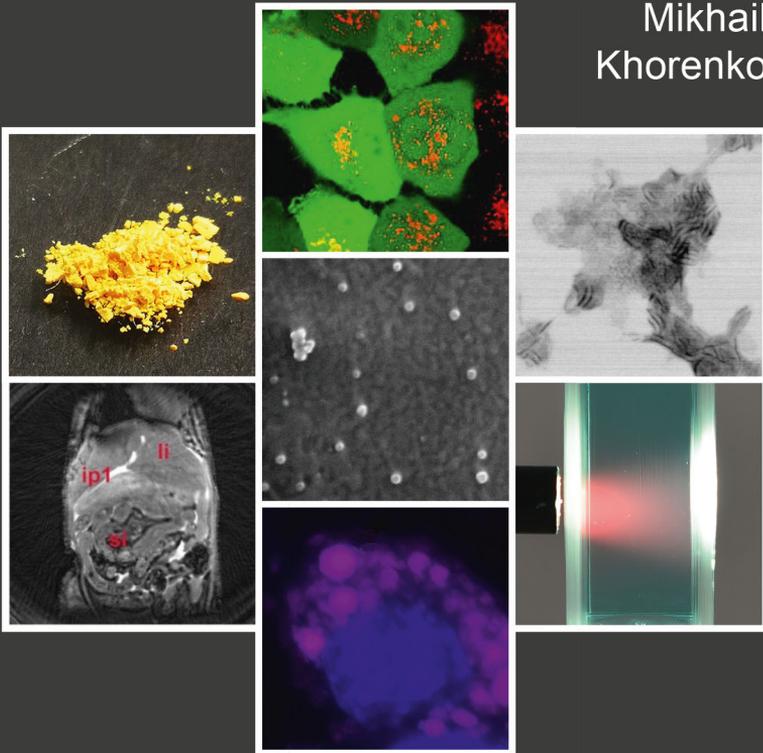


Synthese und Charakterisierung anorganisch-organischer Hybridnanopartikel mit biologisch-medizinischem Anwendungspotential

Mikhail
Khorenko





Synthese und Charakterisierung
anorganisch-organischer Hybridnanopartikel
mit
biologisch-medizinischem
Anwendungspotential





Synthese und Charakterisierung anorganisch-organischer Hybridnanopartikel mit biologisch-medizinischem Anwendungspotential

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Mikhail Khorenko

aus

St. Petersburg, Russland

Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm

Referent: Prof. Dr. Claus Feldmann

Korreferent: Prof. Dr. Ute Schepers

Tag der mündlichen Prüfung: 20. April 2020



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2020

Zugl.: (KIT) Karlsruhe, Univ., Diss., 2020

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2020

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2020

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-7262-9

eISBN 978-3-7369-6262-0

Die vorgelegte Arbeit wurde im Zeitraum vom Oktober 2016 bis März 2020 am Institut für Anorganische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter Anleitung von Prof. Dr. Claus Feldmann angefertigt.

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig angefertigt wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt wurden. Wörtlich und inhaltlich übernommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Ich habe dabei die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in ihrer gültigen Fassung beachtet.

Mikhail Khorenko

Karlsruhe, den 5. März 2020



„Man braucht nichts im Leben zu fürchten,
man muss nur alles verstehen.“

Marie Curie, 1867-1934





INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
2	<u>ANALYTISCHE METHODEN</u>	5
2.1	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	5
2.1.1	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	8
2.1.2	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE	9
2.1.3	ENERGIEDISPERSIVE RÖNTGENSPEKTROSKOPIE	12
2.2	DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG	14
2.3	ZETA-POTENTIALMESSUNGEN	16
2.4	THERMOGRAVIMETRISCHE ANALYSE	19
2.5	ELEMENTARANALYSE	20
2.6	RÖNTGENPULVERDIFFRAKTOMETRIE	21
2.7	SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	23
2.7.1	PHOTOLUMINESZENZSPEKTROSKOPIE	24
2.7.2	UV-VIS-SPEKTROSKOPIE	27
2.7.3	FOURIER-TRANSFORM-INFRAROTSPEKTROSKOPIE	28
2.8	MASSENSPEKTROMETRIE	31
2.9	<i>IN VITRO-</i> & <i>IN VIVO</i>-STUDIEN	34
2.9.1	FLUORESCENZMIKROSKOPIE	34
2.9.2	UNTERSUCHUNG DER ZELLVIABILITÄT	35
2.9.3	STUDIEN ZUR ZELLULÄREN AUFNAHME	37
2.9.4	EVALUATION DER ANTIVIRALEN WIRKUNG	37
2.9.5	MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE	38
3	<u>PRÄPARATIVE METHODEN</u>	39
3.1	KONTROLLE DER PARTIKELSYNTHESE	39
3.2	AUFARBEITUNG DER PARTIKELSUSPENSION	41
3.3	FREISETZUNGSVERSUCHE	42
3.4	BELICHTUNGSVERSUCHE ZUR INDUKTION DER ROS ERZEUGUNG	43
3.5	EVALUATION DES TUMORWACHSTUMS	44
3.6	VERWENDETE CHEMIKALIEN	45



4	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT BIOKOMPATIBLER BELADUNG	47
4.1	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT ADENOSIN-5'-MONOPHOSPHAT	47
4.1.1	SYNTHESE	48
4.1.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	48
4.1.3	<i>IN VIVO</i> : EINSATZ IN DER MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE	52
4.2	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT FOLSÄURE	55
4.2.1	SYNTHESE	56
4.2.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	57
4.3	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT COENZYMATISCHER BELADUNG	60
4.3.1	SYNTHESE	61
4.3.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	63
4.3.3	FLUORESZENZMARKIERUNG MIT INDOCYANINGRÜN	70
4.3.4	<i>IN VITRO</i> : ZELLAUFNAHME UND TOXIZITÄT	71
4.4	ZUSAMMENFASSUNG	73
5	ZYTOTOXISCHE HYBRIDNANOPARTIKEL ZUR ANTITUMORALEN ANWENDUNG	75
5.1	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT PEMETREXED	76
5.1.1	SYNTHESE	77
5.1.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	77
5.2	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT METHOTREXAT	84
5.2.1	SYNTHESE	85
5.2.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	85
5.3	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT ESTRAMUSTINPHOSPHAT	89
5.3.1	SYNTHESE	89
5.3.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	90
5.4	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT FLUDARABINPHOSPHAT	93
5.4.1	SYNTHESE	94
5.4.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	94
5.5	HYBRIDNANOPARTIKEL ZUR MULTIMODALEN KREBSBEHANDLUNG	98
5.5.1	SYNTHESE	98
5.5.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	100
5.6	FLUORESZENZMARKIERUNG MIT INDOCYANINGRÜN	106
5.7	EVALUATION DER NANOPARTIKELEIGENSCHAFTEN <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i>	108
5.8	ZUSAMMENFASSUNG	112



6	<u>PHOTO- UND ZYTOTOXISCHE HYBRIDNANOPARTIKEL ZUR ANTITUMORALEN ANWENDUNG</u>	115
6.1	EXKURS: PHOTODYNAMISCHE THERAPIE	117
6.2	SYNTHESE	119
6.3	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	120
6.4	OPTISCHE EIGENSCHAFTEN	129
6.5	IN VITRO-EVALUATION DER PHOTO- UND ZYTOTOXISCHEN EIGENSCHAFTEN	131
6.5.1	ZELLAUFNAHME UND NACHWEIS DER PHOTOTOXIZITÄT	131
6.5.2	ZELLTOXIZITÄT MIT UND OHNE BELICHTUNG	133
6.5.3	AUSWIRKUNG AUF DIE ANGIOGENESE	137
6.6	ZUSAMMENFASSUNG	140
7	<u>HYBRIDNANOPARTIKEL ZUR ANTIBAKTERIELLEN ANWENDUNG</u>	143
7.1	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT NOVIOCIIN	143
7.1.1	SYNTHESE	145
7.1.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	145
7.2	HYBRIDNANOPARTIKEL MIT TEDIZOLIDPHOSPHAT	151
7.2.1	SYNTHESE	152
7.2.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	152
7.3	FLUORESZENZMARKIERUNG MIT INDOCYANINGRÜN, DY647-DUTP UND N ⁶ -(6-AMINOHEXYL)-ATP-ATTO-647N	159
7.4	UNTERSUCHUNGEN DER ZELLULÄREN AUFNAHME UND DER THERAPEUTISCHEN EFFIZIENZ	162
7.5	ZUSAMMENFASSUNG	166
8	<u>HYBRIDNANOPARTIKEL MIT FOSCARNET ZUR ANTIVIRALEN ANWENDUNG</u>	167
8.1	SYNTHESE	168
8.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	169
8.3	FLUORESZENZMARKIERUNG MIT DY647-DUTP	178
8.4	IN VITRO: ANTIVIRALER EINFLUSS DER HYBRIDNANOPARTIKEL AUF HUMANES CMV	180
8.5	ZUSAMMENFASSUNG	184
9	<u>ZERSETZUNG VON HYBRIDNANOPARTIKELN IN IN-VIVO ANGENÄHERTEN SYSTEMEN</u>	187
9.1	SYNTHESE	188



9.2	MATERIALCHARAKTERISIERUNG	190
9.3	FLUORESZENZEIGENSCHAFTEN	197
9.4	UNTERSUCHUNG DES AUFLÖSEVERHALTENS	198
9.5	ZUSAMMENFASSUNG	209
10	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>211</u>
11	<u>AUSBLICK</u>	<u>215</u>
12	<u>LITERATUR</u>	<u>217</u>
13	<u>ANHANG</u>	<u>227</u>
13.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	227
13.2	EA-DATEN ZU ICG-MODIFIZIERTEN HYBRIDNANOPARTIKELN	233
13.3	ZUSAMMENSETZUNG VON FETALEM KÄLBERSERUM	237
13.4	EA-MESSDATEN ZU AUFLÖSUNGSSTUDIEN	238
13.5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	239
13.6	TABELLENVERZEICHNIS	249
13.7	KONFERENZEN UND TAGUNGEN	251
13.8	PUBLIKATIONSLISTE	253
13.9	LEBENS LAUF	255
14	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>257</u>



1 EINLEITUNG

Die Erhaltung der Gesundheit ist eine permanente Herausforderung, mit der sich der Mensch und heutzutage auch immer stärker die Gesellschaft auseinandersetzt. Die Bewältigung dieser Herausforderung ist die Kernaufgabe der Medizin, die durch Verbesserung der Lebensqualität gesellschaftliche Haltungen und Strukturen maßgeblich beeinflusst. Dank dem technischen Progress konnte die Medizin in den letzten Jahrzehnten riesige Fortschritte erzielen. Die Entwicklung von sowohl hochauflösenden bildgebenden als auch hochpräzisen analytischen Verfahren ermöglichte einen Einblick in Strukturen und Mechanismen auf zellulärer Ebene und trug auf diese Weise zu einem besseren Verständnis von Krankheitsursachen, -abläufen und Einflussfaktoren bei. Anhand dieser Erkenntnisse konnten neue, effektivere Medikamente, Diagnose- und Therapieverfahren entwickelt und verbessert werden.

Der Zugang zur Beobachtung und Analyse von biologischen Prozessen auf mikroskopischer Ebene führte zum natürlichen Verlangen nach einer bedarfsgerechten Steuerung dieser Prozesse, um beispielsweise in Form einer Therapie Krankheitsursachen gezielt und hochselektiv bekämpfen zu können. Auf dieser Grundlage konnte sich die sogenannte Nanomedizin zuerst als neues Forschungsgebiet entwickeln und anschließend sich als vielversprechende Richtung in der modernen Medizin etablieren. Das Spielfeld der Nanomedizin ist gemäß der Arbeitsgruppe Nanomedizin (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) definiert als „[...] die Anwendung von meist synthetisch hergestellten Stoffen und Strukturen, die bedingt durch ihre Größe (< 100 nm) über neue spezifische Eigenschaften verfügen und die für medizinische Zwecke wie Diagnose und Behandlung von Krankheiten im Sinne des Arzneimittelgesetzes bzw. des Medizinproduktegesetzes bestimmt sind.“^[1]

Die Entwicklung von nanoskaligen Verbindungen zur medizinischen Anwendung ist durch die erwarteten Vorteile einer solchen Therapie gegenüber dem Einsatz freier Wirkstoffe motiviert. Dazu gehört in erster Linie die Möglichkeit, eine hohe Wirkstoffbeladung aufzunehmen und diese in geschützter Form durch den Körper zu bewegen. Auf diese Weise kann zum einen die Zersetzung der Wirkstoffe im biologischen Medium vermieden und zum anderen die Verweilzeit der Wirkstoffe im Körper signifikant erhöht werden.^[2] Außerdem ermöglicht der Einsatz nanoskaliger Verbindungen die Umsetzung einer multimodalen Behandlung. Diese kann sowohl aus einer Kombination mehrerer therapeutischer Wirkstoffe als auch aus einer Kombination von therapeutischen und bildgebenden Verfahren bestehen.

Erste Schritte zum Einsatz von nanoskaligen Transportsystemen für eine medizinische Anwendung sind aus den Arbeiten von Khanna und Speiser (1969) bekannt.^[3,4] Hierbei wurden Impfstoffe in Nanokapseln aus Polyacrylamid erst oral, später aber auch intravenös, verabreicht. Die injizierten Nanokapseln sollten dauerhaft im Blut zirkulieren und langsam den Impfstoff freisetzen. Auf diese Weise wurde versucht die Notwendigkeit mehrfacher Injektionen, die bei Impfungen gegen Tetanus, Diphtherie und andere Infektionen erforderlich sind, zu umgehen.^[5] Auf Basis dieser Arbeiten wurde zuerst in der Gruppe von Speiser, später aber auch in anderen Forschungsgruppen, ein rasanter Entwicklungsprozess von neuen Materialkonzepten für nanoskalige Wirkstoffträger eingeleitet.^[6] In diesem Zuge wurden auch weitere Vorteile und Einsatzmöglichkeiten für solche Verbindungen aufgedeckt. So wurden bereits im Jahre 1978 Nanopartikel aus denaturiertem Albumin vorgestellt, in die das Chemotherapeutikum Doxorubicin sowie magnetisches Fe_3O_4 eingelagert waren.^[7] An diesen Nanopartikeln konnte die Möglichkeit einer extern gesteuerten Anreicherung in einem definierten Teil des Organismus aufgezeigt werden, die zu einer ortsselektiven therapeutischen Wirkung geführt hat.

Der Vorteil einer selektiven Anreicherung kann jedoch auch ohne einen externen Eingriff erfolgen. Hierbei wird zwischen einem passiven und einem aktiven Prozess unterschieden. Eine passive Anreicherung kann beispielsweise bei einer erhöhten Permeabilität der Blutgefäßwände erfolgen, wie sie in entzündetem Gewebe und in Tumoren beobachtet wird.^[8,9] So resultiert die schnelle Proliferation von Tumorgewebe, die einer ständigen Zufuhr an Nährstoffen bedarf, in einer mangelhaften Struktur des neu aufgebauten vaskulären Systems. Die Blutgefäßwände weisen größere Fenestrierungen auf, durch die Makromoleküle (> 40 kDa) und nanoskalige Partikel in das Gewebe eintreten können.^[9] Da das Tumorgewebe weiterhin durch eine schlechte Effizienz des lymphatischen Systems gekennzeichnet ist, können diese Makromoleküle und Nanopartikel nicht aus dem Tumorgewebe abtransportiert werden und es erfolgt eine lokale Anreicherung. Dieses Phänomen ist als der EPR-Effekt bekannt (engl.: *Enhanced Permeability and Retention*).^[9,10]

Eine aktive Anreicherung von Nanopartikeln in bestimmten Zelltypen kann über eine gezielte Ansteuerung von zellspezifischen Rezeptoren erfolgen (*Drug Targeting*). Die Oberfläche der Nanopartikel muss hierfür mit entsprechenden Liganden modifiziert sein (z.B. Antikörper, Peptide, Folat-Analoga).^[11–13] Weiterhin können Beschichtungen mit Substanzen, die in molekularer Form von Zellen vermehrt aufgenommen und verwertet werden, zu einer Steigerung der Aufnahme rate führen (z.B. Albumin, Mono- und Polysaccharide).^[14–16]



Dieser Prozess ist jedoch weniger selektiv und lässt sich primär an Tumorzellen aufgrund deren erhöhten Energiebedarfs anwenden.

Die Nanopartikel, die sich auf die beschriebene Art und Weise lokal anreichern lassen, können sowohl therapeutische als auch bildgebende Eigenschaften haben. Zu bildgebenden Verfahren, die auf Basis von Nanopartikeln angewendet werden können, gehören die Magnetresonanztomographie (MRT) und die optische Bildgebung. Magnetische Eigenschaften, auf denen der Einsatz von Nanopartikel als MRT-Kontrastmittel basiert, können beispielsweise durch den Einbau von paramagnetischem Gadolinium oder durch die Einlagerung von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (engl.: *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*, SPIONs) erreicht werden.^[17,18] Für die optische Bildgebung werden Fluoreszenzmarker eingesetzt. Hierbei handelt es sich meist um organische Fluoreszenzfarbstoffe oder anorganische fluoreszierende Nanopartikel (z.B. CdTe und CdSe Q-Dots).^[19,20]

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert bereits eine Vielzahl an erfolgreich demonstrierten Materialkonzepten für Nanopartikel, die eine simultane Therapie und Diagnostik ermöglichen und somit dem Bereich der Theranostik zugeordnet werden können. Zu diesen gehören mesoporöse Silica-Nanopartikel,^[21] Metall- und Metalloxid-Nanopartikel (z.B. Au-Nanopartikel, SPIONs),^[22–24] Kohlenstoff-Nanoröhren,^[25] Polymer-Nanopartikel,^[26] Liposome und Dendrimere.^[27–29] Die funktionelle Beladung ist hierbei entweder innerhalb der Nanopartikel eingeschlossen oder auf der Oberfläche immobilisiert.^[30–33] Ebenso kann das Trägermaterial über eine funktionelle Eigenschaft verfügen und wie im Falle von SPIONs zur therapeutischen und/oder bildgebenden Wirkung der Partikel beitragen.

Die vorgestellten Nanopartikelkonzepte erlauben jedoch nur einen verhältnismäßig geringen Wirkstoffanteil im Vergleich zum Anteil des Trägermaterials. So liegt dieser für mesoporöse Siliziumdioxid-Nanopartikel (MSNP) und Polymer-Nanopartikel in der Regel unter 10 Gew-%.^[15,34,35] Da die Effizienz einer nanopartikelbasierten Wirkstoffanreicherung in direkter Korrelation mit dem Beladungsgrad steht, bietet es sich an, Materialkonzepte zu entwickeln, die dieser Anforderung gerecht werden können. Einen Ansatz hierfür bietet mit 70 – 90 Gew-% funktioneller Beladung das Konzept der anorganisch-organischen Hybridnanopartikel.^[35,36] Es handelt sich um nanoskalige Verbindungen mit einer salzartigen Zusammensetzung aus anorganischen Kationen und funktionellen organischen Anionen. Die Herstellung erfolgt über eine einfache, meist wasserbasierte Synthese, die sich positiv auf die Biokompatibilität der Hybridnanopartikel auswirkt.

Erste Verbindungen nach diesem Materialkonzept wurden von Roming *et al.* unter Einsatz von $[\text{ZrO}]^{2+}$ -Kationen und funktionellen Organophosphatanionen $[\text{R}_{\text{Funktion-O-PO}_3}]^{2-}$ hergestellt.^[37] Im weiteren Entwicklungsverlauf konnte von Poß *et al.* und Neumeier *et al.* die Anwendbarkeit dieses Materialkonzepts auch auf funktionelle organische Anionen mit Sulfonat- und Carboxylat-Gruppen übertragen werden.^[34,36,38] Um eine Schwerlöslichkeit in wässrigem Medium zu gewährleisten, musste hierbei auch das Kation variiert werden, sodass das Materialkonzept um Gd^{3+} -, La^{3+} -, Cu^{2+} - und Ag^+ -Kationen erweitert wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Hybridnanopartikel weisen eine entzündungshemmende, antibakterielle oder chemotherapeutische Wirkung auf oder können aufgrund eingebauter Fluoreszenzfarbstoffe zur optischen Bildgebung eingesetzt werden.^[35,39,40] Weiterhin ist in der Arbeit von Poß *et al.* die Möglichkeit aufgezeigt worden, Hybridnanopartikel als MRT-Kontrastmittel einzusetzen.^[41]

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und Charakterisierung von neuartigen anorganisch-organische Hybridnanopartikeln auf Basis von Gd^{3+} - und $[\text{ZrO}]^{2+}$ -Kationen, die aufgrund ihrer Wirkstoffbeladung in unterschiedlichen Bereichen von Biologie und Medizin eingesetzt werden können. Hierbei sollten auch neue Anwendungsgebiete, so wie die Behandlung viraler Erkrankungen, für Hybridnanopartikel erschlossen werden. Außerdem sollten Hybridnanopartikel entwickelt werden, die mehrere chemotherapeutischen, phototoxischen oder antibakteriellen Wirkstoffe kombinieren. Auf diese Weise sollte das vielversprechende Modell einer Kombinationstherapie mit mehreren Wirkstoffen auf anorganisch-organische Hybridnanopartikel übertragen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Modifizierung der hergestellten Hybridnanopartikel mit Fluoreszenzfarbstoffen, um die Detektierbarkeit der Hybridnanopartikel *in vitro*- und *in vivo*-Studien zu ermöglichen. Durch den Einsatz von Gd^{3+} als Kation sollte zudem ein Anschluss zwischen den bereits bekannten $[\text{GdO}]^+[\text{ICG}]^-$ -Hybridnanopartikeln, für die eine Anwendbarkeit als MRT-Kontrastmittel belegt werden konnte, und wirkstoffbeladenen Hybridnanopartikeln geknüpft werden. Solche Nanopartikel, die über therapeutische und bildgebende Eigenschaften verfügen, sind von besonderem Interesse für einen Einsatz in der Theranostik.



2 ANALYTISCHE METHODEN

2.1 Elektronenmikroskopie

Unter dem Auflösungsvermögen eines Mikroskops versteht man den minimalen Abstand zweier punktförmiger Objekte, bei dem diese getrennt wahrgenommen werden können. Für ein Lichtmikroskop wird das Auflösungsvermögen nach der Theorie von Ernst Abbè durch die Wellenlänge des Lichts λ und die numerische Apertur beschrieben. Die numerische Apertur definiert die Eigenschaft der Linse, Licht zu fokussieren. Dabei setzt sie sich aus dem Brechungsindex des Mediums n und dem halben Öffnungswinkel α aufseiten des Objekts zusammen.

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin\alpha} \quad (2.1)$$

Bei Wellenlängen des sichtbaren Lichts zwischen 380 und 780 nm liegt die Auflösungsgrenze damit bei etwa 0,2 μm . Da dies unzureichend ist, um nanoskalige Objekte zu untersuchen, wird hier auf mikroskopische Methoden mit hochenergetischen Elektronenstrahlen zurückgegriffen. Der Welle-Teilchen-Dualismus von Elektronen ermöglicht Strukturuntersuchungen bis in den Sub-Nanometerbereich. Die Wellenlänge der Elektronen steht dabei nach der De-Broglie-Gleichung in direktem Zusammenhang mit deren Bewegungsgeschwindigkeit.

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m_0 v} \quad (2.2)$$

h ist hierbei das Planck'sche Wirkungsquantum und p der Impuls des Teilchens, welcher sich aus seiner Ruhemasse m_0 und seiner Geschwindigkeit v zusammensetzt.

Der Elektronenstrahl bei mikroskopischen Messverfahren wird in der Regel durch thermische Anregung und Ladungsextraktion im elektrischen Spannungsfeld erzeugt. Die anschließende zielgerichtete Beschleunigung der Elektronen zur Probe erfolgt durch eine Loch-Anode, wobei über die Beschleunigungsspannung U_B die Geschwindigkeit der Elektronen mit der Elementarladung e und damit auch deren Wellenlänge reguliert wird. Der Zusammenhang zwischen diesen Größen wird über die beiden Formeln ersichtlich, mit denen die Energie des Elektrons beschrieben werden kann.

$$E_{el} = eU_B \quad (2.3)$$

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m_0 v^2 \quad (2.4)$$

Da in diesem Fall die elektrische Energie E_{el} , die sich aus U_B und der Elementarladung e zusammensetzt, der kinetischen Energie E_{kin} des Teilchens entspricht, können diese gleichgesetzt werden. Im Zusammenhang mit der De-Broglie-Gleichung kann damit die Abhängigkeit der Wellenlänge von der Beschleunigungsspannung folgendermaßen beschrieben werden:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0 e U_B}} \quad (2.5)$$

Diese Gleichung gilt jedoch nur für Elektronen mit einer Energie < 100 keV. Wenn sich die Geschwindigkeit des Elektrons der Lichtgeschwindigkeit c annähert, kann die Abweichung der relativistischen Masse m_{rel} von m_0 nicht mehr vernachlässigt werden.

$$m_{rel} = m_0 \cdot \frac{1}{\sqrt{1 - \left(\frac{v}{c}\right)^2}} \quad (2.6)$$

Mit dieser Erweiterung nimmt Gleichung (2.5) die folgende Form an:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0 e U_B \cdot \left(1 + \frac{e U_B}{2m_0 c^2}\right)}} \quad (2.7)$$

Dementsprechend beträgt beispielsweise die Wellenlänge von Elektronen in einem Transmissionselektronenmikroskop mit 200 kV Beschleunigungsspannung etwa 2,51 pm, sodass die theoretische Auflösungsgrenze im subatomaren Bereich liegt. Die auftretenden Störungen in Form von nicht-idealen Umgebungsbedingungen, Abbildungsfehlern des Linsensystems und energetischen Schwankungen wirken sich jedoch limitierend auf das Auflösungsvermögen des Geräts aus.

Grundsätzlich lässt sich die Elektronenmikroskopie in zwei unterschiedliche Messanordnungen unterteilen – Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (siehe Kapitel 2.1.1 und 2.1.2). Der Hauptunterschied dieser Verfahren liegt primär in der Detektion der Teilchen, welche nach der Wechselwirkung mit dem Elektronenstrahl aus der Materie austreten. Das Probenvolumen, in dem diese Interaktion stattfindet, wird als die Anregungsbirne bezeichnet. Trotz der unterschiedlichen Beschleunigungsspannungen (REM: etwa 1 - 30 kV, TEM: etwa 80 - 400 kV) stimmen die Prozesse, welche durch das Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe zustande kommen, für beide Verfahren überein. Wie in Abbildung 1 gezeigt, führt der Beschuss mit hochenergetischen Elektronen zur Freisetzung von Rückstreu-, Sekundär- und Auger-Elektronen (RE, SE, AE). Diese werden in der Rasterelektronenmikroskopie zur Bildgebung beziehungsweise in der Augerelektronenspektroskopie zur Untersuchung der



Oberflächenzusammensetzung verwendet werden. RE, SE und AE unterscheiden sich untereinander durch ihre Entstehungsart und damit verbunden durch ihre Energie. Rückstreuerelektronen sind elastisch zurückgestreute Elektronen des Primärstrahls, welche nur einen minimalen Energieverlust gegenüber den Primärelektronen aufweisen. Elektronen, welche durch Primärelektronen aus den Elektronenschalen der Atome herausgeschlagen wurden, werden als Sekundärelektronen bezeichnet. Ihre Energie ist kleiner als 50 eV. Die Auger-Elektronen entstehen in Folge von strahlungslosen Übergängen innerhalb der Elektronenhülle der Atome des untersuchten Materials und haben deswegen diskrete materialspezifische Energiewerte.^[42,43]

Für sehr dünne Proben und hohe Beschleunigungsspannungen kann ein Teil der Elektronen die Materialbarriere passieren. Diese transmittierten Elektronen werden zur Bildgebung in der Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt. Zusätzlich zu den oben genannten Prozessen wird Energie in Form von Kathodenlumineszenz und Röntgenstrahlung freigesetzt. Die letztere kann zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Probenzusammensetzung eingesetzt werden. Dieses separate Analyseverfahren wird in Kapitel 2.1.3 behandelt.

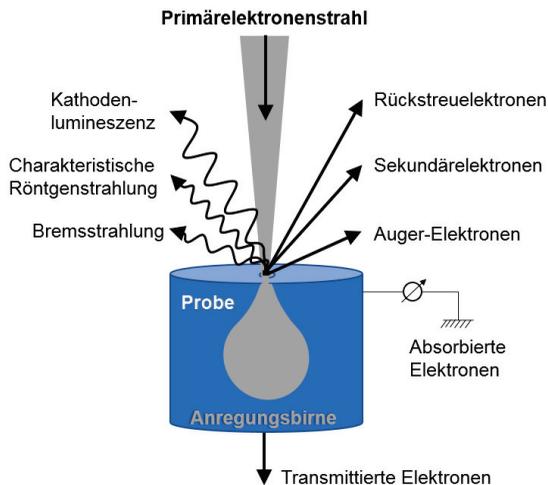


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen dem Primärelektronenstrahl und der Probe in einem Elektronenmikroskop (Abbildung modifiziert nach ^[44]).

2.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem die Oberfläche der Probe mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgerastert wird und die detektierten Sekundär- und Rückstreuelektronen pixelweise zu einem Gesamtbild der Probenoberfläche zusammengefügt werden.

Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops. Dieser besteht aus einer Elektronenquelle mit Beschleunigungsanode, einem Linsensystem zur Fokussierung des Elektronenstrahls, einem Probenträger und den Detektoren, welche oberhalb der Probe angebracht sind. Ein ebenfalls wichtiger Bestandteil des Mikroskops ist ein Vakuumsystem zur Gewährleistung eines Ultrahochvakuums (etwa 10^{-10} mbar) in der Mikroskopsäule. Auf diese Weise wird eine Streuung des Elektronenstrahls durch Wechselwirkung mit Gasmolekülen auf dem Weg zur Probe vermieden.

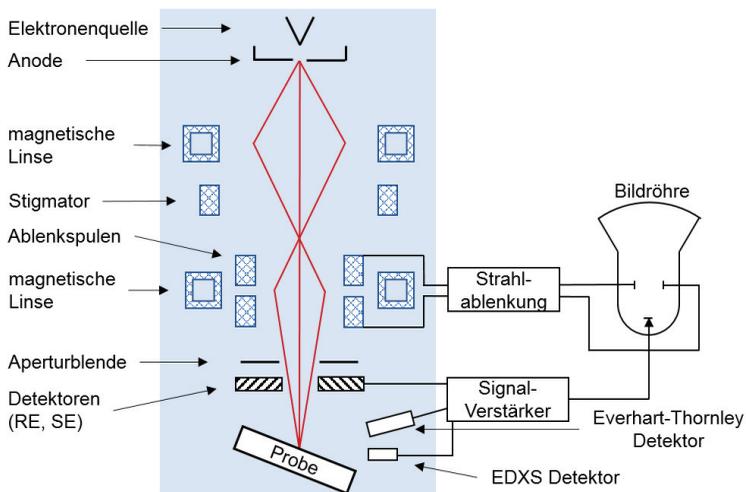


Abbildung 2. Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops.

Die meistgenutzte Informationsquelle für die Oberflächenabbildung in der Rasterelektronenmikroskopie sind die Sekundärelektronen. Bedingt durch ihre geringe Energie können nur oberflächennahe SE die Probe verlassen, sodass die erzeugten Bilder einen hohen topografischen Kontrast aufweisen. Detektiert werden Sekundärelektronen über den InLens-Detektor, welcher sich oberhalb der Probe befindet, sowie über den Everhart-Thornley-Detektor seitlich von der Probe. Über den Everhart-Thornley-Detektor können zudem auch Rückstreuelektronen abgefangen werden. Da mit zunehmender Ordnungszahl der



Atome in der Probe die Rückstreuung zunimmt, sind die aufgenommenen Bilder durch einen hohen Materialkontrast gekennzeichnet.^[42,43]

Für diese Arbeit wurde ein Supra 40VP Rasterelektronenmikroskop (CARL ZEISS, Oberkochen, Deutschland) mit einer ZrO_2/W -Feldemissionskathode (1800 K Betriebstemperatur) eingesetzt. Die REM-Bilder wurden bei 2 - 5 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen. Zur Detektion der Sekundärelektronen wurde hierbei ein InLens-Detektor mit einem Arbeitsabstand von 2 mm zur Probe verwendet. Zur Probenpräparation wurde ein Siliziumwafer mittels eines Ultraschallverneblers mit einer verdünnten, meist wässrigen Nanopartikelsuspension bedampft und bei Raumtemperatur getrocknet. Der Siliziumwafer wurde anschließend auf einen Aluminiumträger mit Leitsilber befestigt. Die Bestimmung der Größenverteilung der Partikel erfolgte anhand von einer statistischen Auszählung von mindestens 120 Partikeln mithilfe der ImageJ Software (Version 1.52p).

2.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Ähnlich zu einem Lichtmikroskop, ermöglicht die Transmissionselektronenmikroskopie eine direkte Abbildung von Objekten. Bei großer Beschleunigungsspannung, geringer Probendicke sowie hoher Ordnungszahl der Atome kann das Auflösungsvermögen bei diesem Verfahren sehr hoch sein und bis hin zur atomaren Ebene reichen. Wie in Kapitel 2.1 erläutert, liegt die theoretische Auflösungsgrenze eines Transmissionselektronenmikroskops im Pikometerbereich. Das Auflösungsvermögen wird jedoch durch Abbildungsfehler des Linsensystems, Schwankungen der Elektronenstrahlenergie und weitere Parameter eingeschränkt.

Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops. Dieser weist eine starke Ähnlichkeit mit einem Lichtmikroskop auf, wobei statt optischer Linsen elektromagnetische Linsen eingesetzt werden.

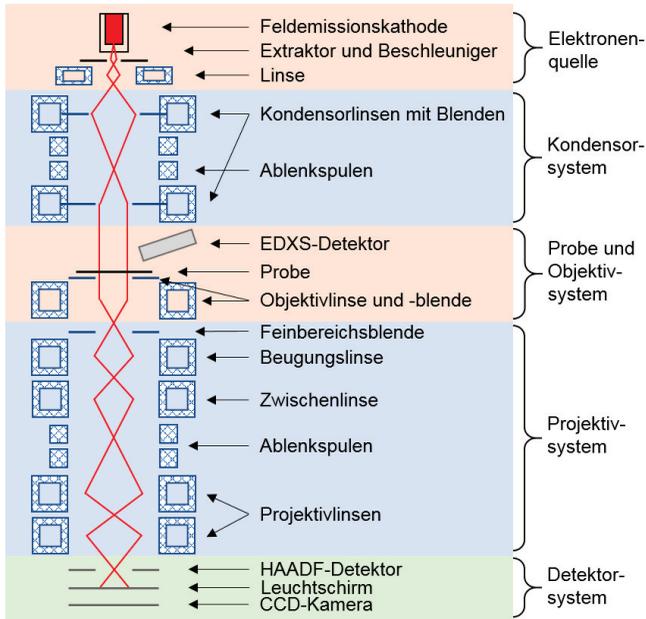


Abbildung 3. Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops.

Der obere Teil des Aufbaus – zwischen der Elektronenquelle und dem Probenträger – entspricht jenem eines Rasterelektronenmikroskops, wobei der Elektronenstrahl für TEM-Aufnahmen nicht fokussiert auf die Probe geleitet wird, sondern in Form von einem Zylinder mit parallel verlaufenden Elektronenwellen (siehe Abbildung 4a). Da bei diesem Verfahren die Bildgebung über transmittierte Elektronen erfolgt, wird die Detektion unterhalb vom Probenträger durchgeführt. Das Bild der Probe wird dabei zuerst durch ein Objektiv-Linsensystem in ein Zwischenbild überführt und anschließend durch das Projektiv-Linsensystem auf einen Leuchtschirm oder eine CCD-Kamera vergrößert. Unterschieden wird hier zwischen einer Hellfeld- (engl.: *Bright Field*, BF) und einer Dunkelfeld-Abbildung (engl.: *Dark Field*, DF). Bei Hellfeld-Detektion wird der Elektronenstrahl hinter der Probe mittels der Apertur-Blende auf nicht oder kaum abgelenkte Elektronen eingeschränkt. Somit erscheinen Bereiche mit geringer Probendicke oder kleinen Ordnungszahlen der Atome heller. Für das Dunkelfeld werden die gestreuten Strahlen für die Bildgebung genutzt, sodass das Kontrastverhältnis umgekehrt ist.

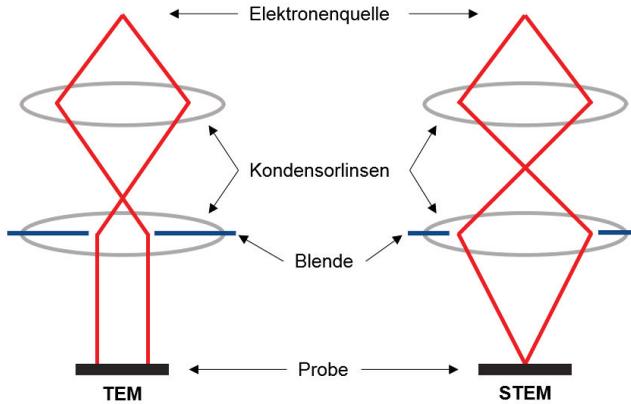


Abbildung 4. Strahlengang im Kondensorsystem zur Erzeugung von a) einem parallelen Strahl für TEM Aufnahmen und b) einem fokussierten Strahl für STEM-Aufnahmen.

Alternativ kann der Aufbau des TEMs für Rastertransmissionselektronenmikroskopie (engl.: *Scanning Transmission Electron Microscopy*, STEM) eingesetzt werden. Hierbei fällt der Elektronenstrahl von der Kondensorenlinse fokussiert auf die Probe (siehe Abbildung 4b). Mithilfe der Ablenkspulen wird die Probenoberfläche mit diesem Strahl abgerastert. Je nachdem wie stark die Elektronen beim Durchgang durch die Probe elastisch gestreut werden, kann an jeder Stelle der Probe zwischen unterschiedlichen Probendicken sowie zwischen Bereichen mit unterschiedlichen Ordnungszahlen der Atome differenziert werden. Für die Detektion stehen hierbei mehrere Modi zur Verfügung, wie es in Abbildung 5 gezeigt ist. Über einen Hellfeld-Detektor (BF) senkrecht unter der Probe werden Elektronen detektiert, die nicht an der Probe gestreut wurden. Dadurch erscheinen Bereiche mit Probe dunkel und Bereiche ohne Probe hell. Am Dunkelfeld-Ringdetektor (engl.: *Annular Dark-Field*, ADF) außerhalb der Primärstrahlrichtung kommen die Elektronen mit einer geringen Ablenkung von der ursprünglichen Strahlrichtung an. Hier ist der Untergrund dunkel, sodass die eintreffenden Elektronen eine Aufhellung in der Abbildung erzeugen. Des Weiteren gibt es einen Weitwinkel-Dunkelfeld-Ringdetektor (engl.: *High-Angle Annular Dark-Field*, HAADF). Dieser ist weiter außen positioniert und detektiert Elektronen, die eine starke Ablenkung durch die Probe erfahren haben.^[45,46]

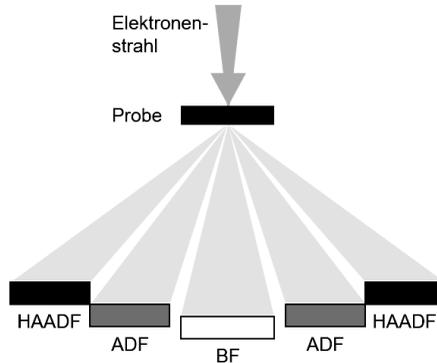


Abbildung 5. Detektoranordnung im STEM-Abbildungsmodus (Abbildung modifiziert nach ^[47]).

Für TEM/STEM-Aufnahmen, welche in dieser Arbeit vorgestellt werden, wurde ein Osiris S/TEM Transmissionselektronenmikroskop (FEI, Hillsboro, USA) bei 200 kV Beschleunigungsspannung eingesetzt, wobei die Detektion über eine CCD-Kamera erfolgte. Die Bildaufnahmen wurden von Mareike Bechtold (AG Feldmann, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe) durchgeführt. Bei der Probenpräparation wurde ein Tropfen der verdünnten wässrigen Suspension auf ein kohlenstoffbeschichtetes Kupfer-Netzchen aufgebracht und über fünf Tage bei 50 °C im Vakuum vorgetrocknet. Zur Auswertung wurden die Programme TIA (Version 4.6) und Gatan DigitalMicrograph (Version 2.32.888.0) verwendet.

2.1.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDXS) ist eine analytische Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Probenzusammensetzungen. Das Auftreffen hochenergetischer Elektronen auf eine Atomschicht kann dazu führen, dass kernnahe Elektronen aus ihren Schalen herausgeschlagen werden. Die freien Plätze werden von Elektronen höherer Schalen, unter Freisetzung von überschüssiger Energie in Form von Röntgenquanten, besetzt (siehe Abbildung 6a). Der Betrag dieser Energie entspricht der Differenz zwischen dem energetischen Start- und Endpunkt des Elektronenübergangs und ist aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen einzelnen Atomen des Periodensystems elementspezifisch (siehe Abbildung 6b).

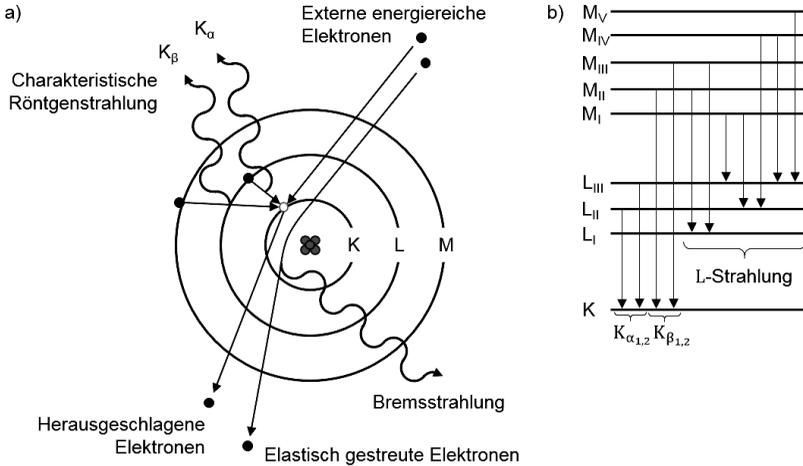


Abbildung 6. a) Schematische Darstellung der Erzeugung von Röntgenstrahlung durch Beschuss von Materie mit hochenergetischen Elektronen; b) Überblick der erlaubten Übergänge im Atom zwischen den K-, L- und M-Schalen (Abbildung modifiziert nach ^[43]).

Raster- und Rastertransmissionselektronenmikroskope werden aufgrund der hohen Beschleunigungsspannungen und der Fokussierung des Elektronenstrahls oft mit zusätzlichen Halbleiter-Detektoren für die EDXS Analyse ausgestattet. Die Detektoren sind seitlich vom Primärstrahl platziert und fangen so die aus der Probe austretenden Röntgenquanten auf. Dadurch entstehen im Halbleitermaterial Elektronen-Loch-Paare, deren Anzahl proportional zur Energie des absorbierten Röntgenquants ist. Die Auflösung eines solchen Detektors liegt typischerweise zwischen 120 und 140 eV.^[48]

Für diese Arbeit wurden die EDXS-Untersuchungen sowohl am Rasterelektronenmikroskop Supra 40VP (siehe Kapitel 2.1.1) als auch am Transmissionselektronenmikroskop Osiris S/TEM (siehe Kapitel 2.1.2) durchgeführt.

Für Messungen am Supra 40 VP wurde die bei 50 °C getrocknete Pulverprobe zu Presslingen verdichtet und auf ein selbstklebendes Kohlenstoffpad aufgebracht. Dieses wurde zum Einbringen in die Messkammer auf einem Aluminiumträger fixiert. Für alle Messungen wurde eine Beschleunigungsspannung von 30 kV und ein „Take-off“-Winkel von 35° verwendet. Die Röntgenquanten wurden mit einem Stickstoff-gekühlten EDAX Genesis 4000 Detektor (AMETEK, Berwyn, USA) detektiert und anschließend über das Programm Genesis Spectrum (Version 4.52) analysiert.

Die EDXS-Aufnahmen am Osiris S/TEM wurden bei 200 kV mithilfe von einem Quantax XFlash Detektorsystem (BRUKER, Ettlingen, Deutschland) gemacht. Die Probenpräparation wurde analog zur Auftragung von TEM-Proben (siehe Kapitel 2.1.2) durchgeführt. Die Auswertung der Bildaufnahmen erfolgte mit der Esprit Software (Version 1.8).

2.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist ein gängiges Verfahren zur Bestimmung von Partikelgrößen im Submikrometerbereich. Ihre alternativen Bezeichnungen, Photonenkorrelationsspektroskopie (engl.: *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS) oder quasielastische Lichtstreuung (QELS), spiegeln bereits die Kernprinzipien wider, die dieser Messmethode zugrunde liegen.

Monochromatisches Laserlicht wird durch eine Suspension der Probe geleitet, wobei es zu quasielastischen Streuprozessen an einzelnen Partikeln kommt (siehe Abbildung 7). In Abhängigkeit vom Verhältnis der Partikelgröße zur Wellenlänge des eingestrahlten Lichts handelt es sich hierbei vorwiegend um Rayleigh-Streuung ($d \ll \lambda$) oder Mie-Streuung ($d \approx \lambda$).

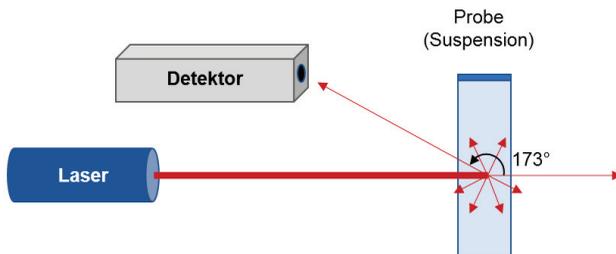


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Rückstreuanordnung für Messungen der Dynamischen Lichtstreuung.

Die gestreuten Photonen verschiedener Streuzentren interferieren am Detektor, sodass die gemessene Intensität einer gegenwärtigen Anordnung der Partikel in der Suspension entspricht. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung kann eine Suspension jedoch nicht als ein starres System betrachtet werden. Die auftretende Bewegung der Partikel führt zu einer Änderung der Streuintensität am Detektor. Die Analyse dieser zeitabhängigen Fluktuation ermöglicht eine Bestimmung der Partikelgrößen. Hierfür wird die Intensität in eine Intensität-Zeit-Autokorrelationsfunktion (AKF) umgewandelt.



$$g_2(t) = \langle I(t + \tau)I(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t + \tau)I(t) dt \quad (2.8)$$

Es wird somit eine Korrelation der Intensität für jeden Zeitpunkt (t) und einen späteren Zeitpunkt ($t + \tau$) durchgeführt. Je kleiner das τ ist, desto geringer ist die Differenz dieser Intensitätswerte. Die normierte Form dieser Gleichung besitzt die Form:

$$g_2(t) = \frac{\langle I(t + \tau)I(t) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2.9)$$

Über die Siegert-Relation ist die Intensität-Zeit-Autokorrelationsfunktion $g_2(q, t)$ mit der Feld-Zeit-Autokorrelationsfunktion $g_1(q, t)$ verknüpft.

$$g_2(q, t) = C \cdot g_1(q, t)^2 + 1 \quad (2.10)$$

C ist hierbei ein Vorfaktor, der durch den Messaufbau bestimmt wird, und q der Streuvektor. $g_1(q, t)$ kann alternativ über den Diffusionskoeffizienten ausgedrückt werden.

$$g_1(q, t) = g_1(q, t_0) \cdot e^{-Dq^2 t} \quad (2.11)$$

Somit gilt:

$$g_2(q, t) = C' \cdot e^{-2Dq^2 t} + 1 \quad (2.12)$$

Diese Gleichung ist für eine monodisperse Partikelverteilung gültig und bedarf eines zusätzlichen Wichtungsfaktors a_i bei polydispersen Proben, um die Überlagerung einzelner Exponentialfunktionen mitzuberechnen.

$$g_2(q, t) = C'' \cdot \sum_i a_i \cdot e^{-2Dq^2 t} + 1 \quad (2.13)$$

Daraus kann über den Diffusionskoeffizienten D mithilfe der Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius r_H der Partikel berechnet werden.

$$r_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2.14)$$

T ist hierbei die Temperatur, k_B die Boltzmann-Konstante und η die dynamische Viskosität des Dispersionsmediums. Generell lässt sich hinsichtlich der Mobilität der Partikel feststellen, dass größere Partikel sich langsamer durch das Medium bewegen als kleine Partikel, sodass ihre Autokorrelationsfunktion weniger steil abfällt (siehe Abbildung 8).^[49,50]

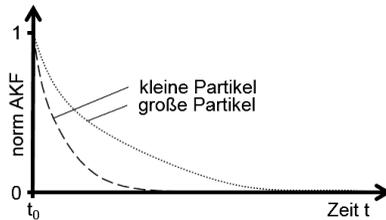


Abbildung 8. Schematische Darstellung einer normierten Autokorrelationsfunktionen für große und kleine Partikel (Abbildung modifiziert nach ^[49]).

Für diese Arbeit wurden die DLS-Messungen an einem Zetasizer Nano ZS (MALVERN INSTRUMENTS, Malvern, UK) mit einem He-Ne-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) als Lichtquelle durchgeführt. Die Streuintensität wurde, wie in Abbildung 7 gezeigt, unter einem Winkel von 173° detektiert. Für die Messung wurden zwei Milliliter des Dispersionsmediums in eine Polystyrol-Küvette gegeben und mit drei Tropfen der konzentrierten Probensuspension versetzt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der Zetasizer Software (Version 6.01).

2.3 Zeta-Potentialmessungen

Werden Partikel, welche eine Oberflächenladung tragen, in einem Medium dispergiert, führt die attraktive Wechselwirkung mit Ionen entgegengesetzter Ladung sowie mit Mediummolekülen zur Anlagerung von diesen an der Partikeloberfläche.

Die Anlagerung erfolgt in mehreren Schichten, wobei die inneren Schichten stärker an der Oberfläche gebunden sind und das elektrostatische Potential nach außen hin abschirmen. Das Modell in Abbildung 9 zeigt die Änderung des Potentials mit zunehmendem Abstand von der geladenen Partikeloberfläche.

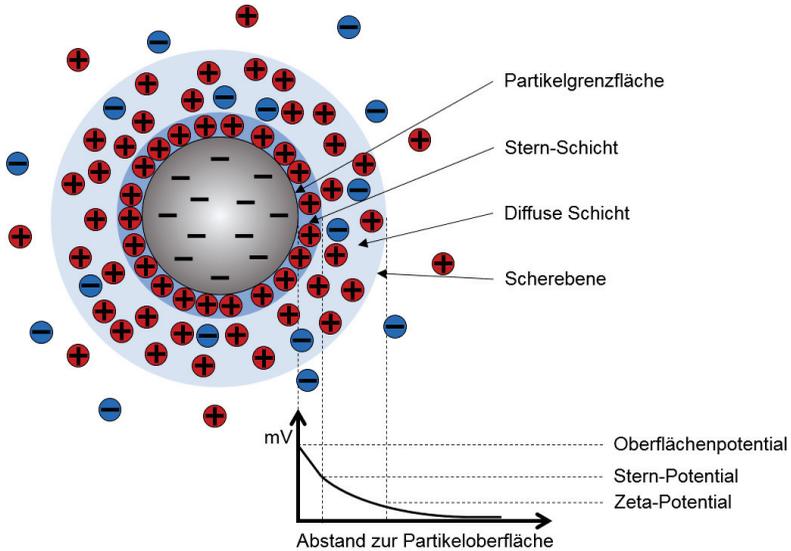


Abbildung 9. Schematische Anordnung von Ladungsträgern um ein Nanopartikel mit negativer Oberflächenladung sowie die Potentialentwicklung mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche.

Es kann dabei zwischen den folgenden Ionen-Schichten unterschieden werden: Die innere Schicht, welche sich direkt an der Grenzfläche der Partikel ausbildet und starr an diese gebunden ist, wird als die Stern-Schicht bezeichnet. Gefolgt wird diese von einer diffusen Schicht von Ionen und Molekülen. Gemäß dem Doppelschicht-Modell von Otto Stern, welches auf den Vorarbeiten von Hermann Helmholtz, Louis Georges Gouy und David Lenard Chapman aufbaut, nimmt das elektrostatische Potential innerhalb der Stern-Schicht linear ab, während die weitere Abnahme exponentiell gegen null verläuft. Die dispergierten Partikel erscheinen somit nach außen hin neutral.

Bewegung der Partikel in der Suspension führt zu einer partiellen Abscherung der diffusen Schicht. Das elektrostatische Potential dieser Scherebene relativ zum Potential des Mediums wird als das Zeta-Potential bezeichnet. In Bezug auf Nanopartikel nimmt das Zeta-Potential eine wesentliche Rolle als Maß für die elektrostatische Stabilisierung der Suspension ein. Ein hohes Zeta-Potential unterbindet aufgrund von elektrostatischer Repulsion die Annäherung von zwei Partikeln und vermeidet auf diese Weise Agglomerationsprozesse. Definitionsgemäß wird ein Wert größer als 30 mV oder kleiner als -30 mV als ausreichend für eine erfolgreiche Stabilisierung angesehen. Entsprechend ist am isoelektrischen Punkt (0 mV, IEP) die Stabilisierung am schlechtesten.^[46]