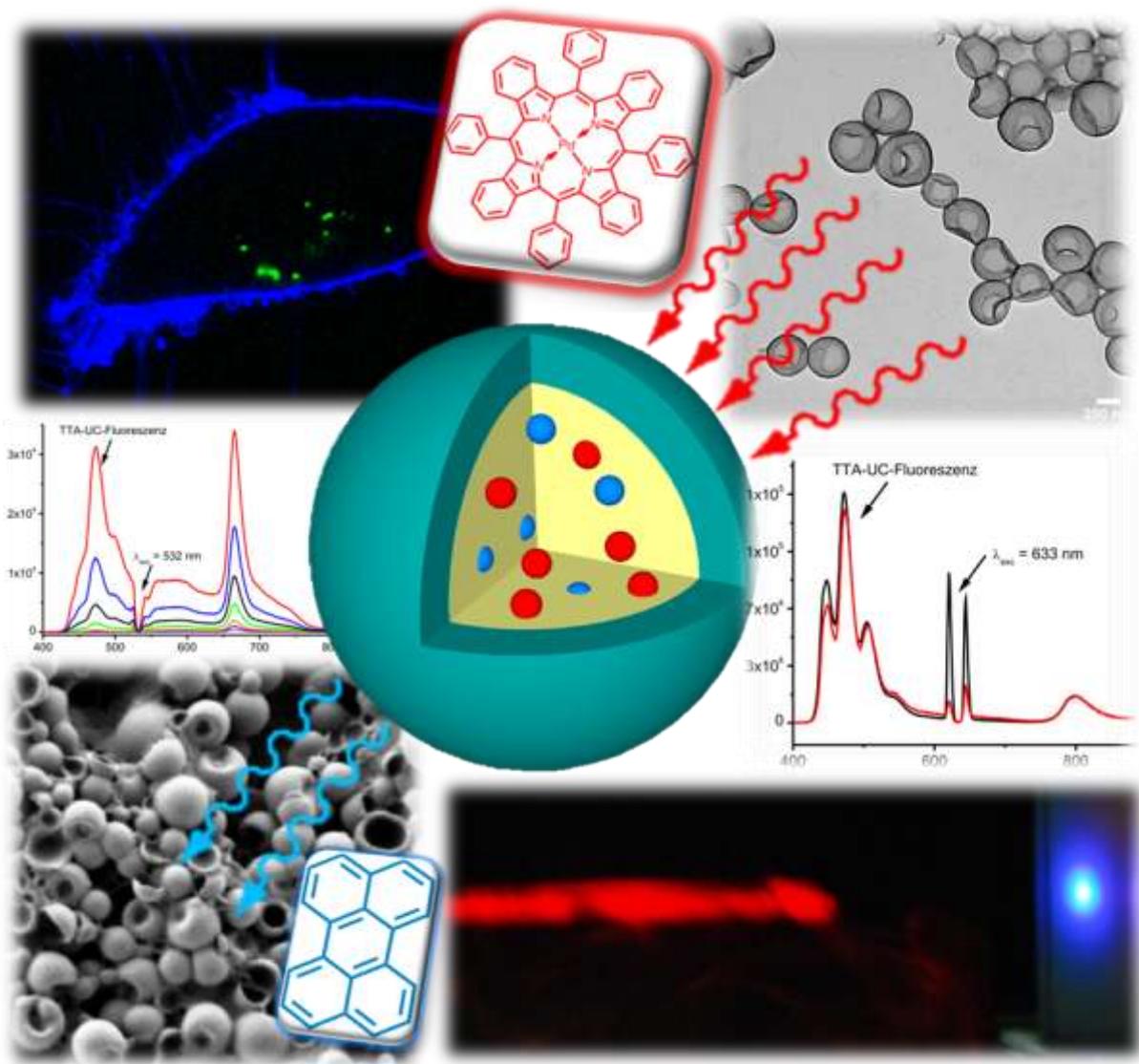


Dissertation

Photonen-Aufkonversion in Nanokapseln

Christian Wohnhaas





Max Planck Institut für Polymerforschung



Photonen-Aufkonversion in Nanokapseln

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Christian Wohnhaas

Geboren in Ehingen (Donau)

Mainz 2012


JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



Dekan:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
2	Theorie und Grundlagen.....	14
2.1	Miniemulsion.....	14
2.2	Miniemulsionstechniken und Strukturen.....	18
2.3	Nanokapseln mittels Miniemulsion ^[67]	19
2.3.1	Radikalische Miniemulsionspolymerisation.....	19
2.3.2	Lösungsmittelverdampfungsprozess.....	24
2.3.3	Sol-Gel-Prozess zu anorganischen SiO ₂ -Nanokapseln.....	26
2.4	Photonen-Aufkonversion.....	27
2.4.1	TTA-Aufkonversion (TTA-UC).....	31
2.4.2	TTA-UC in Nano-Trägersystemen dispergiert in Wasser.....	44
3	Charakterisierungsmethoden.....	46
3.1	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	46
3.2	Transmissionselektronenmikroskop (TEM).....	47
3.3	UV-VIS-Spektroskopie.....	49
3.4	Konfokales Laser-Raster-Mikroskop (cLSM).....	50
3.5	Durchflusszytometrie.....	51
4	Experimentalteil.....	53
4.1	Darstellung der Nanokapseln.....	53
4.1.1	Radikalische Miniemulsionspolymerisation (1. Generation).....	54
4.1.2	Lösungsmittelverdampfungsprozess (2. Generation).....	56
4.1.3	Darstellung Silicium basierter Nanokapseln (3. Generation) ^[92]	59
4.1.4	Verwendete UC-Farbstoffe.....	60

4.2	Messung der UC	65
4.2.1	Laser Aufbau (Abbildung 4.15)	65
4.2.2	Probenpräparation.....	67
4.3	Durchführung der Zellexperimente	69
4.3.1	Zellkultur.....	69
4.3.2	Probenpräparation für cLSM	69
4.3.3	Probenpräparation für FACS	70
4.4	Probenpräparation für Analytik.....	71
4.5	Verwendete Chemikalien	73
5	Ergebnisse und Diskussion.....	75
5.1	Kapseln der ersten Generation	75
5.1.1	Zusammenfassung Kapseln erster Generation	92
5.2	Kapseln der zweiten Generation.....	93
5.2.1	Statistisches Copolymer P(S _{0,86} - <i>stat</i> -MAA _{0,14}).....	93
5.2.2	Blockcopolymer P(S _{0,48} - <i>b</i> -MMA _{0,52})	97
5.2.3	PMMA	112
5.2.4	Anwendung der UC-Nanokapseln (2.Generation) in Zellen	143
5.2.5	Zusammenfassung der Kapseln der 2. Generation	156
5.3	Kapseln der dritten Generation	158
5.3.1	UC in SiO ₂ -Nanokapseln	158
6	Zusammenfassung	167
Summary	170
7	Literaturverzeichnis.....	173
8	Anhang	182

8.1	Abkürzungsverzeichnis	182
8.2	Tabellen	186
8.3	Lebenslauf	191
8.4	Veröffentlichungen	192
	Danksagung	194
	Erklärung	196

1 Einleitung

Aus der Sicht der Menschen hat sich das Bild der Sonne im Laufe der Jahrhunderte stark verändert. Galt sie in der frühen Menschheitsgeschichte als Gottheit (Ägypter), wird sie in der heutigen Zeit vor allem als unerschöpfliche Energiequelle angesehen. Sie sendet ihr Licht über ca. 150 Millionen Kilometer bis zur Erde und ermöglicht uns dadurch das Leben auf der Erde. In einer Zeit der knapp werdenden fossilen Energiequellen muss sich der Mensch und die Wissenschaft an der Natur orientieren, welche die unerschöpfliche Energie der Sonne schon immer zu nutzen wusste (Photosynthese,^[1] Blühen der Pflanzen). Mit der Erfindung und Erforschung der Solarzellen, welche eine Umwandlung der Sonnenstrahlung in elektrische Energie ermöglichen, ist bereits ein großer Schritt in die richtige Richtung vollbracht. Alltagstaugliche Solarzellen, welche heutzutage auf vielen Dächern zu finden sind, bestehen hauptsächlich aus Silicium und gehören somit zur Sparte der anorganischen Solarzellen. Neben den anorganischen wird ebenso intensiv an der Weiterentwicklung der organischen Solarzellen gearbeitet. Diese sind unabhängig vom relativ teuren Herstellungsprozess des Siliciums, besitzen eine hohe Flexibilität und zugleich eine geringe Schichtdicke, wodurch ein vielfältiger Anwendungsbereich zustande kommt. Jedoch gibt es den entscheidenden Nachteil, dass diese organischen Solarzellen einen zu geringen Wirkungsgrad aufweisen. Im Vergleich mit anorganischen Solarzellen liegt der Rekord der organischen bei 10,7% (Heliatek),^[2] wohingegen der bei anorganischen viermal höher, bei 43,5%^[3] liegt. Eine Möglichkeit zur Verbesserung dieses Wirkungsgrades stellt die Photonen-Aufkonversion dar.

Photonen-Aufkonversion (engl. photon-upconversion, UC) ist ein physikalischer Prozess, bei dem energiearme Photonen in energiereiche Photonen umgewandelt werden. Es findet eine Absorption im langwelligen Bereich statt, gefolgt von einer relativ zur Absorptionswellenlänge blau (anti-Stokes) verschobenen, aufkonvertierten Fluoreszenz im kurzwelligeren Bereich.

Es gibt mehrere Arten der UC, welche alle auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen und auch nach diesen benannt werden, wie beispielsweise die zwei (oder mehr) Photonen-Absorption (engl. two photon absorption, TPA),^[4] die Frequenzverdopplung (engl. second harmonic generation, SHG),^[5] die sequentielle Energieübertragung (engl. sequential energytransfer upconversion, ETU)^[6] oder die Absorption von angeregten Zuständen (engl.

excited state absorption, ESU).^[7] Alle bisher genannten UC-Mechanismen weisen entscheidende Nachteile in Bezug auf ihre Anregungsbedingungen auf. Die benötigten Anregungsintensitäten liegen in Bereichen von $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ bis zu $\text{MW}\cdot\text{cm}^{-2}$,^[8] was ungefähr dem hunderttausendfachen der normalen Sonneneinstrahlung eines sonnigen Tages entspricht. Ein weiteres Problem ist die notwendige spektrale Leistungsdichte der Anregungsquellen. Während von der Sonne durchschnittlich nur $100 \mu\text{W}\cdot\text{nm}^{-1}$ geliefert werden, liegen die Anforderungen der bereits genannten UC-Prozesse ($\text{W}\cdot\text{nm}^{-1}$) deutlich über diesem Wert. Am wichtigsten jedoch ist die kohärente Strahlung der Anregungsquelle. Bei allen bisher genannten UC-Prozessen, mit Ausnahme des ETU-Prozess, ist kohärente Strahlung als Anregungsquelle eine Grundvoraussetzung und kann nur von Laserlicht erfüllt werden. Bei den ETU-Prozessen ist die spektrale Leistungsdichte der limitierende Faktor, der eine bisherige Anregung mit Sonnenlicht verhindert hat.^[9]

Bei einer weiteren Art der UC, der Triplett-Triplett-Annihilation Aufkonversion (TTA-UC), ist man nicht mehr auf diese hohen Anregungsintensitäten angewiesen. 2006 wurde von Balushev et al.^[10] gezeigt, dass bereits gewöhnliches nicht kohärentes Sonnenlicht mit Anregungsintensitäten im Bereich von $10 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ als Anregungsquelle ausreichend ist (Abbildung 1.1). Intensitäten im $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ sind möglich,^[11] was im Vergleich zu anderen Arten der UC einem Unterschied von mehreren Größenordnungen entspricht. Die benötigte spektrale Leistungsdichte für TTA-UC entspricht mit ca. $125 \mu\text{W}\cdot\text{nm}^{-1}$ ebenfalls dem Größenbereich, der von der Sonne geliefert wird.^[12]

Der allgemeine Mechanismus der TTA-UC funktioniert mit Hilfe von zwei organischen Farbstoffen, einem Sensibilisator (Donor, im Folgenden wurde der engl. Begriff Sensitizer verwendet), welcher die eingestrahnten Photonen absorbiert, und einem Emitter (Akzeptor), welcher nach erfolgreichem Prozess der TTA-UC eine relativ zur Anregungswellenlänge blau-verschobene Lumineszenz aufweist. Durch die Variation dieser beiden Farbstoffe lassen sich die Wellenlängen von Anregung und resultierender UC-Fluoreszenz fast beliebig auf einen gewünschten Anwendungsbereich einstellen. Der Bereich für die möglichen Anregungswellenlängen bewegt sich von ca. $\lambda = 410 \text{ nm}$ ^[13] bis in den nahen Infrarotbereich^[14] (NIR, ca. $\lambda = 800 \text{ nm}$). Die dazugehörige anti-Stokes (blau)-Verschiebung (hypsochromer Effekt) der Wellenlängen liegt zwischen $\Delta\lambda = 50$ und 200 nm , was einer Energieverschiebung von $\Delta E = 0,26 - 0,8 \text{ eV}$ entspricht.

Durch diese hohe Flexibilität gibt es für die TTA-UC eine Reihe von vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten. Wie bereits erwähnt, wird intensiv an einer Verbesserung der Effizienz von Solarzellen gearbeitet^[15-17]. Da Solarzellen immer einen bestimmten Absorptionsbereich aufweisen, wird nur ein Teil des Sonnenspektrums genutzt (Abbildung 1.1, Bild b). Der ungenutzte energetisch niedriger liegende Teil des Spektrums (relativ zum Absorptionsbereich) kann mit Hilfe der TTA-UC in höher energetische Strahlung umgewandelt werden, welcher somit ebenfalls von der Solarzelle absorbiert werden kann. Durch diese Verschiebung der Energie wird eine Effizienzerhöhung der Solarzellen erreicht. Eine weitere Anwendung der TTA-UC ist der vollständig organische, flexible und transparente UC-Bildschirm.^[18] Dieser von der Firma Sony entwickelte Farbbildschirm (Abbildung 1.1) besteht aus Styrololigomeren, in denen die UC-Farbstoffe gelöst sind. Der Vorteil gegenüber bisherigen anorganischen UC-Displays,^[19] bestehend aus Seltenerdionen dotierten Festkörpern und Gläsern, liegt in der nur sehr geringen Anregungsintensität, wodurch die Gefahr für die Augen durch entstehendes Streulicht extrem minimiert wird, und in den geringeren Produktionskosten. Des Weiteren lassen sich photochemische Reaktionen über TTA-UC starten. Als bekanntes Beispiel soll hier die Dimerisierung von Anthracen aufgeführt werden, welche von Castellano et al.^[20] durchgeführt wurde. Auf dieser Grundlage wurden weitere photochemische Reaktionen wie beispielsweise Cycloadditionen mit Hilfe der TTA-UC in Gang gesetzt.

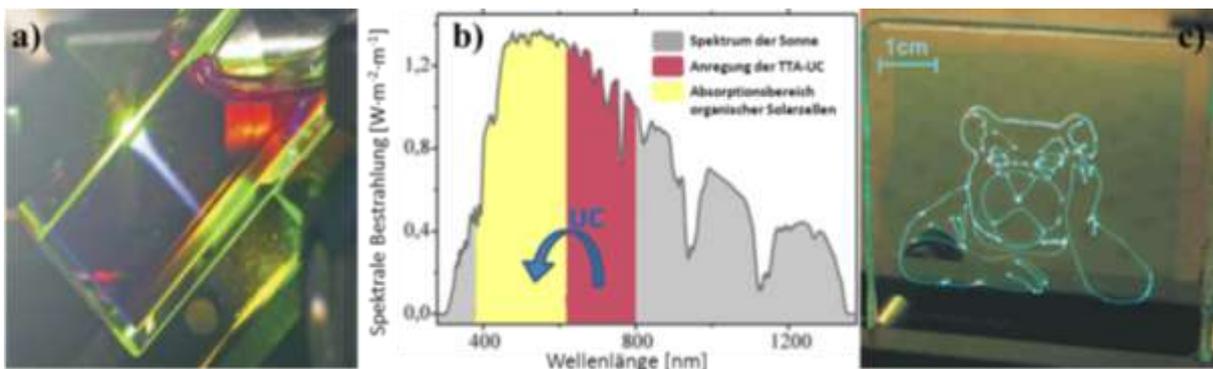


Abbildung 1.1: Anwendungsbereiche der TTA-UC: a) TTA-UC-Fluoreszenz bei Anregung mit Sonnenlicht;^[10] b) Strahlungsspektrum der Sonne (grau): Der Absorptionsbereich von effizienten organischen Solarzellen wurde gelb markiert, während der Bereich der mittels TTA-UC umgewandelt werden kann rot markiert wurde; c) organischer TTA-UC-Bildschirm.^[18]

Die vorliegende Arbeit behandelt die Verknüpfung der TTA-UC mit dem Feld der Nanotechnologie und dem dadurch möglich gewordenen Übergang in den Bereich der Lebenswissenschaft (engl. life science) mit zahlreichen biologischen Anwendungen. Bereits

in meiner Diplomarbeit gelang der bis dahin nicht existierende Transfer der TTA-UC ins wässrige Medium.^[21] Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die TTA-UC nur in organischen Lösungsmitteln (Toluol, Benzol, Chloroform, THF) oder Polymerfilmen gezeigt. Mit Hilfe der Technik des Miniemulsionsprozesses wurden Nanokapseln^[22] (Kapseln der 1. Generation), bestehend aus einer Polymerhülle und einem flüssigen hydrophoben Kern aus Hexadekan (HD), hergestellt. Die zur TTA-UC benötigten Farbstoffe wurden im Hexadekan gelöst, wodurch TTA-UC-fähige, in Wasser dispergierte Nanokapseln hergestellt wurden.

Ein Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es, diese grundlegenden Ergebnisse der Diplomarbeit aufzunehmen, zu optimieren und auf mögliche biologische Anwendungen zu untersuchen. Dabei werden neue Methoden der Kapselherstellung getestet und die damit hergestellten Nanokapseln, bestehend aus unterschiedlichen Materialien von Kern und Hülle auf TTA-UC-Tauglichkeit untersucht. Dabei wird versucht, die Effizienz der TTA-UC in den Kapseln zu optimieren und eine breite Farbstoffauswahl für die neu entwickelten Kapseln zu testen und zu etablieren. Außerdem wird versucht, den Einfluss von Sauerstoff auf die TTA-UC in den Nanokapseln zu verringern.

Während in der Diplomarbeit nur der Mechanismus der radikalischen Miniemulsionspolymerisation zur Kapselherstellung verwendet wurde, wurde hier ein für die Miniemulsion neuer Pfad der Kapselherstellung beschrritten. Mit Anwendung der Technik des Lösungsmittelverdampfungsprozesses (engl. solvent evaporation) in Kombination mit dem Miniemulsionsprozess sollte eine neue, schonendere Möglichkeit zur Herstellung der Kapseln ermöglicht werden.^[23] Im Vergleich zur radikalischen Polymerisation bei 70 °C läuft der Prozess der Solvent Evaporation bei RT und ohne Radikalbildung ab. Durch die neue Technik soll eine breitere Variationsmöglichkeit in der Auswahl der Polymerhülle, des flüssigen hydrophoben Kerns und der verwendeten UC-Farbstoffe ermöglicht werden. Diese Farbstoffvariation spielt eine besondere Rolle in Anbetracht möglicher biologischer Anwendungen. Durch die Auswahl eines geeigneten Sensitizers lässt sich die Anregungswellenlänge der TTA-UC in den NIR-Bereich von ca. $\lambda = 700$ nm verschieben. Mit dieser Verschiebung gelingt eine nahezu perfekte Überlappung der Anregungswellenlänge mit dem natürlichen „optischen Fenster“ (Transparenzfenster, Abbildung 1.2) der menschlichen Haut und dem Gewebe.^[24, 25] Für mögliche biologische Anwendungen bedeutet diese Überlappung eine extreme Eindringtiefe der Anregungsquelle bis hin zu einigen Zentimetern. Ein Beispiel für solch eine biologische Anwendung stellt die photodynamische Therapie^[26], eine strahlungsbasierte Methode zur Zerstörung von Krebszellen, dar. Hierbei wird energiereiches Licht (ca. $\lambda = 400-500$ nm) benötigt, um sogenannte Photosensibilisatoren

anzuregen, welche dadurch Singulett-Sauerstoff produzieren, der wiederum einen nahegelegenen Tumore zerstört.^[27] Mit Hilfe der TTA-UC-Nanokapseln könnte dieses energiereiche Licht ($\lambda = 400\text{-}500\text{ nm}$) sozusagen lokal vor Ort (in situ) mit einer wesentlich energieärmeren Anregungsquelle ($\lambda = 700\text{ nm}$) erzeugt werden. Durch das tiefere Eindringen der Anregungsquelle könnte diese Heilungsmethode, bisher limitiert auf einige spezifische Krebsarten, auch auf andere, tiefer im Körper liegende, Krebsarten ausgeweitet werden.

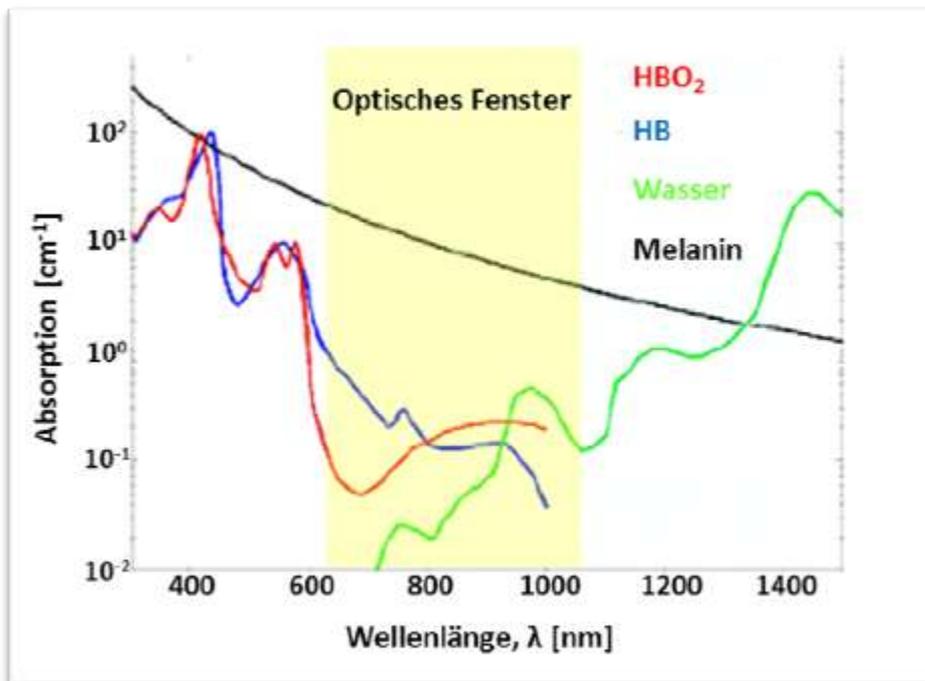


Abbildung 1.2: Optisches Fenster (Transparenzfenster) von menschlichem Gewebe und Hautbestandteilen. Absorptionsspektren^[28] von Wasser (grün), Hämoglobin (HB, blau), Oxyhämoglobin (HBO₂, rot), Melanin (schwarz).

Die Überlappung der Anregungswellenlänge mit dem „optischen Fenster“ ist auch in der biologischen Bildgebung von Zellen von bedeutender Wichtigkeit. Zellen zeigen im UV-nahen Bereich des sichtbaren Spektrums, was dem Anregungsbereich der meisten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe entspricht, eine nicht zu vernachlässigende Autofluoreszenz. Somit erreicht man bereits durch die bei der TTA-UC möglichen Verschiebung der Anregungswellenlänge in den NIR-Bereich eine automatische Verringerung der Autofluoreszenz. Zusätzlich liegt der Detektionsbereich der TTA-UC im relativ zur Anregungswellenlänge blau verschobenen Bereich, was die Detektion von jeglicher Autofluoreszenz der Zelle automatisch ausschließt. Ein weiterer Vorteil der Verschiebung der Anregungswellenlänge ist die Reduzierung des durch Photonen induzierten Stresses der Zelle. Dieser photoninduzierter Stress bewirkt einen toxischen Einfluss auf die Zellen, nimmt aber

exponentiell mit der wachsenden Anregungswellenlänge ab. Neben dieser Verbesserung der Bildgebung von Zellen ist die Erzeugung von blauen Photonen in situ nach Anregung mit roten Photonen auch für mögliche FRET-Anwendungen (Fluoreszenz(Förster)-Resonanz-Energietransfer) oder für mehrfach Anfärbungen (engl. multicolour staining) von ausgewählten Zellen oder Zellteilen wichtig.

Grundlagen für solche Anwendungen sind die in dieser Arbeit durchgeführten Zellversuche mit den verschiedenen Kapselsystemen. Ziel dieser Zellversuche ist es, eine möglichst hohe Aufnahme der Nanokapseln in verschiedenen Zellarten (HeLa (Krebszellen) und MSC (mesenchymale Stammzellen)) mit möglichst geringen toxischen Einflüssen der Kapseln auf die Zellen zu erreichen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (engl. flow cytometry) an einem FACS (fluorescence activated cell sorting) wurden Toxizitätstests durchgeführt und die Aufnahme der verschiedenen Partikel auf die verschiedenen Zelllinien untersucht. An einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (engl. confocal laser scanning microscope, cLSM) wurden die lebenden und fixierten Zellen auf TTA-UC untersucht.

2 Theorie und Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen dieser Arbeit vorgestellt. Dabei werden die Theorie der Miniemulsion und die für eine Kapselbildung essentielle Phasenseparation erklärt. Des Weiteren werden unterschiedliche Techniken des Miniemulsionsprozesses zur Herstellung der Nanokapseln vorgestellt. Neben der Miniemulsion wird auch die Theorie der TTA-UC beschrieben und ein kurzer Literaturüberblick über die Entwicklung der TTA-UC gegeben.

2.1 Miniemulsion

Bereits im Jahre 1973 publizierten El-Aasser und Ugelstad die Grundlagen und die Theorie der Miniemulsion.^[29] Mittlerweile findet die Technik der Miniemulsion breite Anwendung und es existieren zahlreiche Übersichtsartikel zu diesem Thema.^[30-34] Die Miniemulsion ist ein Heterophasensystem und gehört somit, wie der Name (eingeführt im Jahre 1980)^[35] bereits sagt, zu den Emulsionen und besteht aus zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten. Andere Heterophasensysteme wie beispielsweise Aerosole (flüssig/gasförmig, Nebel oder fest/gasförmig, Rauch) und Dispersionen (fest/flüssig, Kakao) unterscheiden sich in den Aggregationszuständen der beiden unterschiedlichen Phasen. Die Miniemulsion stellt damit eine besondere Art der Emulsionen dar. Sie unterscheidet sich in der Größe und Stabilisierung der Tröpfchen von anderen Emulsionen wie der Makroemulsion^[36] oder der Mikroemulsion^[36, 37] und wird im Folgenden genauer erklärt.

Die für die Miniemulsion charakteristische, einheitliche Tröpfchengröße liegt in einem Größenbereich zwischen 50 und 500 nm. Bei einer Miniemulsion kann man zwischen direkter und indirekter Miniemulsion unterscheiden. Die direkte Miniemulsion besteht aus Öltröpfchen in Wasser (Ö/W), während die indirekte sich aus Wassertröpfchen in Öl (W/Ö) zusammensetzt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die direkte Miniemulsion verwendet, auf deren Herstellung im Folgenden eingegangen wird.

Die Herstellung einer direkten Miniemulsion beginnt mit der Vereinigung von zwei, nicht miteinander mischbaren, Phasen. Die eine Phase, bezeichnet als kontinuierliche Phase (wässrige Phase), besteht aus Wasser und einem zur Stabilisierung benötigten Tensid. Die andere Phase, genannt disperse Phase (Öl-Phase), setzt sich aus einem Öl oder Monomer und einem zusätzlich stabilisierenden Hydrophob zusammen. Beide Phasen ergeben somit ein sich

auftrennendes Zweiphasengemisch. Um Tröpfchen im Nanometergrößenbereich zu erhalten, wird das Einwirken von starken äußeren Kräften benötigt. Dazu wird zunächst durch längeres, starkes Rühren (Voremulgieren) eine Makroemulsion mit Tröpfchengrößen im Mikrometerbereich hergestellt. Diese Makroemulsion ist thermodynamisch instabil und weist eine breite Größenverteilung der Tröpfchen auf, nach längerer Zeit findet eine Entmischung der Phasen statt.^[38] Um diese Entmischung zu verhindern und einen stabilen bzw. den metastabilen (kinetisch stabilisierten) Zustand der Miniemulsion zu erreichen, ist eine weitere Krafteinwirkung nötig. Diese wird in Form von Scherkräften durch den Einsatz eines Ultraschallstabes oder einem Hochdruckhomogenisator geliefert.^[39] Die starke Krafteinwirkung in Form von Kavitation hat Verschmelzungs- und Aufspaltungsprozesse der bereits vorhandenen Tröpfchen zur Folge, was für geringere Größen und engere Verteilungen der Tröpfchen sorgt. Die Krafteinwirkung sollte andauern bis sich schließlich ein metastabiles Gleichgewicht zwischen den Tröpfchen eingestellt hat,^[40] und der Zustand der Miniemulsion erreicht ist. Um diesen dauerhaft zu erhalten, wurden, wie bereits oben erwähnt, ein Tensid und ein Hydrophob beigemischt.

Das Tensid verhindert eine Koaleszenz - Kollision und Verschmelzung - der Tröpfchen (Abbildung 2.1). Es lagert sich an der Grenzfläche der Tröpfchen zum Wasser an und verringert damit die Grenzflächenspannung.

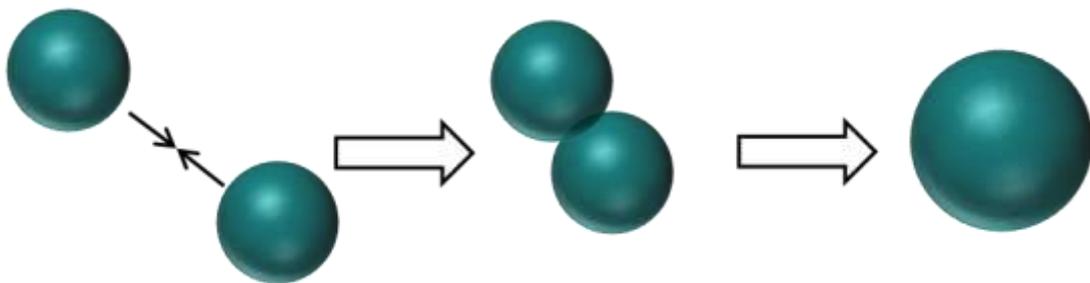


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Koaleszenz.

Des Weiteren sorgen die Ausbildung einer ionischen Doppelschicht und/oder sterische Wechselwirkungen für eine gegenseitige Abstoßung der Tröpfchen. Dadurch wird ein mögliches Zusammenstoßen der Tröpfchen mit anschließender Verschmelzung verhindert (Abbildung 2.2). Bei der Miniemulsion wird, im Gegensatz zu anderen Emulsionen, nur so viel Tensid eingesetzt, dass Koaleszenz gerade eben verhindert wird. Somit bleibt das System unter dem Wert der kritischen Mizellbildung (cmc), wodurch (im Gegensatz zur Makroemulsion und der Emulsionspolymerisation) keine freie Mizellenbildung stattfindet. Je

nach Wahl der Tenside kann man, wie bereits erwähnt, elektrostatische und/oder sterische Wechselwirkungen zwischen Tröpfchen beobachten. Nichtionische Tenside bilden nur sterische Wechselwirkungen aus und wurden von Griffin^[41] durch das HLB-Konzept (Hydrophile-Lipophile-Balance) klassifiziert und eingeteilt. Für ionische Tenside (anionische und kationische) erfolgt eine Einteilung des Stabilisierungspotential für Dispersionen über die DLVO-Theorie.^[42, 43] Danach eignet sich Natriumdodecylsulfat (SDS) besonders gut zur Stabilisierung.

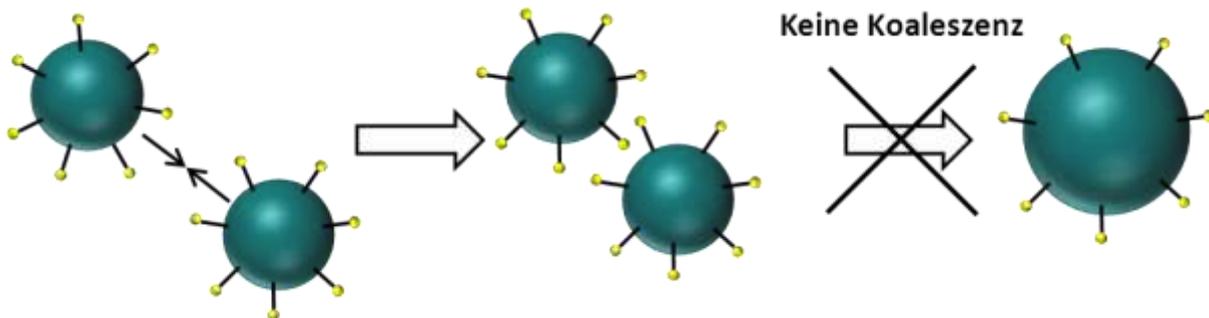


Abbildung 2.2: Der Einsatz von Tensiden verhindert die Koaleszenz.

Um die Funktionsweise des Hydrophobs zu erklären, muss zunächst der Prozess der Ostwald-Reifung^[44] erläutert werden. Dieser beschreibt, einfach ausgedrückt, das stetige Wachsen der größeren Tröpfchen auf Kosten von kleineren Tröpfchen, was schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt ist.

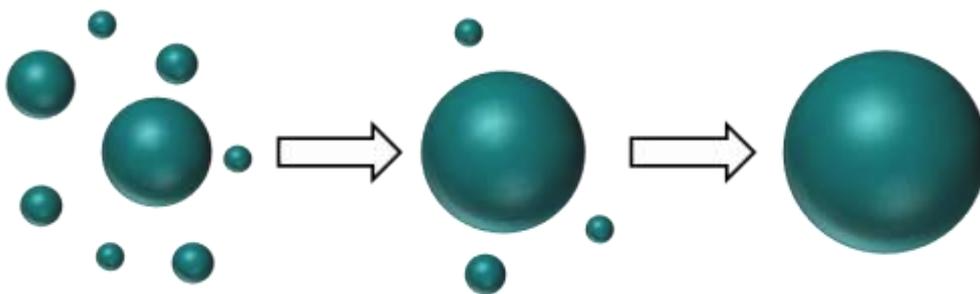


Abbildung 2.3: Schematischer Prozess der Ostwald-Reifung von Tröpfchen.

Triebkraft für diesen Vorgang ist der sogenannte Laplace-Druck (Krümmungsdruck), welcher von der Oberflächenspannung und dem Kugelradius abhängig ist (Gleichung (2.1)). Durch den geringeren Radius in kleineren Tröpfchen herrscht dort ein größerer Laplace-Druck als in den großen Tröpfchen. Dies hat eine Diffusion des Öles/Monomers von den kleinen zu den großen Tröpfchen zur Folge (Ostwald-Reifung). Das kann schließlich zum vollständigen

Verschwinden der kleinen Tröpfchen führen und stellt somit einen destabilisierenden Effekt dar. Der Laplace-Druck ist:

$$P_L = \frac{2 \cdot \gamma_{LL}}{r} \quad (2.1)$$

Mit P_L = Laplace-Druck [$\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$]

γ_{LL} = Grenzflächenspannung zwischen zwei Flüssigkeiten [$\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$]

r = Tröpfchenradius [m]

Zur Unterdrückung dieser Ostwald-Reifung (Diffusion) wird ein Hydrophob zur dispersen Phase beigemischt.^[45] Dieses besteht meist aus einem langkettigen Alkan (hier: Hexadekan),^[46, 47] kann aber auch ein hydrophober Farbstoff^[48] oder ein hydrophobes Comonomer^[49] sein (Hauptsache ist, dass eine hohe Hydrophobizität gegeben ist) und wirkt als osmotisches Reagenz. Der entstehende osmotische Druck wirkt dem Laplace-Druck entgegen (Abbildung 2.4)^[50] und verhindert somit die Diffusion des Monomers zu den größeren Tröpfchen. Je geringer die Löslichkeit des Hydrophobs in der kontinuierlichen Phase ist, desto größer ist der osmotische Druck.

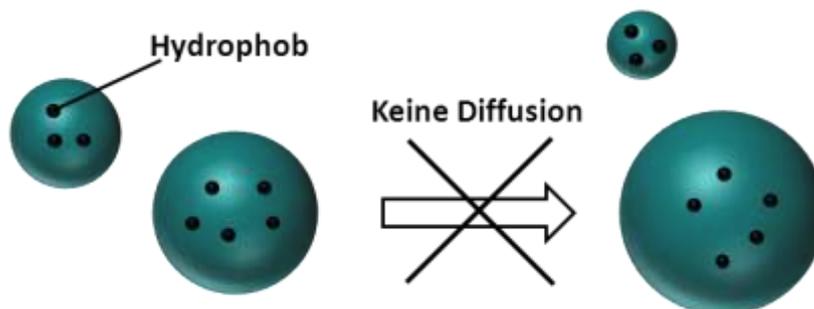


Abbildung 2.4: Unterdrückung der Ostwald-Reifung von Tröpfchen durch Verwendung eines Hydrophobs.

2.2 Miniemulsionstechniken und Strukturen

Bisher wurde die Herstellung und Stabilisierung einer Miniemulsion (Miniemulsionsprozess) beschrieben. In diesem Abschnitt wird erläutert, wie man aus den Tröpfchen feste, in Wasser dispergierte Nanoteilchen erhält. Dazu gibt es neben der Technik der Polymerisation der Monomertropfchen auch die Möglichkeit des Lösungsmittelverdampfungsprozess (Solvent Evaporation-Prozess).

Im Vergleich zur Emulsionspolymerisation sind bei der Polymerisation mittels Miniemulsionsprozess neben der radikalischen Polymerisation auch andere Polymerisationsarten möglich. Die unterschiedlichen Reaktionen finden, je nach Polymerisationsart, direkt in den Tröpfchen oder an der Grenzfläche zum Wasser hin statt.

Kettenwachstumsreaktionen wie die radikalische,^[51] anionische,^[52, 53] kationische^[54, 55] und katalytische^[56] (Metathese)^[57] Polymerisation und radikalische Copolymerisation^[22, 58] finden direkt (in situ) in den Tröpfchen statt. Dies hat die vollständige Umwandlung (Größe und Form) der Tröpfchen in Polymerteilchen zur Folge, weswegen die Tröpfchen als Nanoreaktoren^[59] bezeichnet werden können. Bei den wasserempfindlichen Reaktionen sorgt die hohe Hydrophobizität der Tröpfchen für den Ausschluss des Wassers und ein reibungsloses Ablaufen der Reaktion. Stufenwachstumsreaktionen wie Polykondensation,^[60] Polyaddition^[61, 62] oder Polymerisation mittels Klick-Chemie^[63, 64] können entweder an der Grenzfläche der Tröpfchen oder in ihrem Inneren stattfinden.

Durch die Anwendung dieser und weiterer nicht aufgeführter Reaktionen auf den Miniemulsionsprozesses ergibt sich eine Vielzahl an möglichen Nanostrukturen. Neben den gewöhnlichen Dispersionen mit Nanopartikeln unterschiedlichster Eigenschaften^[30, 33, 65, 66] sind vor allem Nanokapseln,^[22, 67] Mikrogele^[68, 69] und die Januspartikel^[23, 70] zu erwähnen.

Ebenso ist die Herstellung anorganischer Nanostrukturen aus TiO_2 ^[71] oder SiO_2 ^[72] mittels Sol-Gel-Reaktionen von Titan- oder Silicium-Alkoxiden an der Grenzfläche der Tröpfchen möglich, was das Anwendungsspektrum der Miniemulsion zusätzlich erweitert.

Da in dieser Arbeit ausschließlich Nanokapseln hergestellt wurden, wird im Anschluss, anhand der Techniken der radikalischer Polymerisation und dem Lösungsmittelverdampfungsprozess, die Bildung dieser speziellen Nanostruktur mit Kern-Hülle-Morphologie erklärt. Ebenso wird auf die Herstellung anorganischer SiO_2 -Nanokapseln eingegangen.

2.3 Nanokapseln mittels Miniemulsion^[67]

Generell spricht man bereits von Nanokapseln, wenn die aus einer Miniemulsion resultierenden Partikel, außer dem Polymer und dem Hydrophob, noch eine zusätzliche Komponente beinhalten. Diese Komponenten können beispielsweise Farbstoffe^[73] oder Metallkomplexe^[74] sein, welche bereits im Monomer löslich sind und später im Partikel homogen verteilt sind. Diese Art der „Nanokapseln“ finden Anwendung in der Untersuchung von Aufnahmeprozessen (Endozytose) der Nanopartikeln in Zellen^[75] und der Nanolithographie.^[76] Ebenfalls können nicht-lösliche Komponenten in Nanopartikeln untergebracht werden und zählen somit theoretisch zur Sparte der Nanokapseln. Dazu werden Stoffe wie Magnetit^[77] für biomedizinische Anwendungen (MRT, Magnetische-Resonanz-Tomographie),^[78] anorganische Azoverbindungen als thermisch schaltbare Freisetzungsmittel^[79] oder Farbstoffpigmente^[80, 81] für mögliche Anwendungen als Druckerfarbstoffe gezählt.

Schließlich gibt es die Art von Nanokapseln, welche einen flüssigen Kern umschlossen von einer festen Hülle aufweisen können. In dieser Arbeit wird der Begriff Nanokapsel auf Kapseln mit dieser Kern-Hülle-Morphologie eingeschränkt. Zur Verkapselung von Flüssigkeiten in Miniemulsion sind drei unterschiedliche Prozesse möglich. Zwei dieser Prozesse, Phasenseparation und Reaktion an der Grenzfläche, werden in dieser Arbeit verwendet. Diese werden in den folgenden Abschnitten an den Beispielen der radikalischen Miniemulsionspolymerisation (2.3.1), dem Lösungsmittelverdampfungsprozess (2.3.2) und dem Sol-Gel-Prozess (2.3.3) genauer erklärt. Der dritte Prozess ist eine Abscheidung (Ausfällung) von Polymer auf bereits bestehende Tröpfchen.^[82] Da sich dieser Prozess nur auf inverse Systeme bezieht, und in dieser Arbeit keine Anwendung findet, wird nicht näher darauf eingegangen.

2.3.1 Radikalische Miniemulsionspolymerisation

Die Kapselherstellung mittels radikalischer Miniemulsionspolymerisation (schematisch dargestellt in Abbildung 2.5) wurde erstmals im Jahre 2001 von *Tiarks et al.*^[22] durchgeführt. Der Prozess der Kapselbildung beruht auf einer Phasenseparation des während der radikalischen Polymerisation entstehenden Polymers und einer zu verkapselnden hydrophoben Flüssigkeit. Um diese Phasenseparation innerhalb den Tröpfchen zu erhalten, muss zunächst die Miniemulsion hergestellt werden. Dazu braucht man, wie bereits in

Abschnitt 2.1 beschrieben, ein Zweiphasengemisch aus einer dispersen und kontinuierlichen Phase. Die disperse Phase besteht aus dem Monomer, dem öllöslichen Initiator und der zu verkapselnden Flüssigkeit. Auf ein zusätzliches Hydrophob zur Unterdrückung der Ostwaldreifung kann verzichtet werden, da bereits die zu verkapselnde Flüssigkeit einen hohen Grad an Hydrophobizität aufweisen sollte und somit die Ostwald-Reifung unterdrückt. Diese hydrophobe Flüssigkeit (in dieser Arbeit ist häufig Hexadekan) muss ein Lösungsmittel für das Monomer sein, für das entstehende Polymer hingegen nicht. Die kontinuierliche Phase setzt sich aus Wasser und dem Tensid zusammen. Nach dem Herstellen der Miniemulsion durch Rühren und Ultraschallbehandlung wird die Polymerisation gestartet. Dazu wird das gesamte System bis zur Zersetzungstemperatur des radikalischen Initiators erhitzt. Durch das einsetzende Kettenwachstum und dem folglich steigenden Molekulargewicht des Polymers fällt dieses aus dem bisherigen Lösungsmittel, der hydrophoben Flüssigkeit, aus. Um eine gut ausgebildete Kern-Hülle-Morphologie zu erhalten, muss eine Phasenseparation zwischen dem Polymer und der hydrophoben Flüssigkeit stattfinden, so dass sich das Polymer an der Grenzfläche zu Wasser hin anordnet und die hydrophobe Flüssigkeit sich im Inneren des Tröpfchens sammelt.

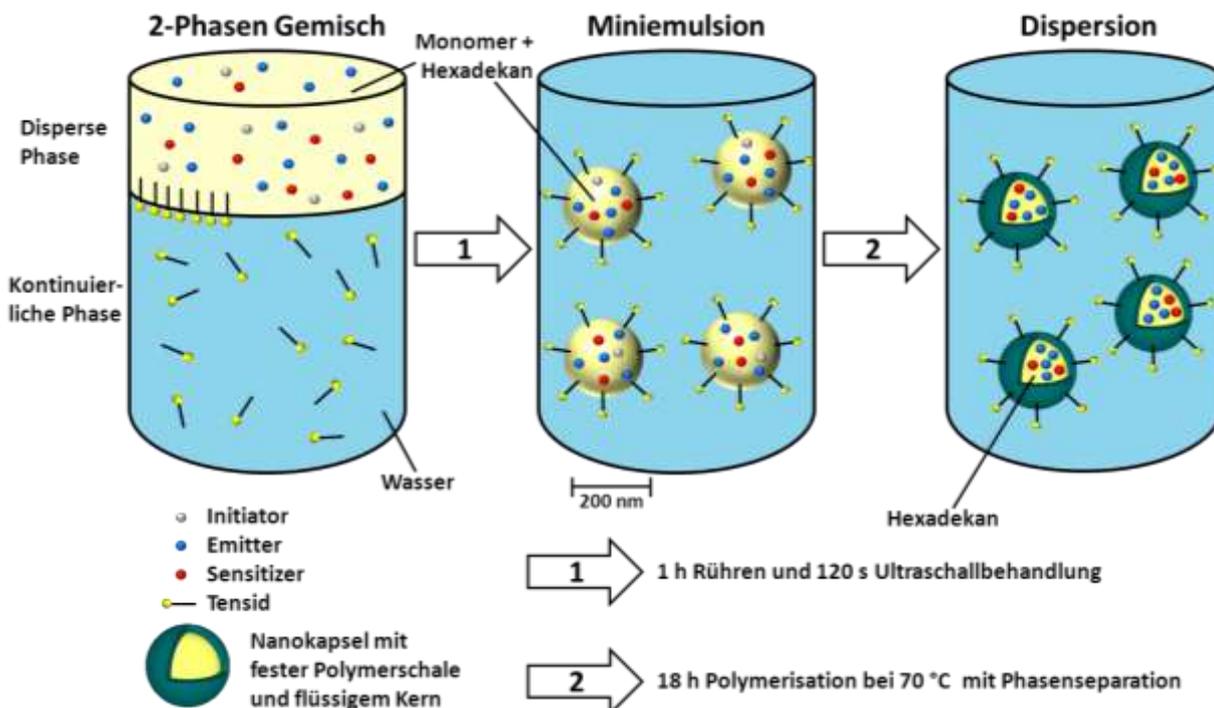


Abbildung 2.5: Schema des radikalischen Miniemulsionsprozesses zur Herstellung von Nanokapseln. Zusätzlich, die Kapselbildung nicht beeinflussend, wurde die für die TTA-UC nötigen Farbstoffe (Emitter und Sensitizer) mit dargestellt.

Diese Phasenseparation beruht auf unterschiedlichen Grenzflächenspannungen zwischen dem Polymer und der hydrophoben Flüssigkeit gegenüber Wasser. So entsteht eine feste Schale aus Polymer, welche den flüssigen Kern vollständig umschließt. Durch das Einstellen des Verhältnisses an Monomer zu hydrophober Flüssigkeit bei Beginn des Prozesses kann die Schalendicke und Kerngröße variiert werden. Die Größe der Kapseln lässt sich über die Menge des eingesetzten Tensids einstellen, wobei eine gewisse Grenze nicht überschritten werden darf. Verwendet man zu wenig Tensid, ist die Miniemulsion nicht stabil genug. Setzt man jedoch zu viel ein ist der Unterschied in der Grenzflächenspannung zur notwendigen Phasenseparation nicht mehr groß genug.

Das Prinzip der Phasenseparation, welches zur Erklärung der Bildung einer Kern-Hülle Morphologie angewandt werden kann, wurde bereits 1970 von Torza und Mason^[83] aufgestellt. Mit dem von ihnen entwickelten Modell lässt sich die Morphologie eines Systems, bestehend aus drei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten, vorhersagen. Dazu benötigt man lediglich die Grenzflächenspannungen zwischen den jeweiligen Flüssigkeiten und den daraus resultierenden Spreitungskoeffizienten jeder Flüssigkeit. Der Zusammenhang ist durch Gleichung (2.2) gegeben:

$$S_i = \gamma_{kj} - \gamma_{ik} + \gamma_{ij} \quad (2.2)$$

Mit S_1 = Spreitungskoeffizient der Flüssigkeit 1 [$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$]

γ_{kj} = Grenzflächenspannung zwischen den Flüssigkeiten k und j [$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$]

γ_{ik} = Grenzflächenspannung zwischen den Flüssigkeiten i und k [$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$]

γ_{ij} = Grenzflächenspannung zwischen den Flüssigkeiten i und j [$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$]

Das Modell beschreibt die beiden Flüssigkeiten 1 und 3 als nicht miteinander mischbare Öle, welche sich in einem Tröpfchen, umgeben von Wasser (Flüssigkeit 2), befinden. Im Tröpfchen entsteht somit eine Phasenseparation zwischen den nicht mischbaren Ölen und es bildet sich eine von den Spreitungskoeffizienten abhängige Morphologie. In Abbildung 2.6 sind verschiedene Fälle dargestellt, bei denen sich eine unterschiedliche Morphologie bildet. Fall 1 beschreibt eine vollständige Verkapselung von Öl 1 durch Öl 3. In diesem Fall weist Öl 3 eine größere Hydrophilie auf als Öl 1. Dies zeigt sich in der Grenzflächenspannung der

beiden Öle zum Wasser (Flüssigkeit 2), welche bei Öl 3 wesentlich geringer ist als bei Öl 1 ($\gamma_{32} \ll \gamma_{12}$).

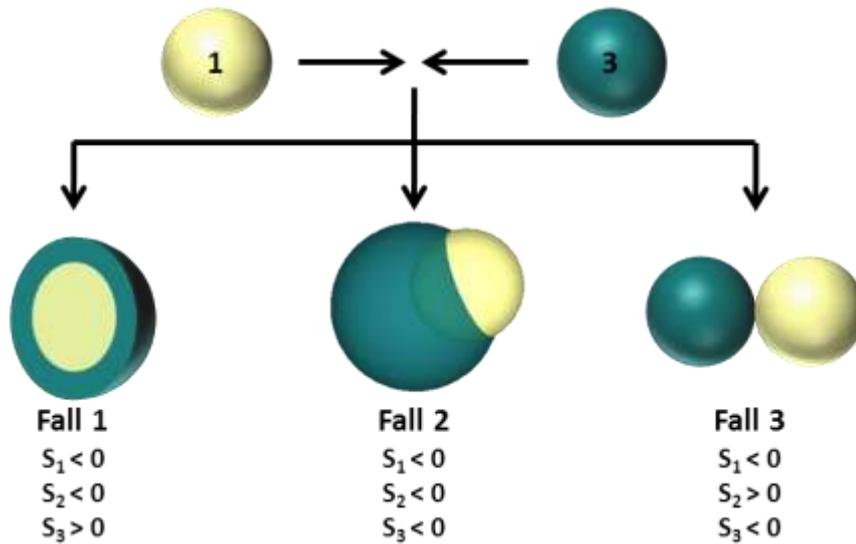


Abbildung 2.6: Beispiele für eine mögliche Morphologie bei verschiedenen Spreitungskoeffizienten. Fall 1 beschreibt die vollständige Verkapselung, Fall 2 eine partielle Umschließung und Fall 3 eine Entmischung.

Fall 2 zeigt eine partielle Umschließung von Öl 1 durch Öl 3. Diese Morphologie ist bei ähnlichen Grenzflächenspannungen (ähnliche Hydrophilie) der Öle gegenüber Wasser zu beobachten ($\gamma_{32} \approx \gamma_{12}$). Eine vollständige Entmischung der beiden Öle (zu sehen bei Fall 3) ergibt sich, wenn die Grenzflächenspannung zwischen den beiden Ölen 1 und 3 viel größer ist als die jeweilige zum Wasser ($\gamma_{32}, \gamma_{12} \ll \gamma_{13}$). Die Spreitungskoeffizienten aus Abbildung 2.6 erhält man durch Einsetzen der Grenzflächenspannungen in Gleichung (2.2).

Diese Theorie mit dem Modell der drei Flüssigkeiten wurde 1989 von Sundberg auf zwei nicht mischbare Polymere in Wasser übertragen. Zusätzlich wurde die Thermodynamik des Systems untersucht.^[84] Dabei stellte sich heraus, dass die Morphologie mit der geringsten freien Enthalpie G bevorzugt wird. Diese hängt von der Grenzflächenspannung und der Größe der Grenzfläche zwischen den untersuchten Stoffen ab:

$$G = \sum \gamma_{i,j} \cdot A_{i,j} \quad (2.3)$$

Mit G = Freie Enthalpie [J]

$\gamma_{i,j}$ = Grenzflächenspannung zwischen zwei Flüssigkeiten (i,j) [$\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$]

$A_{i,j}$ = Größe der Grenzfläche i und j [m^2]

Der thermodynamisch günstigste Fall (möglichst geringe Enthalpie) entspricht somit einer Minimierung der Gesamtgrenzflächen­spannung. Betrachtet man das Modell von Torza und Mason mit dem Ansatz von Sundberg, erhält man dieselben Resultate. Im Fall 1 ist die Grenzflächen­spannung zwischen Öl 1 und Wasser am größten ($\gamma_{32} \ll \gamma_{12}$). Das Gesamtsystem versucht damit das Auftreten dieser Grenzflächen­spannung zu vermeiden. Dies gelingt mit einer vollständigen Umschließung von Öl 1 durch Öl 3 und entspricht einer vollständigen Kern-Hülle-Morphologie (vollständige Verkapselung). Beim Fall 2 existieren ähnliche Grenzflächen­spannungen der beiden Öle zum Wasser. Folglich werden beide vom Gesamtsystem ausgebildet, was eine partielle Umschließung zur Folge hat. In Fall 3 besitzt γ_{13} (zwischen den beiden Ölen) den Wert der größten Grenzflächen­spannung. Das System vermeidet somit die Berührung der beiden Öle miteinander und bildet zwei getrennte Tröpfchen in Wasser. Beide dargestellten Modelle lassen sich auf die in dieser Arbeit durchgeführten Phasenseparationen übertragen.

Neben den thermodynamischen Aspekten der Phasenseparation hat Sundberg auch die Geschwindigkeit der Phasenseparation untersucht.^[85] Hier wurde eine Abhängigkeit von der Diffusion der beiden Öle/Polymere festgestellt. Bei Polymeren verläuft die Diffusion unterschiedlicher (langsamer) als bei Ölen, was zur Ausbildung von zahlreichen neuen Strukturen mit kinetisch bedingter Morphologie führt.

Für die Bildung von Nanokapseln im wässrigen Medium bedeutet dies folgendes: Das verwendete Polymer und das eingesetzte Hydrophob müssen unterschiedliche Grenzflächen­spannungen zu Wasser aufweisen, wobei das Polymer davon eine geringere Grenzflächen­spannung aufweisen muss als das zu verkapselnde Hydrophob. Mit anderen Worten: die Hydrophilie des Polymers muss größer sein als die des Hydrophobs. Ist diese Grundvoraussetzung gegeben, muss zudem die Diffusion des Polymers und des Hydrophobs in Betracht gezogen werden. Ist beispielweise eine hohe Viskosität des Hydrophobs gegeben, „leidet“ die Diffusion darunter und die Kapselbildung kann fehlschlagen. Zusätzlich wird die Grenzflächen­spannung und somit die resultierende Morphologie von weiteren Parametern wie der Wahl des Tensids,^[85] der Menge und Art des Initiators^[86] und natürlich der Temperatur^[87] beeinflusst.

2.3.2 Lösungsmittelverdampfungsprozess

Neben der radikalischen Polymerisation ist der Lösungsmittelverdampfungsprozess (engl. solvent evaporation process) eine weitere Möglichkeit, um Nanokapseln über eine Miniemulsion zu erhalten.

2011 wurde diese Technik zur Kapselgewinnung in Miniemulsion zum ersten Mal von Staff et al.^[23] veröffentlicht. Bis dahin wurde die Lösungsmittelverdampfungs-Methode in Miniemulsion nur zur Herstellung von Nanopartikeln^[75, 88] verwendet. Dazu wurden bereits vorab gefertigte Polymere in der dispersen Phase durch die Zugabe eines Lösungsmittels in Lösung gebracht. Nach dem Herstellen der Miniemulsion wurde das Lösungsmittel des Polymers, enthalten in den Tröpfchen, verdampft. Dabei findet eine Ausfällung des Polymers im Tröpfchen statt und die Nanopartikel werden gebildet.

Dieser Prozess wurde so modifiziert, dass eine Herstellung von Nanokapseln möglich ist. Dazu muss, wie bereits bei der radikalischen Polymerisation, eine Phasenseparation innerhalb der Tröpfchen stattfinden. In Abbildung 2.7 ist ein Schema des Lösungsmittelverdampfungsprozesses zur Herstellung von Nanokapseln dargestellt.

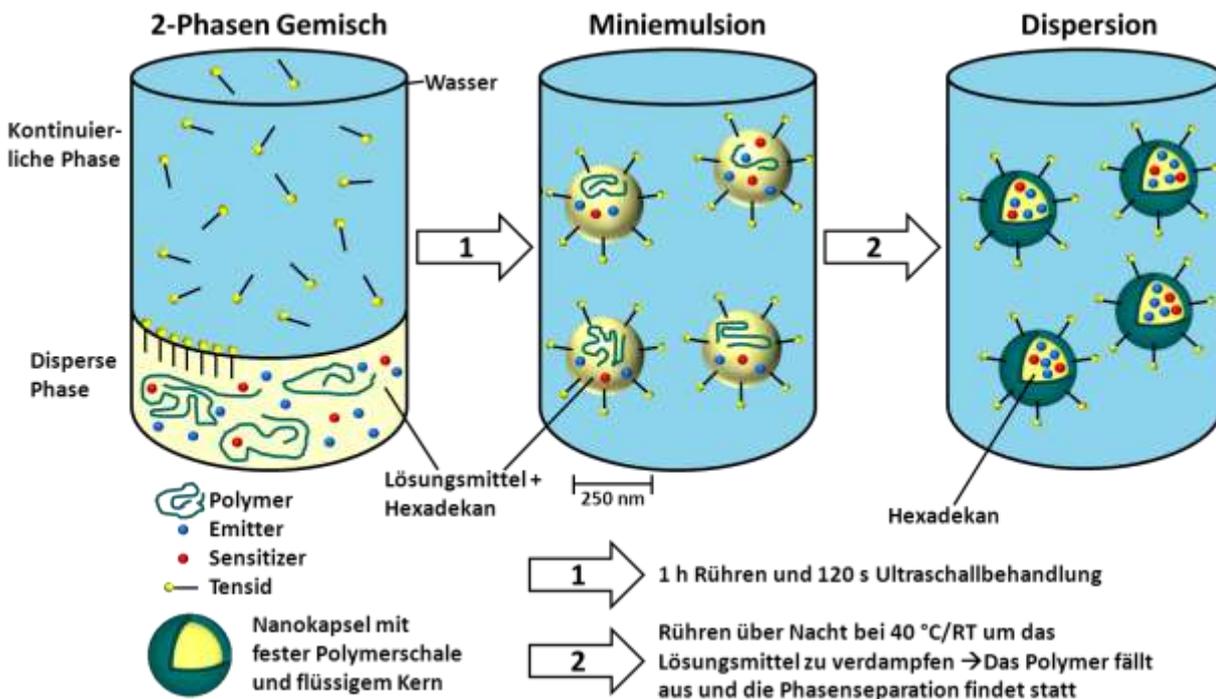


Abbildung 2.7: Schema des Lösungsmittelverdampfungsprozesses. Zusätzlich, die Kapselbildung nicht beeinflussend, wurde die für die TTA-UC nötigen Farbstoffe (Emitter und Sensitizer) mit dargestellt.

Wie bereits erwähnt, wird das verwendete Polymer vorab synthetisiert. Der große Vorteil dieser Methode gegenüber der radikalischen Polymerisation besteht darin, dass unter sehr sanften Bedingungen (ohne Radikalbildung und bei RT oder 40 °C) auch eine Verkapselung von empfindlichen Reagenzien möglich ist. Das Lösungsmittel für das Polymer sollte nicht mischbar mit Wasser sein und einen möglichst geringen Siedepunkt (zumindest geringer als Wasser) aufweisen. Die disperse Phase wird schließlich komplettiert von der zu verkapselnden Flüssigkeit mit starken hydrophoben Eigenschaften. Die kontinuierliche Phase (Wasser und Tensid) hat sich im Vergleich mit der radikalischen Polymerisation nicht verändert. Durch Behandlung mit dem Ultraschallstab (und vorangegangener Voremulgierung) wird der Zustand der Miniemulsion erreicht. Wie gewohnt finden sich alle Bestandteile der dispersen Phase in den Tröpfchen wieder. Wird das Lösungsmittel des Polymers verdampft, kommt es zu einem Ausfällungsprozess des Polymers und anschließender Phasenseparation zwischen Polymer und hydrophober Flüssigkeit. Die Größe der resultierenden Nanokapseln entspricht nicht exakt der Größe der Tröpfchen da das Lösungsmittel des Polymers vollständig verdampft und somit eine Verringerung des Kapseldurchmessers zur Folge hat. Wie bereits bei der radikalischen Polymerisation findet auch hier eine Phasenseparation in den Kapseln statt. Folglich müssen zur Ausbildung einer Kern-Hülle-Morphologie auch die gleichen Grundbedingungen erfüllt werden. Das beinhaltet einen Grenzflächenenergieunterschied von Polymer und Hydrophob zum Wasser, wobei die Hydrophilie des Polymers größer sein muss als die des Hydrophobs. Ebenso darf die Viskosität des hydrophoben Mediums nicht zu groß sein, damit eine Phasenseparation erfolgen kann. Bei dieser Methode sind aber ebenso andere Parameter von Bedeutung. Die Kinetik des Prozesses ist deutlich einfacher beeinflussbar als bei der radikalischen Polymerisation. Durch das Einstellen der Temperatur kann die Verdampfungsgeschwindigkeit des Lösungsmittels variiert werden. Damit kann dem Prozess der Phasenseparation mehr Zeit gegeben werden, was zu einer besseren Ausbildung der Kern-Hülle Morphologie führt. Weitere Faktoren, welche die Geschwindigkeit der Verdampfung bzw. der Fällung des Polymers beeinflussen, sind beispielsweise das Molekulargewicht des Polymers, die Menge des verwendeten Lösungsmittels und die Siedetemperatur des Lösungsmittels.

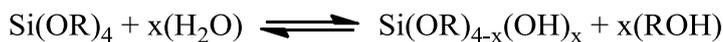
2.3.3 Sol-Gel-Prozess zu anorganischen SiO₂-Nanokapseln

Wie bereits erwähnt, gibt es neben dem Prozess der Phasenseparation auch noch die Möglichkeit der Grenzflächenreaktion, um aus Miniemulsionströpfchen Nanokapseln herzustellen. Das System der Grenzflächenreaktion wird hauptsächlich bei inversen Miniemulsionen angewendet, um wässrige Flüssigkeiten zu verkapseln. Als Grenzflächenreaktion wird meistens eine Polyaddition^[89, 90] von hydrophoben Isocyanaten und wasserlöslichen Diolen/Diaminen verwendet, um eine Kapselhülle aus Polyurethan oder Polyharnstoff zu generieren. Des Weiteren existiert die Möglichkeit der sogenannten Klickchemie an der Grenzfläche. Dies funktioniert mit einem hydrophoben Diin und einem hydrophilen Diazid und es bildet ein Triazol-basiertes Polymer um einen hydrophilen Kern.^[64]

Eine weitere Möglichkeit zur Kapselbildung ist die Durchführung eines Sol-Gel-Prozesses an der Grenzfläche.^[91] Dieser Prozess erlaubt eine Grenzflächenreaktion in direkter Miniemulsion und ermöglicht somit die Verkapselung von hydrophoben Flüssigkeiten.^[92] Anstatt einer Schale aus organischem Polymer erhält man mit dem Sol-Gel-Prozess eine anorganische Struktur aus tetraedrisch verknüpften SiO₂-Einheiten.

Dazu benötigt man sogenannte Silizium-Präkursoren (engl. Precursor), meistens bestehend aus einem Tetraalkoxysilan (in der vorliegenden Arbeit TEOS, Tetraethylorthosilicat) welches zusammen mit der zu verkapselnden hydrophoben Flüssigkeit die disperse Phase bildet. Die kontinuierliche Phase besteht wie gewohnt aus dem stabilisierenden Tensid und Wasser. Beim Sol-Gel-Prozess findet zunächst eine teilweise oder vollständige Hydrolyse des Alkoxysilans (Si(OR)₄) zum Hydroxysilan (Si(OH)₄) statt. Der darauffolgende Gel-Prozess ist eine Kondensationsreaktion zwischen zwei, am Silizium gebundenen, Hydroxygruppen unter der Abspaltung von Wasser (Abbildung 2.8).

Hydrolyse (Sol-Prozess)



Kondensation (Gel-Prozess)



Abbildung 2.8: Reaktionsgleichungen des Sol-Gel-Prozesses.

Beide Reaktionen finden an der Grenzfläche der Tröpfchen statt, so dass sich eine tetraedrisch geformte SiO₂-Struktur bildet, welche die hydrophobe Flüssigkeit vollständig umschließt. Der

Aufbau der anorganischen Schale um die hydrophobe Flüssigkeit durch den Sol-Gel-Prozess an der Grenzfläche ist in Abbildung 2.9 schematisch dargestellt.

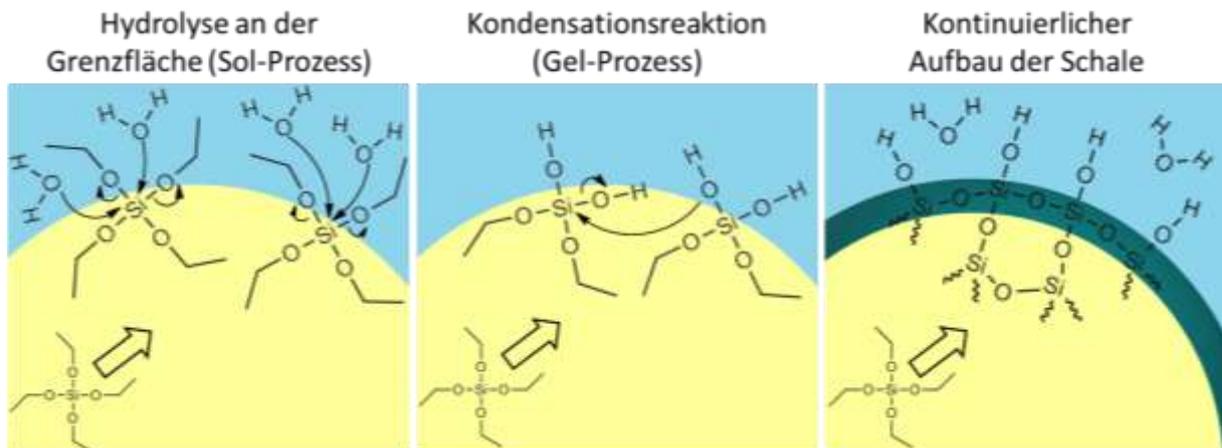


Abbildung 2.9: Schematischer Ablauf des Schalenbaus (grün) an der Grenzfläche. TEOS befindet sich in Lösung (im Tröpfchen, gelb) und diffundiert an die Grenzfläche zu Wasser (blau), wo der Sol-Gel-Prozess stattfindet.

2.4 Photonen-Aufkonversion

In diesem Kapitel wird zunächst der Begriff der Photonen-Aufkonversion (engl. photon upconversion, UC) erklärt und verschiedene Prozesse der Aufkonversion dargestellt. Im Anschluss wird dann auf den in dieser Arbeit verwendeten Prozess der „Triplet-Triplet-Annihilation Aufkonversion“ (TTA-UC) eingegangen. Dabei werden die Theorie und die Eigenschaften dieses speziellen Falles der UC erklärt. Im letzten Abschnitt wird ein Überblick über die TTA-UC in Nanopartikeln gegeben.

Photonen-Aufkonversion (UC) ist ein physikalischer Prozess und steht für die Umwandlung von langwelligem Licht in kurzwelliges Licht. Mit anderen Worten ausgedrückt: Es ist ein Prozess zur Erzeugung von energiereichen Photonen aus energieärmeren Photonen.

Der Prozess der UC lässt sich in verschiedene Mechanismen unterteilen. Es gibt zum einen die klassischen nichtlinearen optischen Prozesse der Frequenzverdopplung und der simultanen Zweiphotonenabsorption (engl. two photon absorption, TPA). Zum anderen existieren die Prozesse der Energietransfer-Aufkonversion (ETU) und der Absorption des angeregten Zustandes (engl. excited state absorption, ESA). Neben diesen Prozessen gibt es den in dieser Arbeit verwendeten Prozess der Triplet-Triplet-Annihilation Aufkonversion, welcher sich aber von den vorab genannten Prozessen deutlich unterscheidet. Bevor eine genauere

Erklärung des TTA-UC-Prozesses erfolgt, soll zunächst ein kurzer Überblick über die anderen Prozesse gegeben werden.

Beim Prozess der simultanen Zweiphotonenabsorption^[4] (TPA) werden gleichzeitig zwei Photonen mit derselben Energie absorbiert, was über ein virtuelles Zwischenniveau zur Population des angeregten Zustandes führt. Bei der Relaxation des angeregten Zustandes wird ein Photon, welches eine größere Energie als die der eingestrahlten Photonen ($\nu_2 > \nu_1$) besitzt, emittiert (Abbildung 2.10, links). Da beide zur Anregung benötigten Photonen gleichzeitig vorliegen müssen, werden sehr hohe Anregungsintensitäten ($\text{MW}\cdot\text{cm}^{-2}$ und $\text{GW}\cdot\text{cm}^{-2}$) benötigt. Eine Mehrphotonenabsorption (MPA) erfolgt nach demselben Prinzip und findet beispielsweise in modernen Mikroskopiemethoden^[93] seine Anwendung.

Bei der Frequenzverdopplung^[5] wird Licht auf ein nichtlineares optisches Medium (Bsp. Kaliumdihydrogenphosphat, KDP) eingestrahlt. Die resultierende Emission weist die doppelte Frequenz der Anregungswellenlänge auf. Die Frequenzverdopplung wird als SHG (engl. second harmonic generation) bezeichnet und findet beispielsweise Anwendung in der Veränderung von Laseranregungswellenlängen (Abbildung 2.10, rechts).

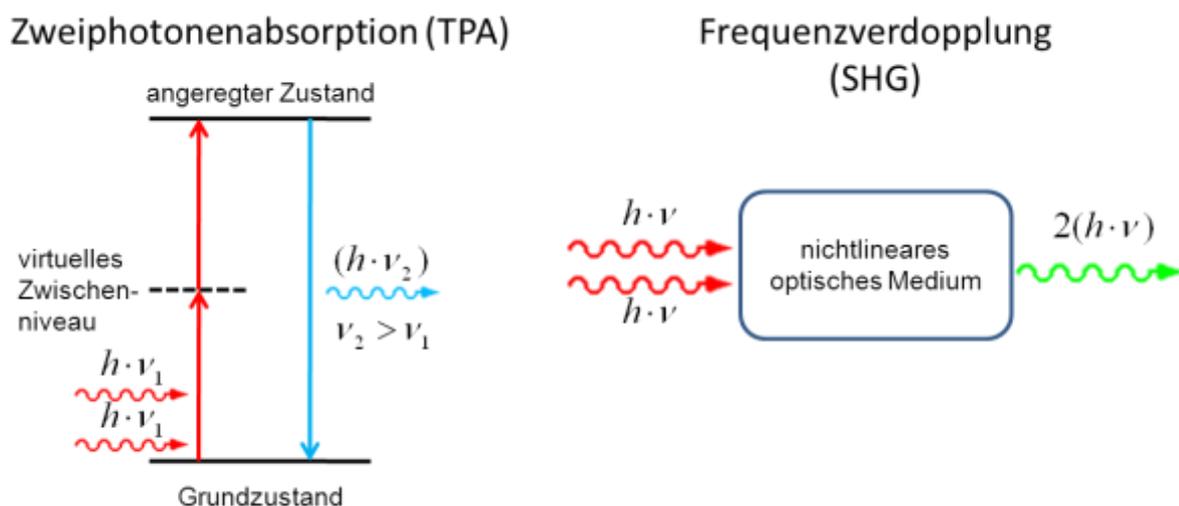


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der UC-Prozesse der Zweiphotonenabsorption (links) und der Frequenzverdopplung (rechts).

Um eine ausreichende Effizienz der beiden Prozesse zu gewährleisten, werden kohärente Strahlungsquellen, sehr hohen Intensitäten im Bereich von $\text{MW}\cdot\text{cm}^{-2}$ oder $\text{GW}\cdot\text{cm}^{-2}$ und hohe spektrale Strahlungsdichten benötigt. Diese hohen Anforderungen an die Anregungsquelle kann nur durch die Verwendung von Lasern erfüllt werden. Aus diesen Gründen sollten sie von den weiteren Prozessen der ETU und ESA abgegrenzt werden.

Der Prozess der ESA^[7, 94] ist schematisch in Abbildung 2.11 (links) dargestellt. Es wird zunächst ein Photon absorbiert und somit der erste angeregte Zustand besetzt. Die Absorption eines weiteren Photons durch den ersten angeregten Zustand führt zu einer Besetzung des zweiten angeregten Zustandes. Von dort besteht die Möglichkeit zur Relaxation in den Grundzustand unter Abgabe eines Photons. Die Absorption des zweiten Photons muss, im Gegensatz zum TPA-Prozess, nicht exakt zum selben Zeitpunkt erfolgen, da ein reales Zwischenniveau existiert. Dieses reale Zwischenniveau ist jedoch sehr kurzlebig (Bereich von ps, je nach Material), weshalb eine extrem zeitnahe, zweite Photonenabsorption erfolgen sollte. Aus diesen Gründen können die Anregungsintensitäten im Vergleich zum TPA und SHG-Prozess etwas geringer sein ($\text{MW}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Ebenfalls in Abbildung 2.11 (rechts) dargestellt, ist der Prozess der Energietransfer-Aufkonversion. Dieser Prozess der ETU wurde von Bloembergen^[95] vorhergesagt und schließlich von Auzel^[6] nachgewiesen. Es findet eine sequentielle Energieübertragung von einem Sensibilisator auf einen Aktivator statt. Es werden zwei Sensibilisatoren durch Absorption von Photonen in den angeregten Zustand angehoben. Die Energie eines Sensibilisators wird auf den Aktivator übertragen, der sich somit anstelle des Sensibilisators im ersten angeregten Zustand befindet. Die benötigte Energie, um den zweiten angeregten Zustand zu erreichen, wird vom zweiten Sensibilisator geliefert. Durch Population dieses Zustandes ist durch Relaxation eine Emission mit höherer Energie (relativ zur Anregung) zu beobachten.

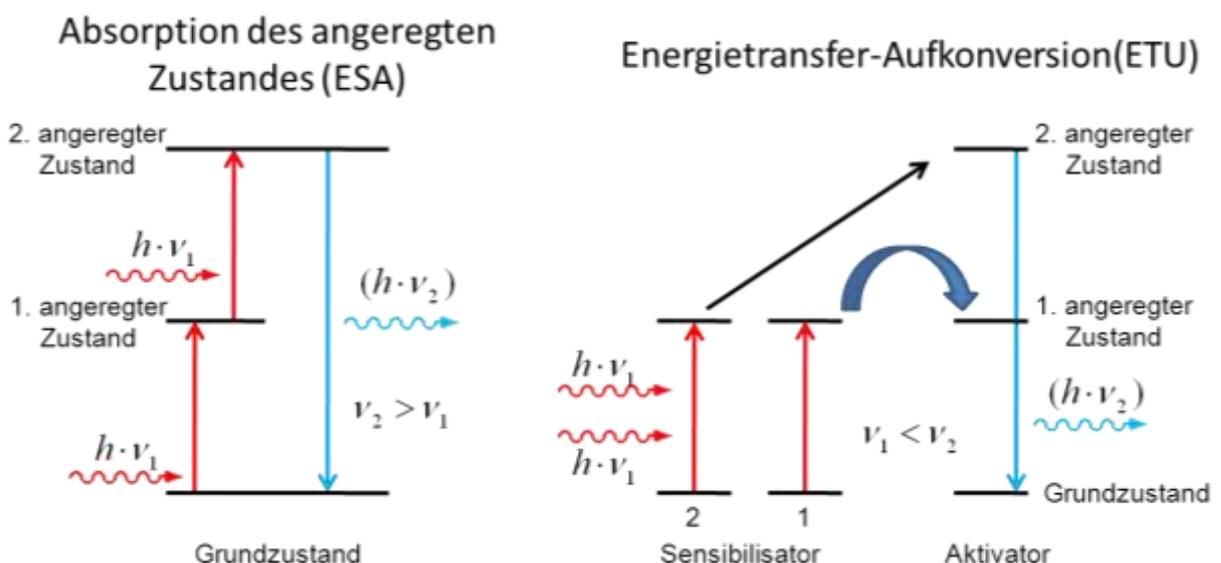


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der UC-Prozesse der Absorption des angeregten Zustandes (ESA) (links) und der Energietransfer Aufkonversion (ETU) (rechts).

Wie bereits bei der ESA muss auch hier das zweite Photon nicht exakt zeitgleich mit dem ersten Photon zur Absorption vorhanden sein, was Anregungsintensitäten im Bereich von $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ermöglicht.

Die ETU ist, ebenso wie die ESA, vor allem bei mit Übergangsmetall- oder Lanthanoid-Ionen (Seltenerdionen) dotierten Festkörpern zu beobachten. Als besonders effektives Material für ETU gilt ein mit Yb^{3+} und Er^{3+} dotierter NaYF_4 -Festkörper.^[96] Die Dotierung entspricht dem Sensibilisator, während der Festkörper den Aktivator darstellt. Da es sich somit bei der Anregung der ETU um einzelne Atomlinien handelt, sind die Energieniveaus sehr schmal (geringe Linienbreite). Dadurch muss das Absorptionsspektrum einen sehr eng definierten Wellenlängenbereich aufweisen, der exakt mit der Energie des Energieniveaus überlappt und dessen Besetzung ermöglicht. Der Prozess der ETU ist bei Anregungsintensitäten im $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ und $\text{MW}\cdot\text{cm}^{-2}$ möglich, womit auf kohärente Strahlung verzichtet werden kann. Trotzdem sind für den Prozess hohe spektrale Leistungsdichten nötig, weshalb bisher keine Anregung mit Sonnenlicht gezeigt wurde.^[9]

Deshalb ist der Prozess der ETU in seinen möglichen Anwendungen in der Solarzellentechnik^[9] und in biologischen Anwendungen wie der photodynamischen Therapie^[97] oder der biologischen Bildgebung^[98] nur eingeschränkt einsetzbar.

All diese dargestellten unterschiedlichen Prozesse der Aufkonversion werden, wie bereits erwähnt, mit der Verwendung von hohen Anregungsintensitäten im Bereich von $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ bis zu $\text{GW}\cdot\text{cm}^{-2}$ in Verbindung gebracht.^[8] Des Weiteren sind die meisten dieser Methoden auf kohärente Anregungsquellen (Laser) angewiesen. Einzige Ausnahme davon bildet der ETU-Prozess mit der sequentiellen Energieübertragung, welcher bereits bei Anregungsintensitäten im Bereich von $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ und $\text{MW}\cdot\text{cm}^{-2}$ nachgewiesen wurde.^[6, 99] Der Nachteil des ETU-Prozess und auch der anderen genannten UC-Prozesse ist eine benötigte hohe spektrale Leistungsdichte der Anregungsquelle im Bereich von $\text{W}\cdot\text{nm}^{-1}$. Diese hohen Anforderungen an die Anregungsquellen der nichtlinearen UC-Prozesse begrenzen ihre Anwendungsmöglichkeiten im Solarzellenbereich ebenso wie bei möglichen biologischen Anwendungen. Im folgenden Kapitel wird eine Methode der Aufkonversion vorgestellt, welche bereits mit Sonnenlicht als Anregungsquelle^[10] nachgewiesen wurde und somit wesentlich geringere Anforderungen an die Art und Intensität der Anregungsquelle stellt, als die bisher vorgestellten Methoden der UC.

2.4.1 TTA-Aufkonversion (TTA-UC)

2.4.1.1 Grundlegende Theorie

Diese Art der Aufkonversion wurde 1962 zum ersten Mal von Parker und Hatchard in einem Sensitizer-Emitter-Gemisch aus Phenantren (Sensitizer) und Naphthalin (Emitter) entdeckt.^[100] Sie beobachteten die im Vergleich zur Anregung blau (anti-Stokes) verschobene Emission des Emitters nach Anregung eines Sensitizers. Diese verzögerte Fluoreszenz aus dem angeregten Singulett-Zustand des Akzeptors erklärten sie mittels Energieübertragungen über die Triplettzustände der beiden Farbstoffe und entwickelten damit in den folgenden Jahren eine Theorie, welche in ihren Grundzügen bis heute Bestand hat.^[101-103] In den folgenden Jahrzehnten wurden auf dem Gebiet, außer der Entdeckung von metallierten Porphyrinen als Sensitizer,^[104] kaum nennenswerte Ergebnisse erzielt. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts^[105] erlebte das Feld der TTA-UC eine Wiedergeburt und erfährt seitdem ein stetig wachsendes Interesse in der Forschungswelt. Die geringen Anforderungen an die Anregungsbedingungen, wie inkohärente Strahlung, Anregungsintensitäten im Bereich von $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ und die geringe spektrale Leistungsdichte, stellen im Vergleich zu anderen UC-Arten einen enormen Vorteil dar. Somit wurden zahlreiche Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht, wodurch eine stetige Weiterentwicklung der Theorie und Charakteristika des Prozesses stattfand. Diese Entwicklungen wurden in den letzten Jahren in einigen Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[16, 106-108] Mögliche Anwendungen der TTA-UC sind die mögliche Effizienzsteigerung von organischen Solarzellen,^[17] der vollständig organische flexible Farbbildschirm,^[18] die Durchführung von photoelektrochemischen Prozesse,^[109] die biologische Bildgebung^[110] oder die Verwendung als Sauerstoffsensoren.^[111] Die meisten dieser Anwendungen wurden bereits in der Einleitung detailliert vorgestellt.

Der allgemein anerkannte Mechanismus der TTA-UC ist in Abbildung 2.12 mit Hilfe eines Jablonski-Diagramms dargestellt und beruht auf einer Energieübertragung zwischen zwei Farbstoffmolekülen, dem Sensitizer (Sensibilisator, Donor) und dem Emitter (Akzeptor). Diese Energieübertragung setzt sich aus drei nacheinander ablaufenden, essentiellen Prozessen zusammen: Intersystem-Crossing (ISC), Triplett-Triplett-Transfer (TTT) und Triplett-Triplett-Annihilation (TTA).

Der Gesamtprozess der TTA-UC beginnt mit einer selektiven Anregung des Sensitizers mit einer bestimmten Energie $E = h\nu_I$, was eine Besetzung des angeregten Singulettzustandes (1S_1) des Sensitizers nach sich zieht. Insgesamt kann das Anregungsspektrum über einen

breiteren Wellenlängenbereich verteilt sein, da die Energieniveaus der Sensitizer nicht so eng definiert sind wie beispielsweise bei der ETU. Es folgt ein Intersystem-Crossing (ISC), wobei die Energie in den Triplettzustand (3S_1) des Sensitizers übergeht. In der Quantenmechanik stellt der Prozess des ISC einen Spin-verbotenen Übergang (d.h. die Wahrscheinlichkeit ist sehr gering) dar. Auf Grund der Notwendigkeit dieser Besetzung des Triplettzustandes kommen nur Moleküle mit einem hohen ISC-Koeffizienten (hohe Wahrscheinlichkeit für Übergang) als Sensitizer der TTA-UC in Frage. Beispiele für solche Moleküle sind Metall-Ligand Charge-Transfer-Komplexe^[112, 113] oder metallierte Makrozyklen wie Porphyrine^[114] und Phthalocyanine^[115] mit einem schweren Metallatom (Pd, Pt, Ru) im Ringinneren.

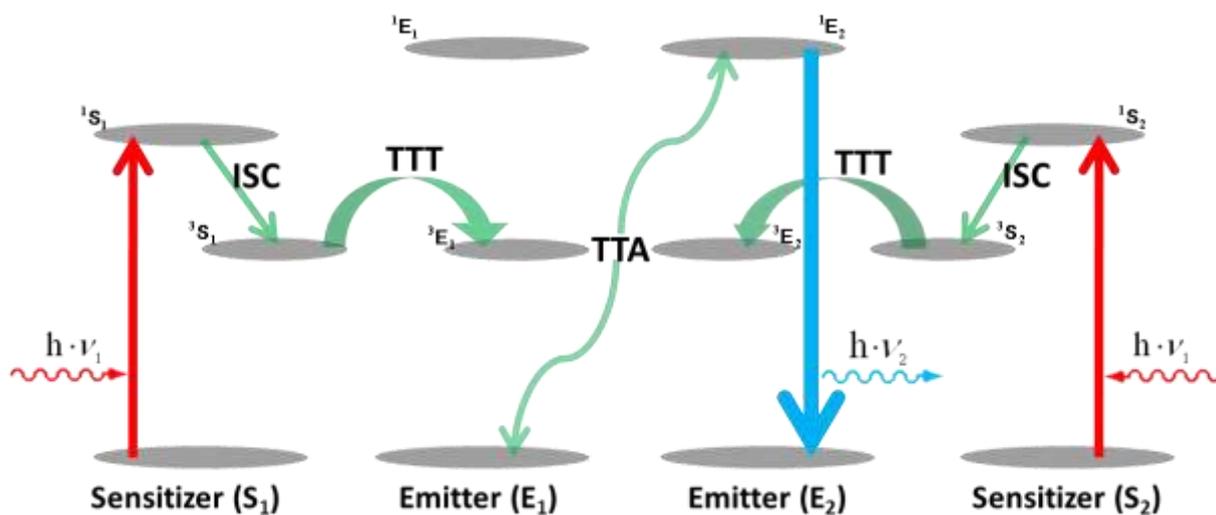
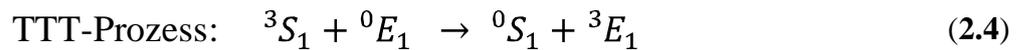


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung des TTA-UC-Mechanismus. Beschreibung des Energieverlaufs: Anregung der beiden Sensitizer (S_1 und S_2) mit der Energie $h\nu_1$ (rote Pfeile) in deren angeregten Singulettzustand (1S_x); Intersystem-Crossing (ISC) zum jeweiligen Triplettzustand des Sensitizers (3S_x); Triplett-Triplett-Transfer (TTT) zum Triplettzustand von einem Emittor (3E_1 und 3E_2); Triplett-Triplett-Annihilation (TTA) von beiden Triplettzuständen (3E_1 und 3E_2), wodurch ein Emittor (E_1) in den Grundzustand relaxiert, während der andere Emittor (E_2) in den angeregten Singulettzustand (1E_2) angehoben wird; Relaxation von E_2 in den Grundzustand unter Abstrahlung eines Photons (UC-Fluoreszenz, blauer Pfeil) mit der Energie $h\nu_2$.

Das Metallzentrum ist die Ursache einer erhöhten Spin-Bahn-Kopplung dieser Moleküle,^[116, 117] was ISC-Koeffizienten von nahezu eins und somit eine Wahrscheinlichkeit von fast 100% eines ISC nach Anregung des Moleküls mit sich bringt^[118]. Auf Grund dieser hohen ISC-Rate kann man bei solchen Molekülen keinerlei Fluoreszenz beobachten. Die Besetzung des relativ langlebigen Triplettzustandes (Lebensdauer von μs und mehr) ist eine Grundvoraussetzung der TTA-UC, und kann somit als Energiereservoir für die weiteren Prozesse betrachtet werden. Durch diese „Zwischenspeicherung“ der Energie in den langlebigen Triplettzuständen werden die geringen Anregungsbedingungen ermöglicht. Durch geringere

Anregungsintensitäten dauert es länger, bis sich ein zweites Photon im Triplettzustand einfindet, was aber auf Grund der erhöhten Lebensdauer keinen negativen Einfluss auf den Gesamtprozess ausübt.

Der nächste Schritt ist eine Übertragung der Energie vom angeregten Triplettzustand des Sensitizers (3S_1) zum Triplettzustand des Emitters (3E_1). Dieser Prozess wird als Triplett-Triplett-Transfer (TTT) bezeichnet und kann mit folgender Gleichung (2.4) beschrieben werden:



Mit 3S_1 = Triplettzustand des Sensitizers S_1

0S_1 = Grundzustand des Sensitizers S_1

0E_1 = Grundzustand des Emitters E_1

1E_1 = Singulettzustand des Emitters E_2

Um eine hohe Effizienz (bzw. den Ablauf) dieses TTT zu gewährleisten, muss die Energie des Triplettzustandes des Sensitizers größer oder gleich der Energie des Triplettzustandes des Emitters sein. Je größer die Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen, desto leichter findet der TTT statt. Dies stellt somit eine weitere Grundvoraussetzung des Gesamtprozesses dar und ist in Gleichung (2.5) zusammengefasst:

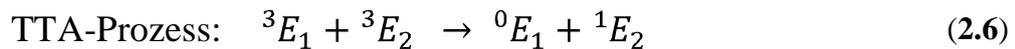
$$E_{Sensitizer}^{Triplett} \geq E_{Emitter}^{Triplett} \quad (2.5)$$

Mit $E_{Sensitizer}^{Triplett}$ = Energie des Triplettzustandes des Sensitizers

$E_{Emitter}^{Triplett}$ = Energie des Triplettzustandes des Emitters

Die Energieübertragung zwischen den beiden beteiligten Molekülen beim TTT erfolgt nach derzeitigem Wissenstand, über einen Dexter-Prozess.^[119] Dazu ist eine Begegnung, bzw. ein Zusammenstoß der Moleküle notwendig, um die Energie zu transferieren. Durch den Zusammenstoß findet eine Überlappung der Wellenfunktionen beider Zustände statt, was eine Energieübertragung ermöglicht. Während der einzelne Übergang in dem jeweiligen Molekül ($^3S_1 \rightarrow {}^0S_1$ und ${}^0E_1 \rightarrow {}^3E_1$) jeweils Spin-verboten ist, stellt der Gesamtprozess des TTT einem Spin-erlaubten Übergang dar.

Die besetzten Triplettzustände der Emitter sollten, um einen möglichen Energieverlust zu minimieren, eine möglichst geringe Wahrscheinlichkeit zur strahlungslosen Relaxation oder zur Phosphoreszenz aufweisen. Dies bedeutet, eine niedrige ISC-Wahrscheinlichkeit des Emitters ist eine Grundvoraussetzung für die Effizienz des Gesamtprozess der TTA-UC. Die Emitter, meistens aromatische Kohlenwasserstoffe, garantieren diese geringen notwendigen ISC-Raten^[118]. Für den weiteren Ablauf des Prozesses werden zwei Emitter (E_1 und E_2) mit besetzten Triplettzuständen benötigt. Die Besetzung des zweiten Emitters E_2 erfolgt analog zur beschriebenen Besetzung des Emitters E_1 . Dabei wird entweder ein neues Sensitizer-Molekül (S_2) oder dasselbe wie beim ersten Teilprozess (S_1) verwendet, nachdem es wieder in den Grundzustand relaxiert ist (2.4). Nachdem damit zwei Emitter im Triplettzustand vorliegen, findet der bimolekulare Prozess der Triplett-Triplett-Annihilation (TTA) statt. Dabei wird die Energie von einem Emitter (E_1) auf den anderen (E_2) übertragen. Dies hat die Anhebung von einem Emitter (E_2) in den angeregten Singulettzustand (1E_2) zur Folge, während der andere Emitter (E_1) in den Grundzustand (0E_1) relaxiert (Gleichung (2.6)):



Mit 0E_1 = Grundzustand des Emitters E_1
 ${}^3E_{1/2}$ = Triplettzustand des Emitters E_1 oder E_2
 1E_2 = Singulettzustand des Emitters E_2

Damit diese Annihilation überhaupt möglich ist, muss eine weitere Grundvoraussetzung erfüllt sein. Die Energie des angeregten Singulettzustandes des Emitters sollte nicht größer sein als die doppelte Energie des Triplettzustandes des Emitters, da sonst ein Erreichen dieses angeregten Singulettzustandes nicht möglich wäre (Gleichung (2.7)):

$$2E_{\text{Emitter}}^{\text{Triplett}} \geq E_{\text{Emitter}}^{\text{Singulett}} \quad (2.7)$$

Mit $E_{\text{Emitter}}^{\text{Triplett}}$ = Energie des Triplettzustandes des Emitters
 $E_{\text{Emitter}}^{\text{Singulett}}$ = Energie des Singulettzustandes des Emitters

Nachdem sich der Emitter im angeregten Singulettzustand (1E_2) befindet, findet eine Relaxation in den Grundzustand unter Abgabe von Licht mit Energie $E = h\nu_2$ statt. Eine

Grundvoraussetzung des Gesamtprozess ist die hohe Quanteneffizienz dieser Fluoreszenz des Emitters aus dem angeregten Singulettzustand. Diese beobachtete Fluoreszenz wird als verspätete Fluoreszenz (engl. delayed Fluorescence) bezeichnet. Im Vergleich zur normalen, direkten Fluoreszenz, welche im Zeitraum von ps oder ns nach der Anregung detektiert wird, kann diese verspätete UC-Fluoreszenz erst nach einem Zeitraum von μs ^[120] beobachtet werden. Diese verspätete Detektion der Fluoreszenz resultiert aus der Zwischenspeicherung der Energie in den Triplettzuständen von Emitter und Sensitizer. Die Frequenz (ν_2) dieser beobachtbaren Emission (UC-Fluoreszenz) ist größer als die zur Anregung des Sensitizers eingestrahlte Frequenz (ν_1). Mit anderen Worten, es wurden zwei Photonen von langwelligem Licht in ein Photon mit kurzwelligem Licht umgewandelt, was somit einer anti-Stokes (hypsochromen) Verschiebung der Wellenlängen entspricht. Die Größe dieser Verschiebung hängt von der Kombination der beiden Farbstoffpaare aus Sensitizer und Emitter zusammen. Eine Auflistung der bis 2010 veröffentlichten Farbstoffkombinationen und deren Verschiebungsgrößen finden sich in einem Übersichtsartikel.^[106]

Eine letzte Voraussetzung für einen effizienten UC-Prozess hängt mit der Energie der Absorptionsbanden des Sensitizers und der Energie der Emission des Emitters zusammen. Die zur TTA-UC verwendeten Porphyrine weisen Absorptionsspektren mit zwei Absorptionsbanden auf. Die kurzwellige Absorptionsbande wird Soret-Band genannt, das langwellige Absorptionsband hingegen Q-Band. Im Wellenlängenbereich zwischen den beiden Banden findet keine Absorption statt. Die Energie der Emission (Energie des Singulettzustandes des Emitters) sollte somit zwischen den beiden Absorptionsbändern des Sensitizers liegen, damit beispielsweise keine Reabsorption der emittierten Photonen durch den Sensitizer stattfinden kann. Solch eine Reabsorption würde zu einer geringeren Effizienz der TTA-UC führen^[121]:

$$E_{\text{Sensitizer}}^{\text{Soretband}} > E_{\text{Emitter}}^{\text{Singulett}} \gg E_{\text{Sensitizer}}^{\text{Q-Band}} \quad (2.8)$$

Mit $E_{\text{Sensitizer}}^{\text{Soretband}}$ = Energie des Soretbands des Sensitizers

$E_{\text{Emitter}}^{\text{Singulett}}$ = Energie des Singulettzustandes des Emitters

$E_{\text{Sensitizer}}^{\text{Q-Band}}$ = Energie des Q-Band des Sensitizers

Diese Bedingung ist in Gleichung (2.8) und Abbildung 2.13 dargestellt. Dieser Bereich zwischen den Absorptionsbändern des Sensitizers wird Transparenz-Fenster genannt (nicht zu verwechseln mit dem optischen Fenster von menschlichem Gewebe).

Ebenso wichtig ist, dass im Bereich des Q-Bandes keinerlei Absorption des Emitters stattfindet. Damit ist gewährleistet, dass die gemessene Lumineszenz nur durch TTA-UC zustande kommt (über Anregung des Sensitizers) und nicht durch direkte Fluoreszenz des Emitters nach Anregung im roten Bereich.

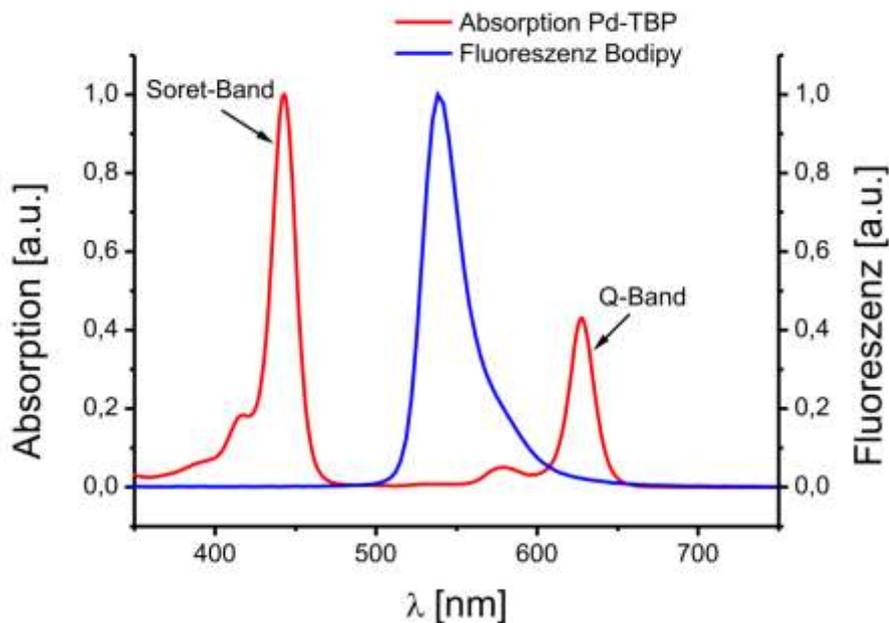


Abbildung 2.13: Absorptionsspektrum eines Sensitizers (Pd-TBP) und Emissionsspektrum des zugehörigen Emitters (Bodipy). Das Soret- und Q-Band im Absorptionsspektrum des Sensitizers sind zusätzlich markiert. Im Transparenzfenster des Sensitizers befindet sich die Fluoreszenz des Emitters.

Abschließend soll kurz auf den natürlichen Energieverlust des TTA-UC-Prozesses eingegangen werden. Dieser natürliche Verlust stammt von der strahlungslosen Relaxation der Schwingungsenergieniveaus innerhalb angeregter Zustände, welche nach jedem Übergang in einen neuen angeregten Zustand stattfindet. Dieser natürliche Energieverlust kann durch Vergleiche mit der natürlichen Phosphoreszenz oder Fluoreszenz der verwendeten Moleküle abgeschätzt werden. Auf Grund dieses natürlichen Energieverlustes durch strahlungslose Relaxation entspricht die resultierende Energie der UC-Fluoreszenz nicht dem doppelten Wert der eingestrahnten Energie.^[15]

2.4.1.2 Charakteristika der TTA-UC

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, erlebte der Prozess der TTA-UC vor ca. zehn Jahren eine Art Wiedergeburt. Daher wurden in den letzten 10 Jahren die Theorie des Prozesses ständig weiterentwickelt. In diesem Abschnitt werden verschiedene Eigenschaften des TTA-Prozess vorgestellt.

Sauerstoff als Quencher

Ein Problem des TTA-UC-Prozess ist, dass Sauerstoff in seiner Form des Triplettzustandes als Quencher des Gesamtprozesses fungiert. Befindet sich Sauerstoff im System der TTA-UC, wird die Energie aus dem Triplettzustand des Sensitizer auf den Sauerstoff übertragen, der dadurch vom Triplettzustand in den Singulettzustand angehoben wird. Durch diesen quenchenden Prozess kann die TTA-UC nur unter sauerstofffreien Bedingungen ablaufen. Dieser Prozess wird in Abbildung 2.14 oder mit Gleichung (2.9) beschrieben:



- Mit ${}^3S / {}^3E$ = Triplettzustand von Sensitizer/Emitter
 3O_2 = Triplettzustand von Sauerstoff
 ${}^0S / {}^0E$ = Grundzustand von Sensitizer/Emitter
 1O_2 = Singulettzustand von Sauerstoff

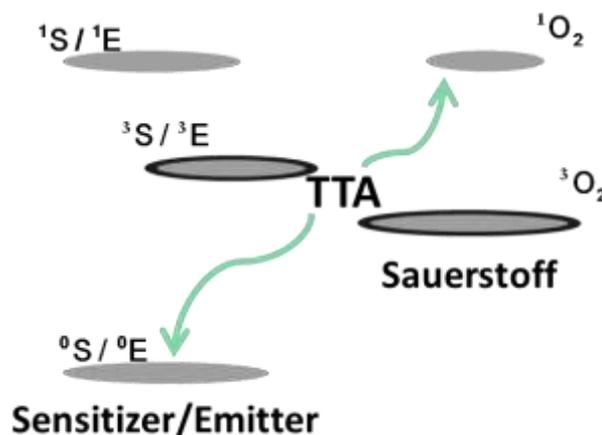


Abbildung 2.14: Energieverlauf, wenn Sauerstoff im System vorhanden ist. Es findet eine TTA zwischen dem Triplettzustand des Sensitizer oder des Emitters statt. Dabei wird der Sauerstoff in den angeregten Singulettzustand angehoben und der Sensitizer/Emitter strahlungslos in den Grundzustand relaxiert.

Quantenausbeute

Die Quantenausbeute (η) beschreibt die Effizienz von optischen Prozessen wie beispielsweise der Fluoreszenz. Sie ist definiert als das Verhältnis zwischen den angeregten und emittierten Photonen eines Prozesses und kann einen maximalen Wert von $\eta = 1$ (entspricht einem Wert von 100%) erreichen. Beim Prozess der TTA-UC ist die Berechnung der Quantenausbeute ein Mittel, um die Effizienz des Prozesses zu bestimmen und somit eine Einteilung für mögliche Anwendungen zu schaffen. Das Modell der Quantenberechnung eines Einkomponentensystems (keine Zwischenprozesse zwischen Absorption und Fluoreszenz) lässt sich jedoch nicht einfach auf ein Multikomponentensystem (mehrere Prozesse sind beteiligt wie ISC, TTT und TTA), wie bei der TTA-UC benötigt, übertragen. Insgesamt kann man die Quantenausbeute des Gesamtprozess η_{UC} in vier einzelne Prozesse unterteilen (Gleichung (2.10)). Da bei dem Gesamtprozess der TTA-UC aus zwei Photonen ein Photon entsteht, muss die Quantenausbeute des Gesamtprozesses durch den Faktor zwei geteilt werden:

$$\eta_{UC} = \frac{1}{2} \cdot \eta_{ISC} \cdot \eta_{TTT} \cdot \eta_{TTA} \cdot \eta_F \quad (2.10)$$

Mit η_{UC} = Quantenausbeute UC
 η_{ISC} = Effizienz ISC-Prozess
 η_{TTT} = Effizienz TTT-Prozess
 η_{TTA} = Effizienz TTA-Prozess
 η_F = Effizienz Fluoreszenz vom Emitter

Aus diesem Grund wurde für das System der TTA-UC eine Vereinfachung eingeführt (Abbildung 2.15). Das System der TTA-UC wurde auf ein Einkomponentensystem reduziert (TTA-UC „Black-Box“) und die Zahl der vom Sensitizer absorbierten Photonen mit der Zahl der vom Emitter ausgestrahlten Photonen verglichen. Alle weiteren Prozesse dazwischen (ISC, TTT und TTA) wurden unter der „Black-Box“ zusammengefasst.

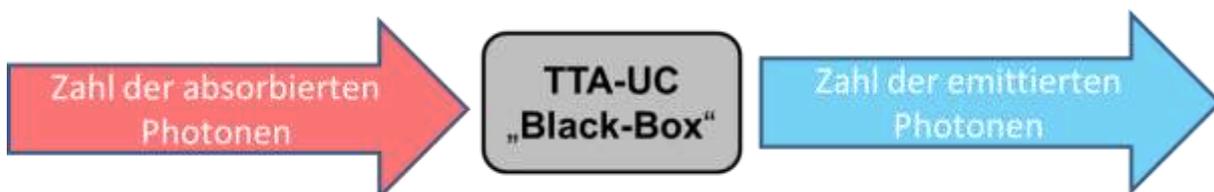


Abbildung 2.15: Modell zur Bestimmung der Quantenausbeute der TTA-UC.

$$\eta_x = \eta_R \frac{P_x \cdot h\nu_x \cdot n_x^2 \cdot I_R \cdot A_R}{P_R \cdot h\nu_R \cdot n_R^2 \cdot I_x \cdot A_x} \quad (2.11)$$

- Mit η = Quantenausbeute
 P = Integral UC-Emission
 $h\nu$ = Energie Anregungsphotonen [eV]
 n = Brechungsindex
 I = Intensität Anregungslicht [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]
 A = Absorption der Lösung bei der Anregungswellenlänge

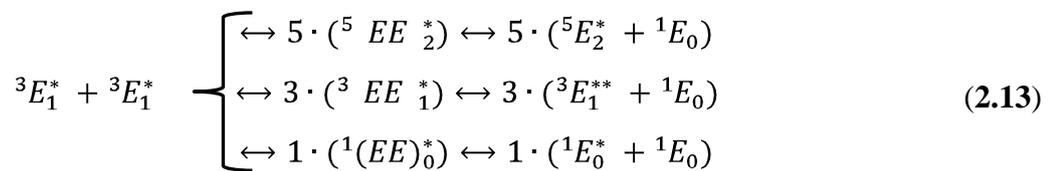
Die Bestimmung der Quantenausbeute wird schließlich mittels relativer Aktinometrie durchgeführt. Dies ist eine Standardmethode zur Bestimmung von Quantenausbeuten, bei der eine Referenzprobe bei denselben experimentellen Bedingungen untersucht wird wie die eigentliche Probe.^[122] Durch den Vergleich und unter Verwendung der Gleichung (2.11) kann die Quanteneffizienz berechnet werden. Der Index x steht für das zu untersuchende UC-System, der Index R für die Referenzprobe.

Für eine theoretische Berechnung der maximalen Quantenausbeute wird Formel (2.10) verwendet, welche sich aus den Effizienzen der einzelnen Teilprozesse (ISC, TTT, TTA und Fluoreszenz des Emitters) zusammensetzt. Auf Grund der Grundvoraussetzungen für Sensitizer und Emitter liegen die Effizienzen der Prozesse des ISC und der Emitterfluoreszenz nahezu bei eins. Die Effizienz des TTT kann theoretisch ebenfalls einen Wert von eins erreichen, was bedeutet, dass es keine obere Grenze für diesen Ablauf gibt. Ein Indikator für die Effizienz des TTT ist die gemessene Phosphoreszenz vom Sensitizer. Die Phosphoreszenz findet nur dann statt, wenn die Energie nicht auf den Emitter übertragen wird. Somit ist der TTT abhängig von vielen Faktoren, wie beispielsweise der Konzentration von Emitter und Sensitizer, der Diffusion der Farbstoffe im Medium und der Energie der Triplettzustände von Sensitizer und Emitter. Wichtig ist jedoch, dass eine Effizienz von 100% erreicht werden kann, wenn alle Faktoren stimmen. Die Geschwindigkeitskonstante k_{TTT} des TTT kann mit Hilfe der Stern-Vollmer-Gleichung (2.12) berechnet werden. Dazu wird die die Intensität der Phosphoreszenz des Sensitizers bei steigender Emitterkonzentration beobachtet und durch Auftragung und mit Hilfe der Gleichung (2.12) der Wert von k_{TTT} berechnet:

$$\frac{I}{I_0} = 1 + K_{SV} E, \quad K_{SV} = k_{TTT} \cdot \tau_0 \quad (2.12)$$

- mit I = Intensität der Phosphoreszenz
 I_0 = Intensität der Phosphoreszenz zum Zeitpunkt τ_0
 $[E]$ = Konzentration des Emitters [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]
 k_{TTT} = Geschwindigkeitskonstante des TTT
 τ_0 = Lebensdauer des Triplettzustandes des Sensitizers [s]

Im Folgenden wird die Effizienz des TTA –Prozess η_{TTA} näher beschrieben. Beim Prozess der TTA existiert ein Grenzwert für die Effizienz, der durch Spin-statistische Faktoren in diffusionskontrollierten Reaktionen bestimmt wird.^[123] Diese sagen aus, dass, wenn zwei Moleküle ${}^m\text{A}$ und ${}^n\text{B}$ mit den Spinzuständen n und m über Diffusion zusammenstoßen, das Produkt der Spinzustände ($m \cdot n$) die mögliche Anzahl der Stoßpaare ergibt. Dies entspricht im Falle des TTA-Mechanismus, bei dem zwei angeregte Triplettzustände ${}^3\text{E}_1^*$ zusammenstoßen, einer Entstehung von neun unterschiedlichen „Stoßpaaren“ (EE) mit verschiedenen Spinzuständen. Alle Stoßpaare werden mit derselben Wahrscheinlichkeit gebildet. Diese Stoßpaare sind in drei Untergruppen (mit unterschiedlicher Spinquantenzahl) aufgeteilt, welche sich mittels der Glebsch-Gordon-Reihe ermitteln lassen. Dabei befinden sich fünf Stoßpaare im Quintett ($S = 2, M = 2S+1$), drei im Triplett ($S = 1$) und eines im Singulett ($S = 0$) (Gleichung (2.13)). Nur aus einem dieser neun Stoßpaare, dem im Singulettzustand, kann der erste angeregte Singulettzustand des Emitters (${}^1\text{E}_0^*$) erreicht werden. Da dieses Stoßpaar mit der gleichen Wahrscheinlichkeit resultiert wie die anderen acht, liegt die Wahrscheinlichkeit des Prozesses bei $1/9$, was wiederum $11,1\%$ ^[106] entspricht. Es gilt:



- mit E = Emitter
 $*$ = angeregter Zustand
 Index oben links = Spinmultiplizität
 Index unten rechts = Spinquantenzahl (Untergruppen) ($S = 0, 1, 2$)

Diese 11,1% wurden zunächst als oberes Limit für die Effizienz des TTA-Prozess angesehen. Kurze Zeit danach (2010) wurde von Schmidt et al. 2010 das Limit experimentell überschritten und zusätzlich eine theoretische Erklärung für den höheren Grenzwert geliefert.^[124] Dabei wurde das theoretische Modell (2.13) genauer untersucht und festgestellt, dass die Stoßpaare im Quintettzustand zwar auftreten, jedoch die resultierenden Quintettzustände ($^5E_2^*$) eines einzelnen Emitters, auf Grund zu großer benötigter aber nicht vorhandener Energien, nicht auftreten können. Somit zerfallen alle Stoßpaare im Quintettzustand wieder zurück in ihre Edukte, nämlich den zwei Emittern im angeregten Tripletzustand ($^3E_1^*$). Die Zustände im Quintett werden somit nicht weiter berücksichtigt und aus der Wahrscheinlichkeitsrechnung ausgeschlossen.

Aus den Stoßpaaren im Tripletzustand kann der Zerfall zu einem Emitter im zweiten angeregten Tripletzustand ($^3E_1^{**}$) und einen Emitter im Grundzustand (0E_1) durchaus erfolgen. Aus dem zweiten angeregten Tripletzustand ($^3E_1^{**}$) erfolgt aber üblicherweise im Anschluss eine Relaxation zum ersten angeregten Tripletzustand ($^3E_1^*$), welcher somit erneut am Gesamtprozess teilnehmen kann. Es geht folglich nur einer der Tripletzustände aus jedem Stoßpaar verloren. Somit wurde ein neues theoretisches Limit von 40% für die Effizienz des TTA-Prozess berechnet.

Bezieht man dabei die Reversibilität (Rückreaktion) der Stoßpaare zu ihren Ausgangsprodukten mit ein, so vergrößert sich die Wahrscheinlichkeitsrechnung auf Werte zwischen den 40% und der maximalen Ausbeute von 100%. Die Rückreaktion der Stoßpaare ist von der Energie der zu bildenden Produkte und somit von der Art des Emitters selbst abhängig. Man kann damit mit einer Obergrenze der Effizienz von TTA zwischen 40% und 100% rechnen $0,4 \leq \eta_{TTA} < 1$. Schließlich muss mit eingerechnet werden, dass beim TTA-Prozess aus zwei Photonen nur ein Photon entsteht, weshalb maximal 50% Ausbeute erzielt werden kann. Deshalb müssen die errechneten Wahrscheinlichkeiten durch den Faktor zwei geteilt werden. Somit wurde ein theoretisches Limit für die Quantenausbeute des Prozesses der TTA von $20\% \leq \eta_{TTA} < 50\%$ errechnet.

Betrachtet man die Gesamtgleichung für die Quantenausbeute des Gesamtprozess (2.10) und nimmt eine Effizienz von 100% für ISC, TTT und Emitterfluoreszenz an, so ist der TTA-Prozess mit 20-50% Effizienz der limitierende Faktor der Gesamtausbeute (η_{UC}). Diese Zahlen können jedoch nur erreicht werden, wenn Zerfallsprozesse der ersten Ordnung der Tripletzustände vernachlässigt werden. Insgesamt lässt sich der Zerfallsprozess der Tripletzustände der Emitter durch folgendes Geschwindigkeitsgesetz (2.14) ausdrücken^[123, 125]. Dabei wird angenommen, dass die Farbstoffe sich in Lösung befinden, die Anregung mit

einem gepulsten Laser stattfindet und alle Prozesse wie der ISC und TTT sehr schnell ablaufen und sich damit die Energie bereits nach extrem kurzer Zeit im angeregten Tripletts des Emitters befindet ($^3E^*$). Durch diese Annahmen werden nur die zwei Zerfallsprozesse für die Emittermoleküle im Triplettszustand in der Gleichung berücksichtigt. Der Zerfallsprozess erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante k_1 , tritt bei der TTA-UC als unerwünschter, effizienzminimierender Nebenprozess auf. Das Molekül relaxiert dabei entweder strahlungslos oder durch Ausstrahlung von Phosphoreszenz in den Grundzustand. Der Zerfallsprozess der zweiten Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 stellt den TTA-Prozess dar (alle Möglichkeiten aus Gleichung (2.13)), bei der zwei angeregte Emitter nötig sind (deshalb quadratisch und somit zweiter Ordnung). Aus dem Prozess der TTA resultiert dann schließlich der angeregte Singulettzustand des Emitters, aus welchem die verzögerte Fluoreszenz zu beobachten ist:

$$\frac{d[{}^3E_1^*]}{dt} = -k_1[{}^3E_1^*]_t - k_2[{}^3E_1^*]_t^2 \quad (2.14)$$

- mit
- $[{}^3E_1^*]$ = Konzentration der Emitter im Triplettszustand [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
 - t = Zeit [s]
 - k_1 = Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls der ersten Ordnung
 - k_2 = Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls der zweiten Ordnung

Abhängigkeit von der Anregungsintensität

Für den ursprünglichen Prozess der TTA-UC wurde von Hatchard und Parker^[126] eine quadratische Abhängigkeit der UC-Fluoreszenz von der eingestrahlten Anregungsintensität festgestellt. Balushev et al. haben, entgegen dieser „klassischen“ Darstellung, eine sublineare Abhängigkeit der TTA-UC-Fluoreszenz über einen gewissen Bereich nachgewiesen.^[14] Diese sublineare Abhängigkeit der TTA-UC, nachgewiesen über mehrere Größenordnungen der Anregungsintensität, ermöglicht eine einfache Kontrolle der UC-Emission durch Variation der Anregungsintensität. Der Bereich der linearen Abhängigkeit einer Probe ist bei jedem UC-Farbstoffpaar unterschiedlich und zudem von den jeweiligen experimentellen Bedingungen (Konzentration der Farbstoffe, Temperatur, Viskosität des Mediums) abhängig. Zur Bestimmung der Abhängigkeit wird die variierte Anregungsintensität über mehrere Größenordnungen gegen die UC-Fluoreszenz (Integral) aufgetragen. Die Abhängigkeit (linear oder quadratisch) wird mit Hilfe eines Potenzgesetzes näherungsweise bestimmt (Gleichung

(2.15)). Der Wert des Exponenten b spiegelt die Abhängigkeit der UC-Emission in einem bestimmten Anregungsbereich wieder. Bei Werten im Bereich von $b \approx 1$ ist die Abhängigkeit linear, bei Werten von $b \approx 2$ quadratisch. Es gilt:

$$P_{UC} = a * I_{exc}^b \quad (2.15)$$

mit P_{UC} = Integral UC-Emission [cps]

I_{exc} = Anregungsintensität [$\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$]

a, b = freie Variablen

Von Monguzzi wurde nachgewiesen, dass die gemessene UC-Fluoreszenz je nach der Stärke der Anregungsintensität linear oder quadratisch abhängig ist.^[127] Dazu wird die Abhängigkeit der Intensität der UC-Fluoreszenz von der Anregungsintensität mit Gleichung (2.14) verknüpft^[11, 128, 129]. Wenn der Prozess der ersten Ordnung überwiegt ($k_1 > k_2$), d.h. wenn nur wenige angeregte Tripletzustände (geringe Konzentration) vorhanden sind, was beispielsweise bei zu geringen Anregungsintensitäten (oder zu geringen Sensitizerkonzentrationen) der Fall ist, resultiert eine quadratische Abhängigkeit der UC-Fluoreszenz von der Anregungsintensität. Wird aber dann eine Grenze ($k_1 = k_2$) der Anregungsintensität überschritten, d.h. sind, relativ zu den nicht angeregten Zuständen, viele angeregte Tripletzustände (hohe Konzentration) vorhanden, verläuft die Abhängigkeit der UC-Fluoreszenz linear. Damit überwiegt der Prozess der zweiten Ordnung ($k_2 > k_1$) gegenüber der ersten Ordnung und die UC-Fluoreszenz folgt einer linearen Abhängigkeit von der Anregungsintensität.

Medium für UC

Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurde effiziente TTA-UC in unterschiedlichen Medien beobachtet. Ursprünglich wurde die TTA-UC von Parker und Hatchard in Ethanol^[100] entdeckt und selbst heutzutage sind organische Lösungsmittel wie Toluol, Benzol, Chloroform oder Dichlormethan das effizienteste Medium für TTA-UC.^[20, 130-135] Das Problem bei der Verwendung der organischen Lösungsmittel sind die dadurch stark begrenzten Anwendungsmöglichkeiten. Auf Grund ihrer toxischen Eigenschaften, eignen sie sich beispielsweise nicht für biologische Anwendungen. Selbst im Solarzellenbereich können organische Lösungen nicht genutzt werden. Aus diesem Mangel an potentiellen Anwendungen wurde versucht, das organische Lösungsmittel als Medium zu ersetzen. Diese

Übertragung der TTA-UC in ein festes Medium gelang in den letzten Jahren verschiedenen Gruppen. 2003 wurde zum ersten Mal TTA-UC in einem festen Polymerfilm nachgewiesen.^[105] Dabei wurde das Polymer selbst, bestehend aus Polyfluoren, als Emitter verwendet, während im Film dotiertes, metalliertes Porphyrin als Sensitizer fungierte. Weitere als Emitter einsetzbare Polymere sind leiterartig aufgebautes Polypentaphenylen^[136] und ein Copolymer aus Polyspirobifluoren-*co*-polyanthrazen,^[137] welche beide mit einem metallierten Porphyrin als Sensitizer dotiert wurden.

Polymere als Trägermaterial für Sensitizer und Emitter wurden erstmals 2007 eingesetzt. Dabei wurde ein Copolymer aus Polyethylenoxid-*co*-polyepichlorhydrin^[138] mit niedriger Glasübergangstemperatur (T_g) als Trägermaterial für Pd-OEP und Diphenylanthrazen verwendet. Weitere als Trägermaterialien eingesetzte Polymere sind verschiedene Polyurethane,^[139, 140] Polyethylenglycol,^[141] PMMA^[13] und Zelluloseacetat^[142]. All diese eingesetzten Polymere weisen einen niedrigen T_g auf, der den eingebetteten UC- Farbstoffen eine geringe Beweglichkeit (Diffusion) ermöglicht (bei $T > T_g$) und somit Energieübertragung und TTA-UC ermöglicht. Jedoch ist die Effizienz durch die nur geringe Diffusion in diesen verarbeiteten Polymeren, mit einer Ausnahme^[140], nicht besonders hoch. Diese festen oder „pseudo“ festen ($T > T_g$) Polymerträger eignen sich beispielsweise für Anwendungen im Photovoltaikbereich, müssen aber in ihren Materialeigenschaften und der TTA-UC-Effizienz verbessert werden.

Für biologische Anwendungen dagegen muss ein Transfer der TTA-UC vom organischen Medium in ein wässriges Medium erfolgen. Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit im Jahre 2010 wurde dieser Übergang ins wässrige Medium in der Literatur noch nicht beschrieben. Somit ist die im Jahre 2009 angefertigte Diplomarbeit,^[21] teilweise veröffentlicht im Jahre 2011,^[110] der erste erfolgreich durchgeführte Versuch der Überführung der TTA-UC in wässriges Medium. In den letzten zwei Jahren gab es dann einige Publikationen, die ebenfalls einen Transfer der TTA-UC ins wässrige Medium beschreiben. Da bis heute keine TTA-UC mit wasserlöslichen Farbstoffen nachgewiesen wurde, ist die Verwendung von in Wasser dispergierten Trägersystemen mit eingebetteten UC-Farbstoffen der einfachste Weg, diesen Transfer zu realisieren. Diese Systeme werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

2.4.2 TTA-UC in Nano-Trägersystemen dispergiert in Wasser

Die Verwendung von Nano-Trägersystemen eignet sich besonders für den erfolgreichen Transfer der TTA-UC vom organischen ins wässrige Medium. Mit Hilfe dieses Transfers ist

der Weg für biologische Anwendungsmöglichkeiten geebnet. Neben der TTA-UC werden auch andere UC-Arten in solchen Nanosystemen verwendet. Besonders der Prozess der ETU mit Seltenerdionen dotierten Festkörpern findet zahlreiche Anwendungen in Nanopartikeln, welche bereits in einem Übersichtsartikel^[143] zusammengefasst wurden. Die Nachteile der darin verwendeten Art der UC (ETU) gegenüber der hier verwendeten TTA-UC wurden bereits in Abschnitt 2.4.1 ausführlich dargestellt, weshalb im Folgenden nur auf die Systeme mit TTA-UC eingegangen wird.

Neben den hier verwendeten in Wasser dispergierten Nanokapseln wurden auch andere Nano-Trägersysteme für die TTA-UC entwickelt. Tanaka hat bereits 2010 TTA-UC in Dendrimerkomplexen, gelöst in wässrig-organischer Lösung (10% DMSO, 1% THF, 89% Wasser), nachgewiesen.^[144] In reinem Wasser wurden 2011 von Turshatov et al. Mizellen als Trägersystem für die TTA-UC genutzt.^[145] Dabei wurde Polyoxyethanyl- α -tocopherylsebacin (PTS) als Tensid verwendet und die UC-Farbstoffe wurden im Kern der Mizellen eingelagert. Ein ähnliches System wurde 2012 von Li^[146] vorgestellt, bei dem ebenfalls zunächst Mizellen als Trägersystem verwendet wurden. Nach der Einlagerung der Farbstoffe in Mizellen aus Pluronic F127 (Blockcopolymer) wurde eine SiO₂-Schale um die Mizellen aufgebaut. Durch diese zusätzliche anorganische SiO₂-Schale werden aus den ursprünglichen Mizellen feste, in Wasser dispergierte Nanopartikel. Ebenfalls Nanopartikel, diesmal aber aus organischen Polymeren wurden ebenfalls erstmals 2012 hergestellt. Simon et al. demonstrierte TTA-UC in tensidfreien quervernetzten Nanopartikeln aus Poly-n-butylacrylat mit Divinylbenzol (DVB) als Quervernetzer.^[147] Hier wurde ein Polymer mit niedrigem T_g verwendet, um die notwendige Diffusion der Farbstoffe im Polymer zu gewährleisten. Monguzzi et al. hingegen zeigt TTA-UC in Nanopartikeln aus Polystyrol.^[148] Die Verwendung von Polystyrol als Trägermaterial (im Bulk) für TTA-UC war auf Grund zu geringer Diffusion der Farbstoffe bis dahin nicht möglich, wird aber hier vermutlich durch die geringen Partikelgröße von ca. 25 nm und der daraus resultierenden räumlichen Nähe der Farbstoffe zueinander ermöglicht.

Mit der Ausnahme der Mizellen aus PTS verwenden alle anderen dargestellten Trägersysteme für TTA-UC nur Farbstoffe bzw. Sensitizer, welche im grünen Bereich des sichtbaren Spektrums angeregt werden. Um die hier aufgeführten Nano-Trägersysteme jedoch für biologische Anwendungen interessant zu machen, sollten die verwendeten Anregungswellenlängen mit dem optischen Fenster von menschlichem Gewebe überlappen, um hohe Eindringtiefen der Anregungsquellen zu ermöglichen.

3 Charakterisierungsmethoden

3.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Dynamische Lichtstreuung^[149] (DLS) oder auch Photonenkorrelationsspektroskopie genannt, ist ein Standardverfahren zur Messung von mittleren Teilchengrößen und deren Verteilungen innerhalb kolloidaler Systeme.^[150] Das grundlegenden Prinzipien dieser Methode sind zum einen der Doppler-Effekt und zum anderen die Brownsche Molekularbewegung.^[151] Der Doppler-Effekt bezeichnet die Fluktuation einer messbaren Frequenz (Wellen) bei einer relativen Bewegung von Strahlungsquelle und Detektor zueinander. Bei der dynamischen Lichtstreuung wird mit einem Laser kohärentes und monochromatisches Licht auf eine verdünnte Dispersion eingestrahlt. Der Laserstrahl wird an Teilchengrößen im Nanometer bis Mikrometerbereich gestreut. Durch die Brownsche Molekularbewegung in der Dispersion findet eine, in alle Raumrichtungen ungeordnete, Bewegung der Streuzentren (Teilchen) statt. Diese Bewegung ist der Grund für den auftretenden Doppler-Effekt. Das vom Detektor gemessene Streulicht unterliegt, durch die eben beschriebenen Effekte, einer Frequenzverschiebung und somit einer Schwankung der Intensität. Diese Intensitätsschwankungen stehen mit der Bewegungsgeschwindigkeit der Teilchen und folglich mit der Teilchengröße im Zusammenhang. Große Teilchen diffundieren langsamer, und haben somit geringere Intensitätsschwankungen zur Folge als kleinere Partikel. Innere Schwingungen und Rotationen der Streuzentren werden auf Grund ihrer hohen Geschwindigkeit vernachlässigt. Diese Intensitätsschwankungen des Streulichtes werden mit einem Photomultiplier über einen bestimmten Zeitraum aufgezeichnet und mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion (3.1) dargestellt.^[152] Es gilt:

$$g(t) = P \cdot e^{-q^2 \cdot D \cdot t} \quad (3.1)$$

Mit P = Präexponentieller Faktor

q = Streulichtvektor

D = Diffusionskoeffizient [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]

t = Zeit [s]

Der Diffusionskoeffizient D , erhalten aus Gleichung (3.1), hängt über die Stokes-Einstein-Beziehung (3.2) mit dem hydrodynamischen Radius zusammen, welcher dann schließlich Auskunft über die Teilchengröße liefert:

$$r_H = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta D} \quad (3.2)$$

Mit r_H = hydrodynamischer Radius [m]
 η = dynamische Viskosität [Pa·s]
 D = Diffusionskoeffizient [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]
 k_B = Boltzmannkonstante $1,38 \cdot 10^{-23}$ [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$]
 T = Temperatur [K].

3.2 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Durch das Abbe-Limit ist die Auflösungsgrenze von konventionellen Lichtmikroskopen auf 200 nm beschränkt. Die Gleichung von Abbe (3.3) beschreibt die Abhängigkeit der Auflösungsgrenze von der verwendeten Wellenlänge des Lichtes:

$$d_A = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin\alpha} \quad (3.3)$$

Mit d_A = Auflösungsgrenze [m]
 λ = Wellenlänge des Lichtes [m]
 n = Brechungsindex
 α = Öffnungswinkel der Apparatur

Um diese Auflösungsgrenze^[153] zu unterschreiten, kann beispielsweise die relativ neue Technologie der STED-Mikroskopie (engl. Stimulated Emission Depletion, Stimulierte Unterdrückung der Emission) verwendet werden. Sie wurde von Stefan Hell 1994 theoretisch^[154] entwickelt und 2001 experimentell^[155] nachgewiesen. In dieser Arbeit soll jedoch der Weg der Elektronenmikroskopie,^[156] hauptsächlich der Transmissionselektronenmikroskopie^[157] gewählt werden. Durch die Verwendung von Elektronen als „Licht“, welche eine im Vergleich zum sichtbaren Licht deutlich kürzere Wellenlänge aufweisen, wird die Auflösungsgrenze im besten Fall bis in den Subnanometerbereich hinein verringert. Die

Elektronen werden an einer Kathode thermisch erzeugt und durch die Anode mit 50-200 kV (Beschleunigungsspannung) in Richtung Probe beschleunigt. Mit Hilfe elektromagnetischer Linsen wird der Elektronenstrahl auf der Probe fixiert. Beim Durchdringen der Probe werden die Elektronen an dieser gestreut, gehen verloren und erzeugen somit ein Negativbild. An hohen Ordnungszahlen der Atome und größeren Strukturen erfahren die Elektronen eine stärkere Ablenkung und liefern somit einen besseren Kontrast (Teil der Probe erscheint dunkel). Die transmittierten Elektronen werden mittels Objektiv- und Projektorlinsen auf einen fluoreszierenden Bildschirm gelenkt. Dort kann das Negativbild der Probe entweder direkt beobachtet werden oder es wird mittels Kamera aufgenommen. Ein schematischer Aufbau des TEM ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Im ganzen Aufbau herrscht ein Hochvakuum, um Absorption durch Glasteilchen oder andere Ablenkung zu vermeiden. Bei der Probenpräparation sollte eine gewisse Schichtdicke (100 nm) nicht überschritten werden, um eine Transmission der Elektronen durch die Probe zu gewährleisten.

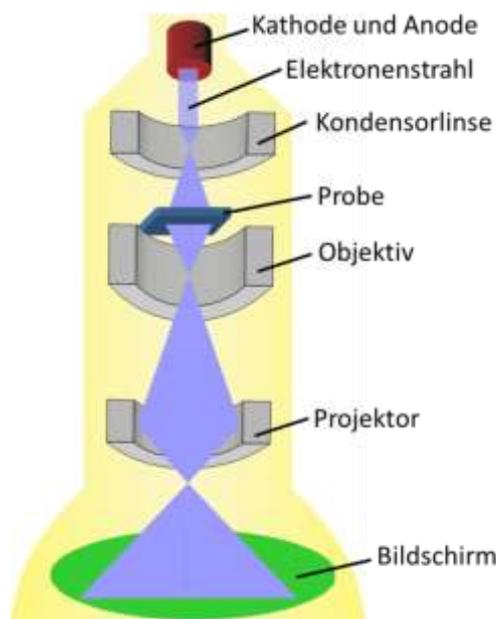


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops.

Zur Verbesserung des Kontrastes und zur besseren Stabilisierung der Probe gegen den Elektronenstrahl wurde bei einigen Proben ein zusätzlicher Kohlefilm aufgedampft. Die Methode der Transmissionselektronenmikroskopie wird hauptsächlich zur Erfassung der Größe und Morphologie der Teilchen angewandt.

3.3 UV-VIS-Spektroskopie

Bei der UV-VIS-Spektroskopie wird die Absorption von Farbstoffen im Ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Bereich des Spektrums untersucht. Ein schematischer Aufbau des verwendeten UV-VIS-Spektrometers ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Als Strahlungsquelle im sichtbaren Bereich diente eine Wolframhalogenlampe, im UV-Bereich wurden Deuterium-Entladungslampen verwendet. Mit Hilfe des Monochromators, bestehend aus einem Prisma oder einem Beugungsgitter, wird monochromatische Strahlung erzeugt. Die monochromatische Strahlung trifft auf die Probe und wird teilweise absorbiert. Die restliche Strahlung wird von einer Photodiode (Detektor) in ein elektrisches Signal umgewandelt, verstärkt und an einen PC zur Auswertung weitergeleitet. Als Referenzprobe wird das reine Lösungsmittel ohne Farbstoff verwendet. Die Absorption der Farbstofflösung ergibt sich somit aus der Differenz der beiden Lösungen.

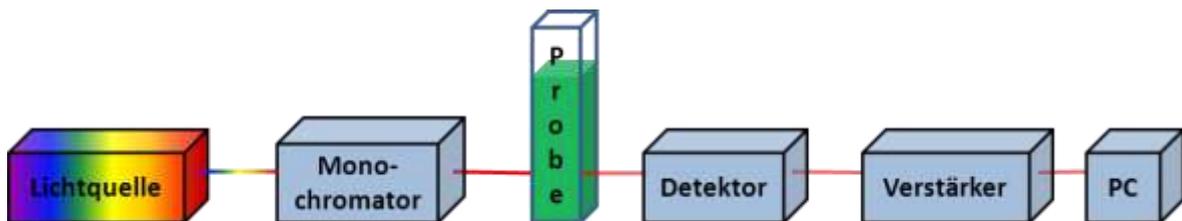


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau UV-VIS-Spektrometer.

Die Absorption der Farbstofflösung beruht auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes (3.4)^[158] und hängt somit von verschiedenen Faktoren ab:

$$A = \lg \frac{I}{I_0} = b \cdot c \cdot \varepsilon \quad (3.4)$$

- Mit
- b = Breite der Probe [m]
 - c = Konzentration der Probenlösung [mol·L⁻¹]
 - ε = molarer Absorptionskoeffizient [m²·mol⁻¹]
 - I = Intensität (Lichtstrahl) nach der Probe [W·m⁻²]
 - I_0 = Intensität (Lichtstrahl) vor der Probe [W·m⁻²]
 - A = Absorption

3.4 Konfokales Laser-Raster-Mikroskop (cLSM)

Das konfokale Laser-Raster-Mikroskop^[159] (engl. Confocal Laser Scanning Microscope, cLSM) unterscheidet sich vom gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskop in der Aufnahmetechnik der Bilder. Während beim Fluoreszenzmikroskop das gesamte Präparat bestrahlt und dessen Emission gemessen wird, findet beim cLSM die Anregung nur mit einem beugungsbegrenztem Lichtpunkt eines Lasers statt. Dadurch wird die Emission nur von diesem, durch den Laser angeregten, Teil der Probe detektiert. Um ein Bild der gesamten Probe zu erhalten, wird diese mit dem Laser Schritt für Schritt abgerastert und schließlich zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Um Streulicht aus anderen Ebenen auszuschließen, wird eine Lochblende (engl. Pinhole) verwendet. Durch diese Lochblende gelangt nur die Emission aus der Fokusebene zum Detektor (siehe Abbildung 3.3). Mittels dieses konfokalen Prinzips, eingeführt von Minsky im Jahre 1957,^[160] können optische Schnitte (in der Z-Ebene) einer Probe durchgeführt werden. Dies ermöglicht die Aufnahme eines 3D-Bildes (Zusammenfügung mehrerer Schnitte) und somit eine genaue Lokalisierung der gemessenen Fluoreszenz.^[161] Mit dem cLSM ist eine Auflösung von bis zu 200 nm in XY-Richtung (lateral) und 400 nm in Z-Richtung (axial) möglich.

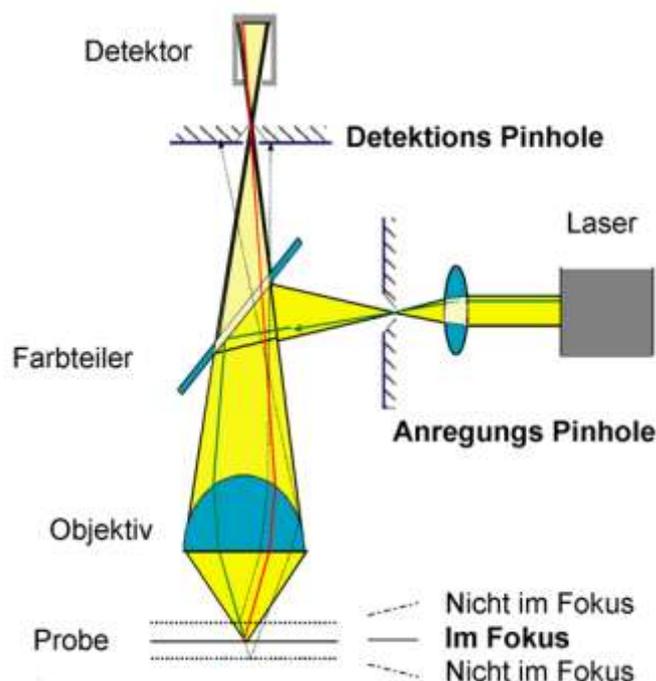


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines cLSM.^[162] Nur Emissionslicht aus der Fokusebene gelangt durch das Detektionspinhole zum Detektor. Licht aus anderen Ebenen (außerhalb des Fokus, gestrichelte Linien) hingegen gelangt nicht durch das Pinhole und somit nicht zum Detektor.

Um die Fluoreszenz der Probe zu detektieren, sind vor dem Detektor verschiedene schaltbare Emissionsfilter eingebaut. Diese ermöglichen eine selektive Auswahl der gewünschten Wellenlängen. Als Detektor wird entweder ein leicht einstellbarer Photonenvervielfacher (engl. Photomultiplier tube, PMT) oder eine empfindlichere Lawinenphotodiode (engl. Avalanche Photo Diode, APD) verwendet. Das cLSM wurde dazu verwendet, um TTA-UC in Zellen zu untersuchen.

3.5 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie, 1979 patentiert und entwickelt von Göhde,^[163] ermöglicht eine Analyse der Fluoreszenz, Granularität und Größe von Zellen oder Teilchen ähnlicher Größenordnung. Im Folgenden wird diese Methode oft als FACS (engl. Fluorescence activated cell sorting) bezeichnet. In Abbildung 3.4 ist ein schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers dargestellt. Bei der Durchflusszytometrie wird ein kontinuierlicher Strom der zu untersuchenden Probe durch eine Messkapillare geleitet.

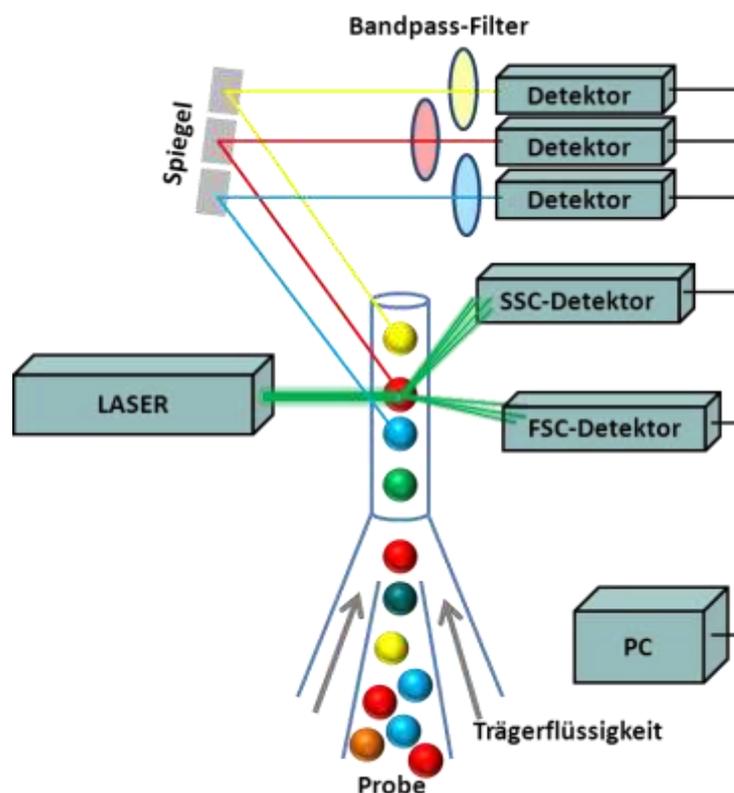


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometer.

Die direkt aufeinanderfolgenden einzelnen Untersuchungsobjekte werden dort zum einen von einem Laser angeregt, zum anderen wird das Laserlicht am Objekt gestreut. Durch die Messung der Vorwärtsstreuung (engl. Forward scattering, FFC) im Winkel von 20° können Rückschlüsse auf die Größe der Objekte gezogen werden. Die Analyse der Seitwärtsstreuung (engl. Sideward scattering, SSC), gemessen bei einem Winkel von 90° , gibt Auskunft über die Granularität. Die Fluoreszenz der Objekte wird mittels Spiegel und Filter auf unterschiedliche Detektoren verteilt, wodurch die gleichzeitige Detektion mehrerer Wellenlängen möglich ist. Die Detektoren sind PMTs und wandeln die Intensität der Fluoreszenz in ein elektrisches Signal um und leiten es an einen PC weiter, an dem die Auswertung erfolgt. Durch die hohe Durchflussrate der Zellen (bis zu 2000 Objekte pro Sekunde) kann in kurzer Zeit ein quantitativer Überblick erhalten werden. Jedoch kann beispielsweise nicht festgestellt werden, ob Nanokapseln tatsächlich in Zellen aufgenommen werden oder ob sie nur äußerlich anhaften. Dazu ist eine Untersuchung mit dem cLSM nötig.

4 Experimentaltteil

4.1 Darstellung der Nanokapseln

Alle in dieser Arbeit verwendeten Nanokapseln wurden mittels eines Miniemulsionsprozesses hergestellt. Die hergestellten Nanokapseln wurden in unterschiedliche Generationen unterteilt, die sich in der Art und Weise des Kapselbildungsprozesses unterscheiden.

Die erste Generation von Kapseln wurde mit Hilfe des radikalischen Miniemulsionspolymerisationsprozess hergestellt (siehe Abschnitt 2.3.1).^[22] Ein Teil dieser ersten Generation von Kapseln wurde bereits in meiner Diplomarbeit^[21] hergestellt. Für die vorliegende Doktorarbeit wurde der grundlegende Prozess übernommen und erweitert.

Die zweite Generation von Kapseln wurde mittels Lösungsmittelverdampfungsprozess dargestellt. Bei dieser Kapselbildung findet keine Polymerisation statt, da in der dispersen Phase bereits ein Polymer (anstelle eines Monomers) in der dispersen Phase gelöst wird. Das Polymer fällt dann während der Verdampfungsphase des Lösungsmittels aus und die Kapselmorphologie entsteht (siehe Theorie, Abschnitt 2.3.2).

Die Schale der dritten Generation der Nanokapseln besteht nicht aus organischem Polymer, sondern aus anorganischem, tetraedrisch verknüpften SiO_2 . Die Hydrolyse und Kondensationsreaktion (Sol-Gel-Prozess) von Silicium-Alkoxiden findet an der Grenzfläche der hydrophoben Nanotröpfchen und ihrer wässrigen Umgebung statt (siehe Abschnitt 2.3.3).

Bei allen dargestellten Kapseln besteht der innere Kern aus einer hydrophoben Flüssigkeit wie das hauptsächlich verwendete Hexadekan (HD) oder Phenylheptadekan (PHD). Die zur UC benötigten Farbstoffe (Sensitizer und Emitter) sind in diesem hydrophoben Medium gelöst. Da die Lösung der Farbstoffe nur sehr langsam von statten geht, wurde ebenfalls ein Lösungsmittelverdampfungsprozess angewandt. Zunächst wurde der benötigte Farbstoff in einem guten Lösungsmittel wie Toluol oder THF gelöst, dann wurde das hydrophobe Medium hinzugefügt. Vom resultierenden Lösungsmittelgemisch wurde das gute Lösungsmittel (Toluol, THF) im Vakuum vollständig verdampft, wodurch der Farbstoff gelöst im hydrophoben Medium zurückbleibt. Diese erhaltene Farbstofflösung im hydrophoben Medium wurde direkt in der dispersen Phase verwendet.

Die genaue Darstellung der jeweiligen Nanokapseln wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.1.1 Radikalische Miniemulsionspolymerisation (1. Generation)

Die Herstellung mit Hilfe der Technik der radikalischen Miniemulsionspolymerisation ist charakteristisch für die Kapseln der ersten Generation. Die disperse Phase bestand aus dem eingesetzten Monomer, dem Initiator und dem hydrophoben Medium inklusive der darin gelösten UC-Farbstoffe. Die kontinuierliche Phase setzte sich aus 30 mg Tensid und 30 g demineralisiertem Wasser zusammen. Nach dem Vermischen der beiden Phasen wurde 1 h bei 2000 rpm voremulgiert. Anschließend wurde 2 min mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier W-450D, ½-Zoll Spitze, 90% Amplitude, Eiskühlung) homogenisiert, wodurch eine Miniemulsion mit charakteristischen Tröpfchen im Nanometerbereich erhalten wurde. Durch Erhitzen der Miniemulsion auf 70 °C wurde der Initiator zersetzt und die Polymerisation gestartet. Nach 18 h bei konstantem Rühren und 70 °C wurde die Polymerisation beendet und die durch Phasenseparation von Polymer und hydrophoben Medium erhaltenen Nanokapseln analysiert.

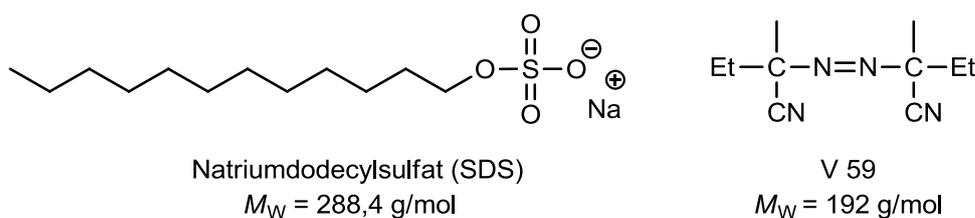


Abbildung 4.1: Strukturformel von SDS und V59.

Bei den Kapseln erster Generation wurden Natriumdodecylsulfat (SDS) als Tensid und 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril) (V59) als Initiator eingesetzt (Abbildung 4.1). Als hydrophobes Medium wurde Hexadekan (HD) oder Phenylheptadekan (PHD) verwendet. Variiert wurde vor allem in der Wahl der eingesetzten Polymere. Bereits in meiner Diplomarbeit wurden Polystyrol (PS), Polymethylmethacrylat (PMMA) und ein Copolymer, Polystyrol-co-Polyacrylsäure (PS-co-PAA) als mögliche Schale der Nanokapseln untersucht. In dieser Arbeit wurde das am besten für die Kapselbildung geeignete Copolymer PS-co-PAA (Abbildung 4.2) wieder verwendet und in weiteren Experimenten zusätzlich modifiziert. Dazu wurden bei einer weiteren Reihe von Experimenten verschiedene Gehalte an Divinylbenzol (DVB) (Abbildung 4.3) zur Copolymermischung hinzugefügt, um eine Vernetzung der Polymerhülle zu erreichen.

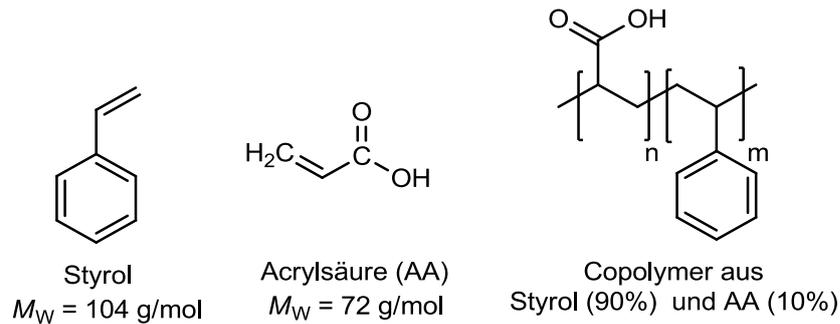


Abbildung 4.2: Strukturformeln der Monomere Styrol, Acrylsäure und dem resultierenden Copolymer.

Bei den Experimenten ohne Vernetzung wurden 50 mg Initiator pro 1 g Monomergemisch verwendet und der prozentuale Anteil der verwendeten Acrylsäure betrug 10% (bezogen auf die Gesamtmenge an eingesetztem Monomer). Die disperse Phase bestand zu 1/3 aus Monomergemisch und zu 2/3 aus hydrophobem Medium. Die kontinuierliche Phase betrug das Fünffache (bezogen auf die Masse) der dispersen Phase. Die genauen Zusammensetzungen der Ansätze sind im Anhang (Abschnitt 8.1) in Tabelle 8.1 dargestellt.

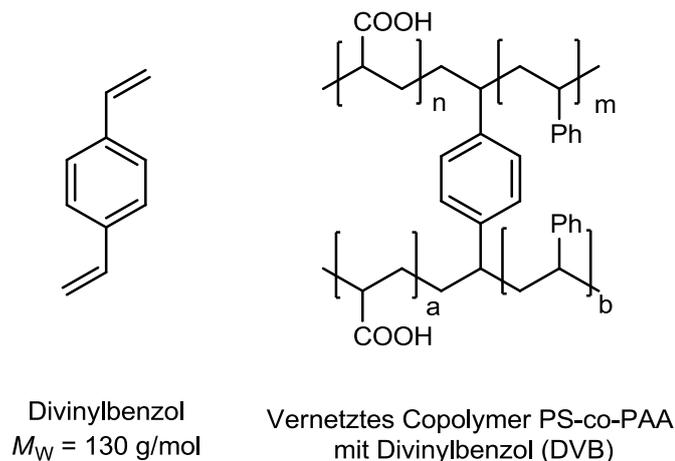


Abbildung 4.3: Strukturformel von DVB und dem vernetzten Copolymer.

Bei den Vernetzungsexperimenten wurden 50 mg Initiator auf 1 g Monomergemisch zugegeben. Der prozentuale Anteil an AA betrug hier 10% relativ zur Gesamtmenge an Monomer gesehen. Der Anteil von DVB wurde stark variiert (1% bis 45%), um verschiedene Vernetzungsgrade zu erhalten. Die Prozentangabe bezieht sich auf die Gesamtmenge an Monomer. Das Verhältnis von Monomergemisch und hydrophoben Medium beträgt wie bereits bei den unvernetzten Nanokapseln 1:2. Die genauen Zusammensetzungen der Ansätze sind im Anhang (Abschnitt 8.1) in Tabelle 8.2 dargestellt.

4.1.2 Lösungsmittelverdampfungsprozess (2. Generation)

Der Lösungsmittelverdampfungsprozess (engl. solvent evaporation process) ist im Vergleich zur radikalischen Miniemulsionspolymerisation eine schonende Möglichkeit, um Nanopartikel^[88] oder Nanokapseln^[23, 164] herzustellen. Bei dieser Methode wird kein Monomer polymerisiert wie bei der radikalischen Miniemulsionspolymerisation, sondern es wird lediglich das bereits vollständig polymerisierte Polymer ausgefällt. Die Phasenseparation zwischen Polymer und hydrophoben Medium findet während dem Verdampfungsprozess des Lösungsmittels vom Polymer statt.

4.1.2.1 Allgemeine Synthesevorschrift

Zu Beginn wird eine disperse Phase, bestehend aus dem Polymer, einem guten, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel für das Polymer und dem hydrophoben Medium, inklusive der darin gelösten UC-Farbstoffe, hergestellt. Die kontinuierliche Phase setzt sich aus demineralisiertem Wasser und dem Tensid zusammen. Nach dem Vereinigen der beiden Phasen wurde 1 h unter kontinuierlichem Rühren bei 1200 rpm voremulgiert, wobei das Reaktionsgefäß während der ganzen Zeit verschlossen blieb, um vorzeitige Verdampfung des Lösungsmittels zu verhindern. Die Homogenisierung erfolgte mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier W-450D, ½-Zoll Spitze) bei einer Amplitude von 70% über eine Dauer von 3 min (30 s Puls/10 s Pause) und unter ständiger Eiskühlung. Anschließend wurde die Miniemulsion bei RT oder bei 40 °C über Nacht bei offenem Reaktionsgefäß gerührt, um das Lösungsmittel des Polymers zu verdampfen und die Phasenseparation zu erhalten.

Als Kapselhülle wurden verschiedene Polymere verwendet. Die genauen Synthesevorschriften werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.1.2.2 Statistisches Copolymer ($P(S_{0.86}\text{-stat-MAA}_{0.14})$)

Im diesem Abschnitt werden die Experimente beschrieben, bei denen das statistische Copolymer Polystyrol-*co*-Polymethacrylsäure ($P(S_{0.86}\text{-stat-MAA}_{0.14})$) verwendet wurde. Zusätzlich wird die Synthese des Copolymers beschrieben.

Das bei diesen Ansätzen verwendete statistische Copolymer Polystyrol-*co*-Polymethacrylsäure wurde mittels freier radikalischer Polymerisation in Lösung hergestellt.

Dazu wurden die Monomere, 72 g Styrol und 6,6 g Methacrylsäure (MAA, Abbildung 4.4) in einem 500 mL Schlenkcolben mit aufgesetztem Rückflusskühler in 280 ml THF gelöst und mehrmals mit Argon gespült um störenden Sauerstoff zu entfernen. Nach Erhitzen der Lösung mit einem Ölbad auf 80 °C wurden 80 mg AIBN (Azo-bis-(isobutyronitril), Abbildung 4.4) (gelöst in 4 mL THF) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 6 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde die Polymerisationsreaktion unter Kühlung mit einem Eisbad bei 0 °C abgebrochen. Das Ausfällen des entstandenen Copolymers erfolgte in einem Lösungsmittelgemisch aus 75% Ethanol und 25% Wasser. Nach Filtration und erneutem Waschen mit der Fällungslösung wurde es bei 80 °C unter Vakuum getrocknet. Das entstandene Copolymer wurde mittels NMR und GPC charakterisiert.

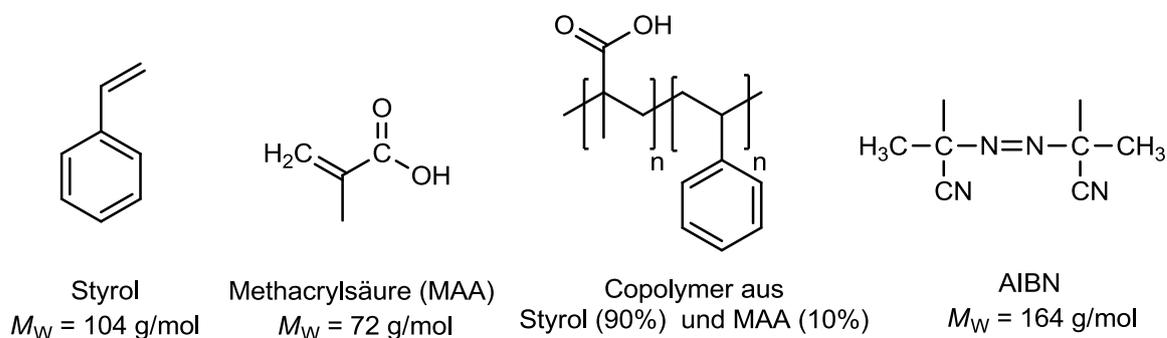


Abbildung 4.4: Strukturformeln von Styrol, MAA, PS-co-PAA und AIBN.

Zur Bildung der Nanokapseln wurde das synthetisierte Copolymer $P(S_{0.86}\text{-stat-MAA}_{0.14})$ verwendet, welches in Chloroform gelöst wurde. Das Verhältnis von Polymer zu hydrophoben Medium (PHD) war entweder 1:2 oder 2:3. Die kontinuierliche Phase setzte sich aus SDS und 10 g demineralisiertem Wasser zusammen. Die genauen Zusammensetzungen der jeweiligen Ansätze sind im Anhang (Abschnitt 8.1) in Tabelle 8.3 dargestellt.

4.1.2.3 Blockcopolymer (PS-block-PMMA)

Im Folgenden werden die Ansätze beschrieben, für welche das Blockcopolymer (Abbildung 4.5) als Polymerhülle der Kapseln verwendet wurde. Zusätzlich wird die Synthese des Blockcopolymers kurz erläutert.

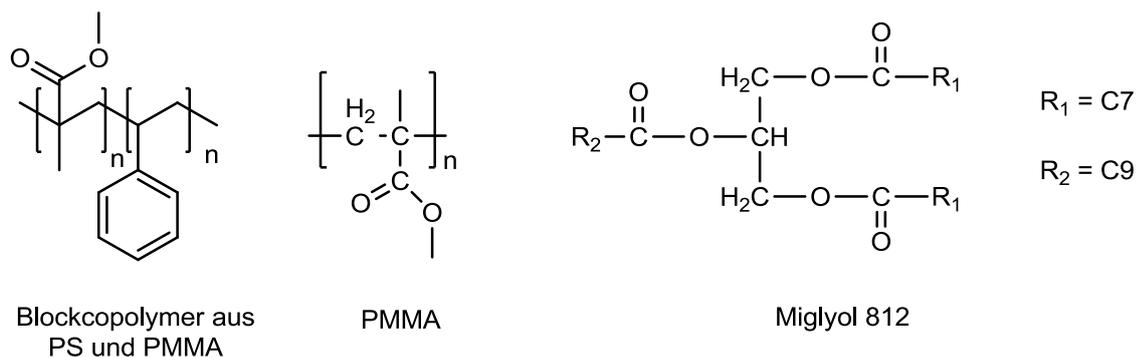


Abbildung 4.5: Strukturformeln von P(S-*b*-MMA), PMMA und Miglyol.

Das verwendete Blockcopolymer aus Polystyrol und Polymethylmethacrylat P(S_{0.48}-*b*-MMA_{0.52}) wurde mittels anionischer Polymerisation hergestellt. Initiiert wurde mit *sec*-Butyl-Lithium und terminiert mit sauerstofffreiem Methanol. Das Molekulargewicht und die Zusammensetzung der Blöcke wurden mit Gelpermeationschromatographie (GPC) und NMR bestimmt. Die Synthese und Analyse des Blockcopolymer wurde von Herrn Jürgen Thiel durchgeführt.

Für alle Experimente, bei denen das Blockcopolymer verwendet wurde, wurde SDS als Tensid in der kontinuierlichen Phase eingesetzt. Das Lösungsmittel des Polymer war CHCl₃ und als inneres hydrophobes Medium wurde HD, PHD oder α -Tocopherol (Vitamin E) (Abbildung 4.6) inklusive der darin gelösten UC-Farbstoffe verwendet. Die genauen Zusammensetzungen der jeweiligen Ansätze sind im Anhang (Abschnitt 8.1) in Tabelle 8.4 dargestellt.

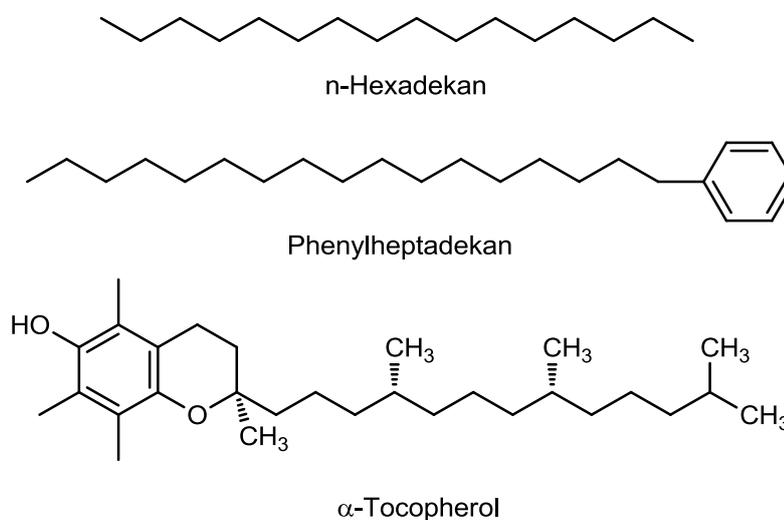


Abbildung 4.6: Eingesetzte hydrophobe Medien: Hexadecan (HD), Phenylheptadecan (PHD) and α -Tocopherol.

4.1.2.4 Polymethylmethacrylat (PMMA)

Im folgenden Abschnitt wurde PMMA (Abbildung 4.5) als Polymer für die Kapselhülle verwendet. Das kommerziell erhältliche Polymer besitzt ein Molekulargewicht von $M_w = 120000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Als Tensid wurde SDS verwendet, als inneres hydrophobes Medium HD, PHD und Miglyol 812 (im Folgenden nur Miglyol genannt, Abbildung 4.5) und kommerziell im Supermarkt erhältliches Olivenöl. Miglyol ist ein Triglyzerid aus einer Mischung der gesättigten Fettsäuren von Caprylsäure und Caprinsäure und wird unter anderem in Kosmetika verwendet. Für den Standardansatz der UC-Nanokapseln (ab SE-25-01) wurden schließlich 150 mg Polymer in 2,5 g CHCl_3 gelöst. Die disperse Phase wurde durch 300 mg Hydrophob inklusive der gelösten UC-Farbstoffe vervollständigt. Die kontinuierliche Phase bestand aus 10 mg SDS und 10 g demineralisiertem Wasser. Die genauen Zusammensetzungen der jeweiligen Ansätze sind im Anhang (Abschnitt 8.1) in Tabelle 8.5. dargestellt.

4.1.3 Darstellung Silicium basierter Nanokapseln (3. Generation)^[92]

In diesem Abschnitt wird die Synthese der anorganischen SiO_2 -Nanokapseln mittels Miniemulsionsprozess beschrieben (siehe Theorie, Abschnitt 2.3.3). Die disperse Phase bestand aus 1,3 g Tetraethylorthosilicat (TEOS, Abbildung 4.7) und 0,5 g von dem jeweiligen hydrophoben Medium PHD oder Miglyol. Die UC-Farbstoffe lagen als Lösung im hydrophoben Medium vor. Die kontinuierliche Phase setzte sich aus 7,5 g demineralisiertem Wasser und 5,75 mg CTMA-Cl (Cetyltrimethylammonium-chlorid, Abbildung 4.7) zusammen. Nach dem Vereinigen der beiden Phasen wurde 5 min bei 1200 rpm voremulgiert, um eine vorzeitige Hydrolyse von TEOS zu vermeiden. Das Gemisch wurde anschließend unter Eiskühlung für 3 min (30 s Puls, 10 s Pause) mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier W-450D, ½-Zoll Spitze) bei einer Amplitude von 70% behandelt. Die erhaltene Miniemulsion wurde im geschlossenen Gefäß für 20 h bei 800 rpm gerührt, bis die komplette Hydrolyse und anschließende Kondensation abgeschlossen war. Die genauen Zusammensetzungen der jeweiligen Ansätze sind im Anhang (Abschnitt 8.1) in Tabelle 8.6 dargestellt.

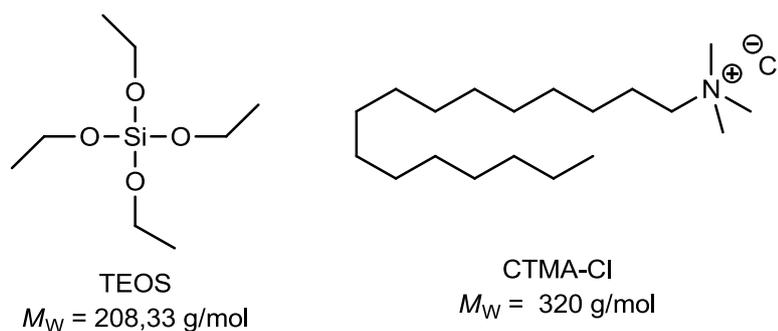


Abbildung 4.7: Strukturformeln von TEOS und CTMA-Cl.

4.1.4 Verwendete UC-Farbstoffe

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten UC-Farbstoffe beschrieben. Dazu werden die Strukturformeln, Absorptions- und Fluoreszenzspektren (jeweils auf 1 normiert) von jedem Farbstoff dargestellt. Da bei den Sensitizern keine Fluoreszenz messbar ist, wurde direkt das Fluoreszenzspektrum des korrespondierenden Emitters mit eingefügt. Dadurch kann festgestellt werden, ob die Emission des Emitters im Wellenlängenbereich des Transparenzfensters des Sensitizers (zwischen Soret-Band und Q-Band) liegt und somit eine Grundvoraussetzung für erfolgreiche TTA-UC erfüllt ist.^[18] Pd-OEP, Perylen und ein Teil des verwendeten Pd-TBP waren kommerziell erhältlich. Alle weiteren verwendeten Farbstoffe wurden innerhalb der Gruppe von Dr. Yuri Avlasevich, Dr. Mikhail Filatov oder Dr. Andrey Turshatov synthetisiert.

In Abbildung 4.8 sind die Absorptionsspektren und Fluoreszenzspektren der verwendeten UC-Emitter, Perylen (Dibenz[*de,kl*]anthracen), Bodipy (1,3,5,7-Tetramethyl-8-phenyl-2,6-diethyl Dipyrrromethan·BF₂), B-P-Dyad (4-(Perylen-3'-yl)-8-phenyl-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl Dipyrrromethan·BF₂) und Y-Perylen (3,10-bis(4-(tert-butylphenyl)ethinyl)perylene) dargestellt. Die Anregungswellenlänge der Fluoreszenzspektren wurde entsprechend dem Absorptionsmaximum, erhalten aus dem Absorptionsspektrum, gewählt. Die zugehörigen Strukturformeln der Emitter sind in Abbildung 4.9 zu finden.

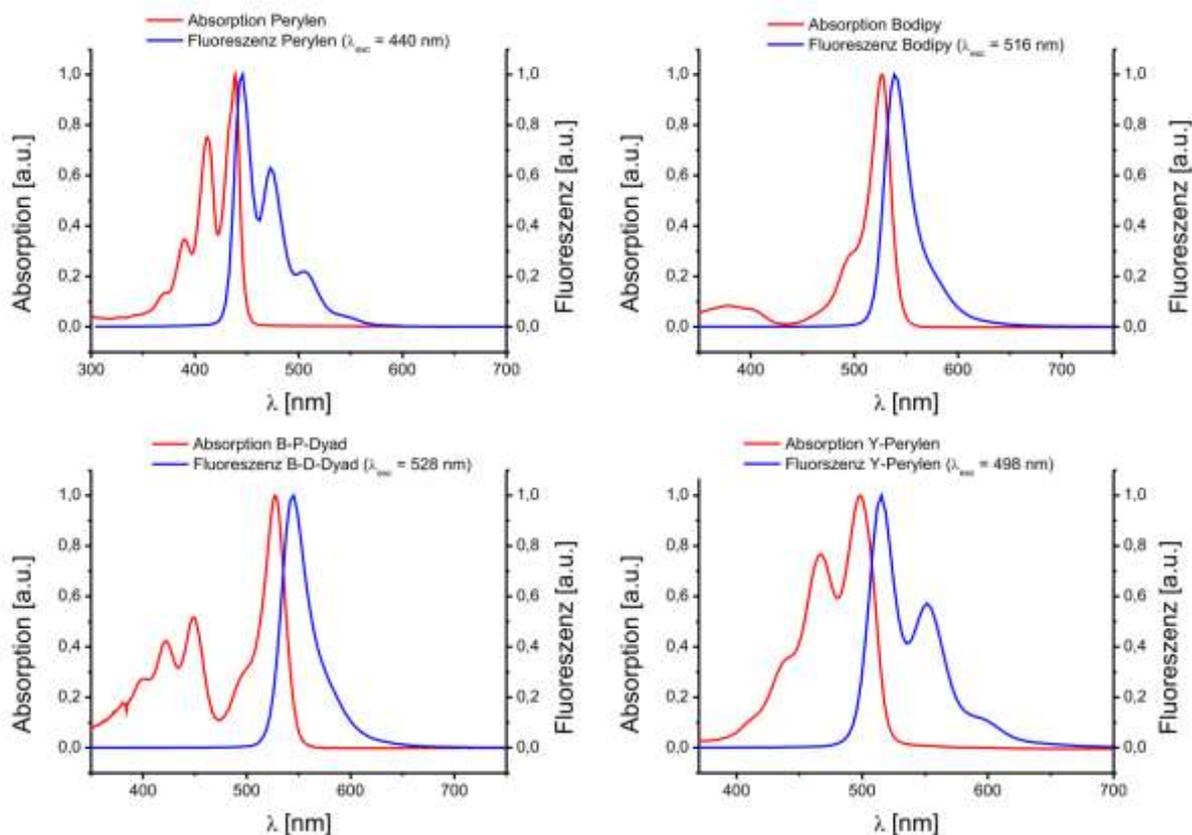


Abbildung 4.8: Absorptionsspektren (rot) und Fluoreszenzspektren (blau) (alle normalisiert) der verwendeten Emittter. Oben links: Perylen; Oben rechts: Bodipy; Unten links: B-P-Dyad; Unten rechts: Y-Perylen.

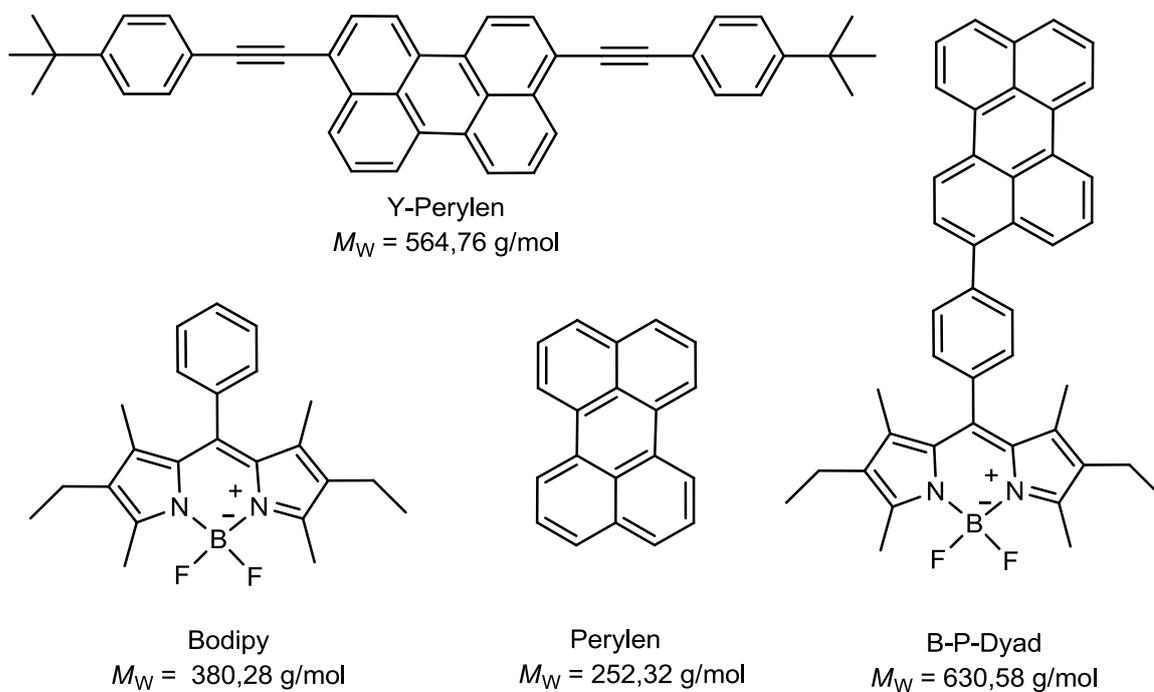


Abbildung 4.9: Strukturformeln der verwendeten Emittter: Perylen, Bodipy, Y-Perylen und B-P-Dyad.

In dieser Arbeit wurden folgende Sensitizer verwendet: Pd-OEP (2,3,7,8,12,13,17,18-octaethylporphyrin Palladiumkomplex), Pd-TBP (*meso*-Tetraphenyl-tetrabenz[2,3]porphyrin Palladiumkomplex) und Pd-TNP (*meso* Tetra(4-metoxycarbonylphenyl)-tetranaphtho[2,3]-porphyrin Palladiumkomplex).

In Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11 (links) sind die Absorptionsspektren der einzelnen Sensitizer mit dem Fluoreszenzspektrum des korrespondierenden Emitters dargestellt. Dort kann man feststellen, ob sich die Emission des Emitters im Wellenlängenbereich zwischen dem Soret-Band und dem Q-Band (Transparenzfenster) des Sensitizers befindet. Die Strukturformeln sind in Abbildung 4.12 dargestellt.

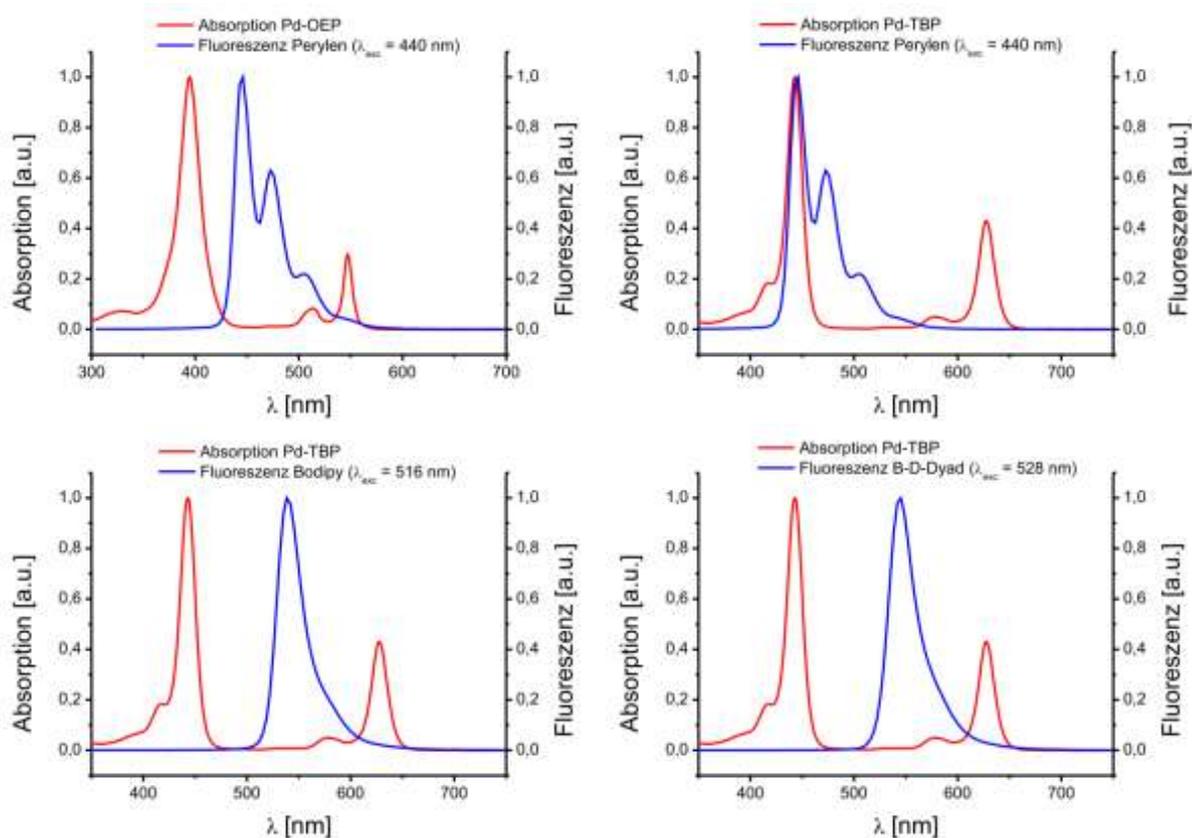


Abbildung 4.10: Absorptionsspektren (rot) der Sensitizer mit eingefügtem Fluoreszenzspektrum (blau) (alle normalisiert) des dazu verwendeten Emitters. Oben links: Absorptionsspektrum von Pd-OEP mit Perylen; Oben rechts: Absorptionsspektrum von Pd-TBP mit Perylen; Unten links: Absorptionsspektrum von Pd-TBP mit Bodipy; Unten rechts: Absorptionsspektrum von Pd-TBP mit B-P-Dyad.

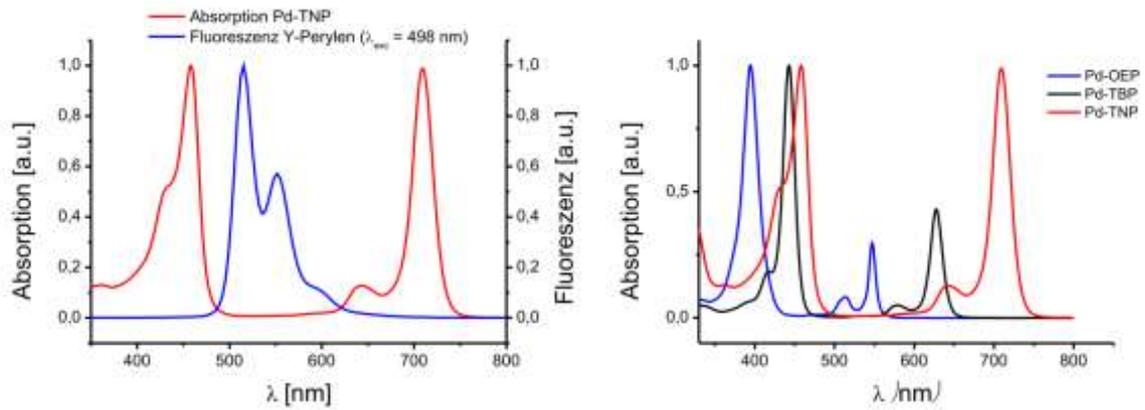


Abbildung 4.11: Links: Absorptionsspektrum (rot) von Pd-TBPP mit eingefügter Fluoreszenz (blau) (alle normalisiert) vom dazu verwendeten Emittter Y-Perylen ($\lambda_{\text{em}} = 498$ nm); Rechts: Absorptionsspektren aller verwendeter Sensitizer (Pd-OEP (blau), Pd-TBP (schwarz), Pd-TNP (rot)).

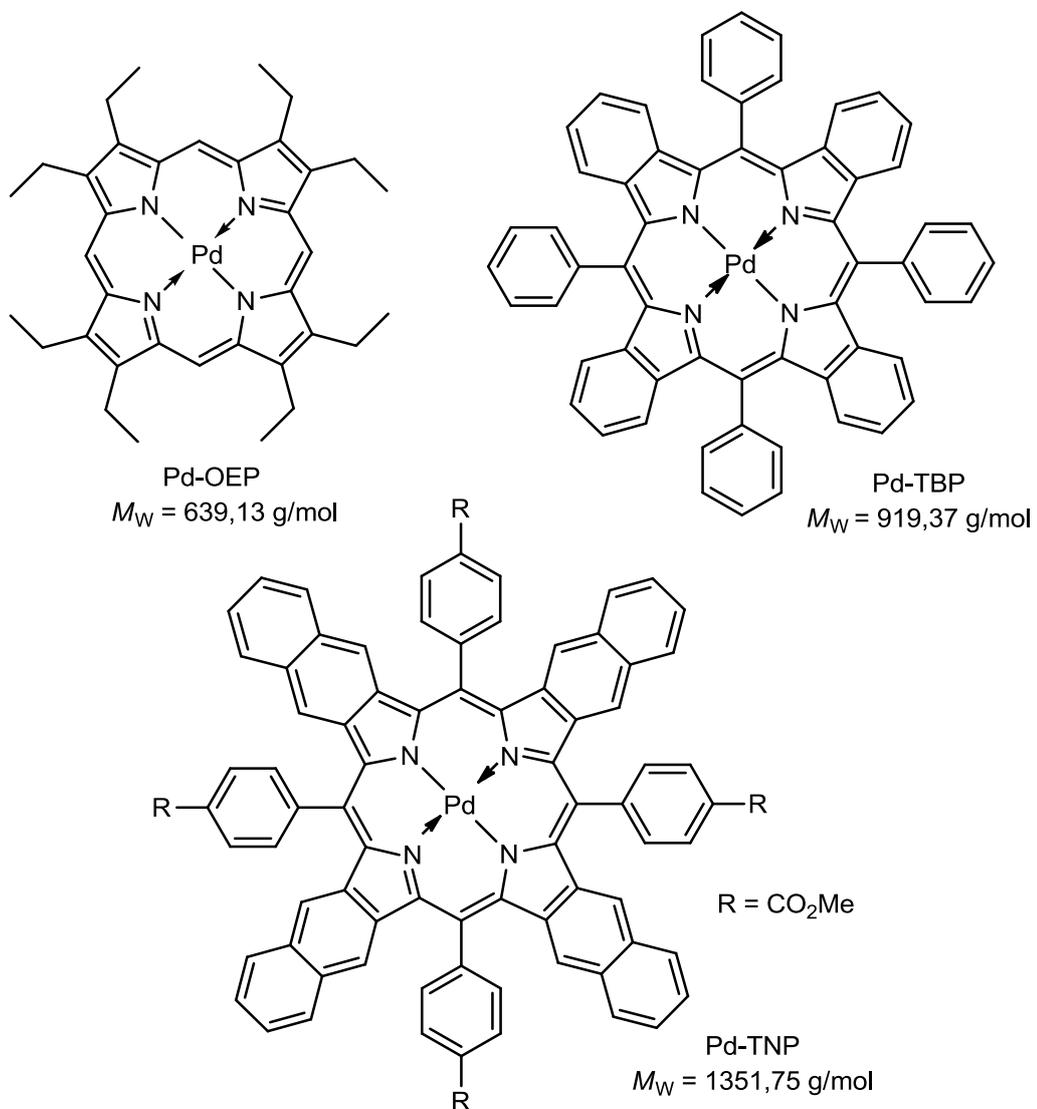


Abbildung 4.12: Strukturformel der verwendeten Sensitizer Pd-OEP, Pd-TBP und Pd-TNP.

Zusätzlich sind alle Absorptionsspektren der Sensitizer sind gemeinsam in Abbildung 4.11 (links) dargestellt. Dort kann man sehen, wie sich das Q-Band und somit die Anregungswellenlänge der Sensitizer in den NIR-Bereich verschieben lässt. Diese Verschiebung wird durch die Erweiterung des aromatischen Grundgerüsts des Porphyrins erreicht. In Abbildung 4.13 sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von weiteren in der Arbeit verwendeten Farbstoffen wie PMI (N-(2,6-diisopropylphenyl)perylen-3,4-dicarboximid) und Bodipy-X (polymerisierbares Bodipy-Derivat, 8-(4-(2-(methacryloyloxy)ethoxy)phenyl)-3,7-di(thiophen-2-yl) Dipyrrromethan-BF₂) dargestellt. Die zugehörigen Strukturformeln dieser Farbstoffe sind in Abbildung 4.14 gezeigt.

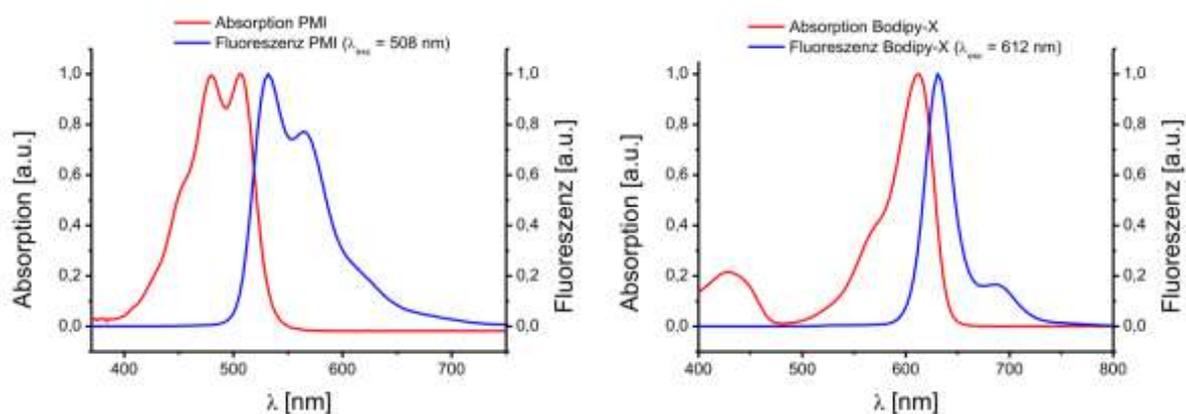


Abbildung 4.13: Absorptionsspektren (rot) und Fluoreszenzspektren (blau) (alle normalisiert) von verwendeten Farbstoffen. Links: PMI; Rechts: Bodipy-X.

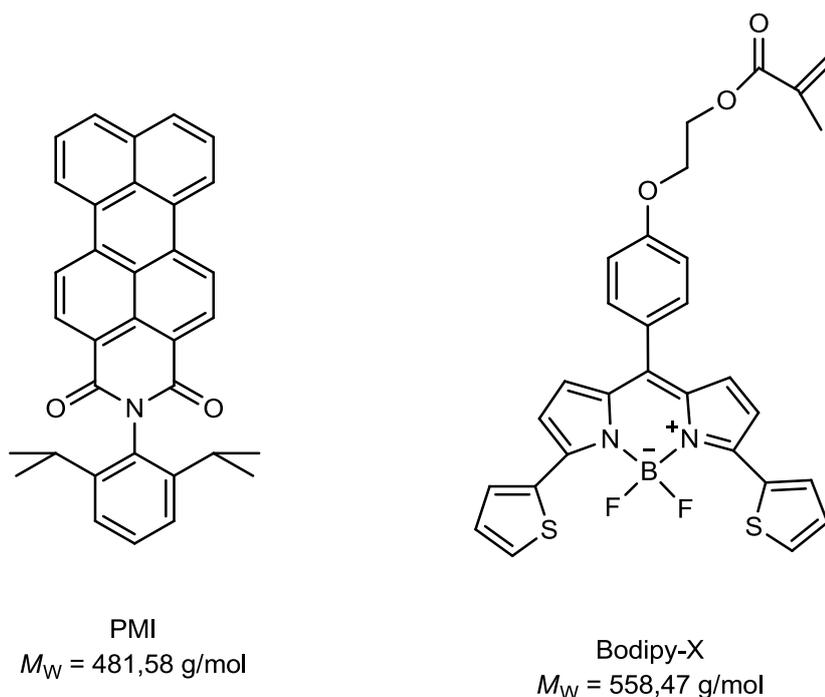


Abbildung 4.14: Strukturformeln der Farbstoffe PMI und Bodipy-X.

4.2 Messung der UC

In den folgenden Abschnitten wird beschrieben, wie die TTA-UC gemessen wurde. Dazu wird der Aufbau des Lasers erklärt und die einzelnen Schritte der Probenpräparation werden erläutert. Außerdem wird auf die Berechnung der Integrale der UC-Emission und die daraus erfolgende Berechnung der UC-Effizienz eingegangen.

4.2.1 Laser Aufbau (Abbildung 4.15)

Als Anregungsquelle wurde ein superkontinuierlicher, quasi-Dauerstrich (continuous wave, cw) Laser (SC450-2-PP, Fianium Inc.) verwendet. Bei einer Impulsfolgefrequenz von ca. 20 MHz und einer Pulsdauer von ~ 10 ps ist mit diesem Laser eine spektrale Leistungsdichte von $\sim 1 \text{ mW}\cdot\text{nm}^{-1}$ möglich. Zur Auswahl und Einstellung einer spezifischen Wellenlänge wird das weiße Emissionslicht des Lasers durch einen 4F-Monochromator (Prisma) geleitet. Für die Messungen wurde normalerweise eine Signalbandbreite (Halbwertsbreite, FWHM) von $\Delta\lambda = 10\text{-}15$ nm verwendet. Nach dem Monochromator wird der Laserstrahl über einen Raumfilter geführt, um eine nahezu transversale Intensitätsverteilung (TEM_{00}) zu erhalten. Um die Leistung des Strahls vorsichtig zu dämpfen und einzustellen, wurden im Strahlengang reflektierende Neutraldichte-(ND)-Filter (Thorlabs Inc.) auf einem drehbaren optischen Halter installiert. Der optische Halter wurde verwendet, um die optischen Achsen des Experiments nicht zu beeinflussen. Anschließend wurde der Strahl über ein Spiegelsystem (Ultrabreitband Spiegel, MaxMirror, Semrock Inc.) auf eine achromatische Linse (Numerische Apertur, $\text{NA} = 0,24$) geleitet, welche schließlich den Strahl auf der zu untersuchenden Probe fokussiert. Die Anregungsleistung des Lasers wurde direkt vor der Probe mit einer, an ein Powermeter angeschlossenen, Photodiode eingestellt und überprüft.

Der Durchmesser des Anregungspunktes (Spot) wurde über einen Strahlprofilmesser (beam profiler, BP104-VIS, Thorlabs Inc.) kontrolliert und justiert. Aus Durchmesser und Anregungsleistung kann die Anregungsintensität berechnet werden.

Die Emission der zu untersuchenden Probe wurde von derselben achromatischen Linse eingefangen, wodurch wird eine vollständige räumliche Überlappung des Anregungs- und Emissionspunktes (Spot) garantiert wird. Die Emission des Anregungsstrahls wurde mittels einem, je nach Anregungswellenlänge, passenden Notch-Filter abgeblockt (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Auswahl der Notch-Filter bei bestimmter Anregungswellenlänge.

Anregungswellenlänge λ_{exc}	Notch-Filter
532 nm	$\lambda = 532$ nm (FWHM ~ 17 nm, NF 03-532E-25, Semrock Inc.)
546 nm	$\lambda = 546$ nm and $\lambda = 647$ (FWHM ~ 20 nm, NF 01-546/647 25x5.0, Semrock Inc.)
633 nm	$\lambda = 633$ nm (FWHM ~ 16 nm, NF 03-633U-25, Semrock Inc.)
710 nm	Short Pass-Filter $\lambda = 694$ nm

Die Emission der Probe wurde schließlich von einem CCD-Spektrometer (C10083CA, Hamamatsu Inc.) aufgenommen, welches auf absolute Wellenlängen kalibriert wurde und eine korrigierte spektrale Empfindlichkeit (SR, spectral response) aufweist. Gemessen wurde die Zahl der Photonen pro Sekunde (cps, counts per second) der einzelnen Wellenlängen über den Gesamtbereich von $\lambda = 300-1200$ nm. In Abbildung 4.15 ist der schematische Aufbau des Laser-Setups dargestellt.

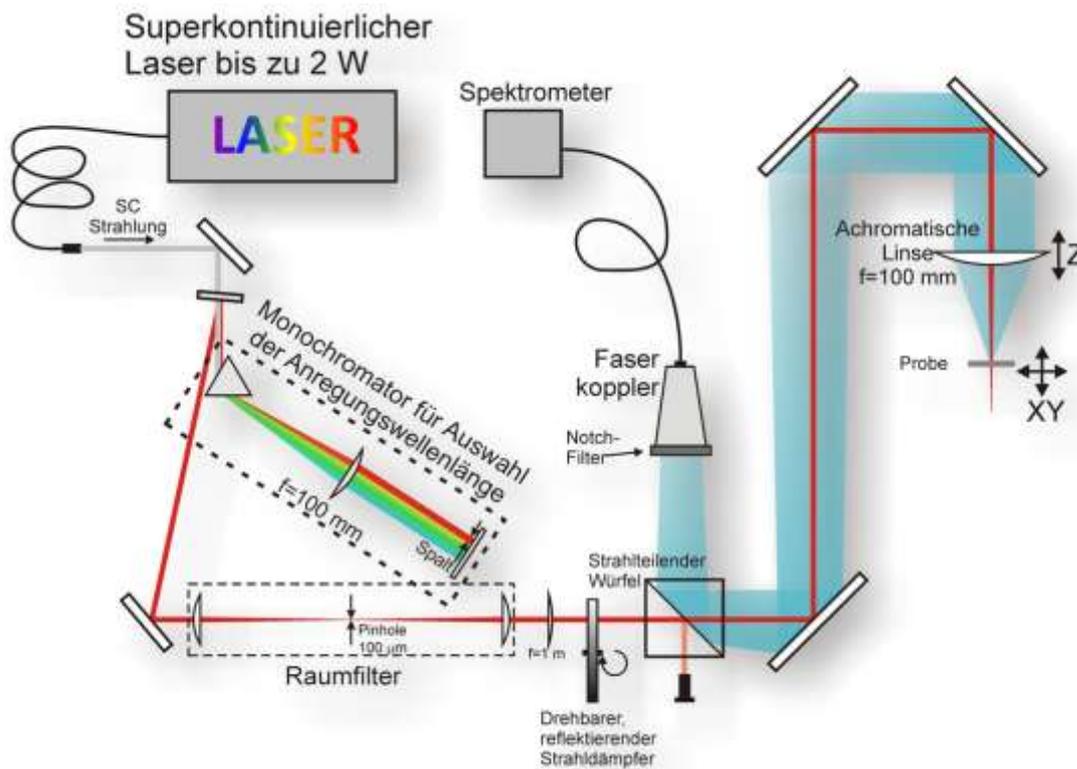


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung des Laser-Setups mit freundlicher Genehmigung von Herr Dmitry Busko.^[165]

4.2.2 Probenpräparation

Die Probenpräparation zur Messung der UC-Emission von in Wasser dispergierten Nanokapseln erfolgte auf unterschiedlichen, von der Art der Deoxygenierung abhängigen, Arten. Alle Proben der Dispersion wurden in einer 1 mm dicken Küvette ($h = 4$ cm, $b = 1$ cm) gemessen. Die Messung der Proben erfolgte in der Regel (wenn nicht anders aufgeführt) bei einem Fokusbereich des Lasers auf der Probe von $d_{\text{Fokus}} = 400$ μm .

Deoxygenierung der Dispersion auf chemischem Weg:

Um den Sauerstoff mit Sulfid zu reduzieren, wurden 5 mL der Dispersion abgetrennt und mit Na_2SO_3 (Sulfid) von einer Konzentration $c(\text{Sulfid}) = 0,01$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versetzt. Die sauerstofffreie Dispersion wurde in die 1 mm dicke Küvette abgefüllt und mit einem Deckel verschlossen, um stetiges Nachströmen von Sauerstoff zu unterbinden.

Deoxygenierung auf physikalischem Weg:

Ein Teil der Dispersion (ca. 15 mL) wurde abgetrennt und für 24 h in einer mit Stickstoff-Atmosphäre (O_2 -Gehalt < 5 ppm) gefüllten Glovebox (Uni Lab, mBraun) gelagert. Der in der Dispersion vorhandene Sauerstoff wurde in dieser Zeit vom Stickstoff verdrängt. Die Probe wurde in der Glovebox in die Küvette abgefüllt, mit einem Deckel verschlossen und mit Parafilm luftdicht versiegelt. Anschließend wurde die Probe ausgeschleust und innerhalb von 30 min gemessen.

Bei der Auswertung der aufgenommenen Spektren der unterschiedlichen Nanokapseln wurden UC-Effizienzen und Integrale der gemessenen Peaks (UC-Emission und Phosphoreszenz) gemessen. Im Folgenden wird die Berechnung der Integrale und der relativen UC-Effizienz erklärt.

Berechnung der Integrale:

Zur Berechnung der Integrale wurde die gemessene Emission gegen die Frequenz (nicht Wellenlänge) aufgetragen. Dazu wurden die Wellenlängen mit der Formel (4.1) in die zugehörige Frequenz umgerechnet. Die Integrationsgrenzen werden hier zur besseren Anschaulichkeit in der entsprechenden Wellenlänge angegeben. Die Integrationsgrenzen wurden für jedes Farbstoffpaar individuell festgelegt (Tabelle 4.2).

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad (4.1)$$

mit f = Frequenz [Hz, $1 \cdot s^{-1}$]

c = 299792458 $m \cdot s^{-1}$ (Lichtgeschwindigkeit)

λ = Wellenlänge [nm]

Tabelle 4.2: Integrationsgrenzen der verschiedenen Farbstoffpaare.

Farbstoffpaar	Grenzen UC-Emission λ [nm]	Grenzen Phosphoreszenz λ [nm]
Pd-OEP/Perylen	433-505 nm	636-728 nm
Pd-TBP/Perylen	433-533 nm	750-870 nm
Pd-TBP/Bodipy	525-610 nm	750-870 nm
Pd-TBP/B-P-Dyad	520-610 nm	750-870 nm
Pd-TNP/Y-Perylen	500-640 nm	880-975 nm

Berechnung der relativen UC-Effizienz

Anhand des Verhältnisses der Integrale der Peaks von UC-Emission und Phosphoreszenz kann man eine Effizienz des TTA-UC-Prozess bestimmen. Dazu wird die Summe aus beiden Integralen ($2 \times UC + \text{Phosphoreszenz}$) berechnet, welche die Gesamtmenge an gemessener Emission darstellt. Das Integral der UC-Emission muss dabei doppelt gezählt werden, weil für jedes gemessene UC-Photon zwei Photonen eingestrahlt wurden, von denen eines jedoch strahlungslos relaxierte. Somit kann der prozentuale Anteil der UC-Emission ($2 \times UC$ -Integral) und Phosphoreszenz (Phosphoreszenz-Integral), bezogen auf die Gesamtmenge an gemessener Emission, berechnet werden. Je höher der prozentuale Anteil der UC-Emission ist, desto besser ist die Effizienz der UC. Durch Phosphoreszenz gehen die Photonen verloren, welche keinen Triplet-Triplet-Transfer zum Emitter eingehen und somit für den UC-Prozess keine Rolle mehr spielen.

4.3 Durchführung der Zellexperimente

4.3.1 Zellkultur

HeLa-Zellen sind Krebszellen, die ursprünglich aus dem Gebärmutterhalskrebs von Henrietta Lachs nach ihrem Tod im Jahre 1951 gewonnen wurden. Bis heute sind HeLa-Zellen, mitunter die wohl am häufigsten genutzten menschlichen Zellen überhaupt.^[166] Die hier verwendeten HeLa-Zellen stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

Ein weiterer, in dieser Arbeit verwendete Zelltyp sind mesenchymale Stammzellen (engl. mesenchymal stem cells, MSC). Sie sind multipotente Stammzellen und wurden dem Knochenmark eines Spenderhüftknochens isoliert. Diese Arbeiten sind durch das Ethikkomitee der Universität Freiburg genehmigt.

Die HeLa-Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified essential medium) mit 10% FCS (Fötale Kälber Serum), 100 Einheiten Penicillin und $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Streptavidin kultiviert.

Die MSCs wurden in α -MEM (minimal essential medium) kultiviert, welches zusätzlich mit 20% FCS, 100 Einheiten Penicillin, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Streptavidin, 1 mM Na-Pyruvat und 0,6% Ciprofloxacin versetzt wurde.

Für die Weiterverarbeitung der Zellen wurden je nach Gebrauch, entweder für cLSM oder FACS, unterschiedliche Präparationsmethoden verwendet.

4.3.2 Probenpräparation für cLSM

Für die Inkubation wurden am ersten Tag adhärente Zellen mit einer Dichte von $5000 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ (HeLa) oder $4000 \text{ Zellen}\cdot\text{m}^{-2}$ (MSC) in einem Ibidi-Gefäß (μ -Schale, $d = 35 \text{ mm}$) ausgesät. Am zweiten Tag wurden die Nanokapseln in definierter Konzentration (Bereich von $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ - $5000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) zum Medium hinzugegeben. Um die Zellaufnahme zu erleichtern erfolgte die Inkubation in einem Brutschrank für 24 h unter kontrollierten Bedingungen (37°C , 5% CO_2 , 100% Luftfeuchtigkeit). Nach der Inkubation wurde das Medium aus dem Ibidi-Gefäß entfernt und die adhärenen Zellen wurden dreimal mit 3 mL PBS (phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Kalzium- oder Magnesium-Ionen) gewaschen. Eine Färbung der Zellen erfolgte im Anschluss. Dazu wurden für eine Anfärbung der Zellmembran CellMask Orange oder CellMask Deep Red mit einer Konzentration von $c = 0,1$

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ für 30 min hinzugegeben. Für eine Kernfärbung wurde Draq 5 mit einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ für 5 min zugesetzt.

Die Proben wurden an einem Leica TCS SP5 II gemessen. Das Mikroskop ist mit bestückt mit folgenden Lasern (Wellenlänge λ [nm] und maximale Leistung P_{max} [mW]):

- Ar-Laser (cw): $\lambda = 458 \text{ nm}$ (5 mW), $\lambda = 476 \text{ nm}$ (5 mW), $\lambda = 488 \text{ nm}$ (20 mW), $\lambda = 496 \text{ nm}$ (5 mW), $\lambda = 514 \text{ nm}$ (20 mW).
- DPSS-Laser (Dioden gepumpter Feststofflaser, engl. Diode pumped solid state) (cw): $\lambda = 561 \text{ nm}$ (20 mW).
- HeNe-Laser: $\lambda = 594 \text{ nm}$ (2,5 mW), $\lambda = 633 \text{ nm}$ (10 mW).

Bei der Probenpräparation der fixierten Zellen wurden die Zellen auf einem Deckglas ausgesät. Dazu wurde das Deckglas in das Ibidi-Gefäß gelegt, damit sich die Zellen auf dem Deckglas anlagern konnten. Die Partikelzugabe erfolgte wie oben beschrieben. Die Fixierung der Zellen auf dem Deckglas erfolgte mit 4% Paraformaldehyd für 2 h. Das Deckglas mit den fixierten Zellen wurde in eine Glovebox mit Stickstoffatmosphäre überführt. Dort wurde es für 24 h gelagert, anschließend luftdicht versiegelt und am cLSM gemessen.

Die Probenpräparation der Zellen für das cLSM wurde von Steffen Lorenz und Melanie Dröge durchgeführt.

Die Probenpräparation der PVA-Fasern erfolgte mittels Elektrosponning. Dazu wurde eine PVA-Lösung hergestellt (10% Gew.), von der 4,5 mL mit 0,15 mL der jeweiligen Dispersion vermischt wurde (3 min Vortexer). Die Fasern wurden auf einen Objektträger bei einer Spannung von 10 kV gesponnen. Die Fließrate der Spritze mit PVA-Lösung/Dispersion wurde auf $2,54 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ eingestellt, der Spitzendurchmesser betrug 0,4 mm. Der Objektträger mit den Fasern wurde in der Glovebox luftdicht versiegelt und am cLSM untersucht.

4.3.3 Probenpräparation für FACS

Zunächst wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin abgetrennt und in, mit zusätzlichen FCS enthaltenem, Medium mit einer Dichte von $20000 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ (HeLa) oder $10000 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ (MSC) in einer 6-Well Platte ausgesät. Am zweiten Tag wurden die Nanokapseln in definierter Konzentration (Bereich von $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ - $5000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) zum Medium hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte, um die Zellaufnahme zu erleichtern, in einem Brutschrank unter kontrollierten Bedingungen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , 100% Luftfeuchtigkeit) für 24 h. Nach der Inkubation wurde das Medium mit PBS gewaschen, trypsiniert, zentrifugiert (3 min, 1500

rpm) und für Cytotoxizitätstests für 15 min bei RT mit $28,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 7-AAD^[167] (7-Aminoactinomycin D), angefärbt. 7-AAD zeigt bei der Aufnahme in apoptotischen Zellen eine charakteristische Fluoreszenz.^[168] Anschließend wurde wieder in PBS resuspendiert.

Die Proben wurden an einem FACS Cyflow ML gemessen und mit dem Programm FCS Express 3.0 ausgewertet. Der FL-1 Kanal ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 527 \text{ nm}$) wurde, unter Verwendung der direkten Anregung des Emitters, für die Untersuchung der Kapselaufnahme verwendet. Zur Untersuchung der Toxizität wurde der Kanal FL-6 ($\lambda_{\text{exc}} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 675 \text{ nm}$) unter der Anregung von 7-AAD verwendet. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einer Auftragung von FSC gegen SSC, um tote Zellen (Zelltrümmer) oder nicht aufgenommene Nanokapseln auszuschließen. Durch das Anlegen eines „Gates“ wurden nur die lebenden Zellen in den beiden Kanälen weiter auf Fluoreszenz untersucht. Die Intensität der Fluoreszenz entspricht der Menge an aufgenommenen oder angehafteten Nanokapseln in den Zellen. Zur Untersuchung auf Fluoreszenz von 7-AAD wird FL-1 gegen FL-6 aufgetragen und die Zahl der lebenden, apoptotischen und toten Zellen wird mittels Negativkontrolle bestimmt. Alle Messungen wurden dreimal wiederholt, aus denen dann eine Standardabweichung ermittelt und angegeben wurde. Die Messungen mit dem FACS wurden von Melanie Dröge durchgeführt.

4.4 Probenpräparation für Analytik

Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Die TEM-Aufnahmen wurden entweder an einem Zeiss EM-902 mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV oder an einem Zeiss EM-912 bei 120 kV Beschleunigungsspannung durchgeführt. Zur Probenpräparation wurden $3 \mu\text{L}$ der zu messenden Dispersion entnommen und mit demineralisiertem Wasser auf ein Verhältnis von 1:1000 verdünnt. Von der verdünnten Probe wurden $5 \mu\text{L}$ mit einer Eppendorfpipette entnommen und auf ein mit Kohle bedampftes TEM-Grid (Kupfernetz) platziert. Nach der vollständigen Trocknung des Grids wurde es am TEM untersucht.

Bei den Nanokapseln mit PMMA, dem Blockcopolymer und dem statistischem Copolymer wurde die Probe auf dem TEM-Grid zusätzlich nochmal mit Kohlestaub bedampft. Dadurch wurde eine schnelle Zersetzung des Polymers unter dem Elektronenstrahl verhindert und zusätzlich der Kontrast der Probe verbessert.

Rasterelektronenmikroskop (SEM)

Die SEM-Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Leo 1530 Gemini bei einer Beschleunigungsspannung von 0,1-1 kV aufgenommen. Zur Probenpräparation wurden 5 μL der Dispersion entnommen und mit demineralisiertem Wasser auf ein Verhältnis von 1:1000 verdünnt. Davon wurden 10 μL entnommen und auf ein gereinigtes SiO_2 -Substrat (ca. 5x5 mm) getropft. Nach dem Trocknen des Substrats wurde es am SEM untersucht. Eine zusätzliche Bedampfung mit Kohle wurde bei den Proben mit PMMA, dem Blockcopolymer und dem statistischen Copolymer durchgeführt. Dadurch wurde die schnelle Zersetzung des Polymers unter dem Elektronenstrahl verhindert und zusätzlich der Kontrast der Probe verbessert.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Mittels dynamischer Lichtstreuung an einem Submicron Particle Sizer Nicomp 380 wurde die Kapselgröße (d_i) und deren Standardabweichung (σ) erhalten. Dazu wurde ein Tropfen der Probe in eine spezielle Plastikkuvette überführt und dort auf das ca. Tausendfache verdünnt, bis nur noch eine geringe Trübung zu erkennen war. Die Messung wurde bei 23 °C und bei einer Laserwellenlänge von $\lambda = 635 \text{ nm}$ durchgeführt. Das erhaltene Streulicht wurde bei einem fest eingestellten Winkel von 90° detektiert.

Feststoffgehalt

Der Feststoffgehalt wurde mit einer automatischen Feststoffwaage (Kern RH 120-3) gemessen. Dazu wurden mehrere Tropfen der Dispersion auf eine Aluminiumschale getropft, welche auf die Feststoffwaage gestellt wurde. Dann wird automatisch langsam erhitzt, bis das Wasser der Dispersion vollständig verdampft ist. Aus dem erhaltenen Rückstand wurde der Feststoffgehalt gravimetrisch bestimmt. Bei dieser Methode wird das innere hydrophobe Medium auf Grund seines hohen Siedepunktes nicht verdampft, wodurch es zum Anteil des Feststoffgehaltes mit hinzugerechnet werden muss.

Absorptionsmessungen

Zur Messung der Absorption der unterschiedlichen Farbstoffe wurde Lösungen der Farbstoffe in Toluol mit einer Konzentration von $c(\text{Farbstoff}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hergestellt. Die Lösung wurde in spezielle Küvetten ($d = 1 \text{ cm}$) abgefüllt und mit einem Lambda 25 UV-VIS-Spektrometer (Perkin Elmer) gemessen. Die Absorption wurde über einen Wellenlängenbereich von $\lambda = 300\text{-}800 \text{ nm}$ mit einer Scangeschwindigkeit von $240 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$

in Nanometerschritten aufgenommen. Als Negativkontrolle wurde eine reine Toluollösung verwendet. Die Graphische Auswertung der Daten erfolgte mit Origin.

Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzspektren der Farbstoffe wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer (TIDAS FL3095 SL, J&M) aufgenommen. Dazu wurden Toluollösungen der Farbstoffe mit einer Konzentration von $c(\text{Farbstoff}) = 1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hergestellt. Die Messung fand in speziellen Quarzküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) statt. Es wurden Fluoreszenzspektren bei verschiedenen Anregungswellenlängen aufgenommen. Dargestellt wurde das Spektrum, welches bei der Anregungswellenlänge des Absorptionsmaximums des jeweiligen Farbstoffes gemessen wurde. Die graphische Auswertung der Daten erfolgte mit Origin.

4.5 Verwendete Chemikalien

Die Monomere wie Styrol, Acrylsäure und Methacrylsäure wurden vor der Verwendung mit einer Säule über Kieselgel aufgereinigt. Alle weiteren Chemikalien (Tabelle 4.3) wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Tabelle 4.3: Alphabetische Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Abkürzung	Hersteller (Reinheit)
Acrylsäure	AA	Merck (99%)
7-Aminoactinomycin D	7-AAD	Sigma/Alexis Biochemicals
Azo-bis-(isobutyronitril)	AIBN	Aldrich (98%)
2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril)	V59	Wako
3,10-bis(4-(tert-butylphenyl)ethinyl)perylene	Y-Perylen	Synthese in Gruppe
CellMask™ (orange + rot)	----	Invitrogen
Cetyltrimethylammonium-chlorid	CTMA-Cl	Acros Organics (99%)
Chloroform	CHCl ₃	VWR PROLABO
Ciprofloxacin	----	Fluka
Dibenz[de,kl]anthracen	Perylen	Aldrich (99,5%)
p-Divinylbenzol	DVB	Aldrich (85%)
Draq 5 Zellkernfarbstoff	----	Biostatus Limited
Dubbecco's modified essential medium	DMEM	Invitrogen
Fötales Kälber Serum	FCS	Invitrogen
Hexadekan	HD	Merck (99%)

Experimentarteil

8-(4-(2-(methacryloyloxy)ethoxy)phenyl)-3,7-di(thiophen-2-yl) Dipyrrromethan·BF ₂	Bodipy-X	Synthese in Gruppe
Methacrylsäure	MAA	Aldrich (99%)
Miglyol 812	Miglyol	Fagron
minimal essential medium	α-MEM	Lonza
Natriumdodecylsulfat	SDS	Alfa Aesar (99%)
Natrium-Pyruvat	Na-Pyruvat	Invitrogen
Natriumsulfit	Sulfit/Na ₂ SO ₃	VWR PROLABO
N-(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4-dicarboximid	PMI	Synthese im Haus
2,3,7,8,12,13,17,18-octaethylporphyrin Palladiumkomplex	Pd-OEP	Porphyrin Systems (98%)
Penicillin	----	Invitrogen
4-(Perylen-3'-yl)-8-phenyl-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl Dipyrrromethan·BF ₂	B-P-Dyad	Synthese in Gruppe
Phenylheptadekan	PHD	Aldrich (97%)
Phosphat gepufferte Salzlösung	PBS	Invitrogen
Polymethylmethacrylat (120000 g·mol ⁻¹)	PMMA	Aldrich
Polystyrol- <i>block</i> -polymethylmethacrylat	P(S- <i>b</i> -MMA)	Synthese im Haus
Polystyrol- <i>co</i> -polymethacrylsäure	P(S- <i>co</i> -MAA)	selbst synthetisiert
Streptavidin	----	Invitrogen
Styrol	----	Merck (99%)
Tetraethylorthosilicat	TEOS	Alfa Aesar (99,9%)
Tetrahydrofuran	THF	VWR PROLABO
1,3,5,7-Tetramethyl-8-phenyl-2,6-diethyl Dipyrrromethan·BF ₂	Bodipy	Synthese in Gruppe
<i>meso</i> -Tetra(4-metoxycarbonylphenyl)-tetranaphtho[2,3]porphyrin Palladiumkomplex	Pd-TNP	Synthese in Gruppe
<i>meso</i> -Tetraphenyl-tetrabenzo[2,3]porphyrin Palladiumkomplex	Pd-TBP	Aldrich (98%)
α-Tocopherol	α-Toc	Aldrich (96%)
Toluol	----	Aldrich (99,7%)
Valinomycin	----	Aldrich (98%)
Vitamin C	----	Aldrich (98%)

5 Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnissteil dieser Arbeit ist in drei Teile unterteilt, wovon jeder Teil eine Generation von Kapseln beschreibt. Die verschiedenen Generationen der Kapseln unterscheiden sich grundlegend in ihrem Herstellungsprozess. Durch die Anwendung der unterschiedlichen Herstellungsprozesse wird die Verwendung vielfältiger Materialien für die Nanokapseln ermöglicht, was ebenfalls Veränderungen in den Eigenschaften der Nanokapseln in Bezug auf TTA-UC zur Folge hat. Die verschiedenen Generationen wurden im Laufe dieser Arbeit entwickelt, wobei die jeweils neue Generation eine Verbesserung der älteren mit sich bringt.

5.1 Kapseln der ersten Generation

Bevor die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt werden, soll kurz auf die Ergebnisse der Diplomarbeit eingegangen werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gelang dort bereits der Transfer der TTA-UC vom organischen Medium in die wässrige Umgebung. Mit Hilfe der radikalischen Miniemulsionspolymerisation wurden Nanokapseln, dispergiert in Wasser, mit hydrophobem Kern und einer Schale aus Polymer hergestellt. Der hydrophobe Kern besteht aus Hexadekan und den zur UC nötigen Farbstoffen Pd-OEP und Perylen (Abbildung 4.12). Um die beste Kern-Hülle-Morphologie durch unterschiedliche Grenzflächenspannungen zwischen Polymer, Wasser und hydrophoben Medium zu erhalten, wurden verschiedene Polymere mit unterschiedlicher Hydrophilie eingesetzt. Bei reinem Polystyrol (PS), welches die schwächste Hydrophilie aufweist, wurden kaum Kapseln generiert, was sich auf die gemessene UC auswirkt. PMMA (Polymethylmethacrylat) hingegen weist durch die Sauerstoffatome in der Carbonsäureestergruppe eine höhere Hydrophilie als PS auf, bildet somit bessere Kapseln und zeigt ein besseres UC-Signal inklusive UC-Effizienz. Das beste UC-Signal, die beste UC-Effizienz und auch die besten Kapseln wurden mit einem Copolymer aus PS-co-PAA erzielt. Mit dem Zusatz von 10% Acrylsäure zum Monomer Styrol wurde die hier beste Grenzflächenspannung zwischen entstehendem Copolymer, Wasser und hydrophoben Medium eingestellt, um die optimale Kern-Hülle-Struktur zu erhalten (Theorie Abschnitt 2.3.1). In Abbildung 5.1 wurden die verschiedenen Kapselsysteme auf UC-Fluoreszenz untersucht und verglichen. Wie bereits erwähnt, weist das Copolymer-System (rot) das größte UC-Signal auf. Jedoch ist bei den Kapseln, im Vergleich zu Systemen in organischer Lösung (HD, grün), die Phosphoreszenz nicht vollständig

gequencht. Das auftretende Verhältnis zwischen UC- und Phosphoreszenzpeak lässt sich somit direkt mit der Effizienz des UC-Prozesses verknüpfen.

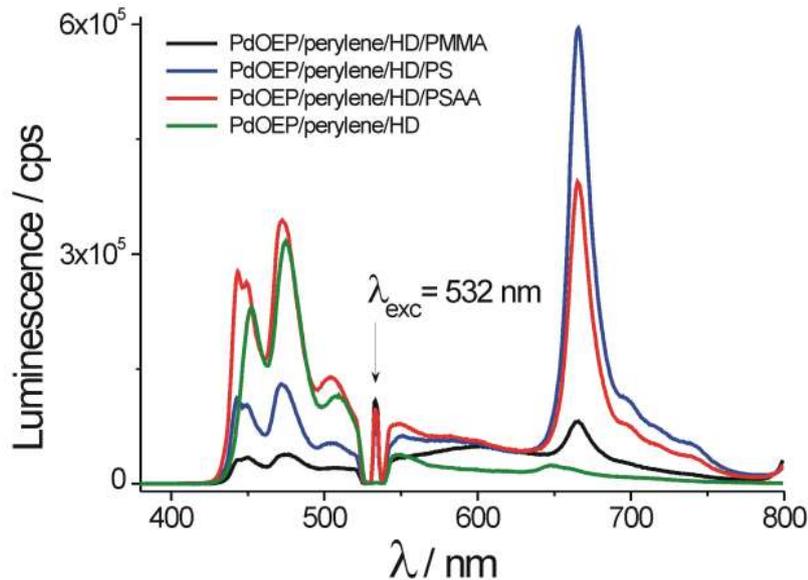


Abbildung 5.1: Vergleich der UC-Emission von unterschiedlichen, in Wasser dispergierten, Nanokapseln (rot (PS-co-PAA), schwarz (PMMA) und blau (PS)). Das UC-Spektrum von reinem HD (grün) wurde zum besseren Vergleich mit dem Faktor 0,1 multipliziert. Die Konzentration der Farbstoffe in reinem und verkapseltem HD beträgt für Pd-OEP ($c = 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und Perylen ($c = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$).^[169]

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse aus der Diplomarbeit als Grundlage verwendet, ausgebaut und verbessert.

Zunächst wurde die Abhängigkeit der UC-Fluoreszenz von der Anregungsintensität in den Kapseln untersucht, da dies ein wichtiger Faktor in möglichen biologischen Anwendungen darstellt. Dort werden die UC-Photonen als Anregungsquelle für lichtabhängige Prozesse direkt vor Ort (in situ) weiterverwendet, wobei eine genaue Kenntnis und Kontrolle der verwendeten optischen Parameter von enormem Vorteil ist. Mit einer möglichen Linearität der UC kann man unnötige, zu hohe Anregungsstrahlung gezielt vermeiden und notwendige Anregungsintensitäten genau berechnen. Durch die Potenzgleichung (2.15) lässt sich die Abhängigkeit der UC-Emission von der Anregungsintensität näherungsweise bestimmen:

$$P_{UC} = a \cdot I_{exc}^b \quad (2.15)$$

mit P_{UC} = Integral UC-Emission [cps]
 I_{exc} = Anregungsintensität [$\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$]
 a, b = freie Variablen

In Abbildung 5.2 wird diese Abhängigkeit der UC-Emission gegenüber der Anregungsintensität gezeigt. Wie in Abbildung 5.1 für eine Intensität dargestellt, wurden die Spektren der UC-Emission bei verschiedenen Anregungsintensitäten im Bereich von $10 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ bis $10 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (über drei Größenordnungen hinweg) aufgenommen. Die Emission der jeweiligen Strahlung wurde über das Integral des zugehörigen Peaks ermittelt. Bei der Phosphoreszenz von Pd-OEP wurde von $\lambda = 636 \text{ nm}$ bis 728 nm integriert, bei der UC-Fluoreszenz von $\lambda = 433 \text{ nm}$ bis 481 nm .

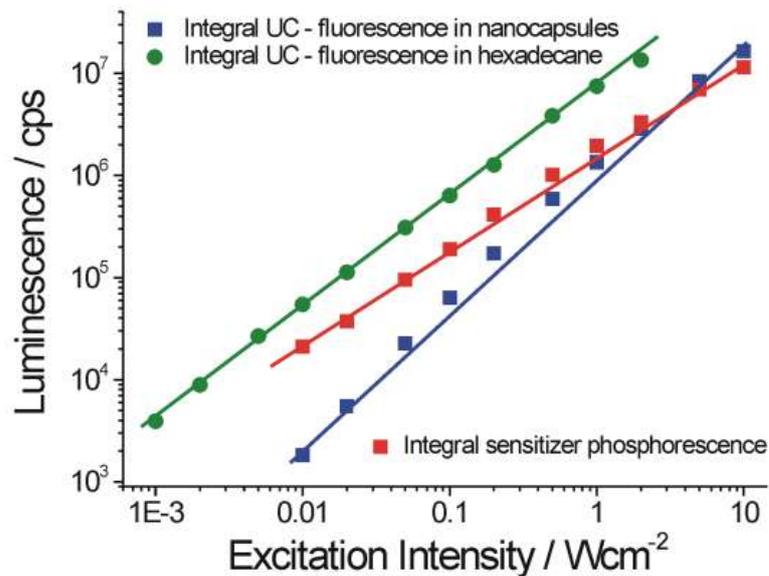


Abbildung 5.2: Abhängigkeit der UC-Emission (blau) und Phosphoreszenz (rot) von der Anregungsintensität ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$) gemessen in PSAA-Nanokapseln der ersten Generation, dispergiert in Wasser, mit Pd-OEP ($c = 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und Perylen ($c = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gelöst in HD als UC-Farbstoffe. Zum Vergleich wurde die Abhängigkeit der UC-Emission in reinem HD (grün) hinzugefügt (Werte mit 0,1 multipliziert um Vergleichbarkeit zu erreichen.^[169])

Wenn man die Gleichung einsetzt, beträgt $b = 1,32 \pm 0,1$ was einem sublinearen Bereich entspricht. Somit wurde, wie bereits in der Literatur für organische Lösungen^[14, 114] und viskose Materialien^[18] gezeigt, in Nanokapseln eine sublineare Abhängigkeit der UC-Emission über einen Anregungsbereich von mehreren Größenordnungen nachgewiesen.

Für eine Verwendung der Kapseln im biologischen Bereich musste die Farbstoffkonzentration im inneren hydrophoben Medium der Kapseln erhöht werden. Mit der bisherigen Konzentration von Pd-OEP ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und Perylen ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) war mit dem cLSM kein positiver Nachweis der TTA-UC möglich. Die Konzentration wurde schrittweise erhöht bis schließlich die Löslichkeitsgrenze der Farbstoffe in HD erreicht wurde. Dabei wurde das Verhältnis zwischen den beiden Farbstoffen von 1:10 (Pd-OEP:Perylen) konstant

gehalten. In Abbildung 5.3 werden die Kapseln mit ansteigender Farbstoffkonzentration bei gleich bleibenden Anregungsbedingungen ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$) miteinander verglichen. Grundsätzlich zeigt sich mit der Erhöhung der Farbstoffkonzentration ein Ansteigen der UC-Emission. Leichte Abweichungen kommen vermutlich durch unterschiedliche Feststoffgehalte der unterschiedlichen Ansätze zustande (Tabelle 5.1). Bei der eingesetzten Konzentration von $c = 7 \times 10^{-4}$ für Pd-OEP und $c = 7 \times 10^{-3}$ für Perylen sind in der Dispersion ausgefallene Farbstoffkristalle zu sehen, was auf die Überschreitung der Löslichkeitsgrenze hindeutet.

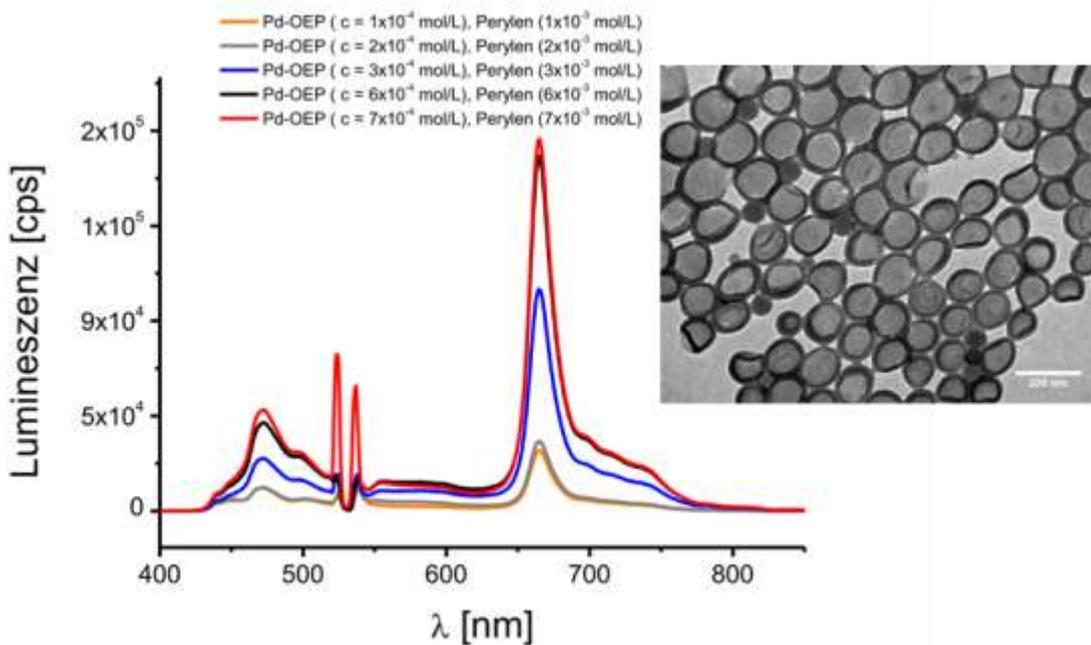


Abbildung 5.3: UC-Spektrum von Proben mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen in HD ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$) mit zusätzlicher TEM-Aufnahme von PSAA-32.

Diese Erhöhung der Farbstoffkonzentration hat keinen weiteren Einfluss auf die Kapselbildung, wie in Abbildung 5.3 (TEM-Aufnahme von PSAA-32) und Tabelle 5.1 gezeigt wird. Die DLS-Daten der verschiedenen Ansätze betragen alle ca. $d_i = 200 \text{ nm}$ mit leichten Abweichungen, was aber bei der Bildung von Kapselsystemen nicht zu vermeiden ist.

Tabelle 5.1: Analysedaten und eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der unvernetzten Kapseln.

Probe	Feststoffgehalt	$D_i (\pm \sigma)$ [nm]	Farbstoffe	
			Sensitizer c [mol·L ⁻¹]	Emitter c [mol·L ⁻¹]
PSAA-20	9,0%	204 (±20)	Pd-OEP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)
PSAA-24	10,1%	186 (±53)	Pd-OEP (2x10 ⁻⁴)	Perylen (2x10 ⁻³)
PSAA-26	9,1%	199 (±46)	Pd-OEP (3x10 ⁻⁴)	Perylen (3x10 ⁻³)
PSAA-30	10,8%	196 (±41)	Pd-OEP (5x10 ⁻⁴)	Perylen (5x10 ⁻³)
PSAA-33	9,0%	192 (±49)	Pd-OEP (6x10 ⁻⁴)	Perylen (7x10 ⁻³)
PSAA-32	10,2%	189 (±44)	Pd-OEP (7x10 ⁻⁴)	Perylen (7x10 ⁻³)
PSAA-42	9,7%	217 (±55)	Pd-TBP (7x10 ⁻⁴)	B-P-Dyad (7x10 ⁻³)
PSAA-55	11,5%	198 (±59)	Pd-TBP (7x10 ⁻⁴)	----
PSAA-74	10,9%	213 (±48)	Pd-TBP (7x10 ⁻⁴)	----
PSAA-75	10,6%	259 (±100)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)

Die Sublinearität der UC ist ebenfalls gegeben, welche in Abbildung 5.4 gemeinsam mit dem UC-Spektrum von PSAA-32 (höchste Farbstoffkonzentration von $c(\text{Pd-OEP}) = 7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und $c(\text{Perylen}) = 7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) bei verschiedenen Laserleistungen dargestellt ist. Die Sublinearität wurde über das Integral der UC-Emission (berechnet über die Frequenz) berechnet, welche gegen die Anregungsintensität aufgetragen wurde. Die Integralgrenzen werden nicht als Frequenz, sondern in der jeweiligen korrespondierenden Wellenlänge angegeben und wurden bei $\lambda = 433 \text{ nm}$ und $\lambda = 490 \text{ nm}$ gesetzt. Mit Hilfe von Formel (2.15) wurde für b ein Wert von $b = 1,279 \pm 0,02$ berechnet, was ebenfalls im sublinearen Bereich liegt.

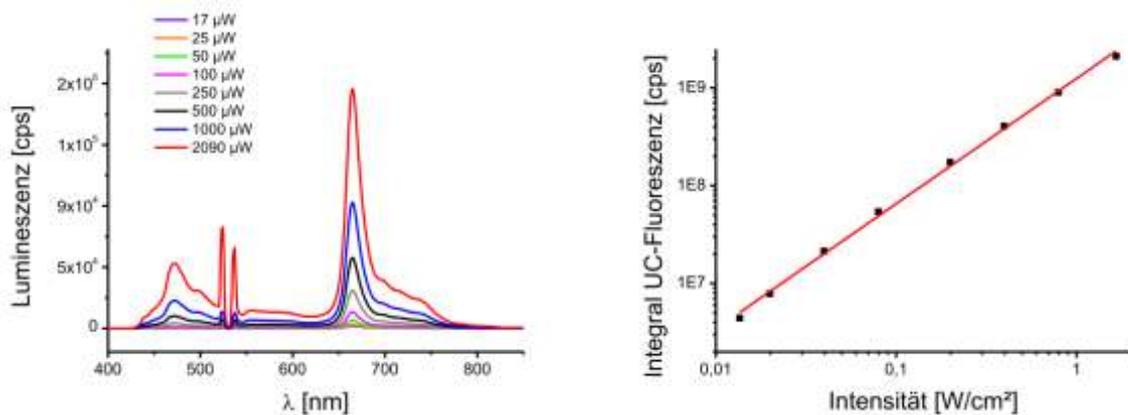


Abbildung 5.4: UC-Spektrum von PSAA-32 bei verschiedenen Anregungsstärken ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $c(\text{Pd-OEP}) = 7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und $c(\text{Perylen}) = 7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Durch die erreichte Konzentrationssteigerung der UC-Farbstoffe sind Aufnahmen der UC mit dem cLSM möglich. Um dies zu zeigen, wurden zunächst die Kapseln mittels Elektrosponnen in Fasern aus Polyvinylalkohol (PVA) eingesponnen. In Abbildung 5.5 zeigen REM- und TEM-Aufnahmen die in Fasern eingebetteten Kapseln. Die Fasern, bereits auf ein Deckglas gesponnen, wurden in der Glovebox innerhalb von 24 h vom Sauerstoff befreit, luftdicht versiegelt und anschließend mit dem cLSM auf UC-Emission untersucht.

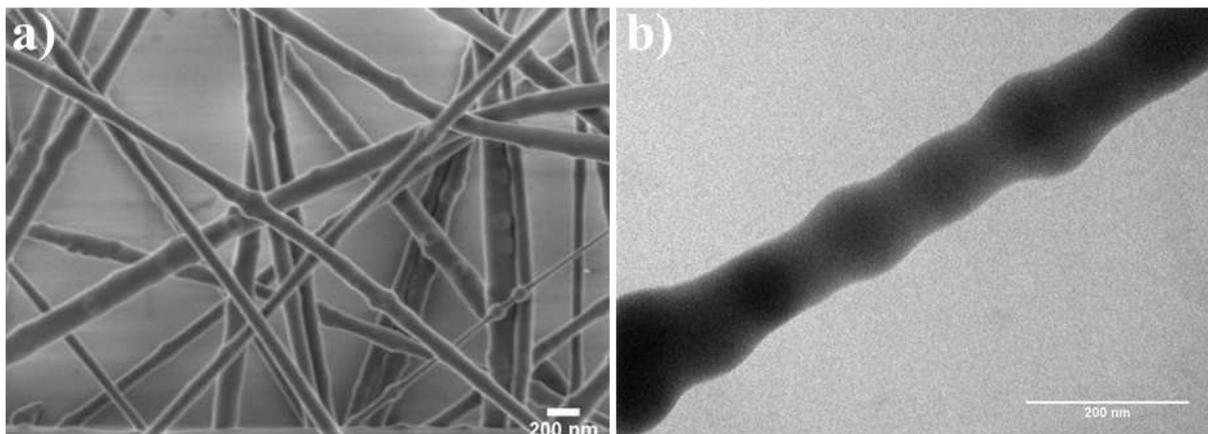


Abbildung 5.5: REM- (links) und TEM-Aufnahmen (rechts) von Nanokapseln in PVA-Fasern.

Zunächst wurde dabei nur das Perylen in den Kapseln mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 458$ nm angeregt. Die Emission wurde mit einem APD-Detektor gemessen. Aufgezeichnet wurden nur Wellenlängen im Bereich von $\lambda_{\text{det}} = 470-500$ nm, da ein Beamsplitter ($\lambda = 505$ nm) und ein anschließender Band-Pass-Filter ($\lambda = 470-500$ nm) vorgeschaltet waren. Der Transmissionsbereich des Bandpassfilters überlappt mit dem Emissionsbereich von Perylen, was in Abbildung 5.7 (Id) gezeigt wird.

Wie in Abbildung 5.6 auf dem linken Bild (a) dargestellt, ist eine deutliche Emission von Perylen (blau) aus den in den PVA-Fasern eingebetteten Nanokapseln zu erkennen. Die Anregung von Pd-OEP und einer dadurch resultierenden UC-Emission erfolgte, bedingt durch die Laserauswahl am cLSM, mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm. Diese entspricht eigentlich nicht dem Absorptionsmaximum von Pd-OEP (Abbildung 4.10), was automatisch einen Effizienzverlust zur Folge hat. Zur Detektion möglicher UC-Emission wurde ebenfalls der APD-Detektor mit Beamsplitter und Band-Pass-Filter verwendet ($\lambda_{\text{det}} = 470-500$ nm). Im rechten Bild (b) in Abbildung 5.6 ist die UC-Fluoreszenz der Nanokapseln gut erkennbar. Die Emissionen beider Bilder überlappen nahezu perfekt (hohe Kolokalisierung), was zeigt, dass sowohl UC als auch Fluoreszenz aus derselben Quelle, den Nanokapseln, stammt.

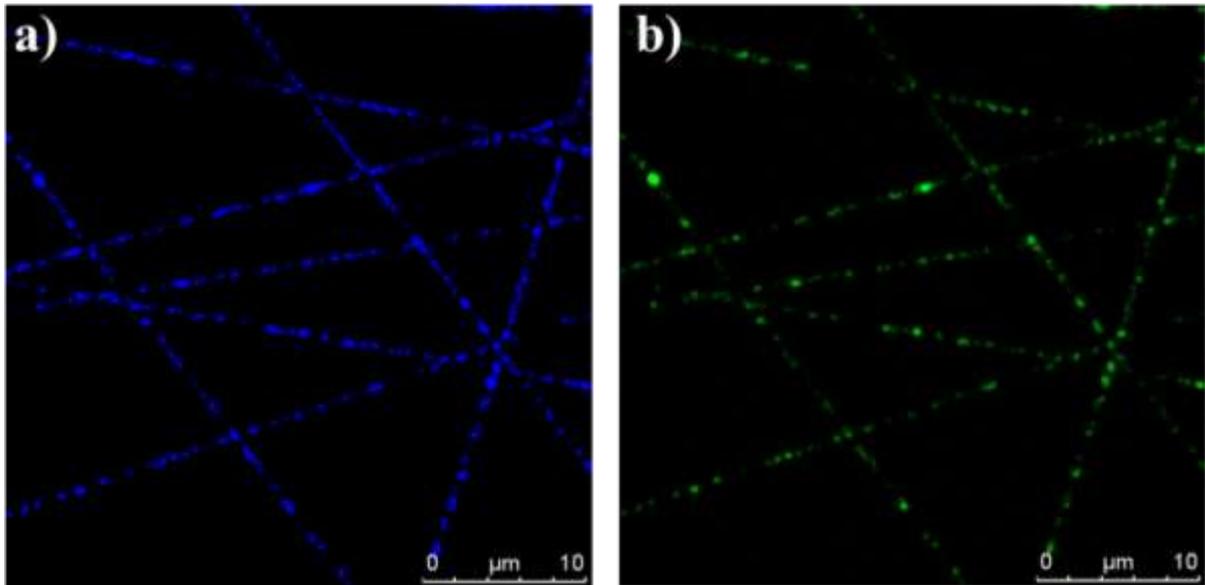


Abbildung 5.6: cLSM-Aufnahmen von UC-Nanokapseln in PVA-Fasern. Bild a): Normale Fluoreszenz von Perylen durch direkte Anregung, λ_{exc} : 458 nm (10% Laser Power), λ_{det} : 470-500 nm (APD Detektor mit Band-Pass-Filter). Bild b): UC-Fluoreszenz nach Anregung des Sensitizers bei λ_{exc} : 514 nm (50% Laser Power), λ_{det} : 470-500 nm (APD Detektor mit Band-Pass-Filter).

Da nachgewiesen wurde, dass TTA-UC der Nanokapseln im cLSM detektiert werden kann, wurden die ersten Zellexperimente durchgeführt. Für diese Zellexperimente wurden zunächst HeLa-Zellen ausgewählt, da diese sehr gut in der Literatur bekannt sind und als eine der ersten Zell-Linien überhaupt in Zellkulturen gezüchtet wurden. Des Weiteren sind verschiedene Mechanismen der schnell erfolgenden Aufnahme von Nanopartikeln und Nanokapseln bekannt.^[170] Zunächst wurden Nanokapseln hergestellt, in denen der Farbstoff PMI eingebettet wurde. Mit Hilfe der starken Fluoreszenz von PMI ($\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm) sollte die Aufnahme der Nanokapseln in HeLa-Zellen untersucht werden. In Abbildung 5.7 (IIb und IIc) wurde durch eine Transmissions- und Fluoreszenzaufnahme ($\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm) von lebenden HeLa-Zellen die erfolgreiche Partikelaufnahme bestätigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass fluoreszierende Nanokapseln innerhalb der Zelle im Cytoplasma, aber nicht im Kern, lokalisiert sind.

Auf Grund des negativen Einflusses von Sauerstoff auf den Prozess der TTA-UC wurden für den Nachweis der UC die Zellen mit 4%iger Formaldehydlösung auf einem Deckglas fixiert und anschließend in der Glovebox vom Sauerstoff befreit. Die Probe wurde luftdicht versiegelt und am cLSM untersucht.

In Abbildung 5.7 (IVa-d) wurde zum ersten Mal TTA-UC in Zellen nachgewiesen. Die cLSM-Bilder von fixierten HeLa-Zellen mit inkubierten Nanokapseln (PSAA-33) wurden mit drei verschiedenen Kanälen aufgenommen. In dem Fluoreszenzkanal „a“ wurde nur das

Perylen mit $\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$ angeregt und dessen direkte Fluoreszenz detektiert ($\lambda_{\text{det}} = 470\text{-}500 \text{ nm}$) (blau), um die Kapseln innerhalb der Zelle zu lokalisieren. Im TTA-UC-Kanal „b“ wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$ angeregt und im Bereich von $\lambda_{\text{det}} = 470\text{-}500 \text{ nm}$ die anti-Stokes verschobene TTA-UC-Emission (grün) aufgezeichnet.

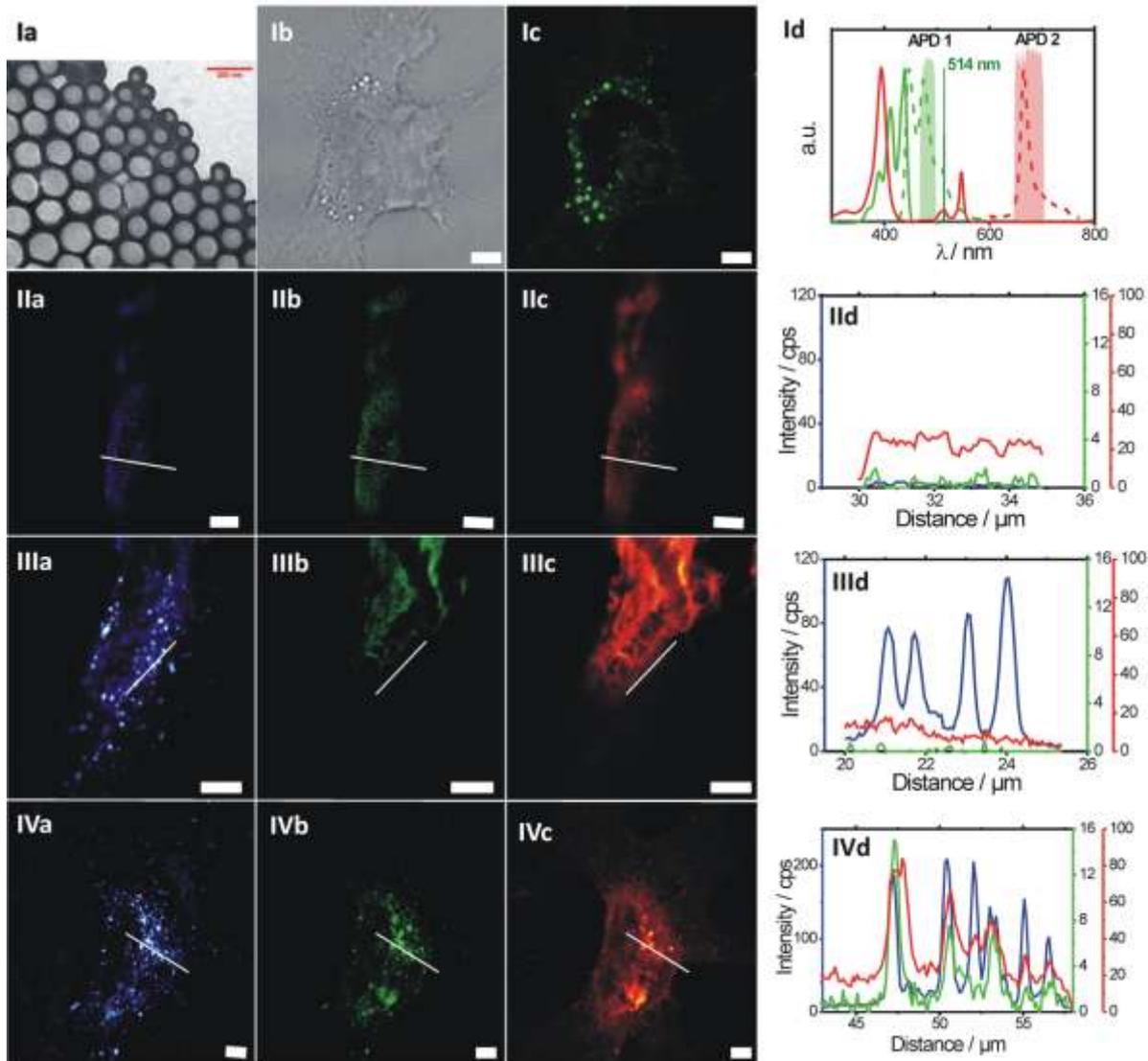


Abbildung 5.7:^[169] Ia: TEM Aufnahme von PSAA-33. Ib and Ic: Aufnahmen einer lebenden HeLa-Zelle mit PMI-gefärbten Nanokapseln (PSAA-21) im Transmissionskanal (Ib) und von der Fluoreszenz von PMI (Ic) (Anregung: λ_{exc} : 514 nm, Detektion: λ_{det} : 540-600 nm, PMT). Id: Schema der Anregungs- und Detektionswellenlängen der UC-Messungen.

IIa-d: Negativ Kontrolle von fixierten HeLa-Zellen ohne Nanokapseln.

IIIa-d: Negativ Kontrolle von Nanokapseln nur mit Perylen gefärbt, inkubiert in fixierte HeLa-Zellen.

IVa-d: UC-fähige Nanokapseln (mit Pd-OEP und Perylen, PSAA-33), inkubiert in fixierte HeLa-Zellen.

a – Fluoreszenzkanal: Anregung bei λ_{exc} : 458 nm, Detektion mit APD 1 bei λ_{det} : 470-500 nm

b – UC-Kanal: Anregung bei λ_{exc} : 514 nm, Detektion mit APD 1 bei λ_{det} : 470-500 nm

c – Phosphoreszenzkanal: Anregung bei λ_{exc} : 514 nm, Detektion mit APD 2 bei λ_{det} : 647-703 nm

d – Intensitätsprofil der verschiedenen Emissionen bezogen auf die markierte Linie in der zugehörigen Zellaufnahme.

Im Phosphoreszenzkanal „c“ wurde ebenfalls bei $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm angeregt und die Phosphoreszenz von Pd-OEP (rot dargestellt) zwischen $\lambda_{\text{det}} = 647-703$ nm gemessen. In IVd ist das Intensitätsprofil der drei Aufnahmen dargestellt welches sich auf die weiße Linie in den zugehörigen Bildern (IVa-IVc) bezieht. Die exakte Überlappung des UC-Signals (IV b) mit der Position der Nanokapseln (aus IVa erhalten) und der zusätzlich gemessenen Phosphoreszenz (IVc), ebenfalls überlappend, beweist die auftretende TTA-UC in den Zellen. Um sicher zu gehen, dass das UC-Signal nicht durch Autofluoreszenz, Streuung oder sonstige Effekte zustande kommt, wurden verschiedene Negativkontrollen durchgeführt. In IIa-d wurden Zellen ohne Nanokapseln, ebenfalls in den drei Kanälen (a-c), untersucht. Zwar ist eine schwache homogen verteilte Emission in allen Kanälen sichtbar, jedoch ist die Intensität der Signale (II d) sehr gering im Vergleich zu den Aufnahmen der Zellen mit Nanokapseln, bei denen stark lokalisierte Signale von Nanokapseln zu sehen sind. Diese schwache Emission resultiert hauptsächlich durch die Autofluoreszenz der HeLa-Zellen und durch Streuung des Anregungslichtes an den Zellen.

In IIIa-d wurden Nanokapseln, nur mit Perylen ausgestattet, in die Zellen inkubiert. Im Fluoreszenzkanal „a“ wurde nochmal die Partikelaufnahme bestätigt (vgl. Ic) und im UC-Kanal „b“ tritt nur eine homogene Emission auf, wie bereits bei der Negativkontrolle in (IIb), was eine mögliche Anregung von Perylen durch $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm ausschließt. Zusammenfassend schließen die beiden Negativkontrollen jegliche andere Effekte wie Autofluoreszenz oder Streuung aus, was die gemessene Emission in IVb zusätzlich als TTA-UC charakterisiert.

Nach dem erfolgreichen Nachweis von TTA-UC in fixierten Zellen soll dann der nächste Schritt erfolgen. Wie bereits oben erwähnt, sind fixierte Zellen keine lebenden Zellen. Diese Fixierung der Zellen war jedoch nötig, da zum Ausschluss des Sauerstoffs eine Lagerung der Zellen in der Glovebox unumgänglich war. Um den für lebende Zellen notwendigen Sauerstoff vom TTA-UC System fernzuhalten, wurde versucht, die Polymerhülle der Nanokapseln zu modifizieren.

Vernetzung der Polymerhülle

Durch eine Vernetzung des bisher verwendeten Copolymers PS-*co*-PAA mit Divinylbenzol (DVB) als Vernetzer soll eine Verdichtung der Polymerhülle erreicht werden, welche die Permeabilität von Sauerstoff verringert.

Als Grundlage für diese Versuche wurden verschiedene Gehalte an DVB (1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 45% vom Monomergemisch bei konstanter Gesamtmenge an Monomer) zur Ansatzmenge hinzugegeben und zunächst nur die Kapselbildung untersucht. Mit Tabelle 5.2 und den TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.8 ist ersichtlich, dass ein höherer Vernetzungsgrad keinen Einfluss auf die Kapselgröße hat. Die verschiedenen DLS-Messungen liegen alle sehr konstant innerhalb eines Bereichs von $d_i = 200$ nm.

Tabelle 5.2: Analysedaten der vernetzten Nanokapseln mit unterschiedlichem Anteil an DVB.

Probe	Anteil DVB	Feststoffgehalt	$D_i (\pm \sigma)$ [nm]
PSAA-27	1%	10,8%	201 (\pm 56)
PSAA-28	3%	9,9%	200 (\pm 43)
PSAA-29	5%	12,2%	195 (\pm 41)
PSAA-37	3%	10,1%	191 (\pm 48)
PSAA-38	10%	11,2%	199 (\pm 42)
PSAA-39	20%	12,2%	199 (\pm 50)
PSAA-40	30%	12,6%	204 (\pm 50)
PSAA-47	45%	12,0%	201 (\pm 39)

Bei den verschiedenen TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.8 lassen sich ebenfalls kaum strukturelle Unterschiede ausmachen. Am ehesten kann man sagen, dass die Kapselmorphologie mit steigendem DVB-Gehalt etwas besser wird, da die Zahl an reinen Partikeln etwas geringer wird.

Ab einem Anteil von 30% DVB lassen sich in der Kapselmitte dunkle Stellen erkennen, welche bei 45% Anteil nochmals deutlicher zu sehen sind. Diese dunklen Stellen kommen vermutlich durch den höheren Vernetzungsgrad und somit die höhere Dichte des Polymers zustande, was folglich eine erhöhte Streuung der transmittierenden Elektronen zur Folge hat.

In die Kapseln mit höchstem Vernetzungsgrad wurden die UC-Farbstoffe in der höchstmöglichen Konzentration (Pd-OEP $c = 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Perylen $c = 6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) verkapselt. In Abbildung 5.9 ist das zugehörige UC-Spektrum bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm abgebildet. Die Abhängigkeit der UC-Fluoreszenz von der Anregungsintensität ergibt mit Gleichung (2.15) einen Wert $b = 1,59 \pm 0,02$ und liegt somit im sublinearen Bereich.

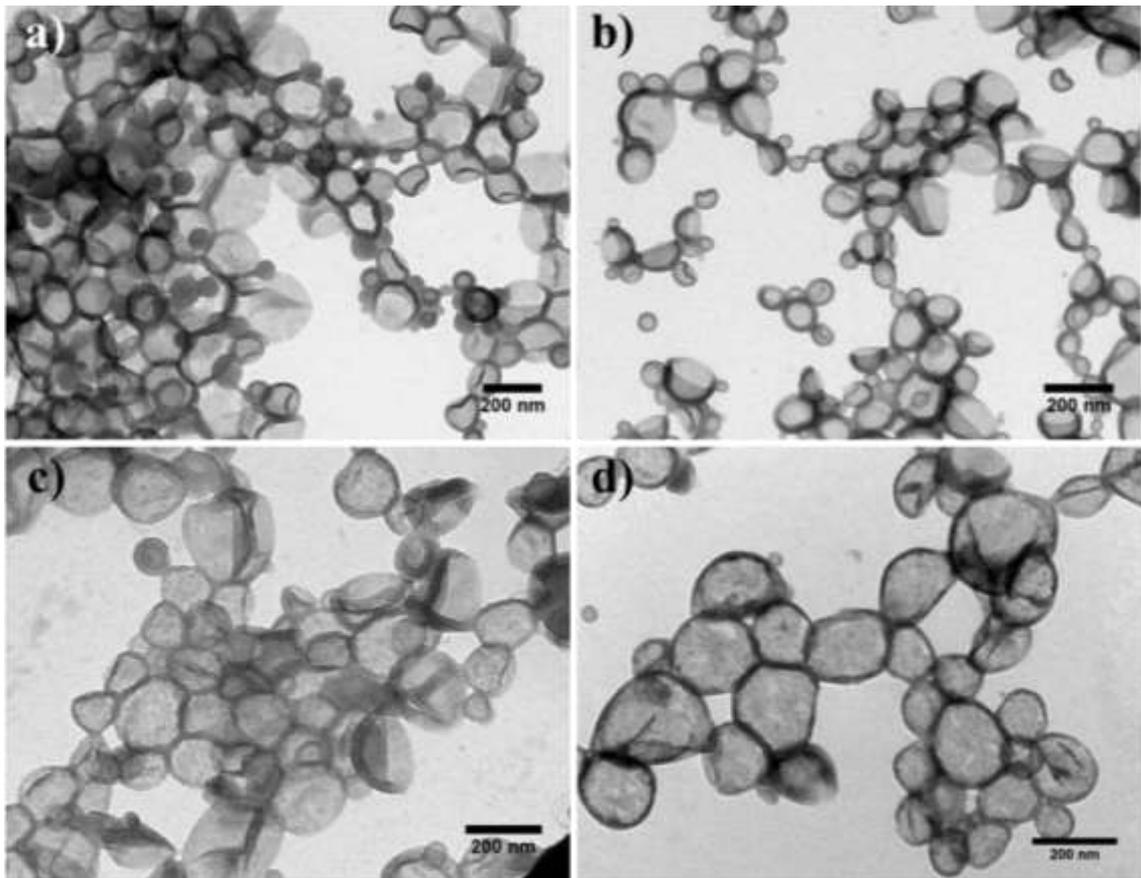


Abbildung 5.8: TEM-Aufnahmen von vernetzten Kapseln. Bild a): PSAA-37 (3% DVB), Bild b): PSAA-38 (10% DVB), Bild c): PSAA-40 (30% DVB), Bild d): PSAA-47 (45% DVB).

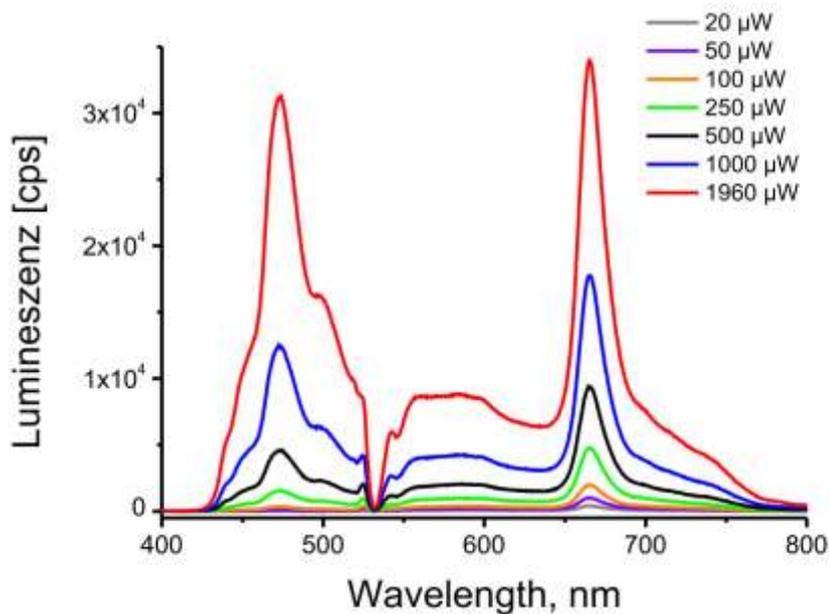


Abbildung 5.9: UC-Spektrum von PSAA-47 bei verschiedenen Laserstärken ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$).

Da mit diesen vernetzten Kapseln eine geringere Sauerstoffpermeabilität erreicht werden sollte, wurde das Signalverhalten der UC und der Phosphoreszenz über einen längeren

Zeitraum ($t = 300$ s) untersucht. In den Graphen (Abbildung 5.10) wird dann das Verhalten einer Wellenlänge, meistens das jeweilige Maximum der entsprechenden Peaks (UC und Phosphoreszenz), gegenüber der Zeit dargestellt. In Abbildung 5.10 zeigt der Graph (a) das Verhalten der UC- und Phosphoreszenzemission der unvernetzten Proben von PSAA-32 unter luftdichten Bedingungen (versiegeltes Probengefäß). Direkt daneben (b) ist das Verhalten der vernetzten Probe PSAA-47 bei sauerstofffreien Bedingungen gezeigt. Beide Proben zeigen sowohl bei Phosphoreszenz als auch bei UC, nach kleinem Signalabfall zu Beginn (bis ca. 50 s) eine gute Langzeitstabilität mit nur sehr schwach abfallendem Signal.

Ebenfalls in Abbildung 5.10 sind die Graphen des Signalverhaltens beider Proben an Luft dargestellt. Zur Durchführung dieses Experiments wurden drei Tropfen aus dem luftdicht verschlossenen Gefäß entnommen, auf einen Objektträger getropft und sofort mit der Messung begonnen. Zu Beginn des Experiments sollte sich eigentlich kein Sauerstoff in den Kapseln befinden, der dann aber im Laufe der Zeit durch die Polymerhülle in das Kapselinnere eindringt und als Quencher die beiden Signale abschwächt.

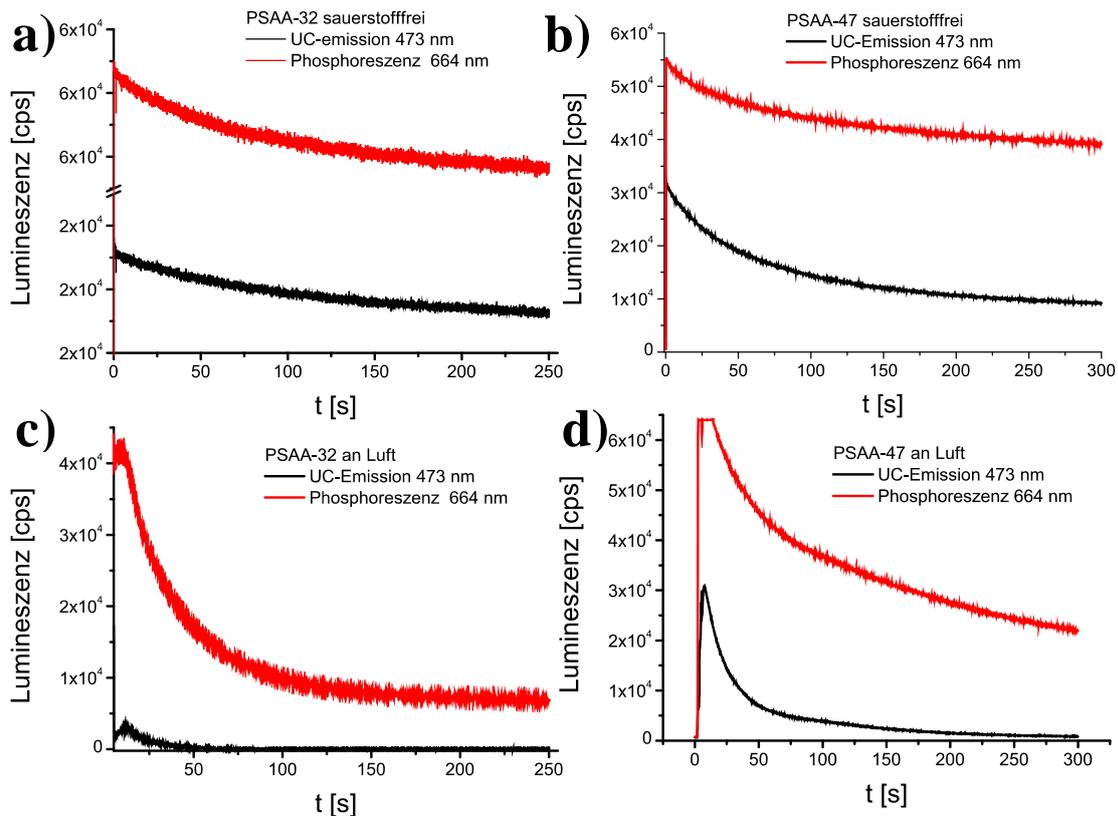


Abbildung 5.10: Kinetikmessungen der UC- und Phosphoreszenzemission von PSAA-32 und PSAA-47 ($\lambda_{exc} = 532$ nm). Bild (a): Probe mit unvernetzter Polymerhülle (PSAA-32) unter sauerstofffreien Bedingungen, Bild (b): Probe mit vernetzter Polymerhülle (PSAA-47) unter sauerstofffreien Bedingungen, Bild (c): Probe mit unvernetzter Polymerhülle (PSAA-32) an Luft gemessen, Bild (d): Probe mit vernetzter Polymerhülle (PSAA-47) an Luft.

Bei der vernetzten Probe PSAA-47 (Bild (d), Abbildung 5.10) ist im Vergleich zur unvernetzten Probe PSAA-32 (Bild c) zu Beginn bereits ein größeres Signal sichtbar. Während bei der unvernetzten Probe das Signal der UC bereits nach 25 s fast vollständig verschwunden ist, kann man bei der vernetzten Probe nach 150 s ein Signal der UC-Fluoreszenz erkennen. Die Abnahme der Phosphoreszenz ist beim vernetzten Polymer deutlich langsamer als beim unvernetzten. Bei beiden Proben ist kurz nach Beginn der Messung zunächst ein kleiner Anstieg zu sehen. Dieser begründet sich vermutlich durch bereits in die Kapsel eingedrungenen Sauerstoff, der aber unter der Lasereinstrahlung mit dem Sensitizer reagiert und somit nicht mehr zum Quenchen der TTA-UC zur Verfügung steht. Sobald jedoch der Sauerstoff in der Kapsel überhandnimmt, fällt das Signal der UC und Phosphoreszenz ab. Da dieser Abfall bei der vernetzten Probe deutlich langsamer fortschreitet, ist eine geringere Permeabilität von Sauerstoff durch die vernetzte Kapselhülle festzustellen als bei der unvernetzten Kapselhülle.

Neuer Sensitizer

In den bisherigen Systemen beschränkte sich die Auswahl der Farbstoffe auf Pd-OEP als Sensitizer und Perylen als Emitter. Um aber, wie bereits in der Einleitung erwähnt, eine für biologische Anwendungen grundsätzlich wichtige Voraussetzung zu erfüllen, muss die Anregungswellenlänge des Sensitiveers in den roten/NIR Bereich des Spektrums verschoben werden. Durch solch eine Verschiebung findet eine Überlappung mit dem natürlichen Transparenzfenster von menschlicher Haut und Gewebe statt, wodurch ein tieferes Eindringen der Anregungsquelle ermöglicht wird und weniger Streuung resultiert. Die optimale Anregungswellenlänge (Absorptionsmaximum) des bisher verwendeten Sensitiveers Pd-OEP liegt bei $\lambda_{\text{exc}} = 547$ nm. Durch den Einsatz eines neuen Sensitiveers, meso-Tetraphenyl-tetrabenzoporphyrin-Palladiumkomplex (Pd-TBP, Abbildung 4.9) dessen Anregungswellenlänge bei $\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm liegt, wird eine Verschiebung von ca. $\Delta\lambda = 90$ nm in Richtung des Transparenzfensters erreicht. Als korrespondierender Emitter kann weiterhin Perylen verwendet werden.

Zur Herstellung der Nanokapseln mit Pd-TBP wurde lediglich der Sensitizer ausgetauscht. Auf die Kapselgröße und Morphologie hatte dieser Austausch des Farbstoffes keinen Einfluss (Tabelle 5.1). In Abbildung 5.11 ist das UC-Spektrum des Ansatzes PSAA-42 dargestellt. Trotz der maximalen Konzentration an eingesetztem Farbstoff ist kaum eine UC-Emission und nur eine geringe Phosphoreszenz zu erkennen.

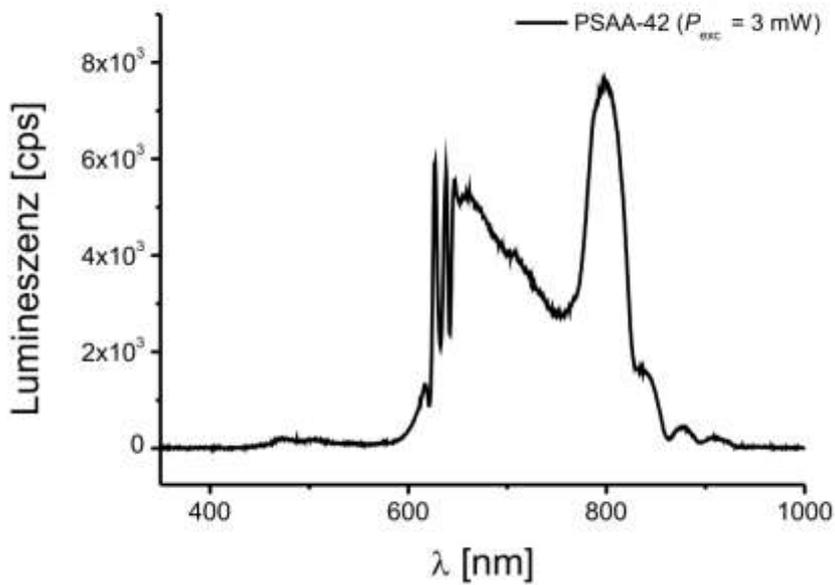


Abbildung 5.11: UC-Spektrum von PSAA-42 ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$).

Dieses Resultat, vor allem die geringe Phosphoreszenz, lässt auf eine Zerstörung des Farbstoffes Pd-TBP während des Kapselbildungsprozess schließen. Mittels UV-VIS-Messungen sollte diese Vermutung bestätigt werden. Dazu wurden Kapseln hergestellt, welche nur mit Pd-TBP ($c = 6 \times 10^{-4}$) beladen sind (PSAA-74). Von diesem Ansatz wurde 3 Proben entnommen: Eine vor dem Homogenisieren mit dem Ultraschallstab (PSAA-74XX), eine nach dem Homogenisieren, aber vor der Initiierung der radikalischen Polymerisation (PSAA-74X) und eine nach der radikalischen Polymerisation nach 18 h bei 72 °C. Durch die Entnahme zu verschiedenen Zeitpunkten im Produktionsprozess sollte die Ursache der Zerstörung ermittelt werden. Entnommen wurde jeweils 1 mL der jeweiligen Emulsion (PSAA-74XX), Miniemulsion (PSAA-74X) und Dispersion (PSAA-74). Die entnommene Probe wurde gefriergetrocknet und der Rückstand wurde in 4 mL THF gelöst.

Die Aufnahmen der jeweiligen Absorptionsspektren sind in Abbildung 5.12 dargestellt. Bereits anhand des Spektrums kann man feststellen, dass nach der Polymerisation ein Großteil des Pd-OEP zerstört wurde. Mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes (Gleichung (3.4)) konnte die genaue Konzentration des Farbstoffes errechnet werden:

$$A = \lg \frac{I}{I_0} = b \cdot c \cdot \varepsilon \quad (3.4)$$

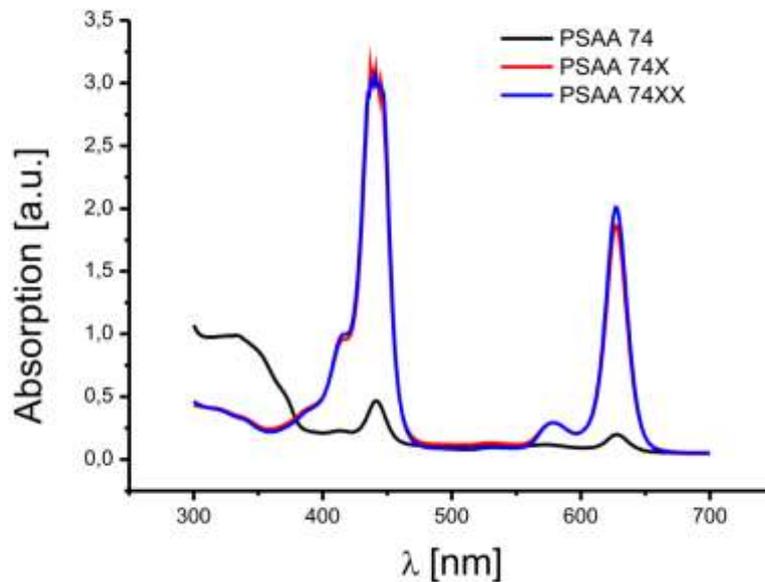


Abbildung 5.12: Absorptionsspektrum von PSAA-74 → Zerstörung von Pd-TBP

Dazu wurde zunächst der Extinktionskoeffizient von zwei verschiedenen Wellenlängen mit Hilfe einer Lösung mit bekannter Konzentration (reines Pd-TBP in Toluol mit $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Abbildung 4.10) berechnet. Die Werte der Extinktionskoeffizienten für die beiden Absorptionsmaxima bei $\lambda = 443 \text{ nm}$ und $\lambda = 628 \text{ nm}$ betragen $\varepsilon_{443} = 257388 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ und $\varepsilon_{628} = 101066 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. Daraus und mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten aus Abbildung 5.12 wurden die jeweiligen Farbstoffkonzentrationen berechnet und in Tabelle 5.3 dargestellt. Die theoretische Konzentration wurde mittels eingewogener Konzentration und des theoretischen Feststoffgehaltes berechnet. Bei den beiden Proben vor der radikalischen Polymerisation entspricht die Farbstoffkonzentration in beiden Fällen der theoretischen Konzentration. Bei der Probe nach der radikalischen Polymerisation ist die Konzentration von Pd-TBP um eine Größenordnung kleiner geworden, was einer Zerstörung von ca. 90% des Farbstoffes entspricht.

Tabelle 5.3: Berechnung der Farbstoffkonzentration von PSAA-74.

Probe	A_{443}	$c \text{ [mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	A_{628}	$c \text{ [mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	Theoretische Konz. $\text{[mol} \cdot \text{L}^{-1}]$
PSAA-74XX	2,966	1,2E-05	2,005	2,0E-05	2,0E-05
PSAA-74X	2,995	1,2E-05	1,858	1,8E-05	
PSAA-74	0,459	1,8E-06	0,199	2,0E-06	

Auf Grund dieser Zerstörung von Pd-TBP durch die radikalische Polymerisation sind eine weitere Verkapselung des Farbstoffes und eine daraus resultierende effiziente TTA-UC nicht möglich. Um Pd-TBP als Sensitizer für TTA-UC in Nanokapseln zu verwenden, muss ein anderer Weg zur Darstellung der Nanokapseln verwendet werden.

Neues hydrophobes Medium

In den bisherigen Ansätzen wurde bereits die Löslichkeitsgrenze der Farbstoffe in Hexadekan erreicht. Durch die Wahl eines anderen hydrophoben Mediums soll die Löslichkeit der Farbstoffe erhöht werden, um somit ein deutlich besser detektierbares UC-Signal zu erhalten. Da die verwendeten Farbstoffe meistens einen aromatischen Teil aufweisen, liegt es nahe, einen aromatischen Teil mit einer langen Kohlenstoffkette (wie bei HD) zu kombinieren. Diese Eigenschaften werden bei Phenylheptadekan (PHD) erfüllt und ermöglichen eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration von Pd-OEP (bisher $c = 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) auf $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und von Perylen (bisher $c = 6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) auf $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Durch diese Erhöhung der Farbstoffkonzentration kann ein höheres Signal der UC-Emission erreicht werden. Die Verwendung hat PHD als neues hydrophobes Medium hat auf die Kapselbildung keinen störenden Einfluss. Die DLS-Werte von PSAA-75 (Tabelle 5.1) zeigen eine geringfügige Erhöhung der Kapselgröße auf ca. 250 nm an. Aufgrund des starken hydrophoben Charakters von PHD sind auf Grund ähnlicher Grenzflächenspannungen mit HD keine Schwierigkeiten im Bildungsprozess der Kapseln zu erwarten. TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.13 (links) bestätigen die mit PHD erhaltene Kern-Hülle-Morphologie und eine Größe der Nanokapseln von 250 nm. Als Polymerhülle wurde das unvernetztes Copolymer PS-co-PAA verwendet.

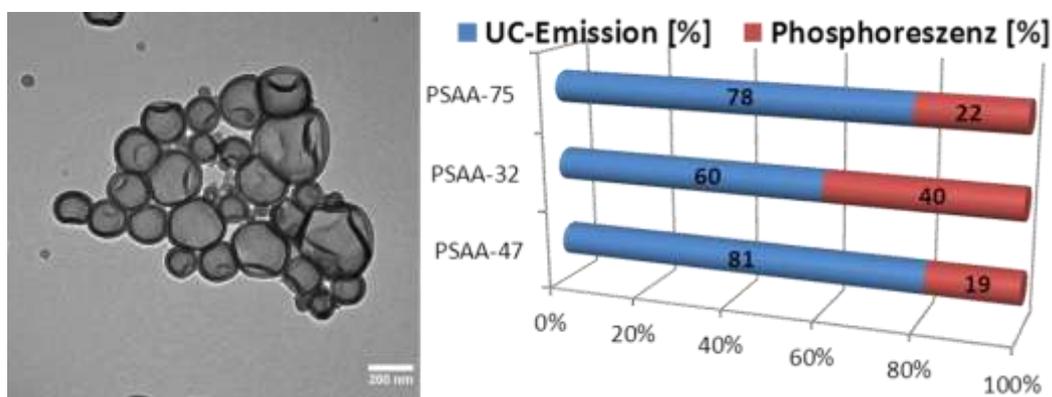


Abbildung 5.13: TEM-Aufnahme von PSAA-75 (links) und Vergleich der UC-Effizienzen der unterschiedlichen Kapseln der 1. Generation (rechts).

In Abbildung 5.14 ist das UC-Spektrum von PSAA-75 (grün) dargestellt. Zum Vergleich wurden Spektren mit HD als Hydrophob der vernetzten (PSAA-47, schwarz) und unvernetzten (PSAA-33, rot) Polymerhüllen eingefügt. Bei gleicher Anregungsstärke von 2 mW und einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm zeigt PSAA-75 mit neuem hydrophoben Medium PHD und somit erhöhter Farbstoffkonzentration ein deutlich höheres UC-Signal als die beiden Vergleichsproben mit geringerer Farbstoffkonzentration. Die genauen Werte der Integrale der UC-Emission (Grenzen: $\lambda = 433$ -505 nm) sind ebenfalls in Abbildung 5.14 dargestellt. Das Integral der UC-Emission von PSAA-75 ist ca. dreimal größer als die der beiden Vergleichsproben, was vor allem auf die erhöhte Farbstoffkonzentration zurückzuführen ist.

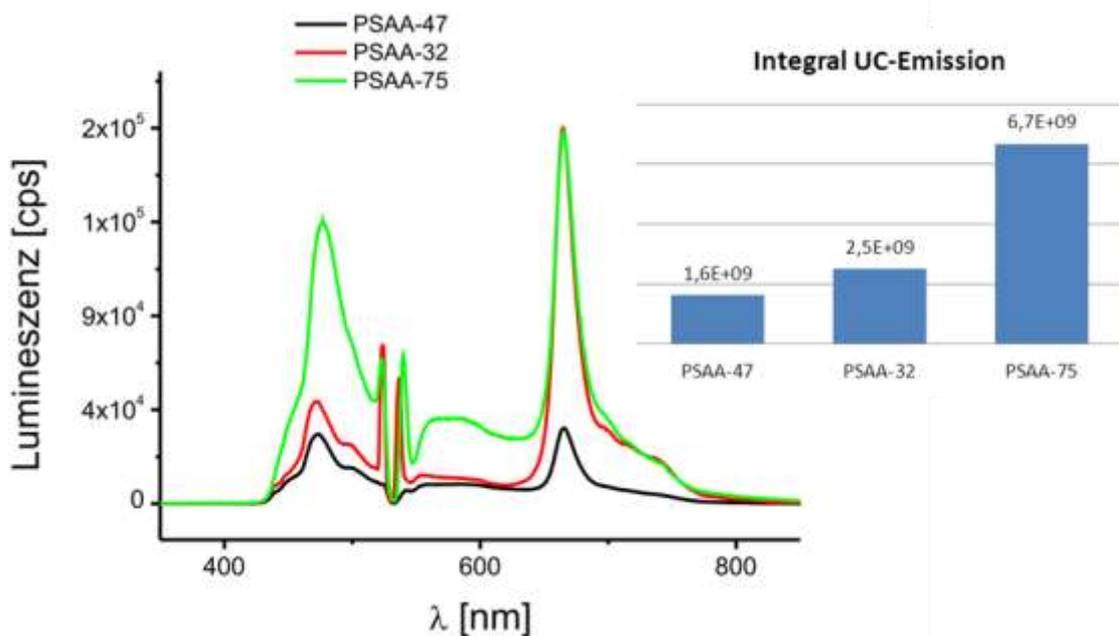


Abbildung 5.14: UC-Spektrum von PSAA-75 (grün), PSAA-32 (rot) und PSAA-47 (schwarz) ($\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm, $P_{\text{exc}} = 2$ mW). Zusätzlich sind die Werte der UC-Integrale der verschiedenen Kapseln angegeben.

In Abbildung 5.13 ist ein Vergleich der relativen Effizienzen der UC von verschiedenen Proben gezeigt. Es wurden die Integrale der UC-Emission (Grenzen: $\lambda = 433$ -505 nm) und der Phosphoreszenz (Grenzen: $\lambda = 636$ -728 nm) über die Frequenz (nicht Wellenlänge) berechnet. Wenn man davon ausgeht, dass alle eingestrahnten Photonen entweder als Phosphoreszenz oder UC resultieren, kann man die Effizienz des UC-Prozess berechnen. Da pro resultierendes UC-Photon zwei eingestrahlte Photonen verbraucht werden, muss das UC-Integral mit dem Faktor zwei multipliziert werden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Photonen, welcher als UC-Emission oder als Phosphoreszenz emittiert. Bei den beiden Proben PSAA-47 und PSAA-75 wurde eine Effizienz von ca. 80% erreicht, während bei PSAA-32 nur eine 60% ige

Effizienz vorhanden ist. Bei PSAA-47 ist dies durch die verbesserte Kapselmorphologie zu erklären, bei PSAA-75 durch den größeren Kapseldurchmesser und, da PHD nochmals hydrophober ist als HD, durch die bessere Phasenseparation zur Ausbildung der Kapseln.

5.1.1 Zusammenfassung Kapseln erster Generation

Aufbauend auf den ersten erfolgreichen Experimenten aus meiner Diplomarbeit, wurde in der vorliegenden Doktorarbeit nochmals erfolgreich nachgewiesen, dass TTA-UC in Wasser dispergierten Nanokapseln möglich ist, was die hohe und einfache Reproduzierbarkeit des Systems beweist. Zusätzlich konnte der erfolgreiche Nachweis der sublinearen Abhängigkeit der TTA-UC, welche zuvor für organische Lösungsmittel erbracht wurde, in den Nanokapseln gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Farbstoffkonzentration im hydrophoben Medium Hexadekan auf das Maximum erhöht. Durch diese Steigerung waren erfolgreiche Experimente mit dem cLSM möglich. TTA-UC konnte, unter Ausschluss von Sauerstoff, in PVA-Fasern und zum ersten Mal in fixierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde mit der Vernetzung der Polymerhülle der Kapseln mit DVB eine geringere Permeabilität von Sauerstoff erreicht. Mit der Einführung des hydrophoben Mediums PHD konnte eine weitere Steigerung der Farbstoffkonzentration bewirkt werden. Außerdem wurde beschrieben, dass die Kapseln der 1. Generation, hergestellt durch radikalische Miniemulsionspolymerisation, nicht geeignet sind, andere Sensitizer, z.B. Pd-TBP, zu verkapseln. Beim Versuch, Pd-TBP zu verkapseln, wurde eine fast vollständige Zerstörung des Sensitizers nachgewiesen. Durch diese Einschränkung in der Wahl der Farbstoffe soll im Folgenden das Augenmerk auf einen Herstellungsprozess gelegt werden, der wesentlich schonender von statten geht und somit die Auswahl der eingesetzten Farbstoffe nicht beeinträchtigt. Außerdem wird versucht, die TTA-UC von Nanokapseln in lebenden Zellen zu detektieren.

5.2 Kapseln der zweiten Generation

Bei den Kapseln der 2. Generation wurde ausschließlich ein neuer, aber ebenfalls auf Miniemulsion basierender Herstellungsprozess für die UC-Nanokapseln verwendet. Da während des neuen Bildungsprozesses der Kapseln keine chemische Reaktion stattfindet und, je nach Lösungsmittel, keine hohen Temperaturen benötigt werden, ist die Methode der Lösungsmittelverdampfung mit ihren schonenden Bedingungen hervorragend geeignet, um sensitive Farbstoffe zu verkapseln. Die Phasenseparation zwischen ausfallendem Polymer und hydrophoben Medium findet während der Verdampfung des Lösungsmittels statt und ist somit nur physikalisch gesteuert. Durch die Anwendung dieses Prozesses soll die Verwendung von weiteren UC-Farbstoffen ermöglicht werden. In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Polymere als Kapselhülle verwendet, welche unterschiedliche Einflüsse auf das Verhalten der TTA-UC im Kapselinneren zeigen.

In Tabelle 5.4 sind die Analysenergebnisse der eingesetzten Polymere dargestellt. Die Molekulargewichte und die Polydispersität (M_w , M_n , PDI) wurden mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmt, während für die jeweiligen Anteile der Monomere, bzw. das Verhältnis der verschiedenen Blöcke im Polymer mit NMR berechnet wurde. Für das statistische Copolymer wurde ein Verhältnis der Einheiten Styrol : PMMA von 86 : 14 (mol%) bestimmt. Beim Blockcopolymer beträgt der Anteil des PS-Blocks 48% (mol), der von PMMA 52% (mol). Das Molekulargewicht von PMMA wurde vom Hersteller angegeben.

Tabelle 5.4: Analysedaten der Polymere für den Lösungsmittelverdampfungsprozess.

Polymer	M_w [g·mol ⁻¹]	M_n [g·mol ⁻¹]	PDI
P(S _{0,48} - <i>b</i> -MMA _{0,52})	37,250	35,400	1.1
P(S _{0,86} - <i>stat</i> -MAA _{0,14})	30,150	11,600	2.6
PMMA	120000	----	----

In den folgenden Abschnitten werden die Ansätze mit den verschiedenen Polymeren dargestellt. Zunächst wird jeweils die Kapselbildung untersucht und dann auf UC-Emission untersucht.

5.2.1 Statistisches Copolymer P(S_{0,86}-*stat*-MAA_{0,14})

Zunächst wurde die Kapselbildung mit dem statistischen Copolymer P(S_{0,86}-*stat*-MAA_{0,14}) getestet. Die Ansätze SE-16-01 bis SE-16-04 unterscheiden sich in aufsteigenden

Feststoffgehalten von 5% (SE-16-01) bis 16% (SE-16-04) (Tabelle 5.5). Durch die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.15 kann man einen Einfluss auf die Morphologie der Kapselbildung ausschließen, lediglich die Kapselgröße steigt von ca. $d_i = 200$ nm (SE-16-01) auf ca. $d_i = 300$ nm (SE-16-04) wie mit Hilfe der DLS-Werte in Tabelle 5.5 zu erkennen ist.

Tabelle 5.5: Analysedaten und eingesetzte Farbstoffmengen der Ansätze mit $P(S_{0,86}\text{-stat-MAA}_{0,14})$.

Probe	Feststoffgehalt	$D_i (\pm \sigma)$ [nm]	Farbstoffe	
			Sensitizer c [mol·L ⁻¹]	Sensitizer c [mol·L ⁻¹]
SE-16-01	5%	194 (±33)	Pd-OEP (1×10^{-3})	Perylen (1×10^{-2})
SE-16-02	6%	214 (±43)	Pd-OEP (1×10^{-3})	Perylen (1×10^{-2})
SE-16-03	9%	246 (±58)	Pd-OEP (1×10^{-3})	Perylen (1×10^{-2})
SE-16-04	16%	310 (±72)	Pd-OEP (1×10^{-3})	Perylen (1×10^{-2})
SE-16-05	10%	243 (±44)	Pd-OEP (1×10^{-3})	Perylen (1×10^{-2})
SE-16-06	10%	241 (±55)	Pd-TBP (1×10^{-3})	Perylen (1×10^{-2})

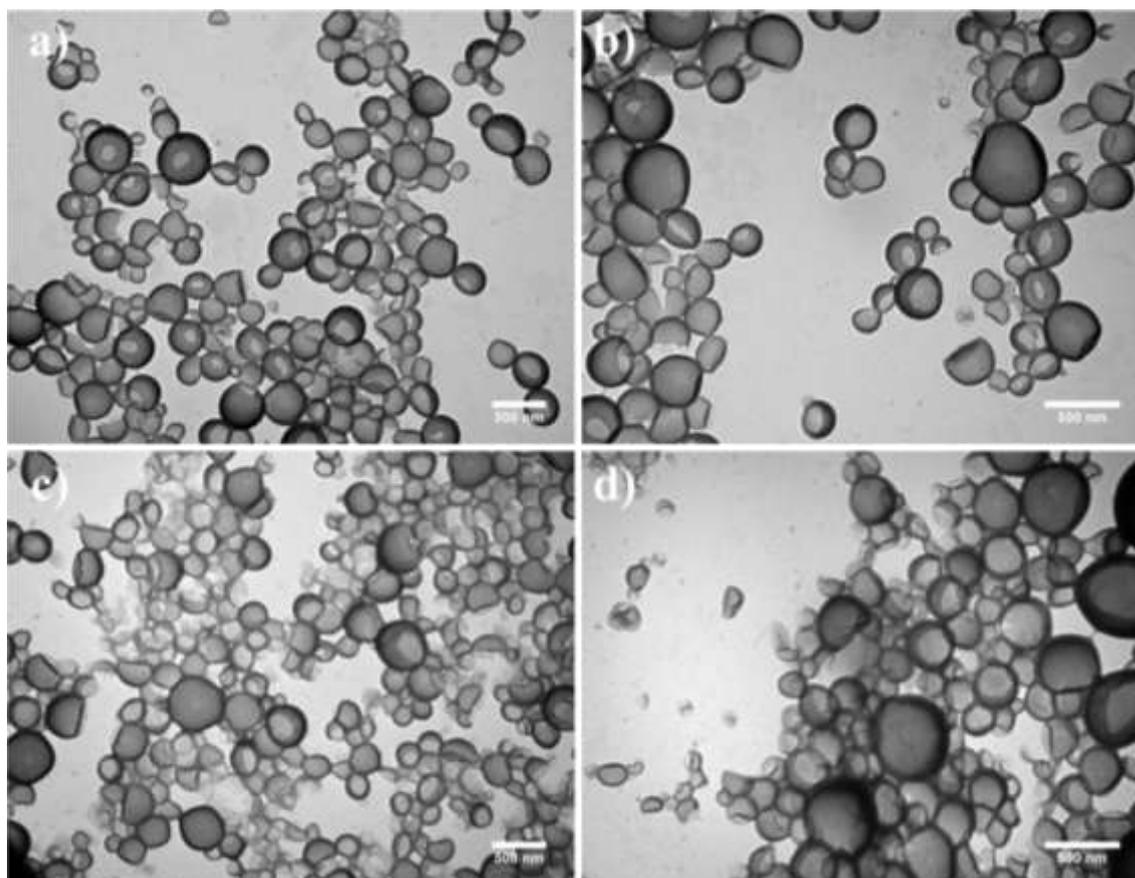


Abbildung 5.15: Bild a): SE-16-01 (5% Feststoffgehalt); Bild b): SE-16-02 (6% Feststoffgehalt); Bild c): SE-16-03 (9% Feststoffgehalt); Bild d): SE-16-04 (16% Feststoffgehalt).

Die Messung der UC der Proben 16-01 bis 16-04 mit dem Farbstoffpaar Pd-OEP/Perylen ist in Abbildung 5.16 im linken Diagramm dargestellt. Zwar wurde bei allen Proben UC-Emission gemessen, jedoch ist ein deutlicher Peak der Phosphoreszenz zu sehen. Die Erhöhung des Feststoffgehaltes wirkt sich wie erwartet auf die Signalstärke der Gesamtlumineszenz (Phosphoreszenz und UC-Fluoreszenz) aus. Bei hohem Feststoffgehalt wird eine höhere Emission detektiert als bei geringeren Feststoffgehalten, was aus der Messung des Integrals der UC-Emission in Abbildung 5.16. hervorgeht.

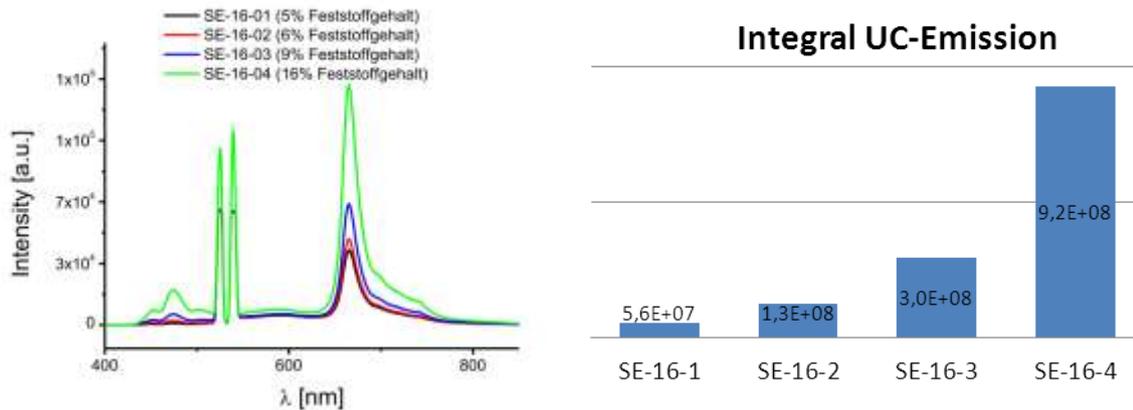


Abbildung 5.16: UC-Spektren der Proben 16-01 bis 16-04. Links: Aufsteigende Feststoffgehalte von 16-01 bis 16-04. Die Anregungswellenlänge beträgt $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ bei $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$ und einer Farbstoffkonzentration von $c(\text{Pd-OEP}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und $c(\text{Perylen}) = 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Rechts: Integralwerte der UC-Emission von $\lambda = 433\text{-}505 \text{ nm}$ der Ansätze SE-16-1 bis SE-16-04.

Neben Pd-OEP wurde auch Pd-TBP (SE-16-06) als Sensitizer eingesetzt. In Abbildung 5.17 wurde im linken Diagramm das UC-Spektrum der Ansätze SE-16-05 (mit Pd-OEP) und SE-16-06 dargestellt, wobei sich beide Ansätze nur in der Wahl der Farbstoffe unterscheiden. Bei 16-06 wurde mit $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ und einer Laserleistung von $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$ angeregt entsprechend dem Einsatz von Pd-TBP als neuem Sensitizer. Am starken Signal der Phosphoreszenz von Pd-TBP (SE-16-06, blau) im Wellenlängenbereich von $\lambda \approx 800 \text{ nm}$ kann man erkennen, dass der Farbstoff, im Vergleich zu den Ansätzen der 1. Generation, nicht zersetzt wurde.

Betrachtet man die UC-Emission, ist bei beiden Proben ein geringes Signal im Bereich von $\lambda = 470 \text{ nm}$ sichtbar, jedoch ist die Effizienz der Proben im Vergleich mit Ansätzen der Kapseln aus der ersten Generation viel zu gering für eine weitere Verwendung wie beispielsweise für Zelleexperimente am cLSM. Da auf den TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.15 ausschließlich Nanokapseln mit gut sichtbarer Kern-Hülle-Morphologie zu sehen sind, kann der Effizienzverlust dadurch nicht erklärt werden. Störende, nur zu Phosphoreszenz fähige Nanopartikel sind nicht sichtbar.

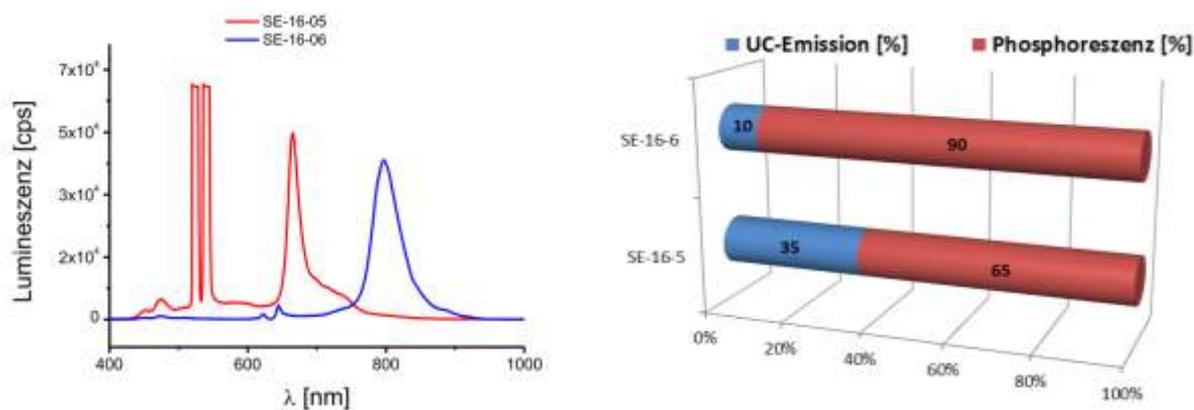


Abbildung 5.17: Links: Ansatz 16-05 (rot, $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$) mit Pd-OEP ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) und Perylen ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) und Ansatz 16-06 (blau, $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$) mit Pd-TBP ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) und Perylen ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Rechts: Vergleich der beiden UC-Effizienzen von SE-16-5 und SE-16-6.

Eine Möglichkeit liegt im Aufbau des statistischen Copolymers. Im Vergleich zum Copolymer der 1. Generation (PS-*co*-PAA) befinden sich die funktionellen Carbonsäuregruppen nicht hauptsächlich auf der Kapseloberfläche, sondern statistisch in der Polymerhülle verteilt. Möglicherweise haben ins Innere der Kapsel ragende Gruppen einen negativen Einfluss auf den Prozess der TTA, indem sie Farbstoffe an sich binden und aus dem Gesamtprozess isolieren. Ein erhöhter Farbstoffanteil in der Polymerhülle, möglicherweise entstanden durch zu schnelles Ausfällen des Polymers oder durch besondere Affinität des Polymers zu den Farbstoffen, kann ebenfalls als Ursache für die geringe Effizienz in Frage kommen. Quenchende Effekte durch Verunreinigungen im Polymer können eigentlich auf Grund der starken Phosphoreszenz ausgeschlossen werden.

5.2.2 Blockcopolymer P(S_{0.48}-*b*-MMA_{0.52})

In diesem Abschnitt wird ein weiteres Polymer eingesetzt um UC-Nanokapseln zu erhalten. Das Blockcopolymer P(S_{0.48}-*b*-MMA_{0.52}) besteht zu 48% (molar) aus einem hydrophoben Polystyrol Block und zu 52% (molar) aus einem hydrophilen PMMA-Block. Auf Grund des hydrophilen Anteils des Polymers sollte es hervorragend zur Kapselbildung geeignet sein.

Der Standardansatz beim Blockcopolymer bestand zunächst aus einem Polymer:HD-Verhältnis von 1:1, bei einem resultierenden Feststoffgehalt von ca. 5-6%. Die Menge an eingesetztem SDS war hierbei 3% bezogen auf die disperse Phase. Dieser Standardansatz wurde dann für die einzelnen Anwendungen optimiert. Dabei wurden unterschiedliche hydrophobe Medien wie α -Tocopherol, HD und PHD getestet und zusätzlich neue UC-Farbstoffe in Nanokapseln eingeführt. Die genauen Ansatzmengen sind im Anhang 8.2 in Tabelle 8.4 angegeben, die Analysenergebnisse der jeweiligen Ansätze sind in Tabelle 5.6 angegeben.

Tabelle 5.6: Analysedaten, eingesetzte Farbstoffkonzentrationen und hydrophobes Medium der Ansätze mit Blockcopolymer P(S_{0.48}-*b*-MMA_{0.52}).

Probe	Hydrophobes Medium	Feststoffgehalt [%]	D _i ($\pm \sigma$) [nm]	Farbstoffe	
				Sensitizer c [mol·L ⁻¹]	Emitter c [mol·L ⁻¹]
Standardansatz	HD	5,4	146 (± 50)	----	----
SE-13-2	α -Toc	6,0	193 (± 75)	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
SE-13-6	70% α -Toc + 30% HD	5,9	225 (± 79)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
SE-13-7	50% α -Toc + 50% HD	6,1	282 (± 113)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
SE-13-8	30% α -Toc + 70% HD	5,6	280 (± 118)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
SE-13-9	80% α -Toc + 20% HD	5,9	248 (± 103)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
SE-15-1	PHD	18,7	233 (± 54)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
SE-15-4	PHD	18,6	237 (± 43)	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
SE-17-4	PHD	19,6	294 (± 100)	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	Bodipy (1x10 ⁻²)
SE-17-8	PHD	9,9	252 (± 79)	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	B-P-Dyad (1x10 ⁻²)
SE-19-1	PHD	18,9	240 (± 72)	Pd-TNP (1x10 ⁻³)	Y-Perylen (1x10 ⁻²)
SE-18-5	PHD	19,1	233 (± 31)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	----
SE-18-6	PHD	18,5	230 (± 51)	----	Perylen (1x10 ⁻²)
SE-18-7	PHD	----	218 (± 47)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
SE-22-3	PHD	18,8	311 (± 133)	----	----

5.2.2.1 Verwendung von α -Tocopherol

α -Tocopherol (α -Toc, Strukturformel in Abbildung 4.6) ist ein Hauptbestandteil von Vitamin E und zeichnet sich unter anderem durch seine Fähigkeit als Radikalfänger^[171, 172] und somit auch als Sauerstofffänger^[173] aus. Da die Anwesenheit von Triplett-Sauerstoff einen quenchenden Einfluss auf die TTA-UC hat, soll der Einsatz von α -Tocopherol als hydrophobes Medium bereits vorhandenen oder in die Kapsel eindringenden Sauerstoff binden und somit seinen negativen Einfluss auf die TTA-UC verhindern. Der Einsatz von α -Toc wurde bereits bei den Kapseln der ersten Generation getestet. Jedoch machte α -Toc durch seine Eigenschaften als Radikalfänger die radikalische Polymerisation zunichte und es konnten keine Kapseln gebildet werden. Da bei der Lösungsmittelverdampfungs-Methode keinerlei Radikale auftreten, sollte dem Einsatz von α -Toc als zu verkapselndes hydrophobes Medium nichts mehr im Wege stehen.

In Ansatz SE-13-02 wurde die gesamte Menge an HD (bisheriges Medium des Standardansatzes) mit α -Toc ersetzt. Auf den TEM-Aufnahmen (nicht gezeigt, aber ähnlich wie in Abbildung 5.18 Bild a) wurden keine Kapseln, sondern nur Partikel gefunden. Vermutlich wird die Phasenseparation von ausfallendem Polymer und hydrophoben Medium durch die extrem hohe Viskosität von α -Toc zunichte gemacht, d.h. es ist keine ausreichende Diffusion möglich.

In den weiteren Experimenten wurde versucht, eine Mischung aus HD und α -Toc zu verkapseln und damit die Viskosität zu verringern, aber gleichzeitig den Effekt des Radikalfängers von α -Toc zu erhalten. Bei den Ansätzen 13-06 bis 13-09 wurde das Verhältnis von α -Toc:HD variiert, um geeignete Bedingungen zur Verkapselung zu finden.

Bei SE-13-09 wurde ein Verhältnis (α -Toc:HD) von 80:20 eingesetzt, was aber, sichtbar in Abbildung 5.18 (Bild a), nicht ausgereicht hat, um Nanokapseln zu erhalten. Durch weiteres Erhöhen des Gehaltes an HD auf 30% bei SE-13-06, 50% bei SE-13-07 und 80% bei SE-13-08 konnte die Viskosität des inneren Mediums ausreichend verringert werden. Bei einem Gehalt von 30% an HD sind bei den TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.18 (Bild b) bereits teilweise Kapseln zu sehen. Bei 50% HD (Bild c) und somit ebenso bei 80% HD (Bild d) sind überwiegend Kapseln anstelle von Partikeln zu erkennen. Mit einem gewissen Anteil an HD als Substanz zur Herabsetzung der Viskosität, bzw. als Trägermaterial lässt sich α -Toc erfolgreich verkapseln. Die Frage, ob sich α -Toc tatsächlich in den vorhandenen Nanokapseln befindet, kann mit Hilfe der TTA-UC aufgeklärt werden.

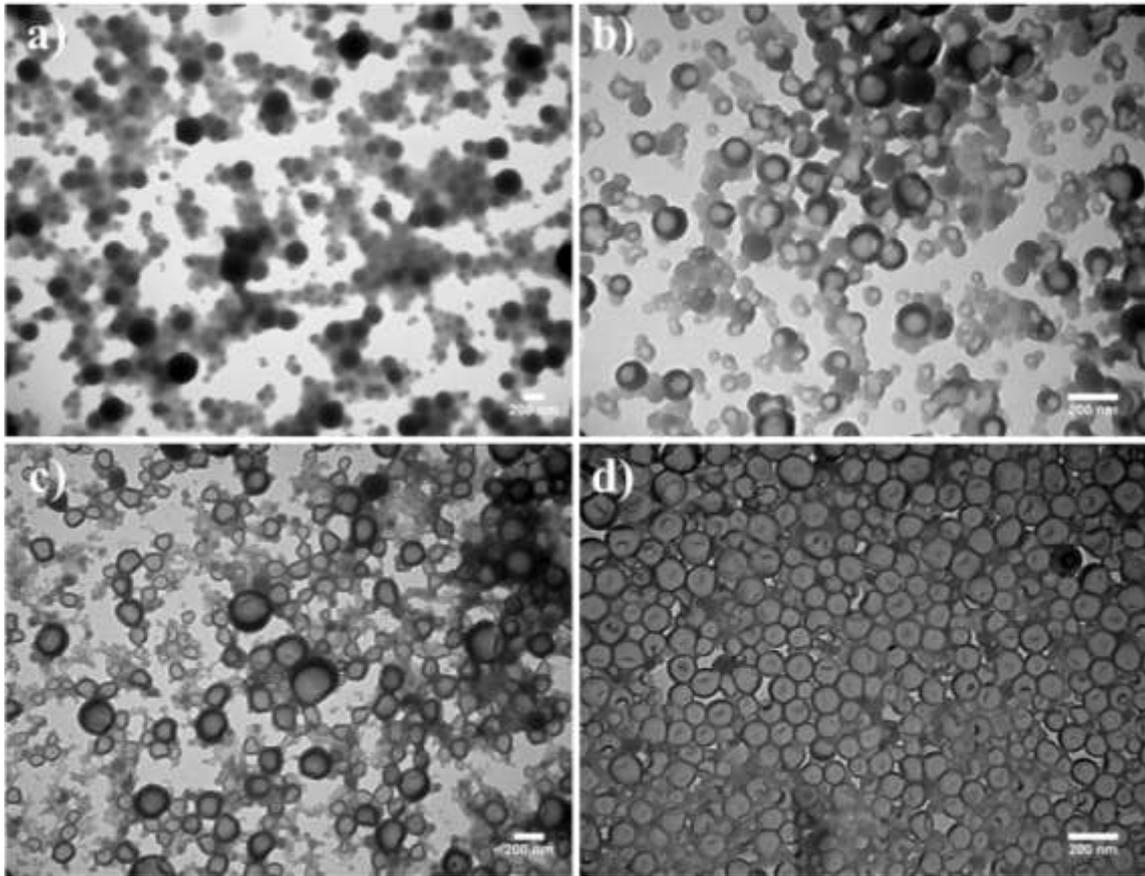


Abbildung 5.18: TEM-Aufnahmen von SE-13-06 bis 13-09. Absteigender Anteil an α -Tocopherol. Bild a): SE-13-09 (80% α -Toc); Bild b): SE-13-06 (70% α -Toc); Bild c): SE-13-07 (50% α -Toc); Bild d): SE-13-08 (20% α -Toc).

In allen Ansätzen (SE-13-06 bis SE-13-09) wurden bereits die zur UC nötigen Farbstoffe (Pd-OEP $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Perylen $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) mit verkapselt. In Abbildung 5.19 (links) sind die UC-Spektren der Ansätze SE-13-06 bis SE-13-09 dargestellt und überraschenderweise ist keinerlei UC-Emission auszumachen. Bei Ansatz SE-13-09 war das auf Grund der fehlenden Kapseln das erwartende Resultat. Bei den weiteren Ansätzen, bei denen deutlich Kapseln zu erkennen sind, sollte aber eigentlich UC-Emission im Wellenlängenbereich zwischen $\lambda = 430\text{-}490 \text{ nm}$ zu sehen sein. Da dies nicht der Fall ist wurde, dargestellt im rechten Diagramm in Abbildung 5.19, die TTA-UC einer Lösung von Pd-OEP ($c = 1 \times 10^{-4}$) und Perylen ($c = 1 \times 10^{-3}$) in reinem α -Toc untersucht. Selbst in reiner Lösung von α -Toc wurde keine UC-Fluoreszenz detektiert, was darauf schließen lässt, dass der Prozess der TTA-UC in α -Toc nicht stattfinden kann. Diese Unterdrückung der TTA-UC lässt sich entweder durch die hohe Viskosität des Stoffes oder durch andere, teilweise aus der Literatur bekannte quenchende Effekte^[174] von Triplettzuständen durch α -Toc erklären. Der hohe Phosphoreszenzpeak spricht für die Intaktheit der Farbstoffe (zumindest vom Sensitizer) und für einen gehemmten oder gar nicht vorhandenen TTT-Prozess der Energie. Dass

wiederum in den Kapseln keinerlei UC zu sehen ist, bestätigt die Erklärung von zusätzlichen quenchenden Effekten, da die Viskosität durch die Vermengung mit HD deutlich herabgesetzt wurde. Somit klärt sich hier die Frage, ob das α -Toc tatsächlich in den Kapseln ist oder nur das mitverkapselte HD. Wenn nur HD in den Kapseln wäre, müsste eigentlich TTA-UC-Emission aus diesen reinen HD-Kapseln zu sehen sein. Da dies nicht der Fall ist, wurde gezeigt, dass das quenchende α -Toc in allen Kapseln teilweise vorhanden ist.

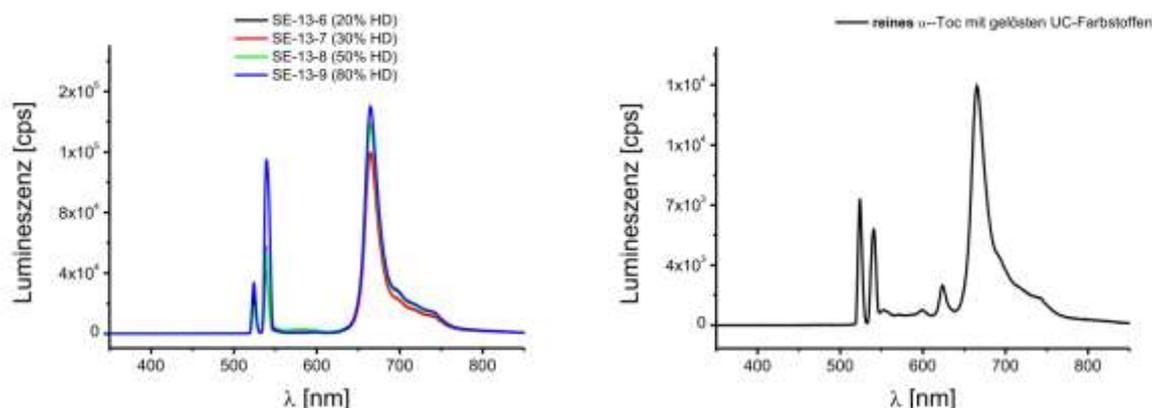


Abbildung 5.19: Links: UC-Spektren der Proben SE-13-06 bis SE-13-09. Rechts: UC Spektrum einer Lösung von Pd-OEP und Perylen in reiner α -Toc. $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ bei $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$.

Durch die Erkenntnis dieser Experimente kommt α -Toc als Medium für die TTA-UC nicht in Frage, womit bei den weiteren Kapseln auf die bisherigen Medien HD oder PHD zurückgegriffen werden muss.

5.2.2.2 Einführung neuer Farbstoffe

Durch die Verwendung der Lösungsmittelverdampfungs-Methode treten im Gegensatz zur radikalischen Miniemulsionspolymerisation beim Kapselbildungsprozess keine Radikale mehr auf. Durch diese sanfte Herstellungsmethode der Nanokapseln lassen sich empfindliche Farbstoffe auf einfache Art und Weise verkapseln. Pd-TBP (Meso-Tetraphenyl-tetrabenzoporphyrin-Palladiumkomplex, Abbildung 4.12) gehört, wie bereits in Kapitel 5.1 dargestellt, als die nahezu vollständige Zerstörung des Farbstoffes durch den radikalischen Polymerisationsprozess gezeigt wurde, zu solch empfindlichen Farbstoffen. Im Vergleich zu Pd-OEP besitzt Pd-TBP einen weiteren aromatischen Rest, der zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda = 547 \text{ nm}$ zu einem im roten Bereich bei $\lambda = 633 \text{ nm}$ liegenden Maximum führt. Generell lässt sich bei metallierten Porphyrinen durch Erweiterung des π -

Systems mit zusätzlichen aromatischen Ringen eine Verschiebung der Absorptions- und Emissionsspektren in den roten Bereich des sichtbaren Spektrums oder bis in den NIR-Bereich erzielen.^[14, 175] Diese Verschiebung der Anregungswellenlänge des Sensitizers in das natürliche Transparenzfenster von Haut und Gewebe ist für biologische Anwendungen von enormer Bedeutung. Mit der Einführung eines neuen Sensitizers erfolgt meistens ebenfalls ein Austausch des Emitters, da eine Überlappung der Triplettzustände von Sensitizer und Emitter gewährleistet sein muss für eine erfolgreiche TTA-UC (siehe Abschnitt 2.4.1.1).

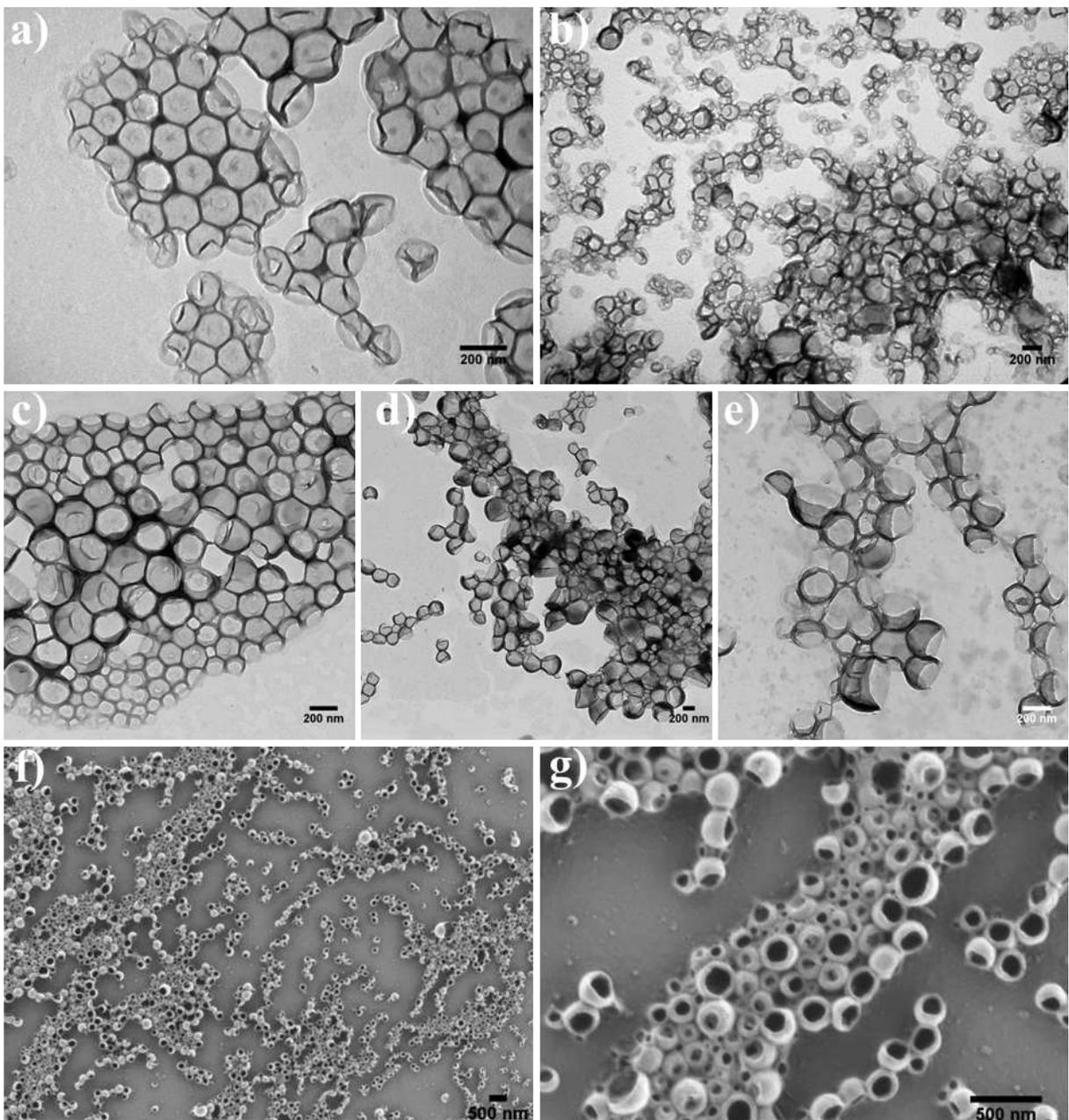


Abbildung 5.20: TEM- und SEM-Aufnahmen von verschiedenen Ansätzen. Bild a): SE-15-01; Bild b): SE-15-04; Bild c): SE-17-4; Bild d): SE-17-08; Bild e): SE-19-01; Bild f) und g): SEM-Aufnahmen von SE-19-01.

Für die Verkapselung der neuen Farbstoffe musste zunächst das System optimiert werden. Vom Standardansatz ausgehend (Beschrieben in ersten Abschnitt von Kapitel 0) wurde zunächst der Feststoffgehalt von ca. 6% auf ca. 17% fast verdreifacht. Diese Erhöhung hatte auf die Kapselmorphologie keinen Einfluss und liefert aber bei UC-Messungen der Dispersionen ein höheres Signal. Ebenso ein besseres UC-Signal erhält man durch die Verkleinerung des Verhältnisses von Polymer:hydrophobem Medium von 2:3 auf 1:2. Hier gab es ebenfalls nur geringfügige Auswirkungen auf die Kapseln-Morphologie in Form von etwas dünneren Schalen der Kapseln (Abbildung 5.20). Des Weiteren wurde der Gehalt an SDS auf ein Minimum reduziert. Beim Standardansatz wurden 3% (bezogen auf disperse Phase) SDS eingesetzt, bei den folgenden Ansätzen (ab SE-15-01 beim Blockcopolymer) wird lediglich 1% SDS verwendet. Trotz der Verringerung des SDS-Gehaltes wird bei den Kapseln eine tadellose Kern-Hülle-Morphologie erhalten. Logischerweise wird die Kapselgröße durch den geringeren Gehalt an SDS von ca. 150 nm auf ca. 230 nm (Tabelle 5.6) erhöht, was aber auf die weitere Verwendung der Nanokapseln keinen negativen Einfluss hat. Bei den folgenden Ansätzen wurden verschiedene UC-Farbstoffpaare verwendet, um die Anregungswellenlänge des Sensitizer in Richtung „optisches Fenster“ zu verschieben. Beim Ansatz SE-15-01 (Abbildung 5.21) wurden die bereits bei den Kapseln der 1. Generation verwendeten Farbstoffe, Pd-OEP als Sensitizer und Perylen als Emitter, eingesetzt.

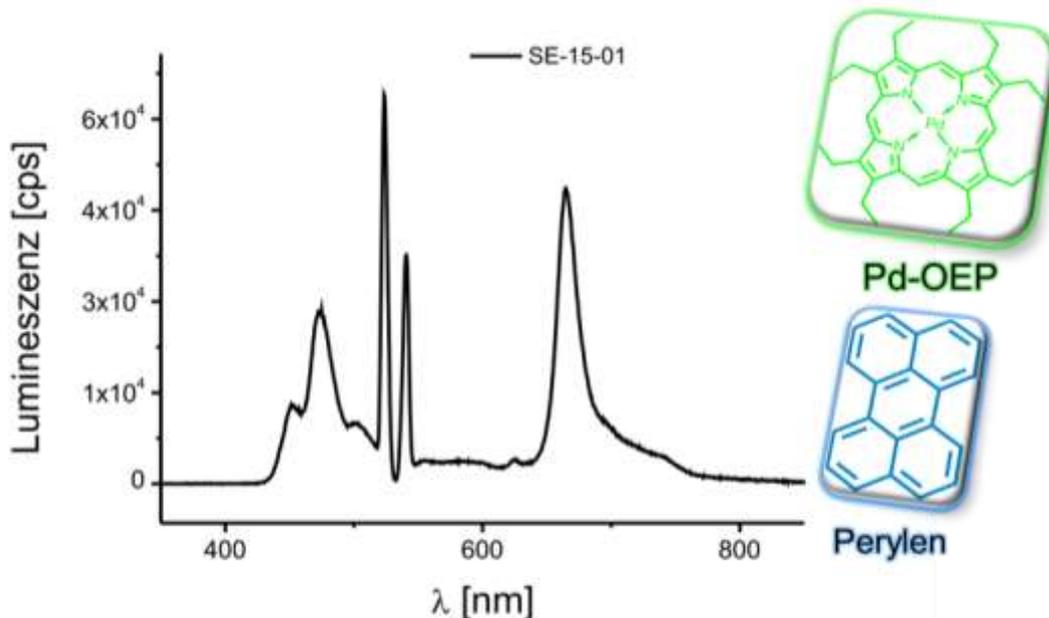


Abbildung 5.21: UC-Spektrum von SE-15-01. Die Anregungswellenlänge von Pd-OEP beträgt $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ bei einer Anregungsleistung des Lasers $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$. UC-Fluoreszenz von Perylen im Bereich von $\lambda = 430 \text{ nm}$ bis 515 nm und Phosphoreszenz von Pd-OEP im Bereich von $\lambda = 630 \text{ nm}$ bis 730 nm .

Die Anregungswellenlänge liegt bei $\lambda = 532$ nm mit einer Laserleistung von $P_{\text{exc}} = 2$ mW. Im Bereich von $\lambda = 430$ -515 nm ist die UC-Fluoreszenz von Perylen zu sehen, während bei $\lambda = 630$ -730 nm die Phosphoreszenz von Pd-OEP detektiert wurde.

Beim Ansatz 15-04 wurde Pd-TBP zum ersten Mal erfolgreich als Sensitizer eingesetzt. Durch den Austausch des Sensitizers, der sich chemisch von Pd-OEP vor allem durch eine Erweiterung des aromatischen Systems auszeichnet, wurde eine Verschiebung der Anregungswellenlänge, von $\lambda = 532$ nm auf $\lambda = 633$ nm, um ca. $\Delta\lambda = 100$ nm in den roten Bereich des Spektrums erreicht. Um bestmögliche Effizienzen und Emissionen zu erhalten, wurde die Laserleistung von $P_{\text{exc}} = 2$ mW auf $P_{\text{exc}} = 3$ mW erhöht. In Abbildung 5.22 kann man somit im Bereich von $\lambda = 750$ -870 nm die Phosphoreszenz von Pd-TBP erkennen. Der Emitter wurde mit Perylen nicht verändert, was eine anti-Stokes Verschiebung (von der Anregungswellenlänge bis zum Emissionsmaximum von Perylen) von $\Delta\lambda_{\text{shift}} = 158$ nm ($\Delta E = 0,65$ eV) entspricht. Wenn man die beiden Emissionsbereiche von Perylen bei SE-15-01 und SE-15-04 vergleicht, kann bei SE-15-04 erkennen, dass die linke Schulter nicht vollständig ausgeprägt ist. Diese Abflachung kommt durch eine Reabsorption der UC-Emission durch Pd-TBP zustande, da hier die Fluoreszenz von Perylen ein wenig mit dem Absorptionsspektrum (Soret-Band) von Pd-TBP überlappt d.h. die Emission von Perylen befindet sich etwas außerhalb des Transparenzfensters von Pd-TBP (Abbildung 4.10).

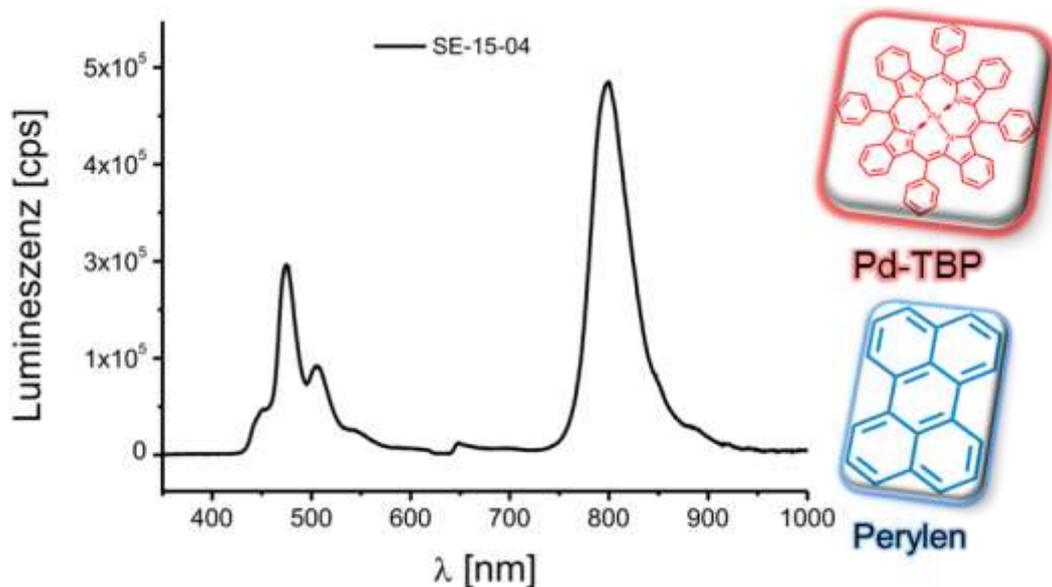


Abbildung 5.22: UC-Spektrum von SE-15-04. Die Anregungswellenlänge von Pd-TBP beträgt $\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm bei einer Anregungsleistung des Lasers $P_{\text{exc}} = 3$ mW. UC-Fluoreszenz von Perylen im Bereich von $\lambda = 430$ nm bis 530 nm und Phosphoreszenz von Pd-TBP im Bereich von $\lambda = 750$ nm bis 870 nm.

Diese Art der Reabsorption ist beim Ansatz SE-17-04 ausgeschlossen, da sich die Fluoreszenz des hier verwendeten Emitters Bodipy genau zwischen den Absorptionsbändern (Soret-Band und Q-Band) des Pd-TBP befindet. In Abbildung 5.23 ist das UC-Spektrum für diese neue Farbstoffkombination (Pd-TBP als Sensitizer und Bodipy als Emitter) dargestellt. Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ und einer Laserleistung $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$ ist im Bereich von $\lambda = 750\text{-}870 \text{ nm}$ der Phosphoreszenzpeak von Pd-TBP und bei $\lambda = 525\text{-}610 \text{ nm}$ (Maximum: $\lambda_{\text{max}} = 554 \text{ nm}$) die UC-Emission von Bodipy zu sehen. Durch diesen Austausch verliert man zwar einen Teil der anti-Stokes Verschiebung welche hier nur $\Delta\lambda_{\text{shift}} = 79 \text{ nm}$ ($\Delta E = 0,28 \text{ eV}$) beträgt.

Vergleicht man die relativen Effizienzen der beiden Experimente SE-15-04 und SE-17-04, kann man einen leichten Rückgang von 69% (15-04) auf 61% (17-04) beobachten (Abbildung 5.26). Dabei muss aber in Betracht gezogen werden, dass der Ansatz SE-17-04 nur bei $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$ Laserleistung gemessen worden und nicht bei $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$ (SE-15-04), was die gemessene Effizienz negativ beeinflusst und somit teilweise für den geringen Rückgang verantwortlich ist.

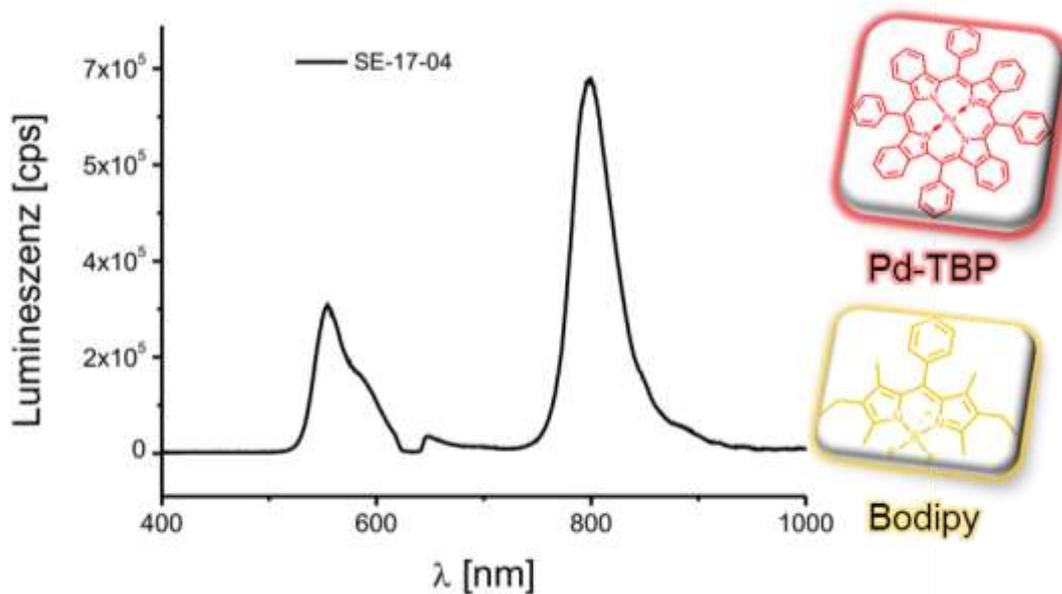


Abbildung 5.23: UC-Spektrum von SE-17-04 bei unterschiedlichen Zeiten nach Anregung. Die Anregungswellenlänge von Pd-TBP beträgt $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ bei einer Anregungsleistung des Lasers $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$. UC-Fluoreszenz von Bodipy im Bereich von $\lambda = 525 \text{ nm}$ bis 610 nm und Phosphoreszenz von Pd-TBP im Bereich von $\lambda = 750 \text{ nm}$ bis 870 nm .

In Abbildung 5.24 wurde bei gleich bleibendem Sensitizer Pd-TBP ein weiterer neuer Emitter (B-P-Dyad) verwendet. Dieser stellt eine Verknüpfung mittels C-C-Verknüpfung der beiden Emitter Perylen und Bodipy dar (Strukturformel in Abbildung 4.9). Dieser neue Farbstoff hat sein Emissionsmaximum bei $\lambda = 551 \text{ nm}$, und ist damit dem von Bodipy sehr ähnlich,

wodurch sich die anti-Stokes-Verschiebung kaum vergrößert. Die Anregungswellenlänge von Pd-TBP liegt unverändert bei $\lambda = 633$ nm, und die Phosphoreszenz von Pd-TBP ist im Bereich von $\lambda = 750$ -870 nm zu finden. Die UC-Emission des B-P-Dyad-Farbstoffes ist sichtbar im Bereich von $\lambda = 520$ -610 nm. Bei einer Laserleistung von $P_{\text{exc}} = 3$ mW ist die UC-Effizienz der beiden Farbstoffe mit 54% am geringsten und das Integral der UC-Emission fällt somit deutlich ab. Scheinbar ist die Überlappung der Triplettzustände von Emitter und Sensitizer etwas schlechter, so dass der Prozess des TTT weniger effizient abläuft und somit ein größerer Anteil der Energie als Phosphoreszenz des Sensitizer verloren geht. Trotz der leichten Effizienzverluste kann man bei allen Experimenten mit Pd-TBP ein deutliches UC-Signal erkennen und die Wahl des Emitters kann je nach benötigter Wellenlänge variabel gestaltet werden.

Um die Anregungswellenlänge nochmals weiter in den roten Bereich des Spektrums zu verschieben, muss das aromatische Grundgerüst des Porphyrins um einen weiteren Ring erweitert werden. Das in unserer Gruppe synthetisierte Pd-TNP erfüllt diese Voraussetzung und weist eine Absorptionsbande (Q-Band, Abbildung 4.12) bei $\lambda = 710$ nm auf. Der dazu passende Emitter, im folgenden Y-Perylen genannt, wurde ebenfalls in unserer Gruppe synthetisiert und besitzt die Perylenstruktur als Grundgerüst. Die beiden Farbstoffe wurden beim Ansatz SE-19-01 erfolgreich in die Nanokapseln eingebettet. Das zugehörige aufgenommene UC-Spektrum ist in Abbildung 5.25 dargestellt.

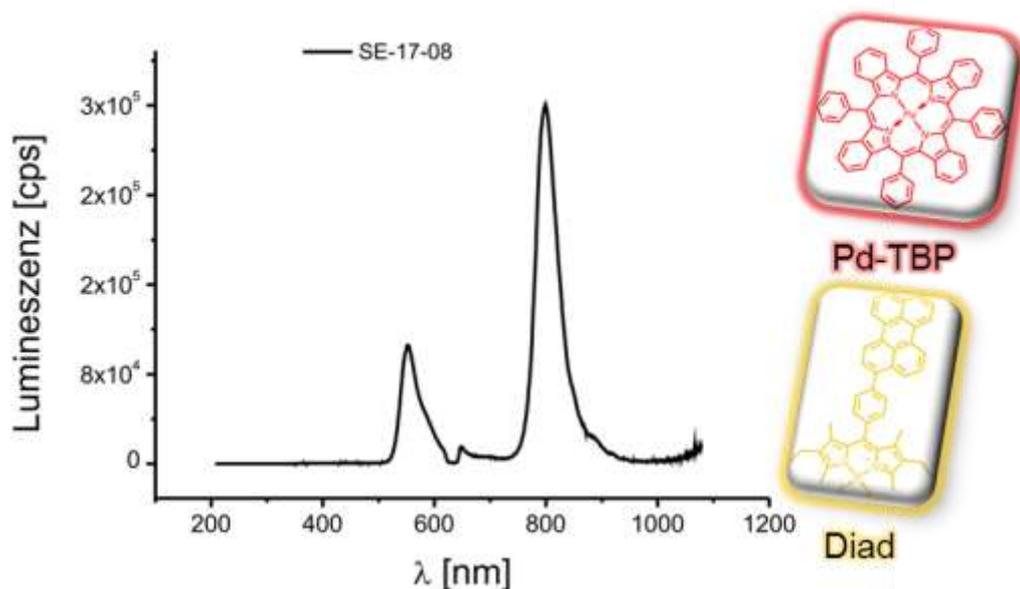


Abbildung 5.24: UC-Spektrum von SE-17-08. Die Anregungswellenlänge von Pd-TBP beträgt $\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm bei einer Anregungsleistung des Lasers $P_{\text{exc}} = 3$ mW. UC-Fluoreszenz von B-P-Dyad im Bereich von $\lambda = 520$ nm bis 610 nm und Phosphoreszenz von Pd-TBP im Bereich von $\lambda = 750$ nm bis 870 nm.

Die Dispersion wurde bei einer Anregungsleistung von 2,5 mW gemessen. Die UC-Emission des Y-Perylens liegt im Bereich von $\lambda = 500\text{-}640\text{ nm}$ mit einem Maximum bei $\lambda = 556\text{ nm}$, von der Form her ähnlich dem normalen Perylen, lediglich verschoben in Richtung des roten Bereichs vom sichtbaren Spektrums.

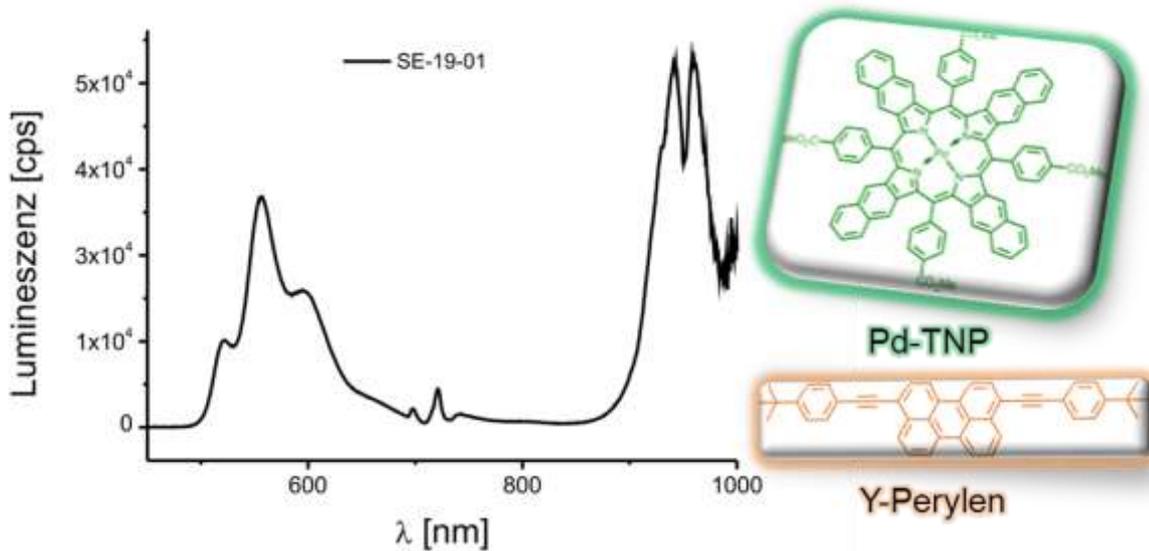


Abbildung 5.25: UC-Spektrum von SE-19-01. Die Anregungswellenlänge von Pd-TNP beträgt $\lambda_{\text{exc}} = 710\text{ nm}$ bei einer Anregungsleistung des Lasers $P_{\text{exc}} = 2,5\text{ mW}$. UC-Fluoreszenz von Y-Perylen im Bereich von $\lambda = 500\text{ nm}$ bis 640 nm und Phosphoreszenz von Pd-TBP im Bereich von $\lambda = 880\text{ nm}$ bis 975 nm .

Die Phosphoreszenz von Pd-TNP liegt im Bereich von $\lambda = 880\text{-}975\text{ nm}$ und ist somit im Grenzbereich des Aufnahmespektrums des eingesetzten Spektrometers. Möglicherweise ist dadurch die berechnete Effizienz von 82% mit einem größeren Fehler behaftet als die der anderen Experimente. Der bei diesem Farbstoffpaar erreichte hypsochrome shift (anti-Stokes shift) liegt bei $\Delta\lambda_{\text{shift}} = 154\text{ nm}$ ($\Delta E = 0,48\text{ eV}$). Mit der erfolgreichen Detektion der UC-Fluoreszenz von SE-19-01 ist eine weitere, tiefere Verschiebung der Anregungswellenlänge in den Bereich des optischen Fensters gelungen, was die Anwendungsmöglichkeiten im biologischen Bereich nochmal erweitert.

In Abbildung 5.26 sind die verschiedenen Effizienzen der in Kapitel 5.2.2.2 aufgeführten Ansätze abgebildet. Da die verschiedenen Ansätze bei unterschiedlichen Anregungsleistungen aufgenommen wurden, und die Effizienz von der Anregungsleistung/Intensität beeinflusst wird, ist der direkte Vergleich nur mit Einschränkungen möglich. Prinzipiell gilt, je höher die Anregungsintensität/Leistung ist, desto besser ist die UC-Effizienz. Bei den berechneten Effizienzen kann man einen leichten Rückgang beim Wechsel des Sensitizers von Pd-OEP auf Pd-TBP erkennen. Alle Experimente mit Pd-TBP weisen, trotz teilweise größerer

Anregungsintensität, eine geringere Effizienz auf als SE-15-01 mit Pd-OEP/Perylen als Farbstoffpaar. Dies deutet auf eine grundsätzlich schwächere Überlappung der Triplettzustände von den verwendeten Emittlern und Pd-TBP als Sensitizer hin. Der Unterschied innerhalb der Farbstoffpaare mit Pd-TBP als Sensitizer kommt bei Bodipy als Emitter (SE-17-04) teilweise durch die geringere Anregungsleistung/Intensität zustande. Zusammenfassend eignet sich, nur die Effizienz betrachtet, Perylen am besten, gefolgt von Bodipy und B-P-Dyad als Emitter bei Pd-TBP als eingesetztem Sensitizer. Die hohe Effizienz des Farbstoffpaares Pd-TNP/Y-Perylen wurde bereits etwas relativiert und eignet sich deshalb nur bedingt zum direkten Vergleich.

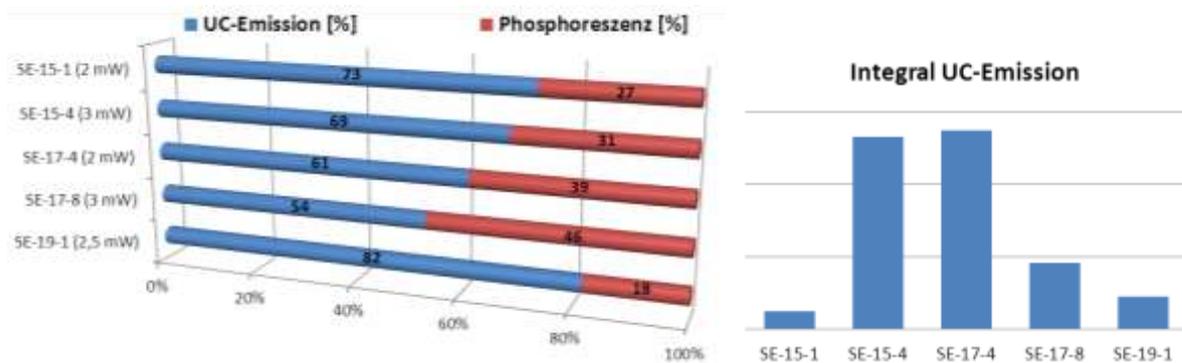


Abbildung 5.26: Links: Vergleich der Effizienzen der Experimente mit verschiedenen Farbstoffen in einer Kapselhülle aus dem Blockcopolymer $P(S_{0,48}\text{-}b\text{-}MMA_{0,52})$, aufgenommen bei verschiedenen Anregungsintensitäten des Lasers. Rechts: Vergleich der absoluten Integrale der UC-Fluoreszenz (entspricht der gemessenen Photonenzahl).

Betrachtet man die absoluten Integrale der UC-Fluoreszenz der verschiedenen Proben, muss man zunächst die Abhängigkeit vom Feststoffgehalt der Dispersion mit einbeziehen. Dieser liegt bei den allen Proben bei ca. 19% mit Ausnahme von SE-17-08, welche nur einen Feststoffgehalt von ca. 10% aufweisen kann. Des Weiteren ist das absolute Integral, ebenfalls wie die Effizienz von der Anregungsintensität abhängig. Bei der Probe SE-15-01 ist zwar die Effizienz relativ hoch, jedoch ist das absolute Integral (Zahl der emittierten Photonen) trotz hohem Feststoffgehalt sehr gering. Dies liegt teilweise an der Anregungswellenlänge, da bei geringerer Energie (höherer Wellenlänge) und gleicher Intensität, mehr Photonen zur Absorption vorhanden sind, was eine höhere Emission der Photonen bewirkt. Ein weiterer Grund kann in der Absorptionsrate des Sensitiveers liegen, der bei Pd-OEP möglicherweise niedriger ist als bei Pd-TBP. Dieses geringere Signal der Emission macht dieses Farbstoffpaar weniger interessant für weitere Anwendungen.

Bei den Proben SE-15-04 und SE-17-04 nimmt die Effizienz im Vergleich zu SE-15-01 zwar leicht ab, jedoch ist die absolute Anzahl der detektierten Photonen (entspricht dem absoluten Integral) sehr viel größer als bei SE-15-01. Bei SE-17-08 ist der geringere Feststoffgehalt von ca. 10% für das geringere Integral verantwortlich. Bei Ansatz SE-19-01 wurden auf Grund von Löslichkeitsproblemen der beiden Farbstoffe Teile davon vermutlich nicht mit verkapselt (was eine niedrigere Farbstoffkonzentration zur Folge hat), was eine Ursache für den geringen Wert sein sollte.

Neben den bereits aufgeführten Experimenten wurden auch zahlreiche Negativkontrollen durchgeführt. Bei den Ansätzen SE-18-05 und SE-18-06 wurde jeweils nur ein Farbstoff (Emitter oder Sensitizer) verkapselt, um nachzuweisen, dass UC nur in Kombination beider Farbstoffe möglich ist. Bei SE-18-05 wurde nur Perylen verkapselt und nach Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 419 \text{ nm}$ wurde das Fluoreszenzspektrum von Perylen erhalten (Abbildung 5.27, links). Bei einer Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ war keine Emission zu erkennen. SE-18-06 wurde bei $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ angeregt und es wurde die Phosphoreszenz von Pd-OEP gemessen, während im Bereich der UC ist kein Signal zu sehen.

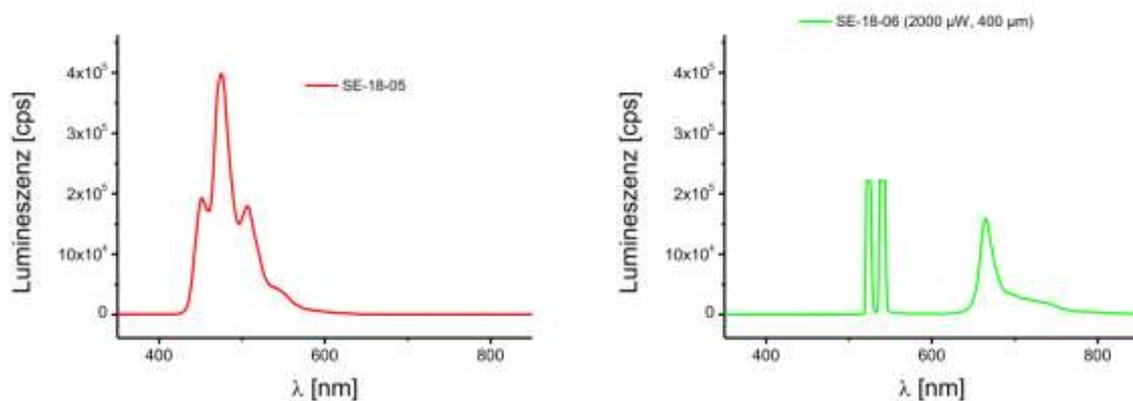


Abbildung 5.27: Spektrum der Proben SE-18-05 (links) und SE-18-06 (rechts). Bei SE-18-05 wurde nur Perylen verkapselt und bei $\lambda_{\text{exc}} = 419 \text{ nm}$ ($P_{\text{exc}} = 85 \mu\text{W}$, $d_{\text{Fokus}} = 250 \mu\text{m}$) angeregt. Bei SE-18-06 ist nur Pd-OEP verkapselt und bei $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ ($P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$) angeregt.

5.2.2.3 Messungen unter Sauerstoffbedingungen (Luft)

Alle bisher gezeigten Ansätze mit dem Blockcopolymer $\text{P}(\text{S}_{0.48}\text{-}b\text{-MMA}_{0.52})$ wurden unter sauerstofffreien Bedingungen gemessen. Dazu wurde die Dispersion für 24 h in der Glove Box gelagert, dort in die Messküvetten abgefüllt und luftdicht versiegelt. Für Messungen unter „normalen“ Bedingungen wurde die Dispersion direkt an Luft in die Küvetten abgefüllt und mit einem Deckel verschlossen.

In Abbildung 5.28 wurde der Ansatz SE-17-04 unter Sauerstoffbedingungen gemessen ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$). Durch die Veränderung des Fokusbereichs (d_{Fokus}) des Lasers wurde die Anregungsintensität verändert. Die rote Kurve in Abbildung 5.28 wurde bei einem Durchmesser $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$ gemessen ($I_{\text{exc}} = 2,38 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$), während bei den weiteren Messungen (schwarz und blau) die Intensität erhöht wurde ($d_{\text{Fokus}} = 100 \mu\text{m}$, $I_{\text{exc}} = 38 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$), um ein stärkeres Signal zu erhalten, was eine bessere Analyse ermöglicht. Bei der höheren Intensität kann man somit zeitliche Unterschiede der Spektren erkennen. Die schwarze Kurve wurde 1 s, die blaue 5,6 s nach dem Beginn der Anregung aufgezeichnet. Bei fortlaufender Anregung durch den Laser lässt sich innerhalb dieser wenigen Sekunden ein Anstieg des Signals detektieren.

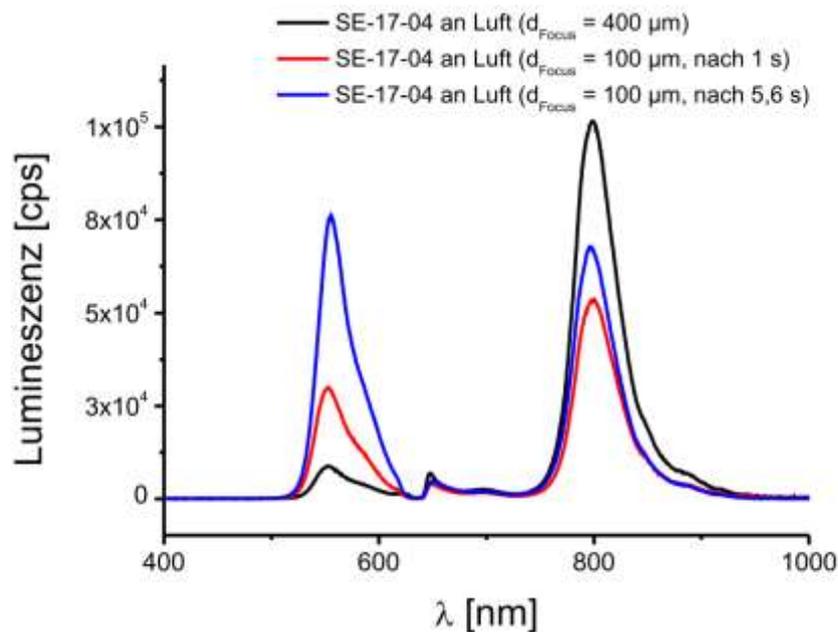


Abbildung 5.28: Messung von SE-17-04 an Luft ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$), bei verschiedenen Anregungsintensitäten, eingestellt mit Hilfe des Durchmessers vom Fokuspunkt des Laser: $100 \mu\text{m}$ (rot (nach 5,6 s), blau (nach 1 s)), $400 \mu\text{m}$ (schwarz).

In Abbildung 5.29 ist im rechten Diagramm die Kinetikmessung der Probe SE-17-04 dargestellt. Es wurde die Emission bei einer Wellenlänge von $\lambda = 556 \text{ nm}$ (Maximum der UC-Emission) über einen Anregungszeitraum von $t = 70 \text{ s}$ aufgezeichnet. Hier kann man erkennen, dass direkt nach dem Beginn der Anregung ein Wachstum des UC Signals vorherrscht, welches nach $t = 5,6 \text{ s}$ sein Maximum erreicht (gesamtes UC-Spektrum von SE 17-04 nach 5,6 s in Abbildung 5.28), dann langsam abklingt und sich einem Grenzwert annähert. Der Anstieg des Signals lässt sich vermutlich mit der Zerstörung des zu Beginn der Messung vorhandenen Sauerstoffs durch Reaktionen mit dem Sensitizer erklären. Der Anstieg

des Signals dauert so lange an, bis neuer Sauerstoff durch die Polymerhülle der Kapseln nachdiffundiert. Da das Nachdiffundieren langsamer als das Zerstören vonstättengeht, bildet das Signal zunächst ein Maximum, um dann wieder abzufallen, da zu viel O_2 nachdiffundiert. Wenn sich die Reaktion mit Sauerstoff und das Nachdiffundieren in einem Gleichgewicht einpendeln, verläuft das gemessene UC-Signal auf einen konstanten Grenzwert. Nach 70 s hat sich ein konstantes Signal der UC-Fluoreszenz ausgebildet. Dieses Signal bleibt vermutlich so lange konstant, bis entweder weniger oder kein Sauerstoff mehr nachdiffundiert (Küvette ist geschlossen), was eine Vergrößerung zur Folge hätte. Eine andere Möglichkeit ist, dass der Sensitizer durch die Reaktion mit O_2 unbrauchbar für weitere TTA-UC wird, die Konzentration an Sensitizer dadurch langsam abnimmt, was ein Abklingen des UC-Signals zur Folge hätte.

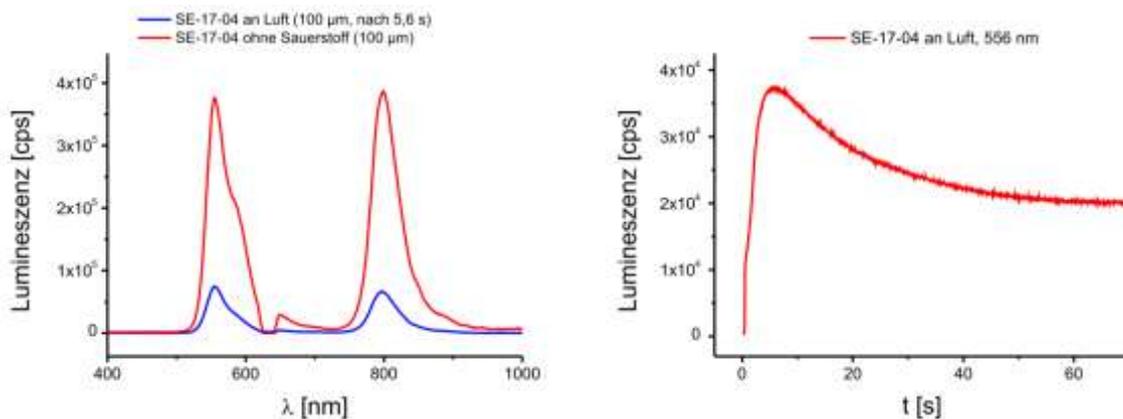


Abbildung 5.29: Links: Vergleich der Spektren SE-17-04 mit Sauerstoff (blau) und ohne Sauerstoff (rot) bei denselben Lasereinstellungen ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 100 \mu\text{m}$). Rechts: Kinetikmessung der Probe 17-04 an Luft, Entwicklung der Signalstärke am Maximum $\lambda = 556 \text{ nm}$ über $t = 70 \text{ s}$).

Zum Vergleich mit sauerstofffreien Bedingungen wurde in Abbildung 5.29 im linken Diagramm die Probe SE-17-04 bei denselben Anregungsbedingungen gemessen. Die rote Kurve stellt die Messung ohne Sauerstoff dar, die blaue wurde unter der Anwesenheit von Sauerstoff gemessen. Das Signal unter sauerstofffreien Bedingungen ist ca. um das sechsfache größer (Berechnung mittels Integral der UC-Emission) als bei „normalen“ Bedingungen mit Sauerstoff.

Zur Verdeutlichung der Zerstörung des Sauerstoffes unter kontinuierlicher Laseranregung wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dazu wurde die Küvette mit der Dispersion von SE-15-04 an Luft abgefüllt. Anschließend wurde die Dispersion bei geschlossenem Deckel für längere Zeit mit einem Laser bestrahlt ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $I_{\text{exc}} = 6 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, $d_{\text{Fokus}} = 50 \text{ mm}$). Während der fortlaufenden Anregung wurde alle 15 min mit einer Digitalkamera ein Bild der

Dispersion aufgenommen (Abbildung 5.30). Bild 1 (0 min) zeigt die Dispersion ohne Anregung, Bild 2 (ebenfalls 0 min) die selbige mit Anregung jeweils zu Beginn des Experiments. Für die weiteren Bilder wurde vor die Kamera ein Short-Pass Filter für $\lambda = 600$ nm (alles unter $\lambda = 600$ nm wird durchgelassen) installiert, so dass die durch die Dispersion gestreute Anregungswellenlänge (siehe Bild 2) nicht auf dem Bild zu sehen ist. Nach $t = 75$ min ist die erste blaue UC-Emission vom verkapselten Emitter Perylen zu sehen. Nach $t = 120$ min hat sich der Bereich der UC-Emission deutlich vergrößert und hat bei $t = 135$ min sein Maximum erreicht. Da die UC-Emission erst nach $t = 75$ min sichtbar wurde, war bis zu diesem Zeitpunkt vermutlich zu viel Sauerstoff in der Dispersion vorhanden.

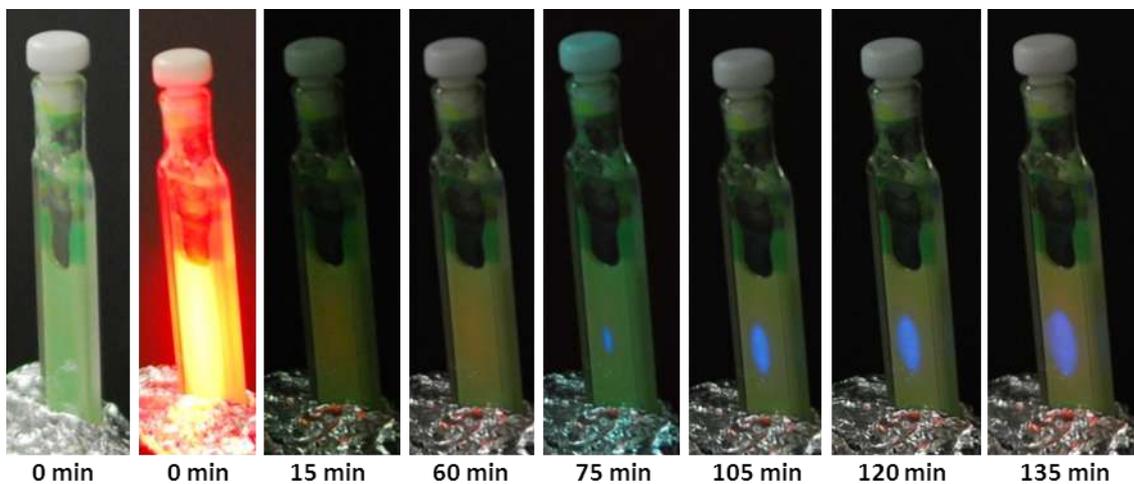


Abbildung 5.30: Zeitlicher Entwicklung der UC-Emission bei dauerhafter Anregung unter normalen Bedingungen an Luft. ($\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm, $I_{\text{exc}} = 6$ mW·cm⁻², $d_{\text{Fokus}} = 50$ mm).

Das Ansteigen des Signals ist mit der steigenden Eliminierung des Sauerstoffes in der Küvette durch die dauerhafte Anregung mit dem Laser zu erklären. Ein Nachfließen des Sauerstoffes ist durch den Deckel nur bedingt möglich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Verwendung des Blockcopolymers in Kombination mit der Solvent Evaporation Methode neue UC-Farbstoffe erfolgreich verkapselt wurden und UC-Emission ebenso erfolgreich nachgewiesen wurde. Ebenso wurden Messungen unter „normalen“ Bedingungen, an Luft, durchgeführt und UC-Fluoreszenz nachgewiesen.

5.2.3 PMMA

5.2.3.1 Kapselbildung mit PMMA

Nachdem das Blockcopolymer, das zu ca. 50% aus PMMA bestand, erfolgreich zur Bildung von UC-Nanokapseln verwendet wurde, sollte in weiteren Experimenten reines PMMA ($120000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) verwendet werden. Dazu wurde zunächst eine mögliche Kapselbildung mit der Lösungsmittelverdampfungs-Methode untersucht, um anschließend dann auf erfolgreiche UC getestet. Die Analysedaten von DLS-Messungen und der Feststoffgehalte sind in Tabelle 5.7 aufgeführt. Die genauen Ansatzmengen sind im Anhang 8.2 in Tabelle 8.5 aufgeführt.

Tabelle 5.7: Wichtige Analysedaten und Reaktionsbedingungen der PMMA-Nanokapseln ohne Farbstoffe.

Probe	Feststoffgehalt [%]	$D_i (\pm \sigma)$ [nm]
SE-22-1 (Standardansatz)	18,6	520 (± 224)
SE-22-5	18,1	433 (± 46)
SE-22-6	9,6	391 (± 173)
SE-22-8	17,8	505 (± 196)
SE-22-11	4,8	232 (± 65)
SE-22-12	5,1	225 (± 65)
SE-22-13	4,7	232 (± 45)
SE-22-14	5,4	225 (± 47)
SE-22-17	5,1	228 (± 61)
SE-22-18	4,8	227 (± 30)
SE-22-20	5,2	216 (± 50)

Zunächst wurden die Standardmengen eingesetzt, welche bereits beim Blockcopolymer erfolgreich verwendet wurden. Auf dem TEM-Bild (Abbildung 5.31, Bild a) des Standardansatzes (SE-22-1) kann man erkennen, dass neben den Kapseln auch viele Partikel aus PMMA gebildet werden. Um einen Kapselüberschuss zu erreichen, wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt.

Bei Ansatz SE-22-5 wurde die Menge an eingesetztem Chloroform, bei SE-22-6 die eingesetzte Menge an Wasser (\rightarrow halbiertes Feststoffgehalt) verdoppelt. Beides hatte eine Verkleinerung der Kapseln von 500 nm auf ca. 400 nm (DLS-Werte Tabelle 5.7) und eine Verringerung der Partikelzahl (siehe TEM-Bilder Bild b) und c), Abbildung 5.31) zur Folge.

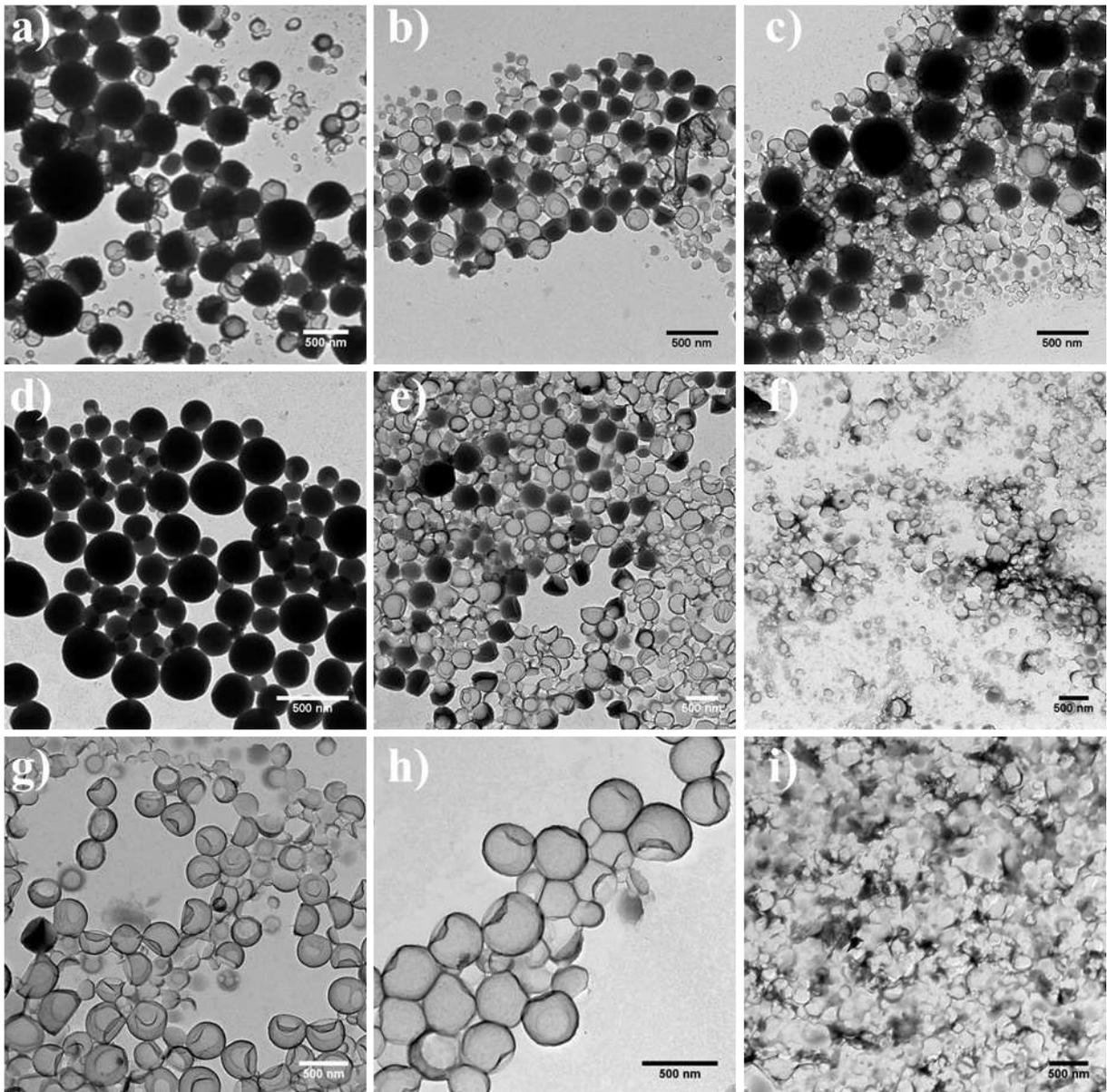


Abbildung 5.31: Bild a): SE-22-1 Standardansatz von Experimenten mit Blockcopolymer; Bild b): SE-22-5, mehr CHCl_3 ; Bild c): SE-22-6, weniger Feststoffgehalt; Bild d): SE-22-8, höheres Verhältnis Polymer/HD; Bild e): SE-22-11, mehr CHCl_3 , weniger Feststoffgehalt, mehr SDS; Bild f): SE-22-14, anders Lösungsmittel (CH_2Cl_2); Bild g): SE-22-17, Verdampfung bei RT; Bild h): SE-22-18, PHD anstelle von HD; Bild i): SE-22-20, geringeres Verhältnis Polymer/HD.

In einem weiteren Ansatz (SE-22-8) wurde das Verhältnis von Polymer/HD von bisher 1:2 auf 1:1 erhöht, wodurch eine reine Partikelbildung stattfand (Bild d). Durch die Erhöhung des SDS-Gehaltes von 1% (bezogen auf disperse Phase) auf 2% (SE-22-11) und eine Erhöhung der Scherkräfte beim Schallen (90% Amplitude anstelle von 70%) (SE-22-12) wurde die Partikelgröße auf ca. 230 nm (Tabelle 5.7) reduziert. Jedoch bildete die Dispersion immer noch ein Gemisch aus Kapseln und Partikeln (Bild e).

In weiteren Versuchen wurde die Verdampfungsgeschwindigkeit des Lösungsmittels und somit die Zeit für die Phasenseparation zwischen Polymer und hydrophobem Medium beeinflusst. Für eine Erhöhung der Verdampfungsgeschwindigkeit bei gleicher Verdampfungstemperatur wurde ein Austausch des Lösungsmittels von Chloroform zu Dichlormethan vorgenommen. Eine Temperaturerhöhung des Prozesses (bei gleich bleibendem Lösungsmittel), hätte eine vermehrte Verdampfung der kontinuierlichen Phase zur Folge. Durch den Austausch des Lösungsmittels (SE-22-14) wurde der Siedepunkt von 61 °C auf 40 °C gesenkt, was eine schnellere Verdampfungsgeschwindigkeit (bei 40 °C) zur Folge hat. In Bild f) kann man fast nur unvollständige Kapseln erkennen, was auf einen zu schnellen Verdampfungsprozess zurückzuführen ist. Um die Verdampfungsgeschwindigkeit zu verlangsamen, wurde beim Einsatz von Chloroform die Temperatur während des Verdampfungsprozesses (SE-22-17) von 40 °C auf RT verringert. Durch diese Verlangsamung des Prozesses konnte die vollständige Phasenseparation stattfinden und man erhält dadurch eine gut ausgebildete Kern-Hülle Morphologie (Bild g). Die Variation des hydrophoben Mediums von HD auf PHD (SE-22-18) hatte keinen Einfluss auf die Kapselbildung (Bild h). Bei SE-22-20 wurde nochmals versucht, das Verhältnis Polymer/HD von 1:2 auf 1:3,5 zu verringern, wodurch jedoch zu wenig PMMA vorhanden war, um alles HD zu verkapseln, und es entstanden keine vollständig geschlossenen Kapseln (Bild i).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Verdampfungsgeschwindigkeit wohl den größten Einfluss auf die Kapselbildung ausübt. Wenn dieser Prozess zu schnell voranschreitet, bleibt keine Zeit für eine vollständige Phasenseparation und nicht alle Partikel weisen eine Kern-Hülle-Morphologie auf. Läuft der Prozess jedoch nur sehr langsam ab, bleibt genug Zeit zur Phasenseparation und einer Ausbildung der Kern-Hülle-Morphologie. Mit diesem neuen Standardansatz mit Verdampfung bei Raumtemperatur wurden die zur UC benötigten Farbstoffe in PMMA-Nanokapseln eingebettet.

5.2.3.2 UC in PMMA-Kapseln

Die Verkapselung der UC-Farbstoffe stellt, wie bereits beim zuvor verwendeten Blockcopolymer, kein Problem dar und wirkt sich nicht auf die Kapselbildung aus. Durch das Anwenden der Lösungsmittelverdampfungs-Technik ist die Wahl der Farbstoffe nicht limitiert. Bei den Ansätzen mit den verschiedenen Farbstoffen wurde der im vorangegangenen Abschnitt ermittelte Standardansatz (SE-22-17) für PMMA-Nanokapseln verwendet. Alle Kapseln mit eingebetteten Farbstoffen besitzen einen Durchmesser von ca. $d_i = 230$ nm und einen Feststoffgehalt von ca. 5% (Tabelle 5.8), was mit den Ergebnissen des Standardansatzes übereinstimmt und somit die extrem hohe Reproduzierbarkeit der Nanokapseln veranschaulicht.

Tabelle 5.8: Analyseergebnisse und eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der PMMA-Experimente.

Probe	Hydrophobes Medium	Feststoffgehalt [%]	$D_i (\pm \sigma)$ [nm]	Farbstoffe	
				Sensitizer c [mol·L ⁻¹]	Emitter c [mol·L ⁻¹]
SE-26-3	PHD	5,0	223 (± 51)	Pd-OEP (1×10^{-3})	Perylen (1×10^{-2})
SE-26-4	PHD	5,4	236 (± 70)	Pd-TBP (1×10^{-3})	Perylen (1×10^{-2})
SE-26-13	PHD	4,9	225 (± 54)	Pd-TBP (1×10^{-3})	Bodipy (1×10^{-2})
SE-26-6	PHD	5,5	238 (± 56)	Pd-TNP (1×10^{-3})	Y-Perylen (1×10^{-2})
SE-26-8	PHD	5,6	233 (± 54)	Pd-TBP (1×10^{-3})	----
SE-26-9	PHD	4,9	232 (± 60)	----	Bodipy (1×10^{-2})
SE-26-10	PHD	5,3	234 (± 72)	----	Perylen (1×10^{-2})
SE-26-11	PHD	4,8	228 (± 50)	----	----

In Abbildung 5.32 werden TEM- und SEM-Aufnahmen von der Probe SE-26-13 dargestellt, auf denen die Größe der Nanokapseln von ca. 230 nm bestätigt wird und die Kern-Hülle-Morphologie deutlich zu erkennen ist. Auf Grund der guten Reproduzierbarkeit wurde auf eine Darstellung der Bilder von weiteren Proben verzichtet.

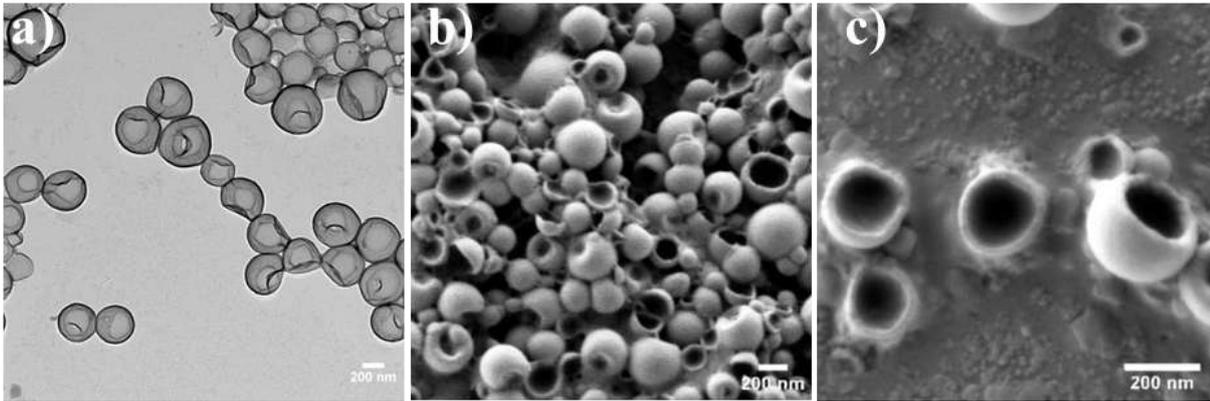


Abbildung 5.32: TEM- und SEM-Aufnahmen von SE-26-13.

Wie bereits beim zuletzt verwendeten Blockcopolymer werden auch bei den Nanokapseln mit PMMA unterschiedliche Farbstoffkombinationen eingesetzt und auf UC-Emission untersucht. Dazu wurden zunächst die bereits bekannten Farbstoffe Pd-OEP und Perylen eingesetzt (SE-26-03, Abbildung 5.33 linkes Diagramm), bei $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ angeregt und die UC-Emission gemessen. Die Anregungsleistung musste von bisher $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$ auf $P_{\text{exc}} = 1,3 \text{ mW}$ reduziert werden, da Alterungserscheinungen am Laser aufgetreten sind und eine Leistung von $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$ bei dieser Wellenlänge nicht mehr möglich war. Dieser Faktor muss somit bei Vergleichen mit früheren Proben (Blockcopolymer und 1. Generation) berücksichtigt werden.

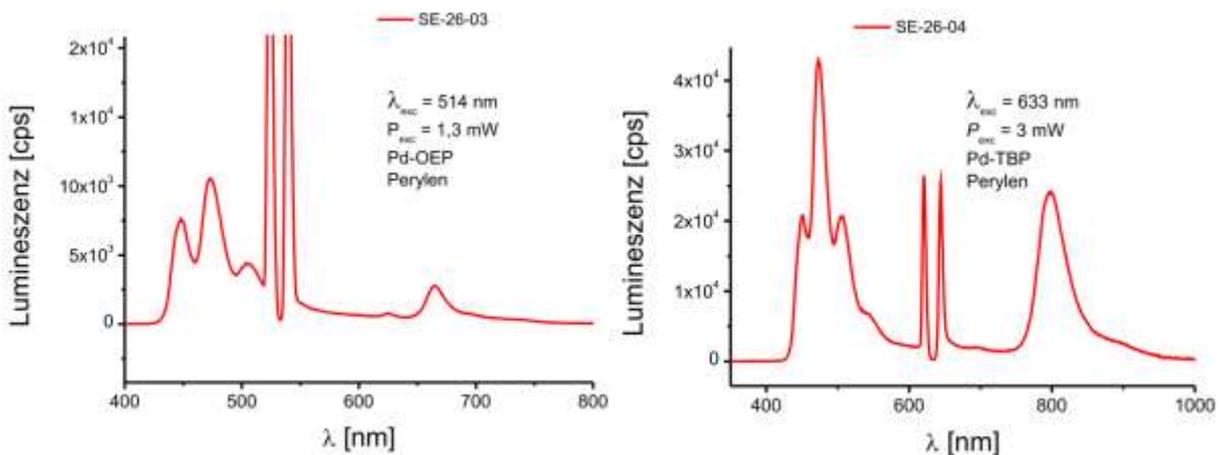


Abbildung 5.33: Spektren der Proben SE-26-03 ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 1,3 \text{ mW}$, Pd-OEP/Perylen) und SE-26-04 ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$, Pd-TBP/Perylen).

Ebenfalls in Abbildung 5.33 wurde das Spektrum von SE-26-04 (rechtes Diagramm) dargestellt. Die Farbstoffe in diesem Ansatz sind Pd-TBP und Perylen welche bei $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ und $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$ angeregt wurden. Bei beiden Ansätzen ist bereits im Spektrum eine Verbesserung der Effizienz im Vergleich zu den analogen Ansätzen mit dem Blockcopolymer

zu erkennen. Das Signal der UC-Fluoreszenz ist deutlich größer als das der unerwünschten Phosphoreszenz. Die genauen Werte wurden in Abbildung 5.35 berechnet und in Tabelle 5.9 mit den Effizienzen der analogen Ansätze mit dem Blockcopolymer verglichen.

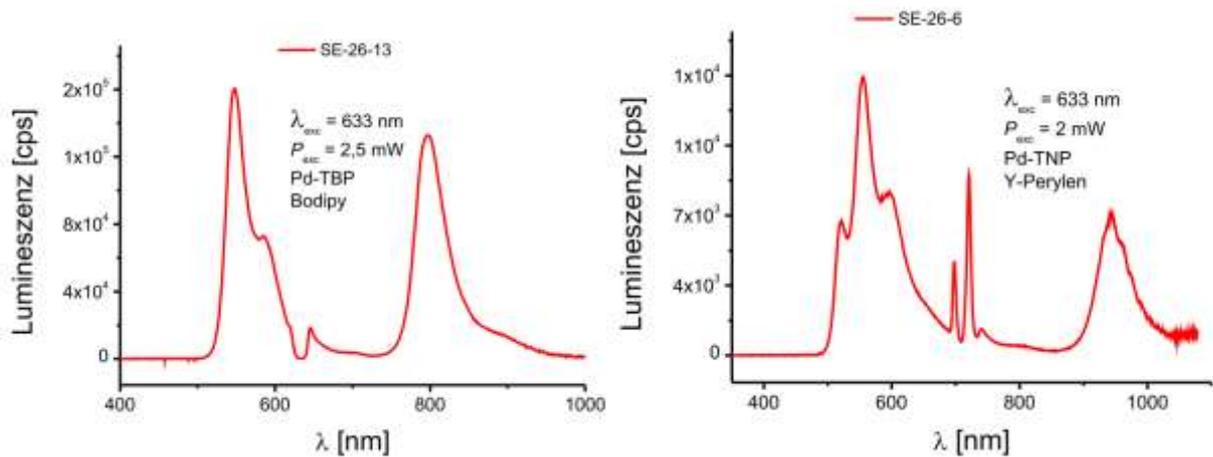


Abbildung 5.34: UC-Spektren der Proben SE-26-13 ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, $P_{exc} = 2,5 \text{ mW}$, Pd-TBP/Bodipy) und SE-26-6 ($\lambda_{exc} = 710 \text{ nm}$, $P_{exc} = 2 \text{ mW}$, Pd-TNP/Y-Perylen).

Wie bereits beim Blockcopolymer wurden auch die Farbstoffkombinationen Pd-TBP/Bodipy und Pd-TNP/Y-Perylen in PMMA Nanokapseln eingebettet (Abbildung 5.34), womit gezeigt wird, dass bei PMMA die Verkapselung aller empfindlichen Farbstoffe möglich ist. Dadurch ist im PMMA-System eine ebenfalls sehr hohe Variabilität der UC-Farbstoffe möglich, was eine Verschiebung sowohl bei der Anregungswellenlänge als auch bei der Emissionsbande möglich macht. Bei diesen beiden Proben kann man, ebenso wie bei den anderen Farbstoffpaaren mit PMMA, nur ein geringes Signal der Phosphoreszenz erkennen, was eine gesteigerte UC-Effizienz zur Folge hat. Auf Grund der geringeren Feststoffgehalte von ca. 5% sind die absoluten Integrale der Proben schwächer als bei den Ansätzen mit dem Blockcopolymer, bei denen der Feststoffgehalt der gemessenen Dispersion bei ca. 18% liegt. Vergleicht man die UC-Effizienzen der der PMMA-Proben untereinander (Abbildung 5.35) erhält man dieselbe Tendenz wie bereits beim Blockcopolymer. Die beste Effizienz wurde trotz geringerer Anregungsleistungen ($P_{exc} = 1,3 \text{ mW}$) beim Farbstoffpaar Pd-OEP/Perylen (SE-26-03) mit 95% erreicht. Bei Pd-TBP/Perylen (SE-26-04, 89%) und PD-TBP/Bodipy (SE-26-13, 80%) ist eine leichte Abschwächung der UC-Effizienz zu beobachten, wobei sich der leichte Abfall bei Bodipy teilweise durch die geringere Anregungsleistung ($P_{exc} = 2,5 \text{ mW}$) im Vergleich zum Farbstoffpaar mit Perylen ($P_{exc} = 3 \text{ mW}$) erklären lässt. Der hohe Wert von 94% bei SE-26-06 (Pd-TNP/Y-Perylen) ist erneut durch die Aufnahme der

Phosphoreszenz im Randbereich des Spektrometers etwas zu relativieren und eignet sich nur bedingt zum Vergleich mit den anderen Proben.

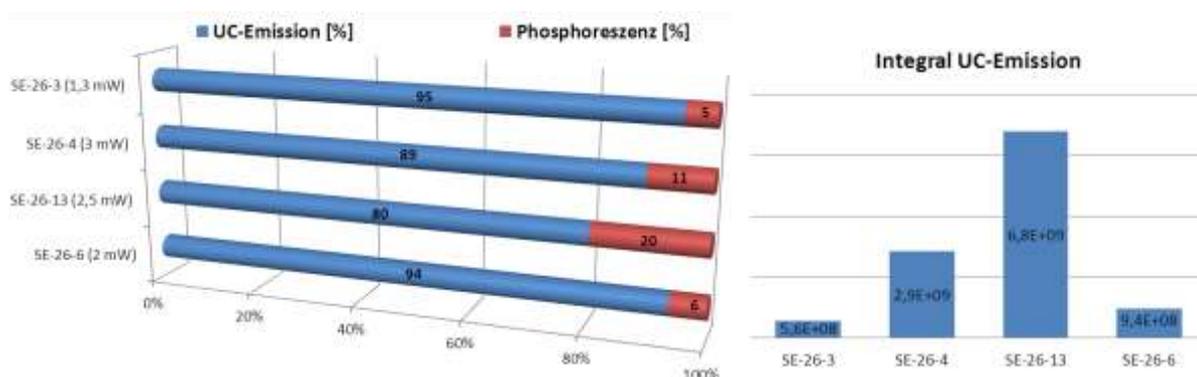


Abbildung 5.35: Links: Vergleich der Effizienzen der Experimente mit verschiedenen Farbstoffen in einer Kapselhülle aus PMMA, aufgenommen bei verschiedenen Anregungsintensitäten des Lasers. Rechts: Vergleich der absoluten Integrale der UC-Fluoreszenz (entspricht der gemessenen Photonenzahl).

Ebenfalls in Abbildung 5.35 ist im rechten Diagramm das Integral der UC-Emission dargestellt, welches mit der Gesamtzahl der detektierten UC-Photonen in dem integrierten Frequenz-/Wellenlängenbereich gleichzusetzen ist. Deutlich am größten ist die Photonenzahl bei der Probe SE-26-13, welche trotz einer geringeren Anregungsleistung von $P_{\text{exc}} = 2,5 \text{ mW}$ mehr als den doppelten Wert des Integrals aufweist als SE-26-04 mit $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$ Anregungsleistung. Alle Proben weisen einen Feststoffgehalt von ca. 5% auf. Der geringe Wert bei SE-26-06 lässt sich erneut durch Kristallisation von Teilen der Farbstoffe bei der Synthese und einer daraus geringeren Farbstoffkonzentration erklären. Der geringe Wert von SE-26-03 deutet auf eine geringere Leuchtkraft, bzw. Quanteneffizienz des Farbstoffpaares Pd-OEP/Perylen hin, da bereits beim Blockcopolymer diese Kombination einen geringen Integralwert aufzuweisen hatte.

Vergleicht man die UC-Effizienzen der verschiedenen Nanokapseln der 2. Generation, hergestellt mittels der Lösungsmittelverdampfungs-Technik, miteinander (Tabelle 5.9), so erhält man folgendes Ergebnis. Für die jeweiligen Farbstoffpaare zeigt sich in den unterschiedlichen Nanokapseln die gleiche Tendenz. Das Farbstoffpaar Pd-OEP/Perylen weist bei allen die höchste Effizienz auf, gefolgt vom Pd-TNP/Y-Perylen. Bei den Versuchen mit Pd-TBP gab es einen kleinen Rückgang der Effizienz, bei Bodipy als Emitter etwas stärker als bei Perylen, wobei man aber die geringere Anregungsintensität bei Bodipy (im Vergleich zu Perylen) in Betracht ziehen muss, was den Abfall etwas relativiert.

Vergleicht man die verschiedenen Nanokapseln untereinander, muss man bei demselben Farbstoffpaar bleiben, um eine zuverlässige Aussage treffen zu können. Nimmt man Pd-

OEP/Perylen als Farbstoffpaar, ist bei PMMA die größte UC-Effizienz von 93% messbar. Dieser Wert ist trotz der niedrigeren Anregungsintensität von nur $P_{\text{exc}} = 1,2 \text{ mW}$ deutlich höher als beim Blockcopolymer (73%) und beim statistischen Copolymer (35%) bei $P_{\text{exc}} = 2 \text{ mW}$. Auch bei den anderen Farbstoffpaaren ist die UC-Effizienz in PMMA-Kapseln deutlich größer (ca. 20%) als beim Blockcopolymer oder dem statistischen Copolymer.

Tabelle 5.9: Vergleich der UC-Effizienzen zwischen den Experimenten mit statistischem Copolymer, Blockcopolymer und PMMA.

Farbstoffpaar	Statistisches Copolymer	Blockcopolymer	PMMA
Pd-OEP/Perylen	35% (2 mW)	73% (2 mW)	95% (1,3 mW)
Pd-TBP/Perylen	10% (3 mW)	69% (3 mW)	89% (3 mW)
Pd-TBP/Bodipy	----	61% (2 mW)	80% (2,5 mW)
Pd-TNP/Y-Perylen	----	82% (2,5 mW)	94% (2 mW)

Diese Steigerung der UC-Effizienz lässt sich unter anderem mit einer fast perfekt ausgeprägten Kern-Hülle-Morphologie erklären. Des Weiteren scheint nur sehr wenig Farbstoff in der Kapselhülle eingeschlossen zu sein, was sich möglicherweise durch den sehr langsamen Verdampfungsprozess des Lösungsmittels erklären lässt. Durch dieses langsame Ausfällen des Polymers wird vermutlich weniger Farbstoff im Polymer eingeschlossen und mehr Moleküle können am TTA-UC-Prozess teilnehmen. Insgesamt weist die Probe SE-26-13 den besten Emissionswert an UC-Fluoreszenz und eine sehr hohe Effizienz auf, weshalb diese Probe im Folgenden für weitere Versuche verwendet wird, um die Eigenschaften der Nanokapseln genauer zu analysieren.

Im Vergleich zu den bisherigen Proben wurden die Dispersionen mit PMMA-Nanokapseln zur Deoxygenierung nicht für 24 h in der Glove-Box gelagert, um den quenchenden Sauerstoff zu entfernen, sondern es wurde eine neue, chemische Methode zur Deoxygenierung der Dispersion verwendet. Dazu wurde Natriumsulfit (Na_2SO_3 , nur Sulfit genannt) als Reduktionsmittel für den Sauerstoff eingesetzt.^[176, 177] Bei Zugabe von Na_2SO_3 zu einer sauerstoffhaltigen Dispersion wird der vorhandene Sauerstoff reduziert und das Sulfit zu Sulfid oxidiert, was in Gleichung (5.1) dargestellt ist:



Um zu zeigen, dass die Zugabe von Sulfit dieselbe Wirkung hat wie die Lagerung für 24 h in der Glovebox, wurden beide Methoden an der Probe SE-26-13 miteinander verglichen.

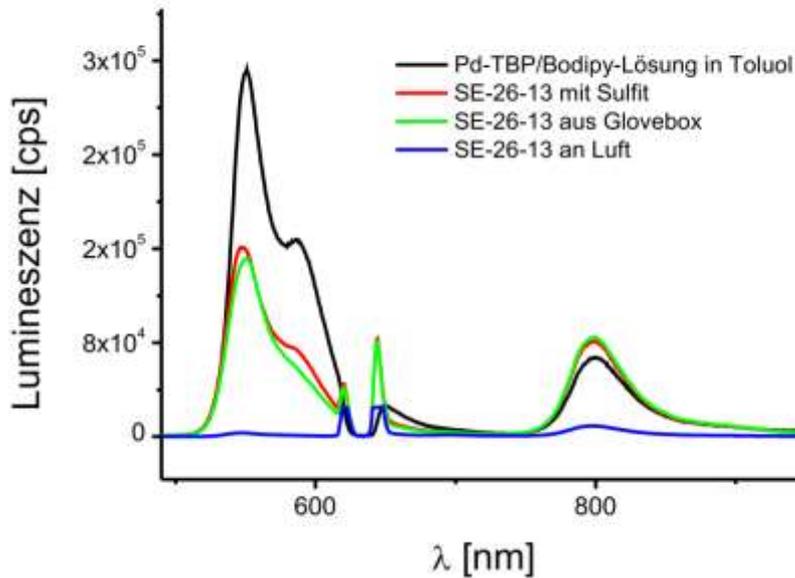


Abbildung 5.36: UC Spektren von SE-26-13 ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, $P_{exc} = 3 \text{ mW}$, $d_{Fokus} = 400 \text{ }\mu\text{m}$) aufgenommenen bei verschiedenen Bedingungen. Rot: Sauerstoff entfernt durch Zugabe von Na_2SO_3 ; Grün: Sauerstoff entfernt durch Lagerung (24 h) in Glovebox; Blau: Messung an Luft; Schwarz: UC-Spektrum von Pd-TBP/Bodipy in Toluol ($c_{\text{Pd-TBP}} = 1 \times 10^{-4}$, $c_{\text{Bodipy}} = 1 \times 10^{-3}$).

Dazu wurde zum einen die Sulfitkonzentration der Dispersion auf $c_{\text{Sulfit}} = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ eingestellt und somit vom Sauerstoff befreit, zum anderen wurde ein Teil des Ansatzes ohne Sulfitzugabe 24 h in der Glovebox gelagert, um den Sauerstoff zu verdrängen. Beide Ansätze sind in Abbildung 5.36 dargestellt. Zwischen den beiden Spektren (Rot und Grün) kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was beide Methoden zu Deoxygenierung als gleich wirkungsvoll qualifiziert. Der ersparte Zeitaufwand bei der Sulfitzugabe und die Unabhängigkeit in der Benutzung einer Glove-Box bringen enorme Vorteile bei der Deoxygenierung des UC-Systems mit sich.

In derselben Abbildung 5.36 wurde zum Vergleich das aufgenommene Spektrum vom Farbstoffpaar Pd-TBP/Bodipy, gelöst in Toluol, dargestellt. Zum anschaulichen Vergleich wurde die Konzentration der Farbstoffe um eine Größenordnung verringert ($c(\text{Pd-TBP}) = 1 \times 10^{-4}$, $c(\text{Bodipy}) = 1 \times 10^{-3}$). Hier kann man erkennen, dass selbst in der reinen Farbstofflösung ein kleiner Phosphoreszenzpeak sichtbar ist und die PMMA-Nanokapseln einen ähnlich geringen Wert aufweisen.

Zusätzlich wird die Messung der PMMA-Nanokapseln an Luft in Abbildung 5.36 dargestellt, welche bei denselben Anregungsbedingungen aufgenommen wurde wie die dort ebenfalls

dargestellten restlichen Proben. Bereits allein auf Grund des schwachen Feststoffgehaltes kann man jedoch kaum ein Signal erkennen. Wenn man jedoch den Durchmesser des Fokuspunktes auf $d_{\text{Fokus}} = 100 \mu\text{m}$ verringert und somit die Anregungsintensität nochmal erhöht, bekommt man ein deutlich besseres Signal (Abbildung 5.37). Vergleicht man die Signalstärke von PMMA an Luft mit der vom Blockcopolymer an Luft (vgl. Abbildung 5.28) erhält man im Falle des Blockcopolymers ein ca. vierfach stärkeres Signal als im Fall von PMMA. Dieser Wert relativiert sich wieder wenn man den geringeren Feststoffgehalt von PMMA (4,9%) in Betracht zieht, welcher ca. vierfach geringer ist als beim Blockcopolymer (19,6%).

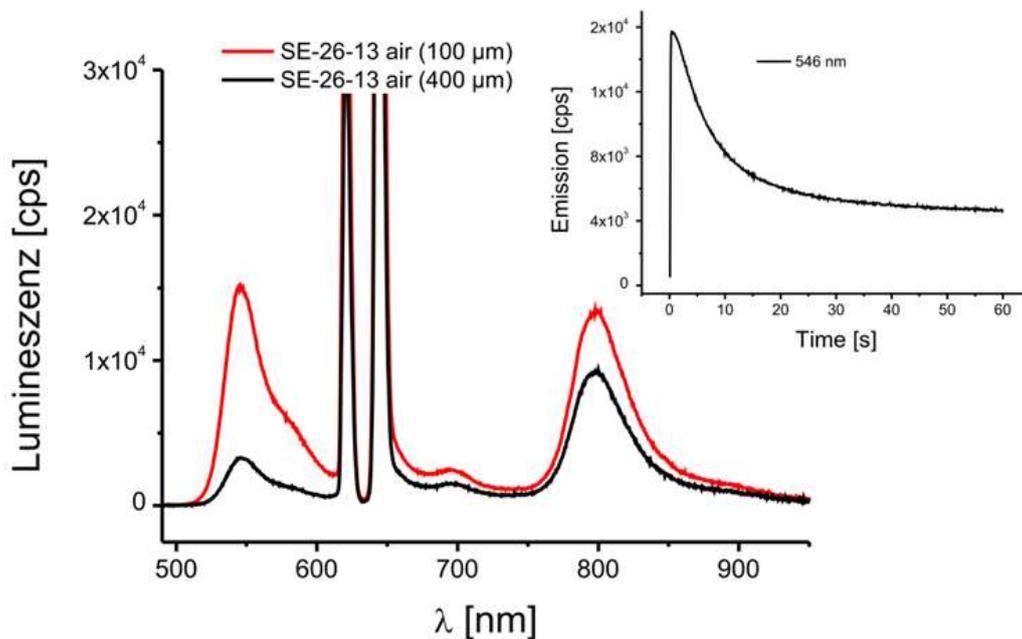


Abbildung 5.37: Ansatz SE-26-13 an Luft und zusätzliche Kinetikmessung. Rot: $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$; Schwarz: $d_{\text{Fokus}} = 100 \mu\text{m}$. Kinetikmessung von SE-26-13 an Luft ($d_{\text{Fokus}} = 100 \mu\text{m}$) für $\lambda = 546 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$).

Wenn man von einem linearen Anstieg ausgeht (später gezeigt in Abbildung 5.42), erhält man für beide Proben beim gleichen Feststoffgehalt ungefähr dieselben Werte. Auch die Kinetik für das erhaltene UC-Signal verhält sich gleich. Wie bereits beim Blockcopolymer zu beobachten war, erreicht das Signal bei den PMMA-Kapseln nach kurzem Anstieg ein Maximum und fällt dann ab und nähert sich einem Grenzwert an. Vermutlich wird der Sauerstoffgehalt (vgl. Blockcopolymer) in dem Inneren der Nanokapseln soweit reduziert (durch chemische Reaktion des Sauerstoffes mit dem Sensitizer), dass eine TTA-UC detektierbar ist und diese zunächst ein Maximum erreicht. Die relativ dichte Hülle der Kapseln aus PMMA verhindert dann einen schnellen Wiedereintritt des Sauerstoffes in das Kapselinnere. Dieses langsame Wiedereindringen des Sauerstoffes ins Innere der Kapseln

zeigt sich im langsamen Rückgang des Signals und der Annäherung an einen Grenzwert (Gleichgewicht zwischen nachrückendem und abreagierendem Sauerstoff).

Wie bereits am normalen Spektrum zu sehen ist, gibt es bei der Effizienz und der Zahl der gemessenen UC-Photonen keinen Unterschied zwischen der Probe in der Glovebox und der mit Sulfite behandelten Probe (Abbildung 5.38). Beide erreichen eine hohe Effizienz von fast 90% und einen für den eigentlich geringen Feststoffgehalt von 4,9% einen hohen Wert (Integral) an gemessener UC-Fluoreszenz. Der Vergleich mit der Lösung zeigt, dass selbst in reiner Lösung nicht 100% an Effizienz erreicht werden. Beim Vergleich der gemessenen UC-Photonen (Integral) muss man beachten, dass bei der reinen Lösung die Konzentration um eine Größenordnung verringert wurde.

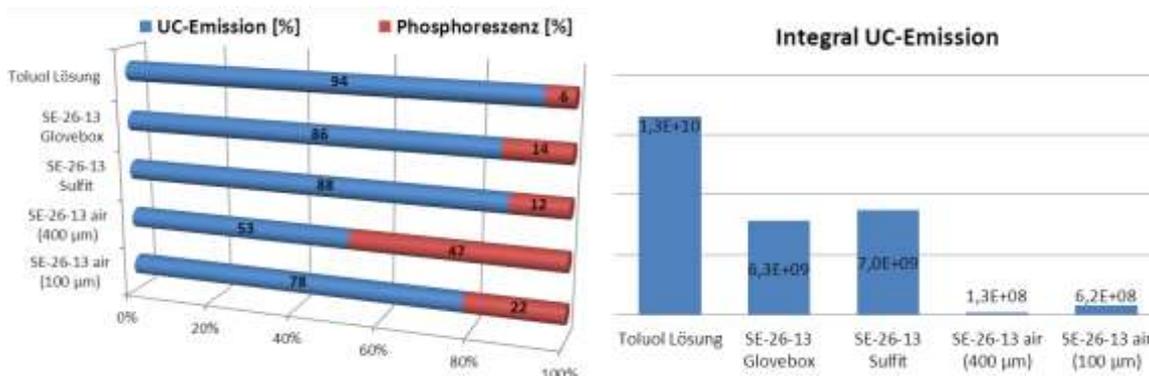


Abbildung 5.38: Effizienzvergleich (links) und Integral der UC-Emission (rechts) des Ansatzes SE-26-13, aufgenommen bei unterschiedlichen Bedingungen. Zum Vergleich wurde die Farbstofflösung von Pd-TBP/Bodipy in Toluol mit aufgeführt.

Bei den zwei Proben, die an Luft gemessen wurden, ist die Effizienz deutlich schlechter. Somit wird nochmal bestätigt, dass die Anwesenheit von Sauerstoff einen negativen Einfluss auf die UC-Effizienz ausübt. Bei der Probe SE-26-13 an Luft, gemessen bei $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$, und damit bei denselben Anregungsbedingungen wie die Proben ohne Sauerstoff, erhält man einen Verlust der Effizienz von 30-40%. Wenn man beide Proben gemessen an Luft, miteinander vergleicht, zeigt sich nochmal ein deutlicher Einfluss der Anregungsintensität auf den Ablauf des UC-Prozesses. Bei einer Erhöhung der Intensität um das 16-fache ($d_{\text{Fokus}} = 100 \text{ nm}$) ergibt sich eine Steigerung der Effizienz um ca. 30%. Vergleicht man das UC-Signal (Integral) der beiden Proben an Luft mit den deoxygenierten Proben (Sulfite und Glovebox), so erhält man einen Verlust von fast 90% des Signals. Dieser ist damit etwas höher als beim Blockcopolymer, bei dem er nur bei ca. 80% liegt.

Letztlich wurde gezeigt, dass eine erfolgreiche Deoxygenierung mit Sulfit als Reduktionsmittel des Sauerstoffs ohne Verlust an Effizienz und UC-Fluoreszenz stattfindet. Außerdem wurden erfolgreiche Messungen der TTA-UC an Luft durchgeführt, bei denen die Dispersion zuvor nicht vom Sauerstoff befreit wurde.

Einfluss der Deoxygenierung mit Sulfit

In den folgenden Experimenten wird die Deoxygenierung mit Sulfit näher untersucht. Zum einen wird untersucht, wie hoch die Konzentration an Na_2SO_3 sein muss um den Sauerstoff vollständig zu reduzieren, zum anderen wird analysiert, am Beispiel eines geschlossenen und geöffneten Gefäßes, wie lange eine bestimmte Sulfitkonzentration für sauerstofffreie Bedingungen sorgt.

Zur Untersuchung des Einflusses der Deoxygenierung mit Sulfit wurden in Abbildung 5.39 Spektren von SE-26-13 ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$) bei unterschiedlichen Sulfitkonzentrationen (1×10^{-4} bis 1×10^{-2}) aufgenommen. Bei den geringen Konzentration von $c(\text{Sulfit}) = 1 \times 10^{-4}$ bis $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde nur ein geringes UC-Signal detektiert welches, das vom UC-Integral her mit dem unter Sauerstoff aufgenommenen Signal von SE-26-13 vergleichbar ist. Ab einer Konzentration von $c = 3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde das Signal der UC-Fluoreszenz deutlich stärker, und erreicht fast den Wert der vollständig deoxygenierten Probe mit $c(\text{Sulfit}) = 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Zur Verdeutlichung dieser Ergebnisse wurde das Signal der UC-Emission gegen die steigende Sulfitkonzentration aufgetragen und zusätzlich in Abbildung 5.39 eingefügt. Man sieht deutlich, dass ab einer bestimmten Grenze (zwischen 2×10^{-3} und $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) genug Sulfit vorhanden ist, um den Sauerstoff vollständig zu reduzieren. Vor dieser Grenze ist genug O_2 im System, um die TTA-UC vollständig zu unterdrücken (TTA-Signal wie an Luft). Nach dem Überschreiten dieser Grenze wird ein Maximalwert der UC-Emission erreicht, der sich durch weitere Erhöhung der Konzentration an Sulfit nicht mehr verändert, da der gesamte Sauerstoff vollständig reduziert wurde.

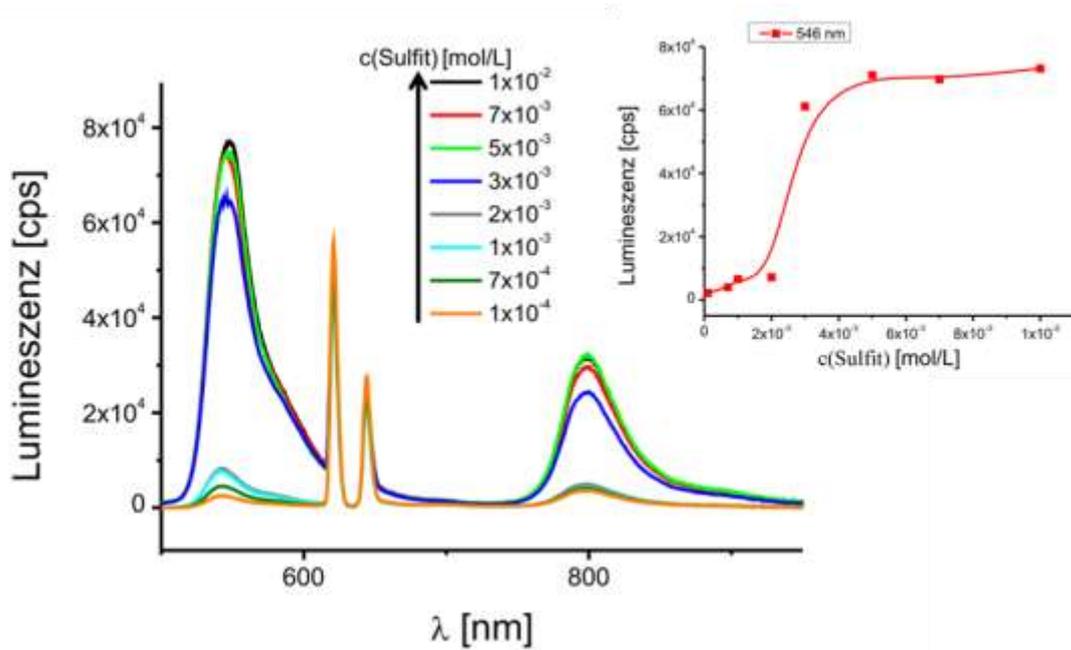


Abbildung 5.39: UC-Spektren von SE-26-13, aufgenommen bei steigender Sulfidkonzentration ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$). Zusätzliches Diagramm mit UC-Emission aufgetragen gegen steigende Sulfidkonzentration $c(\text{Sulfit})$ in $[\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$.

Alle Proben wurden an Luft abgefüllt, wodurch von einer „normalen“ Konzentration von Sauerstoff in Dispersion und Küvette ausgegangen werden darf. Die Küvette war während der Messung mit einem Deckel verschlossen, so dass kaum weiterer Sauerstoff aus der Luft nachströmen konnte. Bei allen weiteren Experimenten mit Sulfid als Antioxidans, wurde eine Sulfidkonzentration von $c(\text{Sulfit}) = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ verwendet, um einen zusätzlichen „Puffer“ an Antioxidantmittel zu haben. Beim Einsatz von zu großen Mengen an Na_2SO_3 kann eine Verschiebung des pH-Wertes der Dispersion in den alkalischen Bereich auftreten. Diese pH-Wert-Änderung hat zur Folge, dass die Stabilität der Dispersion durch die verminderte elektrostatische Stabilisierung beeinträchtigt wird, wodurch eine Koagulation der Nanokapseln stattfinden kann. Die bisherigen Versuche mit Sulfid und Sauerstoff wurden in einer Standardküvette ($h = 3,5 \text{ cm}$, $d = 1 \text{ mm}$) bei geschlossenem Deckel ($d = 3,5 \text{ cm}$) durchgeführt.

Um das Sulfid als mögliches Antioxidans bei den cLSM Messungen der lebenden Zellen zu verwenden, wurde ein Plastikgefäß (Ibidi, $d = 3 \text{ cm}$) verwendet (dasselbe Gefäß wie bei den Zellanwendungen), dort die Dispersion eingefüllt und bei offenem und geschlossenem Deckel Sulfid ($c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) hinzugefügt. Anschließend wurde das UC-Signal nach bestimmten Zeitintervallen ($t = 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180 \text{ min}$) gemessen und dadurch die Anwesenheit von quenchenden Sauerstoff in der Dispersion untersucht.

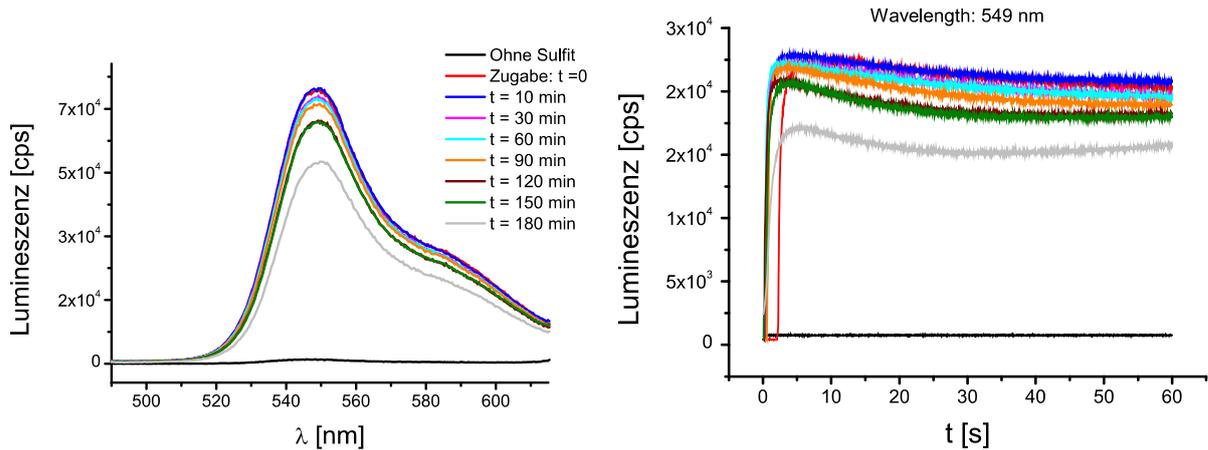


Abbildung 5.40: Links: UC-Spektren von SE-26-13 ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$) nach Zugabe von Sulfit ($c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) nach bestimmten Zeitintervallen in einem geschlossenen Plastikgefäß (Ibidi, $d = 3,5 \text{ cm}$). Rechts: Kinetik der jeweiligen UC-Messung von der Wellenlänge $\lambda = 549 \text{ nm}$ der definierten Zeitintervalle über den Bereich von $t = 60 \text{ s}$ (Legende siehe linkes Diagramm).

In Abbildung 5.40 sind die Spektren der Messungen bei geschlossenem Gefäß dargestellt. Als Negativkontrolle wurde die Messung zunächst ohne Sulfit (schwarz) durchgeführt, bei der dann wie erwartet kaum ein UC-Signal zu sehen ist. Bereits direkt nach der Zugabe von Sulfit wurde die erste Messung ($t = 0$, rot) durchgeführt und es wurde sofort ein hohes UC-Signal gemessen. Das heißt, der vorhandene Sauerstoff wurde vom Sulfit in weniger als ca. 10 s vollständig reduziert, so dass TTA-UC möglich ist. Bei den unterschiedlichen Zeitintervallen kann man jeweils einen minimalen Signalverlust erkennen. Nach $t = 180 \text{ min}$ wird dieser Verlust ein wenig deutlicher, liegt aber immer noch im Bereich eines guten UC-Signals.

Bei der Messung mit dem offenen Gefäß (Abbildung 5.41, Sauerstoff kann ungehindert in Dispersion nachdiffundieren) ist ebenso direkt nach der Zugabe von Sulfit ($t = 0$, rot) ein maximales UC-Signal messbar. Wie bereits beim geschlossenen Gefäß wurde auch hier bei der Negativkontrolle nur ein sehr geringes UC-Signal detektiert. Bei allen Messungen, die zu denselben Zeiten wie beim geschlossenen Gefäß erfolgten, ist somit ein etwas stärkerer Verlust des Signals zu beobachten. Besonders deutlich ist dies nach $t = 150 \text{ min}$ und schließlich nach $t = 180 \text{ min}$ zu beobachten. Nach 3 h ist nur die halbe Signalstärke erreichbar, was ebenso wie der langsamere Anstieg zu Beginn der 60 s auf eine Reaktion von vorhandenem Sauerstoff mit dem Sensitizer hindeutet. Als Nebenbemerkung sei erwähnt, dass beim offenen Gefäß grundsätzlich ein höheres Signal erzielt wurde, da der Deckel kein zusätzliches Hindernis (Streuobjekt) für die Emission darstellte (ca. 15% mehr Signal), weshalb sich die absoluten Zahlen der Signale nur innerhalb einer Messreihe vergleichen lassen.

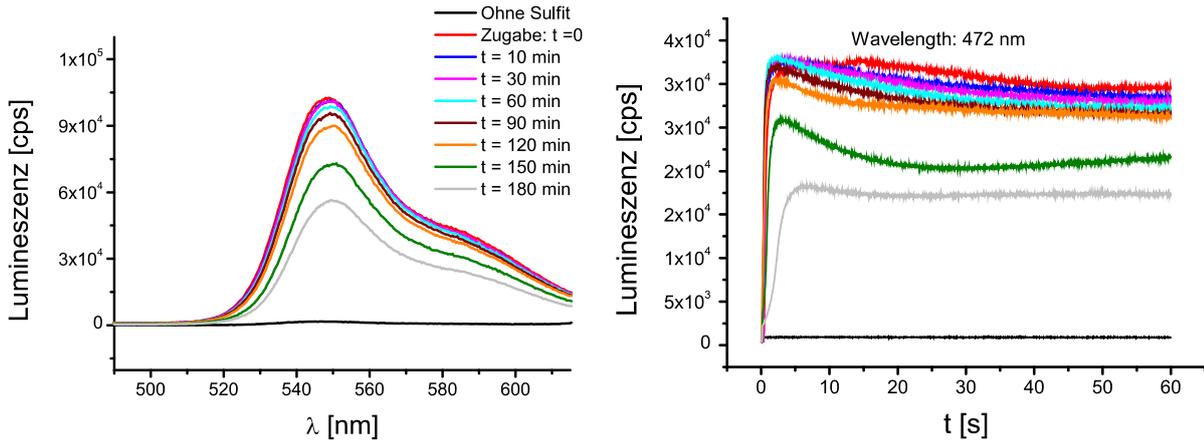


Abbildung 5.41: Links: UC-Spektren von SE-26-13 ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$) nach Zugabe von Sulfit ($c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) nach bestimmten Zeitintervallen in einem offenen Plastikgefäß (Ibidi, $d = 3,5 \text{ cm}$). Rechts: Kinetik der jeweiligen UC-Messung von der Wellenlänge $\lambda = 549 \text{ nm}$ der definierten Zeitintervalle über den Bereich von $t = 60 \text{ s}$ (Legende siehe linkes Diagramm).

Beide Messreihen zusammenfassend betrachtet kann man sagen, dass sowohl beim offenen als auch beim geschlossenen Gefäß nach 120 min ein ausreichendes UC-Signal vorhanden ist, um beispielsweise die UC mit dem Mikroskop zu detektieren.

Abhängigkeit vom Feststoffgehalt

Beim folgenden Experiment wurde untersucht, ob sich eine steigende Verdünnung der Dispersion auf die UC-Effizienz auswirkt. Dazu wurden von der Dispersion SE-26-13 fünf verschiedenen Verdünnungen hergestellt. Da die ursprüngliche Dispersion einen Feststoffgehalt von 4,88% aufweist, wurde der Feststoffgehalt der jeweiligen Verdünnungen entsprechend berechnet (siehe Legende in Abbildung 5.42). Wie erwartet gehen die Signale der UC-Emission mit steigender Verdünnung zurück. Wenn man die gemessenen Integrale der UC-Emission (rechtes Diagramm, Abbildung 5.43) gegenüber dem sinkenden Feststoffgehalt aufträgt, erhält man einen nahezu linearen Abfall (Abbildung 5.42, Zusatzdiagramm), was die bisherigen Vermutungen bestätigt. Wenn man die Effizienzen der jeweiligen Verdünnungen von SE-26-13 miteinander vergleicht (Abbildung 5.43, linkes Diagramm), dann kann man eigentlich keinen großen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Verdünnungen feststellen.

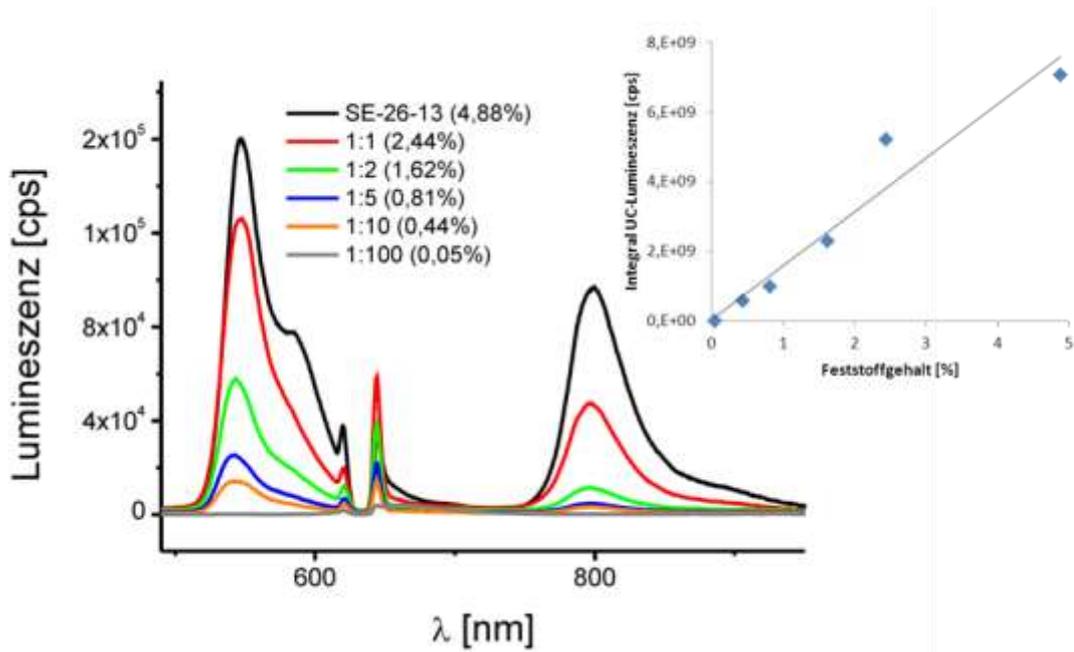


Abbildung 5.42: UC-Spektren von SE-26-13 ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, $P_{exc} = 3 \text{ mW}$, $d_{Fokus} = 400 \mu\text{m}$) bei steigender Verdünnung der Dispersion (abnehmender Feststoffgehalt). Zusätzliches Diagramm rechts: Gemessenes UC-Integral gegenüber Feststoffgehalt aufgenommen.

Es gibt zwar von der unverdünnten Probe einen leichten Anstieg der Effizienz von 86% auf zunächst 88% (1:1) und dann 94% (1:2 bis 1:10) bis er bei weiterer Verdünnung auf 1:100 wieder auf 88% abfällt. Vermutlich lassen sich die Abweichungen zwischen den einzelnen Proben auf Messungenauigkeiten zurückzuführen, speziell bei den geringeren Signalen, bei denen ein Messfehler vielleicht stärker ins Gewicht fällt.

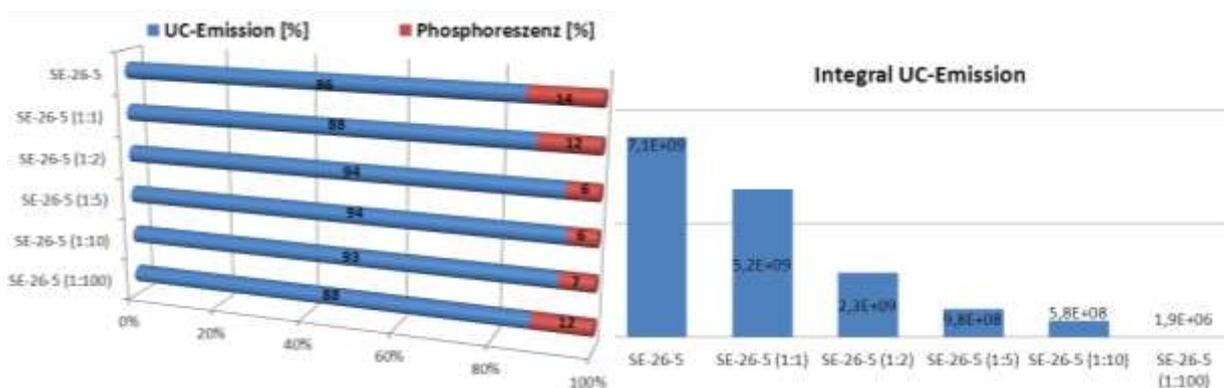


Abbildung 5.43: Effizienzvergleich (links) und Integral der UC-Emission (rechts) von steigenden Verdünnungen des Ansatzes SE-26-13.

Somit ist festzustellen, dass sich eine vergrößerte Verdünnung, bzw. ein niedrigerer Feststoffgehalt nicht negativ auf die UC-Effizienz auswirkt, was das Herabsetzen des

Feststoffgehaltes um 80% von den Ansätzen mit dem Blockcopolymer zu denen mit PMMA ebenfalls mit einschließt.

Abhängigkeit vom pH-Wert

In einem weiteren Versuch wurde eine mögliche pH-Abhängigkeit der UC-Emission der PMMA-Kapseln untersucht. Dieser Versuch ist im Besonderen für die biologische Anwendung von Bedeutung, da in einer Zelle in den verschiedenen Zellkompartimenten unterschiedliche pH-Werte zu finden sind.^[178, 179] Dazu wurden zu der Dispersion SE-26-13 wenige Tropfen einer Säure (HCl für pH 1, Essigsäure für pH 2-3) oder Base (NaOH für pH > 11) zugegeben und der resultierende pH-Wert gemessen. Anschließend wurde die Dispersion 24 h in der Glovebox gelagert, um den Sauerstoff zu verdrängen.

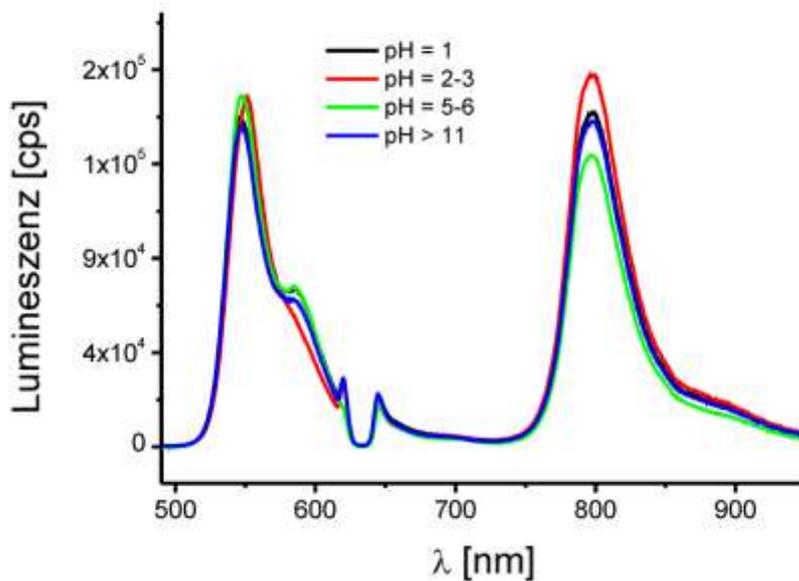


Abbildung 5.44: UC-Spektren der Probe SE-26-13 ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 2,5 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \text{ }\mu\text{m}$) bei verschiedenen pH-Werten.

Die Messungen bei den unterschiedlichen pH-Werten sind in Abbildung 5.44 dargestellt. Bei der UC-Emission gibt es keine Unterschiede bei den unterschiedlichen pH-Werten. Es sind zwar geringe Schwankungen zu erkennen, jedoch sind diese Schwankungen wahrscheinlich auf Messungenauigkeiten oder auf leichte Schwankungen in der Stabilität der Nanokapseln zurückzuführen. Somit ist die TTA-UC, eingebettet in Nanokapseln, von einer Änderung des pH-Wertes der Dispersion nicht beeinflusst, egal ob sie alkalisch oder sauer ist. Da das eigentliche UC-System in den Nanokapseln durch die Polymerhülle vom wässrigen System abgegrenzt ist, waren diese Ergebnisse zu erwarten. Das einzige Problem bei extremen pH-

Werten bestand darin, dass bei $\text{pH} = 1$ eine Aggregation der Kapseln festgestellt wurde. Dieser extreme Wert sorgt somit für eine Destabilisierung der Nanokapseln, da die elektrostatische Abstoßung des anionischen Tensids SDS nicht mehr aufrechterhalten wird. Trotz der Koagulation der Kapseln ist ein UC-Signal messbar, das sich von dem der nicht aggregierten Nanokapseln nicht unterscheidet. Mit diesem Versuch wurde die Unabhängigkeit der Nanokapseln von einer äußeren pH-Wertänderung nachgewiesen und gezeigt, dass die unterschiedlichen pH-Werte in verschiedenen Zellkompartiments keinen entscheidenden Einfluss auf eine UC-Emission aus Nanokapseln ausüben.

Aufreinigung der Nanokapseln

Bei den folgenden Experimenten wurde versucht, die Nanokapseln durch Dialyse oder durch Größenfiltration aufzureinigen. Bei beiden Aufreinigungen wurde zum Vergleich ein neues Spektrum von SE-26-13 aufgenommen, um exakt dieselben Messbedingungen zu erhalten. Die Filtration der Dispersion SE-16-13 erfolgte zunächst mit einem Spritzenfilter mit einer Porengröße von 400 nm und anschließend nochmal mal mit einem Filter einer Porengröße von 200 nm. Nach beiden Filtrationen der Dispersion wurden jeweils DLS-Messungen durchgeführt, Feststoffgehalte gemessen und auf TTA-UC untersucht. Nach dem Filtrieren entstand in beiden Fällen ein Verlust am Feststoffgehalt. Nach dem ersten Filtrieren war ein Feststoffgehalt von 3,2% vorhanden, der durch das zweite Filtrieren nochmal reduziert wurde auf 1,75%. Die Messung der DLS-Werte ergab eine geringere Größenverteilung und einer Verschiebung hin zu kleineren Größen (Tabelle 5.10). Auf zusätzlich aufgenommenen TEM-Bildern (nicht gezeigt) konnte, neben der durchschnittlich verringerten Kapselgröße, kein wesentlicher Unterschied, wie beispielsweise eine Zerstörung der Kapseln als Folge der Filtration im Vergleich zu den nicht aufgereinigten Proben festgestellt werden.

Tabelle 5.10: Vergleich der Analysedaten der unterschiedlichen Aufreinigungsarten.

Probe	$D_i (\pm \sigma)$ [nm]	Feststoffgehalt [%]	UC-Integral	UC-Effizienz [%]
SE-26-13	224 (± 54)	4,88	$4,9 \times 10^9$	86
SE-26-13 (400 nm)	212 (± 55)	3,21	$3,4 \times 10^9$	76
SE-26-13 (200 nm)	182 (± 50)	1,75	$6,3 \times 10^9$	71
SE-26-13	228 (± 55)	4,7	$6,8 \times 10^9$	74
SE-26-13 dialysiert	235 (± 71)	4,58	$1,6 \times 10^9$	71

Betrachtet man das UC-Spektrum (Abbildung 5.45) nach den beiden Filtrationen, fällt zunächst auf, dass nach der ersten Filtration trotz eines Rückgangs des Feststoffgehaltes keine

Abnahme des Signals der UC-Emission zu erkennen ist. Dafür ist ein deutlicher Anstieg der Phosphoreszenz zu beobachten, was folglich zu einer Verschlechterung der UC-Effizienz (von 86% auf 76%, Abbildung 5.46, linkes Diagramm) führt.

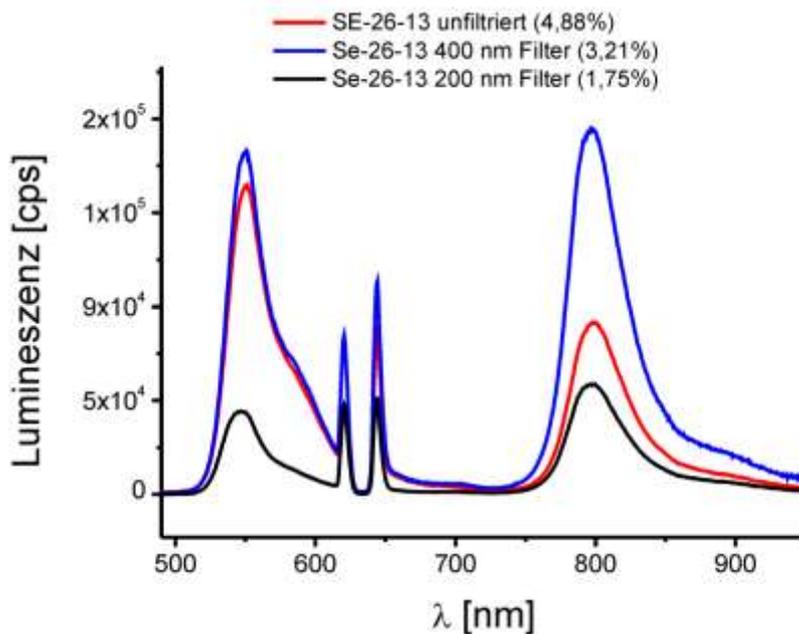


Abbildung 5.45: UC-Spektren von SE-26-13 ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, $P_{exc} = 3 \text{ mW}$, $d_{Fokus} = 400 \mu\text{m}$) vor und nach Filtration mit 400 nm und 200nm Porengröße des Filters.

Nach der zweiten Filtration mit der Porengröße von 200 nm ist ein deutlicher Rückgang des UC-Signals (Tabelle 5.10) zu sehen, was bei dem gemessenen Feststoffgehalt von 1,75% im erwarteten Bereich liegt. Außerdem gab es wieder einen leichten Rückgang der Effizienz um ca. 5%. Der Effizienzverlust nach dem Filtrieren lässt sich durch das Entfernen von einigen großen Kapseln ($d_i \geq 400 \text{ nm}$) erklären. Durch die Entfernung dieser größeren Kapseln verschiebt sich die Effizienz der UC in der Dispersion zu geringeren Werten. Das lässt sich vermutlich damit erklären, dass in der resultierenden Dispersion ein erhöhter Partikelanteil zurückbleibt, da diese normalerweise einen Größenbereich von ca. 100 nm aufweisen. Diese nicht gefilterten Partikel zeigen nur Phosphoreszenz und keine TTA-UC-Emission und verschlechtern somit die gesamte Effizienz der Dispersion.

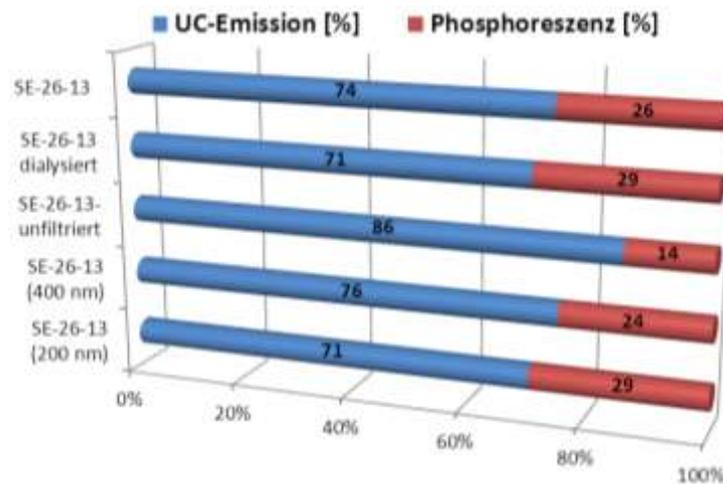


Abbildung 5.46: Effizienzvergleich (links) des Ansatzes SE-26-13, aufgenommen nach unterschiedlichen Aufreinigungen.

Die Dialyse sollte neben dem überschüssigen Tensid auch eventuell nicht verkapselte Farbstoffanteile aus der Dispersion (stabilisiert in Mizellen) entfernen. Bei der Aufarbeitung mittels Dialyse für 24 h mit einem Dialyseschlauch (Porengröße 12000 Dalton oder MWCO 12000 g·mol⁻¹) erhält man im Vergleich zur Filtration nur einen geringen Verlust des Feststoffgehaltes (4,7% auf 4,6%), bedingt durch zunehmende Verdünnung im Dialyseschlauch. Wenn man die beiden Spektren (vor und nach Dialyse, Abbildung 5.47) miteinander vergleicht, kann man den Signlrückgang, begründet durch den geringeren Feststoffgehalt, sehen. Vergleicht man die Effizienzen miteinander, lässt sich kein Rückgang feststellen (Abbildung 5.46). Da aber nur ein geringer Signalverlust und keine Effizienzänderung zu sehen ist, war der Anteil der nicht verkapselten Farbstoffe sehr gering. Die Vermutung, dass überschüssiges Tensid zur zusätzlichen Stabilisierung von Farbstoffen gelöst in PHD vorhanden ist, stellte sich als unbegründet heraus. Bereits die Dialyse für 24 h reichte aus, um so viel Tensid zu entfernen, um die Stabilisierung zu schwächen. Ohne Dialyse ist die Dispersion über mehrere Monate stabil, während nach der Dialyse bereits eine Aggregation nach wenigen Tagen festzustellen ist.

Zusammengefasst machen beide Prozesse der Aufarbeitung wenig Sinn. Die Dialyse entfernt „zu viel“ Tensid (kaum ein Überschuss vorhanden) und verringert somit die langfristige Stabilisierung der Nanokapseln. Bei der Filtration ist ein zu großer Signal- und Effizienzverlust zu beobachten. Eine Ausnahme zur Anwendung dieser Methode wäre eine absolute Notwendigkeit von geringeren Kapselgrößen für bestimmte Anwendungen, welche einen Teilverlust der Lumineszenz rechtfertigen würde.

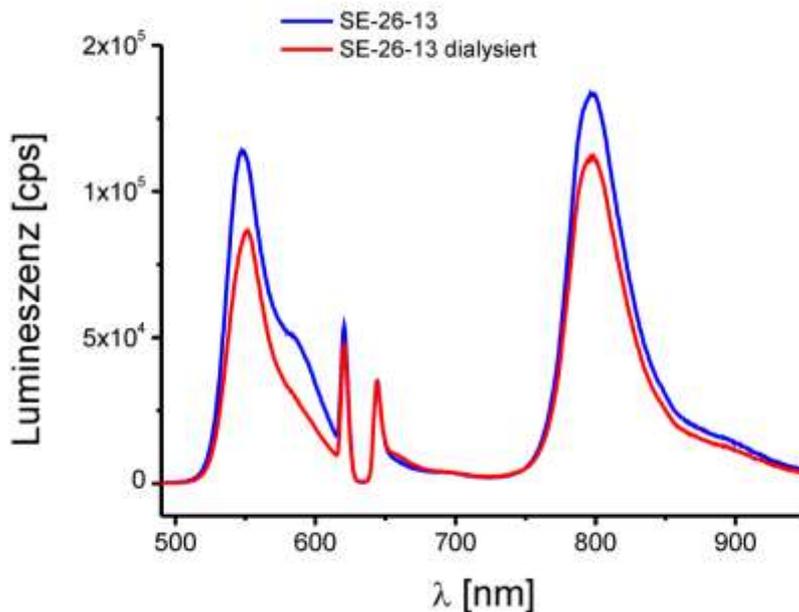


Abbildung 5.47: UC-Spektren von SE-26-13 ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 3 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$) vor und nach der Dialyse für 24 h mit einem Dialyseschlauch (Porengröße 12000 Dalton).

Für die Zellanwendungen der Nanokapseln wurden somit keine zusätzlichen Aufarbeitungsschritte unternommen. Die Kapseln wurden direkt nach der Synthese weiterverwendet.

5.2.3.3 Einführung von weiteren hydrophoben Flüssigkeiten

Um die Nanokapseln besser für weitere Zellanwendungen oder andere biologische Anwendungen zu nutzen, wurde versucht, weitere alternative hydrophobe Flüssigkeiten einzuführen. Die Anforderung an dieses alternative Kernmaterial ist zunächst eine hohe Biokompatibilität. Nebenbei soll es auch die anderen Eigenschaften der bisher verwendeten hydrophoben Flüssigkeiten aufweisen wie eine gute Löslichkeit der UC-Farbstoffe, kein Quenchen der TTA-UC, keine Absorption im sichtbaren Bereich, und eine hohe Hydrophobizität, die entscheidend ist für eine Phasenseparation und somit für eine erfolgreichen Kapselbildung.

In den folgenden Experimenten wurden zwei Substanzen getestet: Zum einen Miglyol, einem kommerziellen Triglyzerid aus Caprylsäure und Caprinsäure, was bereits Anwendung in verschiedenen Kosmetika und Arzneimitteln findet;^[180] zum anderen wurde kommerzielles Olivenöl aus dem Supermarkt zur Anwendung gebracht.

Zunächst galt es herauszufinden, ob sich die beiden Stoffe zur UC eignen, sprich ob die benötigten Farbstoffe gelöst werden können und ob in reiner Lösung TTA-UC stattfindet. Dazu wurde das UC-Farbstoffpaar Pd-OEP/Perylen mit einer Konzentration von $c(\text{Pd-OEP}) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und $c(\text{Perylen}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ aus einer toluolischen Lösung in das jeweilige Medium überführt, welches dann anschließend vom Sauerstoff befreit wurde und auf UC untersucht wurde. Da hier die reinen Lösungen untersucht wurden, konnte die Quantenausbeute (Berechnung mit Gleichung (2.11)) bestimmt werden. Zum Vergleich wurden die Messungen mit HD und PHD durchgeführt. Zur Bestimmung der Quantenausbeute wurden die Absorptionsspektren der Farbstofflösung gemessen (Abbildung 5.49). Die Anregungswellenlänge von Pd-OEP wurde von $\lambda = 532 \text{ nm}$ auf 542 nm verschoben, da diese Wellenlänge näher am Absorptionsmaximum von Pd-OEP liegt (Abbildung 4.10). Die Nutzung dieser Wellenlänge wurde durch die Anschaffung eines neuen Notch-Filters möglich, welcher zusätzlich im Bereich von $\lambda = 650 \text{ nm}$ ($\pm 10 \text{ nm}$) die Transmission der Wellenlängen blockiert und somit einen Teil der möglichen Phosphoreszenz abschneidet. In Abbildung 5.48 sind die UC-Spektren der vier eingesetzten Farbstofflösungen dargestellt. Das größte UC-Signal und die beste Quantenausbeute ($\text{QY} = 7,5\%$) wurde beim Lösungsmittel Miglyol gemessen, was möglicherweise mit der Löslichkeit der Farbstoffe oder der geringen Viskosität zusammenhängt. PHD ($\text{QY} = 5,8$) und HD ($4,55\%$) unterscheiden sich kaum in der UC-Fluoreszenz und der daraus resultierenden Quantenausbeute, liegen aber unter dem Wert von Miglyol.

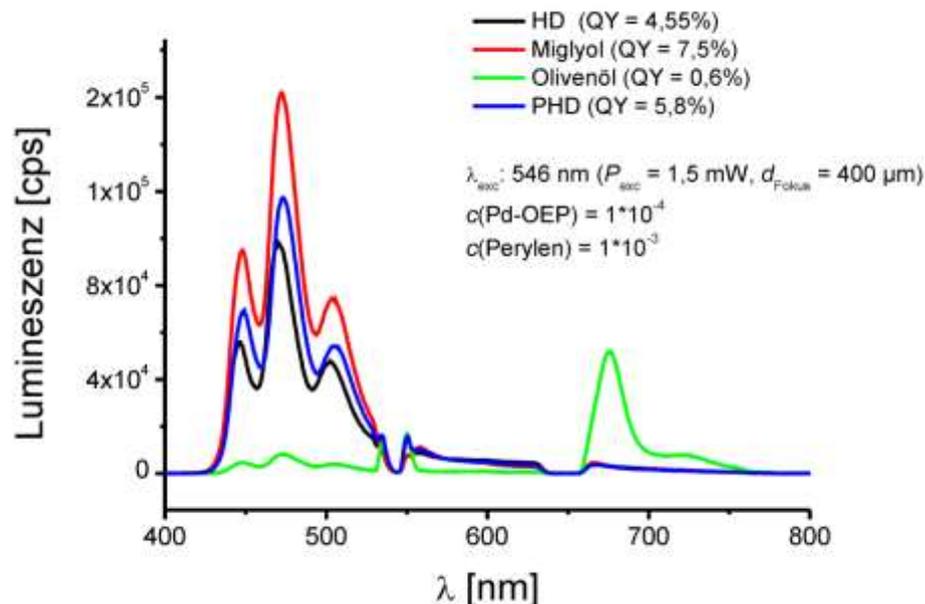


Abbildung 5.48: UC-Spektren der verschiedenen Lösungsmittel ($\lambda_{\text{exc}} = 546 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 1,5 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$) und Angabe der berechneten Quantenausbeuten (QY).

Olivenöl hingegen grenzt sich deutlich ab von den anderen Lösungsmitteln und weist mit einer Ausbeute von $QY = 0,5\%$ den schwächsten Wert auf. Zusätzlich ist beim Olivenöl Phosphoreszenz zu beobachten, was auf einen gehinderten TTT-Transfer, möglicherweise resultierend aus zu hoher Viskosität, hindeutet.

Einen weiteren Hinweis auf das geringe UC-Signal des Olivenöls kann man im Absorptionsspektrum (Abbildung 5.49) finden. Im Vergleich zu den anderen Lösungsmitteln ist bei Olivenöl zwischen $\lambda = 450$ und 500 nm ein höherer Absorptionswert messbar. Somit wird ein mögliches UC-Signal teilweise vom Lösungsmittel selbst wieder absorbiert. Dieser Absorptionswert ist mitunter auf die Verunreinigung der vielen Zusatzstoffe in kommerziellem Olivenöl zurückzuführen. Trotz der geringen Quantenausbeute von Olivenöl wurde es, wie bereits Miglyol, auf eine mögliche Kapselbildung mit der Lösungsmittelverdampfungs-Methode untersucht.

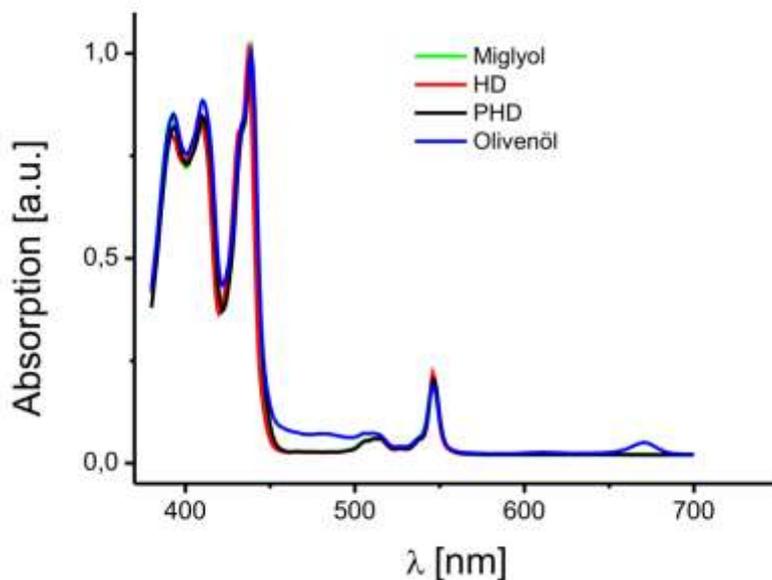


Abbildung 5.49: Absorptionsspektren (auf 1 normalisiert) der Farbstofflösungen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln.

Die Analysenergebnisse der beiden hergestellten Dispersionen (Tabelle 5.11) unterscheiden sich in Größe (ca. 220 nm, DLS-Werte in) und im Feststoffgehalt (ca. 5%) nicht wesentlich von den bisherigen Nanokapseln mit PHD als Hydrophob.

Tabelle 5.11: Analyseergebnisse und eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der PMMA-Experimente mit alternativem hydrophobem Kern.

Probe	Hydrophobes Medium	Feststoffgehalt [%]	$D_i (\pm \sigma)$ [nm]	Farbstoffe	
				Sensitizer c [mol·L ⁻¹]	Emitter c [mol·L ⁻¹]
SE-28-1	Olivenöl	5,1	216 (± 60)	Pd-OEP (1×10^{-4})	Perylen (1×10^{-3})
SE-28-2	Miglyol	4,8	210 (± 62)	Pd-OEP (1×10^{-4})	Perylen (1×10^{-3})
SE-29-1	PHD	5,2	219 (± 55)	Pd-TNP (1×10^{-4})	Y-Perylen (1×10^{-3})
SE-29-2	Miglyol	5,0	208 (± 47)	Pd-TNP (1×10^{-4})	Y-Perylen (1×10^{-3})

Das Betrachten der TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.50 jedoch zeigt, dass beim Ansatz SE-28-01 mit Olivenöl (Bild a) neben den erhaltenen Kapseln auch viele Nanopartikel gebildet wurden, bei denen keine Kern-Hülle-Struktur zu sehen ist. Beim Ansatz SE-28-02 mit Miglyol hingegen sind neben den zahlreichen und gut ausgebildeten Nanokapseln nur vereinzelt Partikel ohne Kern-Hülle Morphologie zu finden und somit unterscheidet dieser Ansatz in der Anzahl der Kapseln nicht von den Ansätzen mit HD oder PHD als Hydrophob.

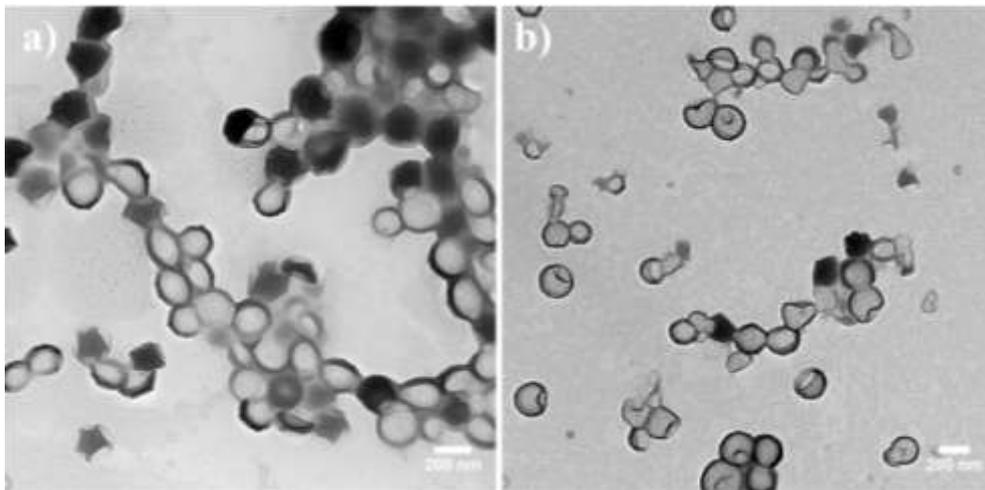


Abbildung 5.50: TEM-Aufnahmen von SE-28-01 (Bild a) mit Olivenöl und SE-28-02 (Bild b) mit Miglyol.

Diese Beobachtungen zeigen sich ebenfalls in den gemessenen UC-Spektren der beiden Proben, welche in Abbildung 5.51 dargestellt sind. Beim Ansatz mit Olivenöl wurde nur ein geringes Signal der UC-Emission gemessen, jedoch aber ein dazu relativ hoher Anteil an Phosphoreszenz. Dieser Anteil stammt, wie bereits in anderen Proben festgestellt, vom Partikelanteil der Dispersion, da dort kaum Diffusion der Farbstoffe stattfindet und somit der Triplett-Triplett-Transfer nur eingeschränkt stattfinden kann.

Beim Ansatz mit Miglyol (SE-28-02) ist ein deutliches Signal der UC-Fluoreszenz, vergleichbar mit dem Ansatz mit PHD (SE-26-03) als Hydrophob, zu sehen. Der direkte Vergleich mit vorherigen Proben ist jedoch nicht möglich, da hier bei höheren Wellenlängen und Laserleistungen ($\lambda_{\text{exc}} = 546 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 1,5 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$) angeregt wurde. Außerdem muss man die hier um eine Größenordnung geringere Konzentration der UC-Farbstoffe in Betracht ziehen (Tabelle 5.11). Im Vergleich mit der Olivenölprobe ist wie erwartet auf Grund des höheren Kapselanteils in der Dispersion eine geringere Phosphoreszenz gemessen worden. Für beide Proben wurden die Integrale der Emission bestimmt und die UC-Effizienz berechnet (siehe Abbildung 5.51). Wie bereits beim Betrachten des Spektrums aufgefallen, ist die Effizienz bei den Kapseln mit Miglyol (95%) deutlich größer als bei denen mit Olivenöl (52%). Erneut ist der Vergleich mit vorherigen Ansätzen schwierig auf Grund der verschiedenen Anregungsbedingungen. Zusätzlich ist der Peak der Phosphoreszenz nicht vollständig aufgezeichnet, da der verwendete Notch-Filter einen Teil davon abschneidet, was die Effizienzberechnung stark beeinflusst. Diese, durch den experimentellen Aufbau entstandene Verkleinerung des Integrals führt zu höheren resultierenden Werten der UC-Effizienz. Aus diesen Gründen eignen sich die Zahlen der beiden Ansätze nur zum Vergleich untereinander.

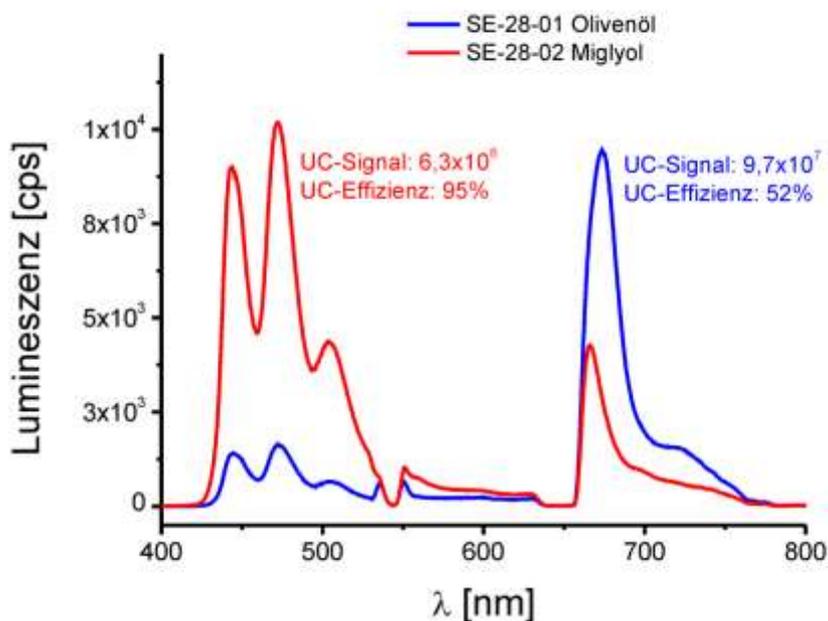


Abbildung 5.51: UC-Spektren der Proben SE-28-01 (Olivenöl, blau) und SE-28-02 (Miglyol, rot) ($\lambda_{\text{exc}} = 546 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 1,5 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$).

Da der direkte Vergleich zwischen PHD und Miglyol mit den oben gezeigten Ansätzen (Abbildung 5.50) nicht möglich war, wurden neue Experimente mit Miglyol und PHD

durchgeführt. Dazu wurde das Farbstoffpaar Pd-TNP/Y-Perylen in PMMA-Kapseln eingebettet, einmal gelöst in PHD und ein weiteres Mal in Miglyol als Hydrophob. Die Konzentration der Farbstoffe wurde im Vergleich zu vorangegangenen Ansätzen mit Pd-TNP und Y-Perylen um eine Größenordnung verringert ($c(\text{Pd-TNP}) = 1 \times 10^{-4}$, $c(\text{Y-Perylen}) = 1 \times 10^{-3}$), um die bisher aufgetretene partielle Kristallisation der Farbstoffe bei der Kapselbildung zu vermeiden. Die gemessenen UC-Spektren der beiden Proben sind in Abbildung 5.52 dargestellt. Angeregt wurde Pd-TNP bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 710$ nm und einer Laserleistung von $P_{\text{exc}} = 4$ mW mit einem Fokusbereich von $d_{\text{Fokus}} = 400$ μm . Als Filter für die Anregungswellenlänge wurde ein Short-Pass Filter ab $\lambda = 700$ nm gewählt. Dadurch würde die eigentlich im Bereich von $\lambda = 900$ - 1000 nm erhaltene Phosphoreszenz vom Filter abgeblockt und somit nicht aufgezeichnet. Vergleicht man nur die beiden UC-Emissionen miteinander, sieht man im Fall von Miglyol ein etwas größeres Signal als im Fall von PHD. Auf die Berechnung der Effizienz muss auf Grund des Fehlens der Phosphoreszenz verzichtet werden, Jedoch ist wie bei den vorherigen Proben mit Pd-TNP/Y-Perylen eine hohe Effizienz im Bereich von 85-90% zu vermuten.

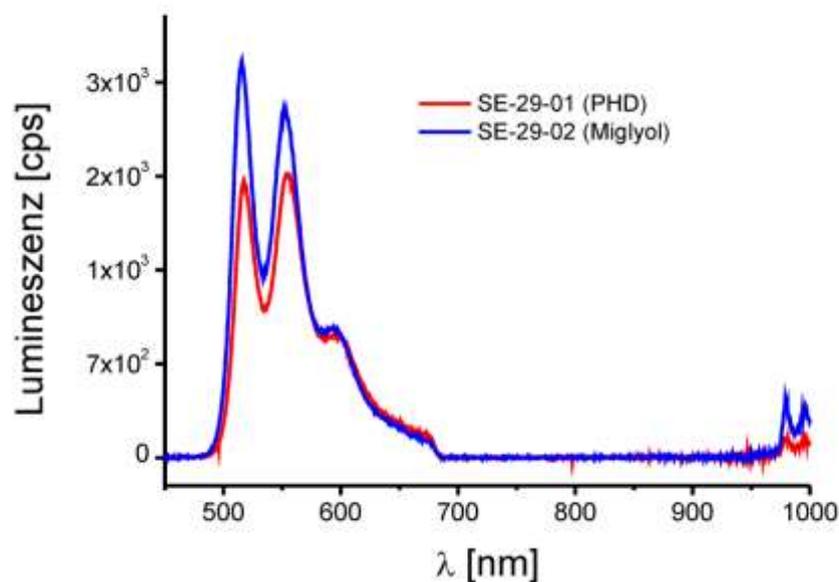


Abbildung 5.52: UC-Spektren der Proben SE-29-01 (Pd-TBP/Y-Perylen in PHD) und SE-29-02 (Pd-TBP/Y-Perylen in Miglyol) ($\lambda_{\text{exc}} = 710$ nm, $P_{\text{exc}} = 4$ mW, $d_{\text{Fokus}} = 400$ μm) ohne Phosphoreszenz.

Somit scheint die Miglyol als hydrophobes Lösungsmittel der Farbstoffe eine bessere Wahl zu sein als das bisher verwendete PHD. Jedoch gilt dies nur für bestimmte Farbstoffkombinationen, wie man in Abschnitt 5.2.3.5 bei den Berechnungen der Quantenausbeuten für verschiedene Farbstoffkombinationen feststellen kann.

5.2.3.4 Nanokapseln mit breitem Emissionsspektrum

Die Energieübertragung vom Sensitizer auf einen Emitter findet, wie bereits in der Theorie beschrieben, über den sogenannten Triplett-Triplett-Transfer (TTT) statt. Dieser TTT muss nicht auf einen Emitter beschränkt sein. Wenn beispielsweise mehrere Emitter im System vorhanden sind, wird die Energie auch auf mehrere Emitter übertragen, wodurch man dann folglich eine TTA-UC-Emission von mehreren Emittoren erhält.^[134] Dadurch wird es möglich, einen sehr breiten anti-Stokes-verschobenen Emissionsbereich der TTA-UC relativ zur Anregungswellenlänge zu erhalten. Die Analysenergebnisse und die Konzentrationen der eingesetzten Farbstoffe sind in Tabelle 5.12 dargestellt.

Tabelle 5.12: Analysenergebnisse und eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der Ansätze SE-25-1 bis SE-25-8.

Probe	Hydrophobes Medium	Feststoffgehalt [%]	$D_i (\pm \sigma)$ [nm]	Farbstoffe	
				Sensitizer c [mol·L ⁻¹]	Emitter c [mol·L ⁻¹]
SE-25-1	PHD	18,9	431(±264)	Pd-TBP 1x10 ⁻³	Perylen / Bodipy 5x10 ⁻³ / 5x10 ⁻³
SE-25-2	PHD	18,3	458 (±122)	Pd-TBP 1x10 ⁻³	Perylen / Bodipy 6,6x10 ⁻³ / 3,3x10 ⁻³
SE-25-8	PHD	5,6	208 (±47)	Pd-TBP 1x10 ⁻³	Perylen / Bodipy 8,3x10 ⁻³ / 1,6x10 ⁻³

In den folgenden Experimenten wird versucht, mehrere Emitter bei nur einem Sensitizer in den Nanokapseln einzubetten. Zunächst wurde eine Kombination der Emitter Perylen und Bodipy getestet. Damit sollte die Verbreiterung des Emissionsspektrums erreicht werden. Wird nur ein Emitter (Perylen) verwendet, kann man Emission in einem Bereich von ca. $\Delta\lambda = 100$ nm feststellen; verwendet man einen zusätzlichen Emitter (Bodipy), reicht der Emissionsbereich über fast $\Delta\lambda = 200$ nm hinweg.

Im ersten Versuch SE-25-01 war das eingesetzte Konzentrationsverhältnis der beiden Emitter (Perylen:Bodipy) mit 1:1 ausgeglichen ($c(\text{Perylen}) = 1 \times 10^{-3}$ mol·L⁻¹, $c(\text{Bodipy}) = 1 \times 10^{-3}$ mol·L⁻¹), während beim Ansatz SE-25-2 ein Verhältnis von 2:1 (Überschuss von Perylen bei gleich bleibender Gesamtkonzentration) eingesetzt wurde. Als Sensitizer wurde jeweils Pd-TBP mit einer Konzentration von $c(\text{Pd-TBP}) = 1 \times 10^{-3}$ mol·L⁻¹ verwendet.

Abbildung 5.53 zeigt den Vergleich der beiden Spektren von SE-25-1 und SE-25-2. Wenn man die UC-Emission der beiden Farbstoffe in SE-25-01 vergleicht, stellt man fest, dass Integral der Emission von Bodipy ist deutlich größer als das von Perylen. Das Integral der

Emission von Perylen wurde von $\lambda = 433$ bis 514 nm berechnet, das der Emission von Bodipy von $\lambda = 515$ bis 610 nm. Aus diesen beiden wurde das Gesamtintegral der UC berechnet und der prozentuale Anteil der jeweiligen Signale ermittelt. Die Berechnung ergab für 25-1, dass 80% der UC-Emission von Bodipy stammt, während nur 20% aus Perylen resultiert. Bei gleich eingesetzter Konzentration der Farbstoffe bedeutet das einen bevorzugten TTT vom Sensitizer Pd-TBP zum Emitter Bodipy anstatt zu Perylen. Um einen gleichen Anteil der UC-Signale beider Emitter zu bekommen, muss das Verhältnis der Konzentrationen der Emitter angepasst werden. Beim Ansatz SE-25-2 wurde ein Überschuss an Perylen eingesetzt (Perylen:Bodipy 2:1), wodurch sich der prozentuale Anteil für Perylen von 20% auf 30% erhöht wurde.

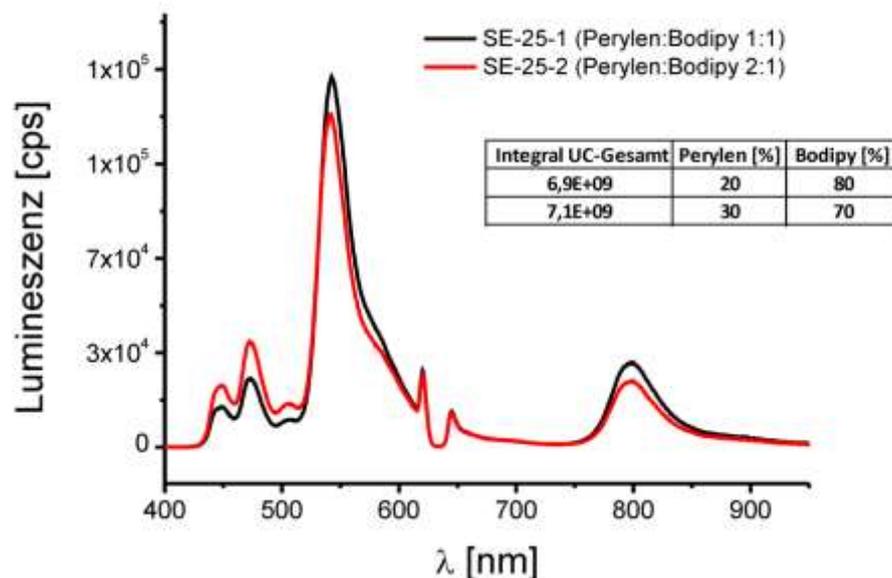


Abbildung 5.53: UC-Spektren von SE-25-1 (schwarz) und SE-25-2 (rot) ($\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm, $P_{\text{exc}} = 3$ mW, $d_{\text{Fokus}} = 400$ μm) mit zwei Emittlern (Perylen und Bodipy) und jeweils einem unterschiedlichen Konzentrationsverhältnis.

Um ein ausgeglichenes Signalverhältnis der beiden Emitter zu erhalten, wurde im Ansatz SE-25-8 ein Konzentrationsverhältnis von 6:1 (Perylen:Bodipy) verwendet. Im UC-Spektrum (Abbildung 5.54) ist ein ausgeglichenes Signalverhältnis mit einem prozentualen Anteil von 52% für Perylen und 48% für Bodipy gemessen worden. Zusätzlich wurde in diesen Ansatz ein Copolymer aus MMA und Bodipy X (0,5 Gew.%) (MMA-Monomer mit kovalent gebundenem Bodipy) (Abbildung 4.14), beigemischt. Durch diesen zusätzlichen Farbstoff gekoppelt an PMMA, welcher ebenfalls bei $\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm angeregt wird, erhält man einen zusätzlichen Emissionspeak. Dieser resultiert aber nicht durch TTA-UC sondern nur durch gewöhnliche direkte Fluoreszenz nach direkter Anregung des Farbstoffes. Durch die

zusätzliche Fluoreszenz erweitert man den Emissionsbereich der Nanokapseln. Zählt man die Phosphoreszenz des Sensitizers als zusätzliche Emission, ist fast der gesamte Bereich des sichtbaren Spektrums mit dem Emissionsbereich der Kapseln abgedeckt.

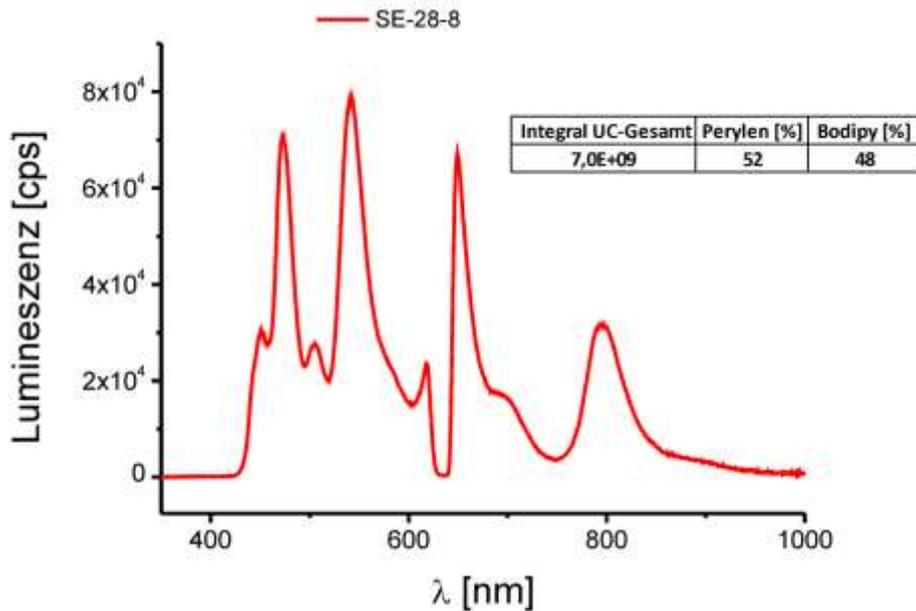


Abbildung 5.54: UC-Spektrum von SE-25-08 mit Perylen und Bodipy als UC-Emitter und zusätzlichem Fluoreszenzemitter (Derivat von Bodipy) bei Anregung mit $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$ ($P_{exc} = 1,2 \text{ mW}$, $d_{Fokus} = 400 \mu\text{m}$).

Schließlich erhält man Nanokapseln, welche mit Anregung bei nur einer Wellenlänge ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$) ein extrem breites Emissionsspektrum bei fast jeder Wellenlänge im sichtbaren Bereich aufweisen. Diese Kapseln mit „weißem“ Licht als Emission bei Anregung mit einer Wellenlänge könnten ihre Anwendung beispielsweise im Bereich der Detektion von molekularen Informationen kleiner Proben finden, wenn dort mehrere Farbstoffkanäle zur Differenzierung unterschiedlicher Informationen benötigt werden (Multiplexed/Multicoloured Detection).^[181]

5.2.3.5 Bestimmung der Quantenausbeute (QY)

Zusätzlich zu den bestimmten Werten der Quantenausbeute in Kapitel 5.2.3.2 wurde ein weiteres Farbstoffpaar gemessen. Bisher wurde Pd-OEP/Perylen auf seine Quantenausbeute in verschiedenen Lösungen (Miglyol, HD, PHD und Olivenöl) untersucht. Das bei den PMMA-Kapseln am häufigsten verwendete UC-Farbstoffpaar war jedoch Pd-TBP/Bodipy. In den folgenden Messungen wurde auf Olivenöl als hydrophobes Lösungsmittel verzichtet, da

es in Polymernanokapseln auf Grund der hohen Partikelbildung keine weitere Anwendung findet. Alle Messungen wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ angeregt. Die Konzentration der Farbstoffe war etwas geringer als in den Lösungen welche für die Kapseln eingesetzt wurde ($c(\text{Pd-TBP}) = 1 \times 10^{-5}$, $c(\text{Bodipy}) = 5 \times 10^{-4}$).

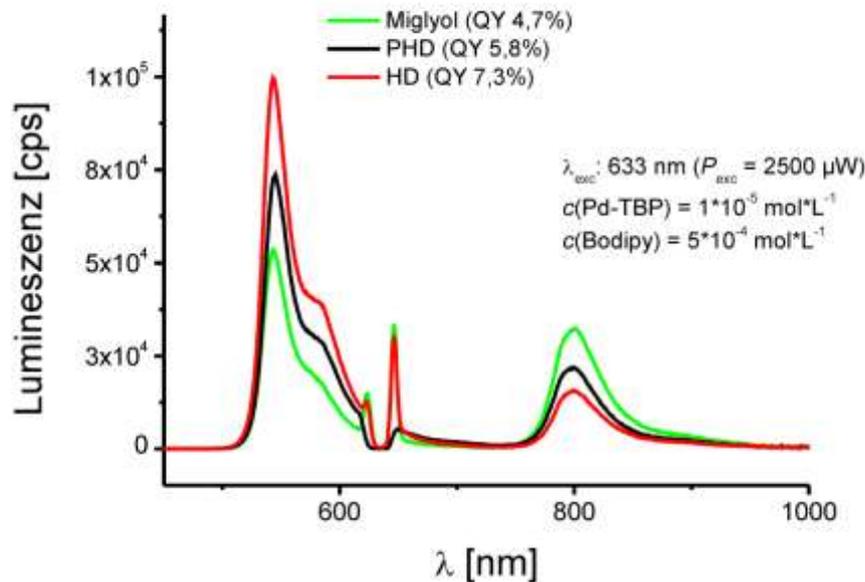


Abbildung 5.55: UC-Spektren des Farbstoffpaares Pd-TBP/Bodipy ($c(\text{Pd-TBP}) = 1 \times 10^{-5}$, $c(\text{Bodipy}) = 5 \times 10^{-4}$) in verschiedenen Lösungen (Miglyol, HD und PHD) ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 2,5 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$).

Die zur Quantenausbeute benötigten Absorptionmessungen der Farbstofflösungen sind in Abbildung 5.56 dargestellt. Die Quantenausbeute wurde mit Formel (2.11) berechnet, welche bereits im theoretischen Teil (Abschnitt 2.4.1.2) erklärt wurde.

Die berechneten Werte der QY für Pd-TBP/Bodipy werden in Tabelle 5.13 mit den Werten für Pd-OEP/Perylen verglichen. Dort kann man sehen, dass für das Farbstoffpaar Pd-OEP/Perylen Miglyol das beste Lösungsmittel mit der besten Quantenausbeute ist. Verwendet man jedoch Miglyol mit Pd-TBP und Bodipy, ist es vergleichsweise das ungünstigste Lösungsmittel für dieses Farbstoffpaar. Für die Verwendung von HD als Lösungsmittel gilt das genaue Gegenteil, bei Pd-OEP/Perylen am ungünstigsten und bei Pd-TBP/Bodipy am effektivsten. Bei PHD als Lösungsmittel spielt die Wahl der Farbstoffe keine Rolle, da sich die Quantenausbeute kaum ändert. Da die berechnete Quantenausbeute von extrem vielen Faktoren abhängig ist (siehe Formel (2.11)), kann man keine Vorhersage über die Quantenausbeute in den Nanokapseln machen. Leider kann die Quantenausbeute in den Nanokapseln nicht direkt gemessen werden. Auf Grund ihrer Teilchengröße und dem sich ändernden Brechungsindex kann keine Absorption gemessen werden. Die Streuung der

Anregungswellenlänge bei der Absorptionsmessung ist im kurzwelligen Bereich viel zu groß, um aussagekräftige Daten zu erhalten.

Tabelle 5.13: Vergleich der QY-Berechnungen von unterschiedlichen UC Farbstoffpaaren.

Hydrophobes Lösungsmittel	QY von Pd-OEP/Perylen	QY von Pd-TBP/Bodipy
HD	4,5%	7,3%
PHD	5,8%	5,8%
Miglyol	7,5%	4,7%
Olivenöl	0,6%	----

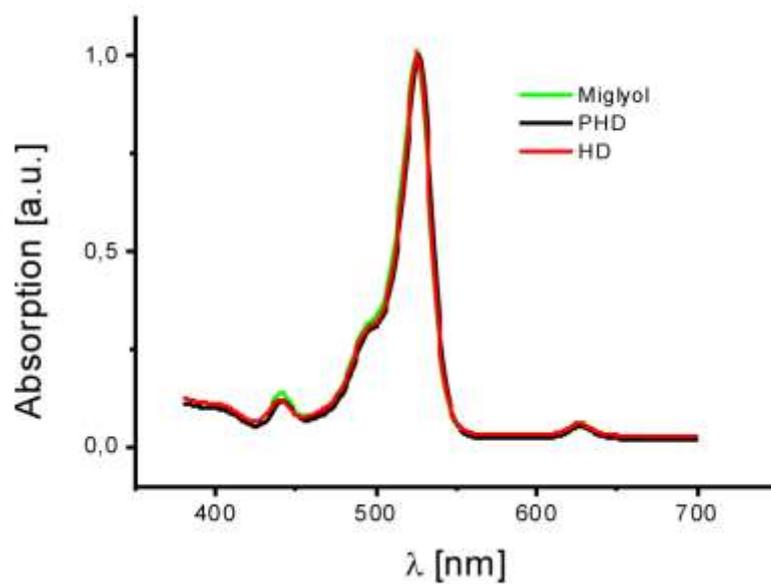


Abbildung 5.56: Absorptionsspektren (auf 1 normalisiert) des Farbstoffpaares Pd-TBP/Bodipy in verschiedenen Lösungsmitteln.

5.2.4 Anwendung der UC-Nanokapseln (2.Generation) in Zellen

Nach erfolgreicher Modifizierung der Nanokapseln, von den Kapseln der ersten Generation zu denen der zweiten Generation wurden erneut Zellversuche durchgeführt. Durch die Einführung der neuen Farbstoffe Pd-TBP und Pd-TNP als Sensitizer verschiebt sich die Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm (am cLSM) auf $\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm oder auf $\lambda_{\text{exc}} = 710$ nm, womit der Bereich des optischen Fensters (Abbildung 1.2) von menschlichem Gewebe erreicht wäre.

In Abschnitt 5.1 wurde bereits erfolgreich UC von Nanokapseln der ersten Generation in HeLa-Zellen gemessen. Auf Grund der Notwendigkeit der Sauerstoffverdrängung in einer Glovebox mit anschließender luftdichter Versiegelung wurden die Zellen auf einem Glasträger fixiert. Die Messung wurde damit nicht am lebenden Objekt, sondern an fixierten, sauerstofffreien Zellen durchgeführt. Um die Nanokapseln für weitere biologische Anwendungen interessant zu machen, ist der nächste Schritt eine Messung der TTA-UC am lebenden Zellobjekt (*in vitro*), was eine Anwesenheit von Sauerstoff mit einschließt. Dazu sollen für die Bildgebung und Untersuchung der Zellen allgemein bekannte und gut etablierte Methoden wie das bereits in dieser Arbeit verwendete konfokale Mikroskop cLSM^[182] oder die Durchflusszytometrie^[183] (Fluorescence activated cell sorting, FACS) angewendet werden. Im folgenden Abschnitt wird versucht, die TTA-UC-Emission in lebenden Zellen *in vitro* mit den eben genannten Methoden zu detektieren. Der Ansatz SE-26-13 wurde ausgewählt, da er im Vergleich mit den anderen Ansätzen die größte TTA-Emission aufweist und somit die Wahrscheinlichkeit einer Detektion am höchsten ist. Außerdem wurde gezeigt, dass für diesen Ansatz eine Detektion der TTA-UC unter Sauerstoffbedingungen möglich ist (Abbildung 5.37), was bei einer *in vitro*-Messung notwendig ist.

Eine Grundvoraussetzung bei Messungen der lebenden Zellen ist die Verträglichkeit der Zellen mit den Nanokapseln. Um diese Zellverträglichkeit der PMMA-Nanokapseln zu untersuchen, wurden Toxizitätstests mit unterschiedlichen Zellarten am FACS durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an Nanokapseln zum Zellmedium hinzugegeben. Unter kontrollierten Umgebungsbedingungen (37 °C, 5% CO₂) betrug die Inkubationszeit für die Kapseln 24 h. Zur Analyse der Toxizität wurde der Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) als Fluoreszenzmarker für apoptotische Zellen hinzugegeben. Dann wurden die Proben auf Fluoreszenz des 7-AAD ($\lambda_{\text{exc}} = 561$ nm, $\lambda_{\text{det}} = 675$ nm) untersucht und dadurch der Anteil der lebenden, apoptotischen und toten Zellen ermittelt. Zusätzlich wurden Negativkontrollen der reinen Zellen (NK) und der Zellen nur mit 7-AAD ohne Nanokapseln (NK-7AAD)

durchgeführt. Alle Ergebnisse der FACS Messungen sind Mittelwerte aus drei durchgeführten Messungen.

Die unterschiedlichen eingesetzten Konzentrationen der Nanokapseln erstrecken sich von der normalerweise in unserer Gruppe eingesetzten Standardkonzentration für Nanopartikel^[184] in Zellexperimenten von $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bis hin zu $5000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Diese Auswahl der eigentlich ungewöhnlich hohen Konzentrationen erklärt sich durch die Größe der Kapseln. Auf Grund eines Durchmessers von ca. $d_i = 240 \text{ nm}$ wird bei einer Konzentration von $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ eine viel geringere Anzahl an Kapseln/Partikel verwendet als bei Experimenten mit geringeren Partikelgrößen und gleicher Konzentration. Die Erhöhung der Konzentration ist somit nur ein Angleichen der Anzahl der Kapseln an die Werte der in der Literatur beschriebenen Experimente. Dazu wurden in Tabelle 5.14 einige Beispiele für in der Literatur verwendete Partikel, Partikelgrößen und deren eingesetzten Konzentrationen in Zellen miteinander verglichen. Die Anzahl der jeweils eingesetzten Kapseln/Partikeln wurde über das Volumen und die Dichte der jeweiligen Materialien berechnet. Vergleicht man die PMMA-Nanokapseln mit den Polystyrol-Nanopartikeln die als Standard in Zellexperimenten eingesetzt werden,^[184] wird in unserem Experiment die ca. dreifache Anzahl verwendet. Wenn man jedoch die Werte mit anderen UC-fähigen Nanomaterialien vergleicht, befindet man sich entweder auf einem ähnlichen Level (10^{11}), oder deutlich darunter (10^{13}). Mit der Erhöhung der Konzentration passte man sich dadurch nur an die Werte von anderen UC-Experimenten in Zellen an.

Tabelle 5.14: Literaturbeispiele für Partikelkonzentrationen in Zellen.

Partikelart	Polystyrol ^[184]	UC-fähige ($\text{NaYF}_4\cdot\text{Yb}^{3+}$, Er^{3+} , Tm^{3+})			UC-PMMA Nanokapseln
		Nanokapseln ^[185]	Partikel ^[186]	Nanokristalle ^[98]	
Partikelgröße [nm]	110	50	20	28	240
Konzentration [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	75	50	200	10	3000
Anzahl der Partikel/Kapseln	$1,2 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^{13}$	$3,4 \times 10^{11}$	$4,4 \times 10^{11}$

In Abbildung 5.57 sind die Toxizitätstests von SE-26-13 mit HeLa-Zellen und mit MSCs bei verschiedenen Kapselkonzentrationen dargestellt. Mit steigender Konzentration der Nanokapseln ist ein steigender Anteil der apoptotischen und toten Zellen zu beobachten. Die HeLa-Zellen zeigen sich empfindlicher gegenüber hohen Konzentrationen, da dort bei $5000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ca. 20% der Zellen tot oder apoptotisch sind. Bei den MSCs hingegen sind es nur ca.

10%, welche als nicht mehr lebend detektiert werden. Zusammengefasst haben die PMMA-Nanokapseln auf beide der untersuchten Zellarten kaum einen negativen toxischen Einfluss.

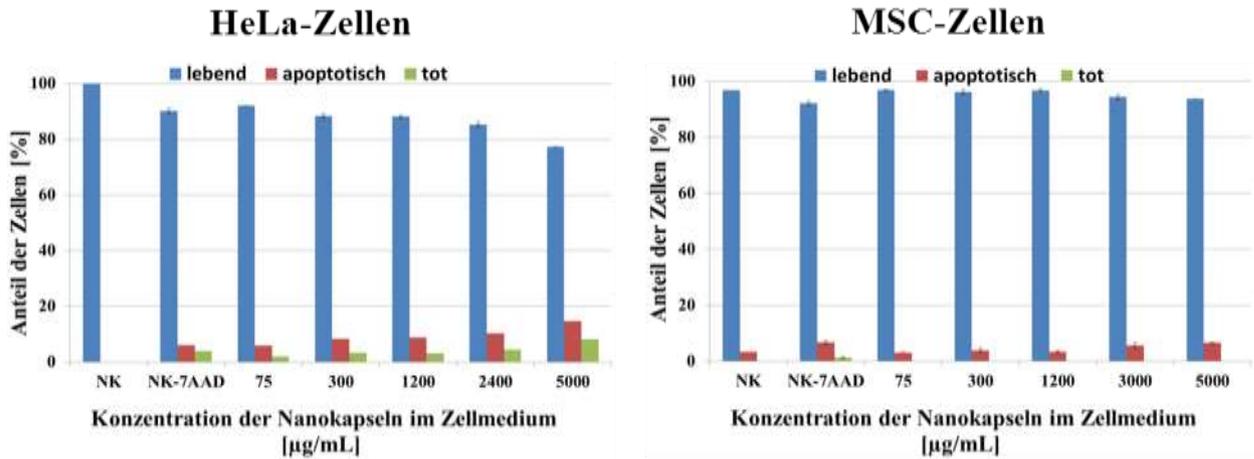


Abbildung 5.57: Toxizitätstests für PMMA-Nanokapseln (SE-26-13) in HeLa- und MSCs bei verschiedenen Konzentrationen der Kapselzugabe im FACS. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes 7-AAD erfolgte bei $\lambda_{\text{exc}} = 561$ nm, die Detektion bei $\lambda_{\text{det}} = 675$ nm.

Neben der Toxizität wurde mit dem FACS die Aufnahme der Kapseln in die Zellen untersucht. Dazu wurde die Fluoreszenz des in den Nanokapseln eingebetteten Bodipy verwendet. Durch eine Analyse der Seitwärts- und Vorwärtsstreuung unterscheidet das FACS automatisch lebende Zellen von nicht aufgenommenen Nanopartikeln und Zelltrümmern. Detektiert wird damit nur die Fluoreszenz der lebenden Zellen, bzw. die Fluoreszenz der in oder an der Zelle gebundenen Nanokapseln. Mit dieser Methode kann somit nicht zwischen den an der Kapselhülle adsorbierten Nanokapseln und den tatsächlich in den Zellen aufgenommenen Nanokapseln unterschieden werden. Um diesen Unterschied aufzuklären werden cLSM-Messungen durchgeführt.

In Abbildung 5.58 ist die FACS-Messung zur Analyse der Kapselaufnahme von SE-26-13 in HeLa- und MSCs abgebildet. Die gemessene Intensität (Detektion bei $\lambda_{\text{det}} = 527$ nm) der Fluoreszenz von Bodipy nach Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm spiegelt die Anzahl der aufgenommenen Nanokapseln wieder. Da alle Negativkontrollen (keine Nanokapseln) bei derselben Anregung keine Intensität aufweisen, stammt die gemessene Fluoreszenz vom den eingesetzten Nanokapseln (oder vom eingesetzten Farbstoff). Durch das Einstellen der Masken nach der Analyse der FSC und SSC wird nur die Fluoreszenz von lebenden Zellen detektiert. Toten Zellen oder freie, nicht aufgenommene Nanokapseln werden nicht gemessen. Je höher die Intensität ist, desto mehr Nanokapseln und damit mehr Farbstoff sind in der Zelle aufgenommen. Wie erwartet ist bei beiden Zellarten eine steigende Intensität mit

zunehmender Kapselkonzentration zu sehen. Insgesamt scheint bei den HeLa-Zellen eine bessere Aufnahme zu erfolgen, da bei allen Werten die Intensität deutlich größer ist als bei den ebenfalls untersuchten MSCs.

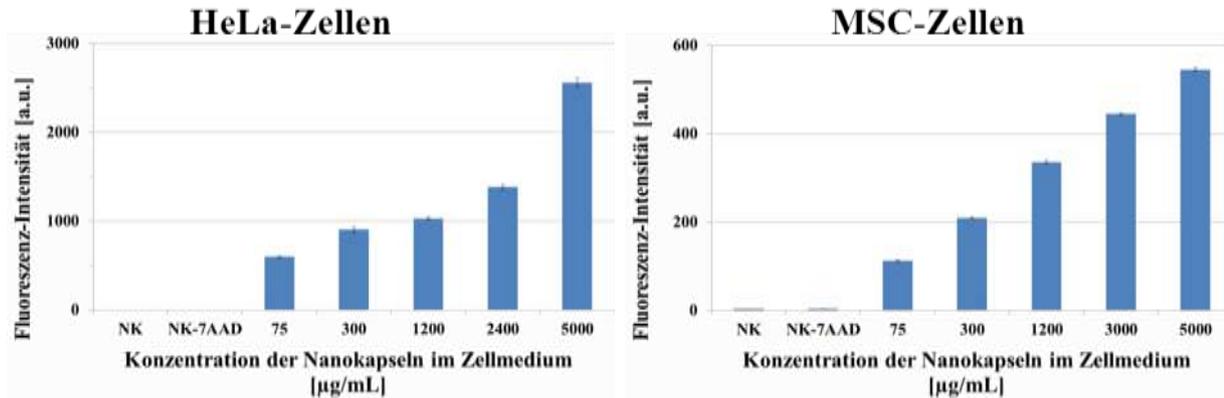


Abbildung 5.58: Zellaufnahme der Nanokapseln bei ansteigenden Konzentrationen der Nanokapseln im Zellmedium. Angeregt wurde die Fluoreszenz von Bodipy, eingebettet in Nanokapseln, bei $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, die Detektion erfolgte bei $\lambda_{\text{det}} = 527 \text{ nm}$.

Zum Beweis der erfolgreichen Inkubation von Nanokapseln in Zellen wurden cLSM-Aufnahmen von MSCs durchgeführt. Die Inkubationszeit der Nanokapseln (SE-26-13) betrug 24 h mit einer Kapselkonzentration von $3000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ im Zellmedium ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$). Zusätzlich zu den fluoreszierenden Nanokapseln wurde der Zellkern mit Draq 5 ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ (HeNe-Laser), $\lambda_{\text{det}} = 659\text{-}728 \text{ nm}$) ($0,25 \text{ }\mu\text{l}$) und die Zellmembran/Mitochondrium mit CellMaskTM Orange ($\lambda_{\text{exc}} = 561 \text{ nm}$ (DPSS 561 Laser), $\lambda_{\text{det}} = 594\text{-}660 \text{ nm}$) ($0,25 \text{ }\mu\text{l}$) angefärbt. Damit keine Überlagerung der Anregungs- und Emissionsbereiche der verschiedenen Farbstoffe stattfindet, wurden die Bilder mittels sequentiellen Scan aufgenommen. Für die Färbung der Nanokapseln wurde die Fluoreszenz von Bodipy, nach direkter Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (Ar-Laser) mit einem Detektionsbereich von $\lambda_{\text{det}} = 499\text{-}583 \text{ nm}$, verwendet. Zur Detektion aller Emissionen wurden Photomultiplier als Detektoren verwendet.

In beiden Aufnahmen von Abbildung 5.59 ist eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz im Zellmitochondrium zu sehen, während im Kern erwartungsgemäß keine zu finden sind. Eine hier nicht gezeigte Bilderserie entlang der z-Achse der Zelle bestätigt, dass die aufgenommene Fluoreszenz nicht über- oder unterhalb der Zelle detektiert wurde, sondern in ihrem inneren. Somit wurde gezeigt, dass die PMMA-Nanokapseln von lebenden MSCs und HeLa-Zellen aufgenommen werden und keine toxische Einwirkungen auf die verschiedenen Zellarten ausüben.

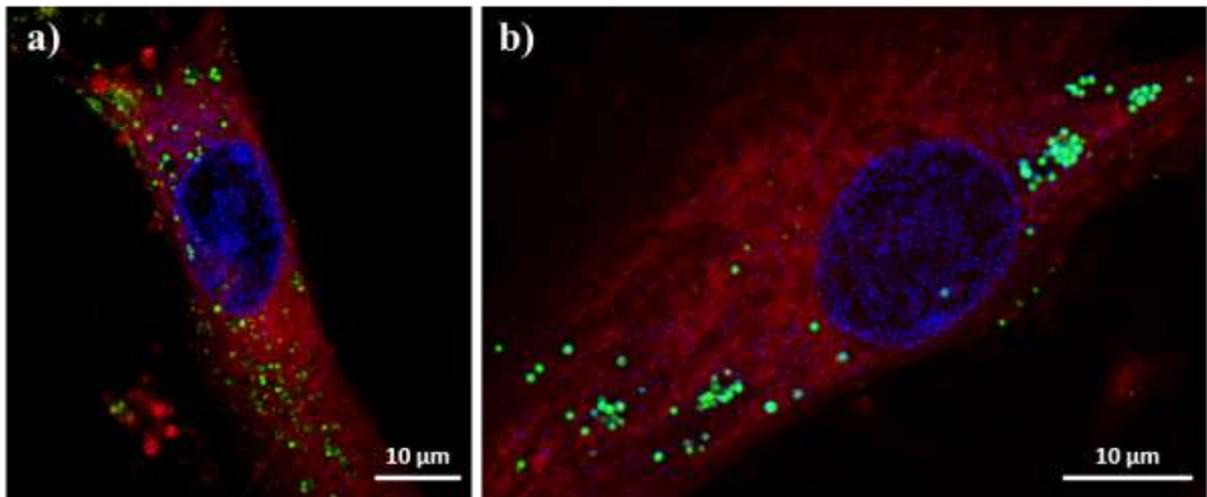


Abbildung 5.59: CLSM-Aufnahmen von lebenden MSCs mit inkubierten Nanokapseln (SE-26-13, 24 h, $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Die Fluoreszenz (Bodipy) der Nanokapseln (grün dargestellt) wurde mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ angeregt und bei $\lambda_{\text{det}} = 499\text{-}583 \text{ nm}$ detektiert. Zusätzlich wurde der Zellkern (blau dargestellt) (DRACO 5, $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 659\text{-}728 \text{ nm}$) und die Zellmembran (rot dargestellt) (CellMaskTM Orange, $\lambda_{\text{exc}} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 594\text{-}660 \text{ nm}$) angefärbt.

Bei allen bisherigen Aufnahmen der Zellen wurde keine Messung einer möglichen TTA-UC-Emission durchgeführt. Im Folgenden wird die erfolgreiche Messung der TTA-UC-Fluoreszenz in lebenden Zellen dargestellt.

Zunächst jedoch soll der Beweis erbracht werden, dass TTA-UC-Emission aus den Nanokapseln überhaupt mit dem cLSM detektiert werden kann. Dazu wurden die Nanokapseln in einem Ibidi-Gefäß ($c = 3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ohne Zellen gemessen. Die Nanokapseln, welche am Boden des Gefäßes adsorbiert sind, können ohne Migration (Bewegung der Kapseln) gemessen werden. Um den in der Dispersion vorhandenen Sauerstoff zu entfernen, wurde Na_2SO_3 ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) zur Reduktion zugegeben, was ein stabiles UC-Signal für 2 h garantiert (Abbildung 5.40). Um möglich Artefakte auszuschließen und UC-Emission zweifelsfrei zu bestätigen, wurde bei jeder Messung zuerst die Fluoreszenz nach direkter Anregung des Emitters detektiert (Bild a). Anschließend wurde die TTA-UC-Emission (gleicher Detektionsbereich wie bei direkter Anregung) nach Anregung des Sensitizers gemessen (Bild b). Damit soll sichergestellt werden, dass die Strahlung tatsächlich aus den Nanokapseln stammt, in denen beide Farbstoffe vorhanden sind.

In Abbildung 5.60 sind die cLSM-Aufnahmen der Nanokapseln am Boden eines Ibidi-Gefäßes zu sehen. Die direkte Anregung der Nanokapseln in Bild (a) (Bodipy) erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, detektiert wurde im Bereich $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$. Bild (b) stellt die gemessene UC-Fluoreszenz der Nanokapseln dar, angeregt bei $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ und detektiert im selben Bereich $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$ wie bei der direkten Anregung. In Bild (c) ist

die Überlagerung der beiden Bilder (a) und (b) dargestellt. Zur Detektion der Emission wurden APD-Detektoren (Avalanche Photo Diode) mit einem vorgeschaltetem Band-Pass Filter (525 ± 50), der nur für Wellenlängen im Bereich von $\lambda = 500-550$ nm durchlässig ist, verwendet. Diese Art der Detektion wird ebenfalls bei den folgenden Aufnahmen der Bodipy-Fluoreszenz und der UC-Emission verwendet. Mit der Aufnahme der UC-Fluoreszenz in Bild (b) wurde die erfolgreiche Detektion mit dem cLSM nachgewiesen. Ebenso wurde in Bild (c) eine exakte Überlappung der Emission der direkten und der UC-Anregung nachgewiesen. Somit wurden mögliche Artefakte ausgeschlossen und gezeigt, dass in allen durch Fluoreszenz lokalisierten Nanokapseln UC-Emission möglich ist.

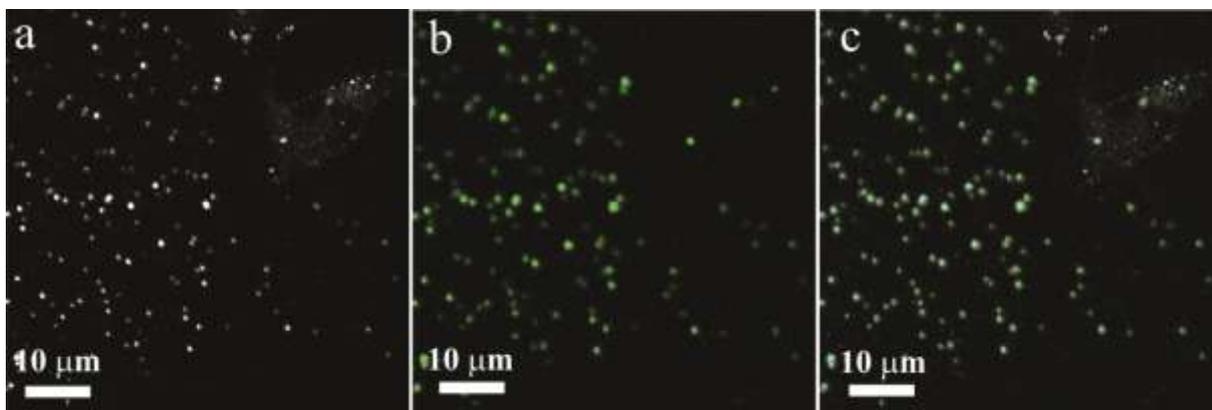


Abbildung 5.60: CLSM-Aufnahmen von UC-Nanokapseln (SE-26-13) ohne Zellen im Ibidi-Gefäß ($3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und gemessen unter sauerstofffreien Bedingungen. (a) Direkte Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{det}} = 500-550$ nm); (b) UC-Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm, $\lambda_{\text{det}} = 500-550$ nm); (c) Überlagerung der Bilder (a) und (b).

Der nächste Schritt ist die erfolgreiche Detektion der TTA-UC in lebenden Zellen. In Abbildung 5.61 sind cLSM-Aufnahmen von lebenden MSCs dargestellt. Nanokapseln der Probe SE-26-13 (Pd-TBP/Bodipy) wurden mit einer Konzentration von $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in die Zellen inkubiert (24 h). Zum Ausschluss möglicher Artefakte und dem Vergleich der UC-Emission ($\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm, $\lambda_{\text{det}} = 500-550$ nm, Bild b) wurde dieselbe Aufnahme mit direkter Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{det}} = 500-550$ nm) in Bild (a) präsentiert.

Die Zellmembran wurde zur besseren Darstellung der Zellen zusätzlich mit CellMaskTM Deep Red ($\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm, $\lambda_{\text{det}} = 653-702$ nm) angefärbt. Für die Anregung der UC-Emission der cLSM-Aufnahmen in diesem Abschnitt 5.2.4 mit $\lambda_{\text{exc}} = 633$ nm wurde ein Dauerstrich-HeNe-Laser verwendet. Die Laserleistung im Fokus ist kleiner als $P_{\text{exc}} = 0,3 \mu\text{W}$, was einer durchschnittlichen Intensität von unter $I_{\text{exc}} = 100 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ entspricht.

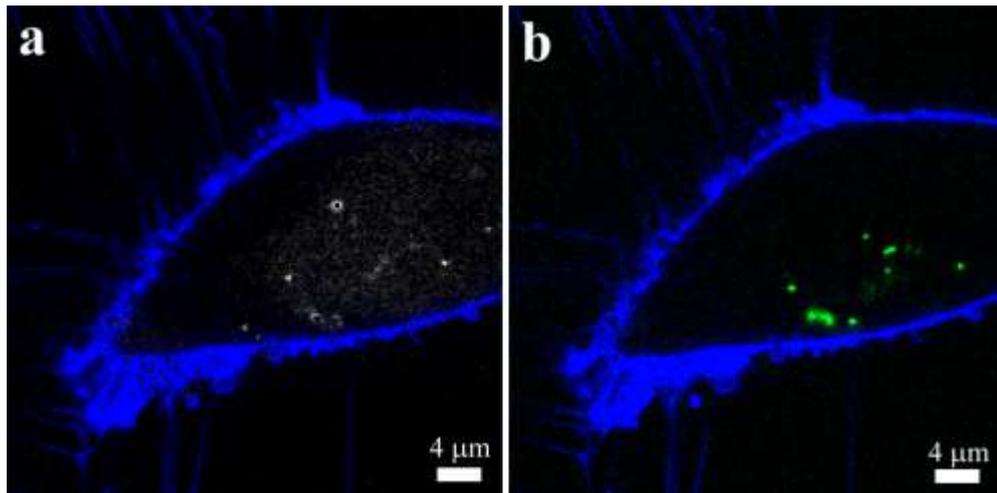


Abbildung 5.61: CLSM-Aufnahmen von lebenden MSCs mit inkubierten TTA-UC-Nanokapseln (SE-26-13, $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). (a) Direkte Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$); (b) UC-Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$). In beiden Aufnahmen wurde zusätzlich die Zellmembran mit CellMaskTM Deep Red ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 653\text{-}702 \text{ nm}$) blau angefärbt.

In Bild (b) ist die TTA-UC-Fluoreszenz innerhalb einer lebenden MSC-Zelle zu sehen. Vergleicht man mit der direkten Anregung in Bild (a), kann man nur eine teilweise Überlappung der beiden Emissionen feststellen. Dies kann in einer lebenden Zelle verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann der zwar geringe aber vorhandene Zeitunterschied zwischen den Messungen einen Einfluss haben. In der kurzen Zeit ist eine Migration der Kapseln oder der Zellen möglich, in dem sich mögliche Emissionspunkte aus der fokalen Ebene entfernen und somit nicht mehr vollständig detektiert werden. Bei einer Bewegung der Zelle selbst kann man eine Verschiebung aller detektierten Emissionspunkte in eine einheitliche Richtung beobachten. Zum anderen kann es innerhalb der Zellen in unterschiedlichen Kompartiments möglicherweise zu Schwankungen der vorhandenen O_2 -Konzentration kommen. Wenn sich die Nanokapseln in einem Bereich mit hoher Sauerstoffkonzentration befinden, wird lediglich Fluoreszenz nach direkter Anregung erhalten, während die UC-Emission unterdrückt wird. Ist die Sauerstoffkonzentration in der Umgebung der Nanokapseln dagegen sehr gering, ist sowohl direkte Fluoreszenz als auch UC-Fluoreszenz messbar, was eine Überlappung der Emissionspunkte zur Folge hat.

Den Einfluss verschiedener pH-Werte in den unterschiedlichen Bereichen der Zellen, wie beispielsweise $\text{pH} \approx 7\text{-}7,4$ im Zytoplasma,^[187] $\text{pH} \approx 5,5\text{-}6$ in späten Endosomen^[185] und $\text{pH} \approx 5\text{-}5,5$ in Lysosomen,^[185] wurde bereits mit den UC-Messungen der Dispersion in Abbildung 5.44 ausgeschlossen. Dort wurde die Unabhängigkeit des UC-Signals der Nanokapseln über den ganzen pH-Bereich nachgewiesen.

Trotz der unvollständigen Überlappung der Emissionen wurde TTA-UC-Emission in lebenden MSCs detektiert. Wenn man erneut beide Aufnahmen miteinander vergleicht, zeigen sich deutliche Vorteile beim Bild in der UC-Anregung gegenüber dem der direkten Anregung. Bei der UC-Anregung ist eine deutliche Verringerung der Hintergrundstrahlung zu sehen (weniger Rauschen). Diese Verbesserung kommt einerseits durch die nur sehr geringe benötigte Anregungsintensität zustande, welche weniger Streulicht des Lasers nach sich zieht. Dadurch werden mögliche, bei hohen Intensitäten nicht erwünschte und nicht kontrollierbare, nichtlineare Prozesse wie die zwei-Photonen-Absorption vollständig vermieden. Andererseits wird durch die Charakteristik der UC, einer hypsochromen (anti-Stokes) Verschiebung der detektierbaren Emission relativ zur Anregungswellenlänge, eine mögliche Messung der Autofluoreszenz der Zellen vollständig abgeschnitten, da sie außerhalb des Detektionsbereichs liegt. Berechnet man das Verhältnis Signal/Hintergrund (S/H) für beide Bilder (a) und (b), so erhält man einen Unterschied von einer Größenordnung zum Vorteil der UC-Anregung. Der genaue Wert für das Verhältnis bei direkter Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) liegt bei $(S/H)_{\text{direkt}} = 4,5$. Durch UC-Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ erhält man einen Wert von $(S/H)_{\text{UC}} = 40$, was fast dem Zehnfachen des Wertes bei direkter Anregung entspricht. Zusätzlich wird durch die extrem milden Anregungsbedingungen eine geringere Phototoxizität (Zerstörung der Zellen durch den Anregungslaser) garantiert und die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Zellerhitzung wird ebenfalls verringert.

Nach dem erfolgreichen Nachweis für TTA-UC-Emission in MSCs wurden (Abbildung 5.62) HeLa-Zellen untersucht. Erneut sind Nanokapseln vom Ansatz SE-26-13 (Pd-TBP/Bodipy) zur Inkubation verwendet worden ($3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Die Anregung der Nanokapseln und die Detektion der direkten Fluoreszenz und UC-Fluoreszenz erfolgten auf gleiche Art und Weise, wie bereits bei den MSCs beschrieben. Auf ein Anfärben der Zellmembran wurde diesmal verzichtet.

In Abbildung 5.62 wurden erneut beide Anregungsarten in Bild (a) (direkte Anregung) und Bild (b) (UC-Anregung) direkt miteinander verglichen. Wie bereits bei den MSCs fällt auch hier die geringe Hintergrundstrahlung bei der UC-Anregung auf. Ebenfalls auffällig ist eine erneute, nicht vollständige Überlappung beider Signale. Besonders deutlich ist dies in den blau markierten Bereichen der HeLa-Zelle zu sehen. Dort befinden sich besonders große Ansammlungen oder Aggregationen der Nanokapseln, welche aber nur nach direkter Anregung detektiert werden. Durch Negativkontrollen der Zellen ohne Nanokapseln konnten Autofluoreszenzeffekte der Zelle ausgeschlossen werden, was bedeutet, dass die gemessenen

Signale tatsächlich von den verwendeten Farbstoffen stammen. Da diese Teile nach UC-Anregung nicht mehr zu sehen sind (siehe blau markierte Bereiche Bild (b)), muss folglich die UC in diesen Bereichen der Zelle gequencht werden. Dieses Quenchen der UC-Emission der großen Ansammlungen der Nanokapseln bedeutet möglicherweise eine hohe lokale Konzentration von O_2 in diesen Bereichen der Zelle. Im restlichen Bereich der Zelle, in dem die Kapseln mehr oder weniger homogen verteilt sind, ist eine fast vollständige Übereinstimmung der beiden Bilder vorhanden. Dort scheint der lokale Gehalt an Sauerstoff niedrig genug zu sein, um eine erfolgreiche TTA-UC zu messen. Die Messung der HeLa-Zellen liefert damit einen Hinweis auf unterschiedlich lokale O_2 -Konzentrationen in Zellen.

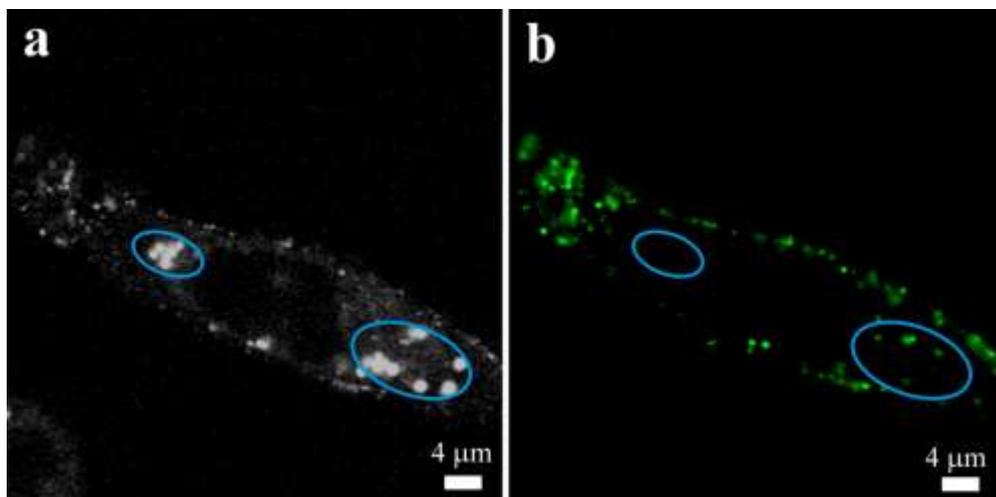


Abbildung 5.62: CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen mit inkubierten TTA-UC-Nanokapseln (SE-26-13, $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). (a) Direkte Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$; (b) UC-Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$). Blaue Markierungen wurden zur Hervorhebung interessanter Stellen zusätzlich eingeführt.

Im folgenden Experiment wurde versucht, die These der unterschiedlichen Sauerstoffgehalte in verschiedenen Zellkompartiments zu beweisen. Dazu wurden erneut Nanokapseln von SE-26-13 in lebenden MSCs inkubiert ($3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Zusätzlich wurde bei einem weiteren Experiment Valinomycin verwendet. Valinomycin gehört zu der Klasse der Ionophore^[188] und sorgt in Zellen durch eine Zerstörung des Membranpotentials zwischen den Mitochondrien für eine Entkopplung der Atmungskette.^[189] Das bedeutet einen erhöhten Verbrauch von Sauerstoff in der Zelle, da die Atmungskette im Leerlauf weiterläuft. Durch den erhöhten Verbrauch von O_2 sinkt dessen Konzentration im Inneren der Zelle. In der Literatur wurde Valinomycin bereits dazu verwendet, um die Konzentration an Sauerstoff in Zellen zu reduzieren.^[190] In unserem Fall sollte durch die Verringerung der O_2 -Konzentration in der Zelle eine verbesserte UC-Emission detektiert werden.

In Abbildung 5.63 sind die cLSM-Aufnahmen lebender Zellen mit inkubierten Nanokapseln dargestellt. In Bild (a) ist eine Transmissionsaufnahme der Zelle gezeigt, um den Umriss der Zelle zu bestimmen der in den folgenden Bildern mit einer orangen Markierung hervorgehoben wurde. In Bild (b) wird die Fluoreszenz nach direkter Anregung der inkubierten Nanokapseln mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ gezeigt. Der hellblau markierte Bereich zeigt besonders viele fluoreszierende Nanokapseln in der Zelle und ist besonders interessant beim Vergleich mit den weiteren Bildern. In Bild (c) ist die UC-Emission nach Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ zu sehen. Das Hauptaugenmerk soll auf den blau markierten Bereich gelegt werden. Dort ist zwar TTA-UC-Emission zu sehen, jedoch keine vollständige Übereinstimmung der Emission mit Bild (b). Dies deutet erneut auf lokale Unterschiede der O_2 -Konzentration innerhalb der Zelle hin.

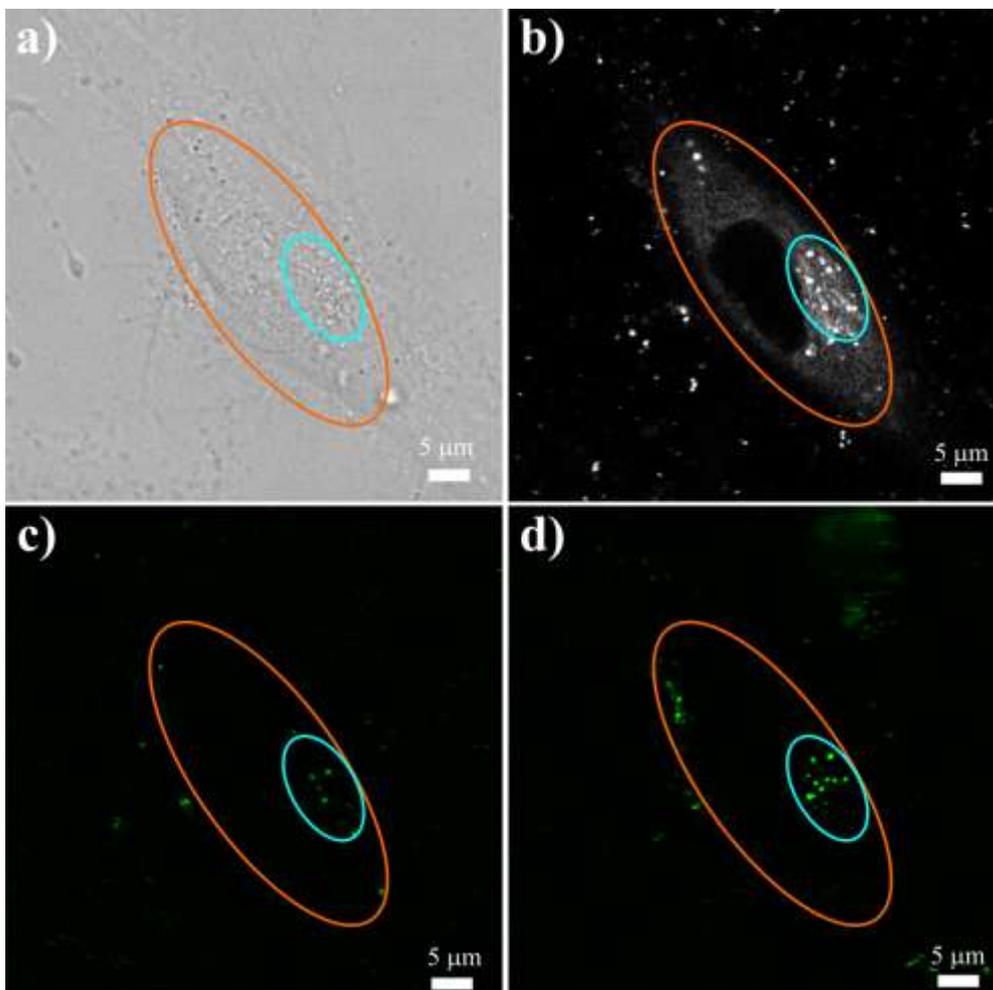


Abbildung 5.63: CLSM-Aufnahmen von lebenden MSCs mit inkubierten TTA-UC-Nanokapseln (SE-26-13, $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). (a) Transmissionsaufnahme der Zelle; (b) Direkte Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$); (c) UC-Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) (d) UC-Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) nach Zugabe von Valinomycin (nach 10 minütiger Einwirkzeit). Blaue und Orange Markierungen wurden zur Hervorhebung interessanter Stellen (Orange = Zelle) zusätzlich eingeführt.

Durch die Zugabe von Valinomycin ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) soll eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration innerhalb der Zelle stattfinden. Bild (d) wurde 10 min nach der Zugabe von Valinomycin aufgenommen. Bereits nach dieser kurzen Zeit wurde in der ganzen Zelle, aber speziell im blau markierten Bereich mehr TTA-UC Emission detektiert als bei der Aufnahme ohne Valinomycin (Bild c). Es wird sowohl eine stärkere Intensität (vgl. Bild c) der UC-Emission registriert, als auch eine größere Anzahl der UC-aktiven Nanokapseln gemessen. Die Zugabe von Valinomycin hat damit eine Zerstörung des Großteils des intrazellulären Sauerstoffs bewirkt, wodurch mehr UC-Emission detektiert werden konnte. Somit wurde nachgewiesen, dass innerhalb der Zelle unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen zu finden sind, welche dann für eine lokale Unterdrückung der UC-Emission sorgen.

In weiteren Experimenten wurde Vitamin C (0,5%) als Antioxidans zu den Zellen zugegeben. Außerdem wurde, ebenfalls unter Einsatz von Vitamin C, versucht UC-Emission mit Hilfe des FACS zu messen.

Für die cLSM-Aufnahmen wurden Nanokapseln der Probe SE-26-13 in HeLa-Zellen inkubiert. Die Inkubationszeit wurde im Vergleich zu bisherigen Versuchen drastisch von bisher 24 h auf nur 4 h reduziert. Die Partikelkonzentration während der Inkubationszeit wurde mit $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nicht verändert. Die Anregungs- und Detektionsbedingungen für die cLSM-Aufnahmen wurden von den bisherigen Versuchen übernommen. Auf den cLSM-Bildern ist eine Gruppe von mehreren Zellen mit zahlreichen inkubierten Nanokapseln zu sehen. Abbildung (a) zeigt die Fluoreszenz nach direkter Anregung, Abbildung (b) zeigt die detektierte UC-Emission nach Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ und Abbildung (c) die Überlagerung der beiden Abbildungen (a) und (b).

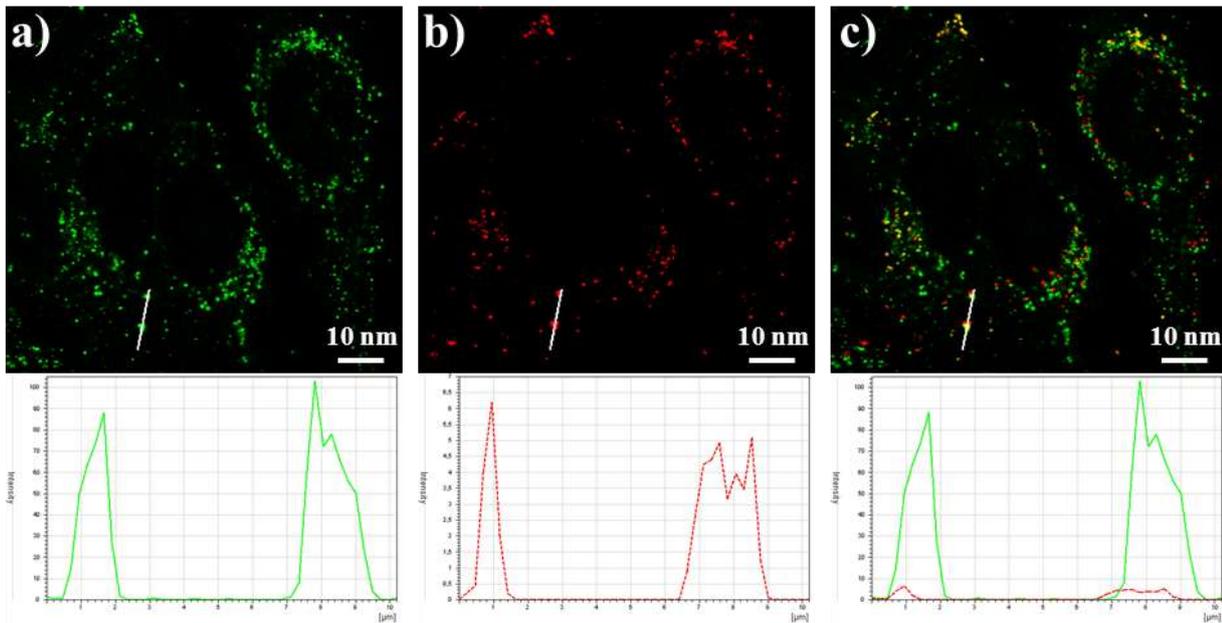


Abbildung 5.64: CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen mit inkubierten TTA-UC-Nanokapseln (SE-26-13, $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). (a) Direkte Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$); (b) UC-Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$); (c) Überlagerung der beiden Bilder (a) und (b). Unter jedem Bild ist die jeweilige Intensität der gemessenen Emission entlang der weißen Linie im Bild angezeigt.

Unter jedem cLSM-Bild ist die Intensität der jeweiligen gemessenen Emission, entlang der weißen Linie im Bild, dargestellt. Bei der UC-Messung wurde die Skala der Intensität verringert. Das Verhältnis der beiden Intensitäten ist dann in Abbildung (c) zu sehen. Die UC-Intensität ist ca. 10-mal schwächer als die der direkten Fluoreszenz. Dabei muss die geringere Anregungsintensität in Betracht gezogen werden.

Insgesamt ist in Abbildung (c) ein hoher Grad der Überlappung vorhanden, lediglich eine leichte Verschiebung der ganzen Zellgruppe zwischen den beiden Aufnahmen (a) und (b) ist sichtbar (ebenso wie im Intensitätsdiagramm). Durch den Einsatz von Vitamin C (0,5%) als Antioxidans scheint somit der lokale Sauerstoff innerhalb der Zelle zerstört zu sein. Dadurch ist eine fast vollständige Übereinstimmung der UC-Emission und der Fluoreszenz nach direkter Anregung möglich.

Mit dem Einsatz von Vitamin C wurde versucht, TTA-UC-Emission direkt mit dem FACS zu messen. Dazu wurden Nanokapseln der Probe SE-26-13 in lebende HeLa-Zellen inkubiert. Zum Vergleich wurden zwei verschiedene Inkubationszeiten, 4 h und 24 h, getestet, außerdem wurden unterschiedliche Konzentrationen der Nanokapseln von SE-26-13 verwendet. Zusätzlich wurden Negativkontrollen von Kapseln ($3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mit nur einem UC-Farbstoff (Pd-TBP oder Bodipy) und Kapseln ohne Farbstoff untersucht. Angeregt wurde mit

einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, während bei $\lambda_{\text{det}} = 527 \text{ nm}$ detektiert wurde. Im Vergleich zum cLSM geht bereits durch den experimentellen Aufbau des FACS ein Teil des Signals verloren, da Anregung und Detektion nicht am jeweiligen Maximum erfolgen.

In Abbildung 5.65 ist die Intensität der gemessenen Fluoreszenz bei den unterschiedlichen Proben dargestellt. SE-26-13 mit $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hebt sich als einzige Messung mit größerer Intensität von den Werten der Negativkontrolle ab. Bei der Konzentration von $1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ist nur ein minimaler Anstieg des Signals im Vergleich zu den Negativkontrollen zu beobachten. Bei den Konzentrationen unterhalb $1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sind keine UC-Intensitäten zu beobachten. Alle weiteren durchgeführten Negativkontrollen ohne Farbstoff oder mit nur einem UC-Farbstoff weisen den gleichen Wert der Intensität wie die Negativkontrolle ohne Kapseln (NK) auf. Dadurch wurde gezeigt, dass die gemessene Intensität, die größer ist als die der Negativkontrollen, zweifelsfrei von der TTA-UC stammt und nicht von Streueffekten, Fluoreszenz einzelner Farbstoffe oder anderen nicht erwünschten Artefakten. Somit wurde, unter dem Einsatz von Vitamin C (0,5%), TTA-UC-Fluoreszenz in lebenden HeLa-Zellen, erfolgreich mit dem FACS gemessen.

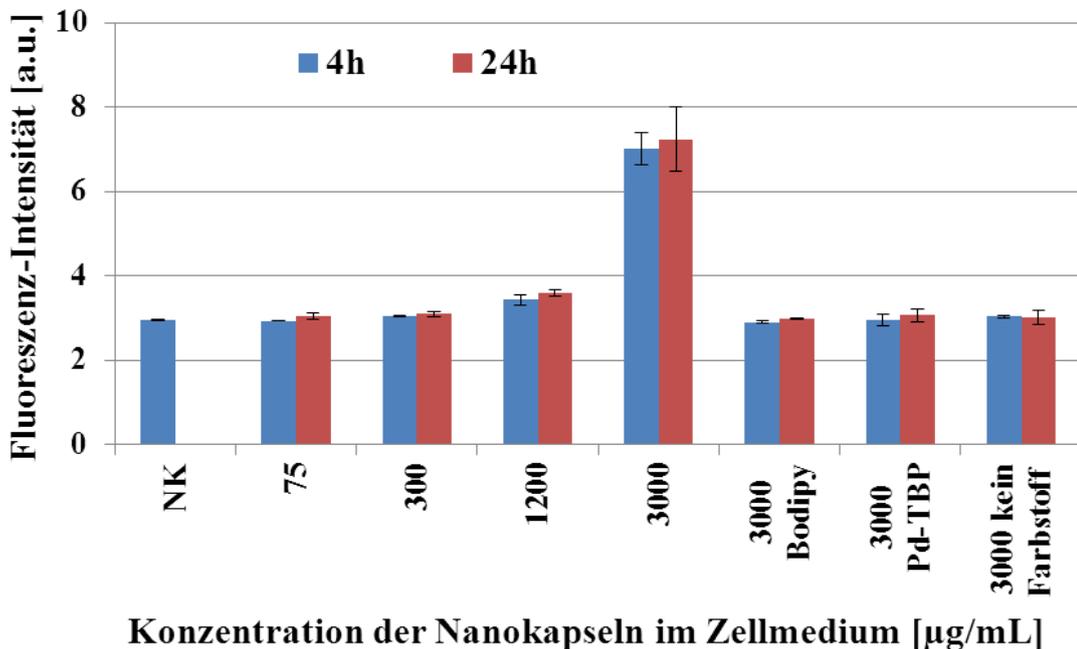


Abbildung 5.65: FACS-Messung von SE-26-13 in lebenden Zellen bei verschiedenen Konzentrationen der Nanokapseln [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] im Zellmedium. Zusätzlich wurden Negativkontrollen von Nanokapseln mit nur jeweils einem UC-Farbstoff (3000 Bodipy und 3000 Pd-TBP), ohne Farbstoff (3000 kein Farbstoff) und ohne Nanokapseln (NK) durchgeführt. Es wurden zwei unterschiedliche Inkubationszeiten, 4 h (blau) und 24 h (rot) getestet ($\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 527 \text{ nm}$).

Durch eine Verwendung der Nanokapseln mit dem breiten Emissionsspektrum aus Kapitel 5.2.3.4 am FACS kann möglicherweise eine neue Art der Zellsortierung erreicht werden. Die gleichzeitige Emission bei mehreren Wellenlängen nach Anregung bei nur einer Wellenlänge liefert die Grundvoraussetzung für optische Entschlüsselungsverfahren^[181] oder Sortierverfahren von zahlreichen biologischen Proben.^[191-193]

Betrachtet man alle Zellergebnisse, konnte man nachweisen, dass TTA-UC-Emission, nach dem erfolgreichen Nachweis in fixierten Zellen (Abschnitt 5.1) auch in lebenden Zellen möglich ist. Die dazu verwendeten Methoden, das cLSM und FACS, sind Standardfahren in der biologischen Bildgebung von Zellen. Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass TTA-UC-Fluoreszenz in lebenden Zellen nachweisbar ist. Mit FACS-Messungen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass keinerlei toxischer Einfluss der Nanokapseln auf die Zellen besteht. Durch die Verwendung der TTA-UC-Emission im Bereich der Bildgebung von Zellen mit dem cLSM erreicht man im Vergleich zur direkten Fluoreszenz eine deutlich verbesserte Bildqualität. Durch die Verwendung von geringen Anregungsintensitäten wird außerdem die Phototoxizität während des Messverfahrens drastisch reduziert.

5.2.5 Zusammenfassung der Kapseln der 2. Generation

Im Vergleich zu den Kapseln der ersten Generation wurde für die Kapseln der 2. Generation ein neuer Syntheseweg verwendet. Durch den Einsatz der Methode des Lösungsmittelverdampfungs-Prozesses und den damit verbundenen milden Reaktionsbedingungen ist es möglich, die Auswahl der UC-Farbstoffe beliebig zu erweitern. Neben Pd-OEP konnten somit auch Pd-TBP und Pd-TNP als Sensitizer verkapselt werden. Dadurch ergab sich eine für biologische Anwendungen extrem wichtige Verschiebung der Anregungswellenlänge in den roten/NIR Bereich des Spektrums. Durch die dadurch resultierende Überlappung des Anregungsbereichs mit dem natürlichen optischen Fenster von menschlicher Haut und Gewebe wird eine hohe Eindringtiefe der Anregung in die zu untersuchenden Proben möglich. Neben dem Sensitizer kann auch der Emitter variiert werden, was eine TTA-Emission über einen großen Bereich des sichtbaren Spektrums ermöglicht.

Des Weiteren wurden verschiedene Polymere als Kapselhülle verwendet und auch der hydrophobe Kern kann ohne größere Probleme verändert werden. Alle Kapseln weisen eine hohe Reproduzierbarkeit auf und sind variabel in der Größe, der Auswahl des Polymers für

die Kapselhülle und in der Wahl des Mediums für den hydrophoben Kern. Die eingesetzten Modifikationen sind in Abbildung 5.66 dargestellt, daneben sind auf Grund der nur geringen Einschränkungen weitere, fast beliebig viele Möglichkeiten zur Variation vorhanden.

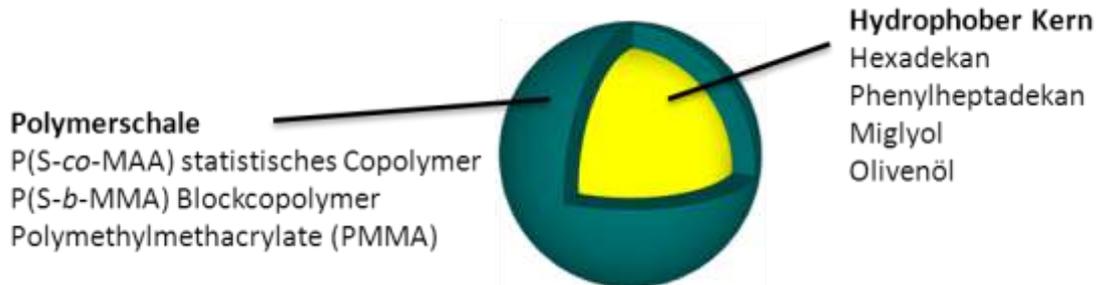


Abbildung 5.66: Eingesetzte Variationen der Materialien für die hergestellten Nanokapseln.

Durch die Variation der Materialien der Nanokapseln konnten gegenüber den Kapseln der ersten Generation Verbesserungen in der messbaren Effizienz der TTA-UC-Fluoreszenz erzielt werden. Mit dem Einsatz von verschiedenen Antioxidantien wie Na_2SO_3 oder Vitamin C, welche auf chemischem Weg (Reduktion) den in Wasser gelösten Sauerstoff entfernen, kann auf aufwendige und zeitintensive Prozesse, wie die Verdrängung des Sauerstoffs durch Lagerung in der Glovebox mit anschließender Versiegelung, verzichtet werden. Aber auch an Luft, d.h. unter dem Einfluss von Sauerstoff, wurde erfolgreich TTA-UC-Emission aus den in Wasser dispergierten Nanokapseln nachgewiesen.

Zusätzlich wurden Nanokapseln mit einem breiten Emissionsspektrum, erlangt durch die Verkapselung von mehreren UC- und Fluoreszenzemittern, bei nur einer Anregungswellenlänge hergestellt. Diese Kapseln könnten möglicherweise in Kombination mit erfolgreichen UC-Messungen am FACS zur optischen Entschlüsselung komplizierter biologischer Systeme beitragen.

Nachdem bereits in Abschnitt 5.1 TTA-UC-Emission in fixierten und versiegelten Zellen nachgewiesen wurde, konnte dies ebenfalls in lebenden HeLa-Zellen und MSCs erreicht werden. Durch die Inkubation der PMMA-Nanokapseln in Zellen konnte mit Hilfe von biologischen Standardverfahren, wie der Bildgebung mittels cLSM oder der Untersuchung mit dem FACS, TTA-UC-Fluoreszenz in lebenden Zellen nachgewiesen werden. Besonders bei der Bildgebung mittels cLSM wurden entscheidende Vorteile wie eine deutlich verbesserte Bildqualität und eine geringere Phototoxizität festgestellt.

5.3 Kapseln der dritten Generation

Bei den bisherigen Generationen der Kapseln (1. und 2.), bestand die Hülle der Kapseln aus einem organischen Polymer oder einem Copolymer wie beispielsweise PMMA, P(S-co-AA) oder P(S-b-MMA). Der Aufbau der Kern-Hülle-Struktur der polymeren Nanokapseln entstand aus einer Phasenseparation zwischen dem Polymer und dem verwendeten hydrophoben Medium (Kern).

Die Kapseln der dritten Generation zeichnen sich durch ihre anorganische, tetraedrisch verknüpfte SiO₂-Hülle aus. Der Herstellungsprozess erfolgt wie bereits bei den alten Kapselsystemen (1. und 2. Generation) über den Miniemulsionsprozess. Der Aufbau der Kapselhülle entsteht durch eine Grenzflächenreaktion (Tröpfchen zu Wasser) von TEOS, dem eingesetzten Monomer in der dispersen Phase und dem Wasser der kontinuierlichen Phase. Auf die Hydrolyse des TEOS folgt eine Kondensationsreaktion zwischen den hydrolysierten Si(OH)₄-Molekülen, was zur Ausbildung des tetraedrischen SiO₂-Polymers führt. Somit wird eine feste Schale aus anorganischem „Polymer“ um den hydrophoben Kern herum aufgebaut.

5.3.1 UC in SiO₂-Nanokapseln

Als hydrophobe Medien im inneren der Nanokapseln (Kern) wurden Miglyol und PHD verwendet, die ebenso wie die verkapselten UC-Farbstoffe bereits aus den vorherigen Kapiteln bekannt sind. Die Synthese erfolgt wie bereits in Abschnitt 4.1.3 beschrieben. In Tabelle 5.15 sind die DLS-Daten und Feststoffgehalte der Si-Proben aufgeführt.

Tabelle 5.15: Analyseergebnisse der Si-Kapseln mit UC-Farbstoffen.

Probe	Feststoffgehalt [%]	$D_i (\pm \sigma)$ [nm]	Farbstoffe	
			Sensitizer c [mol·L ⁻¹]	Emitter c [mol·L ⁻¹]
Si-57	9,5	216 (±58)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
Si-52	8,3	216 (±33)	Pd-TBP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)
Si-53	10,0	220 (±87)	Pd-TBP (1x10 ⁻⁴)	Bodipy (1x10 ⁻³)
Si-54	9,5	198 (±49)	Pd-TNP (1x10 ⁻⁴)	Y-Perylen (1x10 ⁻³)
Si-55	9,8	232 (±97)	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)
Si-49	8,4	230 (±91)	Pd-TBP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)
Si-50	9,6	227 (±91)	Pd-TBP (1x10 ⁻⁴)	Bodipy (1x10 ⁻³)
Si-51	8,8	229 (±105)	Pd-TNP (1x10 ⁻⁴)	Y-Perylen (1x10 ⁻³)

Die Ansätze oberhalb des Trennstriches (Si-57/Si-52/Si-53/Si-54) sind mit PHD als Kernmaterial, die unterhalb (Si-55/Si-49/Si-50/Si-51) mit Miglyol. Der gemessene Feststoffgehalt liegt bei allen Proben bei ca. 9%. Leichte Abweichungen kommen vermutlich durch unterschiedliche Mengen an verdampfter kontinuierlicher Phase zustande.

Die DLS-Werte fallen für die Proben mit Miglyol (ca. $d_i = 230$ nm) leicht größer aus als für diejenigen mit PHD (ca. $d_i = 215$ nm) als hydrophoben Kernmaterial. Die Standardabweichung der Kapseln ist in beiden Fällen relativ groß, bei den Kapseln mit Miglyol etwas größer als bei denen mit PHD. Die TEM-Aufnahmen aus Abbildung 5.67 bestätigen neben der nahezu perfekten Kern-Hülle-Struktur von jedem Teilchen auch die Größe der Kapseln von ca. $d_i = 200$ -250 nm. Daneben sind aber auch kleinere Kapseln mit einem Durchmesser von ca. $d_i = 50$ nm zu sehen. Diese kleinen Kapseln werden im DLS vermutlich nicht als einzelne Kapseln gemessen, sondern nur als Aggregationen von drei bis vier Nanokapseln.

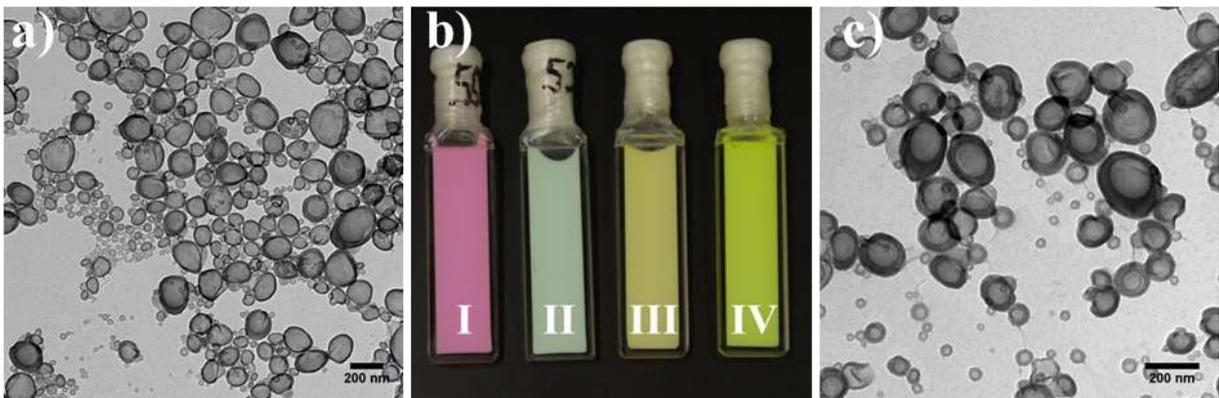


Abbildung 5.67: TEM-Aufnahmen von SiO₂-Kapseln mit PHD (Bild a) und Miglyol (Bild c). Bild b): Dispersionen der unterschiedlichen Farbstoffpaare mit Miglyol (I = Pd-OEP/Perylen, II = Pd-TBP/Perylen, III = Pd-TBP-Bodipy, IV = Pd-TNP/Y-Perylen).

Im Folgenden werden die UC-Spektren der durchgeführten Ansätze mit SiO₂-Nanokapseln und den bereits bekannten UC-Farbstoffpaaren aufgeführt. Für jedes UC-Farbstoffpaar wurden zwei Ansätze mit Miglyol und PHD hergestellt. Diese beiden Ansätze pro Farbstoffpaar werden in den folgenden UC-Spektren direkt miteinander verglichen. Zusätzlich zu den Spektren wurden bei jedem Farbstoffpaar „Live-Bilder“ aufgenommen, bei denen die UC-Emission mit dem Auge sichtbar ist. Zur Unterdrückung des Streulichtes der Anregung wurden die Bilder der Emission durch einen jeweils passenden Filter aufgenommen. Der Laserstrahl wurde mittels Dampf von flüssigem Stickstoff sichtbar gemacht. In Abbildung 5.67 wurden im mittleren Bild die Dispersionen der unterschiedlichen

Farbstoffpaare (I = Pd-OEP/Perylen-pink, II = Pd-TBP/Perylen-grünlich, III = Pd-TBP-Bodipy-gelbbraun, IV = Pd-TNP/Y-Perylen-gelbgrün) mit Miglyol fotografiert. Zur Messung der UC wurde die Dispersion so verwendet (dieselbe Küvette, derselbe Feststoffgehalt), wie es in diesem Bild zu sehen ist.

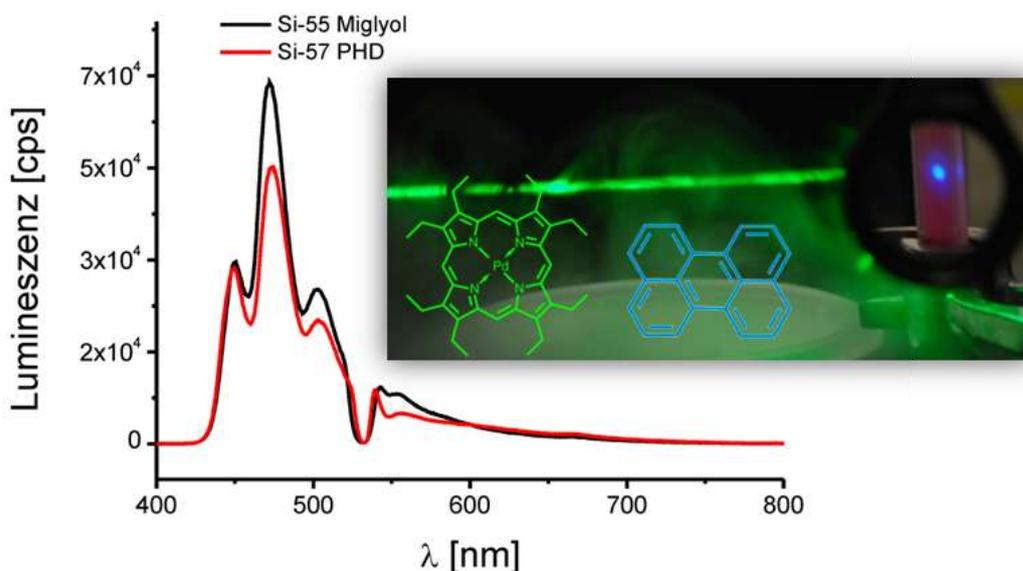


Abbildung 5.68: UC-Spektrum der Si-Kapseln (Si-56 mit Miglyol, schwarz, und Si-57 mit PHD, rot) mit dem Farbstoffpaar Pd-OEP/Perylen. Die Konzentration der Farbstoffe beträgt für Pd-OEP $c(\text{Pd-OEP}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und für Perylen $c(\text{Perylen}) = 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Zusätzlich: „Live-Bild“ der UC-Emission (Notch-Filter: $\lambda = 530 \text{ nm}$) während der Anregung mit dem Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 1,25 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$).

In Abbildung 5.68 sind die UC-Spektren der Ansätze mit Pd-OEP und Perylen als UC-Farbstoffe dargestellt (Si-56 mit Miglyol, schwarz, und Si-57 mit PHD, rot). Die Konzentration der Farbstoffe ist im Vergleich zu den folgenden Ansätzen um eine Größenordnung höher und liegt für Pd-OEP bei $c(\text{Pd-OEP}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und für Perylen bei $c(\text{Perylen}) = 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Bei beiden Spektren ist kaum eine Phosphoreszenz auszumachen. Wie bei UC-Spektren in reiner organischer Lösung ist der Peak der Phosphoreszenz auf ein Minimum begrenzt und deutet somit auf eine fast vollständige Effizienz der UC hin. Der Ansatz von Miglyol zeigt ein leicht größeres Signal als der mit PHD. Das kann am etwas höheren Feststoffgehalt liegen oder aber an der besseren QY des Farbstoffpaares in Miglyol als in PHD (Abbildung 5.55).

Als nächstes Farbstoffpaar wurde Pd-TBP und Perylen in Abbildung 5.69 gemessen. Wie bereits erwähnt, betrug die Konzentration der Farbstoffe hier nur $c(\text{Pd-TBP}) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und $c(\text{Perylen}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Hier ist, wie bereits beim vorigen Experiment, eine sehr

hohe UC-Effizienz beider Ansätze zu sehen, da sich der Phosphoreszenzpeak auf ein Minimum beschränkt. Hier scheint die Wahl des hydrophoben Kerns keine Auswirkungen auf das UC-Spektrum zu besitzen. Sowohl im absoluten Signal als auch in der Effizienz gibt es keine nennenswerten Unterschiede.

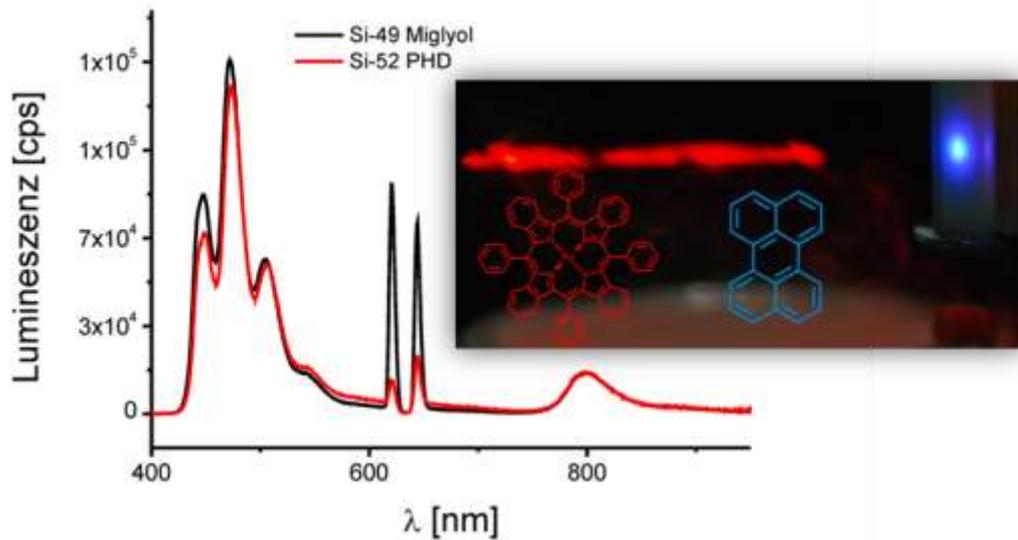


Abbildung 5.69: UC-Spektrum der Si-Kapseln (Si-49 mit Miglyol und Si-52 mit PHD) mit dem Farbstoffpaar Pd-TBP/Perylen. Die Konzentration der Farbstoffe beträgt für Pd-TBP $c(\text{Pd-TBP}) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und für Perylen $c(\text{Perylen}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Zusätzlich: „Live-Bild“ der UC-Emission (Notch-Filter: 633 nm) während der Anregung mit dem Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 2,5 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$).

Anders dagegen ist es beim Farbstoffpaar Pd-TBP und Bodipy. In Abbildung 5.70 sind zwischen den beiden Spektren von Miglyol (schwarz) und PHD (rot) deutliche Unterschiede zu sehen. Trotz gleicher Konzentration beider Ansätze ($c(\text{Pd-TBP}) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und $c(\text{Bodipy}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) und auch sonst vergleichbaren Bedingungen zeigt sich im gemessenen absoluten Signal ein deutlicher Unterschied. Der Ansatz Si-53 mit PHD als hydrophobem Kern weist ein höheres UC-Signal und eine bessere UC-Effizienz auf als der Ansatz mit Miglyol. Wenn man diesen Unterschied mit den Ansätzen der anderen Farbstoffpaare vergleicht, bei denen es kaum einen Unterschied zwischen Miglyol und PHD zu sehen gibt, erscheint dieser extreme Unterschied etwas fragwürdig. Eine mögliche Erklärung ist die nur begrenzte Stabilität der Ansätze mit Bodipy und SiO_2 -Kapseln. Während alle anderen Ansätze eine hohe Langzeitstabilität von mehreren Monaten aufweisen, zeigen sich bei den Ansätzen mit Bodipy (Pd-TBP kann als Ursache ausgeschlossen werden, da es in Kombination mit Perylen keine Probleme gibt) bereits nach wenigen Tagen erste

Aggregationen. Eine mögliche Anbindung (physikalisch oder chemisch) des Bodipy an die SiO_2 -Schale oder an das verwendete Tensid CTMA-Cl kann zu den beobachteten Unstabilitäten führen. Zwar wurden beide Messungen in einer stabilen Dispersion durchgeführt, trotzdem kann ein negativer Einfluss nicht ausgeschlossen werden. Jedenfalls sind die Ergebnisse der Ansätze mit Bodipy und den SiO_2 -Nanokapseln nur bedingt vergleichbar, was dann wiederum zu dem Entschluss führte dass Bodipy nur bedingt zur Verkapselung in SiO_2 -Kapseln geeignet ist.

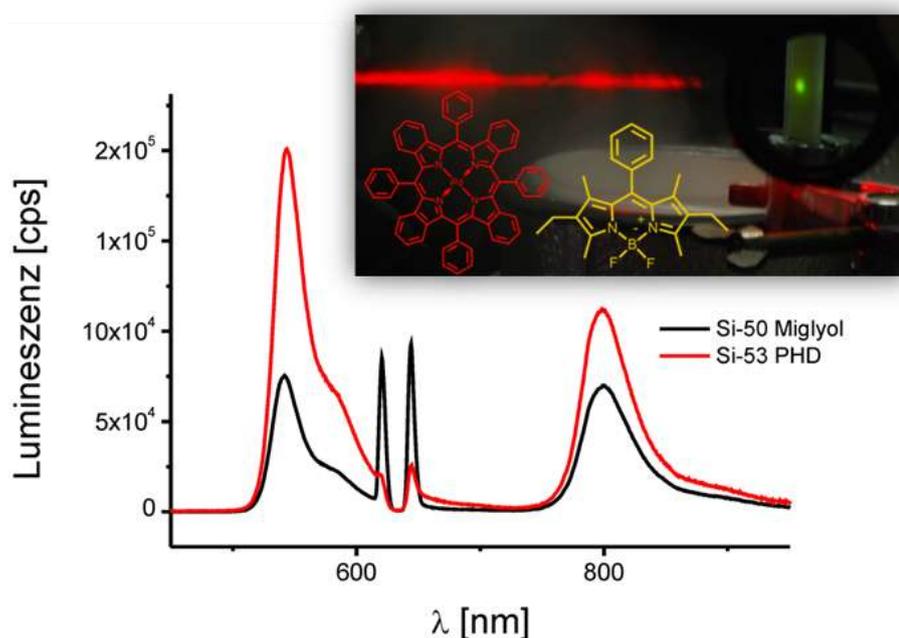


Abbildung 5.70: UC-Spektrum der Si-Kapseln (Si-50 mit Miglyol und Si-53 mit PHD) mit dem Farbstoffpaar Pd-TBP/Bodipy. Die Konzentration der Farbstoffe beträgt für Pd-TBP $c(\text{Pd-TBP}) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und für Bodipy $c(\text{Bodipy}) = 1 \times 10^{-3}$. Zusätzlich: „Live-Bild“ der UC-Emission (Notch-Filter: $\lambda = 633 \text{ nm}$) während der Anregung mit dem Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $P_{\text{exc}} = 2,5 \text{ mW}$, $d_{\text{Fokus}} = 400 \mu\text{m}$).

Als letztes Farbstoffpaar wurde Pd-TNP und Y-Perylen gemessen. In Abbildung 5.71 sind die UC-Spektren der beiden Ansätze mit PHD und Miglyol mit den Farbstoffkonzentrationen von $c(\text{Pd-TNP}) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und $c(\text{Y-Perylen}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ abgebildet. Hier gibt es erneut kaum einen Unterschied zwischen den beiden Spektren auszumachen. Lediglich die UC-Effizienz scheint im Falle des PHD geringfügig besser zu sein als die vom Ansatz mit Miglyol. Im Falle des „Live-Bilds“ mit Pd-TNP/Y-Perylen ist der Laserstrahl nur sehr schwach oder gar nicht zu sehen, während er mit dem Auge sehr gut erkennbar ist. Dafür verantwortlich ist vermutlich der sogenannte Bayer-Sensor, der für die Farbzusammensetzung der Bilder in den meisten Digitalkameras verantwortlich ist. Die Anregungswellenlänge des

Lasers von $\lambda = 710$ nm wird von diesem Sensor nahezu vollständig aus dem resultierenden Bild entfernt.

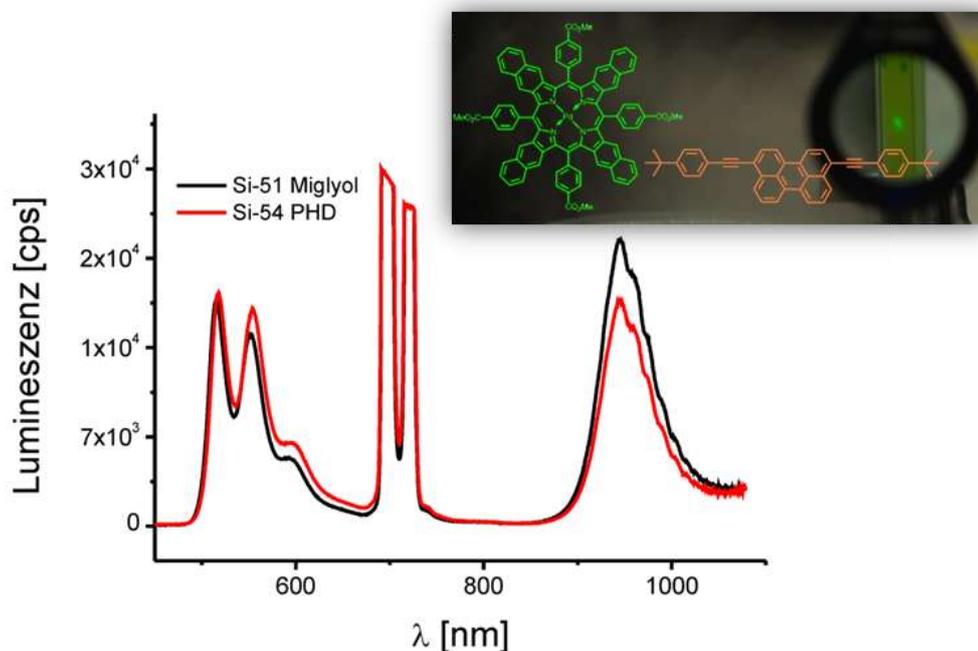


Abbildung 5.71: UC-Spektrum der Si-Kapseln (Si-51 mit Miglyol und Si-54 mit PHD) mit dem Farbstoffpaar Pd-TNP/Y-Perylen. Die Konzentration der Farbstoffe beträgt für Pd-TBP $c(\text{Pd-TNP}) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und für Y-Perylen $c(\text{Y-Perylen}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Zusätzlich: „Live-Bild“ der UC-Emission (Short-Pass: $\lambda = 700$ nm) während der Anregung mit dem Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 710$ nm, $P_{\text{exc}} = 2,5$ mW, $d_{\text{Fokus}} = 400$ μm).

Nachdem alle Farbstoffpaare der PMMA-Nanokapseln ebenfalls in den SiO_2 -Nanokapseln verwendet wurden, kann man die UC in beiden Systemen miteinander vergleichen (Tabelle 5.16). Hier ist Vorsicht geboten, weil man erneut die unterschiedlichen Bedingungen mit einrechnen muss. Das gemessene UC-Integral, gleichzusetzen mit der Zahl der gemessenen Photonen, hängt vom Feststoffgehalt, der Laserleistung und der eingesetzten Farbstoffkonzentration ab. Bei allen Ansätzen mit SiO_2 wurde, mit Ausnahme von Pd-OEP/Perylen, eine geringere Konzentration (eine Größenordnung!) eingesetzt. Außerdem ist der Feststoffgehalt der SiO_2 -Dispersionen ca. doppelt so groß wie der von den PMMA-Dispersionen. Auf Grund schwankender Laserleistungen (alternder Laser) war eine Messung bei gleicher Laserleistung nur selten möglich. Besser hingegen gelingt der Vergleich der UC-Effizienz. Diese wird nur von der Laserleistung entscheidend beeinflusst, zeigt sich aber weitgehend unabhängig von Feststoffgehalt und Farbstoffkonzentration.

Am besten lässt sich somit das Farbstoffpaar Pd-OEP/Perylen miteinander vergleichen (dieselbe Konzentration). Das Integral bei beiden SiO_2 -Ansätzen ist deutlich größer als beim

PMMA, was durch den halbierten Feststoffgehalt nicht auszugleichen ist. Außerdem wurde zusätzlich bei geringerer Laserleistung gemessen. Die UC-Effizienz ist im Falle der SiO₂-Nanokapseln, wie bereits im Spektrum ohne Berechnung zu sehen war, nahezu perfekt. Mit 99% wird, trotz leicht geringerer Laserleistung, ein höherer Wert erreicht als bei den PMMA-Kapseln mit 95%.

Diese hohe Effizienz wird auch beim nächsten Farbstoffpaar Pd-TBP/Perylen beobachtet. Der Unterschied zu den PMMA-Kapseln ist trotz einem größeren Unterschied der Laserleistung (3 mW zu 2,5 mW) durch den Anstieg um fast 10% (von 89% auf 98%) nochmals deutlicher als beim ersten Farbstoffpaar. Dies wirkt sich direkt auf das gemessene UC-Integral aus, das trotz geringerer Konzentration und geringerer Laserleistung immer noch größer ist als bei den PMMA-Kapseln. Dabei muss der Feststoffgehalt der Probe mit einbezogen werden, der bei den SiO₂-Nanokapseln doppelt so hoch ist wie bei den PMMA-Nanokapseln. Unter der Annahme einer linearen Steigerung (Abbildung 5.42) wäre das theoretisch berechnete Signal der PMMA-Nanokapseln bei gleichem Feststoffgehalt trotzdem geringer ist als bei den SiO₂-Kapseln.

Tabelle 5.16: UC-Integrale und UC-Effizienzen von SiO₂- und PMMA-Nanokapseln.

Probe	UC-Integral	Feststoffgehalt [%]	UC-Effizienz [%]	Laserleistung [mW]	Farbstoffpaar Sensitizer/Emitter
Si-57	3,3 x10 ⁹	9,5	99	1250	Pd-OEP/Perylen
Si-55	2,8 x10 ⁹	9,8	99	1250	
SE-26-3	5,6x10 ⁸	5,0	95	1300	
Si-49	8,6x10 ⁹	8,4	98	2500	Pd-TBP/Perylen
Si-52	7,7x10 ⁹	8,3	97	2500	
SE-26-4	2,9x10 ⁹	5,4	89	3000	
Si-50	2,8x10 ⁹	9,6	76	2500	PD-TBP/Bodipy
Si-53	7,5x10 ⁹	10,0	85	2500	
SE-26-13	6,8x10 ⁹	4,9	80	2000	
Si-51	1,0x10 ⁹	8,8	85	2500	PD-TNP/Y-Perylen
Si-54	1,1x10 ⁹	9,5	89	2500	
SE-26-6	9,4x10 ⁸	5,5	94	2000	

Bei den nächsten beiden Farbstoffpaaren wird der Vergleich hingegen deutlich schwieriger, da bei den SiO₂-Ansätzen mit Pd-TBP/Bodipy Stabilitätsprobleme beobachtet wurden. Diese haben möglicherweise einen negativen Effekt auf ein reproduzierbares Signal und somit die

Vergleichbarkeit. Nimmt man beispielsweise das Spektrum mit PHD, wurde zwar eine bessere Effizienz (85% zu 80%) gemessen, jedoch aber bei einer höheren Laserleistung von $P_{\text{exc}} = 2,5$ anstatt $P_{\text{exc}} = 2$ mW. Das UC-Integral ist auf Grund der viel geringeren Konzentration der Farbstoffe trotzdem größer einzuschätzen (geringerer Feststoffgehalt und höhere Laserstärke berücksichtigt) als das der PMMA-Kapseln. Beim Ansatz mit Miglyol wurden nochmals schwächere Werte gemessen.

Beim Farbstoffpaar Pd-TNP ist das Signal der SiO₂-Ansätze doppelt so groß, was sich durch den Feststoffgehalt ausgleicht. Die geringere Farbstoffkonzentration spricht, trotz der höheren Laserleistung ($P_{\text{exc}} = 2,5$ anstatt $P_{\text{exc}} = 2$ mW), für ein generell besseres Signal bei den SiO₂-Nanokapseln. Die Effizienz hingegen ist etwas schlechter als beim PMMA (geringere Werte bei höheren Laserstärken), jedoch wurde bereits bei den PMMA-Ansätzen auf mögliche Messungenauigkeiten des Phosphoreszenzpeaks hingewiesen, was die Berechnung der UC-Effizienz beeinflusst.

Zusammengefasst zeigen die SiO₂-Nanokapseln bei den Farbstoffpaaren Pd-OEP/Perylen und Pd-TBP/Perylen eine nahezu perfekte Effizienz wie sie in organischer Lösung zu beobachten ist. Diese Verbesserung der Effizienz, im Vergleich zu den PMMA-Kapseln ist möglicherweise über den Bildungsprozess der Nanokapseln zu erklären. Bei den bisherigen Nanokapseln (erste und zweite Generation) wurde das Auftreten der Phosphoreszenz mit unbeweglichen, in der Kapselhülle eingeschlossenen Sensitizermolekülen erklärt. Da bei den Kapseln mit SiO₂ kaum eine Phosphoreszenz auftritt, scheint somit kaum oder kein Sensitizer in der Kapselhülle eingeschlossen zu sein. Dies kann möglicherweise über die Kapselbildung erklärt werden. Die Schale der Kapseln der dritten Generation aus SiO₂ wird durch Hydrolyse und Kondensation direkt an der Grenzfläche der Tröpfchen zur kontinuierlichen Phase aufgebaut. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit eines eingeschlossenen Farbstoffmoleküls (gelöst oder adsorbiert) viel geringer als beim anderen Bildungsprozess. Dort fällt das Polymer langsam im Inneren des Tröpfchens aus (durch steigendes Molekulargewicht oder Einengung des Lösungsmittels) und begibt sich dann, auf Grund der höheren Hydrophilie als das hydrophobe Medium, zur Grenzfläche Tröpfchen/Wasser. Durch das Ausfällen des Polymers kann es vorkommen, dass Farbstoffmoleküle im Polymerknäuel (und somit in der Schale) eingeschlossen werden und nicht im hydrophoben Kern in Lösung vorliegen.

Bei dem Ansatz mit Pd-TBP/Bodipy sind die SiO₂-Kapseln die vermeintlich schlechtere Alternative. Im Vergleich mit den PMMA-Kapseln zeigen sie keine Langzeitstabilität und möglicherweise eine Reaktion (chemisch oder physikalisch) mit Bodipy, was einen negativen Einfluss auf das gemessene UC-Spektrum ausübt.

Fasst man die Ergebnisse für die dritte Generation der UC-Nanokapseln aus anorganischem SiO_2 zusammen, so lässt sich vor allem eine besonders hohe Effizienz der UC feststellen. Diese Effizienz ist vermutlich im Bildungsprozess der Nanokapseln begründet. Im Vergleich zu den bereits sehr guten Effizienzen bei den PMMA-Kapseln nähert man sich mit den SiO_2 -Nanokapseln sehr stark den Werten der UC-Effizienzen in reinen organischen Lösungen an. Die hohe Stabilität und Robustheit machen die SiO_2 -Nanokapseln für mögliche Anwendungen im Solarzellenbereich oder in der Photokatalyse interessant.

Einzelne, nicht dargestellte, Zellversuche konnten zeigen, dass keinerlei Aufnahme der SiO_2 -Nanokapseln in die Zellen beobachtet werden konnte. Dies kann für weitere Anwendungen im Zellbereich von Vorteil sein.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation zeigt eine erfolgreiche Verknüpfung der Triplet-Triplett-Annihilation-Aufkonversion (TTA-UC) mit möglichen biologischen Anwendungen. Die Grundlage für solche Anwendungen ist ein Transfer der TTA-UC aus seinem üblicherweise verwendeten organischen Medium in eine wässrige Umgebung. Dazu ist besonders das Verfahren der Miniemulsion geeignet, mit dessen Hilfe sich in Wasser dispergierte Nanokapseln herstellen lassen. Der Kern solcher Nanokapseln besteht aus einem flüssigen hydrophoben Medium, in dem die zur TTA-UC notwendigen Farbstoffe gelöst sind. Dieser flüssige Kern ist vollständig von einer festen Polymerhülle umschlossen und somit isoliert von seiner wässrigen Umgebung. Bereits in meiner Diplomarbeit wurden TTA-UC-fähige Nanokapseln, dispergiert in Wasser, hergestellt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Grundlagen aufzunehmen und das System bezüglich seiner Effizienz, Anregungswellenlänge und Sauerstoffempfindlichkeit zu verbessern. Dazu sollten neue Nanokapseln hergestellt werden, zusammengesetzt aus unterschiedlichen Materialien für Kern und Hülle, und auf TTA-UC untersucht werden. Ziel dabei war es, die Effizienz der TTA-UC in den Kapseln zu optimieren und eine breite Farbstoffauswahl für die neu entwickelten Kapseln zu testen und zu etablieren. Diese optimierten Nanokapseln sollten schließlich im biologischen Bereich zur Anwendung gebracht werden.

Die stetige Systemverbesserung gelingt mit der Herstellung von drei unterschiedlichen Kapselgenerationen. Diese Generationen charakterisieren sich durch den angewandten Kapselbildungsprozess, der jeweils auf der Technik der Miniemulsion basiert.

Bei der ersten Generation wurde die radikalische Miniemulsionspolymerisation zur Kapselbildung verwendet. Durch den Einsatz verschiedener Monomere konnten die Zusammensetzung der Polymerhülle variiert werden. Die Verwendung von unterschiedlichen hydrophoben Medien ermöglichte eine Steigerung der Farbstoffkonzentration im inneren Kern der Kapseln. Mit Hilfe dieser Konzentrationserhöhung der UC-Farbstoffe konnte zum ersten Mal mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop effiziente TTA-UC in fixierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde durch eine zusätzliche Vernetzung der Polymerhülle eine geringere Sauerstoff-permeabilität des Polymers erreicht, was in Bezug auf die Sauerstoffempfindlichkeit des TTA-UC-Systems von großem Vorteil ist.

Auf Grund der drastischen Reaktionsbedingungen durch auftretende Radikalbildung und einer Temperatur von 70 °C, ist diese erste Generation in der Auswahl der UC-Farbstoffpaare auf einige wenige begrenzt. Diese Beschränkung in der Farbstoffwahl war der Grund für die Entwicklung eines neuen Bildungsprozess für die Nanokapseln der zweiten Generation. Durch die Anwendung der Methode der Lösungsmittelverdampfung zur Bildung von Nanokapseln in Miniemulsion wurden die Reaktionsbedingungen stark reduziert (keine Radikalbildung, 40 °C oder RT). Diese milden Bedingungen im Bildungsprozess sorgten für eine uneingeschränkte Auswahlmöglichkeit der UC-Farbstoffpaare. Durch den Einsatz unterschiedlicher Sensitizer wie Palladium-Tetrabenzoporphyrin (Pd-TBP) oder Palladium-Tetranaphtoporphyrin (Pd-TNP) konnte die Anregungswellenlänge der TTA-UC in den roten und in den nahen Infrarot-Bereich des sichtbaren Spektrums verschoben werden. Diese Verschiebung ist im biologischen Anwendungsbereich von enormer Wichtigkeit, da dort eine Überlappung mit dem natürlichen optischen Fenster von menschlicher Haut und Gewebe stattfindet. Die dort verminderte Absorption ermöglicht eine reduzierte Streuung und hohe Eindringtiefen der Anregungsquelle in das zu untersuchende Medium. Neben dem Sensitizer wurden auch verschiedene Emitter eingesetzt, was eine, je nach benötigter Anwendung, große Bandbreite der resultierenden UC-Fluoreszenz ermöglicht.

Bei den Kapseln der zweiten Generation wurden neben unterschiedlichen Farbstoffpaaren auch verschiedene Kapselsysteme hergestellt. Dabei wurde einerseits das Polymer variiert, indem beispielsweise Polymethylmethacrylat (PMMA) oder ein Blockcopolymer (Polystyrol-*block*-Polymethylmethacrylat, PS-*b*-PMMA) als jeweilige Polymerhülle verwendet wurde. Andererseits wurde auch das innere hydrophobe Medium, d.h. der flüssige Kern der Kapseln verändert, um beispielsweise mit dem Einsatz von Miglyol oder Olivenöl eine bessere Biokompatibilität als mit Hexadekan oder Phenylheptadekan zu erreichen. Alle hergestellten Systeme weisen eine extrem gute Reproduzierbarkeit auf und sind in der resultierenden Größe der Nanokapseln variierbar.

Durch die Anwendung von Antioxidantien wie NaSO₃ oder Vitamin C, welche den Sauerstoff in der Dispersion auf chemischem Weg (Reduktion) entfernen, konnte auf die aufwendige und zeitintensive Deoxygenierung verzichtet werden. Aber auch ohne eine vorherige Deoxygenierung konnte TTA-UC aus den Nanokapseln nachgewiesen werden.

Schließlich wurde mit den Kapseln der zweiten Generation zum ersten Mal TTA-UC in lebenden Zellen (HeLa und MSC) nachgewiesen. Die verspätete Fluoreszenz aus den Zellen wurde mit biologischen Standardverfahren, sowohl mit der Durchflusszytometrie (FACS) als auch am cLSM nachgewiesen. Besondere Vorteile gegenüber direkter Fluoreszenz konnte bei

der Bildgebung von Zellen erreicht werden. Die relativ energiearme Anregungswellenlänge und die dazu anti-Stokes verschobene, detektierte verspätete UC-Fluoreszenz liefert eine bessere Bildqualität und eine sehr geringe Phototoxizität der Zellen. Durch den Wegfall der Autofluoreszenz der Zelle (liegt außerhalb des Messbereichs) entsteht kaum Hintergrundrauschen und somit ein viel besserer Kontrast. Dabei wurde eine zehnfache Verbesserung des Verhältnisses von Signal zu Hintergrund gemessen.

Die Kapseln der dritten Generation zeichnen sich durch ihre anorganische, tetraedrisch verknüpfte SiO₂-Hülle aus und wurden mittels einer Grenzflächenreaktion (Sol-Gel-Prozess) in Miniemulsion hergestellt. Diese Kapseln weisen im Vergleich zur zweiten Generation, bedingt durch den neuen Kapselbildungsprozess, eine nochmals bessere UC-Effizienz auf und sind im Vergleich zu den Polymernanokapseln stabiler und robuster. Diese Eigenschaften machen die zur TTA-UC-fähigen anorganischen Nanokapseln interessant für Anwendungen im Solarzellenbereich oder im Bereich der Photokatalyse.

Insgesamt konnte im Verlauf der Arbeit und durch die Entwicklung der verschiedenen Generationen die Eigenschaften der erhaltenen Nanokapseln stetig verbessert werden. Ebenfalls ist die Verknüpfung mit möglichen biologischen Anwendungen gelungen, da entscheidende Vorteile im Bildgebungsbereich von Zellen nachgewiesen wurden.

Des Weiteren bietet das Gebiet der TTA-UC neben den bisher kaum erforschten biologischen Anwendungen zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten in denen die TTA-UC-kompatiblen Nanokapseln, hergestellt mit der Miniemulsionstechnik, eine Verwendung finden könnten

Summary

This work presents the successful connection between triplet-triplet-annihilation upconversion (TTA-UC) and possible applications in the biological field. The requirement for such a connection is the transfer of the TTA-UC from generally used organic media into a water based system. This transfer is easily reachable with the miniemulsion process by producing nanocapsules dispersed in water. The needed dyes for TTA-UC are dissolved in the liquid hydrophobic core of the capsules which is surrounded by a solid polymeric shell and therefore separated from aqueous environment. First successful experiments were already reached in my diploma thesis. The aim of this PhD-thesis was, to improve these basic results by varying the whole system to reach better UC-efficiency, other excitation wavelengths or less oxygen sensitivity. Therefore, new nanocapsules, composed out of different materials for core and shell should be investigated in relation to their TTA-UC compatibility. The aim was to optimize the UC-efficiency and to test and establish a broad variety of dyes for the nanocapsules. Finally the optimized nanocapsules should be made compatible for biological applications.

The continuous improvement of the system was reached by fabrication of three different kinds of nanocapsules (first, second and third generation). These three generations are characterized by different formation processes of the capsules of which all are based on miniemulsion technique.

For the first generation, the radical miniemulsion polymerization process was applied. The composition of the polymeric shell was varied by using different monomers. The insertion of diverse hydrophobic material for the liquid core enabled higher concentrations of the UC-dyes. Due to this increase of dye concentration, efficient TTA-UC was detected, for the first time, within fixed HeLa-cells by confocal laser-scanning-microscope (cLSM). Furthermore, a crosslinking of the polymeric shell results in lower oxygen permeability, which is very important concerning the oxygen sensitivity of the TTA-UC-system.

The disadvantage of the first generation is the drastic conditions of the capsule formation. The arisen radicals and a temperature of 70 °C reduce the choice of UC-dyes dramatically. The method of solvent evaporation in combination with the technique of miniemulsion allowed a new (second) generation of nanocapsules. The thereby possible soft conditions (no radicals, 40 °C or RT) are responsible for more a less unrestricted choice of UC-dyes. By using

different sensitizers, the excitation wavelength was shifted into the red or even into the NIR area of the visible spectra. This red-shift of excitation wavelength enables an overlap with optical window of human tissue and skin, which is of crucial importance for further biological applications. Through less absorption in the region of the optical window, a reduced scattering and an increased penetration depth of the excitation source is reached. Besides the exchange of the sensitizer, also the emitter was replaced to reach high flexibility of the resulting UC-fluorescence for different applications.

The building process of the nanocapsules of the second generation also allows the substitution of core and shell material. For the shell, different polymers like polymethylmethacrylate or a blockcopolymer (polystyrene-*co*-polymethylmethacrylate, PS-*co*-PMMA) were successfully used. As core material, next to hexadecane and phenylheptadecane, miglyol and olive oil were investigated, to reach higher biocompatibility of the entire capsule system. All produced nanocapsules offer extremely high reproducibility and can be varied in their size. With usage of NaSO₃ or vitamin C as antioxidant on a chemical way (reduction of oxygen), the extremely time consuming and complex deoxygenation via glove-box was avoided. Also without any previous deoxygenation, TTA-UC out of nanocapsules was detected.

Finally, with the nanocapsules of the second generation, the TTA-UC was measured for the first time in living HeLa-cells and MSCs. The delayed fluorescence out of the cells was detected with standardized biological measurement methods, like FACS and cLSM. Notably in the field of cell imaging crucial improvements were achieved in compare to the usage of direct fluorescence. Especially the relatively low excitation energy and the detected anti-Stokes shifted delayed UC-fluorescence results in better image quality and lower phototoxicity. Without autofluorescence of cells (not in detection area), the background (noise) is much weaker which finally leads to an improvement of signal to noise ration of around ten times.

The capsules of the third generation were formed via interfacial polymerization (sol-gel-process) in miniemulsion. They are composed of an inorganic tetrahedral bonded SiO₂-shell and miglyol or PHD as inner hydrophobic liquid. In compare to other capsule generations, these ones show, due to the different formation process, better UC efficiency, and due to the inorganic shell material also better stability and robustness. With these properties the nanocapsules of third generation are maybe more attractive for applications in solar cells or in the field of photo catalysis.

Summary

In summary, a continuous evolution of the system was achieved by the development of the several generations of nanocapsules. Also the connection to some biological applications was successful with the shown improvement of image quality in cell imaging with cLSM. Furthermore the field of TTA-UC offers lots of different applications in which the produced nanocapsules could possibly play an important role.

7 Literaturverzeichnis

- [1] R. M. Devlin, A. V. Barker, *PHOTOSYNTHESIS*, **1971**.
- [2] http://www.heliatek.com/wp-content/uploads/2012/04/120427_PI_Heliatek-Weltrekord-10_7-Prozent-Effizienz.pdf.
- [3] M. A. Green, K. Emery, Y. Hishikawa, W. Warta, E. D. Dunlop, *Progress in Photovoltaics: Research and Applications* **2012**, *20*, 12-20.
- [4] D. Meschede, *Optik, Licht und Laser*, Teubner, Wiesbaden, **2005**.
- [5] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, G. Weinreich, *Physical Review Letters* **1961**, *7*, 118.
- [6] F. Auzel, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 139-173.
- [7] M. Pollnau, D. R. Gamelin, S. R. Luthi, H. U. Gudel, M. P. Hehlen, *Physical Review B* **2000**, *61*, 3337-3346.
- [8] Y. R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics*, Wiley, Berlin, **2002**.
- [9] J. de Wild, A. Meijerink, J. K. Rath, W. G. J. H. M. van Sark, R. E. I. Schropp, *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4*, 4835-4848.
- [10] S. Balushev, T. Miteva, V. Yakutkin, G. Nelles, A. Yasuda, G. Wegner, *Physical Review Letters* **2006**, *97*, 143903.
- [11] A. Monguzzi, J. Mezyk, F. Scotognella, R. Tubino, F. Meinardi, *Physical Review B* **2008**, *78*.
- [12] S. Balushev, V. Yakutkin, G. Wegner, T. Miteva, G. Nelles, A. Yasuda, S. Chernov, S. Aleshchenkov, A. Cheprakov, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 181103-181101-181103-181103-181103.
- [13] P. B. Merkel, J. P. Dinnocenzo, *Journal of Luminescence* **2009**, *129*, 303-306.
- [14] V. Yakutkin, S. Aleshchenkov, S. Chernov, T. Miteva, G. Nelles, A. Cheprakov, S. Balushev, *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14*, 9846-9850.
- [15] S. Balushev, G. Nelles, K. Landfester, T. Miteva, **2012**, 84710E-84710E.
- [16] S. Balushev, T. Miteva, *Vol. 165* (Eds.: A. B. Cristóbal López, A. Martí Vega, A. Luque López), Springer Berlin / Heidelberg, **2012**, pp. 157-190.
- [17] Y. Y. Cheng, B. Fückel, R. W. MacQueen, T. Khoury, R. Clady, T. F. Schulze, N. J. Ekins-Daukes, M. J. Crossley, B. Stannowski, K. Lips, T. W. Schmidt, *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5*, 6953-6959.

- [18] T. Miteva, V. Yakutkin, G. Nelles, S. Balushev, *New J. Phys.* **2008**, *10*, 103002 (103010 pp.)-103002 (103010 pp.).
- [19] E. Downing, L. Hesselink, J. Ralston, R. Macfarlane, *Science* **1996**, *273*, 1185-1189.
- [20] R. R. Islangulov, F. N. Castellano, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2006**, *45*, 5957-5959.
- [21] C. Wohnhaas, *Diploma Thesis: Upconversion in Nanokapseln* **2009**, 70.
- [22] F. Tiarks, K. Landfester, M. Antonietti, *Langmuir* **2001**, *17*, 908-918.
- [23] R. H. Staff, P. Rupper, I. Lieberwirth, K. Landfester, D. Crespy, *Soft Matter* **2011**, *7*, 10219-10226.
- [24] R. R. Anderson, J. A. Parrish, *Journal of Investigative Dermatology* **1981**, *77*, 13-19.
- [25] B. J. Tromberg, N. Shah, R. Lanning, A. Cerussi, J. Espinoza, T. Pham, L. Svaasand, J. Butler, *Neoplasia* **2000**, *2*, 26-40.
- [26] D. K. Chatterjee, L. S. Fong, Y. Zhang, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1627-1637.
- [27] S. Choudhary, K. Nouri, M. L. Elsaie, *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24*, 971-980.
- [28] <http://www.rheinahr-campus.de/Forschung.3889.0.html>.
- [29] J. Ugelstad, M. S. Elaasser, Vanderho.Jw, *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Letters* **1973**, *11*, 503-513.
- [30] K. Landfester, in *Annual Review of Materials Research, Vol. 36*, Annual Reviews, Palo Alto, **2006**, pp. 231-279.
- [31] F. J. Schork, Y. W. Luo, W. Smulders, J. P. Russum, A. Butte, K. Fontenot, in *Polymer Particles, Vol. 175* (Ed.: M. Okubo), **2005**, pp. 129-255.
- [32] M. S. El-Aasser, E. D. Sudol, Federation Soc Coatings Technology, Boston, MA, **2002**, pp. 21-31.
- [33] K. Landfester, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2009**, *48*, 4488-4507.
- [34] M. Antonietti, K. Landfester, *Progress in Polymer Science* **2002**, *27*, 689-757.
- [35] Y. J. Chou, M. S. Elaasser, J. W. Vanderhoff, *J. Dispersion Sci. Technol.* **1980**, *1*, 129-150.
- [36] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen-und Kolloidchemie* Wiley-VCH, **1994**.
- [37] J. H. Schulman, W. Stoeckenius, L. M. Prince, *J. Phys. Chem.* **1959**, *63*, 1677-1680.
- [38] B. Abismail, J. P. Canselier, A. M. Wilhelm, H. Delmas, C. Gourdon, *Ultrason. Sonochem.* **1999**, *6*, 75-83.
- [39] J. R. Canselier, H. Delmas, A. M. Wilhelm, B. Abismail, *J. Dispersion Sci. Technol.* **2002**, *23*, 333-349.

- [40] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, M. Antonietti, *Macromolecules* **1999**, *32*, 5222-5228.
- [41] W. C. Griffin, *Journal of Cosmetic Science* **1949**, *1*, 311-326.
- [42] B. Derjaguin, L. Landau, *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki* **1945**, *15*, 663-682.
- [43] E. J. W. Verwey, J. Th. G. Overbeek, *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Elsevier, **1948**.
- [44] W. Ostwald, *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie--Stoichiometrie Und Verwandtschaftslehre* **1900**, *34*, 495-503.
- [45] W. I. Higuchi, J. Misra, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1962**, *51*, 459-&.
- [46] K. Fontenot, F. J. Schork, *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, *49*, 633-655.
- [47] K. Landfester, N. Bechthold, S. Forster, M. Antonietti, *Macromolecular Rapid Communications* **1999**, *20*, 81-84.
- [48] C. S. Chern, T. J. Chen, Y. C. Liou, *Polymer* **1998**, *39*, 3767-3777.
- [49] J. Reimers, F. J. Schork, *Polym. React. Eng.* **1996**, *4*, 135-152.
- [50] S. S. Davis, H. P. Round, T. S. Purewal, *Journal of Colloid and Interface Science* **1981**, *80*, 508-511.
- [51] K. Landfester, *Macromolecular Rapid Communications* **2001**, *22*, 896-936.
- [52] C. K. Weiss, M. R. Lorenz, K. Landfester, V. Mailaender, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 883-896.
- [53] D. Crespy, K. Landfester, *Macromolecules* **2005**, *38*, 6882-6887.
- [54] S. Cauvin, A. Sadoun, R. Dos Santos, J. Belleney, F. Ganachaud, P. Hemery, *Macromolecules* **2002**, *35*, 7919-7927.
- [55] S. Cauvin, F. Ganachaud, M. Moreau, P. Hemery, *Chem. Commun.* **2005**, 2713-2715.
- [56] P. Wehrmann, S. Mecking, *Macromolecules* **2006**, *39*, 5963-5964.
- [57] D. Quemener, V. Heroguez, Y. Gnanou, *Macromolecules* **2005**, *38*, 7977-7982.
- [58] A. Zeller, A. Musyanovych, M. Kappl, A. Ethirajan, M. Dass, D. Markova, M. Klapper, K. Landfester, *Acs Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2*, 2421-2428.
- [59] N. Bechthold, K. Landfester, *Macromolecules* **2000**, *33*, 4682-4689.
- [60] M. Barrere, K. Landfester, *Polymer* **2003**, *44*, 2833-2841.
- [61] K. Landfester, F. Tiarks, H. P. Hentze, M. Antonietti, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 1-5.
- [62] F. Tiarks, K. Landfester, M. Antonietti, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2001**, *39*, 2520-2524.

- [63] G. Baier, J. M. Siebert, K. Landfester, A. Musyanovych, *Macromolecules* **2012**, *45*, 3419-3427.
- [64] J. M. Siebert, G. Baier, A. Musyanovych, K. Landfester, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5470-5472.
- [65] C. K. Weiss, K. Landfester, in *Hybrid Latex Particles: Preparation With*, Vol. 233 (Eds.: A. M. VanHerk, K. Landfester), **2010**, pp. 185-236.
- [66] A. Ethirajan, K. Landfester, *Chem.-Eur. J.* **2010**, *16*, 9398-9412.
- [67] K. Landfester, C. K. Weiss, in *Modern Techniques for Nano- and Microreactors/-Reactions*, Vol. 229 (Ed.: F. Caruso), Springer-Verlag Berlin, Berlin, **2010**, pp. 1-49.
- [68] D. Klinger, K. Landfester, *Soft Matter* **2011**, *7*, 1426-1440.
- [69] K. Landfester, A. Musyanovych, in *Chemical Design of Responsive Microgels*, Vol. 234 (Eds.: A. Pich, W. Richtering), **2010**, pp. 39-63.
- [70] T. Kietzke, D. Neher, M. Kumke, O. Ghazy, U. Ziener, K. Landfester, *Small* **2007**, *3*, 1041-1048.
- [71] R. Rossmannith, C. K. Weiss, J. Geserick, N. Huesing, U. Hoermann, U. Kaiser, K. Landfester, *Chem. Mat.* **2008**, *20*, 5768-5780.
- [72] R. Schiller, C. K. Weiss, J. Geserick, N. Husing, K. Landfester, *Chem. Mat.* **2009**, *21*, 5088-5098.
- [73] M. R. Lorenz, M. V. Kohnle, M. Dass, P. Walther, A. Hoherl, U. Ziener, K. Landfester, V. Mailander, *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 711-727.
- [74] E. Schreiber, U. Ziener, A. Manzke, A. Plettl, P. Ziemann, K. Landfester, *Chem. Mat.* **2009**, *21*, 1750-1760.
- [75] A. Musyanovych, J. Schmitz-Wienke, V. Mailander, P. Walther, K. Landfester, *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 127-139.
- [76] A. Manzke, C. Pfahler, O. Dubbers, A. Plettl, P. Ziemann, D. Crespy, E. Schreiber, U. Ziener, K. Landfester, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1337-+.
- [77] L. P. Ramirez, K. Landfester, *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 22-31.
- [78] K. Landfester, L. P. Ramirez, *J. Phys.-Condes. Matter* **2003**, *15*, S1345-S1361.
- [79] A. Hamberger, A. M. Popa, R. M. Rossi, D. R. Kattnig, D. Hinderberger, K. Landfester, D. Crespy, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 9909-9920.
- [80] F. Tiarks, K. Landfester, M. Antonietti, *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, *202*, 51-60.
- [81] N. Steiert, K. Landfester, *Macromol. Mater. Eng.* **2007**, *292*, 1111-1125.
- [82] U. Paiphansiri, P. Tangboriboonrat, K. Landfester, *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 33-40.
- [83] S. Torza, S. G. Mason, *Journal of Colloid and Interface Science* **1970**, *33*, 67-&.

- [84] J. Berg, D. Sundberg, B. Kronberg, *Journal of Microencapsulation* **1989**, *6*, 327-337.
- [85] D. C. Sundberg, A. P. Casassa, J. Pantazopoulos, M. R. Muscato, B. Kronberg, J. Berg, *J. Appl. Polym. Sci.* **1990**, *41*, 1425-1442.
- [86] M. Okubo, A. Yamada, T. Matsumoto, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1980**, *18*, 3219-3228.
- [87] S. Lee, A. Rudin, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1992**, *30*, 2211-2216.
- [88] M. Urban, A. Musyanovych, K. Landfester, *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 961-970.
- [89] E.-M. Rosenbauer, K. Landfester, A. Musyanovych, *Langmuir* **2009**, *25*, 12084-12091.
- [90] D. Crespy, M. Stark, C. Hoffmann-Richter, U. Ziener, K. Landfester, *Macromolecules* **2007**, *40*, 3122-3135.
- [91] B. Peng, M. Chen, S. Zhou, L. Wu, X. Ma, *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *321*, 67-73.
- [92] J. Fickert, P. Rupper, R. Graf, K. Landfester, D. Crespy, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 2286-2291.
- [93] K. Koenig, *Journal of Microscopy (Oxford)* **2000**, *200*, 83-104.
- [94] F. E. Auzel, *Proceedings of the Ieee* **1973**, *61*, 758-786.
- [95] N. Bloembergen, *Physical Review Letters* **1959**, *2*, 84-85.
- [96] J. F. Suyver, J. Grimm, M. K. van Veen, D. Biner, K. W. Kramer, H. U. Gudel, *Journal of Luminescence* **2006**, *117*, 1-12.
- [97] Hai Sheng Qian, Hui Chen Guo, Paul Chi-Lui Ho, Ratha Mahendran, Yong Zhang, *Small* **2009**, *9999*, NA.
- [98] J. C. Zhou, Z. L. Yang, W. Dong, R. J. Tang, L. D. Sun, C. H. Yan, *Biomaterials* **2011**, *32*, 9059-9067.
- [99] A. Shalav, B. S. Richards, M. A. Green, *Solar Energy Materials and Solar Cells* **2007**, *91*, 829-842.
- [100] C. A. Parker, C. G. Hatchard, *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences* **1962**, *269*, 574-&.
- [101] C. A. Parker, C. G. Hatchard, *Transactions of the Faraday Society* **1963**, *59*, 284-&.
- [102] C. A. Parker, C. G. Hatchard, T. A. Joyce, *Analyst* **1965**, *90*, 1-&.
- [103] C. A. Parker, C. G. Hatchard, T. A. Joyce, *Nature* **1965**, *205*, 1282-&.
- [104] G. F. Stelmakh, M. P. Tsvirko, *Optika I Spektroskopiya* **1980**, *49*, 511-516.

- [105] P. E. Keivanidis, S. Balushev, T. Miteva, G. Nelles, U. Scherf, A. Yasuda, G. Wegner, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 2095-+.
- [106] T. N. Singh-Rachford, F. N. Castellano, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2560-2573.
- [107] J. Zhao, S. Ji, H. Guo, *RSC Advances* **2011**, *1*, 937-950.
- [108] Y. C. Simon, C. Weder, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 20817-20830.
- [109] R. S. Khnayzer, J. Blumhoff, J. A. Harrington, A. Haefele, F. Deng, F. N. Castellano, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 209-211.
- [110] C. Wohnhaas, A. Turshatov, V. Mailaender, S. Lorenz, S. Balushev, T. Miteva, K. Landfester, *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 772-778.
- [111] S. M. Borisov, C. Larndorfer, I. Klimant, *Advanced Functional Materials* **2012**, n/a-n/a.
- [112] R. R. Islangulov, D. V. Kozlov, F. N. Castellano, *Chem. Commun.* **2005**, 3776-3778.
- [113] W. Zhao, F. N. Castellano, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 11440-11445.
- [114] S. Balushev, V. Yakutkin, T. Miteva, Y. Avlasevich, S. Chernov, S. Aleshchenkov, G. Nelles, A. Cheprakov, A. Yasuda, K. Mullen, G. Wegner, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2007**, *46*, 7693-7696.
- [115] T. N. Singh-Rachford, F. N. Castellano, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 3550-3556.
- [116] M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, 14-19.
- [117] R. L. Fulton, M. Gouterman, *J. Chem. Phys.* **1961**, *35*, 1059-&.
- [118] M. Pope, C. E. Swenberg, *Electronic processes in organic crystals* **1982**, xx+821 pp.
- [119] D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836-850.
- [120] S. Balushev, V. Yakutkin, T. Miteva, G. Wegner, T. Roberts, G. Nelles, A. Yasuda, S. Chernov, S. Aleshchenkov, A. Cheprakov, *New J. Phys.* **2008**, *10*.
- [121] D. V. Kozlov, F. N. Castellano, *Chem. Commun.* **2004**, 2860-2861.
- [122] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991-&.
- [123] J. Saltiel, B. Atwater, *Advances in Photochemistry, Vol. 14*, Wiley, **1988**.
- [124] Y. Y. Cheng, T. Khoury, R. Clady, M. J. Y. Tayebjee, N. J. Ekins-Daukes, M. J. Crossley, T. W. Schmidt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 66-71.
- [125] S. M. Bachilo, R. B. Weisman, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 7711-7714.
- [126] C. A. Parker, C. G. Hatchard, *Proceedings of the Chemical Society of London* **1962**, 386-&.
- [127] A. Monguzzi, R. Tubino, F. Meinardi, *Physical Review B* **2008**, *77*.
- [128] A. Haefele, J. Blumhoff, R. S. Khnayzer, F. N. Castellano, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 299-303.

- [129] J. E. Auckett, C. Yuen Yap, T. Khoury, R. G. C. R. Clady, N. J. Ekins-Daukes, M. J. Crossley, T. W. Schmidt, *Journal of Physics: Conference Series* **2009**, *185*, 012002 (012004 pp.)-012002 (012004 pp.).
- [130] T. N. Singh-Rachford, A. Haefele, R. Ziessel, F. N. Castellano, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16164-+.
- [131] T. N. Singh-Rachford, R. R. Islangulov, F. N. Castellano, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 3906-3910.
- [132] S. Ji, H. Guo, W. Wu, W. Wu, J. Zhao, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2011**, *50*, 8283-8286.
- [133] W. Wu, W. Wu, S. Ji, H. Guo, J. Zhao, *Dalton Transactions* **2011**, *40*, 5953-5963.
- [134] A. Turshatov, D. Busko, Y. Avlasevich, T. Miteva, K. Landfester, S. Balushev, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 3112-3115.
- [135] P. W. Du, R. Eisenberg, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 502-506.
- [136] S. Balushev, P. E. Keivanidis, G. Wegner, J. Jacob, A. C. Grimsdale, K. Mullen, T. Miteva, A. Yasuda, G. Nelles, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86*.
- [137] F. Laquai, G. Wegner, C. Im, A. Busing, S. Heun, *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*.
- [138] R. R. Islangulov, J. Lott, C. Weder, F. N. Castellano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12652-+.
- [139] T. N. Singh-Rachford, J. Lott, C. Weder, F. N. Castellano, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12007-12014.
- [140] J. H. Kim, F. Deng, F. N. Castellano, *Chem. Mat.* **2012**, *24*, 2250-2252.
- [141] W. Wu, H. Guo, W. Wu, S. Ji, J. Zhao, *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 7056-7064.
- [142] A. Monguzzi, R. Tubino, F. Meinardi, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 1171-1174.
- [143] M. Haase, H. Schafer, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2011**, *50*, 5808-5829.
- [144] K. Tanaka, K. Inafuku, Y. Chujo, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4378-4380.
- [145] A. Turshatov, D. Busko, S. Balushev, T. Miteva, K. Landfester, *New J. Phys.* **2011**, *13*.
- [146] Q. Liu, T. S. Yang, W. Feng, F. Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5390-5397.
- [147] Y. C. Simon, S. Bai, M. K. Sing, H. Dietsch, M. Achermann, C. Weder, *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33*, 498-502.
- [148] A. Monguzzi, M. Frigoli, C. Larpent, R. Tubino, F. Meinardi, *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 139-143.
- [149] W. Burchard, *Vol. 48*, Springer Berlin / Heidelberg, **1983**, pp. 1-124.

- [150] M. D. G. Lechner, K.; Nordmeier, E. H. , *Makromolekulare Chemie*, Birkhäuser, Basel, **2003**.
- [151] R. P. Bruce J. Berne, in *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*, Courier Dover Publications, **2000**.
- [152] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und Kolloid-disperse Systeme*, Springer Verlag, Heidelberg, **2002**.
- [153] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153-1158.
- [154] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780-782.
- [155] T. A. Klar, M. Dyba, S. W. Hell, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *78*, 393-395.
- [156] J. W. H. Stanley L. Flegler, Karen L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*, Spektrum-Akademischer Vlg, **1995**.
- [157] W. Nagel, *Elektronenmikroskopische Laborpraxis*, Springer Verlag, **1981**.
- [158] J. d. P. Peter W. Atkins, *Physikalische Chemie Auflage v. 4, Vol. 4*, Wiley-VCH, **2006**.
- [159] <http://www.konfokalmikroskop.de>, FRT.GMBH, **2009**.
- [160] M. Minsky, *Scanning* **1988**, *10*, 128-138.
- [161] S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch, H. Heinz, *Zeiss Mikroskopie: Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*.
- [162] Leica Microsystems, **2004**.
- [163] Dittrich W., Gohde W., 3761187, United States, **1973**.
- [164] D. Crespy, K. Landfester, *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 457-466.
- [165] D. Busko, Laser-Setup, **2011**.
- [166] R. Rahbari, T. Sheahan, V. Modes, P. Collier, C. Macfarlane, R. M. Badge, *Biotechniques* **2009**, *46*, 277-+.
- [167] A. Musyanovych, J. Dausend, M. Dass, P. Walther, V. Mailander, K. Landfester, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 4160-4168.
- [168] N. J. Philpott, A. J. C. Turner, J. Scopes, M. Westby, J. C. W. Marsh, E. C. GordonSmith, A. G. Dalglish, F. M. Gibson, *Blood* **1996**, *87*, 2244-2251.
- [169] C. Wohnhaas, A. Turshatov, V. Mailander, S. Lorenz, S. Balushev, T. Miteva, K. Landfester, *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 772-778.
- [170] J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailänder, *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 1135-1143.
- [171] G. W. Burton, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6472-6477.
- [172] M. J. Fryer, *Plant, Cell & Environment* **1992**, *15*, 381-392.
- [173] H. Sies, W. Stahl, *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, S1315-S1321.

- [174] L. Shen, H.-F. Ji, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2008**, *199*, 119-121.
- [175] Karl Kadish, Kevin Smith, Roger Guilard, *The Porphyrin Handbook, Vol. 1-11*, Elsevier, **1999**.
- [176] A. Karimi, F. Mandizadeh, D. Salari, A. Niaei, *Desalination* **2011**, *275*, 148-153.
- [177] M. E. Rollie, G. Patonay, I. M. Warner, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1987**, *26*, 1-6.
- [178] A. M. Dennis, W. J. Rhee, D. Sotto, S. N. Dublin, G. Bao, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2917-2924.
- [179] R. G. W. Anderson, L. Orci, *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 539-543.
- [180] F. H.P, *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzender Gebiete, 4. Auflage* **1996**.
- [181] R. Wilson, A. R. Cossins, D. G. Spiller, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 6104-6117.
- [182] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy* **2006**.
- [183] J. P. Robinson, *Handbook of Flow Cytometry Methods* **1993**.
- [184] J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailander, *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 1135-1143.
- [185] J. F. Jin, Y. J. Gu, C. W. Y. Man, J. P. Cheng, Z. H. Xu, Y. Zhang, H. S. Wang, V. H. Y. Lee, S. H. Cheng, W. T. Wong, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7838-7847.
- [186] Q. Liu, J. Peng, L. Sun, F. Li, *ACS Nano* **2011**, *5*, 8040-8048.
- [187] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, L. Ananthanarayan, *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 489-501.
- [188] B. C. Pressman, *Annu. Rev. Biochem.* **1976**, *45*, 501-530.
- [189] D. Safiulina, V. Veksler, A. Zharkovsky, A. Kaasik, *Journal of Cellular Physiology* **2006**, *206*, 347-353.
- [190] T. C. O'Riordan, K. Fitzgerald, G. V. Ponomarev, J. Mackrill, J. Hynes, C. Taylor, D. B. Papkovsky, *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *292*, R1613-R1620.
- [191] A. Tarnok, J. Hamsch, R. Chen, R. Varro, *Clinical Chemistry* **2003**, *49*, 1000-1002.
- [192] J. Dasso, J. Lee, H. Bach, R. G. Mage, *Journal of Immunological Methods* **2002**, *263*, 23-33.
- [193] A. J. Sutherland, *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2002**, *6*, 365-370.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
A	Absorption
A	Größe der Grenzfläche [m^2]
AA	Acrylsäure
Abkürzung	Bedeutung
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
APD	Lawinendiode (engl. avalanche photo diode)
Ar	Argon
b	Breite der Probe [m]
Bodipy-X	Polymer mit kovalent gebundenem Bodipy Farbstoff (siehe Chemikalienliste)
B-P-Dyad	Kombination aus Bodipy und Perylen (siehe Chemikalienliste)
c	Konzentration [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
c	Lichtgeschwindigkeit 300×10^6 [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
CHCl_3	Chloroform
cLSM	Konfokales Laser-Raster-Mikroskop (engl. confocal laser scanning microscope)
cmc	Kritische Mizellbildung
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cps	Zahl der Photonen pro Sekunde (engl. counts per second)
CTMA-Cl	Cetyltrimethylammonium-chlorid
cw	Dauerstrich (engl. continuous wave)
D	Diffusionskoeffizient [$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$]
d	Durchmesser [m]
d_A	Auflösungsgrenze [m]
d_{Fokus}	Durchmesser des Lasers im Fokus
d_i	Partikeldurchmesser
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DMEM	Dubbecco's modified essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutscher Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVB	Divinylbenzol

E	Energie [eV]
Er	Erbium
ESA	Absorption angeregter Zustände (engl. energy state absorption)
ETU	Sequentielle Energieübertragung (engl. sequential energytransfer upconversion)
FACS	Gerät zur Durchflusszytometrie (engl. fluorescent activated cell sorting)
FCS	Fötales Kälber Serum
FFC	Vorwärtsstreuung (engl. forward scattering)
FRET	Fluoreszenz(Förster)-Resonanz-Energietransfer
FWHM	Halbwertsbreite (engl. full width half maximum)
G	Freie Enthalpie [J]
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Planck'sches Wirkungsquantum $6,626 \times 10^{-34}$ [J·s]
HB	Hämoglobin
HBO ₂	Oxyhämoglobin
HCl	Salzsäure
HD	Hexadekan
HeLa	Gebärmutterhalskrebszelle von Henrietta-Lachs
HLB	Hydrophile Lipophile Balance
I	Intensität [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]
I_{exc}	Anregungsintensität [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]
I_{exc}	Anregungsintensität [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]
ISC	Intersystem Crossing
k	Geschwindigkeitskonstante
k_{B}	Boltzmannkonstante $1,38 \times 10^{-23}$ [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$]
KDP	Kaliumdihydrogenphosphat
MAA	Methacrylsäure
M_n	Molekulargewicht (Zahlenmittel) [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
MPS	Mehrphotonenabsorption (engl. multi photon absorption)
MRT	Magnetische Resonanz Tomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
M_w	Molekulargewicht (Gewichtsmittel) [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
n	Brechungsindex
NA	Numerische Apertur
Na ₂ SO ₃	Natriumsulfit
NaOH	Natronlauge
NaYF ₄	Natrium Yttriumtetrafluorid

ND	Neutraldichte
NIR	Nahes Infrarot
O ₂	Sauerstoff
PAA	Polyacrylsäure
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PDI	Polydispersität
Pd-OEP	Palladium-Octaethylporphyrin (siehe Chemikalienliste)
PDT	Photodynamische Therapie
Pd-TBP	Palladium-tetrabenzaporphyrin (siehe Chemikalienliste)
Pd-TNP	Palladium-tetranaphtoporphyrin (siehe Chemikalienliste)
P _{exc}	Anregungsleistung [W]
PHD	Phenylheptadekan
P _L	Laplace-Druck [N·m ⁻²]
PMAA	Polymethacrylsäure
PMI	Perylenmonoimid (siehe Chemikalienliste)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMT	Photonenvervielfacher (engl. photon multiplier tube)
PS	Polystyrol
P _{UC}	Integral UC-Emission
PVA	Polyvinylalkohol
q	Streulichtvektor
QY	Quantenausbeute
r	Radius [m]
REM/SEM	Rasterelektronenmikroskop
r _H	Hydrodynamischer Radius
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur [°C, K]
S	Spreitungskoeffizient [N·m ⁻¹]
S/H	Signal/Hintergrund
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHG	Frequenzverdopplung (engl. second harmonic generation)
SiO ₂	Siliciumdioxid
SSC	Seitwärtsstreuung (engl. sideward scattering)
STED	Stimulierte Unterdrückung der Emission (engl. stimulated emission depletion)
t	Zeit [s]
T	Temperatur [°C, K]

TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEOS	Tetraethylorthosilicat
T_g	Glasübergangstemperatur [$^{\circ}\text{C}$, K]
THF	Tetrahydrofuran
TiO_2	Titandioxid
TPA	Zweiphotonenabsorption (engl. two photon absorption)
TTA	Triplet-Triplet-Annihilation
TTA-UC	Triplet-Triplet-Annihilation Aufkonversion
TTT	Triplet-Triplet-Transfer
UC	Photonen Aufkonversion (engl. photon-upconversion)
UV	Ultraviolett
V59	Azobis(2-methylbutyronitril
VIS	sichtbarer Bereich des Spektrums
Yb	Ytterbium
Y-Perylen	Derivat von Perylen (siehe Chemikalienliste)
α -MEM	minimal essential medium
α -Toc	α -Tocopherol
γ	Grenzflächenspannung [$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$]
$\Delta\lambda$	Wellenlängenbereich [nm]
ε	molarer Absorptionskoeffizient [$\text{m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$]
η	Quantenausbeute
η	dynamische Viskosität [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]
λ	Wellenlänge [nm]
λ_{exc}	Anregungswellenlänge [nm]
ν , f	Frequenz [Hz]
σ	Standardabweichung
τ_0	Lebensdauer [s]

8.2 Tabellen

Tabelle 8.1: Ansatzmengen und Analysenergebnisse der Kapseln der ersten Generation mit PS-*co*-PAA als Polymerhülle. Verwendete Initiatormenge: 50 mg V59 auf 1 g Monomergemisch. Der Prozentuale Anteil an AA beträgt relativ zur Gesamtmenge an Monomer 10%.

Probe	Monomer		Hydrophobes Medium	Kontinuierliche Phase SDS / H ₂ O	Farbstoffe		Feststoffgehalt	$d_i (\pm \sigma)$ [nm]
	Styrol [g]	AA [g]			Sensitizer: c [mol·L ⁻¹]	Emitter: c [mol·L ⁻¹]		
PSAA-20	1,8	0,2	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP (1×10^{-4})	Perylen (1×10^{-3})	9,0%	204 (± 20)
PSAA-24	1,8	0,2	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP (2×10^{-4})	Perylen (2×10^{-3})	10,1%	186 (± 53)
PSAA-26	1,8	0,2	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP (3×10^{-4})	Perylen (3×10^{-3})	9,1%	199 (± 46)
PSAA-30	1,8	0,2	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP (5×10^{-4})	Perylen (5×10^{-3})	10,8%	196 (± 41)
PSAA-33	1,8	0,2	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP (6×10^{-4})	Perylen (6×10^{-3})	9,0%	192 (± 49)
PSAA-32	1,8	0,2	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP (7×10^{-4})	Perylen (7×10^{-3})	10,2%	189 (± 44)
PSAA-42	0,9	0,1	2 g HD	15 mg / 15 g	Pd-TBP (7×10^{-4})	Perylen (7×10^{-3})	9,7%	217 (± 55)
PSAA-55	1,8	0,2	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-TBP (7×10^{-4})	----	11,5%	198 (± 59)
PSAA-74	0,6	0,06	1,3 g HD	10 mg / 10 g	Pd-TBP (7×10^{-4})	----	10,9%	213 (± 48)
PSAA-75	0,6	0,06	1,3 g PHD	10 mg / 10 g	Pd-OEP (1×10^{-3})	Perylen (1×10^{-2})	10,6%	259 (± 100)

Anhang

Tabelle 8.2: Ansatzmengen und Analysenergebnisse der Kapseln der ersten Generation mit PS-co-PAA als Polymerhülle mit zusätzlichem Quervernetzer DVB. Der Prozentuale Anteil an AA beträgt relativ zur Gesamtmenge an Monomer 10%. Die Prozentangabe von DVB bezieht sich ebenfalls auf die Gesamtmenge an eingesetztem Monomer.

Probe	Monomer			Hydrophobes Medium	Kontinuierliche Phase SDS / H ₂ O	Farbstoffe		Feststoffgehalt	$d_i (\pm \sigma)$ [nm]
	Styrol [g]	AA [g]	DVB [g] [%]			Sensitizer: c [mol·L ⁻¹]	Emitter: c [mol·L ⁻¹]		
PSAA-27	1,78	0,2	0,02 (1%)	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP: (1x10 ⁻⁴)	Perylen: (1x10 ⁻³)	10,8%	201 (± 56)
PSAA-28	1,75	0,2	0,06 (3%)	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP: (1x10 ⁻⁴)	Perylen: (1x10 ⁻³)	9,9%	200 (± 43)
PSAA-29	1,7	0,2	0,1 (5%)	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP: (1x10 ⁻⁴)	Perylen: (1x10 ⁻³)	12,2%	195 (± 41)
PSAA-37	1,75	0,2	0,06 (3%)	4 g HD	30 mg / 30 g	Pd-OEP: (6x10 ⁻⁴)	Perylen: (6x10 ⁻³)	10,1%	191 (± 48)
PSAA-38	1,6	0,2	0,2 (10%)	4 g HD	30 mg / 30 g	----	----	11,2%	199 (± 42)
PSAA-39	1,4	0,2	0,4 (20%)	4 g HD	30 mg / 30 g	----	----	12,2%	199 (± 50)
PSAA-40	1,2	0,2	0,6 (30%)	4 g HD	30 mg / 30 g	----	----	12,6%	204 (± 50)
PSAA-47	0,9	0,2	0,9 (45%)	2 g HD	15 mg / 15 g	Pd-OEP: 6x10 ⁻⁴	Perylen: 6x10 ⁻³	12,0%	201 (± 39)

Tabelle 8.3: Ansatzmengen und Analysenergebnisse der Kapseln der zweiten Generation mit dem statistischen Copolymer aus P(S_{0,86}-stat-MAA_{0,14}) als Polymerhülle.

Probe	Polymer [mg]	Hydrophobes Medium	CHCl ₃ [g]	Kontinuierliche Phase SDS / H ₂ O	Farbstoffe		Feststoffgehalt	$d_i (\pm \sigma)$ [nm]
					Sensitizer c [mol·L ⁻¹]	Emitter c [mol·L ⁻¹]		
SE-16-01	200	300 mg PHD	5	10 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	5%	194 (±33)
SE-16-02	200	400 mg PHD	5	10 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	6%	214 (±43)
SE-16-03	300	600 mg PHD	5	10 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	9%	246 (±58)
SE-16-04	666	1100 mg PHD	8	15 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	16%	310 (±72)
SE-16-05	333	666 mg PHD	5	10 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	10%	243 (±44)
SE-16-06	333	666 mg PHD	5	10 mg / 10 g	Pd-TBP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	10%	241 (±55)

Anhang

Tabelle 8.4: Ansatzmengen und Analysenergebnisse der Kapseln der zweiten Generation mit dem Blockcopolymer aus P(S_{0,48}-*b*-MMA_{0,52}) als Polymerhülle.

Probe	Polymer [mg]	Hydrophobes Medium	CHCl ₃ [g]	Kontinuierliche Phase SDS / H ₂ O	Farbstoffe		Feststoffgehalt	d _i (± σ) [nm]
					Sensitizer <i>c</i> [mol·L ⁻¹]	Emitter <i>c</i> [mol·L ⁻¹]		
Standardansatz	200	300 mg HD	2,5	20 mg / 10 g	----	----	5,4%	146 (±50)
SE-13-2	300	300 mg α-Toc	4	10 mg / 10 g	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	6,0%	193 (±75)
SE-13-6	150	100 mg α-Toc 50 mg HD	1,3	5 mg / 5 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	5,9%	225 (±79)
SE-13-7	150	75 mg α-Toc 75 mg HD	1,3	5 mg / 5 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	6,1%	282 (±113)
SE-13-8	150	50 mg α-Toc 100 mg HD	1,3	5 mg / 5 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	5,6%	280 (±118)
SE-13-9	150	120 mg α-Toc 30 mg HD	1,3	5 mg / 5 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	5,9%	248 (±103)
SE-15-1	666	1333 mg PHD	5	20 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	18,7%	233 (±54)
SE-15-4	333	666 mg PHD	2,5	10 mg / 5 g	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	18,6%	237 (±43)
SE-17-4	333	666 mg PHD	2,5	10 mg / 5 g	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	Bodipy (1x10 ⁻²)	19,6%	294 (±100)
SE-17-8	150	300 mg PHD	205	5 mg / 5 g	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	B-P-Dyad (1x10 ⁻²)	9,9%	252 (±79)
SE-19-1	333	666 mg PHD	2,5	10 mg / 5 g	Pd-TNP (1x10 ⁻³)	Y-Perylen (1x10 ⁻²)	18,9%	240 (±72)
SE-18-5	333	666 mg PHD	2,5	10 mg / 5 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	----	19,1%	233 (±31)
SE-18-6	333	666 mg PHD	2,5	10 mg / 5 g	----	Perylen (1x10 ⁻²)	18,5%	230 (±51)
SE-18-7	----	1000 mg PHD	5	20 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	----	218 (±47)
SE-22-3	333	666 mg PHD	2,5	10 mg / 5 g	----	----	18,8%	311 (±133)

Tabelle 8.5: Ansatzmengen und Analysenergebnisse der Kapseln der zweiten Generation mit PMMA als Polymerhülle.

Probe	Polymer [mg]	Hydrophobes Medium	CHCl ₃ [g]	Kontinuierliche Phase SDS / H ₂ O	Farbstoffe		Feststoffgehalt	D _i (± σ) [nm]
					Sensitizer c [mol·L ⁻¹]	Emitter [mol·L ⁻¹]		
SE-22-1	333	666 mg HD	2,5	10 mg / 5 g	----	----	18,6%	520 (±224)
SE-22-5	333	666 mg HD	5,0	10 mg / 5 g	----	----	18,1%	433 (±46)
SE-22-6	333	666 mg HD	2,5	10 mg / 10 g	----	----	9,6%	391 (±173)
SE-22-8	500	500 mg HD	5,0	10 mg / 5 g	----	----	17,8%	505 (±196)
SE-22-11	150	300 mg HD	2,5	10 mg / 10 g	----	----	4,8%	232 (±65)
SE-22-12	150	300 mg HD	2,5	10 mg / 10 g	----	----	5,1%	225 (±65)
SE-22-13	150	300 mg HD	2,5	10 mg / 10 g	----	----	4,7%	232 (±45)
SE-22-14	150	300 mg HD	2,5	10 mg / 10 g	----	----	5,4%	225 (±47)
SE-22-17	150	300 mg HD	2,5	10 mg / 10 g	----	----	5,1%	228 (±61)
SE-22-18	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	----	----	4,8%	227 (±30)
SE-22-20	100	350 mg HD	2,5	10 mg / 10 g	----	----	5,2%	216 (±50)
SE-26-03	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	5,0%	223 (±51)
SE-26-04	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	5,4%	236 (±70)
SE-26-13	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	Bodipy (1x10 ⁻²)	4,9%	225 (±54)
SE-26-06	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	Pd-TNP (1x10 ⁻³)	Y-Perylen (1x10 ⁻²)	5,5%	238 (±56)
SE-26-8	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	Pd-TBP (1x10 ⁻³)	----	5,6%	233 (±54)
SE-26-9	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	----	Bodipy (1x10 ⁻²)	4,9%	232 (±60)
SE-26-10	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	----	Perylen (1x10 ⁻²)	5,3%	234 (±72)
SE-26-11	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	----	----	4,8%	228 (±50)

Anhang

Probe	Polymer [mg]	Hydrophobes Medium	CHCl ₃ [g]	Kontinuierliche Phase SDS / H ₂ O	Farbstoffe		Feststoffgehalt	d _i (± σ) [nm]
					Sensitizer <i>c</i> [mol·L ⁻¹]	Emitter <i>c</i> [mol·L ⁻¹]		
SE-28-01	150	300 mg Olivenöl	2,5	10 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	5,1%	216 (±60)
SE-28-02	150	300 mg Miglyol	2,5	10 mg / 10 g	Pd-OEP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	4,8%	210 (±62)
SE-29-01	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	Pd-TNP (1x10 ⁻⁴)	Y-Perylen (1x10 ⁻³)	5,2%	219 (±55)
SE-29-02	150	300 mg Miglyol	2,5	10 mg / 10 g	Pd-TNP (1x10 ⁻⁴)	Y-Perylen (1x10 ⁻³)	5,0%	208 (±47)
SE-25-1	333	666 mg PHD	2,5	10 mg / 5 g	Pd-TBP 1x10 ⁻³	Perylen / Bodipy 5x10 ⁻³ / 5x10 ⁻³	18,9%	431(±264)
SE-25-2	333	666 mg PHD	2,5	10 mg / 5 g	Pd-TBP 1x10 ⁻³	Perylen / Bodipy 6,6x10 ⁻³ / 3,3x10 ⁻³	18,3%	458 (±122)
SE-25-8	150	300 mg PHD	2,5	10 mg / 10 g	Pd-TBP 1x10 ⁻³	Perylen / Bodipy 8,3x10 ⁻³ / 1,6x10 ⁻³	5,6%	208 (±47)

Tabelle 8.6: Ansatzmengen und Analysenergebnisse der Kapseln der dritten Generation mit anorganischem, tetraedrisch verknüpftem SiO₂ als Polymerhülle.

Probe	TEOS [g]	Hydrophobes Medium	Kontinuierliche Phase CTMA-Cl / H ₂ O	Farbstoffe		Feststoffgehalt	d _i (± σ) [nm]
				Sensitizer <i>c</i> [mol·L ⁻¹]	Emitter <i>c</i> [mol·L ⁻¹]		
Si-57	1,3	500 mg PHD	5,75 mg / 7,5 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	9,5%	216 (±58)
Si-52	1,3	500 mg PHD	5,75 mg / 7,5 g	Pd-TBP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	8,3%	216 (±33)
Si-53	1,3	500 mg PHD	5,75 mg / 7,5 g	Pd-TBP (1x10 ⁻⁴)	Bodipy (1x10 ⁻³)	10,0%	220 (±87)
Si-54	1,3	500 mg PHD	5,75 mg / 7,5 g	Pd-TNP (1x10 ⁻⁴)	Y-Perylen (1x10 ⁻³)	9,5%	198 (±49)
Si-55	1,3	500 mg Miglyol	5,75 mg / 7,5 g	Pd-OEP (1x10 ⁻³)	Perylen (1x10 ⁻²)	9,8%	232 (±97)
Si-49	1,3	500 mg Miglyol	5,75 mg / 7,5 g	Pd-TBP (1x10 ⁻⁴)	Perylen (1x10 ⁻³)	8,4%	230 (±91)
Si-50	1,3	500 mg Miglyol	5,75 mg / 7,5 g	Pd-TBP (1x10 ⁻⁴)	Bodipy (1x10 ⁻³)	9,6%	227 (±91)
Si-51	1,3	500 mg Miglyol	5,75 mg / 7,5 g	Pd-TNP (1x10 ⁻⁴)	Y-Perylen (1x10 ⁻³)	8,8%	229 (±105)

8.3 Lebenslauf

- Aus datenschutzrechtlichen Gründen gelöscht -

8.4 Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

1. Christian Wohnhaas, Andrey Turshatov, Volker Mailänder, Steffen Lorenz, Stanislav Balushev, Tzenka Miteva, Katharina Landfester
Annihilation Upconversion in Cells by Embedding the Dye System in Polymeric Nanocapsules
Macromolecular Bioscience 2011, 772–778
2. Johannes Fickert, Christian Wohnhaas, Andrey Turshatov, Katharina Landfester, Daniel Crespy
Copolymer Nanocapsules for Self-Healing Materials
Macromolecules
3. Christian Wohnhaas, Andrey Turshatov, Volker Mailänder, Melanie Dröge, Stanislav Balushev, Tzenka Miteva and Katharina Landfester
Triplet-Triplet Annihilation Upconversion in Living Cells: Bioimaging
Eingereicht September 2012
4. Filippo Marsico, Christian Wohnhaas, Frederik Wurm, Stanislav Balushev, Katharina Landfester, Andrey Turshatov
Toward Oxygen Independent Triplet Triplet Annihilation Upconversion
In Vorbereitung
5. Christian Wohnhaas, Dmitry Busko, Mikhail Filatov, Yuri. Avlasevich, Daniel Crespy, Stanislav Balushev, Katharina Landfester, Andrey Turshatov
Nanocapsules with Silica Dioxide Shell for Triplet Triplet Annihilation Upconversion
In Vorbereitung
6. Christian Wohnhaas, Kathrin Friedman, Stanislav Balushev, Katharina Landfester, Daniel Crespy, Andrey Turshatov
Upconversional nanofibers: Triplet Triplet Annihilation Upconversion in nanostructured environment
In Vorbereitung

Vorträge

Christian Wohnhaas, Andrey Turshatov, Volker Mailänder, Melanie Dröge, Stanislav Balushev, Tzenka Miteva and Katharina Landfester

Triplet-triplet-annihilation upconversion compatible nanocapsules for biological applications

ACS-Meeting (Materials for Health and Medicine) 19-23. August 2012, Philadelphia, USA

Christian Wohnhaas, Andrey Turshatov, Stanislav Balushev, Katharina Landfester.

Aufkonversion in Nanokapseln

BASF, Ludwigshafen, Deutschland

Poster

Christian Wohnhaas, A. Turshatov, V. Mailänder, S. Lorenz, S. Balushev, T. Miteva and K. Landfester.

Polymeric nanocapsules for annihilation upconversion of light: synthesis, properties and perspectives in bio applications.

BioPIC 2010, Dublin, Irland.

Christian Wohnhaas, A. Turshatov, V. Mailänder, S. Lorenz, S. Balushev, T. Miteva and K. Landfester

Polymeric nanocapsules for annihilation upconversion of photon energy: synthesis, properties and perspectives in bio applications

Postertag MPIP 2010, Mainz, Deutschland

Danksagung

- Aus datenschutzrechtlichen Gründen gelöscht -

Erklärung

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2010 bis Dezember 2012 im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere von Prof. Dr. Katharina Landfester am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz erstellt.

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Mainz, den

Wohnhaas Christian