journal of Physical Chemistry C 113(44), 19161–19171 (2009).

[38] Lakowicz, J., [Principles of fluorescence spectroscopy] , 3rd ed., Springer, New York (2010).

[39] Schmidtke, C., Lange, H., Tran, H., Ostermann, J., Kloust, H., Bastús, N.G., Merkl, J.-P., Thomsen, C., and Weller, H., "Radical Initiated Reactions on Biocompatible CdSe-Based Quantum Dots: Ligand Cross-Linking, Crystal Annealing, and Fluorescence Enhancement," The Journal of Physical Chemistry C 117, 8570−8578 (2013).

[40] Pöselt, E., Schmidtke, C., Fischer, S., Peldschus, K., Salamon, J., Kloust, H., Tran, H., Pietsch, A., Heine, M., et al., "Tailor-made quantum dot and iron oxide based contrast agents for in vitro and in vivo tumor imaging.," ACS nano 6(4), 3346–55 (2012).

[41] Schmidtke, C., Pöselt, E., Ostermann, J., Pietsch, A., Kloust, H., Tran, H., Schotten, T., Bastús, N.G., Eggers, R., et al., "Amphiphilic, cross-linkable diblock copolymers for multifunctionalized nanoparticles as biological probes.," Nanoscale 5(16), 7433–44 (2013).

[42] Kloust, H., Pöselt, E., Kappen, S., Schmidtke, C., Kornowski, A., Pauer, W., Moritz, H.-U., and Weller, H., "Ultrasmall biocompatible nanocomposites: a new approach using seeded emulsion polymerization for the encapsulation of nanocrystals.," Langmuir 28(18), 7276–81 (2012).

[43] Kloust, H., Schmidtke, C., Feld, A., Schotten, T., Eggers, R., Fittschen, U.E., Schulz, F., Pöselt, E., Ostermann, J., et al., "In situ functionalization and PEO coating of iron oxide nanocrystals using seeded emulsion polymerization.," Langmuir 29(15), 4915–21 (2013).

[44] Hassane, F.S., Frisch, B., and Schuber, F., "Targeted Liposomes : Convenient Coupling of Ligands to Preformed Vesicles Using 'Click Chemistry'," Bioconjugate chemistry 17, 849–854 (2006).

[45] Schlegel, G., Bohnenberger, J., Potapova, I., and Mews, A., "Fluorescence Decay Time of Single Semiconductor Nanocrystals," Physical Review Letters 88(13), 1–4 (2002).

[46] Mekis, I., Talapin, D. V., Kornowski, A., Haase, M., and Weller, H., "One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdSe/CdS Core-Shell Nanocrystals via Organometallic and 'Greener' Chemical Approaches," The Journal of Physical Chemistry B 107(30), 7454–7462 (2003).

Downloaded From: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/ on 03/25/2014 Terms of Use: http://spiedl.org/terms

Literaturverzeichnis

[1] Zhan, N.; Palui, G.; Merkl, J.-P.; Mattoussi, H. Journal of the American Chemical Society **2016**, 138, 3190–3201.

[2] Merkl, J.-P.; Wolter, C.; Flessau, S.; Schmidtke, C.; Ostermann, J.; Feld, A.; Mews, A.; Weller, H. Nanoscale **2016**, 8, 7402–7407.

[3] Merkl, J.-P.; Schmidtke, C.; Safi, M.; Muroski, M.; Alpers, D.; Tran, H.; Ostermann, J.; Ehrich, S.; Strouse, G.; Wolters-Eisfeld, G.; Mattoussi, H.; Weller, H. TechConnect Briefs **2015**, 2, 78–81.

[4] Merkl, J.-P.; Heidari, H.; Schmidtke, C.; Kloust, H.; Feld, A.; Aldeek, F.; Lange, H.; Mattoussi, H.; Bals, S.; Weller, H. TechConnect Briefs **2015**, 6, 432–435.

[5] Zhan, N.; Palui, G.; Merkl, J.-P.; Mattoussi, H. Quantifying the density of surface capping ligands on semiconductor quantum dots. Proc. SPIE 9338. 2015; p 93381A.

[6] Feld, A.; Merkl, J.-P.; Kloust, H.; Flessau, S.; Schmidtke, C.; Wolter, C.; Ostermann, J.; Kampferbeck, M.; Eggers, R.; Mews, A.; Schotten, T.; Weller, H. Angewandte Chemie International Edition **2015**, 54, 12468–12471.

[7] Feld, A.; Merkl, J.-P.; Kloust, H.; Flessau, S.; Schmidtke, C.; Wolter, C.; Ostermann, J.; Kampferbeck, M.; Eggers, R.; Mews, A.; Schotten, T.; Weller, H. Angewandte Chemie **2015**, 127, 12645–12648.

[8] Kloust, H.; Zierold, R.; Merkl, J.-P.; Schmidtke, C.; Feld, A.; Pöselt, E.; Kornowski, A.; Nielsch, K.; Weller, H. Chemistry of Materials **2015**, 27, 4914–4917.

[9] Ostermann, J.; Schmidtke, C.; Wolter, C.; Merkl, J.-P.; Kloust, H.; Weller, H. Beilstein Journal of Nanotechnology **2015**, 6, 232–242.

[10] Schmidtke, C.; Eggers, R.; Zierold, R.; Feld, A.; Kloust, H.; Wolter, C.; Ostermann, J.; Merkl, J.-P.; Schotten, T.; Nielsch, K.; Weller, H. Langmuir **2014**, 30, 11190–11196.

[11] Dimitrijevic, J.; Krapf, L.; Wolter, C.; Schmidtke, C.; Merkl, J.-P.; Jochum, T.; Kornowski, A.; Schüth, A.; Gebert, A.; Hüttmann, G.; Vossmeyer, T.; Weller, H. Nanoscale **2014**, 6, 10413–22.

[12] Merkl, J.-P.; Ostermann, J.; Schmidtke, C.; Kloust, H.; Eggers, R.; Feld, A.; Wolter, C.; Kreuziger, A.-M.; Flessau, S.; Mattoussi, H.; Weller, H. Shielding of quantum dots using diblock copolymers: implementing copper catalyzed click chemistry to fluorescent quantum dots. Proc. of SPIE 8955. 2014; p 89551X.

[13] Kloust, H.; Schmidtke, C.; Merkl, J.-P.; Feld, A.; Schotten, T.; Fittschen, U. E. A.; Gehring, M.; Ostermann, J.; Pöselt, E.; Weller, H. The Journal of Physical Chemistry C **2013**, 117, 23244–23250.

[14] Schmidtke, C.; Kloust, H.; Bastús, N. G.; Merkl, J.-P.; Tran, H.; Flessau, S.; Feld, A.; Schotten, T.; Weller, H. Nanoscale **2013**, 5, 11783–11794.

[15] Ostermann, J.; Merkl, J.-P.; Flessau, S.; Wolter, C.; Kornowksi, A.; Schmidtke, C.; Pietsch, A.; Kloust, H.; Feld, A.; Weller, H. ACS Nano **2013**, 7, 9156–9167.

[16] Schmidtke, C.; Lange, H.; Tran, H.; Ostermann, J.; Kloust, H.; Bastús, N. G.; Merkl, J.-P.; Thomsen, C.; Weller, H. The Journal of Physical Chemistry C **2013**, 117, 8570–8578.

[17] Smalley, R. E. 27th Illinois Jr. Science & Humanities Symposium **2005**, 27.

[18] Parak, W. J.; Nel, A. E.; Weiss, P. S. ACS Nano **2015**, 9, 6637–6640.

[19] Whitesides, G. M. Small **2005**, 172–179.

[20] Mattoussi, H.; Rotello, V. Advanced Drug Delivery Reviews **2013**, 65, 605–756.

[21] Faraday, M. Philosophical Transactions of the Royal Society of London **1857**, 147, 145–181.

[22] Balzani, V.; Credi, A.; Venturi, M. Chemistry – A European Journal **2002**, 8, 5524–5532.

[23] Goesmann, H.; Feldmann, C. Angewandte Chemie International Edition **2010**, 49, 1362–1395.

[24] Goesmann, H.; Feldmann, C. Angewandte Chemie **2010**, 122, 1402–1437.

[25] Vance, M. E.; Kuiken, T.; Vejerano, E. P.; McGinnis, S. P.; Hochella, M. F.; Rejeski, D.; Hull, M. S. Beilstein Journal of Nanotechnology **2015**, 6, 1769–1780.

[26] Wagner, S.; Gondikas, A.; Neubauer, E.; Hofmann, T.; von der Kammer, F. Angewandte Chemie International Edition **2014**, 53, 12398–12419.

[27] Wagner, S.; Gondikas, A.; Neubauer, E.; Hofmann, T.; von der Kammer, F. Angewandte Chemie **2014**, 126, 12604–12626.

[28] Kovalenko, M. V. et al. ACS Nano **2015**, 9, 1012–1057.

[29] Liz-Marzán, L. M. Angewandte Chemie International Edition **2015**, 54, 3860–3861.

[30] Parolo, P. D. B.; Kumar, R.; Ghosh, R.; Huberman, B. a.; Kaski, K. ArXiv **2015**, 1503.01881.

[31] Bothe, C.; Kornowski, A.; Tornatzky, H.; Schmidtke, C.; Lange, H.; Maultzsch, J.; Weller, H. Angewandte Chemie **2015**, 127, 14389–14393.

[32] Bothe, C.; Kornowski, A.; Tornatzky, H.; Schmidtke, C.; Lange, H.; Maultzsch, J.; Weller, H. Angewandte Chemie International Edition **2015**, 54, 14183–14186.

[33] Guerrero-Martínez, A.; Grzelczak, M.; Liz-Marzán, L. M. ACS Nano **2012**, 6, 3655–3662.

[34] Warren, S. C.; Guney-Altay, O.; Grzybowski, B. a. Journal of Physical Chemistry Letters **2012**, 3, 2103–2111.

[35] Bruchez Jr., M.; Moronne, M.; Gin, P.; S, W.; Alivisatos, a. P. Science **1998**, 281, 2013–2016.

[36] Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Nature Methods **2008**, 5, 763–775.

[37] Silvi, S.; Credi, A. Chemical Society Reviews **2015**, 44, 4275–4289.

[38] Kantner, K. et al. Small **2015**, 11, 896–904.

[39] Howes, P. D.; Chandrawati, R.; Stevens, M. M. Science **2014**, 346, 1247390–1247390.

[40] Lemon, C. M.; Curtin, P. N.; Somers, R. C.; Greytak, A. B.; Lanning, R. M.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G.; Nocera, D. G. Inorganic Chemistry **2014**, 53, 1900–1915.

[41] Palui, G.; Aldeek, F.; Wang, W. T.; Mattoussi, H. Chemical Society Reviews **2015**, 44, 193–227.

[42] García, K. P.; Zarschler, K.; Barbaro, L.; Barreto, J. a.; O'Malley, W.; Spiccia, L.; Stephan, H.; Graham, B. Small **2014**, 10, 2516–2529.

[43] Derfus, A. M.; Chan, W. C. W.; Bhatia, S. N. Nano Letters **2004**, 4, 11–18.

[44] Rivest, J. B.; Jain, P. K. Chemical Society Reviews **2013**, 42, 89–96.

[45] Schlücker, S. Angewandte Chemie - International Edition **2014**, 53, 4756–4795.

[46] Schlücker, S. Angewandte Chemie **2014**, 126, 4852–4894.

[47] Morsbach, E.; Brauns, E.; Kowalik, T.; Lang, W.; Kunz, S.; Bäumer, M. Physical Chemistry Chemical Physics **2014**, 16, 21243–21251.

[48] Li, Y.; Zhou, J.; Liu, C.; Li, H. Journal of Materials Chemistry **2012**, 22, 2507.

[49] Demeler, B.; Nguyen, T.-L.; Gorbet, G. E.; Schirf, V.; Brookes, E. H.; Mulvaney, P.; El-Ballouli, A. O.; Pan, J.; Bakr, O. M.; Demeler, A. K.; Hernandez Uribe, B. I.; Bhattarai, N.; Whetten, R. L. Analytical Chemistry **2014**, 86, 7688–7695.

[50] Romo-Herrera, J. M.; Alvarez-Puebla, R. a.; Liz-Marzán, L. M. Nanoscale **2011**, 3, 1304–15.

[51] de Broglie, L. Nature **1923**, 112, 540.

[52] Broglie, L. Foundations of Physics **1970**, 1, 5–15.

[53] Astruc, D. Nanoparticles and Catalysis, 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2007.

[54] Henglein, A. Chemical Reviews **1989**, 89, 1861–1873.

[55] Schmid, G. In Nanoparticles, 2nd ed.; Schmid, G., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2010.

[56] LaMer, V. K.; Dinegar, H. Journal of the American Chemical Society **1950**, 72, 4847–4854.

[57] Xia, Y.; Xia, X.; Peng, H.-C. Journal of the American Chemical Society **2015**, 137, 7947–7966.

[58] P. W. Atkins and J. de Paula, Physikalische Chemie, 3rd ed.; WILEY-VCH: Weinheim, 2006.

[59] Russel, W. B. Journal of Rheology **1980**, 24, 287.

[60] Gates, B. D.; Xu, Q.; Stewart, M.; Ryan, D.; Willson, C. G.; Whitesides, G. M. Chemical Reviews **2005**, 105, 1171–1196.

[61] Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntes, V. Langmuir **2011**, 27, 11098–105.

[62] Aldeek, F.; Safi, M.; Zhan, N.; Palui, G.; Mattoussi, H. ACS Nano **2013**, 7, 10197–10210.

[63] Pang, X.; Zhao, L.; Han, W.; Xin, X.; Lin, Z. Nature Nanotechnology **2013**, 8, 426–31.

[64] Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.-S. Science and Technology of Advanced Materials **2015**, 16, 023501.

[65] Lee, N.; Yoo, D.; Ling, D.; Cho, M. H.; Hyeon, T.; Cheon, J. Chemical Reviews **2015**, 150807073744009.

[66] Wang, Y. X. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery **2011**, 1, 35–40.

[67] Hasany, S. F.; Rehman, A.; Jose, R.; Ahmed, I. Current Nanoscience **2013**, 9, 561–575.

[68] Ling, D.; Hyeon, T. Small **2013**, 9, 1450–1466.

[69] Xu, P.; Zeng, G. M.; Huang, D. L.; Feng, C. L.; Hu, S.; Zhao, M. H.; Lai, C.; Wei, Z.; Huang, C.; Xie, G. X.; Liu, Z. F. Science of The Total Environment **2012**, 424, 1–10.

[70] Nassar, N. N. Application of Adsorbents for Water Pollution Control **2012**, 81–118.

[71] Robey, R. F.; Dix, W. M. Journal of Chemical Education **1937**, 14, 414.

[72] Wagner, D. Einführung in die Theorie des Magnetismus; Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, 1966.

[73] Sorensen, C. In Nanoscale Materials in Chemistry; Klabunde, K. J., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Weinheim, 2001.

[74] Colombo, M.; Carregal-Romero, S.; Casula, M. F.; Gutiérrez, L.; Morales, M. P.; Böhm, I. B.; Heverhagen, J. T.; Prosperi, D.; Parak, W. J. Chemical Society Reviews **2012**, 41, 4306.

[75] Kim, J.; Piao, Y.; Hyeon, T. Chemical Society Reviews **2009**, 38, 372–390.

[76] Currie, P. Annales de Chimie et de Physique **1895**, 5, 289–405.

[77] Weiss, P.-E. Journal of Physics **1911**, 1, 965.

[78] Daou, T. J.; Grenèche, J. M.; Pourroy, G.; Buathong, S.; Derory, a.; Ulhaq-Bouillet, C.; Donnio, B.; Guillon, D.; Begin-Colin, S. Chemistry of Materials **2008**, 20, 5869–5875.

[79] Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J.-G.; Noh, H.-J.; Kim, J.-Y.; Park, J.-H.; Hwang, N.-M.; Hyeon, T. Nature Materials **2004**, 3, 891–895.

[80] Hyeon, T.; Lee, S. S.; Park, J.; Chung, Y.; Na, H. B. Journal of the American Chemical Society **2001**, 123, 12798–12801.

[81] Yu, W. W.; Falkner, J. C.; Yavuz, C. T.; Colvin, V. L. Chemical Communications **2004**, 2306–2307.

[82] Zhao, Y.; Li, Y.-H.; Ma, R.; Roe, M.; McCartney, D.; Zhu, Y. Small **2006**, 2, 422–427.

[83] Chaudhari, N. K.; Yu, J.-S. The Journal of Physical Chemistry C **2008**, 112, 19957–19962.

[84] Nadagouda, M. N.; Varma, R. S. Crystal Growth & Design **2007**, 8, 291–295.

[85] Park, S.-J.; Kim, S.; Lee, S.; Khim, Z. G.; Char, K.; Hyeon, T. Journal of the American Chemical Society **2000**, 122, 8581–8582.

[86] Sun, H.; Chen, B.; Jiao, X.; Jiang, Z.; Qin, Z.; Chen, D. The Journal of Physical Chemistry C **2012**, 116, 5476–5481.

[87] Si, J. C.; Xing, Y.; Peng, M. L.; Zhang, C.; Buske, N.; Chen, C.; Cui, Y. L. Crystengcomm **2014**, 16, 512–516.

[88] Bigall, N. C.; Parak, W. J.; Dorfs, D. Nano Today **2012**, 7, 282–296.

[89] Kostopoulou, A.; Lappas, A. Nanotechnology Reviews **2015**, 4.

[90] Pöselt, E.; Kloust, H.; Tromsdorf, U.; Janschel, M.; Hahn, C.; Maßlo, C.; Weller, H. ACS Nano **2012**, 6, 1619–1624.

[91] Maxwell Garnett, J. C. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences **1904**, 203, 385–420.

[92] Mie, G. Annalen der Physik **1908**, 25, 377–445.

[93] Liz-Marzán, L. M.; Murphy, C. J.; Wang, J. Chemical Society Reviews **2014**, 43, 3820.

[94] Koenderink, A. F.; Alu, A.; Polman, A. Science **2015**, 348, 516–521.

[95] Stockman, M. I. Physics Today **2011**, 64, 39–44.

[96] Huang, X.; El-Sayed, M. a. Journal of Advanced Research **2010**, 1, 13–28.

[97] Nguyen, S. C.; Zhang, Q.; Manthiram, K.; Ye, X.; Lomont, J. P.; Harris, C. B.; Weller, H.; Alivisatos, A. P. ACS Nano **2016**, 10, 2144–2151.

[98] Link, S.; El-Sayed, M. A. The Journal of Physical Chemistry B **1999**, 103, 8410–8426.

[99] Yguerabide, J.; Yguerabide, E. E. Analytical Biochemistry **1998**, 262, 137–156.

[100] Brongersma, M. L.; Halas, N. J.; Nordlander, P. Nature Nanotechnology **2015**, 10, 25–34.

[101] Christopher, P.; Xin, H.; Linic, S. Nature Chemistry **2011**, 3, 467–472.

[102] Misawa, M.; Takahashi, J. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine **2011**, 7, 604–614.

[103] El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A. Cancer Letters **2006**, 239, 129–135.

[104] Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. Chemical Society Reviews **2012**, 41, 2740–2779.

[105] Maier, S. A. Plasmonics: Fundamentals and Applications; Springer Science+Business Media LLC: New York, 2007.

[106] Kreibig, U.; Vollmer, M. Optical Properties of Metal Clusters; Springer Berlin Heidelberg: New York, 1995.

[107] Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. Discuss. Faraday Soc. **1951**, 11, 55–75.

[108] Schulz, F.; Homolka, T.; Bastús, N. G.; Puntes, V.; Weller, H.; Vossmeyer, T. Langmuir **2014**, 30, 10779–10784.

[109] Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. The Journal of Physical Chemistry B **2006**, 110, 15700–15707.

[110] Zhao, P.; Li, N.; Astruc, D. Coordination Chemistry Reviews **2013**, 257, 638–665.

[111] Aldeek, F.; Muhammed, M. A. H.; Palui, G.; Zhan, N.; Mattoussi, H. ACS Nano **2013**, 7, 2509–2521.

[112] Park, J.-W.; Shumaker-Parry, J. S. ACS Nano **2015**, 9, 1665–1682.

[113] Rehbock, C.; Merk, V.; Gamrad, L.; Streubel, R.; Barcikowski, S. Physical Chemistry Chemical Physics **2013**, 15, 3057–3067.

[114] Smith, D. K.; Korgel, B. A. Langmuir **2008**, 24, 644–649.

[115] Scarabelli, L.; Coronado-Puchau, M.; Giner-Casares, J. J.; Langer, J.; Liz-Marzán, L. M. ACS Nano **2014**, 8, 5833–5842.

[116] Gou, L.; Murphy, C. J. Chemistry of Materials **2005**, 17, 3668–3672.

[117] Shao, Y.; Jin, Y.; Dong, S. Chemical Communications **2004**, 1104.

[118] Skrabalak, S. E.; Chen, J.; Sun, Y.; Lu, X.; Au, L.; Cobley, C. M.; Xia, Y. Accounts of Chemical Research **2008**, 41, 1587–1595.

[119] Senthil Kumar, P.; Pastoriza-Santos, I.; Rodríguez-González, B.; Javier García de Abajo, F.; Liz-Marzán, L. M. Nanotechnology **2008**, 19, 015606.

[120] Grzelczak, M.; Pérez-Juste, J.; Mulvaney, P.; Liz-Marzán, L. M. Chemical Society Reviews **2008**, 37, 1783.

[121] Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M.; Carnie, S.; Chan, D. Y. C.; Mulvaney, P. Advanced Functional Materials **2004**, 14, 571–579.

[122] Johnson, C. J.; Dujardin, E.; Davis, S. a.; Murphy, C. J.; Mann, S. Journal of Materials Chemistry **2002**, 12, 1765–1770.

[123] Scarabelli, L.; Sánchez-Iglesias, A.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. The Journal of Physical Chemistry Letters **2015**, 6, 4270–4279.

[124] Scarabelli, L. Rational Synthesis and Self-Assembly of Anisotropic Nanoparticles. Ph.D. thesis, Universidad de Vigo, 2015.

[125] Almora-Barrios, N.; Novell-Leruth, G.; Whiting, P.; Liz-Marzán, L. M.; López, N. Nano Letters **2014**, 14, 871–875.

[126] Katz-Boon, H.; Walsh, M.; Dwyer, C.; Mulvaney, P.; Funston, A. M.; Etheridge, J. Nano letters **2015**, 15, 1635–1641.

[127] Aouani, H.; Rahmani, M.; Navarro-Cía, M.; Maier, S. A. Nature Nanotechnology **2014**, 9, 290–294.

[128] Bardhan, R.; Grady, N. K.; Cole, J. R.; Joshi, A.; Halas, N. J. ACS Nano **2009**, 3, 744–752.

[129] Kusch, P.; Heeg, S.; Lehmann, C.; Müller, N. S.; Wasserroth, S.; Oikonomou, A.; Clark, N.; Vijayaraghavan, A.; Reich, S. arXiv **2015**, 1503.03835.

[130] Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Physical Review Letters **1997**, 78, 1667–1670.

[131] Nie, S.; Emory, S. R. Science **1997**, 275, 1102–1106.

[132] Lakowicz, J. R.; Ray, K.; Chowdhury, M.; Szmacinski, H.; Fu, Y.; Zhang, J.; Nowaczyk, K. The Analyst **2008**, 133, 1308.

[133] Serrano-Montes, A. B.; de Aberasturi, D. J.; Langer, J.; Giner-Casares, J. J.; Scarabelli, L.; Herrero, A.; Liz-Marzán, L. M. Langmuir **2015**, 150815092507003.

[134] Cheng, J.-X.; Xie, X. S. Science **2015**, 350, aaa8870–aaa8870.

[135] Weller, H. Advanced Materials **1993**, 5, 88–95.

[136] Weller, H. Angewandte Chemie International Edition **1993**, 32, 41–53.

[137] Weller, H. Angewandte Chemie **1993**, 105, 43–55.

[138] Feldmann, C.; Jüstel, T.; Ronda, C.; Schmidt, P. Advanced Functional Materials **2003**, 13, 511–516.

[139] Rabouw, F. T.; Vaxenburg, R.; Bakulin, A. A.; van Dijk-Moes, R. J. A.; Bakker, H. J.; Rodina, A.; Lifshitz, E.; L. Efros, A.; Koenderink, A. F.; Vanmaekelbergh, D. ACS Nano **2015**, 9, 10366–10376.

[140] Jang, E.; Jun, S.; Jang, H.; Lim, J.; Kim, B.; Kim, Y. Advanced Materials **2010**, 22, 3076–3080.

[141] Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. Journal of the American Chemical Society **1993**, 115, 8706–8715.

[142] Mekis, I.; Talapin, D. V.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. The Journal of Physical Chemistry B **2003**, 107, 7454–7462.

[143] Green, M. Journal of Materials Chemistry **2010**, 20, 5797.

[144] Chen, O.; Zhao, J.; Chauhan, V. P.; Cui, J.; Wong, C.; Harris, D. K.; Wei, H.; Han, H.-S.; Fukumura, D.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G. Nature Materials **2013**, 12, 445–451.

[145] Allen, P. M.; Walker, B. J.; Bawendi, M. G. Angewandte Chemie International Edition **2010**, 49, 760–762.

[146] Dabbousi, B. O. et al. J. Phys. Chem. B **1997**, 101, 9463–9475.

[147] Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. Nano Letters **2001**, 1, 207–211.

[148] Kim, S.; Fisher, B.; Eisler, H.-J.; Bawendi, M. Journal of the American Chemical Society **2003**, 125, 11466–7.

[149] Zhu, H.; Song, N.; Lian, T. Journal of the American Chemical Society **2011**, 133, 8762–71.

[150] Balet, L. P.; Ivanov, S. A.; Piryatinski, A.; Achermann, M.; Klimov, V. I. Nano Letters **2004**, 4, 1485–1488.

[151] Li, J. J.; Wang, Y. A.; Guo, W.; Keay, J. C.; Mishima, T. D.; Johnson, M. B.; Peng, X. Journal of the American Chemical Society **2003**, 125, 12567–75.

[152] Xie, R.; Kolb, U.; Li, J.; Basché, T.; Mews, A. Journal of the American Chemical Society **2005**, 127, 7480–7488.

[153] Talapin, D. V.; Mekis, I.; Götzinger, S.; Kornowski, A.; Benson, O.; Weller, H. Journal of Physical Chemistry B **2004**, 108, 18826–18831.

[154] Ivanov, S. A.; Piryatinski, A.; Nanda, J.; Tretiak, S.; Zavadil, K. R.; Wallace, W. O.; Werder, D.; Klimov, V. I. Journal of the American Chemical Society **2007**, 129, 11708–19.

[155] Bajwa, P.; Gao, F.; Nguyen, A.; Omogo, B.; Heyes, C. D. ChemPhysChem **2015**, asap.

[156] Mahler, B.; Spinicelli, P.; Buil, S.; Quelin, X.; Hermier, J.-P.; Dubertret, B. Nature Materials **2008**, 7, 659–664.

[157] Chen, Y.; Vela, J.; Htoon, H.; Casson, J. L.; Werder, D. J.; Bussian, D. A.; Klimov, V. I.; Hollingsworth, J. A. Journal of the American Chemical Society **2008**, 130, 5026–5027.

[158] Wang, X.; Ren, X.; Kahen, K.; Hahn, M. A.; Rajeswaran, M.; Maccagnano-Zacher, S.; Silcox, J.; Cragg, G. E.; Efros, A. L.; Krauss, T. D. Nature **2009**, 459, 686–9.

[159] Boldt, K.; Schwarz, K. N.; Kirkwood, N.; Smith, T. A.; Mulvaney, P. The Journal of Physical Chemistry C **2014**, 118, 13276–13284.

[160] Casavola, M.; van Huis, M. A.; Bals, S.; Lambert, K.; Hens, Z.; Vanmaekelbergh, D. Chemistry of Materials **2012**, 24, 294–302.

[161] Groeneveld, E.; Witteman, L.; Lefferts, M.; Ke, X.; Bals, S.; Van Tendeloo, G.; de Mello Donega, C. ACS Nano **2013**, 7, 7913–7930.

[162] Kumar, S.; Nann, T. Small **2006**, 2, 316–329.

[163] Washington, A. L.; Foley, M. E.; Cheong, S.; Quffa, L.; Breshike, C. J.; Watt, J.; Tilley, R. D.; Strouse, G. F. Journal of the American Chemical Society **2012**, 134, 17046–52.

[164] Alivisatos, A. P.; Peng, X.; Manna, L.; Yang, W.; Wickham, J.; Scher, E.; Kadavanich, A. Nature **2000**, 404, 59–61.

[165] Talapin, D. V.; Koeppe, R.; Gotzinger, S.; Kornowski, A.; Lupton, J. M.; Rogach, A. L.; Benson, O.; Feldmann, J.; Weller, H. Nano Letters **2003**, 3, 1677–1681.

[166] Carbone, L. et al. Nano Letters **2007**, 7, 2942–50.

[167] Manna, L.; Milliron, D. J.; Meisel, A.; Scher, E. C.; Alivisatos, a. P. Nature Materials **2003**, 2, 382–385.

[168] Milliron, D.; Hughes, S.; Cui, Y.; Manna, L. Nature **2004**, 430, 190–195.

[169] Son, D. H.; Hughes, S. M.; Yin, Y.; Alivisatos, A. P. Science **2004**, 306, 1009–1012.

[170] Chan, E. M.; Marcus, M. a.; Fakra, S.; ElNaggar, M.; Mathies, R. a.; Alivisatos, a. P. The Journal of Physical Chemistry A **2007**, 111, 12210–12215.

[171] Kriegel, I.; Wisnet, A.; Srimath Kandada, A. R.; Scotognella, F.; Tassone, F.; Scheu, C.; Zhang, H.; Govorov, A. O.; Rodríguez-Fernández, J.; Feldmann, J. Journal of Materials Chemistry C **2014**, 2, 3189.

[172] Chen, D.; Viswanatha, R.; Ong, G. L.; Xie, R.; Balasubramaninan, M.; Peng, X. Journal of the American Chemical Society **2009**, 131, 9333–9.

[173] Zheng, H.; Rivest, J. B.; Miller, T. a.; Sadtler, B.; Lindenberg, A.; Toney, M. F.; Wang, L.-W.; Kisielowski, C.; Alivisatos, a. P. Science **2011**, 333, 206–209.

[174] Ott, F. D.; Spiegel, L. L.; Norris, D. J.; Erwin, S. C. Physical Review Letters **2014**, 113, 156803.

[175] Comin, A.; Manna, L. Chemical Society Reviews **2014**, 43, 3957.

[176] De Trizio, L.; Manna, L. Chemical Reviews **2016**, acs.chemrev.5b00739.

[177] Baek, J.; Allen, P. M.; Bawendi, M. G.; Jensen, K. F. Angewandte Chemie International Edition **2011**, 50, 627–630.

[178] Baek, J.; Allen, P. M.; Bawendi, M. G.; Jensen, K. F. Angewandte Chemie **2011**, 123, 653–656.

[179] Tran, V.-H. Entwicklung einer Miniplant-Anlage für die Verschalung von CdSe basierten II-VI halbleitenden Nanopartikeln im Fließ-System. Ph.D. thesis, 2012.

[180] Tran ; Niehaus, Steffen Jan, ; Weller, Horst, ; Ness, Daniel,, V. H.; NANOPARTICLES, M. F. O. R. P. C. N. A. N. D. C. METHOD FOR PRODUCING CORE/SHELL NANOPARTICLES AND CORE/SHELL NANOPARTICLES . 2014.

[181] Gómez, D. E.; Califano, M.; Mulvaney, P. Physical Chemistry Chemical Physics **2006**, 8, 4989.

[182] Nirmal, M.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. Physical Review Letters **1995**, 75, 3728–3731.

[183] Efros, A.; Rosen, M. Physical Review Letters **1997**, 78, 1110–1113.

[184] Bergmann, L. Lehrbuch der Experimentalphysik - Festkörper, 6th ed.; Walter de Gruyter: Berlin, New York, 1992.

[185] Bloch, F. Physical Review **1946**, 70, 460–474.

[186] Bloch, F. Physical Review **1956**, 102, 104–135.

[187] Wang, Y. R.; Duke, C. B. Physical Review B **1988**, 37, 6417–6424.

[188] Boldt, K. Untersuchungen an Halbleitenden Nanoheterostrukturen. Ph.D. thesis, Universität Hamburg, 2011.

[189] Bawendi, M. G.; Steigerwald, M. L.; Brus, L. E. Annual Review of Physical Chemistry **1990**, 41, 477–496.

[190] Brus, L. E. The Journal of Chemical Physics **1984**, 80, 4403.

[191] Jones, M.; Scholes, G. D. Journal of Materials Chemistry **2010**, 20, 3533.

[192] Efros, A.; Rosen, M.; Kuno, M.; Nirmal, M.; Norris, D.; Bawendi, M. Physical Review B **1996**, 54, 4843–4856.

[193] Turro, N. J. Modern Molecular Photochemistry; University Science Books, 1991.

[194] Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 4th ed.; Springer-Verlag: Heidelberg, 2006.

[195] Schlegel, G.; Bohnenberger, J.; Potapova, I.; Mews, A. Physical Review Letters **2002**, 88, 1–4.

[196] Shen, Y.; Tan, R.; Gee, M. Y.; Greytak, A. B. ACS Nano **2015**, 9, 3345–3359.

[197] Empedocles, S.; Bawendi, M. Accounts of Chemical Research **1999**, 32, 389–396.

[198] Empedocles, S.; Norris, D.; Bawendi, M. Physical Review Letters **1996**, 77, 3873–3876.

[199] Rowland, C. E.; Susumu, K.; Stewart, M. H.; Oh, E.; Mäkinen, A. J.; O'Shaughnessy, T. J.; Kushto, G.; Wolak, M. A.; Erickson, J. S.; L. Efros, A.; Huston, A. L.; Delehanty, J. B. Nano Letters **2015**, 15, 6848–6854.

[200] Dickson, R. M.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y.; Moerner, W. E. Nature **1997**, 388, 355–8.

[201] Basché, T. Journal of Luminescence **1998**, 77, 263–269.

[202] Meschede, D. Gethersen Physik, 24th ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2010.

[203] Fisher, B. R.; Eisler, H.-J.; Stott, N. E.; Bawendi, M. G. The Journal of Physical Chemistry B **2004**, 11, 143–148.

[204] Kuno, M.; Fromm, D. P.; Hamann, H. F.; Gallagher, a.; Nesbitt, D. J. The Journal of Chemical Physics **2000**, 112, 3117.

[205] Cordones, A. A.; Bixby, T. J.; Leone, S. R. Nano Letters **2011**, 11, 3366–3369.

[206] Michler, P.; Imamoglu, a.; Mason, M.; Carson, P.; Strouse, G.; Buratto, S. Nature **2000**, 406, 968–70.

[207] Crouch, C. H.; Sauter, O.; Wu, X.; Purcell, R.; Querner, C.; Drndic, M.; Pelton, M. Nano Letters **2010**, 10, 1692–8.

[208] Galland, C.; Ghosh, Y.; Steinbrück, A.; Sykora, M.; Hollingsworth, J. A.; Klimov, V. I.; Htoon, H. Nature **2011**, 479, 203–7.

[209] Hohng, S.; Ha, T. Journal of the American Chemical Society **2004**, 126, 1324–5.

[210] Hamada, M.; Nakanishi, S.; Itoh, T.; Ishikawa, M.; Biju, V. ACS Nano **2010**, 4, 4445–4454.

[211] Rabouw, F. T.; Cogan, N. M. B.; Berends, A. C.; van der Stam, W.; Vanmaekelbergh, D.; Koenderink, A. F.; Krauss, T. D.; Donegá, C. d. M. ArXiv **2015**,

[212] Wang, X.; Ren, X.; Kahen, K.; Hahn, M. A.; Rajeswaran, M.; Maccagnano-Zacher, S.; Silcox, J.; Cragg, G. E.; Efros, A. L.; Krauss, T. D. Nature **2015**, 527, 544–544.

[213] Flessau, S.; Wolter, C.; Poselt, E.; Kroger, E.; Mews, A.; Kipp, T. Physical Chemistry Chemical Physics **2014**, 16, 10444–10455.

[214] Xiong, W.; Hickstein, D. D.; Schnitzenbaumer, K. J.; Ellis, J. L.; Palm, B. B.; Keister, K. E.; Ding, C.; Miaja-Avila, L.; Dukovic, G.; Jimenez, J. L.; Murnane, M. M.; Kapteyn, H. C. Nano Letters **2013**, 13, 2924–2930.

[215] Bell, D. M.; Howder, C. R.; Johnson, R. C.; Anderson, S. L. ACS Nano **2014**, 8, 2387–2398.

[216] Pons, T.; Medintz, I. L.; Wang, X.; English, D. S.; Mattoussi, H. Journal of the American Chemical Society **2006**, 128, 15324–15331.

[217] Ji, X.; Wang, W.; Mattoussi, H. Nano Today **2015**, 1–24.

[218] Stern, O.; Volmer, M. Physikalische Zeitschrift **1919**, 20, 183–188.

[219] Förster, T. Annalen der Physik **1948**, 6, 55–75.

[220] Marcus, R. A. The Journal of Chemical Physics **1956**, 24, 966.

[221] Marcus, R. A. Nobel Lecture **1992**,

[222] Smoluchowski, M. Annalen der Physik **1915**, 48, 1103–1112.

[223] Scholes, G. D. Annual Review of Physical Chemistry **2003**, 54, 57–87.

[224] Clapp, A. R.; Medintz, I. L.; Mauro, J. M.; Fisher, B. R.; Bawendi, M. G.; Mattoussi, H. Journal of the American Chemical Society **2004**, 126, 301–310.

[225] Krainer, G.; Hartmann, A.; Schlierf, M. Nano letters **2015**, 5–8.

[226] Pons, T.; Medintz, I. L.; Sapsford, K. E.; Higashiya, S.; Grimes, A. F.; English, D. S.; Mattoussi, H. Nano Letters **2007**, 7, 3157–64.

[227] Medintz, I. L.; Pons, T.; Trammell, S. a.; Grimes, A. F.; English, D. S.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Journal of the American Chemical Society **2008**, 130, 16745–56.

[228] Aldeek, F.; Ji, X.; Mattoussi, H. The Journal of Physical Chemistry C **2013**, 117, 15429–15437.

[229] Wegner, K. D.; Hildebrandt, N. Chem. Soc. Rev. **2015**, 44, 4792–4834.

[230] Ertl, G. Angewandte Chemie International Edition **2008**, 47, 3524–3535.

[231] Ertl, G. Angewandte Chemie **2008**, 120, 3578–3590.

[232] Boles, M. A.; Ling, D.; Hyeon, T.; Talapin, D. V. Nature Materials **2016**, 15, 141–153.

[233] Moyano, D. F.; Rotello, V. M. Langmuir **2011**, 27, 10376–10385.

[234] Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. Nature Materials **2005**, 4, 435–46.

[235] Zhou, J.; Yang, Y.; Zhang, C.-y. Chemical Reviews **2015**, 115, 11669–11717.

[236] Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. Chemical Reviews **2013**, 113, 1904–2074.

[237] Hines, D. A.; Kamat, P. V. ACS Applied Materials & Interfaces **2014**, 6, 3041–3057.

[238] Karakoti, A. S.; Das, S.; Thevuthasan, S.; Seal, S. Angewandte Chemie **2011**, 123, 2024–2040.

[239] Karakoti, A. S.; Das, S.; Thevuthasan, S.; Seal, S. Angewandte Chemie International Edition **2011**, 50, 1980–1994.

[240] Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R. N.; Gambhir, S. S. Nanomedicine **2011**, 6, 715–728.

[241] Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. Advanced Drug Delivery Reviews **2002**, 54, 459–476.

[242] Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Angewandte Chemie International Edition **2010**, 49, 6288–6308.

[243] Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Angewandte Chemie **2010**, 122, 6430–6452.

[244] Hemenway, J. N.; Carvalho, T. C.; Rao, V. M.; Wu, Y.; Levons, J. K.; Narang, A. S.; Paruchuri, S. R.; Stamato, H. J.; Varia, S. A. Journal of Pharmaceutical Sciences **2012**, 101, 3305–3318.

[245] Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Chemical Reviews **2005**, 105, 1103–1170.

[246] Thiry, M.; Boldt, K.; Nikolic, M. S.; Schulz, F.; Ijeh, M.; Panicker, A.; Vossmeyer, T.; Weller, H. ACS Nano **2011**, 5, 4965–4973.

[247] Takeuchi, H.; Omogo, B.; Heyes, C. D. Nano Letters **2013**, 13, 4746–4752.

[248] Manshian, B. B.; Pfeiffer, C.; Pelaz, B.; Heimerl, T.; Gallego, M.; Möller, M.; del Pino, P.; Himmelreich, U.; Parak, W. J.; Soenen, S. J. ACS Nano **2015**, 9, 10431–10444.

[249] Pelaz, B.; del Pino, P.; Maffre, P.; Hartmann, R.; Gallego, M.; Rivera-Fernández, S.; de la Fuente, J. M.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J. ACS Nano **2015**, 9, 6996–7008.

[250] Breus, V.; Heyes, C.; Nienhaus, G. Journal of Physical Chemistry C **2007**, 111, 18589–18594.

[251] Bruchez Jr., M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. Science **1998**, 281, 2013–2016.

[252] Mattoussi, H.; Mauro, J.; Goldman, E.; Green, T.; Anderson, G.; Sundar, V.; Bawendi, M. Physica Status Solidi (B) **2001**, 224, 277–283.

[253] Susumu, K.; Mei, B. C.; Mattoussi, H. Nature Protocols **2009**, 4, 424–436.

[254] Zhan, N.; Palui, G.; Safi, M.; Ji, X.; Mattoussi, H. Journal of the American Chemical Society **2013**, 135, 13786–13795.

[255] Zhan, N.; Palui, G.; Mattoussi, H. Nature Protocols **2015**, 10, 859–874.

[256] Zhan, N.; Palui, G.; Grise, H.; Tang, H.; Alabugin, I.; Mattoussi, H. ACS Applied Materials & Interfaces **2013**, 5, 2861–2869.

[257] Palui, G.; Avellini, T.; Zhan, N.; Pan, F.; Gray, D.; Alabugin, I.; Mattoussi, H. Journal of the American Chemical Society **2012**, 134, 16370–8.

[258] Piradashvili, K.; Alexandrino, E. M.; Wurm, F. R.; Landfester, K. Chemical Reviews **2015**, acs.chemrev.5b00567.

[259] Wang, W.; Kapur, A.; Ji, X.; Safi, M.; Palui, G.; Palomo, V.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Journal of the American Chemical Society **2015**, 137, 5438–5451.

[260] Wang, W.; Ji, X.; Kapur, A.; Zhang, C.; Mattoussi, H. Journal of the American Chemical Society **2015**, 137, 14158–14172.

[261] Tasso, M.; Giovanelli, E.; Zala, D.; Bouccara, S.; Fragola, A.; Hanafi, M.; Lenkei, Z.; Pons, T.; Lequeux, N. ACS Nano **2015**, acsnano.5b05705.

[262] Nann, T. Chemical Communications **2005**, 1735.

[263] Aldeek, F.; Hawkins, D.; Palomo, V.; Safi, M.; Palui, G.; Dawson, P. E.; Alabugin, I.; Mattoussi, H. Journal of the American Chemical Society **2015**, 137, 2704–2714.

[264] Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Raedler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. Nano Letters **2004**, 4, 703–707.

[265] Pöselt, E.; Schmidtke, C.; Fischer, S.; Peldschus, K.; Salamon, J.; Kloust, H.; Tran, H.; Pietsch, A.; Heine, M.; Adam, G.; Schumacher, U.; Wagener, C.; Förster, S.; Weller, H. ACS Nano **2012**, 6, 3346–3355.

[266] Gaitzsch, J.; Huang, X.; Voit, B. Chemical Reviews **2016**, 116, 1053–1093.

[267] Schmidtke, C. Mizellulare Verkapselung von Nanopartikeln mit amphiphilen, quervernetzbaren Diblockcopolymeren. Ein multifunktionelles Werkzeug für die Nanomedizin. Ph.D. thesis, Universität Hamburg, 2013.

[268] Kim, Y.; Song, N. W.; Yu, H.; Moon, D. W.; Lim, S. J.; Kim, W.; Yoon, H.-J.; Koo Shin, S. Physical Chemistry Chemical Physics **2009**, 11, 3497.

[269] Pasut, G.; Veronese, F. Progress in Polymer Science **2007**, 32, 933–961.

[270] Cabral, H.; Kataoka, K. Science and Technology of Advanced Materials **2010**, 11, 014109.

[271] Johnstone, T. C.; Kulak, N.; Pridgen, E. M.; Farokhzad, O. C.; Langer, R.; Lippard, S. J. ACS Nano **2013**, 7, 5675–5683.

[272] Liao, L.; Liu, J.; Dreaden, E. C.; Morton, S. W.; Shopsowitz, K. E.; Hammond, P. T.; Johnson, J. A. Journal of the American Chemical Society **2014**, 136, 5896–5899.

[273] Elsabahy, M.; Heo, G. S.; Lim, S.-M.; Sun, G.; Wooley, K. L. Chemical Reviews **2015**, 115, 10967–11011.

[274] Nam, J.; Won, N.; Bang, J.; Jin, H.; Park, J.; Jung, S.; Jung, S.; Park, Y.; Kim, S. Advanced Drug Delivery Reviews **2013**, 65, 622–648.

[275] Maysinger, D.; Lovrić, J.; Eisenberg, A.; Savić, R. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **2007**, 65, 270–281.

[276] Rafipoor, M.; Schmidtke, C.; Wolter, C.; Strelow, C.; Weller, H.; Lange, H. Langmuir **2015**, 31, 9441–9447.

[277] Götz, M. G.; Takeuchi, H.; Goldfogel, M. J.; Warren, J. M.; Fennell, B. D.; Heyes, C. D. The Journal of Physical Chemistry B **2014**, 118, 14103–14109.

[278] Schmidtke, C.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Pietsch, A.; Kloust, H.; Tran, H.; Schotten, T.; Bastús, N. G.; Eggers, R.; Weller, H. Nanoscale **2013**, 5, 7433–44.

[279] Lemon, C. M.; Curtin, P. N.; Somers, R. C.; Greytak, A. B.; Lanning, R. M.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G.; Nocera, D. G. Inorganic Chemistry **2014**, 53, 1900–1915.

[280] Ruedas-Rama, M. J.; Orte, A.; Hall, E. a. H.; Alvarez-Pez, J. M.; Talavera, E. M. Chemical Communications **2011**, 47, 2898.

[281] Jimenez De Aberasturi, D.; Montenegro, J. M.; Ruiz De Larramendi, I.; Rojo, T.; Klar, T. a.; Alvarez-Puebla, R.; Liz-Marzán, L. M.; Parak, W. J. Chemistry of Materials **2012**, 24, 738–745.

[282] Tang, R.; Lee, H.; Achilefu, S. Journal of the American Chemical Society **2012**, 134, 4545–4548.

[283] Lemon, C. M.; Karnas, E.; Han, X.; Bruns, O. T.; Kempa, T. J.; Fukumura, D.; Bawendi, M. G.; Jain, R. K.; Duda, D. G.; Nocera, D. G. Journal of the American Chemical Society **2015**,

[284] Damiano, M. G.; Mutharasan, R. K.; Tripathy, S.; McMahon, K. M.; Thaxton, C. S. Advanced Drug Delivery Reviews **2013**, 65, 649–662.

[285] Bartelt, A. et al. Nature Medicine **2011**, 17, 200–205.

[286] Bruns, O. T. et al. Nature Nanotechnology **2009**, 4, 193–201.

[287] Aslam, M.; Fu, L.; Li, S.; Dravid, V. P. Journal of Colloid and Interface Science **2005**, 290, 444–449.

[288] C. Brinker,; Scherer, G. Advanced Materials; 1990; Vol. 3; p 912.

[289] Kloust, H.; Pöselt, E.; Kappen, S.; Schmidtke, C.; Kornowski, A.; Pauer, W.; Moritz, H.-U.; Weller, H. Langmuir **2012**, 28, 7276–81.

[290] Kloust, H.; Schmidtke, C.; Feld, A.; Schotten, T.; Eggers, R.; Fittschen, U. E.; Schulz, F.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Bastús, N. G.; Weller, H. Langmuir **2013**, 29, 4915–21.

[291] Kloust, H. Synthese und Funktionalisierung von Nanokompositen und Nanohybriden. Ph.D. thesis, Universität Hamburg, 2013.

[292] Tieke, B. Makromolekulare Chemie; WILEY-VCH: Weinheim, 2005.

[293] Lechner, M. D.; Gehrke, K.; Nordmeier, E. H. Makromolekulare Chemie, 4th ed.; Birkhäuser Basel: Basel, 2010.

[294] Vanderhoff, J. W.; Vitkuske, J. F.; Bradford, E. B.; Alfrey, T. Journal of Polymer Science **1956**, 20, 225–234.

[295] Mai, W.; Sun, B.; Chen, L.; Xu, F.; Liu, H.; Liang, Y.; Fu, R.; Wu, D.; Matyjaszewski, K. Journal of the American Chemical Society **2015**, 137, 13256–13259.

[296] Lao, Y.-H.; Phua, K. K.; Leong, K. W. ACS Nano **2015**, 9, 2235–2254.

[297] Anselmo, A. C.; Zhang, M.; Kumar, S.; Vogus, D. R.; Menegatti, S.; Helgeson, M. E.; Mitragotri, S. ACS Nano **2015**, 9, 3169–3177.

[298] Ritz, S.; Schöttler, S.; Kotman, N.; Baier, G.; Musyanovych, A.; Kuharev, J.; Landfester, K.; Schild, H.; Jahn, O.; Tenzer, S.; Mailänder, V. Biomacromolecules **2015**, 16, 1311–1321.

[299] Mullen, D. G.; Fang, M.; Desai, A.; Baker, J. R.; Orr, B. G.; Banaszak Holl, M. M. ACS Nano **2010**, 4, 657–670.

[300] Liu, K.; Liu, X.; Zeng, Q.; Zhang, Y.; Tu, L.; Liu, T.; Kong, X.; Wang, Y.; Cao, F.; Lambrechts, S. A. G.; Aalders, M. C. G.; Zhang, H. ACS Nano **2012**, 6, 4054–4062.

[301] Hinterwirth, H.; Kappel, S.; Waitz, T.; Prohaska, T.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M. ACS Nano **2013**, 7, 1129–1136.

[302] Oh, E.; Susumu, K.; Blanco-Canosa, J. B.; Medintz, I. L.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Small **2010**, 6, 1273–1278.

[303] Hadar, I.; Abir, T.; Halivni, S.; Faust, A.; Banin, U. Angewandte Chemie International Edition **2015**, 54, 12463–12467.

[304] Hadar, I.; Abir, T.; Halivni, S.; Faust, A.; Banin, U. Angewandte Chemie **2015**, 127, 12640–12644.

[305] Wu, P.; Zhao, T.; Wang, S.; Hou, X. Nanoscale **2014**, 6, 43–64.

[306] Lou, Y.; Zhao, Y.; Chen, J.; Zhu, J.-J. Journal of Materials Chemistry C **2014**, 2, 595–613.

[307] Prasuhn, D. E.; Feltz, A.; Blanco-Canosa, J. B.; Susumu, K.; Stewart, M. H.; Mei, B. C.; Yakovlev, A. V.; Loukou, C.; Mallet, J.-M.; Oheim, M.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. ACS Nano **2010**, 4, 5487–5497.

[308] Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. TrAC Trends in Analytical Chemistry **2006**, 25, 207–218.

[309] Chen, Y.; Rosenzweig, Z. Analytical Chemistry **2002**, 74, 5132–5138.

[310] Chereddy, N. R.; Janakipriya, S.; Korrapati, P. S.; Thennarasu, S.; Mandal, A. B. The Analyst **2013**, 138, 1130–1136.

[311] Linder, M. C.; Moor, J. R.; Wright, K. Journal of the National Cancer Institute **1981**, 67, 263–75.

[312] Linder, M. C.; Houle, P. A.; Isaacs, E.; Moor, J. R.; Scott, L. E. Enzyme **1979**, 24, 23–35.

[313] Jin, W. J.; Fernández-Argüelles, M. T.; Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. Chemical Communications **2005**, 883.

[314] Beaune, G. G.; Tamang, S.; Bernardin, A.; Bayle-Guillemaud, P.; Fenel, D.; Schoehn, G.; Vinet, F.; Reiss, P.; Texier, I. ChemPhysChem **2011**, 12, 2247–54.

[315] Isarov, A. V.; Chrysochoos, J. Langmuir **1997**, 13, 3142–3149.

[316] Merkl, J.-P. Darstellung von polymer-eingekapselten CdSe/CdS/ZnS- Quantenpunkten und Charakterisierung der Polymermembran mit Quenching Experimenten. Ph.D. thesis, University of Hamburg, 2013.

[317] Swarnkar, A.; Shanker, G. S.; Nag, A. Chemical Communications **2014**, 50, 4743.

[318] Boldt, K.; Jander, S.; Hoppe, K.; Weller, H. ACS Nano **2011**, 5, 8115–8123.

[319] Strähle, J.; Schweda, E. Lehrbuch der analytischen und präparativen Chemie, 16th ed.; S. Hirzel Verlag Stuttgart: Stuttgart, 2006.

[320] Bernardin, A.; Cazet, A.; Guyon, L.; Delannoy, P.; Vinet, F.; Bonnaffé, D.; Texier, I. Bioconjugate chemistry **2010**, 21, 583–8.

[321] Schieber, C.; Bestetti, A.; Lim, J. P.; Ryan, A. D.; Nguyen, T.-L.; Eldridge, R.; White, A. R.; Gleeson, P. A.; Donnelly, P. S.; Williams, S. J.; Mulvaney, P. Angewandte Chemie International Edition **2012**, 51, 10523–10527.

[322] Schieber, C.; Bestetti, A.; Lim, J. P.; Ryan, A. D.; Nguyen, T.-l.; Eldridge, R.; White, A. R.; Gleeson, P. A.; Donnelly, P. S.; Williams, S. J.; Mulvaney, P. Angewandte Chemie **2012**, 124, 10675–10679.

[323] Darbandi, M.; Thomann, R.; Nann, T. Chemistry of Materials **2005**, 17, 5720–5725.

[324] Wang, Y. Q.; Zhao, T.; He, X. W.; Li, W. Y.; Zhang, Y. K. Biosensors and Bioelectronics **2014**, 51, 40–46.

[325] Yang, Q.; Wang, S.; Fan, P.; Wang, L.; Di, Y.; Lin, K.; Xiao, F.-S. Chemistry of Materials **2005**, 17, 5999–6003.

[326] Mavila, S.; Eivgi, O.; Berkovich, I.; Lemcoff, N. G. Chemical Reviews **2016**, 116, 878–961.

[327] Mancini, M. C.; Kairdolf, B. a.; Smith, A. M.; Nie, S. Journal of the American Chemical Society **2008**, 130, 10836–7.

[328] Li, H.; Li, Y.; Cheng, J. Chemistry of Materials **2010**, 22, 2451–2457.

[329] Ojea-Jiménez, I.; Piella, J.; Nguyen, T.-L.; Bestetti, A.; Ryan, a. D.; Puntes, V. Journal of Physics: Conference Series **2013**, 429, 012009.

[330] Sailor, M. J.; Park, J.-H. Advanced Materials **2012**, 24, 3779–3802.

[331] Vogel, N.; Retsch, M.; Fustin, C.-A.; del Campo, A.; Jonas, U. Chemical Reviews **2015**, 115, 6265–6311.

[332] Peres, M.; Costa, L. C.; Neves, A.; Soares, M. J.; Monteiro, T.; Esteves, A. C.; Barros-Timmons, A.; Trindade, T.; Kholkin, A.; Alves, E. Nanotechnology **2005**, 16, 1969–1973.

[333] Pazos-Pérez, N.; Gao, Y.; Hilgendorff, M.; Irsen, S.; Pérez-Juste, J.; Spasova, M.; Farle, M.; Liz-Marzán, L. M.; Giersig, M. Chemistry of Materials **2007**, 19, 4415–4422.

[334] Corr, S. A.; O' Byrne, A.; Gun'ko, Y. K.; Ghosh, S.; Brougham, D. F.; Mitchell, S.; Volkov, Y.; Prina-Mello, A. Chemical Communications **2006**, 4474.

[335] Wang, D.; He, J.; Rosenzweig, N.; Rosenzweig, Z. Nano Letters **2004**, 4, 409–413.

[336] Kriegel, I.; Jiang, C.; Rodríguez-Fernández, J.; Schaller, R. D.; Talapin, D. V.; da Como, E.; Feldmann, J. Journal of the American Chemical Society **2012**, 134, 1583–90.

[337] Medintz, I. L.; Clapp, A. R.; Brunel, F. M.; Tiefenbrunn, T.; Tetsuo Uyeda, H.; Chang, E. L.; Deschamps, J. R.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Nature Materials **2006**, 5, 581–589.

[338] Zhang, Y.; Lu, F.; Yager, K. G.; van der Lelie, D.; Gang, O. Nature Nanotechnology **2013**, 8, 865–872.

[339] Maye, M. M.; Kumara, M. T.; Nykypanchuk, D.; Sherman, W. B.; Gang, O. Nature Nanotechnology **2010**, 5, 116–120.

[340] Nykypanchuk, D.; Maye, M. M.; van der Lelie, D.; Gang, O. Nature **2008**, 451, 549–552.

[341] Chi, C.; Vargas-Lara, F.; Tkachenko, A. V.; Starr, F. W.; Gang, O. ACS Nano **2012**, 6, 6793–6802.

[342] Kas, R.; Sevinc, E.; Topal, U.; Acar, H. Y. The Journal of Physical Chemistry C **2010**, 114, 7758–7766.

[343] Roullier, V.; Grasset, F.; Boulmedais, F.; Artzner, F.; Cador, O.; Marchi-Artzner, V. Chemistry of Materials **2008**, 20, 6657–6665.

[344] Erogbogbo, F.; Yong, K. T.; Hu, R.; Law, W. C.; Ding, H.; Chang, C. W.; Prasad, P. N.; Swihart, M. T. ACS Nano **2010**, 4, 5131–5138.

[345] Di Corato, R.; Bigall, N. C.; Ragusa, A.; Dorfs, D.; Genovese, A.; Marotta, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. ACS Nano **2011**, 5, 1109–1121.

[346] Kim, B.-S.; Taton, T. A. Langmuir **2007**, 23, 2198–2202.

[347] Hühn, D.; Kantner, K.; Geidel, C.; Brandholt, S.; De Cock, I.; Soenen, S. J. H.; Riveragil, P.; Montenegro, J. M.; Braeckmans, K.; Müllen, K.; Nienhaus, G. U.; Klapper, M.; Parak, W. J. ACS Nano **2013**, 7, 3253–3263.

[348] Park, J.-H.; von Maltzahn, G.; Zhang, L.; Schwartz, M. P.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N.; Sailor, M. J. Advanced Materials **2008**, 20, 1630–1635.

[349] Park, J.-H.; von Maltzahn, G.; Zhang, L.; Derfus, A. M.; Simberg, D.; Harris, T. J.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N.; Sailor, M. J. Small **2009**, 5, 694–700.

[350] Tam, F.; Goodrich, G. P.; Johnson, B. R.; Halas, N. J. Nano Letters **2007**, 7, 496–501.

[351] Siefermann, K. R. et al. Journal of Physical Chemistry Letters **2014**, 5, 2753–2759.

[352] Montenegro, J. M.; Grazu, V.; Sukhanova, A.; Agarwal, S.; de la Fuente, J. M.; Nabiev, I.; Greiner, A.; Parak, W. J. Advanced Drug Delivery Reviews **2013**, 65, 677–688.

[353] Vivès, E.; Schmidt, J.; Pèlegrin, A. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **2008**, 1786, 126–138.

[354] Delehanty, J. B.; Bradburne, C. E.; Boeneman, K.; Susumu, K.; Farrell, D.; Mei, B. C.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, G.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H.; Medintz, I. L. Integrative Biology **2010**, 2, 265.

[355] Fleischmann, C.; Lievenbrück, M.; Ritter, H. Polymers **2015**, 7, 717–746.

[356] Blanco-Canosa, J. B.; Medintz, I. L.; Farrell, D.; Mattoussi, H.; Dawson, P. E. Journal of the American Chemical Society **2010**, 132, 10027–33.

[357] Kogot, J. M.; England, H. J.; Strouse, G. F.; Logan, T. M. Journal of the American Chemical Society **2008**, 130, 16156–7.

[358] Maus, L.; Spatz, J. P.; Fiammengo, R. Langmuir **2009**, 25, 7910–7917.

[359] Dai, Q.; Walkey, C.; Chan, W. C. W. Angewandte Chemie **2014**, 126, 5193–5196.

[360] Dai, Q.; Walkey, C.; Chan, W. C. W. Angewandte Chemie International Edition **2014**, 53, 5093–5096.

[361] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Angewandte Chemie International Edition **2001**, 40, 2004–2021.

[362] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. Angewandte Chemie International Edition **2002**, 41, 2596–2599.

[363] Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Accounts of Chemical Research **2011**, 44, 666–676.

[364] Algar, W. R.; Prasuhn, D. E.; Stewart, M. H.; Jennings, T. L.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. Bioconjugate chemistry **2011**, 22, 825–58.

[365] Wendeler, M.; Grinberg, L.; Wang, X.; Dawson, P. E.; Baca, M. Bioconjugate Chemistry **2014**, 25, 93–101.

[366] Dirksen, A.; Dawson, P. E. Bioconjugate Chemistry **2008**, 19, 2543–2548.

[367] Brennan, J. L.; Hatzakis, N. S.; Tshikhudo, T. R.; Dirvianskyte, N.; Razumas, V.; Patkar, S.; Vind, J.; Svendsen, A.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; Brust, M. Bioconjugate chemistry **2006**, 17, 1373–5.

[368] Boisselier, E.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Astruc, D. Chemical Communications **2008**, 5788.

[369] Guerrini, L.; Graham, D. Chemical Society Reviews **2012**, 41, 7085.

[370] Sánchez-Iglesias, A.; Grzelczak, M.; Altantzis, T.; Goris, B.; Pe, J.; Sa, A.; Bals, S.; Tendeloo, G. V.; Donaldson, S. H.; Chmelka, B. F. ACS Nano **2012**, 11059–11065.

[371] Pazos-Perez, N.; Wagner, C. S.; Romo-Herrera, J. M.; Liz-Marzán, L. M.; García de Abajo, F. J.; Wittemann, A.; Fery, A.; Alvarez-Puebla, R. a. Angewandte Chemie International Edition **2012**, 51, 12688–12693.

[372] Pazos-Perez, N.; Wagner, C. S.; Romo-Herrera, J. M.; Liz-Marzán, L. M.; García de Abajo, F. J.; Wittemann, A.; Fery, A.; Alvarez-Puebla, R. A. Angewandte Chemie **2012**, 124, 12860–12865.

[373] Travesset, A. Science **2011**, 334, 183–184.

[374] Kao, J.; Thorkelsson, K.; Bai, P.; Rancatore, B. J.; Xu, T. Chemical Society Reviews **2013**, 42, 2654–2678.

[375] Blakey, I.; Merican, Z.; Thurecht, K. J. Langmuir **2013**, 29, 8266–8274.

[376] Kang, Y.; Taton, T. A. Angewandte Chemie International Edition **2005**, 44, 409–412.

[377] Kang, Y.; Taton, T. A. Angewandte Chemie **2005**, 117, 413–416.

[378] Luo, L.; Eisenberg, A. Langmuir **2001**, 17, 6804–6811.

[379] He, J.; Huang, X.; Li, Y. C.; Liu, Y.; Babu, T.; Aronova, M. a.; Wang, S.; Lu, Z.; Chen, X.; Nie, Z. Journal of the American Chemical Society **2013**, 135, 7974–7984.

[380] Rossner, C.; Vana, P. Angewandte Chemie International Edition **2014**, n/a–n/a.

[381] Rossner, C.; Vana, P. Angewandte Chemie **2014**, 126, 12849–12852.

[382] Dey, P.; Zhu, S.; Thurecht, K. J.; Fredericks, P. M.; Blakey, I. J. Mater. Chem. B **2014**, 2, 2827–2837.

[383] Urban, A. S.; Shen, X.; Wang, Y.; Large, N.; Wang, H.; Knight, M. W.; Nordlander, P.; Chen, H.; Halas, N. J. Nano Letters **2013**,

[384] Kang, Y. J.; Taton, T. A. Macromolecules **2005**, 38, 6115–6121.

[385] Grzelczak, M.; Sánchez-Iglesias, A.; Mezerji, H. H.; Bals, S.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. Nano Letters **2012**, 12, 4380–4384.

[386] Ruan, Q.; Shao, L.; Shu, Y.; Wang, J.; Wu, H. Advanced Optical Materials **2014**, 2, 65–73.

[387] Pierrat, S.; Zins, I.; Breivogel, A.; Sönnichsen, C. Nano Letters **2007**, 7, 259–263.

[388] Xu, X.; Rosi, N. L.; Wang, Y.; Huo, F.; Mirkin, C. A. Journal of the American Chemical Society **2006**, 128, 9286–9287.

[389] Chou, L. Y. T.; Zagorovsky, K.; Chan, W. C. W. Nature Nanotechnology **2014**, 9, 148–155.

[390] Gellner, M.; Steinigeweg, D.; Ichilmann, S.; Salehi, M.; Schütz, M.; Kömpe, K.; Haase, M.; Schlücker, S. Small **2011**, 7, 3445–3451.

[391] Barrow, S. J.; Wei, X.; Baldauf, J. S.; Funston, A. M.; Mulvaney, P. Nature Communications **2012**, 3, 1275.

[392] Chandler, D. Nature **2005**, 437.

[393] Grzelczak, M.; Liz-Marzán, L. M. The Journal of Physical Chemistry Letters **2014**, 5, 2455–2463.

[394] Lum, K.; Chandler, D.; Weeks, J. D. Journal of Physical Chemistry **1999**, 103, 4570–4577.

[395] Frenkel, D. Nature Materials **2014**, 14, 9–12.

[396] Manoharan, V. N. Science **2015**, 349.

[397] Bishop, K. J. M. ACS Central Science **2015**, 1, 16–17.

[398] Chen, Q.; Cho, H.; Manthiram, K.; Yoshida, M.; Ye, X.; Alivisatos, A. P. ACS Central Science **2015**, 1, 33–39.

[399] Khanal, B. P.; Pandey, A.; Li, L.; Lin, Q.; Bae, W. K.; Luo, H.; Klimov, V. I.; Pietryga, J. M. ACS Nano **2012**, 6, 3832–3840.

[400] Ma, X.; Tan, H.; Kipp, T.; Mews, A. Nano Letters **2010**, 10, 4166–74.

[401] Sun, D.; Tian, Y.; Zhang, Y.; Xu, Z.; Sfeir, M. Y.; Cotlet, M.; Gang, O. ACS Nano **2015**, 9, 5657–5665.

[402] Acuna, G. P.; Möller, F. M.; Holzmeister, P.; Beater, S.; Lalkens, B.; Tinnefeld, P. Science **2012**, 338, 506–510.

[403] Kulakovich, O.; Strekal, N.; Yaroshevich, A.; Maskevich, S.; Gaponenko, S.; Nabiev, I.; Woggon, U.; Artemyev, M. Nano Letters **2002**, 2, 1449–1452.

[404] Focsan, M.; Gabudean, A. M.; Vulpoi, A.; Astilean, S. The Journal of Physical Chemistry C **2014**, 118, 25190–25199.

[405] Hollingsworth, J. A.; Htoon, H.; Piryatinski, A.; Götzinger, S.; Sandoghdar, V. MRS Bulletin **2015**, 40, 768–776.

[406] Peng, B.; Li, Z.; Mutlugun, E.; Hernández Martínez, P. L.; Li, D.; Zhang, Q.; Gao, Y.; Demir, H. V.; Xiong, Q. Nanoscale **2014**, 6, 5592.

[407] Cohen-Hoshen, E.; Bryant, G. W.; Pinkas, I.; Sperling, J.; Bar-Joseph, I. Nano Letters **2012**, 12, 4260–4264.

[408] Breshike, C. J.; Riskowski, R. A.; Strouse, G. F. The Journal of Physical Chemistry C **2013**, 117, 23942–23949.

[409] Holzmeister, P.; Pibiri, E.; Schmied, J. J.; Sen, T.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Nature Communications **2014**, 5, 5356.

[410] Samanta, A.; Zhou, Y.; Zou, S.; Yan, H.; Liu, Y. Nano Letters **2014**, 14, 5052–5057.

[411] Gueroui, Z.; Libchaber, A. Physical Review Letters **2004**, 93, 1–4.

[412] Cadusch, J. J.; Panchenko, E.; Kirkwood, N.; James, T. D.; Gibson, B. C.; Webb, K. J.; Mulvaney, P.; Roberts, A. Nanoscale **2015**, 7, 13816–13821.

[413] Song, F.; Tang, P. S.; Durst, H.; Cramb, D. T.; Chan, W. C. W. Angewandte Chemie International Edition **2012**, 51, 8773–8777.

[414] Song, F.; Tang, P. S.; Durst, H.; Cramb, D. T.; Chan, W. C. W. Angewandte Chemie **2012**, 124, 8903–8907.

[415] Jennings, T. L.; Singh, M. P.; Strouse, G. F. Journal of the American Chemical Society **2006**, 128, 5462–7.

[416] Yun, C. S.; Javier, a.; Jennings, T.; Fisher, M.; Hira, S.; Peterson, S.; Hopkins, B.; Reich, N. O.; Strouse, G. F. Journal of the American Chemical Society **2005**, 127, 3115–3119.

[417] Persson, B. N. J.; Lang, N. D. Physical Review B **1982**, 26, 5409–5415.

[418] Ruppin, R. The Journal of Chemical Physics **1982**, 76, 1681.

[419] Gersten, J. The Journal of Chemical Physics **1981**, 75, 1139.

[420] Kuhn, H. The Journal of Chemical Physics **1970**, 53, 101.

[421] Carminati, R.; Greffet, J.-J.; Henkel, C.; Vigoureux, J. Optics Communications **2006**, 261, 368–375.

[422] Singh, M. P.; Strouse, G. F. Journal of the American Chemical Society **2010**, 132, 9383–9391.

[423] Pustovit, V. N.; Shahbazyan, T. V. The Journal of Chemical Physics **2012**, 136, 204701.

[424] Puchkova, A.; Vietz, C.; Pibiri, E.; Wünsch, B.; Sanz Paz, M.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Nano Letters **2015**, 15, 8354–8359.

[425] Gómez, D. E.; Roberts, A.; Davis, T. J.; Vernon, K. C. Physical Review B **2012**, 86, 035411.

[426] Walmsley, I. A. Science **2015**, 348, 525–530.

[427] Zheng, W.; Liu, Y.; West, A.; Schuler, E. E.; Yehl, K.; Dyer, R. B.; Kindt, J. T.; Salaita, K. Journal of the American Chemical Society **2014**, 136, 1992–9.

[428] Fu, A.; Micheel, C. M.; Cha, J.; Chang, H.; Yang, H.; Alivisatos, a. P. Journal of the American Chemical Society **2004**, 126, 10832–3.

[429] Liu, N.; Prall, B. S.; Klimov, V. I. Journal of the American Chemical Society **2006**, 128, 15362–3.

[430] Basiruddin, S.; Maity, A. R.; Saha, A.; Jana, N. R. The Journal of Physical Chemistry C **2011**, 115, 19612–19620.

[431] Sun, D.; Tian, Y.; Zhang, Y.; Xu, Z.; Sfeir, M. Y.; Cotlet, M.; Gang, O. ACS Nano **2015**, 9, 5657–5665.

[432] Beaune, G.; Dubertret, B.; Clément, O.; Vayssettes, C.; Cabuil, V.; Ménager, C. Angewandte Chemie International Edition **2007**, 46, 5421–5424.

[433] Beaune, G.; Dubertret, B.; Clément, O.; Vayssettes, C.; Cabuil, V.; Ménager, C. Angewandte Chemie **2007**, 119, 5517–5520.

[434] Park, J.-H.; von Maltzahn, G.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N.; Sailor, M. J. Angewandte Chemie International Edition **2008**, 47, 7284–7288.

[435] Park, J.-H.; von Maltzahn, G.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N.; Sailor, M. J. Angewandte Chemie **2008**, 120, 7394–7398.

[436] Acharya, A.; Rawat, K.; Bhat, K. A.; Patial, V.; Padwad, Y. S. Materials Research Express **2015**, 2, 115401.

[437] Chen, O. et al. Nature Communications **2014**, 5, 5093.

[438] Insin, N.; Tracy, J. B.; Lee, H.; Zimmer, J. P.; Westervelt, R. M.; Bawendi, M. G. ACS Nano **2008**, 2, 197–202.

[439] Chen, S.; Zhang, J.; Song, S.; Feng, R.; Ju, Y.; Xiong, C.; Dong, L. Langmuir **2016**, acs.langmuir.5b03978.

[440] Wang, G.; Zhang, X.; Liu, Y.; Hu, Z.; Mei, X.; Uvdal, K. Journal of Materials Chemistry B **2015**, 3, 3072–3080.

[441] Jin, Y.; Jia, C.; Huang, S.-W.; O'Donnell, M.; Gao, X. Nature Communications **2010**, 1, 1–8.

[442] Espinosa, A.; Bugnet, M.; Radke, G.; Neveu, S.; Botton, G.; Wilhelm, C.; Abou-Hassan, A. Nanoscale **2015**, 7, 18872–18877.

[443] Chen, P.-J.; Kang, Y.-d.; Lin, C.-h.; Chen, S.-Y.; Hsieh, C.-h.; Chen, Y.-y.; Chiang, C.-w.; Lee, W.; Hsu, C.-y.; Liao, L.-d.; Fan, C.-t.; Li, M.-L.; Shyu, W.-C. Advanced Materials **2015**, 27, 6488–6495.

[444] Tschulik, K.; Ngamchuea, K.; Ziegler, C.; Beier, M. G.; Damm, C.; Eychmueller, A.; Compton, R. G. Advanced Functional Materials **2015**, 25, 5149–5158.

[445] Truby, R. L.; Emelianov, S. Y.; Homan, K. a. Langmuir **2013**, 29, 2465–2470.

[446] Bogart, L. K.; Pourroy, G.; Murphy, C. J.; Puntes, V.; Pellegrino, T.; Rosenblum, D.; Peer, D.; Lévy, R. ACS Nano **2014**, 8, 3107–3122.

[447] Mazzatenta, A.; Giugliano, M.; Campidelli, S.; Gambazzi, L.; Businaro, L.; Markram, H.; Prato, M.; Ballerini, L. Journal of Neuroscience **2007**, 27, 6931–6936.

[448] Cellot, G.; Cilia, E.; Cipollone, S.; Rancic, V.; Sucapane, A.; Giordani, S.; Gambazzi, L.; Markram, H.; Grandolfo, M.; Scaini, D.; Gelain, F.; Casalis, L.; Prato, M.; Giugliano, M.; Ballerini, L. Nature Nanotechnology **2009**, 4, 126–133.

[449] von Maltzahn, G.; Park, J.-H.; Lin, K. Y.; Singh, N.; Schwöppe, C.; Mesters, R.; Berdel, W. E.; Ruoslahti, E.; Sailor, M. J.; Bhatia, S. N. Nature Materials **2011**, 10, 545–552.

[450] Hrkach, J. et al. Science Translational Medicine **2012**, 4, 128ra39–128ra39.

[451] Cao-Milán, R.; Liz-Marzán, L. M. Expert Opinion on Drug Delivery **2014**, 11, 741–752.

[452] Chan, W. C. W. ACS Nano **2014**, 8, 4055–4057.

[453] Pelaz, B.; Charron, G.; Pfeiffer, C.; Zhao, Y.; de la Fuente, J. M.; Liang, X.-J.; Parak, W. J.; del Pino, P. Small **2013**, 9, 1573–1584.

[454] Kettler, K.; Veltman, K.; van de Meent, D.; van Wezel, A.; Hendriks, a. J. Environmental Toxicology and Chemistry **2014**, 33, 481–492.

[455] Nazarenus, M.; Zhang, Q.; Soliman, M. G.; del Pino, P.; Pelaz, B.; Carregal-Romero, S.; Rejman, J.; Rothen-Rutishauser, B.; Clift, M. J. D.; Zellner, R.; Nienhaus, G. U.; Delehanty, J. B.; Medintz, I. L.; Parak, W. J. Beilstein Journal of Nanotechnology **2014**, 5, 1477–1490.

[456] Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Nano Letters **2006**, 6, 662–668.

[457] Dong, C.; Irudayaraj, J. The Journal of Physical Chemistry B **2012**, 116, 12125–12132.

[458] Safi, M.; Courtois, J.; Seigneuret, M.; Conjeaud, H.; Berret, J.-F. Biomaterials **2011**, 32, 9353–63.

[459] Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nature Nanotechnology **2008**, 3, 145–150.

[460] Tenzer, S. et al. ACS Nano **2011**, 5, 7155–7167.

[461] Jiang, Y.; Huo, S.; Mizuhara, T.; Das, R.; Lee, Y.-w.; Hou, S.; Moyano, D. F.; Duncan, B.; Liang, X.-j.; Rotello, V. M. ACS Nano **2015**, 9, 9986–9993.

[462] Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W. Nano Letters **2007**, 7, 1542–1550.

[463] Li, Y.; Kröger, M.; Liu, W. K. Nanoscale **2015**,

[464] Iversen, T. G.; Skotland, T.; Sandvig, K. Nano Today **2011**, 6, 176–185.

[465] Albanese, A.; Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Guo, H.; Emili, A.; Chan, W. C. W. ACS Nano **2014**, 8, 5515–5526.

[466] Kreyling, W. G. et al. Nature Nanotechnology **2015**, 10, 619–623.

[467] Tsoi, K. M.; Dai, Q.; Alman, B. A.; Chan, W. C. W. Accounts of Chemical Research **2013**, 46, 662–671.

[468] Khlebtsov, N.; Dykman, L. Chemical Society Reviews **2011**, 40, 1647–1671.

[469] Mak, I. W.; Evaniew, N.; Ghert, M. American Journal of Translational Research **2014**, 6, 114–8.

[470] Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. The FASEB Journal **2007**, 22, 659–661.

[471] Pino, P. D.; Pelaz, B.; Zhang, Q.; Maffre, P.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J. Materials Horizon **2014**, 1, 301–313.

[472] Treuel, L.; Docter, D.; Maskos, M.; Stauber, R. H. Beilstein journal of nanotechnology **2015**, 6, 857–73.

[473] Li, Y.; Tang, Z.; Prasad, P. N.; Knecht, M. R.; Swihart, M. T. Nanoscale **2014**, 6, 3165–72.

[474] Palafox-Hernandez, J. P.; Tang, Z.; Hughes, Z. E.; Li, Y.; Swihart, M. T.; Prasad, P. N.; Walsh, T. R.; Knecht, M. R. Chemistry of Materials **2014**, 26, 4960–4969.

[475] Monopoli, M. P.; Walczyk, D.; Campbell, A.; Elia, G.; Lynch, I.; Baldelli Bombelli, F.; Dawson, K. a. Journal of the American Chemical Society **2011**, 133, 2525–2534.

[476] Moyano, D. F.; Ray, M.; Rotello, V. M. MRS Bulletin **2014**, 39, 1069–1073.

[477] Baio, J. E.; Jaye, C.; Fischer, D. A.; Weidner, T. ACS Combinatorial Science **2014**, 16, 449–453.

[478] Mauri, S.; Pandey, R.; Rzeźnicka, I.; Lu, H.; Bonn, M.; Weidner, T. Frontiers in Physics **2015**, 3, 1–6.

[479] Maiolo, D.; Del Pino, P.; Metrangolo, P.; Parak, W. J.; Baldelli Bombelli, F. Nanomedicine **2015**, 10, 3231–3247.

[480] Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C.; Landfester, K.; Schild, H.; Maskos, M.; Knauer, S. K.; Stauber, R. H. Nature Nanotechnology **2013**, 8, 772–781.

[481] Casals, E.; Pfaller, T.; Duschl, A.; Oostingh, G. J.; Puntes, V. ACS Nano **2010**, 4, 3623–3632.

[482] Winzen, S.; Schoettler, S.; Baier, G.; Rosenauer, C.; Mailaender, V.; Landfester, K.; Mohr, K. Nanoscale **2015**, 7, 2992–3001.

[483] Salvati, A.; Pitek, A. S.; Monopoli, M. P.; Prapainop, K.; Bombelli, F. B.; Hristov, D. R.; Kelly, P. M.; Åberg, C.; Mahon, E.; Dawson, K. a. Nature Nanotechnology **2013**, 8, 137–143.

[484] Safi, M.; Yan, M.; Guedeau-Boudeville, M.-A.; Conjeaud, H.; Garnier-Thibaud, V.; Boggetto, N.; Baeza-Squiban, A.; Niedergang, F.; Averbeck, D.; Berret, J.-F. ACS Nano **2011**, 5, 5354–5364.

[485] Safi, M.; Sarrouj, H.; Sandre, O.; Mignet, N.; Berret, J.-F. Nanotechnology **2010**, 21, 145103.

[486] Rana, S.; Le, N. D. B.; Mout, R.; Saha, K.; Tonga, G. Y.; Bain, R. E. S.; Miranda, O. R.; Rotello, C. M.; Rotello, V. M. Nature Nanotechnology **2014**, 10, 65–69.

[487] Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Song, F.; Liu, R.; Guo, H.; Olsen, D. W. H.; Cohen, Y.; Emili, A.; Chan, W. C. W. ACS Nano **2014**, 8, 2439–2455.

[488] Pozzi, D.; Caracciolo, G.; Digiacomo, L.; Colapicchioni, V.; Palchetti, S.; Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Zenezini Chiozzi, R.; Puglisi, A.; Laganà, A. Nanoscale **2015**,

[489] Murphy, C. J.; Vartanian, A. M.; Geiger, F. M.; Hamers, R. J.; Pedersen, J.; Cui, Q.; Haynes, C. L.; Carlson, E. E.; Hernandez, R.; Klaper, R. D.; Orr, G.; Rosenzweig, Z. ACS Central Science **2015**, 1, 117–123.

[490] Röcker, C.; Pötzl, M.; Zhang, F.; Parak, W. J.; Nienhaus, G. U. Nature Nanotechnology **2009**, 4, 577–580.

[491] Treuel, L.; Brandholt, S.; Maffre, P.; Wiegele, S.; Shang, L.; Nienhaus, G. U. ACS Nano **2014**, 8, 503–513.

[492] Kang, B.; Okwieka, P.; Schöttler, S.; Winzen, S.; Langhanki, J.; Mohr, K.; Opatz, T.; Mailänder, V.; Landfester, K.; Wurm, F. R. Angewandte Chemie International Edition **2015**, 54, 7436–7440.

[493] Kang, J. W.; So, P. T. C.; Dasari, R. R.; Lim, D.-K. Nano Letters **2015**, 150211151740009.

[494] Moyano, D. F.; Saha, K.; Prakash, G.; Yan, B.; Kong, H.; Yazdani, M.; Rotello, V. M. ACS Nano **2014**, 8, 6748–6755.

[495] Son, D. H. Science **2004**, 306, 1009–1012.

[496] Sutter, J. U.; Birch, D. J. S.; Rolinski, O. J. Measurement Science and Technology **2012**, 23, 55103.

[497] Ostermann, J. Maßgeschneiderte Polymerliganden für die biomedizinische Anwendung von Quantum Dots. Ph.D. thesis, Universität Hamburg, 2014.

[498] Pispas, S.; Hadjichristidis, N.; Potemkin, I.; Khokhlov, A. Macromolecules **2000**, 33, 1741–1746.

[499] Fetters, L. J.; Lohse, D. J.; Colby, R. H. In Physical properties of polymers handbook; Mark, J. E., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2007; pp 445–452.

[500] Kriegel, I.; Jiang, C.; Rodríguez-Fernández, J.; Schaller, R. D.; Talapin, D. V.; da Como, E.; Feldmann, J. Journal of the American Chemical Society **2012**, 134, 1583–90.

[501] Larson, T. A.; Joshi, P. R.; Sokolov, K. ACS Nano **2012**, 6, 9182–9190.

[502] Schulz, F.; Vossmeyer, T.; Bastús, N. G.; Weller, H. Langmuir **2013**, 29, 9897–9908.

[503] Hartmann, R.; Weidenbach, M.; Neubauer, M.; Fery, A.; Parak, W. J. Angewandte Chemie International Edition **2015**, 54, 1365–1368.

[504] Hartmann, R.; Weidenbach, M.; Neubauer, M.; Fery, A.; Parak, W. J. Angewandte Chemie **2015**, 127, 1382–1386.

[505] Flessau, S.; Wolter, C.; Poselt, E.; Kroger, E.; Mews, A.; Kipp, T. Physical Chemistry Chemical Physics **2014**, 16, 10444–10455.

[506] Dirksen, A.; Dirksen, S.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. Journal of the American Chemical Society **2006**, 128, 15602–3.

[507] Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. Angewandte Chemie International Edition **2006**, 45, 7581–7584.

[508] Donakowski, M. D.; Godbe, J. M.; Sknepnek, R.; Knowles, K. E.; Olvera de la Cruz, M.; Weiss, E. a. The Journal of Physical Chemistry C **2010**, 114, 22526–22534.

[509] Knowles, K. E.; Tice, D. B.; McArthur, E. A.; Solomon, G. C.; Weiss, E. A. Journal of the American Chemical Society **2010**, 132, 1041–50.

[510] Meyns, M.; Bastus, N. G.; Cai, Y.; Kornowski, A.; Juarez, B. H.; Weller, H.; Klinke, C. Journal of Materials Chemistry **2010**, 20, 10602–10605.

[511] Pacholski, C.; Kornowski, A.; Weller, H. Angewandte Chemie International Edition **2002**, 41, 1188–1191.

[512] Pacholski, C.; Kornowski, A.; Weller, H. Angewandte Chemie **2002**, 114, 1234–1237.

[513] Pacholski, C.; Kornowski, A.; Weller, H. Angewandte Chemie International Edition **2004**, 43, 4774–4777.

[514] Pacholski, C.; Kornowski, A.; Weller, H. Angewandte Chemie **2004**, 116, 4878–4881.

[515] Wolter, C. Dissertation. Ph.D. thesis, University of Hamburg, 2015.

[516] Datta, G.; Chaddha, M.; Hama, S.; Navab, M.; Fogelman, a. M.; Garber, D. W.; Mishra, V. K.; Epand, R. M.; Epand, R. F.; Lund-Katz, S.; Phillips, M. C.; Segrest, J. P.; Anantharamaiah, G. M. Journal of Lipid Research **2001**, 42, 1096–1104.

[517] Grundy, S. M. In Atlas of Atherosclerosis and Metabolic Syndrome; Grundy, S. M., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2011.

[518] Barrán-Berdón, A. L.; Pozzi, D.; Caracciolo, G.; Capriotti, A. L.; Caruso, G.; Cavaliere, C.; Riccioli, A.; Palchetti, S.; Laganà, A. Langmuir **2013**, 29, 6485–6494.

[519] Strelow, C.; Theuerholz, S.; Schmidtke, C.; Richter, M.; Merkl, J.-P.; Kloust, H.; Ye, Z.; Weller, H.; Heinz, T. F.; Knorr, A.; Lange, H. Nano Letters **2016**, <Y, accepted with minor revisions.

[520] Merkl, J.-P.; Schmidtke, C.; Aldeek, F.; Safi, M.; Feld, A.; Kloust, H.; Mattoussi, H.; Lange, H.; Weller, H. J. Phys. Chem. C **2016**, in Vorbereitung.

[521] Ould-Moussa, N.; Safi, M.; Guedeau-Boudeville, M.-A.; Montero, D.; Conjeaud, H.; Berret, J.-F. Nanotoxicology **2013**, 8, 1–13.

[522] Aldeek, F.; Muhammed, M. A. H.; Palui, G.; Zhan, N.; Mattoussi, H. ACS Nano **2013**, 7, 2509–2521.

[523] Pearson, R.; Songstad, J. Journal of the American Chemical Society **1967**, 89, 1827–1836.

[524] Sapsford, K.; Pons, T.; Medintz, I.; Higashiya, S.; Brunel, F.; Dawson, P.; Mattoussi, H. Journal of Physical Chemistry C **2007**, 111, 11528–11538.

[525] Canady, M. a.; Tihova, M.; Hanzlik, T. N.; Johnson, J. E.; Yeager, M. Journal of Molecular Biology **2000**, 299, 573–584.

[526] Domitrovic, T.; Matsui, T.; Johnson, J. E. Journal of Virology **2012**, 86, 9976–9982.

[527] Tsai, B. Annual Review of Cell and Developmental Biology **2007**, 23, 23–43.

[528] Stender, A. S.; Marchuk, K.; Liu, C.; Sander, S.; Meyer, M. W.; Smith, E. a.; Neupane, B.; Wang, G.; Li, J.; Cheng, J.-X.; Huang, B.; Fang, N. Chemical Reviews **2013**, 113, 2469–2527.

[529] Delehanty, J. B.; Bradburne, C. E.; Susumu, K.; Boeneman, K.; Mei, B. C.; Farrell, D.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H.; Medintz, I. L. Journal of the American Chemical Society **2011**, 133, 10482–10489.

[530] Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des europäischen Parlaments und des Rates. 2008.

8 Anhang

8.1 Verwendete Chemikalien und KMR-Stoffe

Die GHS und die H/P- Kennzeichnung beziehen sich auf das Global Harmonische System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (*Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*). Grundlage dieses Systems ist die EG- Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 vom 16. Dezember 2008.[530]

Tabelle 8.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien. KMR-Stoffe (kursiv und fett) sind zuerst genannt. GHS- Kennungen können Abbildung 8.1 entnommen werden. n.v.u. steht für nicht vollständig untersucht

Chemikalie	GHS Kennung	H - Satz	P - Satz	Menge ca.
Cadmiumselenid	GHS06, GHS08, GHS09	H301- H331- H373- H400	P261- P273- P301 + P310- P311 - P501	10 g
CdSe/CdS/ZnS	GHS02, GHS07, GHS08	H225- H304- H315- H336- H361d- H373- H412	P210- P261- P273- P281- P301 + P310- P331	15 µmol
Chloroform	GHS07, GHS08	H: 302- 315- 351- 373	P: 302+ 352- 314	1 L
Deuterochloroform	GHS07, GHS08	H: 302- 315- 351- 373	P: 302+352- 314	5 mL
Dichlormethan	GHS07, GHS08	H: 315-319-335- 336-351-373	P: 261- 281- 305+351+338	5 L
Ethylenoxid	GHS02, GHS04, GHS06, GHS08	H: 220- 350- 340- 331- 319- 335- 315	P: 201- 210- 261- 305+ 351+ 338- 311	200 g
n-Hexan	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	H: 225 -361f -304- 373- 315- 336- 411	P: 210- 240- 273- 301+ 310- 331- 302+ 352- 403+ 235	5 L
Isopren	GHS02, GHS08	H: 224- 350- 341- 412	P: 210- 201- 281- 273- 308+ 313- 403+235	100 g

Weitergeführt auf folgender Seite

Tabelle 8.1 – *Weiterführung von vorheriger Seite*

Chemikalie	**GHS Kennung**	**H (R)- Satz**	**P (S)- Satz**	**Menge ca.**
Kaliumdichromat	GHS03, GHS05, GHS06, GHS09	H: 272- 350- 340- 360FD- 330- 301- 372- 312- 314- 334- 317- 410	P: 201- 280- 301+330+331- 305+351+338- 304+341-308+313	10 g
Methylviologen	GHS06, GHS08, GHS09	H: 330- 311- 301- 372- 319- 335- 315- 410	P: 261- 273- 305+351+338- 314- 501	100 mg
Atto-Farbstoffe	n.v.u	n.v.u	n.v.u.	10 mg
Azo-(bis)isobutylnitril	GHS02, GHS07	H: 242-302+332-412	P: 273	5 g
Butanol	GHS02, GHS05, GHS07	H: 226- 302- 318- 315- 335- 336	P: 280- 302+352- 305+ 351+338- 313	10 mL
Cadmium(II)acetat	GHS07, GHS09	H: 332- 312- 302- 400- 410	P: 273- 302+352	30 g
Carbonyldiimidazol	GHS05, GHS07	H: 302- H314	P: 280- 305 + 351 + 338- 310	10 g
Diethylether	GHS02, GHS07	H: 224- 302- 336	P: 210- 261	10 L
Diethylentriamin	GHS05, GHS06	H: 302+ 312- 314- 317- 330- 335	P: 260- 280- 284- 305- 351+ 338- 310	100 g
Divinylbenzol	GHS09, GHS07	H: 302- 315- 317- 318- 335	P: 273- 302- 352- 304- 340- 305- 351- 338	20 mL
Dodecylamin	GHS05, GHS07, GHS9	H: 302- 314- 410	P: 273- 280- 305+ 351 + 338- 310- 501	15 g
Ethanol	GHS02	H 225	P: 210	40 L
Eisen(III)chlorid	GHS05, GHS08	H 290- 302- 315	P: 280- 302- 352- 305- 351- 338- 313	10 g
Königswasser	GHS03, GHS05	R: 8-35	S: 23- 26- 36- 45	5 L
Kupfer(II)acetat	GHS07, GHS09	H: 302- 315- 319- 335- 400	P: 261- 273- 305+ 351+ 338	500 mg
Liponsäure	-	-	-	40 g
Natriumborhydrid	GHS02, GHS05, GHS06	H: 260- 301+ 311- 314	P: 223- 231+ 232- 280- 301+ 310- 370+ 378- 422	10 g
Natriumchlorid	-	-	-	200 g

Weitergeführt auf folgender Seite

Tabelle 8.1 – *Weiterführung von vorheriger Seite*

Chemikalie	**GHS Kennung**	**H (R)- Satz**	**P (S)- Satz**	**Menge ca.**
Natriumcitrat	-	-	-	300 g
Natriumoleat	-	-	-	15 g
Natriumsulfat	-	-	-	500 g
Oleylalkohol	GHS07	H: 315	-	100 mL
Oleylamin	GHS05, GHS09	H: 314- 400	P: 273- 280- 305+ 351+ 338- 310	10 g
Ölsäure	GHS07	H: 315	P: -	10 g
1-Pentanol	GHS02, GHS07	H: 226- 315- 332- 335	P: 261	100 mL
PI-*b*-PEO	n.v.u.	n.v.u.	n.v.u.	200 mg
PI-N_3	n.v.u.	n.v.u.	n.v.u.	200 mg
Polysorbat 80	-	H: -	P: -	300 mL
Salpetersäure	GHS03, GHS05	H: 272- 314	P: 220- 280- 305+ 351+ 338- 310	400 mL
Salzsäure	GHS05, GHS07	H: 314- 335	P: 261- 280- 305+ 351+ 338- 310	5 L
Selen	GHS06, GHS08	H: 331- 301- 373- 413	P: 273- 304+ 340	5 g
Styrol	GHS02, GHS07	H: 226- 315- 319- 332	P: 305+ 351+ 338	30 g
Tetrahydrofuran	GHS02, GHS07	H: 302- 314- 331	P: 210- 233- 240- 305+ 351+ 338- 403+ 235	20 L
Thionylchlorid	GHS05, GHS06	H: 226- 302- 318- 315- 335- 336	P: 261- 280- 305+ 351+338- 310	10 mL
Toluol	GHS02, GHS07, GHS08	H: 225- 361d- 304- 373- 315- 336- 361d- 373	P: 210- 301+ 310- 331- 302+ 352	3 L
Trioktylphosphan	GHS07, GHS09	H: 314	P: 280- 305+ 351+ 338- 310	250 mL
Trioktylphosphanoxid	GHS05	H: 315- 318	P: 280- 305+ 351+ 338	100 g
Wasserstoffperoxid	GHS05, GHS07	H302- 318	P: 280- 305+ 351+ 338	100 mL
Oleylamin	GHS05, GHS09	H:314- 400	P:273- 280- 305 + 351 + 338- P310	50 mL
Zink(II)acetat	GHS07, GHS09	H: 302- 400- 410	P: 262-273	10 g

8.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg, den

Unterschrift

8.3 Angehängte Abbildungen

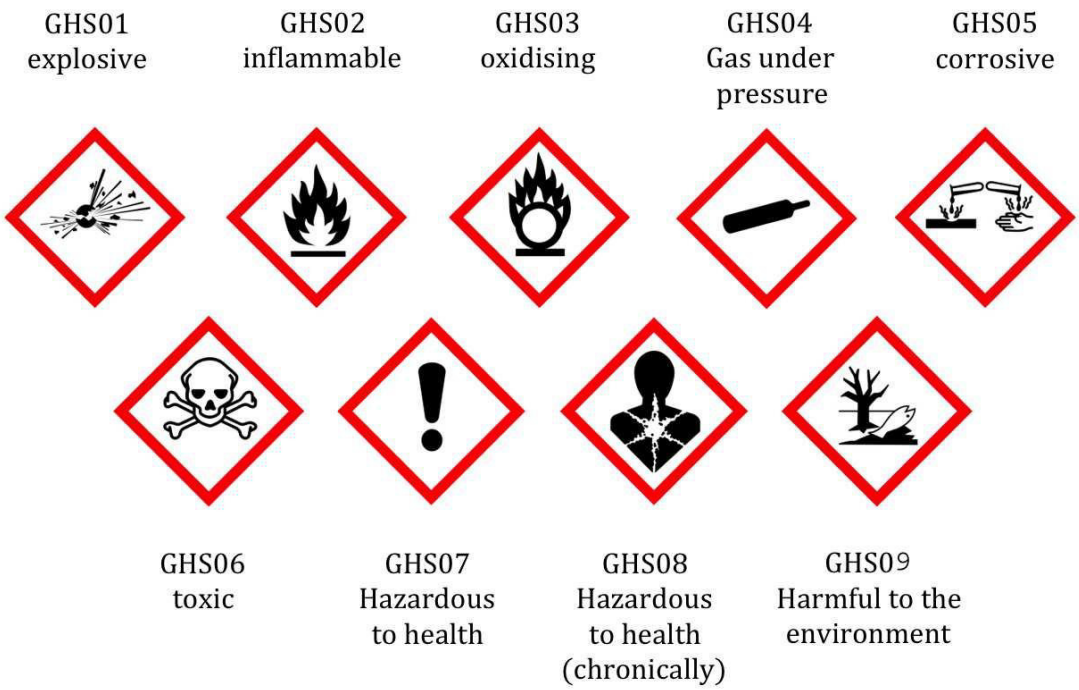


Abbildung 8.1: GHS-Symbole nach Verordnung EG. 1272/2008.[530]

9 Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Horst Weller** danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für das Arbeiten in einem exzellenten wissenschaftlichen Umfeld und für die Freiheiten, die mir im Rahmen der letzten drei Jahre eingeräumt wurden. Deine herzlichen Ratschläge werde ich nicht vergessen!

Herrn **Prof. Dr. Christian Klinke** danke ich dafür, dass er die Zweitbegutachtung der vorliegenden Arbeit übernommen hat.

Herrn **Prof. Dr. Alf Mews** danke ich ihm die mir gewährte Möglichkeit, konfokalmikroskopische Untersuchungen durchzuführen.

I thank **Prof. Dr Hedi Mattoussi** for the opportunity to work at the *Florida State University (FSU)*, Tallahassee Florida, for beeing my *Fulbright*-Supervisor and for the scientific and personal discussions we had during my stay.

I acknowledge **Prof. Luis M. Liz-Marzan** for having me at *CICbiomaGUNE* in San Sebastian, Basque Country. Thank you for the amazing time, scientific discussions and especially for the christmas dinner.

Ich danke dem **Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI)** und der **Deutsch-Amerikanischen Fulbright-Kommission** für die finanzielle Unterstützung während der letzten Jahre.

Frau **Beate Kreutzer** Frau **Sigrid Zeckert** danke ich für ein immer offenes Ohr und viel Unterstützung während der letzten Jahre.

Dem gesamten Arbeitskreis Weller danke ich für die fachlichen und persönlichen Diskussionen. Besonders möchte ich der „Biofraktion“ um **Christian**, **Hauke**, **Johannes**, **Artur**, **Anna**, **Cris**, **Lasse**, **Marcus** und **Robin** für die tolle Zusammenarbeit danken. Einen Extradank sende ich **Huong** für die Betreuung meines ersten Praktikums im Jahr 2011 und das damit verbundene *Einnorden*. Zu guter Letzt möchte ich mich ganz speziell bei **Artur**, **Johannes**, **Hauke** und **Christian** für die Betreuung und Zusammenarbeit während dieser Jahre bedanken — ihr habt einen sehr großen Anteil an dieser Arbeit: (Spitzenforschung!) Danke dafür!

Für die Hilfe bei speziellen Experimenten beziehungsweise dem Verfassen von Publikationen danke ich **Dr. Theo Schotten**, **Andreas Kornowski**, **Alex Fischer**, **Dr.**

Gerrit Wolters, **Dr. Sandra Flessau**, **Mona Rafipoor** und **Prof. Dr. Holger Lange**. I would like to thank **Dr. Hamed Heidari** and **Prof. Dr. Sara Bals** (both EMAT) for executing cryo-electronmicroscopy experiments on the hybrid systems and **Ruth Didier** and **Dr. Megan Mursoski** (both FSU) for help with cellular uptake studies.

I would like to thank both work groups that I visited during my exchange stays at *FSU* and *CICbiomaGUNE* for fruitful discussions and a time to remember! I woulk like to give special thanks to **Malak**, **Fadi**, **Goutam**, **Julian**, **Frank** and **Jorge** at *FSU* and to **Doreta**, **Leo** and **Malte** at *CICbiomaGUNE* with whom I spend most of the great time abroad!

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich: **Christian**, **Huong**, **Johannes**, **Buddy**, **Artur**, **Karin** und **Ulli**.

Weiterhin danke ich meinen Praktikanten **Eva**, **Kati**, **Hauke H.**, **Christina**, **Florian**, **Hendrick**, **Jenny**, **Lara**, **Olga** und **Johannes** und meinen Bachelor bzw. Masterstudenten **Isa**, **Marius** und **Julian** für ihre tatkräftige Unterstützung.

Der *Sommersalon-Crew* danke ich für eine tolle Arbeitsatmosphäre und eine Menge Spaß!

Meinen außergewöhnlichen Freunden, die mich teilweise schon (fast) seit meiner Geburt begleiten; Danke: **Lars**, **Katha**, **Matthias**, **Martin**, **Jason**, **Buddy**, **Carlos**, **Michi**, **Annika**, **Christiane**, **Alex**, **Tini**, **Mercedes**, **Fabian**, **Asia**, **Christian**, **Hauke**, **Johannes**, **Jorge**, **Julien**, **Ole** und **Kristina**.

Der größte Dank gebührt meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung. Danke: **Heidi**, **Siggi**, **Axel**, **Sandra**, **Lena-Pauline**, **Anna**, **Thilo**, **Astrid**, **Rüdiger**, **Paul**, **Lena**, **Moni**, **Fiddi**, **Jette**, **Daniel M.**, **Anna**, **Noah**, **Edda**, **Fritz**, **Daniel F.**, **Malte**, **Dora** und **Uwe** sowie **Bärbel**, **Siegfried (sen.)** und **Margot**. Am meisten möchte ich jedoch **meinen Eltern und meiner Schwester** danken. Mich hätte es nicht besser treffen können. Danke für das für euch Selbstverständliche!

Meiner Liebe **Kristina** danke ich für die Unterstützung und positive Energie, die sie in mein Leben bringt.

Eine Danksagung ist zu wenig, um allen zu danken, die mich auf meinem Weg bis hier begleitet haben, das letzte *Danke* steht stellvertretend für alle, die nicht persönlich aufgeführt wurden.

Stufen

Wie jede Blüte welkt und jede Jugend
Dem Alter weicht, blüht jede Lebensstufe,
Blüht jede Weisheit auch und jede Tugend
Zu ihrer Zeit und darf nicht ewig dauern.
Es muß das Herz bei jedem Lebensrufe
Bereit zum Abschied sein und Neubeginne,
Um sich in Tapferkeit und ohne Trauern
In andre, neue Bindungen zu geben.
Und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne,
Der uns beschützt und der uns hilft, zu leben.

Wir sollen heiter Raum um Raum durchschreiten,
An keinem wie an einer Heimat hängen,
Der Weltgeist will nicht fesseln uns und engen,
Er will uns Stuf' um Stufe heben, weiten.
Kaum sind wir heimisch einem Lebenskreise
Und traulich eingewohnt, so droht Erschlaffen,
Nur wer bereit zu Aufbruch ist und Reise,
Mag lähmender Gewöhnung sich entraffen.

Es wird vielleicht auch noch die Todesstunde
Uns neuen Räumen jung entgegen senden,
Des Lebens Ruf an uns wird niemals enden...
Wohlan denn, Herz, nimm Abschied und gesunde!

aus
Das Glasperlenspiel
Hermann Hesse
1943

Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen.

Hermann Hesse

?