

# Maßgeschneiderte Diblockcopolymere mit Akzeptor-Funktion für Quantum-Dot-FRET-Sensoren

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

MARCUS JANSCHERL

aus Striesow im Spreewald

Hamburg im Mai 2019



Die vorliegende Arbeit wurde von August 2015 bis Mai 2019 am Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Horst Weller angefertigt.

Gutachter der Dissertation:

1. Prof. Dr. Horst Weller
2. Prof. Dr. Alf Mews

Gutachter der Disputation:

1. Prof. Dr. Horst Weller
2. Prof. Dr. Hans-Ulrich Moritz
3. Dr. Thomas Hackl

Datum der Disputation: 07.06.2019

Datum der Druckfreigabe: 07.06.2019



*„Folge deinem Herzen aber nimm dein Hirn mit!“*

Tupac Amaru Shakur (\*1971 - †1996)



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>		<b>v</b>
<b><u>1</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>ABSTRACT</u></b>	<b><u>3</u></b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>THEORETISCHER HINTERGRUND</u></b>	<b><u>7</u></b>
4.1	FLUORESZIERENDE NANOPARTIKEL UND LÖSCHUNGSPROZESSE	7
4.1.1	QUANTUM DOTS: HALBLEITER MIT GRÖßENQUANTISIERUNGSEFFEKT	7
4.1.2	OPTISCHE EIGENSCHAFTEN VON QUANTUM DOTS	11
4.1.3	SCHALENEFFEKTE BEI QUANTUM DOTS	13
4.1.4	STATISCHE UND DYNAMISCHE FLUORESZENZLÖSCHUNG	15
4.1.5	FÖRSTER-RESONANZENERGIETRANSFER	19
4.2	POLYMERE FÜR DEN PHASENTRANSFER UND ZUR VERKAPSELUNG VON QUANTUM DOTS	21
4.2.1	LEBENDE ANIONISCHE POLYMERISATION	22
4.2.2	AMPHIPHILE DIBLOCKCOPOLYMERE	26
4.2.3	LÖSLICHKEIT UND SELBSTORGANISATIONS-PROZESSE AMPHIPHILER DIBLOCKCOPOLYMERE	27
4.2.4	PHASENTRANSFER VON QUANTUM DOTS UND EMULSIONSPOLYMERISATION	30
<b><u>5</u></b>	<b><u>ZIELSETZUNG UND KONZEPTION</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u></b>	<b><u>37</u></b>
6.1	SYNTHESEN, KOMPONENTENAUSWAHL UND VERKAPSELUNG	37

6.1.1	SYNTHESE VON ABRUCHREAGENZIEN MIT SPEZIFISCHER FUNKTION	38
6.1.2	SYNTHESE DER FUNKTIONALISIERTEN POLYISOPREN- <i>B</i> -POLYETHYLENOXIDE	40
6.1.3	AZOFARBSTOFFAUFBAU AN FUNKTIONALISIERTEM PI- <i>B</i> -PEO	51
6.1.4	KOMPONENTENAUSWAHL FÜR DAS QUANTUM-DOT-FRET-SYSTEM	56
6.1.5	PHASENTRANSFER VON QDs MIT PI- <i>B</i> -PEO - IAFG UND EMULSIONSPOLYMERISATION	64
6.2	UNTERSUCHUNGEN AN DEN DARGESTELLTEN QDQR-FRET-SENSOREN	70
6.2.1	EXPERIMENT A – FRET-NACHWEIS UND VARIATION DER AKZEPTORENKONZENTRATION	70
6.2.2	EXPERIMENT B – DETAILLIERTE BETRACHTUNG UND LÖSCHPROZESSE	77
6.2.3	EXPERIMENT C – ABSTANDSVARIATION UND <i>IN-VITRO</i> -ZELLAUFNAHME	88
<b>7</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>95</b>
8.1	CHEMIKALIEN	95
8.2	TROCKNEN, FÄLLEN UND BEARBEITEN SPEZIELLER CHEMIKALIEN	98
8.2.1	ISOPREN	98
8.2.2	ETHYLENOXID	98
8.2.3	FÄLLEN DER POLYMERE	99
8.2.4	POLYMERE	99
8.2.5	TETRAHYDROFURAN	100
8.2.6	METHYLANILIN	100
8.2.7	STYROL UND DIVINYLBENZOL	100
8.3	VERWENDETE GERÄTE	100
8.3.1	KERNSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE	100
8.3.2	GELPERMEATIONSCHROMATOGRAPHIE	101
8.3.3	ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE	101

8.3.4	EMISSIONSSPEKTROSKOPIE	101
8.3.5	DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG	102
8.3.6	FLUORESZENZLEBENSDAUERSPEKTROSKOPIE	102
8.3.7	FLUORESZENZLEBENSDAUERMIKROSKOPIE	102
8.3.8	PH-METRIE	103
8.3.9	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE	103
8.4	SYNTHESEN UND AUFREINIGUNGEN	103
8.4.1	STANDARDREAKTIONSBEDINGUNGEN	103
8.4.2	SICHERER UMGANG MIT ETHYLENOXID	103
8.4.3	SYNTHESE DES ABBRUCHREAGENZES <i>N</i> -GLYCIDYL- <i>N</i> -METHYLANILIN (GMA)	104
8.4.4	SYNTHESE DES ABBRUCHREAGENZES 2-(2-(1-ETHOXYETHOXY)BENZYL)OXIRAN (EEBO)	105
8.4.5	SYNTHESE DES AKTIVIERUNGSREAGENZES DIPHENYLMETHYLKALIUM (DPMK)	107
8.4.6	POLYISOPREN MIT SPEZIFISCHEN FUNKTIONELLEN GRUPPEN	107
8.4.7	POLYISOPREN- <i>BLOCK</i> -POLYETHYLENOXID MIT SPEZIFISCHEN FUNKTIONELLEN GRUPPEN	110
8.4.8	AZOFARBSTOFFAUFBAU AM PI- <i>B</i> -PEO MIT ANTHRANILSÄUREDERIVATEN	114
8.4.9	AZOFARBSTOFFAUFBAU AM PI- <i>B</i> -PEO MIT HETEROCYCLEN MIT AMINOFUNKTION	119
8.4.10	HERSTELLUNG VON QUANTUM-DOT-FRET-SENSOREN	122
8.4.11	PH-PUFFER-LÖSUNGEN, PRÄPARATION DER MESSPROBEN UND MESSUNGEN	125
8.4.12	PROBENPRÄPARATION ZUR FLIM-UNTERSUCHUNG	125
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>127</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>133</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>135</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG</b>	<b>I</b>

<b>12.1</b>	<b>VERWENDETE CHEMIKALIEN MIT H&amp;P – SCHLÜSSELN</b>	<b>I</b>
<b>12.2</b>	<b>SICHERHEITS- UND GEFAHRENHINWEISE (H&amp;P – SÄTZE)</b>	<b>VII</b>
<b>12.2.1</b>	<b>GEFAHRENHINWEISE (H-SÄTZE) DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN</b>	<b>VII</b>
<b>12.2.2</b>	<b>SICHERHEITSHINWEISE (P-SÄTZE) DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN</b>	<b>VIII</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFG	Azofarbstoffgruppe
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
ATRP	radikalische Atomtransfer-Polymerisation (engl. „ <i>atom transfer radical polymerization</i> “)
BHT	Butylhydroxytoluol
CDCl <sub>3</sub>	deutertes Chloroform
CMC	kritische Mizellkonzentration (engl. „ <i>critical micelle concentration</i> “)
DK	Dielektrizitätskonstante
DPMK	Diphenylmethylkalium (-Lösung)
DVB	Divinylbenzol
EEBO	2-(2-(1-Ethoxyethoxy)benzyl)oxiran
EO	Ethylenoxid
EP	Emulsionspolymerisation
EWG	elektronendichteziehende Gruppe (engl. „ <i>electron withdrawing group</i> “)
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (engl. „ <i>fluorescence-lifetime imaging microscopy</i> “)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
ges.	gesättigt
Gl.	Gleichung
GMA	<i>N</i> -Glycidyl- <i>N</i> -methylanilin
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (engl. „ <i>highest occupied molecular orbital</i> “)
IAFG	Iod-substituierte Azofarbstoffgruppe
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert(e)

LAP	Lebende anionische Polymerisation
LB	Leitungsband
LCAO	Lineare Kombination von Atomorbitalen (engl. „ <i>linear combination of atomic orbitals</i> “)
MA	Methylanilin
min	Minute
NMR	Kernspinresonanz (engl. „ <i>nuclear magnetic resonance</i> “)
PB- <i>b</i> -PEO	Polybutadien- <i>block</i> -Polyethylenoxid
PEO	Polyethylenoxid
PI	Polyisopren
PI- <i>b</i> -PEO	Polyisopren- <i>block</i> -Polyethylenoxid
PO	Propylenoxid
QD	Quanten Punkt (engl. „ <i>quantum dot</i> “), halbleitender fluoreszierender Nanopartikel
QDQR	Quantum Punkt – Quantum Stäbchen (engl. „ <i>quantum dot quantum rod</i> “), halbleitender fluoreszierender Nanopartikel
RAFT	Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragung (engl. „ <i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i> “)
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung (engl. „ <i>relative centrifugal force</i> “)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMS	Tetramethylsilan
VA-044	Azoinitiator: 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid
VB	Valenzband
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
$\lambda_{\max(s/b)}$	Wellenlänge des Extinktionsmaximums (saure/basische Form bei pH-Indikatoren)

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die erfolgreiche Herstellung eines pH-Sensors auf Basis von fluoreszierenden halbleitenden Nanopartikeln und einer funktionalisierten Polymerschutzhülle für den Einsatz im physiologischen Umfeld gezeigt. Durch einen pH-responsiven Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) werden hier je nach vorliegender Protonenkonzentration die Fluoreszenz und die Fluoreszenzabklingzeit der Nanopartikel reversibel beeinflusst. Bei den als FRET-Donor wirkenden Nanopartikeln handelt es sich um CdSe-basierte<sup>[1]</sup> Quantenpunkte (engl. „*quantum dot*“, QD). Als FRET-Akzeptoren kommen pH-Indikator-Azofarbstoffe mit einem Umschlagspunkt im physiologisch relevanten Bereich um pH 7 zum Einsatz.

Um eine Wasserlöslichkeit und einen Schutz der QDs vor Fluoreszenzlöschprozessen (engl. „*quenching*“) zu gewährleisten, wurde das amphiphile Diblockcopolymer Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid (PI-*b*-PEO) verwendet. Ein erweiterter Schutz vor Quenchern im wässrig-physiologischen Umfeld wurde durch eine, mittels Emulsionspolymerisation erzeugte, Styrol-Divinylbenzol-Copolymerkapsel erreicht.

Die Akzeptorfunktion in der Schutzhülle konnte durch einen Azofarbstoffaufbau am PI-*b*-PEO erzeugt werden. Eine Voraussetzung hierfür war die Funktionalisierung des PI-*b*-PEOs mit einer Methylanilingruppe. Dazu wurde im Vorfeld ein Oxiran-Abbruchreagenz mit Methylanilinfunktion für die Polyisoprensynthese dargestellt. Das Einbringen der funktionellen Gruppe über ein Abbruchreagenz erlaubte dabei eine vollständige Funktionalisierung des Zielpolymers.

Beim Phasentransfer mittels PI-*b*-PEO (mit Azofarbstoffgruppe) wurden QD-beladene Mizellen erzeugt. Der hydrophobe PI-Block stellt dabei den maßgeblichen Teil des Förster-Radius zwischen QD-Donor und Azofarbstoff-Akzeptor dar. Durch unterschiedliche Abmischungen von PI-*b*-PEO mit und ohne Azofarbstoffgruppe konnte die Akzeptorenkonzentration variiert werden, was sich deutlich auf den gemessenen FRET auswirkte. Die nach Emulsionspolymerisation und Aufreinigung erhaltenen pH-responsiven Quantum-Dot-FRET-Sensoren wurden anschließend auf ihre optischen Eigenschaften und ihr Löschverhalten hin untersucht. Dabei konnten neben einem dynamischen Löschverhalten durch den FRET auch statische Löschprozesse durch erhöhte Quencherkonzentrationen beobachtet werden. Aufgrund des daraus resultierenden gemischten Quenchings erwies sich die Detektion des FRETs über das Fluoreszenzabklingverhalten im Vergleich zur Fluoreszenzintensität als deutlich präziser. Ein abschließendes Zellaufnahmeexperiment zeigte die prinzipielle Anwendbarkeit der hier dargestellten QD-FRET-Sensoren für physiologische Systeme.



## 2 ABSTRACT

In the present work, the successful production of a pH sensor, based on fluorescent semiconducting nanoparticles and a functionalized polymer protective sheath for use in a physiological environment is reported. Depending on the prevailing proton concentration, the fluorescence and the fluorescence decay time of the nanoparticles are influenced by a pH-responsive Förster resonance energy transfer (FRET). The nanoparticles act as FRET donors are CdSe-based<sup>[1]</sup> quantum dots (QD). As FRET acceptors, pH indicator azo dyes that show a turnover point in the physiologically relevant range around pH 7 are used.

In order to ensure water solubility and protection of the QDs from fluorescence quenching processes, the amphiphilic diblock copolymer polyisoprene-*block*-polyethylene-oxide (PI-*b*-PEO) was used. Extended protection against quenchers in the aqueous-physiological environment was achieved by a styrene-divinylbenzene copolymer capsule produced by emulsion polymerization.

The acceptor function in the protective shell could be generated by an azo dye construction on PI-*b*-PEO. A requirement for this was the functionalization of the PI-*b*-PEO with a methylaniline group. This was achieved by, an oxirane with methylaniline function which was used as a termination reagent during the synthesis of polyisoprene. Introduction of the functional group via a termination reagent allowed complete functionalization of the target polymer.

Using the azo dye functionalized PI-*b*-PEO diblock copolymers for the phase transfer of the hydrophobic QDs into water, QD-loaded micelles were achieved. The hydrophobic PI block represents the decisive part of the Förster radius between the QD donor and the azo dye acceptor. By varying the mixing of PI-*b*-PEO with and without azo dye group, the acceptor concentration could be varied, which clearly affected the measured FRET. The pH-responsive quantum dot FRET sensors obtained after emulsion polymerization and purification were then examined for their optical properties and their quenching behavior. In addition to a dynamic quenching behavior by the FRET, static quenching processes of a small fraction of nano-constructs could be observed, which modified the fluorescence intensity but not the fluorescence decay time. Therefore the detection of the FRET via the fluorescence decay behavior compared to the emission proved to be much more precise. In a final experiment, the QD-FRET sensors were applied to suspension cells to show the applicability of the system in a physiological environment.



### 3 EINLEITUNG

Die Nanotechnologie ist ein relativ modernes Forschungsgebiet der Naturwissenschaften und wird erst seit wenigen Jahrzehnten intensiv erforscht. Sie bietet ein zunehmend breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten im materialwissenschaftlichen, elektronischen und auch biomedizinischen Bereich. Der Einsatz von Nanopartikeln in der medizinischen Diagnostik bei dem man mittels Bildgebungsverfahren Aufschluss über biochemische Prozesse erlangt,<sup>[2,3]</sup> gewinnt dabei fortwährend an Bedeutung und verlangt ein immer besseres Verständnis der physikalischen und chemischen Eigenschaften der nanoskopischen Akteure. Zu diesen Akteuren sind beispielsweise die superparamagnetischen Eisenoxidnanoteilchen zu zählen, die bereits seit vielen Jahren in der medizinischen Kernspintomographie als Kontrastmittel zum Einsatz kommen.<sup>[4]</sup> Darüber hinaus rückt die diagnostische Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (engl. „*fluorescence-lifetime imaging microscopy*“, FLIM) als Bildgebungsverfahren, beispielsweise für die kardiovaskuläre Diagnostik, immer weiter in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung.<sup>[5]</sup> Ein fundamentaler Bestandteil dieses Verfahrens sind Fluorophore, die über besondere optische Eigenschaften wie hohe Fluoreszenzquantenausbeuten oder lange Fluoreszenzabklingzeiten verfügen müssen, um zum Beispiel eine Abgrenzung bei der Bildgebung gegen die Autofluoreszenz des umliegenden Gewebes zu ermöglichen.<sup>[6,7]</sup> In Anbetracht dieser Erfordernisse und aufgrund ihrer herausragenden optischen Eigenschaften sind Quantum Dots prädestiniert für einen Einsatz in der diagnostischen FLIM.<sup>[8,9]</sup> Hier konnten bereits endosomale Prozesse unter Verwendung von QDs studiert werden.<sup>[10]</sup> Eine spezielle Herausforderung beim Einsatz der QDs im physiologischen Milieu ist zum einen die Wasserlöslichkeit und zum anderen der Schutz vor Löschprozessen, die zur deutlichen Abnahme bis hin zum völligen Erliegen der Fluoreszenz führen können. Ein in der Arbeitsgruppe Weller etabliertes System verwendet für den Phasentransfer und als Schutzhülle amphiphile Diblockcopolymer, die Mizellen ausbilden, deren hydrophobe Mizellkerne mit QDs beladen sind.<sup>[11]</sup> Diese schützende Polymerhülle kann funktionalisiert werden, um eine Donor-Akzeptor-Wechselwirkung zwischen Quantum Dots und Akzeptormolekül zu erzeugen, welche als Förster-Resonanzenergietransfer<sup>[12,13]</sup> bezeichnet wird. Grundvoraussetzung hierfür ist, dass sich Donor und Akzeptor in einem Abstand von etwa 1-10 nm voneinander befinden und es zu einem spektralen Überlapp zwischen der Emission des QD-Donors und der Absorption des Akzeptors kommt. Durch stimuli-responsive Akzeptormoleküle, wie den in dieser Arbeit verwendeten pH-Indikatorfarbstoffen, können somit Quantum-Dot-FRET-Sensoren zur Anwendung im physiologischen Milieu dargestellt werden. Eine detaillierte Betrachtung der Vorgehensweise, um derartige FRET-Sensoren zu erhalten, wird in Abschnitt 5 (Zielsetzung und Konzeption) gegeben.



## 4 THEORETISCHER HINTERGRUND

Die erfolgreiche Herstellung von Quantum-Dot-FRET-Sensoren beinhaltet das zielgerichtete Zusammenwirken unterschiedlicher chemischer Komponenten und physikalischer Faktoren und Prozesse. In diesem Kapitel werden theoretische Aspekte zu den einzelnen Komponenten der dargestellten Sensoren beschrieben sowie physikalische Faktoren und wirkende Prozesse erläutert. Dazu werden im ersten Abschnitt sowohl relevante Eigenschaften von Quantum Dots als auch Energietransferprozesse erklärt (→4.1). Im zweiten Abschnitt wird ein Einblick in den theoretischen Hintergrund der angewandten Polymerisationsmethode, der verwendeten Diblock-copolymere und der Verkapselung von Quantum Dots gegeben (→4.2).

### 4.1 FLUORESZIERENDE NANOPARTIKEL UND LÖSCHUNGSPROZESSE

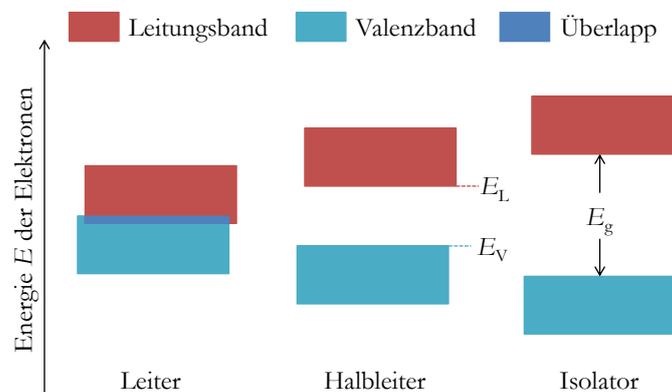
Halbleitende Nanopartikel besitzen einzigartige optische Eigenschaften, weshalb sie für die Anwendung in FRET-Sensoren prädestiniert sind. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Quantum Dots auf Cadmiumselenid-Basis, also II-VI-Halbleiternanopartikel verwendet.

#### 4.1.1 QUANTUM DOTS: HALBLEITER MIT GRÖßENQUANTISIERUNGSEFFEKT

Die elektrische Leitfähigkeit von Festkörpern ist eine materialintrinsische Größe, bei der zwischen leitend, halbleitend und isolierend unterschieden wird. Um die elektronischen Eigenschaften von Festkörpern zu beschreiben, eignet sich die Näherung fester Bindung<sup>[19]</sup>. Unter Annahme, ein Festkörper würde aus einzelnen gleichartigen Atomen bestehen, ergeben sich nach linearer Kombination von  $N$  Atomorbitalen (engl. „*linear combination of atomic orbitals*“, LCAO), gleicher Energie und Symmetrie, auch  $N$  Molekülorbitale. Die gleichartigen  $N$  Molekülorbitale liegen energetisch dicht beisammen und bilden so bei steigendem  $N$  ein energetisches Kontinuum, auch Energieband genannt. Wird die Annahme durch weitere Atomorbitale unterschiedlicher Energie und Symmetrie ergänzt, bedeutet das auch die Existenz mehrerer Energiebänder. Bei diesen energetisch ungleichen Bändern kommt dem sogenannten Valenzband (VB) und dem Leitungsband (LB) eine besondere Bedeutung zu. Das VB ist das energetisch höchst besetzte Energieband, wohingegen das LB das energetisch niedrigste unbesetzte Energieband darstellt. Genauer wird das höchste VB-Niveau Valenzbandoberkante und das niedrigste LB-Niveau Leitungsbandober- bzw. unterkante genannt. Die Energiedifferenz dieser

beiden Bandkanten wird als Bandlücke bezeichnet und bestimmt, ob ein Festkörper ein Leiter, Halbleiter oder Isolator ist.

Bei einer Bandlückenenergie  $E_g$  von  $>4$  eV zwischen Valenzbandoberkante ( $E_V$ ) und Leitungsbandunterkante ( $E_L$ ) ist keine thermische Anregung von VB-Elektronen in das LB möglich, weshalb in diesem Fall ein Isolator vorliegt. Im Bereich von  $<4$  eV wird von Halbleitern gesprochen, bei denen Elektronen vom VB ins LB angeregt werden können und somit eine elektrische Leitfähigkeit möglich wird. Bei  $T = 0$  K sind Halbleiter allerdings ebenfalls Isolatoren. Bei Leitern schließen VB und LB aneinander an oder überlappen sogar weshalb die Bandlücke 0 eV beträgt und sich somit stets Elektronen im Leitungsband befinden. In Abbildung 4.1 wird das Bändermodell für die unterschiedlichen Klassen von Festkörpern dargestellt.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Lage von Valenz- und Leitungsband in Leitern (mit Überlapp), Halbleitern und Isolatoren.

In einer anderen Konstellation, in der ein Leiter vorliegt, befindet sich das Niveau, bei dem die temperaturunabhängige Besetzungswahrscheinlichkeit  $\frac{1}{2}$  beträgt, im Leitungsband. Besitzt beispielsweise jedes von  $N$  Atomen ein Elektron, sind bei  $T = 0$  K die energetisch tiefst liegenden  $\frac{1}{2}N$  Molekülorbitale besetzt.<sup>[19]</sup> In diesem Fall wird das höchste besetzte Niveau bzw. Molekülorbital (engl. „*highest occupied molecular orbital*“, HOMO) Fermi-Niveau oder auch Fermi-Kante genannt. Die energetische Lage der Fermi-Kante wird in der folgenden Abbildung 4.2 schematisch dargestellt.

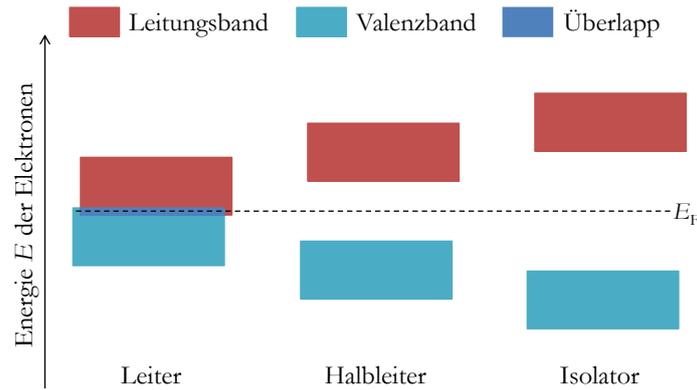


Abbildung 4.2: Lage des Fermi-Niveaus  $E_F$  im Bänderschema von Leiter, Halbleiter und Isolator.

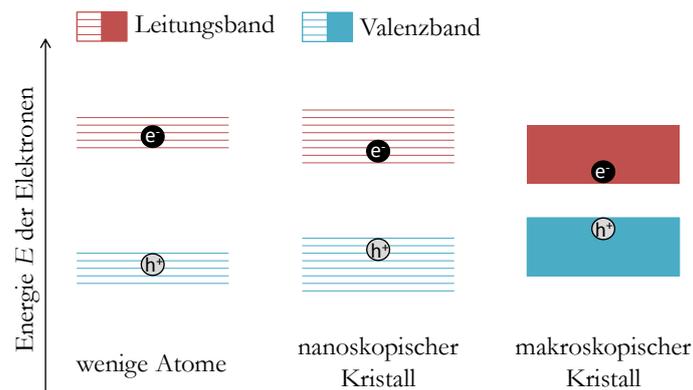
Bei  $T = 0$  K ist demnach auch ein Halbleiter ein Isolator. Mit steigender Temperatur nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass Elektronen in das LB eines Halbleiters angeregt werden, weshalb sich auch die Leitfähigkeit erhöht. Bei Leitern hingegen nimmt die Leitfähigkeit bei steigender Temperatur ab, da es häufiger zur Kollision zwischen Elektronen kommt und somit ihre Beweglichkeit eingeschränkt wird.

Bei Halbleitern führt die Anregung eines Elektrons  $e^-$  in das LB zu einem sogenannten Loch im VB. Dieses positiv geladene Quasiteilchen  $h^+$  wird auch als Defektelektron bezeichnet. Die beiden entgegengesetzten Ladungen können sich aufgrund der Coulomb-Kraft nicht völlig frei voneinander im Festkörper bewegen<sup>[1]</sup> und bilden folglich ein Elektron-Loch-Paar, welches auch als Exziton bezeichnet wird. Der mittlere Abstand der beiden Teilchen wird aufgrund der Ähnlichkeit des Exzitons zum Wasserstoffatom auch als Exziton-Bohr-Radius bezeichnet.<sup>[1]</sup> Durch die Valenzelektronen und Atomrümpfe im Festkörper erfahren die beiden Ladungen eine gewisse Abschirmung voneinander, was zu einer niedrigen Bindungsenergie führt. Hieraus ergeben sich entsprechend große Exziton-Bohr-Radii, die bei II-VI-Halbleitern wie beispielsweise ZnS und CdTe bei 2,2 nm und 7,5 nm liegen.<sup>[20]</sup>

Wird die Größe von Festkörpern in die Betrachtung des Bändermodells einbezogen, zeigt sich, dass die Bandlücke bei nanoskopischen Kristallen im Gegensatz zu makroskopischen keine rein materialintrinsische Eigenschaft mehr darstellt. Die räumliche Ausdehnung des Exzitons erfährt eine Einschränkung durch die Abmessung des Kristalls, wodurch die kinetische Energie der Ladungsträger zunehmen muss.

Zur Beschreibung wird häufig das Modell des Teilchens im sphärischen Kasten verwendet. Innerhalb des Kristalls wird ein Potential von  $V = 0$  und außerhalb in erster Näherung von

$V = \infty$  angenommen. Die Oberfläche, also die Begrenzung des Kristalls, stellt dabei ein unendlich hohes Potential dar. Der Welle-Teilchen-Dualismus erlaubt es, das Exziton als stehende Welle innerhalb des Potentialtopfs zu betrachten. Um ein Auslösen durch Interferenz auszuschließen, muss das Anregen in höhere Energieniveaus stets zu einem Vielfachen der stehenden Welle führen, weshalb nur diskrete Energieniveaus erlaubt sind. Bei kleineren Abmessungen führt dies automatisch zur erhöhten Krümmung der möglichen Wellenfunktionen und somit zu einer Zunahme der kinetischen Energien, was eine Vergrößerung der Bandlücke bewirkt. Dieses Phänomen der Zunahme der Bandlückenenergie bei immer kleineren Abmessungen von Halbleiternanokristallen und gleichzeitiger Quantisierung der erlaubten Energieniveaus wird als Größenquantisierungseffekt bezeichnet.<sup>[1]</sup> In der folgenden Abbildung wird die Bandlücke in Abhängigkeit von der Kristallgröße schematisch dargestellt, wobei ebenfalls das Auflösen der homogenen Bandstruktur durch Abnahme der Anzahl beitragender Atomorbitale gezeigt wird.



**Abbildung 4.3:** Schematischer Vergleich der Bandlückengröße eines Halbleiters bei unterschiedlicher Kristallgröße. Die homogene Bandstruktur löst sich durch die geringer werdende Anzahl von beitragenden Atomorbitalen bei abnehmender Kristallgröße auf.

Um eine quantitative Aussage über die Veränderung der Bandlückenenergie  $\Delta E$  im Vergleich zu einem makroskopischen Festkörper treffen zu können, muss die Wechselwirkung der Ladungsträger mit dem Kristall berücksichtigt werden. Daher werden bei Brus<sup>[21]</sup> Korrekturfaktoren für das Exziton verwendet, die als effektive Massen  $m_e^*$  und  $m_h^*$  des Elektrons und des Lochs bezeichnet werden.

$$\Delta E = \frac{\pi^2 \hbar^2}{2R^2} \left( \frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1,8e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r R} \quad \text{Gl. 4.1}$$

Des Weiteren fließen das reduzierte Planck'sche Wirkungsquantum  $\hbar$ , der Kristallradius  $R$ , die Elementarladung  $e$  und die Dielektrizitätskonstante (DK) des Vakuums  $\epsilon_0$  und die Hochfrequenz-DK des Halbleitermaterials  $\epsilon_r$  in die Betrachtung ein. Dabei beschreibt der Minuend die Vergrößerung der kinetischen Energie durch die Verkleinerung des Potentialtopfs, während der Subtrahend die Coulomb-Wechselwirkung von Elektron und Loch berücksichtigt.

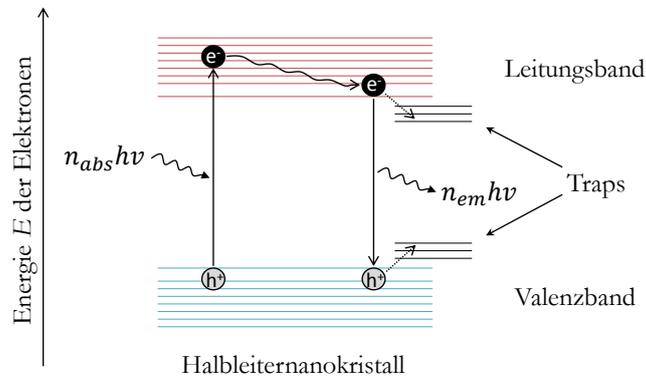
Bei fluoreszierenden Halbleiternanokristallen, die einen Größenquantisierungseffekt aufweisen, wird auch von Quantenpunkten (engl. „*quantum dot*“, QD) gesprochen. Sie besitzen außergewöhnliche optische Eigenschaften.

#### 4.1.2 OPTISCHE EIGENSCHAFTEN VON QUANTUM DOTS

Durch Absorbieren von Photonen können Elektronen von Quantum Dots in einen angeregten Singulettzustand gelangen. Ein entstandenes Exziton löst sich dabei innerhalb weniger Nanosekunden<sup>[13]</sup> durch Rekombination von Elektron und Loch unter Emission von Photonen wieder auf. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet, wobei fluoreszierende Materialien auch Fluorophore genannt werden.

Die Absorption von Photonen ( $n_{abs} \cdot h\nu$ ) verläuft im Bereich von Femtosekunden<sup>[13]</sup> und damit um ein Vielfaches schneller als die Schwingungsperiode eines Moleküls. Deshalb erfolgt die Anregung aus dem Grundzustand sowohl in einen angeregten elektronischen Zustand als auch in einen angeregten Schwingungszustand. Hiernach kommt es zum Relaxieren aus dem angeregten exzitonischen Zustand in den Schwingungsgrundzustand, wobei Energie in Form von Phononen an das Kristallgitter abgegeben wird. Dieser Prozess wird auch als strahlungslose Desaktivierung bezeichnet und verläuft im Bereich von Picosekunden<sup>[13]</sup>. Abschließend können Elektron und Loch aus dem Schwingungsgrundzustand im angeregten elektronischen Zustand unter Emission von Photonen rekombinieren. Aufgrund der strahlungslosen Desaktivierung ist das emittierte Licht ( $n_{em} \cdot h\nu$ ) energieärmer als das zuvor absorbierte, weshalb sich eine Verschiebung hin zu größeren Wellenlängen im Emissionsspektrum im Vergleich zum ersten Maximum des

Absorptionsspektrums beobachten lässt. Dieses Phänomen wird als Stokes-Shift bezeichnet.<sup>[13]</sup> Der gesamte Ablauf wird in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung der Anregung eines Elektrons unter Absorption von Photonen mit anschließender strahlungsloser Desaktivierung, Rekombination, Emission und möglicher Haftstellen für Elektron und Loch.

Ein Gütemaß für die Fluoreszenz von Fluorophoren bzw. Quantum Dots stellt die Fluoreszenzquantenausbeute  $Q$  dar. Sie beschreibt das Verhältnis der Anzahl emittierter ( $n_{em}$ ) zu absorbierten ( $n_{abs}$ ) Photonen, kann allerdings auch über das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstante  $k_{em}$  des Emissionsprozesses zu sämtlichen anderen Relaxationsprozessen  $\sum k_{relax}$  beschrieben werden.

$$Q = \frac{n_{em}}{n_{abs}} = \frac{k_{em}}{\sum k_{relax}} \quad \text{Gl. 4.2}$$

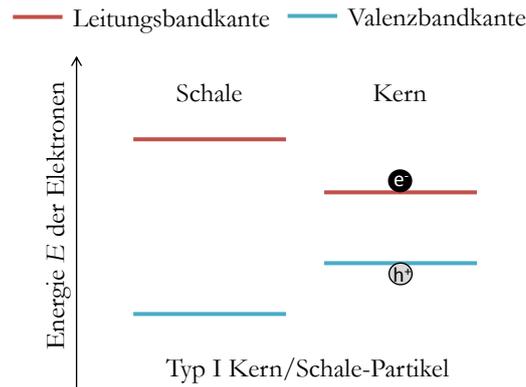
Durch alternative strahlungslose Relaxationsmöglichkeiten wird die Fluoreszenzquantenausbeute erheblich abgesenkt. Solche Relaxationsmöglichkeiten sind durch Haftstellen (engl. „traps“) für Elektronen und Löcher gegeben. In einem sphärischen (Nano)-Kristall fehlen den Oberflächenatomen Bindungspartner, wodurch Fehlstellen und ungesättigte Valenzen entstehen, die als Traps dienen und energetisch innerhalb der Bandlücke liegen (Abbildung 4.4).<sup>[1]</sup> Elektronen können strahlungslos in die Traps relaxieren und senken die Fluoreszenzquantenausbeute dadurch empfindlich ab. Um diesen unerwünschten Effekt zu minimieren können passivierende organische Liganden mit funktionellen Gruppen eingesetzt werden. Dabei kommen häufig

Amine, Phosphane oder auch Thiole zum Einsatz<sup>[22]</sup>, die an der Kristalloberfläche binden können. Eine weitere Herausforderung besteht allerdings darin, sowohl positive als auch negative Valenzen mit Liganden abzusättigen. Durch das Aufwachsen einer weiteren kristallinen halbleitenden Schicht eines geeigneten Materials können die Oberflächenfehlerstellen und Valenzen größtenteils beseitigt werden, wobei die Oberflächenbeschaffenheit der erzeugten Schale je nach Material eine untergeordnete Rolle spielt.

#### 4.1.3 SCHALENEFFEKTE BEI QUANTUM DOTS

Nach erfolgter Darstellung von Nanokristall-(Kernen) können die optischen Eigenschaften in Hinblick auf Fluoreszenzquantenausbeute, Absorptions- und Emissionsmaxima durch das Aufwachsen eines geeigneten Schalenmaterials verbessert bzw. eingestellt werden. Dabei werden zwei Typen von Kern-Schale-Partikeln unterschieden, wobei die Klassifizierung nach Lage der Valenz- und Leitungsbandkante des Schalenmaterials zum Kernmaterial erfolgt.

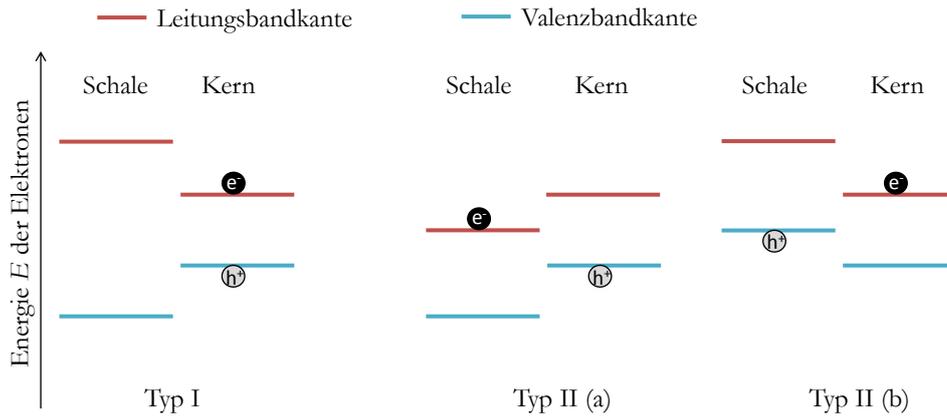
Für sogenannte Typ I Partikel wird ein Schalenmaterial mit größerer Bandlücke im Vergleich zum Kernmaterial verwendet, wobei sowohl Valenzband- als auch Leitungsbandkante des Kernmaterials energetisch innerhalb dieser Bandlücke liegen müssen. Bei Typ I Partikeln wird auf diese Weise eine Potentialbarriere für die Ladungsträger geschaffen, wodurch die Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Schale drastisch herabgesetzt wird und das Exziton hauptsächlich im Kern lokalisiert ist. Auf diese Weise wird das Relaxieren in die Traps größtenteils unterdrückt<sup>[23,24]</sup> und es können Fluoreszenzquantenausbeuten beispielsweise bei CdSe/CdS - Kern/Schale-Partikeln von 97 %<sup>[25]</sup> erreicht werden. Die energetische Lage der Valenz- und Leitungsbandkanten für Typ I Partikel wird in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung der energetischen Lage von Valenz- und Leitungsbandkanten eines Typ I Kern/Schale-Partikels.

Bei der Wahl geeigneter Materialien ist auf eine möglichst geringe Gitterfehlpassung zwischen Kern- und Schalenmaterial zu achten, um ein epitaktisches Aufwachsen der Schale zu erzielen und Fehlstellen an der Grenzfläche zu unterbinden.<sup>[26]</sup> Dies ist beim System CdSe/CdS gegeben, allerdings liegt das Leitungsband von CdS im Vergleich zu CdSe nur minimal höher. Ein Schalenmaterial mit größerer Bandlücke wie ZnS könnte somit auf den ersten Blick eine noch bessere Stabilität liefern. Allerdings ist die Gitterfehlpassung zwischen ZnS und CdSe größer, weshalb hier lediglich Fluoreszenzquantenausbeuten von 50 % erzielt werden konnten.<sup>[27]</sup> Mit einer Kern/Schale/Schale-Architektur aus CdSe/CdS/ZnS wird dieser Umstand behoben, wodurch hohe Stabilitäten bei gleichzeitig hoher Fluoreszenzquantenausbeute erreicht werden können.<sup>[26]</sup>

Sofern die Valenz- oder Leitungsbandkante des Schalenmaterials innerhalb der Bandlücke des Kernmaterials liegt, wird von Typ II Partikeln gesprochen.<sup>[26,28]</sup> Bei diesen Partikeln ist einer der beiden Ladungsträger räumlich vom anderen getrennt und hauptsächlich in der Schale lokalisiert, wodurch auch strahlungslose Rekombinationsprozesse, wie das Relaxieren in Traps, wieder begünstigt werden.<sup>[29,30]</sup> Beispiele für Kern/Schale-Materialkombinationen solcher Partikel sind CdTe/CdSe oder CdSe/ZnTe.<sup>[30]</sup> In Abbildung 4.6 wird die energetische Lage der Valenz- und Leitungsbandkanten von Typ I und Typ II Partikeln schematisch verglichen.



**Abbildung 4.6:** Schematischer Vergleich der energetischen Lage von Valenz- und Leitungsbandkanten von Typ I und Typ II Kern/Schale-Partikeln.

Durch die effektiv kleinere Bandlücke von Typ II Partikeln verlagern sich die Absorptions- und Emissionsmaxima hin zu größeren Wellenlängen.<sup>[31]</sup> Auf diese Weise kann die Fluoreszenz von Quantum Dots in den nahen Infrarotbereich verschoben werden. Für eine Anwendung in der Fluoreszenztomographie ist vor allem das sogenannte optische Fenster im Bereich von 700 – 900 nm interessant, da hier die Streueffekte und Absorption durch umliegendes Gewebe besonders gering sind.<sup>[32]</sup>

#### 4.1.4 STATISCHE UND DYNAMISCHE FLUORESCENZLÖSCHUNG

Die Fluoreszenz und auch Fluoreszenzabklingzeit von Fluorophoren wie Quantum Dots kann durch bestimmte Vorgänge abnehmen oder sogar quasi vollständig unterdrückt bzw. sehr stark verkürzt werden. Bei solchen Prozessen wird von Fluoreszenzlöschung (engl. „*quenching*“) gesprochen, wobei eine strahlungslose Desaktivierung stattfindet.<sup>[13]</sup> Verantwortlich für das Löschen ist ein sogenannter Quencher, der ein Molekül oder Ion sein kann. Der Quencher muss auf eine Distanz von  $<1$  nm zum Fluorophor gelangen, um eine Elektronenübertragung durch Tunnelprozesse zu ermöglichen.<sup>[13]</sup> Je nachdem, nach welchem Mechanismus die Akteure des Quenchings wechselwirken, wird zwischen dynamischer, statischer oder auch gemischter Fluoreszenzlöschung unterschieden.

In Abwesenheit eines Quenchers (Gl. 4.3) kann die Fluoreszenzabklingzeit  $\tau_0$  durch die reziproke Summe der Geschwindigkeitskonstanten für nicht emittierende  $k_{nem}$  und emittierende  $k_{em}$  Relaxationsprozesse beschrieben werden:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_{nem} + k_{em}} \quad \text{Gl. 4.3}$$

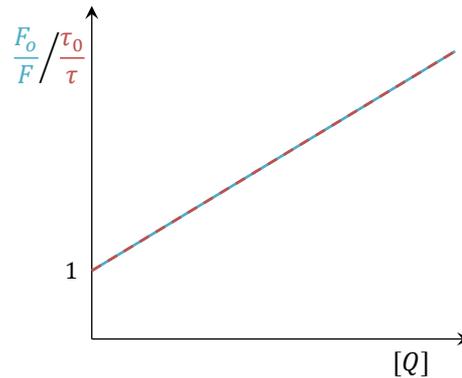
In Gegenwart eines Quenchers (Gl. 4.4) muss der Term für die Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$  zum einen durch die Quencherkonzentration  $[Q]$  und zum anderen durch das Produkt  $k_q$  aus Quenchingeffizienz und Kollisionsrate, auch als bimolekulare Quenchingkonstante bezeichnet, erweitert werden.

$$\tau = \frac{1}{k_{nem} + k_{em} + k_q[Q]} \quad \text{Gl. 4.4}$$

Erreicht ein Quencher innerhalb der Fluoreszenzabklingzeit eine Tunneldistanz zum Fluorophor, sodass eine Elektronenübertragung aus dem exzitonischen Zustand stattfindet, wird der Vorgang als dynamische Fluoreszenzlöschung bezeichnet. Bei diesen Stoßprozessen nehmen sowohl die Fluoreszenzintensität  $F$  als auch die Fluoreszenzabklingzeit ab. Dies wird nachfolgend durch die Stern-Vollmer-Gleichung<sup>[13]</sup> für dynamisches Quenching beschrieben (Gl. 4.5), wobei  $F_0$  die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit eines Quenchers darstellt.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = \frac{\tau_0}{\tau} \quad \text{Gl. 4.5}$$

Die Stern-Vollmer-Auftragung für dynamisches Quenching (Abbildung 4.7) beschreibt zwei Geraden mit gleicher positiver Steigung. Hierbei werden die reziproken Fluoreszenzintensitäten und Fluoreszenzabklingzeiten gegen die Quencherkonzentration aufgetragen.

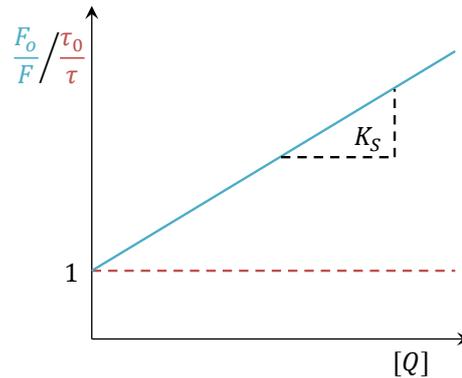


**Abbildung 4.7:** Die Stern-Vollmer-Auftragung für den Fall von dynamischem Quenching zeigt zwei Geraden mit gleicher positiver Steigung, wobei hier die reziproken Fluoreszenzintensitäten  $\frac{F_0}{F}$  (aquamarin) und Fluoreszenzabklingzeiten  $\frac{\tau_0}{\tau}$  (rot) gegen die Quencherkonzentration  $[Q]$  aufgetragen sind.

Ist die Verweilzeit des Quenchers in einem geringen Abstand zum Fluorophor, der eine Elektronenübertragung erlaubt, erheblich länger als die Fluoreszenzabklingzeit, wird von statischem Quenching gesprochen. Nach Anregen des Fluorophors kann hier durch direkte Elektronenübertragung keine strahlende Rekombination mehr stattfinden. Das Wechselwirken von Fluorophor und Quencher kann als Komplexbildung angenommen werden. Stoßprozesse während der Fluoreszenz werden in diesem Fall vernachlässigt, weshalb die Fluoreszenzabklingzeit hier keine Veränderung erfährt. Bei Betrachtung eines Kollektivs an Fluorophoren hängt die Fluoreszenzlöschung somit lediglich von der Quencherkonzentration und der Komplexbildungskonstante  $K_S$  ab. Daraus resultiert die nachfolgende Stern-Vollmer-Gleichung für statisches Quenching.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad \text{Gl. 4.6}$$

Bei der Stern-Vollmer-Auftragung für statisches Quenching werden die reziproken Werte für die Fluoreszenzabklingzeit und Fluoreszenzintensität gegen die Quencherkonzentration aufgetragen (Abbildung 4.8). Für die reziproken Fluoreszenzabklingzeiten zeigt sich wie erwartet eine Gerade mit der Steigung 0 und für die reziproken Fluoreszenzintensitäten eine Gerade mit positiver Steigung, die der Komplexbildungskonstante von Fluorophor und Quencher entspricht.

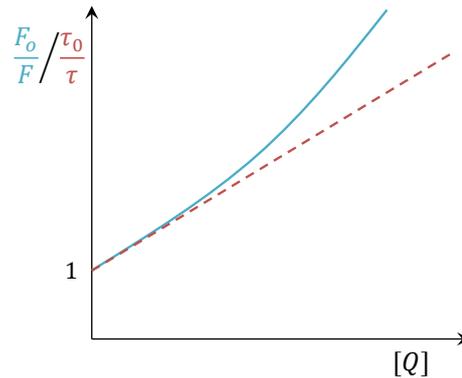


**Abbildung 4.8:** Die Stern-Vollmer-Auftragung gegen die Quencherkonzentration  $[Q]$  im Fall von statischem Quenching zeigt für die reziproken Fluoreszenzabklingzeiten  $\frac{\tau_0}{\tau}$  eine Gerade mit der Steigung 0 (rot) und für die reziproken Fluoreszenzintensitäten  $\frac{F_0}{F}$  eine Gerade mit positiver Steigung (aquamarin), die der Komplexbildungskonstante von Fluorophor und Quencher entspricht.

Liegen sowohl dynamische als auch statische Fluoreszenzlöschung gleichzeitig vor, wird von gemischtem Quenching gesprochen. In diesem Fall wirken zwischen Fluorophor und Quencher sowohl Stoß- als auch Komplexbildungsprozesse. Dadurch nehmen sowohl die Fluoreszenzabklingzeit als auch die Fluoreszenzintensität ab. Dabei folgt die Abnahme der Fluoreszenzintensität keinem linearen Zusammenhang mehr. Da sie sowohl von der bimolekularen Quenchingkonstanten als auch von der Komplexbildungskonstanten abhängt, zeigt sie eine quadratische Abhängigkeit von  $Q$ . Die Stern-Vollmer-Gleichung für gemischtes Quenching (Gl. 4.7) setzt sich aus den Gleichungen für dynamisches und statisches Quenching (Gl. 4.5 & Gl. 4.6) zusammen.

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_S[Q])(1 + k_q\tau_0[Q]) \quad \text{Gl. 4.7}$$

Durch die Stern-Vollmer-Auftragung für gemischtes Quenching zeigen sich zum einen die nicht-lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten und zum anderen die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzabklingzeiten von der Quencherkonzentration. Dabei werden erneut die reziproken Werte der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzabklingzeit gegen die Quencherkonzentration aufgetragen (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9:** Die Stern-Vollmer-Auftragung für gemischtes Quenching zeigt für die reziproken Fluoreszenzintensitäten  $\frac{F_0}{F}$  eine nicht lineare Abhängigkeit von der Quencherkonzentration  $[Q]$  mit positiver Krümmung (aquamarin). Für die reziproken Fluoreszenzabklingzeiten  $\frac{\tau_0}{\tau}$  zeigt sich genau wie beim dynamischen Quenching ein lineares Verhalten mit positiver Steigung (rot).

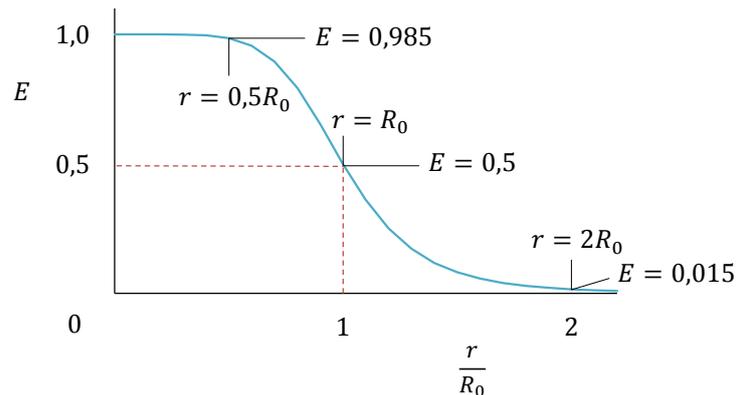
Für die vorliegende Arbeit ist ein weiterer strahlungsloser Quenchingprozess von großer Bedeutung welcher im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

#### 4.1.5 FÖRSTER-RESONANZENERGIETRANSFER

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist ein strahlungsloser elektrodynamischer Energieübertragungsvorgang zwischen einem Donor und einem Akzeptor.<sup>[13]</sup> Durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung<sup>[12]</sup> wird dabei, ohne Emission von Photonen, Energie von einem angeregten Donor auf einen im Grundzustand befindlichen Akzeptor übertragen. Dabei müssen mehrere Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Die Distanz zwischen Donor und Akzeptor darf nicht kleiner als etwa 1 nm sein, da ansonsten Tunneleffekte<sup>[19]</sup> als Konkurrenzenergietransfer auftreten können. Typische FRET-Distanzen liegen im Bereich von 1 – 10 nm.<sup>[33]</sup> Die folgende Gleichung (Gl. 4.8) zeigt die Abhängigkeit der Energietransfereffizienz  $E$  vom Förster-Radius  $R_0$ , und vom Donor-Akzeptor-Abstand  $r$ .

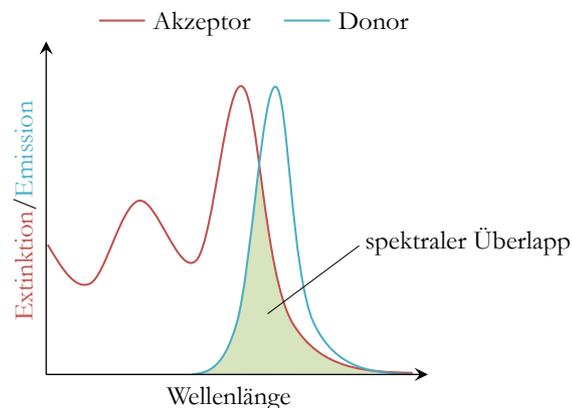
$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad \text{Gl. 4.8}$$

Dabei beschreibt  $R_0$  eine für jedes Donor-Akzeptor-Paar spezifische Distanz bei der  $E$  gerade 50 % beträgt. Das Auftragen von  $E$  gegen  $\frac{r}{R_0}$  zeigt (Abbildung 4.10), dass bereits kleine Variationen im Abstand zwischen Donor und Akzeptor deutlichen Einfluss auf die Energietransfereffizienz besitzen.<sup>[13,33]</sup>



**Abbildung 4.10:** Auftragung der Transfereffizienz  $E$  gegen das Verhältnis aus Donor-Akzeptor-Abstand  $r$  zum Förster-Radius  $R_0$ .<sup>aus Vorlage: [13]</sup>

Eine weitere Grundbedingung, die für einen FRET erfüllt sein muss, ist ein spektraler Überlapp der Emission des Donors und der Extinktion des Akzeptors. Die aus dem Überlapp resultierende Fläche entspricht dabei dem sogenannten Überlappungsintegral  $J$  (Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11:** Schematische Darstellung des Absorptionsspektrums eines Akzeptors (rot) und des Emissionsspektrums eines Donors (aquamarin). Der spektrale Überlapp (grün) ist eine der Grundbedingungen, damit es zum FRET kommen kann, da seine Fläche das Überlappungsintegral  $J$  darstellt.

Unter Berücksichtigung der normierten Fluoreszenzintensität des Donors  $F_D$  und des (molaren) Extinktionskoeffizienten des Akzeptors  $\varepsilon_A$  bei den jeweiligen Wellenlängen  $\lambda$ , kann  $J$  durch die folgende Gleichung (Gl. 4.9) bestimmt werden.<sup>[13]</sup>

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad \text{Gl. 4.9}$$

Das Überlappungsintegral ist eine der für jedes Donor-Akzeptor-Paar spezifischen Größen, die den Förster-Radius  $R_0$  bestimmen. Dazu zählen auch der Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor  $\kappa$ , die Quantenausbeute des Donors  $Q_D$ , und der Brechungsindex  $n$  des Mediums zwischen Donor und Akzeptor. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der Avogadro-Konstanten  $N_A$ , kann  $R_0^6$  mithilfe der folgenden Gleichung (Gl. 4.10) bestimmt werden.<sup>[13]</sup>

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D J}{128\pi^5 N_A n^4} \quad \text{Gl. 4.10}$$

Je nach Ausrichtung von Donor und Akzeptor zueinander, kann das Quadrat des Orientierungsfaktors  $\kappa^2$  Werte zwischen 0 und 4 besitzen, wobei für frei bewegliche Teilchen in Lösung  $\kappa^2 = \frac{2}{3}$  angenommen wird.<sup>[13,16,33]</sup>

Neben der Intensität nimmt auch die Abklingzeit der Fluoreszenz des Donors ab,<sup>[13]</sup> weshalb der Förster-Resonanzenergietransfer auch als dynamischer Quenchingprozess angenommen werden kann.

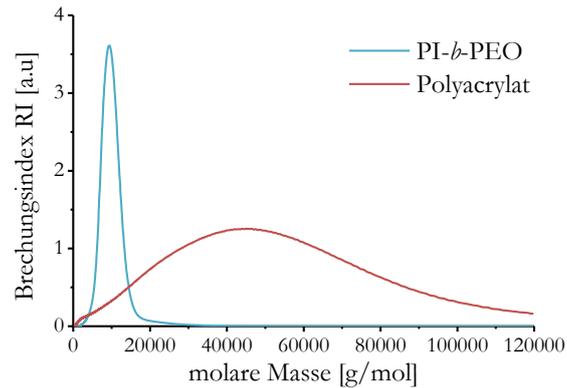
## 4.2 POLYMERE FÜR DEN PHASENTRANSFER UND ZUR VERKAPSELUNG VON QUANTUM DOTS

Um Quantum Dots mit exzellenten optischen Eigenschaften<sup>[9]</sup>, ergo sehr hohen Fluoreszenzquantenausbeuten verbunden mit sehr schmalen Emissionsbanden zu erhalten, sind Hochtemperatursynthesen in organischen Lösungsmitteln wie Tri-*n*-octylphosphanoxid (TOPO) oder 1-Octadecen (ODE) für gewöhnlich am besten geeignet.<sup>[34]</sup> Als stabilisierende Liganden kommen dabei beispielsweise Hexadecylamin (HDA) oder Tri-*n*-octylphosphan (TOP) zum Einsatz,

welche freie Valenzen an der Oberfläche absättigen und eine gute Löslichkeit der Partikel in organischen Lösungsmitteln gewährleisten.<sup>[22]</sup> Diese Liganden führen aber auch zu hydrophoben Eigenschaften von Quantum Dots, wodurch eine direkte Verwendung in hydrophilen Milieus für biomedizinische Zwecke verwehrt bleibt. Um eine Anwendung in hydrophiler Umgebung zu ermöglichen, kann ein Phasentransfer mit amphiphilen Diblockcopolymeren wie beispielsweise Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid (PI-*b*-PEO) durchgeführt werden.<sup>[35–37]</sup> Neben einer Wasserlöslichkeit kann dadurch auch ein gewisser sterischer Schutz erzielt werden, was zum Erhalt der optischen Eigenschaften in Gegenwart von Quenchern beiträgt. Im Folgenden wird ein Überblick über die in dieser Arbeit angewandte Polymerisationsmethode der anionischen Polymerisation zur Darstellung des amphiphilen PI-*b*-PEOs gegeben. Darüber hinaus werden die Grundlagen der zielgerichteten Funktionalisierung dieses Diblockcopolymeren erläutert.

#### 4.2.1 LEBENDE ANIONISCHE POLYMERISATION

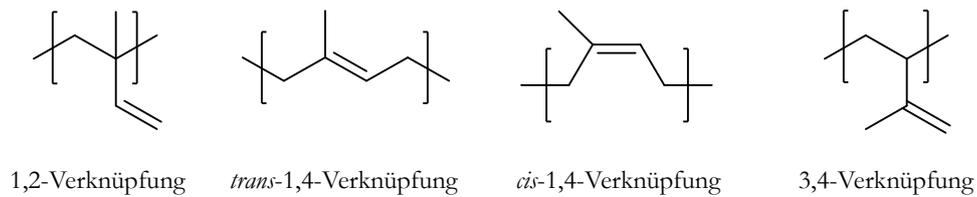
Bei der Darstellung eines zum Phasentransfer von Quantum Dots geeigneten Polymeramphiphils ist besonders auf eine geringe Dispersität zu achten, um später möglichst definierte Überstrukturen erzielen zu können. Von den bekannten radikalischen Kettenwachstumsreaktionen würden hierfür nur die kontrollierten radikalischen Polymerisationsreaktionen in Frage kommen. Dazu zählen die Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungspolymerisation (engl. „*reversible addition-fragmentation chain transfer*“, RAFT) und die Radikalische Atomtransfer-Polymerisation (engl. „*atom transfer radical polymerization*“).<sup>[38,39]</sup> Die am weitesten verbreitete Methode zur Darstellung von Polymeren mit sehr engen Molekulargewichtsverteilungen ist allerdings die erstmals von Szwarc beschriebene Lebende Anionische Polymerisation (LAP).<sup>[40]</sup> Neben einer geringen Dispersität können hier beispielsweise auch das Molekulargewicht eingestellt und eine quantitative Kontrolle der Endgruppenfunktionalisierung erreicht werden.<sup>[41]</sup> Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das amphiphile PI-*b*-PEO zum Phasentransfer von QDs mittels LAP hergestellt. In der folgenden Abbildung 4.12 wird exemplarisch die erreichbare geringe Molmassenverteilung eines per LAP hergestellten PI-*b*-PEOs im Vergleich zu einem mittels radikalischer Kettenpolymerisation hergestellten Polyacrylats gezeigt.



**Abbildung 4.12:** Vergleich der Molmassenverteilung eines per LAP hergestellten PI-*b*-PEOs und eines durch radikalische Kettenpolymerisation hergestellten Polyacrylats (Fraunhofer IAP – CAN). Die relative Häufigkeit einer Polymerkettenlänge wurde dabei über den Brechungsindex mittels Gelpermeationschromatographie bestimmt.

Die LAP verläuft über ionische Zwischenstufen, wobei ein Anion als Initiator dient. Bei der schnell verlaufenden Startreaktion greift das Anion ein Monomer nukleophil an und wird dabei übertragen. Die Kettenfortpflanzung erfolgt dann analog durch weitere nukleophile Additionen an Monomermolekülen. Für eine LAP steht daher nur eine begrenzte Auswahl an Monomeren zur Verfügung. Hierzu zählen zum einen Moleküle, die über eine Doppelbindung mit elektronendichteziehender Gruppe (engl. „*elektron withdrawing group*“, EWG) verfügen, wie z.B. Styrol, Methacrylate, Vinylpyridin, Butadien oder Isopren und zum anderen Heterocyclen wie Caprolacton, Propylenoxid (PO) und Ethylenoxid (EO).<sup>[42]</sup> Für die Initiation der LAP werden beispielsweise Alkalialkoholate oder monofunktionelle Organometallverbindungen wie z.B. *n*- und *sec*-Butyllithium verwendet.<sup>[42]</sup> Darüber hinaus kommen auch radikalisch anionische Initiatoren wie Naphthylkalium<sup>[40]</sup> oder auch Diphenylmethylkalium (DPMK) zum Einsatz.

Im Gegensatz zu anderen Polymerisationstypen wird bei der LAP durch den Initiator ein Kation in die Reaktion eingebracht, welches während der Polymerisation als Gegenion zum Anion wirkt und sowohl Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit als auch auf die Polymerstruktur hat.<sup>[42]</sup> In diesem Zusammenhang ist es über die Wahl des Lösungsmittels möglich, die Mikrostruktur des Polymers zu dirigieren.<sup>[43]</sup> Im Fall der Polyisoprensynthese werden vier unterschiedlichen Verknüpfungsarten unterschieden, deren Strukturen in Abbildung 4.13 dargestellt werden.



**Abbildung 4.13:** Mögliche Verknüpfungsarten im Polyisopren.

Durch Verwendung eines unpolaren Lösungsmittels wie *n*-Heptan dominiert die *cis*-1,4-Verknüpfung. Wird hingegen Tetrahydrofuran (THF) als Lösungsmittel für die Polymerisation verwendet, liegen hauptsächlich 3,4- und 1,2-Verknüpfungen vor. Neben der Beeinflussung der strukturellen Effekte lässt sich das stets vorliegende Gegenion auch für eine quantitative Endgruppenfunktionalisierung nutzen. Kommt bei einer, durch ein Lithiumorganyl initiierten, LAP beispielsweise ein Epoxid als Abbruchreagenz zum Einsatz, entsteht mit Lithiumalkoxyolat ein starkes Kontaktionenpaar, welches die Polymerisation von weiteren Epoxideinheiten verhindert.<sup>[44]</sup> Dadurch wird im letzten Schritt jeweils nur eine einzige Einheit addiert.

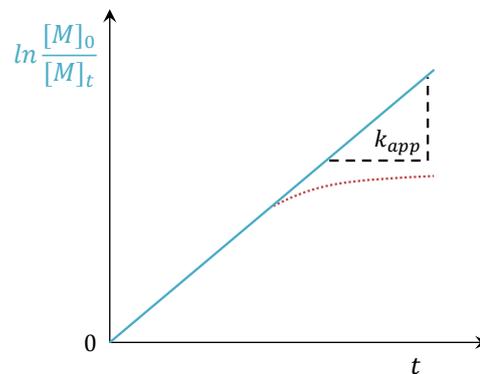
Zum Erhalt des Anions und um einen vorzeitigen Abbruch der LAP zu vermeiden, muss unter Ausschluss von Verunreinigungen, Luftfeuchtigkeit und unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet werden.<sup>[45]</sup> Für eine ideale Reaktionsführung mit schneller Initiation kann die Polymerisationsgeschwindigkeit  $R_p$  in Abhängigkeit von der Monomerkonzentration  $[M]$  zum Zeitpunkt  $t$  nach Gl. 4.11 beschrieben werden.<sup>[46]</sup>

$$R_p = -\frac{d[M]}{dt} = k_p [P^*][M]_t \quad \text{Gl. 4.11}$$

Hierbei beschreibt  $k_p$  die Geschwindigkeitskonstante der Polymerisation und  $[P^*]$  die Konzentration aktiver Kettenenden. Bei ausbleibenden Abbruchreaktionen bleibt  $[P^*]$  konstant und entspricht der Initiatorkonzentration. In diesem Fall zeigt sich nach Integrieren in Gl. 4.12 eine Kinetik erster Ordnung.

$$\ln \frac{[M]_0}{[M]_t} = k_p [P^*] t = k_{app} t \quad \text{Gl. 4.12}$$

Dabei ist  $k_{app}$  die apparente Geschwindigkeitskonstante und  $[M]_0$  die anfangs eingesetzte Monomerkonzentration. Das Auftragen des Umsatzes gegen die Zeit ergibt eine Gerade mit der positiven Steigung  $k_{app}$  (Abbildung 4.14). Beim Auftreten von Abbruchreaktionen wird  $[P^*]$  kleiner und die Beziehung aus Gl. 4.12 verliert ihre Gültigkeit.

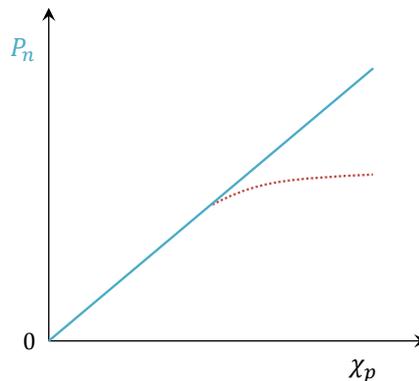


**Abbildung 4.14:** Die Auftragung des Umsatzes  $\ln \frac{[M]_0}{[M]_t}$  einer LAP ohne Abbruchreaktionen gegen die Zeit  $t$  beschreibt eine Gerade (aquamarin), wobei die positive Steigung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{app}$  entspricht. Durch Auftreten von Abbruchreaktionen vermindert sich die Anzahl aktiver Kettenenden  $[P^*]$  (Gl. 4.12), weshalb  $k_{app}$  ihre Gültigkeit verliert (rot).

Für die LAP zeigt der zahlenmittlere Polymerisationsgrad  $P_n$  ein lineares Verhalten zum Monomerumsatz  $\chi_P$  (Gl. 4.13), sofern Übertragungsreaktionen ausbleiben und somit die Anzahl der aktiven und inaktiven Polymerketten  $[P]$  gleich bleibt.<sup>[47]</sup>

$$P_n = \frac{[M]_0 - [M]_t}{[P]} = \frac{[M]_0}{[P]} \chi_P \quad \text{Gl. 4.13}$$

Durch Auftragen von  $P_n$  gegen  $\chi_P$  (Abbildung 4.15) wird eine Gerade mit positiver Steigung erhalten. Dieses lineare Verhalten verliert durch auftretende Transferreaktionen verbunden mit einem Anstieg von  $[P]$  seine Gültigkeit.<sup>[46]</sup>

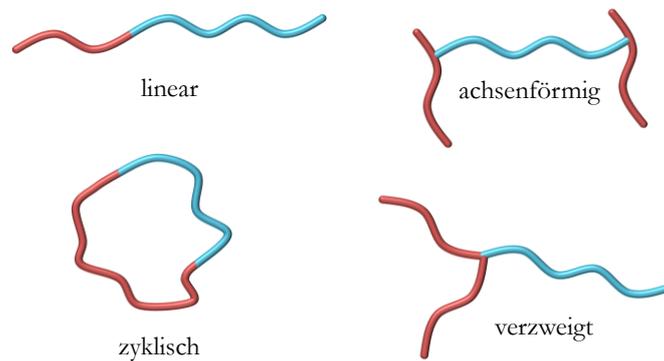


**Abbildung 4.15:** Die Auftragung des zahlenmittleren Polymerisationsgrads  $P_n$  gegen den Monomerumsatz  $X_p$  einer LAP ohne Übertragungsreaktionen ergibt eine Gerade mit positiver Steigung (aquamarin). Das Auftreten von Übertragungsreaktionen führt zu einem Anstieg der Anzahl aktiver und inaktiver Polymerketten  $[P]$  (Gl. 4.13), wodurch der lineare Bezug von  $P_n$  und  $X_p$  seine Gültigkeit verliert (rot).

Grundsätzlich erlaubt die LAP bei entsprechender Reaktionsführung eine schmale Größenverteilung bei gleichzeitiger Kontrolle des Polymerisationsgrades durch die Stöchiometrie der Reaktion, eine quantitative Endgruppenfunktionalisierung und die Darstellung von Blockcopolymeren durch sequenzielle Zugabe von Monomeren.<sup>[41]</sup>

#### 4.2.2 AMPHIPHILE DIBLOCKCOPOLYMERE

Eine Möglichkeit der Klassifizierung von Polymeren ist die Einteilung über die Zusammensetzung der Monomereinheiten. Hierbei wird zunächst die Anzahl verschiedener Monomerarten berücksichtigt, wonach Polymere aus einer Monomerart als Homopolymere, aus zwei Monomerarten als Copolymere und aus drei oder mehr Monomerarten als Terpolymere bezeichnet werden.<sup>[48]</sup> Bei den Copolymeren wird weiterhin nach alternierender, statistischer, gepfropfter oder blockförmiger Monomereinheitenzusammensetzung unterschieden.<sup>[49]</sup> Copolymere blockförmiger Zusammensetzung werden als Blockcopolymere bezeichnet, wobei durch den Präfix Di-, Tri- oder auch Multi- die Anzahl der zum Polymer beitragenden homogenen (aus einer Monomersorte bestehenden) Polymerblöcke beschrieben wird. Die Blöcke können dabei linear, H-förmig (achs-förmig), zyklisch oder auch verzweigt (sternförmig) miteinander verbunden sein.<sup>[36,50–53]</sup> In Abbildung 4.16 sind die möglichen Verknüpfungsarten von Blockcopolymeren schematisch dargestellt.



**Abbildung 4.16:** Schematische Darstellung der möglichen Verknüpfungsarten von Blockcopolymeren, wobei hier zwischen linearen Diblockcopolymeren, achsenförmigen Triblockcopolymeren, zyklischen Diblockcopolymeren und verzweigten Triblockcopolymeren unterschieden wird.

Durch gezieltes Arrangieren von Polymerblöcken mit inkompatiblen Mischverhalten der kovalent gebundenen Blöcke können Blockcopolymeren geschaffen werden, die sowohl hydrophile als auch hydrophobe Eigenschaften besitzen (Amphiphile) und bereits in der Polymerschmelze dazu neigen, Überstrukturen auszubilden. Außerdem kann durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels, das für einen der Blöcke ein Nichtlösungsmittel darstellt, die Ausbildung wohl definierter Überstrukturen gesteuert werden. Durch Lösen beispielsweise von amphiphilen Diblockcopolymeren in Wasser können somit gezielt Mizellen erzeugt werden.<sup>[54]</sup>

#### 4.2.3 LÖSLICHKEIT UND SELBSTORGANISATIONS-PROZESSE AMPHIPHILER DIBLOCKCOPOLYMERE

Die in der Polymerschmelze von Blockcopolymeren beobachtbare Ausbildung von Überstrukturen, bei denen Domänen aus gleichartigen Blöcken entstehen, wird als Mikrophasenseparation bezeichnet. Eine makroskopische Entmischung ist aufgrund der kovalent verknüpften Blöcke nicht möglich. Je nach Molekulargewicht des Blockcopolymeren können sich diese Domänen über 10 – 100 nm erstrecken.<sup>[55]</sup>

Durch das Herstellen von verdünnten Lösungen aus Blockcopolymeren tritt die Wechselwirkung der einzelnen Polymerblöcke mit dem Lösungsmittel für die Ausbildung von Überstrukturen in den Vordergrund. Der Löslichkeitsparameter  $\delta_h$  nach Hildebrand<sup>[56]</sup> kann einen Ansatz zur Beschreibung dieser Wechselwirkung bzw. des Lösungsverhaltens unterschiedlicher Polymerarten liefern. Dabei wird aus der nötigen Verdampfungswärme einer Flüssigkeit  $\Delta H_V$  pro Kubikzentimeter, der idealen Gaskonstanten  $R$ , der Temperatur  $T$  und des molaren Volumens

$V_{mol}$  die sogenannte Kohäsionsenergiedichte  $c$  erhalten, deren Quadratwurzel den Hildebrand-Löslichkeitsparameter ergibt (Gl. 4.14).

$$\delta_h = \sqrt{c} = \sqrt{\frac{\Delta H_V - RT}{V_{mol}}} \quad \text{Gl. 4.14}$$

Der Versuch einer Bestimmung der Verdampfungswärme eines Polymers würde für gewöhnlich eine thermische Zersetzung zur Folge haben, weshalb  $\delta_h$ -Werte für Polymer-Lösungsmittel-Systeme über das Quellverhalten bestimmt werden.<sup>[49]</sup> Die Mischbarkeit von Polymer und Lösungsmittel steigt nach Hildebrand mit zunehmend ähnlichen Löslichkeitsparametern. Der Hildebrand-Löslichkeitsparameter berücksichtigt jedoch nur Van-der-Waals-Wechselwirkungen, weshalb er auch als eindimensional angesehen wird. Um eine genauere Vorhersage für ein Löslichkeitsverhalten zu erzielen, schlug Hansen<sup>[57]</sup> die Einführung eines dreidimensionalen Löslichkeitsparameters  $\delta$  vor, der sich aus den Parametern für unpolare Dispersionskräfte  $\delta_d$ , Wasserstoffbrückenbindungen  $\delta_h$  und polare Dipolkräfte  $\delta_p$  zusammensetzt (Gl. 4.15).

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_h^2 + \delta_p^2 \quad \text{Gl. 4.15}$$

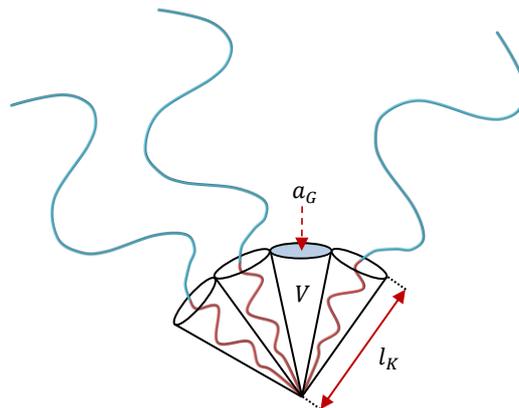
Löslichkeitsparameter werden heutzutage durch standardisierte Prozesse bestimmt und können durch iterative Berechnungen vorhergesagt werden.<sup>[58]</sup>

Durch die Wahl eines selektiven Lösungsmittels für einen der Blöcke eines amphiphilen Diblockcopolymer kommt es zur Assoziation der anderen inkompatiblen Blöcke und damit zur Selbstorganisation der Polymerstränge. Hierbei können sich je nach Zusammensetzung des Polymers unterschiedliche Überstrukturen (Mizellen) ausbilden, bei denen ein gequollener Kern durch eine flexible Hülle umgeben ist.<sup>[59]</sup> Allgemeine Voraussetzung für die Ausbildung von Mizellen ist dabei eine im Normalfall geringe Mindestkonzentration von amphiphilem Diblockcopolymer in einem blockselektiven Lösungsmittel, welche als kritische Mizellkonzentration (engl. „critical micelle concentration“, CMC) bezeichnet wird. Um eine Vorhersage über die Gestalt der zu erwartenden Überstrukturen eines Blockcopolymer-Lösungsmittel-Gemisches

zu ermöglichen, kann der von Israelachvili<sup>[60]</sup> für die Geometrie von Tensiden eingeführte Parameter  $P$  verwendet werden (Gl. 4.16).

$$P = \frac{V}{a_G l_K} \quad \text{Gl. 4.16}$$

Dieser sogenannte Packungsparameter ist im Fall eines amphiphilen Diblockcopolymers abhängig von dem Volumenbedarf  $V$  des hydrophoben Blocks, der Konturlänge  $l_K$  und dem Grenzflächenbedarf  $a_G$  zwischen hydrophobem und hydrophilem Block. In der folgenden Abbildung 4.17 wird der Einfluss des Packungsparameters auf die Krümmung einer Überstruktur schematisch dargestellt.



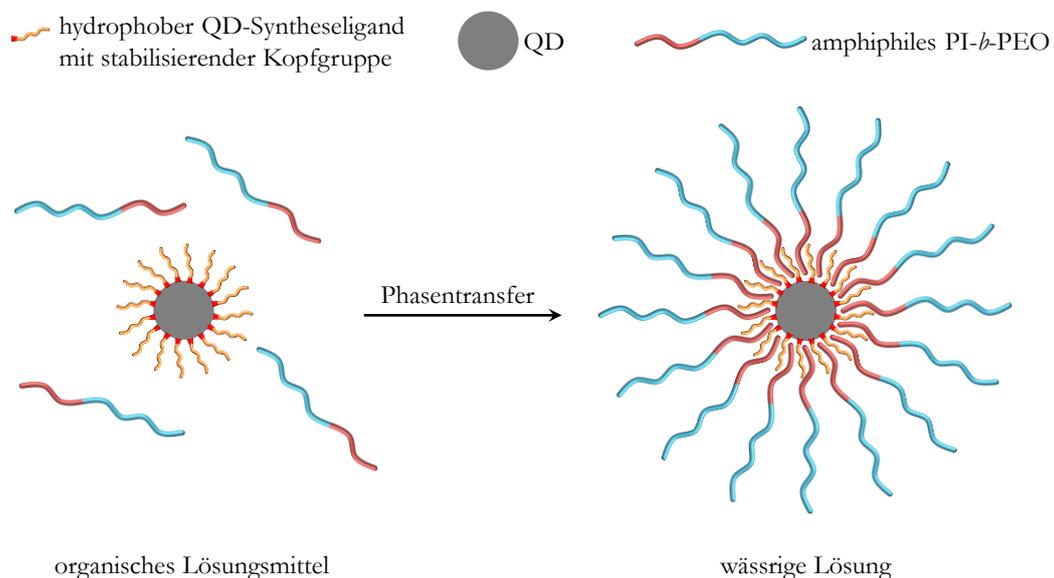
**Abbildung 4.17:** Schematische Darstellung der, vom Packungsparameter abhängigen, Oberflächenkrümmung einer Überstruktur aus amphiphilen Diblockcopolymeren. Das Zusammenspiel aus Grenzflächenbedarf  $a_G$ , Volumenbedarf des hydrophoben Blocks  $V$  und Konturlänge  $l_K$  bestimmt den jeweiligen Packungsparameter  $P$  (Gl. 4.16).

Je nachdem, welchen Wert der Packungsparameter annimmt, kann die Bildung beispielsweise von sphärischen Mizellen ( $P \leq \frac{1}{3}$ ), zylindrischen Mizellen ( $\frac{1}{3} \leq P \leq \frac{1}{2}$ ) oder auch Polymersomen ( $\frac{1}{2} \leq P \leq 1$ ) vorhergesagt werden.<sup>[61]</sup> Eine weitere wichtige Größe, die einen Einfluss auf die Gestalt der Mizellen besitzt, ist das Verhältnis vom Gewichtsanteil des hydrophilen Blocks zum Polymerisationsgrad des hydrophoben Blocks.<sup>[62–65]</sup> Dabei konnte beispielsweise anhand des amphiphilen Polybutadien-*block*-Polyethylenoxids (PB-*b*-PEO) gezeigt werden, dass sich ab einem Gewichtsanteil des PEO-Blocks von etwa 50 % sphärische Mizellen ausbilden. Bei

Gewichtsanteilen zwischen 50 – 40 % wurden hauptsächlich zylindrische Mizellen beobachtet und bei <40 % ging die mizellare Gestalt in Polymersomen über.

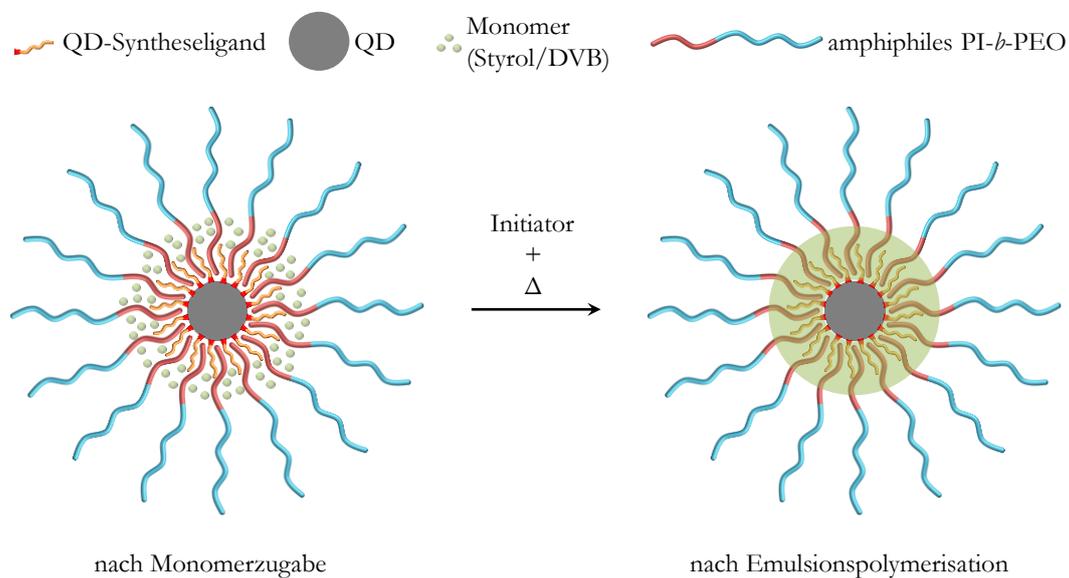
#### 4.2.4 PHASENTRANSFER VON QUANTUM DOTS UND EMULSIONSPOLYMERISATION

Die Erforschung biochemischen Verhaltens von Nanopartikeln setzt in der Regel eine Wasserlöslichkeit voraus.<sup>[2,3,66]</sup> Die hydrophoben Eigenschaften von Quantum Dots, die auf Verwendung langkettiger stabilisierender Liganden bei Hochtemperatursynthesen basieren,<sup>[22,34]</sup> verbieten jedoch einen direkten Einsatz in wässrigen physiologischen Milieus. Durch einen Transfer der QDs aus geeignetem organischem Lösungsmittel, unter Verwendung von amphiphilen Diblockcopolymeren, kann eine Löslichkeit in Wasser hergestellt werden. Untersuchungen der Gruppe Weller konnten zeigen, dass sich das amphiphile PI-*b*-PEO sehr gut für diesen Phasentransferprozess eignet.<sup>[35–37]</sup> Die Polyisoprenblöcke (PI) bilden dabei die hydrophoben Kerne aus, in denen die QDs über die Syntheseliganden gelöst sind, während die Polyethylenoxidblöcke (PEO) nach außen ragen und im Wasser gelöst sind. Das PI-*b*-PEO fungiert somit als Emulgator. In der folgenden Abbildung 4.18 wird der Phasentransferprozess schematisch dargestellt.



**Abbildung 4.18:** Schematische Darstellung eines Phasentransfers von Quantum Dots aus organischem Lösungsmittel in Wasser unter Verwendung eines amphiphilen Diblockcopolymeren (PI-*b*-PEO). Die hydrophoben PI-Blöcke (rot) bilden den Kern, in dem die QDs über ihre hydrophoben Syntheseliganden gelöst sind, wohingegen die hydrophilen PEO-Blöcke (aquamarin) nach außen ragen.

Bei diesem Verfahren können auch mehrere QDs in einer Mizelle eingeschlossen werden. Durch Einstellen des Überschusses an PI-*b*-PEO kann zwischen einfach und mehrfach beladenen Mizellkernen variiert werden.<sup>[37,67]</sup> Um eine hohe Verdünnungsstabilität der Mizellen zu erreichen und den Schutz der Quantum Dots vor Quenchern aus dem wässrigen Milieu zu erweitern, kann nach dem Phasentransfer eine (radikalische) Emulsionspolymerisation (EP) angeschlossen werden, wobei Styrol und Divinylbenzol (DVB) als Monomere dienen können.<sup>[37,67]</sup> Im ersten Schritt werden dabei die hydrophoben Monomere der wässrigen Phase zugeführt, woraufhin sie sich in den Mizellkernen ansammeln. Durch Zugabe von wasserlöslichem Initiator und Erwärmen wird im zweiten Schritt ein vernetztes Styrol-Divinylbenzol-Copolymer im Mizellkern erzeugt. Hierbei wird aufgrund einer gewissen Restlöslichkeit des Monomers in Wasser die Polymerisation außerhalb des Mizellkerns initiiert. Die entstehenden Oligomere besitzen eine weiter herabgesetzte Löslichkeit in Wasser, diffundieren in die Mizellkerne und polymerisieren dort aus. Die Menge an Monomer allgemein steuert dabei die Größe der Konstrukte und die Menge an DVB den späteren Vernetzungsgrad.<sup>[68]</sup> Die folgende Abbildung 4.19 zeigt schematisch den Ablauf einer Emulsionspolymerisation nach erfolgtem Phasentransfer von QDs unter Einsatz von PI-*b*-PEO.



**Abbildung 4.19:** Schematische Darstellung einer Emulsionspolymerisation im Anschluss an den Phasentransfer von QDs unter Verwendung von PI-*b*-PEO. Die Monomere Styrol und DVB (grüne Punkte) reichern sich nach Zugabe im hydrophoben Mizellkern an. Durch Initiatorbeigabe und Erwärmen startet die Emulsionspolymerisation durch eine Restlöslichkeit des Monomers außerhalb der Mizellen, wobei Oligomere entstehen, deren zunehmend weiter herabgesetzte Löslichkeit zum Eindiffundieren in die Mizellen führen. Dadurch wird ein Styrol-DVB-Copolymer (grün) erzeugt, welches als erweiterte Schutzhülle dient.

Bereits durch die Verwendung von PI-*b*-PEOs von verhältnismäßig kleiner molarer Masse ( $\approx 5000$  g/mol) kann nach Phasentransfer der QDs eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenzstabilität gegenüber Quenchern wie Kupfer(II)ionen erreicht werden.<sup>[36]</sup> Die Ausbildung von vernetzten, engmaschigen Copolymerkapseln um die QDs führt durch die Emulsionspolymerisation, selbst in Gegenwart hoher Quencherkonzentrationen, insgesamt zu sehr stabilen optischen Eigenschaften.<sup>[37]</sup> Diese außergewöhnliche Stabilität derart verkapselter QDs erlaubt beispielsweise den Einsatz in einem breiten Spektrum von pH-Pufferlösungen mit physiologischen Konzentrationen.

## 5 ZIELSETZUNG UND KONZEPTION

In den folgenden Absätzen werden die drei Hauptaspekte: Quantum Dots in FRET-Systemen, nicht fluoreszierende Akzeptoren und pH-Responsivität, die zur Zielsetzung der Arbeit geführt haben, näher erläutert. Anschließend werden Überlegungen zur Umsetzung aufgezeigt.

Der Förster-Resonanzenergietransfer wird bereits seit vielen Jahrzehnten erforscht und unter anderem zur Bestimmung von Distanzen in biochemischer Umgebung oder zur Darstellung von subzellulären Prozessen *in vitro* genutzt.<sup>[14,33,69]</sup> Dabei werden für gewöhnlich Donor-Akzeptor-Paare auf Basis von organischen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet.<sup>[13,15,33]</sup> Durch ihre überlegenen optischen Eigenschaften scheinen aber besonders Quantum Dots für einen Einsatz in FRET-Systemen prädestiniert zu sein. Hierbei sind vor allem die enorme Photostabilität, die hohen Extinktionskoeffizienten, verbunden mit breiten Absorptionsbanden, und die engen Emissionsbanden hervorzuheben.<sup>[24,70]</sup> Dies erlaubt den Einsatz über lange Zeiträume, das simultane Anregen verschiedener QD-Spezies und die parallele Detektion (Multiplexing), sogar von einzelnen Kristallen. Darüber hinaus können Quantum Dots verhältnismäßig lange Fluoreszenzabklingzeiten besitzen, weshalb QD-FRET-Systeme auch für die Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie geeignet sind.<sup>[8]</sup>

Bei bereits publizierten FRET-Systemen auf QD-Basis dienen, analog zu den etablierten<sup>[13,15,33]</sup> Systemen, für gewöhnlich Fluorophore als Akzeptoren, wobei als solche sowohl organische Farbstoffe<sup>[8,16,71]</sup> als auch Quantum Dots<sup>[72]</sup> eingesetzt werden. Bei Verwendung derartiger FRET-Paare kann es allerdings neben der Anregung des Donors auch zur Anregung des Akzeptors kommen. Als Resultat kann ein Teil der Fluoreszenzintensität des Akzeptors nicht auf den FRET zurückgeführt werden, was die Präzision eines solchen Systems beeinträchtigt. Darüber hinaus ist die Fluoreszenzintensität von Quantum Dots bei Anwendung in physiologischem Milieu häufig nicht konstant oder genau reproduzierbar. Je nach Präparation beim Phasentransfer und auch späterer Quencherkonzentration kann es zu unterschiedlich stark ausgeprägten, unwillkommenen Lösprozessen der Quantum Dots kommen.<sup>[36,37]</sup> Dabei liegt allerdings überwiegend statisches oder gemischtes Quenching vor, was die Fluoreszenzabklingzeit der QDs nicht oder nur in verhältnismäßig geringem Maße betrifft. Beim Förster-Resonanzenergietransfer handelt es sich um einen dynamischen Quenchingprozess, bei dem nicht nur die Fluoreszenzintensität, sondern im gleichen Verhältnis auch die Fluoreszenzabklingzeit abnimmt. Daher ist ein denkbarer Lösungsansatz die Verwendung eines nicht fluoreszierenden Akzeptors, der unerwünschte Anregung bei gleichzeitiger Detektion des FRET über die Abnahme der Fluoreszenzabklingzeit ausschließt.

Um einen nachhaltigen Erkenntnisgewinn bei physiologischen Untersuchungen sicherzustellen, bieten sich minimal- oder nicht-invasive Methoden an, wodurch Prozesse auf subzellulärer Ebene möglichst gut dargestellt werden können ohne sie direkt zu beeinflussen. Daher ist es von Vorteil möglichst viele Parameter aus einem einzigen nanoskopischen Sensor im physiologischen Milieu auslesen zu können. Eine wichtige Kenngröße der Umgebung in Geweben und Zellen ist der pH-Wert. Durch den Einsatz organischer Fluorophore konnten bereits Veränderungen des pH-Werts auf zellulärer Ebene dargestellt werden.<sup>[73-75]</sup> Bei Verwendung von pH-Indikatoren als Akzeptoren für FRET-Systeme, kann, durch die pH-abhängige Lage der Absorptionsbanden, ein Einfluss auf das Überlappungsintegral des FRET-Paares und somit auf die Transfereffizienz ausgeübt werden. Daher bieten derartige FRET-Systeme, neben einfachem Targeting, die Möglichkeit als pH-Sensor zu fungieren. Hierzu existieren bereits erste Ansätze mit FRET-Paaren aus Quantum Dots und fluoreszierenden pH-Indikatoren.<sup>[76-78]</sup>

Unter Berücksichtigung der hier im Vorfeld besprochenen Aspekte, ergab sich als Ziel der vorliegenden Arbeit: die Darstellung eines QD-FRET-Systems mit nicht fluoreszierenden pH-Indikatorfarbstoffen als Akzeptoren für den Einsatz im physiologischen Milieu.

Da als Donor möglichst fluoreszenzstabile QDs benötigt werden, kamen nur Kern-Schale-Partikel in Betracht.<sup>[23-25]</sup> Der Phasentransfer der QDs sollte über ein etabliertes Verfahren, das auf dem Einsatz des amphiphilen Diblockcopolymer Polyisopren-*b*-Polyethylenoxid basiert, erfolgen.<sup>[35-37]</sup> Das in diesem Fall als Emulgator dienende PI-*b*-PEO besitzt nicht nur exzellente Eigenschaften als Phasentransferreagenz und stellt eine Schutzhülle gegen Quencher dar, sondern ist nicht toxisch und zeigt durch den PEO-Block ein sogenanntes „Stealth“-Verhalten.<sup>[79,80]</sup> Diese Eigenschaft bedingt, dass die unspezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen minimiert werden, was insbesondere in Hinblick auf eine physiologische Anwendung von Interesse ist. Das PI-*b*-PEO sollte eine geringe Molmassenverteilung aufweisen und daher über eine LAP synthetisiert werden, damit beim Phasentransfer möglichst homogene Überstrukturen ausgebildet werden können, die eine intakte Schutzhülle für die QDs darstellen.

Um den FRET-Abstand einzustellen, sollten PIs spezifischer Größe synthetisiert werden und der pH-Indikatorfarbstoff später an einer bestimmten Position des PI-*b*-PEOs aufgebaut werden. Durch die mizellare Überstruktur ergibt sich dabei nach Phasentransfer automatisch ein bestimmter Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Mittels Abmischungen von farbstofffunktionalisiertem und nichtfunktionalisiertem PI-*b*-PEO kann, aufgrund einer statistischen Verteilung bei der Mizellbildung, die Menge an Akzeptoren pro Donor variiert werden.

Durch den Einsatz maßgeschneiderter Abbruchreagenzien auf Epoxid-Basis<sup>[44]</sup> sollte bei einer gezielten Endgruppenfunktionalisierung, während der Synthese des PI-*b*-PEOs, eine funktionelle Gruppe eingeführt werden. Diese erlaubt es im Anschluss, unter Berücksichtigung der Kriterien für geeignete FRET-Paare, einen Farbstoffaufbau an designierter Position durchzuführen.

Die optischen Eigenschaften der pH-responsiven QD-FRET-Sensoren sollten nach Möglichkeit selbst bei hohen Quencherkonzentrationen erhalten bleiben, um sowohl Experimente in einer großen Bandbreite von pH-Puffern als auch im physiologischen Milieu zu ermöglichen. Dazu sollte nach Phasentransfer der QDs eine Emulsionspolymerisation durchgeführt werden, um eine schützende Kapsel aus Styrol-Divinylbenzol-Copolymer im Kern der Mizelle zu erzeugen.<sup>[37]</sup>



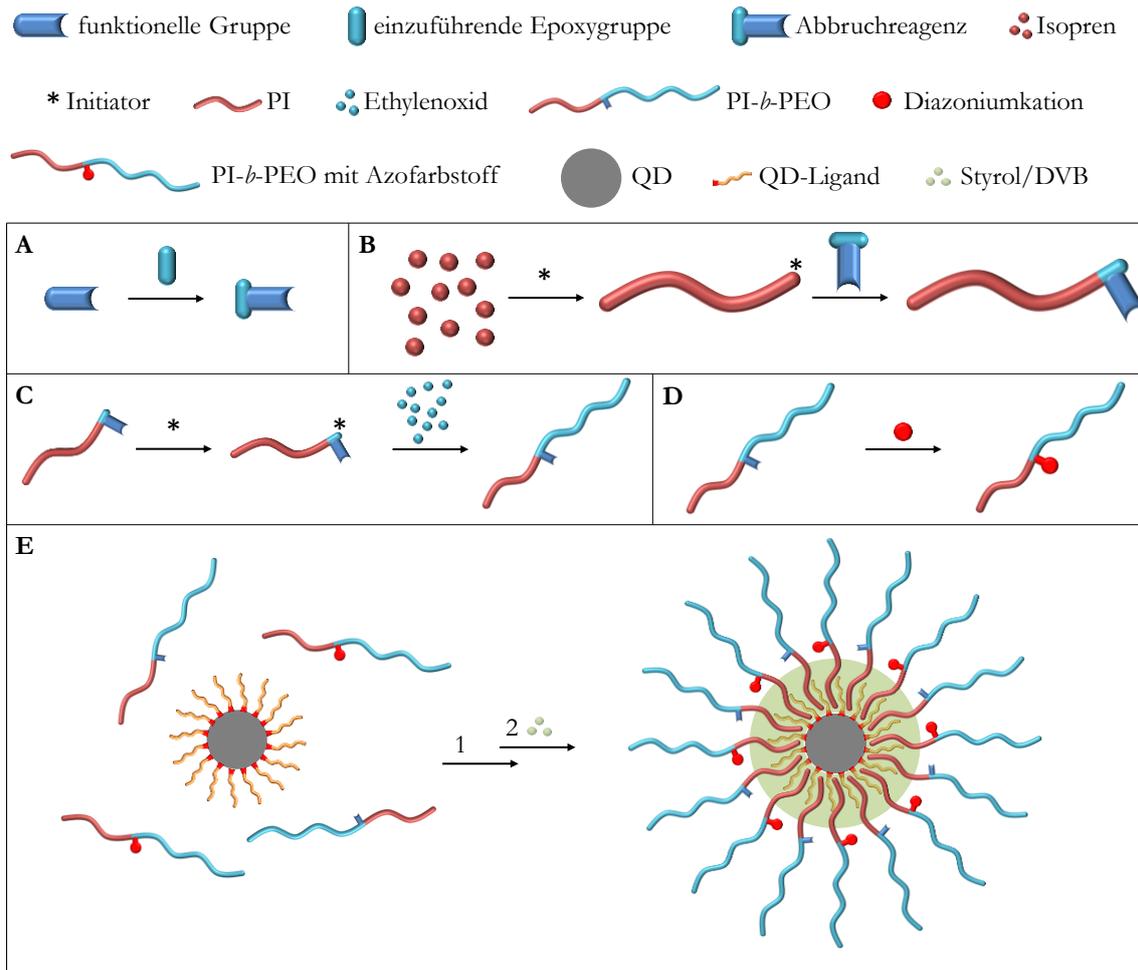
## 6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In diesem Kapitel wird die erfolgreiche Darstellung und Untersuchung von pH-responsiven Quantum-Dot-FRET-Sensoren beschrieben. Dazu werden im ersten Abschnitt die durchgeführten Synthesen der Abbruchreagenzien, Polymere und Farbstoffe sowie die Auswahl geeigneter Komponenten für den Phasentransfer der Quantum Dots und die anschließende Emulsionspolymerisation erläutert (→6.1). Der zweite Abschnitt beinhaltet zum einen die optische Untersuchung der Quantum-Dot-FRET-Sensoren und zum anderen ein physiologisches *in vitro* Experiment (→6.2).

### 6.1 SYNTHESEN, KOMPONENTENAUSWAHL UND VERKAPSELUNG

Im folgenden Absatz wird das sukzessive Vorgehen zur Erlangung der QD-FRET-Sensoren kurz beschrieben und in Abbildung 6.1 schematisch dargestellt.

Um eine gezielte Endgruppenfunktionalisierung bei der Polymersynthese vornehmen zu können, wurden als Erstes die Abbruchreagenzien *N*-Glycidyl-*N*-methylanilin (→Abbildung 6.2) und 2-(2-(1-Ethoxyethoxy)benzyl)oxiran (→Abbildung 6.3) synthetisiert (**A**). Anschließend konnten die, als Phasentransferreagenz vorgesehenen, amphiphilen PI-*b*-PEOs mit designierter Farbstofffunktionalisierungsposition jeweils in einer zweistufigen LAP (→4.2.1) dargestellt werden (**B**, **C**). Dabei wurde stets unter Argon-Atmosphäre und Ausschluss von Feuchtigkeit gearbeitet (→8.4.1). Als Nächstes wurden die pH-Indikator-Azofarbstoffe am PI-*b*-PEO aufgebaut (**D**). Danach konnten die pH-responsiven Quantum-Dot-FRET-Sensoren in einem zweistufigen Verkapselungsprozess (→4.2.4) hergestellt werden (**E**). Dabei erfolgte zunächst ein Phasentransfer mit einer Abmischung aus Farbstoff-funktionalisiertem und nicht-funktionalisiertem PI-*b*-PEO als Emulgator und im Anschluss eine Emulsionspolymerisation mit Styrol und Divinylbenzol als Monomere. Die so erhaltene Lösung verkapselter QD-FRET-Sensoren wurde abschließend noch durch Dichtegradientenzentrifugation von leeren Mizellen befreit.



**Abbildung 6.1:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Erlangung von pH-responsiven QD-FRET-Sensoren. **A** Zuerst erfolgt die Synthese eines Abbruchreagenzes mit funktioneller Gruppe zum Farbstoffaufbau durch Einführen einer Epoxygruppe bzw. Erzeugen eines Oxirans. **B** Anschließend kann die Synthese von PI mit gezielter Endgruppenfunktionalisierung durchgeführt werden. **C** Als Nächstes folgt die Synthese von PI-*b*-PEO mit designierter Funktionalisierungsposition. **D** Im Anschluss wird der als FRET-Akzeptor dienende pH-Indikatorfarbstoff am PI-*b*-PEO aufgebaut. **E** Danach wird im ersten Schritt der Phasentransfer von QDs mit Abmischungen von Farbstoff-funktionalisiertem und nicht-funktionalisiertem PI-*b*-PEO durchgeführt, gefolgt von einer Emulsionspolymerisation zur Erzeugung einer Styrol-DVB-Copolymerkapsel.

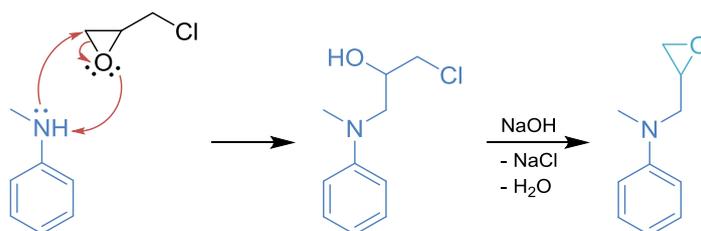
### 6.1.1 SYNTHESE VON ABRUCHREAGENZEN MIT SPEZIFISCHER FUNKTION

Die Abbruchreagenzien sollten bei der Isoprenpolymerisation zur Endgruppenfunktionalisierung eingesetzt werden, um eine designierte Aufbauposition für die pH-Indikatorfarbstoffe zu schaffen. Dabei sollte eine Methylanilinfunktion für den Aufbau von Azofarbstoffen und eine Phenolfunktion zum potentiellen Aufbau von Triphenylmethanfarbstoffen eingeführt werden. Beide Abbruchreagenzien wurden als Oxirane dargestellt, um bei Anwendung zusätzlich eine Hydroxyfunktion als Startpunkt für die Ethylenoxidpolymerisation in das PI-Molekül einzubringen. Nach erfolgter Synthese wurden die Abbruchreagenzien über aktiviertem Molsieb 4 Å und unter Argon-Atmosphäre trocken gelagert, da Wasserreste bei der anionischen

Polymerisation zu unspezifischen Abbrüchen führen, die den Endgruppenfunktionalisierungsgrad des PIs mindern.

#### 6.1.1.1 SYNTHESE VON *N*-GLYCIDYL-*N*-METHYLANILIN

Die Darstellung des Methylanilinoxirans *N*-Glycidyl-*N*-methylanilin erfolgte nach Eisleb<sup>[81]</sup> und Davies<sup>[82]</sup> ausgehend von Methylanilin und Epichlorhydrin. In Abbildung 6.2 wird das Reaktionsschema dieser zweistufigen Synthese gezeigt. Das freie Elektronenpaar am Stickstoff des Methylanilins greift im ersten Schritt in einer  $S_N2$ -Reaktion den äußeren Kohlenstoff der Epoxygruppe des Epichlorhydrins unter Ringöffnung an, während der Sauerstoff das Proton am Stickstoff abstrahiert. Durch Zugabe von NaOH kommt es im zweiten Schritt unter Eliminierung von HCl zum Ringschluss.



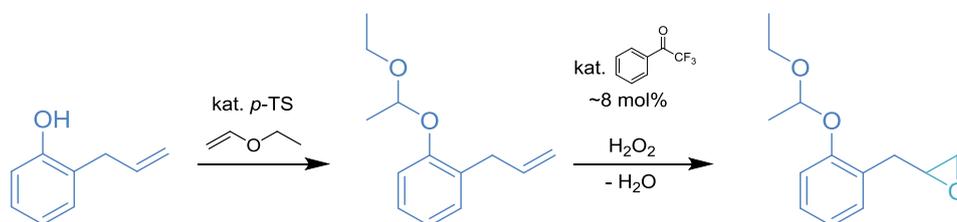
**Abbildung 6.2:** Reaktionsschema der zweistufigen Darstellung von *N*-Glycidyl-*N*-methylanilin aus Methylanilin und Epichlorhydrin. Im ersten Schritt kommt es in einer  $S_N2$ -Reaktion, unter Ringöffnung, zum nukleophilen Angriff des Methylanilins am Epoxidring des Epichlorhydrins. Im zweiten Schritt erfolgen dann durch Zugabe von NaOH der Ringschluss und die Eliminierung von HCl.

Nach erfolgreicher Synthese wurde das Rohprodukt destilliert und das erhaltene, bei Raumtemperatur flüssige, *N*-Glycidyl-*N*-methylanilin trocken gelagert und per Kernspinresonanzspektroskopie (engl. „*nuclear magnetic resonance*“, NMR) charakterisiert (→8.4.3).

#### 6.1.1.2 SYNTHESE VON 2-(2-(1-ETHOXYETHOXY)BENZYL)OXIRAN

Bei der Darstellung von 2-(2-(1-Ethoxyethoxy)benzyl)oxiran wurde von 2-Allylphenol ausgegangen. Das Reaktionsschema der zweistufigen Synthese wird in Abbildung 6.3 dargestellt. Um eine Deprotonierung der Hydroxygruppe und damit einen unspezifischen Abbruch bei der Verwendung als Abbruchreagenz zu verhindern, wurde zunächst eine Ethoxyethyl- oder auch Acetalschutzgruppe eingeführt. Dazu wurde das 2-Allylphenol mit Ethylvinylether und kata-

lytischen Mengen *p*-Toluolsulfonsäure umgesetzt. Anschließend wurde eine Epoxidierung der Doppelbindung nach Limnios<sup>[83]</sup> mit Wasserstoffperoxid und unter Einsatz von etwa 8 mol% katalytisch aktivem 2,2,2-Trifluoracetophenon durchgeführt.



**Abbildung 6.3:** Reaktionsschema der zweistufigen Synthese von 2-(2-(1-Ethoxyethoxy)benzyl)oxiran. Der erste Schritt stellt das Einführen einer Ethoxyethyl-Schutzgruppe durch Einsatz von Ethylvinylether und katalytischen Mengen *p*-Toluolsulfonsäure dar. Im zweiten Schritt folgt die Epoxidierung der Doppelbindung mit Wasserstoffperoxid, wobei 2,2,2-Trifluoracetophenon als Katalysator dient.

Nach der Epoxidierung wurde das Rohprodukt, analog zum Methylanilinoxiran aus dem vorangegangenen Abschnitt, destilliert und das erhaltene, bei RT flüssige, 2-(2-(1-Ethoxyethoxy)benzyl)oxiran per NMR charakterisiert ( $\rightarrow$ 8.4.4) und trocken gelagert.

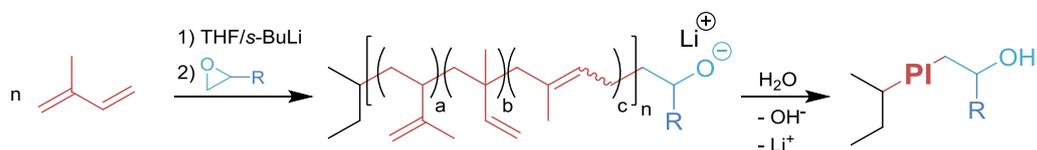
### 6.1.2 SYNTHESE DER FUNKTIONALISIERTEN POLYISOPREN-*b*-POLYETHYLENOXIDE

Beide Blöcke der amphiphilen Diblockcopolymere für den Phasentransfer der Quantum Dots wurden mittels Lebender Anionischer Polymerisation ( $\rightarrow$ 4.2.1) hergestellt. Diese Methode erlaubt eine enge Größenverteilung, ein einstellbares Molekulargewicht und die gezielte Endgruppenfunktionalisierung, die hier im Hinblick auf die nachfolgende Darstellung der Akzeptorfunktionen an den Diblockcopolymeren von besonderem Interesse ist. Die enge Größenverteilung soll beim Phasentransfer die Ausbildung intakter homogener Überstrukturen gewährleisten und die Kontrolle über das Molekulargewicht eine Variation im FRET-Abstand ermöglichen. Zunächst wurden die hydrophoben Polyisoprene hergestellt ( $\rightarrow$ 6.1.2.1) und an diese im Anschluss die hydrophilen Polyethylenoxid-Blöcke polymerisiert ( $\rightarrow$ 6.1.2.2).

#### 6.1.2.1 SYNTHESE DER FUNKTIONALISIERTEN POLYISOPRENE

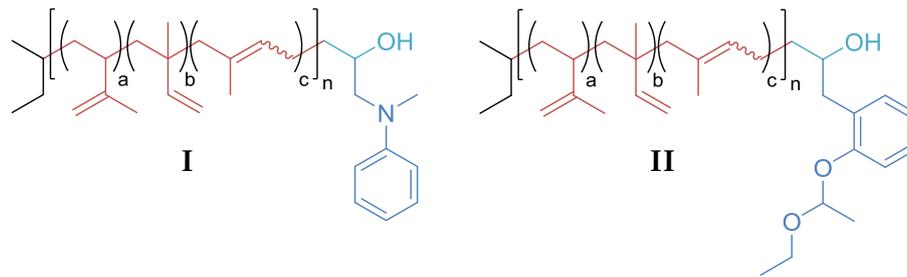
Die dargestellten Polyisoprene wurden unter Verwendung von trockenem Isopren ( $\rightarrow$ 8.2.1) und bei LAP-Standardreaktionsbedingungen ( $\rightarrow$ 8.4.1) unter Schutzgasatmosphäre, Ausschluss von Verunreinigungen bzw. Feuchtigkeit und bei tiefen Temperaturen ( $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hergestellt, um

unerwünschte Abbrüche zu vermeiden. Ein allgemeines Reaktionsschema der durchgeführten Polymerisationen von Isopren wird in Abbildung 6.4 dargestellt. Durch das Verhältnis der Anzahl an Monomereinheiten  $n$  zum Initiator *s*-Butyllithium wurde jeweils die gewünschte Blocklänge eingestellt. Die Synthesen wurden in zuvor getrocknetem ( $\rightarrow$ 8.2.5) THF durchgeführt, welches ausgezeichnete Lösungsmittleigenschaften für die Monomere und die dargestellten Polymere, selbst bei niedrigen Temperaturen von  $<-80$  °C, besitzt. Darüber hinaus kann durch die Verwendung von THF die Mikrostruktur des resultierenden Polymers gesteuert werden, wodurch ein Verknüpfungsverhältnis der Isopreneinheiten von etwa 60 % 3,4- zu 30 % 1,2- zu 10 % 1,4-Verknüpfungen erreicht werden konnte.<sup>[43]</sup> Aus sterischer Sicht begünstigen die nach außen stehenden Doppelbindungen (bei 3,4- und 1,2-Verknüpfungen) eine Vernetzung mit dem Styrol-DVB-Copolymer bei der späteren radikalischen Emulsionspolymerisation ( $\rightarrow$ 6.1.5). Die zuvor dargestellten Oxirane ( $\rightarrow$ 6.1.1) dienen als Abbruchreagenzien bzw. zur gezielten Endgruppenfunktionalisierung. Durch die Anwesenheit des Lithiumkations, das durch den Initiator in die Reaktion eingebracht wurde, kommt es dabei zur Ausbildung eines Lithiumalkoxyat-Kontaktenpaars, wodurch jeweils nur eine Einheit addiert wird.<sup>[44]</sup> Abschließend erfolgte zum Protonieren lediglich die Zugabe von Wasser, was besonders im Hinblick auf die Säureempfindliche Schutzgruppe als geeignet erschien.



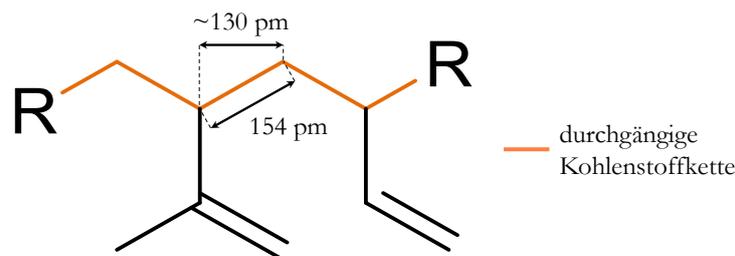
**Abbildung 6.4:** Reaktionsschema der Polymerisation von Isopren mittels LAP. Als Initiator dient *s*-Butyllithium und als Lösungsmittel THF, was eine überwiegende 3,4- und 1,2-Verknüpfung (a, b) der  $n$  Isopreneinheiten zur Folge hat. Als Abbruchreagenz dient ein Oxiran, wodurch ein starkes Lithiumalkoxyat-Kontaktenpaar entsteht und somit nur eine Einheit addiert wird. Abschließend erfolgt die Protonierung des Sauerstoffs durch Wasserzugabe.

Die Strukturen der Polyisoprene mit Methylanilinfunktion (**I**) und mit geschützter Phenolfunktion (**II**), die durch den Einsatz von *N*-Glycidyl-*N*-methylanilin und 2-(2-(1-Ethoxyethoxy)-benzyl)oxiran zur Endgruppenfunktionalisierung erhalten wurden, werden in Abbildung 6.5 vergleichend dargestellt.



**Abbildung 6.5:** Vergleich der Strukturen der synthetisierten Polyisoprene mit Methylanilinfunktion (**I**) und mit Acetal-geschützter Phenolfunktion (**II**).

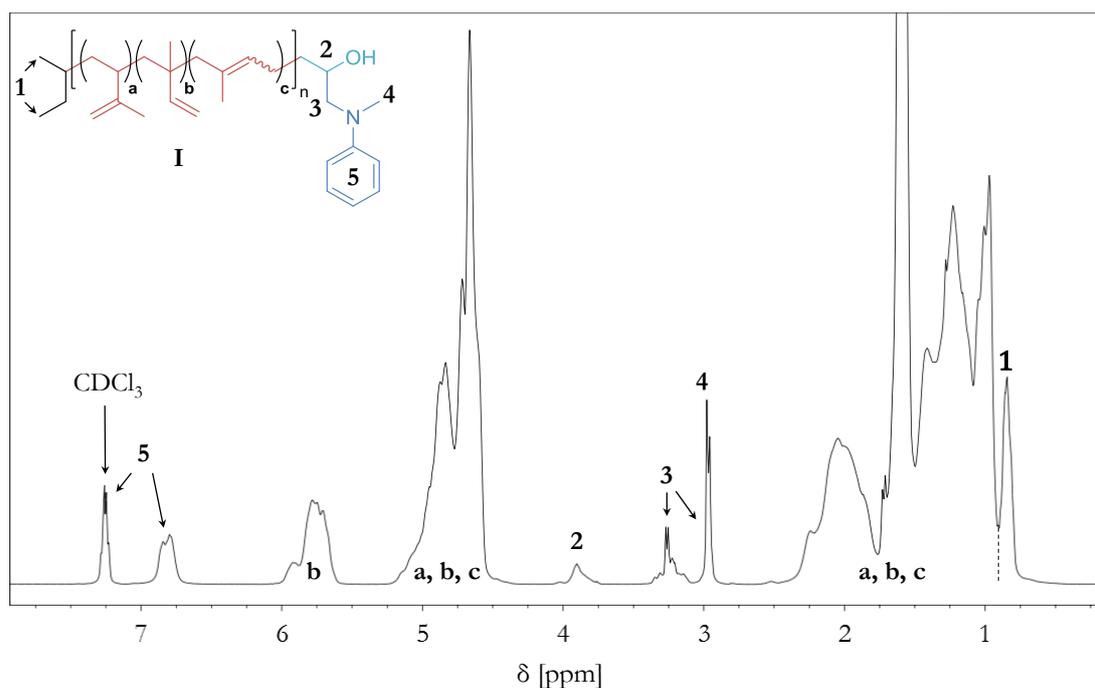
Die Größenbestimmung der Polyisoprene erfolgte sowohl durch Gelpermeationschromatographie (GPC) als auch per NMR. Aus dem Verhältnis der Integrale der Polymer- und Initiatorbanden, lässt sich mittels NMR eine relativ genaue Aussage zur erzielten Größe des Polymers treffen, da bei einer LAP nahezu von Monodispersität bei der Molmassenverteilung der erzeugten Polymere ausgegangen werden kann. Das PI mit Methylanilinfunktion wurde in zwei unterschiedlichen Größen dargestellt ( $\rightarrow$ 8.4.6.1,  $\rightarrow$ 8.4.6.2). Die Größenbestimmung per NMR ergab dabei:  $M_{NMR} \approx 1300$  g/mol und  $M_{NMR} \approx 2600$  g/mol, was bei den eingesetzten Monomer- und Initiatorkonzentrationen den Erwartungen entsprach. Für die zahlengewichteten Molmassen wurden per GPC  $M_N = 1314$  g/mol ( $M_N$ ) und  $M_N = 3556$  g/mol erhalten. Bei dem größeren PI zeigt sich somit eine deutliche Abweichung zwischen den per NMR und GPC bestimmten Molmassen. Dies wird auf das Ausweichen auf ein GPC-Ersatzgerät im Laufe dieser Arbeit zurückgeführt, bei dem ein anderer Standard verwendet wurde ( $\rightarrow$ 8.3.2). Im weiteren Verlauf wird daher von der per NMR ermittelten Molmasse ausgegangen, wodurch sich mit einer molaren Masse des Isoprens von 68,12 g/mol rund 19 bzw. 38 verknüpfte Monomereinheiten ergeben. Durch die überwiegenden 3,4- und 1,2-Verknüpfungen liegen hauptsächlich C-C-Bindungen erster Ordnung in der durchgängigen Kohlenstoffkette des Polymers vor, die eine Bindungslänge von 154 pm<sup>[19]</sup> aufweisen (Abbildung 6.6). Unter Berücksichtigung der Winkel bei einer  $sp^3$ -Hybridisierung und eines ideal gestreckten PI-Blocks trägt jede dieser C-C-Bindungen etwa 130 pm zur Gesamtlänge des PIs bei. Daraus ergeben sich gestreckte Blocklängen von circa 5 nm ( $M_{NMR} \approx 1300$  g/mol) und 10 nm ( $M_{NMR} \approx 2600$  g/mol).



**Abbildung 6.6:** Bindungslänge (154 pm) der überwiegenden C-C-Bindungen erster Ordnung in der durchgängigen Kohlenstoffkette des PIs und effektiver Beitrag zur Gesamtlänge bei ideal gestrecktem Block.

Die Bestimmung der Polydispersitäten mittels GPC ergab  $M_w/M_N = 1,076$  ( $\approx 1300$  g/mol) und  $M_w/M_N = 1,114$  ( $\approx 2600$  g/mol) für die beiden PIs mit Methylanilinfunktion, was die erwartete enge Molmassenverteilung widerspiegelt.

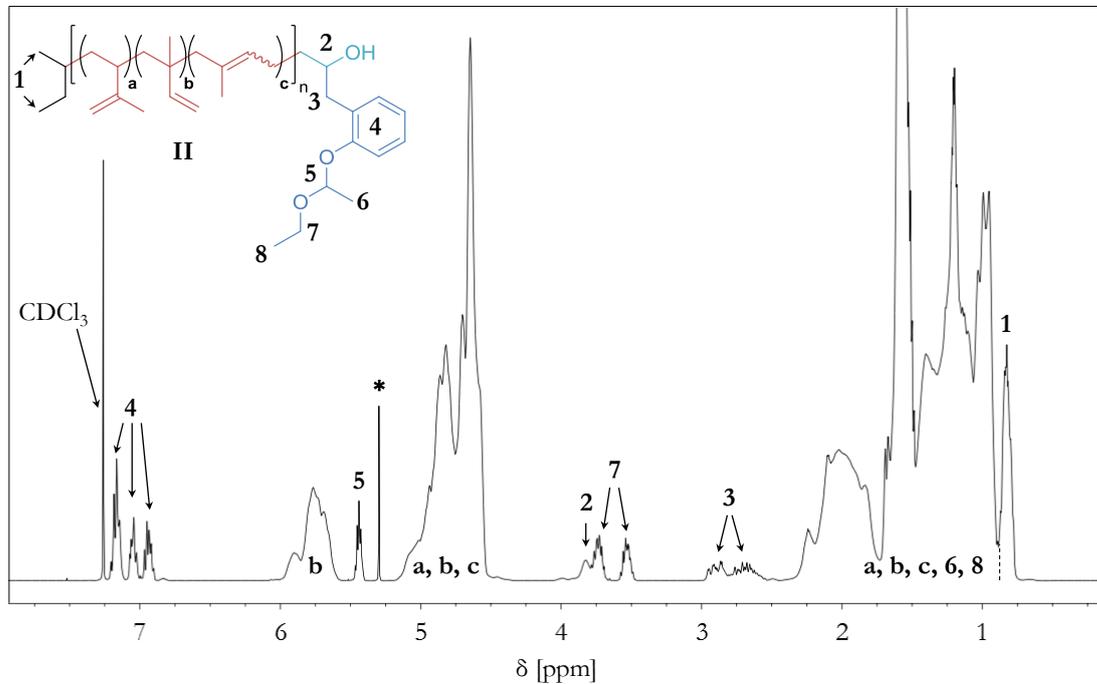
Darüber hinaus konnte nach NMR-spektroskopischer Analyse, wobei jeweils das Verhältnis der Polymerbanden-Integrale zu den Banden-Integralen der jeweiligen funktionellen Gruppe untersucht wurde, eine vollständige Funktionalisierung mit Methylanilin angenommen werden. Da die Spektren der beiden PIs mit Methylanilinfunktion sehr ähnlich sind, wird in Abbildung 6.7 exemplarisch das NMR-Spektrum vom PI mit  $M_{NMR} \approx 1300$  g/mol gezeigt. Dabei beschreiben die Multipletts bei 7,39 – 7,19 ppm (überlagert mit  $CDCl_3$ -Signal) und 6,98 – 6,65 ppm die Signale der aromatischen Protonen (**5**) des Methylanilins. Das Multiplett bei 5,98 – 5,58 ppm kann den einzelnen olefinischen Protonen der 1,2-Verknüpfung (**b**) zugeordnet werden, wobei sämtliche anderen olefinische Protonen aller Verknüpfungsarten (**a**, **b**, **c**) durch das Multiplett bei 5,18 – 4,51 ppm repräsentiert werden. Bei dem zwischen 3,98 – 3,75 ppm liegenden Multiplett handelt es sich um das Signal des einzelnen Protons vor der Hydroxygruppe (**2**). Die  $CH_2$ - und die Methylgruppe am Stickstoff (**3**, **4**) werden durch die ineinander übergehenden Multipletts zwischen 3,38 – 2,86 ppm beschrieben. Im großen Multiplett zwischen 2,31 – 0,91 ppm befinden sich die Signale der Protonen an sämtlichen gesättigten Kohlenstoffatomen des dargestellten Polymers, mit Ausnahme der Methylgruppen des Initiatormoleküls. Diese wiederum werden durch das Multiplett zwischen 0,91 – 0,75 ppm beschrieben (**1**), welches jeweils als Referenz zur Größenbestimmung der Polymere verwendet wurde.



**Abbildung 6.7:** NMR-Spektrum des PIs mit Methylanilinfunktion (**I**) mit  $M_{NMR} \approx 1300$  g/mol. Die Multipletts bei 7,39 – 7,19 ppm (überlagert mit  $\text{CDCl}_3$ -Signal) und 6,98 – 6,65 ppm beschreiben die aromatischen Protonen (**5**). Das Multiplett bei 5,98 – 5,58 ppm wird den einzelnen olefinischen Protonen der 1,2-Verknüpfung (**b**) und das Multiplett bei 5,18 – 4,51 ppm sämtlichen anderen olefinischen Protonen aller Verknüpfungsarten (**a**, **b**, **c**) zugeordnet. Das Multiplett zwischen 3,98 – 3,75 ppm ist auf das einzelne Proton vor der Hydroxygruppe (**2**) zurückzuführen. Die  $\text{CH}_2$ - und die Methylgruppe am Stickstoff (**3**, **4**) werden durch das Multiplett zwischen 3,38 – 2,86 ppm beschrieben. Im Multiplett zwischen 2,31 – 0,91 ppm befinden sich die Signale der Protonen an sämtlichen gesättigten Kohlenstoffatomen des PIs (**a**, **b**, **c**), mit Ausnahme der Methylgruppen (**1**), die durch das Multiplett von 0,91 – 0,75 ppm beschrieben werden.

Das PI mit geschützter Phenolfunktion wurde nach erfolgter Synthese ( $\rightarrow$ 8.4.6.3) ausschließlich mittels NMR untersucht, wobei die Bestimmung der molaren Masse  $M_{NMR} \approx 1300$  g/mol ergab, was sich mit den Erwartungen, bei Berücksichtigung der eingesetzten Monomer- und Initiatorkonzentration, deckte. Durch die gleiche Molmasse kann analog zum PI mit Methylanilinfunktion eine gestreckte Blocklänge von etwa 5 nm angenommen werden. Des Weiteren konnte nach NMR-spektroskopischer Untersuchung auch hier eine vollständige Funktionalisierung mit der geschützten Phenolfunktion angenommen werden. In Abbildung 6.8 wird das zugehörige NMR-Spektrum dargestellt. Da es sich um ein PI handelt, das unter den gleichen Bedingungen hergestellt wurde wie das zuvor beschriebene PI mit Methylanilinfunktion, wird an dieser Stelle auf die erneute Zuordnung der nahezu identischen Polymer- und Initiator-basierten Signale verzichtet. Die Multipletts bei 7,22 – 7,11 ppm, 7,08 – 7,01 ppm und 6,98 – 6,89 ppm können den aromatischen Protonen (**4**) des Phenols zugeschrieben werden. Das einzelne Proton an dem Kohlenstoffatom zwischen den beiden Acetal-bildenden Sauerstoffen (**5**) wird durch das Multiplett bei 5,48 – 5,40 ppm beschrieben. Das Signal bei 5,30 ppm (\*) konnte nicht zugeordnet werden und wird auf Verunreinigungen des deuterierten Chloroforms zurückgeführt. Das

einzelne Proton vor der Hydroxygruppe (2), die CH<sub>2</sub>-Protonen der Acetalgruppe (7) und die CH<sub>2</sub>-Protonen am Phenol (3) resultieren in die Multipllettbanden bei 3,92 – 3,67 ppm, 3,59 – 3,47 ppm und 2,98 – 2,53 ppm.

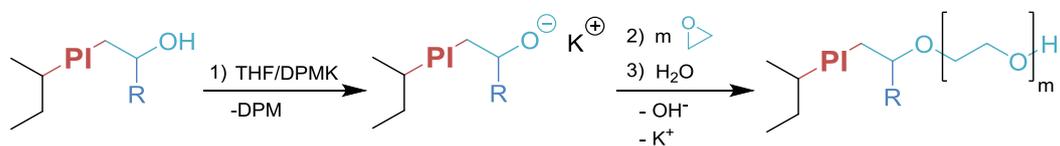


**Abbildung 6.8:** NMR-Spektrum des PIs mit geschützter Phenolfunktion (II). Die Multipletts bei 7,22 – 7,11 ppm, 7,08 – 7,01 ppm und 6,98 – 6,89 ppm beschreiben die aromatischen Protonen (4). Die einzelnen olefinischen Protonen der 1,2-Verknüpfung (b) werden durch das Multiplett bei 6,00 – 5,58 ppm und alle übrigen olefinischen Protonen aller Verknüpfungsarten (a, b, c) durch das Multiplett bei 5,17 – 4,48 ppm beschrieben. Das einzelne Proton an dem Acetal-Kohlenstoffatom (5) wird durch das Multiplett bei 5,48 – 5,40 ppm repräsentiert. Eine angenommene Verunreinigung des CDCl<sub>3</sub> erzeugte vermutlich das ansonsten nicht zu identifizierende Signal bei 5,30 ppm. Das einzelne Proton vor der Hydroxygruppe (2), die CH<sub>2</sub>-Protonen der Acetalgruppe (7) und die CH<sub>2</sub>-Protonen am Phenol (3) führten zu den Multipllettbanden bei 3,92 – 3,67 ppm, 3,59 – 3,47 ppm und 2,98 – 2,53 ppm. Durch das Multiplett zwischen 2,33 – 0,85 ppm werden alle Signale von Protonen an sämtlichen gesättigten Kohlenstoffatomen des PIs (a, b, c) und auch an den Methylgruppen des Acetals (6, 8) beschrieben, mit Ausnahme der Initiator-methylgruppen (1), welche durch das Multiplett von 0,85 – 0,71 ppm beschrieben werden.

Alle synthetisierten PIs besitzen, neben der funktionellen Gruppen für den späteren Farbstoffaufbau, auch eine aus der Verwendung von Oxirane als Abbruchreagenzien resultierende Hydroxygruppe. Da die Lithiumionen durch Aufarbeitung entfernt wurden, können die Polyisoprene durch Deprotonieren dieser Hydroxygruppe als Makroinitiatoren für die, im nächsten Abschnitt beschriebene, Polymerisation von Ethylenoxid eingesetzt werden.

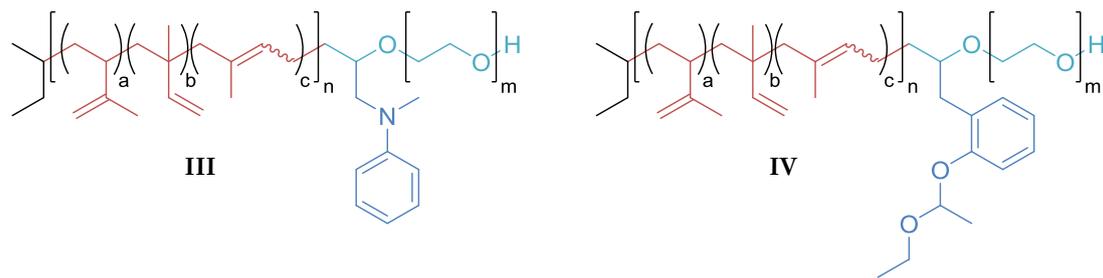
### 6.1.2.2 SYNTHESE DER PEO-BLÖCKE

Für die Synthese der Polyethylenoxide zur Darstellung der amphiphilen PI-*b*-PEOs wurden die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen PIs als Ausgangspolymere verwendet. Analog zur PI-Synthese wurde unter Schutzgasatmosphäre, Ausschluss von Verunreinigungen bzw. Feuchtigkeit und bei tiefen Temperaturen (-40 °C) unter LAP-Standardbedingungen (→8.4.1) gearbeitet, um unerwünschte Abbruchreaktionen auszuschließen. Als Monomer diente mehrfach getrocknetes Ethylenoxid (→8.2.2) und als Lösungsmittel erneut trockenes THF (→8.2.5). Ein Reaktionsschema mit dem allgemeinen Vorgehen bei der Polymerisation von Ethylenoxid in dieser Arbeit wird in Abbildung 6.9 gezeigt. Um die Polyisoprene als Makroinitiator einsetzen zu können, wurden die endständigen Hydroxygruppen jeweils mit Diphenylmethylkalium (DPMK) deprotoniert. Im Vergleich zum Lithiumion ist das Kaliumion größer und „weicher“, weshalb hier ein Solvat-getrenntes Ionenpaar vorliegt, was die Polymerisation von Ethylenoxid erlaubt.<sup>[84]</sup> Die DPMK-Lösung besitzt eine starke rotbraune Färbung. Das durch Protonieren entstehende Diphenylmethan hingegen ist farblos, was eine punktgenaue Titration der PI-Lösung erlaubt. Dadurch kann visuell das Abreagieren von DPMK überprüft werden, welches ansonsten ebenfalls als Initiator bzw. Startpunkt einer EO-Polymerisation dient, wodurch in Konkurrenz zum PI-*b*-PEO dann PEO-Homopolymer gebildet wird.<sup>[85]</sup> In Hinblick auf die Fähigkeit sphärische Mizellen auszubilden, um so den Phasentransfer der Quantum Dots zu ermöglichen, sollte ein PI:PEO Molmassenverhältnis von etwa 1:2 für die darzustellenden PI-*b*-PEOs erzielt werden, was für die Bemessung des EO-Monomers *m* berücksichtigt wurde. Auf Aspekte, die die Ausbildung von Überstrukturen der dargestellten PI-*b*-PEOs betreffen, wird in Abschnitt 6.1.5 näher eingegangen. Durch Zugabe von Wasser, nach erfolgter Polymerisation, wurde der Abbruch der LAP herbeigeführt und das aktive Kettenende protoniert.



**Abbildung 6.9:** Reaktionsschema der Polymerisation von Ethylenoxid. Als Lösungsmittel dient THF und als Aktivierungsreagenz DPMK. Nachdem im ersten Schritt die endständige Hydroxygruppe deprotoniert und ein Solvat-getrenntes Ionenpaar erzeugt wird, kann im zweiten Schritt durch Zugabe von *m* EO-Monomereinheiten die Polymerisation erfolgen. Im letzten Schritt wird das aktive Kettenende nach erfolgter Polymerisation durch Hinzufügen von Wasser protoniert.

In Abbildung 6.10 werden die beiden Strukturtypen der synthetisierten PI-*b*-PEOs mit Methylanilin- (**III**) und Acetal-geschützter Phenolfunktion (**IV**) verglichen.



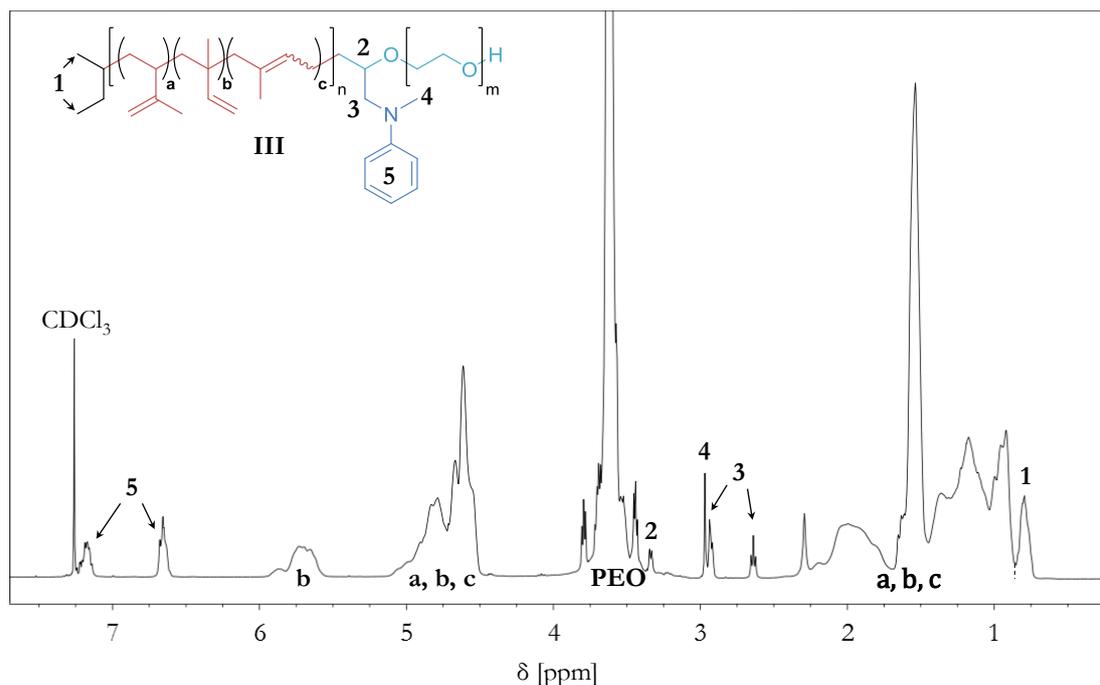
**Abbildung 6.10:** Vergleich der Strukturen der synthetisierten PI-*b*-PEOs mit Methylanilinfunktion (III) und mit Acetal-geschützter Phenolfunktion (IV).

Analog zum beschriebenen Vorgehen im Abschnitt über Polyisoprene ( $\rightarrow$ 6.1.2.1) wurde bei den Polyisopren-*b*-Polyethylenoxiden eine Größenbestimmung sowohl mittels GPC als auch per NMR-Spektroskopie durchgeführt. Für die beiden PI-*b*-PEOs mit Methylanilinfunktion ( $\rightarrow$ 8.4.7.1,  $\rightarrow$ 8.4.7.2) wurden dabei molare Massen von  $M_{NMR} \approx 5400$  g/mol und  $M_{NMR} \approx 8400$  g/mol und zahlengewichtete molare Massen von  $M_N = 5025$  g/mol und  $M_N = 9681$  g/mol bestimmt. Bei dem größeren PI-*b*-PEO zeigt sich eine höhere relative Abweichung zwischen den Molmassen, was erneut auf die Verwendung eines GPC Geräts mit anderem Standard zurückgeführt wird. Im Folgenden wird daher stets von der per NMR bestimmten Molmasse der PI-*b*-PEOs ausgegangen. Die erzielten Molmassen lagen, unter Berücksichtigung von möglichen Abweichungen im angenommenen Funktionalisierungsgrad und der eingesetzten Monomermengen, im Rahmen der Erwartungen. Bei der Herstellung von PI-*b*-PEOs mit relativ geringer Molmasse im Labormaßstab kann es grundsätzlich zu präparativen Ungenauigkeiten bei der Bemessung des Monomers EO kommen, weshalb eine gewisse Abweichung von der Zielgröße nicht ungewöhnlich ist. Die per GPC ermittelte Polydispersität ergab indes für beide PI-*b*-PEOs niedrige Werte von  $M_w/M_N = 1,074$  ( $\approx 5400$  g/mol) und  $M_w/M_N = 1,086$  ( $\approx 8400$  g/mol), was der erwarteten engen Molmassenverteilung von Polymeren, die mittels LAP synthetisiert wurden, entspricht.

Per NMR-spektroskopischer Untersuchung konnte erwartungsgemäß eine vollständige Funktionalisierung der beiden PI-*b*-PEOs mit Methylanilin ermittelt werden. Da eine Polymerisation von Ethylenoxid nur an einem Initiator-molekül möglich ist, muss somit, abgesehen von PEO-Homopolymer, eine vollständige Funktionalisierung durch Methylanilin vorliegen. Sollte das im Vorfeld synthetisierte PI vereinzelt nicht durch das Methylanilinoxiran abgebrochen worden sein, würde solches über keine Hydroxygruppe verfügen, die eine

Aktivierung mit anschließender Polymerisation erlaubt. Solch ein PI würde im Zuge der Aufarbeitung des PI-*b*-PEOs entfernt und nicht mehr im NMR detektiert werden können.

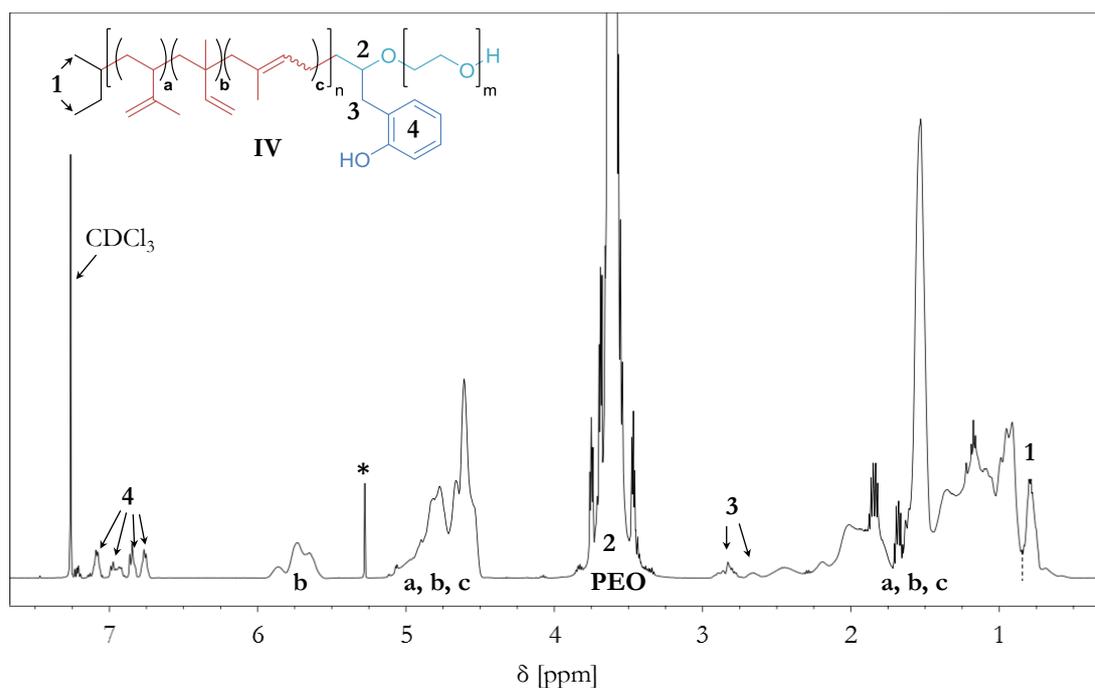
Aufgrund der Ähnlichkeit der Verschiebungen werden die charakteristischen NMR-Signale exemplarisch anhand des Spektrums des PI-*b*-PEO-Methylanilins mit  $M_{\text{NMR}} \approx 5400$  g/mol diskutiert, welches in Abbildung 6.11 dargestellt wird. Auf eine erneute Besprechung der PI-zugehörigen Banden wird an dieser Stelle verzichtet. Deutlich zu erkennen sind die Multipletts bei 7,24 – 7,10 ppm und 6,71 – 6,58 ppm, die den aromatischen Protonen (5) der Methylanilingrouppe zugeordnet werden können. Das herausstechende Multiplett zwischen 3,85 – 3,24 ppm ist dem Polyethylenoxid-Block zuzuschreiben. In der rechten Schulter dieses Multipletts ist im Bereich von 3,36 – 3,30 ppm noch die Bande des einzelnen Protons (2) vor dem ersten Sauerstoff des PEO-Blocks zu erkennen. Die Multipletts zwischen 3,00 – 2,88 ppm und 2,68 – 2,60 ppm resultieren aus der CH<sub>2</sub>- und der Methylgruppe am Stickstoff (3, 4).



**Abbildung 6.11:** NMR-Spektrum von Methylanilin-funktionalisiertem PI-*b*-PEO ( $\approx 5400$  g/mol). Die Multipletts bei 7,24 – 7,10 ppm und 6,71 – 6,58 ppm werden den aromatischen Protonen (5) zugeschrieben. Die einzelnen olefinischen Protonen der 1,2-Verknüpfung (b) werden durch das Multiplett bei 5,94 – 5,54 ppm und die übrigen olefinischen Protonen aller Verknüpfungsarten (a, b, c) durch das Multiplett bei 5,13 – 4,46 ppm repräsentiert. Das herausstechende Multiplett bei 3,85 – 3,24 ppm kann auf die Protonen des PEO-Blocks zurückgeführt werden, wobei in der rechten Schulter ein Multiplett im Bereich von 3,36 – 3,30 ppm zu erkennen ist, das von der CH-Gruppe (2) vor dem ersten PEO-Sauerstoff stammt. Durch die CH<sub>2</sub>- und die Methylgruppe (3, 4) werden die Multipletts bei 3,00 – 2,88 ppm und 2,68 – 2,60 ppm erzeugt. Die übrigen Protonen an gesättigten Kohlenstoffatomen werden durch das große Multiplett zwischen 2,36 – 0,86 ppm dargestellt, mit Ausnahme der Methylgruppenprotonen des PI-Initiators (1), die durch das Multiplett bei 0,86 – 0,71 ppm beschrieben werden.

Die Bestimmung der molaren Masse des PI-*b*-PEOs mit geschützter Phenolfunktion ergab  $M_{NMR} \approx 5400$  g/mol per NMR und eine zahlengewichtete molare Masse von  $M_N = 4951$  g/mol mittels GPC. Das Verhältnis der beiden ermittelten Molekulargewichte entspricht damit in etwa dem des Methylanilin-funktionalisierten PI-*b*-PEOs ( $\approx 5400$  g/mol) und liegt damit, unter Berücksichtigung der in diesem Abschnitt bereits beschriebenen potentiellen Abweichungen und Ungenauigkeiten, im Rahmen der Erwartungen. Für die Molmassenverteilung konnte für das PI-*b*-PEO mit geschützter Phenolfunktion ebenfalls ein LAP-typischer Wert von  $M_W/M_N = 1,100$  ermittelt werden.

Analog zum zuvor diskutierten PI-*b*-PEO mit Methylanilinfunktion wurde auch hier eine vollständige Funktionalisierung, in diesem Fall mit geschütztem Phenol, erwartet und per NMR bestätigt. Die Schutzgruppe wurde unter Einsatz von 4 M Salzsäure entfernt und das erhaltene Phenol-funktionalisierte PI-*b*-PEO erneut untersucht. In Abbildung 6.12 wird das zugehörige NMR-Spektrum gezeigt. Die PI-basierten Banden werden nicht erneut besprochen. Den aromatischen Protonen (4) können die Multipletts bei 7,12 – 7,05 ppm, 7,01 – 6,90 ppm, 6,88 – 6,81 ppm und 6,80 – 6,72 ppm zugeordnet werden. Das Signal (\*) bei 5,28 ppm wird abermals auf eine Verunreinigung des verwendeten  $CDCl_3$  zurückgeführt. Wie erwartet beinhaltet das große Multiplett des **PEO**-Blocks zwischen 3,95 – 3,25 ppm die Bande des einzelnen Protons der CH-Gruppe (2) am Sauerstoff der ersten EO-Einheit. Die Multiplettbanden bei 2,95 – 2,59 ppm können der  $CH_2$ -Gruppe am Phenol (3) zugeschrieben werden.



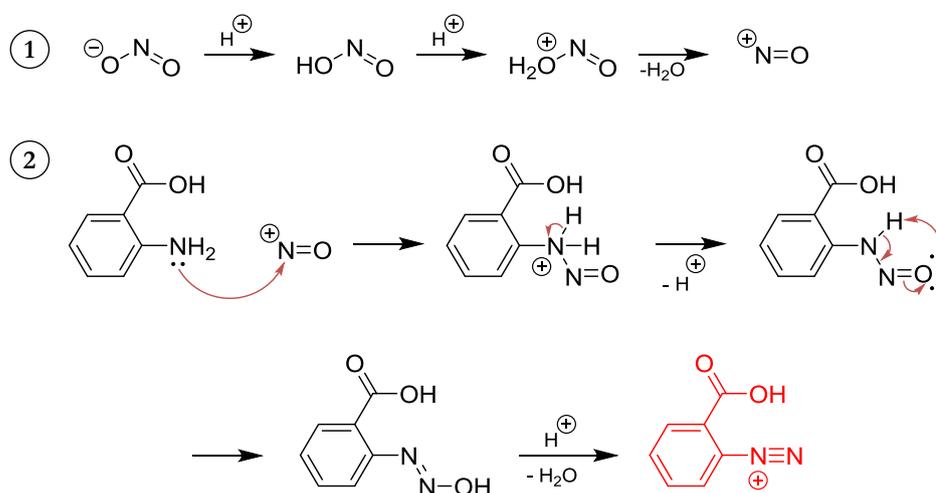
**Abbildung 6.12:** NMR-Spektrum des entschützten PI-*b*-PEOs mit Phenolfunktion. Die Multipletts bei 7,12 – 7,05 ppm, 7,01 – 6,90 ppm, 6,88 – 6,81 ppm und 6,80 – 6,72 ppm können den aromatischen Protonen (4) zugeordnet werden. Die einzelnen olefinischen Protonen der 1,2-Verknüpfung (b) werden durch das Multiplett bei 5,95 – 5,54 ppm und alle übrigen olefinischen Protonen aller Verknüpfungsarten (a, b, c) durch das Multiplett bei 5,13 – 4,47 ppm beschrieben. Das Signal bei 5,28 ppm wird abermals auf eine Verunreinigung des verwendeten CDCl<sub>3</sub> zurückgeführt. Bei dem dominanten Multiplett zwischen 3,95 – 3,25 ppm handelt es sich um die Banden der Protonen des **PEO**-Blocks, die das Signal des Protons der CH-Gruppe (2) vor dem Sauerstoffatom der ersten EO-Einheit beinhalten. Die Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppe am Phenol (3) führen zum Multiplett bei 2,95 – 2,59 ppm. Die Signale sämtlicher übrigen Protonen an gesättigten Kohlenstoffatomen werden durch das große Multiplett zwischen 2,36 – 0,85 ppm dargestellt, mit Ausnahme der Methylgruppenprotonen des PI-Initiators (1), die durch das Multiplett bei 0,85 – 0,71 ppm beschrieben werden.

In diesem Abschnitt konnte abschließend gezeigt werden, dass eine Darstellung von vollständig funktionalisierten amphiphilen Diblockcopolymeren mit komplexen Funktionalitäten wie Methylanilin- und Phenolgruppen möglich ist. Das wiederum erlaubt es in Folgesynthesen einen hohen Grad an Zielfunktionalisierung zu erreichen. Durch die Verwendung von funktionellen Initiatoren oder Abbruchreagenzien können Blockcopolymere mit einer Vielzahl von Funktionalitäten hergestellt werden. Hierfür steht eine breite Palette von Oxiran-basierten Reagenzien, beispielsweise durch Epoxidieren von Molekülen mit nicht konjugierten Doppelbindungen unter milden Bedingungen ( $\rightarrow$ 6.1.1.2),<sup>[83]</sup> zur Verfügung. Der Aufbau der Zielfunktionalisierung an den PI-*b*-PEOs mit Methylanilingroupen wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

### 6.1.3 AZOFARBSTOFFAUFBAU AN FUNKTIONALISIERTEM PI-*b*-PEO

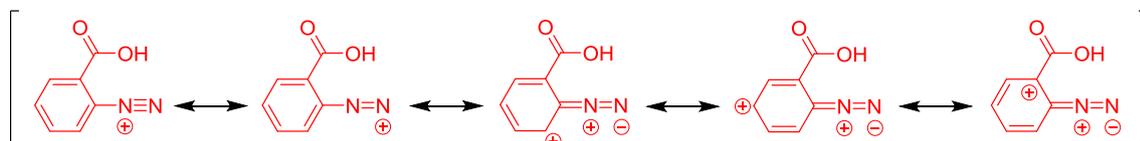
Sowohl die Methylanilin- als auch die Phenolfunktion der hergestellten PI-*b*-PEOs können als Ausgangspunkt für die Darstellung von pH-Indikatorfarbstoffen dienen. Bei dem PI-*b*-PEO mit Phenolfunktion wäre der Aufbau von Triphenylmethanfarbstoffen durch Friedel-Crafts-Acylierung denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte allerdings ausschließlich der Aufbau von Farbstoffen an den PI-*b*-PEOs mit Methylanilinfunktion.

Im Folgenden werden die allgemeinen Reaktionsschritte für die Darstellung der Azofarbstoffe ( $\rightarrow$ 8.4.8,  $\rightarrow$ 8.4.9) an den PI-*b*-PEOs erläutert. Dabei wird Anthranilsäure als Beispiel einer Ausgangsverbindung gewählt. Diese wird in Abbildung 6.13 zunächst in einer Diazotierung<sup>[86,87]</sup> umgesetzt. Dazu wird im ersten Reaktionsschritt (1) aus Natriumnitrit in Gegenwart einer Säure (HCl oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  $\rightarrow$ 8.4.8.1,  $\rightarrow$ 8.4.9.1) nach zweimaligem Protonieren und Abspalten von Wasser das Nitrosylkation erzeugt. Im zweiten Reaktionsschritt (2) greift das freie Elektronenpaar am Stickstoff der Anthranilsäure den Nitrosyl-Stickstoff nukleophil an, wobei sich durch Deprotonieren und anschließender Umlagerung ein Diazohydroxid ausbildet. Nach erneutem Protonieren wird unter Wasserabspaltung das Benzoessäurediazoniumkation erhalten, was zu einer tiefroten Färbung der Lösung führt.



**Abbildung 6.13:** Reaktionsschema der Diazotierung von Anthranilsäure. In Gegenwart einer Säure wird im ersten Schritt aus einem Nitritanion nach zweimaligem Protonieren und Abspalten von Wasser ein Nitrosylkation erzeugt. Der Stickstoff der Anthranilsäure greift im zweiten Schritt den Nitrosyl-Stickstoff nukleophil an. Nach Deprotonieren und Umlagerung entsteht zunächst ein Diazohydroxid, woraus dann nach erneutem Protonieren und Wasserabspaltung ein Diazoniumkation erhalten wird.

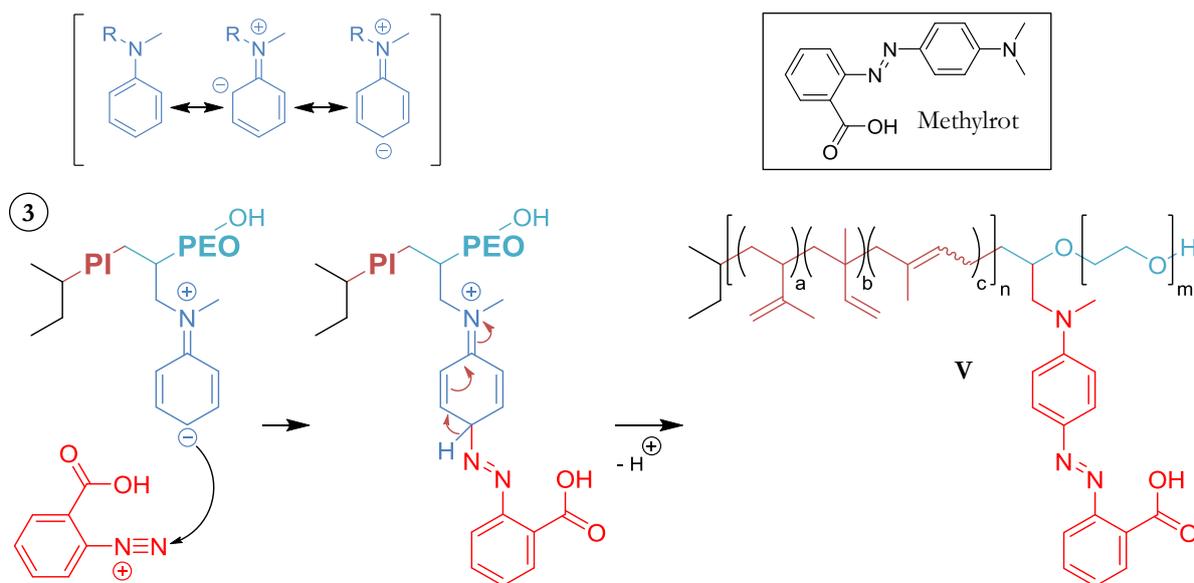
Diazoniumsalz-Lösungen sind sehr reaktiv und können leicht elementaren Stickstoff abspalten, allerdings sind aromatische Diazoniumkationen Mesomerie-stabilisiert (Abbildung 6.14) und daher bei niedriger Temperatur (<5 °C) je nach Verbindung über mehrere Tage beständig, weshalb die Reaktionslösungen stets ausreichend gekühlt wurden.



**Abbildung 6.14:** Mesomerie-Stabilisierung aromatischer Diazoniumsalze am Beispiel des dargestellten Benzoessäurediazoniumkations aus Anthranilsäure.

Die häufig auftretenden charakteristischen Färbungen von Diazoniumsalz-Lösungen, welche durch Abspalten von elementarem Stickstoff verloren gehen, erlauben eine visuelle Kontrolle der Beständigkeit in Reaktionslösungen.

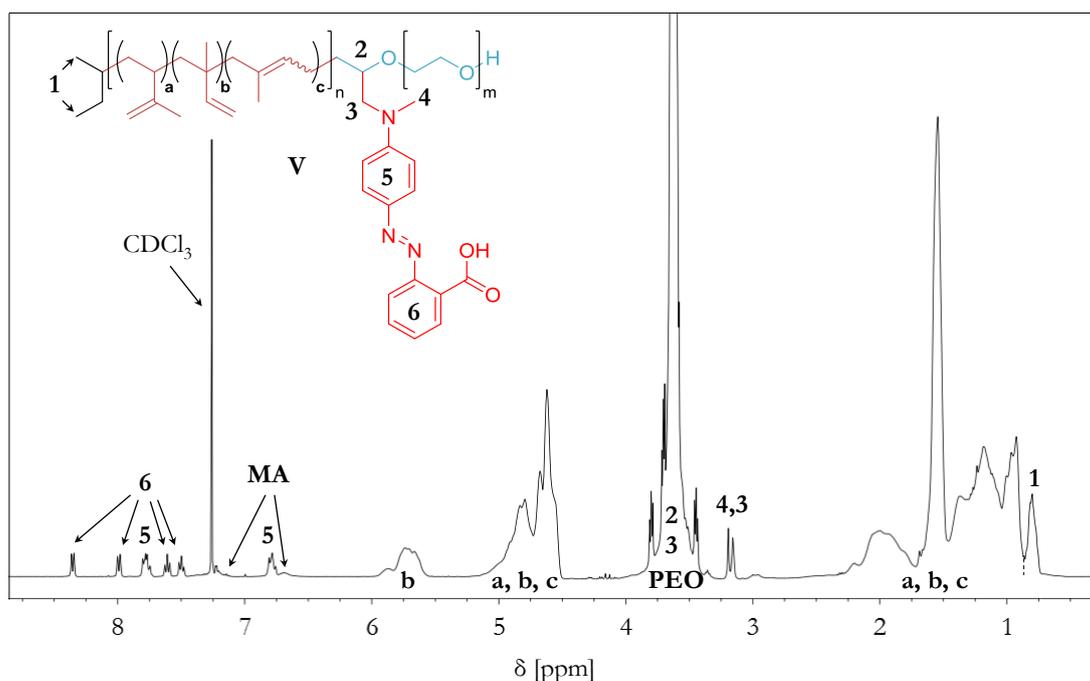
Der letzte Reaktionsschritt (3) beinhaltet das Umsetzen des Methylanilin-funktionalisierten PI-*b*-PEOs mit dem zuvor dargestellten Diazoniumkation in einer Azokupplung<sup>[86,87]</sup>, wobei stets in *para*-Stellung am Methylanilin substituiert wird. Das Reaktionsschema der Azokupplung wird in Abbildung 6.15 gezeigt. Dabei verdeutlicht die mesomere Grenzstruktur den nukleophilen Charakter der Methylanilingruppe, die als aktiver Aromat in einer elektrophilen aromatischen Substitution das Diazoniumkation aus der *para*-Stellung heraus angreift. Nach Deprotonieren und Umlagerung kann abschließend ein Azofarbstoff-funktionalisiertes PI-*b*-PEO (V) und somit die Zielverbindung erhalten werden. Der dargestellte Azofarbstoff unterscheidet sich strukturell nur marginal vom pH-Indikatorfarbstoff Methylrot<sup>[88]</sup>, da hier lediglich eine Methylgruppe durch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe ersetzt ist, welche die Verknüpfung zum Diblockcopolymer darstellt.



**Abbildung 6.15:** Reaktionsschema der durchgeführten Azokupplung mit Methylanilin-funktionalisiertem PI-*b*-PEO und Benzoesäurediazoniumsalz. Die mesomere Grenzstruktur zeigt den nukleophilen Charakter der Methylanilingrouppe, die in einer elektrophilen aromatischen Substitution als aktiver Aromat das Diazoniumkation aus der *para*-Stellung heraus angreift. Durch Deprotonieren und Umlagerung wird abschließend die Zielverbindung (V), ein PI-*b*-PEO mit Azofarbstoffgruppe erhalten, wobei hier im Vergleich zum pH-Indikator Methylrot lediglich eine Methylgruppe durch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe ersetzt ist, die die Bindung zum Polymer darstellt.

Um einen möglichst hohen Funktionalisierungsgrad des PI-*b*-PEOs mit Azofarbstoffen zu erreichen, wurde grundsätzlich mit deutlichen Überschüssen von Diazoniumsalz-Lösungen gearbeitet und über mehrere Stunden bis Tage unter Kühlen gerührt. Die NMR-spektroskopische Untersuchung des PI-*b*-PEOs ( $\approx 5400$  g/mol) ergab nach Azokupplung folglich in den meisten Fällen hohe Farbstoff-Funktionalisierungsgrade von 40 – 60 %. Das NMR-Spektrum des PI-*b*-PEOs mit Methylrotgruppe (V) wird in Abbildung 6.16 dargestellt. An dieser Stelle werden ausschließlich die Signale der funktionellen Azofarbstoffgruppe (AFG) diskutiert, da die PI-*b*-PEO-basierten Signale durch den Farbstoffaufbau unverändert blieben. Die Dubletts bei 8,35 ppm und 7,99 ppm sowie die Triplets bei 7,61 ppm und 7,50 ppm sind auf die vier Protonen des Aromaten (6), der im Zuge der Azokupplung eingeführt wurde, zurückzuführen. Bei den Banden der aromatischen Protonen der ehemaligen Methylanilingrouppe (5) zeigt sich durch den erfolgreichen Aufbau der Azogruppe eine deutliche Tieffeldverschiebung, weshalb die zugehörigen Multipletts nun bei 7,82 – 7,72 ppm und 6,84 – 6,73 ppm liegen. Um das Multiplett bei 6,84 – 6,73 ppm lassen sich sowohl weiter Tieffeld- als auch Hochfeld-verschoben noch Banden von nicht-funktionalisiertem Methylanilin (MA) erkennen, die zwar die Anwesenheit bestätigen aber aufgrund einer enormen Signalverbreiterung und Verflachung nicht abgegrenzt bzw. als Multiplett angegeben werden können. Dieses Phänomen der Signalverbreiterung der nicht-funktionalisierten Methylanilingrouppe konnte auch bei den anderen PI-*b*-PEOs nach

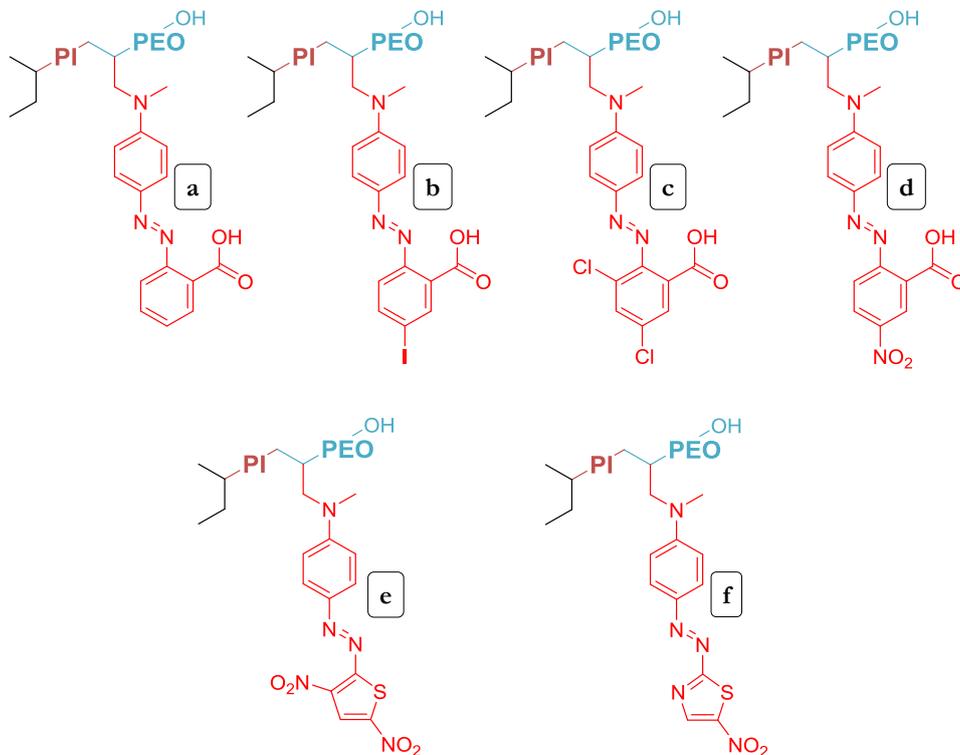
Azofarbstoffaufbau beobachtet werden. Das Multiplett bei 3,23 – 3,10 ppm ist auf die Signale der Protonen der Methylgruppe (4) und eines der Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppe (3) am Stickstoff zurückzuführen. Die Signale des zweiten Protons der CH<sub>2</sub>-Gruppe und der CH-Gruppe am ersten Sauerstoff des PEO-Blocks sind Bestandteil des signifikanten Multipletts bei 4,00 – 3,27 ppm.



**Abbildung 6.16:** NMR-Spektrum eines PI-*b*-PEOs mit AFG (V). Durch die vier Protonen des Aromaten (6) werden die Dubletts bei 8,35 ppm und 7,99 ppm sowie die Triplets bei 7,61 ppm und 7,50 ppm erzeugt. Die Multipletts bei 7,82 – 7,72 ppm und 6,84 – 6,73 ppm sind auf die aromatischen Protonen (5) der ehemaligen Methylanilinderivate zurückzuführen. Die schwachen, breiten nicht als Multiplett einguzurechnenden Signale (MA) die sich neben dem Multiplett 6,84 – 6,73 ppm befinden sind auf nicht-funktionalisiertes Methylanilin zurückzuführen. Die einzelnen olefinischen Protonen der 1,2-Verknüpfungen (b) werden durch das Multiplett zwischen 5,96 – 5,55 ppm beschrieben. Das Multiplett bei 5,16 – 4,48 ppm beinhaltet die Signale aller weiteren olefinischen Protonen (a, b, c). Bei dem markanten Multiplett zwischen 4,00 – 3,27 ppm handelt es sich um die Signale der Protonen des PEO-Blocks, des CH-Protons (2) am ersten Sauerstoff des PEO-Blocks und eines Protons der CH<sub>2</sub>-Gruppe (3) am Stickstoff. Das andere Proton dieser CH<sub>2</sub>-Gruppe und die Protonen der Methylgruppe (4) am Stickstoff erzeugen das Multiplettsignal bei 3,23 – 3,10 ppm. Die Signale sämtlicher übriger Protonen an gesättigten Kohlenstoffatomen (a, b, c), inklusive der Methylgruppenprotonen des PI-Initiators (1), sind dem breiten Multiplett bei 2,33 – 0,72 ppm zuzuschreiben.

Durch Darstellung verschiedener Diazoniumkationen bzw. Diazoniumsalz-Lösungen konnten, analog zu den in diesem Abschnitt bereits beschriebenen Reaktionsschritten (1 – 3), diverse PI-*b*-PEOs mit unterschiedlichen Azofarbstoffgruppen hergestellt werden (→8.4.8, →8.4.9). Eine Auswahl dieser AFGs wird in Abbildung 6.17 gezeigt. Als Ausgangsverbindungen dienten zum einen Anthranilsäure und Derivate mit Halogensubstituenten oder Nitrogruppe, die zu den

entsprechenden AFGs **a-d** führten. Zum anderen wurden auch Heterocyclen mit Aminofunktion als Ausgangspunkt gewählt, wodurch die AFGs **e** und **f** erzeugt werden konnten.

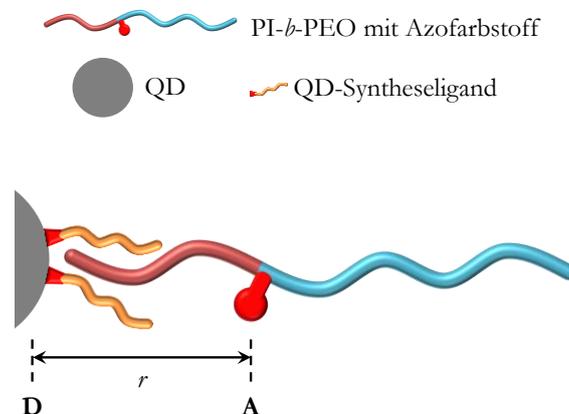


**Abbildung 6.17:** Durch unterschiedliche Diazoniumsalz-Lösungen dargestellte Azofarbstoff-funktionalisierte PI-*b*-PEOs. Bei der Diazotierung wurden sowohl Anthranilsäure(-derivate) eingesetzt, was zu den AFGs **a-d** führte, als auch Heterocyclen mit Aminofunktion, wodurch im Anschluss die AFGs **e** und **f** erzeugt werden konnten.

Die erfolgreiche Darstellung der Azofarbstoff-funktionalisierten amphiphilen Diblockcopolymeren macht es potentiell möglich, nach Phasentransfer, QD-Azofarbstoff-FRET-Systeme zu erhalten. Damit ein Donor-Akzeptor-Paar aus QDs und Azofarbstoffen einen möglichst großen FRET aufweist, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein, die im nächsten Abschnitt erläutert werden.

#### 6.1.4 KOMPONENTENAUSWAHL FÜR DAS QUANTUM-DOT-FRET-SYSTEM

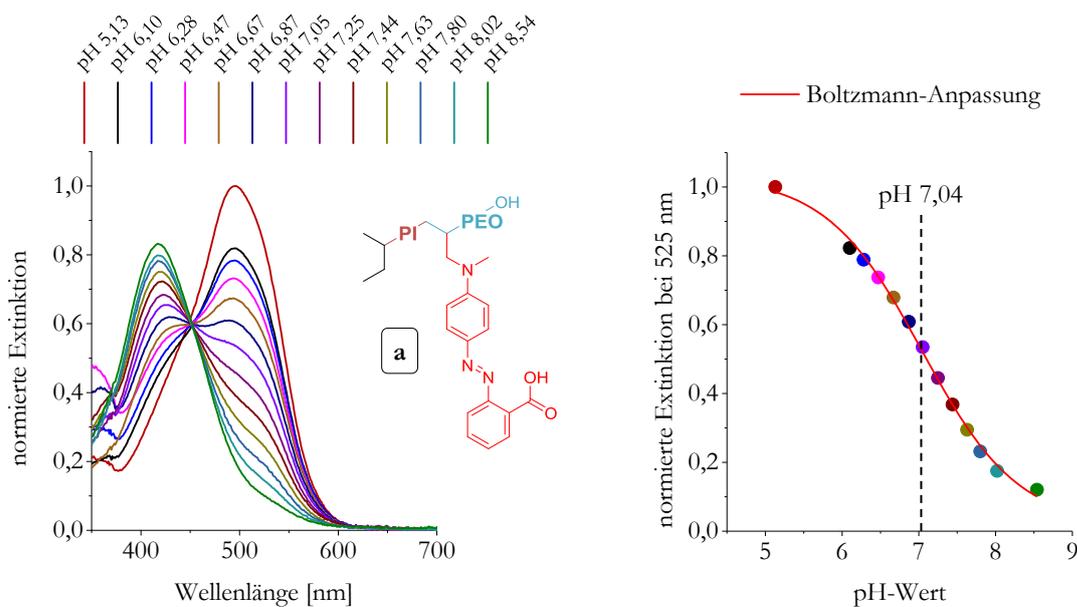
Die dargestellten PI-*b*-PEOs tragen nach Funktionalisierung eine Akzeptorfunktion in Form eines Azofarbstoffs am Übergang vom hydrophoben PI- zum hydrophilen PEO-Block, wobei der Abstand zum QD-Donor, nach Phasentransfer und Ausbildung sphärischer Mizellen, von der Größe bzw. Länge des PI-Blocks abhängt. In Abbildung 6.18 wird der Donor-Akzeptor-Abstand  $r$  eines einzelnen PI-*b*-PEOs mit Akzeptorfunktion (**A**) an der Oberfläche eines QD-Donors (**D**) schematisch dargestellt. Die ermittelten Längen ( $\rightarrow$ 6.1.2.1) für die dargestellten Polyisoprene liegen bei etwa 5 nm ( $M_{NMR} \approx 1300$  g/mol) und 10 nm ( $M_{NMR} \approx 2600$  g/mol) unter Annahme vollständig gestreckter Blöcke. Typische FRET-Distanzen befinden sich im Bereich von 1 - 10 nm.<sup>[33]</sup> Da der hydrophobe Kern im Zuge des Quellens bei der Selbstassemblierung bestrebt ist die Grenzflächenenergie bzw. Grenzfläche zu minimieren,<sup>[89]</sup> kann davon ausgegangen werden, dass die hydrophoben Blöcke kontrahiert vorliegen und damit wesentlich geringere Konturlängen ( $\rightarrow$ 4.2.3,  $\rightarrow$ Abbildung 4.17) als die berechneten Längen gestreckter Blöcke aufweisen. Daher ist für die PIs ein Donor-Akzeptor-Abstand von weniger als 5 nm bzw. 10 nm anzunehmen.



**Abbildung 6.18:** Schematische Darstellung des Donor-Akzeptorabstands  $r$  am Beispiel eines einzelnen Azofarbstoff-funktionalisierten PI-*b*-PEOs an der Oberfläche eines QDs nach Phasentransfer. Der PI-Block ist nicht gestreckt und liegt aufgrund der Minimierung der Grenzflächenenergie kontrahiert vor.

Der überwiegende Anteil der am PI-*b*-PEO aufgebauten Azofarbstoffe weist einen halochromen Effekt auf und damit eine pH-abhängige bathochrome Verschiebung<sup>[90]</sup> der Absorption hin zu höheren Wellenlängen bei Protonierung. In Abbildung 6.19 wird dies am Beispiel der Extinktion des PI-*b*-PEOs mit Methylrotgruppe (**a**) in unterschiedlichen pH-Pufferlösungen (50 mM wässrige Phosphatpufferlösungen) gezeigt. Im Vergleich zu nativem Methylrot, wie es

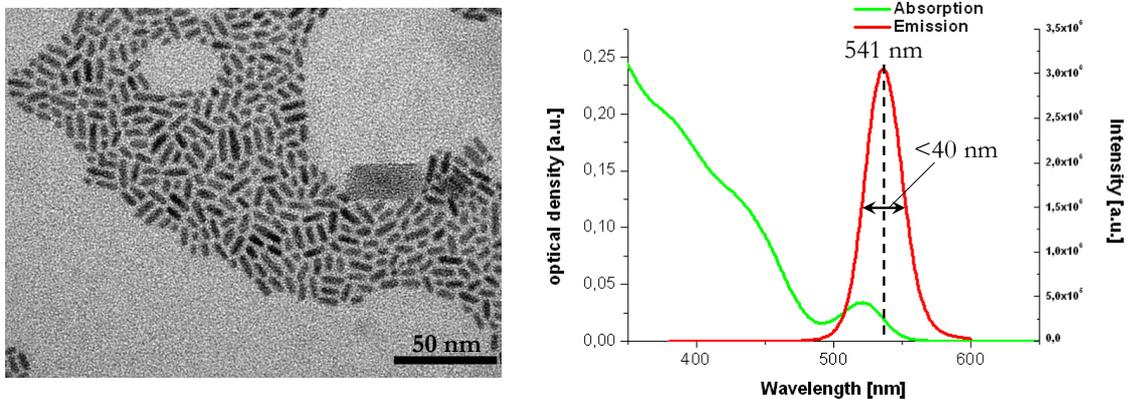
kommerziell<sup>[91]</sup> erhältlich und weit verbreitet ist, wird hier die Extinktion hin zu kleineren Wellenlängen verschoben. Dieser hypsochrome Effekt wird offenbar durch Substitution der Methylgruppe am Stickstoff durch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe (Verbindung zum PI-*b*-PEO) verursacht. Die Extinktionsmaxima verlagern sich dadurch, im Vergleich zum nichtsubstituierten Methylrot<sup>[92]</sup>, für die unprotonierte (basische) Form von 434 nm auf 417 nm und für die protonierte (saure) Form von 524 nm auf 496 nm. Darüber hinaus verschiebt sich der pH-Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt), bei dem das Verhältnis aus protonierter zu unprotonierter Form gerade 1 beträgt von etwa pH 5,2 (nichtsubstituiertes Methylrot<sup>[92]</sup>) auf pH 7,04 (bestimmt bei 525 nm mittels Boltzmann-Anpassung). Dies erweist sich als günstiger Umstand, da typische pH-Werte von Zellen im Bereich von pH 6,4 – 7,4 und von Blut bei etwa pH 7,4 liegen,<sup>[18]</sup> wird die Effizienz der Extinktionsänderung in physiologischen Systemen deutlich verbessert, wodurch hier prinzipiell auch kleinere pH-Änderungen besser detektiert werden können.



**Abbildung 6.19:** pH-abhängige Verschiebung der Extinktion des PI-*b*-PEOs mit Methylrotgruppe. Gemessen wurde in 50 mM Phosphatpufferlösungen. Der Umschlagspunkt wurde durch Boltzmann-Anpassung der Extinktionswerte für unterschiedliche pH-Werte bei 525 nm bestimmt. Der Wendepunkt der Anpassungsfunktion ergibt den pH-Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt).

Die Verwendung solcher pH-Indikatoren als Akzeptoren erlaubt es effiziente pH-responsive FRET-Sensoren darzustellen. Hierzu wird, bei Berücksichtigung des FRET-Abstandes, ein möglichst großer spektraler Überlapp des Donors mit einer der beiden existierenden absorbierenden Spezies des Farbstoffs, im sauren oder basischen Milieu, benötigt.

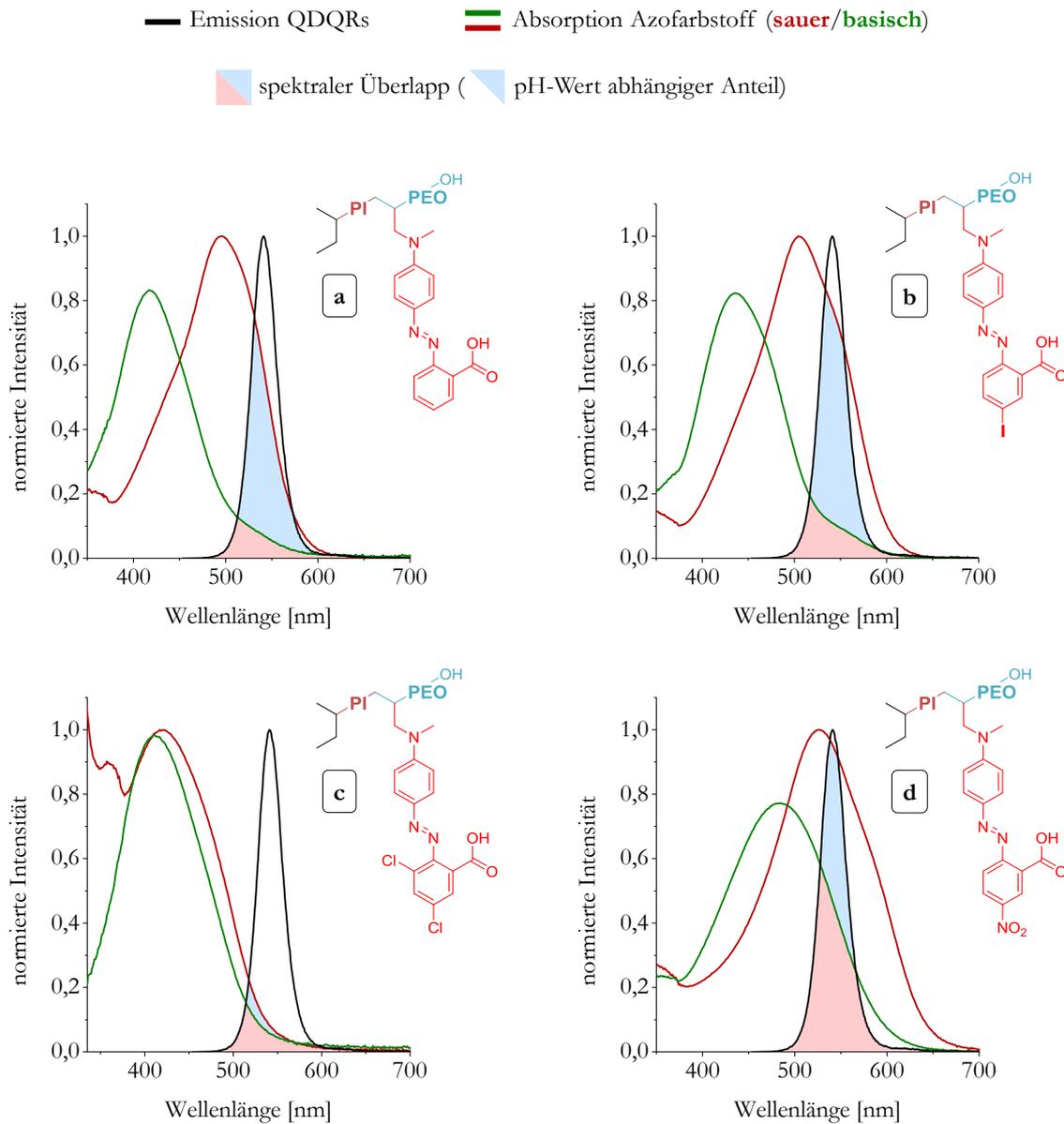
Bei den in dieser Arbeit verwendeten Donor-Quantum-Dots, die vom Fraunhofer – CAN zur Verfügung gestellt wurden, handelt es sich um eine spezielle Art, die eine elongierte Schale besitzen, wodurch sich eine Stäbchenform ergibt und diese daher auch als Quantum-Dot-Quantum-Rods (QDQRs) bezeichnet werden (von engl. „rod“ für Stab/Stäbchen). Eine Abbildung dieser Partikel, die per Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) aufgenommen wurde, sowie die ebenfalls aus dem Spezifikations-Datenblatt<sup>[9]</sup> entnommene Absorptions-/Emissionsauftragung werden in Abbildung 6.20 gezeigt. Die Partikel besitzen ein Aspektverhältnis (Länge/Breite) von etwa 1,5 – 2,5, ein vor Verwendung erneut bestimmtes Absorptionsmaximum von 518 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 541 nm. Die Halbwertsbreite liegt unter 40 nm, was einen selektiven Überlapp mit der Extinktion der AFGs erlaubt.



**Abbildung 6.20:** TEM-Aufnahme der Verwendeten QDQRs, die ein Aspektverhältnis von circa 1,5 - 2,5 besitzen und Absorptions- und Emissionsspektrum mit Emissionsmaximum bei 541 nm sowie einer Halbwertsbreite von  $< 40\text{ nm}$ .<sup>[9]</sup>

Bei allen Azofarbstoffen, die mit Anthranilsäure und Anthranilsäurederivaten an den PI-*b*-PEOs aufgebaut wurden ( $\rightarrow$ 6.1.3,  $\rightarrow$ Abbildung 6.17 **a-d**), zeigen sich halochrome Effekte. In Abbildung 6.21 wird der spektrale Überlapp (blau/rot) zwischen der Emission der eben beschriebenen QDQRs und der Extinktion der dargestellten PI-*b*-PEOs mit AFG (**a-d**) gezeigt. Dabei wurde die Extinktion jeweils sowohl für ein saures (rot) als auch ein basisches (grün) Milieu aufgetragen. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden die Spektren normiert. Der größte durch pH-Änderung schaltbare spektrale Überlapp (blau) zeigt sich bei der AFG mit Iod-Substituent (**b**), was auch auf die Lage der Emissionsbande der verwendeten Partikel zurückzuführen ist. Die Methylrot-AFG (**a**) zeigt eine ähnlich große pH-abhängige bathochrome Verschiebung, würde aber für einen vergleichbaren Überlapp den Einsatz kleinerer QDs mit kürzeren Wellenlängen voraussetzen. Für gewöhnlich nimmt die Fluoreszenzstabilität der QDs

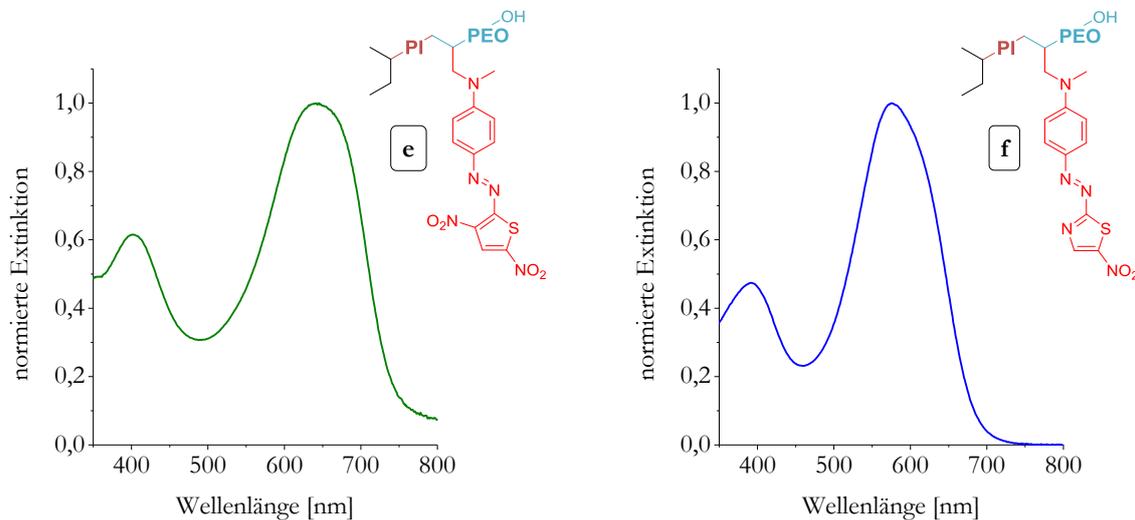
durch das kleiner werdende Volumen-Oberflächen-Verhältnis bei sinkendem Partikelradius ab.<sup>[93]</sup> Dabei existieren verhältnismäßig mehr ungesättigte Valenzen bei gleichzeitiger höherer kinetischer Energie der Elektronen. Im Hinblick auf eine physiologische Anwendung der Partikel, bei der erhöhte Quencherkonzentrationen vorliegen, erscheint das PI-*b*-PEO mit Iod-substituierter AFG (**b**) als geeigneter, da es die Verwendung der zuvor beschriebenen QDQRs erlaubt, die eine hohe Quenchingstabilität aufweisen. Der geringe halochrome Effekt, der sich bei der Dichlor-substituierten AFG (**c**) zeigt, lässt einen Einsatz als pH-responsiven FRET-Akzeptor als wenig sinnvoll erscheinen. Bei der Nitro-substituierten AFG (**d**) zeigt sich zwar der größte Überlapp und eine allgemeine bathochrome Verschiebung der Extinktionsbanden (sauer/basisch), was die Möglichkeit eröffnet größere Partikel mit höheren Wellenlängen zu verwenden, allerdings ist die pH-abhängige bathochrome Verschiebung deutlich geringer. Dieser Umstand führt beim dargestellten Überlapp zu einem großen Anteil bereits bei hohen pH-Werten, der die pH-Sensitivität eines FRET-Systems im Vergleich zum Überlapp bei AFG (**b**) deutlich herabsetzt. Auch bei Verwendung von Partikeln, die eine Emission bei höheren Wellenlängen aufweisen, kann mit AFG (**d**) kein vergleichbar großer pH-abhängiger, schaltbarer spektraler Überlapp erzeugt werden.



**Abbildung 6.21:** Spektraler Überlapp der Emission (schwarz) von QDQRs, mit einem Emissionsmaximum bei 541 nm und einer Halbwertsbreite von <math><40\text{ nm}</math>, mit der Extinktion der Azofarbstoffe (a-d), die mit Anthranilsäure und Anthranilsäurederivaten am PI-*b*-PEO aufgebaut wurden. Die roten Flächen unter den grünen Extinktionsbanden (basisches Milieu) beschreiben den spektralen Überlapp der bereits bei hohen pH-Werten vorliegt und die blauen Flächen unter den roten Banden (saurer Milieu) den pH-abhängig schaltbaren Anteil.

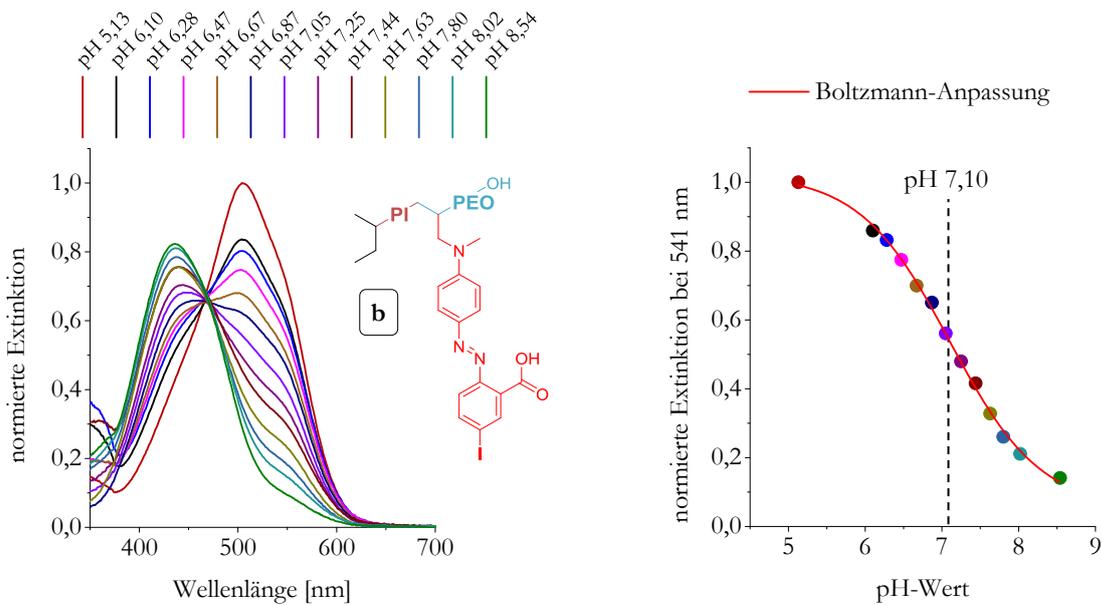
Die mit heterocyclischen Diazoniumsalz-Lösungen dargestellten PI-*b*-PEOs mit AFG zeigen in einem Untersuchungsbereich von pH 1 – 13 keine pH-abhängige Veränderung der Extinktion und kommen daher für den hier angestrebten Einsatz in pH-responsiven FRET-Sensoren für physiologische Anwendungen nicht in Frage. Die normierten Extinktionen dieser beiden PI-*b*-PEOs werden in Abbildung 6.22 gezeigt. Sie besitzen Extinktionsmaxima bei 645 nm (e) und 575 nm (f). Diese starke bathochrome Verschiebung, im Vergleich zum Methylrot, kann

durch ein Zusammenspiel der als Auxochrome (farbvertiefend durch +M-Effekt) wirkenden Stickstoff- und Schwefelatome mit den antiauxochromen (-M-Effekt) Nitrogruppen erklärt werden, was zu einer verstärkten Delokalisation der Elektronen führt.<sup>[90,94]</sup>



**Abbildung 6.22:** Extinktion der mittels heterocyclischen Diazoniumsalz-Lösungen dargestellten PI-*b*-PEOs mit AFG. Die Extinktionsmaxima liegen bei 645 nm (e) und 575 nm (f).

Die Diskussion des spektralen Überlapps (Abbildung 6.21) zeigt eine besondere Eignung der Iod-substituierten AFG (b) als FRET-Akzeptor für die designierten Donor-QDQRs, die bereits (Abbildung 6.20) vorgestellt wurden. In Abbildung 6.23 wird die schrittweise halochrome Verschiebung der Extinktion in unterschiedlichen Phosphatpufferlösungen dieser AFG gezeigt. Des Weiteren wird die Boltzmann-Anpassungsfunktion der Extinktionswerte für unterschiedliche pH-Werte bei 541 nm dargestellt, die ihren Wendepunkt bei pH 7,10 verzeichnet, was dem Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt) entspricht. Damit ist potentiell eine vergleichbar gute pH-Sensitivität im physiologischen Milieu gegeben, wie sie zuvor für die Methylrot-AFG (pH 7,04, bei 525 nm) diskutiert wurde.



**Abbildung 6.23:** Schrittweise pH-abhängige Verschiebung der Extinktion des PI-*b*-PEOs mit Iod-substituierter AFG (b). Gemessen wurde in 50 mM Phosphatpufferlösungen. Der Umschlagspunkt wurde durch Boltzmann-Anpassung der Extinktionswerte für unterschiedliche pH-Werte bei 541 nm bestimmt. Der Wendepunkt der Anpassungsfunktion ergibt den pH-Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt) bei pH 7,10.

Um ein FRET-System aus QDQR und AFG zu charakterisieren, also wichtige Kenngrößen wie Überlappungsintegral  $J$  (Gl. 4.9) und Förster-Radius  $R_0$  (Gl. 4.10) ermitteln zu können ( $\rightarrow$ 4.1.5), muss der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_A$  des Akzeptors bekannt sein. Dieser kann durch lineare Regression der optischen Dichten unterschiedlicher (molarer) Konzentrationen im Extinktionsmaximum der sauren Form  $\lambda_{\max(s)}$  bestimmt werden. Die Steigung ergibt dann den gesuchten Parameter  $\epsilon$ . Dabei muss der mittels NMR bestimmte Farbstofffunktionalisierungsgrad der Polymere berücksichtigt werden, um die tatsächlichen molaren Konzentrationen an Farbstoff in den gelösten PI-*b*-PEO-AFG-Proben abschätzen zu können. In Tabelle 6.1 sind die Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit dargestellten PI-*b*-PEOs mit AFG (a-f), die zugehörigen Extinktionsmaxima und die erhaltenen Bestimmtheitsmaße der linearen Regressionen aufgeführt. Es wurde jeweils eine Bestimmung über vier unterschiedliche Konzentrationen vorgenommen, wobei die Konzentration von Punkt zu Punkt verdoppelt wurde. Die Ergebnisse liegen im Rahmen der Erwartungen, da bei ähnlichen Azoverbindungen in der Literatur vergleichbare Extinktionskoeffizienten ermittelt wurden.<sup>[95,96]</sup> Aufgrund eines per NMR nicht exakt bestimmbareren Funktionalisierungsgrads, ist folglich auch die jeweilige genaue Konzentration an AFGs nicht bekannt. In der Arbeit von Habercorn<sup>[96]</sup> wird ein der AFG (b) ähnlicher Iod-substituierter Azofarbstoff mit  $\epsilon = 42000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  angegeben, weshalb der hier ermittelte Wert von  $\epsilon = 45300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  eine realistische Größe darstellt und den angenommenen Funktionalisierungsgrad indirekt bestätigt.

**Tabelle 6.1:** Extinktionskoeffizienten sämtlicher PI-*b*-PEOs mit AFG (a-f), die mittels linearer Regression in einer 4-Punkt-Bestimmung über die jeweilige Steigung erhalten wurden. Es kamen vier verschiedene molare Konzentrationen zum Einsatz, die von Punkt zu Punkt jeweils verdoppelt wurden. Die optischen Dichten im Extinktionsmaximum der sauren Form  $\lambda_{\max(s)}$  wurden zur linearen Regression herangezogen.

PI- <i>b</i> -PEO-AFG	$\epsilon$ [L · mol <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> ]	$\lambda_{\max(s)}$ [nm]	Bestimmtheitsmaß
<b>a</b>	$38,4 \cdot 10^3$	496	0,99997
<b>b</b>	$45,3 \cdot 10^3$	504	0,99993
<b>c</b>	$27,6 \cdot 10^3$	417	0,99996
<b>d</b>	$51,4 \cdot 10^3$	527	0,99997
<b>e</b>	$53,6 \cdot 10^3$	645	0,99995
<b>f</b>	$44,0 \cdot 10^3$	575	0,99995

Die Summe der Eigenschaften: bathochrome Verschiebung der Extinktion und damit spektraler Überlapp auch mit QDs bzw. QDQRs mit Emission bei höherer Wellenlänge (im Vergleich zu AFG (a)), relativ großer halochromer Effekt (im Vergleich zu den AFGs c, d) und sehr geeigneter Umschlagspunkt (pH 7,10) für die Anwendung im physiologischen Milieu verbunden mit einem im Vergleich zu AFG (a) relativ hohen Extinktionskoeffizienten, lässt die Wahl des geeignetsten FRET-Akzeptors auf das PI-*b*-PEO mit Iod-substituierter AFG (IAFG) (b) fallen. Ein hoher Extinktionskoeffizient des Akzeptors wirkt sich proportional auf das Überlappungsintegral  $J$  in einem FRET-System auswirkt.

Das Überlappungsintegral der gewählten QDQR-Donor- und IAFG-Akzeptor-Komponenten berechnet sich mit der normierten Fluoreszenzintensität  $F_D$  für den Wellenlängenbereich von 480 – 620 nm nach Gl. 6.1 (→4.1.5) und wurde mittels a|e - UV-Vis-IR Spectral Software V2.2 von fluortools bestimmt. Es resultiert aus dem gesamten spektralen Überlapp der Emission der QDQRs und der sauren Form der IAFG (Abbildung 6.21 (b)).

$$J = \int_{480}^{620} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda = 2,84 \cdot 10^{15} \frac{\text{L} \cdot \text{nm}^4}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \quad \text{Gl. 6.1}$$

Mit dem für das Überlappungsintegral bestimmten Wert von  $J = 2,84 \cdot 10^{15} \frac{\text{L} \cdot \text{nm}^4}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$  kann im nächsten Schritt der Förster-Radius  $R_0$  des QDQR - IAFG Donor-Akzeptor-Paares nach Gl. 6.2 ( $\rightarrow$ 4.1.5) berechnet werden. Der Brechungsindex (1,59) des Mediums zwischen Donor und Akzeptor entspricht dabei dem einer Polystyrolmatrix<sup>[97]</sup>, da im letzten Schritt der FRET-Sensoren-Darstellung eine dichte Styrol-DVB-Copolymerkapsel durch Emulsionspolymerisation im hydrophoben Mizellkern erzeugt wird. Die Quantenausbeute der QDQRs wird mit 60 % (0,6) angenommen, was einem Literaturwert<sup>[37]</sup> derart verkapselter Partikel entspricht. Bei dem hier angestrebten FRET-System liegt, durch Abmischung von IAFG-funktionalisiertem und unfunktionalisiertem PI-*b*-PEO, nach Phasentransfer eine statistische Verteilung der Akzeptor-IAFGs um den Donor-QDQR in der Mizelle vor (Ausbildung von sphärischen Mizellen  $\rightarrow$ 6.1.5), weshalb der Wert für den Orientierungsfaktor auf  $\frac{2}{3}$  gesetzt wird, was freien Teilchen in Lösung entspricht.

$$R_0 = \left[ \frac{9000 \cdot (\ln 10) \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,6}{128\pi^5 \cdot N_A \cdot 1,59^4} \cdot 2,84 \cdot 10^{15} \frac{\text{L} \cdot \text{nm}^4}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]^{\frac{1}{6}} = 50,0 \text{ \AA} = 5,00 \text{ nm} \quad \text{Gl. 6.2}$$

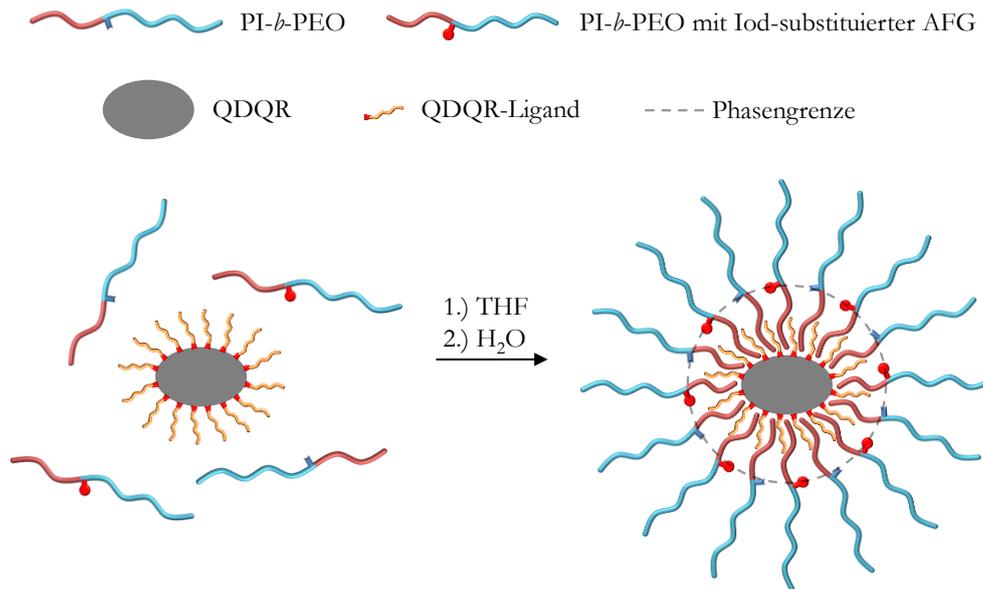
Der berechnete Förster-Radius  $R_0 = 5,00 \text{ nm}$  bei dem die Transfereffizienz 50 % beträgt, lässt für das angestrebte Donor-Akzeptor-Paar (QDQR – IAFG) vor allem bei einer PI-Blockgröße von  $M_{\text{NMR}} \approx 1300 \text{ g/mol}$  (Länge wesentlich kleiner als 5 nm,  $\rightarrow$ siehe Anfang des Abschnitts) einen deutlichen FRET erwarten. Die finale Darstellung des pH-responsiven FRET-Systems aus QDQRs und PI-*b*-PEO mit IAFG wird im nächsten Abschnitt erläutert.

### 6.1.5 PHASENTRANSFER VON QDS MIT PI-B-PEO - IAFG UND EMULSIONSPOLYMERISATION

Die Gestalt der Überstrukturen von amphiphilen Diblockcopolymeren ist neben den Grundvoraussetzungen wie selektive Lösungsmittel (hier Wasser) und kritische Mizellkonzentration von einer ganzen Reihe unterschiedlicher Faktoren abhängig ( $\rightarrow$ 4.2.3). Zu diesen zählen beispielsweise der Volumenbedarf des hydrophoben Blocks, die Konturlänge des hydrophoben Bereichs und der Grenzflächenbedarf zwischen hydrophobem und hydrophilem Block, welche in den von Israelachvili<sup>[60]</sup> propagierten Packungsparameter einfließen. In dieser Arbeit wird die Ausbildung von sphärischen (Kugel-)Mizellen beim Phasentransfer der QDQRs mit PI-*b*-PEO angestrebt,

um neben einer Schutzfunktion vor Quenchern eine statistische Verteilung von AFGs um den QDQR bei gleichzeitig möglichst einheitlichem FRET-Abstand zu erreichen. Dabei sind besonders die Blockmassenverhältnisse zu beachten, da diese einen wichtigen Einfluss auf die resultierende Gestalt der Überstruktur/Mizelle ausüben.<sup>[62-65]</sup> Die hier dargestellten PI-*b*-PEOs besitzen PEO-Molmassenanteile von 76 % ( $M_{NMR} \approx 5400$  g/mol) und 69 % ( $M_{NMR} \approx 8400$  g/mol), womit das PI zu PEO Blockmassenverhältnis etwa 1:3 ( $\approx 5400$  g/mol) und 1:2 ( $\approx 8400$  g/mol) beträgt. Am Beispiel des PB-*b*-PEOs, welches dem PI-*b*-PEO strukturell sehr ähnlich ist, konnte bei derartigen Verhältnissen eine stark begünstigte Ausbildung von sphärischen Mizellen in Wasser beobachtet werden,<sup>[64,98]</sup> was folglich auch für die hier dargestellten PI-*b*-PEOs angenommen werden kann. Des Weiteren konnten Ostermann *et al.* die sphärische Form verkapselter QD-Systeme mit einer PI-*b*-PEO-Hülle gleicher Größenordnung per TEM nachweisen.<sup>[36]</sup>

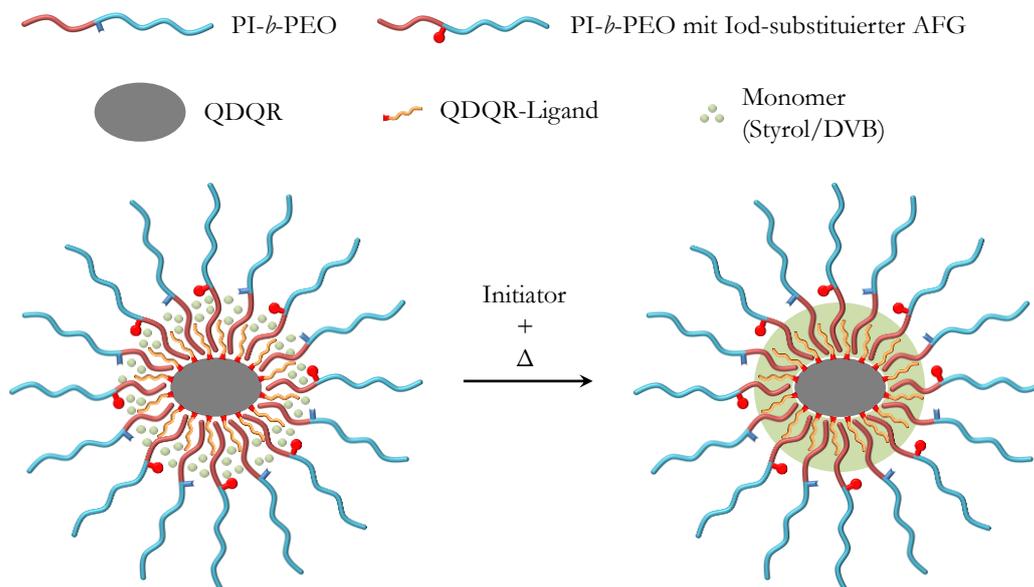
Der Phasentransfer der QDQRs ( $\rightarrow 8.4.10.2$ ,  $\rightarrow 4.2.4$ ) wurde durch Verwendung von THF bewerkstelligt, da dieses sowohl ein Lösungsmittel für beide Blöcke des PI-*b*-PEOs und die QDQRs als auch unbegrenzt mit Wasser mischbar ist. In Abbildung 6.24 wird der Phasentransfer schematisch dargestellt. Durch Einspritzen einer im ersten Schritt (1.) erstellten THF-Lösung von QDQRs und PI-*b*-PEO(-IAFG) in Wasser (2.) bilden sich sphärische (Kugel-)Mizellen aus. Die hydrophoben Kerne (innerhalb gestrichelter Linie) sind mit den QDQRs beladen, da diese aufgrund ihrer Syntheseliganden ebenfalls hydrophobe Eigenschaften besitzen. In der Literatur werden Aggregationszahlen derartiger amphiphiler Diblockcopolymere von circa 100 bis 300 Polymersträngen pro Mizelle bei Phasentransfer ähnlich großer Nanopartikel beschrieben.<sup>[11,98]</sup> Um Mizellen zu erhalten die möglichst nur mit einem QDQR beladen sind, wurden große Überschüsse von etwa 2000 Äquivalenten PI-*b*-PEO pro QDQR verwendet. Dabei kamen unterschiedliche Abmischungen von PI-*b*-PEO mit und ohne IAFG zum Einsatz (Abbildung 6.24 schematisches Beispiel 50:50; Auflistung sämtlicher Abmischungen am Ende dieses Abschnitts in Tabelle 6.2). Für das Einspritzen der QDQR-Polymer-THF-Lösung in Wasser wurde ein in der Arbeitsgruppe Weller (Department Chemie - Universität Hamburg) etabliertes Verfahren angewendet, welches ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit für solche Phasentransferprozesse erlaubt, wie sie in dieser Arbeit beschrieben werden. Bei dem Verfahren wird die QDQR-Polymer-THF-Lösung über einen lamellaren Mikromischer mit einer Kanalbreite von 45  $\mu\text{m}$  mit computergesteuerten Spritzenpumpen bei hohen Flussgeschwindigkeiten von 16 mL/min (14,4 mL/min  $\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 mL/min QDQR-Polymer-THF-Lösung) mit Wasser gemischt.



**Abbildung 6.24:** Schematische Darstellung des Phasentransfers von QDQRs mit einer 50:50 Abmischung von PI-*b*-PEO mit und ohne IAFG. Im ersten Schritt (1.) werden die QDQRs zusammen mit dem PI-*b*-PEO(-IAFG) in THF gelöst und anschließend unter Ausbildung von Mizellen in Wasser eingespritzt (2.). Die QDQRs besitzen aufgrund ihrer Syntheseliganden hydrophobe Eigenschaften und sind im Inneren des sphärischen (Kugel-)Mizellkerns (gestrichelte Linie) „gelöst“.

Nach erfolgtem Phasentransfer wurde das THF durch Erwärmen und Einleiten von Stickstoff entfernt. Im Hinblick auf eine Anwendung im physiologischen Milieu bzw. unter physiologischen Quencherkonzentrationen sollten im Inneren der Mizellkerne dichte Styrol-DVB-Copolymerkapseln erzeugt werden, um eine ausreichende Abschirmung der QDQRs zu gewährleisten. Hierzu wurde eine Emulsionspolymerisation ( $\rightarrow$ 8.4.10.3,  $\rightarrow$ 4.2.4) mit den Monomeren Styrol und DVB durchgeführt, wobei der Anteil des DVBS am gesamten Monomer etwa 7 % betrug und dieses als Quervernetzer des Copolymers fungierte. Die gezielte Darstellung der Polyisoprene mit überwiegender 3,4- und 1,2-Verknüpfung und den damit verbundenen nach außen stehenden Doppelbindungen begünstigt an dieser Stelle eine Vernetzung mit den Mizellkern-bildenden PI-Blöcken.<sup>[35]</sup> Dadurch wird das Ausdiffundieren von Polymersträngen aus dem Mizellverband unterbunden, was eine Grundvoraussetzung für eine hohe Verdünnungsstabilität solcher Konstrukte ist. Schmidtke *et al.* konnten zeigen, dass bereits die alleinige Beigabe eines Radikalstarters wie AIBN schon zu einer Quervernetzung der PI-Blöcke und damit verbunden zu stabileren optischen Eigenschaften mizellar verkapselter QDs führt.<sup>[99]</sup> Die durchgeführte Emulsionspolymerisation wird in Abbildung 6.25 schematisch dargestellt. Zunächst wurden DVB und Styrol zur wässrigen QDQR-Mizelllösung gegeben und unter Erwärmen gerührt, um zum einen die Mizellen mit Monomer anzureichern und zum anderen eine feinere Verteilung von Monomertröpfchen in der gesamten Probe zu erreichen. Als Nächstes wurde wasserlöslicher

Initiator zugesetzt und die Probe mehrere Stunden gerührt. Durch eine Restlöslichkeit des Monomers mit Wasser wird die radikalische Emulsionspolymerisation außerhalb der Mizellen initiiert. Die entstehenden radikalischen Oligomere diffundieren aufgrund einer weiter herabgesetzten Löslichkeit schließlich in die hydrophoben Mizellkerne und polymerisieren dort zu den Styrol-DVB-Copolymerkapseln aus, wobei die mikroskopischen Monomertröpfchen in der umliegenden Lösung zunehmend schwinden, da das Monomer durch die Polymerisation in den Mizellen aufgebraucht wird.

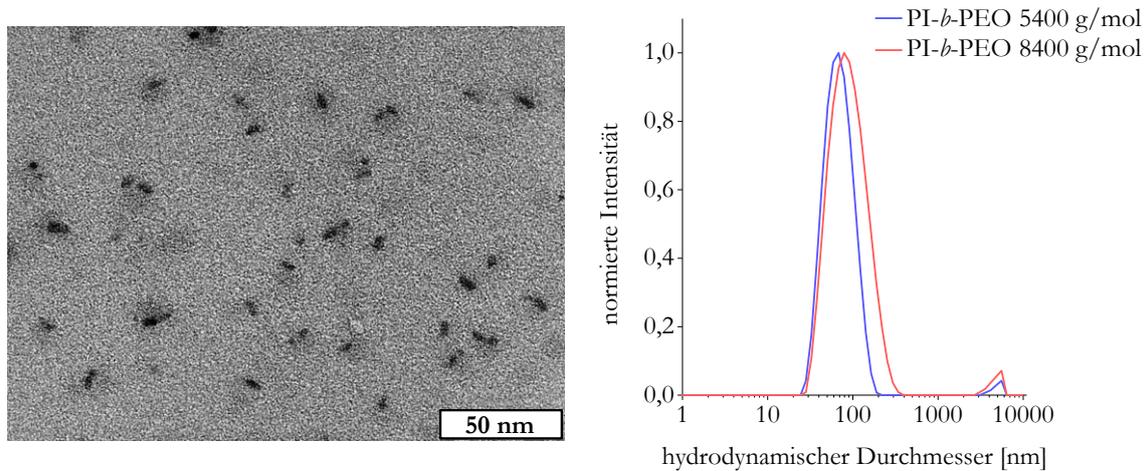


**Abbildung 6.25:** Schematische Darstellung der durchgeführten Emulsionspolymerisation. Als Beispiel dient hier ein QDQR nach Phasentransfer mit einem 50:50 Gemisch aus PI-*b*-PEO mit und ohne IAFG. Das Einbringen der Monomere in die wässrige QDQR-Mizelllösung mit zeitlichem Abstand zur Initiation der EP führt zum Anreichern dieser im Mizellkern (links). Durch Zugabe eines wasserlöslichen Initiators wird Monomer außerhalb der Mizelle initiiert, welches dann als radikalisches Oligomer durch weiter herabgesetzte Löslichkeit in die Mizellkerne diffundiert und dort in Form einer Styrol-DVB-Copolymerkapsel auspolymerisiert (rechts). Dabei wird eine Quervernetzung durch Einsatz von DVB erreicht. Die PI-Blöcke werden ebenso vernetzt, was eine hohe Verdünnungsstabilität bedingt.

Die nach Emulsionspolymerisation erhaltenen verkapselten QDQRs mit einem bestimmten Anteil an PI-*b*-PEO-IAFG stellen die angestrebten pH-responsiven FRET-Sensoren dar. Durch den großen Überschuss an PI-*b*-PEO bezogen auf die QDQRs beim Phasentransfer ist allerdings von einer großen Anzahl unbeladener Mizellen in der Lösung auszugehen, die ebenfalls PI-*b*-PEO-IAFG beinhalten und damit einen störenden Einfluss auf die spektroskopische Untersuchung haben können. Darüber hinaus ist für eine physiologische Anwendung eine minimale Konzentration solcher nanoskopischer Konstrukte gewünscht, um einen möglichst geringen invasiven Effekt auf zelluläre Prozesse auszuüben. Im letzten Schritt wurde daher eine

sogenannte Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt ( $\rightarrow$ 8.4.10.4), wobei hier drei Sucroslösungen mit abnehmender Konzentration (60 %, 10 %, 5 %) übereinander geschichtet wurden. Abschließend wurde die wässrige Lösung der QDQR-beladenen und -unbeladenen PI-*b*-PEO-Styrol-DVB-Konstrukte als letzte Schicht aufgetragen. Durch Zentrifugation (hier bei 50000 rcf) erreichen beladene Konstrukte eine deutlich höhere Eindringtiefe, was den Antrieb dieser Trennungsmethode darstellt. Die nach Waschen und Filtrieren jeweils final erhaltene wässrige Lösung verkapselter QDQRs wurde ohne weitere Behandlung direkt analysiert und für optische Folgeexperimente ( $\rightarrow$ 6.2) eingesetzt.

Die QDQR-PI-*b*-PEO-Styrol-DVB-Konstrukte wurden hinsichtlich ihrer Gestalt und Größe mittels TEM und dynamischer Lichtstreuung (DLS) untersucht. Die TEM-Aufnahme in Abbildung 6.26 (links) zeigt ein Beispiel, bei dem verkapselte QDQRs, deren Phasentransfer mit PI-*b*-PEO 5400 g/mol durchgeführt wurde, zu sehen sind, welche hauptsächlich einzeln verkapselt vorliegen. Die schattigen Bereiche um die Partikel lassen die Kapseln aus Styrol-DVB-Copolymer schwach erahnen. Darüber hinaus scheinen kaum leere Kapseln und damit verbunden Mizellen vorzuliegen, was die Wirksamkeit der Dichtegradientenzentrifugation belegt. Die Durchmesser der schemenhaft erkennbaren Kapseln belaufen sich auf etwa 20 nm und liegen damit in einem Größenbereich, wie er bei derartig verkapselten Nanopartikeln auch in der Literatur zu finden ist.<sup>[67]</sup> Die durch DLS bestimmten intensitätsgemittelten Partikeldurchmesser verkapselter QDQRs (Abbildung 6.26 rechts), ergaben, je nach zum Phasentransfer eingesetztem PI-*b*-PEO, 65 nm (blaue Kurve, 5400 g/mol) oder 82 nm (rote Kurve, 8400 g/mol). Die dazu erhaltenen Polydispersitätsindizes (PDIs) von 0,17 (5400 g/mol) und 0,22 (8400 g/mol) deuten, wie zu erwarten, auf eine geringe Größenverteilung der Konstrukte hin. Bei den intensitätsgemittelten Partikeldurchmessern handelt es sich hier um hydrodynamische Durchmesser, welche aus einer Solvathülle resultieren und damit im Vergleich zu den tatsächlichen Konstrukturchmessern grundsätzlich höhere Werte annehmen. Die erhaltenen DLS-Ergebnisse entsprechen damit, auch im Vergleich mit ähnlichen Verkapselungen in der Literatur, den Erwartungen.<sup>[11,96]</sup>



**Abbildung 6.26:** Die TEM-Aufnahme (links) stammt von verkapselten QDQRs, bei denen zum Phasentransfer PI-*b*-PEO 5400 g/mol eingesetzt wurde. Es liegen hauptsächlich einzeln verkapselte Partikel vor, wobei die Styrol-DVB-Copolymer-Kapseln mit einem Durchmesser von etwa 20 nm als schattige Bereiche um die Partikel schwach zu erkennen sind. Darüber hinaus sind kaum leere Kapseln zu erkennen. Die mittels DLS erhaltene Auftragung der normierten Intensität gegen die hydrodynamischen Durchmesser verkapselter QDQRs ergab intensitätsgemittelte Partikeldurchmesser von 65 nm bei Verwendung des PI-*b*-PEO 5400 g/mol (blaue Kurve) und 82 nm bei Verwendung des PI-*b*-PEO 8400 g/mol (rote Kurve) für den Phasentransfer. Die PDIs deuten mit 0,17 (5400 g/mol) und 0,22 (8400 g/mol) auf eine niedrige Größenverteilung der Konstrukte hin.

In Tabelle 6.2 werden die Anteile an IAFG-funktionalisiertem PI-*b*-PEO, die beim anfänglich in diesem Abschnitt diskutierten Phasentransfer zum Einsatz kamen, aufgelistet. Es wurden drei Experimente durchgeführt, bei denen jeweils 4 (**A**), 3 (**B**) und 6 (**C**) QDQR-Proben verkapselt wurden.

**Tabelle 6.2:** Auflistung der zum Phasentransfer variierten Anteile an IAFG-funktionalisiertem PI-*b*-PEO sowie Größe der jeweils verwendeten Polymere bei den Experimenten **A-C**.

Experiment	Anteil von PI- <i>b</i> -PEO mit IAFG [%]	PI- <i>b</i> -PEO [g/mol]
<b>A</b>	100; 50; 25; 0	5400
<b>B</b>	35; 25; 0	5400
<b>C</b>	50; 30; 0	5400; 8400

Im folgenden Abschnitt 6.2 werden die optischen Eigenschaften der erhaltenen wässrigen Lösungen verkapselter QDQRs in Abhängigkeit vom pH-Wert besprochen.

## 6.2 UNTERSUCHUNGEN AN DEN DARGESTELLTEN QDQR-FRET-SENSOREN

Im Hinblick auf eine physiologische Anwendung sollten die im vorangegangenen Abschnitt 6.1 beschriebenen FRET-Systeme aus QDQR-Donoren und (PI-*b*-PEO-)IAFG-Akzeptoren zur spektroskopischen Untersuchung in ein Milieu mit physiologischen Ionenkonzentrationen<sup>[100]</sup> überführt werden. Dazu wurden die dargestellten Lösungen verkapselter QDQRs in 50 mM wässrige Phosphat-Pufferlösungen (→8.4.11) mit unterschiedlichen pH-Werten eingespritzt. Durch die pH-abhängige Extinktion des Akzeptors wurde ein variabler FRET erwartet. Die pH-Werte der erhaltenen Proben wurden zunächst mittels pH-Meter bestätigt. Direkt im Anschluss folgte jeweils eine Untersuchung der Extinktion, Fluoreszenz und Fluoreszenz-abklingzeit.

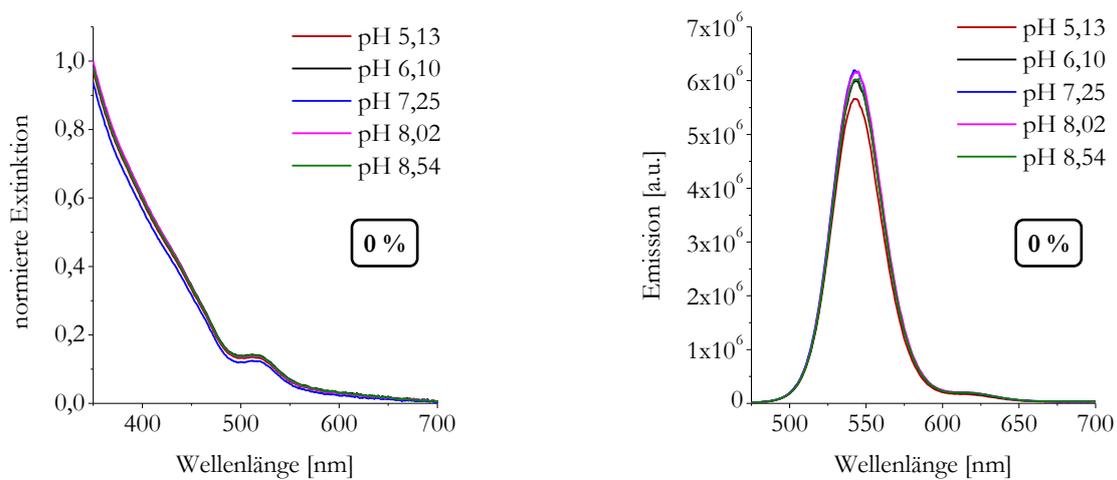
In Experiment **A** (Tabelle 6.2) wurde der generelle FRET-Nachweis geführt, und der Anteil von PI-*b*-PEO mit IAFG in einer großen Spannbreite variiert, um im Anschluss eine geeignete Akzeptorenkonzentration für einen effizienten FRET abschätzen zu können. Das Folgeexperiment **B** diente aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse zum präziseren Einstellen des Anteils an PI-*b*-PEO mit IAFG und zur detaillierteren optischen Charakterisierung des FRET-Systems. Die Variation des FRET-Abstands durch den Einsatz eines PI-*b*-PEOs mit größerem PI-Block sollte durch Experiment **C** gezeigt werden. Darüber hinaus wurden die aus **C** erhaltenen Partikel für einen *in-vitro*-Versuch eingesetzt, bei dem mittels FLIM-Messungen die Aufnahme und Wirkung der dargestellten FRET-Sensoren in Zellen gezeigt werden sollte.

### 6.2.1 EXPERIMENT A – FRET-NACHWEIS UND VARIATION DER AKZEPTORENKONZENTRATION

In der ersten Reihe von Verkapselungen (Experiment **A**, →6.1.5, Tabelle 6.2) wurden vier verschiedene Abmischungen an PI-*b*-PEO (5400 g/mol) mit und ohne IAFG für die Phasentransfers verwendet. Dabei betragen die Anteile an PI-*b*-PEO-IAFG jeweils 0 %, 25 %, 50 % und 100 %. Die aus den QDQR-Verkapselungsprozessen abschließend erhaltenen Lösungen wurden in diesem Experiment jeweils nur in fünf wässrige Phosphat-Pufferlösungen verschiedener pH-Werte eingespritzt, um zunächst generell einen FRET des konstruierten Systems zu belegen. Dabei wurden die pH-Werte um den Umschlagspunkt von PI-*b*-PEO-IAFG bei pH 7,04 (→6.1.4) gewählt. Abschließend sollte ein geeigneter Akzeptoren-Anteil für die Darstellung effizienterer FRET-Systeme in Folgeexperimenten abgeleitet werden.

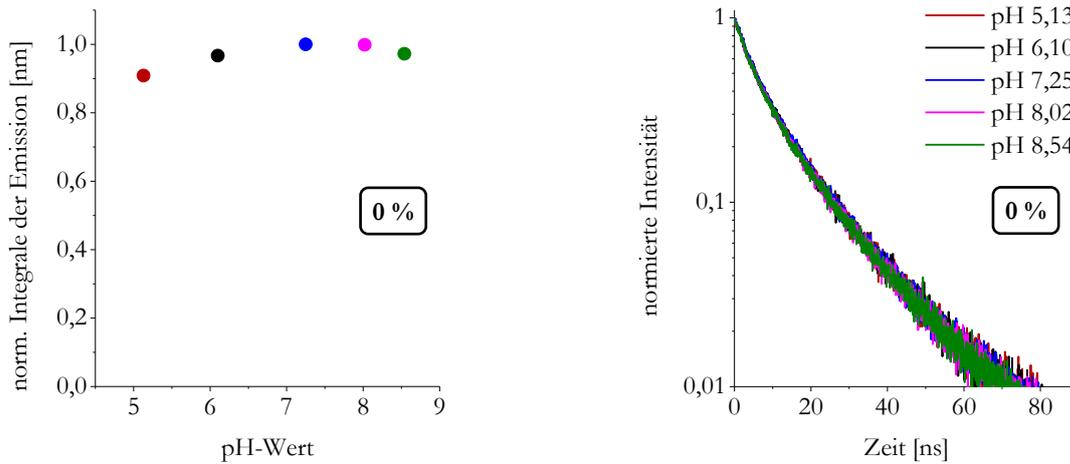
In Abbildung 6.27 werden sowohl die normierte Extinktion (links) als auch die Emission (rechts) der Blindprobe (0 % PI-*b*-PEO-IAFG) für die untersuchten pH-Werte dargestellt. Das erste

Absorptionsmaximum der verwendeten QDQRs ist bei etwa 518 nm gut zu erkennen. Darüber hinaus zeigt die Extinktion wie zu erwarten keine signifikante pH-Abhängigkeit, da keine AFGs bzw. pH-Indikatorfarbstoffe in der Polymerhülle vorliegen. Für die Emission ist hier lediglich eine relativ geringe Abnahme der Intensität bei den beiden niedrigsten und dem höchsten pH-Wert(en) zu erkennen, was für eine intakte Hülle der QDQRs mit einem guten Schutz vor Quenchern spricht.



**Abbildung 6.27:** Normierte Extinktion (links) und Emission (rechts) der Blindprobe (0 % PI-*b*-PEO-IAFG) in unterschiedlichen pH-Pufferlösungen. Die Extinktion zeigt keine signifikante pH-Abhängigkeit. Bei ca. 518 nm ist das erste Absorptionsmaximum der QDQRs zu erkennen. Die Abnahme der Emission bei den beiden niedrigsten und dem höchsten pH-Wert(en) ist minimal und deutet auf eine besonders dichte Polymerhülle hin.

Die auf die höchste Intensität normierten Integrale der Emission in Abbildung 6.28 (links) stützen die Vermutung einer starken Abschirmung der QDQRs gegen Löschprozesse durch die PI-*b*-PEOs und die Styrol-DVB-Copolymerkapseln. Der Vergleich der Integrale zeigt eine maximale Abnahme von etwa 10 % beim niedrigsten pH-Wert von 5,13 und insgesamt eine leichte pH-Abhängigkeit, die auf Quenchingprozesse durch defekte Polymerhüllen zurückgeführt werden kann. Die Fluoreszenzabklingkurven Kurven (rechts) zeigen einen nahezu identischen Verlauf, weshalb hier keine pH-Abhängigkeit des Abklingverhaltens zu beobachten ist.



**Abbildung 6.28:** Die normierten Integrale der Emission (links) der Blindprobe zeigen beim niedrigsten pH-Wert von 5,13 lediglich eine Abnahme von ca. 10 %, was erneut ein Beleg für einen sehr guten Schutz der QDQRs durch die Polymerhülle vor Lösprozessen ist. Die Fluoreszenzabklingkurven (rechts) zeigen annähernd gleiches Abklingverhalten, weshalb hier keine Abhängigkeit von den pH-Werten festzustellen ist.

Die aus den Fluoreszenzzerfallszeit-Untersuchungen in dieser Arbeit gewonnenen Abklingkurven der verkapselten QDQRs ergaben generell eine gute Übereinstimmung mit einer biexponentiellen Anpassung<sup>[101]</sup>, wie sie durch die folgende Beziehung (Gl. 6.3) beschrieben wird.

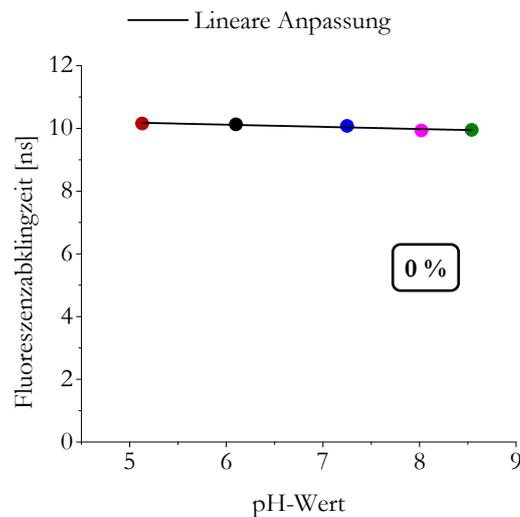
$$A_{(t)} = A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad \text{Gl. 6.3}$$

Die mittlere Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  kann durch die folgende Gleichung (Gl. 6.4) aus den anfänglichen Amplituden  $A_i$  und den zugehörigen Zerfallszeiten  $\tau_i$  bestimmt werden.

$$\tau = \frac{\sum A_i \tau_i^2}{\sum A_i \tau_i} = \frac{A_1 \tau_1^2 + A_2 \tau_2^2}{A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2} \quad \text{Gl. 6.4}$$

Bei sämtlichen in dieser Arbeit angegebenen Fluoreszenzabklingzeiten handelt es sich daher, unter Annahme eines biexponentiellen Zerfalls (Gl. 6.3), um mittlere amplitudengewichtete Fluoreszenzabklingzeiten.

Die aus den Zerfallskurven der Blindprobe in Abbildung 6.28 (rechts) bestimmten Fluoreszenzabklingzeiten zeigen in Abbildung 6.29 keine nennenswerte pH-Abhängigkeit und ergeben bei linearer Anpassung eine zu vernachlässigende Steigung von  $-0,07 \text{ ns/pH}$ . Derart marginale Abweichungen können auch auf Präparations- und Messfehler zurückgeführt werden, weshalb hier im Gegensatz zur Emissionsintensität bzw. den normierten Integralen der Emission (Abbildung 6.27, Abbildung 6.28) keine pH-Abhängigkeit belegbar ist und von konstanten Fluoreszenzabklingzeiten ausgegangen wird.

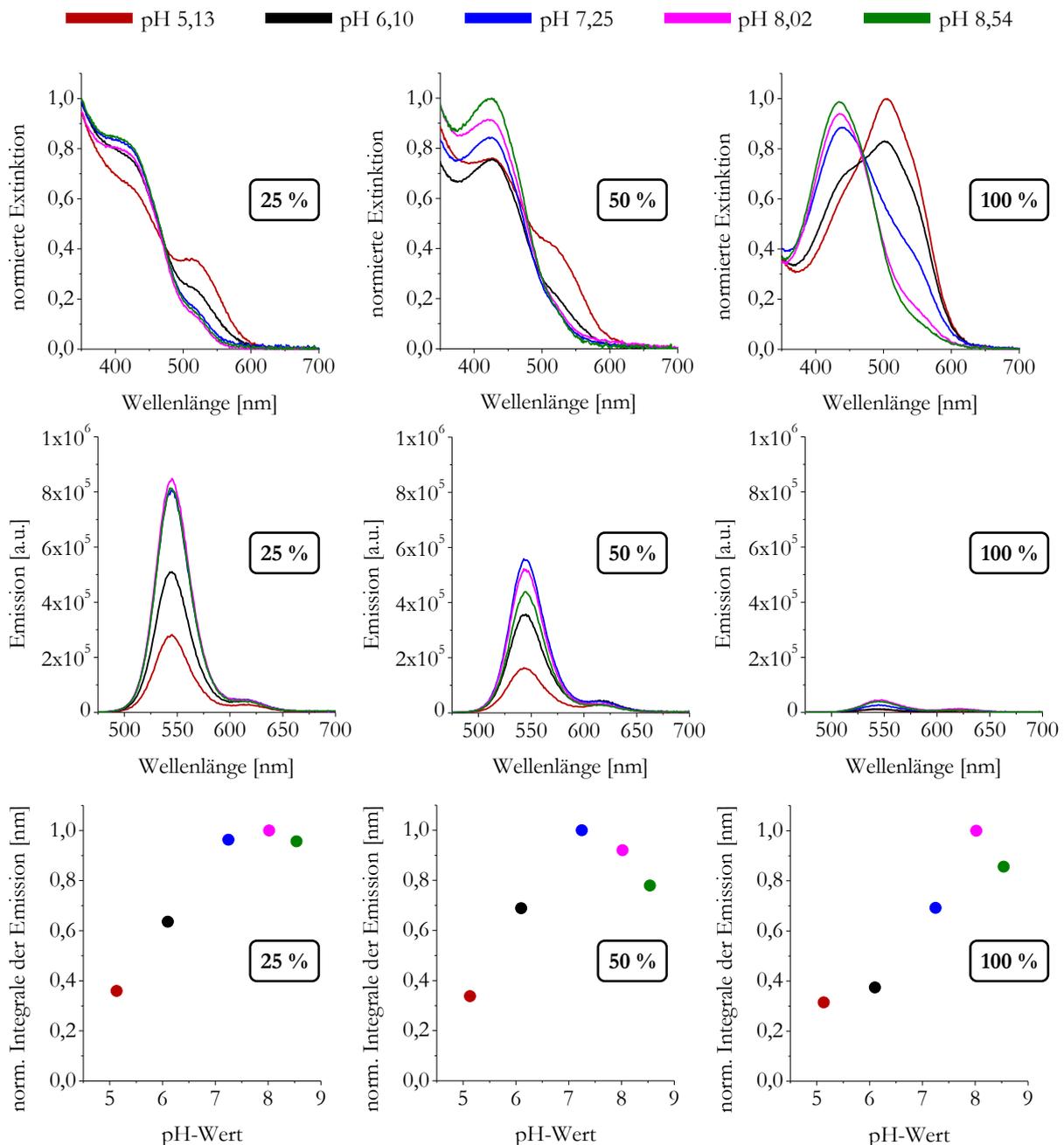


**Abbildung 6.29:** Fluoreszenzabklingzeiten der Blindprobe (**0 %** PI-*b*-PEO-IAFG) mit linearer Anpassung. Die Steigung beträgt mit  $-0,07 \text{ ns/pH}$  annähernd 0, weshalb die Fluoreszenzabklingzeiten als konstant und somit pH-unabhängig betrachtet werden können.

Der Förster-Resonanzenergietransfer kann als dynamischer Quenchingprozess angenommen werden ( $\rightarrow 4.1.5$ ). Da für die Blindprobe durch Abwesenheit des IAFG-Akzeptors keine pH-abhängige Änderung der Extinktion vorliegt, entsprechen die relativ stabile Emission und insbesondere die als konstant anzunehmenden Fluoreszenzabklingzeiten bei unterschiedlichen pH-Werten den Erwartungen für verkapselte QDQR-Konstrukte, die keinen FRET aufweisen.

In Abbildung 6.30 zeichnet sich für die verkapselten Partikel mit PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen von **25 %**, **50 %** und **100 %** ein anderes Bild ab. Für alle drei Proben ist eine pH-abhängige Veränderung der Extinktion (normiert, obere Reihe), also ein halochromer Effekt zu beobachten, der erwartungsgemäß am deutlichsten bei den Konstrukten ausfällt, bei denen ausschließlich PI-*b*-PEO-IAFG zur Darstellung verwendet wurde (**100 %**). Da die Konzentrationen der nach den Verkapselungsprozessen erhaltenen wässrigen Partikellösungen sehr ähnlich sind, kann die Emission der QDQRs (mittlere Reihe) an dieser Stelle direkt verglichen werden. Dabei zeigt sich

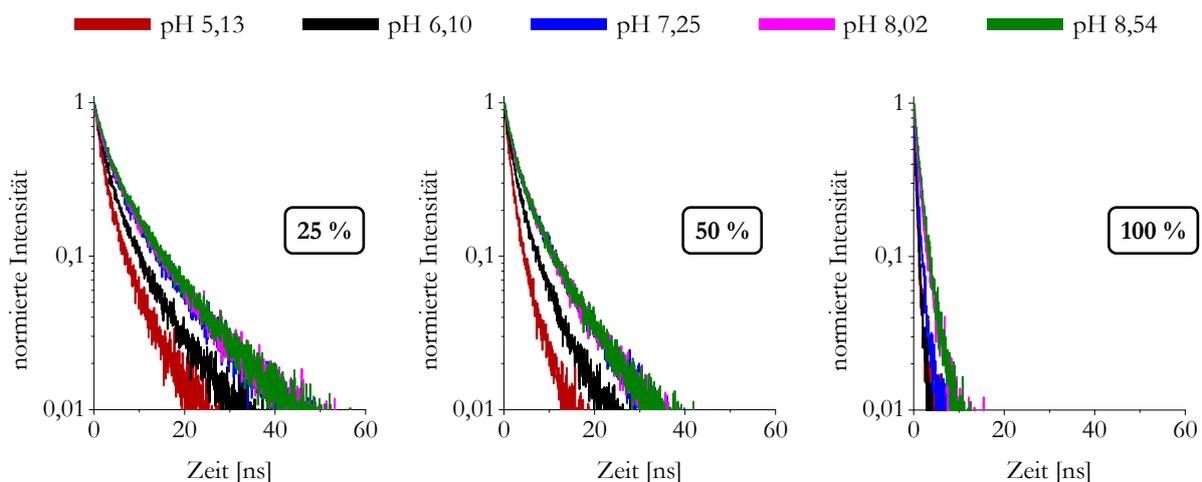
eine ausgeprägte Korrelation zwischen Emission und Anteil des verwendeten PI-*b*-PEO-IAFGs. Mit zunehmender IAFG-Konzentration ist hier die Fluoreszenz allgemein verringert. Unter Annahme vergleichbar dichter Polymerhüllen, wie sie bereits für die Blindprobe diskutiert wurden, kann hier ein erster Beleg für einen vorliegenden FRET abgeleitet werden.



**Abbildung 6.30:** Die normierten Extinktionen (obere Reihe) zeigen eine pH-Abhängigkeit (halochromer Effekt) sämtlicher Konstrukte mit PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil. Die allgemeine massive Abnahme der Emission mit zunehmender IAFG-Akzeptorenanzahl (mittlere Reihe, von links nach rechts), kann durch den auch bei hohen pH-Werten auftretenden geringen spektralen Überlapp mit dem QDQR-Donor und damit verbunden mit einem deutlichen FRET erklärt werden. Darüber hinaus ist eine erhebliche pH-Abhängigkeit der Emission zu beobachten, die durch die normierten Integrale der Emission (untere Reihe) verdeutlicht wird und auf die Zunahme des spektralen Überlapps des FRET-Systems zurückgeführt werden kann.

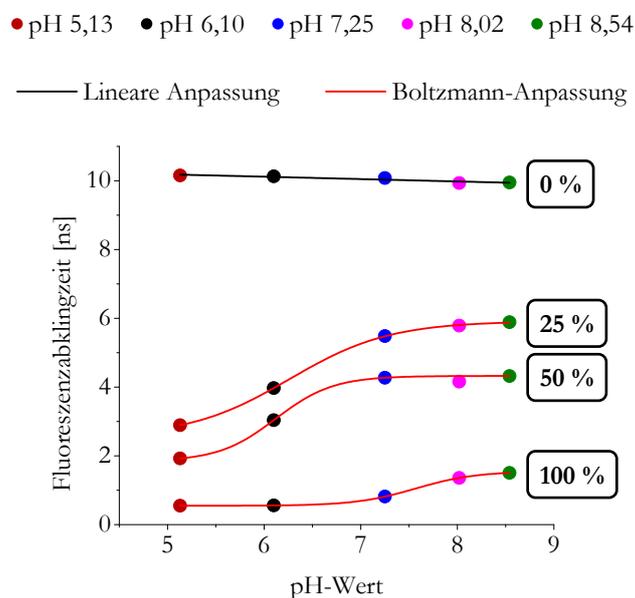
Das allgemeine Absinken der Emission bei zunehmender IAFG-Konzentration (mittlere Reihe, von links nach rechts) ist auf den auch bei hohen pH-Werten auftretenden geringen spektralen Überlapp ( $\rightarrow$ 6.1.4, Abbildung 6.21 (b), rot) zwischen dem Donor-QDQR und den Akzeptoren-IAFGs zurückzuführen. Bei den Konstrukten, für die ausschließlich PI-*b*-PEO-IAFG verwendet wurde (100 %), ist die Akzeptoren-Anzahl so hoch, dass die Fluoreszenz fast vollständig durch den FRET unterdrückt wird. Zusätzlich zeigt sich besonders durch die normierten Integrale der Emission (untere Reihe), dass die Fluoreszenz mit sinkenden pH-Werten bei allen Proben gravierend abnimmt, da der spektrale Überlapp des FRET-Systems durch den halochromen Effekt der IAFG-Gruppe ansteigt ( $\rightarrow$ 6.1.4, Abbildung 6.21 (b), blau). Es ist allerdings auch im basischen Bereich eine gewisse Abnahme der Emission zu beobachten, wobei Quenchingprozesse durch defekte Polymerhüllen eine mögliche Erklärung darstellen. Daher ist die pH-Abhängigkeit der Emission der Proben mit PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen zwar insgesamt in einem größeren Maß auf den FRET zurückzuführen, jedoch nicht ausschließlich.

Die Fluoreszenzabklingkurven in Abbildung 6.31 zeigen ein deutlich beschleunigtes Abklingverhalten der QDQRs bei Erhöhung der Konzentration von PI-*b*-PEO-IAFG (von links nach rechts), was auch hier auf die zunehmende Anzahl von FRET-Akzeptoren und den stets vorliegenden geringen spektralen Überlapp bereits bei hohen pH-Werten zurückzuführen ist. Erwartungsgemäß ist das Zerfallsverhalten auch pH-responsiv, da der schaltbare Anteil der Extinktion bei sinkenden pH-Werten zu einem größeren spektralen Überlapp und damit zu einem erhöhten FRET führt.



**Abbildung 6.31:** Aus den Fluoreszenzabklingkurven ist allgemein ein deutlich beschleunigtes Abklingverhalten der QDQRs bei Erhöhung der Akzeptorenanzahl bzw. Steigerung der Anteile an PI-*b*-PEO-IAFG (von links nach rechts) zu erkennen. Außerdem zeigt sich jeweils eine pH-abhängige Beschleunigung des Abklingverhaltens, da der spektrale Überlapp mit sinkenden pH-Werten zunimmt und dadurch der FRET erhöht wird.

In Abbildung 6.32 werden die aus den Zerfallskurven (Abbildung 6.31) gewonnenen Fluoreszenzabklingzeiten mit denen der Blindprobe verglichen. Während sich bei der Blindprobe mit PI-*b*-PEO-Mizellen ohne AFG (0 %) keine pH-Abhängigkeit im Zerfalls- bzw. Abklingverhalten der QDQRs äußert (lineare Anpassung, Steigung  $\approx 0$ ), kann bei den Konstrukten mit PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen von 25 %, 50 % und 100 % eine deutliche Korrelation zwischen pH-Werten und Fluoreszenzabklingzeiten festgestellt werden, die kein lineares Verhalten zeigen, sondern dem typischen Verlauf einer Titrationskurve folgen (hier über Boltzmann-Anpassung der Abklingzeiten verdeutlicht). Der allgemeine Trend kürzerer Fluoreszenzabklingzeiten mit zunehmender IAFG-Akzeptorenanzahl wird hier nochmal besonders deutlich. Der aus dem geringen spektralen Überlapp bei hohen pH-Werten resultierende FRET führt bei pH 8,54 bereits zu einer Verkürzung der Fluoreszenzabklingzeiten der QDQRs von etwa 10 ns (0 %) auf 5,9 ns (25 %), 4,3 ns (50 %) und 1,5 ns (100 %). Im sauren Milieu bei pH 5,13 addiert sich der pH-schaltbare Anteil des spektralen Überlapps und führt zu einer Erhöhung des FRETs und damit verbunden zu Fluoreszenzabklingzeiten von 2,9 ns (25 %), 1,9 ns (50 %) und 0,55 ns (100 %).



**Abbildung 6.32:** Die Blindprobe (0 %) zeigt kein pH-abhängiges Abklingverhalten der QDQRs (lineare Anpassung, Steigung  $\approx 0$  ns/pH). Für die Konstrukte mit PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen (25 %, 50 %, 100 %) hingegen kann eine deutliche Korrelation der Fluoreszenzabklingzeiten zur Veränderung des pH-Werts beobachtet werden, welche auf den schaltbaren spektralen Überlapp durch die IAFG und damit auf einen veränderlichen FRET zurückgeführt werden kann. Die Fluoreszenzabklingzeiten bei verschiedenen pH-Werten folgen dadurch dem typischen Verlauf einer Titrationskurve (durch Boltzmann-Anpassung der Abklingzeiten verdeutlicht). Des Weiteren führt eine steigende Akzeptoren-Anzahl durch Erhöhung der PI-*b*-PEO-IAFG-Anteile allgemein zu kürzeren Abklingzeiten, aufgrund des geringen spektralen Überlapps von QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor bereits bei hohen pH-Werten.

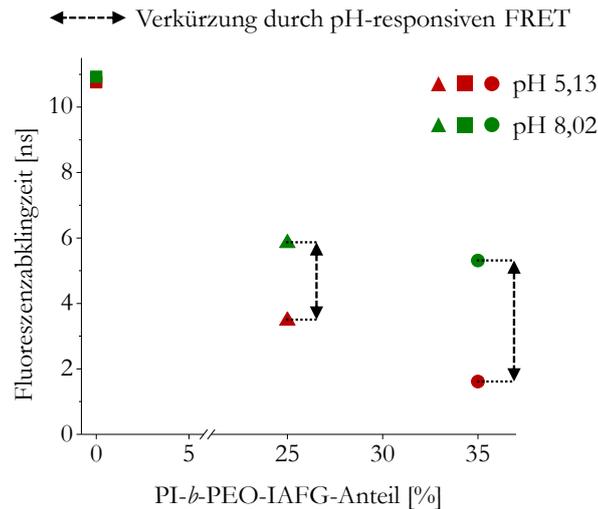
Die Konstrukte, die mit 25 % und 50 % PI-*b*-PEO-IAFG hergestellt wurden, zeigen mit 3,0 ns und 2,4 ns den größten pH-schaltbaren Anteil der Fluoreszenzabklingzeiten und damit den deutlichsten pH-responsiven FRET. Durch das Experiment im folgenden Abschnitt sollte eine Verbesserung der Konstrukte hinsichtlich des pH-schaltbaren Anteils des FRETs mittels einer geeigneteren PI-*b*-PEO-IAFG-Konzentration erreicht werden.

Im Gegensatz zur den normierten Integralen der Emission (Abbildung 6.30) ist in Abbildung 6.32 ausschließlich eine auf die Zunahme des spektralen Überlapps zwischen QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor zurückzuführende pH-abhängige Veränderung des Abklingverhaltens zu beobachten. Eine Auswirkung der erhöhten Quencherkonzentration bei hohen und niedrigen pH-Werten lässt sich nicht ablesen. Auch aus dem Vergleich der normierten Integrale der Emission (Abbildung 6.28) und der Fluoreszenzabklingzeiten (Abbildung 6.29) der Blindprobe wird dieser Unterschied deutlich. Für die Detektion des FRETs scheint daher das Abklingverhalten eine verlässlichere Aussagekraft zu besitzen. Die der Abnahme der Emission sowie der Fluoreszenzabklingzeit zugrunde liegenden Lösprozesse durch den FRET und die Quencher werden im Zuge der detaillierteren Untersuchung im nächsten Abschnitt erläutert.

### 6.2.2 EXPERIMENT B – DETAILIERTE BETRACHTUNG UND LÖSCHPROZESSE

Im vorangegangenen Abschnitt zeigten die QDQR-FRET-Sensoren mit 25 % (3 ns) und 50 % (2,4 ns) PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen im Vergleich zu den Konstrukten mit 100 % (1 ns) einen deutlich größeren absoluten Betrag des pH-responsiven Abklingverhaltens. Um eine bessere Aussage über einen geeigneten PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil treffen zu können, wurden in der zweiten Verkapselungsreihe (Experiment **B**, →6.1.5, Tabelle 6.2) neben einer 0 % Blindprobe Anteile von 25 % und 35 % gewählt. Die 25 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteile wurden dabei aufgrund des großen absoluten pH-schaltbaren Anteils der Fluoreszenzabklingzeiten als Fixpunkt aus dem vorangegangenen Experiment **A** abgeleitet. Nach erfolgreicher Darstellung wurden die hier erhaltenen QDQR-PI-*b*-PEO-(IAFG)-Konstrukte zunächst erneut auf diese Verkürzung der Fluoreszenzabklingzeiten durch einen pH-responsiven FRET hin untersucht. In Abbildung 6.33 sind die erhaltenen Abklingzeiten gegen die PI-*b*-PEO-IAFG-Anteile aufgetragen. Wie erwartet kann die Blindprobe (0 %) erneut als konstant und somit nicht pH-abhängig angenommen werden. In diesem Fall zeigt sich allerdings bei einem Anteil von 35 % PI-*b*-PEO-IAFG mit 3,7 ns die größte absolute Verkürzung des Abklingverhaltens. Die mit einem Anteil von 25 % PI-*b*-PEO-IAFG verkapselten QDQRs weisen hier nur noch eine pH-responsive Veränderung

der Fluoreszenzabklingzeiten von 2,4 ns auf. Für die erweiterten optischen Untersuchungen wurde daher neben der Blindprobe das QDQR-FRET-System mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil gewählt. Allgemein zeigt sich erneut bereits im Basischen eine deutliche Verkürzung der Fluoreszenzabklingzeiten aufgrund des FRETs durch den auch im basischen auftretenden geringen spektralen Überlapp.

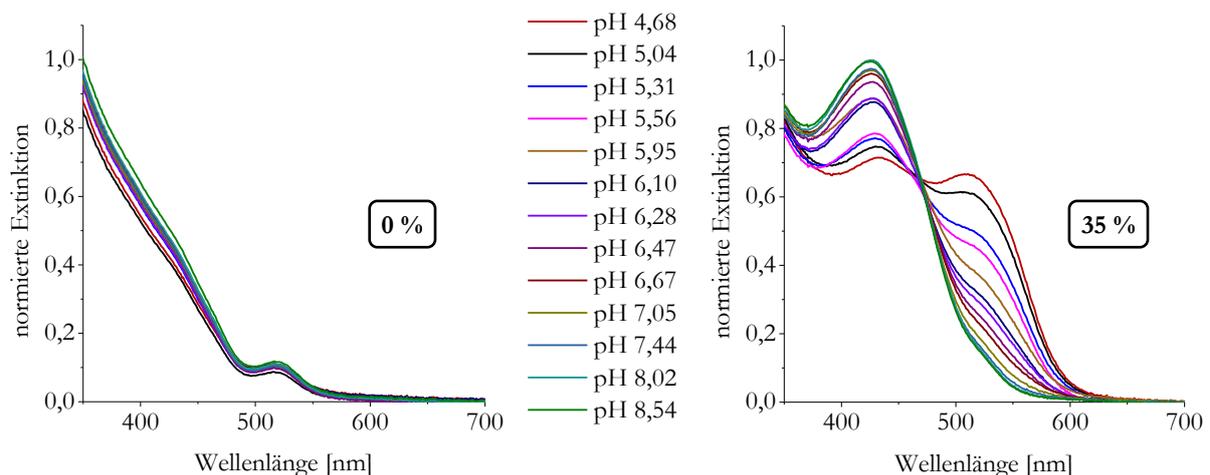


**Abbildung 6.33:** Fluoreszenzabklingverhalten von QDQR-PI-*b*-PEO-(IAFG)-Konstrukten im sauren (pH 5,13) und basischen (pH 8,02) Milieu. Die Blindprobe, welche ausschließlich mit PI-*b*-PEO ohne IAFG-Funktion verkapselt wurde, zeigt konstante Fluoreszenzabklingzeiten. Die Konstrukte mit 25 % und 35 % PI-*b*-PEO-IAFG zeigen bereits im basischen (geringer spektraler Überlapp) und deutlicher im sauren Milieu (pH-schaltbarer spektraler Überlapp) eine auf einen FRET zurückzuführende Verkürzung der Fluoreszenzabklingzeiten. Den mit 3,7 ns absolut größten pH-schaltbaren Anteil des Abklingverhaltens zeigt die Probe mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil.

Um die Unterschiede der Fluoreszenzabklingzeiten, beziehungsweise des pH-schaltbaren Anteils (3,0 ns (**A**) zu 2,4 ns (**B**)) zwischen den QDQR-FRET-Systemen mit einem Anteil von jeweils 25 % PI-*b*-PEO-IAFG aus den Experimenten **A** und **B** erklären zu können, müssen mehrere Aspekte berücksichtigt werden. Zunächst sei an dieser Stelle auf die unterschiedlichen Puffer-Lösungen (pH 8,02 **B** anstatt pH 8,54 **A**) hingewiesen, wobei in diesem pH-Bereich jedoch keine Änderung des spektralen Überlapps mehr zu erwarten ist (siehe Abbildung 6.34 rechts). Andere Überlegungen betreffen eher eine allgemeine Vergleichbarkeit der erhaltenen Fluoreszenzabklingzeiten. Eine mögliche Erklärung für Abweichungen zwischen Partikellösungen, die aus der gleichen QDQR-Stammlösung hergestellt wurden, können aus dem Phasentransferprozess resultierende abweichende optische Eigenschaften sein. Allgemein können die Fluoreszenzquantenausbeute und insbesondere die Fluoreszenzlebenszeit durch die in dieser Arbeit angewandte Verkapselungsmethode zwar gut aufrechterhalten werden, dennoch kommt es

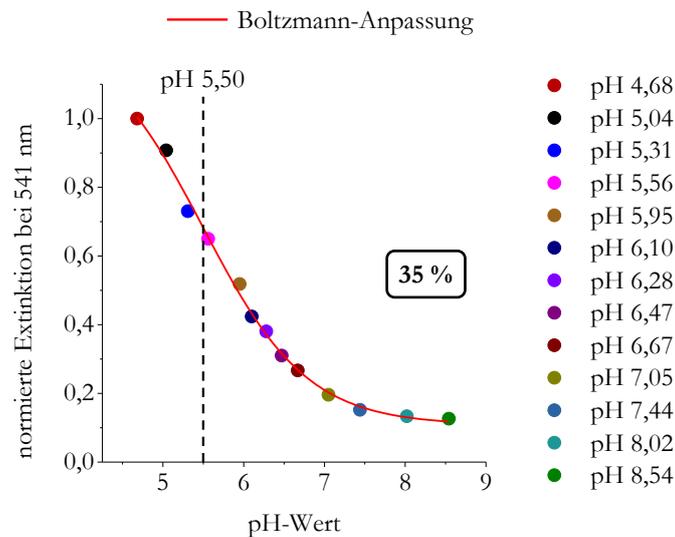
hier zu geringen Variationen zwischen den verkapselten QDQR-Chargen bzw. Verkapselungsreihen. Diesen Variationen liegt vermutlich THF-basiertes Quenching der Partikel und eine geringe jedoch schwankende Anzahl von Partikelclustern, bei denen mehrere QDQRs in einer Mizelle verkapselt sind, zugrunde, die einen Einfluss auf die mittlere Abklingzeit des gesamten Partikelensembles haben können. Die Untersuchung des Fluoreszenzabklingverhaltens verschiedener verkapselter QDQR-Chargen kann daher teils etwas abweichende Fluoreszenzabklingzeiten liefern. Solche Abweichungen werden nicht bei wiederholten Messungen von ein und derselben Partikellösung innerhalb weniger Stunden beobachtet, was ein weiteres Indiz dafür ist, die Hauptursache hier dem Verkapselungsprozess zuzuschreiben.

Die folgende Abbildung 6.34 zeigt die normierte Extinktion sowohl der Blindprobe (**0 %**, links) als auch des QDQR-FRET-Systems mit **35 %** PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil (rechts). Aus dem Spektrum der Blindprobe ist das erste Absorptionsmaximum der QDQRs bei etwa 518 nm analog zu Experiment **A** ( $\rightarrow$ 6.2.1, Abbildung 6.27, links) erneut gut zu erkennen. Ansonsten ist dem Spektrum kein pH-abhängiges Verhalten der Extinktion zu entnehmen. Im Gegensatz dazu zeigen sich beim Spektrum der Konstrukte mit **35 %** PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil eine klare pH-Abhängigkeit der Extinktion und deutlich differenzierbare Absorptionsbanden auch bei kleineren pH-Veränderungen.



**Abbildung 6.34:** Normierte Extinktion der Blindprobe (**0 %**, links) und des QDQR-FRET-Systems mit **35 %** PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil (rechts). Aus dem Spektrum der Blindprobe ist das erste Absorptionsmaximum der QDQRs bei circa 518 nm zu entnehmen und ansonsten keine pH-Abhängigkeit der Extinktion zu beobachten. Das Spektrum des QDQR-FRET-Systems zeigt unverkennbar eine pH-abhängige Extinktion mit gut differenzierbaren Absorptionsbanden auch bei kleineren pH-Schritten.

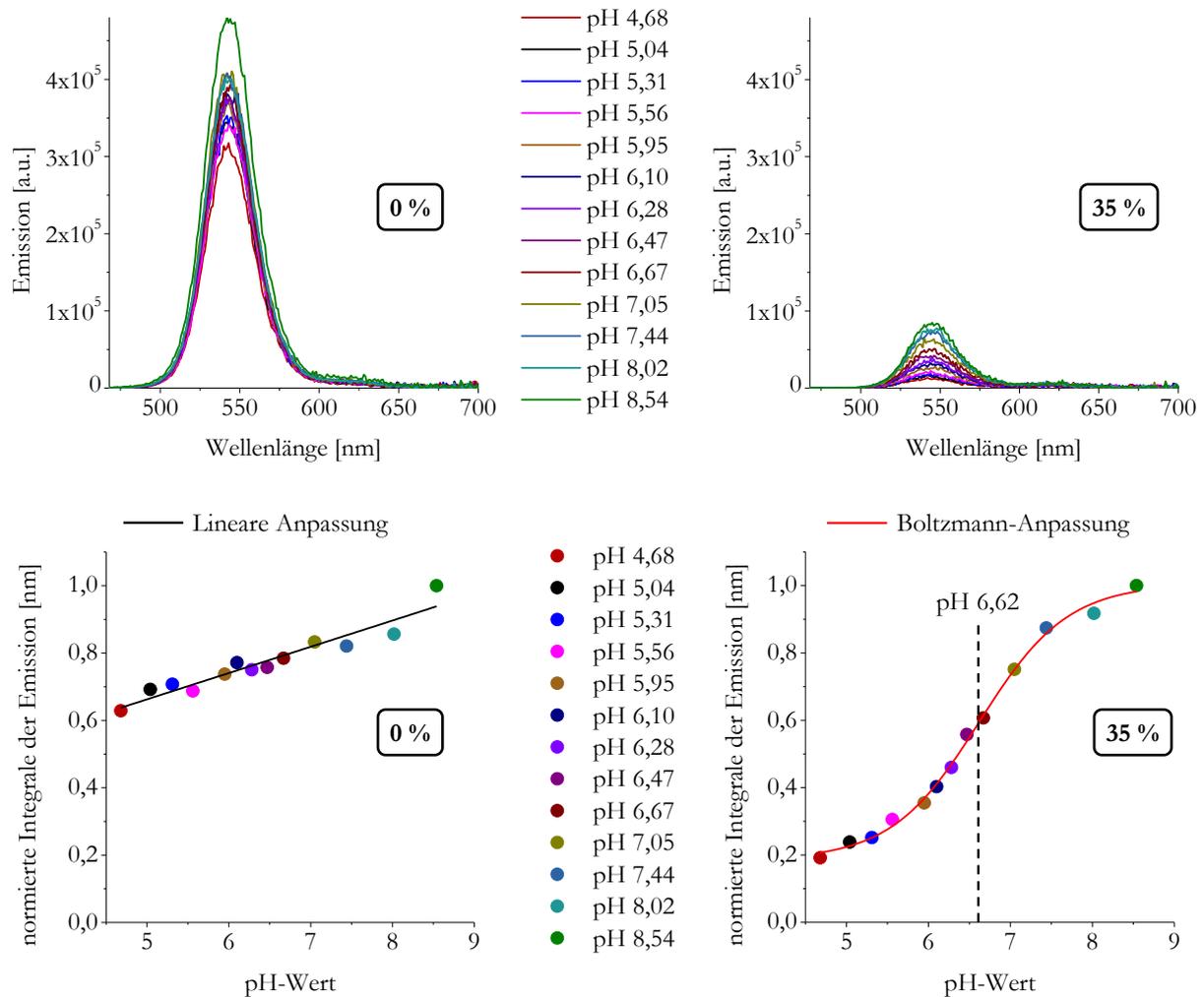
Aus der Auftragung der normierten Extinktionen der FRET-Konstrukte bei 541 nm (Emissionsmaximum der QDQRs, Abbildung 6.35) wird hier über den Wendepunkt einer Boltzmann-Anpassung ein Umschlagspunkt von pH 5,50 erhalten, der deutlich vom Wert (pH 7,10, Abbildung 6.23) des aus den leeren Mizellen bestimmten Umschlagspunkts abweicht. Daher sind auch für das pH-abhängige Quenching der Emission als auch der Fluoreszenzabklingzeiten durch den FRET bzw. das Anwachsen des spektralen Überlapps zwischen QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor niedrigere Umschlagspunkte zu erwarten.



**Abbildung 6.35:** Auftragung der normierten Extinktion der FRET-Konstrukte mit **35 %** PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil gegen die jeweiligen pH-Werte der verwendeten Pufferlösungen. Aus dem Wendepunkt einer Boltzmann-Anpassung kann hier der Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt) bei pH 5,50 bestimmt werden.

Die Untersuchung der Emission in Abbildung 6.36 zeigt für die Blindprobe (**0 %**, oben links) ein etwas stärker pH-anhängiges Verhalten als es für das Pendant aus Experiment **A** ( $\rightarrow$ 6.2.1, Abbildung 6.27, rechts) gemessen wurde, was auf einen geringeren Schutz vor Quenchern durch die Polymerhülle zurückzuführen ist. Wie bereits in diesem Abschnitt beschrieben, kann es durch den Phasentransferprozess zu Variationen bei den optischen Eigenschaften kommen. Ein möglicher Erklärungsansatz könnten hier Ablagerungen in der lamellaren Mischstruktur sein, welche keine absolute Reproduzierbarkeit des Misch- bzw. Einspritzvorgangs erlauben und damit zu einer schwankenden Anzahl intakter QDQR-beladener Mizellen führen würden. Aus der Emulsionspolymerisation würden somit final Konstrukte mit einer abweichenden Hüllendichte resultieren. Die normierten Integrale der Emission (unten links) verdeutlichen das Quenching,

was anscheinend einem linearen Zusammenhang zwischen pH-Wert und Emission folgt und welches hier stärker ausfällt als in Experiment **A** (→6.2.1, Abbildung 6.28, links).



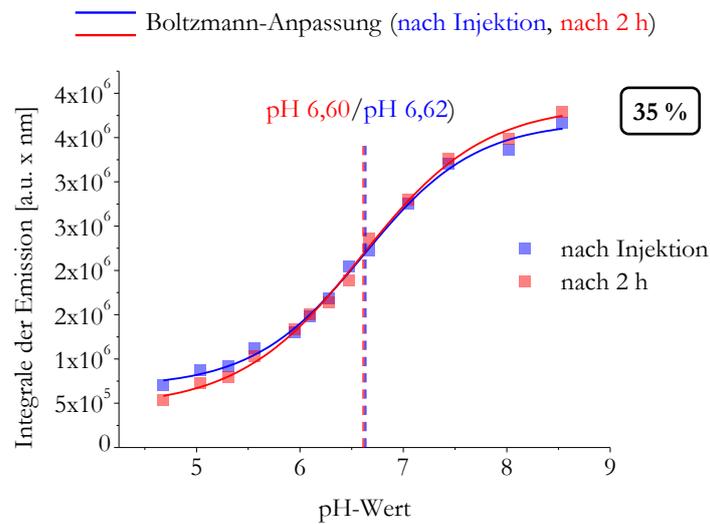
**Abbildung 6.36:** Emission (a.u.) der Blindprobe (0 %, oben links) und der FRET-Konstrukte (oben rechts) mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen sowie die normierten Integrale der Emission dieser beiden Proben (unten). Die Blindprobe zeigt bereits eine pH-Abhängigkeit der Extinktion, welche jedoch geringer ausfällt als die des FRET-Systems und bei genauerer Betrachtung durch die normierten Integrale der Emission näherungsweise einer linearen Anpassung folgt (unten links). Dies belegt eine bestimmte Durchlässigkeit der Polymerhülle für Quencher. Bei den FRET-Konstrukten kann allgemein eine deutliche Abnahme der Emission im Vergleich zur Blindprobe durch den bereits im Basischen vorliegenden geringen spektralen Überlapp beobachtet werden. Zudem ist auch ein sehr viel stärker pH-responsives Verhalten besonders durch die normierten Integrale der Emission (unten rechts) zu beobachten. Die gemessenen Werte folgen hier einer Boltzmann-Anpassung, wobei ein Umschlagspunkt von pH 6,62 aus dem Wendepunkt erhalten wird.

Die Emission des QDQR-FRET-Systems mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG Anteil (oben rechts) zeigt ein ähnliches Verhalten wie die Konstrukte aus Experiment **A** (→6.2.1, Abbildung 6.30, mittlere Reihe). Zum einen ist erneut eine allgemein starke Abnahme der Emission gegenüber der

Blindprobe durch den bereits im Basischen vorliegenden geringen spektralen Überlapp zwischen QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor zu beobachten und zum anderen zeigt sich eine stark ausgeprägte pH-Abhängigkeit. Diese wird durch die normierten Integrale der Emissionsspektren (unten rechts) besonders hervorgehoben, wobei hier im Gegensatz zur Blindprobe die gemessenen Werte einer Boltzmann-Anpassung folgen und die Emissionen bei den jeweiligen pH-Werten besser voneinander zu unterscheiden sind. Das deutlich pH-responsivere Verhalten der Emission ist hier auf den zunehmenden FRET mit sinkenden pH-Werten durch den anwachsenden spektralen Überlapp zurückzuführen. Dieser und sonstige Quenchingprozesse werden im vorliegenden Abschnitt später ausführlicher diskutiert (Abbildung 6.39, Abbildung 6.40). Aus dem Wendepunkt der Boltzmann-Anpassung ergibt sich ein Umschlagspunkt bei pH 6,62. Dieser weicht zwar vom ermittelten Wert (pH 7,10, Abbildung 6.23) für die leeren Mizellen ab, zeigt jedoch eine signifikante Verschiebung in Richtung des physiologisch relevanten Bereichs ( $\approx$ pH 7-7,4) gegenüber dem aus der Extinktion bei 541 nm bestimmten Wert (pH 5,50, Abbildung 6.35).

Das QDQR-FRET-System mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil wurde auch hinsichtlich seiner Fluoreszenzstabilität untersucht, wobei die Emission der Proben aus Abbildung 6.36 rechts nach 2 h erneut gemessen wurde. In Abbildung 6.37 werden die (nicht-normierten) Integrale der Emission der beiden Messreihen in einem Spektrum dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die Emissionen der Proben direkt nach Injektion (blau) und nach 2 h (rot) für sämtliche pH-Werte nahezu identisch sind. Es lassen sich lediglich marginale Abweichungen beobachten, welche jedoch zu gering ausfallen, um eine Diskussionsgrundlage zu bieten. Allgemein kann hier von zeitlich stabiler Fluoreszenz der Proben ausgegangen werden, weshalb sich die Löschprozesse unmittelbar bei der Injektion zu ereignen scheinen. Neben der Fluoreszenzlöschung durch den FRET, wodurch die Auftragung der Integrale der Emission gegen den pH-Wert erneut einer Boltzmann-Anpassung folgen, wirkt sich daher der Einfluss einer erhöhten Quencherkonzentration anscheinend ebenfalls direkt bei Injektion auf die Konstrukte aus. Die für Abbildung 6.36 diskutierte abweichende Hüllendichte der Konstrukte kann hier erneut eine mögliche Erklärung liefern. Durch Injektion der verkapselten QDQRs in die jeweilige pH-Pufferlösung geraten die Partikel in ein Umfeld mit schlagartig ansteigender Protonenkonzentration, wodurch die Fluoreszenz gerade solcher Konstrukte mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Polymerhülle pH-abhängig direkt gelöscht wird. Daher sind nach 2 h keine weiteren Veränderungen der Emission zu beobachten. Aus den Boltzmann-Anpassungen ergeben sich Umschlagspunkte von pH 6,60 (nach Injektion) und pH 6,62 (nach 2 h), welche aufgrund von

Messfehlern als gleich angesehen werden können und somit ebenfalls für die Fluoreszenzstabilität des Systems sprechen.

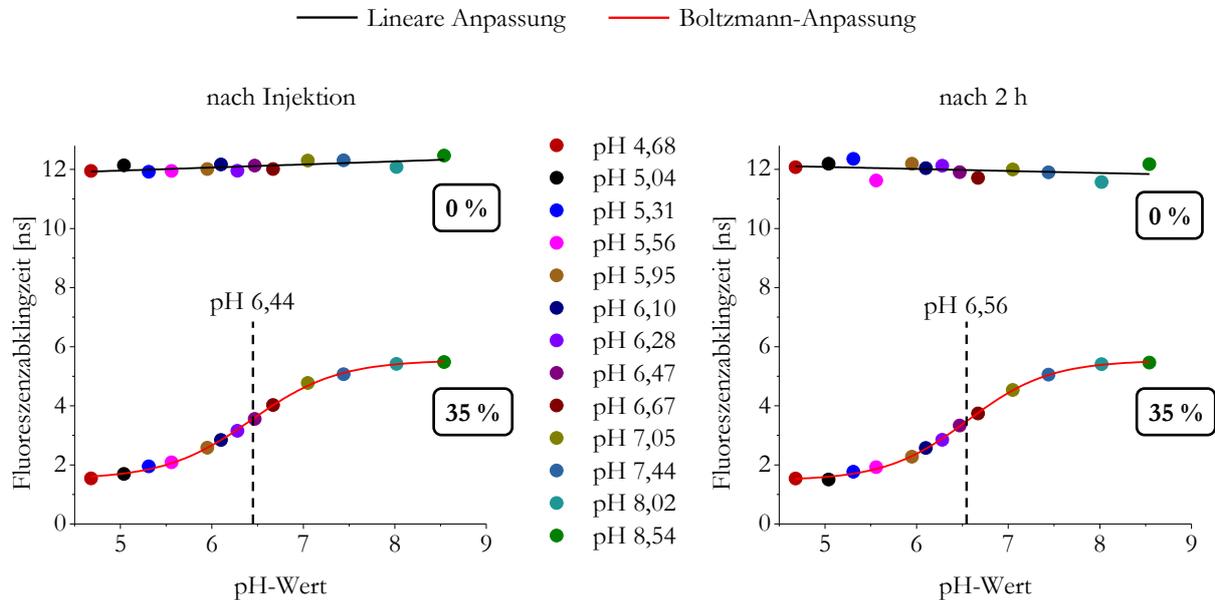


**Abbildung 6.37:** Integrale der Emission des QDQR-FRET-Systems mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil unmittelbar nach Injektion in die jeweiligen Pufferlösungen (blau) und nach 2 h (rot). Es sind nur marginale Abweichungen zwischen den Messreihen zu erkennen, weshalb die Emission hier als stabil angenommen werden kann. Sowohl das Quenching durch den pH-abhängigen FRET als auch durch die erhöhte Protonenkonzentration bei sinkenden pH-Werten scheinen sich daher direkt nach Injektion zu ereignen.

Die aus den Zerfallskurven gewonnenen Fluoreszenzabklingzeiten der Blindprobe (0 %) sowie der Konstrukte mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil werden in Abbildung 6.38 gegen unterschiedliche pH-Werte aufgetragen. Dabei werden zusätzlich die Abklingzeiten der zweiten Messreihe die zwei Stunden nach Injektion durchgeführt wurde dargestellt. Allgemein zeigen sich hier etwas längere Fluoreszenzabklingzeiten, als im Vorversuch zu Beginn dieses Abschnitts (Abbildung 6.33) oder beim vorangegangenen Experiment **A** (→6.2.1, Abbildung 6.32). Der wesentliche experimentelle Unterschied waren hier die längeren Detektionszeiten, wodurch jeweils eine größere Anzahl von Ereignissen detektiert wurde. Dies hat neben den zu Beginn dieses Abschnitts diskutierten Ursachen für abweichende Abklingzeiten einen Einfluss auf die resultierenden Zerfallskurven und kann damit eine Auswirkung auf die biexponentiellen Anpassungen haben.

Die Blindprobe zeigt analog zu Experiment **A** (→6.2.1, Abbildung 6.32) bei beiden Messreihen stabile Fluoreszenzabklingzeiten die jeweils einer linearen Anpassung folgen, welche mit 0,1 ns/pH nach Injektion und -0,07 ns/pH nach 2 h zu vernachlässigende Steigungen besitzen. Somit ist kein Löschvorgang der Fluoreszenzabklingzeiten der Blindprobe durch Erhöhung der Quencher- bzw. Protonenkonzentration nachzuweisen. Der direkte Vergleich der beiden

Blindproben-Messreihen zeigt auch untereinander keine signifikanten Änderungen des Abklingverhaltens.

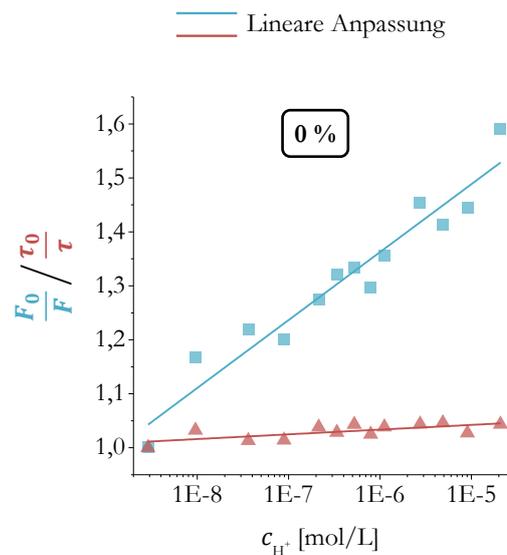


**Abbildung 6.38:** Die Fluoreszenzabklingzeiten der Blindprobe (0 %) zeigen weder direkt nach Injektion noch nach 2 h eine pH-Abhängigkeit, wobei die Steigung der jeweiligen linearen Anpassung marginal ist und als  $\approx 0$  ns/pH angenommen werden kann. Des Weiteren sind keine signifikanten Unterschiede der Fluoreszenzabklingzeiten nach Injektion und nach 2 h zu beobachten. Für die FRET-Konstrukte mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil zeigt sich grundsätzlich eine starke Verkürzung der Fluoreszenzabklingzeiten gegenüber der Blindprobe, welche auf den geringen spektralen Überlapp zwischen QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor bei hohen pH-Werten und dem daraus resultierenden FRET zurückzuführen ist. Darüber hinaus kann eine deutliche pH-responsive Verkürzung der Fluoreszenzabklingzeiten, die jeweils einer Boltzmann-Anpassung folgen, durch den pH-schaltbaren spektralen Überlapp und der daraus resultierenden erhöhten FRET-Effizienz beobachtet werden. Der Vergleich der Abklingzeiten unmittelbar nach Injektion und nach 2 h zeigt auch für die FRET-Konstrukte keine signifikanten Unterschiede, was durch die Umschlagspunkte aus den Wendepunkten der Boltzmann-Anpassung mit pH 6,44 (nach Injektion) und pH 6,56 (nach 2 h) bestätigt wird.

Für die Konstrukte mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil wird hier allgemein eine starke Verkürzung der Fluoreszenzabklingzeiten gegenüber der Blindprobe durch den bereits im Basischen vorliegenden spektralen Überlapp zwischen QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor beobachtet ( $\rightarrow$ 6.1.4, Abbildung 6.21 (b), rot). Darüber hinaus bewirkt der halochrome Effekt der IAFG erneut eine ausgeprägte pH-Responsivität des FRETs, was sich in deutlich verkürzten Abklingzeiten bei höheren Protonenkonzentrationen widerspiegelt und bereits in Experiment A ( $\rightarrow$ 6.2.1, Abbildung 6.32) und auch am Anfang dieses Abschnitts beobachtet wurde (Abbildung 6.33). Die Fluoreszenzabklingzeiten in Abhängigkeit vom pH-Wert folgen dabei einer Boltzmann-Anpassung und zeigen auch hier keine Änderung nach 2 h. Dies lässt darauf schließen, dass der Löschprozess durch den pH-schaltbaren FRET aufgrund des anwachsenden spektralen Überlapps ( $\rightarrow$ 6.1.4, Abbildung 6.21 (b), blau) bei erhöhter Protonenkonzentration

direkt nach Injektion stattfindet. Die aus den Boltzmann-Anpassungen erhaltenen Umschlagspunkte bekräftigen diese Annahme. Hier wurden für die Messreihen direkt nach Injektion und nach 2 h Umschlagspunkte von pH 6,44 und pH 6,56 ermittelt, welche unter Berücksichtigung gewisser Messfehler als nahezu gleich angesehen werden können. Des Weiteren decken sich die Umschlagspunkte gut mit dem aus den Integralen der Emission bestimmten Wert von pH 6,62 (Abbildung 6.36, unten rechts) und zeigen damit eine vergleichbare Verschiebung Richtung physiologisch relevanten Bereich gegenüber dem anfänglich aus der Extinktion bei 541 nm bestimmten Wert von pH 5,50 (Abbildung 6.35).

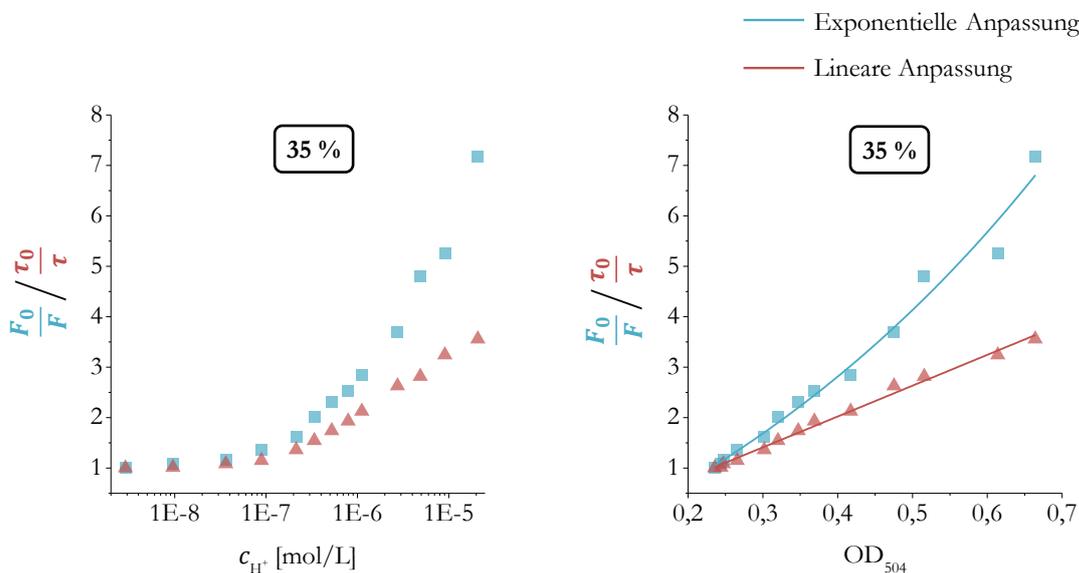
Um Löschprozesse zu differenzieren, können Stern-Vollmer-Auftragungen der Fluoreszenz (Emission) und der Fluoreszenzabklingzeit herangezogen werden. Diese erlauben eine Aussage über den jeweils vorliegenden Quenchingvorgang ( $\rightarrow$ 4.1.4). In Abbildung 6.39 wird solch eine Auftragung für die Blindprobe (0 %) dargestellt. Die Fluoreszenz (Integrale der Emission) bei der geringsten Quencher- bzw. Protonenkonzentration (höchster pH-Wert) wird dabei als  $F_0$  gesetzt, durch die Fluoreszenz  $F$  bei den jeweiligen pH-Werten geteilt und der erhaltene Quotient (aquamarin) gegen die Protonenkonzentration  $c_{\text{H}^+}$  aufgetragen. Zusätzlich wird die Fluoreszenzabklingzeit beim höchsten pH-Wert und damit verbunden geringsten spektralen Überlapp als  $\tau_0$  angenommen und wiederum durch die Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  bei den jeweiligen pH-Werten geteilt. Der resultierende Quotient (rot) wird ebenfalls gegen  $c_{\text{H}^+}$  aufgetragen. Die Quencherkonzentrationen  $c_{\text{H}^+}$  werden durch die pH-Werte der Pufferlösungen repräsentiert, weshalb hier eine logarithmische (dekadisch) Skalierung der Protonenkonzentration gewählt wurde, im Gegensatz zu der für eine Stern-Vollmer-Auftragung üblichen linearen Quencher-Skala. Bereits die Auftragung der normierten Integrale der Emission gegen den pH-Wert (Abbildung 6.36, unten links) zeigte für die Blindprobe eine lineare Abhängigkeit. In diesem Fall kann für  $\frac{F_0}{F}$  gegen die logarithmische Protonenkonzentration erneut ein Quenchingverhalten beobachtet werden, welches einer linearen Anpassung (aquamarin) mit positiver Steigung folgt. Die Fluoreszenzabklingzeiten der Blindprobe konnten in Abbildung 6.38 bereits als konstant angesehen werden, weshalb die Auftragung von  $\frac{\tau_0}{\tau}$  gegen die logarithmische Quencherkonzentration hier wie zu erwarten einer linearen Anpassung (rot) folgt, deren Steigung als  $\approx 0 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  angenommen werden kann. Insgesamt zeigt die Blindprobe damit nach Stern-Vollmer statisches Quenching ( $\rightarrow$ 4.1.4, Abbildung 4.8), welches auf Komplexbildung bzw. dauerhaftes Löschen der Fluoreszenz eines bestimmten Teils des QDQR-Gesamtensembles zurückzuführen ist. Die Fluoreszenzabklingzeit bleibt, wie auch hier zu beobachten, bei statischem Quenching unverändert, da keine dynamischen Löschprozesse stattfinden.



**Abbildung 6.39:** Stern-Vollmer-Auftragung für die Blindprobe mit **0 %** PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil mit logarithmischer Skalierung der Quencherkonzentration  $c_{\text{H}^+}$ . Für das Löschverhalten der Fluoreszenz (Integrale der Emission) kann durch Auftragung von  $\frac{F_0}{F}$  gegen  $c_{\text{H}^+}$  (aquamarin) ein Anstieg beobachtet werden, der einer linearen Anpassung (aquamarin) folgt. Die Auftragung von  $\frac{\tau_0}{\tau}$  gegen  $c_{\text{H}^+}$  (rot) zeigt für die Fluoreszenzabklingzeit keine signifikante Änderung bei verschiedenen Quencherkonzentrationen, weshalb die Quotienten einer linearen Anpassung (rot) folgen, deren Steigung als  $\approx 0 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  angenommen werden kann. Insgesamt entsprechen die Auftragnungen damit dem Löschverhalten von statischem Quenching.

In Abbildung 6.40 werden Stern-Vollmer-Auftragnungen für das QDQR-FRET-System mit **35 %** PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil dargestellt. Dabei werden auf der linken Seite  $\frac{F_0}{F}$  und  $\frac{\tau_0}{\tau}$  analog zur vorangegangenen Diskussion des Löschverhaltens der Blindprobe gegen die Quencherkonzentration  $c_{\text{H}^+}$  mit logarithmischer (dekadisch) Skalierung aufgetragen. Ab einer Protonenkonzentration von  $8,91 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}$  (pH 7,05) lässt sich hier eine deutliche Steigerung des Löschverhaltens sowohl der Fluoreszenz als auch der Fluoreszenzabklingzeit beobachten. Die Ursache hierfür ist der pH-schaltbare Anteil des spektralen Überlapps zwischen QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor und die daraus resultierende Zunahme der FRET-Effizienz. Aus Abbildung 6.34 (rechts) geht hervor, dass gerade ab pH 7,05 eine signifikante Zunahme der Extinktion der FRET-Konstrukte mit sinkenden pH-Werten beginnt. Etwa in diesem Bereich kann hier für die Fluoreszenz eine exponentielle und für die Fluoreszenzabklingzeit eine lineare Zunahme des Löschverhaltens beobachtet werden, was nach Stern-Vollmer auf gemischtes Quenching ( $\rightarrow$ 4.1.4, Abbildung 4.9) hinweist. Da es sich beim Förster-Resonanzenergietransfer um einen dynamischen Quenchingprozess ( $\rightarrow$ 4.1.4, Abbildung 4.7,  $\rightarrow$ 4.1.5) handelt und hier wie bei der Blindprobe zusätzlich von statischem Quenching ausgegangen werden muss, entspricht das

beobachtete Löscherhalten den Erwartungen. Die Auftragung von  $\frac{F_0}{F}$  und  $\frac{\tau_0}{\tau}$  gegen die optische Dichte (OD) bei 504 nm ( $\lambda_{\max(s)}$  von PI-*b*-PEO-IAFG) auf der rechten Seite unterstützt diese Annahme. Dabei zeigt das Löscherhalten der Fluoreszenzintensität eine exponentielle Zunahme während für die Fluoreszenzabklingzeiten ein linearer Trend erkennbar ist. Die Zunahme der OD basiert einzig auf dem halochromen Effekt der IAFG, weshalb sich Datenpunkte für basische pH-Werte überlagern, da hier noch keine bathochrome Verschiebung auftritt (Abbildung 6.34, rechts, pH-Werte: 8,54; 8,02; 7,44), die zu einem FRET-basierten Quenching führt.



**Abbildung 6.40:** Stern-Vollmer-Auftragungen für das QDQR-FRET-System mit 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil gegen die Quencherkonzentration  $c_{H^+}$  (links, logarithmische Skalierung) und die optische Dichte bei 504 nm (rechts, 504 nm =  $\lambda_{\max(s)}$  von PI-*b*-PEO-IAFG). Die Auftragung von  $\frac{F_0}{F}$  und  $\frac{\tau_0}{\tau}$  gegen  $c_{H^+}$  zeigt ab  $8,91 \cdot 10^{-8}$  mol/L (pH 7,05) einen deutlichen Anstieg des Löscherhaltens sowohl der Fluoreszenz als auch der Fluoreszenzabklingzeit. Durch zunehmende Protonenkonzentration und damit einhergehend den halochromen Effekt der IAFG erfährt der spektrale Überlapp zwischen QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor einen Zuwachs, welcher die FRET-Effizienz steigert. Da beim FRET ein dynamischer Quenchingprozess vorliegt, ergibt sich mit dem statischen Quenching, welches für die Blindprobe gezeigt wurde und hier ebenfalls angenommen werden kann, insgesamt ein gemischtes Quenching. Die Auftragung von  $\frac{F_0}{F}$  und  $\frac{\tau_0}{\tau}$  gegen die OD bei 504 nm bekräftigt diese Vermutung, da hier das Löscherhalten der Fluoreszenz einer exponentiellen Anpassung folgt und die Fluoreszenzabklingzeit eine gute Übereinstimmung mit einer linearen Anpassung zeigt.

In diesem Abschnitt konnten aus Experiment **B** ( $\rightarrow$ 6.1.5, Tabelle 6.2) durch direkten Vergleich von Konstrukten mit 25 % und 35 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil (Abbildung 6.33) nochmals effizientere QDQR-FRET-Sensoren als im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden. Der deutlich größere pH-schaltbare Anteil der Fluoreszenzabklingzeit der Konstrukte mit 35 %

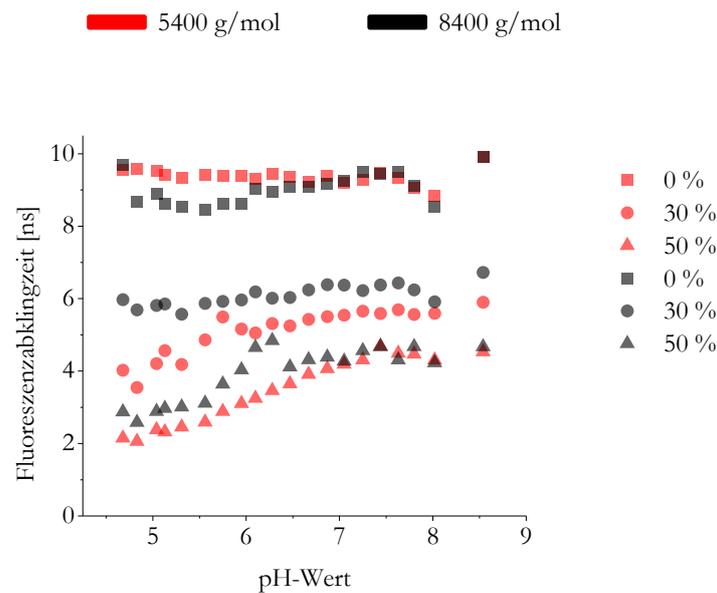
(3,7 ns) im Vergleich zu den Konstrukten mit 25 % PI-*b*-PEO-IAFG-Anteil (2,4 ns) ermöglicht eine bessere Differenzierung von dicht beieinander liegenden pH-Werten. Diese effizienteren FRET-Sensoren wurden anschließend detaillierter auf ihre optischen Eigenschaften hin untersucht. Die abschließende Aufklärung des Löschverhaltens durch die Stern-Vollmer-Auftragungen konnte wie erwartet statisches Quenching für die Blindprobe und gemischtes Quenching für die QDQR-FRET-Konstrukte zeigen. Damit konnte hier nochmals verdeutlicht werden, dass die Beschreibung des FRETs über die Fluoreszenzabklingzeiten präziser ist, da sich statisches Quenching, welches stets zu einem gewissen Teil vorliegt, nur auf die Fluoreszenzintensität (Emission) jedoch nicht auf das Abklingverhalten auswirkt.

Der FRET-Abstand der vorliegenden Konstrukte wird hauptsächlich von der Blockgröße/-länge des hydrophoben PI-Blocks bestimmt ( $\rightarrow$ 6.1.4, Abbildung 6.18), welche somit einen empfindlichen Einfluss auf die Energietransfereffizienz ( $\rightarrow$ 4.1.5, Abbildung 4.10) des FRET-Systems besitzen kann. Im folgenden Abschnitt wird dieser Einfluss näher untersucht. Darüber hinaus werden die Ergebnisse eines ersten physiologischen *in vitro* Zellexperiments unter Verwendung der QDQR-FRET-Sensoren diskutiert.

### 6.2.3 EXPERIMENT C – ABSTANDSVARIATION UND *IN-VITRO*-ZELLAUFNAHME

In Experiment **C** ( $\rightarrow$ 6.1.5, Tabelle 6.2) wurden für den Phasentransfer der QDQRs zwei unterschiedlich große PI-*b*-PEO-(IAFG)s eingesetzt. Dabei wurde neben dem bereits für die Experimente **A** und **B** gewählten PI-*b*-PEO-(IAFG) mit 5400 g/mol das erheblich größere PI-*b*-PEO-(IAFG) mit 8400 g/mol verwendet. Grundsätzlich wird nach Phasentransfer der maßgebliche Anteil des Förster-Radius zwischen QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor aus der Konturlänge ( $\rightarrow$ 6.1.4, Abbildung 6.18) des PI-Blocks im Mizellverband gebildet. Aufgrund des gravierenden Einflusses des Förster-Radius auf die Energietransfereffizienz ( $\rightarrow$ 4.1.5, Abbildung 4.10) wurde daher bei einer Verdopplung der Blockgröße/-länge des PI-Blocks von 1300 g/mol auf 2600 g/mol ein drastisch abgeschwächtes dynamisches Quenching durch den FRET und damit verbunden ein deutlich geringerer Einfluss auf das Abklingverhalten erwartet. In Abbildung 6.41 werden die aus den Zerfallskurven gewonnenen Fluoreszenzabklingzeiten gegen die jeweiligen pH-Werte der Proben aufgetragen. Allgemein zeigt sich eine stärkere Streuung der Messwerte im Vergleich zu den Auftragungen der Experimente **A** und **B** (Abbildung 6.32, Abbildung 6.38), wobei hier Präparationsfehler eine mögliche Erklärung wären. Davon abgesehen, kann erneut eine generelle Abnahme der Fluoreszenzabklingzeiten gegenüber der Blindprobe (0 %) mit steigendem Anteil an PI-*b*-PEO-IAFG (30 %, 50 %) für beide PI-*b*-PEOs

(5400 g/mol (rot) & 8400 g/mol (schwarz)) beobachtet werden, welche auf den bereits im Basischen vorliegenden geringen spektralen Überlapp und dem daraus resultierenden FRET zurückzuführen ist. Des Weiteren ist ebenfalls ein pH-schaltbares Abklingverhalten durch den halochromen Effekt der IAFG und der damit verbundenen Erhöhung des FRETs für beide Polymere bei PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen von 30 % und 50 % zu erkennen, wobei diese pH-Responsivität für das PI-*b*-PEO-(IAFG) mit 8400 g/mol geringer ausfällt.



**Abbildung 6.41:** Fluoreszenzabklingzeiten der Konstrukte aus Experiment **C** mit PI-*b*-PEO 5400 g/mol und 8400 g/mol und PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen von 0 %, 30 % und 50 %. Insgesamt kann ein deutlich verkürztes Abklingverhalten mit steigenden PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen gegenüber der Blindprobe beobachtet werden, welches auf einen geringen spektralen Überlapp bzw. FRET bereits im Basischen zurückzuführen ist. Darüber hinaus ist ein pH-schaltbarer Anteil der Fluoreszenzabklingzeiten für die Konstrukte mit PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen zu beobachten, welcher aus dem halochromen Effekt der IAFG und damit verbunden dem größeren FRET bei höheren Protonenkonzentrationen hervorgeht. Dieses pH-responsive Verhalten fällt beim PI-*b*-PEO mit 8400 g/mol schwächer aus. Die Konstrukte mit dem größeren PI-*b*-PEO-(IAFG) (8400 g/mol) zeigen allgemein keine gravierende Veränderung im Abklingverhalten, obwohl hier eine Verdoppelung der hydrophoben PI-Blöcke vorliegt, welche einen deutlichen Einfluss auf den Förster-Radius haben könnten und dadurch zu einem erheblich abgeschwächten FRET führen würden.

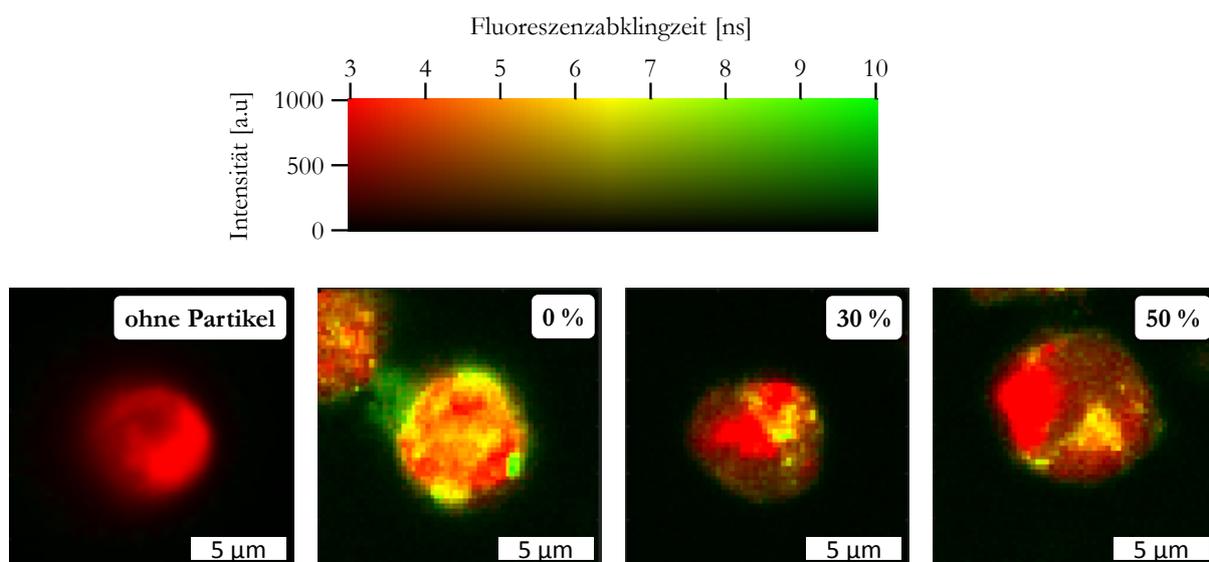
Wie eingangs erwähnt, liegt das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung auf der Variation des Förster-Radius durch die PI-Blocklänge und damit verbunden mit einer deutlichen Abschwächung des FRETs. Diese deutliche Abnahme kann hier jedoch nicht beobachtet werden, auch wenn der Auftragung eine gewisse Tendenz hin zu kürzeren Fluoreszenzabklingzeiten beim kleineren PI-*b*-PEO-(IAFG) (5400 g/mol, 30 %, 50 %) entnommen werden kann. Ein denkbarer Erklärungsansatz für dieses im ersten Moment unerwartete Phänomen wäre ein deutlich gesteigertes Kontraktionsverhalten der PI-Blöcke bei zunehmender Größe. Kürzlich konnten

Koll *et al.*<sup>[98]</sup> zeigen, dass selbst erheblich größere PB-Blöcke beim amphiphilen PB-*b*-PEO nicht zu einer signifikanten Vergrößerung des aus einem Phasentransfer in Wasser resultierenden hydrophoben Mizellkerns führen. Die Molmassen der in dieser Studie verwendeten PB-*b*-PEOs sind mit denen der PI-*b*-PEOs in der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Da PB-*b*-PEO darüber hinaus dem hier verwendeten PI-*b*-PEO strukturell sehr ähnlich ist, kann von vergleichbarem Aggregationsverhalten und von ähnlichen Überstrukturen ausgegangen werden. Daher führt die Verdoppelung der PI-Blockgröße hier vermutlich ebenfalls nicht zu signifikant größeren hydrophoben Mizellkernen. Aus konstanten oder nur marginal veränderten Mizellkerngrößen von PI-*b*-PEO folgt somit auch keine deutliche Veränderung des Förster-Radius zwischen dem QDQR-Donor und dem an der Oberfläche des Mizellkerns lokalisierten IAFG-Akzeptor.

Um eine erste *in vitro* Anwendung der in dieser Arbeit dargestellten QDQR-FRET-Sensoren zu demonstrieren, wurden die Konstrukte mit dem kleineren PI-*b*-PEO-(IAFG) (5400 g/mol, Experiment **C**) gewählt. Dazu wurden Ba/F3 Suspensionszellen mit den Partikellösungen mit unterschiedlichen Anteilen an PI-*b*-PEO-IAFG (0 %, 30 %, 50 %) inkubiert (→8.4.12), wobei hier von einer unspezifischen Aufnahme (Endozytose) der Konstrukte ausgegangen werden kann. Nach Fixieren mit Formalin wurden die Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie untersucht. Bei den Messungen wird der Fokus so variiert, dass schrittweise Aufnahmen vom Substrat bis zum höchstgelegenen Punkt der Zelle bzw. Zelloberfläche erhalten werden. Die in Abbildung 6.42 dargestellten Aufnahmen repräsentieren einen Fokus von 60 % (Höhe) in der vertikalen Achse und somit das Fluoreszenzabklingverhalten aus dem Inneren der Zellen. Die mittleren Fluoreszenzabklingzeiten wurden nach einem anderen Verfahren bestimmt, was jeweils die Hälfte der Flächen unter den Zerfallskurven als Fixpunkt ansetzt und daher nicht direkt mit den in dieser Arbeit ermittelten Abklingzeiten vergleichbar ist.<sup>[7]</sup> Darüber hinaus wurde die Farbgebung anschließend angepasst, um einen möglichst hohen Kontrast zwischen der Autofluoreszenz der Zelle und den Nanopartikeln zu erreichen. Dadurch können Unterschiede im Abklingverhalten der dargestellten Zellaufnahmen verdeutlicht werden.

Die roten Bereiche mit etwa 3 ns Fluoreszenzabklingzeit ergeben sich aus der Autofluoreszenz der Zelle (links, Zelle **ohne Partikel**) und sämtliche übrigen farbigen Bereiche (gelb bis grün) aus der Fluoreszenz der QDQRs. Allgemein kann eine Aufnahme der QDQR-Konstrukte in die Zellen gezeigt werden, wobei für die Konstrukte ohne IAFG (**0 %**) eine breite Verteilung über die Zellkompartimente zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu sind bei den Zellen mit QDQR-FRET-Sensoren (**30 %**, **50 %**) nur in bestimmten Kompartimenten gelbe bis gelb-grüne Färbungen zu erkennen, die auf QDQRs mit entsprechend längeren Abklingzeiten als die

Autofluoreszenz der Zelle zurückzuführen sind. Diese Beobachtung könnte auf den pH-schaltbaren FRET in bestimmten „saurer“ oder Protonen-reicheren Zellkompartimenten hinweisen, wie etwa im Inneren der Endosomen, wobei die Konstrukte unter Verkürzung der Abklingzeiten zur Rotfärbung beitragen würden. Damit wäre prinzipiell der Beleg einer physiologischen Anwendbarkeit der in dieser Arbeit dargestellten QDQR-FRET-Sensoren erbracht. Allerdings muss hier auch die Überlagerung der Abklingzeiten aus der Autofluoreszenz mit dem verkürzten Abklingverhalten der QDQRs durch den bereits im Basischen wirkenden FRET berücksichtigt werden. Dadurch kann die Fluoreszenz bzw. das Fluoreszenzabklingverhalten in Kompartimenten mit geringerer Partikelkonzentration von der Autofluoreszenz der Zelle „überdeckt“ werden. In Anbetracht sämtlicher Aspekte ist eine eindeutige Aussage über die Wirksamkeit der FRET-Sensoren an dieser Stelle somit nicht möglich, da die Färbungen in bestimmten Zellkompartimenten hier auch durch erhöhte Partikelkonzentrationen erklärt werden können.



**Abbildung 6.42:** Fluoreszenzabklingverhalten von Suspensionszellen **ohne Partikel** und nach Aufnahme von QDQR-FRET-Sensoren mit PI-*b*-PEO 5400 g/mol und PI-*b*-PEO-IAFG-Anteilen von **0 %**, **30 %** und **50 %**. Der Fokus ist in der z-Achse auf 60 % zwischen Substrat und etwa höchstem Punkt der Zelle eingestellt, weshalb hier das Abklingverhalten aus dem Inneren der Zellen gezeigt wird. Die Farbgebung ist auf einen möglichst hohen Kontrast der Abklingzeiten aus der Autofluoreszenz der Zelle (rot) und der Fluoreszenz der QDQRs (gelb bis grün) eingestellt, weshalb hier keine direkte Vergleichbarkeit mit zuvor in dieser Arbeit ermittelten Fluoreszenzabklingzeiten gegeben ist. Für alle Konstrukte kann eine Aufnahme in die Zellen beobachtet werden. Die Aufnahme mit den Partikeln ohne IAFG zeigt im Gegensatz zu den QDQR-FRET-Sensoren eine breite Verteilung der QDQRs über die Zellkompartimente. Dass die FRET-Konstrukte nur in bestimmten Teilen der Zelle zu erkennen sind, könnte auf das Quenching in den übrigen Kompartimenten durch eine saurere Umgebung hindeuten. Allerdings ist diese Annahme nicht eindeutig belegbar, da es aufgrund des geringen spektralen Überlapps zwischen QDQR-Donor und IAFG-Akzeptor bereits bei hohen pH-Werten zu einer drastischen Verkürzung der Abklingzeiten durch einen FRET kommt und hier einfach Bereiche mit geringeren Partikelkonzentrationen vorliegen könnten, deren Fluoreszenz (Fluoreszenzabklingzeit) durch die Überlagerung mit der Autofluoreszenz der Zelle zu einer Rotfärbung führen würde. Die gelb bis gelb-grünen Zellkompartimente würden in diesem Fall lediglich Bereiche mit höheren Partikelkonzentrationen widerspiegeln.



## 7 AUSBLICK

Das in der vorliegenden Arbeit erfolgreich dargestellte pH-responsive FRET-System auf Basis von Quantum Dots in Quantum Rods (Donor) und Farbstoff-funktionalisiertem PI-*b*-PEO (Akzeptor) könnte durch diverse Modifikationen effizienter und für ein breiteres Spektrum von Applikationen nutzbar gemacht werden.

Um bei der Untersuchung von Zellen mittels Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie eine schärfere Abgrenzung der FRET-Konstrukte vom Abklingverhalten der Zelle aufgrund der Autofluoreszenz zu gewährleisten, wäre der Einsatz von QDQR-Donoren mit erheblich längeren Fluoreszenzabklingzeiten sinnvoll. Ein anderer Ansatz könnte die Verwendung von Donor-Partikeln (mit entsprechenden Akzeptoren) mit Emissionsmaxima im optischen Fenster<sup>[6]</sup> zwischen 700 - 900 nm sein. Da in diesem Wellenlängenbereich Absorption und Streuung durch Zellen bzw. organisches Gewebe stark gemindert sind, ergibt sich eine deutlich abgeschwächte und somit weniger störende Autofluoreszenz.

Eine naheliegende Modifikation der Akzeptoren wäre der Aufbau von Triphenylmethanfarbstoffen an dem PI-*b*-PEO mit Phenolfunktion, das im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich synthetisiert werden konnte (→6.1.2.2, Abbildung 6.12). Die bekannten Triphenylmethanfarbstoffe decken einen großen Bereich mit unterschiedlichen Absorptionswellenlängen ab und besitzen dazu noch höchst unterschiedliche pH-Umschlagspunkte, weshalb sie in FRET-Systemen auch prinzipiell ein Multiplexing erlauben würden. Des Weiteren könnte beispielsweise durch Verwendung einer Phenolphthalein-Akzeptorgruppe der unerwünschte geringe spektrale Überlapp zum QDQR-Donor bei hohen pH-Werten vollständig unterbunden werden, da dieser Triphenylmethanfarbstoff je nach pH-Wert eine farblose Form besitzt. Neben den pH-Werten gibt es eine Menge anderer medizinisch-physiologisch relevanter Kenngrößen, zu denen beispielsweise auch die Glucosekonzentration zählt. Um diese zu detektieren, wären Saccharid-responsive FRET-Sensoren denkbar, die beispielsweise durch Azofarbstoffaufbau mit bestimmten Phenylboronsäurederivaten<sup>[102]</sup> erhalten werden können. Darüber hinaus wäre das Einbringen etwa von Poly-*N*-Isopropylacrylamid<sup>[103]</sup> (PNIPAM) beim Aufbau der Polymere für den Phasentransfer der QDQRs denkbar, um später Konstrukte mit thermoresponsiven Eigenschaften zu erhalten. Durch den Aufbau von Azofarbstoffen mit nicht-stimuli-responsiver konstanter Absorption (→6.1.4, Abbildung 6.22) an derartigen Polymeren könnte ein FRET einzig durch die thermoresponsive Variation des Förster-Radius erzeugt werden.



## 8 EXPERIMENTELLER TEIL

### 8.1 CHEMIKALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangskemikalien wurden nach Möglichkeit in hoher Reinheit (>98 %) erworben. Notwendige Weiterbehandlungen einiger Chemikalien werden im nächsten Abschnitt (→8.2) erläutert.

**Tabelle 8.1:** Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	angegebene Reinheit
Acetonitril	Sigma-Aldrich	99,8 %
2-Allylphenol	Sigma-Aldrich	98 %
2-Amino-3,5-dinitrothiophen	Sigma-Aldrich	95 %
3-Amino- <i>iso</i> -nicotinsäure	Sigma-Aldrich	95 %
2-Amino-5-nitrothiazol	Sigma-Aldrich	97 %
Anthranilsäure	Alfa Aesar	≥98,0 %
Argon 6.0	Praxair	99,9999 %
Benzophenon	Sigma-Aldrich	99 %
<i>t</i> -Butanol	Sigma-Aldrich	≥99,5 %
<i>n</i> -Butyllithium	Sigma-Aldrich	1,6 M in <i>n</i> -Hexan
<i>s</i> -Butyllithium	Sigma-Aldrich	1,4 M in Cyclohexan
Calciumhydrid	Sigma-Aldrich	>90 %
CANdot Serie A <i>plus</i> Partikel CdSe/CdS, in <i>n</i> -Hexan	Fraunhofer CAN, Hamburg	Quantenausbeute >70 %
Chloroform	VWR	≥99 %, Ethanol stabilisiert (0,4 – 1,0 %)

deutერიertes Chloroform	Eurisotop	>99,5 % D, <0,01 % H <sub>2</sub> O, Silber stabilisiert
Di- <i>n</i> -butylmagnesium	Sigma-Aldrich	1 M in <i>n</i> -Heptan
3,5-Dichlor-anthranilsäure	Sigma-Aldrich	97 %
Dichlormethan	VWR	min. 99 %, Ethanol stabilisiert (1000 ppm)
Diethylether	VWR	≥99 %, BHT stabilisiert (4 – 10 ppm)
Dimethylsulfoxid	Merck	≥99,0 % (GC)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	≥99,5 %
Diphenylmethan	Sigma-Aldrich	99 %
<i>p</i> -Divinylbenzol	Merck	60 – 65 %, Isomerengemisch, BHT stabilisiert (200 ppm)
EDTA Tetranatriumsalz Dihydrat	Sigma-Aldrich	≥99,0 %
(±)-Epichlorhydrin	Sigma-Aldrich	purum, ≥99 % (GC)
Essigsäure	Merck	≥96,0 %
Ethanol	VWR	min. 99,8 %
Ethylenoxid 2.5	Westfalen	99,5 Vol.-%
Ethylvinylether	Sigma-Aldrich	99 %, KOH stabilisiert (0,1 %)
Formaldehyd-Lösung (Formalin)	Carl Roth	≥37,0 %, wässrig, Methanol stabil. (≈10 %)
<i>n</i> -Hexan	VWR	min. 95 %, Isomere min. 98,5 %
5-Iod-anthranilsäure	Sigma-Aldrich	97 %
Isopren	Sigma-Aldrich	99 %, <i>p-tert</i> -Butylcatechol stabilisiert (<1000 ppm)

Kalium	Sigma-Aldrich	98 %
Kaliumcarbonat	Sigma-Aldrich	≥99,0 %
Methanol	VWR	min. 99,5 %
Methylanilin	Sigma-Aldrich	purum, ≥98 % (GC)
Naphthalin	Sigma-Aldrich	≥99,0 % (GC)
Natrium	Sigma-Aldrich	99,9 %
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	≥98,0 %
Natriumhydrogencarbonat	Merck	≥99,0 %
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck	100 %
Natriumnitrit	Fluka	>98 %
Natriumsulfat	Grüssing	99,5 %, wasserfrei
5-Nitro-anthranilsäure	Sigma-Aldrich	95 %
PBS-Pufferlösung (steril)	Carl Roth	287-309 mOsm/kg, pH 7,3-7,5
Propionsäure	Sigma-Aldrich	≥99,5 % (GC)
D(+)-Saccharose	Carl Roth	≥99,5 %, RNase/DNase- frei
Salzsäure	VWR	37 %
Schwefelsäure	Th. Geyer	min. 97,0 %
Styrol	Merck	≥99 %, BHT stabilisiert (200 ppm)
Tetrahydrofuran	VWR	min. 99 %, BHT stabilisiert (250 - 400 ppm)

<i>p</i> -Toluol-sulfonsäure, Monohydrat	Merck	≥99,0 %
2,2,2-Trifluoracetophenon	Sigma-Aldrich	99 %
VA-044	Fujifilm Wako Chemicals	k.A.
Wasserstoffperoxid-Lösung	Fisher Chemical	30 – 32 %, wässrig

Eine Übersichtstabelle sämtlicher Chemikalien mit den zugehörigen Schlüsseln für Sicherheits- und Gefahrenhinweise befindet sich im Anhang (→12.1).

## 8.2 TROCKNEN, FÄLLEN UND BEARBEITEN SPEZIELLER CHEMIKALIEN

### 8.2.1 ISOPREN

Zunächst wurden je ca. 3 mL einer Dibutylmagnesium-Lösung (1,0 M in *n*-Heptan) unter Inertbedingungen vorgelegt und anschließend im Hochvakuum ( $10^{-4}$  mbar) das Lösungsmittel *n*-Heptan entfernt. Zu dem trockenen Dibutylmagnesium wurde anschließend unter Schutzgas und bei 0 °C die jeweils benötigte Menge Isopren hinzugegeben und für etwa 1 h unter weiterem Kühlen gerührt.

### 8.2.2 ETHYLENOXID

Beim Umgang mit Ethylenoxid ist auf spezielle Sicherheitsaspekte zu achten (→ 8.4.2). Im ersten Schritt wurde unter Inertbedingungen eine Messampulle mit etwa 10 Gewichtsprozent Calciumhydrid bezogen auf die gewünschte Menge an Ethylenoxid vorbereitet. Anschließend wurde das Ethylenoxid per Kryodestillation zu dem Calciumhydrid kondensiert. Hierbei, und in den beiden folgenden Kryodestillationen, diente flüssiger Stickstoff als Kältebad. Danach wurde unter Kühlen bei 0 °C (Eisbad) für ca. 1 h gerührt. Im zweiten Trocknungsschritt wurde das Ethylenoxid erneut per Kryodestillation in einen Kolben mit direkt zuvor erzeugtem Natriumspiegel kondensiert und für 1 h bei 0 °C gerührt. Für den letzten Trocknungsschritt wurden zunächst 1,5 mL einer *n*-Butyllithium-Lösung (1,6 M in *n*-Hexan) in eine Messampulle gegeben, das Lösungsmittel *n*-Hexan im Hochvakuum ( $10^{-4}$  mbar) entfernt und abschließend das

Ethylenoxid abermals per Kryodestillation in die Messampulle kondensiert und für 30 min bei 0 °C gerührt.

### **8.2.3 FÄLLEN DER POLYMERE**

#### **8.2.3.1 FÄLLEN VON POLYISOPREN**

Das synthetisierte und gewaschene PI wurde aus Methanol gefällt. Hierzu wurde eine konzentrierte Dichlormethan-Lösung des Polymers in kaltes (-10 °C) Methanol gegossen und anschließend bei -10 °C für 20 min bei 10000 rcf zentrifugiert. Danach wurde das Dichlormethan-Methanol-Gemisch dekantiert und der resultierende Niederschlag erneut in wenig Dichlormethan gelöst. Dieser Fällungsprozess wurde mehrere Male wiederholt.

#### **8.2.3.2 FÄLLEN VON POLYISOPREN-BLOCK-POLYETHYLENOXID**

Im Anschluss an die Synthese und Aufarbeitung durch mehrmaliges Waschen wurde das PI-*b*-PEO aus Diethylether gefällt. Dabei wurde eine konzentrierte Dichlormethan-Lösung des Polymers in kalten (-10 °C) Diethylether gegossen und direkt danach für 10 min bei 10000 rcf und -10 °C zentrifugiert. Als Nächstes wurde das Dichlormethan-Diethylethergemisch dekantiert und der erhaltene Niederschlag abermals in wenig Dichlormethan gelöst. Der Fällungsprozess wurde noch mehrmals wiederholt.

### **8.2.4 POLYMERE**

Nach erfolgreicher Synthese und Aufarbeitung wurden sämtliche Polymere jeweils für mind. 12 h im Hochvakuum ( $10^{-4}$  mbar) getrocknet. Dadurch sollten Wasser- und Lösungsmittelreste möglichst vollständig entfernt werden, um störende Einflüsse auf Folgesynthesen zu begrenzen. Sämtliche Diblockcopolymere wurden anschließend in demin. Wasser gelöst, die Lösung mit einem Kältebad aus flüssigem Stickstoff eingefroren und abschließend lyophilisiert (gefriergetrocknet).

### 8.2.5 TETRAHYDROFURAN

Es wurde kommerziell erhältliches wasserfreies Tetrahydrofuran (Butylhydroxytoluol stabilisiert) mit ca. 200 g Molsieb 4 Å versehen und für etwa 3 Wochen gelagert. Anschließend wurde dem Tetrahydrofuran unter Schutzgasatmosphäre eine Natrium-Kalium-Legierung (flüssig bei Raumtemperatur) beigefügt und das Gemisch für mind. 3 Tage gerührt. Die Zugabe von Benzophenon zeigte abschließend die Abwesenheit von Wasser an (tiefviolette Färbung). Für die Polymersynthesen wurde das trockene THF mittels Kryodestillation in einen ausgeheizten Kolben unter Vakuum überführt.

### 8.2.6 METHYLANILIN

Das Methylanilin wurde vor Verwendung frisch destilliert, da es vom Hersteller bereits mit ersten Anzeichen von Oxidation und Verharzung geliefert wurde, was an einer tiefbraunen Färbung<sup>[104]</sup> zu erkennen war.

### 8.2.7 STYROL UND DIVINYLBENZOL

Vor ihrer Verwendung wurden Styrol und DVB jeweils destilliert, um den Stabilisator Butylhydroxytoluol (BHT) zu entfernen. Dieser besitzt einen störenden Einfluss auf die angestrebte radikalische Emulsionspolymerisation.

## 8.3 VERWENDETE GERÄTE

Sämtliche verwendeten Geräte wurden nach gegenwärtigem Kenntnisstand im Originalzustand belassen.

### 8.3.1 KERNSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE

Die Proben zur NMR-spektroskopischen Untersuchung wurden ausschließlich in deuteriertem Chloroform gelöst. Die Messungen erfolgten an folgenden NMR-Spektrometern der Firma Bruker, wobei Tetramethylsilan (TMS) als interner Standard diente: Avance I 400 (400 MHz <sup>1</sup>H - Resonanzfrequenz), Avance III HD 400 (400 MHz <sup>1</sup>H - Resonanzfrequenz), Avance I 500 (500 MHz <sup>1</sup>H - Resonanzfrequenz), Avance III HD 600 (600 MHz <sup>1</sup>H - Resonanzfrequenz). Die

erhaltenen Rohdaten wurden mit der MestReNova 7.0.1 Analysesoftware von Mestrelab Research S.L. ausgewertet, wobei das Signal des deuterierten Chloroforms bei 7,26 ppm stets als Referenz diente.

### 8.3.2 GELPERMEATIONSSCHROMATOGRAPHIE

Zunächst wurden die Polymerproben in THF gelöst ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) und anschließend mit einem PTFE-Spritzenfilter filtriert.

Die Polymergrößenverteilung wurde über Gelpermeationschromatogramme bestimmt, die mit einem EcoSEC HLC-8320 GPC Gerät von Tosoh aufgenommen wurden. Zur Kalibrierung wurden PEO-Standards des Herstellers PSS verwendet. Bei dem verwendeten GPC System wurde mit drei Trennsäulen mit Porendurchmessern zwischen 50 und 1000 Å bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min und einer Temperatur von 35 °C gearbeitet.

Im Laufe der Arbeit musste aus technischen Gründen auf ein GPC-Ersatzgerät zugegriffen werden. Dabei handelte es sich um ein PSS Agilent Technologies 1260 Infinity System. Bei diesem Gerät wurden allerdings PI-Standards des Herstellers PSS zur Kalibrierung verwendet. Es wurde bei Flussgeschwindigkeiten von 1 mL/min und einer Temperatur von 35 °C gearbeitet.

### 8.3.3 ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE

Zur Bestimmung der Extinktion wurde ein Cary50 Absorptionsspektrometer des Herstellers Varian verwendet. Hierbei lag der untersuchte Spektralbereich zwischen 300 - 700 nm. Sämtliche Proben wurden mit einer Küvette der Schichtdicke 10 mm gemessen, die aus Quarzglas oder Polymethylmethacrylat (PMMA) bestand. Im untersuchten Spektralbereich konnten keine signifikanten Unterschiede in der Absorption der beiden unterschiedlichen Küvettenmaterialien festgestellt werden.

### 8.3.4 EMISSIONSSPEKTROSKOPIE

Die Emission der Proben wurde jeweils mit einem FluoroMax 4 Spektrometer von Horiba/JobinYvon bestimmt. Als Standard wurde Rhodamin 6G verwendet. Die Schichtdicke der Quarzglas- oder PMMA-Küvetten lag bei 10 mm.

### 8.3.5 DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG

Die Messungen der dynamischen Lichtstreuung erfolgten unter Verwendung eines Malvern Zetasizers ZS und die Bestimmung der hydrodynamischen Durchmesser unter Verwendung von Dispersion Technology 5.10 (Malvern). Die für die Proben verwendeten Küvetten aus Quarzglas oder PMMA besaßen eine Schichtdicke von 10 mm.

### 8.3.6 FLUORESCENZLEBENSDAUERSPEKTROSKOPIE

Für die Untersuchung der Fluoreszenzabklingzeiten der Proben der Experimente **A** und **B** (→6.1.5, Tabelle 6.2) wurde ein gepulster Diodenlaser der Firma PicoQuant mit einer Pulsfrequenz von 31,25 Hz bei einer Wellenlänge von 438 nm zur Anregung verwendet. Des Weiteren kam ein PMA.M 185 Photomultiplier von PicoQuant mit einer Zeitauflösung von 250 ps als Detektor zum Einsatz. Zur Aufbereitung des detektierten Signals wurde ein Constant-Fraction 200 MHz Discriminator und ein Time-to-Amplitude Converter von EG&G Ortec benutzt. Die Proben wurden in Küvetten aus Quarzglas oder PMMA gemessen.

Die Fluoreszenzabklingzeiten der Proben des Experiments **C** (→6.1.5, Tabelle 6.2) wurden an einem FluoTime 300 Fluoreszenzlebensdauerspektrometer mit PMA-Hybrid Photonenzähler der Firma PicoQuant gemessen. Dabei diente ein SuperK Fianium Supercontinuum Laser der Firma NKT Photonics als Anregungsquelle. Des Weiteren kam ein LLTF-High-Contrast Bandbreitenfilter der Firma NKT zum Einsatz. Die Anregungswellenlänge lag bei 438 nm. Für die Proben wurden Küvetten aus Quarzglas oder PMMA verwendet, die eine Schichtdicke von 10 mm besaßen. Die Zerfallskurven wurden mit der Software EasyTau2 und mit Origin8.5G bearbeitet, wobei ein biexponentieller Zerfall jeweils die beste Übereinstimmung ergab.

### 8.3.7 FLUORESCENZLEBENSDAUERMİKROSKOPIE

Die Untersuchungen von Zellen mittels Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie wurden unter Verwendung einer 405 nm Laserdiode sowie eines 430 Longpass Filters durchgeführt. Hierbei wurde mit einer Repetier-rate von 2,5 MHz, einer Leistung von 80 nW und einer Auflösung von 128 ps gemessen.

### 8.3.8 PH-METRIE

Die pH-Werte der wässrigen Proben wurden mit einem FiveEasy pH-Meter von Mettler-Toledo gemessen. Um die Messung direkt in den Probenküvetten durchführen zu können, wurde eine InLab Micro pH-Elektrode mit 3 M Kaliumchlorid als Elektrolyt verwendet, die besonders dünn ist.

### 8.3.9 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die TEM-Aufnahmen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV mit einem Jeol JEM-1011 erstellt. Als Probenträger dienten Kupfergrids mit einer amorphen Kohlenstoffbeschichtung.

## 8.4 SYNTHESEN UND AUFREINIGUNGEN

### 8.4.1 STANDARDREAKTIONSBEDINGUNGEN

Die Reaktionen wurden, soweit nicht anders erwähnt, in einem unter Vakuum ausgeheizten (konditionierten) Glaskolben (Borosilikatglas 3.3) unter einer Argon-Atmosphäre durchgeführt. Zugaben erfolgten dabei stets im Argon-Gegenstrom.

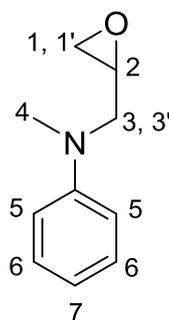
### 8.4.2 SICHERER UMGANG MIT ETHYLENOXID

Bei den Sicherheitsvorkehrungen wurde ein besonderes Augenmerk auf den Umgang mit Ethylenoxid gelegt. Da es sich bei EO um ein toxisches Gas handelt, bei dessen Handhabung höchste Vorsicht geboten ist, muss die Laborausstattung auch Notfallgasmasken enthalten. Bei einer geplanten Kondensation ist im Vorfeld ausreichend für Kühlung zu sorgen, da es bei Erwärmung von EO in geschlossenen Apparaturen ansonsten zu extrem hohen Drücken bis hin zum Bersten von Reaktionsgefäßen kommen kann. Beim Lösen von EO in THF ist die temperaturabhängige Löslichkeit zu beachten.

### 8.4.3 SYNTHESE DES ABRUCHREAGENZES *N*-GLYCIDYL-*N*-METHYLANILIN (GMA)

Es wurde nicht unter Schutzgasatmosphäre und nicht mit konditionierten Kolben nach den Standardreaktionsbedingungen (→8.4.1) gearbeitet. Die Synthese des Abbruchreagenz *N*-Glycidyl-*N*-methylanilin erfolgte nach Eisleb<sup>[81]</sup> mit Modifikation nach Davies und Savige<sup>[82]</sup>, welche lediglich die Zugabe von Wasser im ersten Syntheseschritt umfassen.

Als Erstes wurden 40,0 mL (432 mmol) Epichlorhydrin, 40,0 mL (373 mmol) frisch destilliertes *N*-Methylanilin (→8.2.6), 48 mL Ethanol und 32 mL demin. Wasser in eine Rückflussapparatur gegeben. Danach wurde das Reaktionsgemisch erhitzt und zunächst für 1,5 h bei 110 °C und anschließend noch weitere 30 min bei 120 °C unter Rückfluss gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt war, wurden unter Rühren weitere 32 mL demin. Wasser hinzugegeben. Als Nächstes wurde das Zwischenprodukt zweimal mit je 70 mL Diethylether extrahiert und danach über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Der Ether wurde im Anschluss am Rotationsverdampfer (45 mbar, 50 °C) entfernt. Dem farblosen öligen Zwischenprodukt wurden 60 mL einer kalten wässrigen 50 %igen Natriumhydroxid-Lösung langsam hinzugegeben. Es bildete sich ein weißes hochviskoses Gemisch, das für 2 h gerührt wurde. Um das Rohprodukt zu extrahieren wurden dem Gemisch zunächst 150 mL Wasser beigegeben und die wässrige Lösung danach viermal mit 125 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel dann am Rotationsverdampfer (14 mbar, 40 °C) entfernt. Das Produkt konnte abschließend durch Destillation des Rohprodukts bei 89 °C (0,1 mbar) erhalten werden. Der Destillationssumpf wurde auf bis zu 135 °C erhitzt. Das *N*-Glycidyl-*N*-methylanilin (GMA) wurde unter Argon-Atmosphäre, über Molsieb 4 Å, kühl und unter Ausschluss von Licht gelagert.



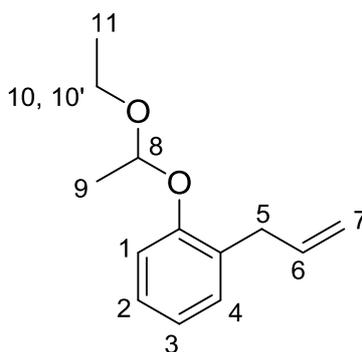
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 7,24 - 7,18$  (m, 2 H, H-6), 6,71 – 6,61 (m, 2 H, H-5; 1 H, H-7), 3,59 – 3,50 (dd,  $J = 15,6$  Hz, 3,2 Hz, 1 H, H-3), 3,34 – 3,25 (dd, 15,6 Hz, 4,8 Hz, 1 H, H-3'), 3,10 – 3,01 (m, 1 H, H-2), 2,90 (s, 3 H, H-4), 2,73 – 2,63 (dd,  $J = 4,8$  Hz, 4 Hz, 1 H, H-1), 2,51 – 2,41 (dd,  $J = 4,8$  Hz, 2,8 Hz, 2 H, H-1').

IUPAC-Bezeichnung: *N*-Methyl-*N*-(2-oxiranylmethyl)anilin

CAS-Nummer: 14236-04-5

#### 8.4.4 SYNTHESE DES ABRUCHREAGENZES 2-(2-(1-ETHOXYETHOXY)BENZYL)OXIRAN (EEBO)

Bei dieser Synthese wurde nicht nach den Standardreaktionsbedingungen ( $\rightarrow$ 8.4.1) gearbeitet. Im ersten Schritt wurden 52,0 mL (398 mmol) 2-Allylphenol mit 150 mL (1,57 mol) Ethylvinylether in einem Reaktionskolben vorgelegt und auf -30 °C abgekühlt. Als Nächstes wurden langsam portionsweise 62,0 mg (326  $\mu\text{mol}$ ) *p*-Toluol-sulfonsäure-Monohydrat zugegeben. Die Reaktionslösung wurde dann durch Entfernen der Kühlung auf RT erwärmt und für 90 min gerührt. Danach wurde mit 150 mL *n*-Hexan verdünnt und die Lösung zunächst dreimal mit 10 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend zweimal mit 10 mL demin. Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde die Lösung über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (<15 mbar) entfernt. Abschließend wurde das Rohprodukt bei  $3,5 \cdot 10^{-2}$  mbar und 60 – 65 °C destilliert (Destillationssumpf 140 °C). Das farblose klare Zwischenprodukt wurde charakterisiert und weiter umgesetzt.

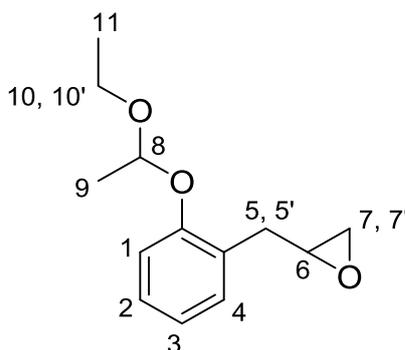


$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 7,20 - 7,14$  (m, 1 H, H-4; 1 H, H-2), 7,03 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1 H, H-1), 6,95 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1 H, H-3), 6,06 – 5,94 (m, 1 H, H-6), 5,42 (q,  $J = 5,2$  Hz, 1 H, H-8), 5,11 – 5,02 (m, 2 H, H-7), 3,82 – 3,72 (m, 1 H, H-10), 3,60 – 3,50 (m, 1 H,

H-10<sup>o</sup>), 3,43 (d,  $J = 6,8$  Hz, 2 H, H-5), 1,52 (d,  $J = 5,6$  Hz, 3 H, H-9), 1,22 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3 H, H-11).

IUPAC-Bezeichnung: 1-Allyl-2-(1-ethoxyethoxy)benzen

Die Synthese des Produkts wurde nach Limnios et al.<sup>[83]</sup> und nicht unter Standardbedingungen ( $\rightarrow$ 8.4.1) durchgeführt. Als Erstes wurden 67,0 mL (325 mmol) des als Zwischenprodukt erhaltenen 1-Allyl-2-(1-ethoxyethoxy)benzen mit 120 mL *t*-Butanol, 120 mL Acetonitril, 4,36 mL (25 mmol) 2,2,2-Trifluoracetophenon und 120 mL einer wässrigen Kaliumcarbonat-EDTA-Pufferlösung (0,6 M Kaliumcarbonat, 40  $\mu$ M EDTA) im Reaktionskolben vorgelegt und gekühlt ( $\approx 10$  °C). Danach wurden 134 mL 30 %ige (1,31 mol) Wasserstoffperoxid-Lösung (kalt,  $\approx 10$  °C) dazugegeben und die Reaktionslösung für 10 min unter weiterem Kühlen gerührt. Anschließend wurde die Kühlung entfernt und die Lösung für weitere 16 h bei RT gerührt. Als Nächstes wurde die wässrige Reaktionslösung fünfmal mit Diethylether extrahiert und die etherische Phase anschließend zweimal mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit demin. Wasser gewaschen. Die etherische Lösung wurde dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und der Diethylether anschließend am Rotationsverdampfer (20 mbar, 60 °C Wasserbad) weitestgehend entfernt. Das Rohprodukt wurde bei 97 °C (155 °C Destillationssumpf) und  $4,8 \cdot 10^{-2}$  mbar destilliert. Das farblose ölige 2-(2-(1-Ethoxyethoxy)benzyl)oxiran wurde unter Argon-Atmosphäre, über Molsieb 4 Å, kühl und unter Ausschluss von Licht gelagert.



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 27 °C, TMS):  $\delta$ [ppm] = 7,25 – 7,17 (m, 1 H, H-4; 1 H, H-2), 7,04 (dd,  $J = 5,2$  Hz, 8,4 Hz, 1 H, H-1), 6,95 (dt,  $J = 1,2$  Hz, 7,2 Hz, 1 H, H-3), 5,45 (q,  $J = 5,2$  Hz, 1 H, H-8), 3,80 – 3,70 (m, 1 H, H-10), 3,60 – 3,49 (m, 1 H, H-10<sup>o</sup>), 3,24 – 3,17 (m, 1 H, H-6),

3,04 – 2,91 (m, 1 H, H-5), 2,88 – 2,75 (m, 1 H, H-7; 1 H, H-5'), 2,61 – 2,55 (m, 1 H, H-7'), 1,52 (dd,  $J = 2,4$  Hz, 5,2 Hz, 3 H, H-9), 1,21 (dt,  $J = 2,4$  Hz, 6,8 Hz, 3 H, H-11).

IUPAC-Bezeichnung: 2-(2-(1-Ethoxyethoxy)benzyl)oxiran

#### 8.4.5 SYNTHESE DES AKTIVIERUNGSREAGENZES DIPHENYLMETHYLKALIUM (DPMK)

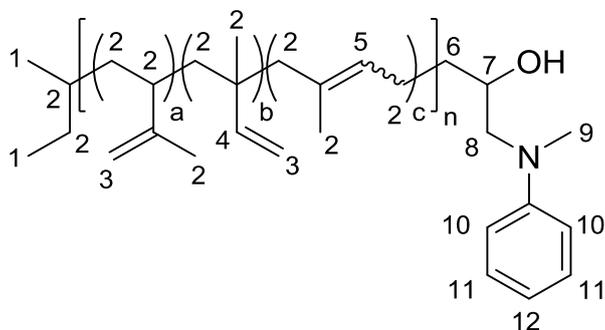
Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur (RT) unter Standardbedingungen ( $\rightarrow$ 8.4.1) durchgeführt. Zu 4,00 g (102 mmol) Kalium wurden 103 mL trockenes THF (getrocknet über Molsieb 4 Å) gegeben. Als Nächstes wurden 13,5 g (105 mmol) Naphthalin hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 66 h gerührt und entwickelte eine dunkelgrüne Färbung. Im letzten Schritt wurden der Naphthylkalium-Lösung 18,0 mL (107 mmol) Diphenylmethan beigefügt. Es wurde abschließend für 66 h gerührt und eine tiefrote Produktlösung erhalten. Die etwa 1 molare Diphenylmethylkalium-Lösung (DPMK-Lösung) wurde direkt zur Aktivierung von PI verwendet. Es wurde keine Aufreinigung oder Analyse durchgeführt.

#### 8.4.6 POLYISOPREN MIT SPEZIFISCHEN FUNKTIONELLEN GRUPPEN

##### 8.4.6.1 SYNTHESE EINES PIS ( $\approx 2600$ G/MOL) MIT METHYLANILIN- UND HYDROXYFUNKTION

Unter Standardbedingungen ( $\rightarrow$ 8.4.1) wurden zunächst etwa 300 mL trockenes THF ( $\rightarrow$ 8.2.5) per Kryodestillation im Reaktionskolben vorgelegt. Anschließend wurden 40,0 mL (400 mmol) trockenes Isopren ( $\rightarrow$ 8.2.1) ebenfalls per Kryodestillation zum THF kondensiert. Die Lösung wurde mit einem Kältebad aus flüssigem Stickstoff auf  $-80$  °C abgekühlt. Als Nächstes wurden sehr rasch 10,8 mL des Initiators *s*-Butyllithium (15,1 mmol, 1,4 M in Cyclohexan) hinzugespritzt. Die zuvor klare farblose Lösung zeigte hierbei schlagartig eine orange-rötliche Färbung auf. Das Reaktionsgemisch wurde bei  $-40$  °C (Ethanolkältebad) für 8 h gerührt, wobei sich mit der Zeit eine gelbe Färbung einstellte. Als Abbruchreagenz dienten danach 2,70 mL (16,6 mmol, etwa 1,1 Äquivalente) GMA ( $\rightarrow$ 8.4.3), die rasch in die Reaktionslösung eingespritzt wurden und die Färbung von gelb zunächst zu grün änderten, bevor die Lösung nach etwa 2 min farblos wurde. Im Anschluss wurde die Lösung noch weitere 12 h gerührt und danach das THF am Rotationsverdampfer weitestgehend entfernt. Der hochviskose Rückstand wurde hinterher in etwa 400 mL Dichlormethan aufgenommen und viermal mit ca. 50 mL demin. Wasser gewaschen. Danach wurde die Lösung über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Dichlormethan bis auf etwa 50 mL am Rotationsverdampfer entfernt. Das Polymer wurde

danach dreimal aus 600 mL kaltem (-10 °C) Methanol gefällt (→8.2.3.1). Als Letztes wurde das Produkt für 12 h im Hochvakuum ( $10^{-4}$  mbar) getrocknet (→8.2.4).



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 7,57 - 7,10$  (m, 2 H, H-11), 7,00 – 6,63 (m, 2 H, H-10; 1 H, H-12), 5,98 – 5,58 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,19 – 4,48 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 4,07 – 3,78 (m, 1 H, H-7), 3,44 – 2,87 (m, 2 H, H-8; 3 H, H-9), 2,32 – 0,88 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2) 0,88 – 0,75 (m, 6 H, H-1).

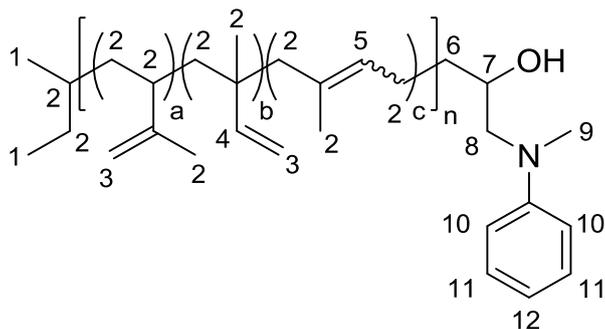
$M_{\text{NMR}} \approx 2600$  g/mol bezogen auf Butylprotonen des Initiators (H-1).

GPC: (PI-Standard)  $M_{\text{W}} = 3960$  g/mol  $M_{\text{N}} = 3556$  g/mol  $M_{\text{W}}/M_{\text{N}} = 1,114$ .

#### 8.4.6.2 SYNTHESE EINES PIs ( $\approx 1300$ G/MOL) MIT METHYLANILIN- UND HYDROXYFUNKTION

Es wurde ein weiteres PI nach gleicher Vorschrift (→8.4.6.1) synthetisiert, wobei lediglich das Lösungsmittelvolumen (THF), die Volumina (Stoffmengen) und vor allem Verhältnisse der Reagenzien angepasst wurden, um eine kürzere Kettenlänge (kleinere Molmasse) zu erhalten.

**Angepasste Volumina:** 250 mL trockenes THF, 30,0 mL (300 mmol) trockenes Isopren, 13,4 mL (18,6 mmol, 1,4 M in Cyclohexan) *s*-Butyllithium, 3,40 mL (20,8 mmol) GMA.



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 7,39 - 7,19$  (m, 2 H, H-11), 6,98 – 6,65 (m, 2 H, H-10; 1 H, H-12), 5,98 – 5,58 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,18 – 4,51 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,98 – 3,75 (m, 1 H, H-7), 3,38 – 2,86 (m, 2 H, H-8; 3 H, H-9), 2,31 – 0,91 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2) 0,91 – 0,75 (m, 6 H, H-1).

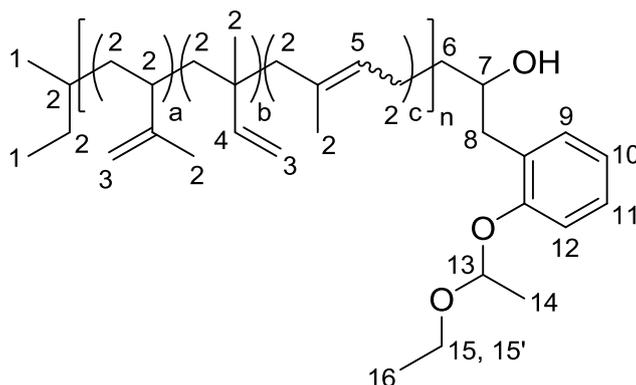
$M_{\text{NMR}} \approx 1300$  g/mol bezogen auf Butylprotonen des Initiators (H-1).

GPC: (PEO-Standard)  $M_w = 1414$  g/mol  $M_n = 1314$  g/mol  $M_w/M_n = 1,076$ .

#### 8.4.6.3 SYNTHESE EINES PIS ( $\approx 1300$ G/MOL) MIT HYDROXY- UND GESCHÜTZTER PHENOLFUNKTION

Die Synthese eines PIs mit Hydroxy- und geschützter Phenolgruppe erfolgte nach gleicher Vorschrift ( $\rightarrow$ 8.4.6.1) wie zuvor. Es wurden Volumina (Stoffmengen) und Verhältnisse der Reagenzien angepasst, um ein Polymer mit kürzerer Kettenlänge zu synthetisieren. Des Weiteren wurde GMA durch EEBO ( $\rightarrow$ 8.4.4) als Abbruchreagenz ersetzt.

**Angepasste Volumina und Abbruchreagenz:** 300 mL trockenes THF, 30,0 mL (300 mmol) trockenes Isopren, 13,4 mL (18,6 mmol, 1,4 M in Cyclohexan) *s*-Butyllithium, 4,50 mL (20,2 mmol) EEBO.



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 7,22 - 7,11$  (m, 1 H, H-9; 1 H, H-12), 7,08 – 7,01 (m, 1 H, H-10), 6,98 – 6,89 (m, 1 H, H-11), 6,00 – 5,58 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,48 – 5,40 (m, 1 H, H-13), 5,17 – 4,48 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,92 – 3,67 (m, 1 H, H-15; 1 H, H-7), 3,59 – 3,47 (m, 1 H, H-15'), 2,98 – 2,53 (m, 2 H, H-8), 2,33 – 0,85 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2; 3 H, H-14; 3 H, H-16) 0,85 – 0,71 (m, 6 H, H-1).

$M_{\text{NMR}} \approx 1300$  g/mol bezogen auf Butylprotonen des Initiators (H-1).

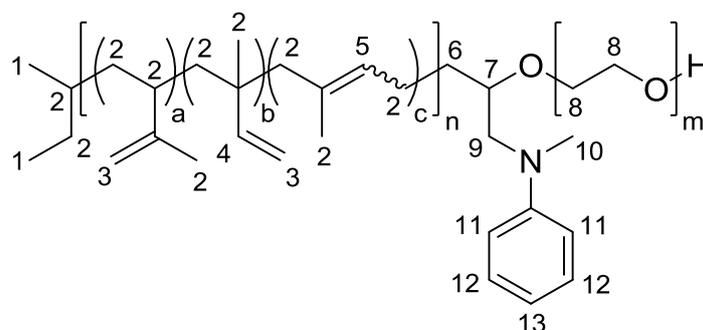
#### 8.4.7 POLYISOPREN-BLOCK-POLYETHYLENOXID MIT SPEZIFISCHEN FUNKTIONELLEN GRUPPEN

##### 8.4.7.1 SYNTHESE EINES PI-B-PEOs ( $\approx 8400$ G/MOL) MIT METHYLANILINFUNKTION

Die Synthese des PI-*b*-PEOs bzw. des PEO-Blocks erfolgte nach den Standardbedingungen ( $\rightarrow$ 8.4.1), wobei ein besonderes Augenmerk auf Sicherheitsaspekte im Umgang mit Ethylenoxid gelegt wurde ( $\rightarrow$ 8.4.2).

Im ersten Schritt wurden 26,0 g (10,0 mmol) des zuvor synthetisierten PIs mit Methylanilin- und endständiger Hydroxyfunktion ( $\rightarrow$ 8.4.6.1) für 2 h bei 50 °C (Wasserbad) intensiv im Hochvakuum ( $10^{-4}$  bar) unter Rühren getrocknet. Als Nächstes wurden zu dem PI 400 mL trockenes THF ( $\rightarrow$ 8.2.5) durch Kryodestillation kondensiert und auf RT erwärmt um das Polymer zu lösen. Die gelbliche Polymerlösung wurde anschließend mit 12 mL (12 mmol) einer 1 M DPMK-Lösung titriert bis sich eine leichte rot-braune Färbung einstellte. Im Anschluss wurde die aktivierte Polymerlösung mit einem Kältebad aus flüssigem Stickstoff 2 h eingefroren und dabei im Hochvakuum ( $10^{-4}$  mbar) entgast. Nach Auftauen der Lösung wurden bei -80 °C (Ethanolkältebad) 59,0 mL (1,19 mol) trockenes EO ( $\rightarrow$ 8.2.2) per Kryodestillation zu dem aktivierten Polymer kondensiert, wobei die Lösung eine gelbe Färbung annahm. Danach wurde

die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch bei RT für 88 h gerührt. Die Lösung verfärbte sich im Verlauf mehrerer Stunden dunkelgrün. Der Abbruch erfolgte durch Zugabe von 1 mL demin. Wasser, wobei sich die Reaktionslösung schlagartig entfärbte. Zur Aufreinigung wurde zunächst das THF am Rotationsverdampfer entfernt und das Polymer anschließend in 500 mL Dichlormethan gelöst. Zunächst wurde die Lösung dann dreimal mit je 50 mL demin. Wasser gewaschen und danach über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wurde, bis auf etwa 100 mL Gesamtvolumen der Lösung, am Rotationsverdampfer entfernt. Im Anschluss wurde das Polymer aus je 1000 mL  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Diethylether viermal gefällt ( $\rightarrow$ 8.2.3.2). Abschließend wurde das Produkt getrocknet ( $\rightarrow$ 8.2.4).



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ , TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 7,87 - 7,08$  (m, 2 H, H-11; 2 H, H-12; 1 H, H-13),  $5,97 - 5,50$  (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4),  $5,10 - 4,47$  (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5),  $3,84 - 3,11$  (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8; 2 H, H-9; 3 H, H-10),  $2,36 - 0,85$  (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2)  $0,85 - 0,71$  (m, 6 H, H-1).

Die Signale der Methylanilingruppe weisen im Vergleich zu den Signalen in der folgenden Synthese ( $\rightarrow$ 8.4.7.2) eine tiefere Verschiebung auf, was auf eine Protonierung des Stickstoffs zurückgeführt wurde.

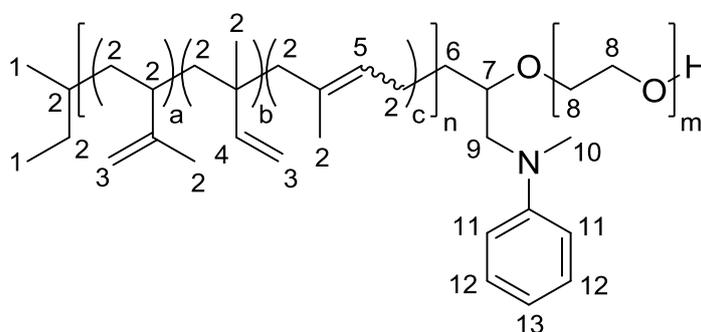
$M_{\text{NMR}} \approx 8400\text{ g/mol}$  bezogen auf Butylprotonen des Initiators (H-1).

GPC: (PI-Standard)  $M_w = 10510\text{ g/mol}$   $M_N = 9681\text{ g/mol}$   $M_w/M_N = 1,086$ .

**8.4.7.2 SYNTHESE EINES PI-B-PEOs ( $\approx 5400$  G/MOL) MIT METHYLANILINFUNKTION**

Bei dieser Synthese wurde nach gleicher Vorschrift ( $\rightarrow$ 8.4.7.1) ein weiteres PI-*b*-PEO synthetisiert. Es wurden lediglich das Lösungsmittelvolumen des THFs und die Volumina (Stoffmengen) und Verhältnisse der Reagenzien angepasst, um eine kürzere Kettenlänge (kleinere Molmasse) zu erhalten. Als Ausgangspolymer diente ein PI ( $\rightarrow$ 8.4.6.2) kürzerer Kettenlänge, das ebenfalls eine Methylanilin- und Hydroxyfunktion besaß.

**Angepasste Volumina und Einwaage:** 300 mL trockenes THF, 18 g (14 mmol) trockenes PI, 15 mL (15 mmol) 1M DPMK-Lösung, 43,0 mL (866 mmol) trockenes Ethylenoxid.



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 7,24 - 7,10$  (m, 2 H, H-12), 6,71 – 6,58 (m, 1 H, H-13; 2 H, H-11), 5,94 – 5,54 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,13 – 4,46 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,85 – 3,24 (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8), 3,00 – 2,88 (m, 3 H, H-10; 1 H, H-9), 2,68 – 2,60 (m, 1 H, H-9), 2,36 – 0,86 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2), 0,86 – 0,71 (m, 6 H, H-1).

$M_{\text{NMR}} \approx 5400$  g/mol bezogen auf Butylprotonen des Initiators (H-1).

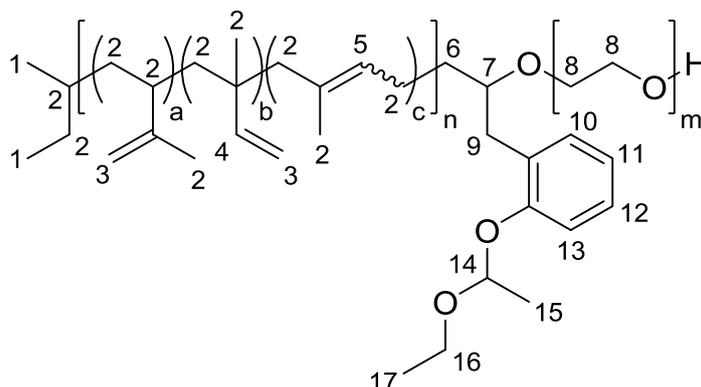
GPC: (PEO-Standard)  $M_w = 5397$  g/mol  $M_N = 5025$  g/mol  $M_w/M_N = 1,074$ .

**8.4.7.3 SYNTHESE EINES PI-B-PEOs ( $\approx 5400$  G/MOL) MIT PHENOLFUNKTION**

Die Synthese wurde abermals nach obiger Vorschrift ( $\rightarrow$ 8.4.7.1) durchgeführt. Erneut wurden Lösungsmittelvolumen sowie die Volumina (Stoffmengen) und Verhältnisse der Reagenzien angepasst, um ein Polymer kleinerer Kettenlänge zu erhalten. Das Ausgangspolymer war in

diesem Fall ein PI ( $\rightarrow$ 8.4.6.3) kürzerer Kettenlänge mit Hydroxy- und geschützter Phenolfunktion.

**Angepasste Volumina und Einwaage:** 300 mL trockenes THF, 12,8 g (9,85 mmol) trockenes PI, 11 mL (11 mmol) 1M DPMK-Lösung, 27,5 mL (554 mmol) trockenes Ethylenoxid.

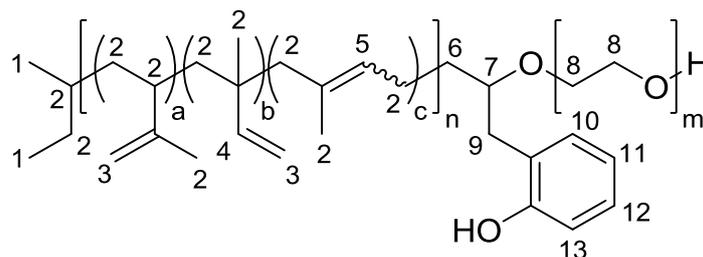


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 7,18 - 7,02$  (m, 1 H, H-10; 1 H, H-13), 7,02 – 6,90 (m, 1 H, H-11), 6,90 – 6,80 (m, 1 H, H-12), 5,96 – 5,52 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,46 – 5,31 (m, 1 H, H-14), 5,13 – 4,47 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,87 – 3,30 (m, 2 H, H-16; 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8;) 2,94 – 2,59 (m, 2 H, H-9), 2,28 – 0,85 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2; 3 H, H-15; 3 H, H-17) 0,85 – 0,71 (m, 6 H, H-1).

$M_{\text{NMR}} \approx 5400$  g/mol bezogen auf Butylprotonen des Initiators (H-1).

GPC: (PI-Standard)  $M_{\text{W}} = 5446$  g/mol  $M_{\text{N}} = 4951$  g/mol  $M_{\text{W}}/M_{\text{N}} = 1,100$ .

Das synthetisierte PI-*b*-PEO wurde nach erfolgter Synthese und Charakterisierung zunächst in 150 mL THF gelöst und anschließend mit 150 mL 4 M Salzsäure versetzt. Das trübe Gemisch wurde für 3 h bei 90 °C (Ölbad) unter Refluxieren gerührt. Danach wurde das THF am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt und die saure Polymerlösung dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden fünfmal mit je 30 mL demin. Wasser gewaschen und im Anschluss über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wurde dann am Rotationsverdampfer bis auf ca. 60 mL entfernt. Abschließend wurde das Polymer dreimal aus je 800 mL kaltem Diethylether gefällt ( $\rightarrow$ 8.2.3.2) und danach getrocknet ( $\rightarrow$ 8.2.4).



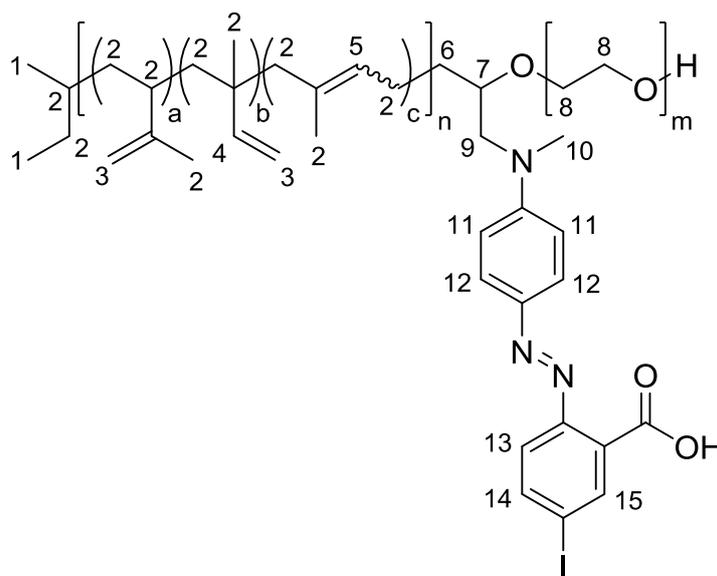
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 7,12 - 7,05$  (m, 1 H, H-10), 7,01 – 6,90 (m, 1 H, H-13), 6,88 – 6,81 (m, 1 H, H-11), 6,80 – 6,72 (m, 1 H, H-12), 5,95 – 5,54 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,13 – 4,47 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,95 – 3,25 (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8); 2,95 – 2,59 (m, 2 H, H-9) 2,28 – 0,85 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2), 0,85 – 0,71 (m, 6 H, H-1).

#### 8.4.8 AZOFARBSTOFFAUFB AU AM PI-*b*-PEO MIT ANTHRANILSÄUREDERIVATEN

##### 8.4.8.1 AZOFARBSTOFFAUFB AU MIT 5-*I*-ANTHRANILSÄURE AN PI-*b*-PEO (8400 G/MOL)

Die Synthese wurde nicht nach den Standardreaktionsbedingungen ( $\rightarrow$ 8.4.1) durchgeführt. Zunächst wurden 5 mL Dimethylsulfoxid und 5 mL Ethanol im Reaktionskolben vorgelegt, 984  $\mu\text{L}$  (11,8 mmol) konzentrierte Salzsäure eingetropft und die Lösung dann im Eisbad ( $<5$  °C) gekühlt. Anschließend wurden 1,59 g (6,05 mmol) 5-Iod-antranilsäure hinzugegeben, die sich vollständig löste. Unter weiterem Kühlen ( $<5$  °C) wurden 415 mg (6,02 mmol) Natriumnitrit zu der Anthranilsäure-Lösung gegeben, woraufhin sich eine rote Färbung der Lösung einstellte. Nach etwa 30 s fing die Lösung an sich einzutrüben und rötlich-beige zu färben. Die entstandene Diazoniumsalz-Lösung wurde 30 min unter weiterem Kühlen ( $<5$  °C) gerührt. In einem anderen Reaktionskolben wurden 1,20 g (143  $\mu\text{mol}$ ) PI-*b*-PEO (8400 g/mol) mit Methylanilinfunktion ( $\rightarrow$ 8.4.7.1) in 80 mL Ethanol gelöst und anschließend im Eisbad gekühlt ( $<5$  °C), wobei Teile des PI-*b*-PEOs als feiner farbloser Niederschlag ausfielen. Die gesamte Diazoniumsalz-Lösung wurde zur Polymerlösung gegeben und zunächst unter weiterem Kühlen ( $<5$  °C) für 42 h und danach für weitere 12 h bei RT weitergerührt. Die Reaktionslösung färbte sich dabei tiefrot. Im Anschluss wurde das Ethanol am Rotationsverdampfer weitestgehend entfernt und das Rohprodukt in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Die tiefrote Dichlormethan-Lösung wurde

zunächst dreimal mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend noch einmal mit demin. Wasser gewaschen. Das Dichlormethan wurde bis auf etwa 3 mL am Rotationsverdampfer entfernt. Hiernach wurde das Polymer aus jeweils 50 mL kaltem (-10 °C) Diethylether viermal gefällt (→8.2.3.2). Im letzten Schritt wurde das tiefrote Produkt getrocknet (→8.2.4).



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 8,69$  (s, 1 H, H-15), 7,91 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1 H, H-14), 7,83 – 7,74 (m, 2 H, H-12), 7,71 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1 H, H-13), 7,00 – 6,87 (m, 2 H, H-11), 5,98 – 5,54 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,17 – 4,40 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,97 – 3,22 (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8; 2 H, H-9; 3 H, H-10), 2,34 – 0,51 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2; 6 H, H-1).

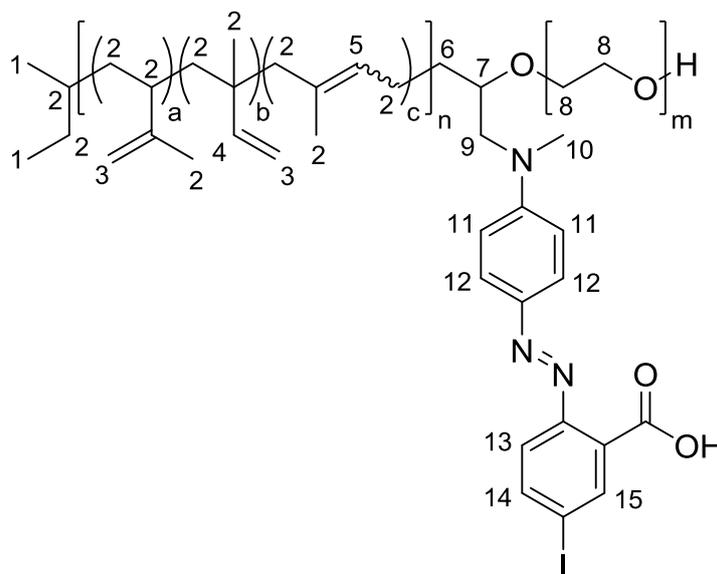
Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt): pH 6,78 (504 nm); pH 7,10 (541 nm)

UV/VIS:  $\lambda_{\text{max(s)}} = 504$  nm;  $\lambda_{\text{max(b)}} = 436$  nm

Extinktionskoeffizient ( $\lambda_{\text{max(s)}} = 504$  nm):  $\varepsilon = 45,3 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

### 8.4.8.2 AZOFARBSTOFFAUFBAU MIT 5-IOD-ANTHRANILSÄURE AN PI-B-PEO ( $\approx 5400$ G/MOL)

Die zuvor beschriebene Synthese ( $\rightarrow$ 8.4.8.1) wurde analog, also mit gleichen Stoffmengenverhältnissen, erneut durchgeführt, wobei hier ein kleineres (kürzeres) PI-*b*-PEO mit Methylanilinfunktion ( $\rightarrow$ 8.4.7.2) verwendet wurde.



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 8,63$  (s, 1 H, H-15), 7,91 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1 H, H-14), 7,83 – 7,74 (m, 2 H, H-12), 7,71 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1 H, H-13), 7,00 – 6,86 (m, 2 H, H-11), 5,96 – 5,55 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,18 – 4,41 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,85 – 3,22 (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8; 2 H, H-9; 3 H, H-10), 2,33 – 0,54 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2; 6 H, H-1).

Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt): pH 6,78 (504 nm); pH 7,10 (541 nm)

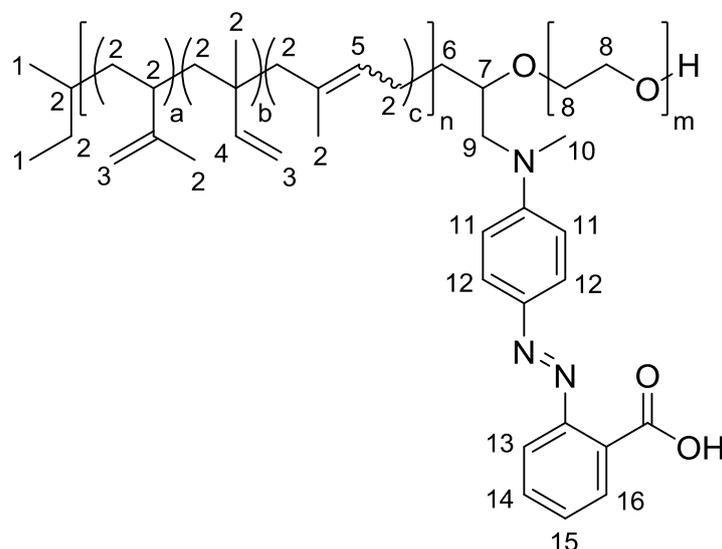
UV/VIS:  $\lambda_{\text{max(s)}} = 504$  nm;  $\lambda_{\text{max(b)}} = 436$  nm

Extinktionskoeffizient ( $\lambda_{\text{max(s)}} = 504$  nm):  $\varepsilon = 45,3 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

### 8.4.8.3 AZOFARBSTOFFAUFBAU MIT ANTHRANILSÄURE

Unter Verwendung von Anthranilsäure wurde nach der oben beschriebenen Anleitung ( $\rightarrow$ 8.4.8.1) mit einem PI-*b*-PEO mit Methylanilinfunktion (5400 g/mol,  $\rightarrow$ 8.4.7.2) eine

Methylrotgruppe aufgebaut. Dabei wurde exakt nach gleicher Durchführung und gleichen Stoffmengenverhältnissen gearbeitet.



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 8,35$  (d,  $J = 8,0$  Hz, 1 H, H-16), 7,99 (d,  $J = 11$  Hz, 1 H, H-13), 7,82 – 7,72 (m, 2 H, H-12), 7,61 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1 H, H-15), 7,50 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1 H, H-14), 6,84 – 6,73 (m, 2 H, H-11), 5,96 – 5,55 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,16 – 4,48 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 4,00 – 3,27 (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8; 1 H, H-9), 3,23 – 3,10 (m, 1 H, H-9; 3 H, H-10), 2,33 – 0,72 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe; H-2, 6 H, H-1).

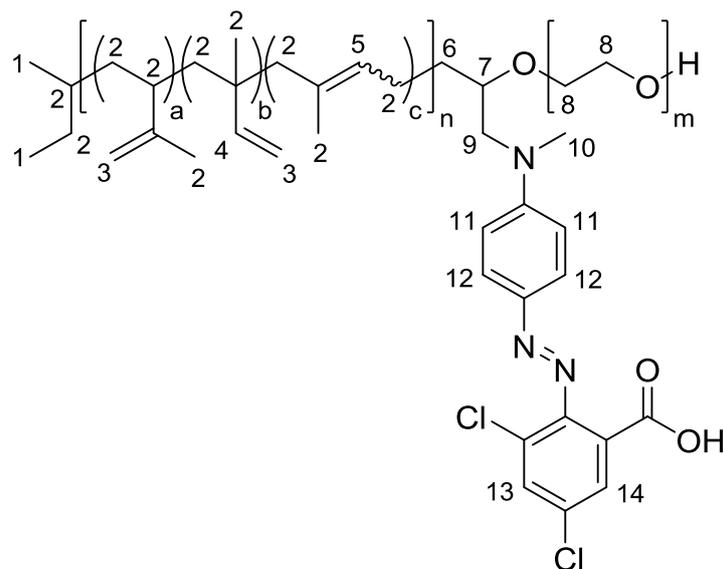
Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt): pH 6,90 (496 nm); 7,04 (525 nm)

UV/VIS:  $\lambda_{\text{max(s)}} = 496$  nm;  $\lambda_{\text{max(b)}} = 417$  nm

Extinktionskoeffizient ( $\lambda_{\text{max(s)}} = 496$  nm):  $\varepsilon = 38,4 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### 8.4.8.4 AZOFARBSTOFFAUFBAU MIT 3,5-DICHLOR-ANTHRANILSÄURE

Die Azofarbstoff-Funktionalisierung von PI-*b*-PEO mit Methylanilinfunktion (5400 g/mol, →8.4.7.2) mit 3,5-Dichloranthranilsäure wurde ebenfalls nach der oben beschriebenen Vorschrift (→8.4.8.1) durchgeführt ohne die Stoffmengenverhältnisse zu ändern.



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 8,11 - 7,45$  (m, 1 H, H-14; 1 H, H-13; 2 H, H-12), 6,90 – 6,76 (m, 2 H, H-11), 5,98 – 5,56 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,17 – 4,49 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 4,07 – 3,06 (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8; 2 H, H-9; 3 H, H-10), 2,35 – 0,62 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2; 6 H, H-1).

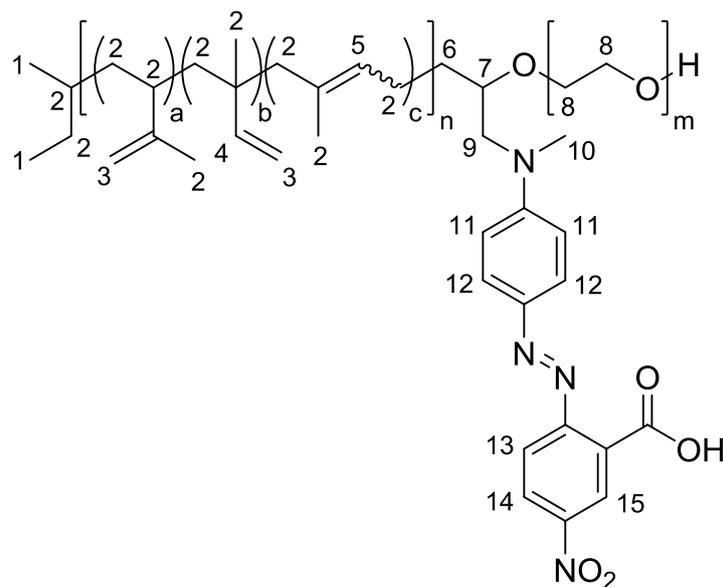
Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt): pH 6,10 (483 nm)

UV/VIS:  $\lambda_{\text{max(s)}} = 417$  nm;  $\lambda_{\text{max(b)}} = 410$  nm

Extinktionskoeffizient ( $\lambda_{\text{max(s)}} = 417$  nm):  $\varepsilon = 27,6 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### 8.4.8.5 AZOFARBSTOFFAUFBAU MIT 5-NITRO-ANTHRANILSÄURE

Beim Azofarbstoff-Aufbau an PI-*b*-PEO mit Methylanilinfunktion (5400 g/mol, →8.4.7.2) mit 5-Nitro-anthranilsäure wurde erneut nach der oben beschriebenen Durchführung (→8.4.8.1) gearbeitet. Die Stoffmengenverhältnisse wurden abermals übernommen.



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 9,20 - 9,14$  (m, 1 H, H-15), 8,43 – 8,37 (m, 1 H, H-14), 8,17 – 8,03 (m, 1 H, H-13), 7,88 – 7,76 (m, 2 H, H-12), 6,93 – 6,81 (m, 2 H, H-11), 5,96 – 5,56 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,17 – 4,50 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,91 – 3,21 (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8; 2 H, H-9; 3 H, H-10), 2,33 – 0,65 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2; 6 H, H-1).

Umschlagspunkt (Äquivalenzpunkt): pH 6,53 (570 nm)

UV/VIS:  $\lambda_{\text{max(s)}} = 527$  nm;  $\lambda_{\text{max(b)}} = 485$  nm

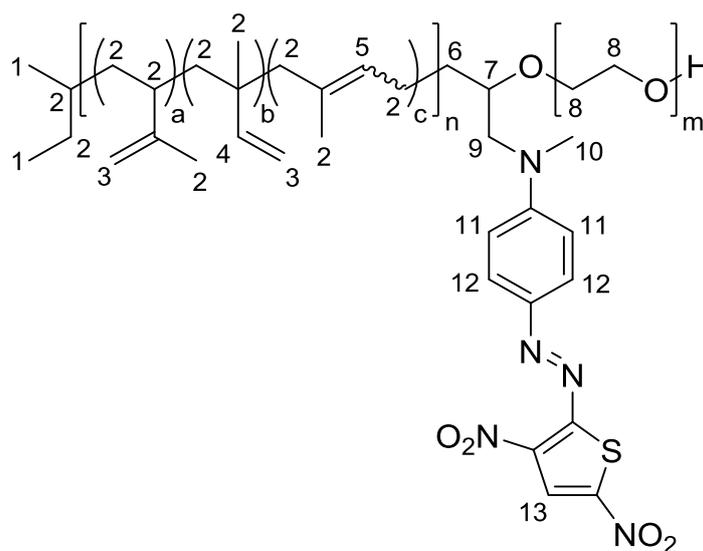
Extinktionskoeffizient ( $\lambda_{\text{max}} = 527$  nm):  $\varepsilon = 51,4 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### 8.4.9 AZOFARBSTOFFAUFBAU AM PI-B-PEO MIT HETEROCYCLEN MIT AMINOFUNKTION

##### 8.4.9.1 AZOFARBSTOFFAUFBAU MIT 2-AMINO-3,5-DINITROTHIOPHEN

Die Reaktionsführung erfolgte nicht nach den Standardbedingungen ( $\rightarrow$ 8.4.1.) Zu Beginn wurden 86,3 mg (1,25 mmol) Natriumnitrit in 1,00 mL (18,2 mmol) konz. Schwefelsäure gelöst und für 1 h bei 65 °C gerührt. Danach wurde die Nitrosylschwefelsäure-Lösung im Eisbad gekühlt ( $<5$  °C). Als Nächstes wurden 236 mg (1,25 mmol) 2-Amino-3,5-dinitrothiophen portionsweise in einem Gemisch aus 2,5 mL Propionsäure und 2,5 mL Essigsäure gelöst und im Eisbad gekühlt ( $<5$  °C). Das Gemisch zeigte eine grünliche Färbung. Anschließend wurde die gekühlte Nitrosylschwefelsäure-Lösung unter weiterem Kühlen ( $<5$  °C) zu der sauren

2-Amino-3,5-dinitrothiophen-Lösung getropft, wobei sich die Lösung dunkel rot-braun färbte. Die Diazoniumsalz-Lösung wurde für 30 min gekühlt ( $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gerührt. Es wurden 500 mg (92,6  $\mu\text{mol}$ ) eines PI-*b*-PEO (5400 g/mol) mit Methylanilinfunktion ( $\rightarrow$ 8.4.7.2) in einem Gemisch aus 5 mL Essigsäure und 5 mL Propionsäure gelöst und im Eisbad ( $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gekühlt. Als Nächstes wurde die kalte Diazoniumsalz-Lösung zur Polymerlösung getropft, wobei sofort eine dunkelgrüne Färbung sichtbar war. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h gerührt und weiter gekühlt ( $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Danach wurde die Reaktionslösung dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethan-Extrakte wurden zunächst zweimal mit je 5 mL einer 0,1 M Salzsäure (wässrig) und anschließend zweimal mit demin. Wasser gewaschen. Danach wurde die Dichlormethan-Lösung über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Anschluss auf etwa 2 mL am Rotationsverdampfer eingengt. Als Nächstes wurde das Polymer aus je 15 mL kaltem ( $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Diethylether viermal gefällt ( $\rightarrow$ 8.2.3.2). Das dunkelgrüne Produkt wurde anschließend getrocknet ( $\rightarrow$ 8.2.4).



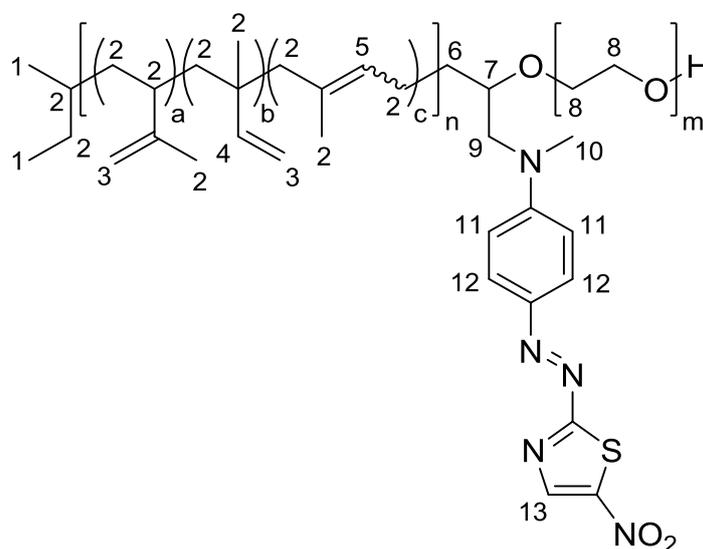
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ , TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 8,34$  (s, 1 H, H-13), 7,99 – 7,86 (m, 2 H, H-12), 6,88 – 6,76 (m, 2 H, H-11), 5,96 – 5,54 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,19 – 4,43 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,87 – 3,05 (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8; 2 H, H-9; 3 H, H-10), 2,29 – 0,67 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe, H-2; 6 H, H-1).

pH-Umschlagspunkt: nicht vorhanden

Extinktionskoeffizient ( $\lambda_{\text{max}} = 645\text{ nm}$ ):  $\varepsilon = 53,6 \cdot 10^3\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

**8.4.9.2 AZOFARBSTOFFAUFBAU MIT 2-AMINO-5-NITROTHIAZOL**

Der Aufbau eines weiteren Azofarbstoffs mit Heterocylus an einem PI-*b*-PEO mit Methylanilinfunktion (5400 g/mol, →8.4.7.2) wurde nach der zuvor beschriebenen Vorschrift (→8.4.9.1) ohne Veränderung der Stoffmengenverhältnisse durchgeführt. Zur Darstellung der Diazoniumsalz-Lösung wurde 2-Amino-5-nitrothiazol verwendet, wobei diese hier eine hellrote Färbung aufwies. Nach Zutropfen der Diazoniumsalz-Lösung zur Polymerlösung konnte eine dunkelblaue Färbung beobachtet werden.



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS):  $\delta[\text{ppm}] = 8,59$  (s, 1 H, H-13), 7,97 – 7,86 (m, 2 H, H-12), 6,85 – 6,75 (m, 2 H, H-11), 5,97 – 5,54 (m, 1 H je 1,2-Einheit, H-4), 5,17 – 4,45 (m, 2 H je 1,2-Einheit, H-3; 2 H je 3,4-Einheit, H-3; 1 H je 1,4-Einheit, H-5), 3,91 – 3,05 (m, 1 H, H-7; 4 H je Einheit, H-8; 2 H, H-9; 3 H, H-10), 2,29 – 0,69 (m, 6 H je 3,4-Einheit, H-2; 5 H je 1,2-Einheit, H-2; 7 H je 1,4-Einheit, H-2; 2 H, H-6; 3 H Butylgruppe; H-2, 6 H, H-1).

pH-Umschlagspunkt: nicht vorhanden

Extinktionskoeffizient ( $\lambda_{\text{max}} = 575 \text{ nm}$ ):  $\varepsilon = 44,0 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

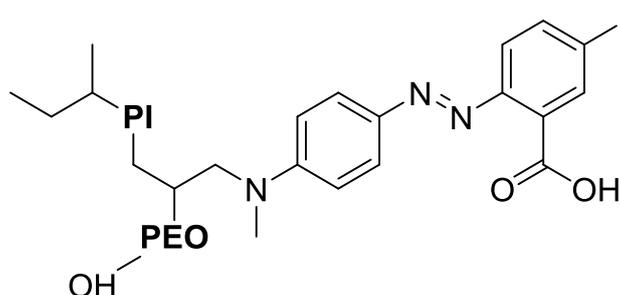
#### 8.4.10 HERSTELLUNG VON QUANTUM-DOT-FRET-SENSOREN

Die hier ausführlich beschriebene Herstellung der Quantum-Dot-FRET-Sensoren, war das letzte und eines von drei Verkapselungsexperimenten dieser Arbeit. Die Verkapselungsexperimente werden im Ergebnisteil in A, B, C unterteilt (→6.1.5, Tabelle 6.2). Die FRET-Sensoren wurden stets unter gleichen (reproduzierbaren) Verhältnissen der eingesetzten Komponenten dargestellt, wobei lediglich der Anteil des PI-*b*-PEO mit IAFG variiert wurde. Eines der ersten Experimente sollte eine geeignete Akzeptorenkonzentration, sprich Anteil des Farbstoff-funktionalisierten PI-*b*-PEOs zeigen. Hierfür wurden jeweils Anteile von: 100 %, 50 %, 25 % und 0 % des PI-*b*-PEO mit IAFG (5400 g/mol) gewählt. Anschließend folgte durch die gewonnenen Erkenntnisse ein Verkapselungsexperiment mit: 35 %, 25 % und 0 % Anteil an PI-*b*-PEO mit IAFG (5400 g/mol). Abschließend wurde ein Verkapselungsexperiment mit den beiden PI-*b*-PEOs mit IAFG 5400 g/mol und 8400 g/mol durchgeführt, was im Folgenden exemplarisch beschrieben wird.

##### 8.4.10.1 KOMPONENTEN DER QD-FRET-SYSTEME

Zur Herstellung der Quantum-Dot-FRET-Sensoren wurden elongierte Kern/Schale-Partikel (Cadmiumselenid/Cadmiumsulfid) der CANdot Serie *A plus* (QDQR) mit einem Emissionsmaximum bei 541 nm, einer Halbwertsbreite von <40 nm und einem Aspektverhältnis von etwa 1,5 - 2,5 verwendet. Es kamen 6 Polymere mit unterschiedlicher Zusammensetzung zum Phasentransfer von je 20 nmol der Partikel zum Einsatz. Dabei wurden je drei Polymere bzw. Polymergemische mit derselben Kettenlänge aber unterschiedlichem Anteil an Azofarbstoff-funktionalisiertem Polymer verwendet. Es wurden je 40 µmol Polymer, was 2000 Äquivalenten bezogen auf die Quantum Dots (QDQRs) entspricht, eingesetzt. Im Anschluss an jeden Phasentransfer wurde jeweils eine Saat-Emulsionspolymerisation durchgeführt.

Zunächst wurden die Polymere bzw. Polymergemische mit und ohne Azofarbstoffgruppe (AFG) bereitgestellt. Dazu wurden PI-*b*-PEOs mit 8400 g/mol (→8.4.7.1 ohne AFG; →8.4.8.1 mit AFG) und mit 5400 g/mol (→8.4.7.2 ohne AFG, →8.4.8.2 mit AFG) verwendet. Hierbei wurden jeweils nur PI-*b*-PEOs gleicher Kettenlänge gemischt. Bei der AFG handelte es sich jeweils um ein Iod-substituiertes Methylrotderivat (IAFG).



**Abbildung 8.1:** Beim Phasentransfer von Quantum Dots verwendetes PI-*b*-PEO mit Iod-substituiertem Methylrotderivat (IAFG).

Die genauen Zusammensetzungen der PI-*b*-PEOs für die einzelnen Verkapselungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

**Tabelle 8.2:** Zusammensetzung der Polymere zur Verkapselung der Quantum Dots.

PI- <i>b</i> -PEO [g/mol]	PI- <i>b</i> -PEO ohne AFG [mg]	PI- <i>b</i> -PEO mit IAFG [mg]	PI- <i>b</i> -PEO mit IAFG [%]
5400	216	0	0
5400	151	65	30
5400	108	108	50
8400	344	0	0
8400	241	103	30
8400	172	172	50

Im Folgenden werden die jeweilige Verkapselung, nachgeschaltete Emulsionspolymerisation und anschließende Aufreinigung durch Dichtegradientenzentrifugation beschrieben.

#### 8.4.10.2 VERKAPSELUNG DER CANDOT PARTIKEL

Im ersten Schritt wurde das *n*-Hexan von 200  $\mu$ L (20,0 nmol) Partikellösung im Stickstoffgegenstrom abgedampft. Anschließend wurden die Partikel in 200  $\mu$ L Chloroform aufgenommen, aus 200  $\mu$ L Methanol gefällt und für 20 min bei 10000 rcf zentrifugiert. Als Nächstes wurde das Chloroform-Methanol-Gemisch dekantiert und der Partikelniederschlag in 4 mL THF gelöst und zu 40  $\mu$ mol Polymer (Tabelle 8.2) gegeben. Die Lösung wurde mit einem

200 µm PTFE-Filter filtriert und über eine lamellare Mischstruktur mit einer Kanalbreite von 45 µm mit Hilfe von computergesteuerten Spritzenpumpen mit 36 mL Wasser gemischt. Anschließend wurde die Partikellösung auf 65 °C erwärmt und für 45 min Stickstoff unter Rühren eingeleitet.

#### **8.4.10.3 EMULSIONSPOLYMERISATION MIT VERKAPSELTEN CANDOTS**

Im nächsten Schritt wurden 140 µL (1,22 mmol) Styrol und 14 µL (98 µmol) DVB, welche zuvor destilliert wurden (→8.2.7), zur Partikellösung gegeben und diese dann für 20 min bei 65 °C und unter weiterem Einleiten von Stickstoff gerührt. Hiernach wurden 4,0 mg (12 µmol) 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid (VA-044), gelöst in 500 µL demin. entgastem Wasser, hinzugeben und für 8 h bei 65 °C gerührt.

#### **8.4.10.4 DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION DER VERKAPSELTEN/UMHÜLLTEN CANDOTS**

Zunächst wurden 6 mL einer 60 %igen wässrigen D(+)-Saccharose-Lösung in einen Polycarbonat-Tube gegeben. Die 60 %ige Lösung wurde anschließend mit 8 mL 10 %iger und diese wiederum mit 16 mL 5 %iger D(+)-Saccharose-Lösung vorsichtig überschichtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass es nicht zu einer Durchmischung der Schichten kam. Die nach der Emulsionspolymerisation erhaltene Partikellösung wurde unter Verwendung von Vivaspin® Ultrafiltrationseinheiten von Sartorius (100 kDa) auf ein Volumen von etwa 5 mL konzentriert. Im nächsten Schritt wurde die Partikellösung auf die 5 %ige D(+)-Saccharose-Lösung aufgetragen, wobei ebenfalls darauf geachtet wurde, dass sich beide Schichten nicht durchmischten. Anschließend wurden die geschichteten Lösungen für 16 h bei 15 °C und 50000 rcf zentrifugiert. Der Bereich, der Mizellen mit Quantum Dots enthält, wurde unter UV-Licht identifiziert, entnommen und mit Vivaspin® Ultrafiltrationseinheiten von Sartorius (100 kDa) durch fünfmaliges Waschen mit demin. Wasser von der D(+)-Saccharose befreit und auf ein Volumen von etwa 5 mL konzentriert. Die erhaltene Lösung verkapselter Quantum Dots (QDQRs) wurde ohne weitere Behandlung für optische Untersuchungen bei unterschiedlichen pH-Werten verwendet.

#### 8.4.11 pH-PUFFER-LÖSUNGEN, PRÄPARATION DER MESSPROBEN UND MESSUNGEN

Es wurden 50 mM pH-Pufferlösungen aus Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat hergestellt. Die pH-Werte wurden um den Umschlagspunkt der IAFG der verwendeten PI-*b*-PEOs (→8.4.8.1; →8.4.8.2) gewählt, der auch den Bereich physiologischer pH-Werte beinhaltet (Tabelle 8.3).

**Tabelle 8.3:** pH-Werte der präparierten Pufferlösungen

pH | 4,68 | 4,83 | 5,04 | 5,13 | 5,31 | 5,56 | 5,75 | 5,95 | 6,10 | 6,28 | 6,47 | 6,67 | 6,87 | 7,05 | 7,25 | 7,44 | 7,63 | 7,80 | 8,02 | 8,54

Es wurde jeweils 1900  $\mu\text{L}$  vom pH-Puffer des gewünschten pH-Werts in einer PMMA- oder Quarzküvette vorgelegt und mit 100  $\mu\text{L}$  der verkapselten und gereinigten Quantum-Dot-Lösung (→8.4.10.4) versetzt und geschüttelt. Anschließend wurden sofort die Fluoreszenzabklingzeit (→8.3.6), Absorption (→8.3.3) und Emission (→8.3.4) der Probe bestimmt. Der pH-Wert der jeweiligen Probe in den Küvetten wurde abschließend nochmals kontrolliert.

#### 8.4.12 PROBENPRÄPARATION ZUR FLIM-UNTERSUCHUNG

Im ersten Schritt wurden Ba/F3 Zellen dreimal mit sterilem PBS (engl. „*phosphate buffered saline*“, phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen. Danach wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  einer Lösung verkapselter Quantum Dots (5400 g/mol, 0 %, 30 %, 50 % PI-*b*-PEO-IAFG; Tabelle 8.2) zu 500k Zellen gegeben. Als Nächstes wurde für 30 min bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit sterilem PBS gewaschen und mit Formalin fixiert.



## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. Weller, *Angew. Chemie* **1993**, *105*, 43–55.
- [2] J. L. West, N. J. Halas, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 215–217.
- [3] P. Alivisatos, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 3–9.
- [4] a Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
- [5] L. Marcu, *J. Biomed. Opt.* **2010**, *15*, 011106.
- [6] X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 969–976.
- [7] M. Mutas, C. Strelow, T. Kipp, A. Mews, *Nano Lett.* **2018**, *10*, 20453–20461.
- [8] A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Chem. Phys. an Phys. Chem.* **2006**, *7*, 47–57.
- [9] Fraunhofer-IAP-CAN, *Technisches Datenblatt - CANdots ® Series A Plus*, Hamburg, **2019**.
- [10] L. Damalakiene, V. Karabanovas, S. Bagdonas, R. Rotomskis, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 473.
- [11] J. Ostermann, Maßgeschneiderte Polymerliganden Für Die Biomedizinische Anwendung von Quantum Dots, Universität Hamburg, **2014**.
- [12] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166–175.
- [13] J. R. Lakowicz, *Energy Transfer*, Springer, New York, **2006**.
- [14] I. Z. Steinberg, *Annu. Rev. Biochem.* **1971**, *40*, 83–114.
- [15] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819–846.
- [16] I. Hadar, S. Halivni, A. Faust, U. Banin, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 3849–3856.
- [17] E. P. Schartner, M. R. Henderson, M. Purdey, D. Dhatrak, T. M. Monro, P. G. Gill, D. F. Callen, *Am. Assoc. Cancer Res.* **2016**, *76*, 1–7.
- [18] O. Bucher, H. Wartenberg, *Cytologie, Histologie Und Mikroskopische Anatomie Des Menschen*, Verlag Hans Huber, Bern Göttingen Toronto Seattle, **1997**.
- [19] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [20] A. D. Yoffe, *Adv. Phys.* **1993**, *42*, 173–266.
- [21] L. E. Brus, *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 4403–4409.

- [22] M. Green, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 5797–5809.
- [23] J. Van Embden, A. J. Jasieniak, A. D. E. Gómez, A. P. Mulvaney, *Aust. J. Chem.* **2007**, *60*, 457–471.
- [24] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763–775.
- [25] K. Boldt, N. Kirkwood, G. A. Beane, P. Mulvaney, *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 4731–4738.
- [26] D. V. Talapin, I. Mekis, S. Götzinger, A. Kornowski, O. Benson, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18826–18831.
- [27] B. O. Dabbousi, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463–9475.
- [28] G. D. Scholes, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1157–1172.
- [29] C. D. M. Donega, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1512–1546.
- [30] S. Kim, B. Fisher, H.-J. Eisler, M. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11466–11467.
- [31] S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. De Grand, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, et al., *Nat. Biotechnol.* **2008**, *22*, 93–97.
- [32] J. M. Klostranec, W. C. W. Chan, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1953–1964.
- [33] R. M. Clegg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6*, 103–110.
- [34] N. Gaponik, D. V. Talapin, A. L. Rogach, K. Hoppe, V. Shevchenko, A. Kornowski, A. Eychmüller, H. Weller, E. V. Shevchenko, A. Eychmüller, **2002**, 7177–7185.
- [35] C. Schmidtke, E. Pösel, J. Ostermann, A. Pietsch, H. Kloust, H. Tran, T. Schotten, N. G. Bastús, R. Eggers, H. Weller, *Nanoscale* **2013**, *5*, 743374–44.
- [36] J. Ostermann, J.-P. Merkl, S. Flessau, C. Wolter, A. Kornowski, C. Schmidtke, A. Pietsch, H. Kloust, A. Feld, H. Weller, *ACS Nano* **2013**, *7*, 9156–9167.
- [37] H. Kloust, C. Schmidtke, J. P. Merkl, A. Feld, T. Schotten, U. E. a Fittschen, M. Gehring, J. Ostermann, E. Pösel, H. Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 23244–23250.
- [38] J. Chiefari, Y. K. B. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. a Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, et al., *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- [39] J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7901–7910.

- [40] M. Szwarc, *Nature* **1956**, *178*, 1168–1169.
- [41] R. P. Quirk, B. Lee, *Polym. Int.* **1992**, *27*, 359–367.
- [42] H.-G. Elias, *Makromoleküle Band I*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [43] M. M. F. Al-Jarrah, R. Apikian, E. Ahmed, *Polym. Bull.* **1984**, *12*, 433–436.
- [44] S. Förster, E. Kramer, *Macromolecules* **1999**, *32*, 2783–2785.
- [45] N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2000**, *38*, 3211–3234.
- [46] M. Szwarc, *Living Polymers and Mechanisms of Anionic Polymerization*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1983**.
- [47] H. Brody, M. Ladacki, R. Milkovitch, M. Szwarc, *J. Polym. Sci.* **1957**, *25*, 221–224.
- [48] Ü. Ulrich, P. Theato, *Angew. Chemie* **2009**, *121*, 9725–9738.
- [49] B. Tieke, *Makromolekulare Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2014**.
- [50] M. U. Kahveci, Y. Yagci, a. Avgeropoulos, C. Tsitsilianis, *Well-Defined Block Copolymers*, Elsevier B.V., **2012**.
- [51] C. Lee, S. P. Gido, Y. Poulos, N. Hadjichristidis, N. B. Tan, S. F. Trevino, J. W. Mays, *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 6460–6469.
- [52] R. Borsali, E. Minatti, J. L. Putaux, M. Schappacher, A. Deffieux, P. Viville, R. Lazzaroni, T. Narayanan, *Langmuir* **2003**, *19*, 6–9.
- [53] S. Pispas, N. Hadjichristidis, I. Potemkin, a. Khokhloy, *Macromolecules* **2000**, *33*, 1741–1746.
- [54] S. Förster, T. Plantenberg, *Angew. Chemie* **2002**, *114*, 712–739.
- [55] S. Förster, M. Antonietti, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 195–217.
- [56] J. H. Hildebrand, *The SOLUBILITY of NONELECTROLYTES*, Reinhold, New York, **1950**.
- [57] C. M. Hansen, *The Three Dimensional Solubility Parameter and Solvent Diffusion Coefficient, Their Importance in Surface Coating Formulation*, Technical University of Denmark, **1967**.
- [58] E. Bagda, *Colloid Polym. Sci.* **1977**, *255*, 384–392.

- [59] G. Riess, *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 1107–1170.
- [60] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525.
- [61] A. Blanzas, S. P. Armes, A. J. Ryan, *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 267–277.
- [62] B. M. Discher, D. A. Hammer, F. S. Bates, D. E. Discher, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5*, 125–131.
- [63] D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science (80-. )*. **2002**, *297*, 967–973.
- [64] S. Jain, F. S. Bates, *Science* **2003**, *300*, 460–464.
- [65] D. E. Discher, F. Ahmed, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 323–341.
- [66] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science (80-. )*. **1998**, *281*, 2016–2018.
- [67] H. Kloust, E. Poeselt, S. Kappen, C. Schmidtke, A. Kornowski, W. Pauer, H. Moritz, H. Weller, *Langmuir* **2012**, *28*, 7276–7281.
- [68] A. Feld, J. Merkl, H. Kloust, S. Flessau, C. Schmidtke, C. Wolter, J. Ostermann, M. Kampferbeck, R. Eggers, A. Mews, et al., *Angew. Commun.* **2015**, *54*, 12468–12471.
- [69] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166–175.
- [70] H. Weller, J. Ostermann, C. Schmidtke, *Zeitschrift für Phys. Chemie* **2014**, *228*, 183–192.
- [71] M. Fernandez-Arguelles, A. Yakovlev, R. A. Sperling, C. Luccardini, A. S. Medel, J. Mallet, J. Brochon, A. Feltz, M. Oheim, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2613–2617.
- [72] K. F. Chou, A. M. Dennis, *Sensors* **2015**, *15*, 13288–13325.
- [73] Y. Wang, T. Zhao, Y. Li, L. Su, Z. Wang, G. Huang, B. D. Sumer, J. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11085–11092.
- [74] P. R. Gil, M. Nazarenus, S. Ashraf, W. J. Parak, *Small* **2012**, *8*, 943–948.
- [75] K. Zhou, Y. Wang, X. Huang, K. K. Luby-Phelps, B. D. Sumer, J. Gao, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 6109–6114.
- [76] A. M. Dennis, W. J. Rhee, D. Sotto, S. N. Dublin, G. Bao, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2917–2924.
- [77] I. L. Medintz, M. H. Stewart, S. A. Trammell, K. Susumu, J. B. Delehanty, B. C. Mei, J. S. Melinger, J. B. Blanco-canosa, P. E. Dawson, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 676–684.
- [78] M. J. Ruedas-Rama, E. A. H. Hall, *PH Sensitive Quantum Dot – Anthraquinone Nanoconjugates*,

- IOP Publishing, **2014**.
- [79] E. Pöselt, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, et al., *ACS Nano* **2012**, *6*, 3346–3355.
- [80] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Müller, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2000**, *18*, 301–313.
- [81] O. Eisleb, *N-Substituted 1,3-Diamino-2-Propanols and Process of Preparing Them*, **1932**, US1845403A.
- [82] W. Davies, W. E. Savige, *J. Chem. Soc.* **1950**, 890–894.
- [83] D. Limnios, C. G. Kokotos, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4270–4276.
- [84] J. Allgaier, A. Poppe, L. Willner, D. Richter, *Macromolecules* **1997**, *9297*, 1582–1586.
- [85] S. Angot, D. Taton, Y. Gnanou, *Macromolecules* **2000**, *33*, 5418–5426.
- [86] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organische Chemie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2013**.
- [87] H. G. O. Becker, R. Beckert, G. Domschke, E. Fanghänel, W. D. Habicher, P. Metz, D. Pavel, K. Schwetlick, *Organikum*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [88] H. T. Clarke, W. R. Kirner, *Org. Synth.* **1922**, *2*, 47.
- [89] B. M. Antonietti, S. Förster, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1323–1333.
- [90] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in Der Organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, **2012**.
- [91] Sigma-Aldrich, *Methyl Red Product Specification*, Saint Louis, **2019**.
- [92] Merck-KGaA, *Methylrot (C.I. 13020) Spezifikationen*, Darmstadt, **2019**.
- [93] A. M. Smith, S. Nie, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 190–200.
- [94] H. Zollinger, *Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [95] H. H. Perkampus, *UV-VIS Atlas of Organic Compounds*, Wiley-VCH, Weinheim New York, **1992**.
- [96] L. Habercorn, *Darstellung von PH-Sensoren Auf Basis von Halbleiternanokristallen Für Die Anwendung in Der Medizinischen Diagnostik*, Universität Hamburg, **2018**.

- [97] C. Smart, E. Willis, *J. Colloid Interface Sci.* **1967**, *25*, 577–583.
- [98] R. Koll, L. S. Fruhner, H. Heller, J. Allgaier, W. Pyckhout-hintzen, M. Kruteva, A. Feoktystov, R. Biehl, S. Förster, H. Weller, *Nanoscale* **2019**, *11*, 3847–3854.
- [99] 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.
- [100] H.-C. Pape, R. Klinke, B. Brenner, S. Silbernagl, *Physiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, **2014**.
- [101] D. P. Lyvers, M. Moazzezi, V. C. De Silva, D. P. Brown, A. M. Urbas, Y. V Rostovtsev, V. P. Drachev, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12.
- [102] C. J. Ward, P. Patel, T. D. James, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, *0*, 462–470.
- [103] F. Y. Pong, M. Lee, J. R. Bell, N. T. Flynn, *Langmuir* **2006**, *22*, 3851–3857.
- [104] A. F. Holleman, in *Lehrb. Der Org. Chemie*, De Gruyter, Berlin, **1960**, p. 357.

## 10 DANKSAGUNG

Für die lehrreiche und spannende Doktorandenzeit, die tolle Unterstützung und den erfolgreichen Abschluss durch die vorliegende Arbeit möchte ich mich an dieser Stelle bei vielen lieben Leuten herzlich bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Horst Weller für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überantwortung des spannenden interdisziplinären Themas und für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Darüber hinaus danke ich ihm für viele hilfreiche Ratschläge und Diskussionen, die gewährten Freiheiten und das stets „offene Ohr“ für das schnelle Lösen von Problemen.

Bei Prof. Dr. Alf Mews möchte ich mich für die relativ kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit bedanken.

Für das Stellen der Prüfungskommission meiner Disputation möchte ich Prof. Dr. Hans-Ulrich Moritz und Dr. Thomas Hackl danken.

Frau Marion Manin danke ich für die Unterstützung bei allen organisatorischen Angelegenheiten und die permanente Hilfsbereitschaft bei allen möglichen Problemen.

Ein ganz besonderer Dank geht an dieser Stelle an Dr. Johannes „Jo“ Ostermann, der mir nicht nur die spannende Welt der anionischen Polymerisation gezeigt hat, sondern mich auch bei unzähligen anderen Fragestellungen über die gesamte Doktorandenzeit hin mit Rat und Tat unterstützt hat. Für das Korrekturlesen dieser Arbeit sei ihm natürlich auch gedankt.

Das Korrekturlesen der Arbeit wurde auch von anderen fleißigen Helferlein übernommen. Dafür möchte ich insbesondere Dr. Monika Kobylinski und Dr. Christoph Hahn danken. Auch gilt mein Dank hier Dr. Lasse Habercorn, Dr. Jan-Philip Merkl und Felix Thiel. Für zahlreiche fruchtbare Diskussionen während der gesamten Zeit danke ich nochmals Dr. Monika Kobylinski und Dr. Lasse Habercorn.

Bei Marina Mutas möchte ich mich für die Durchführung der Zellversuche, die Untersuchungen mittels FLIM und die vor allem in der Schlussphase gehäuften Besprechungen bedanken.

Für die Unterstützung im Labor möchte ich meinem ehemaligen Bachelorand Alex Müller und meinen Praktikanten Manuel Müller, Patrick Kießling, Delil Yesilmen, Cem Güzel und Franziska Esmek danken, die durch ihr fleißiges und durchdachtes Zutun meine Arbeit oft erheblich vorangebracht haben.

Den Kollegen vom Fraunhofer-CAN möchte ich für die Bereitstellung von Geräten, Partikeln und die Unterstützung bei vielen Fragestellungen danken. Hier gilt mein Dank insbesondere Dr. Theo Schotten, Dr. Vesna Aleksandrovic-Bondzic, Maria Lohse und Öznur Tokmak.

Ebenfalls danke ich der NMR-Abteilung unter der Leitung von Dr. Thomas Hackl für das Messen unzähliger NMR-Proben während der gesamten Doktorandenzeit.

Meinem Büro-Homie Marius Schumacher möchte ich für viele hilfreiche Diskussionen und den Spaß abseits der Arbeit danken. Darüber hinaus möchte ich Mazlum Yesilmen, Daniel Jostes und natürlich auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ein tolles „Wohlfühlklima“ und viele lustige und auch ernsthafte Gespräche über „Gott und die Welt“ in den Pausen und auch im Privaten danken.

Für die bombastische Unterstützung während des gesamten Studiums, der Doktorandenzeit und auch abseits der Arbeit möchte ich meinen Eltern Karin und Dietmar Janschel einen ganz besonderen Dank aussprechen!

Zu guter Letzt bedanke ich mich nochmals bei meiner „Monia“ für die phänomenale Hilfe und Unterstützung in den letzten Jahren und für das „Bewahren der Nerven“, wenn es drauf ankam. Danke.

## **11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 15. Mai 2019

Marcus Janschel



## 12 ANHANG

## 12.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN MIT H&amp;P – SCHLÜSSELN

Tabelle 12.1: Verwendete Chemikalien mit zugehörigen Gefahrenpictogrammen (Symbole) und Schlüssel der Gefahren- und Sicherheitshinweise (H&P-Sätze).

Bezeichnung	Symbole	H-Sätze	P-Sätze
Acetonitril		H225, H332, H302, H312, H319	P210, P305, P351, P338, P403, P235
2-Allylphenol		H301 + H311, H314	P280, P301+P310, P305+P351+P338, P310
2-Amino-3,5-dinitrothiophen		H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
3-Amino- <i>iso</i> -nicotinsäure		H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
2-Amino-5-nitrothiazol		H302, H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
Anthranilsäure		H319	P305+P351+P338
Argon 6.0		H280	P403
Benzophenon		H410	P273
<i>t</i> -Butanol		H225, H319, H332, H335, H336	P210, P261, P305+P351+P338, P370+P378, P403+P235
<i>n</i> -Butyllithium		H225, H250, H261, H304, H314, H336, H361f, H373, H411	P210, P222, P231+P232, P261, P273, P422

s-Butyllithium		H225, H250, H260, H304, H314, H332, H336, H410	P210, P222, P223, P231+P232, P370+P378, P422
Calciumhydrid		H260	P223, P231+P232, P370+P378, P422
CANdot Serie A <i>plus</i> Partikel CdSe/CdS, in <i>n</i> -Hexan	Nicht vollständig geprüfter Stoff.		
Chloroform		H302, H315, H350, H373	P201, P202, P260, P264, P280, P301+P312, P302+P352, P308+P313, P321, P332+P313, P362, P405, P501
deuteriertes Chloroform		H302, H315, H319, H331, H351, H361d, H372	P260, P280, P301+P312+P330, P304+P340, P305+P351+P338, P403+P233
Di- <i>n</i> -butylmagnesium		H225, H250, H260, H304, H314, H336, H410	P210, P231+P232, P280, P305+P351+P338, P370+P378, P422
3,5-Dichlor-anthranilsäure	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Dichlormethan		H315, H319, H335, H336, H351, H373	P261, P305+P351+P338
Diethylether		H224, H302, H336, EUH019, EUH066	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P264, P280, P301+P312, P303+P361+P353, P330, P370+P378, P403+P235, P501
Dimethylsulfoxid	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Diphenylmethan	-	H302	-
<i>p</i> -Divinylbenzol		H302, H315, H317, H318, H335, H412	P280, P301+P312+P330, P305+P351+P338+P310
EDTA Tetranatriumsalz-Dihydrat		H302+H332, H318	P280, P305+P351+P338, P310
(±)-Epichlorhydrin		H226, H301+H311+H331, H314, H317, H350	P201, P261, P280, P301+P310, P305+P351+P338, P310
Essigsäure		H226, H314	P280, P305+P351+P338, P310
Ethanol		H225	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P280, P303+P361+P353, P370+P378, P403+P235, P501
Ethylenoxid 2.5		H220, H280, H315, H319, H331, H335, H340, H350	P201, P210, P261, P305+P351+P338, P311, P410+P403
Ethylvinylether		H225, H315, H319, H335	P210, P261, P305+P351+P338
Formaldehyd-Lösung (Formalin)		H301+H311+H331, H314, H317, H335, H341, H350, H370	P260, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P308+P311
<i>n</i> -Hexan		H225, H304, H315, H336, H361f, H373, H411	P201, P202, P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P273, P280, P301+P310, P302+P352, P303+P361+P353, P308+P313, P321,

			P331, P332+P313, P370+P378, P391, P403+P235, P405, P501
5-Iod-anthranilsäure		H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
Isopren		H224, H341, H350, H412	P201, P210, P273, P308+P313
Kalium		H260, H314	P223, P231+P232, P280, P305+P351+P338, P370+P378, P422
Kaliumcarbonat		H315, H319, H335	P302+P352, P305+P351+P338
Methanol		H225, H301, H311, H331, H370	P210, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+310, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P307+P311, P321, P330, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501
Methylanilin		H301, H311, H331, H373, H410	P261, P273, P280, P301+P310, P311, P501
Naphthalin		H228, H302, H351, H410	P210, P280, P301+P312+P330, P370+P378
Natrium		H260, H314	P223, P231+P232, P280, P305+P351+P338, P370+P378, P422
Natriumdihydrogen- phosphat-Dihydrat	Dieser Stoff erfüllt nicht die Kriterien für die Einstufung gemäß der Verordnung Nr. 1272/2008/EG.		
Natriumhydrogen- carbonat	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		

Natriumhydroxid (Plätzchen)		H290, H314	P260, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338
Natriumnitrit		H272, H301, H319, H400	P220, P273, P301+P310, P305+P351+P338
Natriumsulfat	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
5-Nitro-anthranilsäure		H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
PBS-Pufferlösung (steril)	Das Gemisch ist als nicht gefährlich eingestuft im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 [CLP].		
Propionsäure		H226, H314, H335	P210, P260, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P370+P378
D(+)-Saccharose	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Dieser Stoff ist gemäß Richtlinie 67/548/EWG nicht als gefährlich eingestuft.		
Salzsäure		H290, H314, H335	P261, P280, P305+P351+P338, P310
Schwefelsäure		H290, H314	P260, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+ P338
Styrol		H226, H315, H319, H332, H361d, H372	P201, P210, P261, P280, P304+P340, P312, P308+P313
Tetrahydrofuran		H225, H319, H335, EUH019	P210, P240, P241, P242, P243, P261, P264, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P337+P313, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501

<i>p</i> -Toluol-sulfonsäure, Monohydrat		H302, H314, H317	P280, P305+P351+P338, P310
2,2,2-Tri- fluoracetophenon		H226, H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
VA-044		H317	P280, P261, P272, P363, P302+P352, P333+P313, P501
Wasserstoffper- oxid-Lösung		H318, H412	P280, P305+P351+P338 +P310

## 12.2 SICHERHEITS- UND GEFAHRENHINWEISE (H&P – SÄTZE)

### 12.2.1 GEFAHRENHINWEISE (H-SÄTZE) DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN

- H220 Extrem entzündbares Gas.
- H224 Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
- H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
- H228 Entzündbarer Feststoff.
- H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
- H260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
- H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

- H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H361d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen
- H361f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H301+H311 Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt.
- H301+H311+H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

### **Ergänzende Gefahrenmerkmale**

- EUH019 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
- EUH066 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.

### **12.2.2 SICHERHEITSHINWEISE (P-SÄTZE) DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN**

- P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
- P210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
- P220 Von Kleidung und anderen brennbaren Materialien fernhalten.
- P222 Kontakt mit Luft nicht zulassen.

- P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
- P241 Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung / ... verwenden.
- P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
- P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
- P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
- P264 Nach Gebrauch . . . gründlich waschen.
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
- P231+P232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
- P301+P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum / Arzt / ... anrufen.
- P301+P312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum / Arzt / ... anrufen.
- P305+P351+P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen.  
Weiter spülen.
- P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P330 Mund ausspülen.
- P331 Kein Erbrechen herbeiführen.
- P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
- P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P301+P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P301+P312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P302+P352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

- P303+P361+P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P304+P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P304+P340 Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
- P305+P351+P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P307+P311 Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P308+P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P332+P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P333+P313 Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P370+P378 Bei Brand: . . . zum Löschen verwenden.
- P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P422 Inhalt in / unter ... aufbewahren
- P403+P233 Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P403+P235 Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.



