



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

---

# Selbstassemblierung und Einkapselung von Edelmetallnanopartikel-Clustern für den Einsatz als biomedizinische SERS-Sonden

Self-assembly and encapsulation of noble metal  
nanoparticle cluster for use as biomedical SERS probes

---

## Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Doktor rerum naturalium)

vorgelegt von  
**Marius Schumacher**  
aus Lohne (Oldenburg)

Fachbereich Chemie  
Institut für Physikalische Chemie  
Universität Hamburg

**2020**

Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. Horst Weller

Prof. Dr. Alf Mews

Gutachter der Disputation:

Prof. Dr. Horst Weller

Prof. Dr. Gabriel Bester

Prof. Dr. Hans-Ulrich Moritz

Datum der Disputation:

12.02.2021

Datum der Druckfreigabe:

12.02.2021

## Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2017 bis November 2020 im Institut der Physikalischen Chemie an der Universität Hamburg angefertigt. Dabei ist folgende Publikation mit geteilter Erstautorenschaft in Zusammenarbeit mit dem CICbiomaGUNE (San Sebastian), der UCLA (Los Angeles) und der Universität Antwerpen veröffentlicht worden:

Marius Schumacher, Leonardo Scarabelli, Dorleta Jimenez de Aberasturi, Jan-Philip Merkl, Malou Henriksen-Lacey, Thais Milagres de Oliveira, Marcus Janschel, Christian Schmidtke, Sara Bals, Horst Weller, Luis M. Liz-Marzán.

*Encapsulation of Noble Metal Nanoparticles through Seeded Emulsion Polymerization as Highly Stable Plasmonic Systems*. In: *Advanced Functional Materials* **2019**, 29, 1809071.  
doi: 10.1002/adfm.201809071

# Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationen</b>	<b>i</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Abstract</b>	<b>3</b>
<b>3 Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>4 Kenntnisstand</b>	<b>8</b>
4.1 Nanoskala und Nanotechnologie . . . . .	8
4.1.1 Strukturelle Eigenschaften . . . . .	9
4.1.2 Quantenmechanische Eigenschaften . . . . .	10
4.1.3 Plasmonische Eigenschaften . . . . .	11
4.2 Plasmonische Nanokristalle . . . . .	16
4.2.1 Abhängigkeiten und Modifizierung der LSPR . . . . .	16
4.2.2 Lokale Feldverstärkung . . . . .	17
4.2.3 Plasmonenkopplung und Nahfeldinterferenz . . . . .	20
4.3 Oberflächenverstärkte Ramanstreuung (SERS) . . . . .	23
4.3.1 Verstärkungsmechanismen an Nanopartikeln . . . . .	25
4.3.2 Vorteile von SERS in der biomedizinischen Bildgebung . . . . .	28
4.3.3 Design einer SERS-Sonde . . . . .	29
4.3.4 <i>In vivo</i> Tumordetektion . . . . .	31
4.3.5 Nanotheranostik . . . . .	33
4.4 Synthese und Modifikation plasmonischer Systeme . . . . .	34
4.4.1 Synthese Goldnanopartikel . . . . .	34
4.4.2 Selbstassemblierung und Aggregation . . . . .	35
4.4.3 Einkapselung und Funktionalisierung . . . . .	37

<b>5</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>42</b>
6.1	Nanopartikelsynthese . . . . .	42
6.1.1	AuNP Synthese . . . . .	42
6.1.2	AgNP Synthese . . . . .	46
6.2	Einkapselung und Selbstassemblierung von Edelmetallnanopartikeln . . . . .	48
6.2.1	Ligandenaustausch und Phasentransfer . . . . .	49
6.2.2	Selbstassemblierung und Einkapselung . . . . .	57
6.2.3	Stabilität der Nanopartikelcluster . . . . .	68
6.2.4	Zellaufnahme und Zellviabilität . . . . .	70
6.3	Oberflächenverstärkte Ramanstreuung . . . . .	76
6.3.1	Codierung nach der NP-Assemblierung . . . . .	79
6.3.2	Codierung vor der NP-Assemblierung . . . . .	85
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>104</b>
8.1	Chemikalien . . . . .	104
8.2	Generelle Techniken und Geräte . . . . .	105
8.2.1	UV-VIS(-NIR)-Spektroskopie . . . . .	105
8.2.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS) . . . . .	106
8.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) . . . . .	106
8.2.4	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) . . . . .	107
8.2.5	Raman-Spektroskopie . . . . .	107
8.2.6	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) . . . . .	108
8.2.7	Sonstige Geräte und Techniken . . . . .	108
8.3	AuNP Synthese . . . . .	108
8.4	AgNPs Synthese . . . . .	109
8.5	Polyisopren-Dithiocarbamat (PI-DTC) Synthese . . . . .	110
8.6	Polyisopren-Mercaptophenyllessigsäureester (PI-MPEE) Synthese . . . . .	110
8.7	Phasentransfer . . . . .	111
8.8	RaR Codierung vor der Einkapselung . . . . .	112
8.9	Mikrofluidik-Einkapselung . . . . .	113
8.10	RaR Codierung nach der Einkapselung . . . . .	114

8.11 Emulsionspolymerisation . . . . .	115
8.12 Kontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation . . . . .	115
8.13 Stabilitätstest . . . . .	116
8.14 Zellviabilitätstest . . . . .	116
8.15 Zellpräparation für TEM-Analyse . . . . .	117
8.16 Zellpräparation für Reflexions- und Fluoreszenz-Mikroskopie . . . . .	117
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>A Appendix</b>	<b>137</b>
A.1 Phasentransfer . . . . .	137
A.2 Selbstassemblierung und Einkapselung . . . . .	139
A.3 Stabilität der NPC . . . . .	142
A.4 Zellaufnahme und Zellviabilität . . . . .	145
A.5 Oberflächenverstärkte Ramanstreuung . . . . .	147
A.6 Liste der genutzten Chemikalien . . . . .	156
A.7 Sicherheits- und Gefahrenhinweise (H- & P-Sätze) . . . . .	160
A.8 Acknowledgment . . . . .	172
A.9 Eidesstattliche Erklärung . . . . .	173

## Abkürzungsverzeichnis

$\epsilon_\lambda$	wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient
$\hbar$	reduziertes Plancksches Wirkungsquantum
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	reduzierte Masse
$\mu_{ind}$	induziertes Dipolmoment
$\nabla$	Laplace-Operator
$\omega$	Eigenfrequenz, Plasmafrequenz
$\rho_A$	Oberflächenbelegung pro nm <sup>2</sup> der NP-Oberfläche
$\epsilon_0, \epsilon_u, \epsilon_m$	Dielektrikum: Vakuum, Umgebung, Metall
$A(\lambda)$	wellenlängenabhängige Extinktion
$A_{NP}$	Oberfläche der Nanopartikel
$AP$	relativer Aggregationsparameter
$c$	Konzentration oder in Kap. 4.2.2: Lichtgeschwindigkeit
$D$	Distanz
$d$	Durchmesser
$d_H$	hydrodynamischer Durchmesser
$e$	Elementarladung
$I$	Intensität
$k_B$	Boltzmann Konstante
$m_{eff}$	effektive Masse
$n$	Stoffmenge
$R$	Radius
$r$	Abstand zur NP-Oberfläche
$T$	Temperatur
$V$	Volumen
$\eta$	Viskosität
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Abb.	Abbildung

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abs.	Absorption
ABT	4-AminobenzenthioI
AgNP	Silbernanopartikel
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
AP	Aggregationsparameter
AuNP	Goldnanopartikel
AuNPC	Goldnanopartikelcluster ( $\neq$ Nanocluster)
BPDT	Biphenyl-4,4'-dithiol
BPT	Biphenyl-4-thiol
bzw.	beziehungsweise
cps	Counts pro Sekunde
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek Modell
DMF	Dimethylformamid
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EF	Verstärkungsfaktor (engl. <i>enhancement factor</i> )
EM-Feld	elektromagnetisches Feld
engl.	englisch
eqv.	Äquivalente (engl. <i>equivalents</i> )
FWHM	Halbwertsbreite (engl. <i>full width at half maximum</i> )
GHS	Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
h	Stunde (engl. <i>hour</i> )
KMR	krebserregend- mutagen- reproduktionsschädigend
LSP	lokalisiertes Oberflächenplasmon (engl. <i>localized surface plasmon</i> )
LSPR	lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (engl. <i>localized surface plasmon resonance</i> )
M	$\text{mol L}^{-1}$
MBT	4-MethylbenzenthioI
MHA	16-Mercaptohexadecansäure
MPA	3-Mercaptopropionsäure
MS	Massenspektrometrie
MUA	11-Mercaptoundecansäure
NP	Nanopartikel

## Abkürzungsverzeichnis

---

NPC	Nanopartikelcluster ( $\neq$ Nanocluster)
NPT	Naphthalin-1-thiol
PdI	Polydispersitätsindex
PEO	Polyethylenoxid
PI	Polyisopren
PI- <i>b</i> -PEO	Polyisopren- <i>block</i> -Polyethylenoxid
PI-DETA	Polyisopren-diethylentriamin
PI-DTC	Polyisopren-dithiocarbamat
PS	Polystyrol
PT	Phasentransfer
RaR	Raman-Reporter
RT	Raumtemperatur: 293 Kelvin (20 °C)
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (engl. <i>small-angle x-ray scattering</i> )
SERS	oberflächenverstärkte Ramanstreuung (engl. <i>surface enhanced Raman scattering</i> )
sog.	so genannt
SP	Oberflächenplasmon (engl. <i>surface plasmon</i> )
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (engl. <i>surface plasmon resonance</i> )
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
UV-VIS	ultravioletter und sichtbarer Wellenlängenbereich
v. u. Z.	vor unserer Zeitrechnung
VA044	Radikalinitiator: 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid
vgl.	vergleiche

# 1 | Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine vierstufige Strategie zur Herstellung von kolloidal stabilen, geschützten und biokompatiblen plasmonischen Nanopartikelclustern (NPC) mit intensiver oberflächenverstärkter Ramanstreuung und hoher intrazellulärer Aufnahme und Stabilität vorgestellt. Dieses Verfahren unterliegt keinen bekannten Einschränkungen hinsichtlich der Größe, Form oder Zusammensetzung der Nanopartikel (NP). Aufgrund des entwickelten skalierbaren und schnellen Phasentransfers mit Polyisopren-diethylentriamin (PI-DETA) können sowohl nativ hydrophile, als auch hydrophobe NP für diese Strategie verwendet werden. Des Weiteren führten Kinetikstudien des Phasentransfers plasmonischer Gold- und Silber-NP zu der Erkenntnis, dass eine Oberflächenbelegung von  $\approx 3$  PI-DETA ( $1300 \text{ g mol}^{-1}$ ) pro  $\text{nm}^2$  für einen effektiven Phasentransfer und langfristig kolloidal stabile Au- und AgNP nötig sind. Über die Variation des Diblockcopolymers Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid (PI-*b*-PEO) zu PI-DETA-Liganden Verhältnis bei der Mikrofluidik-Einkapselung konnte die Größe der Gold- und Silber-NPC durch die Erhöhung der Anzahl an co-eingekapselten NP in einer Mizelle auf bis zu 200 nm reproduzierbar eingestellt werden. Die durch eine optimierte Saat-Emulsionspolymerisation geformten Polymerhüllen um die NP-Systeme erwiesen sich als wirkungsvoller Schutz gegen Aggregation und Oxidation unter hoher Ionenstärke und extremen Oxidationsbedingungen, wie hohe Cyanid- oder Königswasser-Konzentrationen. Die Biokompatibilitäts-Studien der eingekapselten NP-Systeme zeigten bei der Inkubation mit drei verschiedenen Zelllinien hohe Zellviabilitäten, trotz der sehr hohen zellulären Aufnahme. Weiterhin bestätigten Elektronenmikroskop-Analysen die hohe Zellaufnahme der eingekapselten NP/NPC und die intrazelluläre Stabilität nach der Internalisierung der Strukturen in endosomale Vesikel. Ein Vorteil dieser Einkapselungsstrategie ist, dass das PI-*b*-PEO vor und nach der Einkapselung der NP mit Antikörpern, Peptiden und anderen Target-Molekülen für eine spezifische Zellaufnahme funktionalisiert werden kann. Die Studien über die Beschichtung der NP mit verschiedenen Raman-aktiven Molekülen (Codierung mit Raman-Reportern (RaR)) ergaben, dass die codierten AuNPC im Vergleich zu den uncodierten AuNPC deutlich stärkere Plasmonenkopplung aufweisen. Die Banden der lokalisierten Oberflä-

chenplasmonenresonanz (LSPR) können über einen großen Spektralbereich von 500 bis 1000 nm durch die Variation der RaR-Inkubationszeit und dem RaR-Codierungsgrad eingestellt werden. Das bedeutet, dass die optischen Eigenschaften der NPC für spektroskopische Anwendungen an die Laseranregungswellenlänge angepasst werden können. Die starke Plasmonenkopplung resultiert aus geringen interpartikulären Abständen der NP in den Clustern, die die Ausbildung von Hotspots des elektrischen Felds bei der LSPR-Anregung verursachen. Die Hotspots führten zu einer erheblichen oberflächenverstärkten Ramanstreuung (SERS) der darin lokalisierten RaR bis in die Größenordnung von  $10^5$ . Nach aktuellem Stand liegt diese Verstärkung im Grenzbereich der bekannten maximalen analytischen<sup>1</sup> Verstärkungsfaktoren für geclusterte, sphärische AuNP<sup>[2]</sup> und AgNP<sup>[1]</sup>. Insgesamt ist die vorgeschlagene universelle Strategie zur Herstellung von stabilen, biokompatiblen und sensitiven SERS-Plattformen ein signifikanter Schritt vorwärts in Richtung biomedizinischer *in vivo*-Anwendungen plasmonischer Nanopartikel.

---

<sup>1</sup>In Dispersion anhand der Raman Intensitäten und der RaR-Konzentrationen über die gesamte Probe ermittelter, durchschnittlicher Verstärkungsfaktor.<sup>[1]</sup> Keine selektive Signaldetektion der Hotspots.

## 2 | Abstract

In this work, a four-step strategy for the preparation of colloiddally stable, protected and biocompatible plasmonic nanoparticle clusters (NPC) with intensive surface-enhanced Raman scattering and high intracellular uptake and stability is presented. The procedure is not subject to any known restrictions regarding particle size, shape or composition. Due to the developed, scalable and fast phase transfer with polyisoprene diethylenetriamine (PI-DETA), both natively hydrophilic and hydrophobic nanoparticles (NP) can be used for this strategy. Kinetic studies of the phase transfer revealed that the surface coverage of  $\approx 3$  PI-DETA ( $1300 \text{ g mol}^{-1}$ ) per  $\text{nm}^2$  is required to ensure effective phase transfer and long-term colloidal stability of gold- and silver-NP. By varying the poly(isoprene)-*block*-poly(ethylene oxide) (PI-*b*-PEO) to PI-DETA ligand ratio in the microfluidic encapsulation process, the overall size of the gold- and silver-NPC could be tuned up to 200 nm, by increasing the number of co-encapsulated NP in the formed micelles. The polymer shells formed by an optimized seed emulsion polymerization around the NP systems proved to be effective protection against aggregation and oxidation under high ionic strength and extreme oxidation conditions, such as high cyanide or aqua regia concentrations. The biocompatibility of the encapsulated NP systems was demonstrated by incubation of gold- and silver NP/NPC with three different cell lines. The cells showed high cell viability, despite the very high cellular uptake. Furthermore, electron microscopy analysis of the incubated cells confirmed high cellular uptake and high intracellular stability of the nanostructures, even within the endosomes. An advantage of this encapsulation strategy is that the PI-*b*-PEO can be functionalized before and after the encapsulation of the NP with antibodies, peptides and other target molecules for specific cellular uptake. The studies on the coating of the NP with different Raman-active molecules (coding with Raman reporters (RaR)) showed that the coded AuNPC have a significantly stronger plasmon coupling compared to the uncoded AuNPC. The bands of the localized surface plasmon resonance (LSPR) can be adjusted over a large spectral range from 500 to 1000 nm by varying the RaR incubation time and the RaR coding level. This implies that the optical properties of the NPC can be adapted to the laser excitation wavelength for spectroscopic

applications. The strong plasmon coupling results from small interparticle distances of the NP in the clusters, which cause the formation of hotspots of the electric field during LSPR excitation. The hotspots led to a considerable surface-enhanced Raman scattering (SERS) of RaR located therein. Average analytical<sup>1</sup> enhancement factors up to the order of  $10^5$  were determined. According to the current status, this enhancement is within the known upper limit range of analytical enhancement factors for clustered and spherical AuNP<sup>[2]</sup> as well as AgNP<sup>[1]</sup>.

Overall, the proposed universal strategy for the production of stable, biocompatible and sensitive SERS platforms is a significant step forward towards biomedical *in vivo*-applications of plasmonic nanoparticles.

---

<sup>1</sup>Average enhancement factor determined in dispersion and based on the Raman intensities and the RaR concentrations over the entire sample.<sup>[1]</sup> No selective signal detection of the hotspots.

### 3 | Einleitung

Die Nanotechnologie ist im Jahr 2020 längst keine technologische Randerscheinung oder reine Science-Fiction mehr. Sie fand in den letzten Jahrzehnten, von vielen Menschen wahrscheinlich unbemerkt, in zunehmendem Maß Einzug in unseren Alltag. Produkte und Anwendungen der Nanowissenschaft sind unter anderem in Computern, *Smartphones*, Verpackungs- und Lebensmittelzusatzstoffen, Beschichtungen, Kosmetika, Textilien und medizinischen Diagnose- und Therapieverfahren zu finden.<sup>[3–7]</sup> Wie wichtig das Verständnis und die Erforschung der Nanodimension, sowie die Erfahrungen und das Fachwissen der Nanotechnologie, vor allem im Bereich von *drug delivery*-Systemen, Krebs-Nanovakzinen, dem sog. *immunoengineering* und nanotechnologischen Sensor- und Plattformtechnologien sind, deutet die Pandemie<sup>1</sup> des nanoskaligen<sup>2</sup> Virus SARS-CoV-2 an.<sup>[10–13]</sup> Die Entwicklung von biokompatiblen, sensitiven und kostengünstigen Nanopartikel-Systemen für biomedizinische Bildgebung und gezielte Therapieverfahren sind nicht nur aufgrund der oben erwähnten aktuellen Pandemie von großem Interesse, sondern beschäftigt Wissenschaftler aus diversen Fachgebieten vor allem aufgrund des „Vormarschs“ der Volkskrankheiten, allen voran: Krebs.<sup>[14–16]</sup> Laut WHO ist Krebs die weltweite Haupttodesursache des Menschen. Im Jahr 2008 starben 7.6 Millionen Menschen an Krebs und für das Jahr 2030 werden 13 Millionen Krebstote erwartet.<sup>[17]</sup> Nanoskalige Partikel sind in diesem Zusammenhang besonders aufgrund ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften, die weder diskrete Moleküle noch Bulk-Festkörper aufweisen, interessant.<sup>[18,19]</sup> In Verbindung mit Targeting-Liganden, wie monoklonalen Antikörpern, Peptiden oder kleinen Molekülen, können die NP mit hoher Affinität und Spezifität in malignen Tumoren akkumuliert werden.<sup>[20–22]</sup> Vielversprechend für die *in vivo* Bildgebung und Therapie sind plasmonische Nanopartikel, die die Raman-Streueffizienz von adsorbierten Raman-aktiven Molekülen enorm verstärken können und infolgedessen eine spektroskopische Detektion ermöglichen.<sup>[23–26]</sup> Die Kombination aus dieser oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) und den photothermischen Eigenschaften der plas-

---

<sup>1</sup>11. März 2020: Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) deklarierte die SARS-CoV-2-Epidemie offiziell zu einer Pandemie.<sup>[8]</sup>

<sup>2</sup>Das Virus SARS-CoV-2 weist durchschnittlich einen Durchmesser von 60 bis 140 nm auf.<sup>[9]</sup>

monischen Nanopartikel machen diese zu potentiellen „2-in-1“-Systemen der Theranostik (Therapie und Diagnostik).<sup>[27–36]</sup>

In den 1970er Jahren wurde der SERS-Effekt entdeckt, der die bis dahin größte Beschränkung der Raman-Spektroskopie, die sehr schwache Raman-Streuung im Vergleich zum einfallenden Licht, durch die enorme elektromagnetische Feldverstärkung von angeregten Oberflächenplasmonenresonanzen metallischer Substrate und besonders metallischer Nanopartikel, überwindet.<sup>[23–26]</sup> Die SERS-Technologie hat zwar einige Vorteile in Bezug auf die Photostabilität, die Sensibilität, die Halbwertsbreiten der spektroskopischen Signale und das Multiplexing gegenüber den meisten etablierten biomedizinischen Bildgebungstechniken, jedoch ist die SERS-Technologie bisher noch nicht ausreichend klinisch erprobt worden.<sup>[19,37–39]</sup> SERS steht vielmehr am Beginn des Einzugs in die klinischen Testphasen.<sup>[18,19,40]</sup> Trotz der großen Fortschritte der letzten Jahrzehnte bleibt die größte Herausforderung vor allem im Hinblick auf potentielle *in vitro* oder *in vivo* Anwendungen zur Detektion eines Targets, dass es bisher keine ausgereiften, kostengünstigen, kolloidal stabilen, biokompatiblen SERS-Nanopartikelplattformen gibt, die gleichzeitig auch noch ein intensives und konsistentes SERS-Signal aufweisen und in „kommerziellen Mengen“ hergestellt werden können.<sup>[19]</sup>

Dementsprechend soll in dieser Arbeit eine reproduzierbare Strategie entwickelt werden, die es erlaubt aus relativ einfach herzustellenden, sphärischen Gold- und Silbernanopartikeln, einer Beschichtung der Oberflächen mit Raman-aktiven Molekülen, einer lösungsmittelinduzierten Assemblierung der Nanopartikel zur Erhöhung der Feldverstärkung durch Plasmonenkopplung und einer Saat-Emulsionspolymerisation, geschützte, biokompatible und kolloidal stabile Nanopartikelcluster mit einem intensiven SERS-Signal in Dispersion herzustellen. Dafür soll ein sich bereits für Quantenpunkte und Eisenoxidnanopartikel bewährtes Einkapselungssystem aus der Kombination von Polyisopren-diethylentriamin (PI-DETA) als Nanopartikelligand und Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid (PI-*b*-PEO) als stabilisierender Mizellenbildner genutzt und das Potential dieser Methode zur lösungsmittelinduzierten Assemblierung untersucht werden.<sup>[41–47]</sup> Der Vorteil dieses mizellaren Systems ist neben der kolloidalen Stabilität und der Möglichkeit eine schützende und biokompatible Polymerhülle aufzubauen, dass diese eingekapselten Nanopartikelsysteme über die Kopplung von einer Vielzahl an funktionellen Gruppen, Antikörpern und komplexen Verbindungen (z.B. Biotin, Kohlenhydrate) an den Mizellenbildner PI-*b*-PEO funktiona-

lisiert werden können.<sup>[42–44]</sup>

Im Hinblick auf die potentielle Anwendung der Nanopartikelcluster sind Studien über den SERS-Verstärkungsfaktor, die Schutzwirkung der Polymerhülle, die Stabilität der hergestellten Systeme in Medien mit hoher Ionenstärke und oxidierenden Spezies, die Zellaufnahme von gesunden und kanzerösen Zellen und die Zytotoxizität unverzichtbar, um die generelle, biomedizinische Verwendbarkeit der angestrebten SERS-Plattformen zu untersuchen.

## 4 | Kenntnisstand

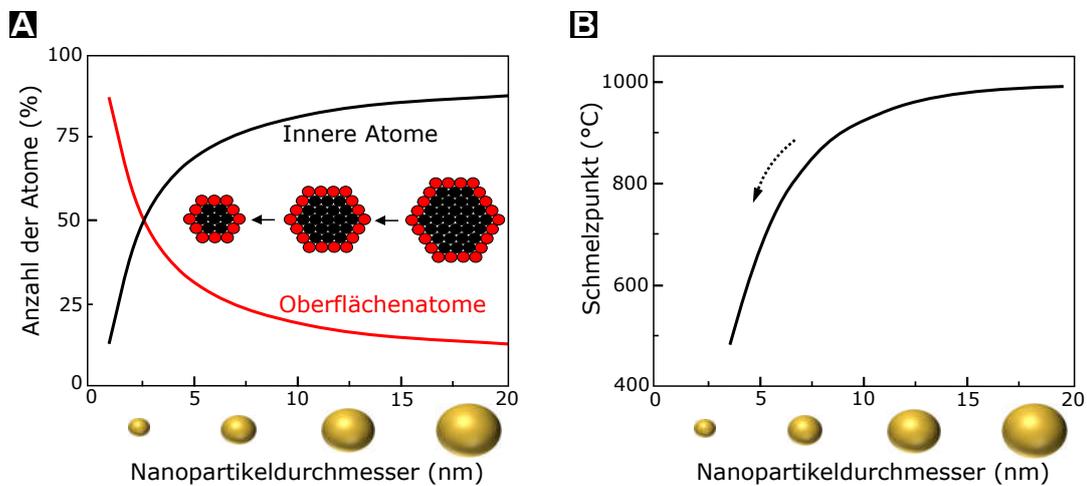
### 4.1 Nanoskala und Nanotechnologie

Nanostrukturen wie „lösliches“ oder kolloidales Gold wurden bereits seit der Antike von den Menschen genutzt.<sup>[48-50]</sup> Kolloidalem Gold wurden heilende und verschönernde Kräfte beigemessen. Des Weiteren wurde es zur Herstellung von gefärbten Gläsern und Keramiken genutzt. Die ersten wissenschaftlich fundierten Erkenntnisse über die Struktur und die Dimension kolloidaler Metallnanopartikel erbrachte Michael Faraday in den 1850er Jahren.<sup>[48-51]</sup> Aufgrund der Fähigkeit der Metallkolloide mit Licht wechselzuwirken, schlussfolgerte Faraday, dass die Größenordnung der Partikel im Bereich der Wellenlängen des Lichts sein müsse. Für einige Wissenschaftler ist das der Beginn der modernen Nanotechnologie, andere wiederum verknüpfen den Beginn der Nanotechnologie mit Richard Feynmans visionärem Vortrag „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ aus dem Jahr 1959, der nachdrücklich betont, wie viel Potenzial in der Erforschung der kleineren Dimensionen liegt.<sup>[6,7,48,52,53]</sup> Feynman sprach unter anderem davon Computerbauteile drastisch zu miniaturisieren, um die Rechenleistung zu verbessern; mikroskopische Maschinen zu bauen, die Arbeit verrichten können und von der Notwendigkeit die Auflösung von Elektronenmikroskopen erheblich zu verbessern. Alles in allem haben sowohl Faraday und Feynman, als auch viele andere Wissenschaftler zur Entstehung dieses Feldes beigetragen und die Nanotechnologie wegweisend zu dem gemacht was sie heute ist:

Das Feld der Nanotechnologie beschreibt im weitesten Sinne die Erforschung, den Aufbau und die Modifikation nanoskaliger Strukturen und Eigenschaften. In der wissenschaftlichen Literatur herrscht generell ein Konsens darüber, dass diese Strukturen einen Größenbereich von 1 - 100 nm umfassen. Der auf den ersten Blick womöglich willkürlich erscheinende Bereich, ist ebenjener Bereich, in dem sich spezifische Materialeigenschaften von denen der diskreten atomaren und makroskopischen Festkörper-Dimension unterscheiden.<sup>[6,19]</sup> Die Nanoeigenschaften können als eine „größenabhängige Diskontinuität“ der Materialeigenschaften verstanden werden und sind in den folgenden Kapiteln aus struktureller und elektronischer Sicht näher erläutert.

### 4.1.1 Strukturelle Eigenschaften

Viele Materialeigenschaften von Nanostrukturen sind direkt auf die Größe zurückzuführen. Tatsächlich können die Eigenschaften kristalliner Teilchen desselben Materials je nach Teilchengröße deutlich variieren. Der Grund vieler Eigenschaftsänderungen liegt darin, dass sich das Oberflächen zu Volumen Verhältnis bei immer kleiner werdenden Teilchen maßgeblich erhöht. Ein abnehmender Nanopartikeldurchmesser hat zur Folge, dass sich immer mehr Atome des Nanopartikels (NP) an der Oberfläche befinden.<sup>[6,54]</sup> In Abb. 4.1 A ist zu erkennen, dass bei Goldnanopartikeln (AuNP) mit einem Durchmesser von 10 nm circa 20 % und bei 2 nm bereits circa 60 % der Gesamtatome an der Oberfläche liegen.



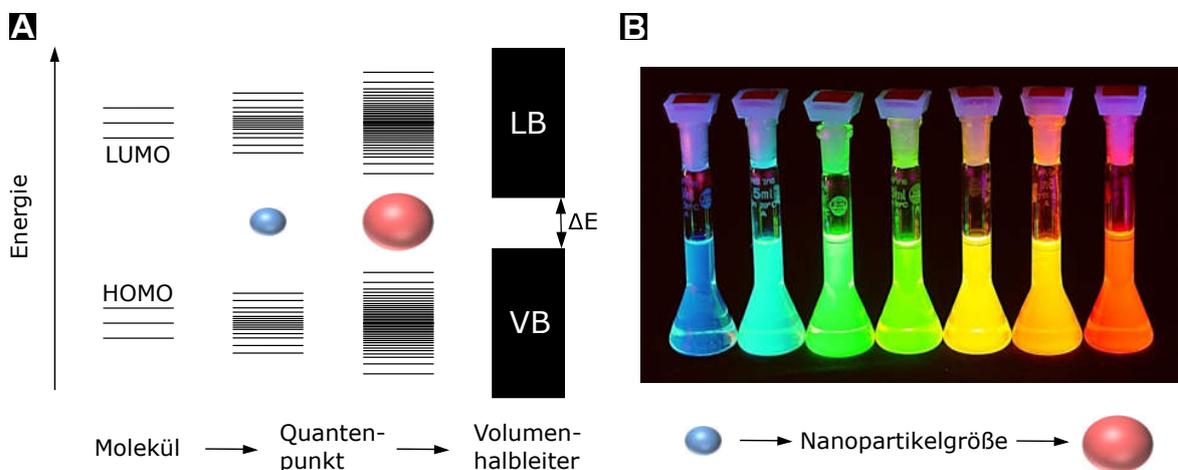
**Abbildung 4.1:** A: Anzahl der Oberflächenatome sowie innerer Atome von AuNP in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers. Schematischer Einschub zur Verdeutlichung der Atomverhältnisse bei sinkendem NP-Durchmesser und B: Schmelzpunkt der AuNP im Verhältnis zum Partikeldurchmesser. Eigene Abbildung in Anlehnung an Referenz<sup>[54]</sup>.

Die steigende Anzahl an schwächer gebundenen Oberflächenatomen steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der relativ starken Abnahme des Schmelzpunktes bei  $< 10$  nm AuNP (Abb. 4.1 B). Das Phänomen wird in der englischsprachigen Literatur als *melting point depression* bezeichnet und kann für sphärische NP näherungsweise mithilfe der Gibbs-Thomson Gleichung beschrieben werden.<sup>[55]</sup> Zusätzlich führt die hohe Anzahl an Oberflächenatomen zu einer höheren Anzahl an freien Koordinationsstellen an der Oberfläche der NP. Die Folgen sind eine erhöhte chemische Aktivität und ein effizienterer Stoffumsatz nanoskaliger Katalysatoren.<sup>[6,50,54,56]</sup> Aufgrund der Größe und der Struktur ergeben sich weitere interessante Eigenschaften und daraus folgende Anwendungen, wie optisch transparente (farbige) Dünnschichten<sup>[7,57,58]</sup>, die Oberflächenleitfähigkeit von NP-

Oxiden<sup>[59]</sup>, der Lotus-Effekt<sup>[60]</sup>, photonische Kristalle<sup>[61]</sup>, Superparamagnetismus<sup>[47,62,63]</sup>, Endozytose beziehungsweise Zellaufnahme<sup>[19,41,42,64–66]</sup>.

#### 4.1.2 Quantenmechanische Eigenschaften

Das wahrscheinlich bekannteste Beispiel für Quanteneffekte in der Nanodimension ist die größenabhängige Farbe und Lumineszenz von Halbleiter-NP (*quantum dots* oder Quantenpunkte; Abb. 4.2 **B**), die kommerziell beispielsweise in Displays eingesetzt werden.<sup>[6,67]</sup> In Molekülen ist eine einfache Beschreibung der elektronischen Struktur und Zustände mit der Molekülorbitaltheorie möglich.<sup>[54,68]</sup> Die Anzahl der zu berücksichtigenden Orbitale ist deutlich begrenzt und es liegen diskrete Energieniveaus vor. Nach der LCAO-Näherung (*linear combination of atomic orbitals*) vervielfältigen und überlagern sich die zu berücksichtigenden Orbitale bei zunehmender Größe des Moleküls bis zum quasi unendlich großen Molekül (Bulk-Festkörper) zu Quasi-Kontinuen an elektronischen Zuständen, die als Energiebänder beschrieben werden (Abb. 4.2 **A**).<sup>[54,68]</sup> Durch bindende und antibindende Orbitalkombinationen entstehen das Valenz- und Leitungsband. Zwischen den Bändern kann eine Bandlücke vorliegen, das bedeutet, dass es keine zugelassenen Energiezustände in einem gewissen Energieintervall gibt.<sup>[54]</sup>



**Abbildung 4.2:** **A:** Schematische Darstellung der LCAO-Näherung bei steigender Anzahl der Atomorbitale von links nach rechts.  $\Delta E$  ist die Bandlücken-Energie, die bei größer werdenden Atomverbänden abnimmt. VB und LB repräsentieren das Valenz- und Leitungsband. **B:** Fluoreszenz von CdSe-Halbleiternanopartikeln unter UV-Lichtanregung mit ansteigender Partikelgröße von links nach rechts. Foto: Arbeitsgruppe H. Weller, Universität Hamburg<sup>[69]</sup>.

Die Größe der Bandlücke unterscheidet elektrische Leiter, Halbleiter und Isolatoren voneinander und ist auch für optische Eigenschaften verantwortlich. Neben den in Kapitel 4.1.1 genannten Materialeigenschaften treten in der Nanodimension größenabhängige Quanteneffekte aufgrund des Zustandes der elektronischen Struktur auf. Im Bereich zwischen Molekül und Volumenkristall weisen die Quantenpunkte mit abnehmender Größe zunehmend diskretere Energiezustände und eine immer größer werdende Bandlücke auf, wie in Abb. 4.2 **A** dargestellt.<sup>[70–72]</sup> Der Grund dafür ist, dass es in kleiner werdenden Halbleiterstrukturen zunehmend zu einer räumlichen Einschränkung der Ladungsträger kommt. Wird ein Elektron durch Absorption eines Photons in das Leitungsband eines Halbleiters angeregt, bildet sich ein Elektronen-Loch-Paar (Exziton), das durch attraktive Coulomb-Wechselwirkungen einen bestimmten Exzitionenradius aufweist. Je weniger Bewegungsfreiheit den Exziton zu Verfügung steht, also je kleiner die NP sind, desto höhere kinetische Energiezustände müssen die angeregten Ladungsträger annehmen und desto diskreter werden die Energiezustände.<sup>[70,73]</sup> Dieser Effekt wird als Größenquantisierungseffekt bezeichnet. Quantenmechanisch werden die Ladungsträger als „Teilchen im Kasten“ betrachtet, wobei die Größe der NP der Größe des Kastens entspricht.<sup>[70,72–74]</sup> Das Brus-Modell beschreibt diesen Effekt über den energetischen Zustand des Teilchens im Kasten, einem Coulomb- und einem Polarisierungsterm und zeigt, abgesehen von Modellschwächen im unteren Nanometerbereich, Energien die nah an experimentell ermittelten Werten liegen.<sup>[71,74,75]</sup> Letztendlich führt die Rekombination von Elektron und Loch, je nach Größe der Bandlücke, zur charakteristischen, größenabhängigen Lumineszenz der Quantenpunkte (nähere Informationen zur Fluoreszenz siehe Kapitel 4.3).

### 4.1.3 Plasmonische Eigenschaften

Die charakteristischen, intensiven Farben von plasmonischen NP erregten spätestens seit der Antike<sup>1</sup> die Aufmerksamkeit von Alchemisten und Handwerkern.<sup>[48–50,76]</sup> Keramiken und Gläser werden sogar bis heute mit plasmonischen NP gefärbt.<sup>[78–80]</sup> Ein berühmtes, gut erhaltenes Anwendungsbeispiel ist der Lykurgos Kelch aus Abb. 4.3, der von außen beleuchtet grün und von innen heraus beleuchtet rot erscheint. Untersuchungen der Glasschmelze des Kelchs in den 1960er Jahren zeigten einen geringen Anteil von 40 ppm und 300 ppm an Gold und Silber, sodass die Vermutung aufkam, es müsse sich um Kolloide der Metalle handeln, deren Lichtstreuungseigenschaften bereits bekannt waren.<sup>[81]</sup> Im Jahr 1990

---

<sup>1</sup>Plasmonische AuNP wurden bereits auf vergoldetem Elfenbein (ca. 8. Jahrhundert v. u. Z.) nachgewiesen, wobei die Herstellung nicht beabsichtigt war.<sup>[76,77]</sup>

wurde schließlich mithilfe einer TEM-EDX Untersuchung aufgeklärt, dass die Verursacher dieses Effekts 50-100 nm große Nanopartikel aus einer Silber-Gold-Kupfer-Legierung<sup>2</sup> sind, die vor allem grünes Licht absorbieren sowie (zurück)streuung und rotes Licht eine höhere Transmission aufweist.<sup>[83]</sup> Der Grund für die ausgeprägte Wechselwirkung der Metall-NP mit Licht ist die Plasmonenresonanz. Im konkreten Fall von plasmonischen Metall-NP, wie beispielsweise aus Gold, Silber, Kupfer und auch Aluminium, wird dieses Phänomen als lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) bezeichnet.<sup>[84]</sup> Im Wesentlichen ist es die kollektive Oszillation der quasi-freien Elektronen der Metall-NP, ausgelöst durch resonante elektromagnetische Wellen (Abb. 4.4 C). Die an Photonen gekoppelte diskrete Oszillation des Elektronengases wird auch als Teilchen betrachtet und als Plasmon-Polariton bezeichnet. LSP-Polaritonen können auch als „gefangene“ elektromagnetische Wellen, die bei kleinen NP hauptsächlich zur Oszillation der Oberflächenladungsdichte führen, beschrieben werden.<sup>[85]</sup> Das Attribut „lokalisiert“ bezieht sich darauf, dass Partikelplasmonen nicht an der Oberfläche oder durch das Volumen propagieren. Die Wechselwirkungen der plasmonischen Bulk-Metalle bis zu nanoskaligen Partikeln ebendieser Metalle mit elektromagnetischen Feldern (EM-Felder) können mithilfe der klassischen Elektrodynamik ohne Zuhilfenahme der Quantenmechanik ausreichend beschrieben werden.<sup>[86]</sup> Zum Verständnis der Eigenschaften plasmonischer NP mit einem Durchmesser vom Subnanometerbereich bis ca. 2 nm müssen quantenmechanische Effekte bzw. Beschränkungen berücksichtigt werden<sup>3</sup>.<sup>[87]</sup> 2D- und 3D-Bulkmaterial mit gefüllten d-Bändern, wie Gold, Silber und Kupfer sowie die Bulk-Metalle Aluminium und Magnesium weisen ebenfalls Plasmonen auf, allerdings Oberflächen- und Volumenplasmonen, die aufgrund der räumlichen Ausdehnung des Materials propagieren (Abb. 4.4 A,B).<sup>[88]</sup> Das Volumenplasmon beschreibt die Bewegung der Elektronen im Bulk, die um 180° aus der Phase des einfallenden Feldes oszillieren. Generell oszillieren die freien Elektronen nicht gegen eine Rückstellkraft wie die Coulomb-Kraft, sondern entscheidend ist, dass die Elektronen schnell genug auf die Triebkraft des einfallenden EM-Felds reagieren können. Dieses Verhalten



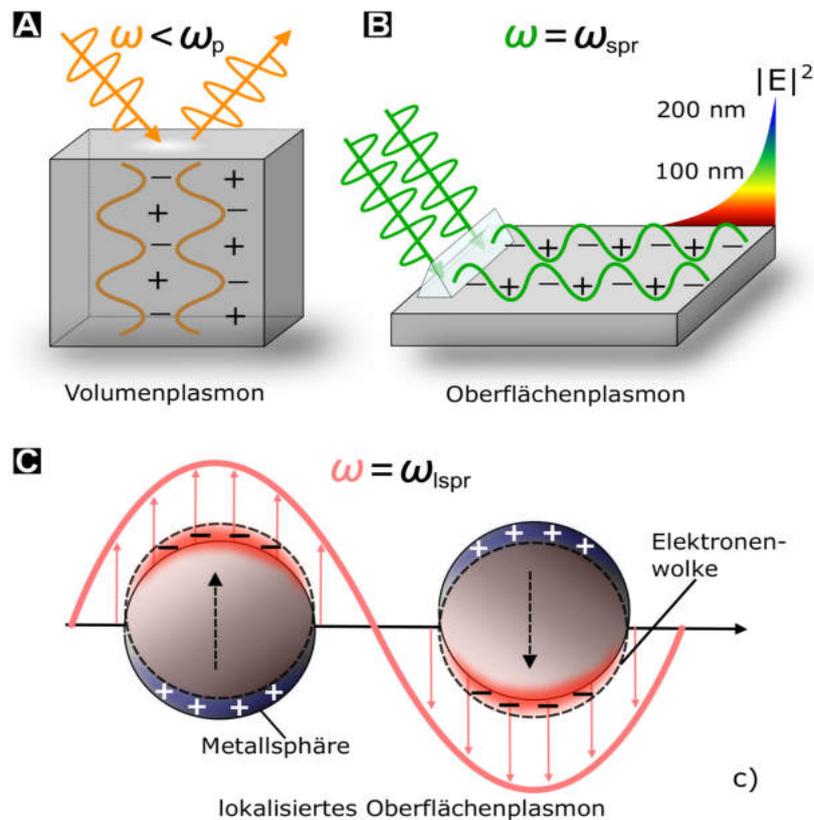
**Abbildung 4.3:** Der Lykurgos Kelch aus dem 4. Jahrhundert v. u. Z. ©The Trustees of the British Museum, London<sup>[82]</sup>

<sup>2</sup>Ag 66.2 ± 2.5 % - Au 31.2 ± 1.5 % - Cu 2.6 ± 0.3 %.<sup>[83]</sup>

<sup>3</sup>gilt für  $k_B T$  bei RT

wird über die Plasmafrequenz der Metalle beschrieben, unterhalb derer die Leitungselektronen des Metalls durch das einfallende Feld oszillieren können (Gleichung 4.1).<sup>[89]</sup> Die Plasmafrequenz hängt von der Dichte der Elektronen  $n$  und der effektiven Masse  $m_{\text{eff}}$  ab.  $\epsilon_0$  ist die Permittivität des Vakuums und  $e$  die Elementarladung.

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m_{\text{eff}}\epsilon_0}} \quad (4.1)$$



**Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung von Volumen-, Oberflächen- und lokalisiertem Oberflächenplasmon. **A:** Volumenplasmonen entstehen bei Frequenzen einfallender EM-Felder unterhalb der Plasmafrequenz  $\omega_p$  und es kommt im 3D-Volumen des Metalls zu quantisierten Schwingungen der Leitungselektronen. **B:** Oberflächenplasmonen sind entlang einer 2D-Oberfläche propagierende Oszillationen der Elektronen. Diese können nur bei bestimmten Winkel- und resonanten Frequenzbedingungen ( $\omega = \omega_{\text{spr}}$ ) durch einfallende Felder ausgelöst werden. Die Amplitude des an diese Oszillation gekoppelten EM-Feldes nimmt exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche ab. **C:** Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz entsteht in Metall-NP die kleiner als die einfallende Wellenlänge sind. Dabei führen resonante Frequenzen ( $\omega = \omega_{\text{lspr}}$ ) zur Oszillation der Elektronenwolke und zur einer Verstärkung des lokalen EM-Feldes nahe der Oberfläche. Eigene Abbildung in Anlehnung an Referenzen<sup>[89,90]</sup>.

Bei einem dünnen Metallfilm existieren Oszillationen an der Oberfläche in Form von propagierenden Schwingungen der Ladungsdichte. Dabei führt die Grenzfläche zwischen der Permittivität des Metalls ( $\varepsilon_m$ ) und der des Umgebungsmediums ( $\varepsilon_u$ ) zu einer scharfen Begrenzung an Frequenzen (und Wellenvektoren), die die Leitungselektronen im einfallenden Feld oszillieren lassen.<sup>[89]</sup> Bei Annahme des idealen Drude-Modells der freien Elektronen in Bezug auf die Permittivitäten, gilt Gleichung 4.2 als Beschreibung der charakteristischen SPR-Frequenz.<sup>[89-91]</sup>

$$\omega_{\text{spr}} = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + \varepsilon_u}} \quad (4.2)$$

Aus der Oszillation der Oberflächenladungsdichte der SP resultiert ein lokales EM-Feld, welches bis ca. 100-200 nm ins Dielektrikum der Umgebung hineinreicht. In der Nanodimension, wie bei nulldimensionalen Nanopartikeln, die im Verhältnis zur Wellenlänge, mit denen sie wechselwirken, kleiner sind, induziert das einfallende EM-Feld eine gleichmäßige Verschiebung der Elektronenwolke (quasi-statisches Regime). Die durch die Ladungsseparation entstehenden Rückstellkräfte, die als interne Triebkraft der Oszillation betrachtet werden können, bewirken die charakteristische Resonanzfrequenz, vergleichbar mit einem harmonischen Oszillator, bei dem die Eigenfrequenz als  $\omega = \sqrt{\frac{k}{\mu}}$  definiert ist.<sup>[92]</sup> Dabei ist  $k$  die Kraftkonstante und  $\mu$  die reduzierte Masse. Im Vergleich zur SPR kann die LSPR ohne ein Prisma direkt durch ein einfallendes Feld angeregt werden, da die gekrümmte Oberfläche der NP dies erlaubt.<sup>[89]</sup> Die Bedingungen für LSPR bei Nanosphären im quasi-statischen (Dipol-)Regime ( $r \ll \lambda$ ) können mithilfe von Gustav Mies Lösungen der Maxwell-Gleichungen für Sphären, die einem EM-Feld ausgesetzt sind, beschrieben werden.<sup>[89,93,94]</sup> Der Extinktions-Wirkungsquerschnitt  $\sigma_{\text{ext}}$ , also die Wahrscheinlichkeit das Streu- oder Absorptionsprozesse an den NP stattfinden, ist in Gleichung 4.3 dargestellt.<sup>[89]</sup> Diese Wahrscheinlichkeit wird als „Trefferfläche“ angegeben.

$$\sigma_{\text{ext}} = 9 \left( \frac{\omega}{c} \right) (\varepsilon_u)^{\frac{3}{2}} V \frac{\varepsilon_m''}{(\varepsilon_m' + 2\varepsilon_u)^2 + (\varepsilon_m'')^2} \quad (4.3)$$

Der Extinktions-Wirkungsquerschnitt erreicht sein Maximum, wenn der Nenner aus Gleichung 4.3 gegen null geht. Das bedeutet, dass der reale Teil der dielektrischen Funktion  $\varepsilon_m' = -2\varepsilon_u$  (Fröhlich Bedingung)<sup>[95]</sup> entsprechen muss und der Imaginärteil  $\varepsilon_m''$  gering sein muss. Ist dies der Fall, gilt Gleichung 4.4 als Bedingung für Resonanz im quasi-statischen Regime.<sup>[89]</sup>

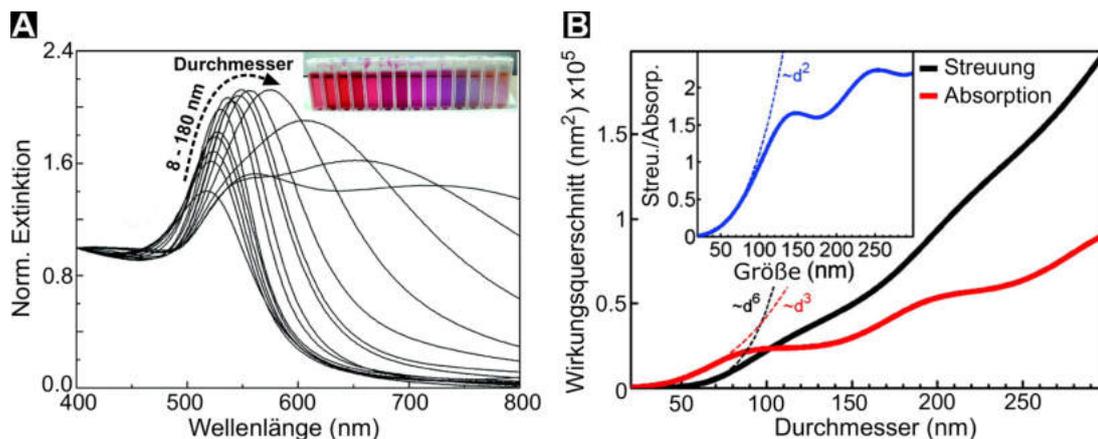
$$\omega_{\text{lspr}} = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + 2\varepsilon_u}} \quad (4.4)$$

Vor diesem Hintergrund ist aus Gleichung 4.3 ersichtlich, dass der Wirkungsquerschnitt  $\sigma_{\text{ext}}$  bei Resonanzbedingung um einige Größenordnungen größer ist, als der Querschnitt des Volumens  $V$  des NP. Der hohe Wirkungsquerschnitt bzw. die hohe Oszillatorstärke der LSPR erklärt die hohe Streu- und Absorptionseffizienz der plasmonischen NP im Vergleich zu *quantum dots* und organischen Farbstoffen und ermöglicht eine Vielfalt an optischen und sensorischen Anwendungen.<sup>[89,92,96–99]</sup>

## 4.2 Plasmonische Nanokristalle

### 4.2.1 Abhängigkeiten und Modifizierung der LSPR

Für viele Anwendungen ist die spektrale Position der LSPR entscheidend. Die LSPR hängt stark von der dielektrischen Funktion des Metalls und der dielektrischen Umgebung ab. Dementsprechend weisen Ag- und AuNP derselben Größe deutlich unterschiedliche Resonanzwellenlängen auf und ein Phasentransfer von in Wasser dispergierten AuNP in THF oder ein Ligandenaustausch führen beispielsweise zu einer Verschiebung der LSPR. Ein Anstieg der Permittivität (und des Brechungsindex) der NP-Umgebung führt generell zu einer Rotverschiebung der LSPR. Die Adsorption von Liganden mit einem positiven induktiven Effekt führt grundsätzlich zur Erhöhung der Elektronendichte und zur Erhöhung der Resonanzfrequenz (Blauverschiebung der LSPR, siehe Gleichung 4.1 und 4.4). Ein negativer induktiver Effekt adsorbierter Liganden führt entsprechend zu einer Verringerung der Resonanzfrequenz (Rotverschiebung der LSPR).



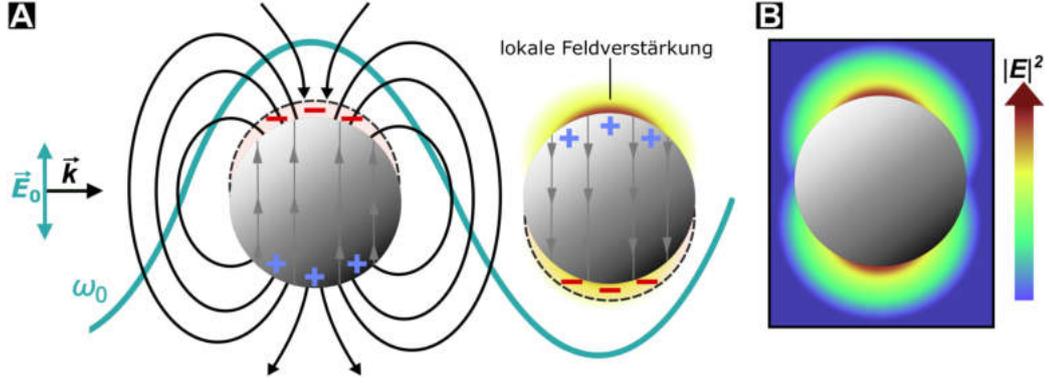
**Abbildung 4.5:** **A:** Extinktions-Spektren von synthetisierten AuNP mit verschiedenen Größen. **B:** Vorhersagen des Absorptions- (rot) und Streuwirkungsquerschnitts (schwarz) aus der Mie-Theorie als Funktion der AuNP Größe bei einer Wellenlänge von 532 nm und einem Brechungsindex des Mediums von 1.25. Die blaue Kurve beschreibt das Verhältnis zwischen Streuung und Absorption. Die gestrichelten Linien zeigen, dass vereinfachte, exponentielle Abhängigkeiten nur für NP < 80 nm akkurat sind. Adapted with permission from **A**<sup>[100]</sup> and **B**<sup>[101]</sup> Copyright © 2011 & 2010 both American Chemical Society.

Die quasi-statische Beschreibung der LSPR gilt nur für sphärische NP bis zu einer bestimmten Größe und berücksichtigt keine Abhängigkeit der Resonanzfrequenz von der NP-Größe.<sup>[102]</sup> Der Anstieg der dipolaren LSPR Wellenlänge (Rotverschiebung, vgl. Abb. 4.5 **A**) bei größer werdenden NP kann in erster Näherung über die Abschwächung der

Rückstellkräfte bei Ladungsseparation über größere Distanzen verstanden werden.<sup>[103]</sup> In größeren NP außerhalb des quasi-statischen Näherungs-Regimes spielen Dämpfungs- und Retardierungseffekte eine immer größere Rolle und führen zur weiteren Rotverschiebung der dipolaren LSPR Wellenlänge, sowie zur Anregung von Quadrupol- bzw. Multipol-schwingungen.<sup>[103,104]</sup> Die Plasmonenanregung zerfällt entweder nicht strahlend in ein Elektronen-Loch-Paar (Intra- oder Interbandanregung) und bewirkt die Lichtabsorption der NP oder es zerfällt strahlend, indem die EM-Energie mit der gleichen Frequenz wie die LSPR abgestrahlt wird und bewirkt die elastischen Rayleigh-Streuung der NP.<sup>[103]</sup> Bei AuNP mit  $d < 0.15\lambda$  sind die mittleren Streu- und Absorptionsintensitäten jeweils proportional zur sechsten und dritten Potenz des NP-Radius.<sup>[105]</sup> Bei größeren NP muss neben den oben erwähnten Retardierungseffekten, die vollständige Mie-Theorie berücksichtigt werden und die einfache Proportionalität der Intensitäten liegt nicht mehr vor. In Abb. 4.5 **B** ist zu erkennen, dass die Streuintensität ab ca.  $d > 0.2\lambda$  gegenüber der Absorptionsintensität überwiegt. Die Breite bzw. Halbwertsbreite (FWHM) der Plasmonenbande nimmt durch Strahlungsdämpfung mit zunehmendem NP-Durchmesser zu (Abb. 4.5 **A**).<sup>[94]</sup> Eine noch nicht erwähnte Möglichkeit die spektrale Position der LSPR zu beeinflussen, ist die Veränderung der Form der NP. Zum Beispiel weisen Gold-Nanostäbchen aufgrund ihrer anisotropen Form eine transversale und eine longitudinale LSPR auf, die durch polarisiertes Licht selektiv angeregt werden können.<sup>[106]</sup> Plasmonische Nanopartikel mit scharfen Kanten oder Spitzen, wie z.B. Nanowürfel, Nanooktaeder oder Nanosterne, weisen eine stärkere Rotverschiebung der LSPR im Vergleich zu ähnlich großen Nanosphären auf.<sup>[107,108]</sup> Außerdem gibt es die Möglichkeit der LSPR-Modifizierung über Kern-Schale Nanostrukturen und die Kopplung von Plasmonen.<sup>[109–112]</sup> Letzteres wird ausführlich in Kapitel 4.2.3 beschrieben.

#### 4.2.2 Lokale Feldverstärkung

Die lokalisierte Ladungsdichteoszillation sorgt ebenso wie die propagierenden SP für die Entstehung eines lokalen elektrischen Feldes, das einige Größenordnungen stärker sein kann als die einfallende elektrische Feldstärke. Das elektrische Feld der LSP reicht allerdings maximal 10-30 nm in das Dielektrikum der Umgebung hinein und ist in unmittelbarer Nähe der Oberfläche am stärksten (Abb. 4.6).<sup>[89]</sup>



**Abbildung 4.6:** **A** Schematische Darstellung der Feldlinien des verstärkten lokalen elektrischen Feldes am NP durch Anregung einer dipolaren LSPR. Die Verstärkung des E-Feldes ist an der gegenüberliegenden Seite der verschobenen Elektronen am höchsten. **B** Schematische Darstellung des relativen  $|E|^2$  Intensitätsprofils. Eigene Abbildung in Anlehnung an Referenzen<sup>[96,113,114]</sup>.

Für eine qualitative Betrachtung der aus der Dipoloszillation verursachten Feldverstärkung kann der getriebene harmonische Oszillator aus der klassischen Mechanik herangezogen werden. Entsprechend kann das induzierte Dipolmoment  $\mu_{\text{ind}}$  in einfachster Beschreibung, wie in Gleichung 4.5 zu sehen, über die Polarisierbarkeit der Metallnanosphäre  $\alpha_{\text{np}}$  und die einfallende elektrische Feldstärke  $E_0(\omega_0)$  definiert werden.<sup>[113]</sup>

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha_{\text{np}} E_0(\omega_0) \quad (4.5)$$

Eine einfallende EM-Welle verändert die Polarität des induzierten Dipols  $\mu_{\text{ind}}$  periodisch mit der Kreisfrequenz  $\omega_0$  und führt zur Entstehung eines Hertzschen Dipols bzw. einer Antenne auf der Nanoebene sowie zur Verstärkung des lokalen elektrischen Feldes in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche (siehe Abb. 4.6).<sup>[113]</sup> Je näher die Frequenz  $\omega_0$  des einfallenden EM-Feldes an der LSPR-Frequenz  $\omega_{\text{lsp}}r$  liegt, desto größer wird die Feldverstärkung. Innerhalb des quasi-statischen Näherungs-Regimes kann die (komplexe) Polarisierbarkeit der NP  $\alpha_{\text{np}}$  wie folgt definiert werden:<sup>[115,116]</sup>

$$\alpha_{\text{np}} = 3\varepsilon_0 V \left( \frac{\varepsilon_{\text{m}} - \varepsilon_{\text{u}}}{\varepsilon_{\text{m}} + 2\varepsilon_{\text{u}}} \right) \quad (4.6)$$

Die Polarisierbarkeit ist bei Fröhlich Bedingungen  $\text{Re}[\varepsilon(\omega)_{\text{np}}] = -2\varepsilon_{\text{u}}$  am höchsten (vgl.  $\sigma_{\text{ext}}$  in Gleichung 4.3) und bedingt bei LSPR-Bedingungen eine Verstärkung des inneren und des äußeren Feldes. Die Verteilung des elektrischen Feldes innerhalb ( $E_{\text{in}}$ , Gl. 4.7) und

außerhalb ( $E_{\text{out}}$ , Gl. 4.8) der Nanosphären kann über die Lösung der Laplace-Gleichung des Potentials  $\nabla^2\Phi = 0$  und folglich  $E = -\nabla\Phi$  bestimmt werden.<sup>[115]</sup>

$$E_{\text{in}} = \frac{3\varepsilon_{\text{u}}}{\varepsilon_{\text{m}} + 2\varepsilon_{\text{u}}} E_0 \quad (4.7)$$

$$E_{\text{out}} = E_0 + \frac{(3(n \cdot \mu) - \mu)}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_{\text{u}}} \frac{1}{r^3} \quad (4.8)$$

In Gleichung 4.8 ist das Dipolmoment  $\mu = \varepsilon_0\varepsilon_{\text{u}}\alpha_{\text{np}}E_0$ ;  $r$  die Distanz zur NP-Oberfläche bzw. die Länge des Positionsvektors zu  $P$  (*point of interest*) und  $n$  der Einheitsvektor zu  $P$ . Eine auf den NP einfallende ebene Welle führt zu einem oszillierenden Dipolmoment  $\mu(t)$  (Gl. 4.9), welches die Veränderung der elektrischen Felder und die Streuung der ebenen Welle am NP bewirkt.<sup>[104,115,116]</sup>

$$\mu(t) = \varepsilon_0\varepsilon_{\text{u}}\alpha_{\text{np}}E_0e^{i\omega t} \quad (4.9)$$

Für das magnetische Feld  $H$  und das elektrische Feld  $E$  der Nanosphären im quasi-statischen Näherungs-Regime folgt durch den assoziierten elektrischen Dipol  $\mu(t)$  in der Nah-, Zwischen-, und Fernzone:<sup>[115,116]</sup>

$$H = \frac{ck^2}{4\pi}(n \times \mu) \frac{e^{ikr}}{r} \left(1 - \frac{1}{ikr}\right) \quad (4.10)$$

$$E = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_{\text{u}}} \left\{ k^2(n \times \mu) \times n \frac{e^{ikr}}{r} + (3n(n \cdot \mu) - \mu) \left( \frac{1}{r^3} - \frac{ik}{r^2} \right) e^{ikr} \right\} \quad (4.11)$$

In der Nahzone am NP, d.h.  $kr \ll 1$  mit  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ , ergibt sich als Näherungsausdruck für das elektrische Feld Gl. 4.8 und für das magnetische Feld Gl. 4.12.<sup>[115,116]</sup>

$$H = \frac{i\omega}{4\pi}(n \times \mu) \frac{1}{r^2} \quad (4.12)$$

Das magnetische Feld der Nahzone ( $kr \ll 1$ ) ist, multipliziert mit dem Wellenwiderstand des Mediums  $Z_{\text{u}}$ , um den Faktor  $kr$  kleiner als das elektrische Feld (vgl.  $r^{-x}$ -Abhängigkeiten).<sup>[115]</sup> Das bedeutet, dass die Nahfelder überwiegend elektrischer Natur sind. Im statischen Limes ( $k \rightarrow 0$ ), also im NP, ist die magnetische Feldstärke null. In der Fernzone  $kr \gg 1$  nehmen die Dipolfelder folgende Formen an:<sup>[115,116]</sup>

$$H = \frac{ck^2}{4\pi} \frac{(n \times \mu)e^{ikr}}{r} \quad (4.13)$$

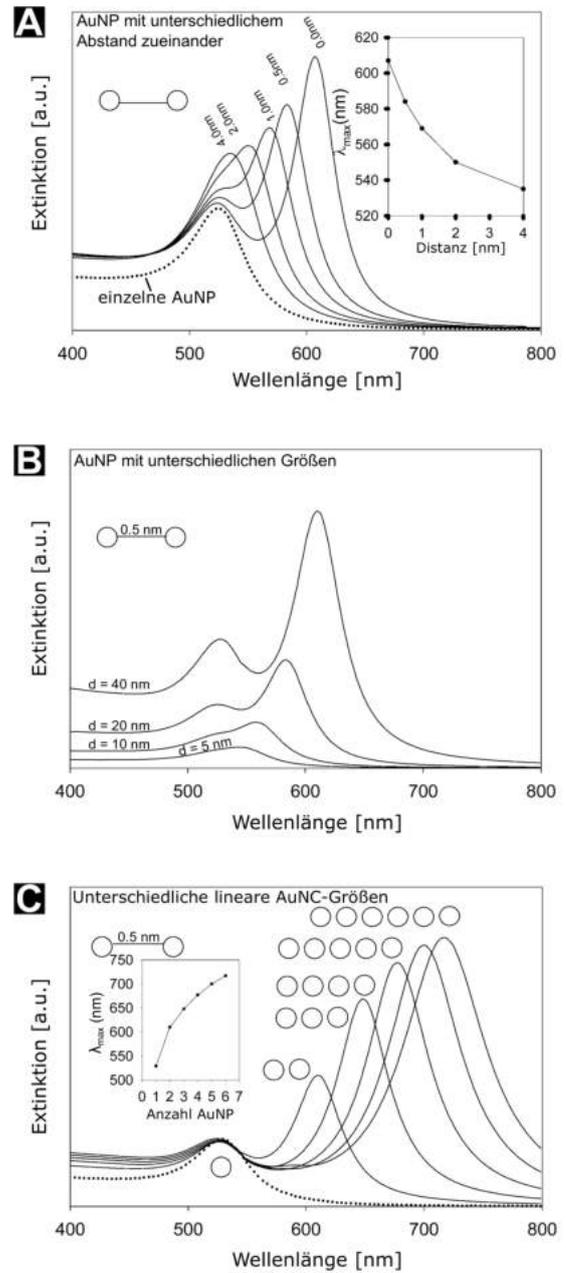
$$E = Z_u H \times n \quad (4.14)$$

Die Felder in der Fernzone zeigen das typische  $r^{-1}$ -Verhalten von Strahlungsfeldern.<sup>[115]</sup> Die Feldverstärkung ist analog zur LSPR-Frequenz abhängig vom Dielektrikum des Metalls und der Umgebung, der Größe und der Form der Nanopartikel.<sup>[117–119]</sup> Bei Gold- und Silber-Nanosphären wurde die größte lokale Feldverstärkung im NP-Durchmesserbereich von 40 - 60 nm nachgewiesen.<sup>[120–122]</sup> Im Vergleich zu Gold zeigt Silber eine höhere Nahfeldverstärkung, da die Energiedifferenz zwischen LSPR und Interband-Absorption bei Silber höher ist und dementsprechend weniger Resonanzdämpfung durch Interbandübergänge stattfinden.<sup>[123]</sup> Allerdings ist Gold für biologische und medizinische Anwendungen aufgrund seiner Biokompatibilität und Inertheit geeigneter als Silber (siehe Kapitel 4.3.3). Starke Krümmungen der Metalloberflächen sorgen durch den sogenannten Blitzableiter-effekt (*lightning rod-effect*) für eine noch höhere Feldverstärkung.<sup>[124]</sup> Scharfe Spitzen und Kanten, wie z.B. bei Nanosternen oder Nanowürfeln, zeigen eine bis zu 7-16 mal höhere maximale Feldverstärkungen als Nanosphären, allerdings sind diese Felder direkt an den Orten höchster Krümmung lokalisiert und klingen über die Distanz schneller ab.<sup>[119]</sup> Ein im Rahmen dieser Arbeit wichtiges Phänomen ist die Plasmonenkopplung bzw. die Überlagerung der elektrischen Nahfelder von mindestens zwei NP in direkter räumlicher Nähe zueinander, was ebenso zu einer deutlichen Verstärkung der Felder führt und im nächsten Kapitel näher erläutert ist.

### 4.2.3 Plasmonenkopplung und Nahfeldinterferenz

Eine bereits kurz angeführte, weitere Möglichkeit die optischen Eigenschaften plasmonischer NP zu modifizieren, ist die Kopplung der Plasmonen von mindestens zwei NP in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander. Zur Kopplung der Plasmonen und zur Interferenz der Nahfelder in den Lücken zwischen den NP kommt es nur bei Unterschreiten eines bestimmten Abstandes. Eine abnehmende Distanz führt dazu, dass sich die NP gegenseitig über ihre induzierten elektrischen Felder beeinflussen, sodass es zur kollektiven Oszillation der Leitungselektronen im gesamten Nanopartikelcluster (NPC) kommen kann. In der einfachsten Näherung kann das über eine Dipol-Dipol Kopplung beschrieben werden. In Abb. 4.7 A ist zu sehen, dass die Distanz zwischen AuNP einen signifikanten Einfluss auf die Ausprägung der LSPR im Extinktionsspektrum hat. Dabei handelt es sich um berechnete, qualitative Spektren von dispergierten AuNP-Dimeren mit unterschiedlichen

Separationsabständen. Die gestrichelte Linie zeigt, dass stark dispergierte, quasi einzeln stabilisierte AuNP mit  $d = 20$  nm nur einen LSPR-Peak bei ungefähr 530 nm aufweisen. AuNP-Dimere (Abb. 4.7 A,B) und auch größere Cluster (Abb. 4.7 C) weisen dagegen mindestens zwei Peaks im Extinktionsspektrum auf. Der Peak bei höheren Wellenlängen kann der rotverschobenen plasmonischen Dipolresonanz zugeordnet werden.<sup>[125,126]</sup> Je geringer die NP-Distanz wird, desto weiter rotverschoben und intensiver ist dieser Peak. Die maximale Verschiebung der Dipolresonanz liegt vor, wenn die NP sich berühren ( $D = 0$  nm) und vom Dipol-Dipol Wechselwirkungsregime in das leitendgekoppelte Regime übergehen und gewissermaßen zu einem einzelnen NP werden.<sup>[97,127]</sup> Auf der anderen Seite liegt keine interpartikuläre Wechselwirkung mehr vor, wenn die NP-Distanz dem fünffachen des NP-Radius entspricht ( $D = 5r$ ).<sup>[97]</sup> Der Peak bei kleineren Wellenlängen nahe der Dipolresonanz der einzelnen NP wird durch plasmonische Quadrupol-Anregung (bzw. das transversale Dipolmoment, siehe unten  $\pi^*$ ) verursacht.<sup>[125,126]</sup> Die Intensität dieses Peaks sinkt mit geringer werdender NP-Distanz. Die spektrale Position und Intensität der Peaks hängt, neben der interpartikulären Distanz, von der Größe (Abb. 4.7 B) und Form der NP, von der Clustergröße und der Orientierung der NP in den Clustern (Abb. 4.7 C) ab.<sup>[97,125]</sup> Eine genaue mathematische Beschreibung der Plasmonenkopplung würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Allerdings



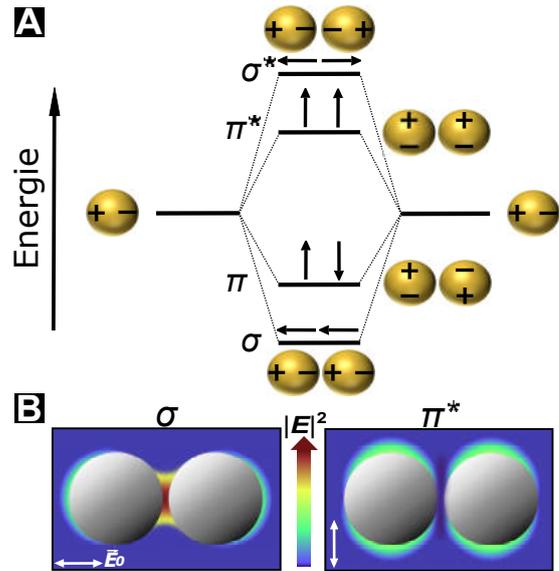
**Abbildung 4.7:** Elektrodynamische Modellierung für AuNPC. **A:** Extinktionsspektren von  $d = 20$  nm AuNP mit unterschiedlichem interpartikulären Abstand  $s$  **B:** AuNP Extinktionsspektren mit  $d = x$  und  $s = 0.5$  nm **C:** Extinktionsspektren von linearen AuNPC ( $d = 40$  nm,  $s = 0.5$  nm). Adapted with permission from<sup>[125]</sup> Copyright © 2004 American Chemical Society.

veröffentlichten P. Nordlander und seine Mitarbeiter die Methode der Plasmonen-Hybridisierung für Nanosphären-Dimere und größere und komplexere NPC, die die Berechnung und Interpretation von Plasmonfrequenzen und optischen Absorptionsspektren deutlich vereinfacht.<sup>[128–131]</sup> Die Plasmonen-Hybridisierung ermöglicht die Darstellung von fundamentalen Plasmon-Modi der NPC über die lineare Kombination der Plasmonen einzelner NP, analog zur Molekülorbitaltheorie bzw. LCAO-Theorie (Abb. 4.8). Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmonen der Nanosphärendimere analog zu Molekülorbitalen als bindende und antibindende Kombinationen,

d.h. Hybridisierungen der individuellen NP-Plasmonen, beschrieben werden können.<sup>[129]</sup>

Besonders der energieärmste, bindende Plasmonmodus  $\sigma$  (siehe Abb. 4.8) zeigt unter resonanter, longitudinaler Anregung eine starke Feldverstärkung zwischen den Partikeln (Hotspot in Abb. 4.8 B), vergleichbar mit der räumlichen Verteilung eines bindenden Molekülorbitals zwischen zwei Atomen.<sup>[134]</sup> Die durch konstruktive Feldinterferenz der jeweiligen Dipolfelder entstehenden Hotspots verursachen eine sehr intensive Verstärkung der spektroskopischen Signale von Molekülen in den Zwischenräumen der NP, zum Beispiel bei der oberflächenverstärkten Ramanstreuung (SERS, siehe Kapitel 4.3). Der sehr ineffiziente Ramanstreuungsprozess kann innerhalb der Hotspots um den Faktor  $10^{14}$  oder höher verstärkt und einzelne Moleküle nachgewiesen werden.<sup>[26,135]</sup>

Weitere Anwendungsgebiete der Nahfeldinterferenz in geordneten NPC sind der elektromagnetische Energietransport und die photonische Wellenführung im Subwellenlängenbereich.<sup>[136–140]</sup> Der im Extinktionsspektrum nachweisbare, antibindende  $\pi^*$  Modus ist auch unter transversaler Anregung schwach.<sup>[132]</sup> Außerdem führt dieser Plasmonmodus nicht zur Ausbildung eines Hotspots. Die Modi  $\sigma$  und  $\pi^*$  weisen gesamtheitlich ein Dipolmoment auf und wechselwirken mit Licht, daher werden sie auch als helle Plasmonen beschrieben. Die Modi  $\pi$  und  $\sigma^*$ , in denen die einzelnen NP entgegengesetzt polarisiert sind, sind bei Homodimeren mit geringem interpartikulärem Abstand weder bei transver-

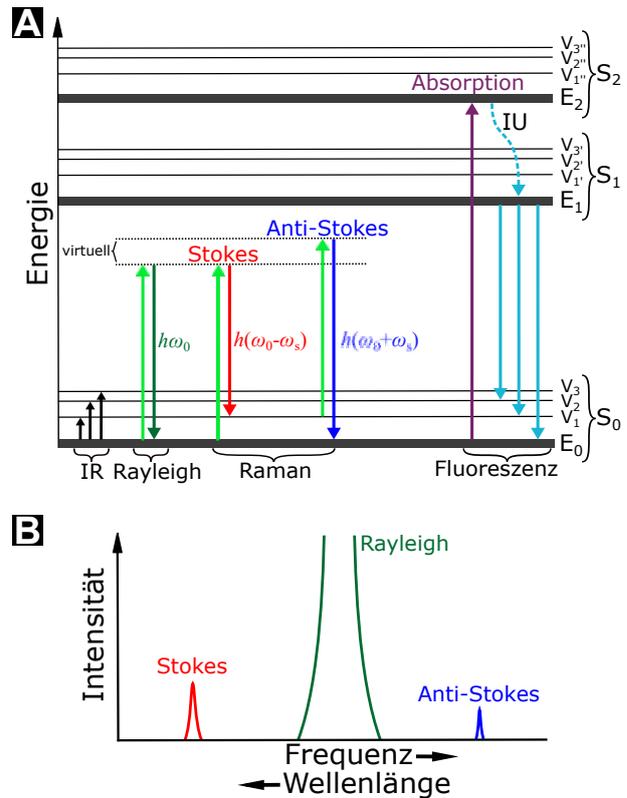


**Abbildung 4.8:** Qualitativ, schematische Beschreibung der **A:** Plasmonen-Hybridisierung zweier identischer, wechselwirkender Nanosphären und **B:** des relativen  $|E|^2$  Intensitätsprofils heller Plasmonen. Eigene Abbildung in Anlehnung an Referenzen<sup>[103,129,132,133]</sup>.

saler, noch longitudinaler Anregung im Extinktionsspektrum zu beobachten. Diese Modi werden auch als dunkle Plasmonen bezeichnet, da sie gesamtheitlich kein Dipolmoment aufweisen (Netto-Dipolmoment = 0) und nicht mit einfallendem Licht wechselwirken. Bei Heterodimeren, wie einem AgNP-AuNP Dimer, sind die  $\pi$  und  $\sigma^*$  Modi im Extinktionsspektrum nachweisbar.<sup>[132]</sup>

### 4.3 Oberflächenverstärkte Ramanstreuung (SERS)

Sowohl die Raman-Spektroskopie, als auch die IR-Spektroskopie sind Methoden der Rotations-Schwingungsspektroskopie von Molekülen. Die IR-Spektroskopie basiert auf der Absorption von Infrarotstrahlung zur Rotations- und Schwingungsanregung des Moleküls. Die Raman-Spektroskopie basiert hingegen auf dem Raman-Effekt, das heißt der unelastischen Streuung von Photonen, die entweder einen Teil ihrer Energie abgeben (Stokes Streuung, Abb. 4.9) und folglich als Streulicht geringerer Frequenz detektierbar sind oder Energie aufnehmen<sup>4</sup> und das Streulicht höhere Frequenzen als das einfallende Licht aufweist (Anti-Stokes-Streuung).<sup>[24,86]</sup> Im Fall der Stokes-Streuung verliert das Photon Energie durch Anregung eines Rotations- oder Schwingungszustandes und bei der Anti-Stokes-Streuung nimmt es Energie durch die Relaxation solcher angeregten Zustände auf, wie im Jablonski-Energiediagramm in Abb. 4.9 **A** abgebildet ist. IR- und Raman-Spektroskopie liefern komplementäre bzw. ergänzende Informationen über die Struktur und die Eigenschaften gleicher-



**Abbildung 4.9:** **A:** Vereinfachtes Jablonski-Energiediagramm für Infrarot-Schwingungsanregung (IR), Rayleigh- und Ramanstreuung sowie für Fluoreszenz.  $E_{>0}$  = elektronisch angeregter Zustand, S = Singulett-Zustand, v = angeregter Schwingungszustand, IU = Innere Umwandlung. **B:** Schematisches Raman-Spektrum. Eigene Abbildung in Anlehnung an Referenzen<sup>[141,142]</sup>.

<sup>4</sup>Das Molekül muss dabei im angeregten Zustand vorliegen

tiger Moleküle, da Schwingungen symmetrisch zum Inversionszentrum oft Raman-aktiv und asymmetrische Schwingungen oft IR-aktiv sind.<sup>[24]</sup> Die Bedingung für die Aktivität einer Schwingung bei der IR-Spektroskopie ist die Änderung des Dipolmoments und bei der Raman-Spektroskopie die Änderung der Polarisierbarkeit des Moleküls. Die inelastische Raman-Streuung kann klassisch über die Modulation des einfallende Felds mit der Frequenz  $\omega_0$  durch die Schwingung eines induzierten Dipolmoments mit der Eigenkreisfrequenz  $\omega_s$  erklärt werden.<sup>[113]</sup> Generell kommen drei Dipol-Komponenten im Molekül vor (vgl. Abb. 4.9):<sup>[113]</sup>

1.  $\mu_{\text{ind}}(\omega_0) = \text{Rayleigh-Streuung mit } E = \hbar(\omega_0)$
2.  $\mu_{\text{ind}}(\omega_0 - \omega_s) = \text{Stokes-Streuung mit } E = \hbar(\omega_0 - \omega_s)$
3.  $\mu_{\text{ind}}(\omega_0 + \omega_s) = \text{Anti-Stokes-Streuung mit } E = \hbar(\omega_0 + \omega_s).$

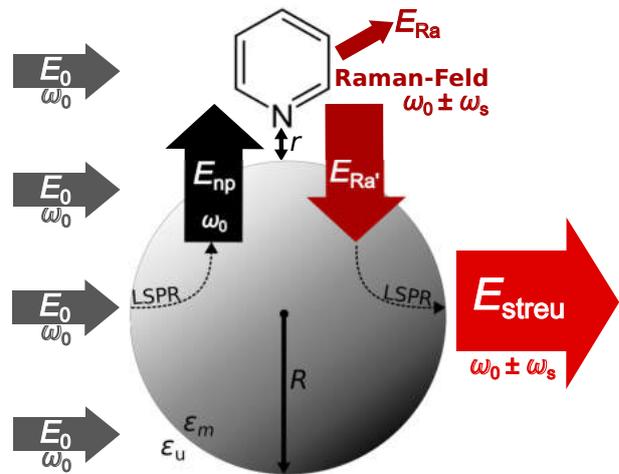
Hierbei ist  $E$  die Energie des gestreuten Lichtes. Die Eigenkreisfrequenz  $\omega_s$  bezieht sich auf einen bestimmten Schwingungszustand aus der Gesamtzahl der Normalschwingungen, welche  $3N - 6$  für nichtlineare und  $3N - 5$  für lineare Moleküle entsprechen.<sup>[113]</sup> Von einer außergewöhnlich starken Ramanstreuung berichteten erstmals Fleischmann *et al.* im Jahr 1974. Dieser Effekt zeigte sich bei Pyridin, das an einer angerauten Silberelektrode adsorbiert war.<sup>[23]</sup> Das Phänomen war und ist deshalb so bemerkenswert, da die Ramanstreuung nicht adsorbierter Moleküle einen sehr ineffizienten Streuprozess darstellt (vgl. elastische Rayleigh-Streuung in Abb. 4.9 **B**). Nur wenige auf ein Molekül einfallende Photonen, ungefähr eines aus zehn Millionen, werden unelastisch gestreut.<sup>[24]</sup> Beim Vergleich der Wirkungsquerschnitte von Raman-aktiven Molekülen (typischerweise bei  $\sim 10^{-30} \text{ cm}^2$ ) und fluoreszierenden Molekülen (typischerweise bei  $\sim 10^{-16} \text{ cm}^2$ ) zeigt sich ebenso die geringe Effizienz der Ramanstreuung, die um ungefähr 14 Größenordnungen kleiner ist, als die der Fluoreszenz.<sup>[26]</sup> Die resonante Ramanstreuung, das heißt bei einem Raman-Streuprozess, bei dem das einfallende Photon in Resonanz mit einem elektronischen Übergang ist und der als virtuell bezeichnete Übergangszustand mit einem realen Energieniveau zusammenfällt, ist zwar stärker als die normale Ramanstreuung, allerdings immer noch deutlich schwächer als die Fluoreszenz.<sup>[86,142]</sup> Drei Jahre nach der Entdeckung von Fleischmann *et al.* erweiterten Jeanmaire und Van Duyne diese Erkenntnis und die Anwendbarkeit analog auf andere stickstoffhaltige Heterocyklen und Amine mit quantitativen Messungen und einer ersten Erklärung der oberflächenverstärkten Ramanstreuung, kurz SERS.<sup>[143]</sup> Sie führten SERS auf einen elektromagnetischen Verstärkungsmechanismus zurück. Zeitnah berichteten Albrecht und Creighton außerdem von einem chemischen

Verstärkungsmechanismus.<sup>[144]</sup> Die SERS-Pioniere berichteten anschließend, dass der elektromagnetische Mechanismus den größten Beitrag zur Ramanverstärkung leistet.<sup>[145,146]</sup> Im Jahr 1996 berichteten Stockmann *et al.* zum ersten mal über sehr hohe Feldverstärkungen in NPC und etablierten gleichzeitig den Begriff Hotspots, die die SERS-Intensität von darin lokalisierten Molekülen noch weiter erhöhen können.<sup>[96,147]</sup> Ein Jahr später wurde schließlich von zwei unabhängigen Gruppen von der *single-molecule* SERS an Nanosystemen und Verstärkungsfaktoren von  $10^{14}$ - $10^{15}$  berichtet, die über die Sensitivität der Fluoreszenz hinausgehen.<sup>[25,26]</sup> Die Nanomedizin und die Biosensorik sind zwei der vielversprechendsten Anwendungsbereiche von SERS. Die aktuellere Forschung beschäftigt sich beispielsweise mit der Entwicklung von nanoskaligen SERS-Plattformen zur Detektion von spezifischen Zellen, Metaboliten, Pathogenen, Proteinen oder zellulären Prozessen und für die nanomedizinischen Theranostik (**Therapie** und **Diagnostik**) von Tumorzellen mithilfe des photothermalen Effekts und SERS.<sup>[18,19,65,84,89,97,148,149]</sup>

#### 4.3.1 Verstärkungsmechanismen an Nanopartikeln

Der chemische und elektromagnetische Verstärkungsmechanismus von SERS an NP können beide gleichzeitig wirken. Für einen chemischen Verstärkungseffekt müssen die Moleküle an bestimmten Oberflächenstellen adsorbiert sein, um elektronisch mit der Oberfläche wechselzuwirken. Das führt in ähnlicher Weise wie bei der resonanten Ramanstreuung zu einem Verstärkungseffekt.<sup>[19]</sup> Der elektromagnetische Verstärkungsmechanismus (Abb. 4.10) entsteht durch die Feldverstärkung der Oberflächenplasmonen, wie in Kapitel 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, die auf ein nah an der NP-Oberfläche lokalisiertes Molekül wirkt und das gestreute Feld des Moleküls verstärkt.

Diese Raman-aktiven Moleküle werden im Zusammenhang mit SERS als Raman-Reporter bezeichnet. In Molekülen bzw. in Raman-Reportern kann in ähnlicher Weise wie bei der Plasmonenresonanz in Metallsphären, ein Dipolmoment induziert werden (siehe



**Abbildung 4.10:** Schematische Darstellung des elektromagnetischen SERS-Verstärkungsmechanismus.  $E_0$  und  $E_{Ra'}$  werden durch die LSPR bedingte elastische Lichtstreuung am NP verstärkt. Eigene Abbildung in Anlehnung an Referenzen<sup>[19,38,113]</sup>.

Gleichung 4.5). Dieses Dipolmoment  $\mu_{\text{ind}}$  ist dabei abhängig von der Polarisierbarkeit des Moleküls  $\alpha_{\text{mo}}$  und der Stärke des gesamten auf ein Molekül am NP einfallenden EM-Felds  $E_{\text{in}}(\omega_0)$ :<sup>[38]</sup>

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha_{\text{mo}} E_{\text{in}}(\omega_0) \quad (4.15)$$

$$E_{\text{in}}(\omega_0) = E_0(\omega_0) + E_{\text{np}}(\omega_0) \quad (4.16)$$

In Abb. 4.10 ist dargestellt, dass die LSPR-bedingte elastische Lichtstreuung des z.B. von einem Laser einfallenden EM-Felds  $E_0(\omega_0)$ , das verstärkte, lokale Feld  $E_{\text{np}}(\omega_0)$  verursacht. Das gesamte verstärkte Feld  $E_{\text{in}}(\omega_0)$  bedingt wiederum eine verstärkte inelastische Raman-Streuung des Moleküls am NP. Die Frequenzen der Stokes und Anti-Stokes Streuung ( $\omega_0 \pm \omega_s$ ), die im Vergleich zur Frequenz des einfallendes Lichts  $\omega_0$  nur relativ geringfügig verschoben sind, weisen ein ähnliches Potential der LSPR-Anregung der Nanostruktur auf, wie  $\omega_0$ .<sup>[19]</sup> Im optimalen Fall liegen die Frequenzen  $\omega_0$ , ( $\omega_0 \pm \omega_s$ ) und  $\omega_{\text{lsp}}^{\text{np}}$  nahe beieinander. Praktisch bedeutet das, dass ein großer Teil des inelastisch gestreuten Raman-Streulichts  $E_{\text{Ra}}(\omega_0 \pm \omega_s)$  über weitere LSPR-Anregung, also einem elastischen Streuprozess, am nächstgelegenen NP (und an weiteren NP) weiter verstärkt werden kann ( $E_{\text{streu}}(\omega_0 \pm \omega_s)$ ). Das resultiert im ausfallenden Feld  $E_{\text{out}}(\omega_0 \pm \omega_s)$ :<sup>[38]</sup>

$$E_{\text{out}}(\omega_0 \pm \omega_s) = E_{\text{Ra}}(\omega_0 \pm \omega_s) + E_{\text{streu}}(\omega_0 \pm \omega_s) \quad (4.17)$$

In diesem simplen Modell ist die Intensität von SERS abhängig vom einfallenden Feld  $E_{\text{in}}(\omega_0)$  und vom ausfallenden Feld  $E_{\text{out}}(\omega_0 \pm \omega_s)$ :<sup>[113]</sup>

$$I_{\text{SERS}} = I(\omega_0)I(\omega_0 \pm \omega_s) = |E_{\text{in}}(\omega_0)|^2 |E_{\text{out}}(\omega_0 \pm \omega_s)|^2 \approx |E_{\text{in}}(\omega_0)|^4 \quad (4.18)$$

Für Raman-Schwingungsbanden, die nahe an der einfallenden Strahlungsfrequenz liegen ( $\omega_0 \approx (\omega_0 \pm \omega_s)$ ), gilt für die SERS-Intensität die Näherung  $I_{\text{SERS}} \approx |E_{\text{in}}(\omega_0)|^4$ . Der Grad der elektromagnetischen Verstärkung  $EF_{\text{EM}}$  (*enhancement factor*) zur SERS-Intensität kann für NP im quasi-statischen Regime näherungsweise anhand der folgenden Gleichung beschrieben werden:<sup>[19,150]</sup>

$$EF_{\text{EM}} \approx \left| \frac{E_{\text{np}}(\omega_0)}{E_0(\omega_0)} \right|^4 = \left| \frac{\varepsilon_{\text{m}} - \varepsilon_{\text{u}}}{\varepsilon_{\text{m}} + 2\varepsilon_{\text{u}}} \right|^4 \left( \frac{R}{R+r} \right)^{12} \quad (4.19)$$

Der Grad der Verstärkung aus Gleichung 4.19 gibt die Zunahme der SERS-Intensität bedingt durch die Intensität des lokalen Felds der NP  $E_{\text{np}}(\omega_0)$  relativ zur Intensität des einfallenden Felds  $E_0(\omega_0)$  an. Das bedeutet, dass die Zunahme der Stärke des lokalen E-Felds um den Faktor  $E_{\text{np}}/E_0 = 10$ , eine Zunahme der SERS-Intensität um einen Faktor  $(E_{\text{np}}/E_0)^4 = 10^4 = 10000$  nach sich zieht. Eine Zunahme von  $E_{\text{np}}/E_0 = 100$  führt entsprechend zu einer Intensitätszunahme um den Faktor hundert Millionen ( $10^8$ ).<sup>[92]</sup> Dieser Zusammenhang zeigt, dass ein starkes lokales Feld der NP zu einer hohen oberflächenverstärkten Raman-Intensität führen kann, wenn die Raman-Reporter am NP bzw. in den Hotspots lokalisiert sind. In Kapitel 4.2.2 Gleichung 4.8 wurde bereits gezeigt, dass die Stärke der elektrischen Dipol-Nahfelder der NP mit ungefähr  $E \sim r^{-3}$  skalieren. Aus Gleichung 4.18 folgt schließlich eine  $I_{\text{SERS}} \sim (r^{-3})^4 = r^{-12}$  Abhängigkeit der SERS-Intensität vom Abstand des Raman-Reporters zur NP-Oberfläche, die auch in Gl. 4.19 dargestellt ist. Im besten Fall sind die Raman-Reporter an der NP-Oberfläche physikalisch oder chemisch adsorbiert ( $r = 0$ ). Sind die Raman-Reporter adsorbiert, kann es, wie bereits erwähnt, zu einem chemischen Verstärkungsmechanismus kommen. Die Beiträge der chemischen Verstärkung zur gesamten SERS-Intensität betragen ca.  $10^2 - 10^3$  und sind generell schwächer, als die der elektromagnetischen Verstärkung.<sup>[19,151]</sup> In der Literatur werden vier miteinander verbundene Prozesse genannt, die zur chemischen Verstärkung beitragen:<sup>[19,152-155]</sup>

1. Erhöhung der molekularen Polarisierbarkeit bei Adsorption an NP
2. Ladungsübertragungs-Resonanz des Molekül-Metall-Komplexes
3. Verstärkung durch Resonanzstreuung
4. Verstärkung durch Plasmonenresonanz.

Einen allgemeinen, theoretischen Ausdruck für den chemischen Verstärkungsfaktor  $EF_{\text{chem}}$  von SERS wurde von Lombardi und Birke entwickelt, allerdings zeigt dieser deutliche praktische Schwächen bei der Bestimmung der zur Verstärkung beitragenden Faktoren, wie molekulare Polarisierbarkeit und Ladungstransfer, da diese sich wechselseitig beeinflussen und nicht unabhängig sind.<sup>[154]</sup> Eine verbreitete und deutlich praktischere Methode den gesamten SERS-Verstärkungsfaktor  $EF_{\text{SERS}} = EF_{\text{EM}} + EF_{\text{chem}}$  zu berechnen, ist:<sup>[19]</sup>

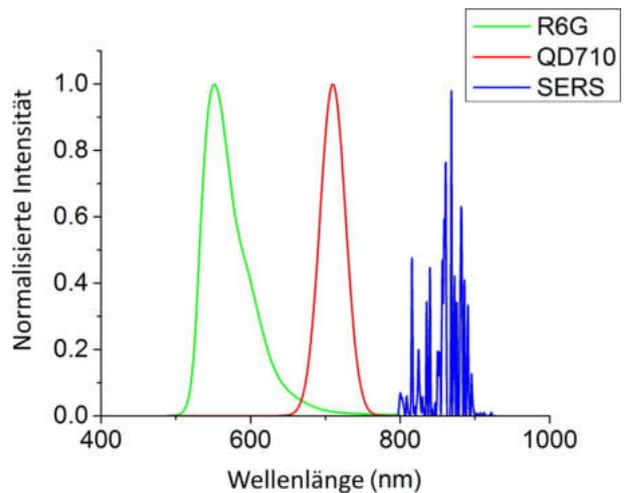
$$EF_{\text{SERS}} = \frac{I_{\text{SERS}}/N_{\text{np}}}{I_{\text{Ra}}/N_{\text{bulk}}} \left( = \frac{I_{\text{SERS}}(\text{mol})}{I_{\text{Ra}}(\text{mol})} \right) \quad (4.20)$$

$I_{\text{SERS}}$  ist die Intensität des Raman-Spektrums von SERS und  $I_{\text{Ra}}$  beschreibt die Intensität des Raman-Spektrums von gleichartigen, freien Molekülen, also einer „normalen“ Ramanstreuung ohne plasmonische Verstärkung.  $N_{\text{np}}$  und  $N_{\text{bulk}}$  sind die Anzahl an Molekülen innerhalb des Anregungsvolumens (Laserspot) auf der NP-Oberfläche oder im Bulkzustand des zu untersuchenden Moleküls. Der in Klammern stehende Term aus Gleichung 4.20 soll vereinfacht darstellen, wie  $EF_{\text{SERS}}$  hier zusammengesetzt ist. Es ist das Verhältnis der molaren SERS-Intensität zur molaren, „normalen“ Raman-Intensität. Diese Berechnung hat sich mittlerweile auf breiter Basis etabliert und scheint auf den ersten Blick relativ unkompliziert zu sein, dennoch kommt es immer wieder zu Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit von  $EF_{\text{SERS}}$ .<sup>[156]</sup> Zu fälschlicherweise sehr hohen  $EF_{\text{SERS}}$  kommt es in manchen Veröffentlichungen durch eine ungenaue Bestimmung von  $N$ , durch unterschiedlich genutzte Laserintensitäten oder Integrationszeiten innerhalb einer Versuchsreihe ohne Normalisierung oder durch selektive Signaldetektion aus Hotspots.<sup>[19]</sup> Unter Berücksichtigung der maximalen elektromagnetischen und chemischen Verstärkung, sowie des Resonanz-Ramaneffektes, ist theoretisch eine maximale SERS-Verstärkung von  $10^{16}$  möglich.<sup>[19,157–159]</sup> Nach aktuellen Kenntnissen ist  $10^{16}$  die maximal mögliche Raman-Verstärkung eines Moleküls bei idealen Bedingungen. Diese liegt damit signifikant höher als die in der Praxis über die gesamte Probe gemittelten, erreichbaren  $EF_{\text{SERS}}$ , da ideale Verstärkungsbedingungen bei absoluter Homogenität der NP-Systeme und eine ausschließliche Lokalisation der RaR in den Hotspots kaum möglich sind. Zusätzlich hängt die Verstärkung der Ramanstreuung von der Richtung der einfallenden Strahlung ab. Demnach kann sich die Raman-Verstärkung einzelner RaR selbst bei absolut homogenen Systemen in einer Probe deutlich unterscheiden. Litti *et al.* stellten durch eine Vielzahl von simulierten und experimentell ermittelten Verstärkungsfaktoren von dispergierten AuNPC fest, dass die durchschnittliche Raman-Verstärkung von adsorbierter 4-Mercaptobenzoessäure in der Größenordnung von  $10^5$  liegt.<sup>[2]</sup> Dieser vergleichsweise geringe Durchschnittswert entsteht dadurch, dass der größte Teil der in die SERS-Messungen und  $EF_{\text{SERS}}$ -Berechnung miteinbezogenen und oberflächengebundenen RaR nicht in den Hotspots der AuNPC lokalisiert ist und einer Verstärkung von weniger als  $10^2$  unterliegt.

#### 4.3.2 Vorteile von SERS in der biomedizinischen Bildgebung

Biomedizinische Bildgebungsverfahren die auf SERS basieren, weisen im Vergleich zu anderen Verfahren wie die Fluoreszenzbildgebung einige Vorteile auf. Im Gegensatz zur Fluoreszenz ist die Raman Streuung fast instantan und weist extrem kurze Lebenszeiten

der angeregten Zustände auf. Die Folge ist, dass SERS-Signale bzw. SERS-Plattformen eine höhere Photostabilität aufweisen und beispielsweise weniger anfällig gegenüber Photobleichung sind.<sup>[19,37]</sup> Des Weiteren ist in Abbildung 4.11 zu sehen, dass die SERS-Peaks vergleichsweise viel schärfer sind und weitaus mehr spektroskopische Informationen durch das SERS-Spektrum übermittelt werden kann. Die FWHM der Raman-Signale liegen bei ca. 1-2 nm und sind damit ca. 10-100 mal enger als die der Fluoreszenzemission der Quantenpunkte oder organischer Farbstoffe.<sup>[19,38,39]</sup> Außerdem können SERS-



**Abbildung 4.11:** Spektraler Vergleich der Fluoreszenzemission von Rhodamin 6G (R6G, grün) und Quantenpunkten (QD710, rot) mit einem SERS-Spektrum (blau). *Adapted with permission from<sup>[19]</sup> Copyright © 2015 American Chemical Society.*

Plattformen mit jeweils unterschiedlichen Raman-Reportern gleichzeitig mit demselben monochromatischen Laser angeregt werden und dabei ungefähr den gleichen Spektralbereich  $200 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  relativ zur Laserwellenlänge abdecken. Das macht Multiplexing mithilfe von relativ einfacher Instrumentation möglich.<sup>[19]</sup> SERS-Plattformen können mit jeweils unterschiedlichen NP-Strukturen, Raman-Reportern und folglich mit unterschiedlichen optimalen Anregungswellenlängen und SERS-Spektren so präpariert werden, dass sie ungefähr identische pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen (siehe Kapitel 4.4). Darüber hinaus werden die Vorteile von SERS im herausragenden Review über SERS-NP in der Medizin<sup>[19]</sup> von L. Lane *et al.* aus dem Jahre 2015 wie folgt zusammengefasst: SERS ist sehr effektiv im Nahinfrarot-Bereich, in dem die Lichtschwächung und Autofluoreszenz des Gewebes sehr gering sind; Raman-Spektroskopie ist besonders im Vergleich zur IR-Spektroskopie geeigneter für biomedizinische Bildgebung, da die Interferenzen mit Wasser geringer sind; intensive SERS-Signale werden routinemäßig von sehr geringen NP-Konzentrationen im Femtomolar-Bereich erhalten, was die Nachweisgrenzen der gängigsten Bildgebungstechnologien (MRT, PET, CT) erheblich übertrifft.

#### 4.3.3 Design einer SERS-Sonde

Beim Design der SERS-Plattformen taucht als eine der grundlegenden Fragen, die Frage nach der Wahl des Metalls der NP auf. Für biomedizinische Anwendungen sind Gold-

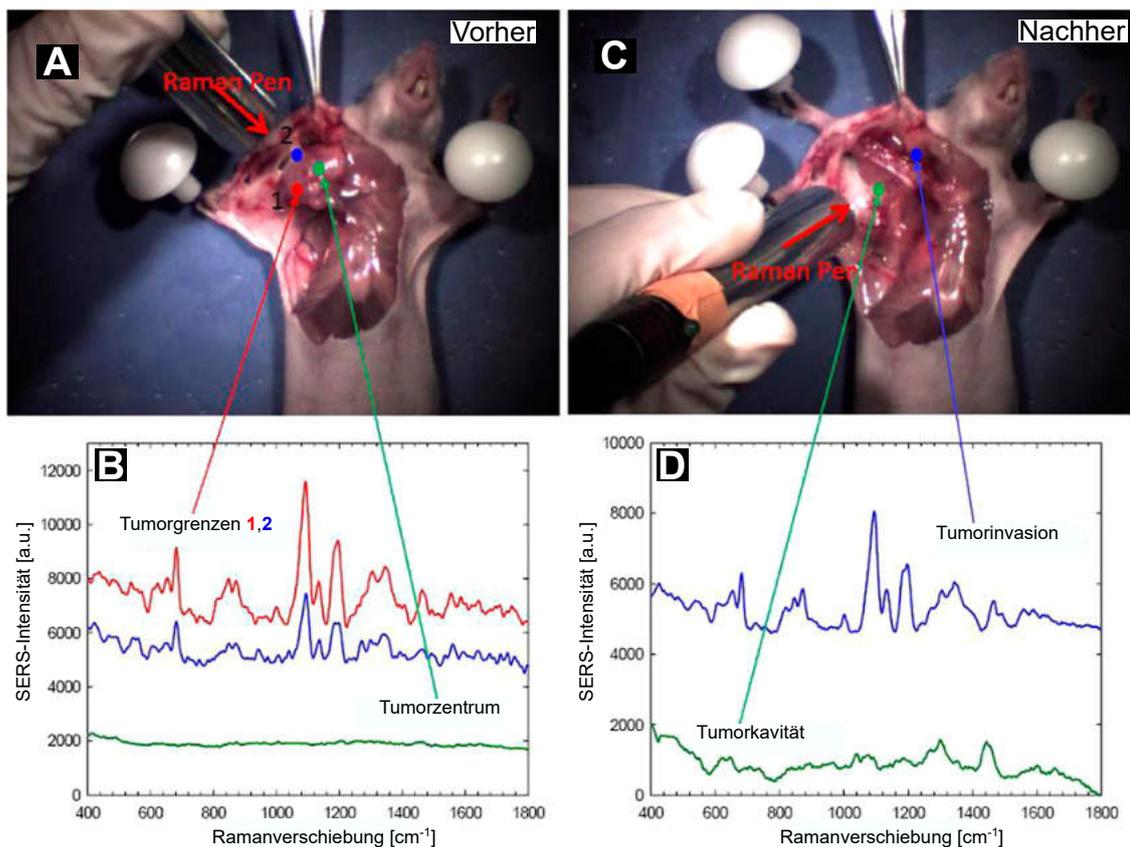
NP aufgrund ihrer Biokompatibilität und Inertheit geeigneter, als weniger inerte plasmonische Metall-NP. In klinischen Krebsstudien wurden Menschen bereits hohe Dosen an Gold-NP verabreicht, die für die SERS-Bildgebung höher als nötig gewesen wären.<sup>[160,161]</sup> Im Gegensatz zu Gold-NP ist die Oberfläche von Silber-NP anfälliger gegenüber Oxidation, die zur Freisetzung von toxischen  $\text{Ag}^+$ -Ionen führt.<sup>[162]</sup> Eine Studie von Köller *et al.* aus dem Jahre 2012 zeigt, dass Silberacetat und Silber-NP im ähnlichen unteren ppm-Konzentrationsbereich für einige menschliche Zelltypen *in vitro* toxisch wirken.<sup>[163]</sup> Dies sei aufgrund der breiten Anwendung als z.B. antibakterielles Mittel oder in Konsumgütern, besorgniserregend. Im sichtbaren Bereich des Spektrums sind Silber-NP zwar plasmonisch aktiver als Gold-NP, im sog. Nahinfrarot-Fenster des biologischen Gewebes hingegen entfällt dieser Vorteil.<sup>[19]</sup> Gold-NP werden daher generell für biomedizinische Anwendungen bevorzugt. In Kapitel 4.2 und 4.3 wurde bereits gezeigt, dass scharfe Ecken und Kanten an NP, bestimmte NP-Größen und ein geringer interpartikulärer Abstand zwischen NP zur Ausbildung von Hotspots des lokalen E-Felds und hohen  $EF_{\text{SERS}}$  führen kann, wenn die Raman-Reporter in diesen Hotspots lokalisiert sind. Das führt zu einem ebenfalls wichtigen Punkt im Hinblick auf das Design einer SERS-Plattform: die Wahl des Raman-Reporters. Im optimalen Fall weisen die genutzten Raman-Reporter einen sehr großen Raman-Wirkungsquerschnitt auf und die Laserwellenlänge zur Anregung von SERS überlappt mit einem elektronischen Übergang bzw. dem Absorptionsspektrum des Raman-Reporters. In diesem Fall kommt es zur oberflächenverstärkten, resonanten Ramanstreuung (SERRS), die den  $EF_{\text{SERS}}$  zusätzlich um den Faktor 10-100 erhöht.<sup>[164]</sup> Da die Raman-Reporter aufgrund des chemischen Verstärkungsmechanismus und der  $r^{-12}$  Abhängigkeit der SERS-Intensität vom Abstand des Raman-Reporters zur NP-Oberfläche, möglichst nah an der Oberfläche lokalisiert sein sollten, ist es zielführend, wenn die Raman-Reporter eine molekulare Ankergruppe auf Schwefel- oder Stickstoff-Basis enthalten und mit hoher Affinität an die Goldoberfläche binden. Die Bindungsaffinität bzw. Bindungsstärke von primären Aminogruppen zu AuNP (R-NH-Au) wird in der Literatur als leicht kovalent<sup>[165]</sup> und die der Thiol- bzw. Thiolatgruppen (R-S-Au) als kovalent<sup>[166]</sup> beschrieben. Aromatische Thiole binden nicht nur fest an die Gold-Oberfläche, sondern weisen ebenfalls hohe Raman-Wirkungsquerschnitte und charakteristische, von anderen Spektren differenzierbare Ramanspektren (in diesem Zusammenhang auch als Raman-Fingerabdrücke bezeichnet) auf.<sup>[167]</sup> Als eine Faustregel gilt, dass hohe Raman-Wirkungsquerschnitte von Molekülen mit leicht polarisierbaren Doppel- oder Dreifachbindungen erhalten werden können.<sup>[168]</sup> Ein Problem bei geeigneten, aromatischen Thiolen

ist häufig, dass sie sehr schlecht wasserlöslich sind und die AuNP in ein organisches, unpolares Lösungsmittel transferiert werden müssen, um eine Oberflächenbedeckung mit Raman Reportern sicherzustellen. Weitere wichtige Aspekte, die bei SERS-Sonden für eine *in vivo* Anwendung gewährleistet sein müssen, ist die Stabilität der Plattformen gegenüber Repulsion der assemblierten NP in einem Cluster und Schutz vor oxidierenden Substanzen oder SERS-Signalkontamination durch einen ungewünschten Liganden bzw. Raman-Reporteraustausch. Des Weiteren müssen viele andere, spezifische Effekte für eine *in vivo* Anwendung berücksichtigt werden: Toxizität der Sonden, Scherkräfte im Blutstrom, Bildung einer Proteinkorona, Veränderungen des pH-Wertes und der Temperatur und Immunsystemaktivität.<sup>[65]</sup> Um diese Probleme zu adressieren und Schutz sowie Stabilität zu erhalten, wurden einige Methoden entwickelt, die in Kapitel 4.4.3 näher erläutert sind. Zusätzlich muss auf der einen Seite die kolloidale Stabilität gewährleistet sein, damit die Sonden nicht präzipitieren oder aggregieren und auf der anderen Seite sollten möglichst viele Raman-Reporter (die häufig wenig bis negativ zur kolloidalen Stabilität beitragen) auf der Oberfläche der NP lokalisiert sein, um ein intensives SERS-Signal zu erhalten. Das bedeutet, dass häufig ein Kompromiss bzw. das optimale Verhältnis zwischen stabilisierenden Liganden und Raman Reportern gefunden werden muss. Mit anderen Worten: die kolloidale Stabilität und die SERS-Intensität beeinflussen sich häufig wechselseitig.<sup>[19,167]</sup> Ein weiterer wichtiger Designfaktor ist die Funktionalität und Selektivität der SERS-Sonden für spezifische Gewebe und Zellen. Dieser Faktor wird aus chemisch, präparativer Sicht in Kapitel 4.4.3 und unter anderem in den nächsten Kapiteln aus biomedizinischer Sicht adressiert.

### 4.3.4 *In vivo* Tumordetektion

Die SERS-Sonden sind vielversprechende Plattformen für eine *in vivo* Tumordetektion, wenn die in den letzten Kapiteln angegebenen Bedingungen erfüllt sind. Im optimalen Fall liegt die LSPR der plasmonischen Nanostrukturen und das Absorptionsspektrum des Raman-Reporters im biologischen NIR-Fenster, damit gesundes Gewebe nicht durch höher frequentierte Strahlung geschädigt wird. Die Detektion von kleinen Tumoren wird im Bereich von 1 – 10 mm Eindringtiefe des NIR-Lasers ins Gewebe ermöglicht.<sup>[19]</sup> Einer der wichtigsten Punkte für eine *in vivo* Anwendung ist die Oberflächenchemie der SERS-Sonden, die das *in vivo* Verhalten der Sonden direkt bestimmt. Nie *et al.* entwickelten biokompatible *in vivo* SERS-Sonden mit sphärischen AuNP ( $d = 60$  nm), Farbstoffen wie Isothiocyanat funktionalisiertem Malachitgrün als Raman-Reporter und PEO-SH als sta-

bilisierendem und schützendem Polymerliganden.<sup>[18]</sup> Eine Antikörper-Funktionalisierung der PEO-SH Liganden führte zu einer spezifischeren Aufnahme in die Zieltumorzellen der Labormäuse. Die Steigerung der spezifischen Aufnahme ist allerdings nur für kleine, solide Tumore mit einem Durchmesser von weniger als 1 – 5 mm signifikant. Gambhir *et al.* nutzen ebenfalls AuNP ( $d = 60$  nm), die sie mit einer Monoschicht aus jeweils einem von 10 unterschiedlichen Raman-Reportern und einer Silikaschicht beschichteten.<sup>[169]</sup> Die 10 verschiedenen SERS-Sonden bzw. Raman-Fingerabdrücke konnten nach Injektion in lebende Labormäuse spektroskopisch deutlich differenziert werden. Diese Studie von 2009 zeigte erstmals das Potential des Multiplexings von SERS-Sonden in lebenden Subjekten. Eine wichtige Voraussetzung der SERS-Sonden, die immer noch einiger Studien bedarf, ist die geringe Bluthalbwertszeit, die bei PEO-geschützten und besonderes Antikörper-funktionalisierten SERS-Sonden verbessert werden muss, um geeignete Mengen im Zielgewebe zu akkumulieren.<sup>[170–172]</sup>



**Abbildung 4.12:** Intraoperative Tumordetektion vor (A,B) und nach (C,D) der spektroskopisch geführten Resektion mithilfe von SERS-NP-Sonden und des *hand-held* Ramanscanners. Adapted with permission from<sup>[19]</sup> Copyright © 2015 American Chemical Society.

Unspezifische Proteinadsorption, unspezifische Zellaufnahme, Akkumulationen in Leber, Lunge und Milz stellen weitere Herausforderungen auf diesem relativ jungen, interdisziplinären Forschungsfeld dar. Dennoch gibt es einige Fortschritte, vor allem im Bereich der Tumorsektionen (chirurgische Entfernung des Tumors), die neben Chemo- und Strahlentherapie eine der wichtigsten Therapien darstellen.<sup>[173]</sup> Hier hervorzuheben sind vor allem technische Fortschritte und Verbesserungen wie die von Kircher *et al.* und Nie *et al.* (Abb. 4.12) entwickelten *hand-held*-Ramanscanner zur Orientierungshilfe bei operativen Tumorentfernungen.<sup>[174,175]</sup> Die Kombination aus SERS-Sonden und einem *hand-held*-Ramanscanner zur spektroskopisch geführten Tumorsektion bietet die Möglichkeit die Grenzen des Tumors genau zu detektieren und nicht weniger oder mehr Gewebe als nötig zu entfernen. Dies hat bei der Resektion eines Gehirntumors höchste Priorität, da es zu schweren Folgen für einen Patienten kommen kann, wenn kanzeröses Gewebe nicht vollständig entfernt oder gesundes Gewebe unnötig entfernt werden würde. Bei einer intravenösen Injektion der SERS-Sonden für eine Gehirnoperation stellt die Blut-Hirn-Schranke eine weitere Herausforderung dar. Smith *et al.* stellten eine Möglichkeit vor, Nanostrukturen mithilfe von Monozyten zum Zielgewebe im Gehirn zu transportieren.<sup>[176]</sup> Trotz alledem ist es unwahrscheinlich, dass sich hohe Sonden-Konzentrationen mithilfe dieser Methode im Hirntumor anreichern lassen, sodass die Erforschung und Synthese von hochsensiblen, biokompatiblen SERS-Sonden notwendig ist.

### 4.3.5 Nanotheranostik

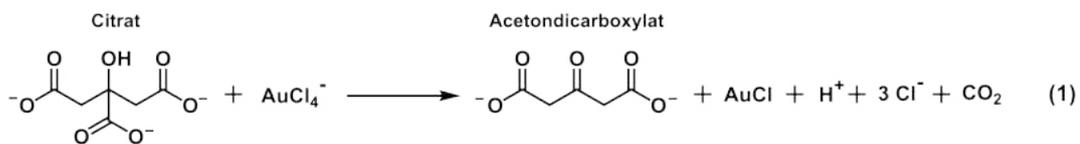
Die Kombination von auf SERS basierender biomedizinischer Bildgebung und der auf den photothermalen Eigenschaften plasmonischer Nanostrukturen basierenden hyperthermischen Krebsbehandlung, machen geeignete SERS-Sonden zu potentiellen „2-in-1“-Systemen der Theranostik.<sup>[27-36]</sup> Die Vereinigung von Diagnose- und Therapiefunktion in einer Nanoplattform oder einem Nanowirkstoff kann zu deutlichen Verbesserungen der Krebsbehandlung durch minimalinvasive Tumorentwicklung, *real-time* Tracking und darauf basierender Therapie und Fortschrittsüberwachung führen.<sup>[27]</sup> Der photothermische Effekt basiert auf dem thermalen Relaxationsprozess der Plasmonen. Angeregte Plasmonen können sehr effizient innerhalb von Picosekunden über die Kopplung an Phononen zerfallen und die Photonen- bzw. Plasmonenergie in Form von Wärme an die Umgebung abgeben. Das heißt, bei ausreichender Bestrahlung geeigneter plasmonischer Nanosysteme mit einem NIR-Laser kann damit direkt und lokal bestimmten Zielzellen Schaden zugefügt und der Zelltod eingeleitet werden. Besonders Au-Nanostäbchen sind im Hinblick auf die

sen Effekt und der relativ simplen Modifikation der LSPR in den NIR-Bereich von großem Interesse. Tsai *et al.* zeigten eine *in vitro* und *in vivo* hyperthermische Therapie von Krebszellen im ersten<sup>5</sup> und zweiten<sup>6</sup> biologischen NIR-Fenster mithilfe von Au-Nanostäbchen in einer Au/Ag-Nanohülle.<sup>[28]</sup> Bhatia *et al.* demonstrierten eine multifunktionale Gold-Nanostäbchen Plattform für SERS und photothermale Therapie.<sup>[177]</sup> Dabei tauschten sie die nativen Liganden aus der Stäbchensynthese gegen eine Kombination aus stabilisierenden PEO-SH Liganden und Raman-Reportern aus. Mithilfe eines 810 nm Lasers war es möglich, die lokale Temperatur in der Umgebung der Au-Nanostäbchen bis auf 70 °C zu erhöhen. Nam *et al.* verglichen die photothermale Antwort unter gepulster Laseranregung von Clustern aus Gold-Nanosphären mit Au-Nanostäbchen und konnten zeigen, dass die AuNPC weniger empfindlich gegenüber Langzeitbestrahlung mit einem NIR-Laser sind und eine höhere Langzeitstabilität des photothermischen Effektes aufweisen.<sup>[30]</sup> Das macht kontrolliert assemblierte, einheitliche, kolloidal stabile, spezifisch funktionalisierte und gegenüber äußeren Einflüssen geschützte AuNPC mit einem intensiven und konsistenten SERS-Signal zu einer vielversprechenden Nanotheranostik-Plattform.

## 4.4 Synthese und Modifikation plasmonischer Systeme

### 4.4.1 Synthese Goldnanopartikel

Die gängigsten Synthesen von AuNP in wässrigem Medium basieren auf der Synthese von Turkevich *et al.*, durch die kolloidal stabile AuNP erhalten werden können.<sup>[178-181]</sup> Diese Synthese beruht auf der Reduktion von Tetrachlorogoldsäure mithilfe von Natriumcitrat als Reduktionsmittel und Stabilisator. Im ersten Schritt der Synthese wird meist Trinatriumcitrat in siedendem Wasser zu Acetondicarboxylat oxidiert und die Au(III)-Ionen der Tetrachlorogoldsäure zu Au(I)-Ionen reduziert (Abb. 4.13 (1)).



**Abbildung 4.13:** Akzeptierter Mechanismus der Turkevich-Synthese.<sup>[182]</sup> (1) Initiale Redoxreaktion und (2) Disproportionierungsreaktion.

<sup>5</sup>650 - 950 nm

<sup>6</sup>1000 - 1350 nm

Das Acetondicarboxylat komplexiert die Au(I)-Ionen in polymolekulare Komplexe, die zu hohen lokalen Goldkonzentrationen führen.<sup>[181]</sup> Die hohen lokalen Konzentrationen ermöglichen schließlich die Disproportionierungsreaktion von Au(I) zu Au(0) und Au(III) (Abb. 4.13 (2)) und die Nukleation und das Wachstum von Au(0) zu AuNP. Eine bewährte Methode, um monodisperse, citrat-stabilisierte AuNP mit einem Durchmesser von 10 bis 200 nm zu präparieren, ist die kinetisch kontrollierte *seeded growth* Synthese von Punter *et al.*<sup>[100]</sup> Dabei sind vor allem 3 Faktoren entscheidend: die Temperaturregulierung um sekundäre Nukleation zu verhindern, die Einstellung des pH-Wertes und die Menge an hinzugefügten Goldatomen bei jedem Wachstumsschritt. Die Synthese ist zweckdienlich für weitere Anwendungen, da keine weiteren Stabilisatoren als Citrat genutzt werden. Das negativ geladene, stabilisierende Citrat auf der Oberfläche der AuNP weist eine relativ geringe Bindungsaffinität im Vergleich zu Amino- oder Thiolat-Liganden auf und kann effizient durch diese ersetzt werden.

#### 4.4.2 Selbstassemblierung und Aggregation

Der Prozess der Selbstassemblierung ist eine autonome Organisation von Komponenten in eine geordnete Struktur ohne direkten Eingriff eines Operators, wie den Menschen oder eine Maschine.<sup>[183]</sup> Im Zusammenhang mit der Nanotechnologie bedeutet das eine Selbstorganisation von NP in geordnete Strukturen durch interpartikuläre Kräfte, Lösungsmittel- bzw. Ligandeneinfluss, externe Felder oder Template.<sup>[184–188]</sup> Die Kontrolle und Reproduzierbarkeit der Assemblierung bzw. Aggregation<sup>7</sup> von NP in genau definierte Formen stellt immer noch eine Herausforderung aufgrund der Unspezifität der Interaktionen dar.<sup>[47,191,192]</sup> Die Assemblierung von NP erfordert die Überwindung einer Energiebarriere repulsiver Kräfte, die zur kolloidalen Stabilität der NP beiträgt. Kolloidale Suspensionen, die durch die Balance von Van der Waals Anziehung und elektrostatischer Repulsion durch die Doppelschicht der Gegenionen auf der geladenen Metallnanopartikeloberfläche stabilisiert werden, werden häufig über das Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek Modell (DLVO) beschrieben.<sup>[184]</sup> Das DLVO-Modell beschreibt die kolloidale Stabilität basierend auf der freien Enthalpie ( $G$ ) von zwei oppositären Effekten:  $G_{VanderWaals}$  und  $G_{elektrostatisch}$ .<sup>[193]</sup> Über die Summe der freien Enthalpien, kann die Energiebarriere ermittelt werden. Je höher diese Energiebarriere ist, desto kolloidal stabiler sind die NP. Das DLVO-Modell ist

---

<sup>7</sup>Die Definitionen von Aggregation und Agglomeration sind vielfältig, inkohärent und kontrovers.<sup>[189]</sup> Auf der Grundlage einer IUPAC-Empfehlung werden die Begriffe in dieser Arbeit als synonym angesehen.<sup>[190]</sup> D.h. auch im Rahmen der Arbeit: Cluster = Aggregat = Agglomerat.

allerdings beschränkt auf das elektrostatisch stabilisierte System und bezieht Faktoren wie sterische, hydrophobe und Solvatisierungs-Kräfte nicht mit ein.<sup>[193,194]</sup> Die Zugabe von Natriumchlorid oder anderen Salzen zu einer Suspension aus Citrat-stabilisierten AuNP führt zu einer Erhöhung der Ionenstärke, die zu einer Abnahme der Dicke der elektrochemischen Doppelschicht und so zur Abnahme der Coulomb-Repulsion führt.<sup>[194]</sup> Eine Abnahme der Dicke der elektrochemischen Doppelschicht bedeutet, dass die Überschussladung, die aus der Natur der Partikel resultiert, bei steigender Ionenstärke fortschreitend abgeschirmt bzw. neutralisiert wird und das Zeta-Potential der NP sinkt.<sup>[195,196]</sup> Das hat zur Folge, dass sich NP aufgrund der dünneren Doppelschicht oder des geringeren Zeta-Potentials näher kommen können und kurz reichende Anziehungskräfte wirksam werden können, d.h. das es zur Aggregation kommt. Für *in vivo* Anwendungen von NP muss die Ionenstärke der biologischen Medien berücksichtigt werden und auf eine gegenüber der Ionenstärke resistenterere Stabilisierung, als die elektrostatische Stabilisierung, umgestiegen werden. Außerdem führen schon geringe Elektrolyt-Konzentrationen, wie Chlorid-Ionen, zu einer signifikanten Veränderung der Oberflächenchemie der NP, die zu deutlichen Einschränkungen in Bezug auf die Adsorption von Raman-Reportern für eine SERS Anwendung führen.<sup>[184]</sup> Die Stabilisierung von kolloidalem Gold durch Makromoleküle und Tenside gegenüber hohen Ionenstärken wurde bereits 1901 von Zsigmondy durch die sogenannte „Goldzahl“, also der Konzentration einer stabilisierenden Substanz, die den Umschlag der roten Suspension nach violett (Aggregation) bei Zugabe von 1 mL zehnpromzentiger Kochsalzlösung verhindert, beschrieben.<sup>[194,197]</sup> Diese Form der Stabilisierung wird als sterische Stabilisierung oder Hinderung bezeichnet. Die Stabilität beruht darauf, dass eine Annäherung der NP nur durch Ligandenpenetration und/oder Ligandenkompression stattfinden kann. Auf der Basis der Flory-Huggins-Theorie postulierte der Kolloidchemiker Napper, dass die sterische Stabilisierung aus entropischen Effekten, enthalpischen Wechselwirkungen oder einer Kombination aus beiden resultieren kann.<sup>[198]</sup> Zur Präparation geeigneter SERS-Plattformen wurden, neben der Einstellung einer bestimmten Salzkonzentration zur Assemblierung, verschiedene andere Methoden entwickelt. Eine im Hinblick auf die Kontrolle des interpartikulären Abstands sehr geeignete Methode ist die Selbstassemblierung über molekulare Linker. Generell werden dabei zwei Strategien unterschieden. Zum einen ist die Assemblierung über bi- oder multifunktionale Moleküle möglich, wie z.B. Dithiole, die im optimalen Fall für SERS einen hohen Raman-Wirkungsquerschnitt aufweisen und durch die Verknüpfung von zwei NP direkt in einem Hotspot lokalisiert sind.<sup>[199,200]</sup> Die Kontrolle über diese Assemblierung stellt insbesondere bei kürzeren Linkern eine Heraus-

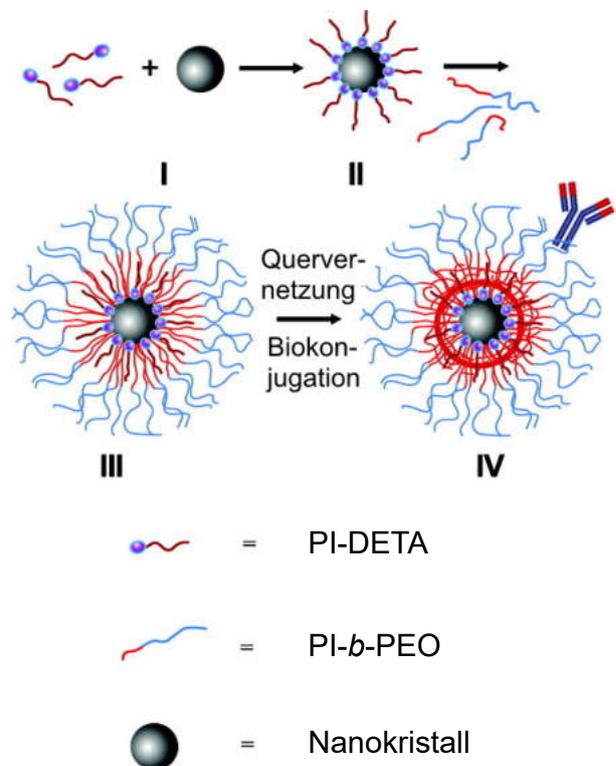
forderung dar und ist von vielen Faktoren, wie der Struktur des Linkers, dem Bindungswinkel zur Oberfläche, dem Lösungsmittel, der Löslichkeit und der Fähigkeit der Linker mit sich selbst zu polymerisieren (z.B. über Disulfidbindungen), abhängig.<sup>[201,202]</sup> Zum anderen ist die Assemblierung über Moleküle und Polymere mit selektiver Bindungsfähigkeit möglich, wie Einzelstrang-DNA funktionalisierte AuNP.<sup>[203]</sup> Eine weitere, verbreitete Strategie zum Aufbau von NP-Clustern ist die lösungsmittelinduzierte Selbstassemblierung. Diese Strategie basiert auf attraktiven interpartikulären Kräften, die z.B. durch den Kollaps hydrophober Polymerliganden bei Überführung der NP in einen Überschuss an Wasser entstehen.<sup>[204]</sup> Eine geringe bis keine sterische Stabilisierung und eine schlechte Löslichkeit der Polymerliganden führt dazu, dass NP aggregieren, um die ungünstigen Wechselwirkungen von Ligand und Lösungsmittel möglichst effektiv abzuschirmen und so die Oberflächenenergie des Systems zu minimieren. Eine mathematische Beschreibung dieses Vorgangs, unter anderem über das hydrophobe Wechselwirkungspotential, ist in der herausragenden Arbeit von Stolarczyk *et al.* zu finden.<sup>[205]</sup> In einer Studie von Merkens *et al.* aus dem Jahre 2019 konnte die lösungsmittelinduzierte Selbstassemblierung und der damit einhergehenden hydrophobe Kollaps von Thiol-terminierten Polystyrol-Liganden von AuNP mithilfe eines Mikrofluidik-Aufbaus, *real-time* UV-VIS-NIR Spektroskopie und *in situ* SAXS überwacht werden.<sup>[187]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Aggregation der NP beginnt, wenn die Ligandenhülle komplett kollabiert ist. Die Ergebnisse würden darauf hinweisen, dass kleine kinetisch „gefangene“ Cluster und größere Cluster je nach Flussrate des Mischens von AuNP in THF mit einem Überschuss an Wasser erhalten werden könnten. Zu einer kontrollierten Synthese von NPC müssen allerdings weitere Aggregation, Präzipitation und Dissoziation der NPC verhindert werden. Dazu können amphiphile Blockcopolymeren wie Polystyrol-*block*-Polyethylenoxid (PS-*b*-PEO) hinzugefügt werden, die die Selbstassemblierung regulieren, indem die gebildeten Aggregate in Mizellen stabilisiert werden.<sup>[47,204,206–208]</sup>

### 4.4.3 Einkapselung und Funktionalisierung

Die vielfältigen Probleme und Herausforderungen der Stabilität und des Schutzes der NP, besonders in biologischen Medien, führte zur Entwicklung einiger Einkapselungsstrategien<sup>[209]</sup>, wie Silika-Einkapselung<sup>[210–212]</sup>, Lipid- oder Peptid-Einkapselung<sup>[213,214]</sup> oder der Einkapselung mithilfe von Di- und Tri-Blockcopolymeren<sup>[42,65,192,215]</sup>. Im Arbeitskreis Weller wurde eine mizellare Einkapselung für den Einsatz von toxischen Quantenpunkten und Eisenoxid-NP als Kontrastmittel in der medizinischen Bildgebung entwickelt, die zu her-

ausragenden physikalischen und biologischen Eigenschaften der NP-Systeme führt.<sup>[41–47]</sup> Die Synthese basiert auf der Kombination von Polyisoprendiethylentriamin (PI-DETA) und Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid (PI-*b*-PEO), die durch einen lösungsmittelinduzierten Selbstassemblierungsprozess zu mizellaren Strukturen mit den NP als Kern der Mizelle geformt werden. Die Methode ist schematisch in Abbildung 4.14 dargestellt. Diese Strategie bietet exzellente Wasserlöslichkeit, langfristige kolloidale Stabilität und sehr geringe Toxizität bzw. sehr hohe Biokompatibilität. Über die äußeren Hydroxygruppen der PEO-Blöcke der Mizelle können eine Vielzahl von funktionellen Gruppen, Antikörper und auch komplexe Verbindungen (z.B. Biotin, Kohlenhydrate) gekoppelt werden und eine Funktionalität zur spezifischen Zellaufnahme bewirkt werden.<sup>[42–44]</sup>

Für einen noch effektiveren Schutz und Stabilität der NP in den Mizellen, etablierten Weller und Mitarbeiter eine Saat-Emulsionspolymerisation, die sich optimal auf dieses Mizellensystem anwenden ließ.<sup>[43,216,217]</sup> Dabei werden die hydrophoben Monomere Styrol und *p*-Divinylbenzol nach der Verkapselung der NP zur Suspension zugegeben und unter bestimmten Bedingungen sammeln sich die Monomere im hydrophoben Mizellkern an. Durch einen wasserlöslichen Radikalinitiator, der thermisch gespalten wird und eine radikalische Polymerisation startet, werden die mit Monomer gefüllten Mizellkerne in Polymerpartikel umgesetzt und eine schützende Hülle um die NP aufgebaut. Eine langfristige kolloidale Stabilität durch sterische Stabilisierung wird durch die hydrophilen PEO-Blöcke gewährleistet, die aus den Polymerkapseln ins Dispersionsmedium herausragen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass superparamagnetische Eisenoxid-NP mithilfe dieser Verkapselung und Saat-Emulsionspolymerisation für einen *in vivo* Einsatz als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie geeignet wären.<sup>[216]</sup> Im Hinblick auf eine SERS-Anwendung könnten



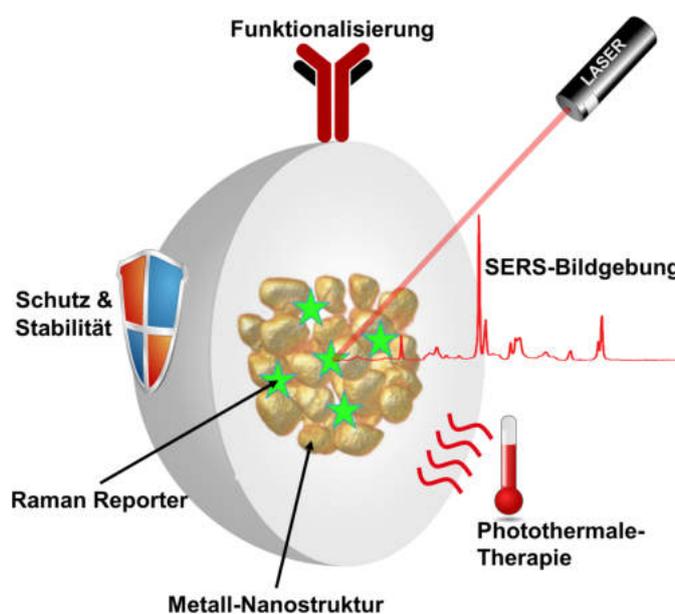
**Abbildung 4.14:** Schematische Darstellung der mizellaren Einkapselungsmethode von Weller und Mitarbeitern. *Adapted with permission from*<sup>[44]</sup> *Copyright © 2012 American Chemical Society.*

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass superparamagnetische Eisenoxid-NP mithilfe dieser Verkapselung und Saat-Emulsionspolymerisation für einen *in vivo* Einsatz als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie geeignet wären.<sup>[216]</sup> Im Hinblick auf eine SERS-Anwendung könnten

die plasmonischen NP durch die schützende Polymerhülle gegen Signalkontamination, Dissoziation und äußere Einflüsse geschützt sein. In einer weiteren Studie von Weller *et al.* wurde schließlich berichtet, dass diese Strategie geeignet ist, eine Selbstassemblierung über die Einstellung des NP zu PI-*b*-PEO-Verhältnisses oder der Variation der Flussgeschwindigkeiten eines Mikrofluidik-Systems, d.h. der Variation der Geschwindigkeit des Mischens von superparamagnetischen Eisenoxid-NP in THF mit Wasser, zu induzieren und das diese Strategie prinzipiell auch auf Goldnanopartikel übertragbar sei.<sup>[47]</sup>

## 5 | Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer reproduzierbaren Methode zur Synthese von kontrolliert assemblierten, einheitlichen, kolloidal stabilen, geschützten und biokompatiblen plasmonischen Gold- und Silber-Nanopartikelclustern, die durch das Implementieren geeigneter Raman-Reporter in die Hotspots der NPC ein intensives und konsistentes SERS-Signal für eine potentielle *in vitro* oder *in vivo* Bildgebung aufweisen und basierend auf dem photothermischen Effekt potentiell als Nanotheranostik-Plattform genutzt werden können. Eine schematische Darstellung des Aufbaus der angestrebten SERS-Nanosysteme ist in Abbildung 5.1 dargestellt, deren reproduzierbare Synthese und Untersuchung das zentrale Leitbild dieser Arbeit darstellt. Der erste Teil dieser Arbeit ist der Übertragung des mizellaren Einkapselungssystems mit anschließender Saat-Emulsionspolymerisation von Weller *et al.* aus Kapitel 4.4.3 auf die Edelmetallnanopartikel aus Silber und Gold



**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung des Aufbaus der angestrebten NPC-SERS-Sonden.

gewidmet. Dabei soll neben der Übertragbarkeit auch das Potenzial dieser mizellaren Einkapselungsstrategie zur kontrollierten Selbstassemblierung der plasmonischen NP zu dreidimensionalen Clustern mit definierter Größe und enger Größenverteilung untersucht werden. Des Weiteren sollen Studien zu der postsynthetischen Aufreinigung, der kolloidalen Stabilität, der Schutzwirkung der Polymerhülle bzw. der Stabilität der NPC in Medien mit hoher Ionenstärke und oxidierenden Spezies, der Zellaufnahme von gesunden und kanzerösen Zellen sowie der Zytotoxizität durchgeführt werden, um Informationen über die Anwendbarkeit in biologischer Umgebung zu erhalten. Der zweite Teil der Ar-

beit ist der Implementierung der Raman-Reporter in die Zwischenräume und Hotspots der NPC gewidmet. Dazu soll eine geeignete, präparative Strategie zur Implementierung entwickelt werden, die ein intensives SERS-Signal der NPC-Dispersionen sicherstellt.

## 6 | Ergebnisse und Diskussion

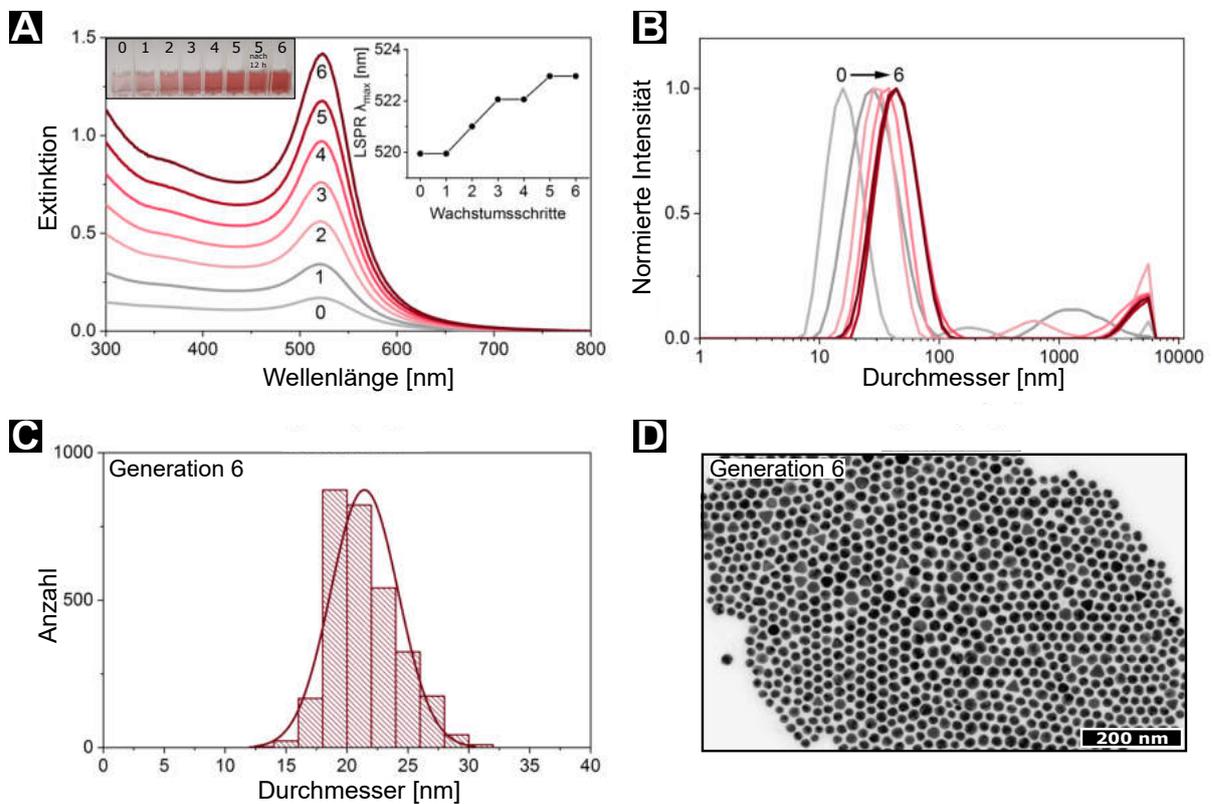
### 6.1 Nanopartikelsynthese

Die höchsten SERS-Verstärkungsfaktoren plasmonischer NP und NPC werden meist im Durchmesserbereich von 20 – 70 nm der einzelnen NP erhalten, wobei hier eine starke Abhängigkeit von Form, Material, Raman-Reporter, Umgebung und Anregungswellenlänge sowie in Clustern eine weitere Abhängigkeit von interpartikulärem Abstand, Orientierung der NP und der Anzahl an Hotspots pro Anregungsvolumen besteht.<sup>[218,219]</sup> Im Rahmen der Zielsetzung dieser Arbeit wurden zunächst AuNP mit einem Durchmesser von ca. 20 nm synthetisiert, um eine hohe Anzahl an Hotspots in dem für Bioapplikation interessanten Größenbereich und eine hohe Anzahl an Raman-Reportern pro Cluster zu erhalten.<sup>[220,221]</sup> Die Übertragbarkeit der mizellaren Einkapselung auf NP einer anderen Größe und eines anderen Metalls wurde unter anderem mit ca. 40 nm AgNP durchgeführt. Eine Voraussetzung für einheitliche NP-Cluster und eine reproduzierbare Assemblierung der NP sind die Uniformität der NP und eine relativ geringe Größenverteilung. Die Synthese und Untersuchung der Au- und AgNP sind in den nächsten zwei Kapiteln erläutert.

#### 6.1.1 AuNP Synthese

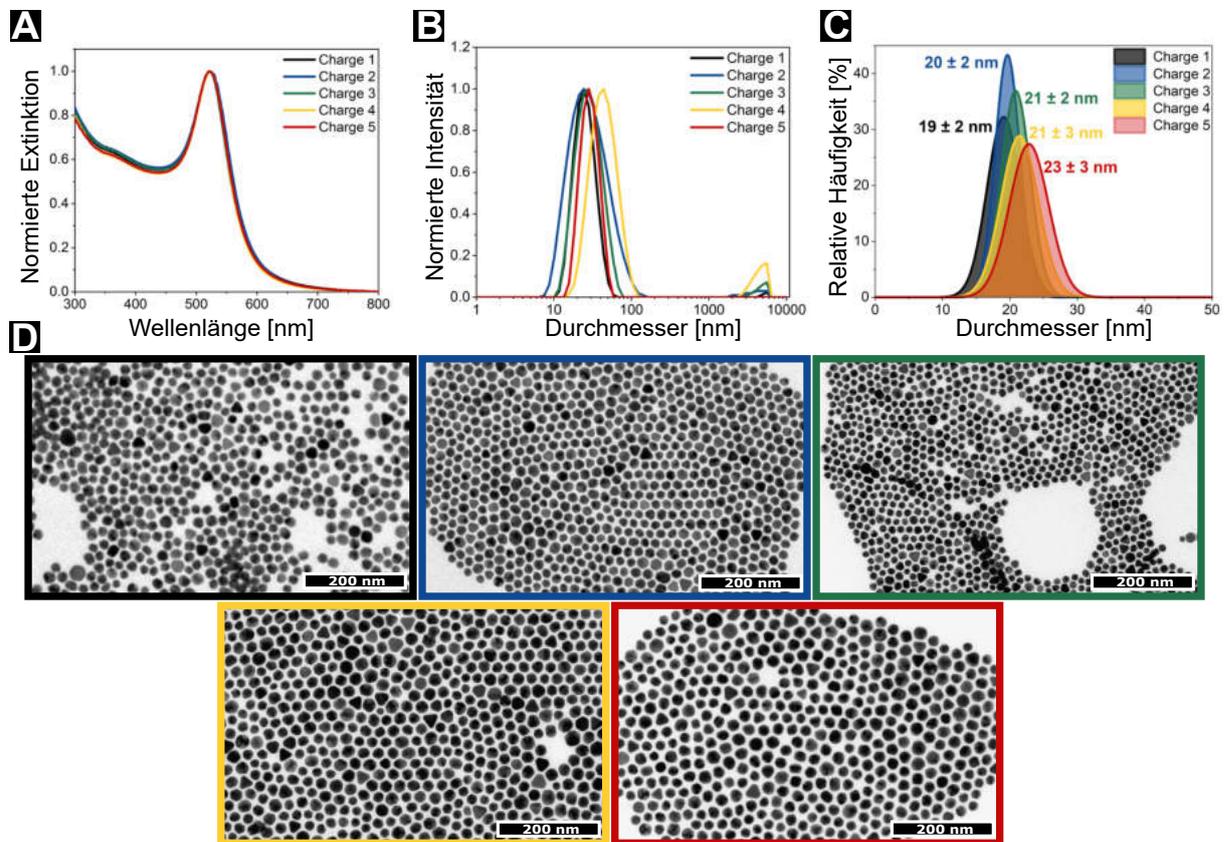
Die am häufigsten eingesetzten AuNP-Synthesen in wässrigem Medium basieren immer noch auf der Synthese von Turkevich *et al.* aus dem Jahre 1951, da sich die Größe der AuNP von 5 – 150 nm relativ unkompliziert über das Citrat-Gold-Verhältnis und den pH-Wert kontrollieren lässt.<sup>[178,222]</sup> Die ursprüngliche Synthese von Turkevich *et al.* führte allerdings häufig zu breiten Größenverteilungen und uneinheitlichen Formen der Partikel, sodass im Verlauf der letzten Jahrzehnte zahlreiche Studien zur Aufklärung des Mechanismus und zur Optimierung der Methode veröffentlicht wurden.<sup>[48,100,179–181,222]</sup> Die *seeded-growth* Synthesemethode, die auf der zeitlichen Trennung von Nukleation und Wachstumsprozess basiert, hat sich als effiziente Methode zur Kontrolle der Größe und Form herausgestellt.<sup>[100]</sup> Die kinetisch kontrollierte *seeded-growth* Synthese von Puntès *et al.* ist eine attraktive Methode zur Herstellung von monodispersen, citrat-stabilisierten

AuNP mit einem Durchmesser von 10 bis 200 nm, da keine weiteren stark adsorbierenden Spezies wie CTAB oder Mercaptobernsteinsäure hinzugefügt werden und eine vielseitige Oberflächenchemie nach der Synthese gewährleistet ist.<sup>[100]</sup> Für eine reproduzierbare Durchführung und Untersuchung der Selbstassemblierung ist es von Vorteil, wenn möglichst große AuNP-Chargen hergestellt werden, um die Einflussfaktoren die von unterschiedlichen Chargen ausgehen können zu eliminieren und eine breite Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten. Des Weiteren sind große Chargen für eine potentiell kommerzielle Nutzung ebenfalls von Vorteil. Der erste Schritt dieser Arbeit bestand darin, die von Puntès *et al.* veröffentlichte Synthese mit Volumina um die 150 mL und mit AuNP-Konzentrationen des Produkts von ungefähr  $3 \cdot 10^{12}$  NP/mL, um ungefähr das vierfache Volumen hochzuskalieren (für weitere Details siehe Kapitel 8.3).



**Abbildung 6.1:** Optische und strukturelle Daten der hochskalierten, kinetisch kontrollierten *seeded growth* Synthese nach Puntès *et al.*<sup>[100]</sup>. **A:** Extinktionsspektren und Abbildung der Saat (0) bis zur 6. Wachstumsgeneration. Eingeschobenes Diagramm zeigt die Rotverschiebung der LSPR-Maxima im Verlauf der Wachstumsschritte. **B:** DLS: Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers  $d_H$  der Generationen. **C:** Größenverteilung der 6. Generation mit Normalverteilungskurve ( $21 \pm 3$  nm). **D:** TEM-Aufnahme der 6. Generation mit 200 nm Maßstabsleiste.

Die optischen und strukturellen Daten der hochskalierten *seeded-growth* Synthese sind in Abb. 6.1 dargestellt. In Abb. 6.1 **A** ist zu sehen, dass die plasmonische Bande der AuNP von der 0. Generation (Saat) bei ca. 520 nm bis zur 6. Generation immer intensiver und das Maximum um 3 nm rotverschoben wird. In Kombination mit den Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung (Abb. 6.1 **B**) wird deutlich, dass die Größe der AuNP bei jeder Generation ansteigt, bis die AuNP bei der 6. Generation einen Durchmesser von  $21 \pm 3$  nm erreichen (Abb. 6.1 **C, D**). Die Standardabweichung der Größenverteilung der hochskalierten Synthese liegt in dem von Puntès *et al.* veröffentlichten Rahmen des 150 ml Ansatzes für die AuNP-Synthese bis 30 nm von ca. 12 – 16% ( $19 \pm 3$  nm,  $25 \pm 3$  nm) für AuNP dieser Größenordnung.<sup>[100]</sup>



**Abbildung 6.2:** Optische und strukturelle Daten der 5 in dieser Arbeit verwendeten AuNP-Chargen der hochskalierten, kinetisch kontrollierten *seeded growth* Synthese nach Puntès *et al.*<sup>[100]</sup>. **A:** Normierte Extinktionsspektren mit LSPR  $\lambda_{max}$ : 523, 523, 521, 523 und 522 nm **B:** DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers  $d_H$  **C:** Normalverteilungskurven der relativen Häufigkeit der Durchmesser mit  $19 \pm 3$ ,  $20 \pm 2$ ,  $21 \pm 2$ ,  $21 \pm 3$  und  $23 \pm 3$  nm. Es wurden jeweils mindestens 700 AuNP ausgemessen. **D:** TEM-Aufnahmen der 5 AuNP Chargen mit 200 nm Maßstabsleiste.

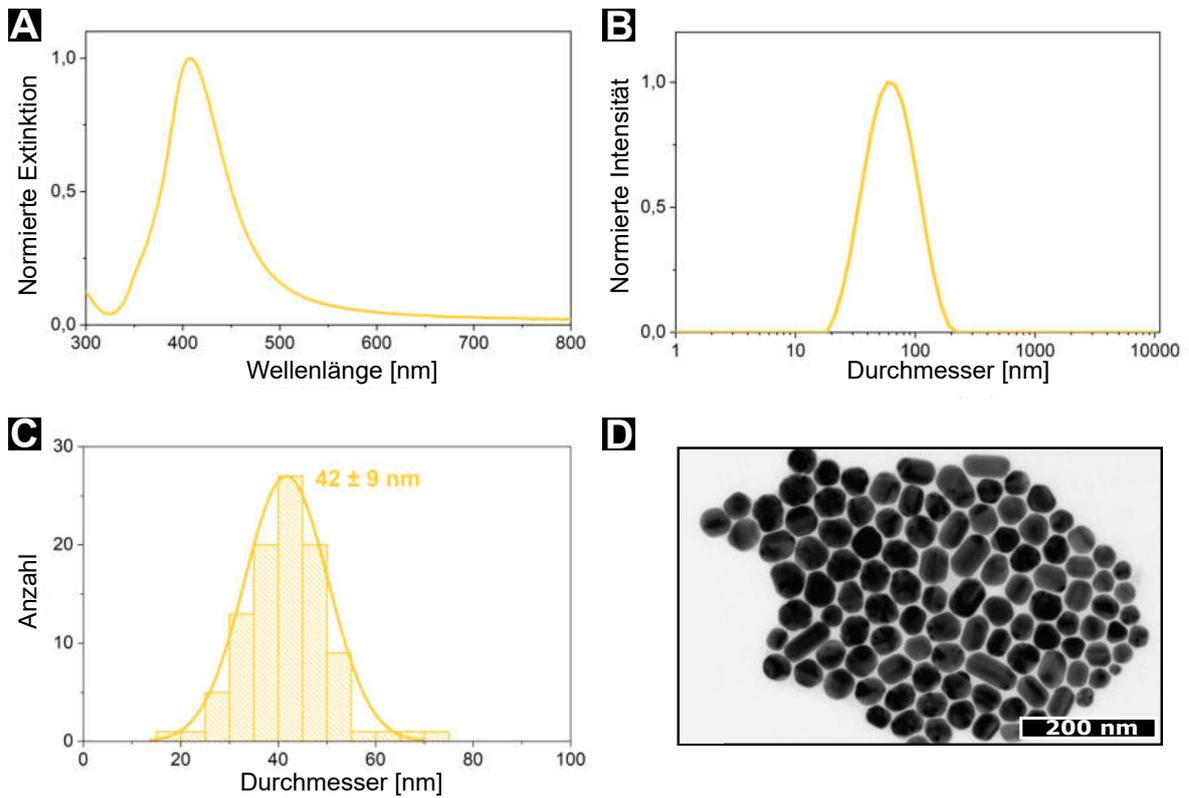
Im Verlauf der Arbeit wurden insgesamt über 10 AuNP-Chargen mit je 600 mL Volumen hergestellt, von denen 5 Chargen die geeignete Größenverteilung und Uniformität aufwiesen. Mit diesen 5 Chargen wurden alle in dieser Arbeit gezeigten Experimente mit ca. 20 nm AuNP durchgeführt. Optische und strukturelle Informationen über die 5 verwendeten AuNP-Chargen sind in Abbildung 6.2 und Tabelle 6.1 zusammengefasst. Die UV-VIS Extinktionsspektren (Abb. 6.2 **A**) der 5 Chargen zeigen eine annähernd übereinstimmende Extinktion bei 300 – 800 nm. Die Chargen weisen ein LSPR-Maximum  $\lambda_{max}$  von 521 – 523 nm auf (siehe Tabelle 6.1). Die Verteilung der mittleren hydrodynamischen Durchmesser aus den intensitätsgewichteten DLS-Messungen (Abb. 6.2 **B**) zeigen mit Ausnahme von Charge 4 mittlere hydrodynamische Durchmesser von 26 – 32 nm. Die Normalverteilungskurven der Größenverteilungshistogramme aus der halb-automatisierten Größenbestimmung der NP anhand der TEM-Aufnahmen (Abb. 6.2 **C**) und die TEM-Übersichtsbilder der 5 AuNP-Chargen (Abb. 6.2 **D**) zeigen, dass alle Chargen einen durchschnittlichen NP-Durchmesser im Bereich von 19 – 23 nm aufweisen (siehe Tabelle 6.1). Die Partikelkonzentration  $c_{np}$  der Chargen wurde über die Extinktion aus den nicht normierten UV-VIS-Spektren bei 400<sup>[223]</sup> und 450 nm<sup>[224]</sup> bestimmt und liegen im Bereich von  $2 \cdot 10^{-9}$  bis  $6 \cdot 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. Die Umrechnung der Konzentration in NP mL<sup>-1</sup> zeigt, dass die hochskalierten Chargen im gleichen Konzentrationsbereich von  $1 \cdot 10^{12}$  bis  $4 \cdot 10^{12}$  NP mL<sup>-1</sup> liegen, wie die von Puntès *et al.* publizierten Konzentrationen für den 150 mL Ansatz von AuNP dieser Größe.<sup>[100]</sup>

**Tabelle 6.1:** Optische und strukturelle Daten der 5 AuNP-Chargen aus den Auftragungen von Abbildung 6.2. Die LSPR-Maxima wurden über UV-VIS-Spektroskopie, der intensitätsgewichtete, mittlere hydrodynamische Durchmesser  $d_H$  wurde über DLS und der Durchmesser  $d$  wurde über die Normalverteilungskurven der Größenverteilung der NP in den TEM-Aufnahmen bestimmt. Die Partikelkonzentration  $c_{np}$  wurde über die UV-VIS Extinktion bei 400<sup>[223]</sup> und 450 nm<sup>[224]</sup> bestimmt und ist hier in mol L<sup>-1</sup> und NP mL<sup>-1</sup> angegeben.

AuNP-Charge	1	2	3	4	5
LSPR $\lambda_{max}$ [nm]	523	523	521	523	522
$d_H$ , DLS [nm]	$26 \pm 8$	$32 \pm 13$	$30 \pm 11$	$48 \pm 17$	$30 \pm 8$
$d$ , TEM [nm]	$19 \pm 3$	$20 \pm 2$	$21 \pm 2$	$21 \pm 3$	$23 \pm 3$
$c_{np}$ [mol L <sup>-1</sup> ]	$4 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-9}$
$c_{np}$ [NP mL <sup>-1</sup> ]	$2 \cdot 10^{12}$	$2 \cdot 10^{12}$	$4 \cdot 10^{12}$	$2 \cdot 10^{12}$	$1 \cdot 10^{12}$

### 6.1.2 AgNP Synthese

Für die Synthese von monodispersen AgNP bis zu 200 nm veröffentlichten Puentes *et al.* ebenfalls eine kinetisch kontrollierte *seeded-growth* Synthese, die auf der Reduktion von Silbernitrat durch Natriumcitrat und Tanninsäure basiert.<sup>[225]</sup> Der Zusatz von Tanninsäure, das als Reduktionsmittel und zur Stabilisierung der AgNP eingesetzt wird<sup>[225-227]</sup>, führt dazu, dass der für den mizellaren Einkapselungsprozess nötige Ligandenaustausch mit amino-terminiertem PI-DETA und der damit einhergehende Phasentransfer (siehe Kapitel 6.2.1) nicht funktioniert. Selbst sehr hohe Überschüsse an PI-DETA konnten den Phasentransfer der Citrat und Tanninsäure enthaltenden Dispersionen nicht einleiten. Im Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit ist eine AgNP-Synthese unumgänglich, die ohne die Zugabe von Reduktionsmitteln und Stabilisatoren funktioniert, die eine weiterführende Modifikation der NP-Oberflächen mit PI-DETA verhindern oder erschweren.



**Abbildung 6.3:** Optische und strukturelle Daten der AgNP-Synthese nach Guerrini *et al.*<sup>[228]</sup>. a) Normiertes UV-VIS-Extinktionsspektrum b) DLS-Messung des hydrodynamischen Durchmessers  $d_H$  c) Anhand von TEM-Aufnahmen ermittelte Größenverteilung der AgNP mit Normalverteilungskurve ( $42 \pm 9$  nm). d) AgNP TEM-Aufnahme mit 200 nm Maßstabsleiste.

Guerrini *et al.* publizierten 2015 eine AgNP-Synthesemethode im 250 mL Ansatz, die mithilfe von Citrat und Ascorbinsäure (Vitamin C) als Reduktions- und Stabilisierungsmittel erfolgt.<sup>[228]</sup> Die bei der Synthese verwendete Ascorbinsäure, die ebenfalls an die NP-Oberfläche adsorbieren kann, kann leicht durch andere Stabilisatoren oder Liganden ausgetauscht werden.<sup>[229]</sup> Das Citrat stellt in Hinblick auf den Austausch keine Herausforderung dar, da die Citrat-Moleküle eine schwache Wechselwirkung mit den Metalloberflächen aufweisen. Die optischen und strukturellen

Daten der AgNP-Synthese nach Guerrini *et al.* sind in Abbildung 6.3 und Tabelle 6.2 dargestellt. Das LSPR Maximum  $\lambda_{max}$  der AgNP Charge liegt bei 408 nm. Der hydrodynamische Durchmesser  $d_H$  beträgt  $72 \pm 29$  nm und der aus den TEM-Aufnahmen ermittelte Durchmesser  $d$  beträgt  $42 \pm 9$  nm. Die Partikelkonzentration  $c_{np}$  der AgNP-Charge wurde über die Extinktion aus dem nicht normierten UV-VIS Spektrum bei LSPR  $\lambda_{max}$ <sup>[230]</sup> bestimmt und liegt bei  $2 \cdot 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> bzw.  $1 \cdot 10^{11}$  NP mL<sup>-1</sup>. Die im Vergleich zu den synthetisierten AuNP (Kapitel 6.1.1) höhere Polydispersität und geringere Einheitlichkeit der Partikelform sind durch die vergleichsweise höhere Reaktivität der Ag-Atome zu erklären und stellen ein in der Literatur bekanntes Problem dar, das häufig nur durch Zugabe

von stark adsorbierenden Stabilisatoren bzw. Tensiden zur Synthese gelöst werden kann, die allerdings wiederum die Zugänglichkeit der Oberfläche für weitere Modifikation verringern.<sup>[225,231]</sup> Die Synthese von monodispersen, sphärischen AgNP mit der Möglichkeit zur vielseitigen Oberflächenmodifikation ist immer noch Bestandteil aktueller Forschung. Die hier synthetisierten AgNP stellen ein Kompromiss zwischen Zugänglichkeit der Oberfläche und Form- und Größenverteilung dar, der für die Untersuchung der Übertragbarkeit des Einkapselungssystems auf AgNP ausreichend ist.

**Tabelle 6.2:** Optische und strukturelle Daten der AgNP-Chargen aus den Auftragungen von Abbildung 6.3. Die LSPR-Maxima wurden über UV-VIS-Spektroskopie, der intensitätsgewichtete, mittlere hydrodynamische Durchmesser  $d_H$  wurde über DLS und der Durchmesser  $d$  wurde über die Normalverteilungskurven der Größenverteilung der NP in den TEM-Aufnahmen bestimmt. Die Partikelkonzentration  $c_{np}$  wurde über die UV-VIS Extinktion bei LSPR  $\lambda_{max}$ <sup>[230]</sup> bestimmt und ist hier in mol L<sup>-1</sup> und NP mL<sup>-1</sup> angegeben.

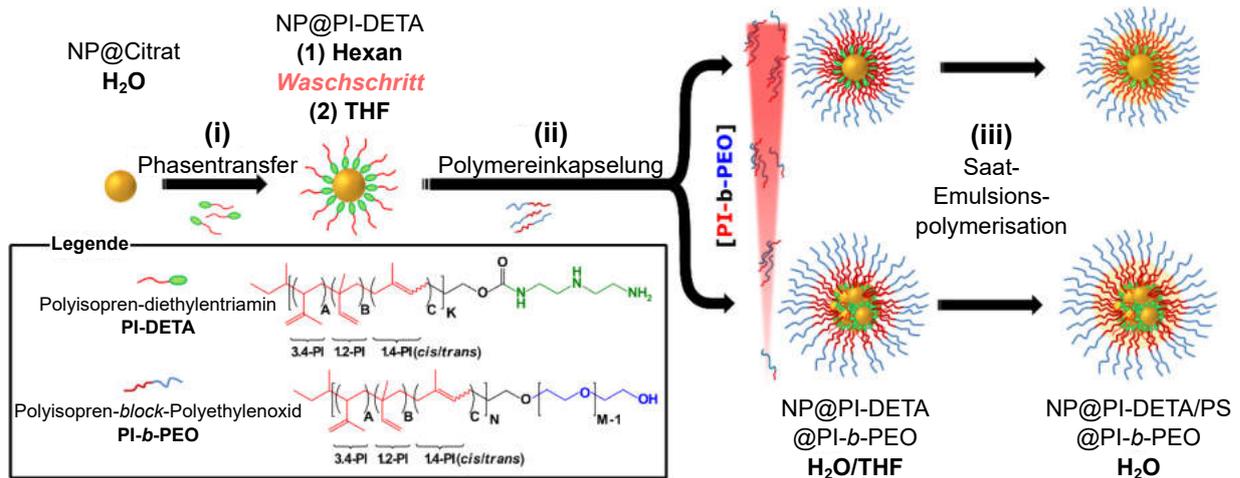
	AgNP-Charge
LSPR $\lambda_{max}$ [nm]	408
$d_H$ , DLS [nm]	$72 \pm 29$
$d$ , TEM [nm]	$42 \pm 9$
$c_{np}$ [mol L <sup>-1</sup> ]	$2 \cdot 10^{-10}$
$c_{np}$ [NP mL <sup>-1</sup> ]	$1 \cdot 10^{11}$

## 6.2 Einkapselung und Selbstassemblierung von Edelmetallnanopartikeln

Ein großer Teil der Ergebnisse dieses Kapitels in der vorliegenden Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit L.M. Liz-Marzán *et al.* (CICbiomaGUNE, San Sebastian), L. Scarabelli (UCLA, Los Angeles) und S. Bals *et al.* (EMAT, Universität Antwerpen) im Fachmagazin *Advanced Functional Materials* des WILEY-VCH Verlags im Jahr 2019 veröffentlicht.<sup>[65]</sup> Die dort veröffentlichte, universelle Methode der kontrollierten Assemblierung über das Verhältnis des Diblockcopolymer PI-*b*-PEO zur Ligandenanzahl bzw. zur NP-Oberfläche wurde von mir entwickelt und alle dort veröffentlichten nanopartikulären Systeme wurden von mir synthetisiert und untersucht. Die Zelltests wurden in Zusammenarbeit mit L.M. Liz-Marzán *et al.* und L. Scarabelli durchgeführt und die *high angle annular dark field scanning TEM* (HAADF-STEM) Aufnahmen, sowie 3D-Rekonstruktionen der NPC wurden in Zusammenarbeit mit S. Bals *et al.* durchgeführt. Entsprechend ist der größte Teil der hier nachgedruckten Abbildungen der Veröffentlichung von mir erstellt worden, mit Ausnahme der Abbildungen betreffend Zelltests und HAADF-STEM. Zum Aufbau und der Struktur der Publikation haben L. Scarabelli und ich gleichermaßen beigetragen. Ein Teil der Ergebnisse des Phasentransfers in der vorliegenden Arbeit wurden bereits in meiner Masterarbeit „*Self-assembly and encapsulation of three-dimensional metallic nanoparticle assemblies using block copolymers and seeded emulsion polymerisation*“<sup>[232]</sup> (unveröffentlicht) vom Juli 2016 bis zum Dezember 2016 an der Fakultät Chemie der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Horst Weller unter der Supervision von Dr. Jan-Philip Merkl erzielt und sind aufgrund der Relevanz für die Methodik unverzichtbar.

Eine schematische Übersicht über die in dieser Arbeit entwickelte Einkapselungs- und Assemblierungsmethode ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Die einzelnen Schritte der Methode werden in den folgenden Unterkapiteln genauer erläutert. Der erste Schritt (i) (Abb. 6.4) ist ein Ligandenaustausch der nativen Liganden mit amino-terminiertem PI-DETA und damit einhergehendem Phasentransfer der NP vom wässrigen in organisches Medium. Der zweite Schritt (ii) besteht aus einer lösungsmittelinduzierten Einkapselung der hydrophoben NP in wässrigem Medium in ein supramolekulares, mizellares System, das durch die Zugabe des Mizellenpolymers PI-*b*-PEO geformt wird. Die Assemblierung mehrerer NP innerhalb einer Mizelle ist während dieses Schrittes möglich. Der dritte und letzte Schritt

(iii) ist die Durchführung einer Saat-Emulsionspolymerisation innerhalb des hydrophoben Kerns der Mizellen, um eine quervernetzte, schützende Polymerhülle zu erhalten. Die Untersuchung der Stabilität, Biokompatibilität und Zellaufnahme der auf diese Weise synthetisierten Systeme sind ebenfalls Teil dieses Kapitels. Die Implementierung der Raman-Reporter in die Zwischenräume der NP-Cluster und weiterführende SERS Untersuchungen sind in Kapitel 6.3 dargestellt.

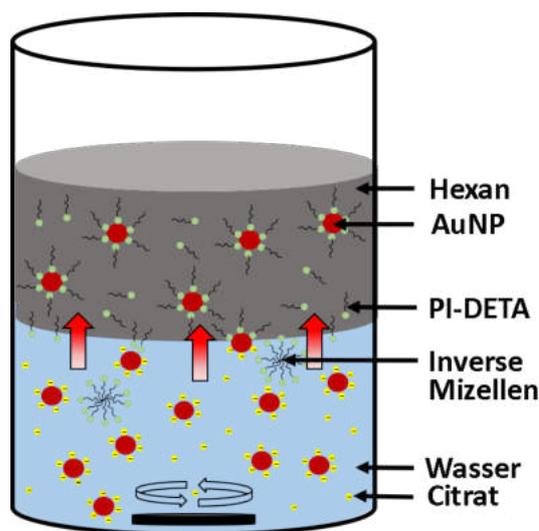


**Abbildung 6.4:** Schematische Darstellung der Dreischritt-Einkapselungsmethode von hydrophilen Edelmetallnanopartikeln mithilfe des Liganden PI-DETA, des Diblockcopolymers PI-*b*-PEO und einer Saat-Emulsionspolymerisation. (i) Ligandenaustausch mit PI-DETA und Phasentransfer, (ii) lösungsmittelinduzierte Einkapselung der NP mit PI-*b*-PEO, (iii) Saat-Emulsionspolymerisation. *Adapted with license from*<sup>[65]</sup> *Copyright* © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

### 6.2.1 Ligandenaustausch und Phasentransfer

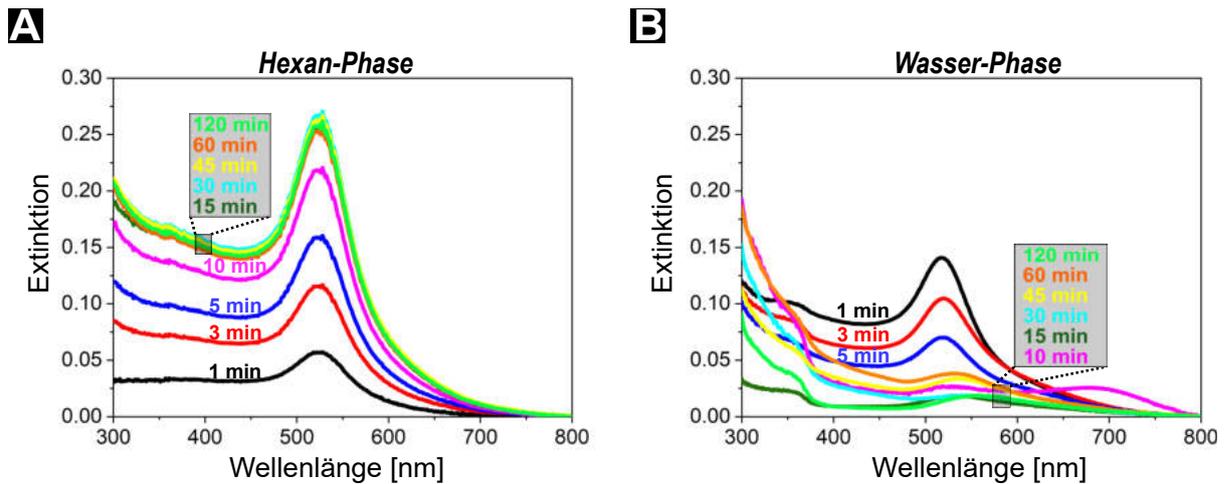
Die Einkapselungsmethode aus Abbildung 6.4 geht von hydrophilen NP aus. Die Übertragung auf nativ hydrophobe NP, das heißt in unpolaren Lösungsmitteln synthetisierte NP, die durch geeignete hydrophobe Polymerliganden stabilisiert sind oder anschließend mit PI-DETA modifiziert werden, ist möglich und erlaubt daher eine umfassende Universalität der Methode. Die Synthese von Au- und AgNP in organischem Medium ist Bestandteil aktueller Forschung und bisher häufig sehr sensitiv, mit relativ hohem Aufwand verbunden, begrenzt in Größen- und Formkontrolle oder häufig erst durch stark adsorbierende Stabilisatoren möglich, wohingegen die wässrigen Synthesen von modifizierbaren, monodispersen, sphärischen und ebenfalls anisotropen AuNP (eingeschränkt für AgNP gültig)

weniger aufwendig sind und bereits ausführlich untersucht und optimiert wurden.<sup>[233–236]</sup> Aus diesen Gründen ist der erste Schritt (i) (Abb. 6.4) Bestandteil dieser Einkapselung. Des Weiteren lieferte Schritt (i) wichtige Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit der NP@PI-DETA und ist entsprechend ein wichtiger Teil der Entwicklung einer Assemblierungsmethode. Der Ligandenaustausch wird in einem zweiphasigen System aus NP@Citrat in Wasser und PI-DETA gelöst in Hexan durch starkes Emulgieren der zwei Phasen mithilfe eines Magnetrührers (für weitere Details siehe Kapitel 8.7) durchgeführt. Dieser Aufbau ist schematisch in Abbildung 6.5 dargestellt. In Abbildung 6.5



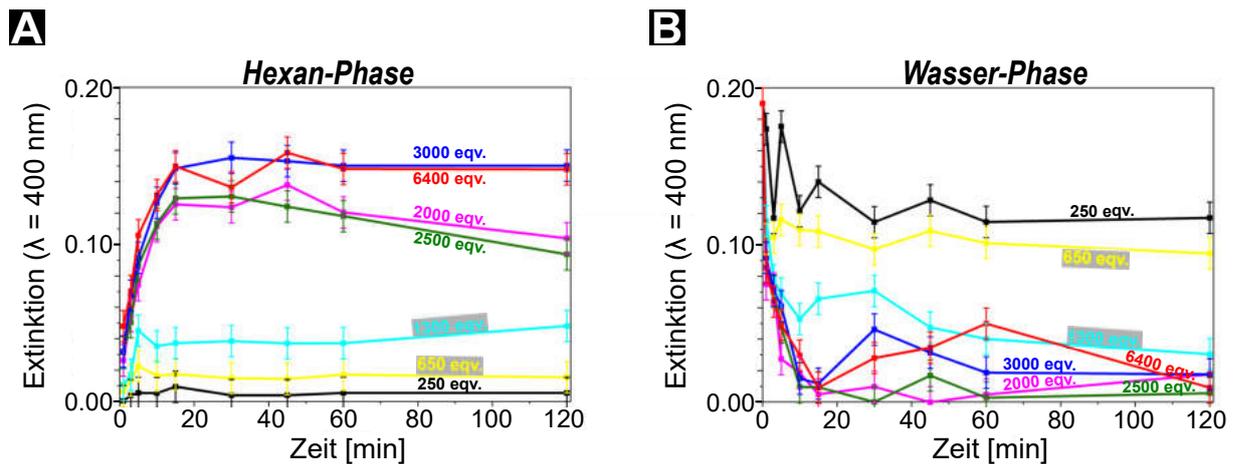
**Abbildung 6.5:** Schematische Darstellung des Phasentransfers von AuNP durch PI-DETA. *Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.*

zu sehen, dass das Citrat an den Grenzflächen der Phasen mit PI-DETA ausgetauscht wird. Die Konzentration von PI-DETA ist ein entscheidender Faktor, da eine zu geringe Konzentration zu einer instabilen Dispersion der NP in Hexan und zum Präzipitieren der NP führt. Eine zu hohe PI-DETA Konzentration führt, wie in Abbildung 6.5 angedeutet, zur Überschreitung der kritischen Mizellenkonzentration von PI-DETA in Wasser und folglich zu stabilen inversen PI-DETA-Mizellen, die Hexantropfen und/oder NP (auch bereits transferierte NP durch eine PI-DETA Doppelschicht) in Wasser stabilisieren können. Dieser Vorgang führt zu beträchtlichen Verlusten an NP während des Ligandenaustausches. Die Erforschung der optimalen PI-DETA Konzentration wurde durch Kinetikmessungen des Ligandenaustausches und Phasentransfers der AuNP@Citrat mit verschiedenen PI-DETA Konzentrationen durchgeführt. Die mit dem Auge zu erkennende Färbung der organischen Phase und gleichzeitige Entfärbung der wässrigen Phase wurde über UV-VIS-Extinktionsmessungen über einen Zeitraum vom Start des Emulgierens bis 120 Minuten mit verschiedenen PI-DETA Konzentrationen überwacht. Die Spektren der organischen Phase (Abbildung 6.6 **A**) und der wässrigen Phase (Abbildung 6.6 **B**) eines erfolgreichen Ligandenaustausches mit 3000 PI-DETA Polymeren pro NP (3000 eqv.) zeigen, dass die Extinktion der AuNP-Dispersion in der organischen Phase nach 15 min das Maximum und in der wässrigen Phase das Minimum erreicht. Längeres Emulgieren führt vermutlich zur Entstehung und Präzipitation von in inversen Mizellen verkapselten NP in H<sub>2</sub>O.



**Abbildung 6.6:** UV-VIS Extinktionsspektren der Hexan-Phase **A** und der dazugehörigen wässrigen Phase **B** zu bestimmten Zeitpunkten während des Phasentransfers von AuNP mit ca. 3000 PI-DETA eqv.. Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Da die Konzentration der AuNP proportional zur Extinktion bei 400 nm<sup>[223]</sup> ist (Interbandübergänge im Gold sind Hauptbeitrag zur Extinktion bei 400 nm), kann diese gegen die Zeit aufgetragen werden und als Maß für die Effektivität des Ligandenaustausches und Phasentransfers dienen. In Abbildung 6.7 ist die zeitliche Entwicklung der Extinktion bei 400 nm mit ausgewählten PI-DETA Äquivalenten aufgetragen. Eine Übersicht über die Kinetikmessungen des Phasentransfers aller genutzten PI-DETA Äquivalenten lässt sich im Appendix entnehmen (Abbildung A.1).



**Abbildung 6.7:** Auftragung der Extinktion bei 400 nm der Hexan **A** und der wässrigen Phase **B** gegen die Zeit des Phasentransfers mit verschiedenen Äquivalenten an PI-DETA. Photometrische Genauigkeit (Ext.):  $\pm 0.01$ . Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Abbildung 6.7 und A.1 zeigen, dass ein Minimum von 3000 eqv. PI-DETA ( $1300 \text{ g mol}^{-1}$ ) für einen effizienten Phasentransfer der AuNP nötig sind, da die Extinktion bei 400 nm nach 15 Minuten die Sättigung erreicht, die auch mit höheren Mengen PI-DETA maximal erreicht wird. Eine Menge von unter 3000 eqv. führt zu kolloidal instabileren AuNP@PI-DETA in Hexan (vgl. Entwicklung von  $A(400 \text{ nm})$  bei 2000 und 2500 eqv. ab 15 Minuten in Abb. 6.7 A) und dazu, dass mindestens 12 % weniger AuNP in die organische Phase transferiert werden. Höhere Äquivalente an PI-DETA führen zu keinen Verbesserungen des Phasentransfers. Im Gegenteil, höhere Äquivalente an amphiphilen PI-DETA führen ab einer bestimmten Stoffmenge dazu, dass die Hexan/Wasser- bzw. Wasser/Hexan-Emulsionen stabiler werden und den Phasentransfer einschränken. Basierend auf diesen Ergebnissen müssen mindestens 3000 PI-DETA Liganden pro Nanopartikel für einen effektiven Phasentransfer verfügbar sein. Das entspricht bei der Größe dieser AuNP einer Oberflächenbelegung von  $\approx 3$  Ligan-

den pro  $\text{nm}^2$  ( $3 \text{ nm}^{-2}$ ). Die Verwendung von  $2500 \text{ g mol}^{-1}$  PI-DETA führte dazu, dass nur noch ca. 2000 eqv. für einen vollständigen Phasentransfer nötig waren. Die hier ermittelten Oberflächenbelegungen der AuNP mit PI-DETA decken sich mit der berichteten Moleküllängen- und Molmassen-Abhängigkeit und den berichteten Belegungswerten ähnlicher Liganden aus der Literatur (vgl. Tabelle 6.3). Die Erkenntnis, dass ab 3000 eqv. ein vollständiger Phasentransfer und Ligandenaustausch zu kolloidal stabilen AuNP@PI-DETA stattfindet, kann durch den relativen Aggregationsparameter  $AP$  (Gleichung 6.1) überprüft werden. Das Integral

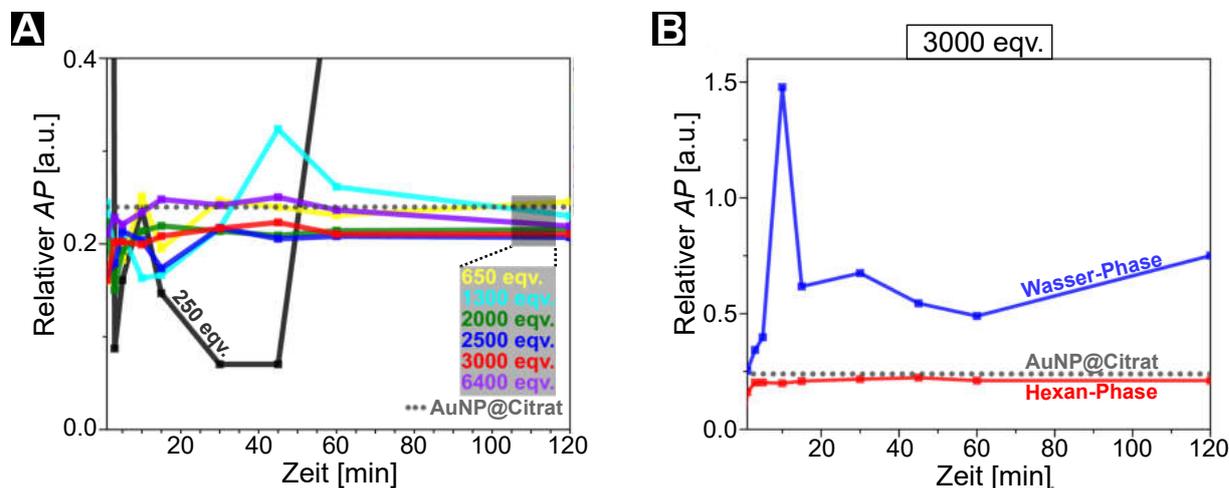
der Intensität der Extinktion  $A(\lambda)$  zwischen 600 – 800 nm und 500 – 600 nm wird dabei ins Verhältnis gesetzt. Der Bereich von 600 – 800 nm repräsentiert hierbei den Bereich der Plasmonenkopplung und 500 – 600 nm deckt den Bereich der LSPR von nicht-aggregierten  $\approx 20 \text{ nm}$  AuNP ab (Abbildung A.2). Das bedeutet, dass der  $AP$  ein Maß für den Grad der Aggregation der AuNP darstellt und ebenso als Maß für die kolloidale Stabilität einzelner

**Tabelle 6.3:** Oberflächenbelegung ( $\text{nm}^{-2}$ ) von AuNP in Abhängigkeit der molaren Masse ( $M$ ) unterschiedlicher Liganden und im Vergleich zur ermittelten PI-DETA Belegung.

Ligand	$M$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$\text{nm}^{-2}$
MPA	106	$6.3^{[237]}$
MUA	218	$5.7^{[237]}$
MHA	288	$5.3^{[237]}$
PEO-SH	282	$4.9^{[237]}$
PEO-SH	459	$4.3^{[237]}$
PEO-SH	1000	$4.1^{[238]}$
PI-DETA	1300	$\approx 3$
PEO-SH	2000	$2.5^{[238]}$
PI-DETA	2500	$\approx 2$
PEO-SH	10000	$1.2^{[238]}$

NP genutzt werden kann.

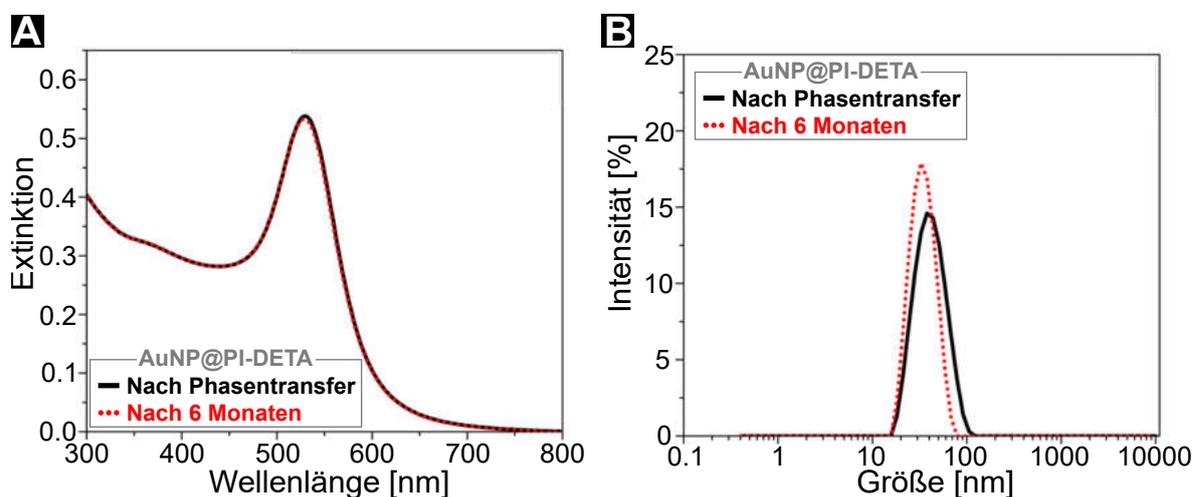
$$AP = \frac{\int_{600}^{800} A(\lambda) d\lambda}{\int_{500}^{600} A(\lambda) d\lambda} \quad (6.1)$$



**Abbildung 6.8:** **A:** Auftragung der relativen Aggregationsparameter  $AP$  der Proben aus Abbildung 6.7 in Hexan im Verlauf des Phasentransfers mit Vergleich des  $AP$  der AuNP Charge in Wasser. **B:**  $AP$  des Phasentransfers mit 3000 eqv. in Hexan und Wasser. Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die Auftragung der  $AP$  der AuNP-Dispersionen in Hexan mit den oben genannten PI-DETA ( $1300 \text{ g mol}^{-1}$ ) Äquivalenten gegen die Zeit ist in Abbildung 6.8 dargestellt. In Abbildung 6.8 **A** ist zu sehen, dass der Verlauf des  $AP$  von 250 eqv. bis 2500 eqv. immer konstanter wird und sich dem Vergleichswert der AuNP@Citrat Charge immer weiter annähert, bis sich schließlich bei 3000 eqv. ein ungefähr konstanter  $AP$  der AuNP@PI-DETA in Hexan einstellt, der unter dem Grad der Aggregation der stabilen Vergleichscharge bleibt (Abb. 6.8 **B**). In der wässrigen Phase (Abb. 6.8 **B**) scheint eine teilweise reversible Plasmonenkopplung durch Destabilisierung der AuNP@Citrat stattzufinden, da der  $AP$  im zeitlichen Verlauf stark ansteigt und genauso schnell wieder auf ein etwas niedrigeres Niveau sinkt. Diese Beobachtung ist allerdings aufgrund der relativ schnell sinkenden Konzentration in der wässrigen Phase und aufgrund der erwartbaren Schwankungen des  $AP$  während des Wechsels von elektrostatischer auf sterischer Stabilisierung an der Phasengrenze von verschiedenen Dielektrika wenig aussagekräftig. Die Ergebnisse des zeitlichen  $AP$ -Verlaufs während des Phasentransfers unterstützen die These, dass  $\approx 20 \text{ nm}$  AuNP mit  $\approx 3$  PI-DETA ( $1300 \text{ g mol}^{-1}$ ) pro  $\text{nm}^2$  eine kollektional stabile Dispersion

bilden. Die mit  $3 \text{ Lig}\cdot\text{nm}^{-2}$  in Hexan transferierten AuNP@PI-DETA können eingetrocknet werden und vollständig in THF redispergiert werden. Der Langzeitstabilitätstest in THF aus Abbildung 6.9 zeigt, dass die Extinktion und der hydrodynamische Durchmesser der AuNP@PI-DETA Dispersion nach 6 Monaten immer noch annähernd gleich sind und



**Abbildung 6.9:** **A:** UV-VIS Extinktionsspektren und **B:** DLS-Messungen von AuNP@PI-DETA in THF mit ungefähr  $3 \text{ Lig}\cdot\text{nm}^{-2}$  direkt nach dem Phasentransfer und nach 6 Monaten Lagerung im Kühlschrank ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

eine nachhaltige kolloidale Stabilität aufweisen. Der Phasentransfer wurde außerdem mit weiteren potentiell geeigneten Liganden bei unterschiedlichen pH-Werten der wässrigen AuNP-Dispersionen durchgeführt. Dabei wurde beispielsweise PI-DETA über eine Reaktion mit Kohlenstoffdisulfid  $\text{CS}_2$ <sup>[239]</sup> in ein Polyisopren-dithiocarbamat (PI-DTC) umgewandelt und als Ligand für den Phasentransfer getestet. Die Bildung eines Dithiocarbamats kann spektroskopisch verfolgt werden und ist im Anhang in Abbildung A.3 dargestellt. Des Weiteren wurden Oleylamin, Octadecylamin, 1-Octanthiol und 1-Octadecanthiol bei pH 5.5 und 11 getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen des Phasentransfers sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst. Der Phasentransfer mit Aminoliganden funktioniert nur zu einem geringen Teil im Basischen bei  $\text{pH} = 11$ , wenn die Amino-Gruppen deprotoniert sind. Das lässt vermuten, dass die Ladung der Ankergruppe ein entscheidender Faktor ist, der die Amphiphilie steigert und das Eindringen der Liganden in die wässrige Phase und das Durchdringen durch die geladene elektrische Doppelschicht zur Oberfläche der NP erleichtert (Abbildung A.4). Ein effizienter Phasentransfer mit PI-DTC ist ebenfalls nur bei  $\text{pH} = 5.5$  zu beobachten (deutlich langsamer als mit PI-DETA), obwohl die Dithiosäure bei  $\text{pH} = 11$  wahrscheinlich deprotoniert und geladen vorliegt. Gründe dafür könnten

die Stabilität des DTC sein (bis pH = 12 stabil<sup>[239]</sup>) oder da kein Transfer im basischen Milieu funktioniert, könnte vollständig deprotoniertes Citrat zu einer schwer durchdringlichen elektrischen Doppelschicht führen. Der Phasentransfer mit den verwendeten kürzeren Liganden ( $\leq C_{18}$ ) funktioniert aufgrund der zu geringen sterischen Stabilisierung dieser Liganden der  $\approx 20$  nm AuNP nicht oder nur unzureichend. Diese Ergebnisse stimmen mit der von Karg *et al.* bei Phasentransfers gefundenen Abhängigkeit der sterischen Stabilisierung von der Ligandenlänge und der AuNP-Größe überein.<sup>[240]</sup>

**Tabelle 6.4:** Zusammenfassung der durchgeführten Phasentransfers mit unterschiedlichen Liganden bei pH 5.5 und 11. Die Zeit bis zur  $c$ (Sättigung) bedeutet, ab wann die NP-Konzentration in der Hexanphase die Sättigung erreichte. Die Daten beziehen sich auf einen Phasentransfer mit der Zugabe von  $3 \text{ Lig} \cdot \text{nm}^{-2}$  bei PI-DETA und PI-DTC und 3 bis zu  $8 \text{ Lig} \cdot \text{nm}^{-2}$  bei den restlichen Molekülen.

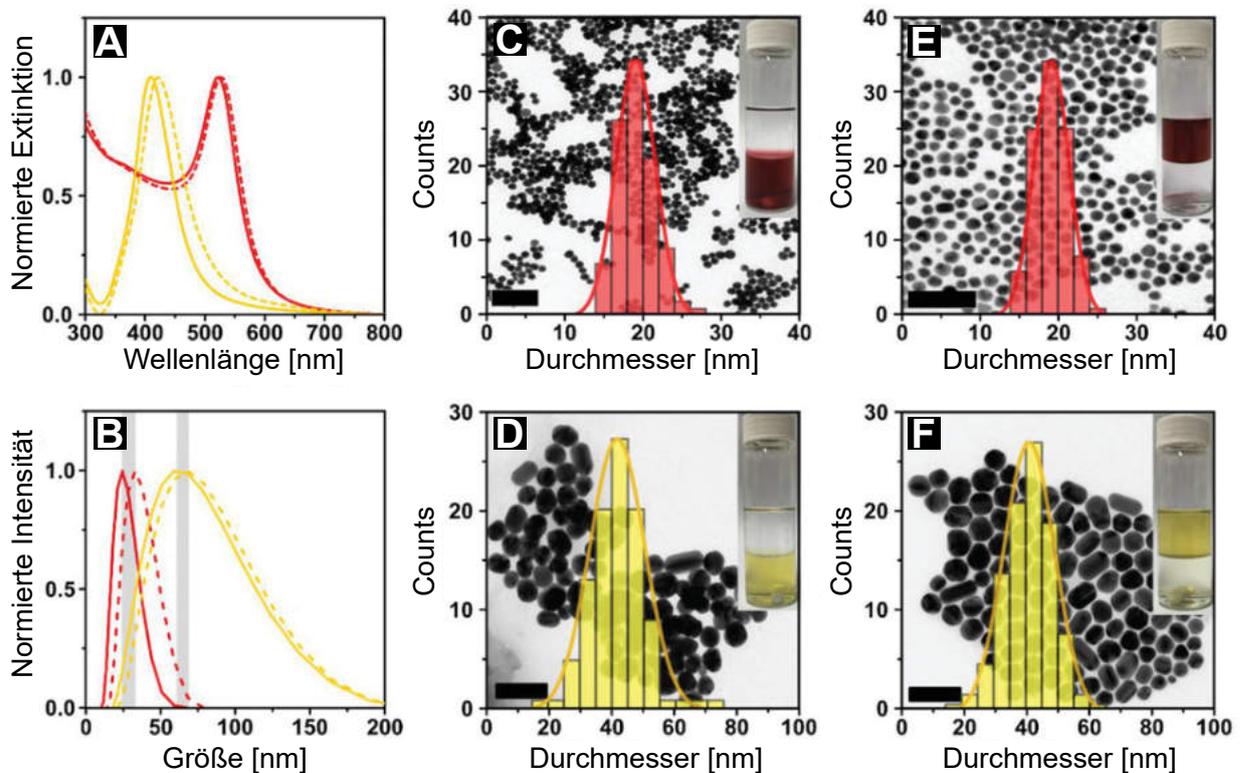
	pH-Wert	Transfer	Zeit bis zur $c$ (Sättigung) [min]
PI-DETA	5.5	hoch	$\approx 15$
	11	gering	-
PI-DTC	5.5	hoch	$\approx 40$
	11	gering	-
Octadecylamin	5.5, 11	gering	-
Oleylamin	5.5, 11	gering	-
1-Octadecanthiol	5.5, 11	-	-
1-Octanthiol	5.5, 11	-	-

Unter Berücksichtigung der oben stehenden Ergebnisse der Phasentransferuntersuchung kann eine allgemeine Formel aufgestellt werden, die es erlaubt den Phasentransfer mit PI-DETA beliebig zu skalieren. Die Voraussetzungen dafür sind, dass der pH-Wert der AuNP@Citrat Dispersion im neutralen bis leicht sauren Bereich (pH  $\approx 5.5$ ) liegt, die Oberfläche  $A_{\text{NP}}$  (nm<sup>2</sup>) der AuNP und die Oberflächenbelegung des PI-DETA  $\rho_A$  (nm<sup>-2</sup>) bekannt sind (Gleichung 6.2).

$$c(\text{PI-DETA}) = \frac{c(\text{NP}) \cdot V(\text{H}_2\text{O}) \cdot (A_{\text{NP}} \cdot \rho_A)}{V(\text{Hexan})} = \frac{n_{\text{NP}} \cdot (A_{\text{NP}} \cdot \rho_A)}{V(\text{Hexan})} \quad (6.2)$$

$$1.9 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} = \frac{3.2 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \cdot 0.60 \text{ L} \cdot (1.3 \cdot 10^3 \text{ nm}^2 \cdot 3.0 \text{ nm}^{-2})}{0.40 \text{ L}} \quad (6.3)$$

Mithilfe dieser Formel wurde ein Phasentransfer einer 600 mL wässrigen AuNP@Citrat Dispersion in 400 mL Hexan erfolgreich durchgeführt. Die Berechnung der PI-DETA ( $1300 \text{ g mol}^{-1}$ ) Konzentration, die in der Hexanphase für den Phasentransfer von 600 mL der AuNP-Charge 2 aus Kapitel 6.1.1 nötig ist, ist beispielhaft in Gleichung 6.3 dargestellt. Die Phasentransfermethode wurde erfolgreich auf  $42 \pm 9 \text{ nm}$  AgNP übertragen, indem die gleiche Oberflächenbelegung ( $\rho_A \approx 3 \text{ nm}^{-2}$ ) der PI-DETA Moleküle auf der Silberoberfläche angenommen wurde. Sowohl AuNP, als auch AgNP zeigen eine zu erwartende geringe Rotverschiebung der Extinktion im UV-VIS Spektrum nach dem Phasentransfer durch die Erhöhung des Brechungsindex (bedingt durch PI-DETA und Hexan) und keine Anzeichen von Aggregation (Abbildung 6.10).



**Abbildung 6.10:** **A:** Normierte UV-VIS Extinktionsspektren und **B:** DLS-Messungen (intensitätsgewichtet) von NP@Citrat (durchgehende Linien) und NP@PI-DETA (gestrichelte Linien) der AuNP (rot) und AgNP (gelb). Der graue Bereich in **B** repräsentiert die Differenz des hydrodynamischen Durchmessers nach dem Phasentransfer. **C-F** TEM-Aufnahmen und Größenhistogramme der AuNP(**C+E**) und AgNP (**D+F**) vor (**C+D**) und nach (**E+F**) dem Ligandenaustausch. Es wurden jeweils mindestens 100 NP ausgemessen und die Maßstabsleisten betragen 200 nm. Im Inset ist das zweiphasige System aus Hexan über Wasser zu sehen. Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

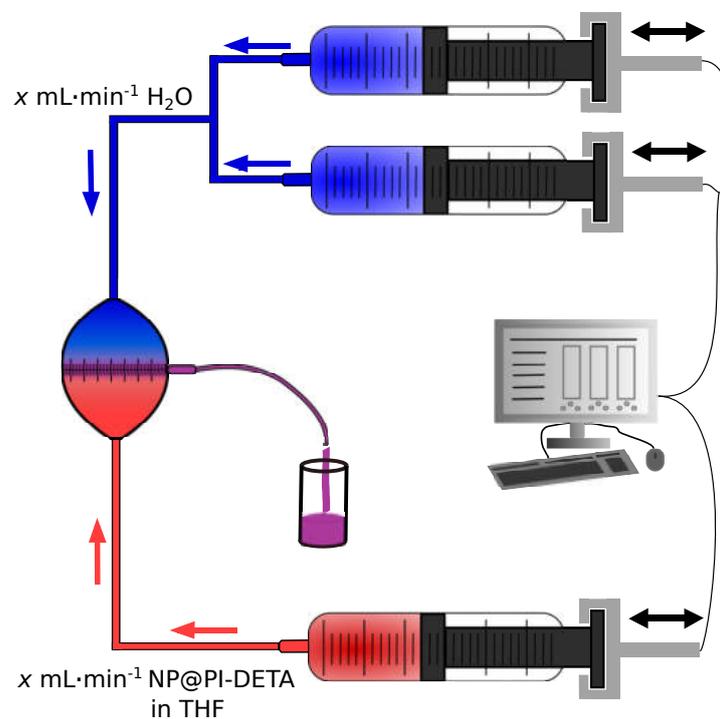
Die Messungen der dynamischen Lichtstreuung wurden zur Unterstützung der optischen Daten herangezogen. Der bei Au- und AgNP zu beobachtende Anstieg des hydrodynamischen Radius von jeweils 8 nm ( $24 - 32$  nm für AuNP;  $60 - 68$  nm für AgNP), bestätigt den Austausch von Citrat mit PI-DETA (Abbildung 6.10 **B**). TEM-Aufnahmen der NP vor und nach dem Phasentransfer zeigen eine unveränderte durchschnittliche Größenverteilung von  $19 \pm 3$  zu  $19 \pm 2$  nm bei den AuNP und  $42 \pm 9$  zu  $41 \pm 8$  nm bei AgNP (Abbildung 6.10 **C-F**). Die Präsenz von PI-DETA auf der Oberfläche der NP kann im Elektronenmikroskop nicht erkannt werden, da das Molekulargewicht des Polymers und die Dichte der Ligandenhülle zu gering sind, um einen Kontrast um Metallpartikel dieser Größe zu generieren.

In diesem Kapitel wurde eine skalierbare Methode vorgestellt, die es erlaubt hydrophile, plasmonische NP@Citrat durch einen Ligandenaustausch mit PI-DETA in einem zweiphasigen System vollständig innerhalb von 15 Minuten in ein organisches, unpolares Dispersionsmedium zu überführen und dabei langfristige kolloidale Stabilität der NP zu gewährleisten. Die Untersuchungen dieses entwickelten Systems führten zu einem tieferen Verständnis des Mechanismus, der Ligandenhülle der NP@PI-DETA und den nötigen Voraussetzungen für einen reproduzierbaren Phasentransfer. Die wichtigsten Erkenntnisse sind, dass bei  $\approx 20$  nm AuNP und  $\approx 42$  nm AgNP mit  $1300 \text{ g mol}^{-1}$  PI-DETA  $\approx 3$  Liganden pro  $\text{nm}^2$  und bei  $2500 \text{ g mol}^{-1}$  PI-DETA  $\approx 2$  Liganden pro  $\text{nm}^2$  für einen effektiven Phasentransfer bzw. Ligandenaustausch, der in kolloidal stabilen NP resultiert, nötig sind. Des Weiteren ist der Phasentransfer pH-abhängig und sollte für ein optimales Resultat im leicht sauren wässrigen Medium durchgeführt werden.

### 6.2.2 Selbstassemblierung und Einkapselung

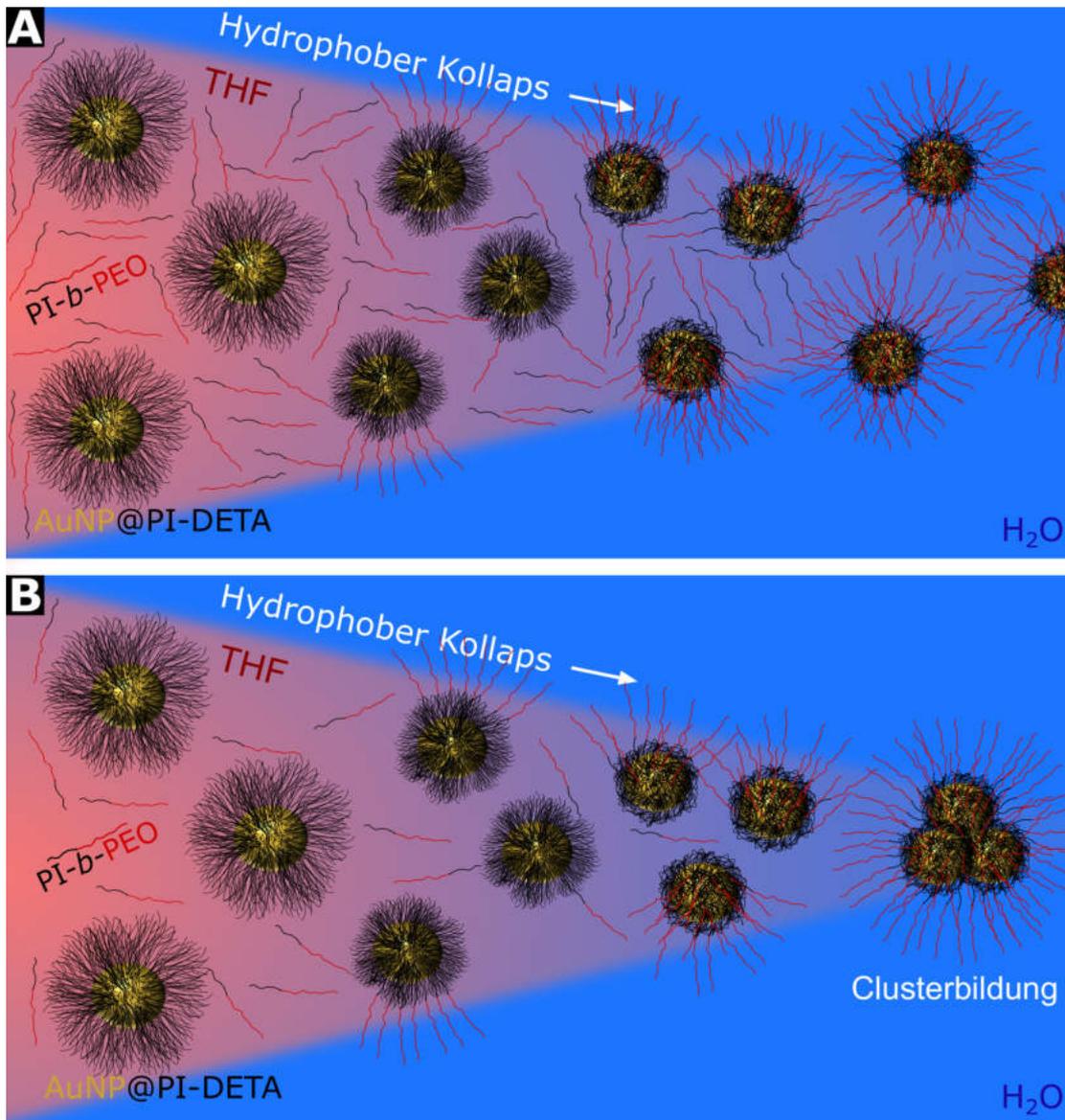
Der nächste und zweite Schritt (ii) der Assemblierungs- und Einkapselungsmethode (siehe Abbildung 6.4) besteht aus einer lösungsmittelinduzierten Einkapselung der hydrophoben NP in wässrigem Medium in ein supramolekulares, mizellares System, das durch die Zugabe des Mizellenbildners PI-*b*-PEO geformt wird. Direkt im Anschluss wird eine Saat-Emulsionspolymerisation (Schritt (iii)) durchgeführt und eine schützende Polystyrolhülle aufgebaut. Die Polymerhüllen aus Schritt (iii) sind zwar in diesem Kapitel dargestellt, werden allerdings genauer in Kapitel 6.2.3 behandelt. Nach dem Ligandenaustausch und Phasentransfer (i) werden die AuNP@PI-DETA zentrifugiert, gewaschen, eingetrocknet und in THF redispersiert. Das Lösungsmittel THF wird deshalb genutzt, da es bei RT vollständig mit Wasser mischbar ist. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass unbe-

dingt stabilisiertes THF genutzt werden muss, da sich bildende Peroxide eine potentielle Gefahrenquelle darstellen, die AgNP oxidieren, die Saat-Emulsionspolymerisation und eine reproduzierbare Einkapselung verhindern (Abbildung A.5). Die Einkapselungsmethode basiert darauf, dass AuNP@PI-DETA zusammen mit dem Diblockcopolymer PI-*b*-PEO in THF zurück in einen Überschuss an Wasser transferiert werden. Eine effiziente und reproduzierbare Mischung der beiden Komponenten wird über ein Mikrofluidik-System (Abb. 6.11) mit geeigneten Mischkammern (für weitere Details siehe Kapitel 8.9) erreicht, das eine exzellente Kontrolle über Scherkräfte bietet, die während des Mischvorgangs entstehen.<sup>[47,241]</sup>



**Abbildung 6.11:** Schematischer Aufbau des Mikrofluidik-Mischsystems mit zwei Computer-gesteuerten, automatisierten Wasserspritzen und einer Computer-gesteuerten, automatisierten Spritze für die NP-Dispersion. Die Flüssigkeiten werden in einen Mikrofluidik-Reaktorchip mit  $45 \mu\text{m}$  Durchmesser Mischkammern geleitet und dort mit einer bestimmten Flussrate vermischt. Hierbei findet die Mischung mit einem Überschuss an Wasser statt. *Adapted with license from*<sup>[65]</sup> *Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.*

Die Mischmethode aus Abbildung 6.11 verhindert die Ausbildung von hohen Konzentrationsgefällen innerhalb des neuen Dispersionsmediums und führt zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit der NP-Mizellen-Bildung im Vergleich zum manuellen Mischen.

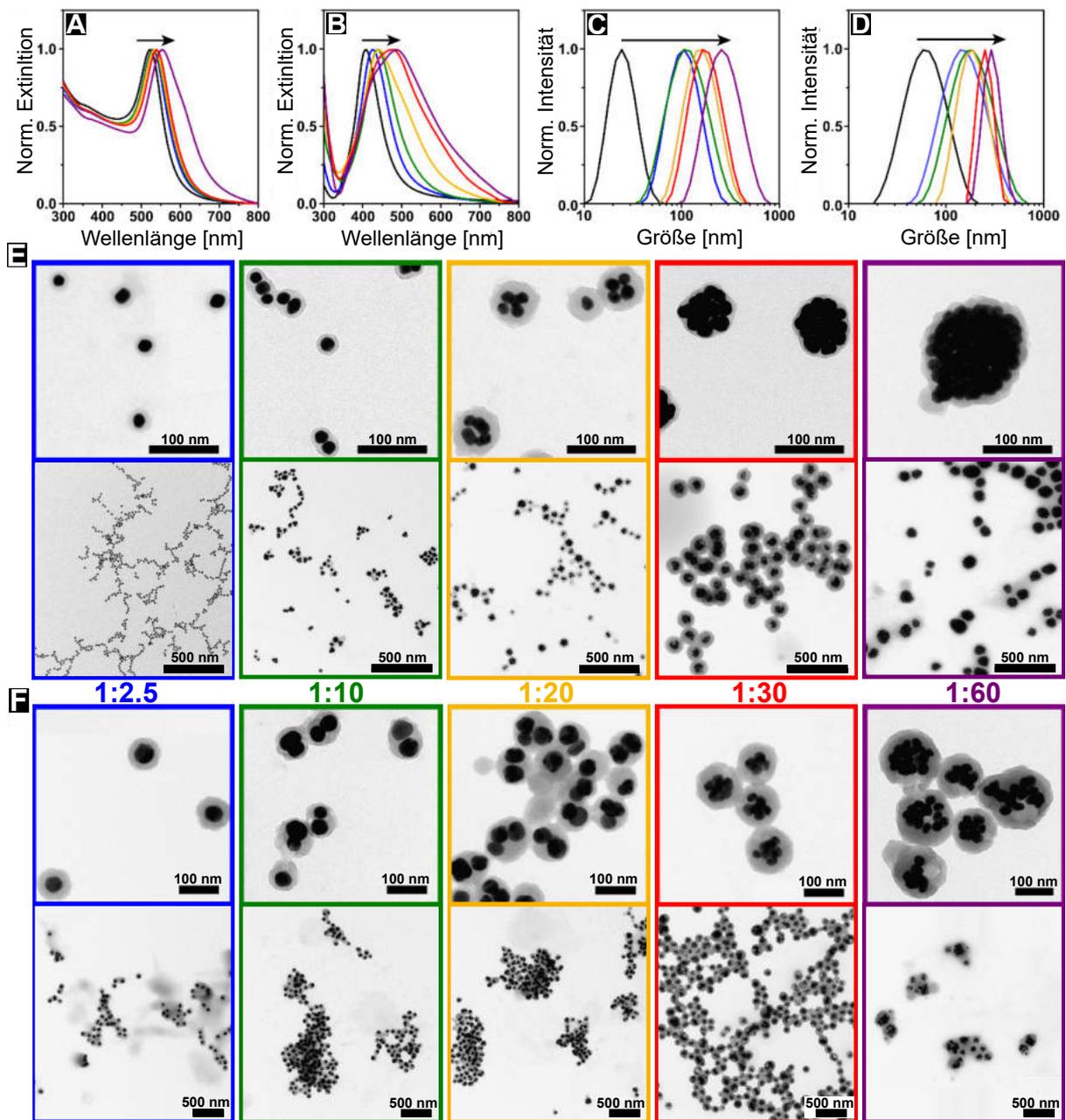


**Abbildung 6.12:** Schematische Darstellung des erwarteten hydrophoben Kollapses der PI-DETA Ligandenhülle in der THF-Wasser-Mischkammer des Mikrofluidik-Systems aus Abbildung 6.11. Die Stabilisierung der NP mit kollabierter PI-DETA Ligandenhülle im wässrigen Medium findet durch das Diblockcopolymer PI-*b*-PEO in **A** einem relativ hohen Überschuss an PI-*b*-PEO pro NP und **B** einem relativ geringeren Überschuss an PI-*b*-PEO pro NP statt. Die hydrophoben Wechselwirkungen der PI-Ketten von PI-DETA und PI-*b*-PEO begünstigen die Bildung einer supramolekularen Mizellensystems um die NP. Der hohe PI-*b*-PEO Überschuss in **A** führt dazu, dass potentiell jeder einzelne NP in einer Mizelle stabilisiert werden kann. Die begrenzte Verfügbarkeit an PI-*b*-PEO in **B** während der Überführung führt zur Destabilisierung einzelner Partikel, die durch Oberflächenenergieminimierung zur Clusterbildung der NP und zur Stabilisierung mehrerer NP in einer Mizelle führt.

Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Polyisopren Ketten des PI-DETA Liganden und des Diblockcopolymers PI-*b*-PEO begünstigen die Formation eines stabilisierenden, supramolekularen, mizellaren Systems um die NP während des Übergangs in das wässrige Dispersionsmedium (Abbildung 6.4 (ii) und 6.12). Diese Methode kann nicht nur, wie schon in Kapitel 4.4.3 für die Einkapselung einzelner Eisenoxidnanopartikel und Quantenpunkte gezeigt, für die Einkapselung einzelner plasmonischer NP angewendet werden, sondern ebenfalls für Einkapselung von plasmonischen NP-Clustern in unterschiedlicher Größe durch die Veränderung des NP@PI-DETA zu PI-*b*-PEO Verhältnisses (Abbildung 6.12). Für eine universelle Methode, die eine direkte Übertragung einer reproduzierbaren Einkapselung auf NP unterschiedlicher Größe und Kontrolle über die Clustergröße erlaubt, wie von  $\approx 20$  nm AuNP auf  $\approx 40$  nm AgNP, ist es jedoch nicht zielführend die Menge an PI-*b*-PEO ins Verhältnis zur Menge an NP in der Dispersion zu setzen, um die Zugabe an PI-*b*-PEO zu berechnen. Ein für verschiedene NP-Durchmesser universeller Parameter zur Berechnung der Stoffmengen zugabe des PI-*b*-PEO, ist das Verhältnis von PI-*b*-PEO zur NP-Oberfläche und gleichbedeutend das Verhältnis PI-*b*-PEO zu PI-DETA. Das bedeutet konkret, dass die Berechnungsmethode mit PI-*b*-PEO:NP für NP gleicher Größe innerhalb einer Versuchsreihe durchaus Informationen und die Kontrolle über die mizellaren Systeme bieten<sup>[47,242,243]</sup>, aber die Anwendung dieses Verhältnisses auf NP anderer Größen zu völlig anderen Clustergrößen führen kann. Ein Verhältnis von 1500 PI-*b*-PEO Polymeren pro NP bewirkt eine andere Stabilisierung bei  $\approx 20$  nm AuNP ( $A_{\text{AuNP}} \approx 1257 \text{ nm}^{-2}$ ) im Vergleich zu  $\approx 40$  nm AgNP ( $A_{\text{AgNP}} \approx 5026 \text{ nm}^{-2}$ ). Im Fall der AuNP ist die theoretische Oberflächenbelegung<sup>1</sup>  $\rho_{\text{A}}(\text{PI-}b\text{-PEO}) \approx 1.2 \text{ nm}^{-2}$  und im Fall der AgNP liegt diese bei  $\rho_{\text{A}}(\text{PI-}b\text{-PEO}) \approx 0.30 \text{ nm}^{-2}$ . Das Verhältnis von  $\rho_{\text{A}}(\text{PI-}b\text{-PEO})$  zu  $\rho_{\text{A}}(\text{PI-DETA})^2$  ist bei 1500 PI-*b*-PEO pro AuNP 1 zu 2.5 und für die AgNP 1 zu 10. In Abbildung 6.13 ist zu sehen, dass ein Verhältnis von 1 zu 2.5 bzw.  $\rho_{\text{A}}(\text{PI-}b\text{-PEO}) \approx 1.2 \text{ nm}^{-2}$  zu fast ausschließlich einzeln verkapselten Au- sowie AgNP führt (Abb. 6.13 **E,F** - blau) und ein Verhältnis von 1 zu 10 bzw.  $\rho_{\text{A}}(\text{PI-}b\text{-PEO}) \approx 0.30 \text{ nm}^{-2}$  bereits dazu führt, dass vermehrt Au- und AgNP-Dimere und -Trimere in einer Mizelle stabilisiert werden (Abb. 6.13 **E,F** - grün, vgl. auch Abb. A.6). Über die Variation von  $\rho_{\text{A}}(\text{PI-}b\text{-PEO})$  bzw. PI-*b*-PEO:PI-DETA konnten so einzeln verkapselte und geclusterte Gold- und Silber-NP mit verschiedenen Clustergrößen reproduzierbar erhalten werden (Abbildung 6.13).

<sup>1</sup>gemeint ist die theoretische Menge an PI-*b*-PEO pro  $\text{nm}^{-2}$  der NP, auch wenn die Diblockcopolymere nicht unbedingt Kontakt zur NP-Oberfläche haben

<sup>2</sup> $3 \text{ nm}^{-2}$ , siehe Kapitel 6.2.1



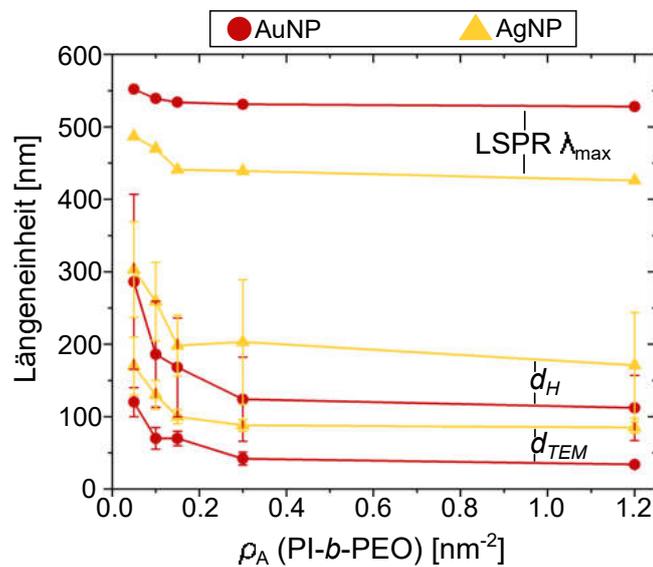
**Abbildung 6.13:** A,B: Normierte UV-VIS Spektren; C,D: DLS-Analyse (intensitätsgewichtet); E,F: repräsentative TEM-Aufnahmen mit jeweils höherer (oben) und geringerer Vergrößerung (unten) von einzeln und geclustert eingekapselten Gold-NP (A,C,E) mit sichtbarer Polystyrolhülle und einzeln und geclustert eingekapselten Silber-NP (B,D,F) mit sichtbarer Polystyrolhülle. Die Systeme wurden mit einem Verhältnis von  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO})$ : $\rho_A(\text{PI-DETA})$  von 1:2.5 (blaue Linien), 1:10 (grüne Linien), 1:20 (gelbe Linien), 1:30 (rote Linien) und 1:60 (violette Linien) präpariert. Diese Verhältnisse entsprechen in derselben Reihenfolge  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) \approx 1.2 \text{ nm}^{-2}$ ,  $0.30 \text{ nm}^{-2}$ ,  $0.15 \text{ nm}^{-2}$ ,  $0.10 \text{ nm}^{-2}$  und  $0.050 \text{ nm}^{-2}$ . Das Farbschema ist für alle Analysen gleich. Die schwarzen Pfeile unterstreichen die Rotverschiebung des LSPR (A,B) und den Anstieg der Clustergrößen (C,D). Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die Erwartung, die in Abbildung 6.12 zusammengefasst ist, dass geringe Mengen an PI-*b*-PEO zur Bildung von größeren Clustern führen würde, hat sich erfüllt und zeigt sich in Abb. 6.13 sowohl in der Rotverschiebung der LSPR durch die Plasmonenkopplung, bei der Zunahme von  $d_H$  und in den TEM-Aufnahmen. Die optischen und strukturellen Daten aus Abbildung 6.13 sind in Tabelle 6.5 dargestellt. Ein energieärmerer Plasmonmodus wird durch Kopplungen der Plasmonen in den Mizellen bei höheren Wellenlängen erkennbar. Je größer die NPC werden, desto ausgeprägter ist dieser energieärmere Plasmonenmodus. Das ist insbesondere bei den AgNPC mit ungefähr doppelt so großen AgNP-Einheiten im Vergleich zu den AuNP zu beobachten (Abb. 6.13 **A**, **B**). Die in der vorliegenden Arbeit für diese Systeme optimierte Saat-Emulsionspolymerisation, die ohne weiteren Zusatz von Emulgatoren funktioniert (für weitere Details siehe Kapitel 8.11), führt zu im TEM sichtbaren Polymerhüllen um die NP und NPC, deren Dicke über die Menge an zur Emulsionspolymerisation zugegebenem Styrol- und Divinylbenzol-Monomer einstellbar ist.

**Tabelle 6.5:** Optische und strukturelle Daten aus Abbildung 6.13 der PI-*b*-PEO eingekapselten Gold- und Silbernanopartikel. Die LSPR-Maxima wurden über UV-VIS Spektroskopie bestimmt. Die intensitätsgewichteten mittleren hydrodynamischen Durchmesser  $d_H$  wurden über DLS-Messungen ermittelt. Die NP pro Mizelle (Kapitel A.2 Abb. A.6) und der Durchmesser der NPC-Systeme (Kapitel A.2 Abb. A.7) wurden über die TEM Aufnahmen ermittelt. Ab einem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis von 1:30 ist keine einfache Bestimmung der NP pro Mizelle wegen starker Überlagerung der NP möglich.

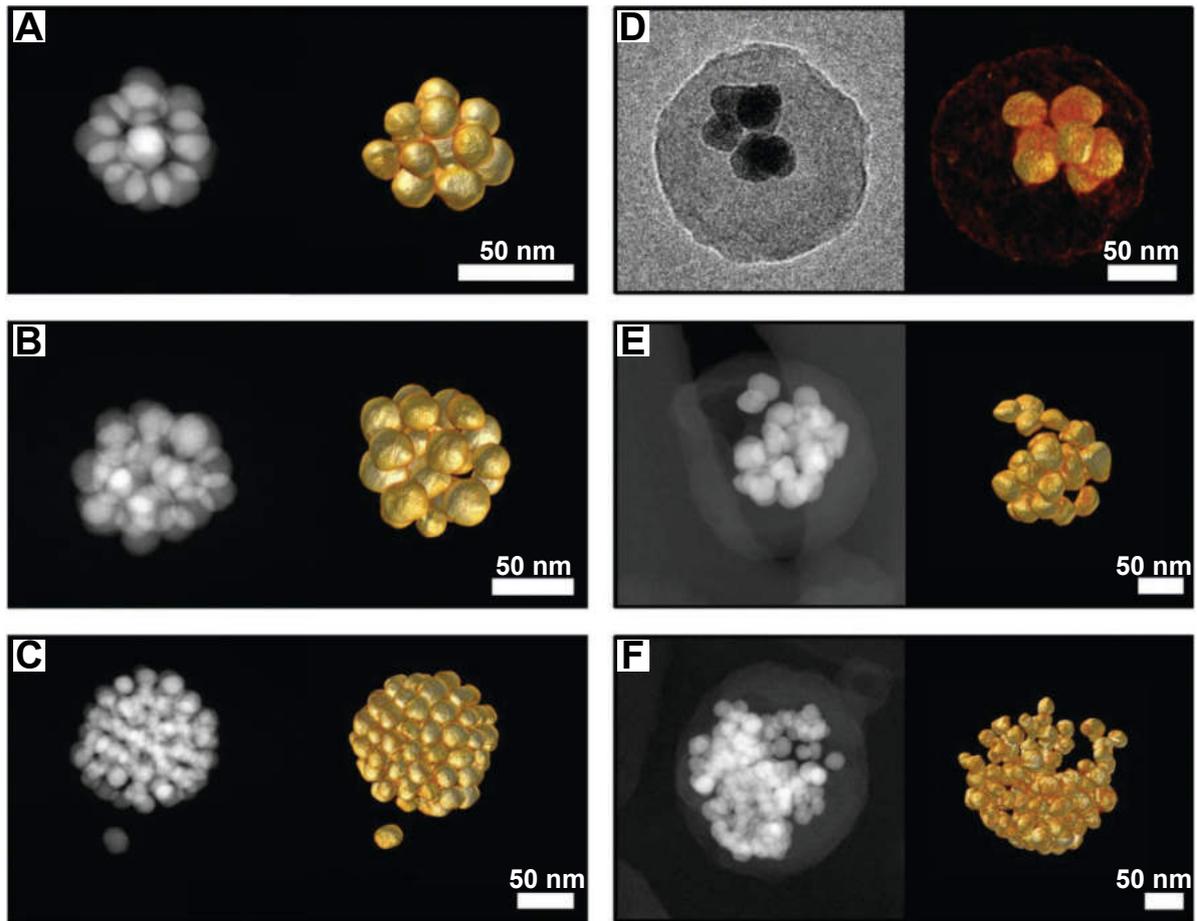
$\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) [\text{nm}^{-2}]$	1.2	0.30	0.15	0.10	0.050
PI- <i>b</i> -PEO:PI-DETA	1:2.5	1:10	1:20	1:30	1:60
Goldnanopartikel					
LSPR $\lambda_{max}$ [nm]	528	531	534	539	552
$d_H$ , DLS [nm]	$112 \pm 45$	$124 \pm 58$	$168 \pm 68$	$186 \pm 73$	$286 \pm 121$
$d$ , TEM [nm]	$34 \pm 3$	$42 \pm 9$	$70 \pm 10$	$70 \pm 15$	$120 \pm 20$
NP pro Mizelle	1.2	2.1	3.6	-	-
Silbernanopartikel					
LSPR $\lambda_{max}$ [nm]	426	439	441	470	487
$d_H$ , DLS [nm]	$171 \pm 73$	$203 \pm 86$	$198 \pm 42$	$259 \pm 54$	$303 \pm 66$
$d$ , TEM [nm]	$85 \pm 8$	$88 \pm 8$	$100 \pm 10$	$130 \pm 20$	$170 \pm 40$
NP pro Mizelle	1.2	1.4	2.4	-	-

Die Auftragung der LSPR  $\lambda_{max}$  Wellenlänge und den Durchmessern  $d_H$  und  $d_{TEM}$  aus Abbildung 6.13 und Tabelle 6.5 gegen  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO})$  in Abbildung 6.14 zeigt, dass es ab einer Oberflächenbelegung  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) < 0.3 \text{ nm}^{-2}$  zu einer signifikanten NP-Clusterbildung sowohl bei AuNP ( $\approx 20 \text{ nm}$ ) als auch AgNP ( $\approx 40 \text{ nm}$ ) kommt. Die Berechnung der für eine signifikante Aggregation von NP nötigen PI-*b*-PEO Stoffmenge über  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO})$  bietet damit potentiell mehr Informationen über die Assemblierung und eine universellere und praktischere Herangehensweise an die Initiierung einer Assemblierung, als die über das Verhältnis von PI-*b*-PEO zu NP, da diese in Bezug auf die Reproduzierbarkeit auf eine NP-Größe beschränkt ist.



**Abbildung 6.14:** Auftragung der LSPR  $\lambda_{max}$  Wellenlänge und den Durchmessern  $d_H$  und  $d_{TEM}$  aus Abbildung 6.13 und Tabelle 6.5 gegen die PI-*b*-PEO Oberflächenbelegung  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO})$ .

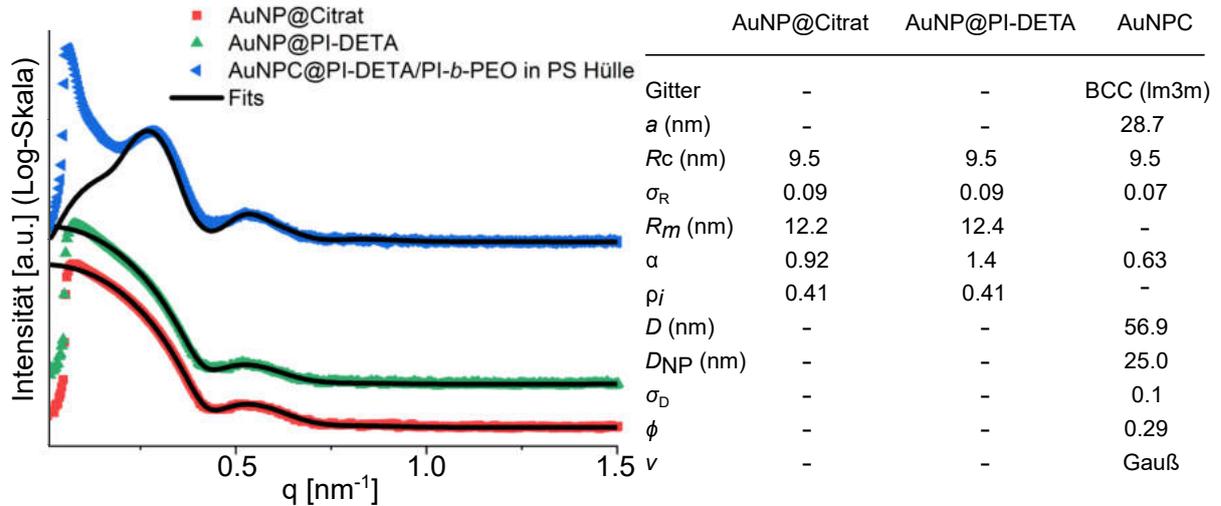
Die Auswertung dieser komplexen Strukturen mit konventioneller TEM, bei der 2D-Aufnahmen für 3D-Strukturen erhalten werden, ergibt wenig zuverlässige Informationen über die 3D-Struktur der NPC. Daher wurden die NPC mithilfe von HAADF-STEM und TEM Elektronentomografie untersucht. Die HAADF-STEM Aufnahmen und elektronentomografischen 3D-Rekonstruktionen sind in Abbildung 6.15 dargestellt. Einem Abflachen oder einer Verformung der NPC durch den Kontakt mit der Trägerschicht während der Probenpräparation wurde entgegengewirkt, indem das TEM-Grid unter Kryobedingungen gefriergetrocknet wurde (für weitere Details siehe Kapitel 8.2.3). Diese Analyse bestätigte, dass die NPC eine quasi-sphärische Form aufweisen. Des Weiteren erlaubt diese Analyse eine Approximation an den durchschnittlichen interpartikulären Abstand.



**Abbildung 6.15:** HAADF-STEM Aufnahmen (jeweils links) und Elektronentomografie Rekonstruktionen (jeweils rechts) von eingekapselten Gold- (**A-C**) und Silber-NPC (**D-F**). Die 3D-Rekonstruktion erlaubt die Bestimmung der Anzahl an NP pro Cluster: **A:** 14, **B:** 24, **C:** 113 | 1, **D:** 6, **E:** 31, **F:** 152. Die Maßstabsleisten betragen 50 nm. Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die Definition des interpartikulären Abstandes entspricht hier dem Abstand zwischen zwei Kanten eines Paares von NP. Der kleinste Abstand wurde über Schnitte der 3D-Rekonstruktion bestimmt und beträgt im Durchschnitt  $3 \pm 1$  nm für sowohl Ag- als auch AuNPC. Dieser Abstand wurde mithilfe von SAXS Messungen und einer am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg entwickelten Methode zur Analyse der SAXS-Messungen von nanoskaligem Material an großen AuNPC ( $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.050 \text{ nm}^{-2}$ ) überprüft.<sup>[244,245]</sup> Die großen AuNPC wurden verwendet, da die Untersuchung von größeren Clustern eine deutlich höhere Anzahl an Elementarzellen miteinbezieht und so validere Informationen über die Struktur erhalten werden können. Die Bestimmung des durchschnittlichen interpartikulären Abstands der AuNP von der Mitte eines NP zur Mitte des

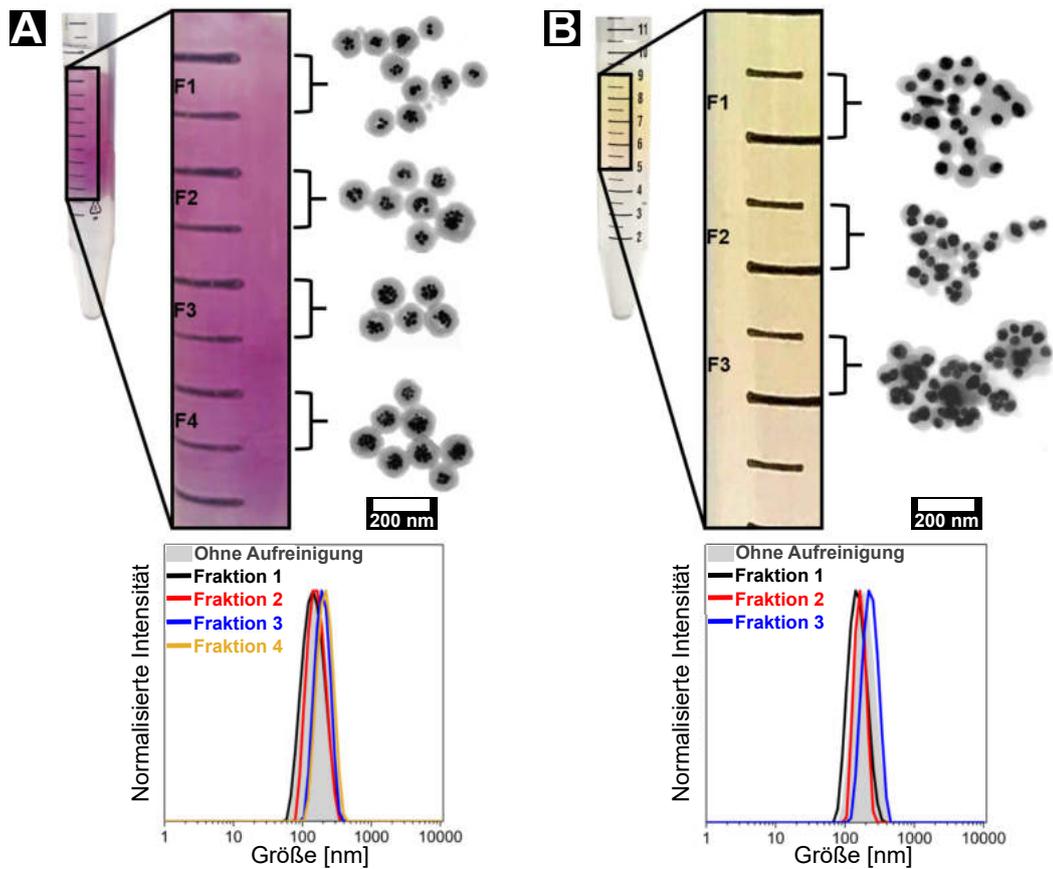
nächsten Nachbar-NP im BCC Gitter in den NPC ergeben im Rahmen des unten stehenden Fits der SAXS-Kurven einen Abstand von  $25 \pm 3$  nm und einen Kern-Radius von  $9.5 \pm 1$  nm (Abbildung 6.16). Das bedeutet, dass der mittlere Abstand der NP-Oberfläche zur NP-Oberfläche des nächsten Nachbarn im Durchschnitt  $25 \text{ nm} - (2 \cdot 9.5 \text{ nm}) = 6$  nm beträgt. Über die Addition der Varianzen ergibt sich dabei eine Standardabweichung von ca. 12 %, d.h. der mittlere Abstand der AuNP-Oberflächen entspricht anhand dieser SAXS-Methode  $6 \pm 1$  nm.



**Abbildung 6.16:** Auftragung und Vergleich der SAXS-Kurven von AuNP@Citrat, AuNP@PI-DETA und AuNPC ( $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.050 \text{ nm}^{-2}$ ) mit dazugehörigen Fits nach Referenzen<sup>[244,245]</sup>. In der Tabelle sind der Gittertyp, die Gitterkonstante  $a$ , der Partikel(kern)radius  $R_c$ , Standardabweichung des Partikelradius (Polydispersität)  $\sigma_R$ , totaler Partikelradius  $R_m$ , Dichteprofil-Exponent  $\alpha$ , Hülle/Kern-Streulängenverhältnis  $\rho_i$ , Domänengröße  $D$ , Abstand NP-NP (Mitte)  $D_{NP}$ , Standardabweichung des NP-NP Abstands  $\sigma_D$ , berechneter Volumenanteil  $\phi$  und der Peak-Formparameter  $\nu$  der Auswertung dargestellt.

Die Bestimmung der NP-NP Abstände ergibt bei der Elektronentomografie bei Ag- und AuNPC unterschiedlicher Clustergröße im Mittel  $3 \pm 1$  nm und bei SAXS bei größeren AuNPC ( $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.050 \text{ nm}^{-2}$ )  $6 \pm 1$  nm. Auf der einen Seite handelt es sich bei SAXS um ein Kollektiv-Verfahren, d.h. das der Abstandswert im Vergleich zur Elektronentomografie über eine erheblich größere Anzahl an NPC gemittelt wurde, allerdings basiert die SAXS-Analyse auf einem Fit mit der Annahme, dass es sich bei den AuNP um perfekte Sphären handelt, die sich in einem idealen kubisch-raumzentrierten Gitter (BCC-Gitter) anordnen. Dass diese Annahmen nicht vollkommen zutreffen ist in Abbildung 6.15 zu sehen. Auf der anderen Seite ist die hier verwendete Elektronentomografie

ein bildgebendes Verfahren mit hoher Auflösung mit der die NP-Abstände relativ genau, allerdings eher stichprobenartig, ermittelt werden können. Obgleich diese Einschränkungen vorliegen, erklärt ein durchschnittlicher Abstand zwischen 3 und 6 nm die relativ geringe Rotverschiebung der LSPR der präparierten AuNPC aus Abbildung 6.13 A. Der Vergleich der Plasmonenkopplung der synthetisierten AuNPC zu der aus Abbildung 4.7 A in Kapitel 4.2.3 weist darauf hin, dass ein interpartikulärer Abstand zwischen 3 und 6 nm bei 20 nm AuNP zu einer ähnlichen Plasmonenkopplung und zu einer vergleichbaren Rotverschiebung der LSPR führt. Die Abstandsmessungen deuten dennoch daraufhin, dass es zur Ausbildung von NP-Abständen in den NPC kommt, die in einem Größenbereich liegen, die die Interferenz der elektronischen Nahfelder und somit die Hotspotsausbildung ermöglichen. Zur Ausbildung von ausgeprägten Hotspots mit hoher elektrischer Feldstärke für eine potentielle SERS-Anwendung muss der mittlere NP-Abstand jedoch weiter verringert werden. Dies kann über die Variation der PI-DETA Länge und dem (teilweisen) Ligandenaustausch mit verhältnismäßig kurzen Raman-Reportern (siehe Kapitel 6.3) realisiert werden, da dies die Dicke der Ligandenhülle der einzelnen NP verringert. Die hier vorgestellte Einkapselungsmethode zeigt deutliche Vorteile und Fortschritte gegenüber anderen Einkapselungs- und Assemblierungsmethoden von plasmonischen NP, bei denen die Plasmonenkopplung durch noch größere NP-Abstände beschränkt ist, keine Größenkontrolle über den für biologische Anwendungen interessanten Größenbereich vorliegt, eine Funktionalisierung der Systeme schwer oder nicht möglich ist und/oder kein ausreichender Schutz der NPC vorhanden ist (Kapitel 6.2.3).<sup>[191,192,200,204,208,246]</sup> Ein weiterer Vorteil ist, dass die hier vorgestellte Methode auf verschiedene NP-Größen, -Formen und -Zusammensetzungen angewendet werden kann. Ein potentieller Nachteil ist allerdings, dass die Breite der Größenverteilung nicht präzise eingestellt oder vorhergesagt werden kann, da die Selbstassemblierung zwar zur Ausbildung von thermodynamischen Minimumstrukturen führt, aber kinetische Effekte während der Selbstassemblierung in einem dynamischen System (Flüssigkeitsstrom mit Turbulenzen) auftreten.<sup>[247]</sup> Die Standardzentrifugation der Proben erlaubt die Entfernung von großen Aggregaten oder leeren Mizellen und organische Verunreinigungen wie unreaktiertem Monomer nach der Emulsionspolymerisation, aber die Größenverteilung der Probe kann dadurch nicht signifikant eingengt werden. Eine Möglichkeit die Größenverteilung postsynthetisch einzuengen, bestimmte Clustergrößen zu separieren und die Proben gleichzeitig aufzureinigen ist die Durchführung einer kontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung. 6.17).



**Abbildung 6.17:** Aufreinigung und Größenseparation von eingekapselten Gold- (A) und Silber-NPC (B) durch eine kontinuierliche Dichtezentrifugation. Die TEM-Aufnahmen und DLS-Messungen entsprechen den markierten Fraktionen (F) und  $d_H$  der nicht aufgereinigten Proben sind in grau hinterlegt. A und B wurden beide mit  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.15 \text{ nm}^{-2}$  bzw. einem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis von 1:20 präpariert. Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

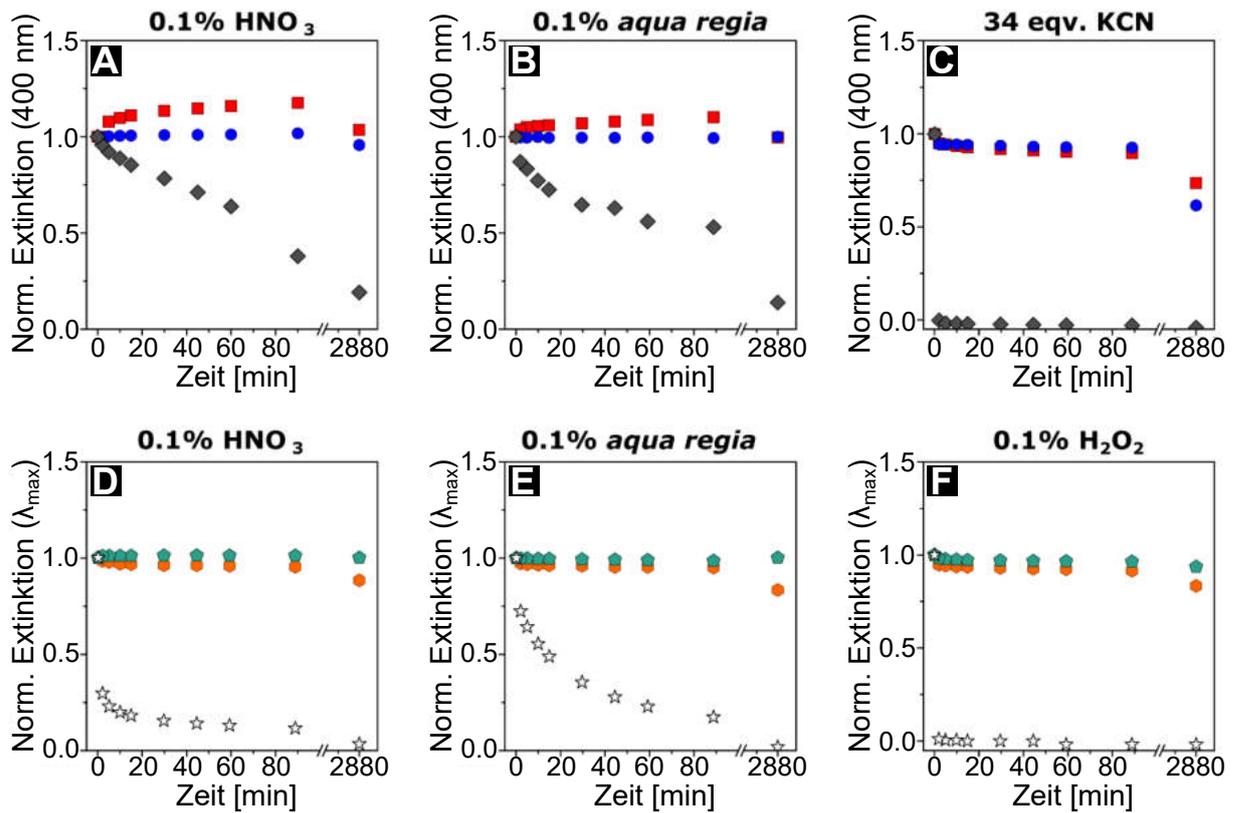
In Abbildung 6.17 ist zu sehen, dass die kontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation genutzt werden kann, um die Größenverteilung auf eine gewünschte Breite einzustellen. Es können ebenfalls einzeln-verkapselte NP, die im Rahmen der Zielsetzung dieser Arbeit nicht gebraucht werden oder andere gewünschte Clustergrößen separiert bzw. abgetrennt werden. Ein Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass sie nur auf kleine Volumina (bis zu 500  $\mu\text{L}$ ) angewendet werden kann. Das bedeutet, dass die NPC nach der Synthese aufkonzentriert werden müssen. Ein weiterer Nachteil ist der relativ zeitaufwendige Extraktions- und Dialyse-Schritt, der nötig ist, um das Glycerin des Gradientenmediums zu entfernen. Eine simple Aufreinigung der Fraktionen über Standardzentrifugation oder über Zentrifugationsfilter führte zur Präzipitation und großen Verlusten der NPC und

macht den schonenden Dialyseschritt notwendig.

### 6.2.3 Stabilität der Nanopartikelcluster

Die Polystyrolhülle der NPC dient als schützende Schicht gegenüber oxidierenden Spezies und potentieller Signalkontamination bei SERS-Anwendung und zur Sicherstellung von hoher Biokompatibilität, Stabilität in physiologischem Medium und damit verbunden hoher Zellaufnahme. Die Untersuchung der Emulsionspolymerisation hat zusammengefasst folgende empirisch erfassten, präparativen Voraussetzungen für die reproduzierbare Ausbildung einer gleichmäßigen und kompakten Polystyrolhülle um die NPC ergeben: stabilisiertes THF ohne Peroxide, Entfernung des THF im Vakuum bei 60°C, Inertgasatmosphäre für eine effiziente Polymerisation ohne Sauerstoffeinfluss, ein Verhältnis von 1:10 der Monomere *p*-DVB und Styrol, ein Überschuss an Radikalinitiator VA44, kein Zusatz von Emulgatoren zur Monomertropfenstabilisierung oder kurzkettigen Alkoholen zur Reduzierung der kritischen Mizellenkonzentration der Emulgatoren<sup>[248,249]</sup> und relativ milde Reaktionsbedingungen bei 60°C für 3 Stunden bei moderater Rührgeschwindigkeit (für weitere Details siehe Kapitel 8.11). Die Stabilität der unter diesen Voraussetzungen hergestellten Polymerschicht von Gold- und Silber-NPC wurde anschließend vor und nach der Polymerisation unter stark oxidierenden Bedingungen untersucht. Die Schutzwirkung der Polymerhülle ist besonders relevant für die AgNPC, da die Freisetzung von Ag<sup>+</sup>-Ionen für die Zelltoxizität von AgNP verantwortlich gemacht wird (siehe Kapitel 4.3.3). Die Stabilitätstest von AuNP wurden in 0.1 Vol.-% Salpetersäure, 0.1 Vol.-% *aqua regia* und 34 Äquivalenten Kaliumcyanid pro Goldatom durchgeführt. Salpetersäure ist zwar nicht fähig metallisches Gold aufzulösen, aber es stellt ein Test mit hoher Ionenstärke zur Untersuchung von Präzipitation dar, wie es bei AuNP@Citrat bei solchen Bedingungen zu beobachten ist. Die entsprechenden Tests von AgNP wurden in 0.1 Vol.-% Salpetersäure, 0.1 Vol.-% *aqua regia* und 0.1 Vol.-% Wasserstoffperoxid durchgeführt. Die Abbildung 6.18 fasst die Ergebnisse dieser Tests zusammen. Die dazugehörigen Spektren sind im Anhang in Abbildung A.8 (AuNP) und A.9 (AgNP) dargestellt. Abbildung 6.18 zeigt ein deutlich differenzierbares Verhalten der eingekapselten und geschützten NP-Systeme im Vergleich zu den Citrat stabilisierten NP. Es ist zu erkennen, dass alle eingekapselten NP-Systeme über mindestens 24 Stunden stabil bleiben, wohingegen die NP@Citrat schnell oxidiert werden oder präzipitieren. Als ein Extremtest wurden die Au- und Ag-NPC in 10 Vol.-% *aqua regia* inkubiert. Sogar in diesem aggressiven Medium, zeigen die NPC eine außerordentliche Resistenz innerhalb von 24 Stunden im Gegensatz zu den NP@Citrat,

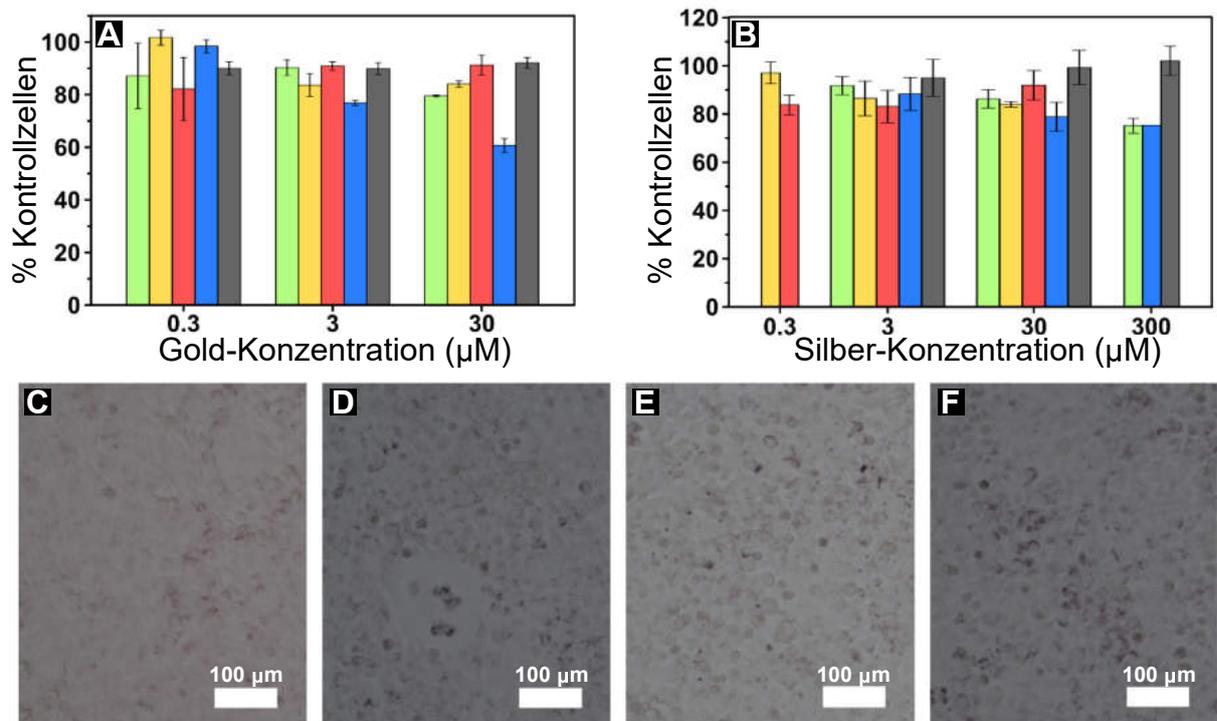
die innerhalb weniger Sekunden vollständig oxidiert werden, wie der Abbildung A.10 zu entnehmen ist. Diese Stabilität der NPC gegenüber oxidierenden Spezies stellt einen wichtigen Vorteil dieser Einkapselungsstrategie dar und macht die eingekapselten NPC zu vielversprechenden Kandidaten für lang andauernde *in-vivo* Anwendungen plasmonischer NP.



**Abbildung 6.18:** A-C: Zeitlicher Ablauf der Extinktion bei 400 nm aus der UV-VIS Spektroskopie Stabilitätsanalyse von AuNP@Citrat (graue Diamanten), einzeln-eingekapselten AuNP (rote Quadrate,  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 1.2 \text{ nm}^{-2}$ ) und eingekapselten AuNPC (blaue Kreise,  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.10 \text{ nm}^{-2}$ ) in **A** 0.1 Vol.-% Salpetersäure, **B** 0.1 Vol.-% *aqua regia* und **C**: 34 Äquivalenten Kaliumcyanid pro Goldatom. **D-F**: Zeitlicher Ablauf der Extinktion bei LSPR  $\lambda_{max}$  [230] aus der UV-VIS Spektroskopie Stabilitätsanalyse von AgNP@Citrat (weiße Sterne), einzeln-eingekapselten AgNP (orange Sechsecke,  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 1.2 \text{ nm}^{-2}$ ) und eingekapselten AgNPC (grüne Fünfecke,  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.10 \text{ nm}^{-2}$ ) in **D**: 0.1 Vol.-% Salpetersäure, **E**: 0.1 Vol.-% *aqua regia* und **F**: 0.1 Vol.-% Wasserstoffperoxid. Die dazugehörigen Spektren sind im Anhang in Abbildung A.8 (AuNP) und A.9 (AgNP) dargestellt. Adapted with license from [65] Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

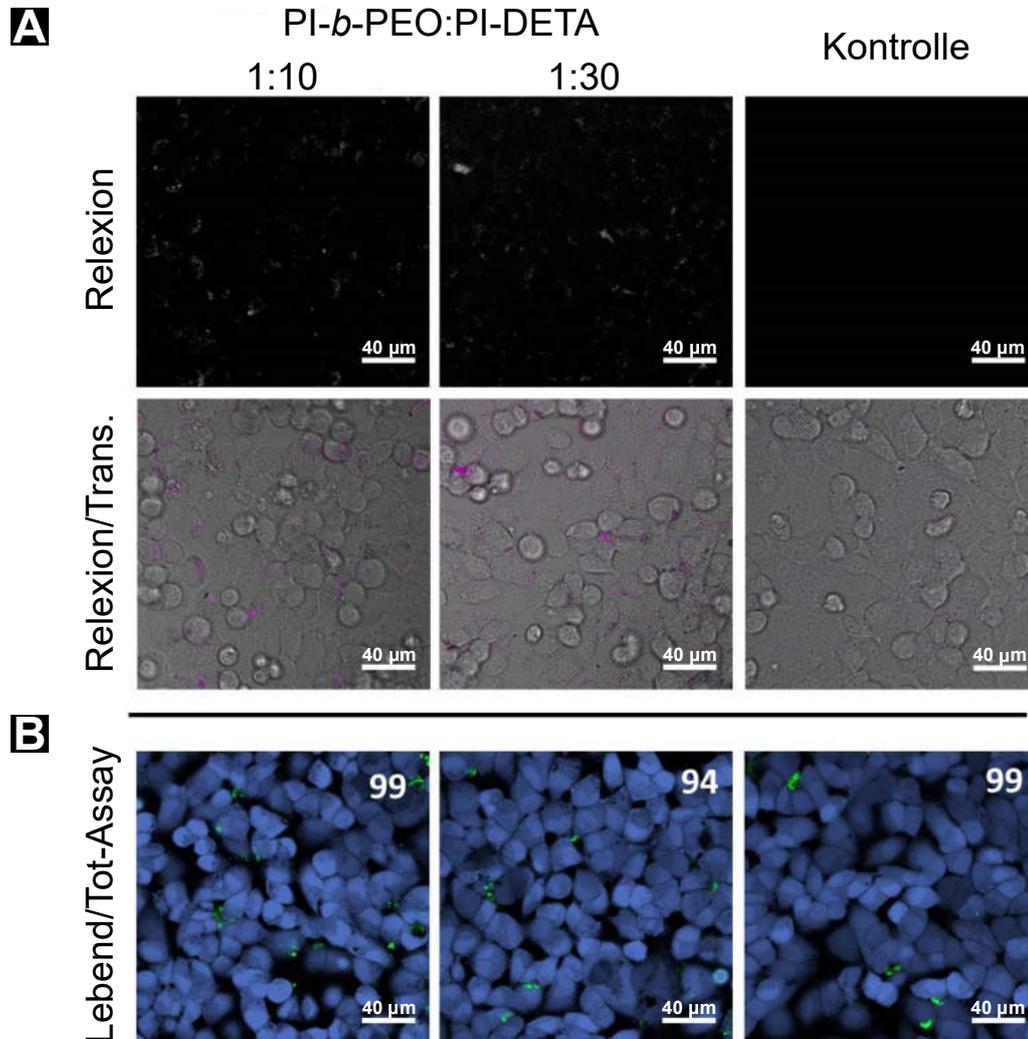
### 6.2.4 Zellaufnahme und Zellviabilität

Die in Kapitel 6.2.2 dargestellten NP-Systeme wurden im Hinblick auf eine potentielle *in-vivo* Anwendung schließlich auf ihre *in-vitro* Stabilität und Biokompatibilität in Harz eingebetteten und fixierten Säugetierzellen mithilfe von TEM und dem MTT-Test untersucht. Der MTT-Test ist ein auf der Reduktion des farbigen Tetrazoliumsalses basierender Test für die metabolische Aktivität von Säugetierzellen, die stark mit der Zellviabilität und entsprechend mit der Zytotoxizität von aufgenommenen Substanzen korreliert.<sup>[250]</sup> Es wurden drei verschiedene, etablierte Zelllinien getestet. Die HeLa- und A549-Zellen wurde als kanzeröse Zelllinien und die humanen dermalen Fibroblasten (HDF) wurden als gesunde Primärzelllinie ausgewählt und untersucht. Die Ergebnisse der metabolischen Aktivität nach Zellaufnahme der NP-Systeme in die HeLa-Zellen ist im Vergleich zu den Kontrollzellen in Prozent in Abbildung 6.19 dargestellt.



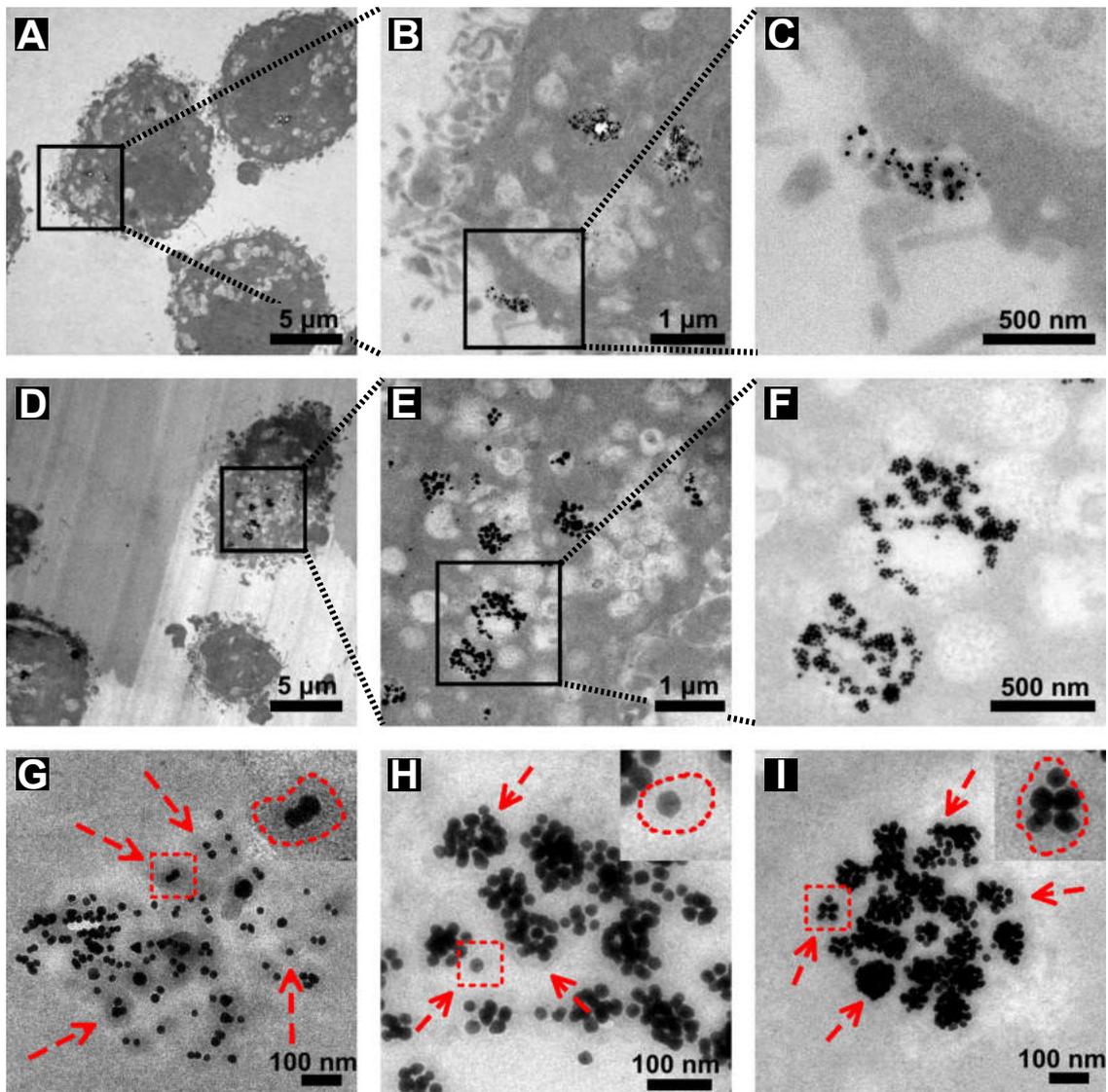
**Abbildung 6.19:** Metabolische Aktivität aus dem MTT-Test der mit **A:** AuNP und **B:** AgNP und verschiedenen Konzentrationen inkubierten HeLa Zellen in Prozent der Kontrollzellen.  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO})[\text{nm}^{-2}]$ : 1.2 (grün), 0.30 (gelb), 0.15 (rot), 0.10 (blau) und NP@Citrat (grau). **C-F:** Lichtmikroskop-Aufnahmen von HeLa-Zellen mit  $30 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  inkubierten AuNP mit  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO})[\text{nm}^{-2}]$ : 1.2 (**C**), 0.30 (**D**), 0.15 (**E**), 0.10 (**F**). Maßstabsleisten: 100 µm. Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die MTT-Ergebnisse für die A549- und die HDF-Zellen sind im Anhang in Abbildungen A.11 und A.12 dargestellt. Die kanzerösen HeLa- und A549-Zellen zeigten ab einer NP-Konzentration von über  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  eine Abnahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen.



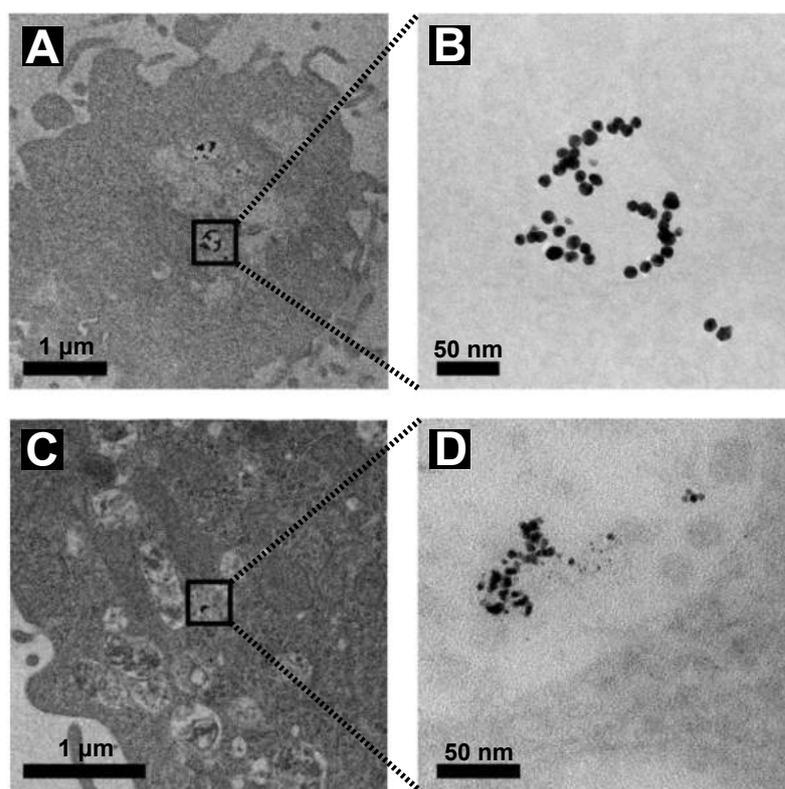
**Abbildung 6.20:** Konfokale Relexionsmikroskopie Aufnahmen von HeLa Zellen, die mit NPC mit einem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis von 1:10 ( $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.30 \text{ nm}^{-2}$ ) und 1:30 ( $0.10 \text{ nm}^{-2}$ ) für 48 Stunden bei einer Konzentration von  $30 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  inkubiert wurden. **A:** Aufnahmen der Reflexion in schwarz-weiß (oben) und der mit der Transmission kombinierten Aufnahmen (NPC rosa farbkodiert). **B:** Lebend-/Totfärbung der gleichen Bedingungen wie oben beschrieben. Die Zellen wurden mit Fluorophoren gefärbt, die lebend (blau), apoptotisch (grün) und nekrotisch (rot) markieren. Der Mittelwert der Anzahl der lebenden Zellen pro Sichtfeld von zwei Bildern ist in der rechten Ecke angezeigt. Maßstabsleisten:  $40 \mu\text{m}$ . *Adapted with license from*<sup>[65]</sup> *Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.*

Eine Abnahme der metabolischen Aktivität wird im Rahmen der MTT-Tests generell mit einer reduzierten Zellviabilität interpretiert, obwohl die NP-induzierte Zytotoxizität durch optische Mikroskopie bei den gezeigten Konzentrationen ausgeschlossen werden kann (Abb. 6.19 **C-F**, Abb. A.11 c und Abb. 6.20). In Abbildung 6.20 **B** wird deutlich, dass weder bei den NP-inkubierten, noch bei den Kontrollzellen nekrotischen Zellen (rot) vorhanden sind. Apoptotische Zellen (grün) sind in ähnlicher, geringer Anzahl bei den NP-inkubierten- und den Kontrollzellen vorhanden. Die Vermutung liegt nahe, dass die vermehrte Zellaufnahme der NPC bei höheren NPC-Konzentrationen in die proliferativen, kanzerösen Zellen einen hemmenden Effekt auf die metabolische Aktivität hat, wie der Vergleich zu den Kontrollzellen zeigt (Abb. 6.19 **A,B** und Abb. A.11 a,b). In der Literatur gibt es einige Berichte darüber, dass der MTT-Test mit einigen chemischen Substanzen oder Nanopartikeln zu einer Über- oder Unterbewertung der Zellviabilität durch eine Substanz- oder NP-induzierte Veränderung des Zellmetabolismus führen kann und die metabolische Aktivität in diesen Fällen fälschlicherweise direkt mit der Zellviabilität korreliert wird.<sup>[251,252]</sup> Die metabolische Aktivität und die Zellviabilität (bei direkter Korrelation) der weniger aktiven, gesunden HDF-Zellen weist bei bis zu  $30 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  NP-Inkubation sowohl für Gold als auch für Silber nahezu gleiche Niveaus im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (Abb. A.12 a,b), obwohl die zelluläre Aufnahme der NPC offensichtlich sehr hoch ist (Abb. A.12 c). Dieser Umstand unterstützt die oben genannte Vermutung, dass die metabolische Aktivität der proliferativen, kanzerösen Zellen durch die hohe NPC-Aufnahme gehemmt wird, aber nicht die der gesunden Zellen. Insgesamt wird die Zellviabilität auch bei direkter Korrelation in allen Fällen nicht signifikant durch die Aufnahme der eingekapselten NPC beeinflusst. Eine weitere wichtige Beobachtung, die auf den oben gezeigten Lichtmikroskop-Aufnahmen bereits zu erkennen ist, ist, dass alle getesteten eingekapselten NP-Systeme über Endozytose in hohen Mengen in die drei Zelllinien aufgenommen werden. Die *in-vitro* Stabilität verschiedener, aufgenommener AuNP-Systeme in die HeLa Zellen wurde zusätzlich mithilfe von TEM analysiert (Abbildung 6.21). Die TEM-Analyse der Zellaufnahme der Silbernanopartikel ist im Anhang in Abbildung A.13 dargestellt. Die TEM-Analysen bestätigen die hohe Zellaufnahme der NPC und die intrazelluläre Stabilität nach der Internalisierung der NPC in endosomale Vesikel. Obwohl innerhalb der endosomalen Vesikel für gewöhnlich ungefähr ein pH-Wert von 4.5 - 5.5 vorhanden ist, ist keine Zersetzung der Polymerhülle oder Destabilisierung der NPC sichtbar.



**Abbildung 6.21:** A-F: Repräsentative TEM-Aufnahmen mit verschiedenen Vergrößerungen, die die zelluläre Aufnahme von AuNPC mit einem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis von A-C: 1:10 und D-F: 1:20 in HeLa Zellen zeigen. Die schwarzen Boxen zeigen den Vergrößerungsbereich der jeweils links stehenden Aufnahme. G-I: zeigen TEM-Aufnahmen mit höherer Auflösung in denen die Polymerhülle sichtbar ist (rote Pfeile). Die gestrichelten Boxen kennzeichnen die Vergrößerung des Insetts und die gestrichelten roten Linien kennzeichnen die Polymerhülle. *Adapted with license from*<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die Schutzwirkung der Polymerhülle der NPC wird deutlicher, wenn eine analoge TEM Analyse der internalisierten, ungeschützten NP@Citrat betrachtet wird (Abbildung 6.22).



**Abbildung 6.22:** A-D: Repräsentative TEM-Aufnahmen mit unterschiedlichen Vergrößerungen, die die Zellaufnahme von AuNP@Citrat (A,B) und AgNP@Citrat (C,D) in HeLa Zellen zeigen. Eine schützende Polymerhülle ist nicht vorhanden und die Silber-NP zeigen deutliche Anzeichen einer Zersetzung. Maßstabsleisten: A,C 1 µm und B,D 50 nm. Adapted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Abbildung 6.22 zeigt deutliche Anzeichen einer Zersetzung der in die HeLa-Zellen aufgenommenen Silber-NP@Citrat und weist auf die Bedeutung einer Schutzhülle der NPC für eine potentielle *in-vivo* Anwendung hin.

Die hier entwickelte Dreischritt-Einkapselungsmethode stellt eine reproduzierbare Methode zur Präparation von kontrolliert assemblierten, kolloidal stabilen, geschützten und biokompatiblen plasmonischen Nanopartikelclustern dar. Dabei wurde die Methode erfolgreich auf Au- und AgNP unterschiedlicher Größe angewandt. Die Variation der PI-*b*-PEO Oberflächenbelegung bzw. des PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnisses erlaubt eine Einstellung der NPC-Größen bis zu 200 nm. Die Polymerhülle erwies sich als effektive Barriere gegenüber oxidierenden Spezies oder hohen Ionenstärken. Eine hohe Zellaufnahme und hohe Biokompatibilität der synthetisierten NPC wurde durch Inkubation in 3 verschiedenen Zelllinien gezeigt. TEM-Analysen der zellulär aufgenommenen NPC demonstrierten die in-

trazelluläre Stabilität sogar in endosomalen Vesikeln. Diese Methode ist ein großer Schritt zur Herstellung von *in-vivo* SERS-Plattformen. Die Implementierung geeigneter Raman-Reporter in die potentiellen Hotspots der mit dieser Methode hergestellten NPC ist das Thema des folgenden Kapitels.

### 6.3 Oberflächenverstärkte Ramanstreuung

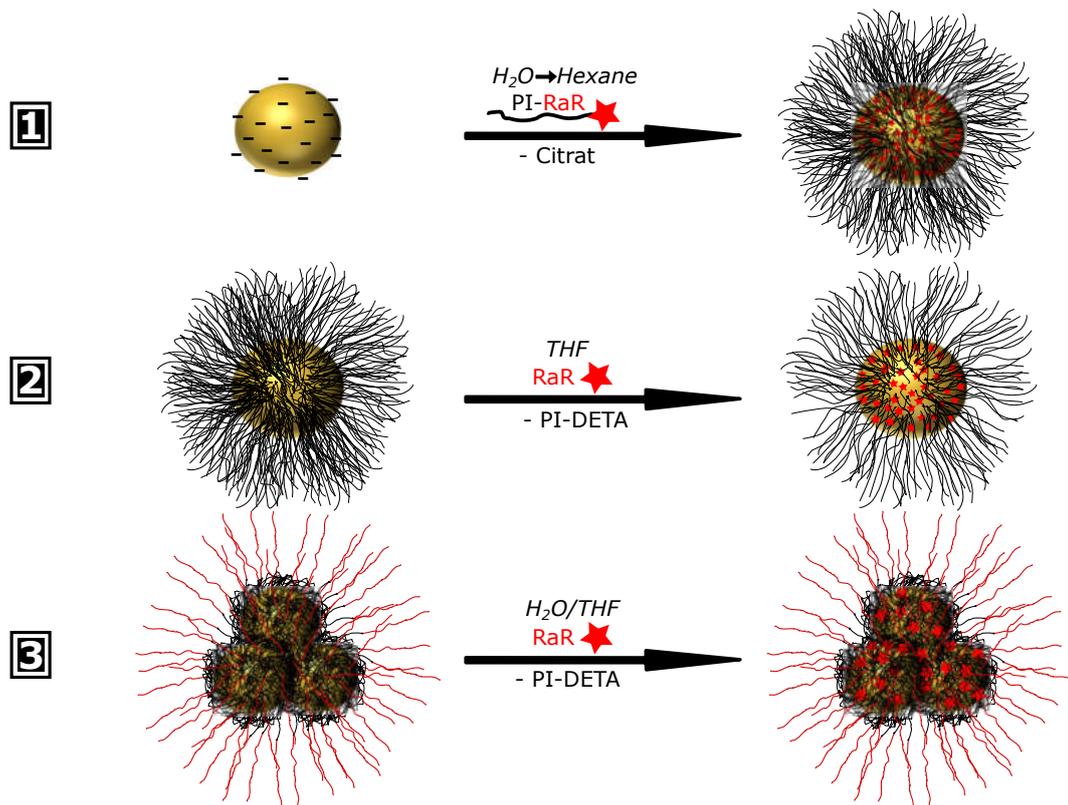
Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Alex Müller im Rahmen seiner Projektstudie im Masterstudiengang Nanowissenschaften, mit Elena Felgenhauer im Rahmen ihres Wahlpflichtpraktikums im Masterstudiengang Chemie und Tobias Kartenkamp im Rahmen seiner Bachelorarbeit im Studiengang Chemie ausgearbeitet. Die Themen und Arbeitspläne wurden in allen Fällen von mir erstellt. Herr Müller und Frau Felgenhauer führten unter meiner Aufsicht einen Teil der praktischen Laborarbeiten im Rahmen der statistischen Versuchsplanung durch. Die Datenauswertung anhand der Statistik-Software *Cornerstone* erfolgte durch mich und alle weiteren Datenauswertungen erfolgten unter meiner Aufsicht. Herr Kartenkamp führte ebenfalls einen Teil der praktischen Laborarbeiten im Rahmen der Raman-Reporter Codierung<sup>3</sup> von AuNP vor der Assemblierung und mizellaren Einkapselung unter meiner Aufsicht durch und die Datenauswertung erfolgte ebenso unter meiner Aufsicht. Die ersten Raman-Messungen im Zusammenhang mit der statistischen Versuchsplanung wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L.M. Liz-Marzán (CICbiomaGUNE, San Sebastian) durchgeführt. Alle weiteren Raman-Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Svenja Patjens aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alf Mews am Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt. Alle weiteren Laborarbeiten, Messungen und Ergebnisse dieses Kapitels wurden ohne Kooperation von mir durchgeführt und ausgearbeitet.

Die Methode zur Herstellung von plasmonischen NPC aus Kapitel 6.2 bietet grundsätzlich drei mögliche Herangehensweisen an die Implementierung von Raman-Reportern in die Hotspots zwischen den NP. Diese drei potentiellen Raman-Codierungsmethoden sind in Abbildung 6.23 dargestellt. Die erste Strategie (Abb. 6.23 1) ist der Phasentransfer mit einem Polymerliganden, der eine Raman-aktive und im Ramanspektrum gut differenzierbare Ankergruppe aufweist, über die die Polymerliganden an die NP-Oberfläche binden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie eine hohe Oberflächenbelegung mit Raman-Reportern gewährleistet, die die Lokalisation der Reporter in potentiellen Hotspots wahrscheinlich macht. Außerdem kann durch diese Strategie grundsätzlich eine hohe kolloidale Stabilität der NP in unpolarem Medium gewährleistet werden. Auf der anderen Seite stehen einige Nachteile, die diese Strategie zu einer ungeeigneten Methode machen, um intensive Hotspots in den NPC zu generieren. Der erste und wichtigste Punkt ist, dass die

---

<sup>3</sup>Codierung = Beschichtung mit „Raman-Codes“/Raman-Reportern (Ursprung: engl. Literatur)

hohe kolloidale Stabilität und die hohe Oberflächenbelegung mit vergleichbaren Polymerliganden wie bei den NPC aus Kapitel 6.2 dazu führt, dass analog eine kollabierte Ligandenhülle entsteht, die die NP im aggregierten Zustand auf Abstand hält und so die Hotspot-Bildung beeinträchtigt. Trotz alledem wurde diese Strategie untersucht, indem 4-Mercaptophenyllessigsäure über eine CDI-Aktivierung der Carbonsäuregruppe an eine Aminogruppe des PI-DETA gekoppelt wurde (für weitere Details siehe Kapitel 8.6). Diese Methode scheiterte allerdings in diesem Fall schon am Phasentransfer, der auch mit der Unterstützung von Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)<sup>[253]</sup> weder im sauren, neutralen oder im alkalischen Medium noch in einem Hexan/Wasser oder Wasser/Chloroform-Zweiphasensystem ohne Präzipitation oder Aggregation funktionierte (siehe Anhang Abb. A.14). Auch wenn es sich hierbei um einen speziellen Einzelfall handelt, wurde Strategie 1 (Abb. 6.23) aufgrund des hohen Synthesaufwands und der geringen Erfolgsaussichten nicht weiter verfolgt.



**Abbildung 6.23:** Schematische Darstellung der potentiellen Raman-Codierungsmethoden. RaR bedeutet Raman-Reporter. **1:** Phasentransfer mit PI-RaR. **2:** Austausch PI-DETA durch RaR in unpolarem Medium. **3:** RaR Zugabe zu assemblierten NPC in Wasser vor der Emulsionspolymerisation und Migration der hydrophoben RaR in den hydrophoben Mizellkern.

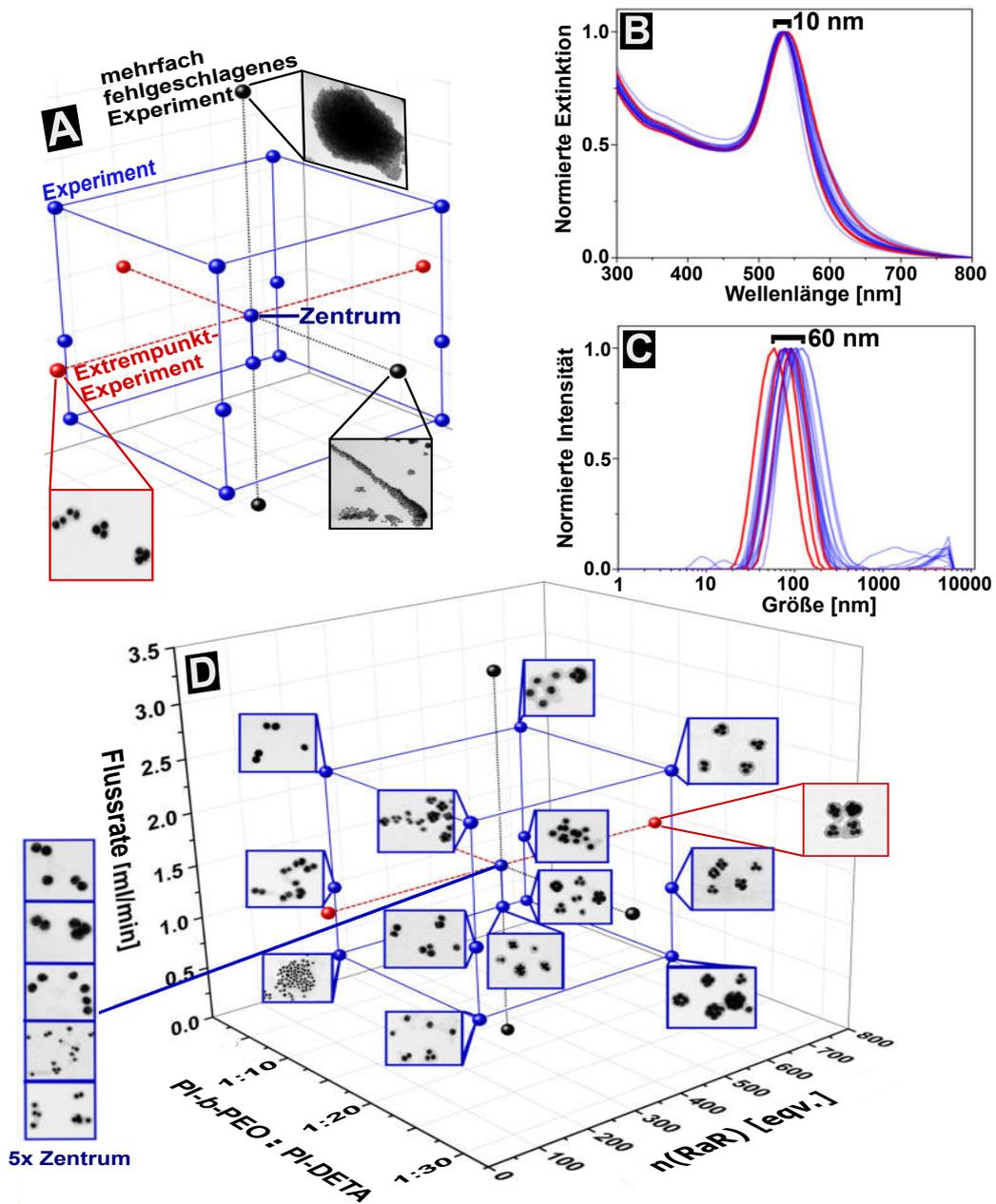
Die Strategie **2** aus Abbildung 6.23 beinhaltet einen Standardphasentransfer mit PI-DETA in ein unpolares, organisches Medium und einen anschließenden Ligandenaustausch mit den in diesem Medium löslichen Raman-Reportern. Diese Reporter müssen mindestens eine Thiol-Gruppe aufweisen, damit eine höhere Affinität zur Goldoberfläche im Vergleich zu den Aminogruppen des PI-DETA gewährleistet wird. Dabei werden die AuNP@PI-DETA für eine bestimmte Zeit zusammen mit den gelösten Raman-Reportern im unpolaren Medium inkubiert und der Ligandenaustausch von PI-DETA mit Raman-Reportern ermöglicht. Anschließend werden die NP in der oben stehenden Standardprozedur zu NPC verkapselt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Oberflächenbelegung der Polymerliganden bei erfolgreichem Ligandenaustausch reduziert wird und eine Annäherung der NP im Mittel unter 3 nm (vgl. Kapitel 6.2.2) durch eine weniger dichte kollabierte Ligandenhülle potentiell möglich ist. Des Weiteren können die NP mit vielen verschiedenen kommerziell erwerbbaaren Raman-Reportern ohne hohen Aufwand codiert werden. Die Reduzierung der Oberflächenbelegung mit PI-DETA birgt allerdings das Risiko der Destabilisierung und Aggregation der NP vor der Assemblierung und dem damit einhergehenden, eventuellen Verlust der Größen- und Formkontrolle sowie der Reproduzierbarkeit der Assemblierung und Einkapselung.

Die Strategie **3** aus Abbildung 6.23 beinhaltet die Standardprozedur der Assemblierung und Einkapselung aus Kapitel 6.2 ohne die Saat-Emulsionspolymerisation, die im Anschluss an die Codierung durchgeführt werden kann. Das bedeutet, dass NPC einer gewünschten Größe assembliert werden, aber noch keine schützende Polystyrolhülle generiert wird. Zu diesen potentiell noch zugänglichen NPC in Wasser werden die hydrophoben Raman-Reporter im Überschuss in THF hinzugefügt. Die Idee der Strategie ist, dass die hydrophoben Raman-Reporter, analog zu den Monomeren Styrol und DVB bei der Emulsionspolymerisation, in den hydrophoben NPC-Mizellkern migrieren und an die NP-Oberfläche adsorbieren bzw. PI-DETA durch die Raman-Reporter teilweise ersetzt wird. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass wie bei Methode **2** eine Vielzahl an Raman-Reportern genutzt werden kann. Des Weiteren wird die Größen- und Formkontrolle sowie die Reproduzierbarkeit der Assemblierung und Einkapselung potentiell nicht so stark beeinflusst, wie bei Methode **2**, da die NPC für die Codierung bereits vorgefertigt wurden. Bei ausreichender Zugänglichkeit der NP-Oberfläche für Raman-Reporter bedeutet das auch, dass solche NPC-Systeme potentiell für einen sog. „*label-free*“ Nachweis von Drogen<sup>[254]</sup>, Sprengstoff<sup>[255]</sup> oder biologischen Markern<sup>[256]</sup> eingesetzt werden könnten. Aus sterischer Sicht ist es allerdings eher unwahrscheinlich, dass die Raman-Reporter in die

abgeschirmten Hotspots der NPC migrieren können. Im Folgenden wird zuerst die Strategie **3** aus Abbildung 6.23 im Rahmen einer statistischen Versuchsplanung evaluiert, um die optimalen Einstellungen der potentiell einflussreichsten Parameter wie Clustergröße (PI-*b*-PEO:PI-DETA), Raman-Reporter-Äquivalente pro NP und der Fließgeschwindigkeiten der THF- und Wasserphase bei der Assemblierung der NP im Hinblick auf die Erzeugung eines (intensiven) SERS-Signal zu bestimmen (Kapitel 6.3.1). Das darauffolgende Kapitel 6.3.2 untersucht die Strategie **2** mit gleicher Zielsetzung auf die optimalen Einstellungen der Raman-Reporter-Äquivalente pro NP, der Inkubationszeit mit Raman-Reportern in unpolarem Medium und der Erhaltung der Größen- und Formkontrolle sowie der Reproduzierbarkeit der NPC-Präparation.

### 6.3.1 Codierung nach der NP-Assemblierung

Zur Untersuchung der Raman-Reporter Codierung nach der NPC-Assemblierung wurde ein Experimentdesign mit drei Faktoren ausgewählt, welches einige Vorversuche, die den Versuchsraum bereits einschränken, miteinbeziehen kann (*Inclusions*, D-optimales Design).<sup>[257]</sup> Weitere Details zur statistischen Versuchsplanung sind in Kapitel 8.10 zu finden. Neben der vorrangigen Zielsetzung und der qualitativen Untersuchung der Implementierung von Raman-Reportern in die Hotspots der NPC, soll untersucht werden, inwiefern das PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis, die Flussgeschwindigkeit der THF- und Wasserphase bei der Assemblierung mithilfe des Mikrofluidikaufbaus (Abbildung 6.11) und die Zugabe an Raman-Reporter pro NP ( $n(\text{RaR})$  [eqv.]) Einfluss auf das potentielle SERS-Signal haben. Als Raman-Reporter wurde Biphenyl-4,4'-dithiol ((BPDT)) aufgrund der Hydrophobizität, der hohen Affinität der Thiole zur Goldoberfläche, der hohen Raman-Aktivität und der NP-verknüpfenden Eigenschaften durch zwei funktionelle Gruppen verwendet und untersucht.<sup>[199,258,259]</sup> Die Flussrate bezieht sich auf die Geschwindigkeit in  $\text{mL min}^{-1}$  mit der die AuNP@PI-DETA/THF-Dispersion mit Wasser vermischt wird. Die Flussrate der Wasser-Mikrofluidikspritzen wurde entsprechend angepasst, sodass die gesamte Flussrate immer konstant  $16 \text{ mL min}^{-1}$  betrug. Der Versuchsraum der statistischen Versuchsplanung ist in Abbildung 6.24 dargestellt. Dabei wurde ein randomisierter Experimenteplan von 24 Experimenten durch die Statistiksoftware *Cornerstone* erstellt, wobei 5 dieser Experimente das Zentrumsexperiment darstellen. Die Parameter der 24 Experimente sind tabellarisch in Kapitel 8.10 dargestellt.

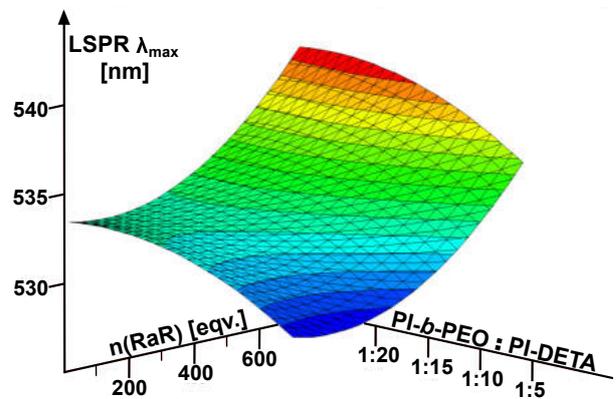


**Abbildung 6.24:** A: Schematische Darstellung des dreifaktoriellen Versuchsraum (Auftragung analog zu D) mit D-optimalem Experimentdesign mit TEM-Beispielen gescheiterter und Extrempunktexperimenten. B: UV-VIS Spektren aller erfolgreichen Synthesen (21 von 24 Experimenten, Farbcodierung wie in A) mit Bereich der LSPR  $\lambda_{max}$  (schwarzer Balken). C: DLS-Messungen aller erfolgreichen Synthesen mit Bereich des  $d_{H,max}$  (schwarzer Balken). D: Darstellung des Versuchsraums mit entsprechenden TEM-Aufnahmen der Experimente. Der Bereich der THF-Flussrate beträgt  $0.74$  bis  $3.3 \text{ mL min}^{-1}$ . Der Bereich der Zugabe des Raman-Reporters Biphenyl-4,4'-dithiol beträgt 2 bis 708 eqv. pro NP. Der Bereich des PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnisses beträgt 1:3 bis 1:30. Schwarze Kugeln zeigen mehrfach fehlgeschlagene Experimente. Rote Kugeln markieren die erfolgreichen Extrempunkt-Experimente und blaue Kugeln die Standardexperimente des Versuchsraums.

3 der 24 Experimente konnten auch nach mehrmaligem Wiederholen nicht erfolgreich durchgeführt werden (schwarze Kugeln). Es zeigte sich, dass eine niedrige THF-Flussrate von  $0.74 \text{ mL min}^{-1}$ , genauso wie eine hohe THF-Flussrate  $3.3 \text{ mL min}^{-1}$  bei konstanter Gesamtflussrate von  $16 \text{ mL min}^{-1}$  nicht zu einer kontrollierten Assemblierung mit definierten NPC führt. Des Weiteren zeigten die mehrfachen Versuche der Raman-Reporter-Codierung größerer NPC mit einem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis von kleiner als 1:25, dass solche NPC durch diese Codierungsstrategie nach der Assemblierung signifikant destabilisiert werden und die Codierung in der NPC-Größenordnung nicht ohne beträchtliche Verluste durch Präzipitation durchgeführt werden kann. Das bedeutet, dass die Codierung nach der Assemblierung der NP auf kleinere NPC mit weniger potentiellen Hotspots beschränkt ist ( $d_{H,max}$  : 58 bis 118 nm, Abbildung 6.24 C). Insgesamt zeigen die LSPR  $\lambda_{max}$ -Werte der 21 erfolgreichen Experimente (Abbildung 6.24 B) eine relativ geringe Verschiebung von 8 bis 18 nm im Vergleich zu den AuNP@Citrat ( $\lambda_{max} = 521 \text{ nm}$ ), das ist eine maximale LSPR-Differenz von 10 nm innerhalb des Versuchsraums. Die geringe LSPR-Verschiebung deutet auf eine geringe Plasmonenkopplung und auf keine Verringerung des NP-NP-Abstands im Vergleich zu den uncodierten NPC aus Kapitel 6.2.2 hin.

Nach der Durchführung der Experimente und der Datenerfassung wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt, um die beobachteten Zielgrößen (hier:  $d_{H,max}$  ; LSPR  $\lambda_{max}$  und SERS-Intensität) als Funktion der signifikanten Einflussfaktoren (hier: Flussrate, PI-*b*-PEO:PI-DETA,  $n(\text{RaR})$ ) anzunähern. Mithilfe spezieller Statistiksoftware wird durch die Regressionsanalyse ein Regressionspolynom aufgestellt, dessen Terme z.B. durch eine Varianzanalyse (*ANOVA*) auf ihre Signifikanz analysiert werden.<sup>4</sup> Auf der Grundlage dieser Signifi-

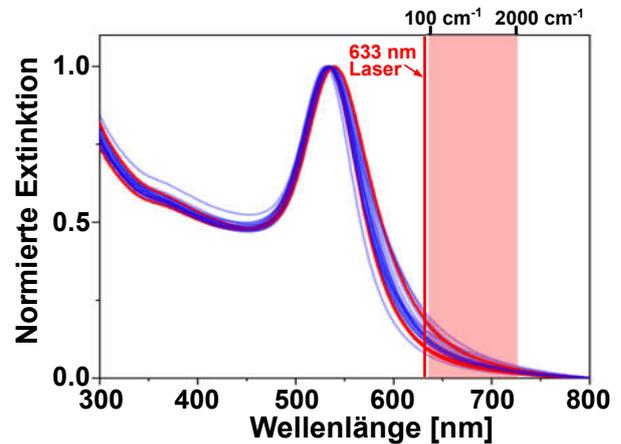
kanzauswertung kann eine Vorhersage der LSPR  $\lambda_{max}$  mit moderater Güte des Fits der Zielgrößenfunktion von  $R_{adj}^2 = 0.837$  aufgestellt werden. Diese Vorhersage ist grafisch in Abbildung 6.25 und weitere Informationen sind im Anhang in Abbildung A.15 dargestellt. In Abbildung 6.25 ist zu erkennen, dass eine Reduzierung der PI-*b*-PEO Zugabe



**Abbildung 6.25:** Grafische Darstellung der vorhergesagten  $\lambda_{max}$  als Funktion von  $n(\text{RaR})$  und PI-*b*-PEO:PI-DETA aus der Regressionsanalyse. Weitere Details siehe Abb. A.15.

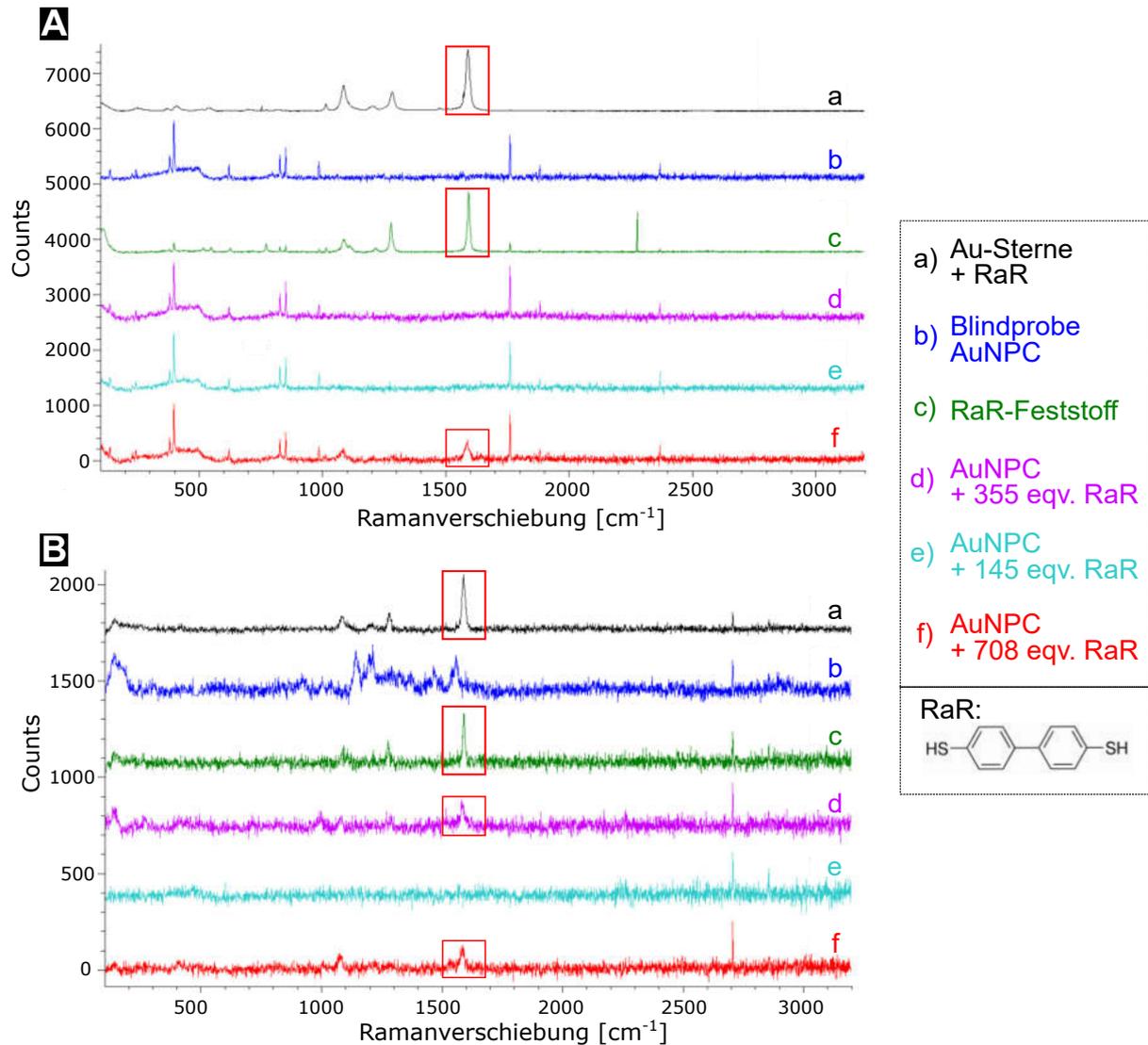
<sup>4</sup>Weiterführende Details sind in z.B. in Referenz<sup>[257]</sup> dargestellt.

und eine Erhöhung der Biphenyl-4,4'-dithiol Zugabe zu einer Rotverschiebung der LSPR führen. Der Anstieg der LSPR im gesamten Vorhersagebereich ist allerdings relativ gering und weist darauf hin, dass der interpartikuläre Abstand nicht signifikant verringert und folglich die Plasmonenkopplung nicht signifikant erhöht wird im Vergleich zu den NPC aus Kapitel 6.2.2. Die Vermutungen liegen nah, dass keine oder nur wenige Thiole an die Metall-Oberflächen adsorbieren und/oder dass die Thiole nur an den äußeren NP-Sphären der NPC adsorbieren und durch sterische Hinderung der kollabierten PI-DETA-Ligandenhülle nicht tiefer in die Cluster eindringen können. Anhand dieser Vermutungen lässt sich der Einfluss von  $n(\text{RaR})$  auf die LSPR durch die Änderung der dielektrischen Umgebung der NP und der daraus resultierenden geringen Rotverschiebung der LSPR erklären. Eine theoretische Extrapolation der LSPR  $\lambda_{max}$  in Abbildung 6.25 zu Werten von  $n(\text{RaR})$  über 1000 Äquivalenten sollte nach dieser Vorhersage zu einer Rotschiebung der LSPR  $\lambda_{max}$  über 550 nm führen. Allerdings zeigte sich, dass Zugaben von  $\geq 1000$  Äquivalenten an Biphenyl-4,4'-dithiol pro NP zur Destabilisierung der mizellaren NPC-Strukturen führen und es zu beträchtlichen NPC-Verlusten durch Präzipitation kommt. Eine Ausdehnung des Versuchsbereichs der Einflussfaktoren, um höhere Werte der Zielgröße der LSPR  $\lambda_{max}$  zu erhalten, ist entsprechend im Rahmen dieser Vorgehensweise nicht möglich. Das bedeutet, dass im Rahmen dieser Codierung keine LSPR-Bande der AuNPC in den Zielbereich der Laseranregungswellenlängen 633 und 785 nm eingestellt werden konnte (siehe Abb. 6.26) und die auf der LSPR-basierenden Oberflächenverstärkung (siehe Kapitel 4.3.1) nicht oder nur sehr schwach vorhanden sein sollte. Die Raman-Messungen zur Bestimmung der Zielgröße der SERS-Intensität ergaben, dass keine der 21 hergestellten NPC ein differenzierbares, vergleichsweise intensives SERS-Spektrum von Biphenyl-4,4'-dithiol zeigen. Die Ramanspektren von 3 ausgewählten AuNPC der statistischen Versuchsplanung sind in Abbildung 6.27 im Vergleich zu BPDT codierten Goldnanosternen nach Referenz<sup>[260]</sup>, einer uncodierten AuNPC-Probe und des BPDT-



**Abbildung 6.26:** UV-VIS Spektren aus Abbildung 6.24. Die rote Linie deutet die Anregungswellenlänge des Lasers bei 633 nm an und der rot-schattierte Bereich deutet den Wellenlängenbereich der inelastischen Streuung ( $100 \text{ cm}^{-1}$  bis  $2000 \text{ cm}^{-1}$ ) an.

Feststoffs dargestellt. Nur die AuNPC mit 708 Äquivalenten an BPDT-Zugabe zeigen bei 785 nm Laserwellenlänge einen Raman-Peak mit geringer Intensität, der der C-C-Streckschwingung des Phenylrings von BPDT bei ca.  $1590\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet werden kann.<sup>[261]</sup>



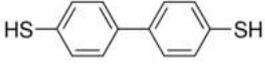
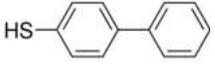
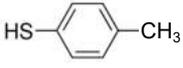
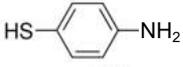
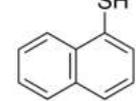
**Abbildung 6.27:** Gemittelte Raman-Spektren eines Tropfens der eingetrockneten Dispersion (oder bei (c) der Feststoff) auf einem Objektträger bei **A:** 785 nm Laserwellenlänge und 1 Sekunde Integrationszeit mit einem 50x Objektiv bei 3 mW Laserleistung und **B:** 633 nm Laserwellenlänge und 1 Sekunde Integrationszeit mit einem 50x Objektiv bei 3 mW Laserleistung. Die Goldnanosterne wurden nach Referenz<sup>[167]</sup> präpariert. Die Au<sup>0</sup>-Konzentration der AuNPC Dispersionen betrug jeweils  $\approx 0.35\text{ mmol L}^{-1}$ . Die roten Kästen kennzeichnen den intensivsten Raman-Peak, der der C-C-Streckschwingung von BPDT bei ca.  $1590\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet werden kann.<sup>[261]</sup>

Bei 633 nm Laserwellenlänge ist der Raman-Peak bei ca.  $1590\text{ cm}^{-1}$  schon bei 355 Äquivalenten an BPDT-Zugabe zu sehen, allerdings weist dieser Peak ebenfalls eine vergleichsweise sehr geringe Intensität auf und keine der codierten AuNPC zeigen ein vollständiges und differenzierbares SERS-Spektrum des BPDT. Die codierten AuNPC ähneln bei beiden Laserwellenlängen der Blindprobe und zeigen wahrscheinlich zum größten Teil die Schwingungen von PI-DETA und Polystyrol. Alles in allem bestätigen die nicht vorhandenen oder nur sehr schwachen BPDT-Ramansignale der hier gezeigten AuNPC sowie die geringe LSPR-Rotverschiebung in den Zielbereich (Abb. 6.26) und der Vergleich zum intensiven BPDT-SERS-Spektrum der Goldnanosternen mit intrinsischen Hotspots, die oben stehende Vermutung, dass die Raman-Reporter mithilfe dieser Strategie nicht in signifikanter Menge in ausgeprägte Hotspots implementiert werden können. Dass diese Codierungsstrategie nicht geeignet ist, zeigte auch die Verwendung anderer Raman-Reporter, wie Benzen-1,4-dithiol oder 4-Aminobenzenthiole (mit 1:20 PI-*b*-PEO:PI-DETA und mit Standardflussrate), weil es in den meisten Fällen schon ab 500 Äquivalenten RaR pro NP zur Destabilisierung der AuNPC kommt, wie im Anhang in Abbildung A.16 dargestellt.

### 6.3.2 Codierung vor der NP-Assemblierung

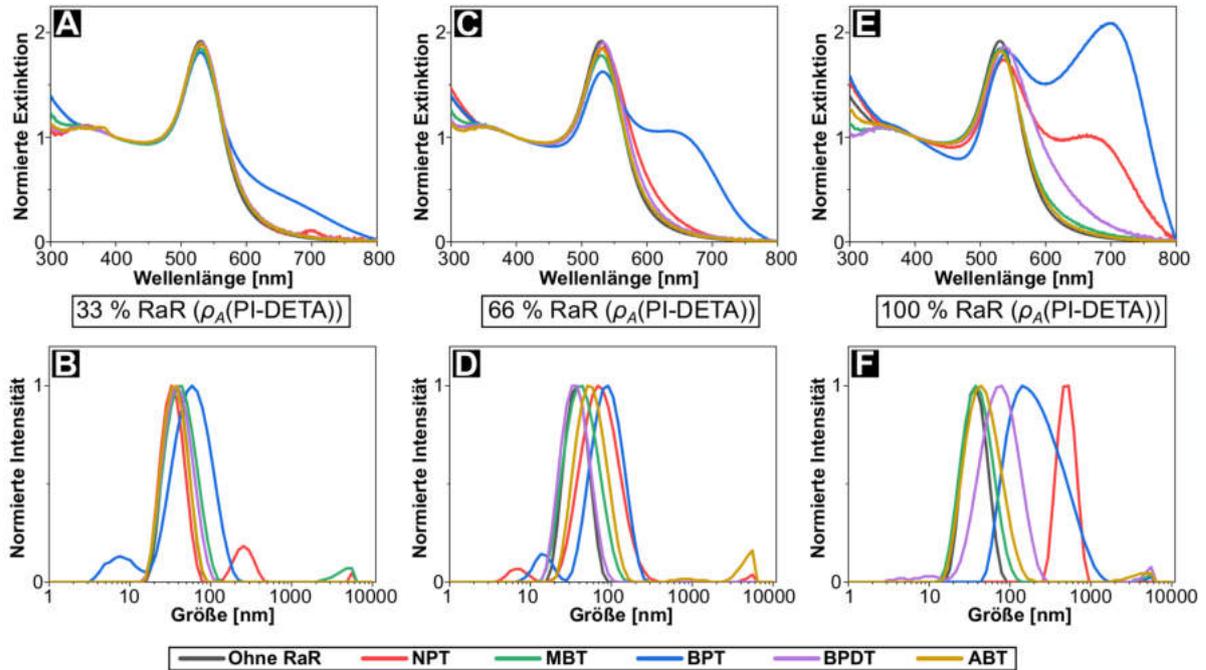
Die Strategie der Codierung mit Raman-aktiven Liganden (**1** in Abb. 6.23) und die der Codierung nach der Assemblierung (**3** in Abb. 6.23) führte zu keiner signifikant ausgeprägteren Plasmonenkopplung und Hotspot-Ausbildung im Vergleich zu den NPC der Standardprozedur ohne Codierung. Im Folgenden soll daher untersucht werden, inwieweit dies mit der Strategie **2** aus Abb. 6.23 möglich ist. Diese Strategie sieht einen Standardphasentransfer mit PI-DETA in Hexan, einen Aufreinigungsschritt und die anschließende Überführung in THF vor. In THF soll der PI-DETA Ligand mit Raman-Reportern, die eine höhere Affinität zur Goldoberfläche aufweisen, teilweise ausgetauscht werden, um einen höheren Codierungsgrad als bei der Strategie **3** erreichen zu können. Dabei muss beachtet werden, dass die kolloidale Stabilität der einzelnen NP@PI-DETA/RaR möglichst erhalten bleibt, um die Reproduzierbarkeit der anschließenden Assemblierung mithilfe von PI-*b*-PEO in Wasser zu gewährleisten. Für diese Strategie wurden insgesamt 5 verschiedene Raman-Reporter getestet, die in Tabelle 6.6 jeweils mit Namen, der in dieser Arbeit genutzten Abkürzung und der Strukturformel dargestellt sind.

**Tabelle 6.6:** Name, Abkürzung und Struktur der genutzten Raman-Reporter.

Raman-Reporter	Abkürzung	Struktur
Biphenyl-4,4'-dithiol	BPDT	
Biphenyl-4-thiol	BPT	
4-Methylbenzenthio	MBT	
4-Aminobenzenthio	ABT	
Naphthalin-1-thiol	NPT	

Zur Ermittlung inwieweit die PI-DETA-Ligandenhülle mit Raman-Reportern codiert werden kann ohne die kolloidale Stabilität negativ zu beeinflussen, das heißt ohne Aggregation zu induzieren, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Es wurden AuNP nach dem Phasentransfer von Hexan in THF überführt und mit verschiedenen Konzentrationen an Raman-Reportern für 20 Stunden unter Lichtausschluss bei niedriger Rührgeschwindigkeit inkubiert. Die RaR-Konzentrationen wurden anhand der PI-DETA Menge pro NP

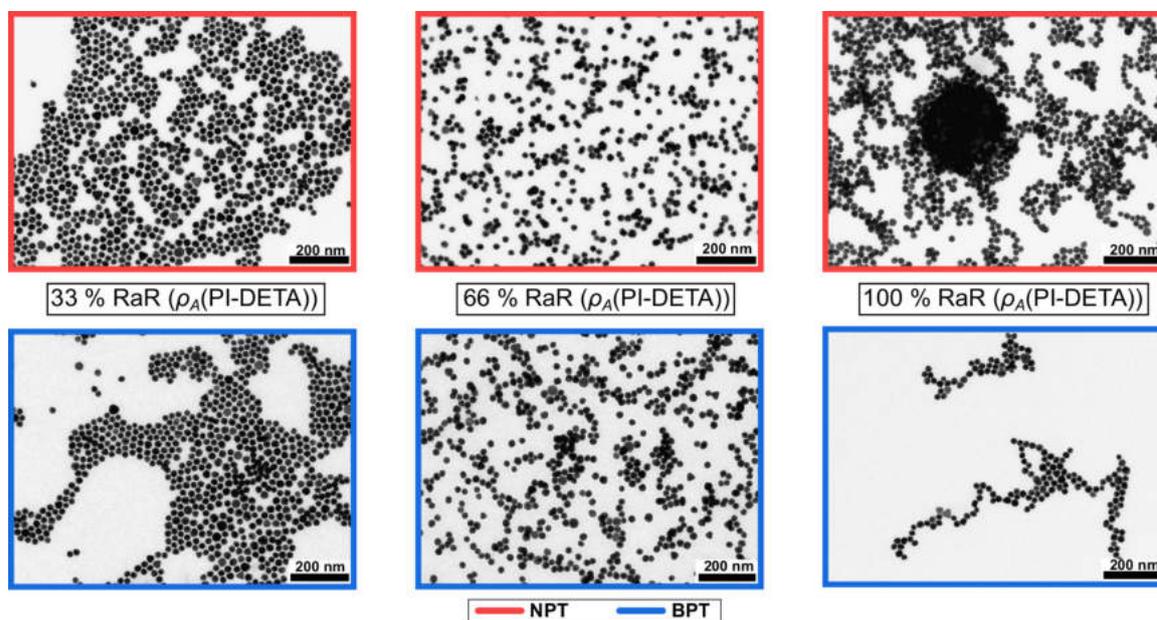
( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) auf 33 %, 66 % und 100 % der RaR-Stoffmenge in Bezug auf die PI-DETA Menge pro NP ausgewählt. Diese Stoffmengenangabe wird im Folgenden als  $x$  % RaR ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) gekennzeichnet. Die optischen Daten dieses Experiments sind in Abbildung 6.28 dargestellt.



**Abbildung 6.28:** Optische Daten nach dem Austausch der PI-DETA Liganden mit **A & B:** 33 % RaR ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ), **C & D:** 66 % RaR ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) und **E & F:** 100 % RaR ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ). **A,C,D:** Normierte UV-VIS-Spektren der AuNP@PI-DETA/RaR. **B,D,F:** Normierte DLS-Messungen der AuNP@PI-DETA/RaR. Das Farbschema ist unten in der Legende dargestellt.

Die optischen Daten des Ligandenaustauschs mit ABT und MBT aus Abbildung 6.28 zeigen weder bei 33 % und 66 % noch bei 100 % RaR ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) signifikante Anzeichen einer Plasmonenkopplung (**A,C,E**) oder Aggregation (**B,D,F**). Je mehr PI-DETA durch BPT (blau) oder NPT (rot) ausgetauscht wird (**A,C,E**), desto ausgeprägter und rotverschobener wird die LSP-Dipolresonanz und desto mehr wird die Anregung von plasmonischen Multipolschwingungen sichtbar, was auf eine starke Plasmonenkopplung und Aggregation der AuNP hinweist. Die DLS-Messungen (Abb. 6.28 **B,D,F**) und eine TEM-Analyse (Abb. 6.29) bestätigen, dass es bei AuNP@PI-DETA/BPT (blau) und AuNP@PI-DETA/NPT (rot) zur Entstehung von Aggregaten während des Ligandenaustauschs kommt. Die TEM-Analyse zeigt außerdem, dass je mehr PI-DETA durch BPT

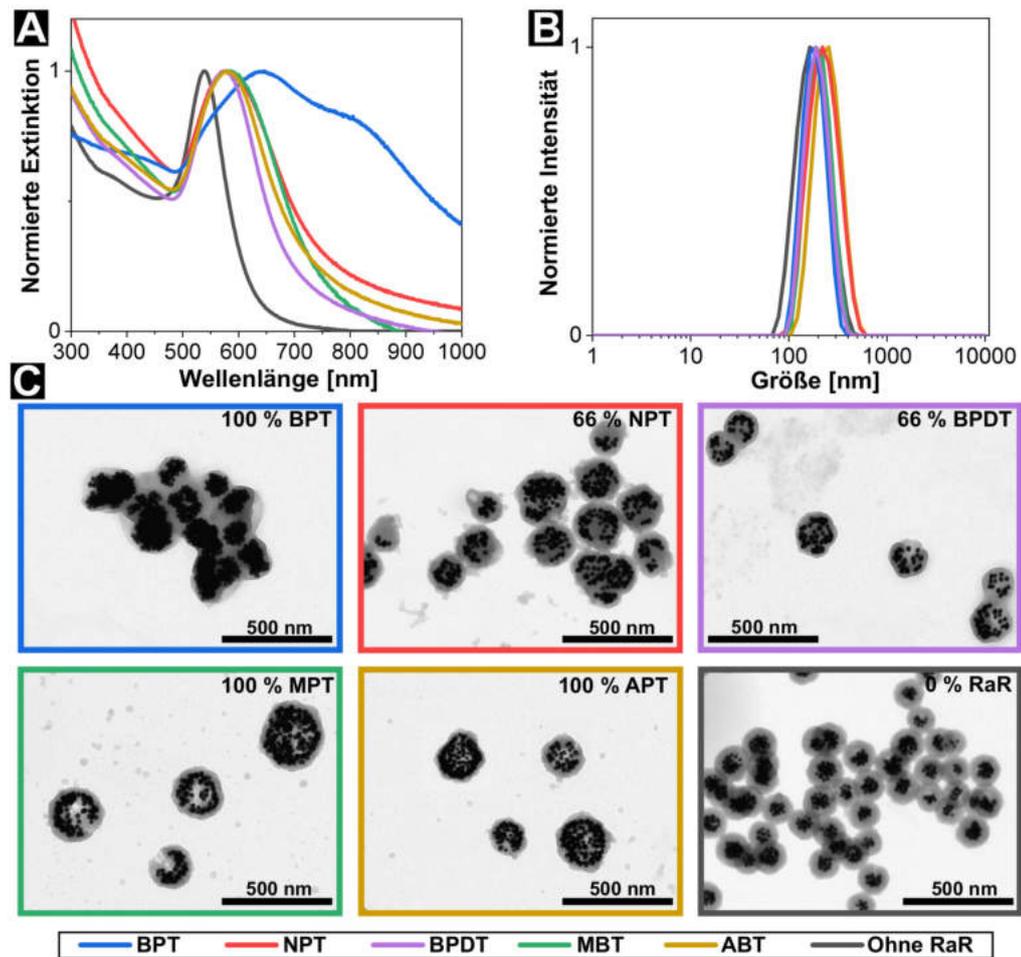
oder NPT ausgetauscht wird, desto größere AuNP-Aggregate werden aufgrund der kolloidalen Destabilisierung gebildet.



**Abbildung 6.29:** Repräsentative TEM-Aufnahmen der AuNP nach dem Ligandenaustausch mit 33 %, 66 % und 100 % BPT (blau) und NPT (rot) ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) aus Abbildung 6.28. Die Maßstabsleisten kennzeichnen 200 nm.

Ein Erklärungsansatz dafür, dass besonders NPT und BPT während des Ligandenaustausches starke Plasmonenkopplung aufweisen, ist, dass die aromatischen Ringe der adsorbierten Verbindungen durch keine Methyl- (MBT), Amino- (ABT) oder weitere Thiolgruppe (BPDT) sterisch abgeschirmt werden und es eventuell über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen von sterisch ungehinderten, auf unterschiedlichen NP adsorbierten Aromaten zu einer deutlichen Verringerung des interpartikulären Abstandes kommt.<sup>[262]</sup> Ein weiterer Erklärungsansatz ist ein unterschiedlicher Bindungswinkel und Volumenbedarf von NPT und BPT auf den NP, die zu einer starken kolloidalen Destabilisierung der NP führen.<sup>[263]</sup> Dass die NP mit einer 33 % BPT Codierung bereits leichte Plasmonenkopplung aufweisen, spricht für letzteres (Abb. 6.28 A,B). Trotz der Voraggregation wurden die mit 100 % Raman-Reporter codierten AuNP nach der 20 stündigen RaR-Inkubation jeweils mit einem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis von 1:30 bei gleichen Bedingungen assembliert und verkapselt. Die Assemblierung und Verkapselung von AuNP mit 100 % NPT und 100 % BDPT waren aufgrund von vollständiger Präzipitation nicht möglich. In diesen Fällen wurden die 66 % RaR ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) codierten AuNP verwendet. Die optischen Daten und repräsentative TEM-Aufnahmen der AuNPC@RaR sind in Abbildung 6.30 dargestellt. Die gemittelten

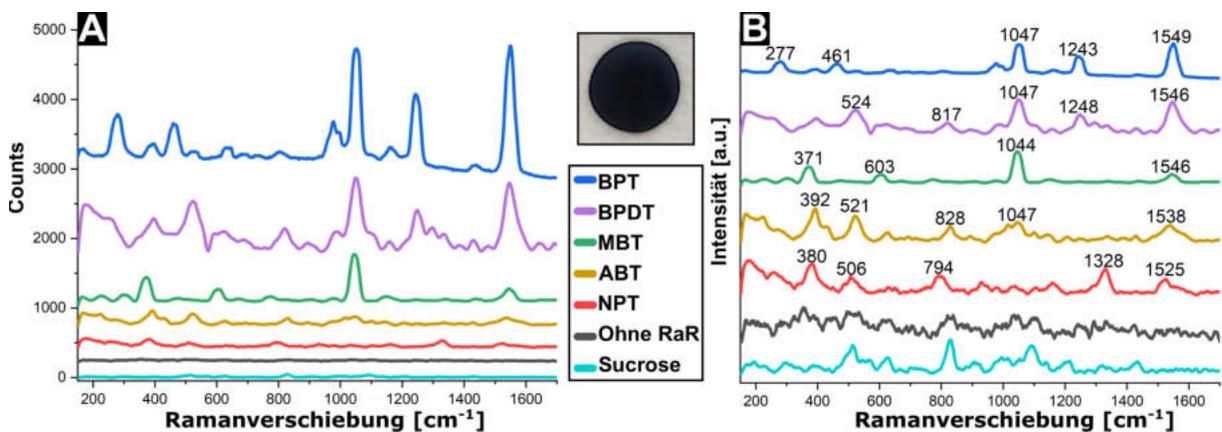
hydrodynamischen Durchmesser  $d_H$  der gezeigten AuNPC liegen im Bereich von ca. 180 - 230 nm. Es ist zu sehen, dass die RaR codierten AuNPC eine deutlich höhere Rotverschiebung der LSPR  $\lambda_{max}$  im Vergleich zu den uncodierten AuNPC aufweisen. Eine sehr starke Plasmonenkopplung weisen besonders die BPT codierten AuNPC auf, deren LSPR Banden einen Wellenlängenbereich von 500 bis 1000 nm abdecken. Die TEM-Aufnahmen der BPT codierten AuNPC zeigen deutlich kompaktere AuNPC, deren interpartikuläre Abstände vermutlich signifikant geringer sind, als die der restlichen codierten AuNPC.



**Abbildung 6.30:** **A:** UV-VIS Spektren ( $\lambda = 300 - 1000$  nm), **B:** DLS-Messungen und **C:** repräsentative TEM-Aufnahmen der mit 0 %, 66 % und 100 % RaR ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) codierte AuNP und mit einem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis von 1:30 (bei Standardflussrate) assemblierten und eingekapselten AuNPC. Die Einkapselung mit 100 % NPT und 100 % BPDT waren aufgrund von vollständiger Präzipitation nicht möglich. Das Farbschema von **A-C** ist unten in der Legende dargestellt.

Die mit NPT, BPDT, MPT und ATP codierten AuNPC weisen im Vergleich zu den BPT codierten und den uncodierten AuNPC eine diffuse Verteilung der NP in den Polymer-

kapseln auf. Die Daten aus Abbildung 6.30 weisen darauf hin, dass die Intensität der potentiell oberflächenverstärkten Raman-Streuung bei den BPT codierten AuNPC wahrscheinlich am höchsten ist. Eine Voraussetzung ist, dass die spezifische Ramanstreuung der jeweiligen Raman-Reporter (durch einen Verstärkungseffekt der AuNP) überhaupt detektiert werden kann. Diese These wurde durch Raman-Messungen überprüft, bei denen die AuNPC-Dispersionen aufkonzentriert, die Extinktion bei 633 nm auf die gleiche optische Dichte und Intensität der Plasmonenbande eingestellt (siehe Anhang Abb. A.17) und mithilfe von Sucrose gleichmäßig eingetrocknet wurden. Die entsprechenden gemittelten Raman-Spektren sind in Abbildung 6.31 dargestellt.



**Abbildung 6.31:** Gemittelte, unnormierte (A) und normierte (B) Raman-Spektren eines Tropfens der eingetrockneten Dispersion aus Abbildung 6.30 auf einem Objektträger bei 633 nm Laserwellenlänge und 1 Sekunde Integrationszeit mit einem 100x Objektiv bei 7 mW Laserleistung. In B ist die Ramanverschiebung [cm<sup>-1</sup>] der intensivsten Peaks der RaR gekennzeichnet. Die optische Dichte der Proben bei 633 nm wurde angeglichen (siehe Abb. A.17). Um den sog. *coffee-ring* Effekt zu verhindern, wurden die AuNPC in einer 200 mmol L<sup>-1</sup> Sucrose-Lösung eingetrocknet (siehe Kasten mittig oben).<sup>[264]</sup> Die Ramanstreuung wurde an verschiedenen Orten der Ablagerung gemessen und die Spektren gemittelt.

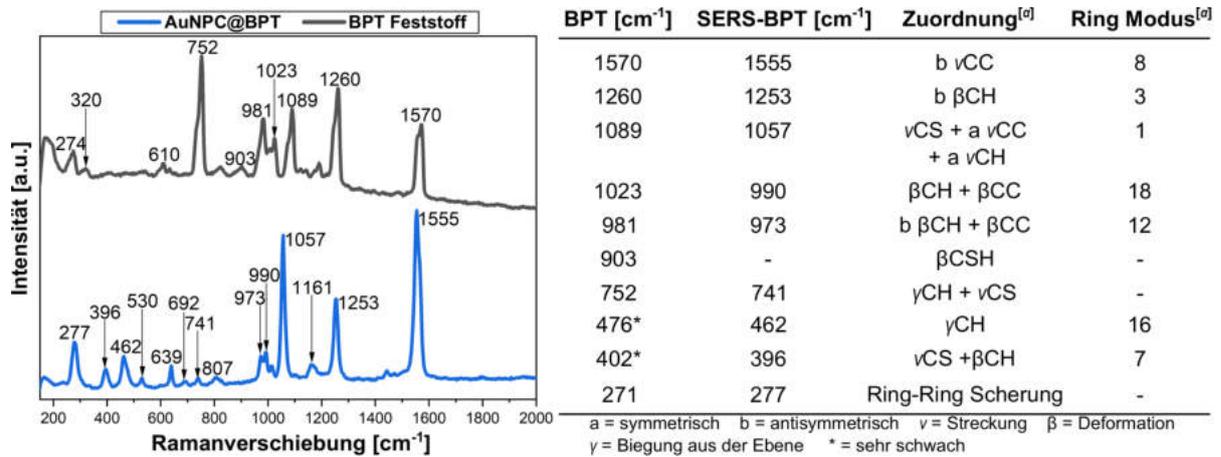
Die Abbildung 6.31 zeigt, dass klar differenzierbare Raman-Spektren der codierten AuNPC erhalten werden. In den normierten Raman-Spektren (Abbildung 6.31 B) sind die ausgeprägtesten Schwingungen mit der entsprechenden Ramanverschiebung [cm<sup>-1</sup>] gekennzeichnet. Die Zuordnung der gekennzeichneten und eindeutig differenzierbaren Schwingungen ist in Tabelle 6.7 dargestellt. Die unnormierten Spektren in Abbildung 6.31 A bestätigen die Vermutung, dass die AuNPC@BPT die höchste Ramanverstärkung aufweisen. AuNPC@ABT und -@NPT weisen im Vergleich die geringsten SERS-Intensitäten auf.

**Tabelle 6.7:** Zuordnung der ausgeprägtesten und eindeutig identifizierbaren Raman-Peaks der AuNPC aus Abbildung 6.31 anhand der Vergleichsspektren der RaR (Anhang Abbildung A.18) und der genannten Referenzen.

	Ramanverschiebung [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Zuordnung)			
<b>BPT</b> <sup>[260,265]</sup>	1549 ( $\nu\text{CC}$ )	1243 ( $\beta\text{CC}$ )	1047 ( $\beta\text{CH}$ )	461 ( $\gamma\text{CH}$ )
<b>BPDT</b> <sup>[199,261]</sup>	1546 ( $\nu\text{CC}$ )	1248 ( $\beta\text{CC}$ )	1047 ( $\beta\text{CH}$ )	817 ( $\gamma\text{CH}$ )
<b>MBT</b> <sup>[260,266]</sup>	1546 ( $\nu\text{CC}$ )	-	1044 ( $\beta\text{CH}$ )	603 ( $\beta/\nu\text{CC} + \nu\text{CS}$ )
<b>ABT</b> <sup>[267]</sup>	1538 ( $\nu\text{CC}$ )	-	1047 ( $\beta\text{CH}$ )	392 ( $\beta\text{CS}$ )
<b>NPT</b> <sup>[260,268]</sup>	1525 ( $\nu\text{CC}$ )	1328 ( $\nu\text{CC} + \beta\text{CH}$ )	794 ( $\beta\text{CC}$ )	380 ( $\beta\text{CC} + \nu\text{CS}$ )

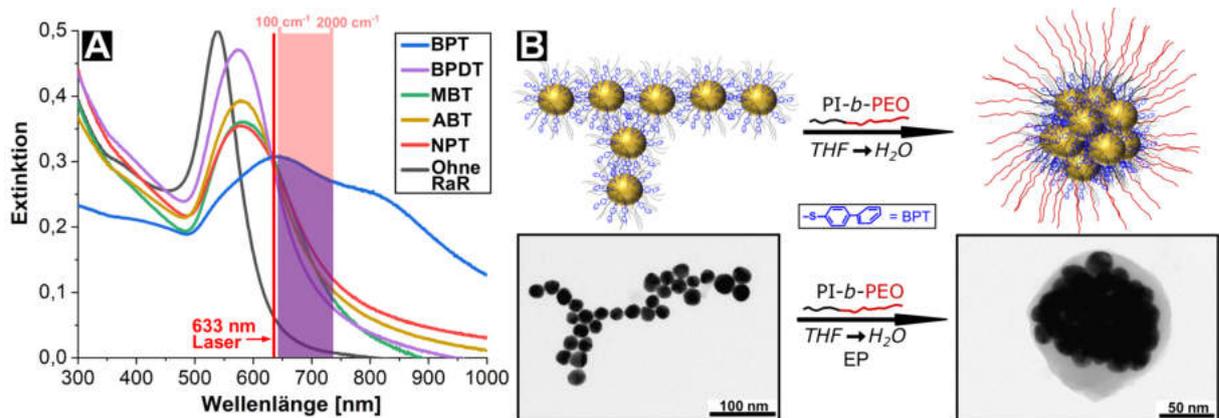
$\nu$  = (Ring-)Streckung     $\beta$  = (Ring-)Deformation     $\gamma$  = Biegung aus der Ebene

Eine noch eindeutiger Zuordnung der Raman-Peaks im SERS-Spektrum ist in Abbildung 6.32 gezeigt, in der das Raman-Spektrum des BPT-Feststoffs und das SERS-Spektrum der AuNPC@BPT bei 30 Sekunden Integrationszeit dargestellt sind. Der Vergleich dieser Spektren und ein Literaturvergleich erlauben die genaue Zuordnung der einzelnen Raman-Peaks und die Bestätigung, dass es sich eindeutig um den Raman-Fingerabdruck von BPT handelt. Die Unterschiede der Peak-Positionen der BPT-Schwingungen im Raman- und im SERS-Spektrum sind charakteristisch für den am Gold chemisorbierten Zustand und weisen auf eine kovalente Gold-Schwefel-Bindung hin.<sup>[265,269,270]</sup> Die Chemisorption des BPT wird durch die im SERS-Spektrum fehlende C-S-H-Schwingung bei  $903 \text{ cm}^{-1}$  und der breiten Au-S-(C-)Steckschwingung bei ca.  $170 \text{ cm}^{-1}$  weiter bekräftigt.<sup>[270,271]</sup> Abbildung 6.31 **B**, Tabelle 6.7 und Abbildung 6.32 zeigen, dass alle Raman-Reporter spektroskopisch auf den AuNPC nachgewiesen werden können. Das bedeutet, dass ein Ligandenaustausch und eine Chemisorption der RaR in signifikanter Menge vor der NP-Assemblierung stattgefunden hat. Die unnormierten Raman-Spektren aus Abbildung 6.31 **A** bestätigt die Vermutung, dass die BPT codierten AuNPC eine höhere oberflächenverstärkte Ramanstreuung im Vergleich zu den anderen codierten AuNPC zeigen. Dies wird wahrscheinlich durch die kompaktere Anordnung der NP und den damit einhergehenden geringeren interpartikulären Abständen verursacht, die die Bildung von Hotspots mit darin lokalisierten RaR ermöglichen.



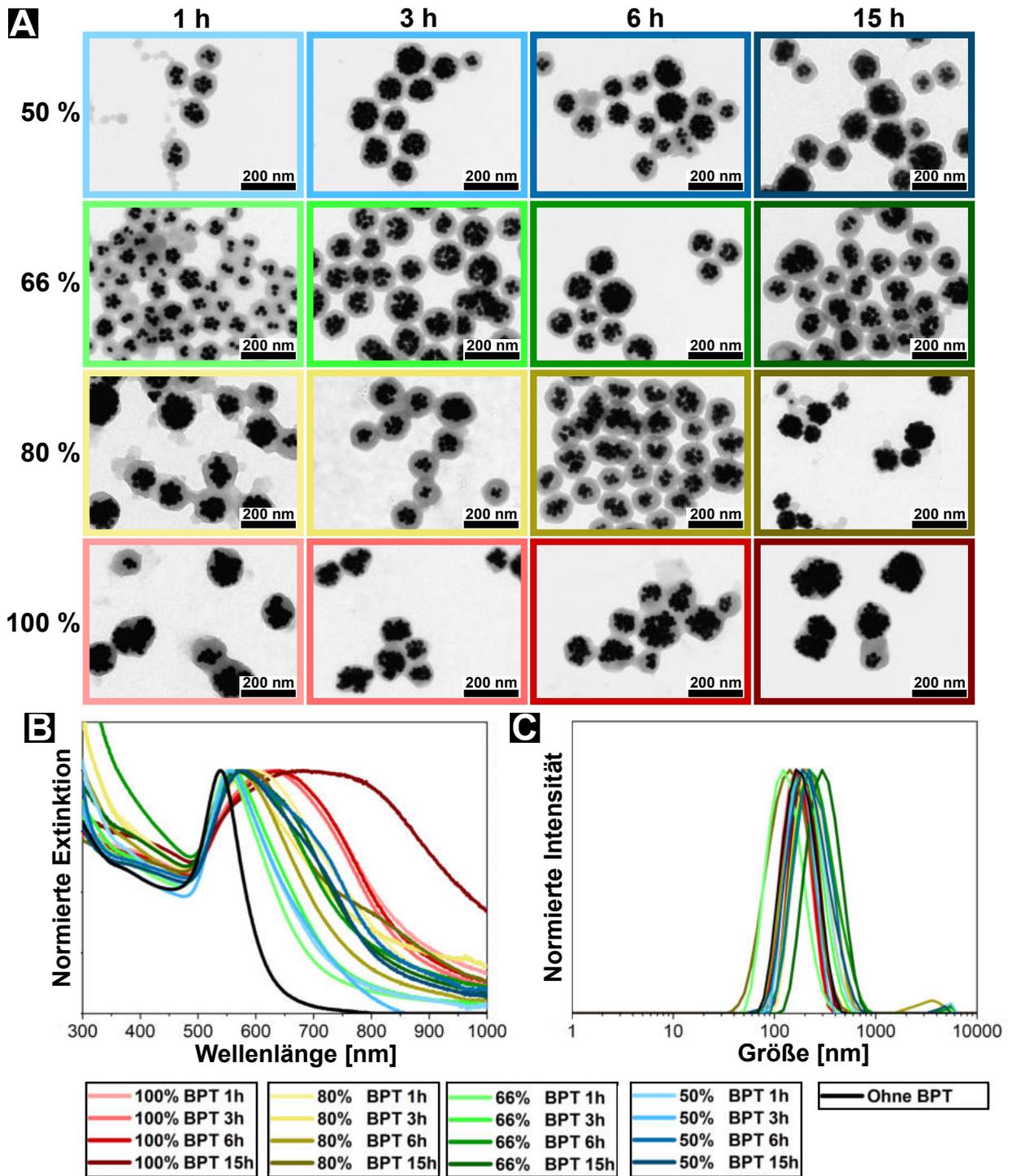
**Abbildung 6.32:** Unnormierte Raman-Spektren (links) der eingetrockneten AuNPC@BPT Dispersion aus Abbildung 6.31 und des reinen BPT-Feststoffs gemessen bei 633 nm Laserwellenlänge und 30 Sekunde Integrationszeit mit einem 100x Objektiv bei 6 mW Laserleistung. [α]: Detaillierte Zuordnung der beobachteten Raman-Peaks von BPT und AuNP@BPT nach Referenzen<sup>[260,265,270,272]</sup>. Die Zuordnung der Ringschwingungs-Modi ist hier in der Wilson-Notation<sup>[273]</sup> angegeben.

Die BPT codierten AuNPC sind die einzigen kompakten Cluster dieser Versuchsreihe, die keine diffuse Verteilung der AuNP in den Polymerkapseln aufweisen (mit Ausnahme der uncodierten AuNPC) und das obwohl die AuNP vor der Assemblierung und während des Ligandenaustausches mit BPT und NPT lange und große Aggregate bilden (siehe Abbildung 6.29 und 6.33 B).



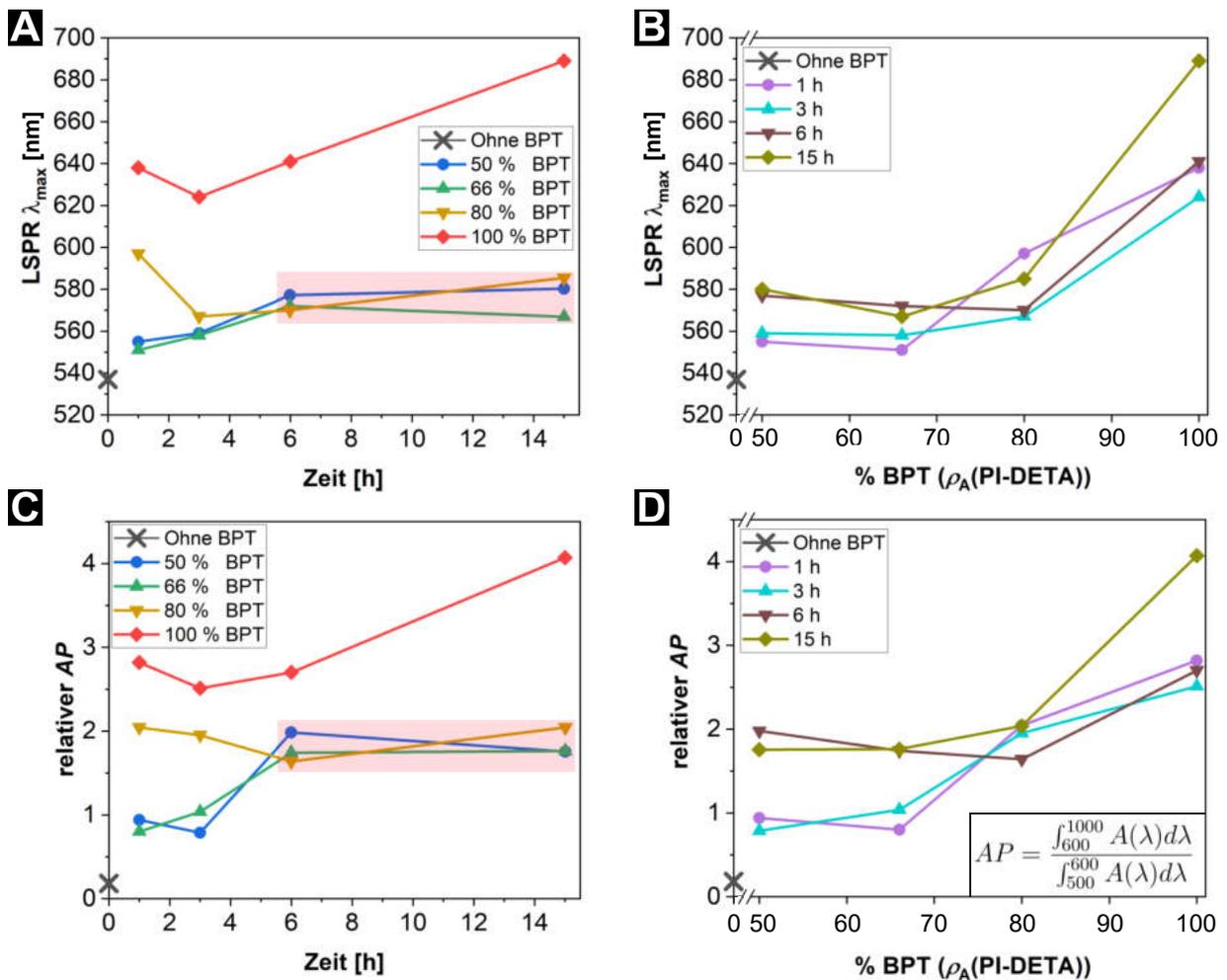
**Abbildung 6.33:** A Extinktionsspektren der AuNPC (siehe Abb. A.17) mit schattiertem Bereich der inelastischen Streuung (100 cm<sup>-1</sup> bis 2000 cm<sup>-1</sup>). Der blau schattierte Bereich deutet die LSPR-Überlappung des Streubereichs mit BPT-codierten AuNPC an. B Schematische Darstellung des vermuteten Kollaps der AuNP@BPT-Aggregate bei Überführung in Wasser mit PI-*b*-PEO mit TEM-Aufnahmen zur Verdeutlichung.

Der Grund dafür, dass trotz der Voraggregation kompakte AuNPC erhalten werden, könnte an geringen attraktiven Wechselwirkungen zwischen den NP@PI-DETA/BPT in den Aggregaten und einer flexiblen Ligandenhüllen-Interkalation liegen, die einen Kollaps der langen Aggregate bei der Überführung in Wasser zu kompakten AuNPC ermöglichen. Diese Vermutung ist in Abbildung 6.33 **B** schematisch dargestellt. Die stärkste Plasmonenkopplung der AuNPC@BPT im Zielbereich der inelastischen Ramanstreuung (Abb. 6.33 **A**) und die damit zusammenhängende höchste Ramanverstärkung (Abb. 6.31 **A**) im Vergleich zu den anderen RaR codierten AuNPC, sowie die TEM-Aufnahmen vor und nach der Assemblierung bekräftigen diese Vermutung und machen AuNPC@BPT zu einem vielversprechenden SERS-System. Die TEM-Aufnahmen der codierten AuNPC aus Abbildung 6.30 **C** zeigen im Vergleich zu den uncodierten AuNPC diffusere, weniger sphärische Clusterformen und eine höhere Polydispersität der Clustergrößen in den Polymerkapseln auf. Da neben der Oberflächenbelegung der RaR auch die Inkubationszeit einen potentiell wichtigen Faktor bei der Codierung und Bildung der langen Aggregate während der Codierung darstellen kann, wurde die Inkubationszeit in einer weiteren Versuchsreihe miteinbezogen. Hierbei wurde sich auf das AuNPC@BPT-System fokussiert, da dieses in den Vorexperimenten das größte Potential der Hotspot-Bildung und der oberflächenverstärkten Ramanstreuung aufwies. Außerdem zeigte eine Studie von Liz-Marzán *et al.*, dass BPT codierte Goldnanosterne im Vergleich zu anderen RaR codierten Goldnanosterne die intensivsten Raman-Signale aufwiesen.<sup>[167]</sup> Aufgrund der starken Voraggregation während der Codierung der AuNP, wurden die Inkubationszeiten von 20 Stunden des Vorexperiments (siehe oben) auf 1, 3, 6 und 15 Stunden reduziert. Die Zugabe an Raman-Reportern im Verhältnis zum PI-DETA wurde in dieser Versuchsreihe auf 50, 66, 80 und 100 % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) eingestellt. Die optischen Daten und TEM-Aufnahmen der Versuchsreihe sind in Abbildung 6.34 dargestellt. Es ist zu sehen, dass alle Proben dieses Versuchsraums zu AuNPC mit einer sichtbaren Polymerhülle führen und dass diese eine signifikant stärkere Plasmonenkopplung aufweisen, als die uncodierten AuNPC. Die UV-VIS Spektren zeigen, dass die LSPR-Banden der codierten AuNPC in Abhängigkeit der Inkubationszeit und dem BPT Codierungsgrad über einen großen Spektralbereich von ca. 500 bis 1000 nm verteilt sind und damit im für Bioanwendungen interessanten Spektralbereich liegen. Die heterogenen und asymmetrischen 100 % codierten BPT AuNPC lassen vermuten, dass die Form der AuNPC wieder durch starke Voraggregation während der Codierung bestimmt wird.



**Abbildung 6.34:** A Repräsentative TEM-Aufnahmen B UV-VIS-Spektren und C DLS-Messungen der BPT codierten AuNPC mit 1 bis 15 Stunden RaR Inkubationszeit und 50 bis 100 % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) Zugabe vor der Assemblierung. Die Assemblierung der AuNPC wurde mit einem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis von 1:30 bei Standardflussrate durchgeführt. Das Farbschema für A-C ist unten in der Legende dargestellt.

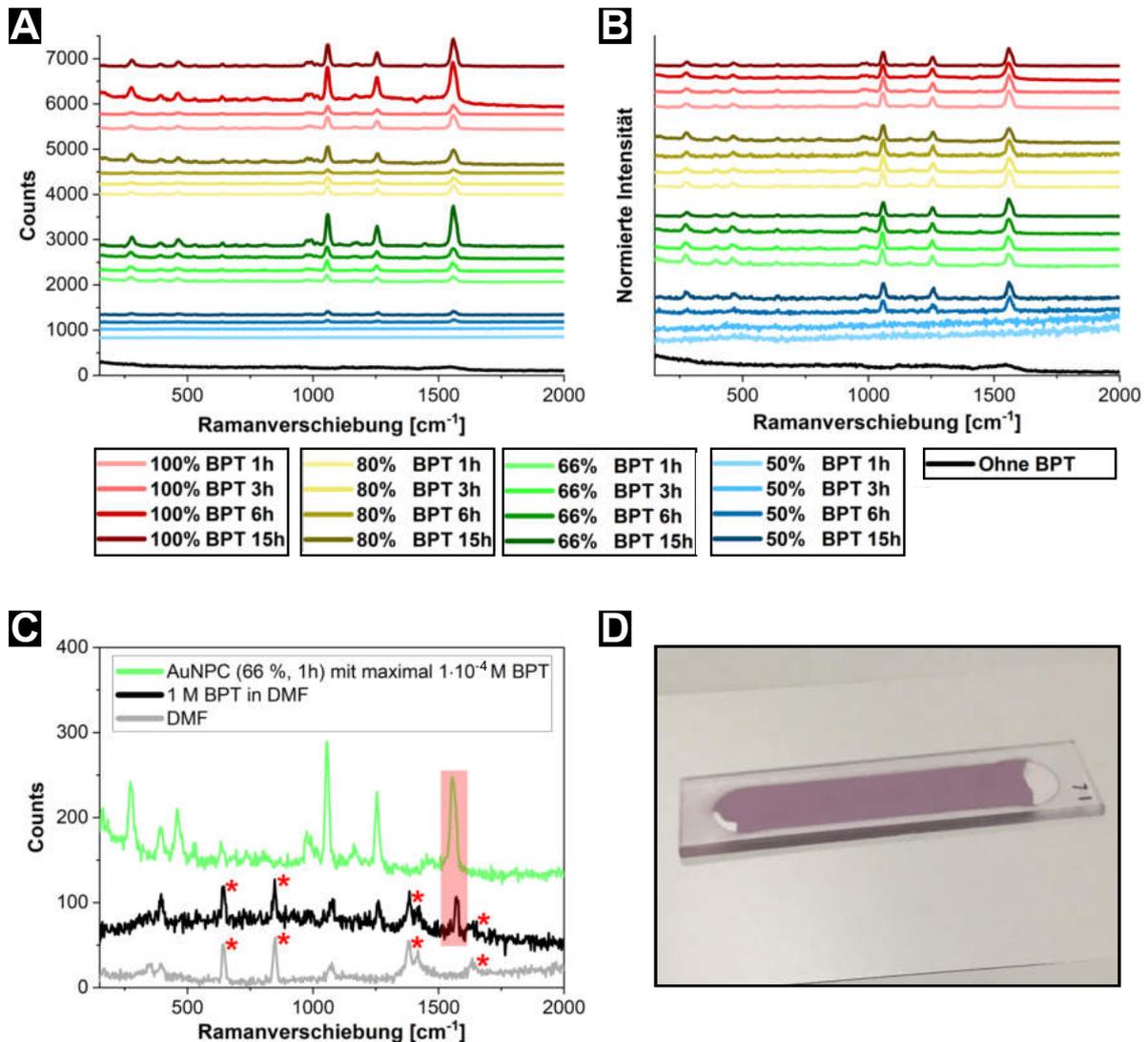
Abbildung 6.35 fasst die Daten der UV-VIS-Spektroskopie aus Abbildung 6.34 zusammen und zeigt, dass sowohl eine Abhängigkeit der LSPR-Position der BPT codierten AuNPC von der BPT-Inkubationszeit, als auch vom BPT-Codierungsgrad besteht. Je länger die AuNP mit BPT inkubiert werden, desto höher ist tendenziell die Rotverschiebung der LSPR (Abb. 6.35 A) und der relative Aggregationsgrad (Abb. 6.35 C).



**Abbildung 6.35:** **A** Auftragung der LSPR  $\lambda_{max}$  gegen die BPT-Inkubationszeit. **B** Auftragung der LSPR  $\lambda_{max}$  gegen die Zugabe an BPT in % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ). **C** Auftragung des relativen Aggregationsparameters  $AP$  gegen die BPT-Inkubationszeit. **D** Auftragung des relativen Aggregationsparameters  $AP$  gegen die Zugabe an BPT in % ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ). Der  $AP$  wurde anhand der Gleichung in **D** berechnet. Der rot schattierte Bereich in **A** und **C** deutet den Bereich der 50, 66 und 80 % codierten AuNPC nach mindestens 6 Stunden Inkubationszeit an.

Die mit 50, 66 und 80 % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) codierten AuNPC zeigen allerdings nach mindestens 6 Stunden BPT Inkubation ähnliche LSPR und AP-Werte, wie in dem rot

schattierten Bereich in Abb. 6.35 **A** und **C** dargestellt ist. Das bedeutet, dass der Ligandenaustausch bei den 50 - 88 % Proben nach 6 Stunden ein Gleichgewicht erreicht hat und die codierten AuNP während der RaR-Inkubation im Vergleich zu den 100 % BPT Proben kolloidal stabiler sind. Die AuNPC mit 100 % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) zeigen verhältnismäßig deutlich rotverschobenere LSPR und höhere relative Aggregationsparameter (**C,D**), als die 50 - 88 % Proben, was für eine deutliche Destabilisierung und Aggregation der AuNP während der Codierung spricht. Des Weiteren zeigen Abbildung 6.35 **B** und **D**, dass der BPT-Codierungsgrad der AuNP einen höheren Einfluss auf die LSPR-Verschiebung und den relativen Aggregationsparameter hat, als die Inkubationszeit, denn der LSPR- und  $AP$ -Anstieg zeigt eine signifikante Abhängigkeit vom Codierungsgrad bei gleichen Inkubationszeiten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Codierungsgrad von 50 - 88 % mit einer Inkubationszeit von 6 bis 15 Stunden einen guten Kompromiss zwischen Form- und Größenkontrolle, Reproduzierbarkeit, Codierungsgrad und LSPR-Verschiebung in den geeigneten Laseranregungsbereich darstellt. Zur Überprüfung der Zielgröße der verstärkten Ramanstreuung und für eine Vergleichbarkeit der SERS-Intensitäten wurden die AuNPC aus Abbildung 6.34 auf die gleiche optische Dichte bei der Laseranregungswellenlänge von 633 nm eingestellt und in einer Flüssigkeitsküvette (0.1 mm Schichtdicke) in Dispersion gemessen. Die Messung in Dispersion hat den Vorteil, dass die Messungen näher an den realen Bedingungen für *in-vivo* SERS-Sonden sind, dass das Anregungsvolumen durch die 0.1 mm Schichtdicke der Flüssigkeitsküvette bekannt ist, dass nicht verstärkte Raman-Vergleichsspektren von RaR-Lösungen mit bekannter Konzentration zur Ermittlung der SERS-Verstärkung ( $EF_{SERS}$ , siehe Kapitel 4.3.1, Gleichung 4.20) herangezogen werden können und dass Trocknungseffekte (siehe Anhang Abbildung A.19) bei der Raman-Messung in einer geschlossenen Küvette verringert werden können. Die SERS-Spektren der BPT codierten AuNPC aus Abbildung 6.36 **A** und **B** zeigen, dass die spezifischen Raman-Peaks des BPT bei einem Codierungsgrad von 50 %, einer Inkubationszeit von 1 und 3 Stunden und den genannten Messbedingungen (1 Sekunde Integrationszeit etc.) nicht detektiert werden können. Erst ab einer BPT-Inkubationszeit von mindestens 6 Stunden bei 50 % BPT Codierungsgrad kann die spezifische inelastische BPT-Streuung unter gleichen Bedingungen detektiert werden. Dieser Umstand bekräftigt, dass der Ligandenaustausch nach 6 Stunden einen Gleichgewichtszustand erreicht hat und eine signifikante Menge an BPT chemisorbiert auf der Goldoberfläche vorliegt.



**Abbildung 6.36:** **A** Unnormierte und **B** normierte SERS-Spektren der BPT codierten AuNPC mit 1 bis 15 Stunden RaR Inkubationszeit und 50 bis 100 % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ). Das Farbschema von **A** und **B** ist in der Legende (mittig) dargestellt. **C:** Eine der schwächsten SERS-Spektren (66 % 1h) aus **A** im Vergleich zu den Raman-Spektren von  $1 \text{ mol L}^{-1}$  BPT in DMF und reinem DMF. Die DMF-Peaks sind mit einem roten Stern gekennzeichnet.<sup>[274]</sup> Der rot schattierte Bereich kennzeichnet die intensive BPT-Ringschwingung. Alle in **A-C** gezeigten AuNPC-Spektren wurden bei gleicher optischen Dichte bei  $\lambda = 633 \text{ nm}$  mit der Laserwellenlänge  $633 \text{ nm}$ , mit 1 Sekunde Integrationszeit, bei  $6 \text{ mW}$  Laserleistung, mit einem  $100\times$  Objektiv und in der in **D** gezeigten Küvette mit einer Schichtdicke von  $0.1 \text{ mm}$  aufgenommen.

Die AuNPC ab einem Codierungsgrad von  $\geq 66 \%$  BPT zeigen unabhängig von der Inkubationszeit ein deutlich identifizierbares BPT-SERS Spektrum, wie besonders Abbildung 6.36 **B** hervorhebt. Die Raman-Messungen der AuNPC mit 66 % BPT (15h) und 100 %

BPT (6h) ergeben die intensivsten SERS-Spektren der Versuchsreihe. Dennoch weisen selbst die SERS-Spektren mit der vergleichsweise geringsten Intensität, wie in Abbildung 6.36 C dargestellt, ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis und eine höhere Raman-Intensität, als die deutlich höher konzentrierte BPT-Vergleichsprobe ( $1 \text{ mol L}^{-1}$  in DMF<sup>5</sup>) auf. Das heißt, dass die präparierten AuNPC mit differenzierbaren BPT-Signalen definitiv einen SERS-Effekt aufweisen. Dies wurde überprüft, indem die Verstärkungsfaktoren  $EF_{\text{SERS}}$  anhand von Gleichung 6.4 berechnet wurden. Da die Raman-Messungen in Dispersion durchgeführt wurden, kann Gleichung 6.4 (vgl. Gleichung 4.20 aus Kapitel 4.3.1) zur Berechnung des sog. analytischen Verstärkungsfaktors herangezogen werden.<sup>[1,275]</sup>

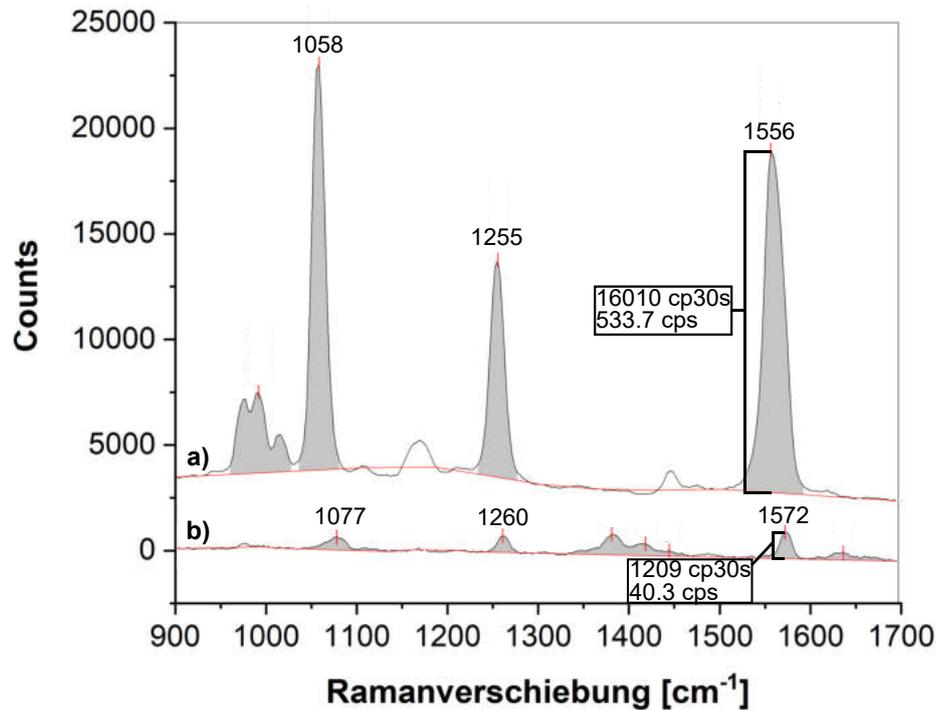
$$EF_{\text{SERS}} = \frac{I_{\text{SERS}}/c_{\text{SERS}}}{I_{\text{Ra}}/c_{\text{Ra}}} = \frac{I_{\text{SERS}} \cdot c_{\text{Ra}}}{c_{\text{SERS}} \cdot I_{\text{Ra}}} \quad (6.4)$$

Der analytische Verstärkungsfaktor ist vor allem bei identischen Messbedingungen und Submonolagenbelegung der RaR auf den Metalloberflächen eine intuitive, praktische und reproduzierbare Berechnungsmethode für kolloidale Systeme.<sup>[1]</sup> Eine zuverlässige Bestimmung der absoluten Stoffmenge  $N_{\text{BPT}}$  und entsprechender Konzentration  $c_{\text{SERS}}$  an adsorbierten BPT-Molekülen der Proben erwies sich aus mehreren Gründen als schwierig. Zum einen unterschreitet die Schwefelkonzentration häufig die Nachweisgrenzen etablierter, konventioneller, elementaranalytischer Methoden für eine quantitative, absolute Bestimmung. Zum anderen sind die Proben für viele konventionelle Analytikmethoden aufgrund des Vorhandenseins von großen Polymeren und des nötigen, aggressiven Probenaufschlusses ungeeignet. Ein nasschemischer bzw. spektroskopischer Nachweis von ungebundenen Thiolen nach der Inkubation der RaR in THF z.B. mittels des Ellmanns-Reagenz ist ebenfalls aufgrund der Nachweisgrenzen und des organischen Mediums nicht geeignet. Eine TEM-EDX-Analyse ist aufgrund der Überlagerung der M-Linien vom Gold und der K-Linien vom Schwefel nicht zuverlässig (siehe Anhang A.20). Dennoch kann durch die Annahme, dass alle zugegebenen Raman-Reporter während der Inkubation adsorbieren und während der Präparation der AuNPC keine Verluste auftreten, die Mindestverstärkung der Ramanstreuung berechnet werden, die die Untergrenze<sup>6</sup> der  $EF_{\text{SERS}}$  kennzeichnet. Die Berechnung der SERS-Verstärkung wurde anhand der SERS-Spektren der AuNPC und des Raman-Spektrums einer  $1 \text{ mol L}^{-1}$  BPT-Lösung bei identischen Bedingungen und

<sup>5</sup>DMF wurde aufgrund der Lösungseigenschaften der RaR und des relativ hohen Siedepunkts (Reduzierung der Eintrocknung durch den Laser) ausgewählt.

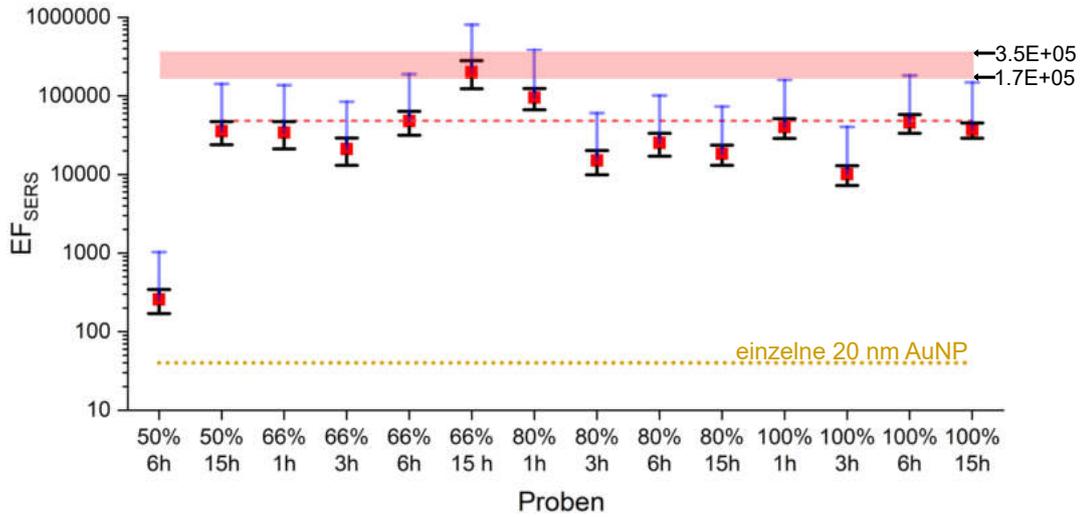
<sup>6</sup>Je mehr RaR zum gemessenen SERS-Signal beitragen, desto geringer ist der Verstärkungsfaktor  $EF_{\text{SERS}}$

jeweils 30 Sekunden Integrationszeit durchgeführt. Dazu wurde die Intensität in Counts pro Sekunde der drei intensivsten Raman-Peaks (b  $\nu_{CC} \approx 1556, 1572 \text{ cm}^{-1}$ ; b  $\beta_{CH} \approx 1255, 1260 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{CS}$  etc.  $\approx 1058, 1077 \text{ cm}^{-1}$ ) des BPT, wie in Abbildung 6.37 gezeigt, durch eine automatisierte, Grundlinien- und Peakhöhenanalyse (für weitere Details siehe Kapitel 8.2.5) ermittelt.



**Abbildung 6.37:** Berechnungsmethode der SERS- und Raman-Intensitäten in Counts pro 30 Sekunden (cp30s) und Counts pro Sekunde (cps) anhand des **a)** SERS-Spektrums der 66 % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) AuNPC mit 15 Stunden Inkubationszeit und anhand des **b)** BPT-Vergleichsspektrums ( $1 \text{ mol L}^{-1}$  in DMF). Die Intensitäten wurden automatisiert von der für alle Spektren gleich berechneten Basislinie (rote Linie) bis zum Peak-Maximum berechnet und ist beispielhaft für die BPT-Ringschwingung (b  $\nu_{CC}$  bei  $1556$  und  $1572 \text{ cm}^{-1}$ ) dargestellt. Die Spektren wurden bei gleicher optischer Dichte bei  $\lambda = 633 \text{ nm}$  mit der Laseranregungswellenlänge  $633 \text{ nm}$ , mit 30 Sekunden Integrationszeit, bei  $6 \text{ mW}$  Laserleistung, mit einem  $100\times$  Objektiv und in der in Abb. 6.36 **D** gezeigten Küvette mit einer Schichtdicke von  $0.1 \text{ mm}$  aufgenommen.

Mit den ermittelten Intensitäten und der angenommenen, maximalen BPT-Adsorption wurden die Untergrenzen der schwingungsspezifischen  $EF_{SERS}$  und ein diesbezüglicher durchschnittlicher  $EF_{SERS}$  berechnet. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Abbildung 6.38 graphisch aufgetragen und in einer Tabelle zusammengefasst.



	$c_{\max}$ BPT [M]	CPS (b vCC)	CPS (b $\beta$ CH)	CPS (vCS etc.)	$EF_{SERS}$ (b vCC)	$EF_{SERS}$ (b $\beta$ CH)	$EF_{SERS}$ (vCS etc.)	$EF_{SERS}$ $\emptyset$
BPT in DMF	1	40.3	26.1	21.1	-	-	-	-
50% 6h	6.8E-05	0.6	0.6	0.3	2.3E+02	3.9E+02	1.5E+02	2.6E+02
50% 15h	5.7E-05	63.8	65.0	35.9	2.8E+04	5.4E+04	2.4E+04	3.6E+04
66% 1h	1.0E-04	93.4	119.7	66.1	2.3E+04	5.5E+04	2.5E+04	3.4E+04
66% 3h	1.2E-04	71.6	87.7	46.3	1.5E+04	3.4E+04	1.5E+04	2.1E+04
66% 6h	9.6E-05	140.6	148.9	81.4	3.7E+04	7.4E+04	3.3E+04	4.8E+04
66% 15h	9.3E-05	533.7	646.4	324.2	1.4E+05	3.3E+05	1.3E+05	2.0E+05
80% 1h	8.3E-05	272.4	246.8	138.3	8.1E+04	1.4E+05	6.4E+04	9.5E+04
80% 3h	2.4E-04	113.6	121.2	65.2	1.2E+04	2.4E+04	1.0E+04	1.5E+04
80% 6h	1.3E-04	107.6	108.2	60.3	2.0E+04	3.8E+04	1.7E+04	2.5E+04
80% 15h	3.5E-04	208.8	195.1	118.5	1.5E+04	2.7E+04	1.3E+04	1.8E+04
100% 1h	7.0E-04	960.7	861.1	515.6	3.4E+04	5.8E+04	2.8E+04	4.0E+04
100% 3h	1.3E-03	445.4	389.8	229.4	8.7E+03	1.5E+04	6.9E+03	1.0E+04
100% 6h	1.0E-03	1611.9	1383.8	845.6	4.0E+04	6.5E+04	3.2E+04	4.6E+04
100% 15h	1.0E-03	1458.5	1094.3	739.4	3.5E+04	5.0E+04	2.7E+04	3.7E+04

**Abbildung 6.38:** Auftragung des durchschnittlichen Verstärkungsfaktors  $EF_{SERS}$  (rote Punkte) aus der unten stehenden Tabelle der 50 % BPT 6 Stunden bis 100 % BPT ( $\rho_A$ (PI-DETA)) 15 Stunden inkubierten AuNPC. Die schwarzen Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Berechnung an. Die blauen Balken kennzeichnen den theoretischen Bereich des  $EF_{SERS}$  bei  $\geq 25$  % der möglichen Oberflächenadsorption der angenommenen, maximalen BPT-Stoffmenge an die AuNP. Die gepunktete gelbe Linie zeigt den ermittelten  $EF_{SERS}$  von einzelnen AuNP mit 20 nm Durchmesser, die mit Kristallviolett codiert wurden.<sup>[275]</sup> Die gestrichelte rote Linie kennzeichnet den  $EF_{SERS}$ -Durchschnitt von  $4.8E+04$  ( $4.8 \cdot 10^4$ ) der Proben (ohne 50 %, 6h). Der rot schattierte Bereich zeigt den  $EF_{SERS}$ -Bereich einer Vielzahl an mithilfe der Randelementmethode simulierten AuNPC mit einem NP-NP Nächste-Nachbar-Abstand von 0.5 nm und experimentell ermittelten  $EF_{SERS}$ -Werten präparierter AuNPC an.<sup>[2]</sup> Die Tabelle gibt die maximal mögliche BPT-Konzentration ( $c_{\max}$ ), die Intensität der zugeordneten, intensivsten Raman-Schwingungen (b vCC  $\approx 1556, 1572 \text{ cm}^{-1}$ ; b  $\beta$ CH  $\approx 1255, 1260 \text{ cm}^{-1}$ ; vCS etc.  $\approx 1058, 1077 \text{ cm}^{-1}$ ) in Counts pro Sekunde (cps), die entsprechenden schwingungsspezifischen  $EF_{SERS}$  und den daraus ermittelten durchschnittlichen  $EF_{SERS}$  mit Farbcodierung (rot = relativ hoch bis grün = relativ niedrig) an.

Die  $EF_{SERS}$  der AuNPC weisen deutliche Unterschiede in Abhängigkeit der BPT-Stoffmengen zugabe und der Inkubationszeit auf. Die AuNPC mit 50 % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) und einer Inkubationszeit von 6 Stunden zeigen die geringste Mindestverstärkung von ca. 260. Dieser Wert liegt verhältnismäßig nah an dem Verstärkungsfaktor einzelner 20 nm AuNP von ca. 40.<sup>[275]</sup> Die 50 % BPT und 15 Stunden Probe zeigt im Vergleich annähernd einen  $EF_{SERS}$  der dem Durchschnitts- $EF_{SERS}$  von  $4.8 \cdot 10^4$  (siehe Abb. 6.38, rot gestrichelte Linie) entspricht. Das bedeutet, dass die Codierung mit 50 % BPT und einer Inkubationszeit von  $\leq 6$  Stunden zu keinem signifikanten Codierungsgrad bzw. zu keiner signifikanten Hotspot-Ausbildung im Verhältnis zu den einzelnen AuNP kommt. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass die NP-Oberfläche dieser AuNP noch ausreichend mit PI-DETA belegt ist, sodass sich die AuNP im assemblierten Zustand durch die sterische Hinderung der kollabierten Ligandenhülle nicht soweit annähern können, dass es zur einer ausgeprägten Plasmonenkopplung bzw. konstruktiver Nahfeldinterferenz kommt. Die AuNPC mit 66 % BPT, 15 Stunden Inkubation zeigen einen signifikant überdurchschnittlichen  $EF_{SERS}$ , der in den  $EF_{SERS}$ -Bereich von Litti *et al.* präparierten 4-Mercaptobenzoessäure codierten AuNPC<sup>7</sup> und einer Vielzahl von simulierten 4-Mercaptobenzoessäure codierten AuNPC mit bis zu 10 AuNP und jeweils mindestens einem Nächste-Nachbar-Abstand von 0.5 nm pro AuNP<sup>8</sup> fällt.<sup>[2]</sup> Es ist nicht auszuschließen, dass höhere interpartikuläre Abstände (geringere Feldverstärkung) der BPT codierten AuNP (evtl. noch PI-DETA auf der Oberfläche) im Vergleich zu den 4-Mercaptobenzoessäure codierten AuNP durch einen höheren Raman-Wirkungsquerschnitt (BPT hat zwei II-Elektronen-System) oder eine höhere Belegungsdichte (insbesondere innerhalb der Hotspots) ausgeglichen wird. Eine Studie von Liz-Marzán *et al.* zeigte, dass BPT codierte Goldnanosterne im Vergleich zu anderen RaR codierten Goldnanosternen die intensivsten Raman-Signale zeigen.<sup>[167]</sup> Hervorzuheben ist, dass die von Litti *et al.*<sup>[2]</sup> simulierten, verschiedenartigen AuNPC mit unterschiedlichen AuNP-Durchmesser und den sehr geringen interpartikulären Abständen sowie die experimentell präparierten AuNPC von Litti *et al.* einen Anhaltspunkt für den

<sup>7</sup>Keine Angaben zum interpartikulären Abstand, allerdings können BPT und 4-Mercaptobenzoessäure codierte AuNP aufgrund ähnlicher Moleküllängen (ca. 1 nm) und ähnlicher durchschnittlicher Bindungswinkel (ca. 20 - 30°) der Liganden auf Goldoberflächen wahrscheinlich ähnliche Minimum-Abstände bei Submonolagenbelegung eingehen.<sup>[258,276-281]</sup>

<sup>8</sup>Mindestabstand zur Vermeidung komplexer Kopplungseffekte zur Simulation. Der NP-Abstand von 0.5 nm befindet sich vermutlich auch im Bereich des geringstmöglichen Abstands zweier BPT (oder auch 4-Mercaptobenzoessäure) codierter NP, wenn sich die Moleküle der BPT-Monolagen quasiplanparallel zur NP-Oberfläche anordnen, denn 0.5 nm entspricht den intermolekularen Abständen der Phenylringe im Biphenyl-Kristall (0.4 - 0.5 nm)<sup>[279,282]</sup> und ebenso den intermolekularen Gleichgewichtsabständen von Benzen (0.3 - 0.5 nm)<sup>[283,284]</sup>.

maximal möglichen analytischen Verstärkungsfaktor bei AuNPC darstellen und dass die gezeigten AuNPC mit 66 % BPT, 15 Stunden Inkubation in diesen Grenzbereich fallen. Des Weiteren zeigten auch die Silber-NPC von Etchegoin *et al.*, die wie bei Litti *et al.* mithilfe hoher Ionenkonzentrationen assembliert wurden, ähnliche analytische Verstärkungsfaktoren bei vier verschiedenen RaR von  $0.53 \cdot 10^5$  bis  $5.0 \cdot 10^5$ .<sup>[1]</sup>

Die Experimente mit 66 % (6 h), 66 % (15 h) und 80 % (1 h) BPT-Inkubation zeigen, dass die kolloidale Stabilität der AuNP während der Inkubation soweit erhalten bleibt, dass sich keine große Aggregate bilden und bei der anschließenden lösungsmittelinduzierten Assemblierung geordnetere AuNPC mit geringeren interpartikulären Abständen entstehen. Auf der anderen Seite wird die Oberflächenbelegung von PI-DETA soweit reduziert, dass die lösungsmittelinduzierte Assemblierung überhaupt erst zu diesen geringen interpartikulären Abständen der AuNP@PI-DETA/BPT in den AuNPC führen kann. In Kapitel 4.3.3 wurde bereits erwähnt, dass das optimale Verhältnis zwischen stabilisierenden Liganden und Raman Reportern gefunden werden muss, da die kolloidale Stabilität und die SERS-Intensität sich wechselseitig beeinflussen. Der  $EF_{SERS}$  der 66 % (15 h) Probe zeigt, dass dieses Verhältnis für eine intensive SERS im Rahmen der möglichen Verstärkung von sphärischen, assemblierten AuNP bei 633 nm Anregungswellenlänge geeignet ist. Die Integrale des Bereichs im UV-VIS-Extinktionsspektrum, die mit dem inelastischen Raman-Streubereich bei 633 nm Laseranregung überlappen, also die Integrale von 633 bis 734 nm (0 bis  $2000 \text{ cm}^{-1}$ ) zeigen ein lokales Maximum bei der 66 % (15 h) Probe (Abb. A.21). Das weist darauf hin, dass diese Codierungsbedingungen zu einer optimalen, spektralen LSPR-Position für eine hohe Raman-Verstärkung in diesem Streubereich führen. Die Integrale von 785 bis 931 nm (0 bis  $2000 \text{ cm}^{-1}$  bei 785 nm Laseranregung) zeigen mit steigendem Codierungsgrad (Abb. A.21 von links nach rechts) steigende Integrale, also eine Verschiebung der dipolaren LSPR in den optimalen Bereich für die Ramanverstärkung im nahen Infrarot-Bereich. Eine Verringerung der MBT, ABT und NPT-Stoffmengen zugabe unter 100 % RaR und eine Verringerung der Inkubationszeit unter 20 Stunden, führte zu einer deutlichen Verbesserung der diffusen AuNP-Verteilung in den Polymerkapseln, wie Abbildung A.22 verdeutlicht. Des Weiteren zeigen NPT codierte AuNPC unter gleichen Präparationsbedingungen eine noch stärkere Plasmonenkopplung als die BPT codierten AuNPC und ebenfalls gute Voraussetzungen für hohe  $EF_{SERS}$  im nahen Infrarot-Bereich.

Die RaR Codierungs-Studien zeigen, dass die codierten AuNPC im Vergleich zu den uncodierten AuNPC deutlich stärkere Plasmonenkopplung aufweisen. Die starke Plasm-

nenkopplung resultiert aus geringen interpartikulären Abständen der NP in den Clustern, verursacht durch eine gemischte PI-DETA/BPT-Ligandenhülle, die die nötige Annäherung der NP in den Clustern und die Ausbildung von Hotspots des elektrischen Felds bei LSPR-Anregung ermöglicht. Die Banden der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) können über einen großen Spektralbereich von 500 bis 1000 nm durch die Variation der RaR-Inkubationszeit und dem RaR-Codierungsgrad für spektroskopische Anwendungen auf die Laseranregungswellenlänge eingestellt werden. Für intensive SERS-Signale bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm zeigt vor allem eine BPT-Inkubation mit 66 % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) und einer Inkubationszeit von 15 Stunden den höchsten Raman-Verstärkungsfaktor  $EF_{\text{SERS}}$  in der Größenordnung von  $10^5$ . Nach aktuellem Stand liegt diese Verstärkung im Grenzbereich des maximal möglichen analytischen Verstärkungsfaktors<sup>[2]</sup> für geclusterte, sphärische AuNP. Zusammenfassend bekräftigen die Zellaufnahme, die kolloidale Stabilität, die Schutzwirkung der Polymerhülle gegenüber äußerer Einflüsse, die Biokompatibilität, die Möglichkeit der LSPR-Einstellung der AuNPC und die hohen Mindestverstärkungen der in den ausgeprägten E-Feld-Hotspots der AuNPC lokalisierten Raman-Reporter bis in den  $10^5$ -Größenbereich das Potential dieser Assemblierungs- und Einkapselungsmethode für die Herstellung *in-vivo* geeigneter und funktionalisierbarer SERS-Plattformen.

## 7 | Ausblick

Die hier vorgestellte Methode zeigt deutliche Vorteile und Fortschritte gegenüber anderen Einkapselungs- und Assemblierungsmethoden von plasmonischen NP und das biomedizinische Potential der damit hergestellten Nanoplattformen ist enorm. Die in dieser Arbeit entwickelte Einkapselungs- und Assemblierungsmethoden kann auf verschiedene NP-Größen, -Formen und -Zusammensetzungen übertragen werden, sodass zukünftige Entwicklungen und Entdeckungen der Plasmonik, wie die aufkommenden Hybrid-NP<sup>[76,285,286]</sup> (z.B. Ag-Au-Legierungen) mit vergleichsweise noch höheren Wirkungsquerschnitten und höheren lokalen elektrischen Feldern als die reinen Metall-NP, mithilfe dieser Methode eingekapselt und für *in vivo* Anwendungen bereitgestellt werden können. Die maximalen analytischen Raman-Verstärkungsfaktoren der in dieser Arbeit hergestellten SERS-Plattformen liegen in der Größenordnung von publizierten analytischen Raman-Verstärkungsfaktoren von dispergierten Goldnanosternen ( $10^5$ )<sup>[287,288]</sup>, die starke intrinsische Hotspots aufweisen. Dieser Faktor ist besonders im Hinblick auf die Verwendung von vergleichsweise einfach und in größeren Mengen herstellbaren, kostengünstigen und sphärischen NP vielversprechend. Die Einkapselung und Assemblierung von anisotropen, plasmonischen NP mithilfe der vorgestellten Methode könnte die Sensitivität der SERS-Plattformen weiter um einige Größenordnungen verbessern, da die konstruktive Interferenz intrinsischer Hotspots zu einer starken lokalen Feldverstärkung und entsprechend starken SERS-Signalen führt. Allerdings wären dafür im Hinblick auf eine klinische Anwendung einige Fortschritte und Optimierungen in der Synthese anisotroper, plasmonischer NP notwendig und auch die Bedingungen und Polymerverhältnisse der vorgestellten Methode müssten für komplexere NP-Formen, wie den Goldnanosternen, angepasst werden. Die Langzeit-Sicherheit und das diesbezügliche Nutzen-Risiko-Verhältnis von Nanomaterialien ist eine Fragestellung, die für viele Gebiete der Nanotechnologie und insbesondere für den Wirkungsbereich der Nanomedizin noch nicht abschließend beantwortet ist.<sup>[3]</sup> Das bedeutet konkret auch für die hergestellten NPC, dass unter anderem *in vivo* Langzeitstudien zur Toxizität, Photostabilität, SERS-Signalstabilität, Pharmakokinetik und Spezifität für Zielzellen notwendig sind.

## 8 | Experimenteller Teil

### 8.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit genutzten Chemikalien sind im Folgenden anhand ihrer kommerziellen Quelle sortiert und mit der Herstellerangabe der Reinheit gelistet. Die Monomere Styrol und *p*-Divinylbenzol wurden jeweils vor der radikalischen Emulsionspolymerisation destilliert, um den Stabilisator Butylhydroxytoloul (BHT) zu entfernen. Die restlichen Chemikalien wurden, sofern nicht anderweitig vermerkt, ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für alle Prozeduren bei denen Wasser verwendet wurde, wurde mindestens 6 Stunden Stickstoffgas gespültes, ultrapures Wasser (Elga LabWater, Purelab flex 2, 18.2 M $\Omega$ cm, < 5 ppb TOC) genutzt. Die Polymere Polyisoprendiethylentriamin (PI-DETA,  $M_w \approx 1300$  und  $2500 \text{ g mol}^{-1}$ ) und Polyisopren-*block*-Polyethylenoxid (PI-*b*-PEO,  $M_w \approx 13400 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $M_n \approx 12600 \text{ g mol}^{-1}$ , 65 Gew.% PEO) wurden über eine lebende anionische Polymerisation<sup>[44]</sup> synthetisiert und vom Fraunhofer CAN (Centrum für Angewandte Nanotechnologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die durchschnittlichen Molekulargewichte der Polymere wurden über eine Größenausschluss-Chromatographie-Analyse ermittelt. Alle genutzten Raman-Reporter wurden neu erworben und unter Stickstoff-Schutzgasatmosphäre in einer UNILAB Fa. Braun Glove-Box bei ca. -17 °C gelagert, um die Disulfidbrücken-Bildung zu verhindern.

#### **Sigma-Aldrich:**

Biphenyl-4,4'-dithiol ( $\geq 95 \%$ ), Tributylphosphin (97 %, Isomerengemisch), Biphenyl-4-thiol ( $\geq 97 \%$ ), 4-MethylbenzenthioI ( $\geq 98 \%$ ), 4-AminobenzenthioI ( $\geq 97 \%$ ), Naphthalen-1-thioI ( $\geq 99 \%$ ), Glycerin ( $\geq 99 \%$ ), L-Ascorbinsäure ( $\geq 99 \%$ ), Salpetersäure (65 %), Kaliumcyanid ( $\geq 98 \%$ ), Tanninsäure ( $\geq 95 \%$ ), Kohlenstoffdisulfid ( $\geq 99 \%$ ), Octadecylamin ( $\geq 97 \%$ ), Oleylamin ( $\geq 98 \%$ ), 1-OctadecanthioI ( $\geq 98 \%$ ), OctanthioI ( $\geq 98.5 \%$ ), 4-Mercaptophenylelessigsäure ( $\geq 97 \%$ ), 1,1'-Carbonyldiimidazol ( $\geq 90 \%$ ), Cetyltrimethylammoniumbromid ( $\geq 98 \%$ )

**VWR:**

Ethanol ( $\geq 99.8\%$ ), Aceton ( $\geq 99\%$ ), Chloroform ( $\geq 99\%$ ), Tetrahydrofuran ( $\geq 99\%$ , BHT stabilisiert (250 - 400 ppm)), Salzsäure (37 %), *n*-Hexan ( $\geq 95\%$ ), Methanol ( $\geq 99.5\%$ )

**Fluka:**

Trinatriumcitrat Dihydrat ( $\geq 99\%$ )

**Alfa Asear:**

Tetrachlorogold(III)-säure Trihydrat ( $\geq 99\%$ )

**Fujifilm Wako Chemicals:**

2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid (k.A., Handelsname: VA044)

**Merck:**

Silbernitrat ( $\geq 99\%$ ), Styrol ( $\geq 99\%$ , BHT stabilisiert (200 ppm)), *p*-Divinylbenzol ( $\approx 55\%$  *para*-Isomer, BHT stabilisiert (200 ppm)), Natriumhydroxid (100 %)

**Eurisotop:**

Deuteriertes Chloroform ( $\geq 99.5\%$  D)

**Fisher Chemical:**

Wasserstoffperoxid (30 - 32 %, wässrig)

## 8.2 Generelle Techniken und Geräte

Alle genutzten Glasgeräte inklusive Quarzglas-Spektralphotometer-Küvetten wurden vor jeder Nutzung mit frischem, konzentriertem Königswasser (Salzsäure (37 %) und Salpetersäure (65 %) im Verhältnis 3 zu 1) gespült und anschließend mit siedendem ultrapurem Wasser mehrfach gespült.

### 8.2.1 UV-VIS(-NIR)-Spektroskopie

Die Bestimmung der Extinktion im Bereich von 300 bis 1000 nm wurde mit einem Cary50 Spektrometer der Firma VARIAN durchgeführt. Dabei wurden die Proben in der Regel mit Quarzglas-Spektralphotometer-Küvetten und Polymethylmethacrylat (PMMA) Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm oder Quarzglas-Spektralphotometer-Küvetten mit einer Schichtdicke von 0.1 mm untersucht.

Die Bestimmung der Absorption im Bereich von 300 bis 1000 nm wurde mit einem Cary500 Zweistrahlabsorptionsspektrometer und einer eingesetzten Ulbricht-Kugel (Lab

Sphere DRA-CA-5500) der Firma VARIAN durchgeführt. Dabei wurden die Proben mit Quarzglas-Spektralphotometer-Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm untersucht.

### 8.2.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Dynamische Lichtstreuung wurde an einem Malvern Instruments Zeta-Sizer Nano ZS (Einzelwinkel 173° Rückstreusystem mit He-Ne Laser bei  $\lambda = 633$  nm) unter Verwendung von Quarzglas-Spektralphotometer-Küvetten oder Polymethylmethacrylat (PMMA) Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Zur Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers wurde die Software Dispersion Technology 5.10 der Firma Malvern eingesetzt.

### 8.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV mit einem Joel JEM-1011 durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgte immer nach demselben Schema: 8  $\mu$ L einer Probe wurden auf ein mit einem Kohlenstofffilm beschichtetes Kupfergrid aufgebracht und 60 s inkubiert. Anschließend wurde das Lösungs- oder Dispersionsmittel mit einem Filterpapier entfernt.

HAADF-STEM und konventionelle TEM-Aufnahmen wurden mit einem FEI Tecnai und einem FEI Osiris Elektronenmikroskop mit der Beschleunigungsspannung von 200 kV aufgenommen. Die Proben wurden mithilfe eines FEI Vitrobot Instruments wie in Referenz<sup>[65]</sup> detailliert beschrieben auf einem Grid gefriergetrocknet. Die Erfassung von Bildserien im TEM bzw. HAADF-STEM wurde mit einem Fischione-Modell 2020 Einzelneigungs-Tomographiehalter durchgeführt. Der Neigungsbereich dieser Bildserien betrug  $-72^\circ$  bis  $+72^\circ$  mit einem Neigungsinkrement von  $2^\circ$ . Die Rekonstruktionen der Neigungsserie wurden mit der Astra Toolbox für MATLAB durchgeführt. Die 3D-Rekonstruktionen und Visualisierung der AuNPC wurden mithilfe der Amira Software durchgeführt.

Die STEM gekoppelte Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) wurden mit einem Jeol JEM 2200 FS mithilfe eines SSD (*Silicon Drift*-Detektors, 100 mm<sup>2</sup>) durchgeführt.

### 8.2.4 Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS)

Die SAXS Messungen und Auswertung wurden nach Referenzen<sup>[244,245]</sup> mit hochkonzentrierten AuNP- und AuNPC-Dispersionen durchgeführt. Dabei wurde die Incoatec Röntgenquelle I $\mu$ S mit Quazar Montel Optik und eine Wellenlänge von 0.154 nm, sowie der CCD-Detektor Rayonix SX165 genutzt.

### 8.2.5 Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektren des Kapitels 6.3.1 wurden mithilfe des konfokalen Raman-Mikroskops Renishaw inVia mit einem 1024 x 512 CCD Detektor aufgenommen. Die Proben wurden jeweils mit einer Au<sup>0</sup>-Konzentration der verschiedenen Dispersionen von  $\approx 0.35 \text{ mmol L}^{-1}$  und einem Volumen von 40  $\mu\text{L}$  auf einem Objektträger eingetrocknet. Die RaR-Blindprobe wurde als Feststoff auf dem Objektträger gemessen. Die Anregungen erfolgten zum einen bei 785 nm Laserwellenlänge und 1 Sekunde Integrationszeit mit einem 50x Objektiv bei 3 mW Laserleistung. Zum anderen wurden analog weitere Messungen bei 633 nm Laserwellenlänge und 1 Sekunde Integrationszeit mit einem 50x Objektiv bei 3 mW Laserleistung durchgeführt.

Die Ramanspektren der in einer Sucrose-Lösung eingetrockneten AuNPC des Kapitels 6.3.2 wurden mithilfe eines Helium-Neon-Lasers ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ), einer Princeton Instruments ProEM EMCCD Kamera, einem Princeton Instruments Acton Spectra Pro 2300i und 2300 Spektrograph, einer ADwin Gold Box, einer Intevac IR CCD Kamera und einem Nikon Apo TIRF 100x Objektiv durchgeführt. Dazu wurden die optischen Dichten der Proben bei 633 nm anhand der Absorptionsspektren angeglichen (d.h. mit Wasser verdünnt oder durch Zentrifugation aufkonzentriert siehe Kapitel 8.11) und jeweils 11.4  $\mu\text{L}$  einer 60 %igen Sucrose-Lösung mit 88.6  $\mu\text{L}$  der AuNP-Probe vermischt. Anschließend wurden 4  $\mu\text{L}$  dieser Sucrose/AuNP-Lösung auf einem Objektträger eingetrocknet. Das Eintrocknen mit Sucrose verhindert den sog. *coffee-ring* Effekt.<sup>[264]</sup> Die eingetrockneten Proben wurden an verschiedenen Positionen mithilfe des Raman-Spektrometers bei 1 Sekunde Integrationszeit mit einem 100x Objektiv und bei 7 mW Laserleistung gemessen und gemittelt.

Die Ramanspektren in Dispersion wurden, wie bei den Messungen der Sucrose/AuNPC Proben (siehe oben), mithilfe desselben konfokalen Aufbaus, Lasers ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ), Ob-

jektives etc. bei verschiedenen Integrationszeiten (1 s, 10 s und 30 s) gemessen. Die Messungen wurden mit einer Flüssigkeitsküvette mit einer Schichtdicke von 0.1 mm aufgenommen. Die Laserleistung belief sich immer auf 6 - 7 mW und ist jeweils unter allen Spektren in der Beschreibung genannt. Alle Spektren die in dieser Arbeit verglichen werden sind unter identischen Bedingungen am selben Tag aufgenommen worden. Für die RaR-Vergleichsspektren wurde jeweils eine 1 mol L<sup>-1</sup> RaR in DMF Lösung hergestellt (NPT wurde unverdünnt gemessen, da bei Standardbedingungen flüssig). DMF wurde aufgrund der Lösungseigenschaften der RaR und des relativ hohen Siedepunkts (Reduzierung der Eintrocknung durch den Laser) ausgewählt. Die Intensitäten der Raman-Peaks in Counts pro Sekunde wurden automatisiert mit dem Peakanalyse-Minitool der Software OriginPro 2019b ermittelt. Dabei wurde die Peakhöhe vom Maximum des Peaks bis zu einer berechneten Basislinie gemessen. Die Basislinie wurde anhand der 2. Ableitung der Kurven und der Glättungsmethode des gleitenden Durchschnitts mit maximal 8 Ankerpunkten erstellt.

### 8.2.6 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die Proben wurden in deuteriertem Chloroform (mit Tetramethylsilan als interner Standard) gelöst und die <sup>1</sup>H-Spektren (400 MHz) mithilfe der Avance I 400 bzw. Avance III HD 400 NMR-Spektrometer der Firma Bruker gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software MestReNova 7.0.1 von Mestrelab Research S.L..

### 8.2.7 Sonstige Geräte und Techniken

Es wurde die Zentrifuge Sigma 3-18K, das MQuant Universalindikator-pH-Paper (pH 1 - 14) und das FiveEasy pH-Meter von Mettler-Toledo genutzt. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden zylindrische Magnetührstäbchen 30x7 mm verwendet. Niedrige Rührgeschwindigkeit bedeutet 150 rpm, moderate Rührgeschwindigkeit bedeutet 500 rpm und starke Rührgeschwindigkeit 1000 rpm.

## 8.3 AuNP Synthese

Die AuNP wurden in einer hochskalierten, kinetisch kontrollierten *seeded-growth* Synthese in Anlehnung an die Synthese von Puntès *et al.*<sup>[100]</sup> synthetisiert. Im ersten Schritt wurden 388 mg (1.3 mmol) Trinatriumcitrat-dihydrat in 100 mL Wasser gelöst und zu 500 mL unter Rückflusskühlung siedendem Wasser in einen 1 L Rundkolben hinzugefügt,

sodass sich eine  $2.2 \text{ mmol L}^{-1}$  Citrat-Lösung bildete. Die Lösung wurde anschließend wieder bis zum Sieden erhitzt, bei Erreichen des Siedepunktes wurden zügig 4 mL einer  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  Tetrachlorogold(III)-säure-Lösung unter starkem Rühren (elliptischer Magnetrührstab 40x15 mm) hinzugefügt und für 10 Minuten zum Sieden erhitzt. Im Verlauf der 10 Minuten färbte sich die Lösung von anfangs leicht gelblich nach rosa bis zu einer roten Färbung. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Heizbad entfernt und die Reaktionslösung auf ca. 90 - 92 °C abgekühlt. Währenddessen wurden 2 mL entnommen und mithilfe der UV-VIS-Spektroskopie und DLS untersucht. Bei Erreichen der 90 - 92 °C wurden 4 mL einer  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  Citrat-Lösung und 4 mL der  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  Tetrachlorogold(III)-säure-Lösung zügig zur Reaktionslösung hinzugegeben, um die Wachstumsphase der AuNP einzuleiten. Die Reaktionslösung wurde dann über einen Zeitraum von 30 Minuten unter konstantem, starkem Rühren auf 90 - 92 °C gehalten. Die rote Farbe der Lösung wurde innerhalb der 30 Minuten immer intensiver. Anschließend wurden 8 mL abgenommen und wieder mithilfe der UV-VIS-Spektroskopie und DLS untersucht. Wenn der gewünschte NP-Durchmesser noch nicht erreicht war, wurden wieder 4 mL einer  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  Citrat-Lösung und 4 mL der  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  Tetrachlorogold(III)-säure-Lösung zügig zur Reaktionslösung hinzugegeben, 30 Minuten bei 90 - 92 °C gerührt, 8 mL der Lösung entnommen, untersucht und so weiter, bis der gewünschte AuNP-Durchmesser (ca. 20 nm) bzw. die gewünschte LSPR-Position (ca. 524 nm) erreicht wurde. Die abgekühlte Reaktionslösung wurde schließlich in ein Braunglas gefüllt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Partikelkonzentration  $c_{np}$  wurde über die UV-VIS Extinktion bei 400<sup>[223]</sup> und 450 nm<sup>[224]</sup> bestimmt. Für detaillierte Informationen zu Durchmesser, Konzentration und LSPR-Position der AuNP-Chargen siehe Tabelle 6.1 in Kapitel 6.1.1.

## 8.4 AgNPs Synthese

Die AgNP wurden nach einer von Guerrini *et al.* modifizierten AgNP-Synthesemethode für sphärische AgNP mit einem Durchmesser von 40 nm im 250 mL Ansatz synthetisiert.<sup>[228]</sup> Dafür wurden die Glasgeräte und die Magnetrührstäbchen mit besonderer Sorgfalt gereinigt und mit Wasser für 30 min abgekocht. Die Synthese wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Zu Beginn wurden 250 mL Wasser unter Rückflusskühlung und starkem Rühren zum Sieden erhitzt. Bei Erreichen der Siedetemperatur wurden 2.27 mL einer  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  Trinatriumcitrat-Lösung und direkt im Anschluss 0.249 mL einer  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  Ascorbinsäure-Lösung unter Stickstoffgegenstrom zügig zum siedenden Wasser hinzuge-

fügt. Nach einer Minute wurden 0.744 mL einer  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  Silbernitrat-Lösung unter starkem Rühren zur Reaktionslösung beigefügt. Die Farbe der Reaktionslösung veränderte sich nach dieser Injektion relativ schnell von farblos zu gelblich. Die Reaktionslösung wurde anschließend weiter für 1 Stunde unter moderatem Rühren zum Sieden erhitzt, um eine vollständige Reaktion zu gewährleisten. Die abgekühlte Reaktionslösung wurde schließlich in ein Braunglas gefüllt und im Kühlschrank bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Partikelkonzentration  $c_{np}$  wurde über die UV-VIS Extinktion bei LSPR  $\lambda_{max}$ <sup>[230]</sup> bestimmt. Für detaillierte Informationen zu Durchmesser, Konzentration und LSPR-Position der AgNP-Charge siehe Tabelle 6.2 in Kapitel 6.1.2.

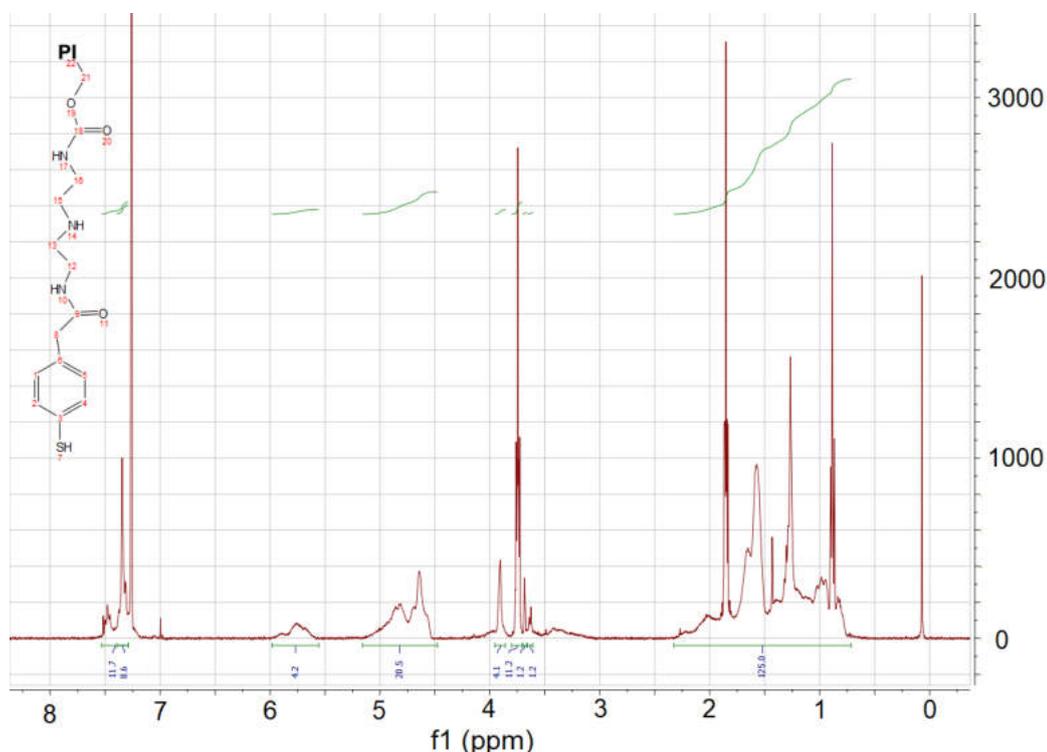
## 8.5 Polyisopren-Dithiocarbamat (PI-DTC) Synthese

Die Funktionalisierung wurde in Anlehnung an Referenz<sup>[239]</sup> durchgeführt. 2.5 Äquivalente an Kohlenstoffdisulfid ( $152 \text{ } \mu\text{g}$  in  $1 \text{ mL}$  *n*-Hexan,  $2.0 \text{ } \mu\text{mol}$ ) wurden zu einer  $1 \text{ mL}$  Lösung von PI-DETA in *n*-Hexan ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0.8 \text{ } \mu\text{mol}$ ) in eine Quarzglas-Spektralphotometer-Küvette hinzugefügt. Die Reaktion wurde via UV-VIS-Spektroskopie verfolgt und beendet, als die während der Reaktion ansteigende Absorption des Dithiocarbamat bei ca. 285 - 300 nm konstant blieb (siehe Abb. A.3). Nach dem Einengen wurden die Polymere mit ca.  $10 \text{ mL}$  kaltem Ethanol ( $\approx -17 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gefällt.

## 8.6 Polyisopren-Mercaptophenyllessigsäureester (PI-MPEE) Synthese

Die Synthese erfolgte generell mit der Schlenktechnik unter Stickstoffgasatmosphäre. Es wurden  $500 \text{ mg}$  ( $2.97 \text{ mmol}$ ) 4-Mercaptophenyllessigsäure (MPE) in einem Schlenkkolben dreimal evakuiert und wieder mit Stickstoffgas gespült und in  $20 \text{ mL}$  Chloroform gelöst. In einem zweiten Schlenkkolben wurden  $626 \text{ mg}$  ( $3.86 \text{ mmol}$ ) 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) ebenfalls dreimal evakuiert und wieder mit Stickstoffgas gespült und in  $10 \text{ mL}$  Chloroform gelöst. Anschließend wurde die MPE-Lösung langsam zur CDI-Lösung getropft und für 96 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung aus  $500 \text{ mg}$  PI-DETA ( $1300 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $0.386 \text{ mmol}$ ) in  $10 \text{ mL}$  Chloroform wurde ebenfalls dreimal evakuiert und wieder mit Stickstoffgas gespült und die aktivierte MPE-Lösung langsam zur PI-DETA-Lösung getropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 24 Stunden bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrock-

net, das Lösungsmittel im Grobvakuum (470 mbar) bei 40 °C eingengt und aus 20 mL kaltem Methanol ( $\approx -17$  °C) gefällt.



**Abbildung 8.1:** Die chemische Verschiebung und die Multiplizität der NMR-Resonanzsignale ( $^1\text{H-NMR}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C, TMS) von PI-DTC entsprechen den von PI-DETA veröffentlichten Werten in Referenz<sup>[44]</sup> von  $\delta$  [ppm] = 0.0 - 6.0. Die Resonanzsignale neben dem intensiven Peak von  $\text{CDCl}_3$  bei  $\delta$  [ppm] = 7.40 - 7.30 (m, 4 H, H des Phenylrings) weisen auf die Kopplung der aromatischen 4-Mercaptophenyllessigsäure an PI-DETA hin.

## 8.7 Phasentransfer

Die Citrat stabilisierten Nanopartikel wurden in einem zweiphasigen System von der Wasser- in eine *n*-Hexan-Phase transferiert. Der Phasentransfer basiert auf einem Ligandenaustausch von Citrat durch PI-DETA und folglich einem Polaritätswechsel der Ligandenhülle von polar zu unpolar. Die Standardprozedur verlief wie folgt: Eine wässrige 12.5 mL Nanopartikel@Citrat Dispersion (pH = 5.5) wurde in einem 40 mL Glasvial mit einer 7.5 mL PI-DETA/*n*-Hexan-Lösung mit der Konzentration  $c(\text{PI-DETA}) \text{ mol L}^{-1}$  überschichtet. Die Konzentration wurde anhand von Gleichung 6.2 in Kapitel 6.2.1 berechnet. Dabei wurden die Partikeloberfläche  $A_{\text{NP}}$  und die Oberflächenbelegung  $\rho_{\text{A}}(\text{PI-DETA})$  miteinbezogen, wobei die Annahme bestand, dass es sich bei den NP um perfekt sphä-

rische Objekte handelte. Das PI-DETA wurde aus einer  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $7.7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) Hexan-Stammlösung hinzugefügt. Bei der AuNP-Charge 2 aus Kapitel 6.1.1 wurde zum Beispiel bei den oben genannten Bedingungen bei jedem durchgeführten Phasentransfer  $203 \text{ }\mu\text{L}$  ( $1.6 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ ) der PI-DETA Stammlösung hinzugefügt. Der Phasentransfer und Ligandenaustausch wurde gestartet, indem die beiden Phasen durch starkes Rühren in dem verschlossenen Glasvial für mindestens 15 min emulgiert wurden. Der Prozess wurde dabei durch UV-VIS-Spektroskopie und DLS Messungen überwacht. Nach vollständiger Überführung wurden die Phasen mit einem 25 mL Scheidetrichter getrennt. Die in *n*-Hexan transferierten NP wurden anschließend im Kühlschrank bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Der Phasentransfer wurde ebenfalls bei  $\text{pH} = 11$  durchgeführt, wobei der pH-Wert der wässrigen Lösung mit einer wässrigen  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH-Lösung eingestellt wurde. Außer PI-DETA wurde PI-DTC, PI-MPEE, Octadecylamin, Oleylamin, 1-Octadecanthiol und 1-Octanthiol getestet. Standardmäßig wurden die Konzentrationen der jeweiligen Verbindungen anhand von Gleichung 6.2 in Kapitel 6.2.1 mit  $\rho_A = 3$  berechnet. Wenn dies zu keinem erfolgreichen Phasentransfer führte, wurde  $\rho_A$  schrittweise auf bis zu 8 Liganden pro  $\text{nm}^2$  (Inkrement =  $1 \text{ Lig} \cdot \text{nm}^{-2}$ ) erhöht und/oder anstatt von *n*-Hexan wurde Chloroform verwendet. Bei PI-MPEE wurden teilweise  $100 \text{ }\mu\text{L}$  einer wässrigen CTAB ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) Lösung hinzugefügt, um den Phasentransfer zu unterstützen.

## 8.8 RaR Codierung vor der Einkapselung

Die Nanopartikel@PI-DETA Dispersion in *n*-Hexan wurde zentrifugiert ( $9000 - 13000 \text{ g}$ ,  $15 \text{ min}$ ,  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ), der *n*-Hexan-Überstand entfernt, das Präzipitat unter Stickstoffgas-Strom gründlich getrocknet und in  $1 \text{ mL}$  THF redispersiert. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und die Dispersion wurde auf  $300 \text{ }\mu\text{L}$  eingengt und in ein  $4 \text{ mL}$  Glasvial überführt. Zu dieser eingengten THF-Dispersion wurden  $P = 33 \text{ } \%$ ,  $50 \text{ } \%$ ,  $66 \text{ } \%$ ,  $80 \text{ } \%$  oder  $100 \text{ } \%$  an Raman-Reportern im Verhältnis zur theoretischen Stoffmenge an PI-DETA mit einer Oberflächenbelegung von  $3 \text{ nm}^{-2}$  hinzugefügt. Die RaR-Stoffmengen zugabe  $n(\text{RaR})$  wurde entsprechend anhand der Nanopartikeloberfläche  $A_{\text{NP}}$  und der PI-DETA Oberflächenbelegung  $\rho_A(\text{PI-DETA})$  von  $3 \text{ nm}^{-2}$  für jede NP-Charge anhand von Gleichung 8.1 (vgl. Gleichung 6.2 in Kapitel 6.2.1) berechnet.

$$n(\text{RaR}) = (c(\text{NP}) \cdot V(\text{H}_2\text{O}, \text{PT}) \cdot (A_{\text{NP}} \cdot \rho_A)) \cdot P[\%] \quad (8.1)$$

Die Berechnung ist beispielhaft in Gleichung 8.2 für AuNP-Charge 2 aus Kapitel 6.1.1 und einer 66 % Raman-Reporter Zugabe im Verhältnis zu PI-DETA gezeigt.

$$1.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} = (3.2 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \cdot 12.5 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot (1.3 \cdot 10^3 \text{ nm}^2 \cdot 3.0 \text{ nm}^{-2})) \cdot 0.66 \quad (8.2)$$

Zu den 300  $\mu\text{L}$  der AuNP@PI-DETA in THF wurden entsprechend bei Charge 2 aus Kapitel 6.1.1 mit  $P = 33 \%$ ,  $50 \%$ ,  $66 \%$ ,  $80 \%$  oder  $100 \%$  folgende RaR Zugaben aus jeweils einer  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  RaR/THF-Stammlösungen gemacht:  $51 \mu\text{L}$  ( $5.2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$ ),  $78 \mu\text{L}$  ( $7.8 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$ ),  $103 \mu\text{L}$  ( $1.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ ),  $125 \mu\text{L}$  ( $1.3 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ ) oder  $156 \mu\text{L}$  ( $1.6 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ ). Anschließend wurde die Lösung mit frischem THF auf  $1.5 \text{ mL}$  aufgefüllt und bei niedriger Rührgeschwindigkeit (zylindrischer Magnetrührstab  $12 \times 4.5 \text{ mm}$ ) für 1, 3, 6, 15 oder 20 Stunden inkubiert. Das weitere Vorgehen ist dem nächsten Kapitel 8.9 ab der PI-*b*-PEO-Zugabe zu entnehmen.

## 8.9 Mikrofluidik-Einkapselung

Die Nanopartikel@PI-DETA Dispersion in *n*-Hexan wurde zentrifugiert ( $9000 - 13000 \text{ g}$ ,  $15 \text{ min}$ ,  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ), der *n*-Hexan-Überstand entfernt, das Präzipitat unter Stickstoffgas-Strom gründlich getrocknet und in  $1 \text{ mL}$  THF redispersiert. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und die Dispersion wurde auf  $300 \mu\text{L}$  eingengt. Schließlich wurde das Volumen  $V(\text{PI-}b\text{-PEO})$  einer  $75 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  PI-*b*-PEO Stammlösung (THF<sup>1</sup>) hinzugegeben und die Lösung mit frischem THF auf das Volumen von  $1.5 \text{ mL}$  verdünnt. Das Volumen  $V(\text{PI-}b\text{-PEO})$  und damit die Stoffmengen zugabe an PI-*b*-PEO wurde im Verhältnis zur Oberflächenbelegung  $\rho_A(\text{PI-DETA})$  (PI-*b*-PEO:PI-DETA = 1:2.5 bis 1:60) berechnet. Das bedeutet beispielsweise für die AuNP-Charge 2 aus Kapitel 6.1.1 eine Zugabe der PI-*b*-PEO-Stammlösung im Bereich von  $832$  bis  $35 \mu\text{L}$  ( $6.2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$  bis  $2.6 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$ ). Die Einkapselung bzw. Assemblierung der Nanopartikel wurde mit einem computergesteuerten Mikrofluidiksystem (neMESYS pump von Cetoni, Gera, Germany) mit einem Reaktorchip, der aus Mischkammern mit einem Durchmesser von  $45 \mu\text{m}$  bestand, durchgeführt. Der Aufbau des Mikrofluidiksystems ist schematisch in Abbildung 6.11 in Kapitel 6.2.2 dargestellt. Nach der Zugabe des PI-*b*-PEO wurde die Dispersion spritzenfiltriert ( $0.2 \mu\text{m}$  PTFE) und in die Spritze des Pumpsystems eingesaugt. Anschließend erfolgte die automatisierte Mischung und Überführung der Nanopartikel mit/in Wasser mit einem

<sup>1</sup>Aufgrund des hohen Dampfdrucks von THF wurde die Stammlösung mindestens nach 7 Tagen neu angesetzt und immer bei  $\approx -17 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Lichtausschluss gelagert.

gesamten Volumenverhältnis (Outputverhältnis) von 1:9 (THF:Wasser) bei der Standardprozedur. Die erhaltene Dispersion wurde auf einem Oritalschüttler bei 150 rpm und RT für 15 Minuten inkubiert.

## 8.10 RaR Codierung nach der Einkapselung

Für die statistische Versuchsplanung wurde die AuNP-Charge 3 Kapitel 6.1.1 genutzt, die mit 406  $\mu\text{L}$  PI-DETA Stammlösung ( $3.2 \cdot 10^{-7}$  mol) in Hexan transferiert wurden (siehe dazu Kapitel 8.7). Bei der Codierung nach der Einkapselung wurde die Mikrofluidik-Einkapselung mit folgenden Parametern (siehe Tabelle 8.1) wie in Kapitel 8.9 durchgeführt. Die Zugabe des BPDT erfolgte nach der Mikrofluidik-Einkapselung durch eine  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  BPDT/THF-Lösung. Die NP wurden anschließend 1 Stunde bei moderater Rührgeschwindigkeit inkubiert, bevor wie in Kapitel 8.11 fortgefahren wurde.

**Tabelle 8.1:** Versuchsplan der Codierung der AuNPC nach der Assemblierung mithilfe statistischer Versuchsplanung.  $V(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 75 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .  $V(\text{BPDT}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Die gesamte, finale Flussrate (gesamter *Output*) wurde immer konstant auf  $16 \text{ mL min}^{-1}$  gehalten.

Versuch	PI- <i>b</i> -PEO: PI-DETA	V(PI- <i>b</i> -PEO) [ $\mu\text{L}$ ]	BPDT [eqv.]	V(BPDT) [ $\mu\text{L}$ ]	Flussrate Wasser (x2) [ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ]	Flussrate THF [ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ]	Verhältnis Flussraten
1	1:16.5	260	355	27	7.2	1.6	9
2	1:16.5	260	355	27	7.2	1.6	9
3	1:8.5	504	565	43	6.8	2.5	6.5
4	1:3	1429	355	27	7.2	1.6	9
5	1:16.5	260	355	27	7.2	11	9
6	1:8.5	504	145	11	7.3	1.4	11.5
7	1:24.5	175	565	43	6.8	2.5	6.5
8	1:16.5	260	355	27	6.3	3.3	4.8
9	1:16.5	260	355	27	7.4	1.2	13.2
10	1:16.5	260	355	27	7.2	1.6	9
11	1:24.5	175	145	11	7.3	1.4	11.5
12	1:16.5	260	2	0.1	7.2	1.6	9
13	1:16.5	260	355	27	7.2	1.6	9
14	1:30	143	355	27	7.2	1.6	9
15	1:24.5	175	565	43	7.3	1.4	11.5
16	1:16.5	260	355	27	7.2	1.6	9
17	1:24.5	175	145	11	6.8	2.5	6.5
18	1:8.5	504	565	43	7.3	1.4	11.5
19	1:8.5	504	145	11	6.8	2.5	6.5
20	1:16.5	260	708	54	7.2	1.6	9
21	1:8.5	504	145	11	7.6	0.74	20.5
22	1:24.5	175	565	43	7.6	0.74	20.5
23	1:24.5	175	145	11	7.6	0.74	20.5
24	1:8.5	504	565	43	7.6	0.74	20.5

Die Erstellung des Versuchsplans und die Auswertung der Proben wurde mithilfe der Statistik- und Datenanalysesoftware Cornerstone von camLine durchgeführt. Weitere Details sind in Kapitel 6.3.1 und im Anhang in Abbildung A.15 dargestellt.

## 8.11 Emulsionspolymerisation

Die Saat-Emulsionspolymerisation wurde unter Stickstoffgasatmosphäre durchgeführt. Die Dispersion aus PI-*b*-PEO eingekapselten Nanopartikeln bzw. Nanopartikelclustern wurde mit 25 mL Wasser verdünnt und in einen 50 mL Dreihalskolben überführt. Anschließend wurde die Dispersion mindestens 30 Minuten bei 60 °C bei offenem Gefäß gerührt, um das enthaltene THF zu entfernen. Danach wurde der Dreihalskolben geschlossen und vorsichtig dreimal evakuiert und wieder mit Stickstoffgas gespült, um THF möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend wurden bei der Standardprozedur der AuNP 6  $\mu\text{L}$  (53  $\mu\text{mol}$ ) frisch destilliertes Styrol und 1.4  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{mol}$ ) frisch destilliertes Divinylbenzol zügig im Stickstoffgegenstrom hinzugefügt. Bei der Standardprozedur der AgNP wurden 2.3  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol}$ ) Styrol und 0.5  $\mu\text{L}$  (4  $\mu\text{mol}$ ) Divinylbenzol zügig im Stickstoffgegenstrom hinzugefügt. Die Dicke der Polymerhülle um die Nanopartikel kann variiert werden, wenn das Verhältnis von Styrol zu *para*-Divinylbenzol konstant auf 1:10 gehalten wird. Dieses Verhältnis wurde auf der Grundlage des molaren *para*-Divinylbenzol-Isomeranteils des Herstellers ( $\approx 55\%$ ) berechnet. Anschließend wurde der Dreihalskolben geschlossen und die Dispersion über 15 Minuten bei moderater Rührgeschwindigkeit und weiterhin 60 °C inkubiert. Um die radikalische Polymerisationsreaktion zu starten wurden 100  $\mu\text{L}$  einer frisch angesetzten, wässrigen 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid-Lösung (VA044,  $c(\text{VA044}) = 60 \text{ mmol L}^{-1}$  (bei AuNP);  $c(\text{VA044}) = 30 \text{ mmol L}^{-1}$  (bei AgNP)) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 3 Stunden bei 60 °C bei moderater Rührgeschwindigkeit gerührt. Leere Mizellen wurde über Zentrifugation (500 - 5000 g, 15 Minuten) und Abtrennung des Überstand entfernt.

## 8.12 Kontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation

Die kontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation wurde anhand des Protokoll von Steinigeweg *et al.*<sup>[290]</sup> durchgeführt, um die Größenverteilung der eingekapselten NP/NPC einzuengen. Die präparierten NPC wurden via Zentrifugation (500 - 5000 g, 15 Minuten) und Abnahme des Überstands auf 500  $\mu\text{L}$  aufkonzentriert und oben auf den Dichtegra-

dienten aufgetragen. Anschließend wurden die NP/NPC mithilfe des 11 180 *Swing Out* Rotors in der Sigma-3-18K-Zentrifuge für 60 Minuten bei 10 °C und 4300 g zentrifugiert. Die Fraktionen wurden mithilfe einer horizontal gebogenen Kanüle von oben nach unten abgenommen und über einen Dialyseschritt (MWCO 3.5 - 5 kD, 4 Tage, 3 mal Lösung erneuert) gereinigt.

### 8.13 Stabilitätstest

Die Stabilitätstest wurden in einer Quarzglas-Spektralphotometer-Küvette in 1 mL Dispersion durchgeführt. Dabei wurde die Extinktion der NP/NPC über einen Zeitraum von 48 Stunden aufgenommen. Salpetersäure (0.1 Vol-%, jeweils in der finalen 1 mL Dispersion) und frisches Königswasser (0.1 Vol-% und 10 Vol-%) wurden bei sowohl Au als auch AgNP/NPC getestet. Des Weiteren wurde Kaliumcyanid ( $0.2 \text{ mol L}^{-1}$ ) bei den AuNP/NPC und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1 Vol-%) bei den AgNP/NPC getestet.

### 8.14 Zellviabilitätstest

Die NP wurden bei 1000 rpm (1:60 NPC), 1500 rpm (1:30 NPC), 2000 rpm (1:20 NPC), 2500 rpm (1:10 NPC) und 3000 rpm (1:2.5 NPC) für 20 Minuten dreimal zentrifugiert und in Wasser redispergiert, um größere Aggregate, leere Mizellen und andere Verunreinigungen zu entfernen. Die HeLa-, A549- und HDF-Zellen wurden in DMEM-Medium (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin-Streptomycin gezüchtet. Die Zellen wurden entweder mit  $1 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung (HeLa und A549) oder mit  $5 \times 10^3$  Zellen pro Vertiefung (HDF) in 96-Well Mikrotiterplatten ausplattiert und über Nacht anhaften gelassen. Am nächsten Tag wurde das Zellmedium mit 100  $\mu\text{L}$  eines AuNP/NPC und AgNP/NPC-Mediums (NP dispergiert in DMEM-Medium) ausgetauscht. Dabei wurden 10fache DMEM-Verdünnungen ausgehend von  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Au) und  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Ag) genutzt. Die anfänglich verwendete Verdünnung lag nie unter 1:3, um die zytotoxischen Wirkungen des Wassers zu minimieren. Die NP/NPC wurden anschließend über 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die NP/NPC durch einen Waschschrift entfernt und der MTT-Assay (Roche) gestartet, wobei die Extinktion bei 550 nm gemessen wurde. Die Ergebnisse wurden als Prozent der Kontrollzellen-Extinktion ausgedrückt. Im Fall der höchsten AuNP-Konzentration ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) wurden Fotos der Plattenvertiefungen mit einem Zeiss Cell Observer Mi-

kroskop (20x Objektiv (0.8 N.A) und Farbkamera) aufgenommen. Alle Einstellungen in Bezug auf die Fotoaufnahme und der Nachbearbeitung (Belichtungszeit, Gammaeinstellungen etc.) waren identisch.

### 8.15 Zellpräparation für TEM-Analyse

Die Zellen wurden entweder mit  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung (HeLa und A549) oder mit  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung (HDF) in 12-Well Mikrotiterplatten ausplattiert und über Nacht anhaften gelassen. Anschließend wurde das Zellmedium mit 800  $\mu\text{L}$  NP/DMEM-Lösung (Finale NP-Konzentration  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ausgetauscht. Die NP wurden im Anschluss über 48 Stunden inkubiert. Danach wurden die NP durch einen Waschschrift entfernt und die angehafteten Zellen mit warmem DMEM-Medium gewaschen. Die Zellen wurden durch Trypsin gelöst und mit dem Sorensens-Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in einer Lösung aus Formaldehyd und Glutaraldehyd fixiert. Die Proben wurden in Agarose eingebettet und in einer Ethanolreihe dehydratisiert, bevor sie in Harz eingebettet wurden. Auf einem Ultramikrotom wurden 80 - 100 nm Schichten geschnitten und mit Uranylacetat und Bleicitrat nachgefärbt. Die TEM-Aufnahmen wurden schließlich mit einem JEOL JEM- 1400PLUS bei 120 kV Beschleunigungsspannung auf einem Kohlenstoff-beschichteten Kupfergrid aufgenommen.

### 8.16 Zellpräparation für Reflexions- und Fluoreszenz-Mikroskopie

Die HeLa-Zellen wurden mithilfe der optischen Mikroskopie in 96-Well Mikrotiterplatten ausplattiert ( $2 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung) und über Nacht anhaften gelassen. Anschließend wurde das Zellmedium mit 200  $\mu\text{L}$  NP/DMEM-Lösung (Finale NP-Konzentration  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ausgetauscht. Die NP wurden anschließend über 48 Stunden inkubiert und ohne einen Waschschrift im konfokalen Reflexionsmodus (Zeiss 880 Confocal Scanning Mikroskop, C-Apochromat 40x Objektiv) mit einer 633 nm Laserquelle und 18 nm Detektorfenster zwischen 624 und 642 nm abgebildet. Dabei wurden stets dieselben Parameter für die Lochblende, die Laserleistung, die Aufnahmezeit und die Nachbearbeitung verwendet. Es wurde ein Drei-Pixel-Medianfilter auf den Reflexionskanal angewendet. Die Bilder sind in Original-Schwarzweiß und Falschfarben in Kombination mit den Hellfeld-Transmissionsbildern gezeigt. Nach dieser Aufnahme wurden die Zellmedien durch ein

Zellmedium ersetzt, das Fluorophore enthielt, die lebende und tote Zellen markieren (Abcam; Apoptose / Nekrose-Nachweiskit). Anschließend wurden Bilder bei den Anregungswellenlängen 405 nm (lebend Fluorophor, blau), 488 nm (Apoptose-Fluorophor, grün) und 597 nm (Nekrose-Fluorophor, rot) aufgenommen. Bei jeder Aufnahme wurden wieder dieselben Parameter für die Lochblende, die Laserleistung, die Aufnahmezeit und die Nachbearbeitung (inklusive Drei-Pixel-Medianfilter) verwendet.

## Literaturverzeichnis

- [1] E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P. G. Etchegoint, *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 13794–13803.
- [2] L. Litti, M. Meneghetti, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2019**, *21*, 15515–15522.
- [3] Y. Xia, *Angewandte Chemie - International Edition* **2014**, *53*, 12268–12271.
- [4] P. Cameron, K. Vaupel, R. Buschmann, *BUND Publikationen: Aus dem Labor auf den Teller* **2018**, *Sep.*, 7ff.
- [5] A. Reihlen, D. Jepsen, *NanoDialog der Bundesregierung: FachDialog Nanomedizin* **2013**, *Okt.*, 6ff.
- [6] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 1402–1437.
- [7] S. Sepsur, N. Laryea, S. Goedicke, F. Groß, *Nanotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*, Vincentz Network, Hannover **2019**, 13ff.
- [8] D. Cucinotta, M. Vanelli, *Acta Bio Medica Atenei Parmensis* **2020**, *91*, 157–160.
- [9] N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G. F. Gao, W. Tan, *New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 727–733.
- [10] Editorial, *Nature Nanotechnology* **2020**, *15*, 617–617.
- [11] W. Van Damme, R. Dahake, A. Delamou, B. Ingelbeen, E. Wouters, G. Vanham, R. Van De Pas, J. P. Dossou, P. Ir, S. Abimbola, S. Van Der Borght, D. Narayanan, G. Bloom, I. Van Engelm, M. A. Ag Ahmed, J. A. Kiendrébégo, K. Verdonck, V. De Brouwere, K. Bello, H. Kloos, P. Aaby, A. Kalk, S. Al-Awlaqi, N. S. Prashanth, J. J. Muyembe-Tamfum, P. Mbala, S. Ahuka-Mundeke, Y. Assefa, *BMJ Global Health* **2020**, *5*, 1–16.
- [12] K. Dardir, H. Wang, B. E. Martin, M. Atzampou, C. B. Brooke, L. Fabris, *The Journal of Physical Chemistry C* **2020**, *124*, 3211–3217.

- [13] D. Zhang, X. Zhang, R. Ma, S. Deng, X. Wang, X. Zhang, X. Huang, Y. Liu, G. Li, J. Qu, Y. Zhu, J. Li, *medRxiv* **2020**, *86*, 2020.05.02.20086876.
- [14] G. Pillai. Nanotechnology Toward Treating Cancer. In *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*, S. S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra, S. B. T. A. o. T. N. D. Thomas, D. Systems, editors, 221–256. Elsevier **2019**.
- [15] A. Jemal, F. Bray, J. Ferlay, *CA Cancer J Clin* **1999**, *49*, 1,33–64.
- [16] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**, *68*, 394–424.
- [17] WHO. Cancer Key statistics, <https://www.who.int/cancer/resources/keyfacts/en/>, Zugriff 29.08.2020, **2020**.
- [18] X. Qian, X. H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, S. Nie, *Nature Biotechnology* **2008**, *26*, 83–90.
- [19] L. A. Lane, X. Qian, S. Nie, *Chemical Reviews* **2015**, *115*, 10489–10529.
- [20] X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. Nie, *Nature biotechnology* **2004**, *22*, 969–976.
- [21] Z. Liu, W. Cai, L. He, N. Nakayama, K. Chen, X. Sun, X. Chen, H. Dai, *Nature Nanotechnology* **2007**, *2*, 47–52.
- [22] R. Weissleder, K. Kelly, E. Y. Sun, T. Shtatland, L. Josephson, *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 1418–1423.
- [23] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Chemical Physics Letters* **1974**, *26*, 163–166.
- [24] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 5. Aufl., WILEY-VCH, Weinheim **2013**, 467ff.
- [25] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 1667–1670.
- [26] S. Nie, S. R. Emory, *Science* **1997**, *275*, 1102–1106.
- [27] Y. Liu, J. R. Ashton, E. J. Moding, H. Yuan, J. K. Register, A. M. Fales, J. Choi, M. J. Whitley, X. Zhao, Y. Qi, Y. Ma, G. Vaidyanathan, M. R. Zalutsky, D. G. Kirsch, C. T. Badea, T. Vo-Dinh, *Theranostics* **2015**, *5*, 946–960.
- [28] M. F. Tsai, S. H. G. Chang, F. Y. Cheng, V. Shanmugam, Y. S. Cheng, C. H. Su, C. S. Yeh, *ACS Nano* **2013**, *7*, 5330–5342.

- [29] J. B. Vines, J. H. Yoon, N. E. Ryu, D. J. Lim, H. Park, *Frontiers in Chemistry* **2019**, *7*, 1–16.
- [30] J. Nam, H. Nam, S. Jung, S. Hwang, T. Wang, J. Hur, K. Im, N. Park, K. H. Kim, S. Kim, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 4105–4109.
- [31] Y. Gao, Y. Li, J. Chen, S. Zhu, X. Liu, L. Zhou, P. Shi, D. Niu, J. Gu, J. Shi, *Biomaterials* **2015**, *60*, 31–41.
- [32] S.-H. Seo, B.-M. Kim, A. Joe, H.-W. Han, X. Chen, Z. Cheng, E.-S. Jang, *Biomaterials* **2014**, *35*, 3309–3318.
- [33] S. Jung, J. Nam, S. Hwang, J. Park, J. Hur, K. Im, N. Park, S. Kim, *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 7674–7681.
- [34] P. Huang, O. Pandoli, X. Wang, Z. Wang, Z. Li, C. Zhang, F. Chen, J. Lin, D. Cui, X. Chen, *Nano Research* **2012**, *5*, 630–639.
- [35] P. Wu, Y. Gao, H. Zhang, C. Cai, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 7692–7699.
- [36] W. Lu, A. K. Singh, S. A. Khan, D. Senapati, H. Yu, P. C. Ray, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 18103–18114.
- [37] W. E. Doering, S. Nie, *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 6171–6176.
- [38] S. Schlücker, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1344–1354.
- [39] K. C. Bantz, A. F. Meyer, N. J. Wittenberg, H. Im, Ö. Kurtulus, S. H. Lee, N. C. Lindquist, S.-H. Oh, C. L. Haynes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11551–11567.
- [40] ACS Newsroom. Studying viral outbreaks in single cells could reveal new ways to defeat them (20.08.2020), <http://www.acs.org/fall2020pressconferences>, Zugriff: 28.08.2020, **2020**.
- [41] 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.
- [42] C. Schmidtke, E. Poselt, J. Ostermann, A. Pietsch, H. Kloust, H. Tran, T. Schotten, N. G. Bastus, R. Eggers, H. Weller, *Nanoscale* **2013**, *5*, 7433–7444.
- [43] H. Kloust, C. Schmidtke, A. Feld, T. Schotten, R. Eggers, U. E. A. Fittschen, F. Schulz, E. Poeselt, J. Ostermann, N. G. Bastus, H. Weller, E. Pösel, J. Ostermann, N. G. Bastús, H. Weller, *Langmuir* **2013**, *29*, 4915–4921.
- [44] E. Pösel, C. Schmidtke, S. Fischer, K. Peldschus, J. Salamon, H. Kloust, H. Tran, A. Pietsch, M. Heine, G. Adam, U. Schumacher, C. Wagener, S. Förster, H. Weller,

- ACS Nano* **2012**, *6*, 3346–3355.
- [45] C. Schmidtke, H. Lange, H. Tran, J. Ostermann, H. Kloust, N. G. Bastus N. G.s, J.-P. Merkl, C. Thomsen, H. Weller, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 8570–8578.
- [46] J.-P. Merkl, J. Ostermann, C. Schmidtke, H. Kloust, R. Eggers, A. Feld, C. Wolter, A.-M. Kreuziger, S. Flessau, H. Mattoussi, H. Weller, *Proc. SPIE* **2014**, *8955*, 89551X–89551X–12.
- [47] C. Schmidtke, R. Eggers, R. Zierold, A. Feld, H. Kloust, C. Wolter, J. Ostermann, J.-P. Merkl, T. Schotten, K. Nielsch, H. Weller, *Langmuir* **2014**, *30*, 11190–11196.
- [48] D. Mingos, P. Michael, *Historical Introduction to Gold Colloids, Clusters and Nanoparticles*, Springer International Publishing, Cham **2014**, 3f.
- [49] C. Houscroft, A. Sharpe, *Anorganische Chemie*, 2. aktuali. Aufl., Pearson Studium, München **2006**, 152–154.
- [50] D. Astruc, *Chemical Reviews* **2020**, *120*, 461–463.
- [51] M. Faraday, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, *147*, 145–181.
- [52] R. Feynman, *Engineering and Science* **1960**, *23*, 22–36.
- [53] D. Thompson, *Gold Bulletin* **2007**, *40*, 267–269.
- [54] C. Janiak, H. J. Meyer, D. Gudat, P. Kurz, *Riedel Moderne Anorganische Chemie*, 5. Aufl., de Gruyter, Berlin **2018**, 210ff, 236ff.
- [55] F. Font, T. G. Myers, *Journal of Nanoparticle Research* **2013**, *15*, 2086, 1–13.
- [56] D. Astruc, F. Lu, J. R. Aranzaes, *Angewandte Chemie - International Edition* **2005**, *44*, 7852–7872.
- [57] S. Schnittger, M. Sinha, *MRS Bulletin* **2007**, *32*, 760–769.
- [58] H. Althues, J. Henle, S. Kaskel, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1454–1465.
- [59] B. O'Regan, M. Grätzel, *Nature* **1991**, *353*, 737–740.
- [60] W. Barthlott, Z. Cerman, A. K. Stosch, *Biologie in unserer Zeit* **2004**, *34*, 290–296.
- [61] D. J. Norris, Y. A. Vlasov, *Advanced Materials* **2001**, *13*, 371–376.
- [62] G. Kandasamy, D. Maity, *International journal of pharmaceutics* **2015**, *496*, 191–218.
- [63] W. Wu, C. Z. Jiang, V. A. L. Roy, *Nanoscale* **2016**, *8*, 19421–19474.

- [64] B. Pelaz, V. Grazu, A. Ibarra, C. Magen, P. Del Pino, J. M. De La Fuente, *Langmuir* **2012**, *28*, 8965–8970.
- [65] L. Scarabelli, M. Schumacher, D. Jimenez de Aberasturi, J. P. Merkl, M. Henriksen-Lacey, T. Milagres de Oliveira, M. Janschel, C. Schmidtke, S. Bals, H. Weller, L. M. Liz-Marzán, *Advanced Functional Materials* **2019**, *29*, 1809071.
- [66] F. Thielbeer, S. V. Chankeshwara, M. Bradley, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 4386–4391.
- [67] V. Lesnyak, M. Yarema, S. Miao, *Frontiers in Chemistry* **2019**, *7*, 684.
- [68] R. Gross, A. Marx, *Festkörperphysik*, 3. Aufl., de Gruyter, Berlin **2018**, 316.
- [69] H. Weller. <https://www.chemie.uni-hamburg.de/institute/pc/arbeitsgruppen/weller.html>, Zugriff: 31.04.2020.
- [70] H. Weller, *Adv Mater.* **1993**, *5*, 88–95.
- [71] L. E. Brus, *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 4403–4409.
- [72] D. Bertram, H. Weller, *Phy. J.* **2002**, *1*, 47–52.
- [73] H. Weller, *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 41–53.
- [74] T. Kippeny, L. A. Swafford, S. J. Rosenthal, *Journal of Chemical Education* **2002**, *79*, 1094–1100.
- [75] L. Brus, *Journal of Physical Chemistry* **1986**, *90*, 2555–2560.
- [76] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi, O. M. Maragò, M. A. Iatì, *Journal of Physics Condensed Matter* **2017**, *29*.
- [77] J. Spadavecchia, E. Apchain, M. Albéric, E. Fontan, I. Reiche, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 8363–8366.
- [78] M. Blosi, S. Albonetti, F. Gatti, G. Baldi, M. Dondi, *Dyes and Pigments* **2012**, *94*, 355–362.
- [79] R. H. Lambertson, C. A. Lacy, S. D. Gillespie, M. C. Leopold, R. H. Coppage, *Journal of the American Ceramic Society* **2017**, *100*, 3943–3951.
- [80] K. Bammel, *Physik Journal* **2006**, *5*, 52–53.
- [81] I. Freestone, N. Meeks, M. Sax, C. Higgitt, *Gold Bulletin* **2008**, *40*, 270–277.
- [82] British Museum Collection Database. The Lycurgus Cup, Lizenz: CC-BY-NC-SA 4.0, [https://www.britishmuseum.org/collection/object/H\\_1958-1202-1](https://www.britishmuseum.org/collection/object/H_1958-1202-1), Zugriff: 31.03.2020.

- [83] D. J. Barber, I. C. Freestone, *Archaeometry* **1990**, *32*, 33–45.
- [84] H. H. Jeong, E. Choi, E. Ellis, T. C. Lee, *Journal of Materials Chemistry B* **2019**, *7*, 3480–3496.
- [85] M. Kociak, O. Stéphan, *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 3865–3883.
- [86] S. A. Maier, *Plasmonics - Fundamentals and Applications*, 1. Aufl., Springer, New York **2007**, 5ff, 159ff.
- [87] H. Qian, M. Zhu, Z. Wu, R. Jin, *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 1470–1479.
- [88] M. F. Ashby, P. J. Ferreira, D. L. Schodek, *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design*, Butterworth-Heinemann, Boston **2009**, 227ff.
- [89] M. Li, S. K. Cushing, N. Wu, *Analyst* **2015**, *140*, 386–406.
- [90] A. E. Rider, K. Ostrikov, S. A. Furman, *European Physical Journal D* **2012**, *66*.
- [91] P. Drude, *Annalen der Physik* **1900**, *306*, 566–613.
- [92] S. Schlücker, *Angewandte Chemie - International Edition* **2014**, *53*, 4756–4795.
- [93] G. Mie, *Annalen der Physik* **1908**, *330*, 377–445.
- [94] G. V. Hartland, *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 3858–3887.
- [95] H. Froehlich, *Theory of dielectrics; dielectric constant and dielectric loss*, Clarendon Press, Oxford **1958**.
- [96] M. I. Stockman, *Physics Today* **2011**, *64*, 39–44.
- [97] S. K. Ghosh, T. Pal, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4797–4862.
- [98] A. Guerrero-Martínez, M. Grzelczak, L. M. Liz-Marzán, *ACS Nano* **2012**, *6*, 3655–3662.
- [99] A. F. Koenderink, A. Alù, A. Polman, *Science* **2015**, *348*, 516–521.
- [100] N. G. Bastus, J. Comenge, V. Puntès, *Langmuir* **2011**, *27*, 11098–11105.
- [101] A. Tcherniak, J. W. Ha, S. Dominguez-Medina, L. S. Slaughter, S. Link, *Nano Letters* **2010**, *10*, 1398–1404.
- [102] E. A. Coronado, E. R. Encina, F. D. Stefani, *Nanoscale* **2011**, *3*, 4042–4059.
- [103] K. E. Fong, L. Y. L. Yung, *Nanoscale* **2013**, *5*, 12043–12071.
- [104] C. D. Geddes, *Reviews in Plasmonics 2017*, 4. Aufl., Springer, Cham **2019**, 1ff, 83ff, 95ff.
- [105] J. Yguerabide, E. E. Yguerabide, *Analytical Biochemistry* **1998**, *262*, 157–176.

- [106] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Coordination Chemistry Reviews* **2005**, *249*, 1870–1901.
- [107] N. J. Halas, S. Lal, W.-S. Chang, S. Link, P. Nordlander, *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 3913–3961.
- [108] A. Tao, P. Sinsersuksakul, P. Yang, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 4597–4601.
- [109] F. Hao, Y. Sonnefraud, P. V. Dorpe, S. A. Maier, N. J. Halas, P. Nordlander, *Nano Letters* **2008**, *8*, 3983–3988.
- [110] S. Mukherjee, H. Sobhani, J. B. Lassiter, R. Bardhan, P. Nordlander, N. J. Halas, *Nano Letters* **2010**, *10*, 2694–2701.
- [111] C. L. Nehl, N. K. Grady, G. P. Goodrich, F. Tam, N. J. Halas, J. H. Hafner, *Nano Letters* **2004**, *4*, 2355–2359.
- [112] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 7238–7248.
- [113] S. Schlücker, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4852–4894.
- [114] S. Farooq, R. de Araujo, *Open Journal of Applied Sciences* **2018**, *08*, 126–139.
- [115] J. D. Jackson, *Klassische Elektrodynamik*, 5. Aufl., de Gruyter, Berlin/Boston **2014**, 169ff, 474ff.
- [116] V. Rivera, F. Ferri, E. Marega Jr., *Plasmonics - Principles and Applications*, Chapter 11, InTech, Rijeka **2012**, 283ff.
- [117] G. Y. Yao, Q. L. Liu, Z. Y. Zhao, *Catalysts* **2018**, *8*.
- [118] J. Katyal, R. Soni, *Plasmonics* **2015**, *10*.
- [119] J. M. McMahon, S. K. Gray, G. C. Schatz, *Phys. Rev. B* **2010**, *82*, 35423.
- [120] R. N. Cassar, D. Graham, I. Larmour, A. W. Wark, K. Faulds, *Vibrational Spectroscopy* **2014**, *71*, 41–46.
- [121] S. Hong, X. Li, *Journal of Nanomaterials* **2013**, *2013*, 790323.
- [122] K. G. Stamplecoskie, J. C. Scaiano, V. S. Tiwari, H. Anis, *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 1403–1409.
- [123] Goldys, K. Drozdowicz-Tomsia. Gold and Silver Nanowires for Fluorescence Enhancement. In *Nanowires - Fundamental Research*. IntechOpen, London **2011**.
- [124] J. I. Gersten, A. Nitzan, *Surface Science* **1985**, *158*, 165–189.

- [125] Z. Zhong, S. Patskovskyy, P. Bouvrette, J. H. T. Luong, A. Gedanken, *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 4046–4052.
- [126] T. Jensen, L. Kelly, A. Lazarides, G. C. Schatz, *Journal of Cluster Science* **1999**, *10*, 295–317.
- [127] T. Atay, J. H. Song, A. V. Nurmikko, *Nano Letters* **2004**, *4*, 1627–1631.
- [128] E. Prodan, C. Radloff, N. J. Halas, P. Nordlander, *Science* **2003**, *302*, 419–422.
- [129] P. Nordlander, C. Oubre, E. Prodan, K. Li, M. I. Stockman, *Nano Letters* **2004**, *4*, 899–903.
- [130] E. Prodan, P. Nordlander, *Journal of Chemical Physics* **2004**, *120*, 5444–5454.
- [131] D. W. Brandl, N. A. Mirin, P. Nordlander, *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 12302–12310.
- [132] H. Zhaosheng, T. Ma, S. Hayase, *Journal of Photonics for Energy* **2018**, *8*, 1.
- [133] K. Metwally, S. Mensah, G. Baffou, *ACS Photonics* **2017**, *4*, 1544–1551.
- [134] L. Shao, K. C. Woo, H. Chen, Z. Jin, J. Wang, H. Q. Lin, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3053–3062.
- [135] A. M. Michaels, L. Brus, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11965–11971.
- [136] J. R. Krenn, M. Salerno, N. Felidj, B. Lamprecht, G. Schider, A. Leitner, F. R. Aussenegg, J. C. Weeber, A. Dereux, J. P. Goudonnet, *Journal of Microscopy* **2001**, *202*, 122–128.
- [137] S. A. Maier, P. G. Kik, H. A. Atwater, S. Meltzer, E. Harel, B. E. Koel, A. A. G. Requicha, *Nature Materials* **2003**, *2*, 229–232.
- [138] S. A. Maier, M. L. Brongersma, P. G. Kik, S. Meltzer, A. A. G. Requicha, H. A. Atwater, *Advanced Materials* **2001**, *13*, 1501–1505.
- [139] M. L. Brongersma, J. W. Hartman, H. A. Atwater, *Phys. Rev. B* **2000**, *62*, R16356–R16359.
- [140] P. K. Jain, W. Huang, M. A. El-Sayed, *Nano Letters* **2007**, *7*, 2080–2088.
- [141] J. Bishop, J. Bell III, J. E. Moersch, *Remote Compositional Analysis: Techniques for Understanding Spectroscopy, Mineralogy, and Geochemistry of Planetary Surfaces*, Cambridge University Press, Cambridge **2019**, 120–146.
- [142] W. Demtröder, *Laserspektroskopie 2*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2013**, 111ff.

- [143] D. L. Jeanmaire, R. P. V. Duyne, *Journal Electroanal Chemistry* **1977**, *84*, 1.
- [144] M. G. Albrecht, J. A. Creighton, *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 5215–5217.
- [145] M. Moskovits, *The Journal of Chemical Physics* **1978**, *69*, 4159–4161.
- [146] K. Kneipp, M. Moskovits, H. Kneipp, *Surface-Enhanced Raman Scattering*, volume 103 of *Topics in Applied Physics*, 1. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2006**, 19ff.
- [147] M. I. Stockman, L. N. Pandey, T. F. George, *Physical Review B* **1996**, *53*, 2183–2186.
- [148] M. V. Kovalenko, L. Manna, A. Cabot, Z. Hens, D. V. Talapin, C. R. Kagan, V. I. Klimov, A. L. Rogach, P. Reiss, D. J. Milliron, P. Guyot-Sionnest, G. Konstantatos, W. J. Parak, T. Hyeon, B. A. Korgel, C. B. Murray, W. Heiss, *ACS Nano* **2015**, *9*, 1012–1057.
- [149] R. Panneerselvam, G. K. Liu, Y. H. Wang, J. Y. Liu, S. Y. Ding, J. F. Li, D. Y. Wu, Z. Q. Tian, *Chemical Communications* **2017**, *54*, 10–25.
- [150] G. C. Schatz, R. P. V. Duyne, *Electromagnetic Mechanism of Surface-enhanced Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester **2002**, 3ff.
- [151] S. M. Morton, L. Jensen, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 4090–4098.
- [152] N. Valley, N. Greeneltch, R. P. Van Duyne, G. C. Schatz, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4*, 2599–2604.
- [153] P. Kambhampati, C. M. Child, M. C. Foster, A. Campion, *The Journal of Chemical Physics* **1998**, *108*, 5013–5026.
- [154] J. R. Lombardi, R. L. Birke, *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 5605–5617.
- [155] S. M. Morton, E. Ewusi-Annan, L. Jensen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7424–7429.
- [156] S. L. Kleinman, R. R. Frontiera, A. I. Henry, J. A. Dieringer, R. P. Van Duyne, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 21–36.
- [157] A. D. McFarland, M. A. Young, J. A. Dieringer, R. P. Van Duyne, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 11279–11285.
- [158] M. Moskovits, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 5301–5311.

- [159] J. A. Dieringer, K. L. Wustholz, D. J. Masiello, J. P. Camden, S. L. Kleinman, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 849–854.
- [160] D. P. Cormode, E. Roessl, A. Thran, T. Skajaa, R. E. Gordon, J.-P. Schlomka, V. Fuster, E. A. Fisher, W. J. M. Mulder, R. Proksa, Z. A. Fayad, *Radiology* **2010**, *256*, 774–782.
- [161] R. Popovtzer, A. Agrawal, N. A. Kotov, A. Popovtzer, J. Balter, T. E. Carey, R. Kopelman, *Nano Letters* **2008**, *8*, 4593–4596.
- [162] M. Ahamed, M. Karns, M. Goodson, J. Rowe, S. M. Hussain, J. J. Schlager, Y. Hong, *Toxicology and Applied Pharmacology* **2008**, *233*, 404–410.
- [163] C. Greulich, D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Epple, M. Köller, *RSC Advances* **2012**, *2*, 6981–6987.
- [164] G. McNay, D. Eustace, W. E. Smith, K. Faulds, D. Graham, *Applied Spectroscopy* **2011**, *65*, 825–837.
- [165] D. V. Leff, L. Brandt, J. R. Heath, *Langmuir* **1996**, *7463*, 4723–4730.
- [166] H. Häkkinen, *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 443–455.
- [167] D. Jimenez De Aberasturi, A. B. Serrano-Montes, J. Langer, M. Henriksen-Lacey, W. J. Parak, L. M. Liz-Marzán, *Chemistry of Materials* **2016**, *28*, 6779–6790.
- [168] E. Lenzi, D. Jimenez De Aberasturi, L. M. Liz-Marzán, *ACS Sensors* **2019**, *4*, 1126–1137.
- [169] C. L. Zavaleta, B. R. Smith, I. Walton, W. Doering, G. Davis, B. Shojaei, M. J. Natan, S. S. Gambhir, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 13511–13516.
- [170] T. Ishida, X. Wang, T. Shimizu, K. Nawata, H. Kiwada, *Journal of Controlled Release* **2007**, *122*, 349–355.
- [171] C. L. Zavaleta, K. B. Hartman, Z. Miao, M. L. James, P. Kempen, A. S. Thakor, C. H. Nielsen, R. Sinclair, Z. Cheng, S. S. Gambhir, *Small* **2011**, *7*, 2232–2240.
- [172] X. Huang, X. Peng, Y. Wang, Y. Wang, D. M. Shin, M. A. El-Sayed, S. Nie, *ACS Nano* **2010**, *4*, 5887–5896.
- [173] A. M. De Grand, J. V. Frangioni, *Technology in Cancer Research & Treatment* **2003**, *2*, 553–562.

- [174] A. M. Mohs, M. C. Mancini, S. Singhal, J. M. Provenzale, B. Leyland-Jones, M. D. Wang, S. Nie, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 9058–9065.
- [175] H. Karabeber, R. Huang, P. Iacono, J. M. Samii, K. Pitter, E. C. Holland, M. F. Kircher, *ACS Nano* **2014**, *8*, 9755–9766.
- [176] B. R. Smith, E. E. B. Ghosn, H. Rallapalli, J. A. Prescher, T. Larson, L. A. Herzenberg, S. S. Gambhir, *Nature nanotechnology* **2014**, *9*, 481–487.
- [177] G. Von Maltzahn, A. Centrone, J. H. Park, R. Ramanathan, M. J. Sailor, T. Alan Hatton, S. N. Bhatia, *Advanced Materials* **2009**, *21*, 3175–3180.
- [178] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55.
- [179] H. Xia, S. Bai, J. Hartmann, D. Wang, *Langmuir* **2010**, *26*, 3585–3589.
- [180] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 15700–15707.
- [181] F. Schulz, T. Homolka, N. G. Bastús, V. Puentes, H. Weller, T. Vossmeier, *Langmuir* **2014**, *30*, 10779–10784.
- [182] Y. Gao, L. Torrente-Murciano, *Nanoscale* **2020**, *12*, 2740–2751.
- [183] G. M. Whitesides, B. Grzybowski, *Science* **2002**, *295*, 2418–2421.
- [184] L. Guerrini, D. Graham, *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 7085–7107.
- [185] B. A. Grzybowski, C. E. Wilmer, J. Kim, K. P. Browne, K. J. M. Bishop, *Soft Matter* **2009**, *5*, 1110.
- [186] M. Grzelczak, J. Vermant, E. M. Furst, L. M. Liz-Marzán, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3591–3605.
- [187] S. Merkens, M. Vakili, A. Sánchez-Iglesias, L. Litti, Y. Gao, P. V. Gwozdz, L. Sharpnack, R. H. Blick, L. M. Liz-Marzán, M. Grzelczak, M. Trebbin, *ACS Nano* **2019**, *13*, 6596–6604.
- [188] A. Ditsch, P. E. Laibinis, D. I. C. Wang, T. A. Hatton, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, *21*, 6006–18.
- [189] G. Nichols, S. Byard, M. J. Bloxham, J. Botterill, N. J. Dawson, A. Dennis, V. Diart, N. C. North, J. D. Sherwood, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *91*, 2103–2109.

- [190] R. G. Jones, C. K. Ober, P. Hodge, P. Kratochvíl, G. Moad, M. Vert, *Pure and Applied Chemistry* **2012**, *85*, 463–492.
- [191] A. Sánchez-Iglesias, N. Claes, D. M. Solís, J. M. Taboada, S. Bals, L. M. Liz-Marzán, M. Grzelczak, *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 3183–3186.
- [192] A. Sánchez-Iglesias, M. Grzelczak, T. Altantzis, B. Goris, J. Pérez-Juste, S. Bals, G. Van Tendeloo, S. H. Donaldson, B. F. Chmelka, J. N. Israelachvili, L. M. Liz-Marzán, *ACS Nano* **2012**, *6*, 11059–11065.
- [193] J. Zhou, J. Ralston, R. Sedev, D. A. Beattie, *J. Coll. and I* **2009**, *331*, 251–262.
- [194] Hans-Dieter Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, 1. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2002**, 583ff.
- [195] R. Pamies, J. G. H. Cifre, V. F. Espín, M. Collado-González, F. G. D. Baños, J. G. De La Torre, *Journal of Nanoparticle Research* **2014**, *16*.
- [196] Y. Kitagawa, S. Yamaguchi, Y. Yorozu, *Clay Science* **2003**, *12*, 91–96.
- [197] R. Zsigmondy, *Zeitschrift für analytische Chemie* **1901**, *40*, 697–719.
- [198] D. H. Napper, *Journal of Colloid and Interface Science* **1970**, *32*, 106–114.
- [199] E. O. Ganbold, S. W. Joo, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2015**, *36*, 887–890.
- [200] K. Sokolowska, E. Hulkko, L. Lehtovaara, T. Lahtinen, *Journal of Physical Chemistry C* **2018**, *122*, 12524–12533.
- [201] W. Azzam, B. I. Wehner, R. A. Fischer, A. Terfort, C. Wöll, *Langmuir* **2002**, *18*, 7766–7769.
- [202] M. Deffner, F. Schulz, H. Lange, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2017**, *231*, 19–31.
- [203] G. Wang, Y. Akiyama, S. Shiraishi, N. Kanayama, T. Takarada, M. Maeda, *Bioconjugate Chemistry* **2017**, *28*, 270–277.
- [204] A. Klinkova, R. M. Choueiri, E. Kumacheva, *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 3976–3991.
- [205] J. K. Stolarczyk, A. Deak, D. F. Brougham, *Advanced Materials* **2016**, *28*, 5400–5424.
- [206] X. Wang, G. Li, T. Chen, M. Yang, Z. Zhang, T. Wu, H. Chen, *Nano Letters* **2008**, *8*, 2643–2647.

- [207] R. J. Hickey, X. Meng, P. Zhang, S.-J. Park, *ACS Nano* **2013**, *7*, 5824–5833.
- [208] A. S. Urban, X. Shen, Y. Wang, N. Large, H. Wang, M. W. Knight, P. Nordlander, H. Chen, N. J. Halas, *Nano Letters* **2013**, *13*, 4399–4403.
- [209] S. K. Nune, P. Gunda, P. K. Thallapally, Y.-Y. Lin, M. Laird Forrest, C. J. Berkland, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2009**, *6*, 1175–1194.
- [210] P.-J. Chen, Y.-D. Kang, C.-H. Lin, S.-Y. Chen, C.-H. Hsieh, Y.-Y. Chen, C.-W. Chiang, W. Lee, C.-Y. Hsu, L.-D. Liao, C.-T. Fan, M.-L. Li, W.-C. Shyu, *Advanced Materials* **2015**, *27*, 6488–6495.
- [211] M. N. Sanz-Ortiz, K. Sentosun, S. Bals, L. M. Liz-Marzán, *ACS Nano* **2015**, *9*, 10489–10497.
- [212] V. T. Cong, E.-O. Ganbold, J. K. Saha, J. Jang, J. Min, J. Choo, S. Kim, N. W. Song, S. J. Son, S. B. Lee, S.-W. Joo, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 3833–3841.
- [213] D. Paramelle, D. Nieves, B. Brun, R. S. Kraut, D. G. Fernig, *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 911–917.
- [214] B. Du, X. Gu, X. Han, G. Ding, Y. Wang, D. Li, E. Wang, J. Wang, *ChemMedChem* **2017**, *12*, 1768–1775.
- [215] Y. Chen, D. Yang, Y. J. Yoon, X. Pang, Z. Wang, J. Jung, Y. He, Y. W. Harn, M. He, S. Zhang, G. Zhang, Z. Lin, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 12956–12967.
- [216] H. Kloust, E. Pösel, S. Kappen, C. Schmidtke, A. Kornowski, W. Pauer, H.-U. Moritz, H. Weller, *Langmuir* **2012**, *28*, 7276–7281.
- [217] H. Kloust, C. Schmidtke, J.-P. Merkl, A. Feld, T. Schotten, U. E. A. Fittschen, M. Gehring, J. Ostermann, E. Pösel, H. Weller, *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 23244–23250.
- [218] H. Ko, S. Singamaneni, V. V. Tsukruk, *Small* **2008**, *4*, 1576–1599.
- [219] S. E. J. Bell, M. R. McCourt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7455–7462.
- [220] M. Meneghetti, A. Scarsi, L. Litti, G. Marcolongo, V. Amendola, M. Gobbo, M. Di Chio, A. Boscaini, G. Fracasso, M. Colombatti, *Small* **2012**, *8*, 3733–3738.
- [221] G. Sciutto, L. Litti, C. Lofrumento, S. Prati, M. Ricci, M. Gobbo, A. Roda, E. Castellucci, M. Meneghetti, R. Mazzeo, *Analyst* **2013**, *138*, 4532–4541.

- [222] R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney, R. W. Murray, *Langmuir* **2009**, *25*, 13840–13851.
- [223] L. Scarabelli, A. Sánchez-Iglesias, J. Pérez-Juste, L. M. Liz-Marzán, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**, *6*, 4270–4279.
- [224] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig, *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 4215–4221.
- [225] N. G. Bastús, F. Merkoçi, J. Piella, V. Puentes, *Chemistry of Materials* **2014**, *26*, 2836–2846.
- [226] K. Ranoszek-Soliwoda, E. Tomaszewska, E. Socha, P. Krzyczmonik, A. Ignaczak, P. Orłowski, M. Krzyzowska, G. Celichowski, J. Grobelny, *Journal of Nanoparticle Research* **2017**, *19*.
- [227] N. Zhang, J. Luo, R. Liu, X. Liu, *RSC Advances* **2016**, *6*, 83720–83729.
- [228] B. Mir-Simon, J. Morla-Folch, P. Gisbert-Quilis, N. Pazos-Perez, H. N. Xie, N. G. Bastús, V. Puentes, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *Journal of Optics (United Kingdom)* **2015**, *17*, 114012.
- [229] L. Malassis, R. Dreyfus, R. J. Murphy, L. A. Hough, B. Donnio, C. B. Murray, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 33092–33100.
- [230] D. Paramelle, A. Sadovoy, S. Gorelik, P. Free, J. Hopley, D. G. Fernig, *Analyst* **2014**, *139*, 4855–4861.
- [231] A. Syafiuddin, Salmiati, M. R. Salim, A. Beng Hong Kueh, T. Hadibarata, H. Nur, *Journal of the Chinese Chemical Society* **2017**, *64*, 732–756.
- [232] M. Schumacher, *Self-assembly and encapsulation of three-dimensional metallic nanoparticle assemblies using block copolymers and seeded emulsion polymerisation*, Masterarbeit, Fachbereich Chemie, Universität Hamburg, **2016**.
- [233] A. López-Millán, P. Zavala-Rivera, R. Esquivel, R. Carrillo, E. Alvarez-Ramos, R. Moreno-Corral, R. Guzmán-Zamudio, A. Lucero-Acuña, *Applied Sciences (Switzerland)* **2017**, *7*.
- [234] R. Herizchi, E. Abbasi, M. Milani, A. Akbarzadeh, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2016**, *44*, 596–602.
- [235] C. Stanglmair, S. P. Scheeler, C. Pacholski, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2014**, *2014*, 3633–3637.

- [236] N. Li, P. Zhao, D. Astruc, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 1756–1789.
- [237] H. Hinterwirth, S. Kappel, T. Waitz, T. Prohaska, W. Lindner, *ACS Nano* **2013**, *7*, 1129–1136.
- [238] D. N. Benoit, H. Zhu, M. H. Lilierose, R. A. Verm, N. Ali, A. N. Morrison, J. D. Fortner, C. Avendano, V. L. Colvin, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9238–9245.
- [239] Y. Zhao, W. Pérez-Segarra, Q. Shi, A. Wei, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 7328–7329.
- [240] M. Karg, N. Schelero, C. Oppel, M. Gradzielski, T. Hellweg, R. Von Klitzing, *Chem. Euro. J.* **2011**, *17*, 4648–4654.
- [241] C. W. Wang, A. Oskooei, D. Sinton, M. G. Moffitt, *Langmuir* **2010**, *26*, 716–723.
- [242] M. Rafipoor, C. Schmidtke, C. Wolter, C. Strelow, H. Weller, H. Lange, *Langmuir* **2015**, *31*, 9441–9447.
- [243] 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.
- [244] S. Förster, A. Timmann, M. Konrad, C. Schellbach, A. Meyer, S. S. Funari, P. Mulvaney, R. Knott, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 1347–1360.
- [245] S. Förster, L. Apostol, W. Bras, *Journal of Applied Crystallography* **2010**, *43*, 639–646.
- [246] I. Blakey, Z. Merican, K. J. Thurecht, *Langmuir* **2013**, *29*, 8266–8274.
- [247] J. D. Halley, D. A. Winkler, *Complexity* **2008**, *14*, 10–17.
- [248] I. V. Rao, E. Ruckenstein, *J. Coll. and I* **1986**, *113*, 375–387.
- [249] C. S. Chern, T. C. Yu, *Polymer* **2005**, *46*, 1899–1904.
- [250] T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [251] A. A. Stepanenko, V. V. Dmitrenko, *Gene* **2015**, *574*, 193–203.
- [252] M. Fisichella, H. Dabboue, S. Bhattacharyya, M.-L. Saboungi, J.-P. Salvétat, T. Hevor, M. Guerin, *Toxicology in Vitro* **2009**, *23*, 697–703.
- [253] M. Lista, D. Z. Liu, P. Mulvaney, *Langmuir* **2014**, *30*, 1932–1938.
- [254] V. Turzhitsky, L. Zhang, G. L. Horowitz, E. Vitkin, U. Khan, Y. Zakharov, L. Qiu, I. Itzkan, L. T. Perelman, *Small* **2018**, *14*, 1802392.

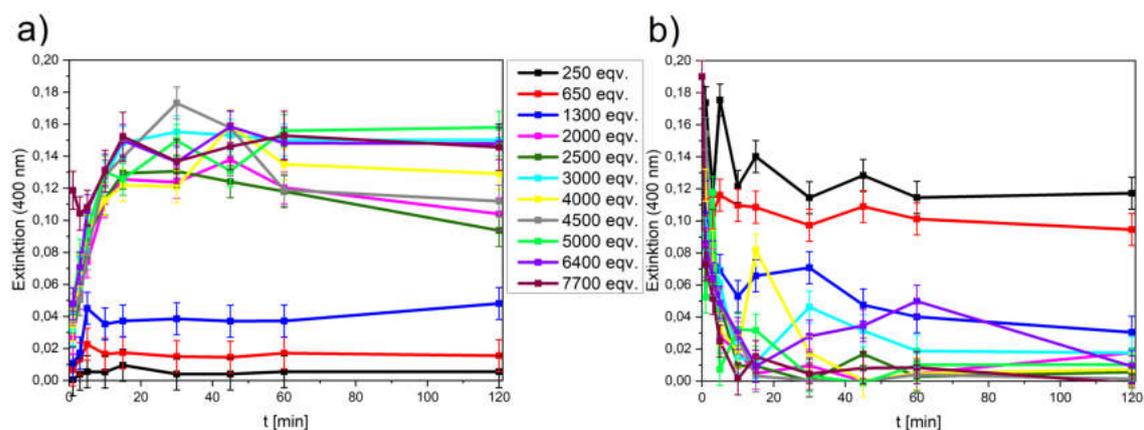
- [255] S. S. Dasary, A. K. Singh, D. Senapati, H. Yu, P. C. Ray, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 13806–13812.
- [256] S. S. Panikar, G. Ramírez-García, S. Sidhik, T. Lopez-Luke, C. Rodriguez-Gonzalez, I. H. Ciapara, P. S. Castillo, T. Camacho-Villegas, E. De la Rosa, *Analytical Chemistry* **2019**, *91*, 2100–2111.
- [257] K. Siebertz, D. van Bebber, T. Hochkirchen, *Statistische Versuchsplanung*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2017**.
- [258] F. Benz, C. Tserkezis, L. O. Herrmann, B. De Nijs, A. Sanders, D. O. Sigle, L. Pukenas, S. D. Evans, J. Aizpurua, J. J. Baumberg, *Nano Letters* **2015**, *15*, 669–674.
- [259] M. Deffner, F. Schulz, H. Lange, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2017**, *231*, ISSN (Online) 2196–7156.
- [260] D. Jimenez de Aberasturi, A. B. Serrano-Montes, J. Langer, M. Henriksen-Lacey, W. J. Parak, L. M. Liz-Marzán, *Chemistry of Materials* **2016**, *28*, 6779–6790.
- [261] Y. R. Lee, M. S. Kim, C. H. Kwon, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2013**, *34*, 470–474.
- [262] G. Caputo, N. Pinna, *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1*, 2370–2378.
- [263] Y.-T. Tao, C.-C. Wu, J.-Y. Eu, W.-L. Lin, K.-C. Wu, C.-h. Chen, *Langmuir* **1997**, *13*, 4018–4023.
- [264] S. F. Shimobayashi, M. Tsudome, T. Kurimura, *Scientific Reports* **2018**, *8*, 17769.
- [265] X. Zhang, M. Mainka, F. Paneff, H. Hachmeister, A. Beyer, A. Götzhäuser, T. Huser, *Langmuir* **2018**, *34*, 2692–2698.
- [266] R. Wang, X.-R. Shen, M. Zhang, R. Devasenathipathy, R. Pang, D.-Y. Wu, J. Zhang, J. Ulstrup, Z.-Q. Tian, *The Journal of Physical Chemistry C* **2019**, *123*, 23026–23036.
- [267] X. Hu, T. Wang, L. Wang, S. Dong, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 6962–6969.
- [268] R. A. Alvarez-Puebla, D. S. Dos Santos Jr, R. F. Aroca, *The Analyst* **2004**, *129*, 1251.
- [269] K. Bandyopadhyay, K. Vijayamohanan, M. Venkataramanan, T. Pradeep, *Langmuir* **1999**, *15*, 5314–5322.
- [270] C. A. Szafranski, W. Tanner, P. E. Laibinis, R. L. Garrell, *Langmuir* **1998**, *14*, 3570–3579.

- [271] S. Li, D. Wu, X. Xu, R. Gu, *Journal of Raman Spectroscopy* **2007**, *38*, 1436–1443.
- [272] S. B. Lee, K. Kim, M. S. Kim, *Journal of Raman Spectroscopy* **1991**, *22*, 811–817.
- [273] E. B. Wilson, *Physical Review* **1934**, *45*, 706–714.
- [274] V. Venkata Chalapathi, K. Venkata Ramiah, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A* **1968**, *68*, 109–122.
- [275] V. Joseph, A. Matschulat, J. Polte, S. Rolf, F. Emmerling, J. Kneipp, *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42*, 1736–1742.
- [276] A. Michota, J. Bukowska, *Journal of Raman Spectroscopy* **2003**, *34*, 21–25.
- [277] W.-q. Ma, Y. Fang, G.-l. Hao, W.-g. Wang, *Chinese Journal of Chemical Physics* **2010**, *23*, 659–663.
- [278] J. R. Lee, T. M. Willey, J. Nilsson, L. J. Terminello, J. J. De Yoreo, T. Van Buuren, *Langmuir* **2006**, *22*, 11134–11141.
- [279] E. Sabatani, J. Cohen-Boulakia, M. Bruening, I. Rubinstein, *Langmuir* **1993**, *9*, 2974–2981.
- [280] D. Barriet, C. M. Yam, O. E. Shmakova, A. C. Jamison, T. R. Lee, *Langmuir* **2007**, *23*, 8866–8875.
- [281] S. Frey, V. Stadler, K. Heister, W. Eck, M. Zharnikov, M. Grunze, B. Zeysing, A. Terfort, *Langmuir* **2001**, *17*, 2408–2415.
- [282] J. Trotter, *Acta Crystallographica* **1961**, *14*, 1135–1140.
- [283] M. O. Sinnokrot, E. F. Valeev, C. D. Sherrill, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 10887–10893.
- [284] R. Zhao, R. Q. Zhang, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18*, 25452–25457.
- [285] M. Fan, F.-J. Lai, H.-L. Chou, W.-T. Lu, B.-J. Hwang, A. G. Brolo, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 509–515.
- [286] T. Lee, S. Kwon, J.-J. Lee, *ACS Applied Nano Materials* **2020**, *3*, 5920–5927.
- [287] E. Nalbant Esenturk, A. R. Hight Walker, *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, *40*, 86–91.
- [288] A. Y. F. Mahmoud, C. J. Rusin, M. T. McDermott, *The Analyst* **2020**, *145*, 1396–1407.
- [289] C. J. Orendorff, A. Gole, T. K. Sau, C. J. Murphy, *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 3261–3266.

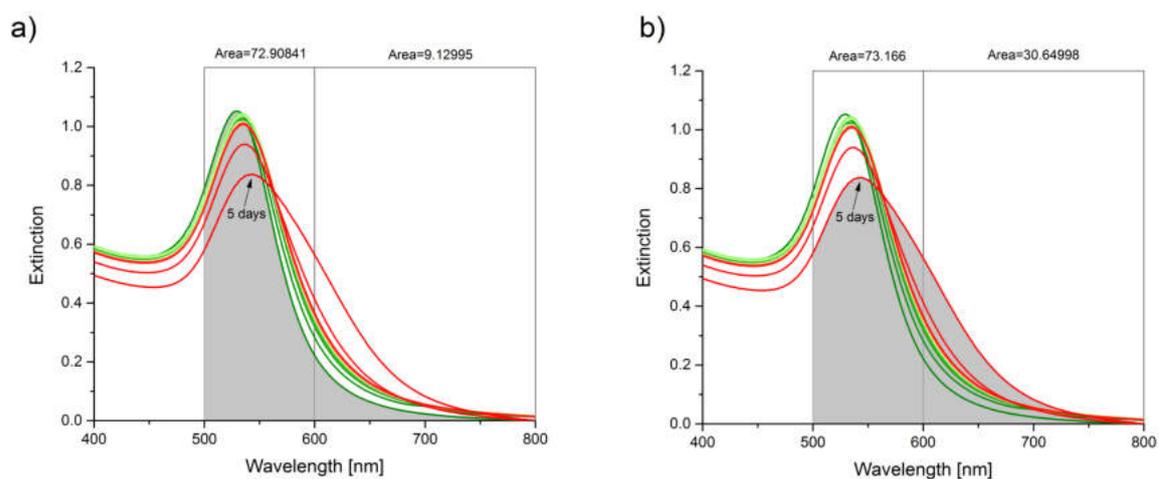
- [290] D. Steinigeweg, M. Schütz, M. Salehi, S. Schlücker, *Small* **2011**, *7*, 2406–2406.

# A | Appendix

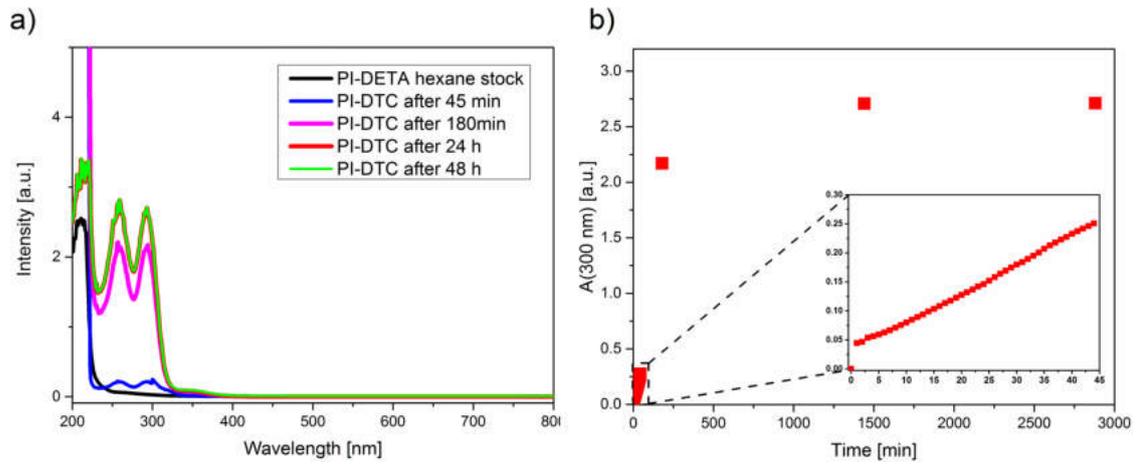
## A.1 Phasentransfer



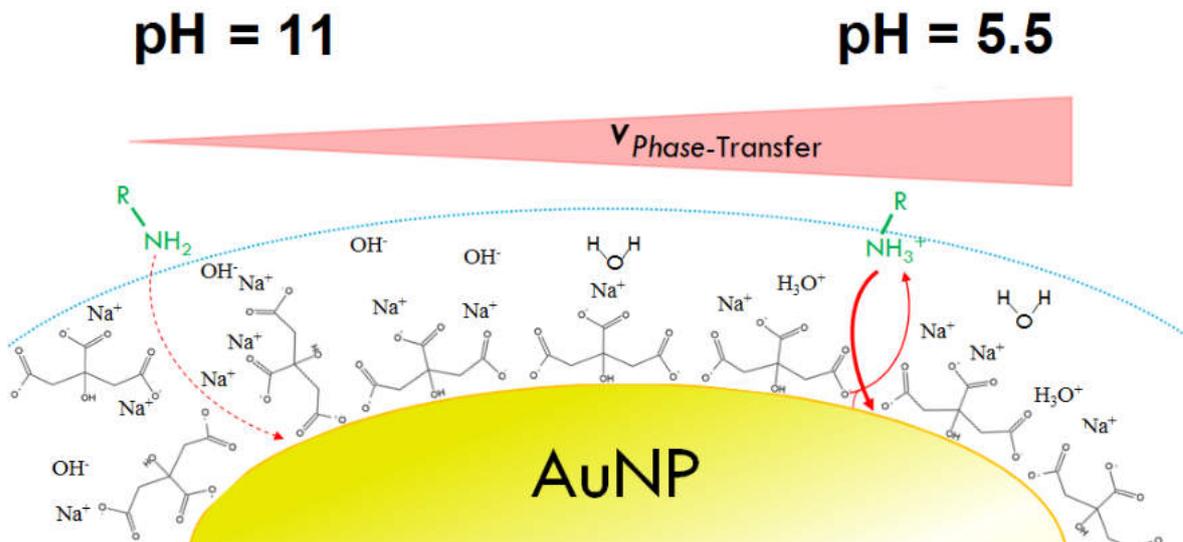
**Abbildung A.1:** Auftragung der Extinktion bei 400 nm der Hexan a) und der wässrigen Phase b) gegen die Zeit des Phasentransfers mit allen genutzten Äquivalenten an PI-DETA. Photometrische Genauigkeit (Ext.):  $\pm 0.01$ .<sup>[232]</sup>



**Abbildung A.2:** Darstellung der Integrale (grau) des relativen *AP* bei a) nicht aggregierten AuNP und b) aggregierten AuNP.

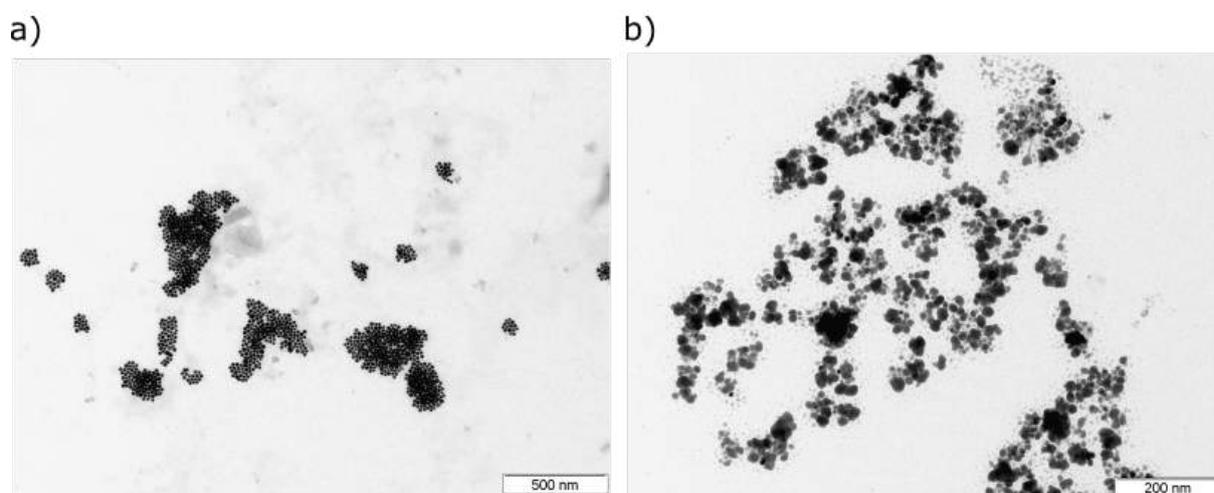


**Abbildung A.3:** a) UV-VIS-Absorptionsspektren der PI-DETA Stammlösung zu bestimmten Zeitpunkten der PI-DTC Synthese nach Referenz<sup>[239]</sup>. b) Auftragung der charakteristischen Dithiocarbamat-Absorption bei 300 nm zu bestimmten Zeitpunkten über einen Zeitraum von 3000 Minuten.<sup>[232]</sup>

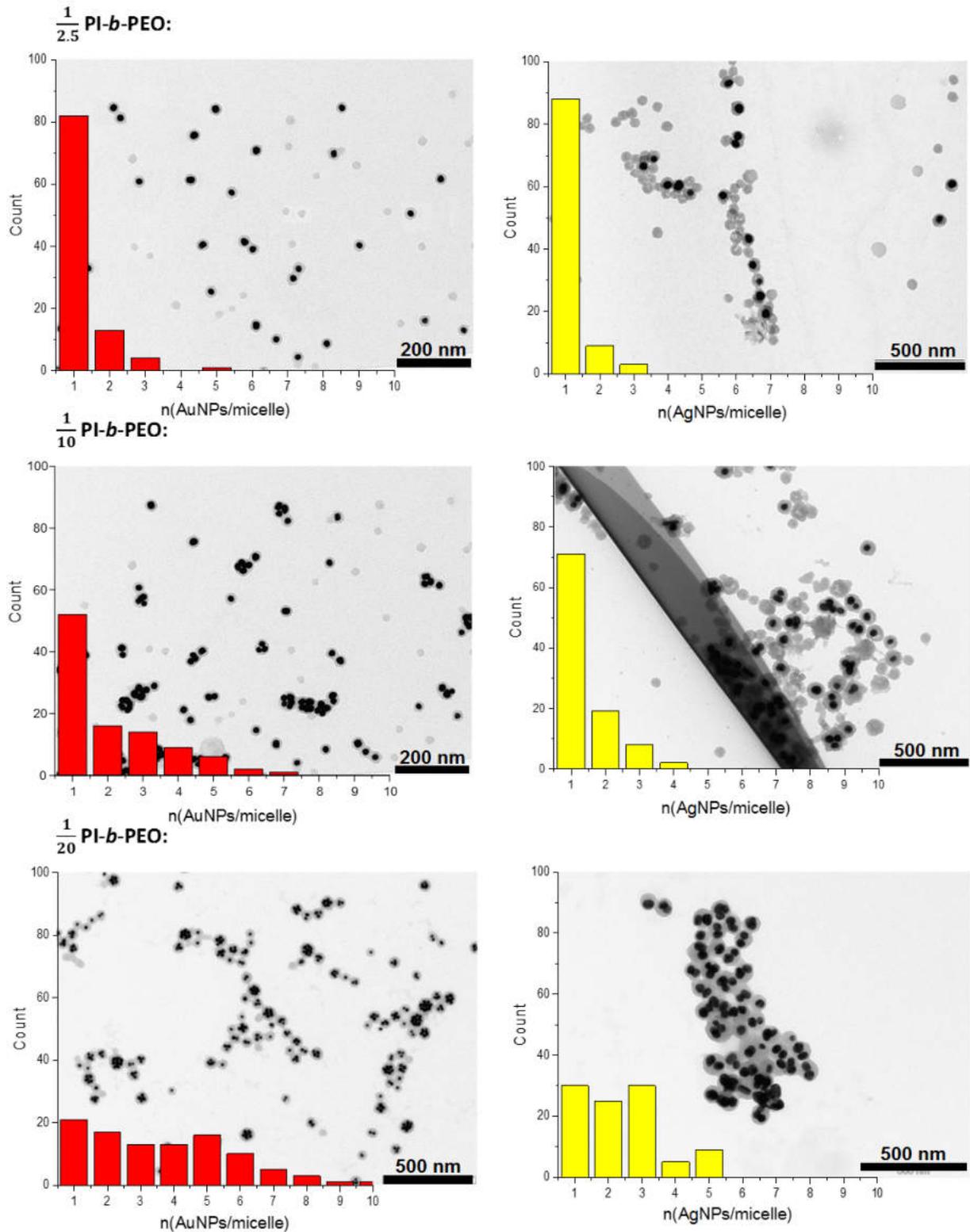


**Abbildung A.4:** Schematische Darstellung des vorgeschlagenen pH-abhängigen Ligandenaustauschs mit Aminoliganden.  $v_{Phase-Transfer}$  repräsentiert die Ligandenaustauschgeschwindigkeit und die gepunktete blaue Linie die elektrische Doppelschicht der AuNP@Citrat.<sup>[232]</sup>

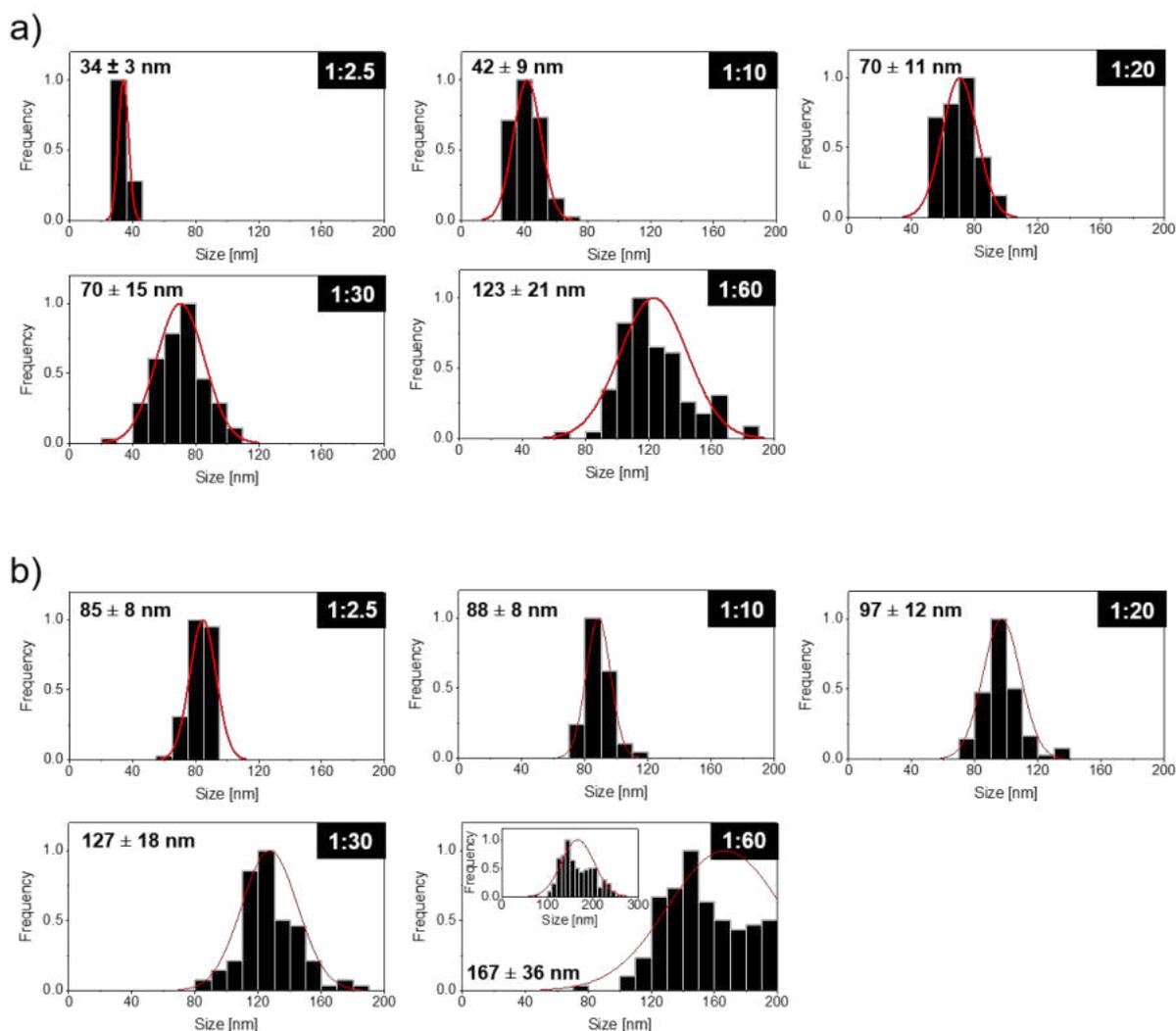
## A.2 Selbstassemblierung und Einkapselung



**Abbildung A.5:** Repräsentative TEM-Aufnahmen nach der Einkapselung und Saat-Emulsionspolymerisation mit nicht stabilisiertem THF von a) AuNP und b) AgNP. Es sind keine einheitlichen NPC und keine Polymerhülle erkennbar. Die AgNP wurden höchstwahrscheinlich durch die vorhandenen Peroxide angegriffen und zerstört (siehe Deformierung und Bruchstücke). Ein positiver, qualitativer Peroxidnachweis über Kaliumiodid und Stärke bestätigten das Vorhandensein einer reaktiven Spezies im nicht-stabilisierten THF wenige Stunden nach der Öffnung einer neuen, kommerziell erworbenen THF-Flasche. Eine reproduzierbare Einkapselung ist mit nicht-stabilisiertem THF nicht möglich.

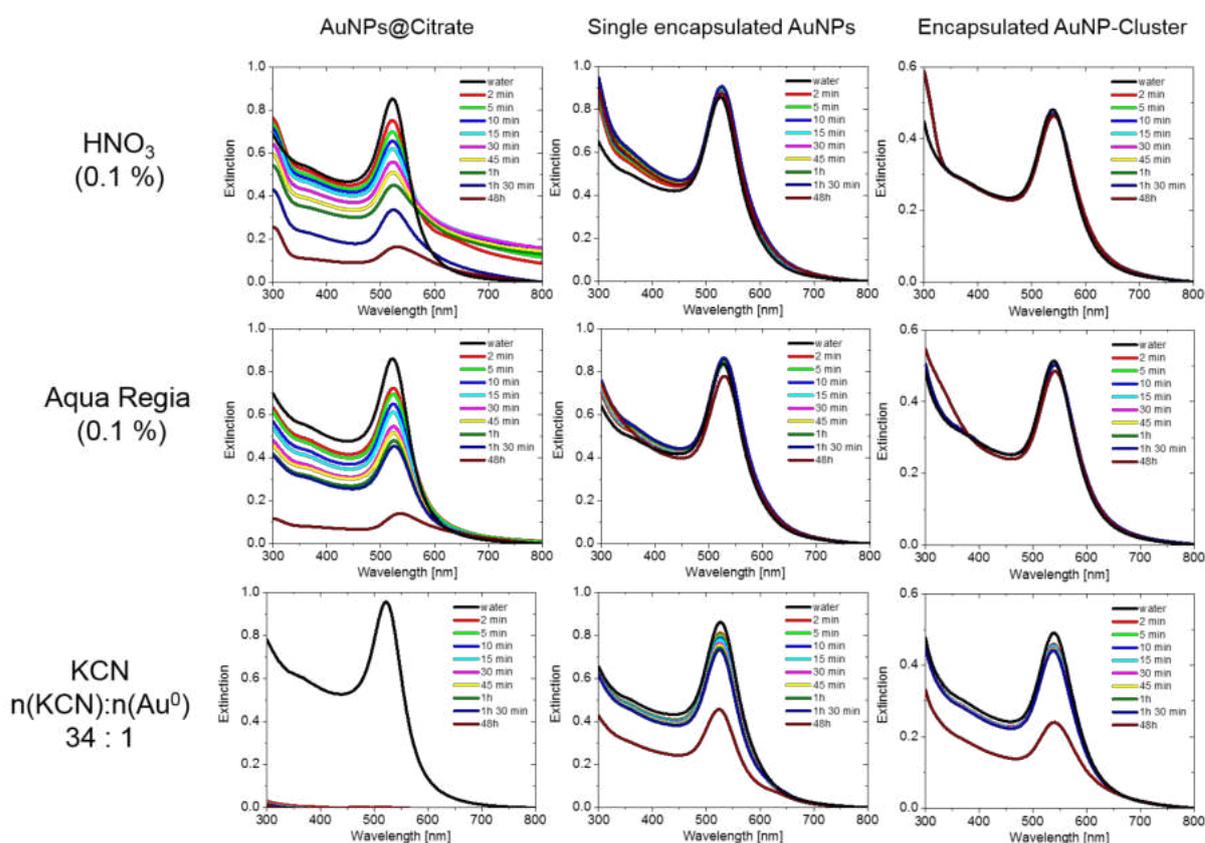


**Abbildung A.6:** Verteilung der Anzahl an NP pro Mizelle bei 100 gezählten Systemen von Gold (rechts) und Silber (links) mit  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO})$  zu  $\rho_A(\text{PI-DETA})$  Verhältnissen von 1:2.5; 1:10; 1:20. Die TEM-Aufnahmen sind ohne Aufreinigung für einen repräsentativeren Überblick präpariert worden. *Reprinted with license from*<sup>[65]</sup> *Copyright* © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

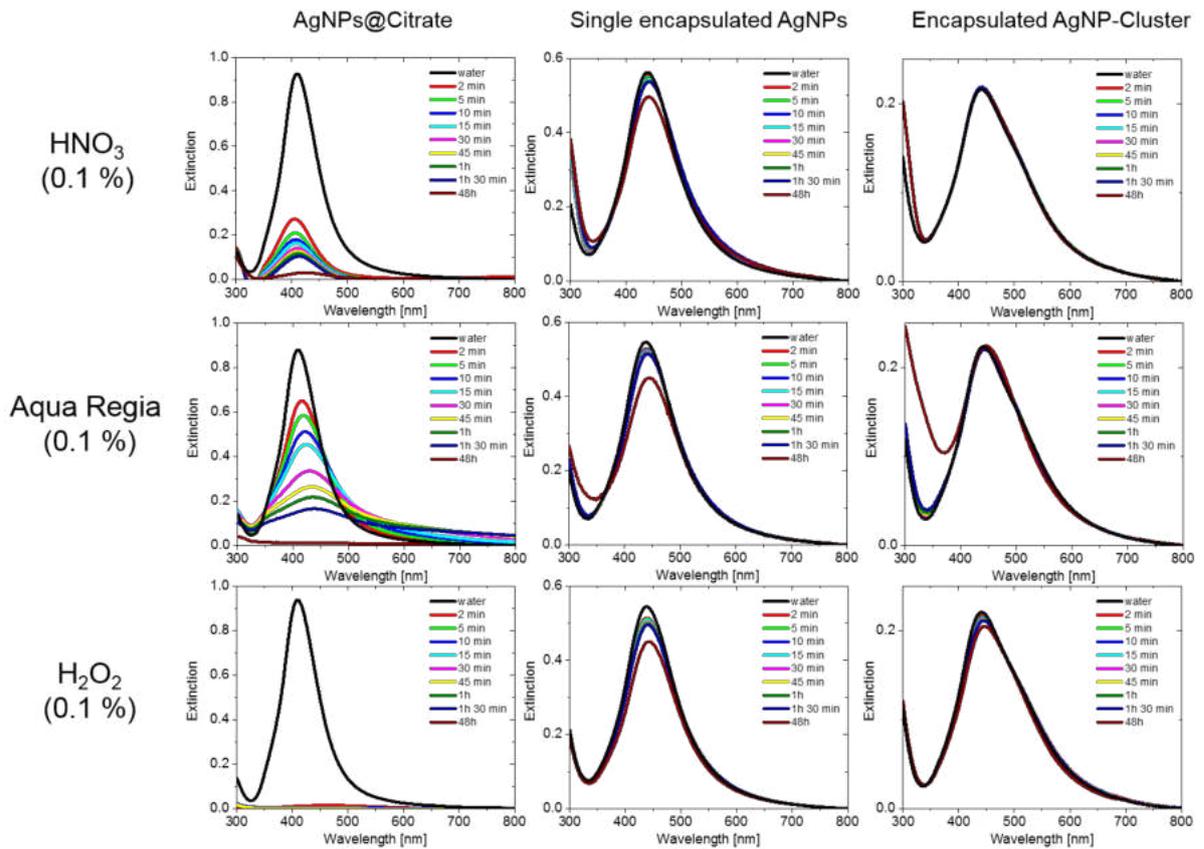


**Abbildung A.7:** Größenverteilungshistogramme der a) Gold- und b) Silber-NP-Polymersysteme mit gekennzeichnetem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis. Es wurden jeweils mindestens 100 Systeme aus den TEM-Aufnahmen über die Software *ImageJ* ausgezählt. Reprinted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

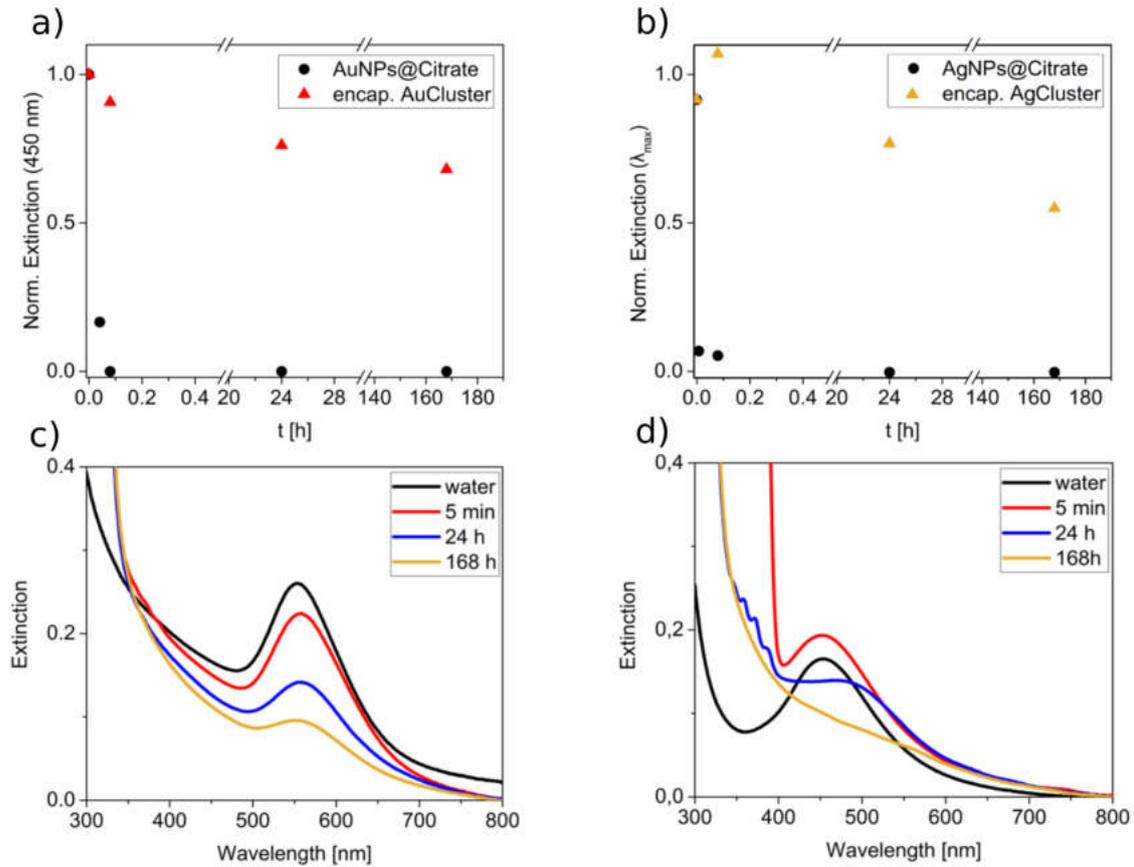
## A.3 Stabilität der NPC



**Abbildung A.8:** UV-VIS Spektren von AuNP@Citrat, einzeln-eingekapselten AuNP ( $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 1.2 \text{ nm}^{-2}$ ) und eingekapselten AuNPC ( $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.10 \text{ nm}^{-2}$ ) in 0.1 Vol.-% Salpetersäure, 0.1 Vol.-% aqua regia und 34 Äquivalenten Kaliumcyanid pro Goldatom bei verschiedenen Inkubationszeiten. Die Spalten beziehen sich auf das entsprechende AuNP-System und die Zeilen beziehen sich auf das entsprechende Medium. *Reprinted with license from*<sup>[65]</sup> *Copyright* © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

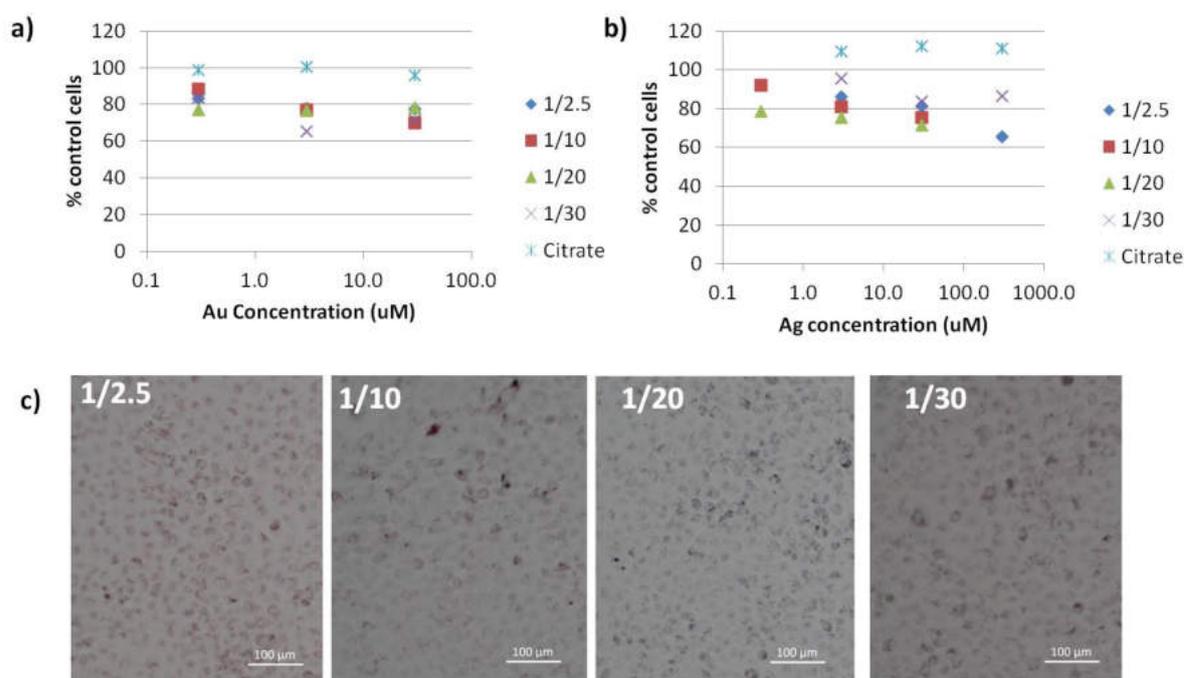


**Abbildung A.9:** UV-VIS Spektren von AgNP@Citrat, einzeln-eingekapselten AgNP ( $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 1.2 \text{ nm}^{-2}$ ) und eingekapselten AgNPC ( $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.10 \text{ nm}^{-2}$ ) in 0.1 Vol.-% Salpetersäure, 0.1 Vol.-% aqua regia und 0.1 Vol.-% Wasserstoffperoxid bei verschiedenen Inkubationszeiten. Die Spalten beziehen sich auf das entsprechende AgNP-System und die Zeilen beziehen sich auf das entsprechende Medium. *Reprinted with license from*<sup>[65]</sup> *Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.*

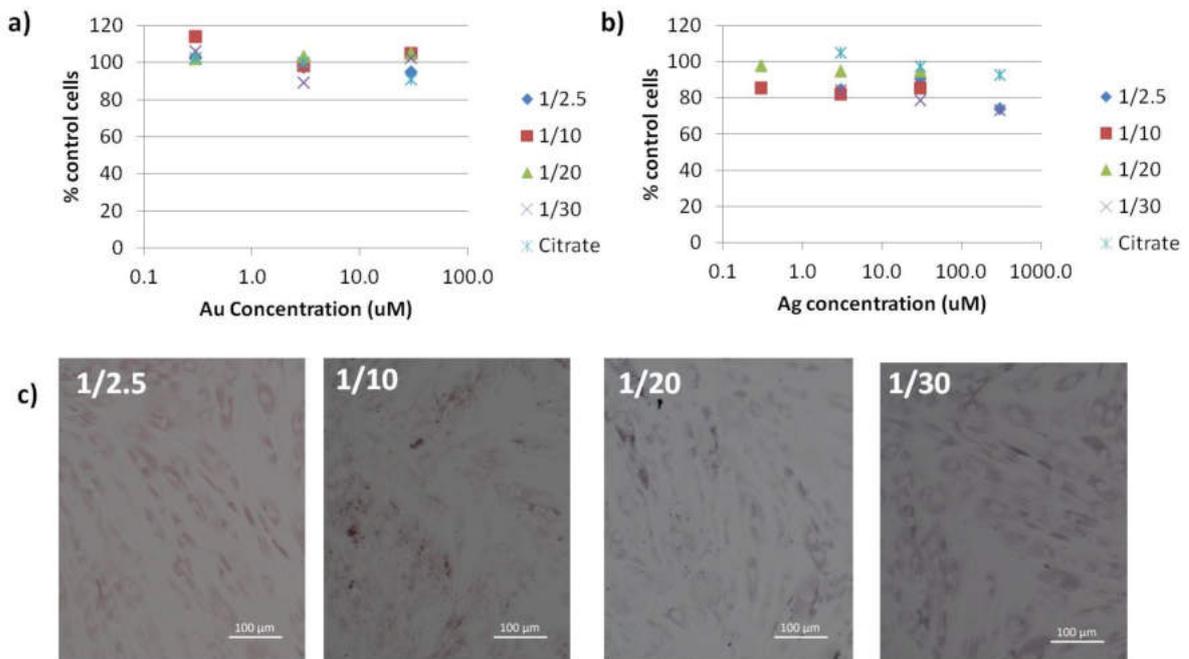


**Abbildung A.10:** UV-VIS Stabilitätstest von a) AuNP@Citrat (schwarze Kreise) und eingekapselten AuNPC (rote Dreiecke,  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.10 \text{ nm}^{-2}$ ) in 10 Vol.-% *aqua regia* mit der Extinktion bei 450 nm gegen die Zeit aufgetragen. Die Extinktion bei 400 nm konnte nicht genutzt werden, da es in diesem Spektralbereich starke Wechselwirkungen mit *aqua regia* gab. b) UV-VIS Stabilitätstest von AgNP@Citrat (schwarze Kreise) und eingekapselten AgNPC (gelbe Dreiecke,  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO}) = 0.10 \text{ nm}^{-2}$ ) in 10 Vol.-% *aqua regia* mit der Extinktion bei LSPR  $\lambda_{max}$  gegen die Zeit aufgetragen. c) UV-VIS Spektren der entsprechenden AuNPC aus a). d) UV-VIS Spektren der entsprechenden AgNPC aus b). Reprinted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

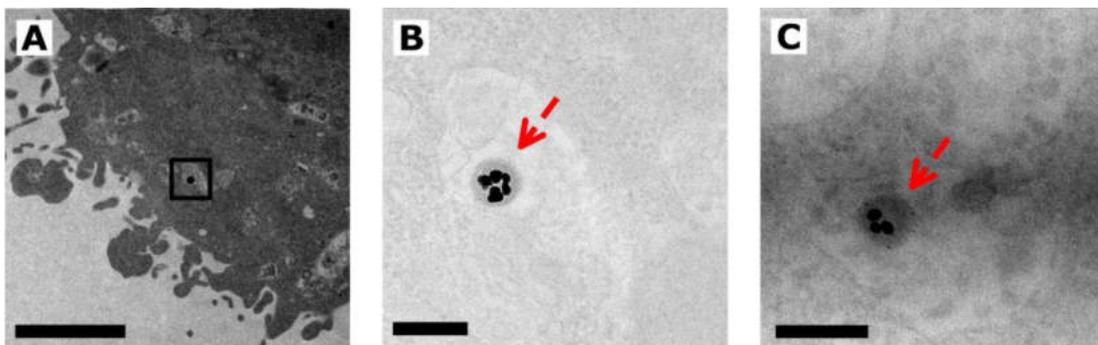
## A.4 Zellaufnahme und Zellviabilität



**Abbildung A.11:** Metabolische Aktivität aus dem MTT-Test der mit a) AuNP und b) AgNP in verschiedenen Größen (PI-*b*-PEO:PI-DETA) und verschiedenen Konzentrationen inkubierten A549-Zellen in Prozent der Kontrollzellen. c) Lichtmikroskop-Aufnahmen von A549-Zellen mit  $30 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  inkubierten AuNP mit  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO})[\text{nm}^{-2}]$  (PI-*b*-PEO:PI-DETA): 1.2 (1:2.5), 0.30 (1:10), 0.15 (1:20), 0.10 (1:30). Maßstabsleisten: 100 µm. Reprinted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

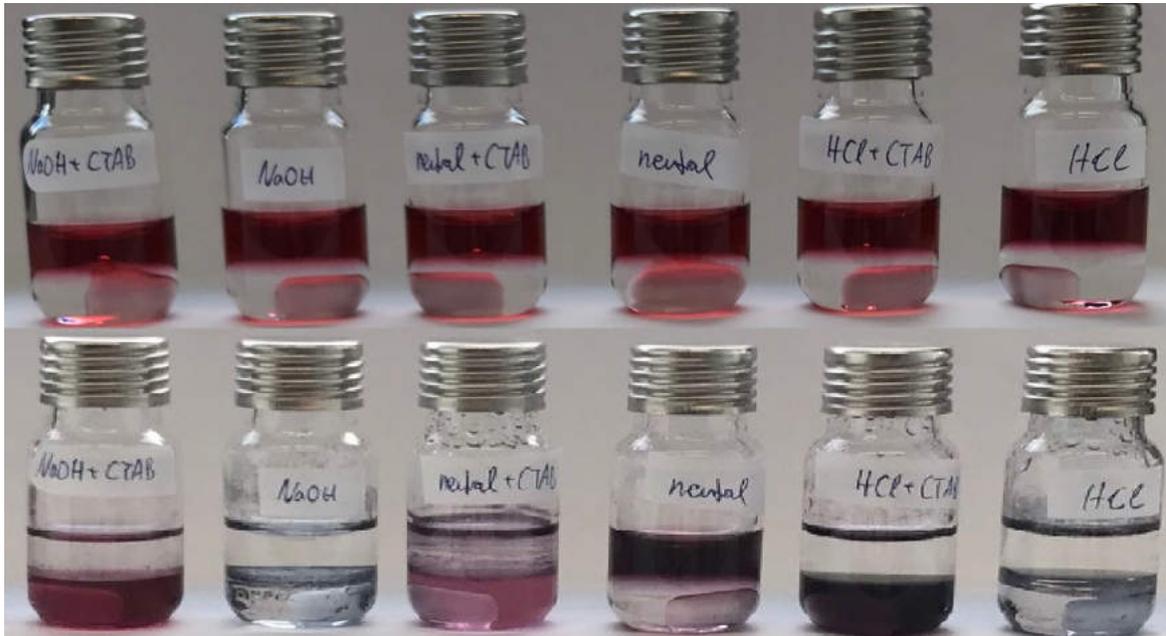


**Abbildung A.12:** Metabolische Aktivität aus dem MTT-Test der mit a) AuNP und b) AgNP in verschiedenen Größen (PI-*b*-PEO:PI-DETA) und verschiedenen Konzentrationen inkubierten HDF-Zellen in Prozent der Kontrollzellen. c) Lichtmikroskop-Aufnahmen von HDF-Zellen mit  $30 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  inkubierten AuNP mit  $\rho_A(\text{PI-}b\text{-PEO})[\text{nm}^{-2}]$  (PI-*b*-PEO:PI-DETA): 1.2 (1:2.5), 0.30 (1:10), 0.15 (1:20), 0.10 (1:30). Maßstabsleisten: 100 µm. Reprinted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.



**Abbildung A.13:** A-C) TEM-Aufnahmen in verschiedenen Auflösungen, die die Zellaufnahme von AgNPC mit einem PI-*b*-PEO:PI-DETA Verhältnis von 1:30 in HeLa Zellen zeigen. B,C) AgNPC in HeLa Zellen mit sichtbarer Polymerhülle (roter Pfeil). Maßstabsleisten: A) 2 µm und B,C) 200 nm. Reprinted with license from<sup>[65]</sup> Copyright © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

## A.5 Oberflächenverstärkte Ramanstreuung



**Abbildung A.14:** Phasentransfer mit PI-MPEE nach Referenz<sup>[253]</sup> in einem Wasser/Chloroform-Phasensystem im leicht sauren (HCl), neutralen und leicht alkalischen (NaOH) Medium und mit und ohne Zusatz von CTAB. Oberes Bild: AuNP@Citrat in Wasser (hier obere Phase) vor dem Phasentransfer. Unteres Bild: nach dem Phasentransfer. Es ist schon mit dem Auge zu erkennen, dass kein Transfer ohne Präzipitation oder starker Rotverschiebung der LSPR funktionierte.

$$y(LSPR) = c \cdot 528,4 \text{ nm} + (-4,687 \cdot 10^{-3}) \cdot x_1 + 0,4915 \cdot x_2 + (2,046 \cdot 10^{-5}) \cdot x_1^2 + (-1,159 \cdot 10^{-2}) \cdot x_2^2$$

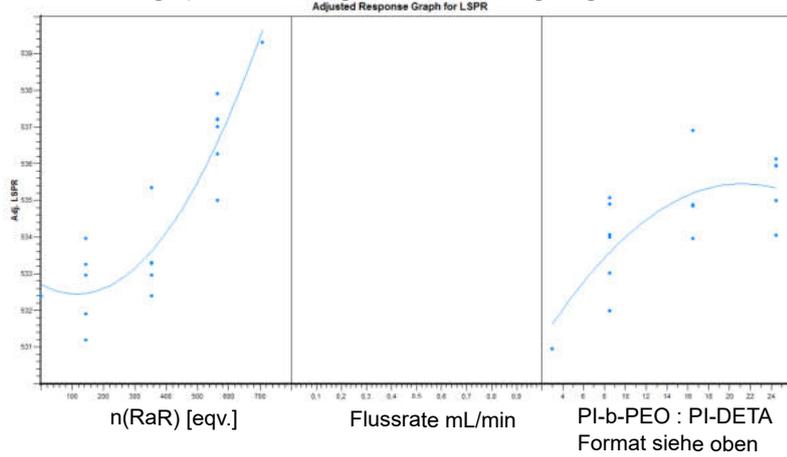
$x_1$  und  $x_1^2$  = Stoffmenge Crosslinker/Ramanreporter

$x_2$  und  $x_2^2$  = Ligand zu Mizellenpolymer Verhältnis (im Format: 1:10 = 10), d.h. PI-DETA pro 1 PI-*b*-PEO

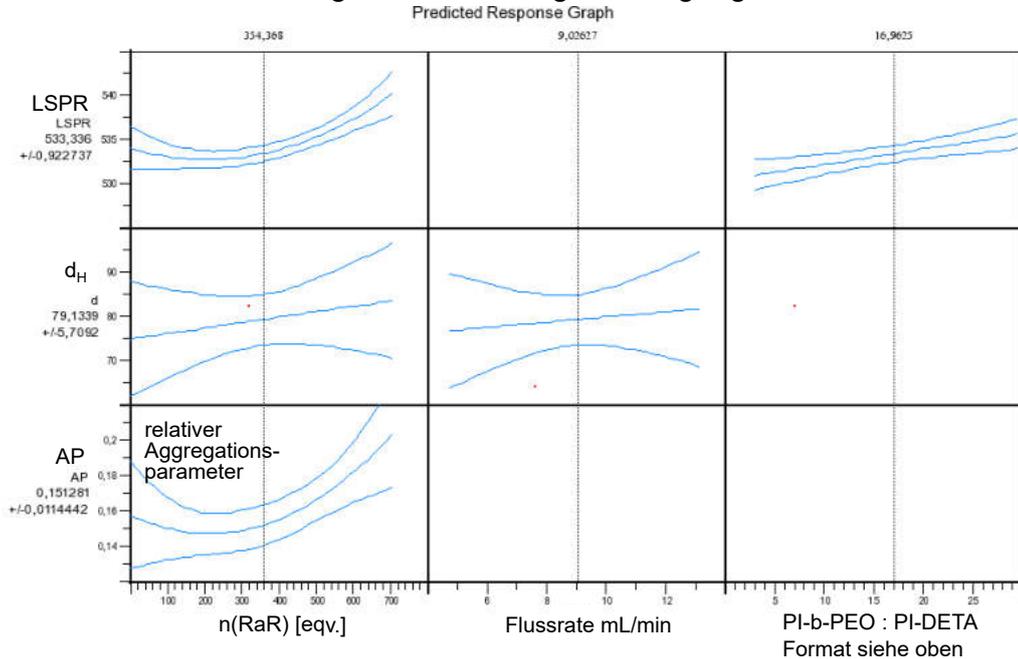
Term	Signifik. p-Wert LSPR
Constant	0
BI	0,37
PI	0,02
FR	0,426
BI * PI	0,467
BI * FR	0,14
FR * PI	0,607
BI <sup>2</sup>	0,01
PI <sup>2</sup>	0,071
FR <sup>2</sup>	0,298
R-Square	0,873
Adj R-Square	0,837
RMS Error	1,062
Pure Error	1,089
Residual df	14

FR = Flussrate  
BI = n(RaR)  
PI = PI-*b*-PEO:PI-DETA

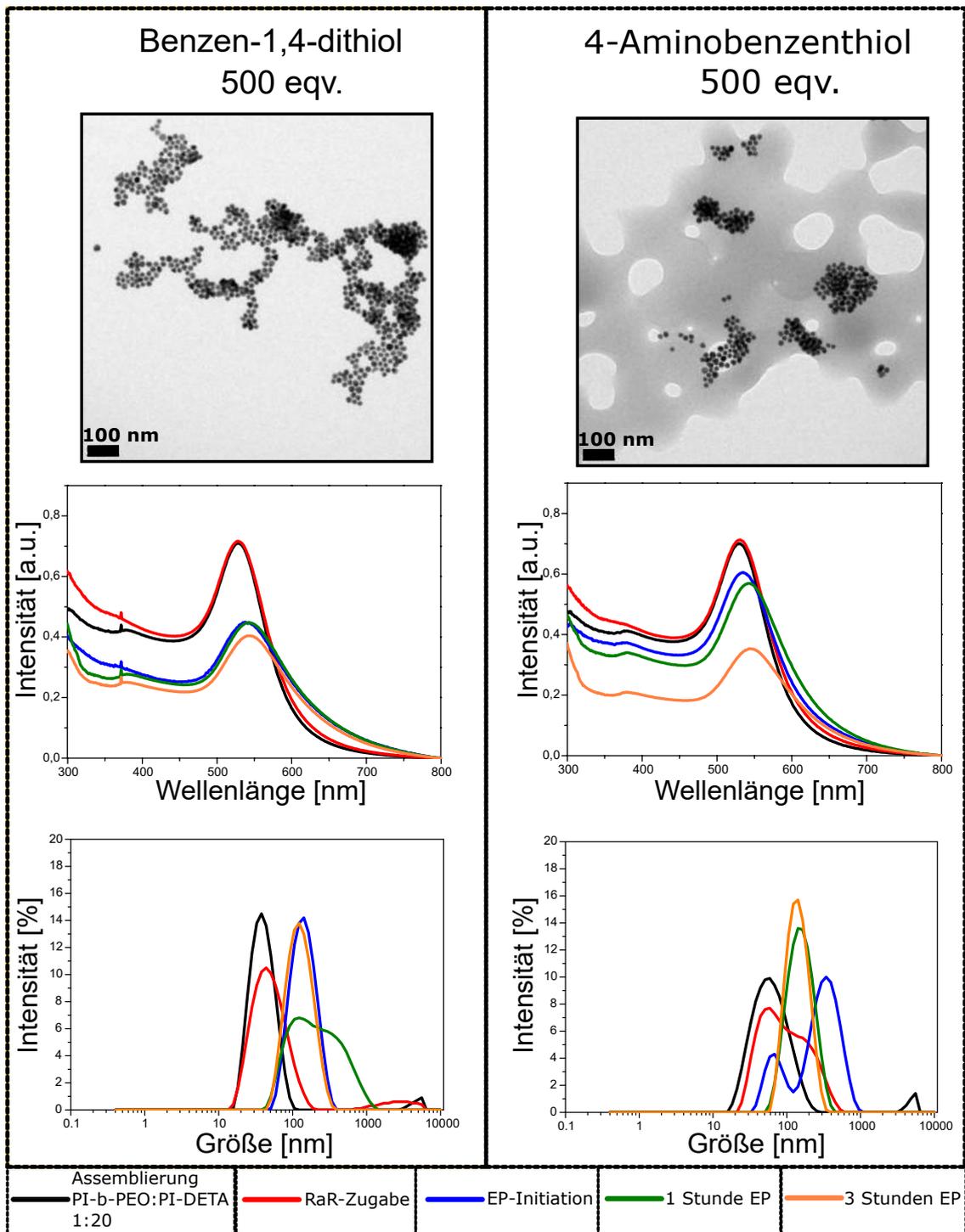
### Angepasste Zielgrößen-Auftragung für LSPR



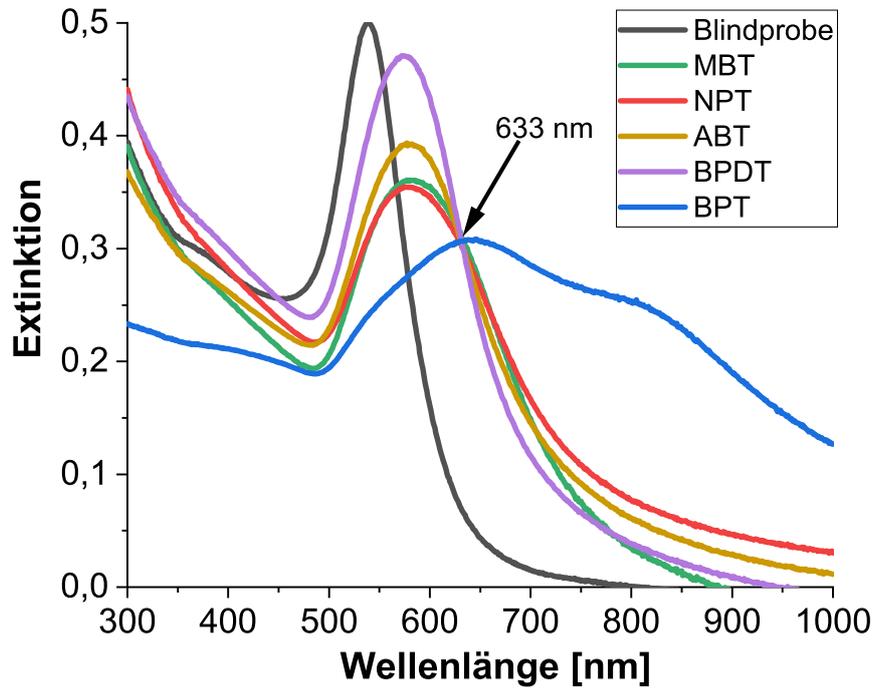
### Zielgrößenvorhersage Auftragung



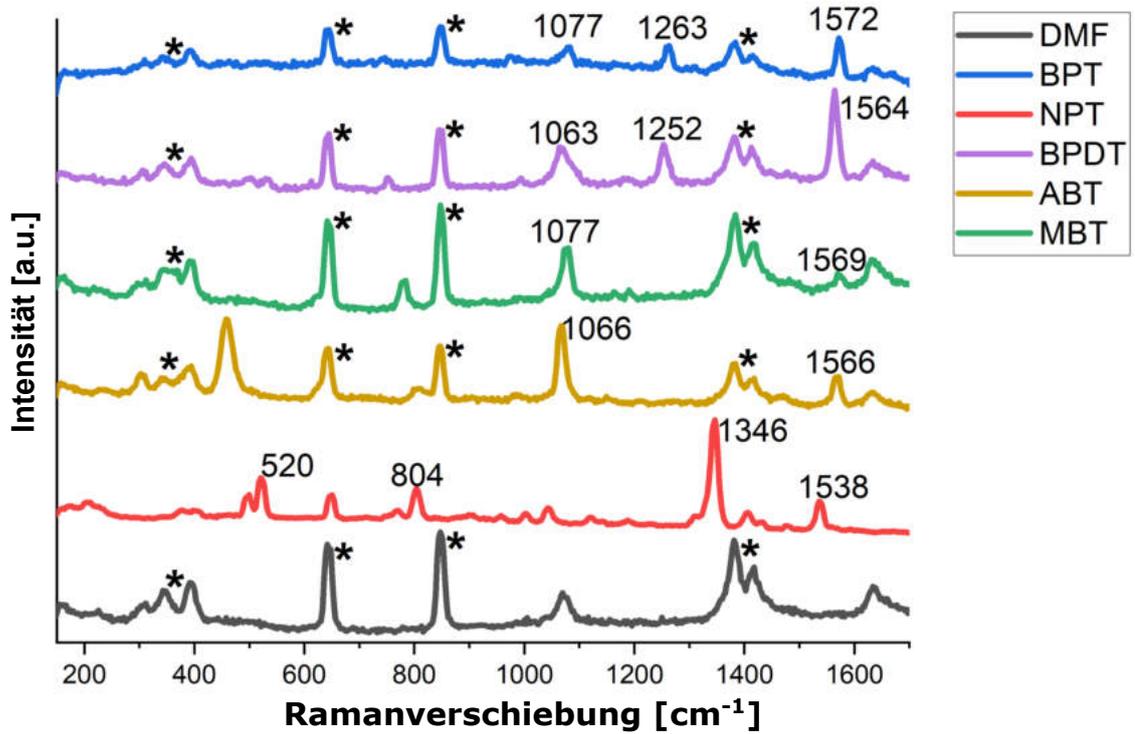
**Abbildung A.15:** Regressionspolynom nach Signifikanzanalyse (oben). Signifikanz der Terme siehe Tabelle (mitte links). Angepasste Zielgrößenauftragung (LSPR, mitte rechts). Zielgrößenvorhersage der LSPR, des  $d_H$  und des relativen Aggregationsparameters (unten).



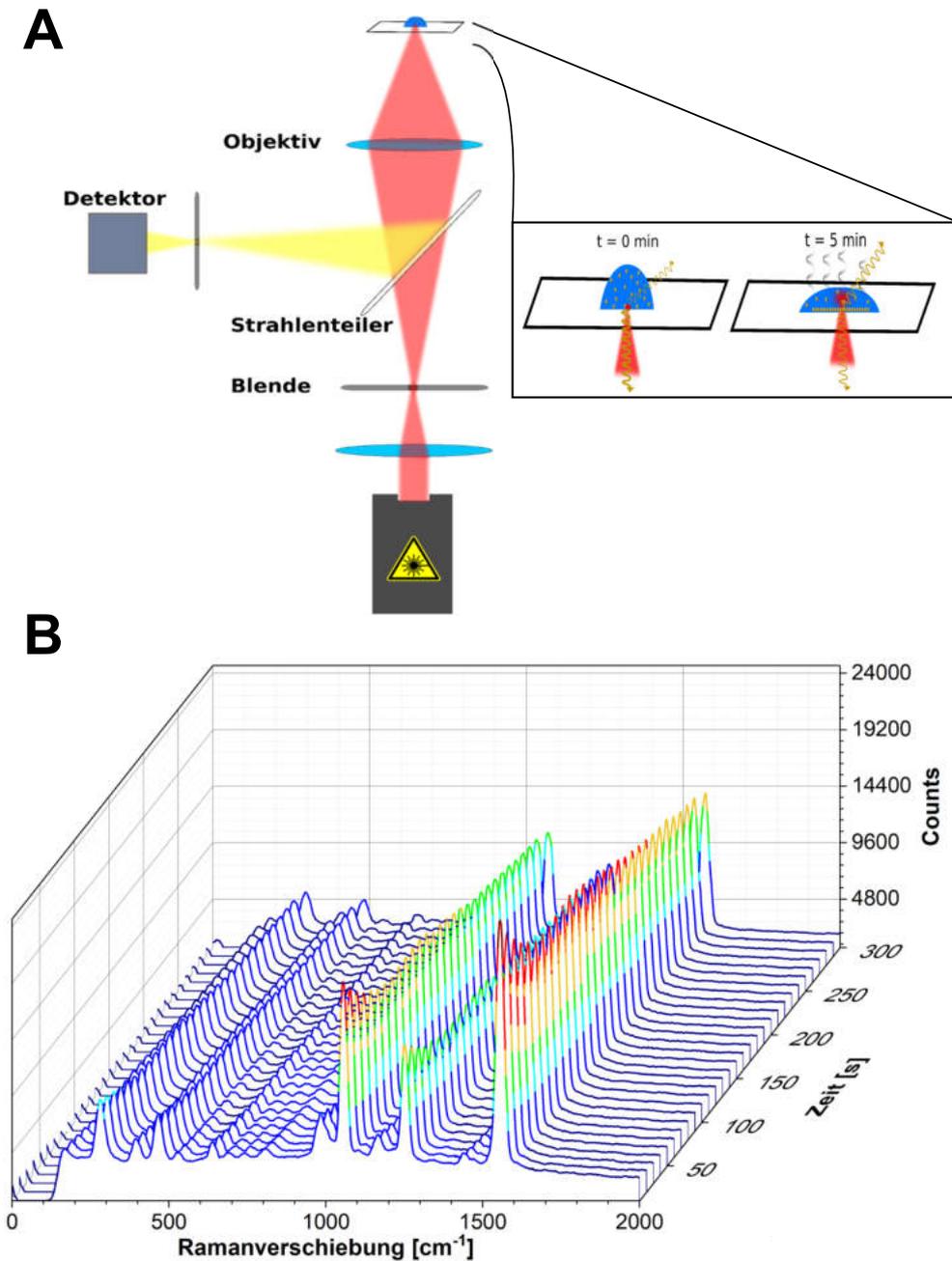
**Abbildung A.16:** RaR-Codierung nach der 1:20 (PI-*b*-PEO:PI-DETA; mit Standardflussrate) Assemblierung (3. Strategie, Abb. 6.23) mit jeweils 500 eqv. Benzen-1,4-dithiol (links) und 500 eqv. 4-AminobenzenthioI. Oben ist jeweils eine repräsentative TEM-Aufnahme des Produkts nach der Emulsionspolymerisation (EP), mittig jeweils die UV-VIS-Spektren und unten die DLS-Messungen während der Herstellung dargestellt. Das Farbschema ist unten in der Legende dargestellt.



**Abbildung A.17:** UV-VIS Extinktionsspektren der RaR (BPT, NPT, ABT, MBT, BPDT) codierten AuNPC und der Blindprobe aus Abbildung 6.30. Die Extinktion bei 633 nm wurde über Aufkonzentration mittels Zentrifugation auf das gleiche Niveau eingestellt. Die Blindprobe wurde anhand der Absorption bei 400 nm in einen ähnlichen Konzentrationsbereich eingestellt, da die Extinktion bei 633 nm bei dieser Probe schwach ist. Die Messungen wurden unverdünnt in einer Flüssigkeitsküvette mit 0.1 mm Schichtdicke durchgeführt.

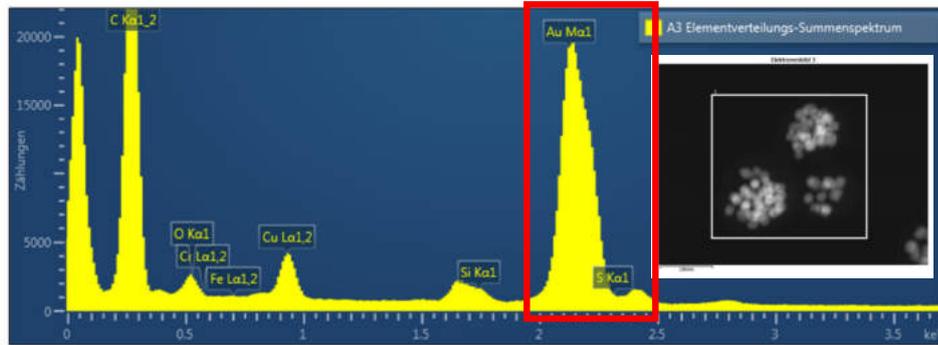


**Abbildung A.18:** Normierte Raman Spektren der in Dimethylformamid (DMF) und einer Flüssigkeitsküvette (Schichtdicke: 0.1 mm) gemessenen RaR (BPT, NPT, ABT, MBT, BPDT) ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ; Ausnahme: flüssiges NPT wurde in Reinform gemessen). DMF ist als Vergleichsspektrum dargestellt und die Lösungsmittelpicks sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die Raman-Peaks der RaR sind mit der Ramanverschiebung [ $\text{cm}^{-1}$ ] gekennzeichnet. Die Messung erfolgte bei 633 nm Laserwellenlänge und 10 Sekunden Integrationszeit mit einem 100x Objektiv bei 6 mW Laserleistung.



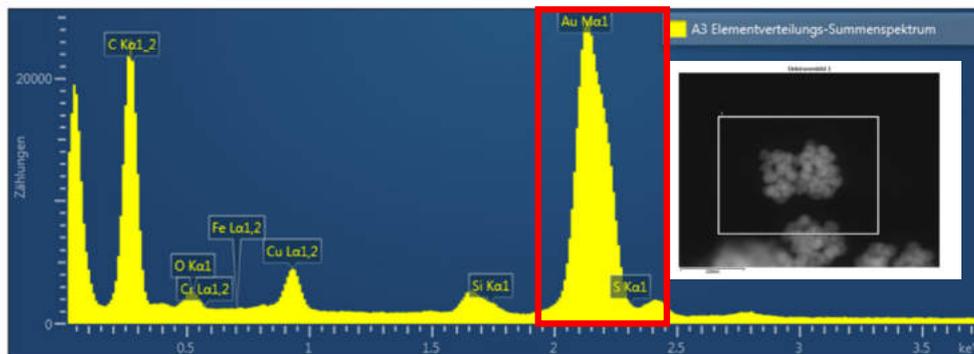
**Abbildung A.19:** **A** Schematischer Aufbau der konfokalen Raman-Messung in Dispersion mit einem Tropfen der Probe auf einem Objektträger. **B** SERS-Spektren von BPT codierten AuNPC in einem Zeitraum von 5 Minuten mit 10 Sekunden Integrationszeit, einem 100x Objektiv und bei 7 mW Laserleistung aufgenommen. Es ist zu sehen, dass die Intensität der Raman-Peaks über die Zeit durch Trocknungseffekte abnehmen.

**A** Blindprobe (theoretisch 0 Atom % S): 3.38, 3.67, 3.17 (map sum) und 3.15 (hier gezeigt) Atom % Schwefel. **Im Durchschnitt: 3.34 Atom % S**



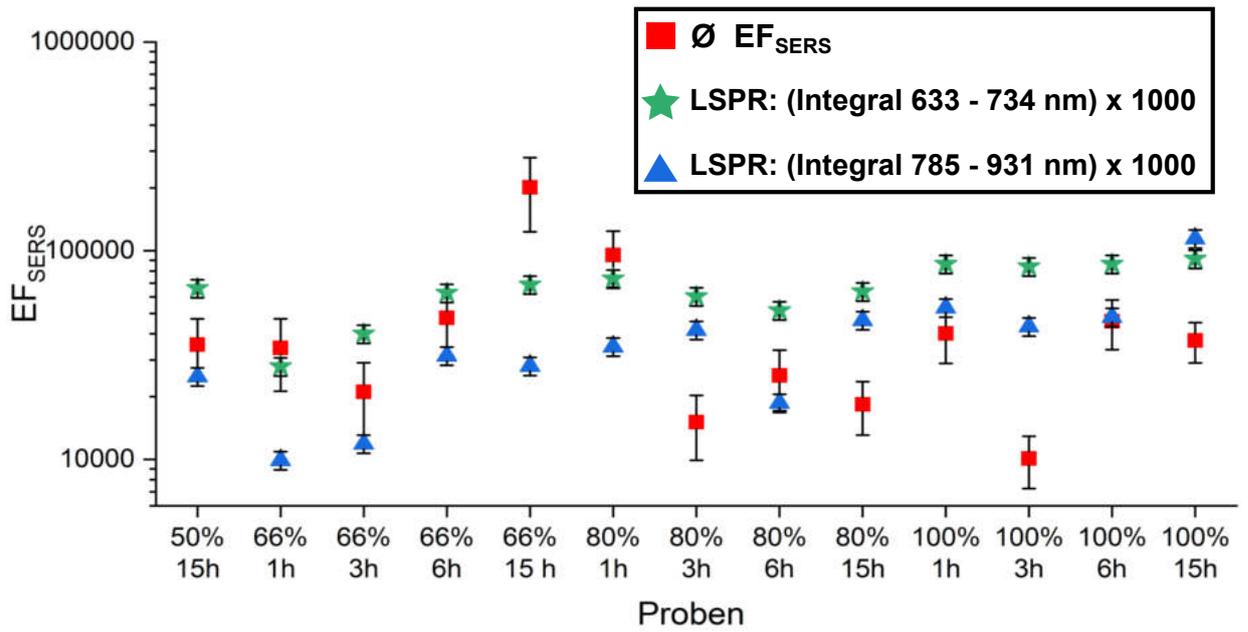
A3 Elementverteilungs-Summenspektrum							
Element	Linientyp	k-Faktor	k-Faktor-Typ	Absorptionskorrektur	Massen %	Massen % Sigma	Atom %
S	K-Serie	0.356	Theroretisch	1.00	0.53	0.10	3.15
Au	M-Serie	0.618	Theroretisch	1.00	99.47	0.10	96.85
Gesamt:					100.00		100.00

**B** 100 % BPT, 15 h (theoretisch 1 Atom % S): 3.62, 2.91, 4.10 (map sum) und 3.91 (hier gezeigt) Atom % Schwefel. **Im Durchschnitt: 3.64 Atom % S**

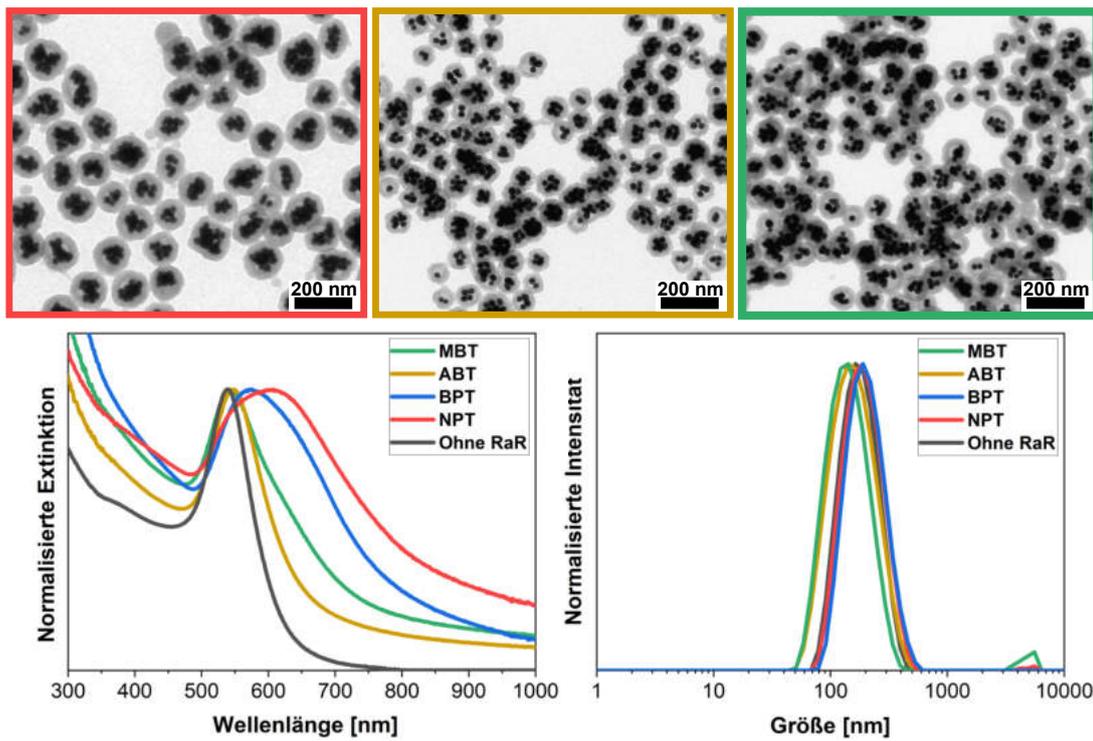


A3 Elementverteilungs-Summenspektrum							
Element	Linientyp	k-Faktor	k-Faktor-Typ	Absorptionskorrektur	Massen %	Massen % Sigma	Atom %
S	K-Serie	0.356	Theroretisch	1.00	0.66	0.09	3.91
Au	M-Serie	0.618	Theroretisch	1.00	99.34	0.09	96.09
Gesamt:					100.00		100.00

**Abbildung A.20:** A EDX-Spektren und Auswertung der Blindprobe mit theoretisch 0 Atom % Schwefel und B der 100 % BPT ( $\rho_A$ (PI-DETA)) Probe mit 15 h Inkubationszeit mit theoretisch 1 Atom % Schwefel. Die TEM-Aufnahmen zeigen jeweils den Aufnahmebereich der abgedruckten Spektren. Die roten Kästen markieren die Gold- und Schwefel-Linien. Die schwarzen Kästen über den Spektren fassen die ermittelten Ergebnisse zusammen. Die Blindprobe weist im Durchschnitt einen ähnlichen Schwefelgehalt, wie die codierten AuNPC auf. Eine verlässliche Aussage über den Schwefelgehalt ist aufgrund der Überlagerung der M- und K-Linien (roter Kasten) und möglicher Verunreinigungen nicht zuverlässig möglich.



**Abbildung A.21:** Vergrößerung von Abbildung 6.38 mit den durchschnittlichen  $EF_{SERS}$  der BPT codierten AuNPC-Proben. Des Weiteren sind die Integrale der UV-VIS Extinktionsspektren von 633 - 734 nm (inelastischer Raman-Streubereich von 0 - 2000  $\text{cm}^{-1}$  bei 633 nm Laseranregung) und 785 - 931 nm (inelastischer Raman-Streubereich von 0 - 2000  $\text{cm}^{-1}$  bei 785 nm Laseranregung). Die Integrale wurden aus Übersichtsgründen und Vergleichbarkeitsgründen mit dem Faktor 1000 multipliziert.



**Abbildung A.22:** Repräsentative TEM Aufnahmen (oben), UV-VIS Spektren (unten links) und DLS-Messungen (unten rechts) der MBT, ABT und NPT codierten AuNPC mit 66 % RaR ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) und 6 Stunden Inkubationszeit. Unten sind die über 6 Stunden mit 66 % BPT ( $\rho_A(\text{PI-DETA})$ ) inkubierten AuNPC und AuNPC ohne RaR zum Vergleich dargestellt.

## A.6 Liste der genutzten Chemikalien

**Tabelle A.1:** Verwendete Chemikalien mit zugehörigen Gefahrenpiktogrammen (Symbole) und den Nummern der Sicherheits- und Gefahrenhinweise (H- & P-Sätze) nach GHS. Die zu den Nummern zugehörigen Hinweise sind in Kapitel A.7 zu finden.

Chemikalie	Symbole	H-Sätze	P-Sätze
1,1'-Carbonyldiimidazol		H302, H314, H360D	P201, P202, P264, P280, P308+P313, P501
2,2'-Azobis-[2-(2-imidazolin-2-yl)-propan]dihydrochlorid	Kein gefährlicher Stoff gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
4-Aminobenzenthiole		H314	P260, P280, P30+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338
4-Mercaptophenyl-essigsäure		H315, H318, H335	P280, P302+P352, P305+P351+P338 +P310
4-Methylbenzenthiole		H319	P280, P305+P351+P338, P337+P313
Aceton		H225, H319, H336	P210, P305+P351 +P338
Biphenyl-4,4'-dithiole		H302, H413	P273, P301+P312 +P330
Biphenyl-4-thiole		H302, H410	P273, P301+P312 +P330

*weiter auf der nächsten Seite*

Chemikalie	Symbole	H-Sätze	P-Sätze
Cetyltrimethyl- ammoniumbromid		H302, H315, H318, H335, H373, H410	P273, P280, P301+P312+P330, P302+P352, P305+P351+P338 +P310, P314
Chloroform		H302, H315, H319, H331, H336, H351, H361d, H372	P201, P301+P312+P330, P302+P352, P304+P340+P311, P305+P351+P338, P308+P313
Divinylbenzol		H302, H315, H317, H318, H335, H412	P273, P280, P301+P312+P330, P302+P352, P305+P351+P338 +P310
Ethanol		H225, H319	P210, P305+P351 +P338
Glycerin	Kein gefährlicher Stoff gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
n-Hexan		H225, H304, H315, H336, H361fd, H373, H411	P210, P240, P273, P301+P330+P331, P302+P352, P314, P403+P233
Kaliumcyanid		H290, H300+H310 +H330, H372, H410	P262, P273, P280, P301+P310+P330, P302+P352+P310, P304+P340+P310

*weiter auf der nächsten Seite*

Chemikalie	Symbole	H-Sätze	P-Sätze
Kohlenstoffdisulfid	  	H225, H315, H319, H332, H361fd, H372	P201, P210, P302+P352, P304+P340+P312, P305+P351+P338, P308+P313
L-Ascorbinsäure	Kein gefährlicher Stoff gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Methanol	  	H225, H301+H311 +H331, H370	P210, P280, P301+P310+P330, P302+P352+P312, P304+P340+P311
Naphthalen-1-thiol		H302	P301+P312 +P330
Natriumhydroxid		H290, H314	P260, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338
1-Octadecanthiol	 	H315, H400	P273, P302+P352
Octadecylamin	  	H304, H315, H318, H373, H410	P273, P280, P301+P310, P305+P351+P338 +P310, P331, P501
Octanthiol	 	H317, H410	P273, P280, P302+P352
Oleylamin	   	H302, H304, H314, H335, H373, H410	P260, P280, P301+P310, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338

*weiter auf der nächsten Seite*

Chemikalie	Symbole	H-Sätze	P-Sätze
Salpetersäure (65 %)	  	H272, H290, H314, H331	P210, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340+P311, P305+P351+P338 +P310
Salzsäure (37 %)	 	H290, H314, H335	P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338 +P310
Silbernitrat	  	H272, H290, H314, H410	P210, P260, P273, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338 +P310
Styrol	  	H226, H315, H319, H332, H361d, H372	P201, P210, P303+P361+P353, P304+P340+P312, P305+P351+P338, P308+P313
Tanninsäure	Kein gefährlicher Stoff gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Tetrachlorogold(III)-säure	 	H302, H314, H317	P280, P305+P351+P338, P310
Tetrahydrofuran	  	H225, H302, H319, H335, H336, H351	P201, P210, P301+P312+P330, P305+P351+P338, P308+P313
Tributylphosphin	  	H226, H250, H302+H312, H314	P210, P280, P302+P334, P305+P351+P338, P370+P378, P422

*weiter auf der nächsten Seite*

Chemikalie	Symbole	H-Sätze	P-Sätze
Trinatriumcitrat	Kein gefährlicher Stoff gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Wasserstoffperoxid	The image shows two red diamond-shaped GHS hazard symbols. The first is the Oxidizing symbol (O), which depicts a flame over a circle. The second is the Hazardous symbol (Xn), which depicts a black exclamation mark.	H302, H318, H412	P273, P280, P301+P312+P330, P305+P351+P338 +P310

## A.7 Sicherheits- und Gefahrenhinweise (H- & P-Sätze)

**Tabelle A.2:** Alle H-, EUH- und P-Sätze.

Nummer	Satz
H200	Instabil, explosiv
H201	Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
H202	Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H203	Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H204	Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H205	Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
H220	Extrem entzündbares Gas.
H221	Entzündbares Gas.
H222	Extrem entzündbares Aerosol.
H223	Entzündbares Aerosol.
H224	Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H240	Erwärmung kann Explosion verursachen.
H241	Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
H242	Erwärmung kann Brand verursachen.
H250	Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
H251	Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H252	In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H260	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
H261	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
H270	Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
H271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
H281	Enthält tiefkaltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H300	Lebensgefahr bei Verschlucken.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H304	Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
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.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H331	Giftig bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350	Kann Krebs erzeugen.
H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
H362	Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
H370	Schädigt die Organe.
H371	Kann die Organe schädigen.
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
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.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
H413	Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.
H350i	Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
H360F	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H361d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H361fd	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H360Fd	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H360Df	Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
EUH001	In trockenem Zustand explosionsgefährlich.
EUH006	Mit und ohne Luft explosionsfähig.
EUH014	Reagiert heftig mit Wasser.
EUH018	Kann bei Verwendung explosionsfähige/entzündbare Dampf/Luft-Gemische bilden.
EUH019	Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
EUH044	Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
EUH029	Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
EUH031	Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
EUH032	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
EUH066	Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
EUH070	Giftig bei Berührung mit den Augen.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
EUH071	Wirkt ätzend auf die Atemwege.
EUH059	Die Ozonschicht schädigend.
EUH201	Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten.
EUH201A	Achtung! Enthält Blei.
EUH202	Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
EUH203	Enthält Chrom (VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH204	Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH205	Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH206	Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.
EUH207	Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.
EUH208	Enthält <i>(Name des sensibilisierenden Stoffes)</i> . Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH209	Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
EUH209A	Kann bei Verwendung entzündbar werden.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
EUH401	Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchsanleitung einhalten.
P101	Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
P102	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
P103	Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210	Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P211	Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
P220	Von Kleidung/.../brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
P221	Mischen mit brennbaren Stoffen/... unbedingt verhindern.
P222	Kontakt mit Luft nicht zulassen.
P223	Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.
P230	Feucht halten mit ...
P231	Unter inertem Gas handhaben.
P232	Vor Feuchtigkeit schützen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P234	Nur im Originalbehälter aufbewahren.
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.
P244	Druckminderer frei von Fett und Öl halten.
P250	Nicht schleifen/stoßen/.../reiben.
P251	Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
P262	Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
P263	Kontakt während der Schwangerschaft und der Stillzeit vermeiden.
P264	Nach Gebrauch . . . gründlich waschen.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P271	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
P282	Schutzhandschuhe/Gesichtsschild/Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
P283	Schwer entflammbare/flammhemmende Kleidung tragen.
P284	Atemschutz tragen.
P285	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P231 + P232	Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
P235 + P410	Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.
P301	BEI VERSCHLUCKEN:
P302	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT:
P303	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar):
P304	BEI EINATMEN:
P305	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:
P306	BEI KONTAMINIRTER KLEIDUNG:
P307	BEI Exposition:
P308	BEI Exposition oder falls betroffen:

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
P309	BEI Exposition oder Unwohlsein:
P310	Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P311	GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P312	Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P313	Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P315	Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P320	Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P321	Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P322	Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P330	Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P332	Bei Hautreizung:
P333	Bei Hautreizung oder -ausschlag:
P334	In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
P335	Lose Partikel von der Haut abbürsten.
P336	Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
P337	Bei anhaltender Augenreizung:
P338	Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P340	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
P341	Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P342	Bei Symptomen der Atemwege:
P350	Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
P351	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
P352	Mit viel Wasser und Seife waschen.
P353	Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P360	Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
P361	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
P362	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P363	Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
P370	Bei Brand:
P371	Bei Großbrand und großen Mengen:
P372	Explosionsgefahr bei Brand.
P373	KEINE Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe/Gemische/Erzeugnisse erreicht.
P374	Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
P375	Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P376	Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P377	Brand von ausströmendem Gas:Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
P378	... zum Löschen verwenden.
P380	Umgebung räumen.
P381	Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
P390	Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
P391	Verschüttete Mengen aufnehmen.
P301 + P310	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P301 + P312	BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P301 + P330 + P331	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
P302 + P334	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
P302 + P350	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
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 + P341	BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P305 + P351 + P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P306 + P360	BEI KONTAKT MIT DER KLEIDUNG: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
P307 + P311	BEI Exposition: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P308 + P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P309 + P311	BEI Exposition oder Unwohlsein: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P332 + P313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P333 + P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P335 + P334	Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
P337 + P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342 + P311	Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P370 + P376	Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P370 + P378	Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
P370 + P380	Bei Brand: Umgebung räumen.
P370 + P380 + P375	Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P371 + P380 + P375	Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P401	... aufbewahren.
P402	An einem trockenen Ort aufbewahren.
P403	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P404	In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.

*weiter auf der nächsten Seite*

<b>Nummer</b>	<b>Satz</b>
P406	In korrosionsbeständigem/... Behälter mit korrosionsbeständiger Auskleidung aufbewahren.
P407	Luftspalt zwischen Stapeln/Paletten lassen.
P410	Vor Sonnenbestrahlung schützen.
P411	Bei Temperaturen von nicht mehr als °C aufbewahren.
P412	Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
P413	Schüttgut in Mengen von mehr als kg bei Temperaturen von nicht mehr als °C aufbewahren.
P420	Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.
P422	Inhalt in/unter ... aufbewahren.
P402 + P404	In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.
P403 + P233	Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P403 + P235	Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P410 + P403	Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P410 + P412	Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
P411 + P235	Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr als °C aufbewahren.
P501	Inhalt/Behälter ... zuführen.

## A.8 Acknowledgment

Special thanks to **Prof. Dr. Horst Weller** for the friendly reception in his work group, for the exciting topics, the advices and support and the excellent scientific environment.

Thanks to **Prof. Dr. Alf Mews** for the second review of this work and also for the support from his work group, especially from **Svenja**.

Thanks to my entire work group for the friendly reception, support, fun and for the scientific discussions, especially: **Jan-Philip, Marion, Marcus, Rieke, Lasse, Felix, Bendix, Sebastian W., Jil, Michael, Johannes, Daniel, Gregor, Maik, Sönke, Sebastian G., Artur, Agnes, Stefan, Andreas, Mazlum, Katrin, Hauke**.

Thanks to **Sigrid Zeckert** and **Martina Krasa** for organizing a lot of bureaucratic and nonburocratic matters.

Thanks to my students, especially: **Alex, Elena, Tobias**.

Thanks to **Prof. Dr. Holger Lange** and his workgroup, especially **Florian, Mona** and **Emanuele** for the support and collaboration.

Thanks to the people of the *CIC biomaGUNE* in Spain for the excellent collaboration: **Prof. Dr. Luis M. Liz-Marzan, Dorleta, Leonardo** and **Judith**.

Thanks to the **Prof. Dr. Sara Bals** and her work group at the *EMAT*, University of Antwerpen for the insightful collaboration.

Thanks to the people who made my internship at the University of Oviedo in Spain possible and gorgeous: **Prof. Dr. Santiago Garcia Granda, Prof. Dr. Wolfgang Maison, Prof. Dr. Jürgen Heck, Jens Tröller, Rafael, Ruben, Guillermo, Nacho**.

Thanks to my friends and companions: **Alex, Vedran, Joscha, Deniz, Cristina, Marie, Damla, Jorit, Rene, Pascal, Manuel, Lou, Mikko, Saskia, Silvano, Benji, Natalie**.

Special thanks to my love and greatest supporter: **Daniela**.

Special thanks to my family: **Elisabeth, Stephan, Mona, Birgit, Ralf, Bernhard, Lugder, Barbara, Anette, Jürgen, Angelika, Uwe, Niklas, Helena, Lea, Gregor, Edgar, Silvia, Marie-Luise, Heinz, Andreas, Beate, Hans** and thanks to my grandparents **Bernd, Paula, Walter, Maria** who surely would be proud of me.

## **A.9 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 23.11.2020

Marius Schumacher